

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Aleš Ďuriš

SEPARACE IGG GLYKOPEPTIDŮ POMOCÍ HYDROFILNÍ
INTERAKČNÍ/IONTOVĚ VÝMĚNNÉ KAPALINOVÉ
CHROMATOGRAFIE

IgG glycopeptides separation using hydrophilic
interaction/ion-exchange liquid chromatography

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.
Konzultanti: RNDr. Tomáš Ječmen, Ph.D.; Mgr. Katarína Molnárová

Praha 2021

Prohlášení

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

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

V Praze dne 10. června 2021.

Abstrakt

Glykoproteomika je náročným odvětvím proteomiky, a to zejména kvůli mikro- a makroheterogenitě proteinové glykosylace. Hydrofilní interakční kapalinovou chromatografií (HILIC) lze využít pro separaci glykopeptidů před jejich identifikací pomocí hmotnostní spektrometrie. Jedná se o výhodnou alternativu ke kapalinové chromatografii na reverzní fázi, která se pro tento typ separace běžně využívá. V současnosti existuje řada komerčně dostupných HILIC kolon lišících se v chemické struktuře stacionární fáze. Zároveň však není publikován dostatek srovnávacích studií, na základě kterých by bylo možné vybrat adekvátní stacionární fázi pro různé glykoproteomické aplikace. V této diplomové práci byly porovnávány tři HILIC kolony od výrobce Advanced Chromatography Technologies (ACE): kolona HILIC-A se silikagelovou stacionární fází, kolona HILIC-N s polyhydroxylovou stacionární fází na bázi silikagelu a kolona HILIC-B s aminopropylovou stacionární fází na bázi silikagelu. Zároveň bylo provedeno srovnání těchto kolon s oktadecylovou reverzní stacionární fází. Kolony HILIC-A a HILIC-B jsou schopny pracovat ve smíšeném retenčním módu, který kombinuje hydrofilní a iontově výměnné interakce. Dle očekávání, reverzní fáze odseparovala klastry glykopeptidů imunoglobulinu G1 a imunoglobulinu G2, které se lišily v sekvenci aminokyselin, nicméně nebyla schopna adekvátně separovat glykoformy se stejným peptidem. Všechny ACE HILIC kolony dosáhly vyšší separace glykoform, různé skupiny glykopeptidů však byly jednotlivými kolonami separovány s různou účinností. Kolony HILIC-A a HILIC-N navíc separovaly izobarické formy A2G1F1 glykopeptidů a poukázaly tak na potenciál pro identifikaci struktur izomerických glykoform. V neposlední řadě byl na základě naměřených chromatografických parametrů diskutován možný retenční mechanismus uplatňující se při využití HILIC stacionárních fází.

Klíčová slova: Glykoproteomika, Glykopeptidy, Multimodální chromatografie, Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie, Imunoglobulin G

Abstract

Glycoproteomics is a challenging branch of proteomics because of the micro- and macro-heterogeneity of protein glycosylation. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is an advantageous alternative to reversed-phase chromatography for intact glycopeptide separation prior to their identification by mass spectrometry. Nowadays, several HILIC columns differing in used chemistries are commercially available. However, there is a lack of comparative studies assessing their performance, and thus providing guidance for the selection of an adequate stationary phase for different glycoproteomics applications. Here, we compare three HILIC columns recently developed by Advanced Chromatography Technologies (ACE) with unfunctionalized (HILIC-A), polyhydroxy functionalized (HILIC-N), and aminopropyl functionalized (HILIC-B) silica with a C18 reversed phase column in the separation of human immunoglobulin G glycopeptides. HILIC-A and HILIC-B exhibit mixed-mode separation combining hydrophilic and ion-exchange interactions for analyte retention. Expectably, reversed-phase mode successfully separated clusters of immunoglobulin G1 and immunoglobulin G2 glycopeptides, which differ in amino acid sequence, but was not able to adequately separate different glycoforms of the same peptide. All ACE HILIC columns showed higher separation power for different glycoforms, and we show that each column separates a different group of glycopeptides more effectively than the others. Moreover, HILIC-A and HILIC-N columns separated the isobaric A2G1F1 glycopeptides of immunoglobulin G, and thus showed the potential for the elucidation of the structure of isomeric glycoforms. Furthermore, the possible retention mechanism for the HILIC columns is discussed on the basis of the determined chromatographic parameters.

Keywords: Glycoproteomics, Glycopeptides, Mixed-mode chromatography, Hydrophilic interaction liquid chromatography, Immunoglobulin G

Poděkování

Chtěl bych velmi poděkovat svému školiteli RNDr. Petru Kozlíkovi, PhD., za odborné vedení mé diplomové práce, ochotu a trpělivost. Zároveň bych chtěl poděkovat RNDr. Tomáši Ječmenovi, PhD., za konzultace biochemických témat souvisejících s mojí prací a Mgr. Kataríně Molnárové za pomoc při experimentálních měřeních. Velké poděkování patří také mým kolegům z Katedry biochemie PřF UK, kteří mi umožnili a výrazně usnadnili vykonávání studijních povinností při zaměstnání.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat Grantové agentuře České republiky za finanční podporu (projekt číslo 19-18005Y).

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	8
1. ÚVOD	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Struktura a biosyntéza glykoproteinů	11
2.1.1 N-glykoproteiny	11
2.1.2 O-glykoproteiny	14
2.2 Imunoglobulin G	15
2.2.1 Charakterizace imunoglobulinu G	15
2.2.2 Imunoglobulin G v klinické analýze a farmacii	17
2.3 Metody analýzy glykoproteinů	18
2.3.1 Analytické postupy v glykoproteomice	18
2.3.2 Hmotnostní detekce	19
2.3.3 Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí	21
2.4 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie	22
2.4.1 Charakterizace metody	22
2.4.2 Stacionární fáze v HILIC	23
2.4.3 Mobilní fáze v HILIC	25
2.4.4 Aplikace HILIC v glykoproteomice	25
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1 Instrumentální vybavení	27
3.2 Seznam chemikálií	27
3.3 Příprava vzorku	28
3.4 Chromatografie na reverzní fázi	29
3.5 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie	30
3.6 Zpracování výsledků	30

4. VÝSLEDKY A DISKUZE	32
4.1 Identifikace glykopeptidů	32
4.2 Chromatografie na reverzní fázi	38
4.3 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie	39
4.4 Porovnání testovaných stacionárních fází	45
4.5 Využití pufrované mobilní fáze	48
5. ZÁVĚR	49
6. CITOVANÁ LITERATURA	51

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

<i>a</i>	šířka vzestupné části chromatografického píku v 10 % výšky [min]
<i>b</i>	šířka sestupné části chromatografického píku v 10 % výšky [min]
<i>A_s</i>	asymetrický faktor píku
Asn	aminokyselina asparagin
AU	arbitrární jednotka
CID	fragmentace v kolizní cele
C18	oktadecylová stacionární fáze
ECD	disociace záchytem elektronu
ESI	ionizace elektrosprejem
ETD	disociace přenosem elektronu
Fab	fragment protilátky vázající antigen
Fc	fragment protilátky vázající se na receptor
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
Fuc	fukosa
Gal	galaktosa
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
GlcNAc	N-acetylglukosamin
Hex	hexosa
HexNAc	N-acetylhexosamin
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HILIC-A	kolona obsahující silikagelovou stacionární fázi
HILIC-B	kolona obsahující aminopropylovou stacionární fázi na bázi silikagelu
HILIC-N	kolona obsahující polyhydroxylovou stacionární fázi na bázi silikagelu
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IEC	iontově-výměnná chromatografie
Int.	intenzita [AU]
IgG	imunoglobulin G
kDa	kilodalton
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LTQ	lineární iontová past kombinovaná s kvadrupólem
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace

Man	mannosa
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
m/z	poměr hmotnosti ku náboji
nanoLC	nanokapalinová chromatografie
NeuAc	N-acetylneuraminová kyselina
PGC	kapalinová chromatografie na porézním grafitizovaném uhlíku
qTOF	průletový hmotnostní analyzátor s předřazeným kvadrupólem
R	rozlišení mezi chromatografickými píky analytů
RA	revmatoidní artritida
RP	reverzní fáze
Ser	aminokyselina serin
Sia	sialová kyselina (N-acetylneuraminová kyselina)
SPE	extrakce na pevné fázi
Thr	aminokyselina threonin
TOF	průletový hmotnostní analyzátor
t_R	retenční čas [min]
UPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie
w	šířka chromatografického píku při základně [min]

1. ÚVOD

Analýza směsi glykopeptidů pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí představuje jednu z hlavních metod charakterizace proteinové glykosylace. Díky rostoucí popularitě využití monoklonálních protilátek na bázi glykoproteinů a zvyšujícímu se množství studií, které uvádějí změny v glykosylaci proteinů do kontextu se závažnými onemocněními, rostou požadavky na kvalitu glykoproteomických analýz. Hojně využívanou metodu v analýze směsi glykopeptidů představuje kapalinová chromatografie na reverzní fázi ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí. Její největší výhody spočívají v rychlosti, robustnosti a citlivosti stanovení analytů. Chromatografie na reverzní fázi však vykazuje nízký potenciál pro vzájemnou separaci glykopeptidů v komplexních směsích. Vyšší selektivitu a potenciál pro separaci glykopeptidů vykazuje hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC), která se v dnešní době s výhodou využívá pro separaci polárních látek.

Cílem této diplomové práce bylo ukázat separační potenciál tří HILIC stacionárních fází od firmy ACE Technologies, které v rámci glykoproteomických analýz dosud nebyly použity. Jednalo se o stacionární fáze na bázi nemodifikovaného silikagelu, silikagelu modifikovaného polyhydroxylovými řetězci a silikagelu modifikovaného aminopropylovými skupinami. Analyzovaným vzorkem byla směs glykopeptidů připravená tryptickým štěpením standardu lidského imunoglobulinu G.

2. TEORETICKÁ ČÁST

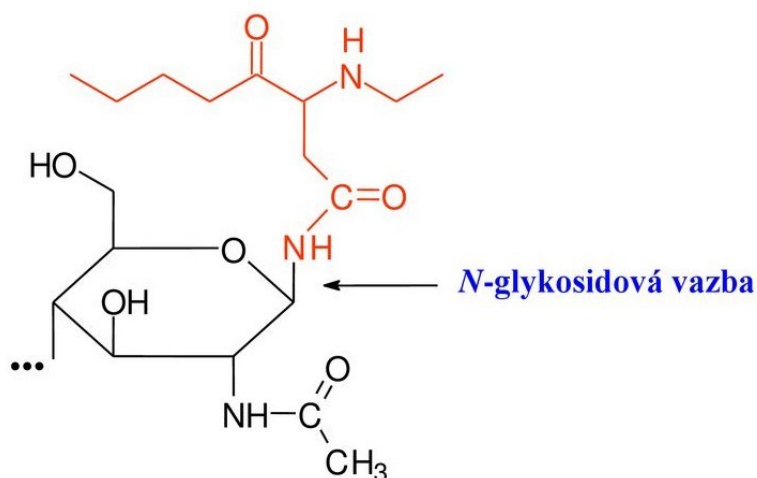
2.1 Struktura a biosyntéza glykoproteinů

Glykosylace je jednou z nejvýznamnějších post-translačních modifikací proteinů. Konjugované proteiny, obsahující kromě aminokyselin i kovalentně vázané oligosacharidové řetězce (glykany), nazýváme glykoproteiny. Tyto látky zprostředkovávají v živých organismech celou řadu důležitých funkcí (strukturní, transportní, ochranné, imunitní aj.)¹.

Glykoproteiny se vyznačují výraznou mikro a makroheterogenitou, což značně komplikuje jejich analýzu ve složitějších vzorcích². Glykany připojené na stejné glykosylační místo se mohou lišit svojí strukturou, a to jak skladbou monosacharidových jednotek, tak i povahou vazeb mezi nimi. Zároveň platí, že každé glykosylační místo nemusí být nutně glykosylované. Rozlišujeme dva hlavní typy glykosylace, a to N-glykosylaci a O-glykosylaci³.

2.1.1 N-glykoproteiny

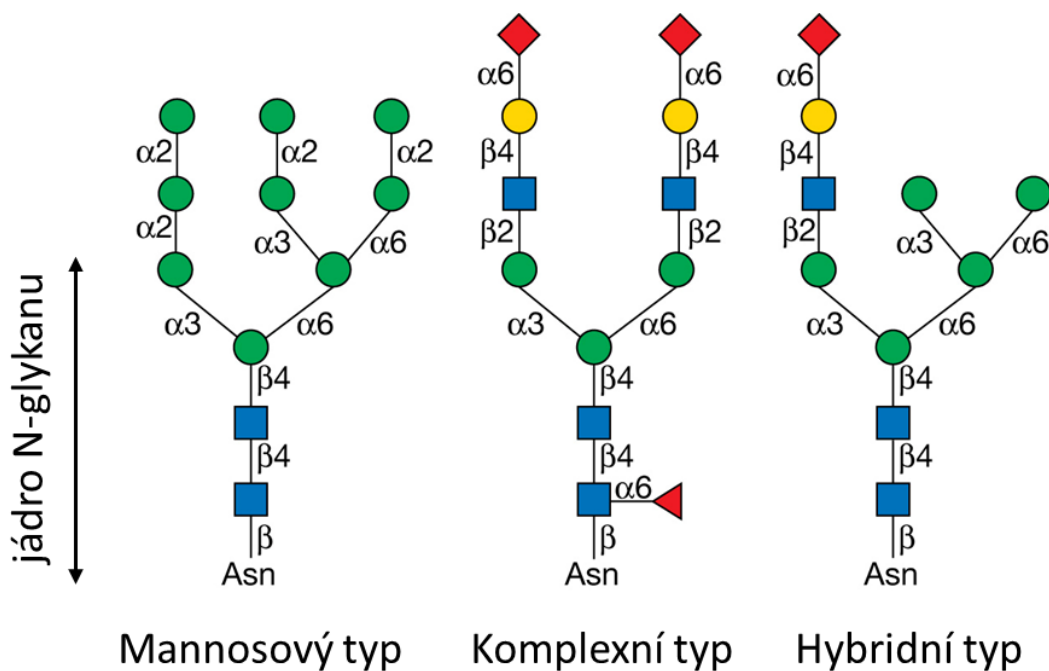
V případě N-glykosylace se oligosacharidové řetězce vážou na postranní řetězec asparaginu (Asn) pomocí N-glykosidové vazby (Obr. 2.1). Stavební bloky složitých glykanových řetězců představuje pět základních monosacharidových jednotek: D-mannosa (Man), D-galaktosa (Gal), L-fukosa (Fuc), N-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc) a N-acetylneuraminová (sialová) kyselina (Sia). U eukaryotických organismů se N-glykany k proteinu připojují přes vazbu GlcNAc β 1–Asn³.



Obr. 2.1: N-glykosidová vazba mezi asparaginem a GlcNAc (převzato z cit. ⁴).

Aby mohlo dojít ke glykosylaci, musí být asparagin součástí sekvence Asn-X-Ser/Thr, kde X představuje jakoukoliv aminokyselinu kromě prolinu. Aminokyselina na pozici X může mít vliv na efektivitu glykosylace – například přítomnost aminokyselin s kyselými postranními řetězci (kyselina asparagová, kyselina glutamová) snižuje efektivitu glykosylace³. Asparagin ve zmíněné sekvenci označujeme jako potenciální glykosylační místo. Díky restrikcím způsobeným například konformací molekuly nemusí během syntézy glykoproteinu v daném místě ke glykosylaci vždy dojít.

Všechny N-glykany eukaryotických organismů obsahují společnou sekvenci sacharidů, označovanou jako jádro glykanu. Jádro je na jedné straně pomocí N-acetylglukosaminu vázáno na postranní řetězec asparaginu a na druhé straně z něj vycházejí ramena, která vykazují rozličné strukturní motivy. Na základě povahy těchto ramen rozlišujeme tři hlavní typy N-glykanů (Obr. 2.2).



Obr. 2.2: Hlavní typy N-glykanů. Legenda: modrý čtverec – GlcNAc, zelené kolečko – Man, žluté kolečko – Gal, červený trojúhelník – Fuc, červený kosočtverec – Sia (převzato z cit. ³).

Prvním druhem řetězců jsou glykany mannosového typu. V tomto případě z jádra vycházejí ramena, která jsou tvořena pouze residui mannosy. Z α -3 mannosy jádra vychází jedno rameno, na α -6 mannose dochází k větvení na dvě ramena. Na Obr. 2.2 je znázorněn mannosový glykan, obsahující 9 Man residuí. V průběhu modifikace

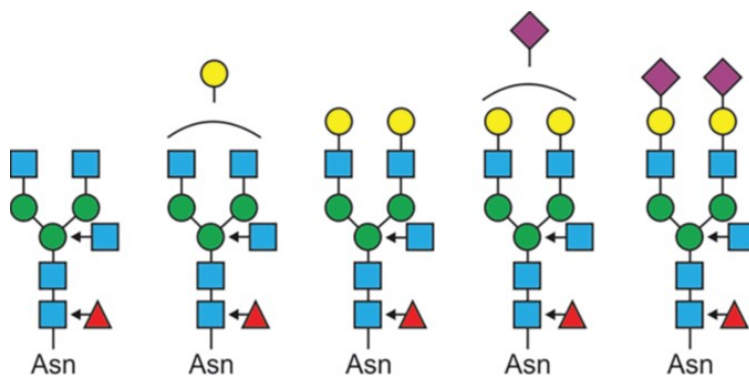
glykanového prekurzoru v rámci syntézy glykoproteínu (viz dále) může dojít k odštěpení dalších Man jednotek. Mannosové glykany jsou zpravidla tvořeny dvěma GlcNAc residui a 5-9 mannosovými residui³.

Druhým typem jsou komplexní glykany, u nichž z jádra vycházejí ramena tvořená N-acetylglukosaminem a galaktosou. Sekvence GlcNAc-Gal se může v rámci jednoho ramene i několikrát opakovat. Ramena bývají zakončena kyselinou N-acetylneuraminovou. Na Obr. 2.2 je zobrazený komplexní glykan se dvěma rameny. Na obou mannosách (α -3 a α -6) glykanového jádra může docházet k větvení. Na každou mannosu mohou být navázána až tři GlcNAc residua, která iniciují ramena komplexního typu³.

Posledním typem jsou hybridní glykany, které jsou kombinací předchozích dvou typů. Na α -3 mannosu glykanového jádra se váže GlcNAc, z něhož vychází rameno komplexního typu, zatímco α -6 mannosu je rozšířena pouze pomocí mannosových residuí.

Jádro glykanu může být modifikováno pomocí dvou různých monosacharidových jednotek. Glykany komplexního a hybridního typu mohou na β -mannose jádra nést tzv. bisektující GlcNAc⁵. Druhým monosacharidem je fukosa, která se může vázat na první GlcNAc jádra (tvořící vazbu s asparaginem). Fukosa se zároveň u komplexních a hybridních typů glykanu může vázat i na GlcNAc v rameni glykanu⁶.

U IgG se nejčastěji vyskytují dvouramenné komplexní glykany s různou úrovní fukosylace, sializace a výskytu bisektujícího GlcNAc (Obr. 2.3). Fukosa se u IgG váže převážně na jádro glykanu⁷.



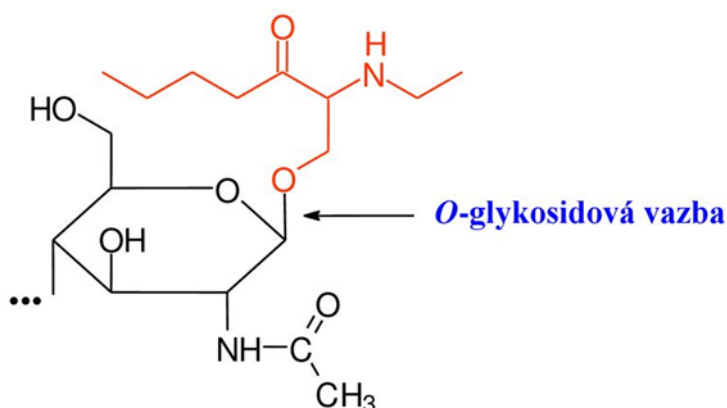
Obr. 2.3: Typická struktura glykanů IgG. Každá z uvedených forem může a nemusí obsahovat fukosu a bisektující GlcNAc. Legenda: modrý čtverec – GlcNAc, zelené kolečko – Man, žluté kolečko – Gal, červený trojúhelník – Fuc, fialový kosočtverec – Sia (převzato z cit. 7).

N-Glykoproteiny jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu a v Golgiho aparátu B-lymfocytů. Po syntéze, transportu a navázání oligosacharidového prekurzoru $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ na protein dochází ve vnitřní části endoplazmatického retikula a v pozdější fázi i v Golgiho aparátu k enzymatické modifikaci tohoto prekurzoru za vzniku různých typů glykanových struktur³.

2.1.2 O-glykoproteiny

Mnoho glykoproteinů nese glykany, které jsou připojeny přes atom kyslíku k hydroxyly serinových či threoninových postranních řetězců (Obr. 2.4). Tyto glykany, které se k aminokyselinám připojují O-glykosidovou vazbou přes N-acetylgalaktosamin, nazýváme O-glykany. Mezi typické monosacharidové jednotky, které se nacházejí v oligosacharidových řetězcích O-glykanů patří N-acetylgalaktosamin (GalNAc), galaktosa (Gal), N-acetylglukosamin (GlcNAc), fukosa (Fuc) a kyselina N-acetylneuraminová (Sia)³.

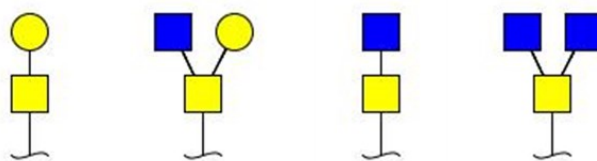
Jednu z nejhojněji O-glykosylovaných tříd glykoproteinů představují muciny. Tyto glykoproteiny jsou u živočichů produkovány epitelovou tkání a ve velkých koncentracích se nacházejí na sliznicích trávicího, močopohlavního i dýchacího ústrojí. Jejich funkcí je především ochrana epitelové tkáně proti fyzickému a chemickému poškození a proti infekcím⁸. Jelikož O-glykany vykazují hydrofilní charakter a často bývají negativně nabitě, jsou schopny vázat vodu a soli a tím přispívat k vysoké viskozitě hlenu vytvářeného muciny⁹.



Obr. 2.4: O-glykosidová vazba mezi serinem a GalNAc (převzato z cit. ⁴).

Na rozdíl od N-glykanů rozlišujeme u O-glykanů celkem čtyři základní typy jader (Obr. 2.5). Na jádra O-glykanů bývají často navázána ramena skládající se z opakujícího se základního disacharidového bloku Gal β 1-3GlcNAc, případně Gal β 1-4GlcNAc. Tyto řetězce vytvářejí páteř, na kterou se vážou další monosacharidy, popřípadě funkční skupiny. Ramena bývají zakončena rozličnými cukernými jednotkami (Fuc, Sia, Gal, GalNAc, GlcNAc), nebo sulfátovými skupinami³.

O-glykosylace proteinů probíhá v Golgiho aparátu. Podobně jako v případě N-glykosylace se jedná o složitý proces, zahrnující řadu enzymatických reakcí, pomocí nichž dochází k postupné výstavbě a modifikacím glykanového řetězce³.



Obr. 2.5: Základní typy jader O-glykanů. Legenda: žlutý čtverec – GalNAc, modrý čtverec – GlcNAc, žluté kolečko – Gal.

2.2 Imunoglobulin G

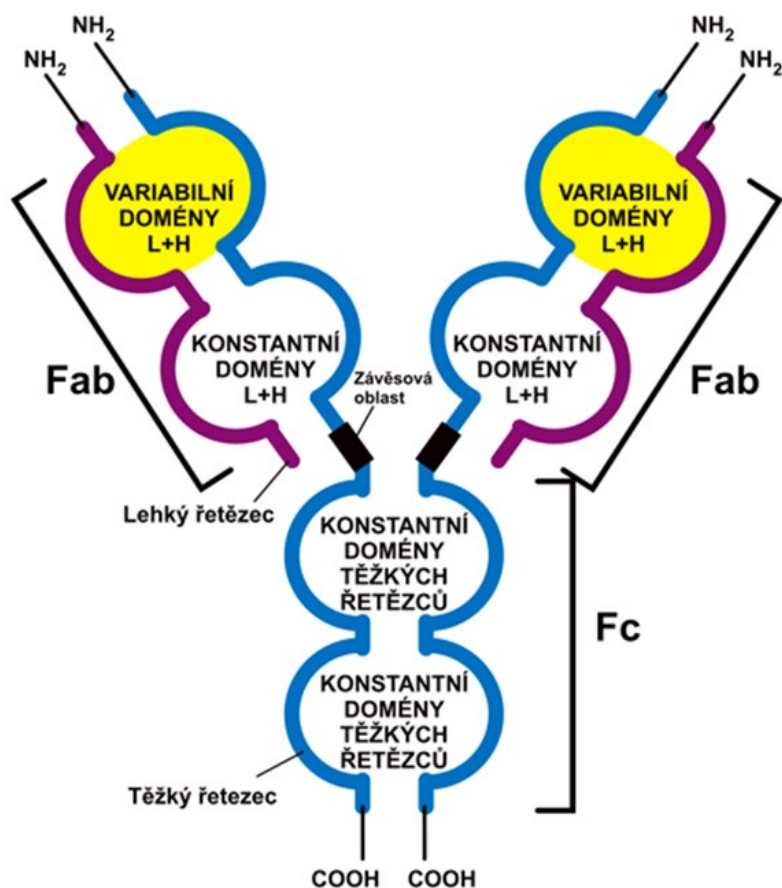
2.2.1 Charakterizace imunoglobulinu G

Imunoglobulin G (IgG) je glykoproteinem krevního séra a tkáňového moku savců. Jedná se o nejpočetněji zastoupenou třídu mezi sérovými imunoglobuliny, tvoří jednu z hlavních součástí humorální složky imunitní odpovědi¹⁰.

IgG tvoří velké molekuly tvarem připomínající písmeno Y (Obr. 2.6) s hmotností přibližně 150 kDa. Každá molekula obsahuje dvojici těžkých polypeptidových řetězců o molekulové hmotnosti přibližně 50 kDa a dvojici lehkých řetězců (cca 25 kDa). Těžké řetězce jsou vzájemně propojeny disulfidickými můstky. Zároveň je ke každému těžkému řetězci připojen lehký řetězec, a to pomocí nekovalentních interakcí a disulfidických můstků. Každý řetězec se skládá z několika rozdílných kompaktně složených proteinových struktur tvořených zhruba 110 aminokyselinami, které se nazývají proteinové domény. Lehké řetězce se skládají z jedné variabilní a jedné konstantní domény, těžké řetězce sestávají z jedné variabilní a tří konstantních domén. Složení aminokyselinové sekvence ve variabilních doménách se mění v závislosti na buňce, která

protilátky vyprodukovala, zatímco aminokyseliny konstantních domén zůstávají pro stejné podtřídy protilátek neměnné. U lidského IgG rozlišujeme čtyři podtřídy, které jsou pojmenované v pořadí podle jejich klesající relativní četnosti: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4¹¹.

Zmíněné domény se spojují za vzniku větších, kulovitých domén. Výsledná struktura obsahuje tři velké kulovité domény, které jsou v závěsové oblasti vzájemně spojeny flexibilním polypeptidovým řetězcem. Tato molekula může být proteolyticky (pomocí enzymu papainu) rozštěpena na tři fragmenty. Dva identické fragmenty zodpovídají za vazbu na antigen a nazývají se Fab fragmenty (z angl. Fragment antigen binding). Třetí fragment neinteraguje s antigenem. Díky schopnosti snadno krystalizovat je nazýván Fc fragmentem (z angl. Fragment crystallizable). Tato část molekuly interaguje s Fc receptory efektorových molekul a buněk¹⁰.



Obr. 2.6: Struktura molekuly imunoglobulinu G (převzato z cit. ¹²).

Ve druhé konstantní doméně těžkého řetězce na asparaginu 297 se nachází glykosylační místo, obsahující kovalentně vázaný N-glykan. Tento glykan je uzavřen mezi dvěma konstantními doménami těžkých řetězců. Jeho struktura má vliv na konformaci Fc regionu, a tudíž i na interakci s Fc receptory a celkovou funkci protilátky⁷.

2.2.2 Imunoglobulin G v klinické analýze a farmacii

Studium glykosylace imunoglobulinu G v souvislosti s onemocněními bylo zahájeno v 70. letech minulého století¹³. Od té doby se výzkum zaměřující se na glykosylaci IgG dostal do popředí akademického zájmu imunologických a biomedicínálních oborů, a to zejména díky rostoucí popularitě využití léčiv na bázi protilátek v moderní medicíně.

Významným milníkem ve studiu glykosylace IgG byla studie Thomase Rademachera, která spojila změny v glykosylaci IgG s revmatoidní artritidou (RA) a osteoartritidou¹⁴. Bylo zjištěno, že relativní četnost určitých druhů glykanů se ve vzorcích od pacientů trpících RA liší od kontrolních vzorků zdravých jedinců. Byl zaznamenán pokles relativní četnosti glykoforem obsahujících terminální galaktosu a sialovou kyselinu a zároveň nárůst glykoforem zakončených N-acetylglukosaminem. Tato data položila základ dnes uznávanému názoru, že pokles v galaktosylaci IgG souvisí se zánětlivými onemocněními. Další studie RA poukázaly na zvýšený výskyt hybridních a mannosových glykanů¹⁵ a také na snížení aktivity galaktosyltransferas v B-lymfocytech pacientů¹⁶. Za zmínku stojí také studie, které poukazují na zvýšenou fukosylaci glykoforem u jedinců s RA¹⁷.

Kromě RA byl pokles v galaktosylaci glykoforem IgG asociován také s dalšími chronickými zánětlivými a autoimunitními onemocněními, a to například s Crohnovou chorobou a se systémovým lupus erythematoses¹⁸. Stejný trend se projevuje také u různých druhů rakoviny, například u rakoviny prostaty¹⁹.

Velký průlom na poli výzkumu glykosylace IgG nastal v roce 2006, kdy bylo zjištěno, že přítomnost terminálních α 2,6-sialových kyselin vykazuje výrazný protizánětlivý účinek při intravenózní IgG terapii revmatoidní artritidy²⁰. Od té doby byly publikovány výsledky řady výzkumů, které poukazují na klíčovou roli α 2,6-sializace v protizánětlivých funkcích IgG.

IgG se v posledních dvou dekadách uplatňuje při produkci léčiv na bázi monoklonálních protilátek. Monoklonální protilátky se vyrábí na základě hybridomové teorie, kterou v roce 1975 publikovali Köhler a Milstein²¹. Princip spočívá v izolaci

buněk schopných produkovat protilátky ze sleziny myši, které byly naočkovány specifickými antigeny. Tyto buňky jsou poté spojeny s rychle se množícími nádorovými buňkami za vzniku hybridomů²² (nesmrtelná buněčná linie), které jsou dále klonovány. Dceřiné buňky pak kontinuálně produkují protilátky proti specifickému antigenu. V konečné fázi dochází ke chimerizaci, případně humanizaci protilátek pomocí genetického inženýrství a rekombinantních technologií, a to z toho důvodu, že myší protilátky mohou v lidském organismu vyvolávat silné imunitní reakce²³.

Glykosylace IgG v monoklonálních protilátkách vykazuje značnou heterogenitu. Přítomny jsou všechny typy N-glykanů (komplexní, hybridní, mannosové). Komplexní a hybridní glykany jsou fukosylované i afukosylované. Glykany většinou neobsahují více než dvě ramena a sializace je v porovnání s ostatními glykoproteiny nižší²⁴.

2.3 Metody analýzy glykoproteinů

2.3.1 Analytické postupy v glykoproteomice

Studium glykosylace proteinů je zatíženo řadou komplikací, které kladou velké nároky na instrumentální techniku a experimentální postupy. Koncentrace glykoproteinů v biologických vzorcích bývá často velmi nízká, je proto zapotřebí používat citlivé metody s nízkými limity detekce a kvantifikace²⁵.

Do popředí analytických technik používaných v glykoproteomice se v posledních letech dostala hmotnostní spektrometrie (MS). Mezi její největší výhody patří citlivost a rychlost analýzy, a hlavně schopnost poskytovat detailní informace o struktuře glykoforem². V analýze glykoproteinů se nejčastěji uplatňuje tzv. „bottom-up“ přístup, v rámci kterého rozlišujeme dva rozdílné experimentální postupy.

Prvním z nich je uvolnění glykanů z glykoproteinů enzymatickými nebo chemickými procesy. Směs proteinů a sacharidů je poté přečištěna a analyzována. Typickými enzymy používanými pro odštěpení N-glykanů jsou N-glykanasy, například PNGasa F (cit. ²⁶). Uvolnění O-glykanů probíhá nejčastěji chemickými postupy, jako je například β -eliminace²⁷. Pro zefektivnění MS analýzy bývají cukry často derivatizovány, využívá se zejména permethylace²⁸. Deglykosylované proteiny jsou štěpeny endoproteasou (trypsin) a získané peptidy jsou analyzovány pomocí MS. Tímto postupem jsme schopni určit strukturu glykanů a sekvenci aminokyselin proteinu, zároveň ale často ztrácíme informaci o charakteru glykosylace ve specifických glykosylačních místech³.

Alternativním postupem je studium glykosylace na úrovni glykopeptidů. Enzymatickým štěpením glykoproteinů určitou peptidázou získáme směs glykosylovaných peptidů, kterou poté podrobíme analýze pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie, často ve spojení s kapalinovou chromatografií²⁹. Získáme informaci o struktuře glykanu a zároveň i peptidu, na který je glykan navázán. Na základě peptidové sekvence jsme pak schopni určit, ve kterém glykosylačním místě proteinu se identifikovaný glykan nacházel.

Studium glykosylace na úrovni glykopeptidů je v komplexních vzorcích značně komplikované. Po štěpení endoproteasami bývají koncentrace glykopeptidů v porovnání s peptidy výrazně nižší. Signály glykopeptidů bývají oproti neglykosylovaným peptidům nižší, v přítomnosti peptidů může dokonce docházet k potlačení signálu glykopeptidů³⁰. Z tohoto důvodu jsou při analýze komplexních směsí uplatňovány nejrůznější techniky nabohacení glykopeptidů před vlastní LC-MS analýzou. Běžně využívanou metodou nabohacení je lektinová afinitní chromatografie, využívající specifických interakcí mezi lektiny a sacharidovými řetězci glykopeptidů³¹. Extrakce na pevné fázi (SPE) s oktadecylovou stacionární fází se často využívá k odsolení a přečištění vzorku po enzymatickém štěpení. Glykopeptidy obsahující sialové kyseliny nesoucí záporný náboj lze prekoncentrovat s využitím iontové výměnné chromatografie³². Jelikož N-glykany významně přispívají k velikosti glykosylovaného peptidu, lze k jejich oddělení od neglykosylovaných peptidů použít gelovou permeační chromatografii³³. Efektivní metodou pro prekoncentraci glykopeptidů je také hydrofilní interakční chromatografie. Mezi její největší výhody patří schopnost separace polárních analytů, kompatibilita s běžně užívanými mobilními fázemi a ortogonalita ke chromatografii na reverzní fází. V neposlední řadě lze k nabohacení glykopeptidů použít chemické metody, spočívající v tvorbě kovalentní vazby mezi glykopeptidy a funkcionalizovanými pevnými nosiči. Popsány jsou metody na bázi chemie hydrazidů³⁴, či kyseliny boronové³⁵.

2.3.2 Hmotnostní detekce

V glykoproteomice a klinické analýze glykoproteinů se nejčastěji využívá pět typů hmotnostních analyzátorů: iontová past, kvadrupólový detektor, průletový detektor (TOF), Orbitrap a iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR). Používají se měkké ionizační techniky, a to ionizace elektrosprejem (ESI) a maticí asistovaná laserová desorpce/ionizace (MALDI)². Ionizační proces neposkytuje dostatečné množství energie k tomu, aby došlo k fragmentaci molekul, a proto se

v glykoproteomice uplatňuje tandemová hmotnostní detekce. Hybridní hmotnostní spektrometry, zejména v kombinaci s kapalinovou chromatografií zefektivňují identifikaci glykoforem, neboť kombinují výhody jednotlivých analyzátorů a ve spojení s různými fragmentačními technikami poskytují důležité informace o struktuře analytů³⁶.

MALDI ionizace se často provádí v experimentálním uspořádání MALDI-TOF/TOF. Tohoto zapojení bylo využito například při mapování změn v glykosylace sérových proteinů v raných stádiích rakoviny žaludku³⁷. Populární kombinace hmotnostních spektrometrů využívající ESI ionizaci jsou zejména lineární iontová past ve spojení s kvadrupólem LTQ (cit. ³⁸), dále pak qTOF (cit. ³⁹), kombinující kvadrupólový analyzátor s průletovým analyzátozem, LTQ-Orbitrap, skládající se z lineární iontové pasti následované spektrometrem typu Orbitrap⁴⁰, případně trojitý kvadrupól⁴¹.

Nejběžněji využívanou metodou fragmentace v tandemové MS je fragmentace v kolizní cele (CID, z angl. „collision-induced dissociation“). V prvním analyzátoru dochází k výběru iontů, které jsou akcelerovány elektrickým polem a následně se v kolizní cele srážejí s molekulami inertního kolizního plynu (helium, argon nebo dusík). Při srážce dochází k rozpadu prekurzorů na fragmenty, které jsou analyzovány druhým analyzátozem. Iontová past umožňuje fragmentaci a následnou analýzu fragmentů v rámci jediného zařízení, v porovnání s ostatními spektrometry ale vykazuje nižší citlivost, rozlišení a rozsah m/z . Při CID fragmentaci glykopeptidového prekurzoru dochází k rozsáhlé fragmentaci oligosacharidového řetězce. Ve spektru pozorujeme charakteristické oxoniové ionty, odpovídající fragmentům odštěpených monosacharidových residuí, o m/z 163 [Hex + H]⁺, m/z 204 [HexNAc + H]⁺, m/z 292 [NeuAc + H]⁺ a m/z 366 [Hex-HexNAc + H]⁺ (cit. ⁴²). Dále pozorujeme signály částečně fragmentovaného glykopeptidu s posuny odpovídajícími charakteristickým ztrátám monosacharidových jednotek glykanového řetězce.

Mezi další metody fragmentace, které se využívají v glykoproteomice, patří disociace záchytem elektronu (ECD) a disociace přenosem elektronu (ETD). Těchto způsobů fragmentace se používá zejména ve FT-ICR hmotnostní spektrometrii. Dochází při nich k fragmentaci peptidové kostry, oligosacharidový řetězec není fragmentován a zůstává připojen k peptidovým fragmentům. Tento způsob fragmentace poskytuje informaci o peptidové sekvenci a o glykosylačních místech².

2.3.3 Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí

Standardně používanou separační metodou v LC-MS glykopeptidů je chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC). Využívá nepolární stacionární fáze, nejčastěji oktadecylové (C18), jako mobilní fáze slouží polární směs vody a organického rozpouštědla (acetonitril, methanol)⁴³. Výhodou je vysoká citlivost, reprodukovatelnost výsledků, rychlost analýzy a dobrá dostupnost stacionárních fází.

Velmi vysokou citlivost vykazuje technika nanokapalinové chromatografie (nanoLC), která využívá kolony s velmi malým průměrem (75 μm). Při průtocích řádově ve stovkách nl/min je koncentrace vzorku (typický nástřik 1 μl) na koloně vysoká, analýza vykazuje velkou citlivost. NanoLC se využívá při kvantitativních glykoproteomických analýzách⁴⁴.

Separace glykopeptidů na C18 kolonách je řízena především fyzikálně-chemickými vlastnostmi peptidové části. Hlavními faktory, které mají vliv na afinitu k reverzní stacionární fázi jsou délka a hydrofobicita peptidové kostry, glykanová část glykopeptidu má na retenční vlastnosti analytu výrazně nižší vliv⁴⁵. S rostoucím počtem hexos a GlcNAc residuí klesá retenční čas, a to díky rostoucí polaritě glykopeptidu. Přítomnost sialové kyseliny naopak retenci zvyšuje, a to z toho důvodu, že nese záporný náboj, který kompenzuje pozitivní náboj vznikající protonizací aminokyselin peptidové kostry, a tím zvyšuje afinitu glykopeptidu k reverzní fázi⁴⁶. Retenční čas glykopeptidů snižuje také fukosylace a prodloužení ramen pomocí N-acetyllaktosaminových (Gal-GlcNAc) jednotek⁴⁷.

Glykoformy s identickou peptidovou částí jsou na reverzní fázi nedostatečně separovány, eluují v úzkých klastrech. Další nevýhodou je neschopnost reverzní fáze rozlišit jednotlivé izoformy glykopeptidů⁴⁵. Z tohoto důvodu se v posledních letech v glykoproteomice začaly uplatňovat alternativní metody separace, jako například chromatografie na stacionární fázi z porézního grafitizovaného uhlíku (PGC) a hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC).

Stacionární fáze v PGC je tvořena kulovitými částicemi s vysokou porozitou (až 75 %). Na molekulární úrovni jsou částice tvořeny rovinnými vrstvami hexagonálně uspořádaných atomů uhlíku vzájemně propojených konjugovaným systémem vazeb⁴⁸. PGC se vyznačuje unikátními retenčními charakteristikami. Interakce s nepolárními analyty je při použití vodně-organických rozpouštědel srovnatelná s alkylovanými silikagelovými stacionárními fázemi používanými v reverzní kapalinové chromatografii. Se zvyšující se hydrofobicitou analytu narůstá i jeho retenční čas vlivem snahy

rozpouštědla vytěsnit analyt z roztoku. Druhým faktorem, který má vliv na retenci je interakce polarizovatelných a polarizovaných funkčních skupin analytu s grafitem. Síla této interakce závisí na velikosti plochy molekuly, která je v kontaktu s grafitem a na povaze funkčních skupin v místě interakce. Čím je molekula analytu planárnější, tím dochází k lepšímu kontaktu s plochou grafitové vrstvy, což vede k nárůstu počtu interakčních míst a prodloužení retence. Mechanismus interakce dosud není zcela objasněn, ukazuje se ale, že se zvyšující se polaritou analytu roste i jeho retenční čas. Díky vlivu tvaru molekuly na interakci s grafitem lze pomocí PGC separovat izomery⁴⁸. PGC byla úspěšně aplikována v glykoproteomických analýzách při separaci izoformem N-glykosylovaných peptidů⁴⁹.

HILIC je efektivní chromatografickou metodou pro separaci polárních analytů, které jsou nedostatečně zadržovány na reverzní fázi. Výhodou této metody je schopnost separace izoformem glykopeptidů⁵⁰.

2.4 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

2.4.1 Charakterizace metody

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie představuje chromatografickou metodu pro separaci polárních analytů, která využívá polární stacionární fáze a vodně-organické mobilní fáze. Jako organická složka mobilní fáze bývá nejčastěji používán acetonitril, obsah vodné složky se obvykle pohybuje mezi 5-40 % (cit. ⁵¹).

Mechanismus retence v hydrofilní interakční chromatografii dodnes zůstává i přes značné množství studií ne zcela objasněn. Všeobecně akceptovaná teorie pracuje s představou, že na povrchu polární stacionární fáze dochází k částečné imobilizaci vrstvy vody z mobilní fáze. Tato vodná vrstva vykazuje koncentrační gradient, s nejvyšší koncentrací vody u povrchu stacionární fáze a postupným snižováním koncentrace s rostoucí vzdáleností od povrchu. Retence je způsobena rozdělováním analytu mezi imobilizovanou vodnou vrstvou a mobilní fází⁵². Retence je přímo úměrná polaritě analytů, polaritě stacionární fáze a nepřímo úměrná polaritě mobilní fáze.

V závislosti na typu stacionární fáze, povaze analytu a složení mobilní fáze se při retenci v HILIC uplatňují také slabé vazebné interakce. Jedná se o elektrostatické interakce s funkčními skupinami na povrchu stacionární fáze a vodíkové vazby mezi analytem a vodnou vrstvou či funkčními skupinami stacionární fáze⁵³.

HILIC lze s výhodou využít k separaci a analýze polárních látek. Pokrývá tedy oblast analytů, které jsou obtížně analyzovatelné pomocí všeobecně využívané chromatografie na reverzní fázi⁵⁴. HILIC rovněž vykazuje ortogonalitu k RP-HPLC, tyto dvě metody lze spojit pro analýzu komplexních vzorků⁵⁵.

2.4.2 Stacionární fáze v HILIC

V hydrofilní interakční chromatografii jsou využívány polární stacionární fáze, které jsou schopny na svém povrchu adsorbovat vodnou vrstvu. Nejčastěji využívané materiály jsou na bázi silikagelu, který může být modifikovaný různými funkčními skupinami. Mezi základní typy stacionárních fází využívaných v HILIC řadíme nemodifikovaný silikagel, chemicky vázané neutrální polární funkční skupiny, vázané nabitě funkční skupiny schopné iontové výměny a zwitterionické stacionární fáze⁵¹.

Silikagelová stacionární fáze na svém povrchu obsahuje volné polární silanolové skupiny. Volbou vhodného výrobního procesu lze ovlivnit množství silanolových skupin na povrchu stacionární fáze a bránit kontaminaci kovovými nečistotami. Stacionární fáze dodávané různými výrobci se mohou lišit v čistotě a poskytovat rozdíly v retenci, účinnosti a tvaru chromatografických píků⁵¹. Retence na silikagelové stacionární fázi je ovlivněna rozdělováním analytu mezi vodnou vrstvu a mobilní fázi, adsorpcí na povrch stacionární fáze a elektrostatickými interakcemi⁵⁶. Při vyšším pH dochází k disociaci silanolových skupin a zvýšení vlivu elektrostatických interakcí na retenci. Pozitivně nabitě analyty jsou silně zadržovány, naopak negativně nabitě analyty vykazují nižší retenci díky elektrostatickému odpuzování. Kolony naplněné plně porézními silikagelovými částicemi s průměrem nižším než 2 μm umožňují rychlou a účinnou HILIC separaci silně a středně polárních analytů. Výhoda silikagelu oproti chemicky vázaným fázím spočívá v tom, že nedochází k postupnému poklesu separační účinnosti vlivem ztrát navázaných ligandů, které mohou navíc vykazovat nežádoucí signály v hmotnostním spektru⁵⁷. Nevýhodou je, že píky některých analytů (např. sacharidů) mohou chvostovat, případně může docházet k ireverzibilní adsorpci na povrch silikagelu⁵⁸.

Vázané fáze jsou zpravidla připravovány chemickou modifikací povrchu silikagelového nosiče. Mezi běžně používané HILIC stacionární fáze patří fáze s vázanými kyanoskupinami, diolovými skupinami, aminoskupinami, cyklodextriny, pentafluorofenylpropyly, polyethylenglykoly, či alkyly s vázanými amidovými skupinami⁵¹.

Aminopropylové fáze obsahující primární aminoskupinu jsou hojně využívány při separacích sacharidů, peptidů, karboxylových kyselin, nukleosidů a některých léčiv. Tyto fáze vykazují zvýšenou afinitu ke kyselým analytům, což je způsobeno příspěvkem iontově výměnných interakcí k retenci. Retence se snižuje se zvyšující se iontovou silou mobilní fáze⁵⁹. Mezi nevýhody aminopropylových fází patří dlouhá ekvilibrace v případě použití některých pufrů, ireverzibilní adsorpce a samovolná ztráta navázaných ligandů, spojená s kontaminací hmotnostních spekter⁵¹. Reaktivní primární aminy mohou tvořit Schiffovy báze s aldehydy a komplikovat tak analýzu sacharidů⁶⁰.

Diolové stacionární fáze obvykle obsahují neutrální 2,3-dihydroxypropylové ligandy. Tyto fáze vykazují vysokou polaritu a ochotu tvořit vodíkové vazby. Neobsahují ionizovatelné skupiny, nezreagované silanoly bývají blokovány, čímž je zamezeno ireverzibilní adsorpci polárních analytů. Diolové stacionární fáze byly kdysi využívány pro separaci proteinů⁶¹, dnes se využívají pro analýzu nízkomolekulárních fenolických látek⁶². Vyrábí se také stacionární fáze, obsahující dlouhé alkylové řetězce zakončené diolovými OH skupinami. Tyto stacionární fáze lze využívat v duálním módu RP/HILIC v závislosti na obsahu organické složky v mobilní fázi⁶³. Nevýhodou je uvolňování vázaných skupin v kyselých podmínkách.

Zwitterionické fáze měly původně sloužit jako stacionární fáze pro iontově výměnnou chromatografii, nicméně jejich vlastností lze s výhodou využít pro chromatografii v módu HILIC. Typickým zástupcem je stacionární fáze tvořená sulfoalkylbetainovými skupinami na silikagelovém či polymerním nosiči. Aktivní vrstva stacionární fáze obsahuje silně kyselou sulfonovou skupinu a silně bazickou kvarterní ammoniovou skupinu, které jsou vzájemně odděleny krátkým alkylovým řetězcem⁶⁴. Tato stacionární fáze umožňuje současnou separaci záporně i kladně nabitých analytů. Nezreagované silanolové skupiny na povrchu nosiče jsou zneutralizovány asociací s opačně nabitými funkčními skupinami⁶⁵. Sulfoalkylbetainové skupiny silně adsorbují vodu a zároveň elektrostatickými interakcemi ovlivňují retenci nabitých analytů. Vzhledem k povaze funkčních skupin závisí účinnost separace na pH mobilní fáze. Zwitterionických stacionárních fází se využívá pro separaci malých polárních molekul, metabolitů, peptidů, glykopeptidů aj.⁵¹

2.4.3 Mobilní fáze v HILIC

Mobilní fáze používané v HILIC bývají vodně-organické, obvykle obsahují 5–40 % vody či pufru. Při MS detekci se používají těkavé pufrы, například mravenčan amonný či octan amonný.

Volba organické složky mobilní fáze má na retenci v HILIC významný vliv. Obecně platí, že eluční síla stoupá se stoupající polaritou rozpouštědla a schopností účastnit se donor/akceptorových protonových interakcí. Mezi rozpouštědla použitelná v HILIC patří methanol, ethanol, 2-propanol, tetrahydrofuran, acetonitril (seřazena podle klesající eluční síly)⁶⁶. Ve většině aplikací je preferovaným rozpouštědlem acetonitril, neboť ostatní rozpouštědla často neposkytují dostatečnou retenci a způsobují rozšíření a asymetrii chromatografických píkú⁵¹.

Vodná složka mobilní fáze bývá často pufována. Iontová síla a pH mají významný vliv na retenci a selektivitu separace ionizovatelných analytů. Retence na neionizovatelných polárních stacionárních fázích se obvykle zvyšuje se stoupající koncentrací solí v pufru. To je způsobeno zefektivněním tvorby vodíkových vazeb mezi analytem a stacionární fází vlivem nárůstu množství solvatovaných iontů v mobilní fázi. Vyšší iontová síla však může zhoršovat retenci na stacionárních fázích umožňujících iontově-výměnné interakce. Dochází totiž o soupeření iontů soli a nabitých analytu o elektrostaticky aktivní místa na stacionární fázi, solné ionty mohou vytěšňovat ionizované molekuly analytu ze stacionární fáze⁶⁷.

2.4.4 Aplikace HILIC v glykoproteomice

Retence glykopeptidů v HILIC je ovlivněna převážně strukturou oligosacharidového řetězce. S rostoucím množstvím monosacharidových jednotek se zvyšuje polarita molekuly analytu, což se projevuje růstem retenčního času⁶⁸. K retenci přispívá v menší míře také peptidová část glykopeptidu, retence roste s rostoucí polaritou peptidové kostry⁶⁹.

Největší výhoda HILIC pak spočívá ve schopnosti separovat při adekvátních experimentálních podmínkách izomery glykopeptidů, které nelze rozlišit pouze s použitím hmotnostní spektrometrie bez účinného separačního kroku. Byly již separovány izomery které se lišily v poloze fukosy na rameni či jádru glykanu a izomery monosializovaných glykopeptidů, u kterých byla sialová kyselina vázána na rozdílná ramena glykanu⁵⁰. Huang et al. využil HILIC pro separaci izomerů lišících se pouze α 2-3 a α 2-6 vazbami sialových kyselin⁷⁰.

Jelikož kvantitativní analýza a profilování glykosylace proteinů hraje důležitou roli v klinických výzkumech a farmaceutických procesech, je zapotřebí navrhnout účinnou a spolehlivou metodu analýzy těchto významných látek. HILIC vykazuje potenciál stát se mocnou komplementární metodou k běžně využívané chromatografii na reverzní fázi.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Instrumentální vybavení

- Kapalinový chromatograf Agilent UHPLC 1290 Infinity II s binárním čerpadlem (Agilent Technologies, Německo)
- Hmotnostní spektrometr Bruker maXis qTOF (Bruker, Německo) s elektrosprejovou ionizací
- Chromatografická kolona BEH C18 (Waters, USA) o rozměrech 2,1 x 100 mm, s velikostí částic 1,7 µm, obsahující reverzní oktadecylovou stacionární fázi
- Chromatografické HILIC kolony o rozměrech 2,1 x 100 mm, s velikostí částic 1,7 µm od firmy ACE Technologies (Velká Británie):
 - ACE HILIC-N: silikagel modifikovaný polyhydroxylovým řetězcem
 - ACE HILIC-A: nemodifikovaný silikagel
 - ACE HILIC-B: silikagel modifikovaný aminopropylovou skupinou
- SPE C18 kolonka Peptide MacroTrap (Michrom Bioresources, USA)
- Lyofilizátor Finn-Aqua Lyovac GT2-E (Steris, USA)
- Analytické váhy Entris 224I-1S (Sartorius, Německo)
- pH metr Jenway 3540 (Jenway, Velká Británie)
- Využitý software:
 - Bruker HyStar (Bruker, Německo) – ovládání měřicích přístrojů
 - Bruker Data Analysis (Bruker, Německo) – analýza hmotnostních spekter a chromatogramů
 - MS Excel (Microsoft, USA) – úprava exportovaných chromatogramů
 - GlycoWorkbench (EUROCarbDB initiative) – tvorba schematických struktur glykanů
 - Inkscape (Inkscape Project) – finální úpravy grafů před vložením do práce
 - Mendeley (Elsevier) – citační software

3.2 Seznam chemikálií

- standard lidského IgG (Sigma Aldrich, USA)
- dithiothreitol (čistota $\geq 99\%$, Sigma Aldrich, USA)

- jodoacetamid (čistota ≥ 99 %, Sigma Aldrich, USA)
- trypsin (Sigma Aldrich, USA)
- hydrogenuhličitan amonný (čistota pro LC-MS, Merck, Německo)
- acetonitril (čistota pro LC-MS, Honeywell, USA)
- voda (čistota pro LC-MS, Merck, USA)
- kyselina mravenčí (čistota pro LC-MS, Sigma Aldrich, USA)
- mravenčan amonný (čistota pro LC-MS, Sigma Aldrich, USA)
- kalibrační roztok pro MS (Agilent, USA)

3.3 Příprava vzorku

Směs glykopeptidů byla připravena tryptickým štěpením standardu lidského IgG. Standardní roztok o koncentraci 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ byl připraven rozpuštěním IgG v 50 mM hydrogenuhličitanu amonném. Ke 100 μl standardního roztoku bylo přidáno 11,1 μl 50 mM dithiothreitolu. Redukce disulfidických můstků probíhala při 60 °C po dobu 60 min. Následně bylo do roztoku přidáno 19,6 μl 100 mM jodoacetamidu. Alkylace zredukovaných cysteinů probíhala po dobu 30 min v temnu při laboratorní teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 15 μl 50 mM dithiothreitolu. Poté bylo do směsi přidáno 4,75 μl roztoku trypsinu o koncentraci 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (v poměru 1:40 w/w vzhledem k proteinové části IgG). Štěpení probíhalo přes noc při teplotě 37 °C.

Směs glykopeptidů byla poté přečištěna na SPE C18 kolonce. Vzorek byl okyselen kyselinou mravenčí (aby její koncentrace dosáhla 0,5 %). Kolonka byla kondicionována ve dvou krocích: propláchnutí 2 ml 80% acetonitrilu s 0,5 % kyseliny mravenčí a následně propláchnutí 2 ml 0,5% kyseliny mravenčí. Tento přípravný krok byl jedenkrát opakován. Poté byl na kolonku nanesen vzorek. Kolonka byla propláchnuta 1 ml 0,5% kyseliny mravenčí a následně byl vzorek eluován pomocí 2 ml 80% acetonitrilu s 0,5 % kyseliny mravenčí. Vzorek byl jímán do čtyř frakcí po 500 μl . Frakce byly poté spojeny a opětovně rozděleny do čtyř mikrozkušavek po 500 μl .

Rozpouštědlo bylo ze vzorku odstraněno lyofilizací. Lyofilizát byl poté uložen do mrazáku při teplotě -20 °C. Před měřením byl lyofilizovaný alikvot resuspendován ve 100 μl 50% acetonitrilu s 0,1 % kyseliny mravenčí.

3.4 Chromatografie na reverzní fázi

Vzorek byl v první fázi studie podroben chromatografické analýze na reverzní fázi za účelem identifikace glykopeptidů a výběru sady glykopeptidů, jejichž separace byla při dalších měřeních sledována.

Měření byla prováděna na přístroji Agilent UHPLC 1290 Infinity II, na koloně BEH C18 (1,7 μm ; 2,1 x 100 mm). Mobilní fázi tvořila voda (složka A) a acetonitril (složka B). Obě složky mobilní fáze obsahovaly 0,1 % kyseliny mravenčí. Byla použita gradientová eluce s gradientem RP (Tab. 3.1). Dávkovaný objem vzorku byl 2 μl , průtok mobilní fáze 0,250 ml/min, teplota kolony 40 $^{\circ}\text{C}$.

Detekce byla prováděna za pomoci hmotnostního spektrometru Bruker maXis qTOF s ionizací elektrosprejem. Detekce probíhala v režimu skenu, spektra byla měřena v rozsahu od 600 do 2500 m/z , s frekvencí 1 Hz. V rámci každého skenu byly pomocí CID fragmentovány tři nejintenzivnější prekurzory, s kolizní energií 35-70 eV. Napětí na kapiláře činilo 4000 V, tlak zmlžovacího plynu 1,5 bar, sušící plyn o teplotě 250 $^{\circ}\text{C}$ byl přiváděn s průtokem 8 l/min.

Tab. 3.1: Gradientové programy pro chromatografickou analýzu metodou RP-HPLC (RP) a metodou HILIC (H1-H3). Legenda: t – čas, $\varphi(\text{B})$ – procentuální obsah složky B (acetonitril).

RP		H1		H2		H3	
t [min]	$\varphi(\text{B})$ [%]	t [min]	$\varphi(\text{B})$ [%]	t [min]	$\varphi(\text{B})$ [%]	t [min]	$\varphi(\text{B})$ [%]
0	5	0	80	0	80	0	80
3	5	10	80	10	80	10	80
9	25	25	65	40	65	17,5	65
24	80	35	40	60	40	27	40
27	80	40	40	70	40	32	40
29	5	43	80	73	80	35	80
34	5	55	80	85	80	45	80

3.5 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

Retenční charakteristiky skupiny glykopeptidů v závislosti na vybraných parametrech měření byly studovány pomocí metody HILIC. Při měření byly využity tři kolony od firmy ACE Technologies o rozměrech 2,1 x 100 mm, s velikostí částic 1,7 μm. Kolona HILIC-A, obsahující stacionární fázi z nemodifikovaného silikagelu, HILIC-B, aminopropylová stacionární fáze a HILIC-N, polyhydroxylová stacionární fáze.

Měření probíhala s využitím mobilní fáze, jejíž vodnou složku A tvořila voda s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí a organickou složku B tvořil acetonitril s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí. Pro každou stacionární fázi byla provedena sada tří analýz s využitím gradientových programů H1-H3 (Tab. 3.1). Experimentální podmínky včetně detekce byly shodné s měřením na reverzní fázi, s výjimkou průtoku mobilní fáze, který činil 0,300 ml/min.

Ve druhé sadě měření byl využit 10 mM mravenčan amonný o pH 3,5 jako vodná složka mobilní fáze. Pufr byl připraven rozpuštěním navážené chemikálie ve vodě (v 80 % celkového objemu roztoku), titrováním kyselinou mravenčí do požadovaného pH 3,5 a doplněním na finální objem. Organickou složkou byl acetonitril s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí. Byl využit gradientový program H1 (Tab. 3.1). Experimentální podmínky byly shodné jako u předchozí sady měření. Měření bylo provedeno na stacionární fázi HILIC-N a HILIC-B.

Třetí sada měření byla měřena za stejných podmínek jako předchozí sada, ale s vyšší iontovou silou mobilní fáze. Jako vodná složka byl využit 50 mM mravenčan amonný o pH 3,5 (pufr byl připraven stejným způsobem), organickou složkou byl acetonitril s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí. Měření bylo provedeno na stacionární fázi HILIC-N a HILIC-B.

3.6 Zpracování výsledků

Z naměřených chromatogramů byly odečteny retenční časy analytů a šířky píků při základně. Byla vypočtena rozlišení mezi píky analytů podle rovnice:

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2} \quad (3.1)$$

kde t_R představuje retenční čas analytu a w šířku píku při základně.

Dále byly vypočteny asymetrické faktory píků analytu podle rovnice:

$$A_s = \frac{b}{a} \quad (3.2)$$

kde b představuje šířku sestupné části píku v 10 % výšky píku, a představuje šířku vzestupné části píku v 10 % výšky píku.

Parametry t_R , w , a , b byly odečteny ručně extrapolací z chromatogramů s přesností na 0,01 min pro měření na reverzní fázi a s přesností na 0,05 min pro měření na HILIC kolonách. Vzhledem k tomu, že píky u řady analýz nevykazovaly Gaussovský tvar, byla šířka píku odečítána metodou konstrukce tečen v inflexním bodě píku a následným odečtením vzdálenosti bodů, ve kterých dvojice tečen protněla časovou osu.

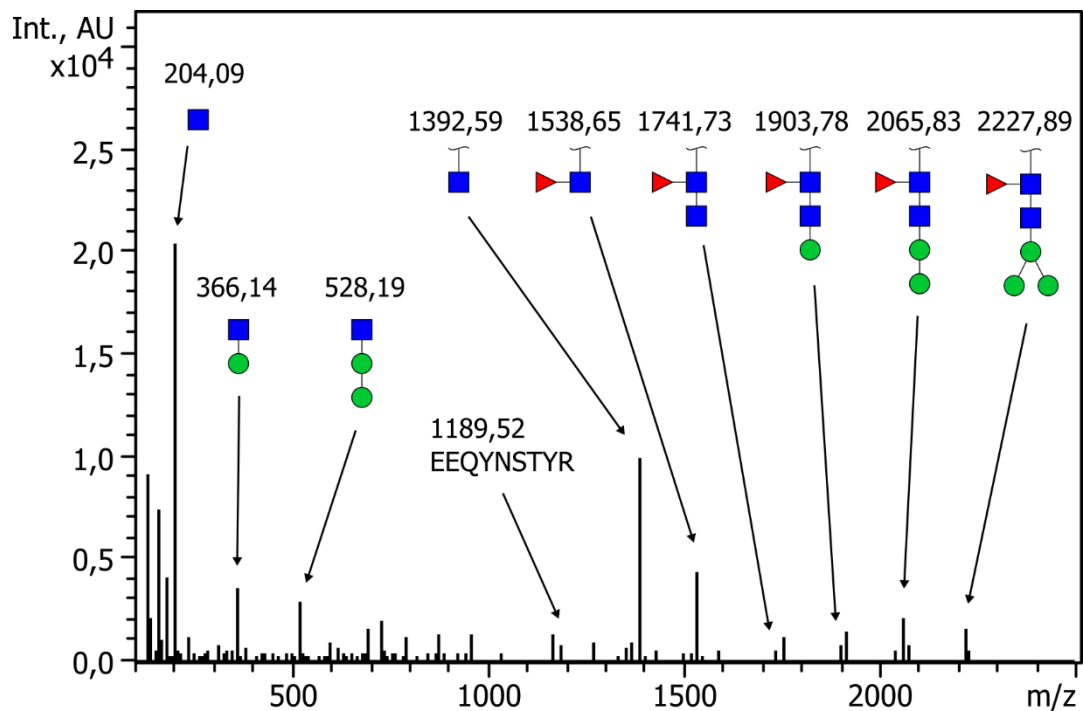
4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Identifikace glykopeptidů

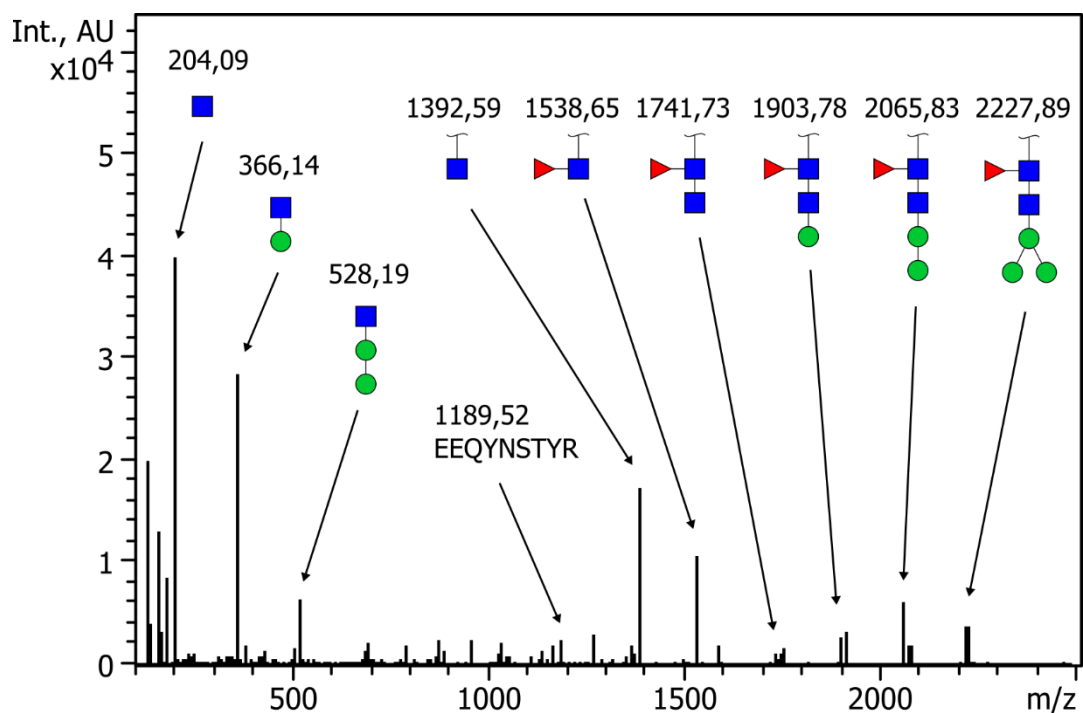
K identifikaci glykopeptidů byla využita experimentální data naměřená během chromatografické analýzy na reverzní fázi za podmínek popsanych v kapitole 3.4. Na základě literární rešerše bylo zjištěno, které glykopeptidy se v tryptických směsích lidského IgG běžně vyskytují. Následně byla vypočítána m/z těchto glykopeptidů v různých nábojových stavech. Pro vypočtená m/z byly extrahovány chromatogramy. Přítomnost glykopeptidu ve směsi byla ověřena rozborem fragmentačního spektra prekurzoru v píku extrahovaného chromatogramu.

Fragmentační spektrum glykopeptidu IgG1:A2F1 (glykan obsahuje čtyři GlcNAc residua, tři Man residua a jednu fukosu) je zobrazeno na Obr. 4.1. Jedná se o spektrum naměřené v čase 5,9 min, po fragmentaci prekurzoru s m/z 878,68 s kolizní energií 35-70 eV. Tato hodnota odpovídá m/z iontu identifikovaného glykopeptidu v nábojovém stavu 3+. Ve spektru pozorujeme oxoniové ionty $[\text{HexNAc} + \text{H}]^+$ při m/z 204,09, $[\text{Hex-HexNAc} + \text{H}]^+$ při m/z 366,14 a $[\text{Hex}_2\text{-HexNAc} + \text{H}]^+$ při m/z 528,19. Tyto ionty, odpovídající fragmentům odštěpených monosacharidových reziduí, jsou charakteristické pro spektra glykopeptidů. Dále pozorujeme signál odpovídající iontu peptidové páteře glykopeptidu $[\text{EEQYNSTYR} + \text{H}]^+$ při m/z 1189,52. Při vyšších m/z pozorujeme signály odpovídající iontům peptidové páteře s částí glykanového řetězce. Jedná se o ionty s m/z 1392,59; 1538,65; 1741,73; 1903,78; 2065,83 a 2227,89. Přičtením hmoty dvou GlcNAc reziduí ($M_r = 203,08$) k poslednímu identifikovanému signálu při m/z 2227,89 a odečtením hmoty protonu ($A_r = 1,008$) dostaneme hmotu 2633,04, která odpovídá relativní molekulové hmotnosti identifikovaného glykopeptidu. Analogickým způsobem byly identifikovány i ostatní glykopeptidy. Jejich spektra jsou zobrazena na Obr. 4.2-4.8.

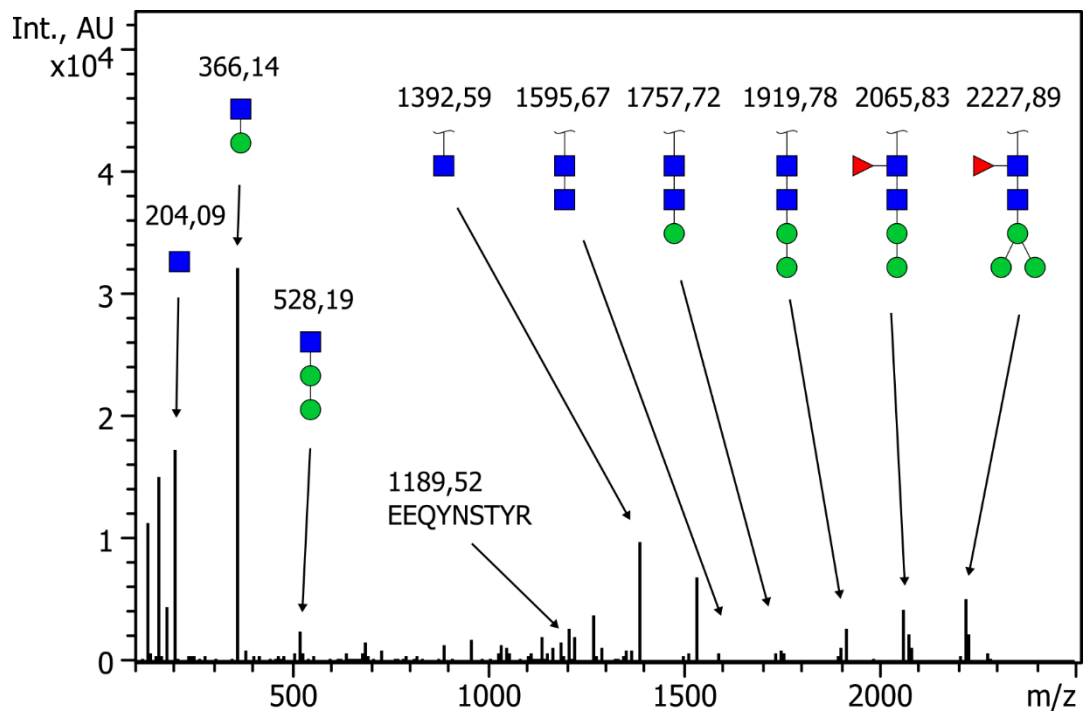
Identifikované glykopeptidy jsou popsány v Tab. 4.1 (str. 37). Jedná se o čtyři glykopeptidy podtřídy IgG1 a čtyři glykopeptidy podtřídy IgG2 s různými strukturami glykanových řetězců: A2F1, fukosylovaný dvojramenný glykan; A2G1F1, fukosylovaný dvojramenný glykan zakončený jednou galaktosou; A2G2F1, fukosylovaný dvojramenný glykan zakončený dvěma galaktosami; A2G2F1S1, fukosylovaný dvojramenný glykan se dvěma galaktosami a sialovou kyselinou.



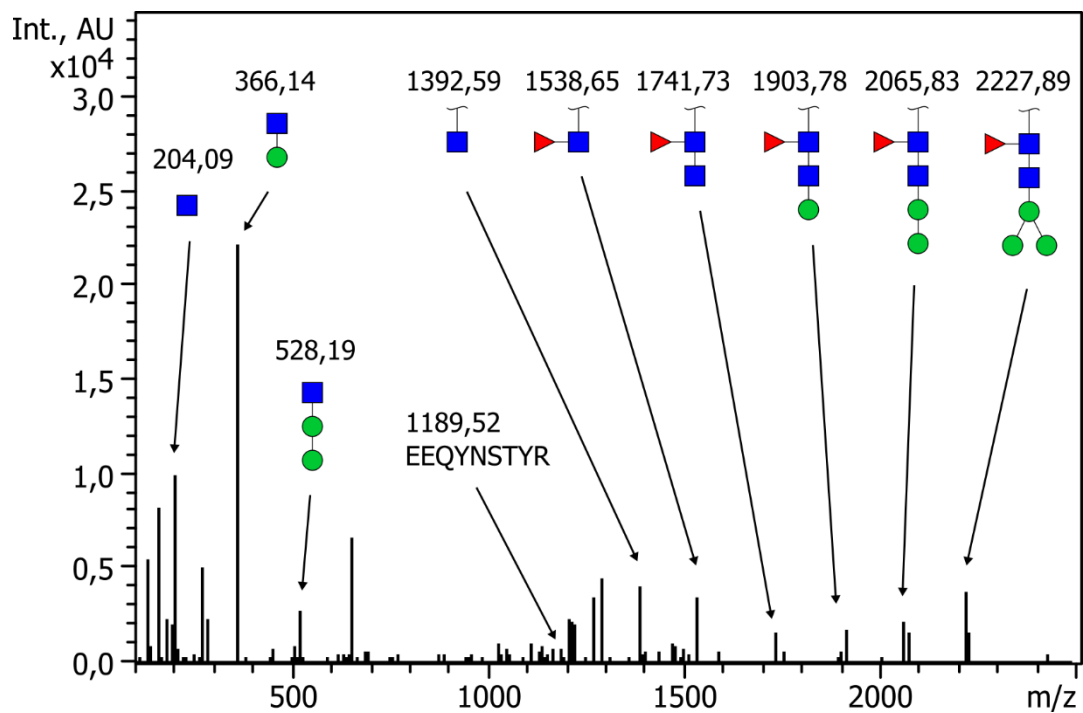
Obr. 4.1: Fragmentační spektrum glykopeptidu IgG1:A2F1. Fragmentován byl prekurzor v nábojovém stavu 3+ s m/z 878,68. Kolizní energie byla 35-70 eV.



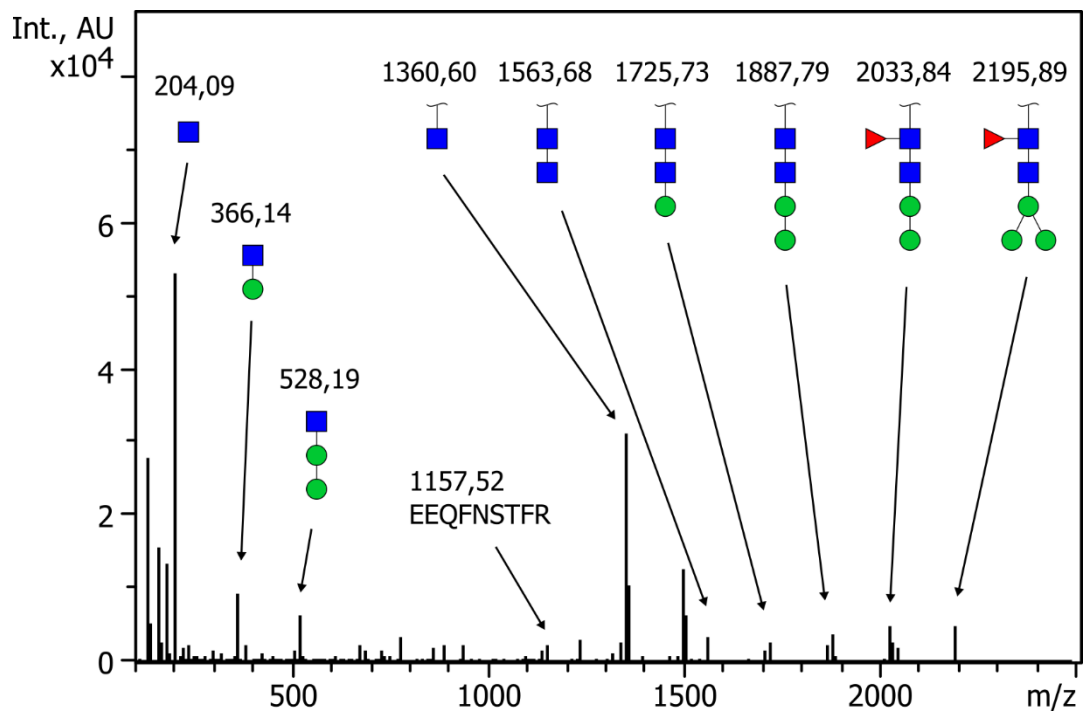
Obr. 4.2: Fragmentační spektrum glykopeptidu IgG1:A2G1F1. Fragmentován byl prekurzor v nábojovém stavu 3+ s m/z 932,70. Kolizní energie byla 35-70 eV.



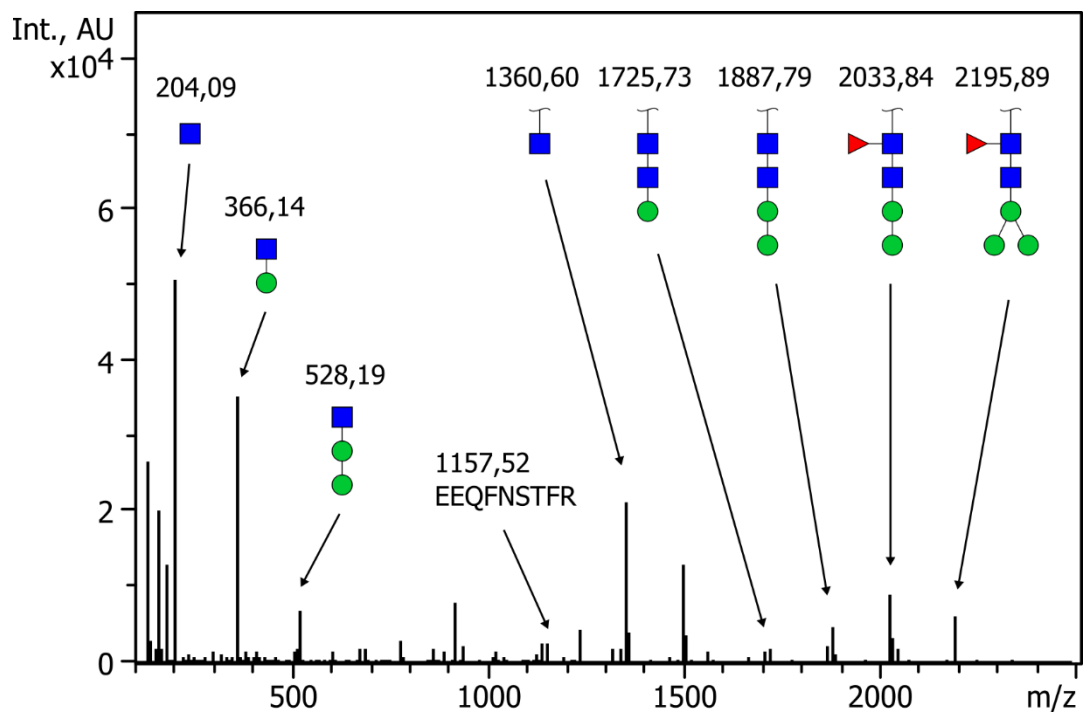
Obr. 4.3: Fragmentační spektrum glykopeptidu IgG1:A2G2F1. Fragmentován byl prekurzor v nábojovém stavu 3+ s m/z 986,72. Kolizní energie byla 35-70 eV.



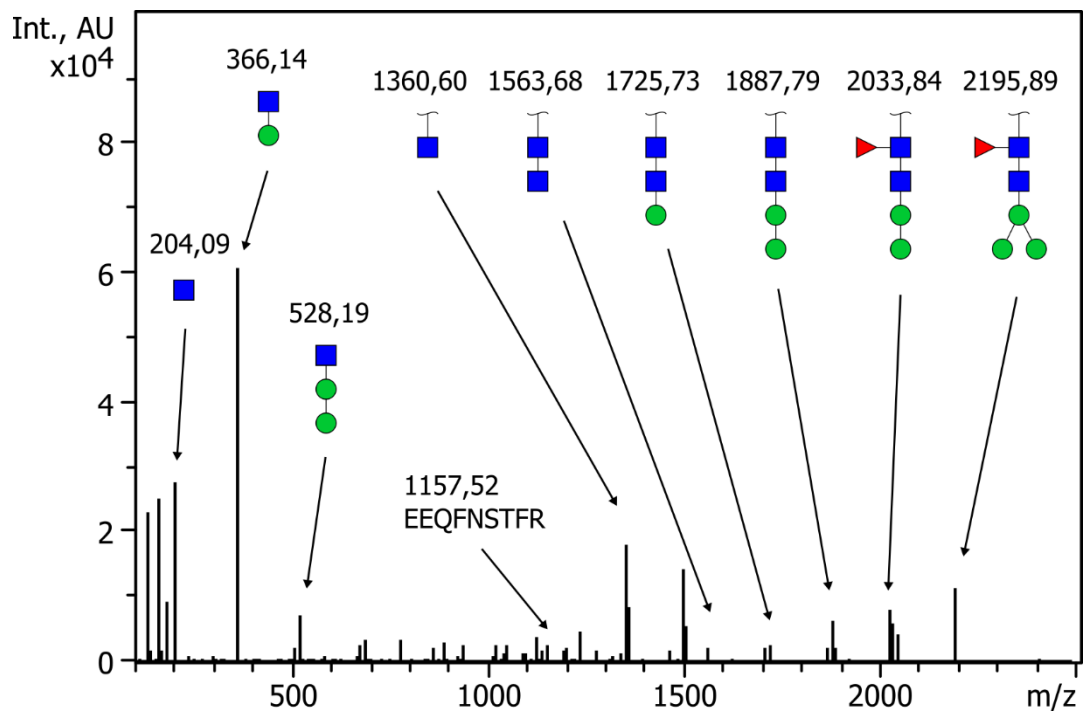
Obr. 4.4: Fragmentační spektrum glykopeptidu IgG1:A2G2F1S1. Fragmentován byl prekurzor v nábojovém stavu 3+ s m/z 1083,75. Kolizní energie byla 35-70 eV.



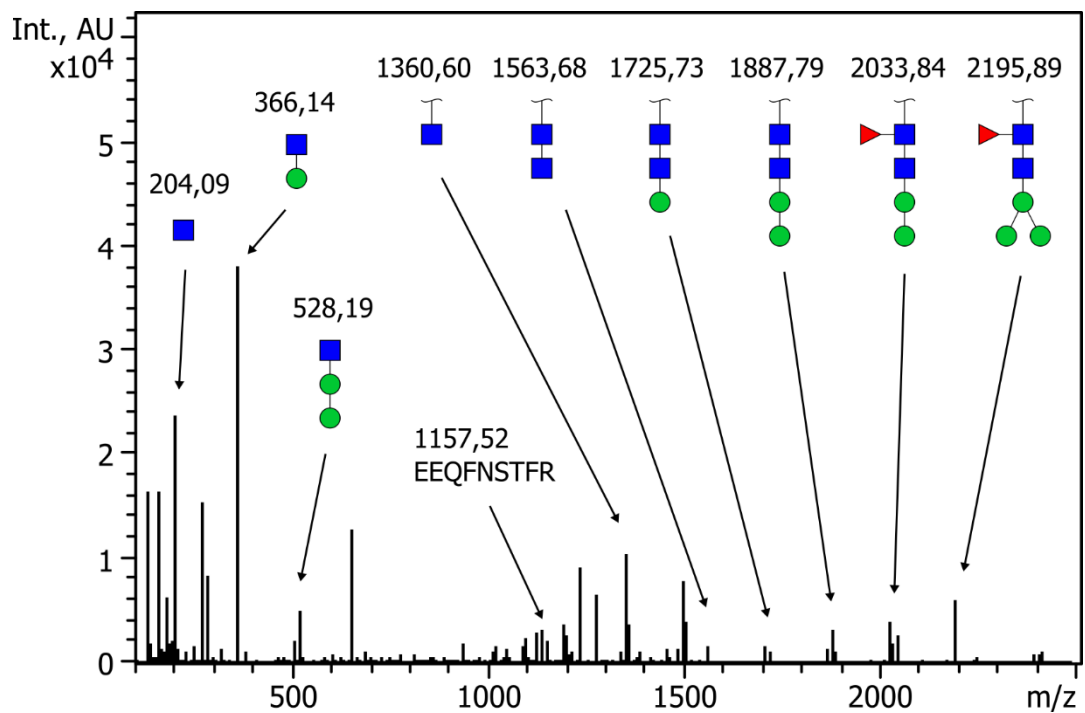
Obr. 4.5: Fragmentační spektrum glykopeptidu IgG2:A2F1. Fragmentován byl prekurzor v nábojovém stavu 3+ s m/z 868,02. Kolizní energie byla 35-70 eV.



Obr. 4.6: Fragmentační spektrum glykopeptidu IgG2:A2G1F1. Fragmentován byl prekurzor v nábojovém stavu 3+ s m/z 922,04. Kolizní energie byla 35-70 eV.



Obr. 4.7: Fragmentační spektrum glykopeptidu IgG2:A2G2F1. Fragmentován byl prekurzor v nábojovém stavu 3+ s m/z 976,06. Kolizní energie byla 35-70 eV.



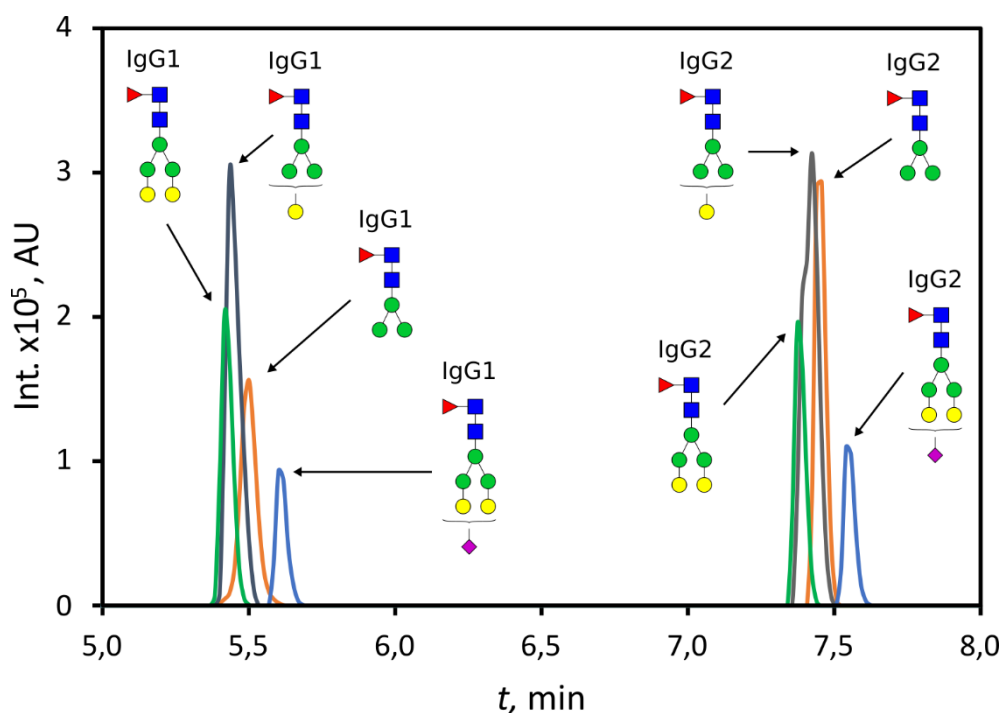
Obr. 4.8: Fragmentační spektrum glykopeptidu IgG2:A2G2F1S1. Fragmentován byl prekurzor v nábojovém stavu 3+ s m/z 1073,09. Kolizní energie byla 35-70 eV.

Tab. 4.1: Přehled identifikovaných glykopeptidů. Symboly: zelené kolečko – mannososa, žluté kolečko – galaktosa, modrý čtverec – N-acetylglukosamin, červený trojúhelník – fukosa, fialový kosočtverec – sialová kyselina. M_r – relativní molekulová hmotnost analytu.

Glykopeptid	M_r	Peptid	Glykan
IgG1			
A2F1	2633,04	EEQYNSTYR	
A2G1F1	2795,09	EEQYNSTYR	
A2G2F1	2957,14	EEQYNSTYR	
A2G2F1S1	3248,24	EEQYNSTYR	
IgG2			
A2F1	2601,05	EEQFNSTFR	
A2G1F1	2763,10	EEQFNSTFR	
A2G2F1	2925,15	EEQFNSTFR	
A2G2F1S1	3216,25	EEQFNSTFR	

4.2 Chromatografie na reverzní fázi

Při chromatografické analýze glykopeptidů na reverzní fázi má na retenci největší vliv hydrofobicita peptidové kostry. Na Obr. 4.9 je zachycen chromatogram analýzy vzorku na koloně BEH C18 s využitím gradientu RP za experimentálních podmínek popsanych v kapitole 3.4. Glykopeptidy eluují v úzkých časových intervalech v závislosti na struktuře peptidové části. V intervalu 5,42-5,61 min eluují glykoformy třídy IgG1, v intervalu 7,38-7,55 min pak glykoformy třídy IgG2. Peptidické části glykopeptidů IgG1 a IgG2 se liší ve dvou aminokyselinách. IgG1 (EEQYNSTYR) obsahuje dva tyrosiny (Y), které jsou v případě IgG2 (EEQFNSTFR) nahrazeny dvěma fenylalaniny (F). Tyrosin je oproti fenylalaninu polárnější aminokyselinou⁷¹, glykopeptidy IgG1 tedy vykazují nižší afinitu k reverzní fázi a eluují dříve.



Obr. 4.9: Separace glykopeptidů IgG na koloně BEH C18 při gradientovém programu RP (Tab. 3.1). Složení mobilní fáze: A, voda s 0,1% kyselinou mravenčí; B, acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí; průtok, 0,25 ml/min; teplota kolony, 40 °C. Symboly: zelené kolečko, mannososa (Man); žluté kolečko, galaktosa (Gal); modrý čtverec, N-acetylglukosamin (GlcNAc); červený trojúhelník, fukosa (Fuc); fialový kosočtverec, sialová kyselina.

S rostoucím počtem neutrálních monosacharidových jednotek glykanu dochází k zvýšení polaritě molekuly glykopeptidu, což se projeví v poklesu retenčního času. Například připojením galaktosy ke glykopeptidu IgG1:A2F1 došlo k poklesu retenčního času o 0,06 min. Naopak přítomnost sialové kyseliny retenci prodlužuje, neboť její náboj kompenzuje náboj vznikající na peptidové kostře a tím zvyšuje afinitu glykopeptidu k reverzní fázi⁴⁶. Připojením sialové kyseliny ke glykopeptidu IgG1:A2G2F1 došlo k nárůstu retenčního času o 0,19 min. Stejné trendy pozorujeme i v případě glykopeptidů IgG2.

4.3 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

Na každé HILIC stacionární fázi byla provedena sada měření s využitím tří odlišných gradientových programů H1-H3 (Tab. 3.1). Na základě chromatografického rozlišení mezi píky analytů byl zvolen nejvhodnější gradient pro každou stacionární fázi. Vzhledem k povaze HILIC stacionární fáze byla porovnávána rozlišení mezi glykopeptidy stejné třídy IgG vzájemně se lišícími o monosacharidovou jednotku. V případě stacionární fáze HILIC-N poskytoval nejvyšší hodnoty rozlišení gradientový program H2 (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Rozlišení mezi píky analytů v chromatografických analýzách na koloně HILIC-N v mobilní fázi voda/acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí, za podmínek popsaných v kapitole 3.5. Rozlišení R při gradientových programech H1-H3 byla počítána dle rovnice (3.1).

Analyty	R_{H1}	R_{H2}	R_{H3}
IgG1: A2F1/A2G1F1	1,64	2,72	1,80
IgG1: A2G1F1/A2G2F1	1,71	2,96	1,64
IgG1: A2G2F1/A2G2F1S1	25,14	41,22	24,55
IgG2: A2F1/A2G1F1	2,10	4,30	1,82
IgG2: A2G1F1/A2G2F1	1,60	3,37	1,64
IgG2: A2G2F1/A2G2F1S1	25,73	50,00	25,09

Pro HILIC-A poskytoval nejlepší rozlišení gradientový program H1 (Tab. 4.3). Pro kolonu HILIC-B byl jako nejvhodnější zvolen gradientový program H2, který poskytoval srovnatelná rozlišení pro glykopeptidy IgG1 jako H3, ale došlo k lepšímu rozlišení glykoforem IgG2 (Tab. 4.4).

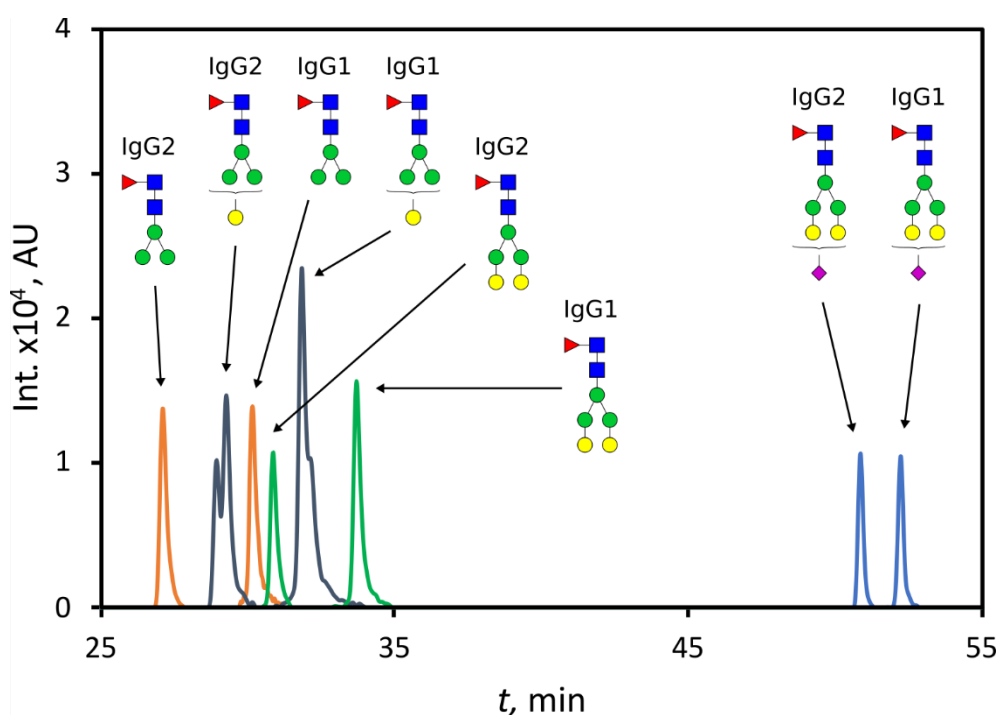
Tab. 4.3: Rozlišení mezi píky analytů v chromatografických analýzách na koloně HILIC-A v mobilní fázi voda/acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí, za podmínek popsanych v kapitole 3.5. Rozlišení R při gradientových programech H1-H3 byla počítána dle rovnice (3.1).

Analyty	R_{H1}	R_{H2}	R_{H3}
IgG1: A2F1/A2G1F1	1,71	1,14	0,85
IgG1: A2G1F1/A2G2F1	1,82	1,34	1,24
IgG1: A2G2F1/A2G2F1S1	3,25	2,37	2,13
IgG2: A2F1/A2G1F1	2,40	1,87	1,50
IgG2: A2G1F1/A2G2F1	1,78	1,43	1,16
IgG2: A2G2F1/A2G2F1S1	3,71	2,83	2,43

Tab. 4.4: Rozlišení mezi píky analytů v chromatografických analýzách na koloně HILIC-B v mobilní fázi voda/acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí, za podmínek popsanych v kapitole 3.5. Rozlišení R při gradientových programech H1-H3 byla počítána dle rovnice (3.1).

Analyty	R_{H1}	R_{H2}	R_{H3}
IgG1: A2F1/A2G1F1	0,68	1,32	1,40
IgG1: A2G1F1/A2G2F1	0,81	1,33	1,27
IgG1: A2G2F1/A2G2F1S1	14,67	29,50	31,00
IgG2: A2F1/A2G1F1	0,67	1,95	1,64
IgG2: A2G1F1/A2G2F1	0,64	1,64	1,27
IgG2: A2G2F1/A2G2F1S1	14,27	38,61	19,60

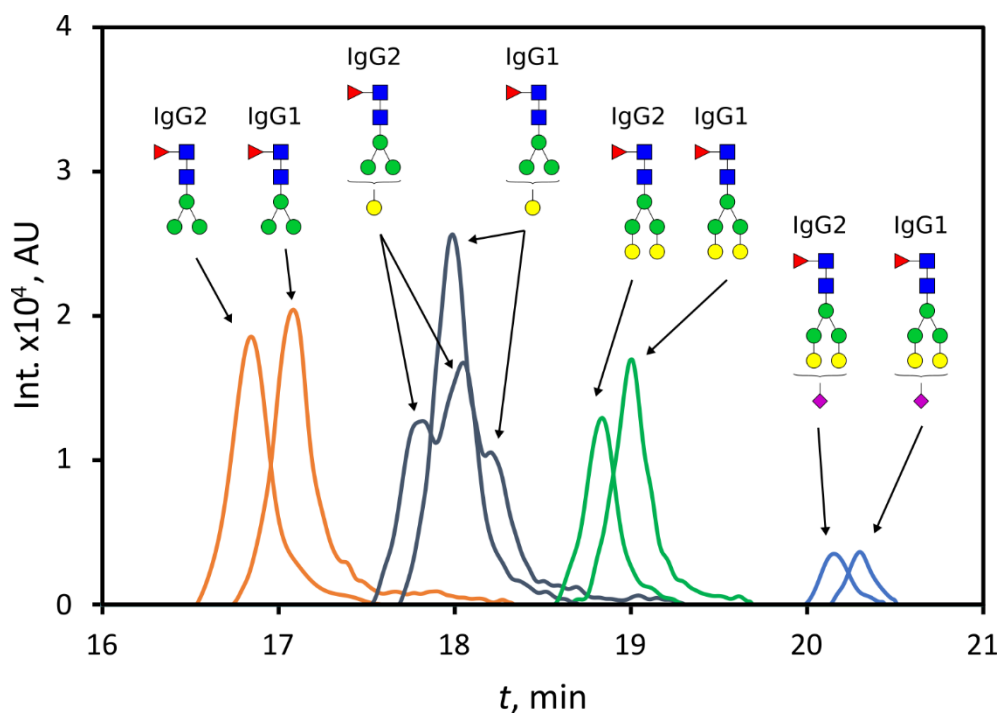
Se zvyšujícím se počtem sacharidových jednotek v oligosacharidové části glykopeptidu dochází k nárůstu retenčních časů analytů. Tento trend lze pozorovat na Obr. 4.10. Jedná se o chromatogram analýzy vzorku na koloně HILIC-N při použití gradientového programu H2 za experimentálních podmínek popsanych v kapitole 3.5. Glykopeptidy podtřídy IgG1 eluují v závislosti na struktuře glykanu v následujícím pořadí: A2F1, A2G1F1, A2G2F1, A2G2F1S1. Stejný trend pozorujeme i u glykopeptidů podtřídy IgG2.



Obr. 4.10: Separace glykopeptidů IgG na koloně HILIC-N při gradientovém programu H2 (Tab. 3.1). Složení mobilní fáze: A, voda s 0,1% kyselinou mravenčí; B, acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí; průtok, 0,30 ml/min; teplota kolony, 40 °C. Symboly: zelené kolečko, mannososa (Man); žluté kolečko, galaktosa (Gal); modrý čtverec, N-acetylglukosamin (GlcNAc); červený trojúhelník, fukosa (Fuc); fialový kosočtverec, sialová kyselina.

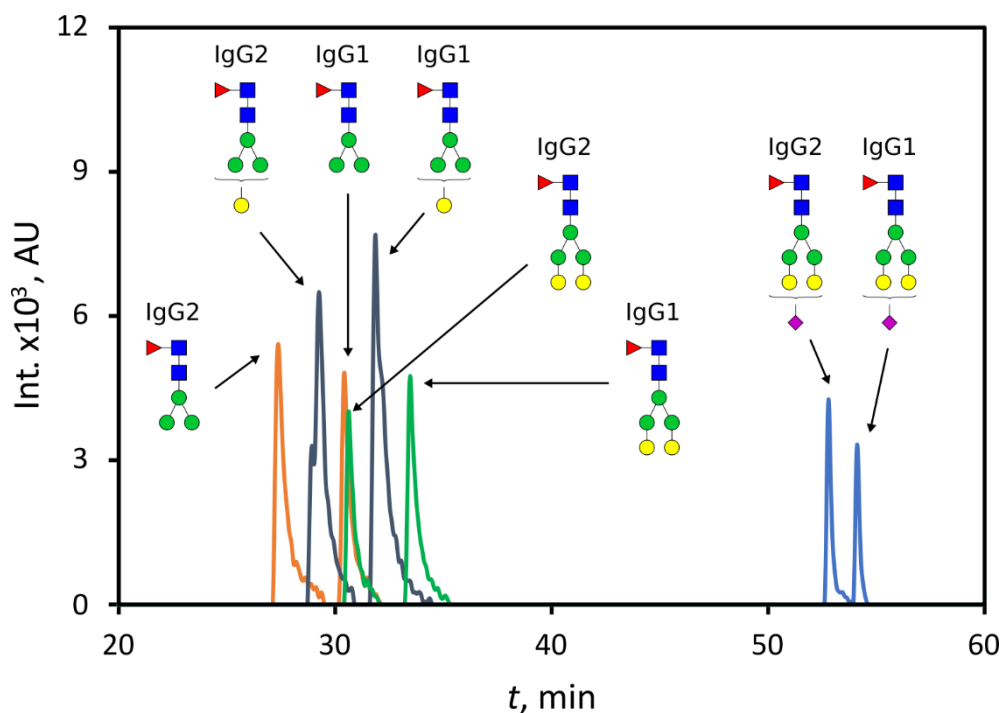
Vliv polarit y aminokyselin peptidové části na retenci analytů je v rámci HILIC opačný než v případě chromatografie na reverzní fázi. Glykopeptidy IgG1 obsahující polárnější tyrosin jsou tedy na koloně více zadržovány než glykopeptidy IgG2, které obsahují méně polární fenylalanin.

Dle údajů poskytnutých výrobcem jsou kolony HILIC-A a HILIC-B schopny pracovat ve smíšeném módu HILIC/IEC. V závislosti na složení mobilní fáze tedy dochází k disociaci silanolových skupin na povrchu silikagelu (HILIC-A), případně k protonizaci aminoskupin aminopropylové stacionární fáze (HILIC-B). Náboj vázaný na povrchu stacionární fáze zprostředkovává elektrostatickou interakci mezi nabitými funkčními skupinami stacionární fáze a nabitými analyty. Analyzované glykopeptidy vykazují amfoterní charakter. Pozitivní náboj je v rámci peptidové části lokalizován na zásadité aminokyselině argininu (R) a na koncové aminoskupině. Peptidová část obsahuje dvě kyseliny glutamové (Q) a koncovou karboxylovou skupinu, které jsou při 0,1% koncentraci kyseliny mravenčí částečně disociované a nesou záporný náboj. Vliv elektrostatické interakce mezi stacionární fází a peptidovou částí analytu je však potlačován stérickými efekty. Pravděpodobně díky adsorbované vodné vrstvě na povrchu stacionární fáze vykazují glykopeptidy tendenci orientovat se tak, aby v kontaktu se stacionární fází byla jejich oligosacharidová část. Z tohoto důvodu dochází na obou zmíněných kolonách k silné elektrostatické interakci mezi záporně nabitou sialovou kyselinou a nabitými funkčními skupinami stacionární fáze. V případě silikagelové stacionární fáze HILIC-A (Obr. 4.11) dochází k elektrostatickému odpuzování mezi záporně nabitými sialovými kyselinami a částečně disociovanými silanolovými skupinami silikagelu. V důsledku toho eluují glykoformy nesoucí glykan A2G2F1S1 s výrazně kratšími retenčními časy než v případě aminopropylové stacionární fáze HILIC-B (Obr. 4.12, str. 44). Zároveň lze v případě kolony HILIC-A sledovat výrazný pokles retenčních časů všech sledovaných analytů, a to díky elektrostatickému odpuzování mezi záporně nabitými skupinami peptidické části a disociovanými silanoly. U stacionární fáze HILIC-B dochází naopak k elektrostatickému přitahování mezi sialovými kyselinami a protonizovanými aminoskupinami, sializované glykopeptidy jsou na koloně více zadržovány.



Obr. 4.11: Separace glykopeptidů IgG na koloně HILIC-A při gradientovém programu H1 (Tab. 3.1). Složení mobilní fáze: A, voda s 0,1% kyselinou mravenčí; B, acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí; průtok, 0,30 ml/min; teplota kolony, 40 °C. Symboly: zelené kolečko, mannososa (Man); žluté kolečko, galaktosa (Gal); modrý čtverec, N-acetylglukosamin (GlcNAc); červený trojúhelník, fukosa (Fuc); fialový kosočtverec, sialová kyselina.

Významnou předností metody HILIC v porovnání s RP-HPLC je potenciál pro separaci izobarických forem glykopeptidů. Na Obr. 4.10 pozorujeme částečnou separaci glykoforem analytu IgG2:A2G1F1 při analýze na polyhydroxylové stacionární fázi. Metodou HILIC jsme schopni rozlišit mezi glykoformami s galaktosou vázanou na α 3-či na α 6-rameno glykanu⁶⁹. Částečnou separaci izobarických glykoforem zmíněného analytu jsme pozorovali i v případě analýzy na silikagelové stacionární fázi HILIC-A (Obr. 4.11). V případě této stacionární fáze došlo i k částečné separaci izobarických forem glykopeptidu IgG1:A2G1F1. V případě analýzy na aminopropyllové stacionární fázi HILIC-B k žádné separaci izoform nedošlo.



Obr. 4.12: Separace glykopeptidů IgG na koloně HILIC-B při gradientovém programu H2 (Tab. 3.1). Složení mobilní fáze: A, voda s 0,1% kyselinou mravenčí; B, acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí; průtok, 0,30 ml/min; teplota kolony, 40 °C. Symboly: zelené kolečko, mannososa (Man); žluté kolečko, galaktosa (Gal); modrý čtverec, N-acetylglukosamin (GlcNAc); červený trojúhelník, fukosa (Fuc); fialový kosočtverec, sialová kyselina.

4.4 Porovnání testovaných stacionárních fází

Pro účely porovnání vhodnosti testovaných stacionárních fází pro separaci glykopeptidů při daných experimentálních podmínkách byly z dat naměřených při nevhodnějších gradientových programech vyhodnoceny následující parametry: rozlišení mezi píky analytů, šířky chromatografických píků analytů a asymetrické faktory píků analytů.

Rozlišení mezi píky glykopeptidů vzájemně se lišících o monosacharidovou jednotku jsou uvedena v Tab. 4.5. Nejvyšších rozlišení všech studovaných glykoforem bylo dosaženo v případě využití polyhydroxylové stacionární fáze HILIC-N. Stacionární fáze HILIC-A a HILIC-B poskytly nižší rozlišení. HILIC-A byla ve srovnání s HILIC-B schopna lépe vzájemně rozlišit asializované glykoformy, naopak glykoformy se sialovou kyselinou byly lépe rozlišeny na koloně HILIC-B. Tato skutečnost je způsobena elektrostatickými interakcemi mezi sialovou kyselinou a stacionární fází – odpuzování v případě HILIC-A a přitahování v případě HILIC-B. Navzdory tomu je však separace sializovaných glykoforem na koloně HILIC-A dostatečná, a proto je za daných experimentálních podmínek tato kolona pro separaci studovaných glykopeptidů vhodnější než kolona HILIC-B. Rozlišení glykoforem na reverzní fázi jsou v porovnání s HILIC kolonami výrazně nižší, reverzní fáze není vhodná k separaci glykopeptidů na základě rozdílné struktury oligosacharidové části.

Tab. 4.5: Porovnání rozlišení R mezi píky analytů naměřených na: reverzní fázi (RP), koloně HILIC-N (N), koloně HILIC-A (A) a koloně HILIC-B (B) v mobilní fázi voda/acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí při optimálních gradientech.

Analyty	R_{RP}	R_N	R_A	R_B
IgG1: A2F1/A2G1F1	0,55	2,72	1,71	1,32
IgG1: A2G1F1/A2G2F1	0,20	2,96	1,82	1,33
IgG1: A2G2F1/A2G2F1S1	2,24	41,22	3,25	29,50
IgG2: A2F1/A2G1F1	0,20	4,30	2,40	1,95
IgG2: A2G1F1/A2G2F1	0,50	3,37	1,78	1,64
IgG2: A2G2F1/A2G2F1S1	2,27	50,00	3,71	38,61

Dalším ze zkoumaných parametrů bylo rozlišení mezi píky glykopeptidů IgG1 a IgG2 nesoucími stejný glykan. Vypočtená rozlišení jsou uvedena v Tab. 4.6. Nejvyšších rozlišení bylo dosaženo na reverzní fázi, kde je hydrofobicita peptidové části hlavním faktorem ovlivňujícím retenci analytu. Nejnižší rozlišení byla obdržena při analýze na stacionární fázi HILIC-A, kde docházelo ke koeluci glykoforem se stejným glykanem. V případě stacionárních fází HILIC-N a HILIC-B došlo k separaci sledovaných glykoforem na základní linii. Polyhydroxylová stacionární fáze byla schopna sledované analyty rozlišit lépe než aminopropylová.

Tab. 4.6: Porovnání rozlišení R mezi píky analytů se stejným glykanem naměřených na: reverzní fázi (RP), koloně HILIC-N (N), koloně HILIC-A (A) a koloně HILIC-B (B) v mobilní fázi voda/acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí při optimálních gradientech.

Analyty	R_{RP}	R_N	R_A	R_B
A2F1: IgG1/IgG2	20,53	6,10	0,59	3,30
A2G1F1: IgG1/IgG2	17,30	4,16	0,08	2,26
A2G2F1: IgG1/IgG2	23,06	6,00	0,37	3,26
A2G2F1S1: IgG1/IgG2	25,87	3,73	0,43	3,25

V rámci měření metodou HILIC eluují analyty v širších chromatografických pících než v případě analýzy na reverzní fázi (Tab. 4.7). Rozšiřování chromatografických píků souvisí s difúzí analytů v mobilní fázi. Vzhledem k tomu, že celková doba analýzy je v případě měření na reverzní fázi výrazně kratší než u metody HILIC, analyty nemají dostatek času difundovat a výsledné chromatografické píky jsou užší. Delší doba analýzy metodou HILIC naopak vedla k širším chromatografickým píkům vlivem difúze analytů v mobilní fázi. Nejširší píky byly získány v případě použití stacionární fáze HILIC-B. Šírky chromatografických píků v případě stacionárních fází HILIC-N a HILIC-A byly srovnatelné.

Tab. 4.7: Porovnání šířek píku w analytů naměřených na: reverzní fázi (RP), koloně HILIC-N (N), koloně HILIC-A (A) a koloně HILIC-B (B) v mobilní fázi voda/acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí při optimálních gradientech.

Glykopeptid	w_{RP} [min]	w_N [min]	w_A [min]	w_B [min]
IgG1				
A2F1	0,11	0,50	0,40	0,80
A2G1F1	0,11	0,75	0,65	1,40
A2G2F1	0,09	0,50	0,45	1,00
A2G2F1S1	0,08	0,40	0,35	0,40
IgG2				
A2F1	0,08	0,50	0,45	1,05
A2G1F1	0,12	0,50	0,55	0,90
A2G2F1	0,08	0,45	0,35	0,75
A2G2F1S1	0,07	0,35	0,35	0,40

Tvar chromatografického píku souvisí s mechanismem retence analytu. Symetrie píků analytů byla vyjádřena pomocí asymetrických faktorů, které jsou shrnuty v Tab. 4.8. V případě reverzní fáze byly získány symetričtější píky než v případě analýzy na polyhydroxylové stacionární fázi HILIC-N. Zatímco retenční mechanismus v případě reverzní fáze závisí především na nespecifických hydrofobních interakcích, mechanismus retence v případě metody HILIC je komplikovanější, což má za následek vyšší asymetrii („tailing“) chromatografických píků. Vzhledem k tomu, že výrobce kolon poskytuje pouze omezené informace o chemické struktuře stacionární fáze, není v tuto chvíli možné tento jev podrobněji diskutovat. Lze však spekulovat o tom, že v případě kolon HILIC-A a HILIC-B má na symetrii píků vliv elektrostatická interakce mezi nabitými analyty a nábojem vázaným na povrchu stacionární fáze. Zatímco v případě kolony HILIC-A došlo v porovnání s HILIC-N k poklesu asymetrického faktoru, v případě kolony HILIC-B došlo k jeho nárůstu. Z této skutečnosti lze usoudit, že elektrostatické odpuzování mezi záporně nabitými karboxylovými skupinami analytů a disociovanými silanoly v případě HILIC-A přispělo ke zlepšení symetrie píků, v případě HILIC-B pak došlo ke zhoršení symetrie píků vlivem elektrostatického přitahování mezi karboxyly glykopeptidů a aminoskupinami stacionární fáze.

Tab. 4.8: Porovnání asymetrických faktorů píku A analytů naměřených na: reverzní fázi (RP), koloně HILIC-N (N), koloně HILIC-A (A) a koloně HILIC-B (B) v mobilní fázi voda/acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí při optimálních gradientech. Asymetrické faktory byly vypočteny podle rovnice (3.2).

Glykopeptid	A_{RP} [min]	A_N [min]	A_A [min]	A_B [min]
IgG1				
A2F1	1,00	2,00	1,40	3,40
A2G1F1	1,75	3,25	1,80	4,20
A2G2F1	1,67	2,00	1,20	5,00
A2G2F1S1	1,67	1,25	1,33	2,00
IgG2				
A2F1	1,67	2,00	1,40	4,20
A2G1F1	0,83	1,40	1,17	2,50
A2G2F1	1,67	2,00	1,00	3,75
A2G2F1S1	1,33	1,67	1,67	1,75

4.5 Využití pufované mobilní fáze

Změnou pH mobilní fáze lze v HILIC módu ovlivnit disociaci či protonizaci funkčních skupin analytu a stacionární fáze, čímž dochází ke zintenzivnění či potlačení elektrostatických interakcí mezi analytem a stacionární fází. Byla provedena série experimentů s využitím stacionárních fází HILIC-N a HILIC-B a mobilních fází, jejichž vodnou složkou byl 10 mM mravenčan amonný s pH 3,5 a organickou složkou acetonitril s přídatkem 0,1 % kyseliny mravenčí. Byl využit gradient H1 a měření probíhala za experimentálních podmínek popsanych v kapitole 3.5. Stejně experimenty byly poté provedeny s mobilní fází, která obsahovala 50 mM mravenčan amonný s pH 3,5 jako vodnou složku.

V průběhu analýz s pufovanou mobilní fází však došlo k výraznému potlačení ionizace analytů, v důsledku čehož nebylo možné identifikovat řadu analytů a sledovat tak jejich chromatografické chování. Pro posouzení vlivu přítomnosti pufru v mobilní fázi na retenci glykopeptidů v HILIC módu bude potřeba provést další experimenty.

5. ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byla porovnána separační účinnost tří stacionárních fází v analýze směsi glykopeptidů metodou hydrofilní interakční kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí. Byla testována polyhydroxylová (HILIC-N), silikagelová (HILIC-A) a aminopropylová (HILIC-B) stacionární fáze. Výsledky těchto analýz byly porovnány s výsledky analýzy získanými za použití reverzní oktadecylové stacionární fáze (BEH C18), která se v rutinních glykoproteomických analýzách běžně využívá.

Enzymatickým štěpením standardu lidského imunoglobulinu G byla připravena směs glykopeptidů, která byla využita jako vzorek pro všechny analýzy. Nejprve byla směs charakterizována s využitím kapalinové chromatografie na oktadecylové stacionární fázi s tandemovou hmotnostní detekcí pomocí průletového hmotnostního analyzátoru s předřazeným kvadrupólem (qTOF). Pomocí fragmentačních spekter byla identifikována sada osmi glykopeptidů, jejichž chromatografické parametry byly sledovány v průběhu analýz na HILIC kolonách.

Na každé z testovaných HILIC stacionárních fází byla provedena série tří analýz při různých gradientech mobilní fáze, která byla tvořena směsí vody a acetonitrilu s 0,1% koncentrací kyseliny mravenčí. Pro každou stacionární fázi byl na základě získaných rozlišení chromatografických píků vybrán nejvhodnější gradient. Následně bylo provedeno srovnání chromatografických parametrů získaných pomocí jednotlivých stacionárních fází při zvolených gradientech.

Nejlepšího rozlišení mezi píky glykoforem v závislosti na struktuře oligosacharidového řetězce bylo dosaženo na polyhydroxylové stacionární fázi (HILIC-N). Kolony HILIC-A a HILIC-B poskytly nižší rozlišení analytů. HILIC-A byla v porovnání s HILIC-B schopna lépe separovat asializované glykoformy, naopak HILIC-B lépe odseparovala glykopeptidy obsahující sialovou kyselinu. Všechny testované HILIC stacionární fáze poskytly lepší rozlišení než reverzní stacionární fáze.

Kolona HILIC-N poskytla v rámci HILIC kolon nejvyšší rozlišení mezi glykopeptidy se stejným glykanem lišící se ve struktuře peptidické části. Nejhorší rozlišení poskytla kolona HILIC-A, kde docházelo ke koeluci glykopeptidů IgG1 a IgG2 nesoucích stejný glykan. V porovnání s reverzní fází bylo na všech HILIC kolonách

dosaženo výrazně nižšího rozlišení mezi glykopeptidy IgG1 a IgG2 nesoucími stejný glykan.

V případě kolon HILIC-A a HILIC-B byl demonstrován vliv elektrostatické interakce na separaci nabitých analytů obsahujících sialovou kyselinu. Vlivem elektrostatického odpuzování došlo na koloně HILIC-A k eluci sializovaných glykopeptidů v kratších retenčních časech. Naopak na koloně HILIC-B docházelo díky elektrostatickému přitahování k delší retenci glykopeptidů obsahující sialovou kyselinu.

Kolony HILIC-N a HILIC-A byly schopné částečně separovat izobarické formy glykopeptidu IgG2:A2G1F1 lišící se ve vazbě terminální galaktosy na α 3-, či α 6-rameno glykanu. Na koloně HILIC-A byla pozorována částečná separace izobarických glykoforem i v případě glykopeptidu IgG1:A2F1. Na koloně HILIC-B ani na reverzní fázi tento jev pozorován nebyl.

S ohledem na studované chromatografické parametry lze za daných experimentálních podmínek považovat polyhydroxylovou stacionární fázi HILIC-N za nejvhodnější pro analýzu studované směsi glykopeptidů. Kolona HILIC-A poskytla nižší rozlišení, její výhoda však spočívá v rychlejší analýze a schopnosti částečné separace izoforem IgG1:A2F1S1. Kolona HILIC-B poskytla za daných podmínek nejhorší výsledky, tudíž ji k analýze nelze doporučit.

6. CITOVANÁ LITERATURA

1. Cole, C. R.; Smith, C. A.: Glycoprotein biochemistry (structure and function) - a vehicle for teaching many aspects of biochemistry and molecular biology. *Biochemical Education* **17**, 179–189 (1989).
2. Liu, H. et al.: Mass spectrometry-based analysis of glycoproteins and its clinical applications in cancer biomarker discovery. *Clinical Proteomics* **11**, 14-22 (2014).
3. Varki, A. et al.: *Essentials of Glycobiology*. Dostupné z URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274/> [8.6.2021].
4. Biochemický ústav LF MU (J.D.): *Proteiny a Glykoproteiny*. Dostupné z URL: <https://is.muni.cz/el/1411/podzim2013/BLLC0111p/um/proteiny.pdf> [8.6. 2021].
5. Miwa, H. E.; Song, Y.; Alvarez, R.; Cummings, R. D.; Stanley, P: The bisecting GlcNAc in cell growth control and tumor progression. *Glycoconjugate Journal* **29**, 609-618 (2012).
6. Staudacher, E.; Altmann, F.; Wilson, I. B. H.; März, L.: Fucose in N-glycans: From plant to man. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1473**, 216–236 (1999).
7. Cobb, B. A.: The history of IgG glycosylation and where we are now. *Glycobiology* **30**, 202–213 (2021).
8. Tran, D. T.; Ten Hagen, K. G.: Mucin-type o-glycosylation during development. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 6921–6929 (2013).
9. Bansil, R.; Turner, B. S.: The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Advanced Drug Delivery Reviews* **124**, 3–15 (2018).
10. Vidarsson, G.; Dekkers, G.; Rispens, T.: IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in Immunology* **5**, 520-536 (2014).
11. Schur, P. H.: IgG subclasses. A historical perspective. *Monographs in allergy* **23**, 1–11 (1988).
12. WikiSkripta: *Protilátka*. Dostupné z URL: <https://www.wikiskripta.eu/w/Protilátka> [8.6.2021].
13. Ciccimarra, F.; Rosen, F. S.; Schneeberger, E.; Merler, E.: Failure of heavy chain glycosylation of IgG in some patients with common, variable agammaglobulinemia. *Journal of Clinical Investigation* **57**, 1386–1390 (1976).

14. Parekh, R. B. et al.: Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* **316**, 452–457 (1985).
15. Malaise, M. G.; Franchimont, P.; Bouillene, C.; Houssier, C.; Mahieu, P. R.: Increased concanavalin A-binding capacity of immunoglobulin G purified from sera of patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Immunology* **68**, 543–551 (1987).
16. Axford, J. S. et al.: Reduced B-cell galactosyltransferase activity in rheumatoid arthritis. *The Lancet* **330**, 1486–1488 (1987).
17. Gornik, I.; Maravić, G.; Dumić, J.; Flögel, M.; Lauc, G.: Fucosylation of IgG heavy chains is increased in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry* **32**, 605–608 (1999).
18. Tomana, M.; Schrohenloher, R. E.; Koopman, W. J.; Alarcán, G. S.; Paul, W. A.: Abnormal glycosylation of serum igg from patients with chronic inflammatory diseases. *Arthritis & Rheumatism* **31**, 333–338 (1988).
19. Kanoh, Y. et al.: Changes in serum IgG oligosaccharide chains with prostate cancer progression. *Anticancer Research* **24**, 3135–3139 (2004).
20. Kaneko, Y.; Nimmerjahn, F.; Ravetch, J. V.: Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* **313**, 670–673 (2006).
21. Köhler, G.; Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
22. Lerner, E. A.: How to make a hybridoma. *Yale Journal of Biology and Medicine* **54**, 387–402 (1981).
23. Irani, V. et al.: Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. *Molecular Immunology* **67**, 171–182 (2015).
24. 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).
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**, 356-379 (2019).

26. de Leoz, M. L. A. et al.: Glycomic Approach for Potential Biomarkers on Prostate Cancer: Profiling of N-Linked Glycans in Human Sera and pRNS Cell Lines. *Disease Markers* **25**, 243-258 (2008).
27. Wada, Y. et al.: Comparison of Methods for Profiling O-Glycosylation. *Molecular & Cellular Proteomics* **9**, 719-727 (2010).
28. Kyselova, Z. et al.: Breast Cancer Diagnosis and Prognosis through Quantitative Measurements of Serum Glycan Profiles. *Clinical Chemistry* **54**, 1166-1175 (2008).
29. Cao, L. et al.: Intact glycopeptide characterization using mass spectrometry. *Expert Review of Proteomics* **13**, 513-522 (2016).
30. 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**, 178-188 (2009).
31. Ongay, S.; Boichenko, A.; Govorukhina, N.; Bischoff, R.: Glycopeptide enrichment and separation for protein glycosylation analysis. *Journal of Separation Science* **35**, 2341-2372 (2012).
32. Lewandrowski, U.; Zahedi, R. P.; Moebius, J.; Walter, U.; Sickmann, A.: Enhanced N-glycosylation site analysis of sialoglycopeptides by strong cation exchange prefractionation applied to platelet plasma membranes. *Molecular and Cellular Proteomics* **6**, 1933-1941 (2007).
33. Alvarez-Manilla, G. et al.: Tools for glycoproteomic analysis: Size exclusion chromatography facilitates identification of tryptic glycopeptides with N-linked glycosylation sites. *Journal of Proteome Research* **5**, 701-708 (2006).
34. Zhang, H.; Li, X.; Martin, D. B.; Aebersold, R.: Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nature Biotechnology* **21**, 660-666 (2003).
35. Wang, X.; Xia, N.; Liu, L.: Boronic Acid-Based Approach for Separation and Immobilization of Glycoproteins and Its Application in Sensing. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 20890-20912 (2013).
36. Illiano, A. et al.: Protein Glycosylation Investigated by Mass Spectrometry: An Overview. *Cells* **9**, 1986-2007 (2020).
37. Gomes, C. et al.: Glycoproteomic Analysis of Serum from Patients with Gastric Precancerous Lesions. *Journal of Proteome Research* **12**, 1454-1466 (2013).

38. Zhu, J.; He, J.; Liu, Y.; Simeone, D. M.; Lubman, D. M.: Identification of Glycoprotein Markers for Pancreatic Cancer CD24 + CD44 + Stem-like Cells Using Nano-LC–MS/MS and Tissue Microarray. *Journal of Proteome Research* **11**, 2272–2281 (2012).
39. Muinelo-Romay, L.; Villar-Portela, S.; Cuevas, E.; Gil-Martín, E.; Fernández-Briera, A.: Identification of $\alpha(1,6)$ fucosylated proteins differentially expressed in human colorectal cancer. *BMC Cancer* **11**, 508–519 (2011).
40. Ye, H.; Boyne, M. T.; Buhse, L. F.; Hill, J.: Direct Approach for Qualitative and Quantitative Characterization of Glycoproteins Using Tandem Mass Tags and an LTQ Orbitrap XL Electron Transfer Dissociation Hybrid Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry* **85**, 1531–1539 (2013).
41. Hong, Q.; Lebrilla, C. B.; Miyamoto, S.; Ruhaak, L. R.: Absolute Quantitation of Immunoglobulin G and Its Glycoforms Using Multiple Reaction Monitoring. *Analytical Chemistry* **85**, 8585–8593 (2013).
42. Kamiyama, T. et al.: Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis. *Hepatology* **57**, 2314–2325 (2013).
43. Vreeker, G. C. M.; Wührer, M.: Reversed-phase separation methods for glycan analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **409**, 359–378 (2017).
44. Zhang, Y.; Yin, H.; Lu, H.: Recent progress in quantitative glycoproteomics. *Glycoconjugate Journal* **29**, 249–258 (2012).
45. Kozlik, P.; Goldman, R.; Sanda, M.: Study of structure-dependent chromatographic behavior of glycopeptides using reversed phase nanoLC. *Electrophoresis* **38**, 2193–2199 (2017).
46. Wang, B.; Tsybovsky, Y.; Palczewski, K.; Chance, M. R.: Reliable Determination of Site-Specific In Vivo Protein N-Glycosylation Based on Collision-Induced MS/MS and Chromatographic Retention Time. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **25**, 729–741 (2014).
47. Ozohanics, O.; Turiák, L.; Puerta, A.; Vékey, K.; Drahos, L.: High-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry methodology for analyzing site-specific N-glycosylation patterns. *Journal of Chromatography A* **1259**, 200–212 (2012).
48. Pereira, L.: Porous Graphitic Carbon as a Stationary Phase in HPLC: Theory and Applications. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **31**, 1687–1731 (2008).

49. Zhu, R.; Huang, Y.; Zhao, J.; Zhong, J.; Mechref, Y.: Isomeric Separation of N-Glycopeptides Derived from Glycoproteins by Porous Graphitic Carbon (PGC) LC-MS/MS. *Analytical Chemistry* **92**, 9556–9565 (2020).
50. Kozlik, P.; Goldman, R.; Sanda, M.: Hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation of glycopeptides and their isomers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **410**, 5001–5008 (2018).
51. Jandera, P.: Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Analytica Chimica Acta* **692**, 1–25 (2011).
52. Alpert, A. J.: Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A* **499**, 177–196 (1990).
53. Wuhrer, M.; de Boer, A. R.; Deelder, A. M.: Structural glycomics using hydrophilic interaction chromatography (HILIC) with mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **28**, 192–206 (2009).
54. McCalley, D. V.: Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1523**, 49–71 (2017).
55. Wang, X.; Li, W.; Rasmussen, H. T.: Orthogonal method development using hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of pharmaceuticals and impurities. *Journal of Chromatography A* **1083**, 58–62 (2005).
56. Chauve, B.; Guillarme, D.; Cléon, P.; Veuthey, J.-L.: Evaluation of various HILIC materials for the fast separation of polar compounds. *Journal of Separation Science* **33**, 752–764 (2010).
57. McCalley, D. V.: Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *Journal of Chromatography A* **1171**, 46–55 (2007).
58. Li, R.; Huang, J.: Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* **1041**, 163–169 (2004).
59. Oyler, A. R. et al.: Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis. *Journal of Chromatography A* **724**, 378–383 (1996).

60. Ikegami, T.; Tomomatsu, K.; Takubo, H.; Horie, K.; Tanaka, N.: Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* **1184**, 474–503 (2008).
61. Regnier, F. E.; Noel, R.: Glycerolpropylsilane Bonded Phases in the Steric Exclusion Chromatography of Biological Macromolecules. *Journal of Chromatographic Science* **14**, 316–320 (1976).
62. Jandera, P.; Hajek, T.: Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavone natural antioxidants. *Journal of Separation Science* **32**, 3603–3619 (2009).
63. Liu, X.; Pohl, C.: New hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode stationary phase and its application for analysis of nonionic ethoxylated surfactants. *Journal of Chromatography A* **1191**, 83–89 (2008).
64. Jiang, W.; Irgum, K.: Covalently Bonded Polymeric Zwitterionic Stationary Phase for Simultaneous Separation of Inorganic Cations and Anions. *Analytical Chemistry* **71**, 333–344 (1999).
65. Guo, Y.; Gaiki, S.: Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* **1074**, 71–80 (2005).
66. Quiming, N. S.; Denola, N. L.; Soliev, A. B.; Saito, Y.; Jinno, K.: Retention behavior of ginsenosides on a poly(vinyl alcohol)-bonded stationary phase in hydrophilic interaction chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, 1477–1488 (2007).
67. Nguyen, H. P.; Yang, S. H.; Wigginton, J. G.; Simpkins, J. W.; Schug, K. A.: Retention behavior of estrogen metabolites on hydrophilic interaction chromatography stationary phases. *Journal of Separation Science* **33**, 793–802 (2010).
68. Kozlik, P.; Sanda, M.; Goldman, R.: Nano reversed phase versus nano hydrophilic interaction liquid chromatography on a chip in the analysis of hemopexin glycopeptides. *Journal of Chromatography A* **1519**, 152–155 (2017).
69. Molnarova, K.; Kozlik, P.: Comparison of Different HILIC Stationary Phases in the Separation of Hemopexin and Immunoglobulin G Glycopeptides and Their Isomers. *Molecules* **25**, 4655–4667 (2020).

70. Huang, Y.; Nie, Y.; Boyes, B.; Orlando, R.: Resolving Isomeric Glycopeptide Glycoforms with Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). *Journal of Biomolecular Techniques : JBT* **27**, 98–104 (2016).
71. Radzicka, A.; Wolfenden, R.: Comparing the polarities of the amino acids: side-chain distribution coefficients between the vapor phase, cyclohexane, 1-octanol, and neutral aqueous solution. *Biochemistry* **27**, 1664–1670 (1988).