

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Mgr. Katarína Molnárová

**HYDROFILNÁ INTERAKČNÁ KVAPALINOVÁ
CHROMATOGRAFIA V ANALÝZE INTAKTNÝCH
GLYKOPEPTIDOV**

Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography in the Analysis of Intact
Glycopeptides

Dizertačná práca

Vedúci práce: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

Praha 2024

Táto dizertačná práca zhrňuje výsledky získané behom môjho doktorského štúdia v rokoch 2019 až 2023 na Katedre analytickej chémie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Karlovej.

Táto dizertačná práca vznikla s finančnou podporou Grantovej agentúry Českej republiky (projekt 19-18005Y), Grantovej agentúry Univerzity Karlovej (projekt 336421) a v rámci projektu Central European Exchange Program for University Studies (network RO-0010-16-2122–Teaching and Learning Bioanalysis).

Vedúci práce: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.
Katedra analytické chémie
Prírodovedecká Fakulta, Univerzita Karlova
Praha, Česká republika

Konzultantka práce: prof. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.
Katedra analytické chémie
Prírodovedecká Fakulta, Univerzita Karlova
Praha, Česká republika

Konzultant práce: doc. RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.
Katedra analytické chémie
Prírodovedecká Fakulta, Univerzita Karlova
Praha, Česká republika

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci vypracovala 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 13.02.2024

Katarína Molnárová

Táto dizertačná práca je založená na nasledujúcich siedmich vedeckých prác, ktoré boli publikované v medzinárodných impaktovaných časopisoch:

1. Kozlik, P., **Molnarova, K.**, Jecmen, T., Krizek, T., Goldman, R. (2020) Glycan-specific precipitation of glycopeptides in high organic content sample solvents used in HILIC. *Journal of Chromatography B*, 1150, 122196.
2. **Molnarova, K.**, Kozlik, P. (2020) Comparison of Different HILIC Stationary Phases in the Separation of Hemopexin and Immunoglobulin G Glycopeptides and Their Isomers. *Molecules*, 25, 4655.
3. **Molnarova K.**, Duris, A., Jecmen, T., Kozlik, P. (2021) Comparison of human IgG glycopeptides separation using mixed-mode hydrophilic interaction/ion-exchange liquid chromatography and reversed-phase mode. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413, 4321-4328.
4. Kozlik, P., **Molnarova, K.**, Jecmen, T., Krizek, T., Bosakova, Z. (2022) Prediction of Intact N-Glycopeptide Retention Time Windows in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Molecules*, 27, 3723.
5. **Molnarova, K.**, Cokrtova, K., Tomnikova, A., Krizek, T., Kozlik, P. (2022) Liquid chromatography and capillary electrophoresis in glycomic and glycoproteomic analysis. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 153, 659-686.
6. **Molnarova, K.**, Chobotova, M., Kozlik, P. (2024) IgG Glycopeptide Enrichment Using Hydrophilic Interaction Chromatography Based Solid-Phase Extraction on Aminopropyl column. Prijatá v *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (31.1.2024).
7. **Molnarova, K.**, Krizek, T., Kozlik, P. (2024) The Potential of Polyaniline-Coated Stationary Phase in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Based Solid-Phase Extraction for Glycopeptide Enrichment. Podaná v *Journal of Chromatography B*.

ABSTRAKT

Analýza glykoproteínov predstavuje obrovskú výzvu v rámci glykoproteomiky, a to hlavne kvôli makro- a mikroheterogenite glykozylácie. Hydrofilná interakčná kvapalinová chromatografia (HILIC) je vhodnou alternatívou k chromatografii na reverznej fáze, ktorá sa najbežnejšie využíva v glykoproteomickej analýze. Táto dizertačná práca sa venuje potenciálu HILIC v glykoproteomickej analýze, zahrňujúca separáciou glykopeptidov na polárnych stacionárnych fázach až po využití HILIC v rámci prípravy vzoriek.

Na úvod bol preskúmaný vplyv koncentrácie acetonitrilu na precipitáciu glykopeptidov v závislosti na typu pripojeného glykánu. Následne boli testované tri, komerčne dostupné stacionárne fáze – kolóna obsahujúca silikagél modifikovaný piatimi hydroxylovými skupinami, amidová a zwitteriónová stacionárna fáza. Porovnaná bola ich účinnosť v separácii glykopeptidových izomérov, ktoré sa líšili iba vo vetvení a/alebo v type väzby. Ďalší výskum bol venovaný separácii glykopeptidov ľudského imunoglobulínu G na relatívne nových kolónach, ktoré zatiaľ neboli charakterizované v rámci glykoproteomickej analýze. Jednalo sa o kolóny od spoločnosti Advanced Chromatography Technologies s nemodifikovaným silikagélom (HILIC-A), s aminopropylom-modifikovaným sorbentom (HILIC-B) a s polyhydroxylovou stacionárnou fázou (HILIC-N). Zároveň bola porovnaná separácia glykopeptidov na reverznej fáze. Všetky HILIC kolóny poskytovali lepšiu separáciu glykoforiem v porovnaní so separáciou na oktadecylovej stacionárnej fáze, avšak poskytovali odlišnú účinnosť separácie. Navyše v prípade kolón HILIC-A a HILIC-B bol pozorovaný viacmodálny retenčný mechanizmus glykopeptidov.

V rámci tejto dizertačnej práce bol vyvinutý model na predikciu retenčných okien glykopeptidov v HILIC módu, ktorý môže slúžiť ako doplnujúci nástroj k identifikácii glykopeptidov pomocou hmotnostnej spektrometrie a tým zamedziť ich falošnú identifikáciu v glykoproteomike.

Posledná časť dizertačnej práce bola venovaná štúdiu experimentálnych podmienok obohatenia glykopeptidov s využitím extrakcie tuhú fázou (SPE) na polárnych stacionárnych fázach v HILIC módu. Boli testované dve stacionárne fáze, komerčne dostupný aminopropylový a nami pripravený polyanilínom pokrytý silikagél. Bol preskúmaný vplyv rôznych experimentálnych podmienok na účinnosť obohatenia, pričom každý testovaný parameter hral kľúčovú rolu v obohatení.

ABSTRACT

The analysis of glycoproteins represents a significant challenge in glycoproteomics, primarily due to the macro- and microheterogeneity of protein glycosylation. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is a convenient alternative to reversed-phase chromatography, commonly used in glycoproteomic analysis. This dissertation thesis discusses the potential of HILIC in glycoproteomic analysis, ranging from the separation of glycopeptides on polar stationary phases to the use of HILIC in sample preparation processes.

First, the effect of acetonitrile concentration on glycopeptide precipitation was investigated, depending on the type of glycan attached. Subsequently, three commercially available stationary phases were tested: a column containing a silica gel modified with five hydroxyl groups, an amide stationary phase, and a zwitterionic stationary phase. Their efficiency in separating glycopeptide isomers, differing only in branching and/or linkage position, was compared. Further research was devoted to the separation of human immunoglobulin G glycopeptides using relatively new columns that have not yet been characterized in glycoproteomic analysis. These columns, provided by Advanced Chromatography Technologies, included unmodified silica gel (HILIC-A), aminopropyl-modified sorbent (HILIC-B) and polyhydroxyl-functionalized stationary phase (HILIC-N). All HILIC columns demonstrated better separation of glycoforms compared to reverse-phase separation, but exhibited different separation efficiencies. Moreover, a mixed-mode retention mechanism of glycopeptides was observed in the case of HILIC-A and HILIC-B columns.

In this dissertation thesis, a model was developed to predict the retention windows of glycopeptides in HILIC mode. This model can serve as a complementary tool to glycopeptide identification by mass spectrometry, thereby reducing their false discovery rate.

The final section of this thesis focused on the study of the experimental conditions for glycopeptide enrichment utilizing solid-phase extraction (SPE) on polar stationary phases operating in HILIC mode. Two stationary phases, a commercially available aminopropyl, and an in-house-synthesized polyaniline-coated silica gel, were tested. The impact of different experimental conditions on the enrichment efficiency was investigated, with each tested parameter playing a crucial role on the enrichment.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Glykoproteomická analýza, glykopeptidy, separácia glykopeptidov, separácia glykopeptidových izomérov, hydrofilná interakčná kvapalinová chromatografia, viacmodálna chromatografia, obohatenie glykopeptidov, extrakcia tuhou fázou na polárnych stacionárnych fázach

KEYWORDS

Glycoproteomics, glycopeptides, glycopeptide separation, separation of glycopeptide isomers, hydrophilic interaction liquid chromatography, mixed-mode chromatography, glycopeptide enrichment, solid-phase extraction on polar stationary phases

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som sa rada poďakovala všetkým, ktorí ma počas môjho celého akademického štúdia podporovali. Najväčšie vďaka patrí môjmu školiteľovi RNDr. Petrovi Kolzíkovi, Ph.D., za jeho spoľahlivé a príjemné vedenie, cenné rady, trpezlivosť a venovaný čas počas doktorského štúdia. Ďalej by som chcela poďakovať mojej konzultantke, prof. Zuzane Bosákovej, CSc., za pomoc, dôveru a umožnenie práce na fakulte. Ďakujem doc. Tomášovi Křížkovi, Ph.D., za všetko, čo ma naučil počas vysokoškolského štúdia, a za to, že ma presvedčil ísť na doktorát.

Rada by som tiež poďakovala celej Katedre analytickej chémie za príjemné a priateľské prostredie. Veľké vďaka patrí celému lab. 118, ktorí dokázali zlepšiť aj tie horšie dni.

V neposlednom rade by som sa chcela poďakovať svojim blízkym, najmä mojej rodine a kamarátom, za ich nekonečnú podporu a vieru vo mňa, bez ktorej by som to nezvládla. Posledné štyri roky mi priniesli oveľa viac, než som očakávala.

Nakoniec by som si na tomto mieste chcela spomenúť na svojich starých rodičov, na ich nekonečnú lásku, múdrosť a oddanosť, ktorú prejavovali pri dohliadaní na mňa v priebehu môjho života.

OBSAH

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	11
1 CIEĽ PRÁCE.....	13
2 LITERÁRNY PREHĽAD.....	14
2.1 Glykoproteíny	14
2.2 Funkcia glykoproteínov	17
2.3 Analýza glykoproteínov.....	18
2.3.1 Chromatografia na reverznej fáze v glykoproteomike.....	19
2.3.2 Chromatografia na polárnych stacionárnych fázach v HILIC móde.....	20
2.3.3 Separácia glykopeptidov v PGC	21
2.4 Obohatenie glykopeptidov	22
2.4.1 Obohatenie glykopeptidov pomocou lektínovej chromatografie	23
2.4.2 Obohatenie glykopeptidov na základe kovalentných interakcií.....	23
2.4.3 Obohatenie glykopeptidov pomocou chelatačných reakcií.....	24
2.4.4 Obohatenie glykopeptidov pomocou SPE-HILIC.....	24
3 VÝSLEDKY A DISKUSIA – KOMENTÁRE K PUBLIKÁCIÁM.....	26
3.1 Štúdium precipitácie glykopeptidov závisiaca na typu pripojených glykánov v rozpúšťadlách s vysokým obsahom organického rozpúšťadla používaných v HILIC režime – Publikácia I	26
3.2 Porovnanie rôznych HILIC stacionárnych fáz v separácii glykopeptidov hemopexínu a IgG a ich izomérov – Publikácia II	29
3.2.1 Separácia glykopeptidov hemopexínu a jeho izomérov.....	31
3.2.2 Separácia glykopeptidov IgG a jeho izomérov	37
3.3 Porovnanie separácie glykopeptidov IgG v režime viacmodálnej chromatografie pracujúcej v režimu hydrofilnej interakčnej/iónovo-výmennej kvapalinovej chromatografie a na reverznej fáze – Publikácia III	39
3.4 Kvapalinová chromatografia a kapilárna elektroforéza v glykomickej a glykoproteomickej analýze – Publikácia IV	44

3.5 Predikcia retenčného času intaktných <i>N</i> -glykopeptidov v režime hydrofilnej interakčnej kvapalinovej chromatografii – Publikácia V	45
3.6 Obohatenie glykopeptidov pomocou SPE na polárnych stacionárnych fázach v HILIC režimu.....	49
3.6.1 Vplyv experimentálnych podmienok na obohatenie glykopeptidov IgG pomocou SPE-HILIC na aminopropylovej kolónke – Publikácia VI.....	49
3.6.2 Potenciál stacionárnej fázy potiahnutej polyaniínom na obohatenie glykopeptidov s využitím SPE-HILIC – Podaná publikácia VII.....	54
4 ZÁVER	57
5 POUŽITÁ LITERATÚRA	60

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ACE	Advanced Chromatography Technologies
Asn	Asparagín
BEH	Technológia hybridných etylénom premostených častíc
C18	Silikagél modifikovaný osemnásťuhlíkovým reťazcom
CID	Kolízne indukovaná disociácia
Con A	Konkanavalín A
CZE	Kapilárna zónová elektroforéza
HILIC	Hydrofilná interakčná kvapalinová chromatografia
IgG	Imunoglobulín G
LC	Kvapalinová chromatografia
MS	Hmotnostná spektrometria
PANI	Polyanilín
PEP1	Peptidová kostra hemopexínu SWPAVGNCSALR
PEP2	Peptidová kostra hemopexínu ALPQPQNVTSLLGCTH
PGC	Porézny grafitový uhlík
PNGáza F	<i>N</i> -glykozidáza F
PREG	Polárna retencia na grafitu
Q-TRAP	Hmotnostný spektrometer typu kvadrupól-lineárna iónová pasca
RNase B	Ribonukleáza B
RP	Reverzná fáza
RRT	Relatívny retenčný čas
Ser	Serín
SPE	Extrakcia tuhou fázou
SRM	Sledovanie vybranej reakcie
Thr	Treonín
TOF	Analyzátor doby letu
UPLC	Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
ZIC	Zwitteriónová stacionárna fáza
<i>I</i>	Iónová sila
<i>m/z</i>	Pomer hmotnosti k náboju
<i>R</i>	Rozlíšenie medzi chromatografickými píkmi analytov
<i>w</i>	Šírka píku pri základni
σ	Smerodajná odchýlka

Zoznam použitých skratiek glykánov

A2F1	Dvojramenná glykoforma bez galaktózy a s fukózou
A2G1F1	Dvojramenná glykoforma s jednou galaktózou a fukózou

A2G2	Dvojamenná glykoforma
A2G2F1	Dvojamenná glykoforma s fukózou
A2G2S1	Dvojamenná glykoforma s jednou sialovou kyselinou
A2G2S2	Dvojamenná glykoforma s dvomi sialovými kyselinami
A2G2F1S1	Dvojamenná glykoforma s fukózou a jednou sialovou kyselinou
A3G3	Trojramenná glykoforma
A3G3F1	Trojramenná glykoforma s fukózou
A3G3S1	Dvojamenná glykoforma s jednou sialovou kyselinou
A3G3S2	Dvojamenná glykoforma s dvomi sialovými kyselinami
A3G3S3	Dvojamenná glykoforma s tromi sialovými kyselinami
G0FB	Bisektínová glykoforma bez galaktózy a s fukózou
G1FB = G1A3F1	Bisektínová glykoforma s jednou galaktózou a fukózou

1 CIEĽ PRÁCE

Dizertačnú prácu je možné rozdeliť na dve časti, pričom spoločným menovateľom je uplatnenie hydrofilnej interakčnej kvapalinovej chromatografie v oblasti glykoproteomickej analýzy.

Cieľom prvej časti dizertačnej práce bolo preskúmanie rôznych polárnych stacionárnych fáz používaných v hydrofilnej interakčnej kvapalinovej chromatografii a ich potenciálu separovať glykopeptidy a ich izoméry:

1. Testovanie a porovnanie troch stacionárnych fáz na separáciu glykopeptidov hemopexínu a imunoglobulínu G – stacionárna fáza obsahujúca päť hydroxylových skupín na viazanom ligandu, amidová stacionárna fáza a stacionárna fáza obsahujúca zwitterionmi modifikovaný silikagél. Charakterizácia daných stacionárnych fáz na účinnosť separácie glykopeptidov a ich izomérov, preskúmanie vplyvu teploty kolóny na účinnosť separácie.
2. Porovnanie separácie glykopeptidov imunoglobulínu G na reverznej fáze obsahujúcej oktadecylom modifikovaný silikagél a troch kolónach, obsahujúcich polárny sorbent v režimu hydrofilnej interakčnej kvapalinovej chromatografie – stacionárna fáza obsahujúca nemodifikovaný silikagél, silikagél modifikovaný polyhydroxylovým reťazcom a silikagél modifikovaný aminopropylovými skupinami. Preskúmanie potenciálu týchto, zatiaľ netestovaných polárnych stacionárnych fáz v glykoproteomickej analýze a porovnanie ich účinnosti na separáciu glykopeptidov.
3. Vývoj modelu na predikciu retenčného okna glykopeptidov v hydrofilnom interakčnom kvapalinovom móde na zamedzenie falošnej detekcie glykopeptidov v glykoproteomickej analýze.

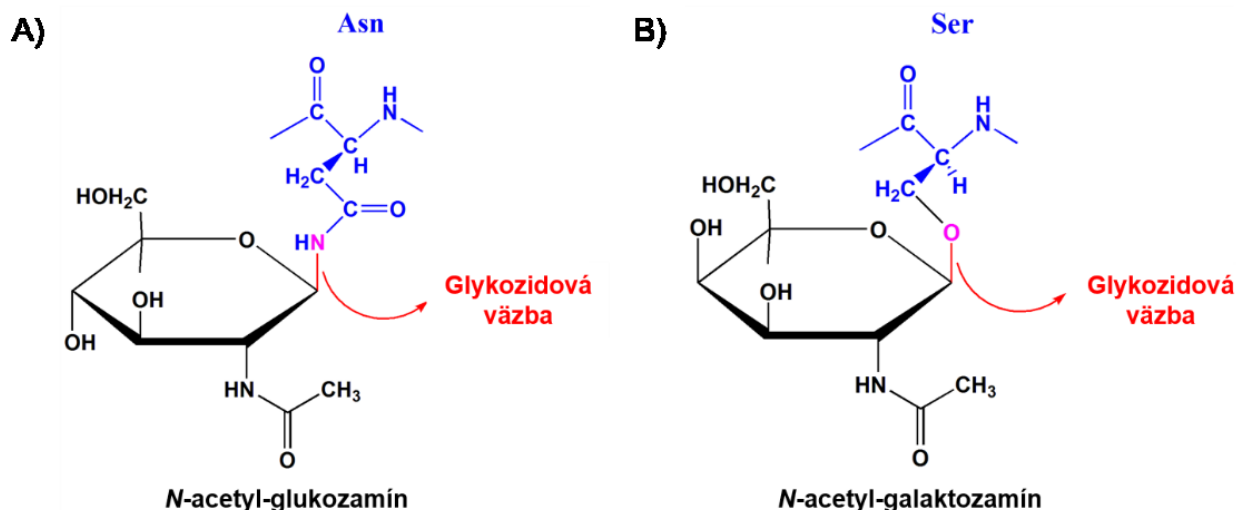
Cieľom druhej časti dizertačnej práce bolo štúdium obohatenia glykopeptidov imunoglobulínu G pomocou extrakcie tuhú fázou na polárnych stacionárnych fázach v režime hydrofilnej interakčnej kvapalinovej chromatografie a preskúmanie vplyvu experimentálnych podmienok na účinnosť obohatenia.

2 LITERÁRNY PREHĽAD

2.1 Glykoproteíny

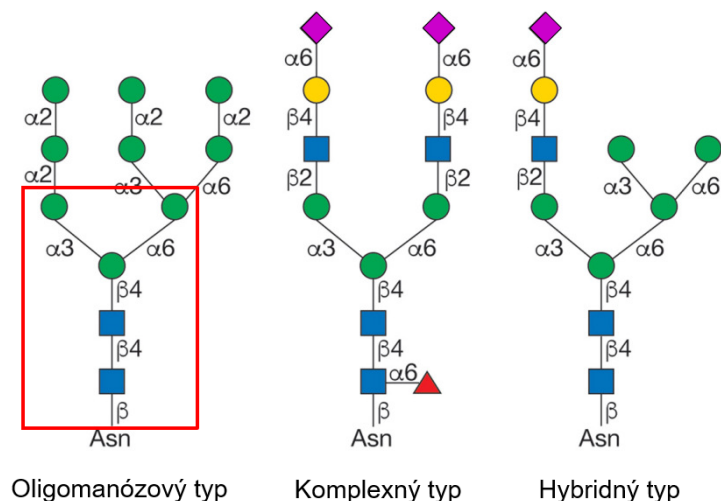
Glykozylácia proteínov je jedna z najvýznamnejších a najviac vyskytujúcich sa posttranslačných modifikácií proteínov [1]. Glykozylácia bielkovín je zložitý, enzymaticky riadený proces pri ktorom sú oligosacharidové jednotky, tiež nazývané glykány, pripojené k proteínovému základu [2]. Glykozylácia sa vyskytuje v baktériách, archebaktériách a v eukaryotoch, hoci proces glykozylácie a štruktúra glykánov naviazaných na polypeptidový reťazec sú v každom organizme značne odlišné [3]. Predpokladá sa, že viac ako 50% ľudských proteínov je glykozylovaných [4], [5]. Proces glykozylácie začína v endoplazmatickom retikule počas syntézy bielkovín v ribozóme. Glykány sú pridané ešte na nezbalené proteíny nachádzajúce sa v translokone, čo naznačuje možnosť, že pripojenie glykánov má vplyv na správne zbalenie proteínov [6]. Glykoproteíny je možné klasifikovať do dvoch skupín, na základe miesta pripojenia glykánov k proteínu. V prípade *N*-glykozylácie, ktorá sa najčastejšie vyskytuje v organizmoch, sú glykány pripojené na zvyšok asparagínu (Asn) (Obr. 1A), *O*-glykozylácia prebieha pripojením glykánov na molekulu serínu (Ser) alebo threonínu (Thr) (Obr. 1B). Predpokladom úspešnej *N*-glykozylácie je prítomnosť aminokyselinovej sekvencie pozostávajúcej z Asn-Xxx-Ser/Thr motívu, kde Xxx môže byť akákoľvek aminokyselina okrem prolínu [7].

Najvýznamnejšie glykány vyskytujúce sa v živočíšnych organizmoch sú *N*-acetylglukózamín, manóza, galaktóza, fukóza, kyselina *N*-acetylneuramínová (tiež nazývaná sialová kyselina) [8]. V rastlinách sa ďalej často vyskytuje xylóza, ktorá ale nie je prítomná v glykozylačnom profile cicavcov [9].



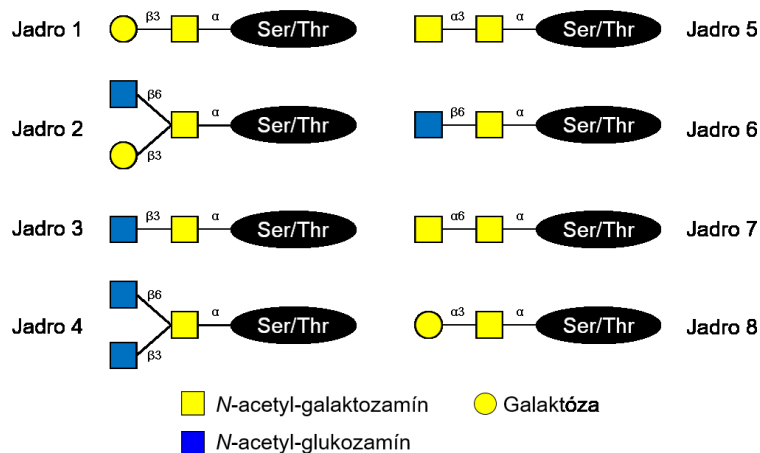
Obrázok 1 Schematické znázornenie *N*- a *O*-glykozylácie (prevzaté a upravené z [10]).

Štruktúra *N*-glykánov obsahuje základnú kostru, ktorá pozostáva z dvoch molekúl *N*-acetyl-glukozamínov a troch molekúl manóz (Obr. 2). Pripojením ďalších monosacharidových jednotiek k tomuto jadru vznikajú 3 základné typy *N*-glykánov: oligomannózový, komplexný a hybridný typ. Oligomannózový typ je najstarším typom *N*-glykánov, obsahuje 5 až 9 molekúl manóz pripojených k jadru, ale vyskytujú sa aj štruktúry s 20 manózami (typické pre kvasinky). Jednotlivé manózy môžu byť prepojené pomocou väzby $\alpha 3$ (ďalej sa nevetví) a $\alpha 6$ (dochádza k vetveniu) [11], [12]. Komplexné typy glykánov obsahujú ako na $\alpha 3$ -, tak aj na $\alpha 6$ -viazaných manózových zvyškoch ešte pripojené molekuly *N*-acetyl-glukozamínu, na ktoré môžu byť ďalej napojené monosacharidové jednotky ako galaktóza alebo sialová kyselina. Navyše, jadro môže byť fukozylované [13]. Hybridný typ *N*-glykánov vzniká kombináciou oligomannózového a komplexného typu: na $\alpha 3$ rameno manózy sa viaže komplexný typ *N*-glykánu, zatiaľ čo $\alpha 6$ rameno je rozšírené iba manózovými zvyškami [13], [14].



Obrázok 2 Základné typy *N*-glykánov pripojených na molekulu Asn, červeným oblňníkom je označené jadro. Symboly: ■ *N*-acetyl-glukozamín; ● Manóza; ● Galaktóza; ► Fukóza; ◆ Sialová kyselina (prevzaté a upravené z [1]).

Na rozdiel od *N*-glykozylácie, v prípade *O*-glykozylácie neexistuje žiadny peptidový motív, ktorý by určoval miesto pripojenia glykánov. Navyše, *O*-glykány obsahujú menší počet monosacharidových jednotiek [15]. Najčastejšie sa vyskytujúcim typom *O*-glykozylácie sú tzv. mucíny, pre ktoré je charakteristické pridanie monosacharidových jednotiek na molekulu *N*-acetyl-galaktózamínu pripojenej k hydroxylovej skupine Ser alebo Thr (Obr. 3). Základne jadro *O*-glykánových štruktúr môže obsahovať ďalšie monosacharidové jednotky, ako je *N*-acetyl-glukozamín, fukóza a sialová kyselina [16].



Obrázok 3 Základné typy *O*-glykánov pripojené na molekulu Ser alebo Thr. Symboly: ■ *N*-acetyl-glukozamín; ■ *N*-acetyl-galaktózamín; ● Galaktóza (prevzaté a upravené z [15]).

2.2 Funkcia glykoproteínov

Glykoproteíny zohrávajú kľúčovú úlohu v mnohých biologických procesoch. Nielenže ovplyvňujú zbaľovanie a degradáciu bielkovín, stabilizujú ich štruktúru, ale zúčastňujú sa v procesoch bunkovej signalizácie, v imunitnej odpovedi, v molekulárnom transporte a tiež ovplyvňujú interakcie medzi hostiteľom a patogénom [17 – 20]. *O*-glykoproteíny zabezpečujú správne zvlhčenie, sprostredkované najmä prítomnosťou sialovej kyseliny, vďaka ktorej dochádza k zmene celkového náboja a rozpustnosti glykoproteínu. Mucíny tvoria vysoko hydratované a lubrikačné vrstvy, ktoré chránia epitel pred dehydratáciou a pred napadnutím patogénmi [21], [22], [23].

Zmeny v glykozylačnom profile sú čoraz častejšie používané ako biomarkéry na sledovanie rôznych ochorení. Glykoproteíny ovplyvňujú základné mechanizmy molekulárnych a bunkových procesov v oblasti biológie rakoviny. Tieto funkcie zahŕňajú bunkovú signalizáciu, invazivitu nádorových buniek, ich šírenie do iných miest organizmu (metastázovanie), imunitnú moduláciu, angiogézu a interakciu s bunkovým matrixom [24]. Z toho dôvodu je stále zreteľnejší záujem o glykoproteíny ako potenciálny nástroj na odhalenie onkologických ochorení v ich raných štádiách a na monitorovanie ich ďalšieho priebehu [25]. Výhodou biomarkérov založených na glykoproteínoch je možnosť ich stanovenia z krvi (plazma, sérum), z iných telesných tekutín alebo zo vzoriek tkaniva, ktoré je možné získať pomocou minimálne invazívnej biopsie [26]. Zmeny v glykozylačnom profile v prípade onkologických ochorení sa preukazujú najmä zvýšenou či zníženou koncentráciou, alebo úplnou stratou špecifických glykoforiem [27]. Bolo preukázané, že zvýšené zastúpenie fukozylovaných glykoproteínov je možné použiť v prípade hepatocelulárneho karcinómu [28], rakoviny prsníka [29], rakoviny vaječníkov [30] a v prípade rakoviny pľúc [31]. Aberantná sializácia je taktiež výrazným znakom mnohých typov rakoviny [32]. Hypersialyzácia a prítomnosť krátkych foriem *O*-glykánov bola pozorovaná v prípade rakoviny prostaty [33], kolorektálneho karcinómu [34] a v prípade chronickej lymfatickej leukémie [35]. Zmeny v glykozylácii boli tiež spojené s cukrovkou [36], Alzheimerovou chorobou [37], reumatickými chorobami [38] a s vrodenými chorobami imunitného systému [39].

V poslednej dekáde sa zvýšil záujem o bioliečivá založené na glykoproteínoch. Vďaka glykozylácii majú terapeutické proteíny vyššiu špecifitu, lepšiu biologickú dostupnosť, sú stabilnejšie a majú dlhší poločas rozpadu [40]. Glykopeptidové antibiotiká (vankomycín, teikoplanín, telavancín, oritavancín, dalbavancín) vykazujú antibakteriálnu

aktivitu voči grampozitívnym organizmom prostredníctvom inhibície syntézy bunkovej steny [41]. Monoklonálne protilátky (imunoglobulíny obsahujúce glykozyláciu v Fc regióne) sa využívajú najmä v protirakovinových liečbach [42 – 45]. Komerčne sú dostupné liečivá s aktívnou látkou trastuzumab [46], erytropoetín [47] a bevacizumab [48].

2.3 Analýza glykoproteínov

Analýza glykoproteínov je zložitá a náročná úloha aj napriek dostupným moderným bioanalytickým metódam. Vývoj nových, a optimalizácia už existujúcich bioanalytických metód je prioritná úloha kvôli zabezpečeniu správnej kvality výroby bioliečiv a výskumu nových biomarkérov. Analýzu glykoproteínov sťažuje hlavne vysoká mikro- a makroheterogenita glykoproteínov [49]. Makroheterogenita spočíva v štrukturálnej diverzite glykoproteínov vznikajúca v dôsledku prítomnosti alebo neprítomnosti glykánů na špecifickom mieste v proteíne (ani špecifická peptidová sekvencia nezaručuje glykozyláciu), pričom ako mikroheterogenita sa označuje štrukturálna rozmanitosť glykoproteínu kvôli prítomnosti rôznych glykánových štruktúr pripojených na glykozylačné miesto [50]. Navyše, jednotlivé glykány môžu byť prepojené rôznymi väzbami a proteínová sekvencia tiež obsahuje vysokú mieru diverzity [51]. Analýzu ďalej komplikuje nízka koncentrácia glykoproteínov v biologických vzorkách a ich nízka ionizačná účinnosť v porovnaní s neglykozylovanými peptidmi [52].

V (glyko)proteomickej analýze je najbežnejšie využívaným prístupom tzv. „bottom-up“ technika, ktorá charakterizuje a pracuje s kratšími sekvenciami (glyko)peptidov, ktoré boli získané pomocou enzymatického štiepenia (glyko)proteínov [53]. Existuje široká škála špecifických a menej špecifických enzýmov používaných na proteolytické štiepenie (glyko)proteínov. Medzi najznámejšie patrí trypsín, ktorý je najbežnejšie používaným enzýmom vďaka vysokej špecifickosti (proteínovú sekvenciu štiepi za molekulami arginínu alebo lyzínu), dostupnosti a účinnosti [54]. Ďalšie menej špecifické enzýmy používané v (glyko)proteomike sú chymotrypsín, Glu-C, Lys-C [55] alebo pronáza E (možná je aj ich kombinácia) [56]. Glykopeptidy získané pomocou proteolytického štiepenia je možné analyzovať dvoma prístupmi. Prvý využíva odštiepenie glykánů od peptidovej kostry, druhý analyzuje priamo glykopeptidy. Výhodou prvého zmieneneho prístupu je isté zjednodušenie analýzy kvôli zníženiu makroheterogenity glykánů, možnosť ďalšej modifikácie uvoľnených glykánů (derivatizácia, fluorescentné a kolorimetrické značenie) [57], [58], [59]. Nevýhodou odštiepenia glykánů od peptidu spočíva v strate informácie

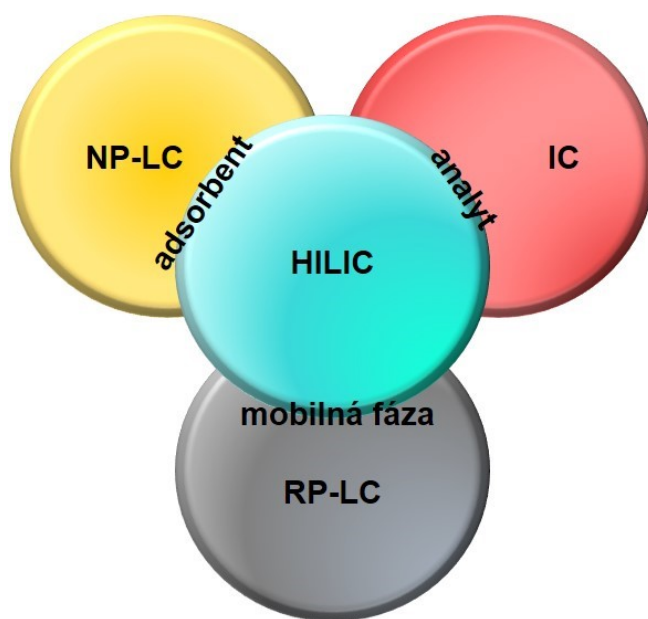
o glykozylačnom mieste a peptidovej sekvencii, ktorá je tiež nositeľom kľúčových informácií. Na odštiepenie *N*-glykánov sa používa *N*-glykozidáza F (PNGáza F), ktorá štiepi väzbu medzi molekulou Asn a *N*-acetyl-glukózamínom, bez ohľadu na veľkosť a štruktúru glykátu [60], [61]. V prípade *O*-glykozylácie, neexistuje žiadny univerzálny enzým slúžiaci na odštiepenie glykánov, preto sú odštiepené chemicky pomocou β -eliminácie [62], [63], [64]. Analýza odštiepených glykánov a intaktných glykopeptidov zvyčajne využíva vysokorozlišovaciu hmotnostnú spektrometriu (MS), ktorá však sama nie je schopná kvantifikácie glykánov a glykopeptidov, neposkytuje kompletne fragmentačné spektrá, a často neposkytuje úplnú štruktúrnu informáciu (nedokáže rozlíšiť jednotlivé izoformy glykánov), a preto je kombinovaná so separačnými technikami, najčastejšie s kvapalinovou chromatografiou (LC) a kapilárnou zónovou elektroforézou (CZE) [65], [66]. Vďaka širokej dostupnosti komerčných stacionárnych fáz, LC umožňuje glykoproteomickú analýzu v rôznych chromatografických módoch, medzi najbežnejšie používané patrí chromatografia na reverznej fáze (RP), hydrofilná interakčná kvapalinová chromatografia (HILIC) a chromatografia využívajúca stacionárne fázy na báze porézneho grafitového uhlíku (PGC).

2.3.1 Chromatografia na reverznej fáze v glykoproteomike

Separácia glykopeptidov na RP-LC najčastejšie prebieha na oktadecylom (C18) modifikovanej stacionárnej fáze. Navyše, nepolárne stacionárne fázy sa v glykoproteomike často používajú ako predbežný krok pred charakterizáciou pomocou MS, pričom tieto výskumy sa nesústreďujú na samotnú separáciu [67 – 71]. V separáciách na RP sa uplatňujú hlavne hydrofóbne interakcie peptidovej sekvencie so stacionárnou fázou s dodatočným vplyvom glykánovej časti [72]. Bolo preukázané, že zvýšením počtu neutrálnych glykánov (*N*-acetyl-glukozamín, manóza, galaktóza, fukóza) dochádza k zvýšeniu celkovej polarita glykopeptidu a tým dochádza k zníženiu retencie [73], [74]. Na druhú stranu, glykopeptidy obsahujúce sialovú kyselinu vykazujú silnejšiu interakciu s nepolárnou stacionárnou fázou, pravdepodobne kvôli neutralizácii pozitívneho náboja vznikajúceho na peptidovej sekvencii, čo vedie k ich neskoršej elúcii [75], [76], [77]. Hoci separácia glykopeptidov pomocou RP-LC je najčastejšie používaný chromatografický mód, nie je dostatočne účinný na separáciu glykoforiem naviazaných na rovnakú peptidovú kosť a tiež nie je vhodný na separáciu glykánových izomérov, ktoré sa líšia iba v polohe vetvenia a/alebo vo väzbe pripojených glykánov [78].

2.3.2 Chromatografia na polárnych stacionárnych fázach v HILIC móde

HILIC je alternatívnym chromatografickým módom k separáciám na nepolárnych stacionárnych fázach, ktorá je schopná separovať polárne látky. Táto chromatografická technika si našla svoje uplatnenie v analýze biofarmaceutík [79], potravín [80], kontaminantov životného prostredia [81], oligonukleotidov [82] a mimo iného v metabolomickej analýze [83]. HILIC je kombináciou troch hlavných chromatografických metód (viď Obr. 4). Stacionárna fáza používaná v HILIC separáciách má polárny charakter, podobne ako stacionárne fázy používané v chromatografii na normálnej fáze. Jedná sa o nemodifikovaný silikagél alebo silikagél s naviazanými polárnymi funkčnými skupinami ako sú diolové, amínové, amidové alebo zwitteriónové (ZIC) skupiny. Na druhú stranu, mobilná fáza používaná v HILIC separáciách sa zhoduje s mobilnou fázou používanou v RP móde, ide o zmes organického rozpúšťadla (najčastejšie metanolu alebo acetonitrilu) s vodou. Je možné použiť izokratickú alebo gradientovú elúciu, pričom počiatočná koncentrácia organickej zložky mobilnej fázy sa obvykle pohybuje nad 70–90%. Mobilná fáza môže obsahovať rôzne aditíva, ako napr. kyseliny, bázy a je možné použiť aj pufrované roztoky. V prípade, že stacionárna fáza obsahuje nabitú funkčnú skupinu, je možné HILIC použiť na separáciu ionizovateľných analytov – podobnosť s iónovou chromatografiou (IC) [84].



Obrázok 4 Znáznornenie kombinácie troch hlavných LC módov prítomné v HILIC separáciách (prevzaté a upravené z [84]).

Separáčny mechanizmus v HILIC móde je pomerne zložitý a bolo preukázané, že je kombináciou viacerých mechanizmov. Prvá teória navrhuje, že hlavným separáčnym mechanizmus je rozdeľovanie polárneho analytu medzi stacionárnou fázou, na ktorej je naadsorbovaná vrstva vody z mobilnej fáze, a medzi mobilnou fázou bohatou na organickú zložku [85]. Ďalej sa analyt môže priamo naadsorbovať na polárnu stacionárnu fázu prostredníctvom polárnych interakcií ako napr. vodíkové väzby, interakcie dipól-dipól alebo nešpecifických van der Waalsových síl [86]. V prípade, že stacionárna fáza a analyty sú nabité je možné pozorovať zmiešaný retenčný mód, ktorý kombinuje hydrofilné a iónovo-výmenné interakcie [87], [88].

Oproti separácii glykopeptidov v RP, v HILIC režime je ich zadržanie založená primárne na glykánovej časti s dodatočným vplyvom peptidovej kostry. So zvyšujúcim sa počtom monosacharidových jednotiek v glykopeptidoch sa zvyšuje ich hydrofilnosť, čo vedie k silnejšej retencii v HILIC móde. Navyše, HILIC je schopný separovať nielen polohové, ale aj glykánové izoméry líšiac sa vo väzbe [78], [89]. Súčasnú poznatky HILIC chromatografie v separácii odštiepených glykánov a intaktných glykopeptidov boli zhrnuté v našom prehľadovom článku, ktorý vedľa LC techník popisuje mimo iné aj využitie CZE v glykomike a glykoproteomike. Prehľadový článok je priložený na konci dizertačnej práce ako Príloha IV.

2.3.3 Separácia glykopeptidov v PGC

Posledný chromatografický mód bežne používaný na separáciu glykopeptidov využíva stacionárne fázy na báze PGC. V tomto prípade stacionárna fáza obsahuje plne porézne sférické častice, kým mobilná fáza je zmes vody (alebo pufru) a organického rozpúšťadla (acetonitril alebo metanol). Výhodou separácie na PGC je, že je schopná zadržať a separovať tak hydrofilné, ako aj hydrofóbne analyty. Polárne analyty sú separované na základe „polárnej retencie na grafit“ (PREG), pričom so zvyšujúcou sa polaritou analytov dochádza k vyššej afinite k povrchu grafitu [90]. Navyše kvôli plochej štruktúre PGC stacionárnej fázy, retencia je tiež ovplyvnená 3D štruktúrou analytov [91].

Počiatky separácie glykopeptidov na PGC zasahujú do 90. rokov, keď výskumný tím Daviesa prvýkrát separoval glykopeptidy fetuínu na HyperCarb kolóne [92], [93]. Zaujímavé výsledky dosiahol Fan a kol., ktorý porovnal separáciu glykopeptidov ribonukleázy B (RNase B), ktorá bola naštiepená pomocou pronázy na nepolárnej C18 a na PGC kolóne. Glykopeptidy s krátkou aminokyselinovou sekvenciou neboli vôbec zadržané na C18 kolóne, na druhú stranu boli úspešne separované na PGC. Taktiež pozorovali vplyv

peptidovej kostry na retenčné chovanie, kde sa retencia hydrofóbných glykopeptidov obsahujúcich dlhé peptidové sekvencie vykazovali silnejšiu interakciu s PGC kolónou a dokázali, že peptidová kostra má významnejší vplyv na separáciu ako majú glykány [94]. Hoci bolo preukázané, že PGC je schopný separácie glykopeptidových izomérov [95 – 98], poskytuje nižšiu reprodukovateľnosť rozlíšenia a retenčných časov a má horšiu robustnosť v porovnaní so separáciou na kolónach HILIC [99]. V prípade PGC separácie bola najčastejšie skúmaná separácia glykopeptidov a glykopeptidových izomérov hovädzieho laktoserínu, kappa kazeínu a hovädzieho fetuínu (obsahujú ako *N*-, tak aj *O*-glykozylačné miesta) [95], RNase B, ľudského vitronectínu, monoklonálnych protilátok a prostaticky špecifického antigénu [97]. Bolo preukázané, že teplota kolóny v PGC chromatografii má významný vplyv na účinnosť separácie glykopeptidových izomérov. Zhu a jeho výskumná skupina skúmala separáciu dvojramennej glykoformy s dvoma sialovými kyselinami hovädzieho fetuínu, kde zistili, že so zvyšujúcou sa teplotou kolóny (z 25 °C na 75 °C) došlo k separácii izomérov, ktoré sa líšili v type väzby (sialová kyselina pripojená väzbou α 3 alebo α 6) [98].

Podrobne sme sa separácii glykánov a glykopeptidov pomocou PGC venovali v našom prehľadovom článku (viď Príloha IV).

2.4 Obohatenie glykopeptidov

V glykoproteomike je v posledných rokoch vysoký záujem o obohacovacie techniky, slúžiace na zjednodušenie analýzy komplexných vzoriek glykopeptidov. Vďaka obohateniu častokrát dochádza k odstráneniu neglykozylovaných peptidov, ktoré potlačujú ionizáciu glykopeptidov a tým dochádza k zvýšeniu citlivosti detekcie, zjednodušeniu separácie a stanoveniu glykopeptidov [100]. Obohacovacie techniky možno kategorizovať na základe použitej metodológie do niekoľkých skupín. Patrí sem obohacovanie pomocou lektínov [101], metódy založené na tvorbe kovalentných interakcií [102], [103] alebo na chelatačných reakciách [104] a v neposlednom rade prečistenie glykopeptidov s využitím extrakcie pevnou fázou (SPE), ktorá operuje v HILIC režime [105].

2.4.1 Obohatenie glykopeptidov pomocou lektínovej chromatografie

Lektíny sú proteíny, ktoré sú schopné špecificky rozpoznať a reverzibilne viazať glykánové štruktúry naviazané na peptidy, vďaka čomu je ich možné použiť na izoláciu, prečistenie a charakterizáciu glykopeptidov [101]. Lektínová afinitná chromatografia využíva lektíny, ktoré sú imobilizované na pevnom nosiči, napríklad na agaróze. Glykopeptidy obsahujúce glykánové štruktúry s afinitou k danému lektínu sa na ne reverzibilne viažu, čo umožňuje ich selektívnu separáciu, pričom neinteragujúce látky sa nezadržujú. Následne, zadržané glykopeptidy sú vymyté pomocou špecifických pufov [106], [107], [108]. Najbežnejšie používanými lektínmi sú konkanavalín A (Con A), ktorý špecificky viaže oligomanóзовé glykopeptidy a glykopeptidy hybridného typu [109] alebo lektíny izolované z bazy čiernej, ktoré sú schopné viazať glykopeptidy s fukózou a sialovou kyselinou [110]. Nevýhodou obohatenia glykopeptidov pomocou lektínov spočíva v tom, že jeden lektín je schopný viazať iba jeden špecifický typ glykánov a existuje iba malé množstvo lektínov, ktoré by boli schopné viazať *O*-glykány [111].

2.4.2 Obohatenie glykopeptidov na základe kovalentných interakcií

Do tejto skupiny sa radia metódy založené na reakciách s hydrazidom [102], [112], [113] a metódy založené na interakciách s kyselinou boritou [103], [114], [115]. Základom prvej zmienenej metódy je oxidácia sacharidových *cis*-diolových skupín na aldehydy pomocou jodistanu. Následne sa vytvorí hydrazónová väzba medzi vzniknutým aldehydom a hydrazidom, ktorý je ukotvený na pevnom nosiči, pričom neglykozylované proteíny sú z nosiča vymyté. Zadržané glykoproteíny sú podrobené proteolýze a *N*-glykozylované peptidy sú uvoľnené pomocou PNGasy F. Hoci táto metóda je vhodná na zachytenie *N*- a *O*-glykopeptidov, analýza obohatených glykopeptidov sa obmedzuje na *N*-glykopeptidy, pretože neexistuje dostatočne špecifický a účinný enzým slúžiaci na uvoľnenie *O*-glykopeptidov. Navyše, tento spôsob obohatenia neposkytuje informácie o glykánovej štruktúre a stupni obsadenosti glykozylačného miesta [116].

Metódu založenú na interakcii s kyselinou boritou je možné použiť na obohatenie glykopeptidov obsahujúcich manózu, galaktózu a glukózu na základe tvorby kovalentnej väzby medzi *cis*-diolovými skupinami a kyselinou boritou, s ktorou môžu byť funkcionalizované rôzne materiály. Výhodou tejto metódy je, že boronátové estery sa tvoria iba pri vysokej hodnote pH a zmenou prostredia je možné reakciu zvrátiť, čo sa využíva na

uvoľnenie glykopeptidov [117]. Nevýhodou tejto metódy spočíva v nízkej špecifite obohatenia, pretože zlúčeniny obsahujúce *cis*-diolové skupiny, ako napr. nukleotidy, môžu byť tiež zachytené, čo obmedzuje a komplikuje analýzu glykopeptidov [118].

2.4.3 Obohatenie glykopeptidov pomocou chelatačných reakcií

Afinitné reakcie s iónmi kovov sú využívané pre analýzu a obohatenie biomolekúl s jedinečnými iónovo- alebo ligandovo-výmennými vlastnosťami, ako sú fosforylované a glykozylované peptidy [104]. Táto metóda využíva tvorbu koordinačnej väzby medzi neobsadeným orbitálom na ióne kovu (upevnený na tuhom nosiči) a neväzbovým elektrónovým párom z atómu kyslíka (v karboxylátových alebo hydroxylových skupinách) alebo atómu dusíka (v amínových skupinách) na glykáne. Okrem toho môže afinitu ovplyvniť aj elektrostatická interakcia medzi záporne nabitými glykánmi a pozitívne nabitými iónmi na povrchu nosiča, čo je možné využiť na obohatenie glykánov obsahujúcich sialovú kyselinu. Najbežnejšie materiály používané na obohatenie glykopeptidov pomocou chelatačnej reakcie využívajú oxid titaničitý, oxid zirkoničitý a nanočastice na základe striebra [119].

2.4.4 Obohatenie glykopeptidov pomocou SPE-HILIC

Ďalšou sľubnou technikou na prečistenie a obohatenie glykopeptidov je SPE využívajúca HILIC princíp. Rovnako ako v HILIC chromatografii, aj v tomto prípade je stacionárna fáza polárna (nemodifikovaný alebo modifikovaný silikagél), pričom mobilná fáza je zmes vody (alebo pufru) s vysokým obsahom organického rozpúšťadla s možnosťou prídavku modifikátoru mobilnej fázy. Hlavná výhoda SPE-HILIC spočíva v jeho vysokej selektivitě voči glykozylovaným peptidom, ktoré sú prednostne zadržané na polárnej stacionárnej fáze [105], v jeho schopnosti pracovať s glykánom, ktorý je stále pripojený k peptidu, umožňujúc súčasnú analýzu glykozylačného miesta, glykánu a peptidu [119]. Okrem toho je schopná obohatiť *N*- a *O*-glykopeptidy [120] a používa mobilnú fázu kompatibilnú s MS detekciou [121]. Stacionárne fázy používané na obohatenie glykopeptidov zahrňujú ZIC-HILIC [122 – 126], nemodifikovanú vatu [105], [127] alebo vatu v kombinácii s ZIC materiálom [128], materiály na báze sacharidov [129], [130] alebo na báze nanočastíc modifikovaných amínovými a ZIC funkčnými skupinami [131], [132].

Bolo preukázané, že zloženie elučného roztoku pri obohacovaní glykopeptidov α 1-antitrypsínu a imunoglobulínu G (IgG) pomocou SPE-ZIC-HILIC má významný vplyv na účinnosť obohatenia. Alagesan a kol. porovnávali rôzne elučné rozpúšťadlá (metanol, etanol, izopropanol a acetonitril), kde zistili, že účinnosť obohatenia závisela nielen od použitého rozpúšťadla, ale aj od hydrofilnosti peptidového reťazca. Metanol bol nevhodný na obohatenie glykopeptidov s hydrofóbnou a hydrofilnou kostrou, etanol a izopropanol súčasne obohatili glykozylované a neglykozylované peptidy. Optimálne výsledky boli získané pri použití acetonitrilu [125]. Tento výskum poukazuje na dôležitosť ladenia experimentálnych podmienok využívajúcich SPE-HILIC obohatenie a hrajú kľúčovú rolu v účinnosti a selektivite obohatenia.

3 VÝSLEDKY A DISKUSIA – KOMENTÁRE K PUBLIKÁCIÁM

3.1 Štúdium precipitácie glykopeptidov závisiaca na typu pripojených glykánov v rozpúšťadlách s vysokým obsahom organického rozpúšťadla používaných v HILIC režime – Publikácia I

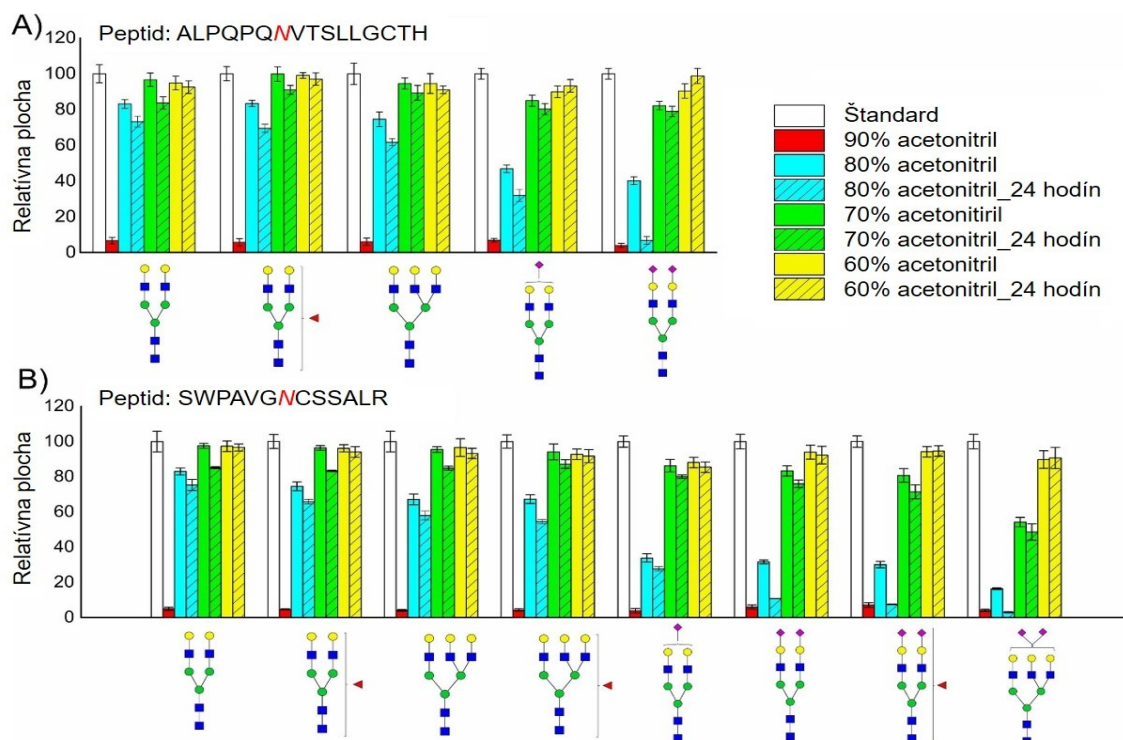
Táto práca študuje precipitáciu glykopeptidov v závislosti na typu pripojeného glykánu k peptidovej kostre v rozpúšťadlách s vysokým obsahom acetonitrilu. Základom tohto výskumu bolo štúdium, kde autori zistili, že niektoré glykopeptidy sú v HILIC móde menej zastúpené ako pri separáciách v RP móde [74]. Toto pozorovanie nás viedlo k hypotéze, že niektoré glykoformy majú obmedzenú rozpustnosť a toto štúdium poukazuje na dôležitosť zloženia rozpúšťadla vzorky v rozpúšťadlách používané v HILIC analýzach. Boli skúmané glykopeptidy hemopexínu s peptidovou kostrou SWPAVGNCSALR a ALPQPQNVTSLLGCTH a haptoglobínu s peptidmi VVLHPNYSQVDIGLIK a MVSHHMLTTGATLINEQWLLTTAK. Oba tieto glykopeptidy slúžia ako markéry hepatocelulárneho karcinómu [133], [134].

Glykopeptidy boli získané pomocou enzymatického štiepenia glykoproteínov hemopexínu a haptoglobínu, následne bola alikvótna časť desialyzovaná pomocou enzýmu α -2,3,6,8,9 neuraminidázy. Desialyzované a sialyzované vzorky boli zmiešané v pomere 1:1, vysušené a rozpustené v 2% acetonitrilu s 0,1% mravčou kyselinou. Táto vzorka slúžila ako referenčná, pretože za tieto podmienky sú glykopeptidy úplne rozpustené. Časť tejto vzorky bola zriedená acetonitrilom tak, aby boli získané vzorky s obsahom acetonitrilu 90, 80, 70 a 60% a s koncentráciou proteínu $0,05 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. Jedna sada vzoriek bola udržiavaná 10 minút pri izbovej teplote a druhá 24 hodín pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (bežná teplota v autosampleroch), okrem vzorky v 90% acetonitrile, ktorá bola testovaná len pri izbovej teplote. Vzorky boli následne odstredené a päťkrát zriedené 2 % acetonitrilom s 0,1% mravčou kyselinou.

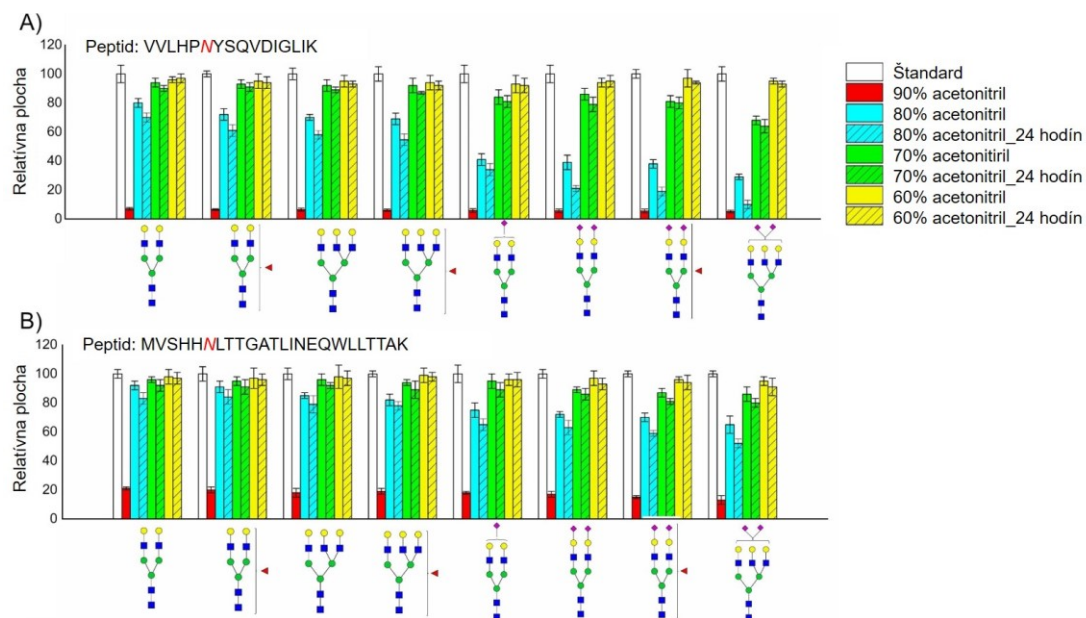
Relatívne plochy píkov boli spočítané ako plocha píkov špecifickej glykoformy glykopeptidu rozpustenej v rozpúšťadle s vysokým obsahom acetonitrilu vydelená zodpovedajúcou plochou píku v referenčnej vzorke a vynásobená 100. Na Obr. 5 sú vidieť nasledovné trendy pre glykopeptidy hemopexínu: (1) vysoká precipitácia všetkých glykopeptidov v 90% acetonitrilu; (2) so zvyšujúcim sa počtom neutrálnych glykánov sa zvýšila precipitácia z dôvodu vyššej hydrofilicite glykopeptidu v 80% acetonitrile;

(3) znížená rozpustnosť glykopeptidov pri skladovaní vzoriek pri 4 °C počas 24 hodín, čo je spôsobené nižšou rozpustnosťou glykopeptidov pri nižšej teplote; (4) signifikantný vplyv sialovej kyseliny na rozpustnosť glykopeptidov. Prítomnosť sialovej kyseliny v glykánovom reťazci znížila rozpustnosti glykopeptidov v rozpúšťadle s vyšším obsahom acetonitrilu, s najväčšou pravdepodobnosťou z dôvodu vyššej polarita sialovej kyseliny ($\log P = -3,5$) v porovnaní s neutrálnymi monosacharidmi, napr. galaktóza ($\log P = -2,6$) alebo fukóza ($\log P = -2,4$) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>). Okrem pripojeného glykánu, peptidová kostra mala tiež vplyv na rozpustnosť glykopeptidov, čo sa prejavilo v odlišnej rozpustnosti sialyzovaných glykopeptidov hemopexínu SWPAVGNCSALR a haptoglobínu VVLHPNYSQVDIGLIK (viď Obr. 6A), ktoré vykazovali nižšiu rozpustnosť ako sialyzované glykopeptidy s ALPQPQNVTSLLGCTH peptidovou kistrou pravdepodobne kvôli celkovo vyššej polarita glykopeptidu. Na druhú stranu študované glykopeptidy haptoglobínu s peptidovou kistrou MVSHHMLTTGATLINEQWLLTTAK vykazovali vyššiu rozpustnosť ako ostatné študované glykopeptidy, pravdepodobne z dôvodu vyššej hydrofobicity peptidového reťazca.

Na základe vyššie uvedených pozorovaní rozpustnosť glykopeptidov vo vysokom obsahu acetonitrilu v rozpúšťadle vzorky závisí ako od typu pripojeného *N*-glykánu, tak aj od polarita peptidového reťazca. Toto zistenie je podstatné pre HILIC chromatografiu, kde rozpustenie vzorky vo vyššom obsahu acetonitrilu je žiadané, ale môže viesť k stratám analytov v dôsledku precipitácie. Táto precipitácia môže ovplyvniť kvantifikáciu glykopeptidov, čo je veľmi dôležitá napríklad pri výskume biomarkérov.



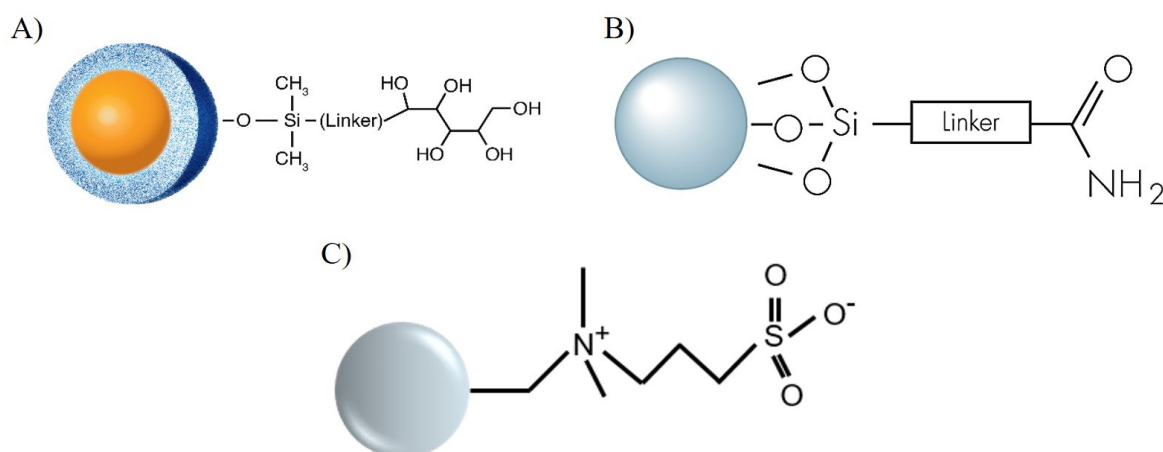
Obrázok 5 Vplyv koncentrácie acetonitrilu v rozpúšťadle vzorky na precipitáciu glykopeptidov hemopexínu s peptidovou kostrou SWPAVGNCSSALR (A) a ALPQPQWTSLLGCTH (B). Popis symbolov vid' na Obr. 2. Tieto výsledky sú súčasťou Publikácie I.



Obrázok 6 Vplyv koncentrácie acetonitrilu v rozpúšťadle vzorky na precipitáciu glykopeptidov haptoglobínu s peptidovou kostrou VVLHPMYSQVDIGLIK (A) a MVSHHMLTTGATLINEQWLLTTAK (B). Popis symbolov vid' na Obr. 2. Tieto výsledky sú súčasťou Publikácie I.

3.2 Porovnanie rôznych HILIC stacionárnych fáz v separácii glykopeptidov hemopexínu a IgG a ich izomérov – Publikácia II

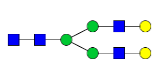
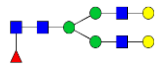
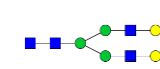


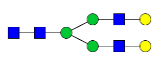

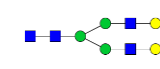
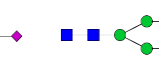
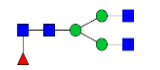
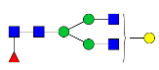
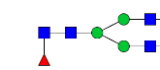
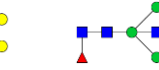


Druhá publikácia je zameraná na porovnanie rôznych HILIC stacionárnych fáz na separáciu glykopeptidov hemopexínu a IgG a ich izomérov. Ako už bolo zmienené, hemopexín je preukázaným biomarkérom onkologických ochorení a IgG je najdôležitejšou protilátkou v ľudskom tele [135]. V rámci práce boli porovnané tri stacionárne fázy, HALO[®] penta-HILIC (2,1 × 150 mm; 2,7 μm; Advanced Materials Technology, Wilmington, Delaware, Spojené štáty), Glycan Amide s technológiou etylénom premostených hybridných (BEH) častíc (2,1 × 150 mm; 1,7 μm; Waters Corporation, Milford, Massachusetts, Spojené štáty) a SeQuant ZIC-HILIC (2,1 × 150 mm; 3,5 μm; Merck, Darmstadt, Nemecko). Štruktúra stacionárnych fáz je zobrazená na Obr. 7.



Obrázok 7 Štruktúra HILIC stacionárnych fáz použitých na separáciu glykopeptidov hemopexínu a IgG. HALO[®] penta-HILIC (A), Glycan BEH Amide (B) a ZIC-HILIC (C) (prevzaté a upravené z [136], [137], [138]).

Všetky merania boli prevedené na kvapalinovom chromatografu Agilent 1290 Infinity II s binárnou gradientovou pumpou (Agilent Technologies, Nemecko) spojeným s vysokorozlišovacím hmotnostným spektrometrom Bruker maXis qTOF (Bruker, Nemecko) s elektro-sprejovou ionizáciou. Merania boli prevedené v dátovo závislom móde, pričom fragmentovaných bolo päť najintenzívnejších prekursorov. Na fragmentáciu bola použitá kolízne indukovaná disociácia (CID) s použitím kolíznej energie 35-70 eV. V tabuľke 3.2.1 sú uvedené študované glykopeptidy a ich skratky.

Tabuľka 3.2.1. Študované glykopeptidy hemopexínu a IgG. Popis symbolov vid' na Obr. 2.

Hemopexín	
SWPAVGN ¹⁸⁷ CSSALR	    
ALPQPQN ⁴⁵³ VTSLGCTH	   
IgG	
EEQYN ¹⁸⁰ STYR (IgG1)	   
EEQFN ¹⁷⁶ STFR (IgG2)	 

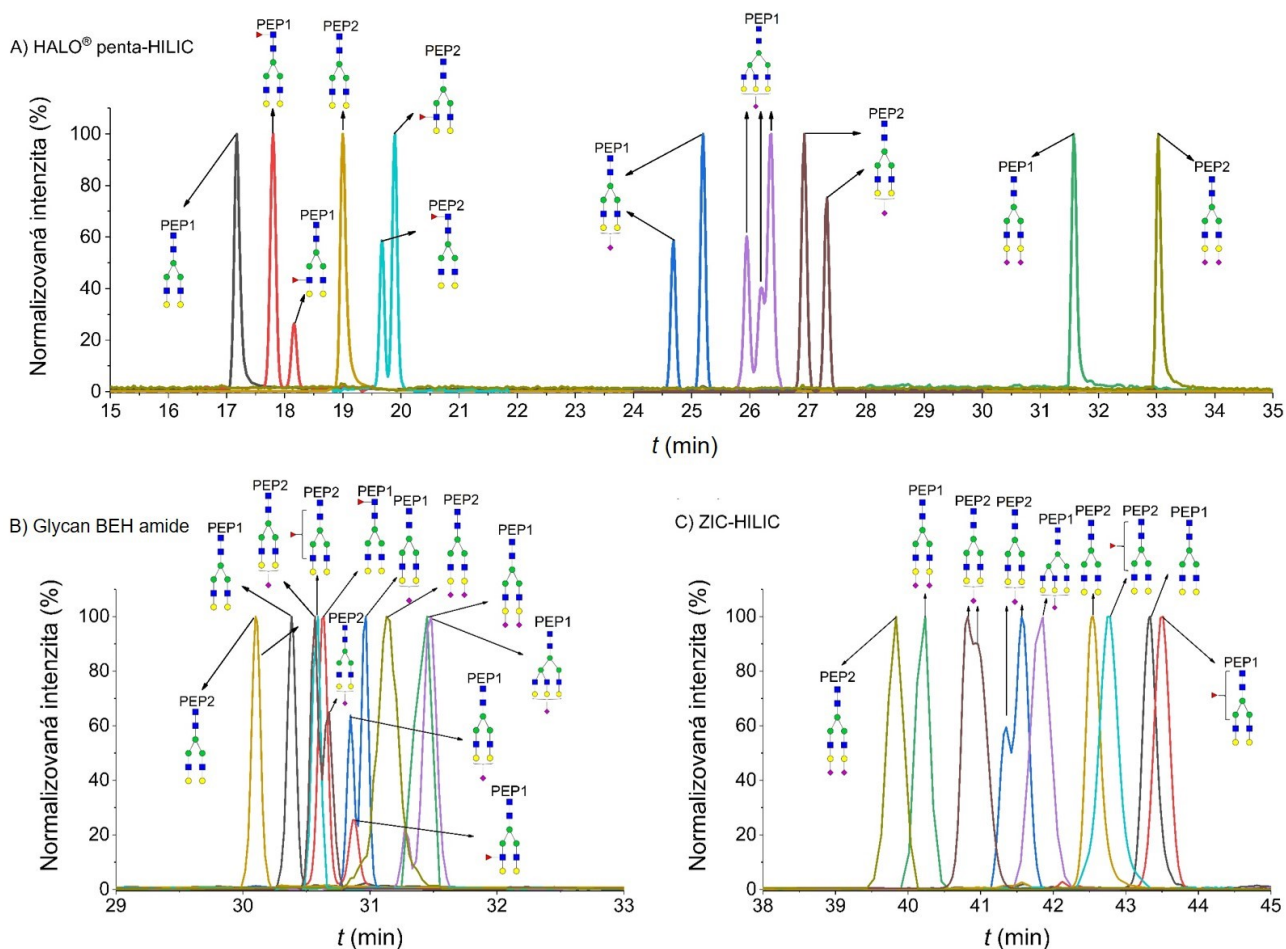
V tabuľke 3.2.2 sú uvedené optimalizované gradienty použité na separáciu glykopeptidov. V prípade Glycan BEH amidovej a HALO[®] penta-HILIC kolóny bolo možné použiť rovnaký gradientový program, ale v prípade ZIC-HILIC kolóny bolo potrebné použiť pomalší gradient, aby bola dosiahnutá čo najlepšia separácia glykopeptidov. Prietok mobilnej fázy bol 0,3 mL min⁻¹ a kolóna bola vyhrievaná na 40 °C (ak nie je uvedené inak).

Tabuľka 3.2.2 Gradientové profily použité na separáciu glykopeptidov. Zložka B je acetonitril s 0,1% mravčou kyselinou.

HALO [®] penta-HILIC a Glycan BEH amide		SeQuant ZIC-HILIC	
Čas (min)	B (%)	Čas (min)	B (%)
0	80	0	80
10	90	10	80
25	65	35	65
35	50	45	40
40	40	55	40
43	80	58	40
55	80	70	80

3.2.1 Separácia glykopeptidov hemopexínu a jeho izomérov

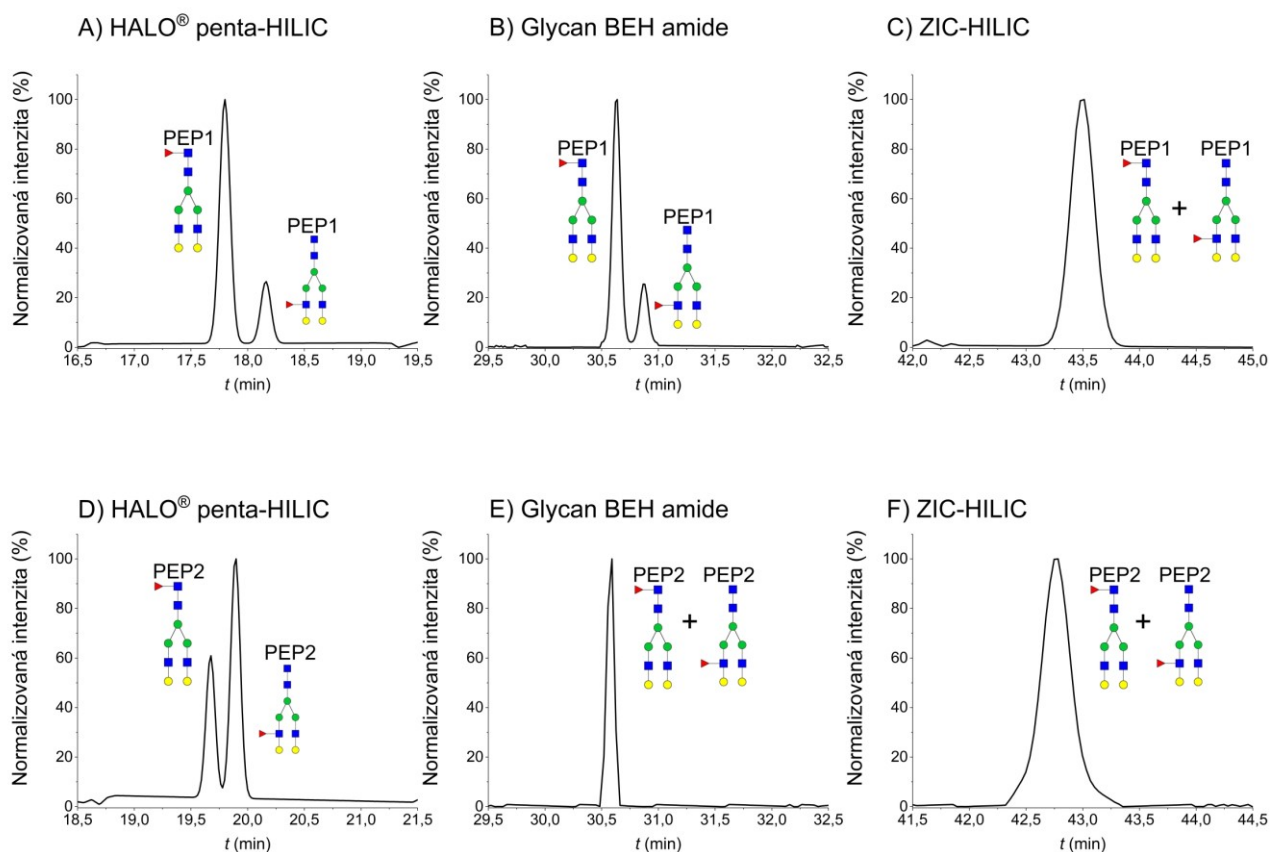
V prípade hemopexínu sme skúmali dve glykozylačné miesta, a to SWPAVGN¹⁸⁷CSSALR (označené ako PEP1) a ALPQPQN⁴⁵³VTSLGCTH (označené ako PEP2). Kozlík a kol. potvrdili, že glykopeptidy SWPAVGN¹⁸⁷CSSALR sú viac hydrofóbne ako glykopeptidy s ALPQPQN⁴⁵³VTSLGCTH peptidovou kostrou, a tým vykazujú slabšiu interakciu s polárnou HALO[®] penta-HILIC a HALO[®] HILIC stacionárnou fázou, čo vedie k ich rýchlejšej elúcii z kolóny [74], [78]. Tento trend sme pozorovali v prípade separácie glykopeptidov na kolóne HALO[®] penta-HILIC (Obr. 8A). Zo získaných chromatogramov je vidieť, že v prípade použitia kolóny HALO[®] penta-HILIC glykopeptidy hemopexínu eluovali v širokom retenčnom okne 17,0-33,5 min. Ako už bolo zmienené, v prípade HILIC separácie zadržanie glykopeptidov je hlavne ovplyvnené naviazaným glykánom. Z toho dôvodu na HALO[®] penta-HILIC kolóne najnižšiu retenciu vykazovala glykoforma A2G2, po ktorej eluovala glykoforma s naviazanou fukózou A2G2F1, ktorá zvýšila celkovú polaritu glykopeptidu. Navyše, sialyzované glykopeptidy vykazovali silnú interakciu so stacionárnou fázou, pravdepodobne kvôli prítomnosti piatich hydroxylových skupín na stacionárnej fáze (vid' Obr. 7), ktoré môžu poskytovať silnejšiu vodíkovú interakciu so skupinou karboxylových kyselín zvyškov sialových kyselín, čo viedlo k ich silnejšiemu zadržaniu [78]. V prípade separácie glykopeptidov hemopexínu na amidovej stacionárnej fáze sme pozorovali užšie retenčné okno glykopeptidov (30,0-31,5 min) a odlišnú selektivitu, pretože glykoforma A2G2 s peptidovou kostrou ALPQPQN⁴⁵³VTSLGCTH eluovala ako prvá, pričom na HALO[®] penta-HILIC kolóne vykazovala silnejšiu interakciu so stacionárnou fázou a eluovala ako druhá. Navyše, retenčné časy sialyzovaných glykopeptidov sa výrazne nezvýšili. Na ZIC-HILIC kolóne sme pozorovali najnižšie retenčné časy sialyzovaných glykopeptidov, v dôsledku elektrostatického odpudzovania medzi záporne nabitou sulfobetainovou funkčnou skupinou stacionárnej fázy a záporne nabitými sialovými skupinami glykánov. Z toho dôvodu ako prvé eluovali disialyzované glykopeptidy, po ktorých nasledovali monosialyzované a nakoniec neutrálne. Hoci glykopeptidy vykazovali najsilnejšiu interakciu so ZIC-HILIC kolónou spomedzi testovaných kolón, táto kolóna poskytovala najhoršiu separáciu glykoforiem hemopexínu.



Obrázok 8 Separácia glykopeptidov hemopexínu na kolóne HALO® penta-HILIC (A), Glycan BEH amide (B) a ZIC-HILIC (C). Ako PEP1 je označená peptidová kostra SWPAVGN¹⁸⁷CSSALR a ako PEP2 peptidová kostra ALPQPQN⁴⁵³VTSLLGCTH. Popis symbolov vid' na Obr. 2. Tieto výsledky sú súčasťou Publikácie II.

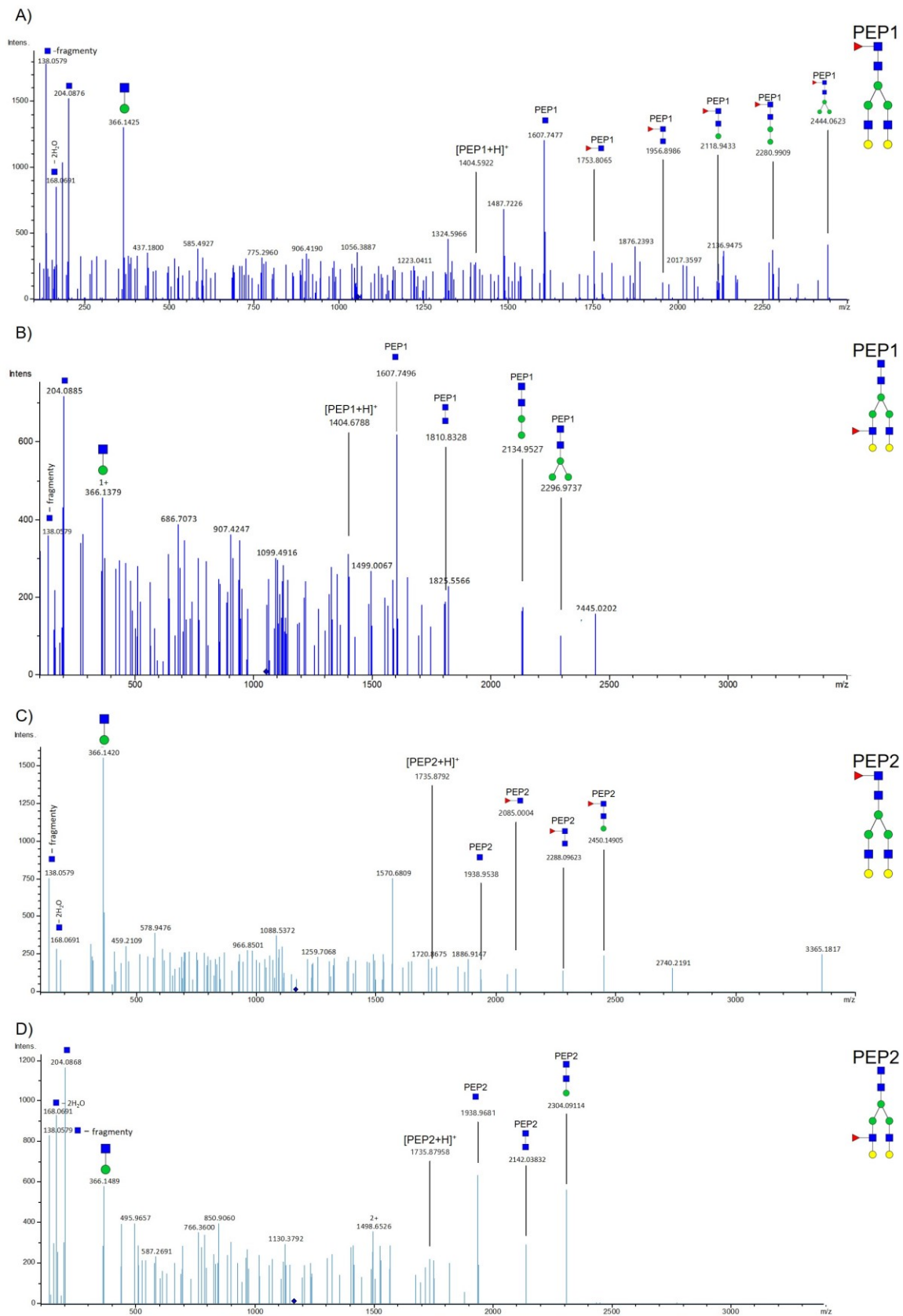
Následne sme skúmali potenciál HILIC kolón v separácii izoméryných glykoforiem hemopexínu. Bolo preukázané, že v prípade glykoformy A2G2F1 fukóza je naviazaná na jadre alebo na ramene [74]. Najlepšia separácia bola dosiahnutá na HALO® penta-HILIC kolóne (vid' Obr. 9A a D), ktorá bola schopná separovať tieto izoformy s rozlíšením $R = 1,99$ (v prípade SWPAVGN¹⁸⁷CSSALR glykopeptidu) a $R = 1,36$ (v prípade ALPQPQN⁴⁵³VTSLLGCTH). Na Glycan BEH amidovej kolóne sme získali rozlíšenie $R = 1,72$ s SWPAVGN¹⁸⁷CSSALR peptidovou kostrou, v prípade druhého sledovaného fukozylovaného glykopeptidu sme neboli schopní tieto dva izobarické glykoformy separovať (Obr. 9B a E). ZIC-HILIC kolóna nebola schopná oddeliť fukozylované izoformy

hemopexínu ani jednej sledovanej peptidovej kostry, ani napriek optimalizovanému gradientovému programu (Obr. 7C A F).



Obrázok 9 Separácia fukozylovaných glykoforiem hemopexínu s peptidovou kostrou SWPAVGM¹⁸⁷CSSALR (PEP1) a ALPQPQN⁴⁵³VTSLLGCTH (PEP2) na rôznych HILIC kolónach. Popis symbolov vid' na Obr. 2. Tieto výsledky sú súčasťou Publikácie II.

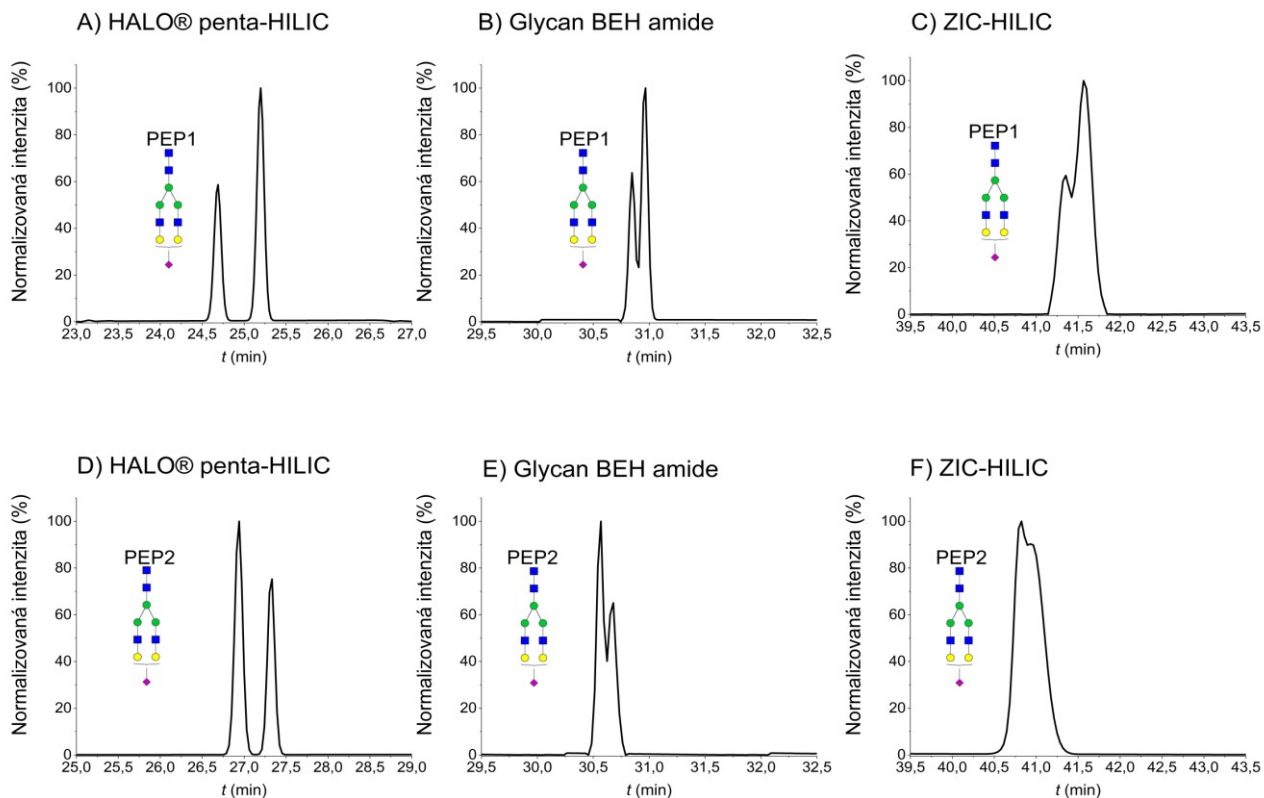
Jednotlivé chromatografické píky boli priradené ku izoformám na základe fragmentačných spektier (Obr. 10) za predpokladu, že v prípade napojenia fukózy na jadro glykánu je vo fragmentačnom spektre prítomný fragment m/z 1753,80 pre glykopeptid s SWPAVGM¹⁸⁷CSSALR kostrou (Obr. 10A) a m/z 2085,10 pre ALPQPQN⁴⁵³VTSLLGCTH glykopeptid (Obr. 10C). Tieto fragmenty neboli prítomné vo fragmentačných spektrách v prípade pripojenia fukózy na rameno glykánu (Obr. 10B a D). V hmotnostnom spektre sú ďalej viditeľné charakteristické oxóniové ióny, ktoré vznikajú fragmentáciou glykánu, jedná sa o m/z 138, 168, 204, 366 [139].



Obrázok 10 Fragmentačné spektrá fukozylovaných izoforiem hemopeptínu získané na kolóne HALO[®] penta-HILIC. Ako PEP1 je označená peptidová kostra

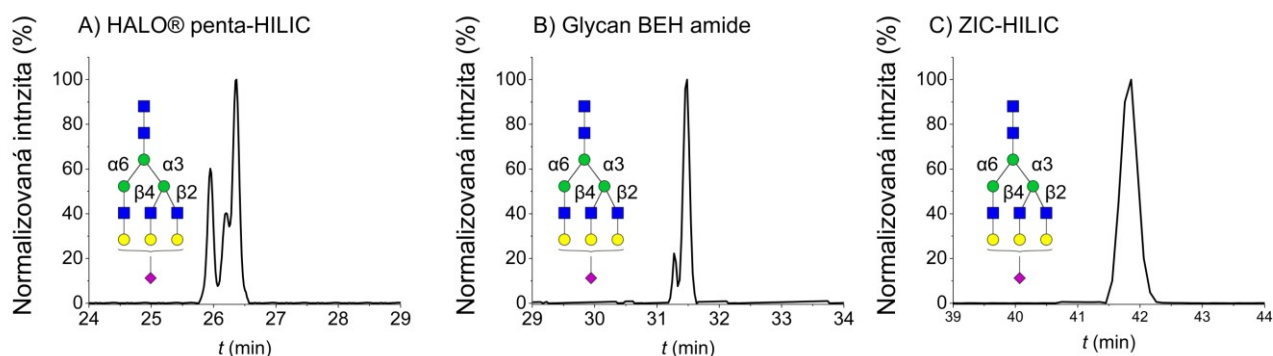
SWPAVGN¹⁸⁷CSSALR a ako PEP2 peptidová kostra ALPQPQN⁴⁵³VTSLGCTH. Popis symbolov vid' na Obr. 2. Tieto výsledky sú súčasťou Publikácie II.

Ďalším dôležitým izomérom sú glykopeptidy hemopexínu s jednou naviazanou sialovou kyselinou. V prípade dvojramenného monosialyzovaného glykopeptidu sa izoméry líšia v lokalizácii sialovej kyseliny, ktorá môže byť napojená na $\alpha 3$ alebo $\alpha 6$ anténu. Najúčinnějšía separácia bola dosiahnutá na HALO[®] penta-HILIC kolóne, ktorá separovala tieto izoméry na základnej línii s rozlíšením $R = 3,09$ pre SWPAVGN¹⁸⁷CSSALR glykopeptid (Obr. 11A) a $R = 2,24$ pre ALPQPQN⁴⁵³VTSLGCTH glykopeptid (Obr. 11C). Glycan BEH amidová kolóna poskytla o niečo lepšiu separáciu monosialyzovaných izomérov (Obr. 11B a E) ako ZIC-HILIC kolóna (Obr. 11C a F), ale ani jedna z nich nebola schopná oddeliť tieto izoméry na základnej línii. Rozlíšenie v prípade Glycan BEH amidovej kolóny bola $R = 1,02$ pre SWPAVGN¹⁸⁷CSSALR a $R = 0,82$ u druhého študovaného peptidu. Najhoršiu separáciu poskytla ZIC-HILIC kolóna, ktorá separovala tieto izoméry s rozlíšením $R = 0,74$ pre SWPAVGN¹⁸⁷CSSALR peptid a $R = 0,43$ pre ALPQPQN⁴⁵³VTSLGCTH.



Obrázok 11 Separácia monosialyzovaných izomérov hemopexínu na testovaných HILIC kolónach. Ako PEP1 je označená peptidová kostra SWPAVGN¹⁸⁷CSSALR a ako PEP2 peptidová kostra ALPQPQN⁴⁵³VTSLLGCTH. Tieto výsledky sú súčasťou Publikácie II.

Trojramenný monosialyzovaný glykopeptid SWPAVGN¹⁸⁷CSSALR môže mať sialovú kyselinu naviazanú na nevetvené $\alpha 6$ rameno alebo na vetvené $\alpha 3$ rameno (s $\beta 2$ alebo $\beta 4$ vetvením). V prípade separácie tohto glykopeptidu na HALO[®] penta-HILIC kolóne (Obr. 12A) sme pozorovali tri čiastočne oddelené píky s rozlíšením $R_{1,2} = 1,28$ a $R_{2,3} = 0,80$, pričom kolóna Glycan BEH amide poskytla dve čiastočne separované píky s rozlíšením $R = 1,23$ (Obr. 12B) a na ZIC-HILIC kolóne sme nepozorovali žiadnu separáciu jednotlivých izomérov (Obr. 12C).

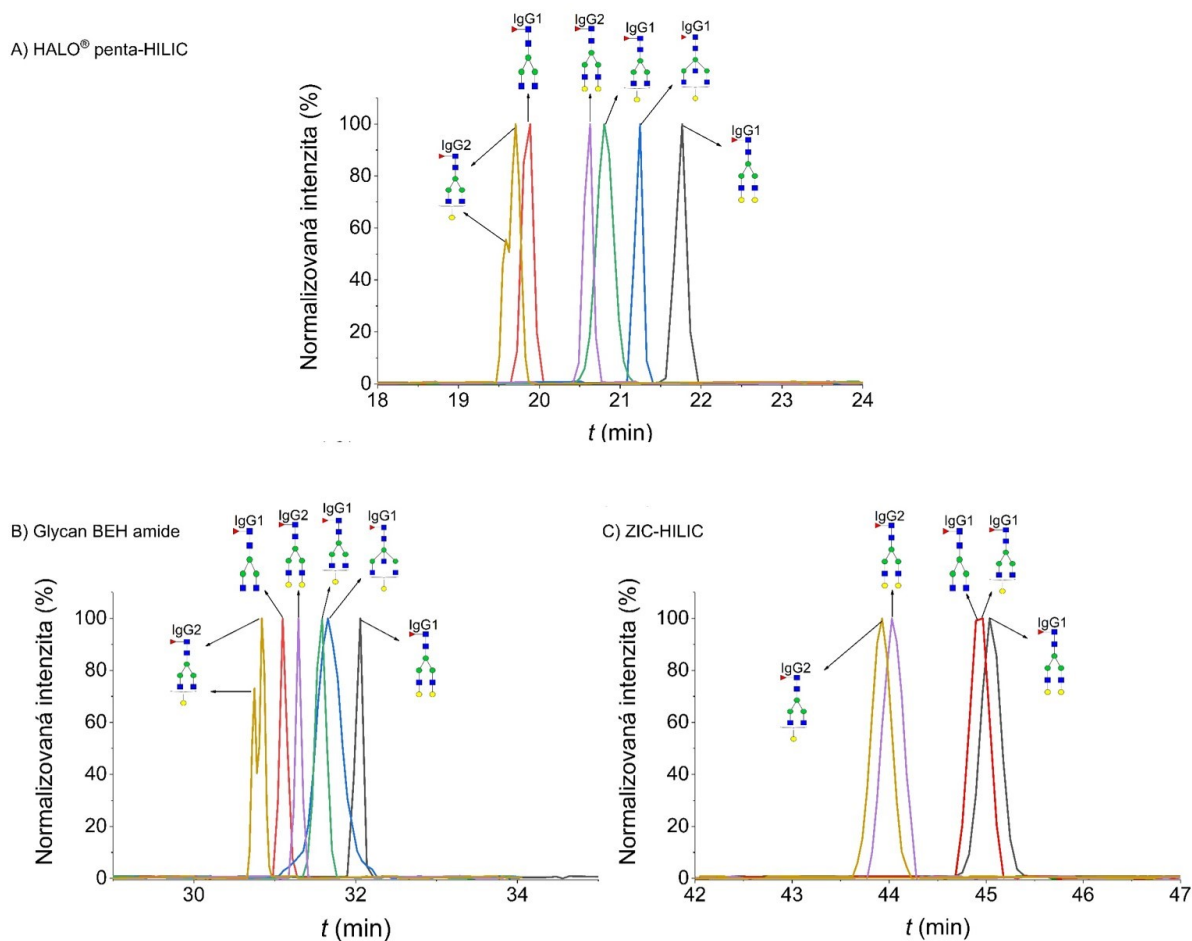


Obrázok 12 Separácia trojramenného monosialyzované glykopeptidu hemopexínu s peptidovou kostrou SWPAVGM¹⁸⁷CSSALR. Popis symbolov vid' na Obr. 2. Tieto výsledky sú súčasťou Publikácie II.

3.2.2 Separácia glykopeptidov IgG a jeho izomérov

Pri separácii IgG sme skúmali dve glykozylované peptidy označované ako IgG1 (EEQYN¹⁸⁰STYR) a IgG2 (EEQFN¹⁷⁶STFR), pričom peptidové kostry sa líšia iba v dvoch aminokyselinách. Glykopeptidy IgG1 obsahujú dva tyrozíny v peptidovej sekvencii vďaka čomu sú viac polárne ako glykopeptidy IgG2 s dvoma hydrofóbnymi fenylalanínmi v peptidovej kostre. Na Obr. 13 je znázornená separácia študovaných glykopeptidov IgG1 a IgG2 na testovaných HILIC kolónach, z ktorého je vidieť, že glykopeptidy IgG1 eluovali za glykopeptidmi IgG2 kvôli líšiacej sa polarite peptidovej kostry. Najnižšiu retenciu vykazoval glykopeptid IgG2 s A2G1F1 glykánom, u ktorého sme pozorovali čiastočnú separáciu izomérov na HALO[®] penta-HILIC (Obr. 13A) a na Glycan BEH amidovej (Obr. 13B) kolóne, ktoré sa líšia v polohe naviazanej galaktózy (naviazaná na $\alpha 3$ alebo $\alpha 6$ rameno) [89]. Retencia glykopeptidu A2G1F1 s IgG2 peptidovou kostrou sa zvýšila asi o minútu v porovnaní s glykoforomou A2F1 na HALO[®] penta-HILIC kolóne. Pridanie jedného *N*-acetyl-hexozamínu na centrálnu galaktózovú molekulu glykopeptidu A2G1F1 však zvýšilo retenčný čas iba o 0,4 minúty, pretože galaktóza ($\log P = -2,6$) je polárnejšia ako *N*-acetyl-hexozamín ($\log P = -1,7$) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>). Podobný trend sme pozorovali v prípade separácie na Glycan BEH amidovej kolóne, aj keď s nižšími posunmi retenčných časov. Podobne ako pri separácii glykopeptidov hemopexínu, ZIC-HILIC kolóna (Obr. 13C) poskytla najvyššie retenčné časy a najhoršie rozlíšenie študovaných IgG glykopeptidov, ktorý nebol schopný separovať glykoformu A2G1F1

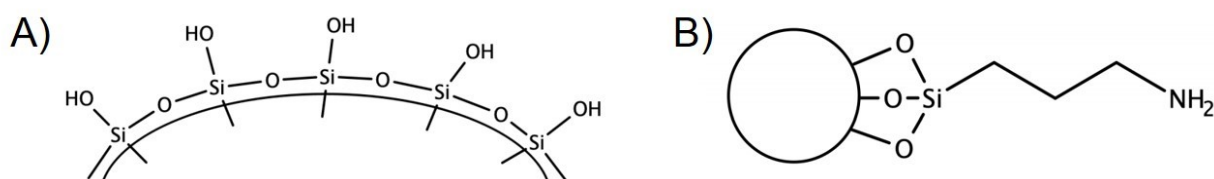
a glykopeptidy IgG1 s A2F1 a A2G1F1 vykazovali úplnú koelúciu. Navyše, z nevysvetliteľných dôvodov na ZIC-HILIC kolóne sme neboli schopní detegovať glykoformu G1A3F1.



Obrázok 13 Separácia glykopeptidov IgG na HALO® penta-HILIC (A), Glycan BEH amid (B) a ZIC-HILIC (C) kolóne. Popis symbolov vid' na Obr. 2. Tieto výsledky sú súčasťou Publikácie II.

3.3 Porovnanie separácie glykopeptidov IgG v režime viacmodálnej chromatografie pracujúcej v režimu hydrofilnej interakčnej/iónovo-výmennej kvapalinovej chromatografie a na reverznej fáze – Publikácia III

Táto práca porovnáva separáciu glykopeptidov ľudského IgG, konkrétne IgG1 a IgG2, na HILIC kolónach nedávno zavedených do chromatografických výskumov, vyvinutých spoločnosťou Advanced Chromatography Technologies (ACE) a na BEH kolóne s C18 stacionárnou fázou. Spomedzi ACE HILIC kolón boli testované kolóny HILIC-A s nemodifikovanou silikagélovou stacionárnou fázou, HILIC-B obsahujúca aminopropylom-modifikovanú silikagélovú stacionárnu fázu a HILIC-N s polyhydroxylom-funkcionalizovanou stacionárnou fázou. Štruktúra stacionárných fáz je zobrazená na Obr. 14 (výrobca neuvádza presnú štruktúru kolóny HILIC-N, preto nie je na Obr. 14 zobrazená).



Obrázok 14 Štruktúra študovaných HILIC-A (A) a HILIC-B (B) kolón testovaných na separáciu glykopeptidov IgG1 a IgG2. Štruktúra HILIC-N kolóny nie je uvedená z dôvodu nedostatočných informácií od výrobcu.

Každé meranie bolo prevedené na kvapalinovom chromatografu s binárnou pumpou Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Nemecko) spojeným s vysokorozlišovacím hmotnostným spektrometrom Bruker maXis qTOF (Bruker, Nemecko) s elektro-sprejovou ionizáciou. Merania boli prevedené v dátovo závislom móde, pričom fragmentovaných bolo tri najintenzívnejších prekurzorov s nábojom 2^+ až 6^+ . Na fragmentáciu bola použitá CID s použitím kolíznej energie 35-70 eV. V tabuľke 3.3.1 sú uvedené študované glykopeptidy a ich skratky.

Tabuľka 3.3.1 Študované glykopeptidy IgG1 a IgG2. Popis symbolov vid' na Obr. 2.

IgG1				Nedetegovaný			
EEQYNSTYR	A2F1	A2G1F1	A2G2F1		A2G2F1S1	G0FB	G1FB
IgG2							
EEQFNSTFR	A2F1	A2G1F1	A2G2F1	A2G1F1S1	A2G2F1S1	G0FB	G1FB

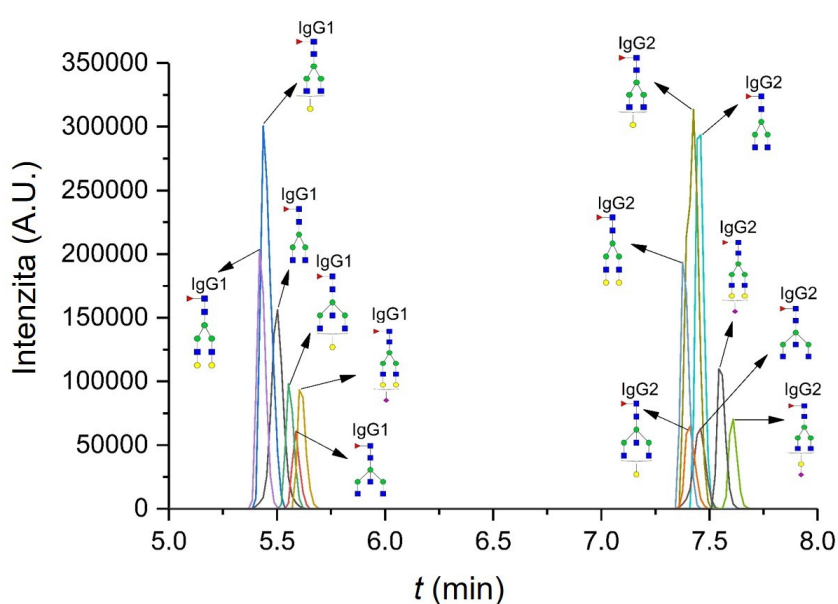
Separácia glykopeptidov v RP móde prebiehala na BEH C18 kolóne od výrobcu Waters ($2,1 \times 100$ mm; $1,7 \mu\text{m}$, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, Spojené štáty). Všetky testované HILIC kolóny mali rozmery $2,1 \times 100$ mm; $1,7 \mu\text{m}$ (Advanced Chromatography Technologies Ltd., Aberdeen, Škótsko). Použité gradienty sú uvedené v tabuľke 3.3.2. Teplota kolóny bola nastavená na 40°C , prietok mobilnej fázy bol $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ v prípade RP separácie a $0,30 \text{ mL min}^{-1}$ pre HILIC separácie, dávkovaný objem vzorky bol $2 \mu\text{L}$.

Tabuľka 3.3.2 Optimalizované gradienty použité na separáciu glykopeptidov IgG na C18 a na HILIC kolónach. Zložka B mobilnej fázy bol acetonitril s $0,1\%$ kyselinou mravčou, zložka A bola voda s $0,1\%$ kyselinou mravčou.

RP-LC		HILIC	
Čas (min)	B (%)	Čas (min)	B (%)
0	5	0	80
3	5	10	80
9	25	25	65
24	80	35	40
27	80	40	40
29	5	43	80
34	5	55	80

Ako už bolo spomenuté separácia glykopeptidov na reverzných stacionárnych fázach je predovšetkým ovplyvnená peptidovou kostrou glykopeptidov. Na Obr. 15 je znázornená separácia študovaných glykopeptidov IgG1 a IgG2 na kolóne C18. Sú vidieť dva, dobre separované klastry glykopeptidov, glykopeptidy IgG1 (EEQYNSTYR) s viac polárnou

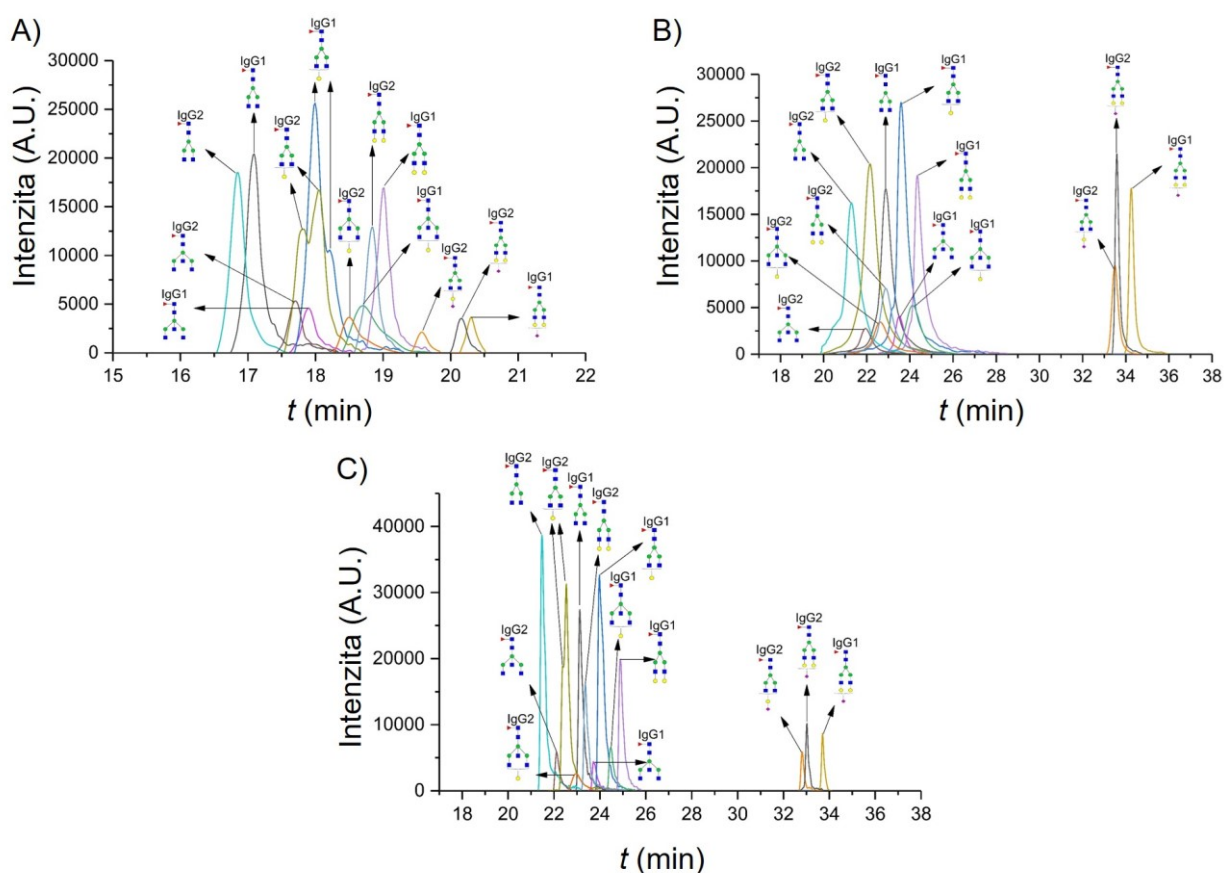
peptidovou kostrou eluovali v čase 5,3 – 5,8 min a glykopeptidy IgG2, ktoré sú viac hydrofóbne (EEQFNSTFR) eluovali v čase 7,3 – 7,7 min. Z chromatogramu je vidieť, že jednotlivé glykopeptidy s rôznym naviazaným glykánom, ale rovnakou peptidovou kostrou neboli na C18 stacionárnej fáze dostatočne oddelené. Zvyšujúca sa polarita (predĺženie glykánu o neutrálnu monosacharidovú jednotku) znížila retenciu glykopeptidov. Naopak, v prípade naviazania sialovej kyseliny sa retencia predĺžila, pravdepodobne preto, lebo záporný náboj sialovej kyseliny kompenzuje pozitívny náboj vznikajúci na peptidovej kostre a tým zvyšuje afinitu týchto glykopeptidov k stacionárnej fáze [76].



Obrázok 15 Separácia glykopeptidov IgG1 a IgG2 na kolóne BEH C18. Popis symbolov vid' na Obr. 2. Tieto výsledky sú súčasťou Publikácie III.

Spomedzi testovaných HILIC kolón, kolóna HILIC-A a HILIC-B majú potenciál pracovať vo viacmodálnom režime, ktorý kombinuje iónovo-výmenný a HILIC separačný mechanizmus. Študované glykopeptidy vykazovali najkratšiu retenciu na kolóne HILIC-A obsahujúca nemodifikovaný silikagél (Obr. 16A) z dôvodu prítomnosti elektrostatického odpudzovania medzi čiastočne disociovanou stacionárnou fázou a čiastočne negatívne nabitými karboxylovými skupinami peptidovej kostry (dve glutamové kyseliny a C-koncová karboxylová kyselina). Kolóna HILIC-B (Obr. 16B) vykazovala silnejšiu interakciu glykopeptidov ako kolóna HILIC-A, z dôvodu prítomnosti elektrostatickej

interakcie medzi čiastočne pozitívne nabitou aminopropylom-funkcionalizovanou stacionárnou fázou a nabitými analytmi. Tento jav bol najviac signifikantný v prípade sialyzovaných glykopeptidov, ktoré navyše obsahujú záporne nabité zvyšky sialovej kyseliny. V prípade separácie glykopeptidov na HILIC-N kolóne (Obr. 16C) sme pozorovali podobné trendy ako na kolóne HILIC-B. Z dôvodu nedostatočných dostupných informácií o stacionárnej fáze nedokážeme tento trend vysvetliť. Navyše, kolóny HILIC-A a HILIC-N boli schopné čiastočne separovať izobarický glykopeptid A2G1F1 (galaktóza pripojená na rameno α 3 alebo α 6).



Obrázok 16 Separácia glykopeptidov IgG1 a IgG2 na kolónach HILIC-A (A), HILIC-B (B) a HILIC-N (C). Popis symbolov vid' na Obr. 2. Tieto výsledky sú súčasťou Publikácie III.

Výsledky separácie glykopeptidov na HILIC kolónach poukazujú na určité trendy, ktoré sú uvedené v tabuľke 3.3.3. Najhoršiu separáciu glykopeptidových párov s rovnakým naviazaným glykánom na peptidovú kosť IgG1 alebo IgG2 poskytovala kolóna HILIC-A,

najlepšia separácia bola dosiahnutá na kolóne HILIC-N a výsledky z kolóny HILIC-B spadali medzi ne.

Tabuľka 3.3.3 Porovnanie účinnosti HILIC kolón na separáciu glykopeptidov s rovnakým naviazaným glykánom na peptidy IgG1 a IgG2. R ($R = (t_{R,2} - t_{R,1})/0,5 \times (w_1 + w_2)$); $t_{R,1}$ – retenčný čas skôr eluujúceho píku, $t_{R,2}$ – retenčný čas neskôr eluujúceho píku, w_1 – šírka píku pri základni skôr eluujúceho píku, w_2 – šírka píku pri základni neskôr eluujúceho píku.

	HILIC-A	HILIC-B	HILIC-N
	<i>R</i>		
A2F1: IgG1/IgG2	0,56	1,35	3,38
A2G1F1: IgG1/IgG2	0,32	1,13	2,29
A2G2F1: IgG1/IgG2	0,35	1,26	2,96
A2G2F1S1: IgG1/IgG2	0,33	1,02	1,71
G0FB: IgG1/IgG2	0,48	1,90	3,26
G1FB: IgG1/IgG2	0,31	1,25	2,08

3.4 Kvapalinová chromatografia a kapilárna elektroforéza v glykomickej a glykoproteomickej analýze – Publikácia IV

Tento prehľadový článok zhrňuje poznatky separácie odštiepených glykánov a intaktných glykopeptidov pomocou LC a CZE. Prvá časť článku je venovaná LC prístupom, ktorá popisuje a diskutuje separáciu pomocou RP, HILIC, PGC a viacdimezióálnych separačných techník v oblasti glykoproteomiky. Druhá časť je venovaná separáciám glykánov a glykopeptidov pomocou CZE. Prehľadový článok je priložený na konci dizertačnej práce ako Príloha IV.

3.5 Predikcia retenčného času intaktných *N*-glykopeptidov v režime hydrofilnej interakčnej kvapalinovej chromatografie – Publikácia V

Cieľom tejto práce bolo navrhnúť ľahko použiteľný model na predpoveď retenčného času glykopeptidov v HILIC móde. Predikcia retenčných časov môže slúžiť ako doplnujúci nástroj vhodný na zamedzenie falošnej detekcie glykopeptidov v glykoproteomickej analýze. Model bol vytvorený na základe chromatografického chovania šiestich tryptických glykopeptidov vysoko zastúpených v ľudskej plazme, konkrétne na základe haptoglobínu (VVLHPNYSQVDIGLIK, MVSHHMLTTGATLINEQWLLTTAK), hemopexínu (SWPAVG/NCSSALR, ALPQPQ/NTSLLGCTH) a globulínu viažuceho pohlavné hormóny (SHEIWITHSCPQSPG/NGTDASH, LDVDQALNR). Každý študovaný glykoproteín poskytoval dva glykopeptidy s jedným *N*-glykozylačným miestom.

Separácia glykopeptidov a ich analýza prebiehala na prístroji nanoAcquity UPLC s binárnou pumpou (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, Spojené štáty) spojeným s hmotnostným spektrometrom typu kvadrupól-lineárna iónová pasca (Q-TRAP) 6500 Q-TRAP (AB Sciex, Framingham, Massachusetts, Spojené štáty). Glykopeptidy boli separované na kolóne HALO[®] penta-HILIC (75 μm \times 150 mm; 2,7 μm ; Advanced Materials Technology, Wilmington, Delaware, Spojené štáty). Ako mobilná fáza bola použitá voda s 0,1% mravčou kyselinou (zložka A) a acetonitril s 0,1% mravčou kyselinou (zložka B), pričom bol použitý nasledovný gradientový program: [(min)/% B] 0/85, 5/85, 50/60, 75/30, 85/30, 87/85, 100/85. Prietok mobilnej fázy bol 400 nL min⁻¹, kolóna bola vyhrievaná na 40 °C a dávkovaný objem vzorky bol 1 μL . Jednotlivé glykopeptidy boli identifikované metódou sledovania vybranej reakcie (SRM).

Na zhotovenie predikčného modelu boli najprv spočítané relatívne retenčné časy (RRT) jednotlivých glykoforiem ako pomer retenčného času sledovaného glykopeptidu a retenčný čas glykoformy A2G2 (glykoforma A2G2 bola použitá z dôvodu jej vysokého zastúpenia vo väčšine plazmatických glykoproteínov). Následne boli spočítané mediány RRT a smerodajné odchýlky, na základe ktorých bolo určené retenčné časové okno glykopeptidov. Pretože sme predpokladali Gaussovo rozdelenie hodnôt RRT, limity boli stanovené v rozmedzí \pm tri štandardné odchýlky od mediánu, čo predstavovalo 99,7 % pravdepodobnostného rozdelenia skutočného retenčného času. V prípade, že daný glykopeptid poskytoval viac chromatografických pík, vyskytujúcich sa hlavne v prípade fukozylovaných a sialyzovaných glykopeptidov (izobarické formy glykánov), kvôli

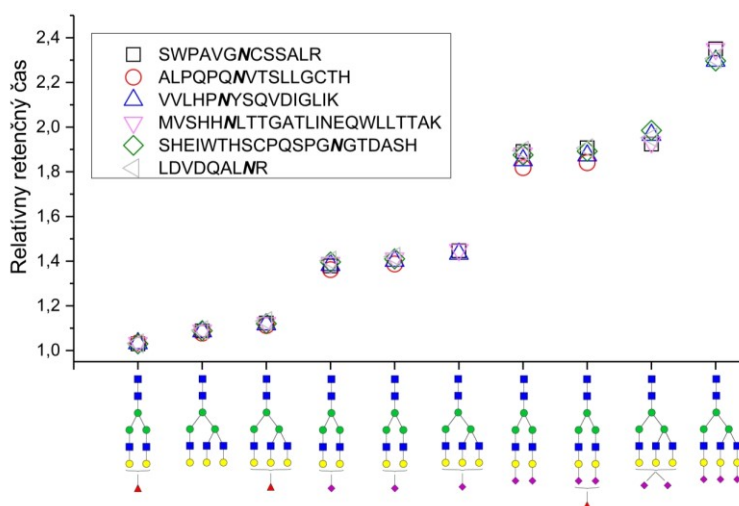
zjednodušeniu neboli spočítané RRT pre všetky izoméry, ale každý z nich bol zahrnutý do výpočtov. Predikčný model teda zahŕňa všetky izoméne formy. V tabuľke 3.5.1 sú uvedené parametre použité na výpočet retenčných okien pre rôzne glykoformy.

Tabuľka 3.5.1 Parametre použité na vypočítanie retenčných okien pre rôzne glykoformy.

	A2G2F1	A3G3	A3G3F1	A2G2S1	A2G2S2
Medián	1,032	1,088	1,121	1,387	1,879
Horný limit	1,027	1,074	1,102	1,347	1,846
Dolný limit	1,034	1,101	1,140	1,427	1,912
	A2G2S1F1	A2G2S2F1	A3G3S1	A3G3S2	A3G3S3
Medián	1,410	1,892	1,447	1,953	2,307
Horný limit	1,388	1,813	1,372	1,886	2,232
Dolný limit	1,433	1,971	1,522	2,019	2,381

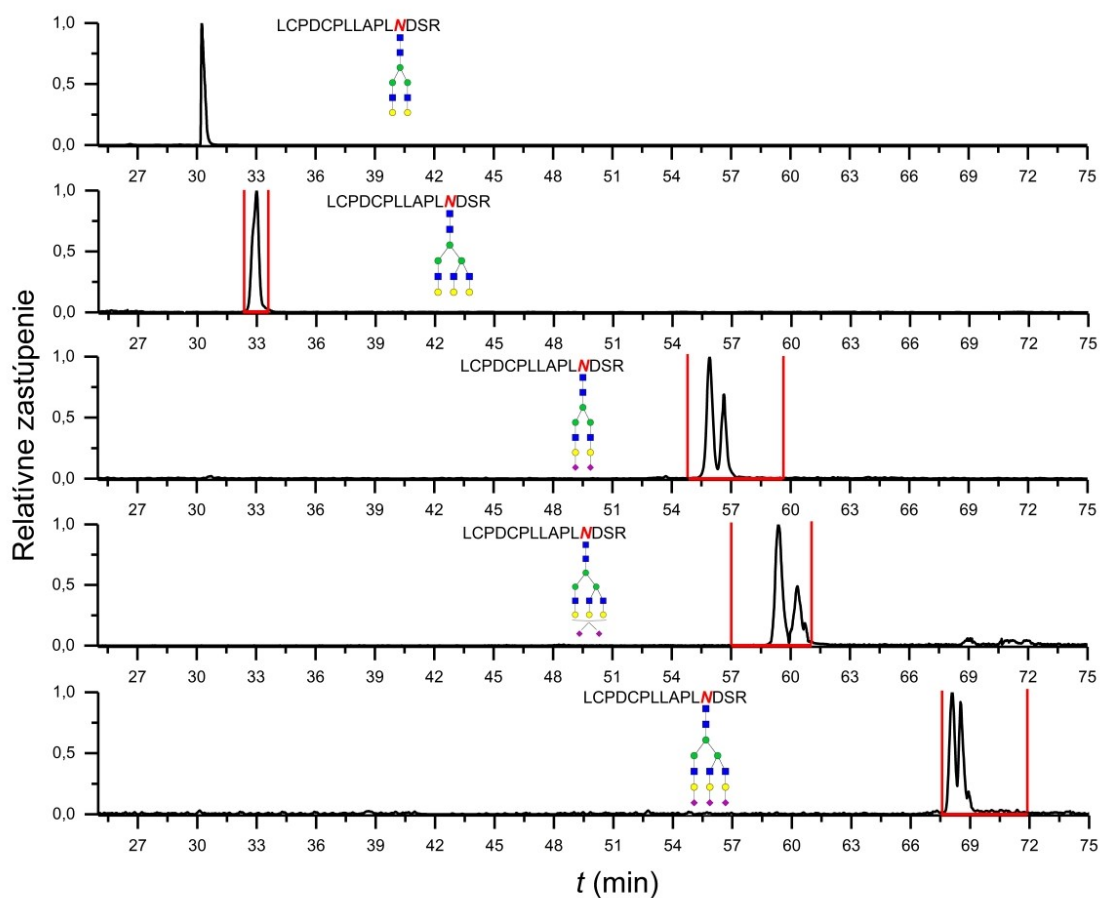
Dolný limit = medián - 3 σ ; Horný limit = medián + 3 σ ; σ je smerodajná odchýlka

Následne sme sledovali vplyv peptidovej kostry na RRT v HILIC móde. Na Obr. 17 je znázornená závislosť RRT jednotlivých glykoforiem pripojených na rôznu peptidovú kostru. Z výsledkov je vidieť, že v HILIC móde charakter peptidového základu nemal významný vplyv na RRT študovaných glykoforiem. Mierne vyššiu odchýlku v RRT vykazovali iba sialyzované glykopeptidy, pravdepodobne v dôsledku vysokého retenčného posunu voči glykoforme A2G2.



Obrázok 17 Závislosť relatívneho retenčného času (t_{rx} glykoforma / t_r A2G2) jednotlivých glykoforiem naviazaných na rôznu peptidovú kostru. Popis symbolov vid' na Obr. 2. Tieto výsledky sú súčasťou Publikácie V.

Na otestovanie vyvinutého predikčného modelu bol naštípený glykoproteín fetuínu a boli študované jeho tri glykozylačné miesta. Na Obr. 18 sú znázornené SRM chromatogramy vybraných glykopeptidov fetuínu s peptidovou kosťou LCPDCPLLAPLNDSR a s vyznačenými retenčnými oknami spočítané podľa predloženého modelu. Z výsledkov je jednoznačne vidieť, že identifikované glykopeptidy eluujú v rámci predpovedaných okien retenčných časov.



Obrázok 18 SRM chromatogramy vybraných glykopeptidov fetuínu s vyznačeným (červené ohraničenie) predikovaných retenčných okien na základne vyvinutého modelu. Popis symbolov vid' na Obr. 2. Tieto výsledky sú súčasťou Publikácie V.

Navyše, v tabuľke 3.5.2 sú uvedené retenčné časy ostatných identifikovaných glykopeptidov fetuínu, z ktorej je vidieť, že všetky spadajú do predikovaných retenčných časových okien. Tieto výsledky naznačujú, že nami vyvinutý model je dostatočne presný na predikciu glykopeptidov v HILIC.

Tabuľka 3.5.2 Porovnanie predikovaných retenčných časov pre glykopeptidy fetuínu s ich skutočne nameranými retenčnými časmi.

Identifikované glykoformy	Predikované retenčné okno (min)	Zmeraný retenčný čas (min)
LCPDCPLLAPLNDSR		
A2G2		30,2
A2G2S2	54,8 – 59,6	55,8
A3G3	32,5 – 33,3	32,9
A3G3S2	57,0 – 61,0	59,4
A3G3S3	67,5 – 71,9	68,1
RPTGEVYDIEIDTLETTCHVLDPTPLANCSVR		
A2G2		36,5
A2G2S1	49,2 – 52,1	49,8
A2G2S2	66,2 – 72,0	67,1
A3G3	39,2 – 40,2	39,6
A3G3S1	50,7 – 52,3	52,1
A3G3S3	81,5 – 86,8	84,1
VVHAVEVALATFNAESNGSYLQLVEISR		
A2G2		33,1
A3G3	35,6 – 36,5	35,8
A3G3S3	73,9 – 78,7	75,7

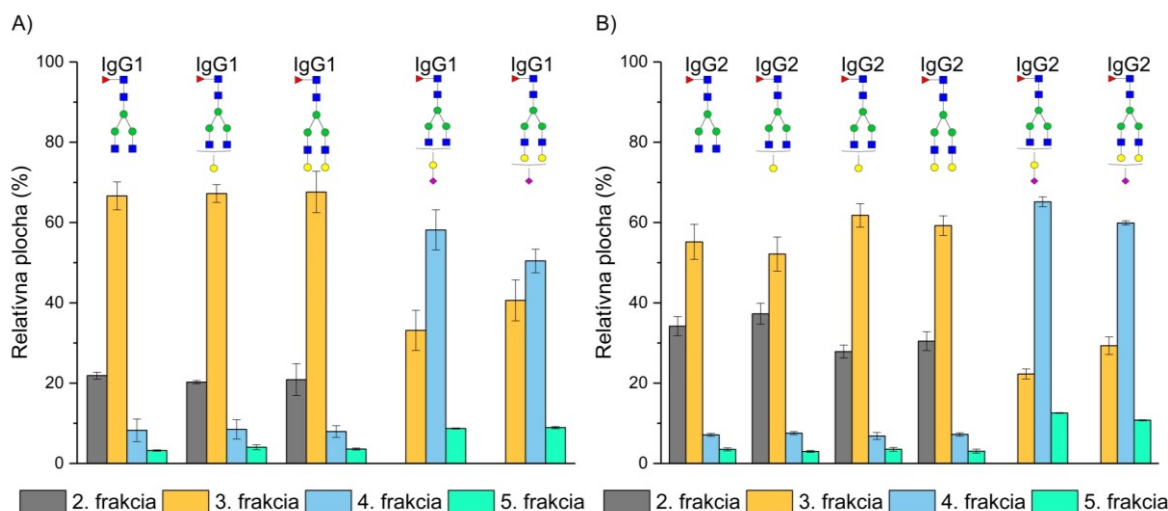
3.6 Obohatenie glykopeptidov pomocou SPE na polárnych stacionárnych fázach v HILIC režimu

3.6.1 Vplyv experimentálnych podmienok na obohatenie glykopeptidov IgG pomocou SPE-HILIC na aminopropylvej kolónke – Publikácia VI

Príprava vzoriek je zásadným krokom v glykoproteomickej analýze. Obohatenie glykopeptidov pomocou SPE-HILIC, ktorá využíva polárne sorbenty je sľubnou technikou, ktorá môže zjednodušiť glykoproteomické analýzy. Alagesan a jej kolektív porovnávala účinnosť a selektivitu obohacovania glykopeptidov pomocou rôznych rozpúšťadiel na ZIC-HILIC sorbente, avšak neskúmali širší vplyv experimentálnych podmienok na účinnosť obohacovania [125]. V tomto štúdiu sme skúmali vplyv experimentálnych podmienok na účinnosť obohatenia glykopeptidov IgG pomocou SPE-HILIC na aminopropylom-modifikovanom sorbente (45 µm; 100 mg sorbent/1 mL, 60 Å, Macherey-Nagel, Düren, Nemecko).

Boli skúmané dva tryptické glykopeptidy ľudského IgG, konkrétne polárnejší IgG1 (EEQYNSTYR) a viac hydrofóbny IgG2 (EEQFNSTFR). Samotné obohatenie bolo prevedené v štyroch krokoch: 1. kondicionácia kolónky: 1 mL vody, 1 mL 85% acetonitrilu a 1 mL 85% acetonitrilu s 0,1% mravčou kyselinou; 2. nanosenie vzorky (100 µL vzorky v 80% acetonitrile s 0,1% mravčou kyselinou); 3. premytie kolónky: 1 mL 85% acetonitrilu s 0,1% mravčou kyselinou; 4. elúcia glykopeptidov do piatich frakcií po 100 µL pomocou 5% organického rozpúšťadla (acetonitril, metanol alebo izopropanol) s 0,1% mravčou kyselinou. Relatívne zastúpenie daného glykopeptidu bola spočítaná ako plocha sledovaného glykopeptidu v danej frakcii vydelená súčtom plôch tohto glykopeptidu vo všetkých frakciách a vynásobená 100.

Pri obohatení glykopeptidov IgG boli pozorované nasledovné obecné trendy, ktoré sú znázornené na Obr. 19: (1) glykopeptidy IgG2 vykazovali slabšiu interakciu s polárnou stacionárnou fázou ako glykopeptidy IgG1 a to z dôvodu odlišnej polarite peptidovej kostry, preto viac glykopeptidov IgG2 bolo detegovaných v skorších frakciách; (2) relatívne zastúpenie negalaktozylovaného glykopeptidu, glykopeptidu s jednou a dvomi galaktózami sa v jednotlivých frakciách signifikantne nelíšilo; (3) glykopeptidy s naviazanou sialovou kyselinou vykazovali silnú interakciu so stacionárnou fázou z dôvodu prítomnosti prítlačlivých interakcií medzi čiastočne disociovanou sialovou kyselinou a pozitívne nabitou aminopropylovou stacionárnou fázou.



Obrázok 19 Obohatenie glykopeptidov IgG1 (A) a IgG2 (B) pomocou SPE-HILIC na aminopropylom-modifikovanej stacionárnej fáze. Popis symbolov vid' na Obr. 2. Tieto výsledky sú súčasťou Publikácie VI.

Následne bol skúmaný vplyv zloženia elučného roztoku na účinnosť obohatenia, testované boli roztoky s metanolom a izopropanolom. V každom prípade elučný roztok obsahoval 5% organickej zložky s 0,1% mracťou kyselinou. V HILIC režime eluotropická rada je nasledovná: metanol > acetonitril > izopropanol [84]. Aj keď koncentrácia organickej zložky bola iba 5%, malo to prekvapivo signifikantný vplyv na elúciu (vid' Publikácia VI). Bolo preukázané, že izopropanol bol najmenej účinný na obohacovanie študovaných glykopeptidov, zatiaľ čo acetonitril poskytoval najlepšie výsledky a metanol sa umiestnil medzi dvoma testovanými rozpúšťadlami (vid' Publikácia VI).

V ďalších experimentoch bol skúmaný vplyv koncentrácie mravčej kyseliny v elučnom roztoku, pričom vyššia koncentrácia mravčej kyseliny (0,1% vs. 1% mravčia kyselina) viedla k potlačení iónových interakcií glykopeptidov so stacionárnou fázou SPE kolónky, čím došlo k rýchlejšiemu vymytiu glykopeptidov z SPE kolónky.

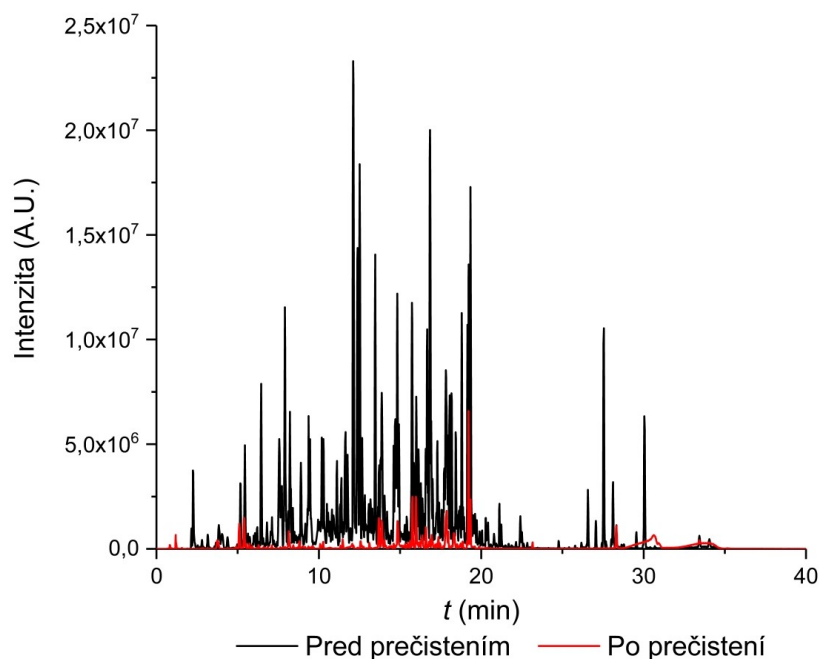
Ďalej bol preskúmaný vplyv typu kyseliny v elučnom roztoku. Bola porovnaná účinnosť obohatenia pre zloženie elučného roztoku obsahujúceho 5% acetonitril s prídavkom mravčej a octovej kyseliny. Koncentrácia octovej kyseliny bola zvolená tak, aby sa pH a iónová sila roztoku čo najviac zhodovala s roztokom obsahujúcim mravčiu kyselinu (porovnané boli obe testované koncentrácie mravčej kyseliny). V prípade použitia octovej kyseliny v elučnom roztoku glykopeptidy eluovali v skorších frakciách,

pravdepodobne kvôli lepšej schopnosti acetátového iónu neutralizovať pozitívny náboj stacionárnej fázy SPE kolónky a peptidovej kostry glykopeptidu. Tento účinok bol významnejší pre čiastočne disociované sialyzované glykopeptidy.

Bolo zistené, že koncentrácia acetonitrilu v elučnom roztoku (5%, 10% a 20% s prídavkom 1% mravčej kyseliny) významne neovplyvnila účinnosť obohatenia glykopeptidov (viď Publikácia VI).

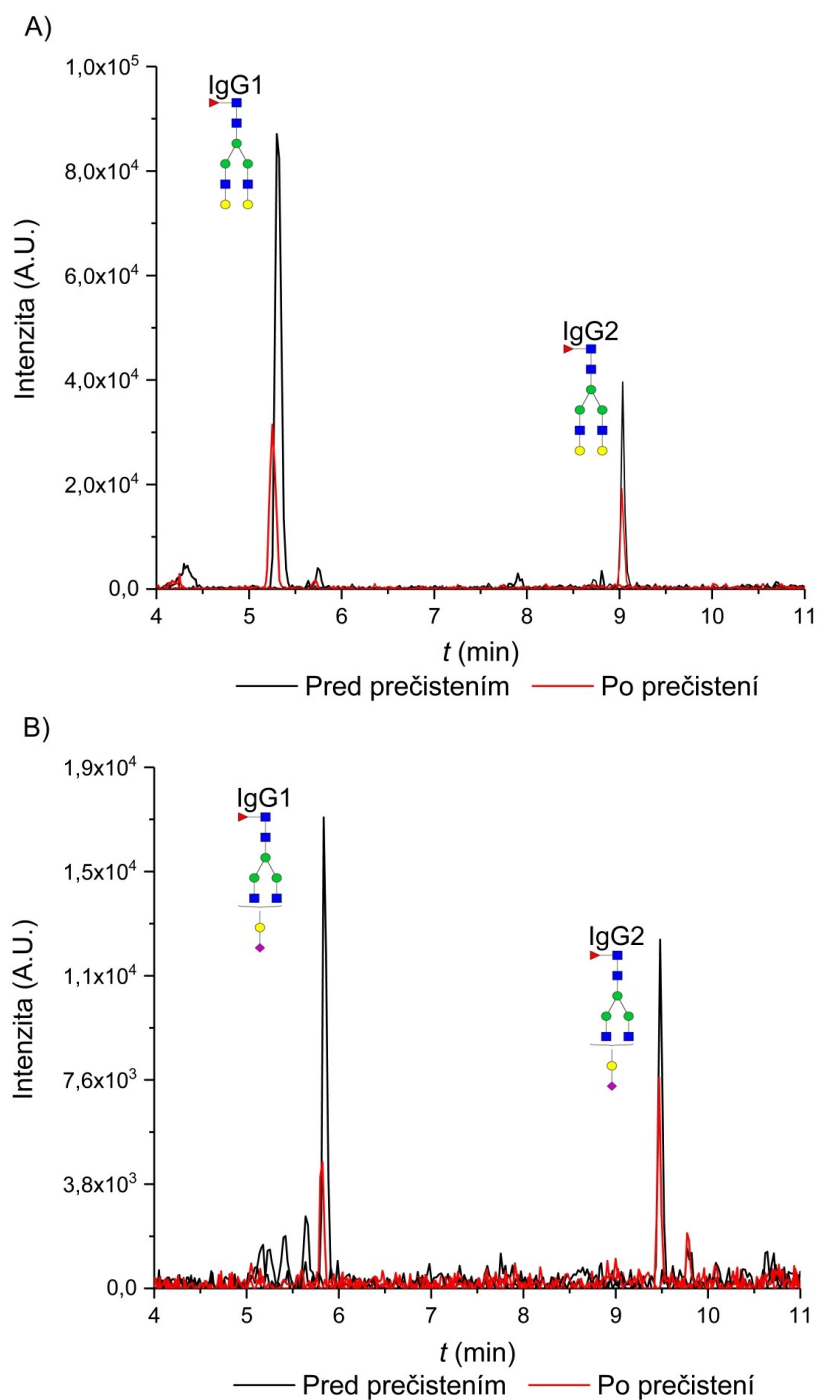
Na záver boli testované tri koncentrácie acetonitrilu 85%, 75% a 65% (každá s prídavkom 0,1% mravčej kyseliny), pričom elučný roztok obsahoval 5% acetonitrilu s 1% mravčou kyselinou. Zistili sme, že pri znižovaní koncentrácie acetonitrilu v kondicionačnom a premývacom roztoku došlo k rýchlejšej elúcie neutrálnych glykopeptidov, navyše keď bol použitý roztok obsahujúci 65% acetonitrilu s 0,1% mravčou kyselinou tieto glykopeptidy boli detegované jedine v premývacej frakcii (frakcia ešte pred nanesením elučného roztoku), jedine sialyzované glykopeptidy boli úspešne zadržané na sorbente. Na druhú stranu, nepozorovali sme žiadny signifikantný rozdiel pri použití 75% alebo 85% acetonitrilu na účinnosť obohatenia, čo naznačuje dôležitú úlohu iónových interakcií ako ďalšieho retenčného mechanizmu medzi čiastočne disociovanou sialovou kyselinou a pozitívne nabitou stacionárnou fázou SPE kolónky. Výsledky sú znázornené v Publikácii VI.

Obohatenie na aminopropylom-modifikovanej SPE kolónke bolo otestované na reálnej vzorke ľudskej plazmy, ktorá bola pripravená rovnako ako štandard IgG. Na Obr. 20 sú znázornené chromatogramy získané pred a po prečistení pripravenej vzorky na SPE kolónke. Z chromatogramov je jednoznačne vidieť, že intenzita neskôr eluovaných zložiek naštepenej plazmy sa výrazne znížila po prečistení, čo viedlo k celkovému zníženiu zložitosti vzorky.



Obrázok 20 Chromatogramy tryptického štepenia ľudskej plazmy pred SPE prečistením (čierna čiara) a po SPE prečistení (červená čiara). Na prečistenie boli použité nasledovné podmienky: 1. kondicionácia kolónky: 1 mL vody, 1 mL 85% acetonitrilu a 1 mL 85% acetonitrilu s 0,1% mravčou kyselinou; 2. naniesenie vzorky (100 μ L vzorky v 80% acetonitrile s 0,1% mravčou kyselinou); 3. premytie kolónky: 1 mL 85% acetonitrilu s 0,1% mravčou kyselinou; 4. elúcia do piatich frakcií po 100 μ L pomocou 5% acetonitrilu s 1% mravčou kyselinou, ktoré boli následne zmiešané, odparené a znovu rozpustené v 5 % acetonitrilu s 1% mravčou kyselinou. Popis symbolov vid' na Obr. 2. Tieto výsledky sú súčasťou Publikácie VI.

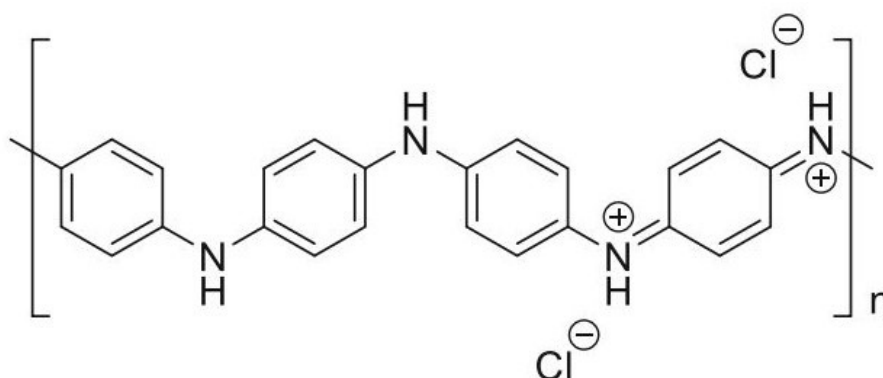
V prípade glykopeptidov IgG sme tiež pozorovali zníženie intenzity po prečistení. Konkrétne, absolútna intenzita neutrálneho glykopeptidu IgG1 sa znížila 2,8x a v prípade IgG2 sa znížila 2,1x. V prípade sialyzovaných glykopeptidov boli tieto hodnoty 4,1x (IgG1) a 3,0x (IgG2). Chromatogramy sú znázornené na Obr. 21. Napriek tomuto zníženiu v absolútnej intenzite došlo k podstatnému zlepšeniu pomeru signál/šum pre všetky analyzované glykopeptidy, ktorý sa zlepšil približne dvoj- až štvornásobne. Chromatogramy ostatných študovaných glykopeptidov a vybraných peptidov, spolu s podrobným popisom výsledkov sú uvedené v Publikácii VI.



Obrázok 21 Chromatogramy neutrálnych (A) a sialyzovaných (B) glykopeptidov IgG1 a IgG2 nájdené v ľudskej plazme pred prečistením (čierna čiara) a po prečistení (červená čiara). Popis symbolov vid' na Obr. 2. Tieto výsledky sú súčasťou Publikácie VI.

3.6.2 Potenciál stacionárnej fázy potiahnutej polyanilínom na obohatenie glykopeptidov s využitím SPE-HILIC – Podaná publikácia VII

Naša posledná podaná publikácia skúmala polyanilínom (PANI) potiahnutý silikagél ako potenciálnu stacionárnu fázu na obohatenie glykopeptidov ľudského IgG pomocou SPE-HILIC a preštudovala vplyv rôznych experimentálnych podmienok na účinnosť obohatenia. Bolo preukázané, že stacionárne fázy na báze silikagélu modifikovaného PANI vykazujú multimodálne retenčné mechanizmy, zahrňujúce NP, RP, HILIC a iónové interakcie [140] a stacionárna fáza bola charakterizovaná v HILIC režime pomocou 80 nízkomolekulárnych látok neutrálneho, kyslého, zásaditého a amfoterného charakteru [141]. Na Obr. 22 je znázornená chemická štruktúra emeraldínovej soli, ktorá je čiastočne protonizovaná forma PANI a najviac zaujímavá z chromatografického hľadiska.

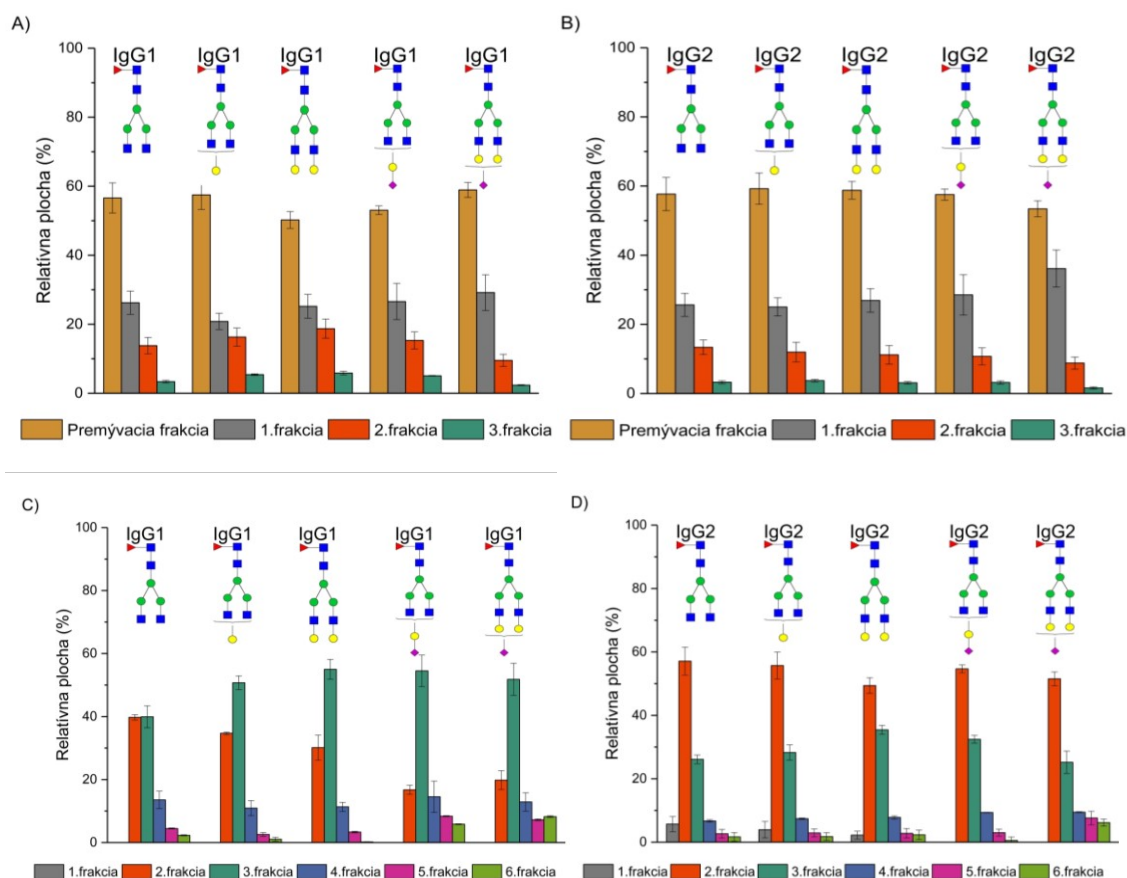


Obrázok 22 Chemická štruktúra emeraldínovej soli.

Príprava PANI potiahnutého silikagélu (40-75 μm , 60 \AA ; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Spojené štáty) prebiehala v našom laboratóriu na základe predchádzajúceho výskumu Taraby a kol. pomocou *in situ* polymerizácie [141]. Na prečistenie bolo použité 100 mg pripraveného sorbentu, ktorý bol nanosený do bavlnenou vatou upchanej 1mL špičky pipety.

Rovnako ako v predchádzajúcej publikácii boli skúmané glykopeptidy IgG1 a IgG2. Pretože vata má tiež potenciál zdržiavať látky polárneho charakteru [127], [128], prvé experimenty boli venované porovnaniu prečistenia glykopeptidov na čistej bavlnenej vate ako sorbentu a na sorbente pozostávajúceho z vaty a PANI-modifikovaného silikagélu. Príprava SPE kolónky a elúcia glykopeptidov prebiehala rovnako ako v prípade obohatenia glykopeptidov na aminopropylom-modifikovanej stacionárnej fáze (viď podaná

Publikácia VII), pričom elučný roztok obsahoval 5% acetonitrilu s 0,1% mravčou kyselinou. Na Obr. 23A a B sú znázornené výsledky získané použitím vaty z ktorých je vidieť, že viac ako 50% glykopeptidov bolo detegovaných už v premývacej frakcii. Navyše, nebol pozorovaný žiadny významný rozdiel v zastúpení študovaných glykopeptidov s rôznymi naviazanými glykánmi. V prípade, že obohatenie bolo vykonané na SPE kolónke ktorá obsahovala vatu a PANI (vid' Obr. 23C a D), glykopeptidy boli viac zadržané na stacionárnej fáze, čo viedlo k ich neskoršej elúcii. V prípade neutrálnych glykopeptidov sme pozorovali silnejšiu interakciu neutrálnych glykopeptidov so zvyšujúcim sa počtom galaktóz, čo je v súlade s ich vyššou polaritou a silnejšou interakciou s polárnym sorbentom. Navyše glykopeptidy IgG2 boli vymyté z SPE kolónky rýchlejšie kvôli celkovej vyššej hydrofobicite glykopeptidov (odlišnosť zloženia peptidovej kostry IgG1 a IgG2). Okrem toho, sme tiež pozorovali silnejšiu interakciu sialyzovaných glykopeptidov s PANI-modifikovaným sorbentom v dôsledku iónových interakcií medzi čiastočne disociovanými zvyškami sialovej kyseliny a kladne nabitou stacionárnou fázou (vid' Obr. 23).



Obrázok 23 Obohatenie glykopeptidov IgG1 a IgG2 na bavlnenej vate (A,B) a na sorbentu obsahujúci bavlnenou vatou a PANI-modifikovaný sorbent (C,D). Popis symbolov vid' na Obr. 2. Tieto výsledky sú súčasťou podanej Publikácie VII.

Následne bol testovaný vplyv koncentrácie mravčej kyseliny na účinnosť obohatenia (5% acetonitril s 0,1% alebo 1% mravčou kyselinou), pričom bolo potvrdené, že vyššia koncentrácia bola účinnejšia na obohatenie neutrálnych a hlavne sialyzovaných glykopeptidov z dôvodu účinnejšiemu potlačeniu iónových interakcií medzi glykopeptidmi a stacionárnou fázou a potlačeniu disociácie sialovej kyseliny (viď podaná Publikácia VII).

Taktiež bol preskúmaný vplyv typu kyseliny na účinnosť obohatenia (mravčia vs. octová kyselina). V prípade PANI-modifikovaného sorbentu bolo zistené, že mravčia kyselina je účinnejšou kyselinou ako je octová kyselina (viď podaná Publikácia VII). Správanie glykopeptidov v skúmanom systéme je zložitá a z výsledkov je vidieť, že typ a koncentrácia kyseliny ovplyvňujú ionizačný stav glykopeptidov, ich celkovú hydrofilitu v dôsledku iónovo-párových efektov a hrúbku adsorbovanej vody na sorbente modifikovanom PANI.

Vplyv koncentrácie acetonitrilu v elučnom roztoku (5%, 10% alebo 20% s prídavkom 1% mravčej kyseliny) bol preštudovaný, pričom bolo zistené, že pri zvýšení koncentrácie acetonitrilu dochádza k silnejšej retencii glykopeptidov, čo je v súlade s HILIC princípom [84].

Nakoniec bol preskúmaný vplyv koncentrácie acetonitrilu v kondicionačnom a premývacom roztoku (85%, 75% a 65% každá s prídavkom 0,1% mravčej kyseliny, pričom elučný roztok obsahoval 5% acetonitrilu s 0,1% mravčou kyselinou). Bolo pozorované, že neutrálne glykopeptidy začínali eluovať už v premývacej frakcii, pravdepodobne kvôli slabej adsorpcii vody na stacionárnu fázou alebo obmedzenej interakcii neutrálnych glykopeptidov so stacionárnou fázou. Na druhú stranu, pri použití 75% acetonitrilu glykopeptidy vykazovali silnejšiu interakciu so stacionárnou fázou ako pri použití 85% acetonitrilu. V prípade sialyzovaných glykopeptidov bolo zistené, že pri najnižšej testovanej koncentrácii tieto glykopeptidy boli detegované už v prvej frakcii, pričom nebol pozorovaný žiadny významný rozdiel v prípade účinnosti obohatenia na sialyzovaný glykopeptid IgG2 pri použití 75% alebo 85% acetonitrilu.

Z výsledkov je zrejmé, že nami pripravený PANI-modifikovaný silikagél má potenciál v obohacovaní glykopeptidov, pričom zdôrazňuje dôležitosť ladenia experimentálnych podmienok pre zvýšenie účinnosti a selektivity obohacovania. Podrobné výsledky sú zhrnuté a viac diskutované v podanej Publikácii VII.

4 ZÁVER

Predkladaná dizertačná práca pozostáva z komentovaného súboru siedmych publikácií, z ktorých je šesť uverejnených v medzinárodných impaktovaných časopisoch a jeden je vo fáze revízie. Publikácie sa venujú hydrofilnej interakčnej kvapalinovej chromatografii v analýze intaktných glykopeptidov. Prvá, rozsiahlejšia časť dizertačnej práce sa zaoberá vplyvom koncentrácie acetonitrilu v rozpúšťadle vzorky na precipitáciu glykopeptidov závisiacej na štruktúre pripojeného glykánu, testovaním rôznych polárnych stacionárnych fáz využívaných v HILIC režime a vývoji modelu na predikciu retenčných časových okien glykopeptidov. Druhá časť dizertačnej práce je zameraná na obohatenie glykopeptidov pomocou SPE-HILIC a na štúdium vplyvu rôznych experimentálnych podmienok na účinnosť obohatenia.

Získané výsledky sú zhrnuté do nasledovných bodov:

- ❖ Vysoká koncentrácia acetonitrilu (90%) v rozpúšťadle vzorky viedla k takmer úplnej precipitácii všetkých študovaných glykopeptidov. Pri 80% acetonitrilu precipitácia glykopeptidov závisela na štruktúre pripojeného glykánu a bola významne ovplyvnená prítomnosťou sialovej kyseliny. Navyše, precipitácia bola ovplyvnená štruktúrou peptidovej kostry.
- ❖ Na HILIC kolónach sme pozorovali zvýšenie retenčného času glykopeptidov hemopexínu a IgG s väčším pripojeným glykánom. Spomedzi testovaných HILIC kolón, HALO[®] penta-HILIC kolóna vykazovala silnú interakciu so sialyzovanými glykopeptidmi pravdepodobne kvôli prítomnosti piatich hydroxylových skupín na viazanom ligande, ktoré poskytovali silné vodíkové interakcie. Naopak, na kolóne Glycan BEH Amide bol tento retenčný posun menej významný a v prípade ZIC-HILIC kolóny sme pozorovali elektrostatické odpudzovanie medzi záporne nabitou sulfobetainovou funkčnou skupinou a čiastočne disociovanými sialovými kyselinami glykopeptidu, čo viedlo k zníženiu ich retencie. Bola porovnaná účinnosť testovaných kolón na separáciu glykopeptidových izomérov hemopexínu obsahujúcich glykopeptidy s jednou fukózou alebo sialovou kyselinou. Kolóna HALO[®] penta-HILIC poskytovala najlepšie výsledky a kolóna ZIC-HILIC najhoršie.
- ❖ Boli otestované tri, relatívne novo zavedené HILIC kolóny na separáciu glykopeptidov ľudského IgG, a to kolóna HILIC-A, HILIC-B a HILIC-N. Kolóny

HILIC-A (obsahujúca nemodifikovaný silikagél) a HILIC-B (s aminopropylom-modifikovanou stacionárnou fázou) vykazovali multimodálny retenčný mechanizmus, pričom najkratšie retenčné časy boli získané na kolóne HILIC-A z dôvodu elektrostatického odpudzovania študovaných glykopeptidov, hlavne sialyzovaných. Naopak, sialyzované glykopeptidy silno interagovali so stacionárnou fázou kolóny HILIC-B, kvôli prítiažlivým interakciám medzi pozitívne nabitou aminopropylomovou stacionárnou fázou a čiastočne disociovanou sialovou kyselinou. Kolóna HILIC-N (obsahujúca polyhydroxylom-funkcionalizovaný silikagél) poskytla podobné výsledky ako kolóna HILIC-B. Kolóny HILIC-A a HILIC-N preukázali potenciál separovať izobarické glykopeptidy A2G1F1, líšiacich sa vo väzbe terminálnej galaktózy na $\alpha 3$ alebo $\alpha 6$ -rameno. Ukázali sme, že každá HILIC kolóna je vhodná na separáciu glykopeptidov, ale poskytuje odlišné separačné rozlíšenia: kolóna HILIC-A poskytla najkratšiu analýzu, ale najhoršie rozlíšenie glykopeptidov, ktoré obsahujú rovnaký glykán pripojený na odlišný peptid; kolóna HILIC-B bola schopná odseparovať sialyzované od asialyzovaných glykopeptidov; kolóna HILIC-N poskytla najlepšie rozlíšenie glykopeptidov v závislosti na štruktúre pripojeného glykánu.

- ❖ Vyvinuli sme model na predikciu retenčných časových okien glykopeptidov, ktorý môže slúžiť ako doplnkový nástroj k spoľahlivej identifikácii glykopeptidov v glykoproteomickej analýze. Model sme vytvorili na základe relatívnych retenčných časov glykopeptidov haptoglobínu, hemopexínu a globulínu viažuceho pohlavné hormóny. Relatívne retenčné časy boli vyjadrené ako retenčné časy sledovaného glykopeptidu voči retenčnému času glykoformy A2G2. Zistili sme, že relatívny retenčný čas nebol signifikantne ovplyvnený peptidovou kostrou. Vyvinutý model bol otestovaný na glykopeptidoch fetuínu a získané výsledky naznačujú, že vyvinutý model je dostatočne presný.
- ❖ Testovali sme rôzne experimentálne podmienky na účinnosť obohatenia glykopeptidov IgG pomocou SPE-HILIC na aminopropylom-modifikovanom sorbente. Zistili sme, že obohatenie bolo ovplyvnené polaritou peptidovej kostry a, že sialyzované glykopeptidy silne interagovali s pozitívne nabitou stacionárnou fázou a preto eluovali v neskorších frakciách. Na účinnosť obohatenia mala vplyv: typ organického rozpúšťadla v elučnom roztoku; koncentrácia mravčej a octovej kyseliny v elučnom roztoku; koncentrácia acetonitrilu v kondicionačnom

a premývacom roztoku, naopak, koncentrácia acetonitrilu v elučnom roztoku účinnosť obohatenia významne neovplyvnila. Nakoniec bola testovaná naša metóda na reálnej vzorke ľudskej plazmy, kde sme zistili, že po prečistení došlo k zlepšeniu pomeru signál/šum, čo je žiadaná v glykoproteomických analýzach.

- ❖ Skúmali sme potenciál polyanilínom-modifikovaného silikagélu na obohatenie glykopeptidov IgG pomocou SPE-HILIC. Sorbent bol pripravený pomocou *in situ* polymerizácie v našom laboratóriu. Preskúmali sme vplyv experimentálnych podmienok na účinnosť obohatenia. Zistili sme, že účinnosť bola ovplyvnená koncentráciou mravčej kyseliny v elučnom roztoku, pričom vyššia testovaná koncentrácia viedla k rýchlejšej elúcii študovaných glykopeptidov (hlavne sialyzovaných). V prípade zamenenia mravčej kyseliny na octovú, došlo k pomalšej elúcii glykopeptidov. Preukázali sme, že koncentrácia acetonitrilu nielen v elučnom roztoku, ale aj v kondicionačnom a premývacom roztoku významne ovplyvnila účinnosť obohatenia.

Z vyššie uvedených výsledkov je zrejmé, že HILIC má obrovský potenciál v glykoproteomickej analýze, počínajúcej od separácii intaktných glykopeptidov, až po fázu prípravy vzoriek.

5 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] 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. (2015) *Essentials of Glycobiology*. New York, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [2] Schoberer, J., Shin, Y.-J., Vavra, U., Veit, C., Strasser, R. (2018) Analysis of Protein Glycosylation in the ER. In: Hawes, C., Kriechbaumer, V. (eds) *The Plant Endoplasmic Reticulum. Methods in Molecular Biology*. New York, New York: Humana Press.
- [3] Zacchi, L. F., Schulz, B. L. (2016) N-glycoprotein macroheterogeneity: biological implications and proteomic characterization. *Glycoconjugate Journal*, 33, 359–376.
- [4] Zhou, H., Froehlich, J. W., Briscoe, A. C., Lee, R. S. (2013). The GlycoFilter: A Simple and Comprehensive Sample Preparation Platform for Proteomics, N-Glycomics and Glycosylation Site Assignment. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12, 2981–2991.
- [5] Fernández-Tejada, A., Brailsford, J., Zhang, Q., Shieh, J. H., Moore, M. A., Danishefsky, S. J. (2015) Total Synthesis of Glycosylated Proteins. *Topics in current chemistry*, 362, 1–26.
- [6] Shental-Bechor, D., Levy, Y. (2008). Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 8256–8261.
- [7] Mellquist, J. L., Kasturi, L., Spitalnik, S. L., Shakin-Eshleman, S. H. (1998). The Amino Acid Following an Asn-X-Ser/Thr Sequon Is an Important Determinant of N-Linked Core Glycosylation Efficiency. *Biochemistry*, 37, 6833–6837.
- [8] Marth, J. D., Grewal, P. K. (2008). Mammalian glycosylation in immunity. *Nature reviews. Immunology*, 8, 874–887.
- [9] Walker, S. H., Taylor, A. D., Muddiman, D. C. (2013). The use of a xylosylated plant glycoprotein as an internal standard accounting for N-linked glycan cleavage and sample preparation variability. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 27, 1354–1358.
- [10] Berg, J.M., Tymoczko J.L., Stryer, L. (2002) *Biochemistry*, Fifth Edition. New York, New York: W.H. Freeman.

- [11] Casteleijn, M. G., Richardson, D. (2014) Engineering Cells and Proteins—creating pharmaceuticals. *European Pharmaceutical Review*.
- [12] Fogarty, C. A., Fadda, E. (2021). Oligomannose N-Glycans 3D Architecture and Its Response to the Fc γ RIIIa Structural Landscape. *The journal of physical chemistry B*, 125, 2607–2616.
- [13] Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., Marth, J. (2022) *N-Glycans*. In *Essentials of Glycobiology* (4th ed.). 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. (eds) New York, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [14] Lyons, J. J., Milner, J. D., Rosenzweig, S. D. (2015) Glycans Instructing Immunity: The Emerging Role of Altered Glycosylation in Clinical Immunology. *Frontiers in pediatrics*, 3, 54.
- [15] Nettleship, J.E. (2012) Structural Biology of Glycoproteins. In *Glycosylation*.
- [16] Jensen, P. H., Kolarich, D., Packer, N. H. (2010) Mucin-type *O*-glycosylation—putting the pieces together. *The FEBS journal*, 277, 81–94.
- [17] Ohtsubo, K., Marth, J. D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 126, 855–867.
- [18] Wolfert, M. A., Boons, G. J. (2013) Adaptive immune activation: glycosylation does matter. *Nature chemical biology*, 9, 776–784.
- [19] Xu, C., Ng, D. T. (2015) Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16, 742–752.
- [20] Miller, N. L., Clark, T., Raman, R., Sasisekharan, R. (2021) Glycans in Virus-Host Interactions: A Structural Perspective. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 666756.
- [21] Hang, H. C., Bertozzi, C. R. (2005) The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13, 5021–5034.
- [22] Crouzier, T., Boettcher, K., Geonnotti, A. R., Kavanaugh, N. L., Hirsch, J. B., Ribbeck, K., Lieleg, O. (2015) Modulating Mucin Hydration and Lubrication by Deglycosylation and Polyethylene Glycol Binding. *Advanced Materials Interfaces*, 2, 1500308.
- [23] Käsdorf, B. T., Weber, F., Petrou, G., Srivastava, V., Crouzier, T., Lieleg, O. (2017) Mucin-Inspired Lubrication on Hydrophobic Surfaces. *Biomacromolecules*, 18, 2454–2462.
- [24] Scott, E., Munkley, J. (2019) Glycans as Biomarkers in Prostate Cancer. *International journal of molecular sciences*, 20, 1389.

- [25] Adamczyk, B., Tharmalingam, T., Rudd, P. M. (2012). Glycans as cancer biomarkers. *Biochimica et biophysica acta*, 1820, 1347–1353.
- [26] Mishra, A., Verma, M. (2010) Cancer biomarkers: are we ready for the prime time?. *Cancers*, 2, 190–208.
- [27] Comunale, M. A., Wang, M., Hafner, J., Krakover, J., Rodemich, L., Kopenhaver, B., Long, R. E., Junaidi, O., Bisceglie, A. M., Block, T. M., Mehta, A. S. (2009) Identification and development of fucosylated glycoproteins as biomarkers of primary hepatocellular carcinoma. *Journal of proteome research*, 8, 595–602.
- [28] Norton, P. A., Mehta, A. S. (2019) Expression of genes that control core fucosylation in hepatocellular carcinoma: Systematic review. *World journal of gastroenterology*, 25, 2947–2960.
- [29] Tu, C. F., Li, F. A., Li, L. H., Yang, R. B. (2022) Quantitative glycoproteomics analysis identifies novel FUT8 targets and signaling networks critical for breast cancer cell invasiveness. *Breast cancer research : BCR*, 24, 21.
- [30] Alley, W. R., Jr, Vasseur, J. A., Goetz, J. A., Svoboda, M., Mann, B. F., Matei, D. E., Menning, N., Hussein, A., Mechref, Y., Novotny, M. V. (2012). N-linked glycan structures and their expressions change in the blood sera of ovarian cancer patients. *Journal of proteome research*, 11, 2282–2300.
- [31] Jia, L., Zhang, J., Ma, T., Guo, Y., Yu, Y., Cui, J. (2018) The Function of Fucosylation in Progression of Lung Cancer. *Frontiers in oncology*, 8.
- [32] Munkley J. (2022) Aberrant Sialylation in Cancer: Therapeutic Opportunities. *Cancers*, 14, 4248.
- [33] Hodgson, K., Orozco-Moreno, M., Scott, E., Garnham, R., Livermore, K., Thomas, H., Zhou, Y., He, J., Bermudez, A., Garcia Marques, F. J., Bastian, K., Hysenaj, G., Archer Goode, E., Heer, R., Pitteri, S., Wang, N., Elliott, D. J., Munkley, J. (2023). The role of GCNT1 mediated O-glycosylation in aggressive prostate cancer. *Scientific reports*, 13, 17031.
- [34] Dobie, C., Skropeta, D. (2021) Insights into the role of sialylation in cancer progression and metastasis. *British journal of cancer*, 124, 76–90.
- [35] Natoni, A., Cerreto, M., De Propriis, M. S., Del Giudice, I., Soscia, R., Peragine, N., Intoppa, S., Milani, M. L., Guarini, A., Foà, R. (2023) Sialylation regulates migration in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 108, 1851–1860.
- [36] Štambuk, T., Gornik, O. (2021) Protein Glycosylation in Diabetes. *Advances in experimental medicine and biology*, 1325, 285–305.

- [37] Zhao, J., Lang, M. (2023) New insight into protein glycosylation in the development of Alzheimer's disease. *Cell death discovery*, 9, 314.
- [38] Kissel, T., Toes, R. E. M., Huizinga, T. W. J., Wuhrer, M. (2023) Glycobiology of rheumatic diseases. *Nature reviews. Rheumatology*, 19, 28–43.
- [39] Lipiński, P., Tylki-Szymańska, A. (2021) Congenital Disorders of Glycosylation: What Clinicians Need to Know?. *Frontiers in pediatrics*, 9, 715151.
- [40] Li, H., d'Anjou, M. (2009) Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Current opinion in biotechnology*, 20, 678–684.
- [41] Zeng, D., Debabov, D., Hartsell, T. L., Cano, R. J., Adams, S., Schuyler, J. A., McMillan, R., Pace, J. L. (2016). Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6, a026989.
- [42] Uçaktürk E. (2012). Analysis of glycoforms on the glycosylation site and the glycans in monoclonal antibody biopharmaceuticals. *Journal of separation science*, 35, 341–350.
- [43] Zhang, Y., Fan, C., Zhang, L., Ma, X. (2019). Glycosylation-dependent antitumor therapeutic monoclonal antibodies. *Progress in molecular biology and translational science*, 163, 471–485.
- [44] Berois, N., Pittini, A., Osinaga, E. (2022). Targeting Tumor Glycans for Cancer Therapy: Successes, Limitations, and Perspectives. *Cancers*, 14, 645.
- [45] Jin, S., Sun, Y., Liang, X., Gu, X., Ning, J., Xu, Y., Chen, S., Pan, L. (2022) Emerging new therapeutic antibody derivatives for cancer treatment. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7, 39.
- [46] Lattová, E., Bartusik, D., Spicer, V., Jellusova, J., Perreault, H., Tomanek, B. (2011) Alterations in glycopeptides associated with herceptin treatment of human breast carcinoma mcf-7 and T-lymphoblastoid cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 10, M111.007765.
- [47] Cao Y. (2013). Erythropoietin in cancer: a dilemma in risk therapy. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 24, 190–199.
- [48] Garcia, J., Hurwitz, H. I., Sandler, A. B., Miles, D., Coleman, R. L., Deurloo, R., Chinot, O. L. (2020) Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer treatment reviews*, 86, 102017.

- [49] Čaval, T., Heck, A. J. R., Reiding, K. R. (2021) Meta-heterogeneity: Evaluating and Describing the Diversity in Glycosylation Between Sites on the Same Glycoprotein. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 20, 100010.
- [50] Fang, P., Ji, Y., Oellerich, T., Urlaub, H., Pan, K. T. (2022). Strategies for Proteome-Wide Quantification of Glycosylation Macro- and Micro-Heterogeneity. *International journal of molecular sciences*, 23, 1609.
- [51] Riley, N. M., Hebert, A. S., Westphall, M. S., Coon, J. J. (2019) Capturing site-specific heterogeneity with large-scale *N*-glycoproteome analysis. *Nature communications*, 10, 1311.
- [52] Yu, A., Zhao, J., Peng, W., Banazadeh, A., Williamson, S. D., Goli, M., Huang, Y., Mechref, Y. (2018). Advances in mass spectrometry-based glycoproteomics. *Electrophoresis*, 39, 3104–3122.
- [53] Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M. C., Yates, J. R., 3rd (2013) Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical reviews*, 113, 2343–2394.
- [54] Oliveira, T., Thaysen-Andersen, M., Packer, N. H., Kolarich, D. (2021) The Hitchhiker's guide to glycoproteomics. *Biochemical Society transactions*, 49, 1643–1662.
- [55] Chernykh, A., Kawahara, R., Thaysen-Andersen, M. (2021) Towards structure-focused glycoproteomics. *Biochemical Society transactions*, 49, 161–186.
- [56] Dodds, E. D., Seipert, R. R., Clowers, B. H., German, J. B., Lebrilla, C. B. (2009) Analytical performance of immobilized pronase for glycopeptide footprinting and implications for surpassing reductionist glycoproteomics. *Journal of proteome research*, 8, 502–512.
- [57] Ruhaak, L. R., Zauner, G., Huhn, C., Bruggink, C., Deelder, A. M., Wuhrer, M. (2010) Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397, 3457–3481.
- [58] Szigeti, M., Bondar, J., Gjerde, D., Keresztessy, Z., Szekrenyes, A., Guttman, A. (2016) Rapid *N*-glycan release from glycoproteins using immobilized PNGase F microcolumns. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1032, 139–143.
- [59] Zhou, S., Veillon, L., Dong, X., Huang, Y., Mechref, Y. (2017) Direct comparison of derivatization strategies for LC-MS/MS analysis of *N*-glycans. *The Analyst*, 142, 4446–4455.

- [60] Kita, Y., Miura, Y., Furukawa, J., Nakano, M., Shinohara, Y., Ohno, M., Takimoto, A., Nishimura, S. (2007). Quantitative glycomics of human whole serum glycoproteins based on the standardized protocol for liberating *N*-glycans. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 6, 1437–1445.
- [61] de Leoz, M. L., An, H. J., Kronewitter, S., Kim, J., Beecroft, S., Vinall, R., Miyamoto, S., de Vere White, R., Lam, K. S., Lebrilla, C. (2008) 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.
- [62] Fukuda M. (2001) β -elimination for release of *O*-GalNAc-linked oligosaccharides from glycoproteins and glycopeptides. *Current protocols in molecular biology*.
- [63] Kotsias, M., Kozak, R. P., Gardner, R. A., Wuhrer, M., Spencer, D. I. R. (2019) Improved and semi-automated reductive β -elimination workflow for higher throughput protein *O*-glycosylation analysis. *PLoS one*, 14, e0210759.
- [64] Wilkinson, H., Saldova, R. (2020) Current Methods for the Characterization of *O*-Glycans. *Journal of proteome research*, 19, 3890–3905.
- [65] Ruhaak, L. R., Xu, G., Li, Q., Goonatileke, E., Lebrilla, C. B. (2018) Mass Spectrometry Approaches to Glycomic and Glycoproteomic Analyses. *Chemical Reviews*, 118, 7886–7930.
- [66] Molnarova, K., Cokrtova, K., Tomnikova, A., Krizek, T., Kozlik, P. (2022) Liquid chromatography and capillary electrophoresis in glycomic and glycoproteomic analysis. *Monatshefte für chemie*, 153, 659–686.
- [67] Medzihradszky, K. F., Besman, M. J., Burlingame, A. L. (1997) Structural characterization of site-specific *N*-glycosylation of recombinant human factor VIII by reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 69, 3986–3994.
- [68] Darebna, P., Novak, P., Kucera, R., Topolcan, O., Sanda, M., Goldman, R., Pompach, P. (2017) Changes in the expression of *N*- and *O*-glycopeptides in patients with colorectal cancer and hepatocellular carcinoma quantified by full-MS scan FT-ICR and multiple reaction monitoring. *Journal of Proteomics*, 153, 44–52.
- [69] Yin, H., An, M., So, P. K., Wong, M. Y., Lubman, D. M., Yao, Z. (2018) The analysis of alpha-1-antitrypsin glycosylation with direct LC-MS/MS. *Electrophoresis*, 39, 2351–2361.

- [70] Yang, H., Xu, F., Xiao, K., Chen, Y., Tian, Z. (2021) *N*-Glycoproteomics Study of Putative *N*-Glycoprotein Biomarkers of Drug Resistance in MCF-7/ADR Cells. *Phenomics*, *1*, 269–284.
- [71] Yang, L., Liu, J., Li, H., Liu, Y., He, A., Huang, P., Gao, W., Cao, H., Xu, R., Tian, R. (2022) A fully integrated sample preparation strategy for highly sensitive intact glycoproteomics. *The Analyst*, *147*, 794–798.
- [72] Bruderer, R., Bernhardt, O. M., Gandhi, T., Reiter, L. (2016) High-precision iRT prediction in the targeted analysis of data-independent acquisition and its impact on identification and quantitation. *Proteomics*, *16*, 2246–2256.
- [73] Kozlik, P., Goldman, R., Sanda, M. (2017) Study of structure-dependent chromatographic behavior of glycopeptides using reversed phase nanoLC. *Electrophoresis*, *38*, 2193–2199.
- [74] Kozlik, P., Sanda, M., Goldman, R. (2017) 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.
- [75] Ozohanics, O., Turiák, L., Puerta, A., Vékey, K., Drahos, L. (2012) High-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry methodology for analyzing site-specific *N*-glycosylation patterns. *Journal of chromatography A*, *1259*, 200–212.
- [76] Wang, B., Tsybovsky, Y., Palczewski, K., Chance, M. R. (2014) 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.
- [77] Molnarova, K., Duris, A., Jecmen, T., Kozlik, P. (2021) Comparison of human IgG glycopeptides separation using mixed-mode hydrophilic interaction/ion-exchange liquid chromatography and reversed-phase mode. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *413*, 4321–4328.
- [78] Kozlik, P., Goldman, R., Sanda, M. (2018) Hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation of glycopeptides and their isomers. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *410*, 5001–5008.
- [79] Periat, A., Fekete, S., Cusumano, A., Veuthey, J. L., Beck, A., Lauber, M., Guillarme, D. (2016) Potential of hydrophilic interaction chromatography for the analytical characterization of protein biopharmaceuticals. *Journal of chromatography A*, *1448*, 81–92.

- [80] Bernal, J., Ares, A. M., Pól, J., Wiedmer, S. K. (2011) Hydrophilic interaction liquid chromatography in food analysis. *Journal of chromatography A*, 1218, 7438–7452.
- [81] Salas, D., Borrull, F., Fontanals, N., Marcé, R. M. (2017). Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based detection to determine emerging organic contaminants in environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 94, 141–149.
- [82] Lobue, P. A., Jora, M., Addepalli, B., Limbach, P. A. (2019) Oligonucleotide analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry in the absence of ion-pair reagents. *Journal of chromatography. A*, 1595, 39–48.
- [83] Tang, D. Q., Zou, L., Yin, X. X., Ong, C. N. (2016) HILIC-MS for metabolomics: An attractive and complementary approach to RPLC-MS. *Mass spectrometry reviews*, 35, 574–600.
- [84] Buszewski, B., Noga, S. (2012) Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 402, 231–247.
- [85] McCalley D. V. (2017) Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 1523, 49–71.
- [86] Guo, Y., Baran, D. (2023) Hydrophilic Partitioning or Surface Adsorption? A Quantitative Assessment of Retention Mechanisms for Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). *Molecules*, 28, 6459.
- [87] Mant, C. T., Hodges, R. S. (2008) Mixed-mode hydrophilic interaction/cation-exchange chromatography (HILIC/CEX) of peptides and proteins. *Journal of separation science*, 31, 2754–2773.
- [88] Kozlik, P., Vaclova, J., Kalikova, K. (2021) Mixed-mode hydrophilic interaction/ion-exchange liquid chromatography – Separation potential in peptide analysis. *Microchemical Journal*, 165, 106158.
- [89] Huang, Y., Nie, Y., Boyes, B., Orlando, R. (2016) Resolving Isomeric Glycopeptide Glycoforms with Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). *Journal of biomolecular techniques:JBT*, 27, 98–104.
- [90] Pereira, L. (2008) Porous Graphitic Carbon as a Stationary Phase in HPLC: Theory and Applications. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31, 1687–1731.

- [91] Veillon, L., Huang, Y., Peng, W., Dong, X., Cho, B. G., Mechref, Y. (2017) Characterization of isomeric glycan structures by LC-MS/MS. *Electrophoresis*, 38, 2100–2114.
- [92] Davies, M., Smith, K. D., Harbin, A. M., Hounsell, E. F. (1992) High-performance liquid chromatography of oligosaccharide alditols and glycopeptides on a graphitized carbon column. *Journal of chromatography*, 609, 125–131.
- [93] Davies, M. J., Smith, K. D., Carruthers, R. A., Chai, W., Lawson, A. M., Hounsell, E. F. (1993) Use of a porous graphitised carbon column for the high-performance liquid chromatography of oligosaccharides, alditols and glycopeptides with subsequent mass spectrometry analysis. *Journal of chromatography*, 646, 317–326.
- [94] Fan, J. Q., Kondo, A., Kato, I., Lee, Y. C. (1994) High-performance liquid chromatography of glycopeptides and oligosaccharides on graphitized carbon columns. *Analytical biochemistry*, 219, 224–229.
- [95] Nwosu, C. C., Seipert, R. R., Strum, J. S., Hua, S. S., An, H. J., Zivkovic, A. M., German, B. J., Lebrilla, C. B. (2011) Simultaneous and extensive site-specific *N*- and *O*-glycosylation analysis in protein mixtures. *Journal of proteome research*, 10, 2612–2624.
- [96] Hua, S., Nwosu, C. C., Strum, J. S., Seipert, R. R., An, H. J., Zivkovic, A. M., German, J. B., Lebrilla, C. B. (2012) Site-specific protein glycosylation analysis with glycan isomer differentiation. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403, 1291–1302.
- [97] Hua, S., Hu, C. Y., Kim, B. J., Totten, S. M., Oh, M. J., Yun, N., Nwosu, C. C., Yoo, J. S., Lebrilla, C. B., An, H. J. (2013) Glyco-analytical multispecific proteolysis (Glyco-AMP): a simple method for detailed and quantitative Glycoproteomic characterization. *Journal of proteome research*, 12, 4414–4423.
- [98] Zhu, R., Huang, Y., Zhao, J., Zhong, J., Mechref, Y. (2020) Isomeric Separation of *N*-Glycopeptides Derived from Glycoproteins by Porous Graphitic Carbon (PGC) LC-MS/MS. *Analytical chemistry*, 92, 9556–9565.
- [99] Donohoo, K. B., Wang, J., Goli, M., Yu, A., Peng, W., Hakim, M. A., Mechref, Y. (2022). Advances in mass spectrometry-based glycomics-An update covering the period 2017-2021. *Electrophoresis*, 43, 119–142.
- [100] Zhu, R., Zacharias, L., Wooding, K. M., Peng, W., Mechref, Y. (2017). Glycoprotein Enrichment Analytical Techniques: Advantages and Disadvantages. *Methods in enzymology*, 585, 397–429.

- [101] Ruiz-May, E., Catalá, C., Rose, J. K. (2014) *N*-Glycoprotein Enrichment by Lectin Affinity Chromatography. In *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, Jorriñ-Novó, J. V., Komatsu, S., Weckwerth, W., Wienkoop, S (eds). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- [102] Sajid, M. S., Jabeen, F., Hussain, D., Ashiq, M. N., Najam-Ul-Haq, M. (2017) Hydrazide-functionalized affinity on conventional support materials for glycopeptide enrichment. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409, 3135–3143.
- [103] Kong, S., Zhang, Q., Yang, L., Huang, Y., Liu, M., Yan, G., Zhao, H., Wu, M., Zhang, X., Yang, P., Cao, W. (2021) Effective Enrichment Strategy Using Boronic Acid-Functionalized Mesoporous Graphene-Silica Composites for Intact *N*- and *O*-Linked Glycopeptide Analysis in Human Serum. *Analytical chemistry*, 93, 6682–6691.
- [104] Yan, J., Li, X., Yu, L., Jin, Y., Zhang, X., Xue, X., Ke, Y., Liang, X. (2010) Selective enrichment of glycopeptides/phosphopeptides using porous titania microspheres. *Chemical communications*, 46, 5488–5490.
- [105] Zacharias, L. G., Hartmann, A. K., Song, E., Zhao, J., Zhu, R., Mirzaei, P., Mechref, Y. (2016) HILIC and ERLIC Enrichment of Glycopeptides Derived from Breast and Brain Cancer Cells. *Journal of proteome research*, 15, 3624–3634.
- [106] Hortin, G. L., Trimpe, B. L. (1990) Lectin affinity chromatography of proteins bearing *O*-linked oligosaccharides: application of jacalin-agarose. *Analytical biochemistry*, 188, 271–277.
- [107] Madera, M., Mann, B., Mechref, Y., Novotny, M. V. (2008) Efficacy of glycoprotein enrichment by microscale lectin affinity chromatography. *Journal of separation science*, 31, 2722–2732.
- [108] Alvarez-Manilla, G., Warren, N. L., Atwood, J., 3rd, Orlando, R., Dalton, S., Pierce, M. (2010) Glycoproteomic analysis of embryonic stem cells: identification of potential glycobiomarkers using lectin affinity chromatography of glycopeptides. *Journal of proteome research*, 9, 2062–2075.
- [109] Bhattacharyya, L., Brewer, C. F. (1989). Interactions of concanavalin A with asparagine-linked glycopeptides. Structure/activity relationships of the binding and precipitation of oligomannose and bisected hybrid-type glycopeptides with concanavalin A. *European journal of biochemistry*, 178, 721–726.
- [110] Orczyk-Pawłowicz, M., Augustyniak, D., Hirnle, L., Kątnik-Prastowska, I. (2013) Lectin-based analysis of fucose and sialic acid expressions on human amniotic IgA during normal pregnancy. *Glycoconjugate journal*, 30, 599–608.

- [111] Durham, M., Regnier, F. E. (2006) Targeted glycoproteomics: serial lectin affinity chromatography in the selection of *O*-glycosylation sites on proteins from the human blood proteome. *Journal of chromatography A*, 1132, 165–173.
- [112] Cao, Q., Ma, C., Bai, H., Li, X., Yan, H., Zhao, Y., Ying, W., Qian, X. (2014) Multivalent hydrazide-functionalized magnetic nanoparticles for glycopeptide enrichment and identification. *The Analyst*, 139, 603–609.
- [113] Chen, Y., Qin, H., Yue, X., Zhou, J., Liu, L., Nie, Y., Ye, M. (2021) Highly Efficient Enrichment of *O*-GlcNAc Glycopeptides Based on Chemical Oxidation and Reversible Hydrazide Chemistry. *Analytical chemistry*, 93, 16618–16627.
- [114] Xu, Y., Wu, Z., Zhang, L., Lu, H., Yang, P., Webley, P. A., Zhao, D. (2009) Highly specific enrichment of glycopeptides using boronic acid-functionalized mesoporous silica. *Analytical chemistry*, 81, 503–508.
- [115] Xu, Y., Zhang, L., Lu, H. (2013) Use of boronic acid nanoparticles in glycoprotein enrichment. *Methods in molecular biology*, 951, 45–55.
- [116] Ongay, S., Boichenko, A., Govorukhina, N., Bischoff, R. (2012) Glycopeptide enrichment and separation for protein glycosylation analysis. *Journal of Separation Science*, 35, 2341–2372.
- [117] Zhu, R., Zacharias, L., Wooding, K. M., Peng, W., Mechref, Y. (2017). Glycoprotein Enrichment Analytical Techniques: Advantages and Disadvantages. In: *Methods in enzymology*, A. K. Shukla (ed). 585, 397–429. Cambridge, Massachusetts: Academic Press.
- [118] Zhu, R., Zacharias, L., Wooding, K. M., Peng, W., Mechref, Y. (2017) Glycoprotein Enrichment Analytical Techniques: Advantages and Disadvantages. *Methods in enzymology*, 585, 397–429.
- [119] Chen, C. C., Su, W. C., Huang, B. Y., Chen, Y. J., Tai, H. C., Obena, R. P. (2014) Interaction modes and approaches to glycopeptide and glycoprotein enrichment. *The Analyst*, 139, 688–704.
- [120] Jensen, P. H., Mysling, S., Højrup, P., Jensen, O. N. (2013). Glycopeptide enrichment for MALDI-TOF mass spectrometry analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography solid phase extraction (HILIC SPE). In: *Mass Spectrometry of Glycoproteins*. Kohler, J. J., Patrie, S. M. (eds). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- [121] Hemström, P., Irgum, K. (2006) Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of separation science*, 29, 1784–1821.

- [122] Thaysen-Andersen, M., Mysling, S., Højrup, P. (2009) Site-specific glycoprofiling of *N*-linked glycopeptides using MALDI-TOF MS: strong correlation between signal strength and glycoform quantities. *Analytical chemistry*, 81, 3933–3943.
- [123] Mysling, S., Palmisano, G., Højrup, P., Thaysen-Andersen, M. (2010) Utilizing ion-pairing hydrophilic interaction chromatography solid phase extraction for efficient glycopeptide enrichment in glycoproteomics. *Analytical chemistry*, 82, 5598–5609.
- [124] Zhao, Y., Chen, Y., Xiong, Z., Sun, X., Zhang, Q., Gan, Y., Zhang, L., Zhang, W. (2017) Synthesis of magnetic zwitterionic-hydrophilic material for the selective enrichment of *N*-linked glycopeptides. *Journal of chromatography A*, 1482, 23–31.
- [125] Alagesan, K., Khilji, S. K., Kolarich, D. (2017) It is all about the solvent: on the importance of the mobile phase for ZIC-HILIC glycopeptide enrichment. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 40, 529–538.
- [126] Xue, Y., Xie, J., Fang, P., Yao, J., Yan, G., Shen, H., Yang, P. (2018) Study on behaviors and performances of universal *N*-glycopeptide enrichment methods. *The Analyst*, 143, 1870–1880.
- [127] Selman, M. H., Hemayatkar, M., Deelder, A. M., Wührer, M. (2011) Cotton HILIC SPE microtips for microscale purification and enrichment of glycans and glycopeptides. *Analytical chemistry*, 83, 2492–2499.
- [128] Dedvisitsakul, P., Jacobsen, S., Svensson, B., Bunkenborg, J., Finnie, C., Häggglund, P. (2014) Glycopeptide enrichment using a combination of ZIC-HILIC and cotton wool for exploring the glycoproteome of wheat flour albumins. *Journal of proteome research*, 13, 2696–2703.
- [129] Sun, N., Xiong, Y., Qing, G., Zhao, Y., Li, X., Liang, X. (2018) Selective enrichment of sialylated glycopeptides with a d-allose@SiO₂ matrix. *RSC advances*, 8, 38780–38786.
- [130] Liu, L., Zhu, B., Fang, Z., Zhang, N., Qin, H., Guo, Z., Liang, X., Yao, Z., Ye, M. (2021) Automated Intact Glycopeptide Enrichment Method Facilitating Highly Reproducible Analysis of Serum Site-Specific *N*-Glycoproteome. *Analytical chemistry*, 93, 7473–7480.
- [131] Bodnar, E. D., Perreault, H. (2013) Qualitative and quantitative assessment on the use of magnetic nanoparticles for glycopeptide enrichment. *Analytical chemistry*, 85, 10895–10903.

- [132] Wu, J., Jin, X., Zhu, C., Yan, Y., Ding, C. F., Tang, K. (2021) Gold nanoparticle-glutathione functionalized MOFs as hydrophilic materials for the selective enrichment of glycopeptides. *Talanta*, 228, 122263.
- [133] Tai, C. S., Lin, Y. R., Teng, T. H., Lin, P. Y., Tu, S. J., Chou, C. H., Huang, Y. R., Huang, W. C., Weng, S. L., Huang, H. D., Chen, Y. L., Chen, W. L. (2017) Haptoglobin expression correlates with tumor differentiation and five-year overall survival rate in hepatocellular carcinoma. *PloS one*, 12, e0171269.
- [134] Fiorito, V., Tolosano, E. (2022) Hemopexin and Cancer. *International journal of molecular sciences*, 23, 997.
- [135] Vidarsson, G., Dekkers, G., Rispen, T. (2014) IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*, 5, 520.
- [136] HALO® Columns for Chromatography Separations. Dostupné z URL: <https://halocolumns.com/product/halo-90-a-penta-hilic/> [9.1.2024].
- [137] Waters Corporation: The Science of What's Possible. Dostupné z URL: <https://www.waters.com/nextgen/cz/en.html> [9.1.2024].
- [138] Merck | Life Science | Industrial & Lab Chemicals. Dostupné z: <http://www.merckmillipore.com/CZ/cs> [9.1.2024].
- [139] Toghi Eshghi, S., Yang, W., Hu, Y., Shah, P., Sun, S., Li, X., Zhang, H. (2016) Classification of Tandem Mass Spectra for Identification of *N*- and *O*-linked Glycopeptides. *Scientific reports*, 6, 37189.
- [140] Taraba, L., Křížek, T. (2017) Study of polyaniline-coated silica gel as a stationary phase in different modes of capillary liquid chromatography. *Monatshefte fur chemie*, 148, 1605–1611.
- [141] Taraba, L., Křížek, T., Hodek, O., Kalíková, K., Coufal, P. (2017) Characterization of polyaniline-coated stationary phases by using the linear solvation energy relationship in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode using capillary liquid chromatography. *Journal of separation science*, 40, 677–687.