

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Studium proteinových biomarkerů a posttranslačních modifikací pomocí hmotnostní spektrometrie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Vojtěch Franc
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Pavel Řehulka, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	22. 4. 2011

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 22. 5. 2011

Vojtěch Franc

Děkuji Pavlu Řehulkovi a Marku Šebelovi za odborné vedení, cenné rady, připomínky a všechny znalosti, které mi předali.

Můj dík patří i celému kolektivu katedry biochemie Univerzity Palackého v Olomouci, Ústavu molekulární patologie Univerzity obrany v Hradci králové a Technické Univerzity Vídeň za vytvoření vstřícné atmosféry na pracovišti.

V neposlední řadě patří můj velký dík mým rodičům, rodině, přátelům a kamarádům, kteří za mnou stáli po celou dobu studia a bez jejichž podpory by tato práce nemohla vzniknout.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora

Název práce

Typ práce

Pracoviště

Vedoucí práce

Konzultant

Rok obhajoby práce

Abstrakt

Bc. Vojtěch Franc

Studium proteinových biomarkerů a posttranslačních modifikací pomocí hmotnostní spektrometrie

Diplomová

Katedra biochemie

RNDr. Pavel Řehulka, Ph.D.

prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.

2011

V teoretické části této diplomové práce se pojednává o posttranslačních modifikacích proteinů, obzvláště pak o N- a O-glykosylacích. Popsána je syntéza N- a O-glykanů, jejich funkce a některé strategie jejich analýzy hmotnostní spektrometrií.

V experimentální části byly studovány tři glykoproteiny – alpha-2-HS-glykoprotein (asialofetuin), cytokinin oxidasa/dehydrogenasa (CKO) a polymerní myelomový IgA (pIgA1). Asialofetuin byl použit jako standardní protein, zatímco CKO a pIgA1 simulující IgA produkované pacienty trpící IgA nefropatií získaný z University of Alabama, byly použity jako vzorky glykoproteinů. Asialofetuin, což je protein modifikovaný jak N-, tak O-glykosylacemi, byl štěpen trypsinem v roztoku nebo kombinací trypsinu a prolylendoproteasy z *Aspergillus niger* (PSE). Získané peptidové směsi byly buď přímo měřeny na hmotnostním spektru MALDI („matrix-assisted laser desorption/ionization“) TOF/TOF („time-of-flight/time-of-flight“) MS/MS („tandem mass spectrometry“) nebo separovány použitím chromatografie na obrácené fázi (RP-LC) a následně analyzovány na MALDI-TOF/TOF MS/MS. Pro RP-LC separaci byla použita 35 mm laboratorně připravená kolona a zařízení využívající jednoduchý mikrogradient. To poskytovalo zjednodušení glykopeptidových směsí, výsledkem čehož bylo zlepšení analýzy glykosylací. Hlavním cílem této práce bylo identifikovat O-glykopeptidy a stanovit lokalizaci odpovídajících O-glykosylací v pantové oblasti IgA1. Pro tento účel byl nejprve vzorek pIgA separován použitím SDS-PAGE („sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“). Na výsledném elektroferogramu se objevily dva pásy s molekulovými hmotnostmi 63 kDa a 28 kDa, které odpovídaly těžkému a lehkému řetězci IgA1. Protože peptidová sekvence pantové oblasti obsahuje tři cysteinová rezidua, bylo také nezbytné optimalizovat redukci/alkylaci vzorku pIgA1, což vedlo k odstranění nežádoucích peptidových modifikací a zlepšení signálu analyzovaných O-glykopeptidů. Separovaný těžký řetězec byl vyříznut z gelu a podroben štěpení trypsinu v gelu. Peptidová směs byla separována RP-LC využívající zařízení s mikrogradientem a dále analyzována MALDI-TOF/TOF MS/MS. Jedna frakce obsahovala směs různých O-glykoforem tryptického peptidu pantové oblasti. Interpretace MS/MS spekter těchto O-glykopeptidů

poskytla jednoznačnou lokalizaci všech O-glykosylačních míst v sedmi nejčtetnějších glykoformách, včetně glykoforem galaktosa-deficientních. Naše výsledky reprezentují první přímé určení míst mnohačetné O-glykosylace s komplexní heterogenitou v pantové oblasti IgA1 použitím MALDI TOF/TOF MS/MS. Posledním studovaným glykoproteinem v této práci byl rekombinantní CKO isoenzym 1 z kukuřice (ZmCKO1) exprimovaný v *Yarrowia lipolytica*. Některá potenciální N-glykosylační místa byla experimentálně potvrzena použitím hmotnostně spektrometrické analýzy. V tryptickém peptidu ZmCKO1 269-LTAPRPGGGGA SFGPMSYVEGSVFNQSLATDLANTGFFTDADVAR-313 byla potvrzena N-glykosylace na Asn 294 technikou MALDI-TOF/TOF MS/MS. Při použití kyseliny ferulové jako matrice byla na stejném aminokyselinovém reziduu detekována technikou MALDI-TOF hyperglykosylace v rozpětí od Man₂₀GlcNAc₂ do Man₄₅GlcNAc₂, a to jak v lineárním, tak v reflektrovném modu.

Klíčová slova

glykoproteomika; hmotnostní spektrometrie; N-glykany; O-glykany; prolyl specific endoprotease

Počet stran

98

Počet příloh

0

Jazyk

Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Vojtěch Franc
Title	Study of protein biomarkers and posttranslational modifications using mass spectrometry
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	RNDr. Pavel Řehulka, Ph.D.
Co-supervisor	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
The year of presentation	2011
Abstract	<p>The theoretical part of this diploma thesis deals with posttranslational modifications of proteins, especially N- and O-glycosylation. It describes the synthesis N- and O-glycans, their functions and some strategies of their analysis by mass spectrometry.</p> <p>In the experimental part three glycoproteins were studied – alpha-2-HS-glycoprotein (asialofetuin), cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKO) and polymer myeloma IgA1 (pIgA1). Asialofetuin was used as a standard protein, while CKO sample and pIgA1 simulating IgA from IgA nephropathy patients obtained from University of Alabama were used as sample glycoproteins. Asialofetuin as a protein modified with N- and O-glycosylation was digested in solution with trypsin or combination of trypsin and prolyl specific endoprotease from <i>Aspergillus niger</i> (PSE). The obtained peptide mixtures were either measured directly with matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight/time-of-flight (TOF/TOF) tandem mass spectrometry or separated using reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) and subsequently analyzed by MALDI-TOF/TOF MS/MS. The RP-LC separation using 35 mm laboratory made column using simple microgradient forming device provided simplification of the glycopeptide mixture and resulted in an improved analysis of glycosylation modifications. The primary aim of this work was to identify O-glycopeptides and to determine the localization of corresponding O-glycosylations at the hinge region of IgA1. For this purpose, the analyzed sample of pIgA1 was first separated using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The resulting electropherogram showed two protein bands with the apparent molecular masses of 63 kDa and 28 kDa that correspond to heavy and light chain of IgA1. Because the peptide sequence of hinge region contains three cysteine residues, it was also necessary to optimize the reduction/alkylation of pIgA1 sample, which resulted in removing the undesired peptide modifications and improved signal response of analyzed O-glycopeptides. The separated heavy chain was cut out of the gel and treated in-gel with trypsin. The peptide mixture separated by RP LC microgradient device was further analyzed by MALDI-TOF/TOF MS/MS. One sample fraction contained the mixture of various O-glycoforms of the</p>

hinge region tryptic peptide. The interpretation of MS/MS spectra of these O-glycopeptides provided unambiguous localization of all O-glycosylation sites in seven most abundant glycoforms, including the glycoforms deficient in Gal. Our results represent the first direct site assignment of multiple O-glycosylation with complex heterogeneity of the IgA1 hinge region using MALDI TOF/TOF MS/MS. The last studied glycoprotein sample in this work was recombinant maize CKO isoenzyme 1 (ZmCKO1) expressed in *Yarrowia lipolytica*. Some of the potential N-glycosylation sites were experimentally confirmed using the mass spectrometry analysis. Especially, in the ZmCKO1 tryptic peptide 269-LTAPRPGGGGASFGPMSYVEGSVFNQSLATDLAN TGFFTDADVAR-313, the N-glycosylation at the Asn 294 residue was proved MALDI-TOF/TOF MS/MS. Using ferulic acid as matrix, the hyperglycosylation spanning from Man₂₀GlcNAc₂ to Man₄₅GlcNAc₂ of the same amino acid residue was detected both in linear and reflectron mode in MALDI-TOF MS analysis.

Keywords	glycoproteomics; mass spectrometry; N-glycans; O-glycans; prolyl specific endoprotease
Number of pages	98
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1. Úvod.....	10
1.1 Aplikace proteomiky pro výzkum a hledání proteinových biomarkerů	10
1.2 Význam proteomiky pro studium posttranslačních modifikací	11
2. Klasifikace a struktura glykanových komponent.....	13
2.1 N-glykosylace.....	13
2.2 O-glykosylace.....	16
3. Biosyntéza oligosacharidů	18
3.1 Obecné rysy biosyntézy oligosacharidů	18
3.2 Biosyntetická dráha vedoucí k N-glykanům.....	19
3.2.1 Systém kontroly kvality – „monitoring“ správného sbalení („foldingu“) glykosylovaných proteinů.....	22
3.4 Biosyntetická dráha vedoucí k O-glykanům.....	23
3.5 Funkce O-glykanů	25
3.6 Mnoho rozpustných a povrchových proteinů obsahuje malé klastry O-glykanů	26
3.7 Glykosylace hrají kritickou roli ve zdraví organismů	26
4. Analýza glykosylace	27
4.1 Překážky v analýze glykosylace	27
4.2 Analýza glykoproteinů	29
4.3 Příprava vzorku pro MS analýzu glykoproteomu.....	29
4.4 Fragmentace glykanů.....	30
4.5 Fragmentace u MALDI-MS	33
4.6 Hmotnostní spektrometrie uvolněných oligosacharidů	33
4.7 Analýza glykopeptidů.....	35
4.8 Analýza intaktních glykopeptidů.....	35
5. Modelové glykoproteiny	36
5.1 Alfa-2-HS-glykoprotein.....	36
5.2 Cytokinin oxidasa/dehydrogenasa (CKO).....	37
5.3 Imunoglobulin A (IgA).....	37
5.3.1 Fyziologická role IgA.....	38
6. Příklad aplikace analýzy glykosylace	40
6.1 Studium IgA nefropatie (IgAN).....	40
6.2 Hypotetický model patogenze IgAN	41
6.3 Proteomika může pomoci v diagnóze a progóze IgAN	42
6.4 Složitost analýzy glykosylace na IgA1 molekule	43
7. Materiál a metody	44

7.1 Biologický materiál	44
7.2 Chemikálie a další materiál	44
7.3 Přístrojová technika	45
7.4 Metody.....	46
7.4.1 SDS-PAGE.....	46
7.4.2 Štěpení proteinů v gelu, redukce a alkylace	47
7.4.3 Příprava laboratorně plněných kolon	47
7.4.4 Odsolení, zahuštění a separace peptidů.....	48
7.4.5 Štěpení proteinů v roztoku	49
7.4.6 Štěpení tryptických peptidů v roztoku PSE.....	50
7.4.7 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	50
7.4.8 Tandemová hmotnostní spektrometrie	50
8. Výsledky	Chyba! Záložka není definována.
8.1 Asialofetuin	Chyba! Záložka není definována.
8.1.1 MALDI TOF MS a MS/MS analýza N-glykopeptidů asialofetuinu bez separace	Chyba! Záložka není definována.
8.1.2 MALDI TOF MS a MS/MS analýza N-glykopeptidů asialofetuinu se separací	Chyba! Záložka není definována.
8.1.3 MALDI TOF MS a MS/MS analýza N-glykopeptidů asialofetuinu štěpených kombinací trypsinu a PSE se separací.....	Chyba! Záložka není definována.
8.1.4 MALDI TOF MS a MS/MS analýza O-glykopeptidů asialofetuinu bez separace	Chyba! Záložka není definována.
8.1.5 MALDI TOF MS a MS/MS analýza O-glykopeptidů asialofetuinu se separací	Chyba! Záložka není definována.
8.1.6 MALDI TOF MS a MS/MS analýza O-glykosylací asialofetuinu štěpeného kombinací trypsinu a PSE se separací.....	Chyba! Záložka není definována.
8.2 Imunoglobulin A.....	Chyba! Záložka není definována.
8.2.1 Optimalizace přípravy vzorku pIgA1 pro analýzu na MS	Chyba! Záložka není definována.
8.2.2 MALDI TOF MS/MS analýza O-glykosylací pIgA1 po separaci	Chyba! Záložka není definována.
8.2.3 Optimalizovaný protokol přípravy vzorku IgA pro analýzu hmotnostní spektrometrií	Chyba! Záložka není definována.
8.3 Cytokinin oxidasa/dehydrogenasa.....	Chyba! Záložka není definována.
8.3.1 MALDI TOF MS a MS/MS analýza N-glykosylací CKO1	Chyba! Záložka není definována.
9. Diskuze	Chyba! Záložka není definována.

Seznam použité literatury	52
Seznam použitých zkratek	62

CÍLE PRÁCE

Teoretická část – provedení rešerše literatury o následujících tématech

- glykosylace proteinů, syntéza a funkce N- a O-glykanů a jejich analýza hmotnostní spektrometrií
- glykoproteiny imunoglobulin A, asialofetuin a cytokinin oxidasa/dehydrogenasa

Experimentální část

- optimalizace přípravy vzorků glykoproteinů pro analýzu hmotnostní spektrometrií
- identifikace a lokalizace O-glykosylací v pantové oblasti IgA1
- identifikace N-glykosylace na cytokinin oxidase/reduktase

Teoretická část

1. Úvod

1.1 Aplikace proteomiky pro výzkum a hledání proteinových biomarkerů

Proteomika je vědecká disciplína zabývající se studiem proteinového složení buňky tzv. proteomu (James, 1997). Zaměřuje se především na struktury a funkce proteinů a jejich kvalitativní a kvantitativní zastoupení. Díky velkým pokrokům ve vývoji analytických technologií pro výzkum proteinů nachází proteomika široké uplatnění v objevování nových léků a proteinových biomarkerů. Biomarkery jsou indikátory biologických procesů a mohou jimi být geny, proteiny, malé molekuly nebo metabolity (Hale *et al.*, 2003). Na výzkum geneticky podmíněných komplexních nemocí bylo vynaloženo obrovské úsilí, díky čemuž je dnes možné v určitých případech použít jednonukleotidové polymorfismy (SNP) jako biomarkery určitých nemocí a/nebo predispozic pacienta pro tyto choroby (Lai *et al.*, 2001). SNP poskytují velmi hodnotné informace použitelné při výběru vhodné léčby a k predikci vyhlídek pacienta. Ovšem zatímco SNP indikují náchylnost k dané nemoci, je to aktivita výsledného proteinu, který ji ve skutečnosti determinuje. Biomarkery toxicity léků nebo jejich účinků na lidský organismus mají značný potenciál urychlit proces vývoje léků, jelikož poskytují informace o jejich účinku dříve, než vůbec dochází k jeho klinickým projevům. Biomarkery tak mohou mít pozitivní dopad na délku a náklady klinické terapie (Hale *et al.*, 2003).

Po získání obrovského množství informací z projektů genomového sekvencování se začala pozornost upínat směrem k produktům exprese genů, čili proteinům. Proteinové biomarkery také poskytují prediktivní informace, ale na rozdíl od SNP jsou vhodné i ve sledování účinků léků během léčby pacientů. Praktickou výhodou využitelnou v klinické praxi je měření změn v zastoupení proteinů v tělních tekutinách, tkáních i buňkách. Vzhledem k velkým objemům dat získaných z analýzy proteinů je ovšem nutné do výzkumu zavádět dostupnější („high throughput“) účinnější a citlivější techniky (Hale *et al.*, 2003).

Ačkoliv bylo vyvinuto nesčetné množství rozdílných variant tzv. „assay“ technologií, které usnadňují rychlé analýzy mnoha proteinových biomarkerů simultánně z jediného vzorku (Kingsmore & Patel, 2003; Peluso *et al.*, 2003). Tyto metody jsou nejvíce limitovány potřebou znalosti monitorovaného proteinu a vývoj specifických reagensů (nejčastěji specifických protilátek) pro tyto proteiny. Problémem je tedy nalezení pokud možno všech relevantních biomarkerů bez předchozí znalosti, co vlastně jsou. Řešení se nabízí v začlenění separačních technik, z nichž některé jsou používány již desítky let spolu s „high throughput“ hmotnostní spektrometrií. Těmito separačními technikami jsou

dvoudimenzionální (2D) gelová elektroforéza (Chambers *et al.*, 2000) a chromatografie (Nilsson & Davidsson, 2000). Hmotnostní spektrometrii (MS) je také možné používat k identifikaci a kvantifikaci proteinů bez předchozí separace (McDonald & Yates, 2002).

Vývoj kvantifikace metodami s hmotnostní spektrometrií je ukázkou toho, jaký mohou mít tyto přístupy užitek v identifikaci biomarkerů v komplexních vzorcích ve stylu „high throughput“. Ovšem jakkoli jsou tyto metody robustní, změny v proteinovém složení naměřené tímto způsobem identifikují pouze kandidáty na biomarkery. Jejich validace bude navíc vyžadovat velmi sofistikované bioinformatické zpracování nasbíraných dat a určení jejich statistické významnosti a spolehlivosti. Celý tento proces by mohl nakonec poskytnout nástroje, které využijí experti pro vizualizaci dat a vykreslení smysluplných závěrů na základě biomarkeru nebo souboru biomarkerů (Hale *et al.*, 2003).

1.2 Význam proteomiky pro studium posttranslačních modifikací

V roce 2003 byl ukončen jeden z největších vědeckých projektů v historii lidstva „Human Genome Project“, díky němuž bylo možné získat primární struktury mnoha proteinů (Schmutz *et al.*, 2004). Ukázalo se však, že pouhá znalost aminokyselinové sekvence určující primární strukturu proteinu není zdaleka dostačující pro vysvětlení jejich rozmanitých biologických funkcí. Po syntéze proteinů ribozomy dochází k jejich úpravám, které se souhrnně nazývají posttranslační modifikace - PTM (tab. 1). Tyto úpravy moduluji vlastnosti proteinů proteolytickým štěpením nebo přidáním modifikující skupiny na jednu nebo více aminokyselin. PTM proteinů zastávají mnoho funkcí v organismu. Mohou např. určovat terciární a kvartérní strukturu proteinů a jejich lokalizaci nebo regulovat aktivitu a interakce s dalšími proteiny (Seo & Lee, 2004, Mann & Jensen, 2003). Příkladem může být buněčná signalizace zprostředkovávaná kinásovými fosforylačními kaskádami, které jsou zapínány a vypínány reversibilním navázáním či odstraněním fosfátových skupin (Cohen, 2000) nebo ubikvitinylace cyklinů podílejících se na regulaci buněčného cyklu, která určuje jejich destrukci v definovaných časových bodech (Tyers & Jorgensen, 2000).

Pochopení vztahu mezi PTM a změnami funkcí proteinů („posttranslatomika“) je další obrovskou výzvou pro biologické vědy. Proteomika, respektive metody, které využívá, se staly velmi úspěšným a efektivním nástrojem při identifikaci proteinů v komplexech a organelách a v dnešní době je možné analyzovat stovky proteinů v jediném experimentu. Jakmile jsou proteiny identifikovány, vyvstává další otázka, zdali jsou nebo nejsou posttranslačně modifikovány a v případě, že ano, jak. Ovšem analýza PTM je mnohem obtížnější, než identifikace proteinů a to hned z několika důvodů. Zatímco k identifikaci proteinů postačuje sekvencování nebo zmapování pouze několika peptidů, analýza PTM vyžaduje kompletní pokrytí sekvence proteinu. Modifikované proteiny se vyskytují *in vivo* pouze v malých frakcích z celkového zastoupení proteinů (méně než 1 %), a proto jsou

zapotřebí metody, které jsou schopny detekovat velmi nízká množství vzorku (méně 5-10 fmol). Dalším problémem jsou analyzované vzorky, které jsou často heterogenními směsmi rozdílně modifikovaných a nemodifikovaných proteinů. Z tohoto důvodu je nutné vyvíjet nové metodiky separace k získání homogenních vzorků. Ačkoliv současná proteomika zatím nevyvinula metodiku, kterou by bylo možné plošně zmapovat všechny modifikace proteinů v buňce, její potenciál a význam v oblasti porozumění PTM je enormní (Seo & Lee, 2004)

Tab. 1.

Některé běžné a důležité posttranslační modifikace (přepřacováno z Mann & Jensen, 2003)

Typ PTM	Δ Mr ^a (Da)	Modifikované aminokyselinové reziduum	Stabilita ^b	Funkce a poznámky
Fosforylace	+80	Tyr Ser Thr	+++ +/ +/ ++	Reverzibilní, aktivace/deaktivace enzymové aktivity, modulace molekulárních interakcí, signalizace
Acetylace	+42	S, K	+++	Stabilita proteinů, chránění N-konce. Regulace interakcí protein-DNA (histony)
Methylace	+14	K	+++	Regulace genové exprese
Acylace, modifikace mastnou kyselinou				Buněčná lokalizace a cílení signálů, vazba na membrány,
Farnesylace	+204	C	+++	mediátor protein-protein interakcí
Myristoylace	+210	G, K	+++	
Palmitoylace	+238	C (S, T, K)	+/ ++	
atd.				
Glykosylace				Exkretované proteiny, rozpoznávání/signalizace
N-glykosylace	>800	N	+/ ++	buňka-buňka, reverzibilní, regulační funkce
O-glykosylace	203, >800	S, T	+/ ++	
GPI kotva	>1000	C-konec	++	Glykosylfosfatidylinositolová (GPI) kotva. Vázání enzymů a receptorů na membrány, převážně na vnější stranu plazmatické membrány
Hydroxyprolin	+16	P	+++	Stabilita proteinu a interakce protein-ligand
Sulfatace	+80	Tyr	+	Modulátor interakcí protein- protein a receptor-ligand

Tvorba vazby	disulfidové	-2	C	++	Intra- a intermolekulární „crosslink“, stabilita proteinu
Deaminace		+1	N, Q	+++	Možný regulátor interakcí protein-protein a protein-ligand
Pyroglutamová kyselina		-17	Q	+++	Stabilita proteinu, blokování N-konce
Ubikvitinylace		>1000	K	+ / ++	Přerušení signálu. Po tryptickém štěpení je ubikvitinylační místo modifikováno dipeptidem Gly-Gly
Nitrace		+45	Y	+ / ++	Oxidativní poškození během zánětu

^aKompletnější seznam PTM Δ Mr hodnot lze nalézt na internetové stránce: <http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home>

<http://www.unimod.org>

^bStabilita: + labilní při tandemové hmotnostní spektrometrii, ++ mírně stabilní, +++ stabilní.

2. Klasifikace a struktura glykanových komponent

Významným znakem proteomu v eukaryotických buňkách je skutečnost, že většina proteinů je objektem PTM, z nichž právě glykosylace je nejběžnější formou. Odhaduje se, že více než polovina všech doposud charakterizovaných proteinů jsou glykoproteiny. Cukerné složky glykoproteinů vykonávají kritické biologické funkce při sbalení proteinů, rozpoznávání receptorů, imunitních odpovědích, interakcích buňky s okolím a při mnoha dalších buněčných procesech (Varki, 1993).

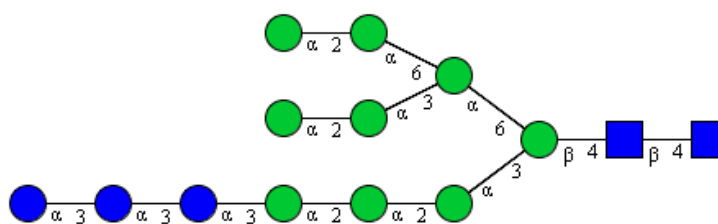
Glykosylace jsou klasifikovány podle typu atomu, přes který jsou glykany připojeny k proteinu. Prvním a nejčastějším typem je N-glykosylace a druhým je O-glykosylace. Třetí hlavní třídou jsou glykosylace lipidů (Herget *et al.*, 2009), o kterých se v této práci nebude pojednávat.

2.1 N-glykosylace

Všechny eukaryotické buňky exprimují glykoproteiny, které mají glykany kovalentně připojeny přes amidový atom dusíku asparaginu (Asn). N-glykany jsou vázány na protein pouze v místech s aminokyselinovou sekvencí Asn-X-Ser/Thr - tzv. „sekvon“ (kde X je jakákoliv aminokyselina mimo Pro; Marshall, 1972). Oligosacharidové intermediáty, které mají být inkorporovány do struktury proteinu, jsou syntetizovány kontrolovaným mechanismem, který je zprostředkován multi-enzymovým komplexem oligosacharidyltransferasou - OST (Kaplan *et al.*, 1987). OST katalyzuje přenos

oligosacharidu o složení $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (obr. 1a) z aktivovaného dolichol pyrofosfátového prekurzoru na vznikající polypeptidový řetězec. Tento intermediární oligosacharid je následně upravován v procesu, který je v souladu se správným složením („folding“) proteinu (Helenius & Aebi, 2001). Během transportu oligosacharidu na Asn reziduum slouží hydroxyaminokyselina v pozici +2 (Ser/Thr) jako donor vodíku pro vytvoření vodíkového můstku, který je nezbytný pro funkci enzymu OST (Imperiali & Hendrickson, 1995, Wopereis *et al.*, 2006). Ovšem ne všechny sekvony přítomné v proteinu jsou glykosylovány. V praxi to znamená, že přítomnost sekvony je pro glykosylaci nezbytná, ale není sama o sobě podmiňujícím kritériem přítomnosti glykanu v daném místě (Apweiler *et al.*, 1999).

(a)



(b)

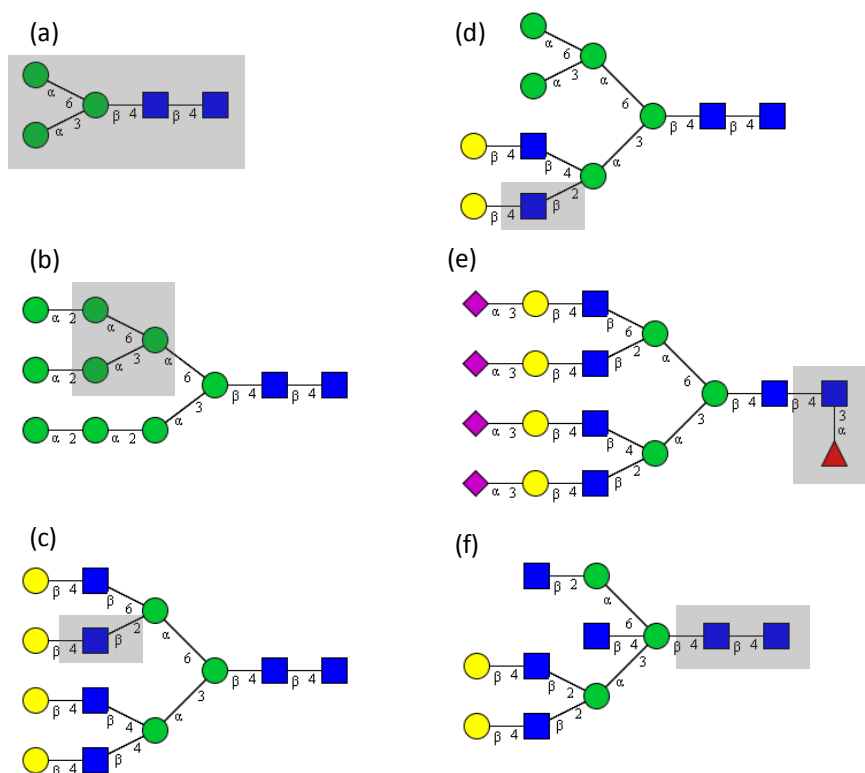
Symbol	Zkratka	Monosacharid	Symbol	Zkratka	Monosacharid
	Gal	Galaktosa		Man	Mannosa
	GalNAc	N-Acetylgalaktosamin		ManNAc	N-Acetylmannosamin
	GalN	Galaktosamin		ManN	Mannosamin
	GalA	Galakturonová kyselina		ManA	Manuronová kyselina
	Glc	Glukosa		Kdn	2-Keto-3-deoxynonová kys.
	GlcNAc	N-Acetylglukosamin		Neu5Ac	N-Acetylneuraminová kys.
	GlcN	Glukosamin		Xyl	Xylosa
	GlcA	Glukuronová kyselina		IdoA	Iduronová kyselina
	Fuc	Fukosa		Neu5Gc	N-Glykolyneuraminová kys.

Obr. 1

(a) Struktura tetradecasacharidu $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, který bývá někdy také označován za prekurzor N-glykanů. Glykosidové vazby jsou označeny spojujícími čarami mezi monosacharidovými jednotkami. U každé vazby je označena pozice vazby a anomerní stav. (b) Symboly značící cukerné struktury schválené podle organizace „Consortium for Functional Glycomics“ (CFG). Kruhy značí hexosy, čtverce N-acetylhexosaminy, diagonálně rozdělené čtverce hexosaminy a diamanty kyselý cukry. Fukosa a iduronová kyselina jsou v L-konfiguraci, všechny ostatní základní monosacharidy jsou v D-konfiguraci (www.functionalglycomics.org).

-přepřevzato z Herget *et al.*, 2009 pomocí programu Glycoworkbench (Ceroni *et al.*, 2008)

Až na několik výjimek (Spiro, 2002) sdílejí všechny N-glykany jeden společný strukturální motiv, tzv. jádro, jehož struktura je $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (obr. 2a) a od něhož jsou odvozeny další tři topologické třídy. Pokud jsou k tomuto jádru připojeny výhradně mannosová rezidua, jedná typ s vysokým obsahem mannosy - „high-mannose“ (obr. 2b). Komplexní typy většinou neobsahují další mannosy, ale spíše se u nich vyskytují GlcNAc přímo připojené ke dvěma větvím N-glykanového jádra. K těmto komplexním typům mohou být navíc navázány sialové kyseliny, a galaktosová a fukosová rezidua (obr. 2c, e). Posledním běžným typem jsou tzv. hybridní typy, které obsahují jak motiv s vysokým obsahem mannosy, tak komplexní (obr. 2d). Další empirické strukturální odlišnosti N-glykanů zahrnují fukosylace a připojování různých antén (obr. 2e, f; Dennis *et al.*, 1999).



Obr. 2

Běžně třídy N-glykanů. Šedé rámečky označují typické strukturální rysy vedoucí k příslušné klasifikaci glykanu: (a) Základní jádro typické pro všechny N-glykany; (b) Typy s vysokým obsahem mannosy vznikají úpravou výchozí struktury $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (viz obr. 1a), která je transportována na Asn reziduum glykoproteinu; (c) N-glykanové jádro je dále rozšiřováno připojením GlcNAc a Gal reziduí, čímž vzniká komplexní třída N-glykanů; (d) Hybridní třída obsahuje jak znaky typu s vysokým obsahem mannosy, tak komplexních typů; (e) N-glykan se čtyřmi anténami s $\alpha(1-3)$ L-fukosou připojenou v oblasti jádra; (f) N-glykan s oddělenými anténami. Pomyslné rozpůlení struktury je definováno připojením $\beta(1-4)$ D-GlcNAc k centrální mannosě tvořící jádro.

-přepřacováno z Herget *et al.*, (2009) pomocí programu Glycoworkbench (Ceroni *et al.*, 2008)

2.2 O-glykosylace

Obecně mluvíme o O-glykosylaci proteinu, pokud je navázán mono- nebo oligosacharid na aminokyselinové reziduum s funkční hydroxylovou skupinou. Konkrétně se jedná o aminokyseliny serin (Ser), threonin (Thr) nebo v menší míře tyrosin (Tyr), hydroxyprolin a hydroxylysin. Na rozdíl od N-glykosylace, u které je za počáteční krok (přenos prekurzorového oligosacharidu na Asn) zodpovědný jediný enzym lokalizovaný v endoplazmatickém retikulu - OST, připojení monosacharidu na aminokyselinu u O-glykosylace může katalyzovat několik rozdílných glykosyltransferas (GT). To může být také důvodem, proč prozatím nebyl definován žádný výrazný sekvenční motiv pro výskyt O-glykosylace srovnatelný se sekvenem pro N-glykosylace (Wopereis *et al.*, 2006). Složitost stanovení takového sekvonu ilustruje i skutečnost, že i kdyby každý rozdílný enzym zodpovědný za počáteční krok O-glykosylace preferenčně rozpoznával určitý sekvenční motiv, výsledkem by byly pouze nejednoznačná data pro O-glykosylované proteiny, protože by se sekvenční motivy pro rozdílné GT mohly navzájem překrývat (Herget *et al.*, 2009).

Z historických důvodů je O-glykosylací rozuměno připojení GalNAc v α -konfiguraci k Ser nebo Thr reziduu činností členů enzymové rodiny GalNAc transferas v sekreční dráze během zrání proteinu v endoplazmatickém retikulu (ER) a Golgiho aparátu (GA). Z tohoto pohledu mohou být O-glykany definovány rozdělením do osmi podtříd podle výskytu běžných strukturálních motivů na redukujícím konci a jedná se zde pouze o tzv. O-glykosylaci mucinového typu (obr. 3; Herget *et al.*, 2009). Budeme-li používat obecnou definici O-glykosylace, lze je klasifikovat podle prvního sacharidu vázaného na Ser, Thr nebo hydroxylysin proteinu na sedm hlavních tříd (tab. 2; Wopereis, *et al.*, 2006).

Tab. 2Sedm hlavních tříd O-glykosylací (přepřacováno z Wopereis, *et al.*, 2006)

Typy O-glykanů u člověka		
Typ O-glykanu	Struktura a peptidová vazba	Glykoprotein
Mucinový typ	(R)-GalNAc (α 1)-Ser/Thr	Sekretované + proteiny plasmatické membrány
GAG	(R)-GlcA (β 1-3) Gal (β 1-3) Gal (β 1-4) Xyl (β 1)-Ser	Proteoglykany
O-GlcNAc	GlcNAc (β 1)-Ser/Thr	Jaderné a cytoplasmatické
O-Gal	Glc (α 1-2) \pm Gal (β 1)-O-Lys	Kolageny
O-Man	-uAc (α 2-3) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-2) Man (α 1)-Ser/Thr	α -Dystroglykan
O-Glc	Xyl (α 1-3) Xyl (α 1-3) +-Glc (β 1)-Ser	EGF proteinové domény
O-Fuc	-uAc (α 2-3) Gal (β 1-4) GlcNAc (β 1-3) Fuc (α 1)-Ser/Thr	EGF proteinové domény
	Glc (β 1-3) Fuc (α 1)-Ser/Thr	TSR repetice

**Obr. 3**

Osm jader O-glykanů mucinového typu má vždy společný D-GalNAc a navzájem se rozlišují podle běžných strukturních elementů na redukujícím konci.

-přepřacováno z Herget *et al.*, (2009) pomocí programu Glycoworkbench (Ceroni *et al.*, 2008)

3. Biosyntéza oligosacharidů

3.1 Obecné rysy biosyntézy oligosacharidů

Na biosyntéze oligosacharidů se primárně podílejí enzymy GT, které postupně připojují jednotlivé oligosacharidy do lineárních a větvených cukerných řetězců. Pro tento účel musí být monosacharidové jednotky buď importovány do buňky, nebo získány z ostatních cukrů uvnitř buňky. Obecně jsou pro syntézu všech glykokonjugátů vyžadovány stavební jednotky v podobě aktivovaných cukerných nukleotidových donorů. Již dlouhou dobu je známo, že nukleotid uridin trifosfát (UTP) reaguje s glykosyl-1-P za tvorby cukerného nukleotidového donoru s vysokým obsahem volné energie, který může participovat v syntéze glykokonjugátů. Jakmile jsou cukerné nukleotidy nasyntetizovány v cytosolu (nebo v případě cytidin-5'-monofosfát-N-acetyl-uraminové kyseliny CMP-u₅Ac v jádře), jsou topologicky translokovány nejčastěji do ER nebo GA. Negativní náboj cukerných nukleotidů jim brání v jednoduché difuzi skrz membrány do kompartmentů. Proto pro ně musely eukaryotické buňky vyvinout transportéry nevyžadující energii, jimiž by se dostaly cukerné nukleotidy do lumenu zmíněných organel (Varki *et al.*, 1999).

U eukaryot je známo více než 10 biosyntetických drah, které připojují glykany na proteiny a lipidy (Spiro, 2002; Freeze, 2006). V databázi „KEGG PATHWAY“ („Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“; <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>; Kanehisa *et al.*, 2004; Kanehisa *et al.*, 2006) je kolekce map drah reprezentujících současné biochemické poznání o molekulárních interakcích a reakčních sítích a zahrnuje 18 drah pro biosyntézu komplexních cukrů a jejich metabolismu a 20 metabolických drah, na kterých cukry participují. Na biosyntéze cukerných struktur nalezených na proteinech a lipidech se podílí více než 200 enzymů a více než 30 různých enzymů má přímou funkci v biosyntéze jediného glykanu. Jednou z nejlépe charakterizovaných drah je biosyntéza komplexních oligosacharidů, které jsou připojeny k proteinu přes atom dusíku aminokyseliny Asn, čímž vznikají N-glykoproteiny (Helenius & Aebi, 2004; Konrfeld & Kornfeld, 1985; Helenius & Aebi, 2001). Kromě všech eukaryontních buněk se glykosylace proteinů odehrává v mnoha archeobakteriích a výjimečně byly popsány i glykosylace v bakteriích (Benz & Schmidt, 2002).

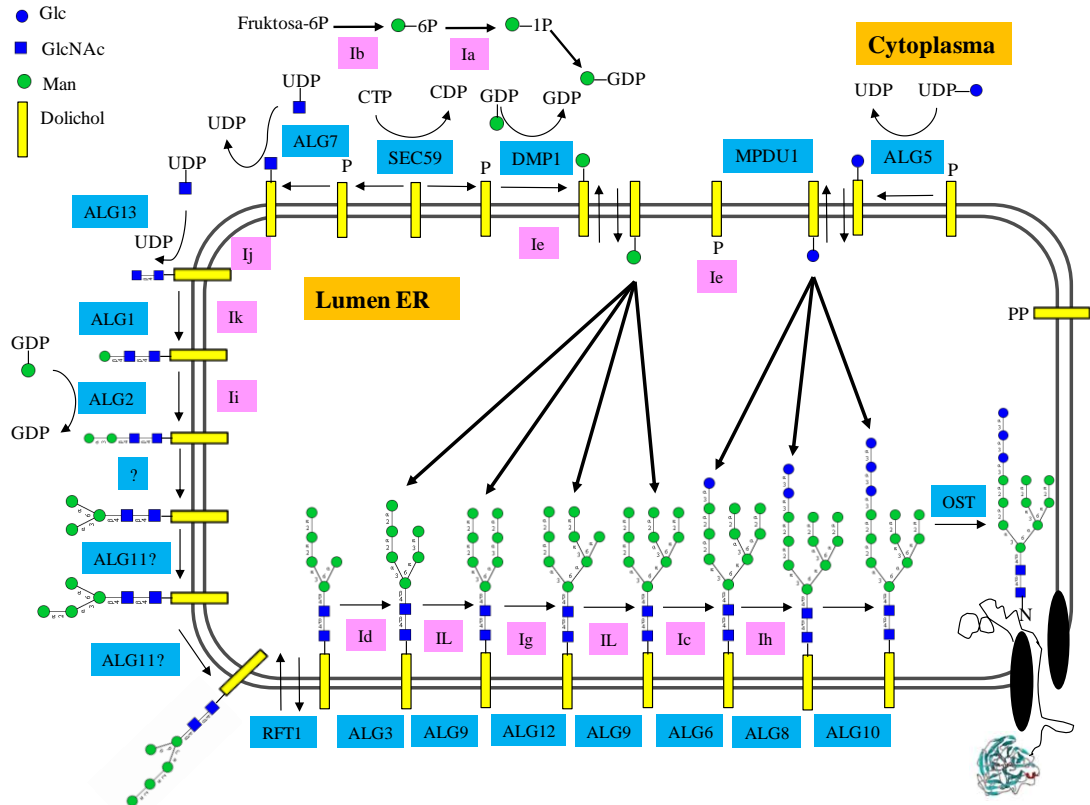
O-glykosylace, kde jsou cukry převážně připojeny k Ser a Thr, se odehrává posttranslačně v GA. Monosacharidy jsou připojovány jeden za druhým sérií reakcí. To je v kontrastu s N-glykosylační dráhou, kde je prekurzorový oligosacharid transportován v bloku na Asn. Druhým důležitým rozdílem je, že není známý žádný typický sekvenční motiv pro výskyt O-glykosylace, který by byl analogický známému motivu u N-glykosylace - Asn-X-Ser/Thr; X ≠ Pro (Wopereis *et al.*, 2006).

3.2 Biosyntetická dráha vedoucí k N-glykanům

N-glykosylace je nejčastější modifikací sekrečních a membránových proteinů v eukaryontních buňkách (Helenius & Aebi, 2001). Proteiny procházející sekreční dráhou ER-GA jsou transportovány na buněčný povrch, odkud jsou poté exportovány nebo ukotveny do plazmatické membrány, extracelulární matrix nebo buněčné stěny. Glykany připojené k těmto glykoproteinům ční ven z buňky a tvoří část glykokalyxu, což je hutné a komplexní uspořádání cukrů, které pokrývá všechny buňky v přírodě (Helenius & Aebi, 2001).

N-glykany jsou syntetizovány velmi starým, evolučně vysoce zakonzervovaným procesem. Jejich syntézu lze rozdělit do čtyř etap: (a) tvorba prekurzoru oligosacharidu, který je napojen na lipid; (b) transfer celého bloku na polypeptidový řetězec; (c) počáteční úpravy; (d) finální zkracování a prodlužování oligosacharidů. Zatímco první tři kroky se odehrávají v ER (obr. 4), konečné zkracování a prodlužování glykanů je prováděno v GA. Každá jednotlivá GT vykazuje silnou preferenci vůči jednotlivým oligosacharidovým motivům, což je základním řídicím elementem této lineární, krokové biosyntetické dráhy (von der Lieth & Lütteke, 2009).

Glykosylační proces je zahájen v ER, kde je na lipidový přenašeč dolichol pyrofosfát nashromážděn tetradecasacharid $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, který bývá někdy také označován za prekurzor N-glykanů. Tento celek je poté transportován na vybraná Asn rezidua polypeptidového řetězce. Biosyntéza samotného prekurzoru začíná v cytoplazmě a zahrnuje translokaci heptasacharidu $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ napojeného na lipid do ER (Helenius *et al.*, 2002). Zde je dosyntetizován do jeho základní podoby tetradecasacharidu $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -PP-Dol. Přenos prekurzorového oligosacharidu na Asn reziduum nascentního proteinu je katalyzován OST (Kaplan *et al.*, 1987). Vzhledem k tomu, že ke glykosylaci dochází ve chvíli, kdy je protein v nesbaleném stavu, lze klasifikovat tento proces za kotranslační proteinovou modifikaci (Yan & Lennarz, 1999).



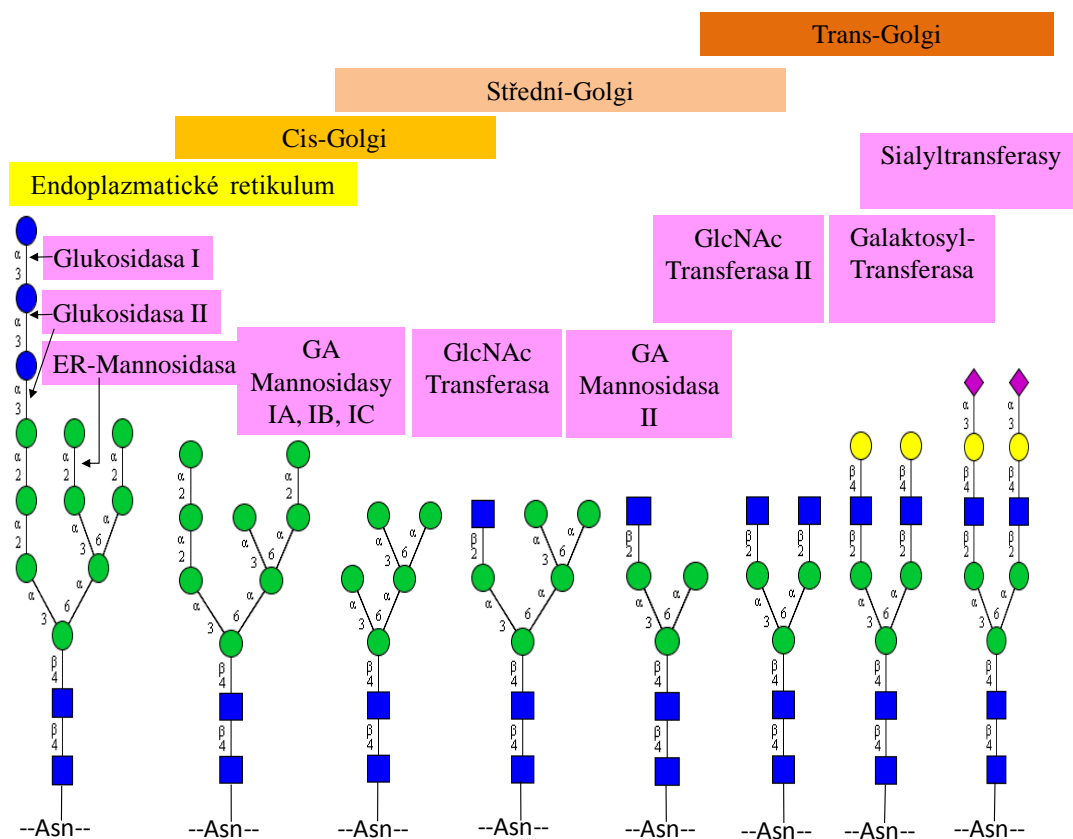
Obr. 4

Biosyntetická dráha N-glykanů - biosyntéza oligosacharidu vázaného na lipid a jeho transfer k nascentnímu polypeptidovému řetězci v ER. V modrých rámečcích jsou zobrazeny evolučně zakonzervované ALG („asparagin-linked glycosylation“) enzymy a některé další proteiny podílející se na této dráze. V růžových rámečcích jsou označeny vrozené nemoci (CDG-„congenital disorders of glycosylation“) způsobené vadnou funkcí enzymů a následnou nesprávnou glykosylací. Nemoci jsou klasifikovány podle enzymu, jehož funkce je nesprávná (Ia-IL viz. Freeze, 2006). Syntéza začíná na cytoplasmatické straně ER. UDP-GlcNAc a GDP-Man jsou donory cukrů, které jsou transportovány na dolichol (Dol). $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ je poté přenesen na luminální stranu ER s pomocí Rft1 (flipasa). Ten je postupně prodlužován, až dosáhne struktury $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, přičemž využívá jako donory monosacharidů Dol-P-Man a Dol-P-Glc. Oligosacharid je následně připojen oligosacharidyltransferasou (OST) k dusíku amidové skupiny Asn rezidua, které je umístěno v sekvenci Asn-X-Ser/Thr nascentních proteinů. Glykosylace probíhá ve chvíli, kdy není polypeptid sbalen do své konečné podoby. Proto může být tento proces klasifikován jako kotranslační modifikace proteinů.

-přepřacováno s menšími úpravami z Helenius & Aebi, 2004 pomocí programu Glycoworkbench; Ceroni *et al.*, 2008)

Počáteční úpravy tetradecasacharidu napojeného na peptid se uskutečňují krokovým odstraněním tří glukosových reziduí dvěma exoglukosidasami. Oba enzymy jsou součástí tzv. kalnexin/kalretikulinového cyklu, což je systém kontroly kvality sbalení proteinů (Williams, 2006). Jakmile jsou proteiny správně složeny, opouštějí kontrolní cyklus a jsou transportovány z ER do GA. Během průchodu ER a v *cis* GA dochází k odstraňování

některých nebo všech mannosových reziduí napojených α -1,2-vazbou, na kterém se podílí celá série enzymů mannosidas. Ve střední části GA a v *trans* GA jsou glykanové řetězce dále upravovány na základní, komplexní nebo hybridní typy N-glykanových struktur (viz předchozí kapitola), které mohou obsahovat i více než pět antén (obr. 5). Bianténové glykany jsou nejvíce zastoupeným typem, ale výjimkou nejsou i tri- a tetraanténové struktury (von der Lieth & Lütteke, 2009).



Obr. 5

Biosyntetická dráha N-glykanů - přetváření základních N-glykanů na komplexní struktury, při transportu z ER do GA. H-d po přenosu na nascentní polyproteinový řetězec je N-glykan dále upravován. Nejprve postupným odstraněním koncových glukosových jednotek exoglukosidasami. Glukosidasa I zodpovídá za odstranění terminální glukosy a glukosidasa II odštěpuje obě zbývající glukosová rezidua, přičemž poslední glukosa má významnou funkci v procesu kontroly správného sbalení proteinu (obr. 6). Po správném sbalení je glykosylovaný protein připraven k transportu z ER do GA. Po úpravě glukosidasami je struktura osekávána sérií mannosidas, které odstraňují některá nebo všechna mannosová rezidua napojená α -1,2-glykosidovou vazbou. Tato úprava začíná v ER a pokračuje v *cis* GA. Následná přestavba N-glykanového jádra se odehrává ve středním a *trans* GA a jejím výsledkem jsou komplexní nebo hybridní typy glykanů, které mohou obsahovat i více než pět antén. Ačkoliv jsou bianténové glykany nejčastější, běžné jsou i tri- a tetraanténové struktury.

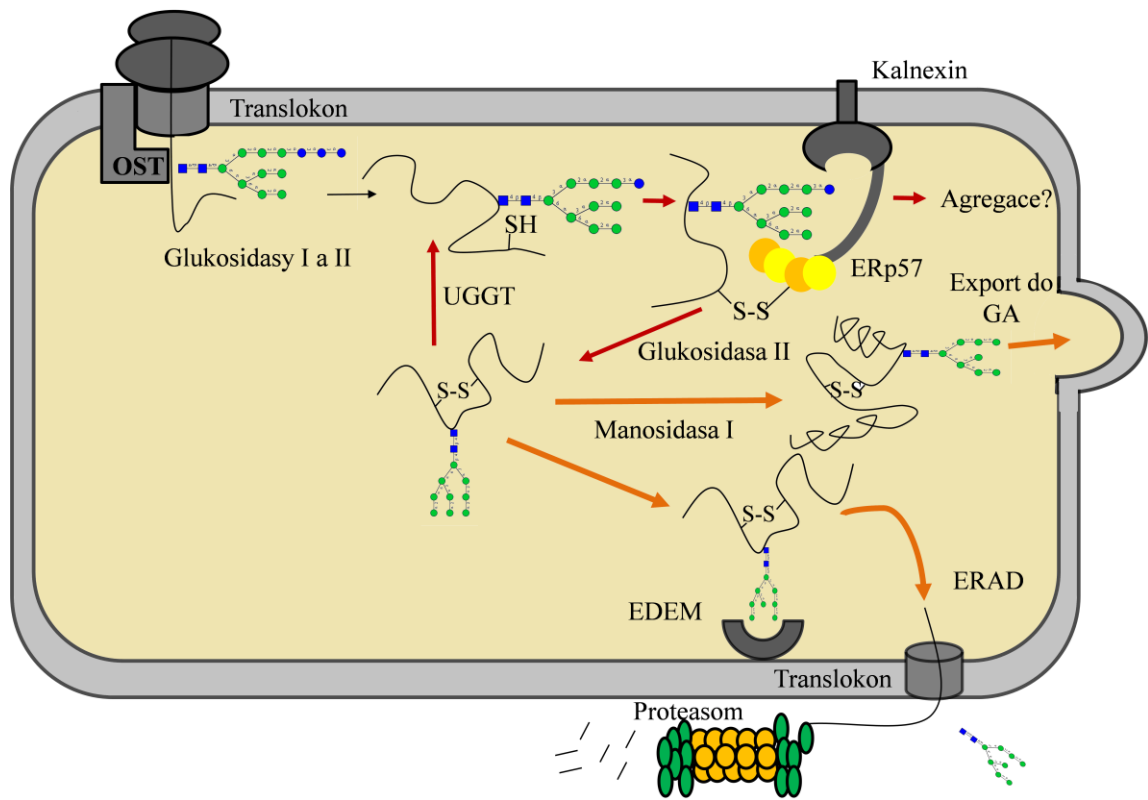
-přepřacováno s menšími úpravami z von der Lieth & Lütteke, 2009 pomocí programu Glycoworkbench; Ceroni *et al.*, 2008)

3.2.1 Systém kontroly kvality – „monitoring“ správného sbalení („foldingu“) glykosylovaných proteinů

N-glykany hrají nepřímou roli v procesu sbalení proteinů. Tato funkce je založena na vázání nově nasyntetizovaných glykoproteinů na lektiny v ER, kde proteiny procházející sekreční dráhou získávají správnou terciární strukturu. Během tohoto procesu slouží glykany jako třídící signály, se kterými buňka nakládá tak, aby odrážely momentální stav o složení proteinu. Nesprávně sbaleným proteinům je tak zabraňováno v opuštění ER a následnému vstupu do GA (Parodi, 2000; Lowe & Marth, 2003).

Finálním krokem v tvorbě výchozího oligosacharidu vázaného na lipid v biosyntetické dráze N-glykanů je přidání koncového glukosového rezidua α -1,2-vazbou, čímž se vytvoří $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (obr. 1a). Připojení terminální glukosy má velkou důležitost, a to z toho důvodu, že slouží jako rozpoznávací determinanta substrátu pro OST (Burda & Aebi, 1998). Ihned po připojení prekurzoru N-glykanů na rostoucí polypeptidový řetězec odstraní enzym glukosidasa tu vnější ze tří přítomných glukos a vytvoří se $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Následuje odstranění další glukosy enzymem glukosidasou II a vzniká $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Glykoproteiny s $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ epitopem jsou rozpoznávány lektinovými doménami dvou ER-rezidentních lektinových chaperonů, membránovým kalnexinem (CNX) a jeho rozpustným homologem kalretikulinem (CRT; obr. 6; Williams, 2006).

Většinu proteinů sbalených v ER se tvoří disulfidové vazby oxidačním procesem katalyzovaným thiol-disulfidoxidoreduktasami. CNX a CRT tvoří komplex s blízkým homologem proteinu disulfidisomerasy (PDI) ERp57, která má čtyři domény podobné thioredoxinu a která katalyzuje tvorbu disulfidové vazby a izomerizaci (Williams, 2006). Když glukosidasa II odstraní zbývající terminální glukosu z glykoproteinu navázaného na CNX/CRT, vytvoří se $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$ a glykoprotein disociuje z CNX/CRT. Nyní je protein schopen opustit ER, a to až do té doby, dokud není rozpoznán rozpustným enzymem UDP-Glc: glykoprotein glukosyltransferasou (UGGT). UGGT reglukosyluje pouze nekompletně sbalené proteiny a slouží tak v cyklu jako čidlo kontrolující sbalení proteinů. Pokud je glykoprotein reglukosylován, naváže se zpět na lektiny a v tomto cyklu zůstává do té doby, než dojde k jeho správnému sbalení, oligomerizaci nebo degradaci. Pokud dojde k blokaci N-glykosylační dráhy, mnoho polypeptidů nedosáhne správného nebo kompletního sbalení (Helenius & Aebi, 2001; Helenius & Aebi, 2004). Neschopnost zaujmout nativní konformaci způsobí, že takové proteiny neprojdou kontrolou kvality v ER a jsou zde zadržovány a nakonec degradovány (Ellgaard & Helenius, 2003; Spiro, 2004).



Obr. 6

Navržený mechanismus kontrolního systému, který zprostředkovává správné sbalení glykosylovaných proteinů. Nascentní protein vstupuje do lumenu ER přes translokon. OST (oligosacharidyltransferasa) rozpozná sekvence Asn-X-Ser/Thr, což jsou potenciální místa glykosylace a připojuje zde již předem připravený tetradecasacharid $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Následně jsou rychle odstraněna dvě vnější glukosová rezidua enzymy glukosidasou I a II a vytvoří se oligosacharid $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, který je rozpoznán kalnexinem (CNX) nebo jeho rozpustným homologem kalretikulinem (CRT; není zobrazeno). Cykly uvolnění a navázání glykoproteinu jsou výhradně kontrolovány odstraněním a zpětným navázáním koncového glukosového rezidua glukosidasou II respektive UDP-glukosa:glykoprotein glukosyltransferasou (UGGT). UGGT je senzorem sbalení, protože jako jediná reglukosyluje non-nativní glykoproteinové konformery. Vázání chaperonu slouží k udržení non-nativních glykoproteinů uvnitř ER a také k naverbování ERp57, což vede k tvorbě disulfidové vazby a izomerizaci. Sbalení se uskutečňuje po uvolnění glykoproteinu z chaperonu. Dochází k dalšímu sestřihu oligosacharidu a exportu do GA. Nesbalené glykoproteiny, které zůstávají delší časový úsek v CNX cyklu jsou sestřihávány mannosidasou I. Vzniká oligosacharid o struktuře $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$, který rozpoznává lektin označený EDEM. EDEM je součástí signálu vedoucího k retrotranslokaci a následné degradaci proteinu v proteasomu (ER-associated degradation ERAD; Ireland *et al.*, 2006).
 -přepřacováno s menšími úpravami z Williams, (2006) pomocí programu Glycoworkbench; Ceroni *et al.*, 2008)

3.4 Biosyntetická dráha vedoucí k O-glykanům

Na rozdíl od biosyntézy N-glykanů, kdy se počáteční krok odehrává kotranslačně a tedy ještě před tím, než je protein sbalen do své nativní struktury, biosyntéza O-glykanů probíhá až po sbalení a oligomerizaci proteinů v ER nebo v jednom z kompartmentů GA (Brockhausen, 2006; Wopereis *et al.*, 2006). Jak již bylo zmíněno dříve, O-glykosylace

proteinu začíná připojením jednoho monosacharidu na hydroxyaminokyseliny Ser nebo Thr. Typ cukerného rezidua na redukujícím konci glykanového řetězce (GalNAc, Xyl, GlcNAc, Gal, Man, Glc nebo Fuc) určuje třídu, do které O-glykan spadá (Wopereis *et al.*, 2006).

GalNAc připojený α -glykosidovou vazbou na Ser nebo Thr (tzv. Tn antigen), tvoří základ mucinového typu O-glykosylace. V závislosti na cukerných reziduích přímo připojených ke GalNAc a druhu jejich vazeb, se rozlišuje na osm typů mucinových jádrových struktur. Podobně jako N-glykany mohou být tyto struktury dále rozšiřovány. Enzymy GT zodpovědné za prodlužování, větvení a ukončování glykanových řetězců, jsou regio- a stereospecifické. To v praxi znamená, že připojují určitý monosacharid určitou vazbou ke specifickému motivu již přítomného glykanového řetězce. Obvykle ovšem nevykazují specifčnost vůči základnímu jádru daného glykanu. Díky tomu mohou stejné enzymy modifikovat terminální části N-glykanů i mnoha O-glykanů (Wopereis *et al.*, 2006).

Dalším běžným typem O-glykanů jsou glykosaminoglykany (GAG). GAG jsou dlouhé, lineární polysacharidy, které obsahují repetitivní disacharidovou jednotku skládající se z GlcNAc nebo GalNAc rezidua spojeného s GlcA, IdoA nebo Gal reziduem. V závislosti na složení této disacharidové jednotky se rozlišují tři rozdílné třídy GAG: (a) dermatan sulfát a chondroitin sulfát (IdoA/GlcA + GalNAc); (b) heparin/heparan sulfát (GlcA/IdoA + GlcNAc); (c) keratan sulfát (Gal + GlcNAc). Pojmenování těchto glykosaminoglykanů reflektuje tkáň, ze které byly původně izolovány. Např. hyaluronová kyselina a chondroitin sulfát, dermatan sulfát a keratan sulfát jsou odvozeny od hyalinních membrán, chrupavky a kůže. Zatímco keratan sulfát je spojen s proteinem přes N-glykosidovou vazbu nebo O-glykanové jádro 2 (Funderburg, 2000), ostatní GAG jsou připojeny k Ser přes spojovací tetrasacharid (GlcA β 1-3Gal β 1-3Gal β 1-4Xyl β 1; Wopereis *et al.*, 2006; Raman *et al.*, 2005). Hyaluronan, čtvrtá třída GAG (GlcA + GlcNAc), není napojen k proteinu vůbec (Raman *et al.*, 2005). Elongace GAG řetězců je často doprovázena modifikačními kroky, při kterých mohou být Glc epimerizovány na IdoA a navíc jsou přidány sulfáty. V případě heparin/heparan sulfátu může nastat N-sulfatace na C2 atomu po N-deacetylaci (Aikawa *et al.*, 2001). Produkt jednoho modifikačního kroku je substrátem v kroku dalším, což vede k charakteristickým sulfátovým motivům. Kromě některých sulfotransferas, transferas, které hrají roli v biosyntéze GAG, jsou specifické právě pro tyto čtyři biosyntetické dráhy a nezasahují do biosyntézy jiných tříd glykokonjugátů (Wopereis *et al.*, 2006; Liu & Pedersen, 2007).

GlcNAc napojený přes O-glykosidovou vazbu je reverzibilním typem O-glykosylace, která zahrnuje pouze jediné GlcNAc reziduum připojené k Ser nebo Thr. Na rozdíl od ostatních glykosylačních tříd, O-GlcNAc není přidán během průchodu sekreční dráhou v ER nebo GA. Namísto toho enzymy, které katalyzují připojení (O-GlcNAc transferasa, OGT) a odstranění (β -N-acetylglukosaminidasa, O-GlcNAcase) GlcNAc se

nacházejí v jádře a cytosolu, kde se podílejí na regulačních procesech (Wells & Hart, 2003; Vosseller *et al.*, 2002).

O-mannosylglykany byly poprvé objeveny v kvasinkách a po dlouhou dobu se mělo za to, že jsou specifickým typem glykosylace u plísní. Postupem času byly nalezeny i v glykoproteinech nebo glykopeptidech rezidujících v savčím mozku, nervových buňkách a kosterním svalstvu (Wopereis *et al.*, 2006; Willer *et al.*, 2003). Biosyntetická dráha O-mannosylace kvasinkového typu se liší od biosyntéz O-glykanů popsanych výše. Předchozí biosyntézy se převážně odehrávají v GA a vyžadují aktivované formy cukru jako donory cukrů. Podobají se tak procesům prodlužování N-glykanových řetězců. Počátek O-mannosylace probíhá v kontrastu s tímto v ER. Podobně jako u N-glykosylace je v prvním kroku transportován aktivovaný cukr dolichol-fosfát- β -mannosa (Dol-P- β -Man) k proteinovému řetězci (Willer *et al.*, 2003). Po přenosu první mannosové jednotky na protein dochází k dalšímu prodloužení O-mannosylglykanů, ale již v GA. Stejně jako ostatní glykosyltransferasy lokalizované v GA, vyžadují pro reakci aktivované cukry jako donory (Willer *et al.*, 2003).

3.5 Funkce O-glykanů

K běžným funkcím N- a O-glykanů patří alternace vlastností proteinů nebo např. slouží jako rozpoznávací epitopy. O-glykany mucinového typu a GAG O-glykany zastávají ještě jednu esenciální roli a tou je vazba vody. Proteiny zvané muciny, které se ve velkém množství vyskytují na mukosálních membránách, jsou velmi hustě O-glykosylovány mucinovým typem glykanů. O-glykany jsou velmi často sialovány, což jim propůjčuje negativní náboj, který jim umožňuje zachycovat ionty a vázat velké množství vody. Muciny jsou zesíťovány intra- nebo intermolekulárními disulfidovými vazbami a tvoří rosolovitý matrix. Vzniklý sliz tvoří štít, který chrání epitelální buňky ležící pod ním před patogeny a např. v případě trávicího traktu také před proteolytickými enzymy, které jsou organismu vlastní (Wopereis *et al.*, 2006).

Druhou třídou proteinů, která využívá O-glykany k vázání vody jsou proteoglykany. Jsou to glykoproteiny nesoucí GAG glykosylace a jsou schopny vázat 1 až 130 GAG řetězců. Tyto řetězce mohou být relativně velké (každý může mít více než 150 monosacharidů), takže molekulová hmotnost glykanové části často významně přesahuje hmotnost samotného proteinu. Proteoglykany jsou jednou z hlavních komponent chrupavek. Voda, která je vázána GAG řetězci umožňuje tkáni se reverzibilně deformovat a tak absorbovat tlak. Degradace chondrálních proteoglykanů je jedním z hlavních patologických příznaků artritidy (Caterson *et al.*, 2000). GAG řetězce se také podílejí na shromáždění a stabilizaci protein-proteinových komplexů v extracelulárním matrix (např. vazba růstových faktorů na jejich receptory) nebo slouží jako ko-receptory. Tímto způsobem modulují různé

regulační a signální procesy (Raman *et al.*, 2005; Bishop *et al.*, 2007). Heparan sulfátové proteoglykany mají funkci při zánětlivých procesech po zraněních, kdy verbují leukocyty do poškozené oblasti (Bishop *et al.*, 2007). V klinické praxi se heparin/heparan sulfát používá jako antikoagulant (Liu & Pedersen, 2007).

O-GlcNAc modifikace se spíše podobá fosforylaci než „klasické“ glykosylaci a to v tom případě, pokud je na jedno modifikační místo jedno cukerné reziduum. Podobnost s fosforylací spočívá v dynamickém připojování a odstraňování GlcNAc. V obou případech se jedná o regulační modifikace, které často navzájem pracují kompetitivním způsobem. Takováto situace nastává, když je daná aminokyselina cílem obou modifikací, nebo když O-GlcNAc znemožňuje kinase fosforylovat aminokyselinová rezidua nacházející se v jeho blízkosti. Jako příklad lze uvést C-koncovou doménu RNA polymerasy II. O-GlcNAc se podílí na transkripční regulaci modifikováním této polymerasy, transkripčních faktorů c-myc nebo sp1 (Wells & Hart, 2003; Vosseller *et al.*, 2002).

3.6 Mnoho rozpustných a povrchových proteinů obsahuje malé klastry O-glykanů

Na rozpustných a povrchových proteinech lze nalézt glykosylovaná Ser a Thr rezidua a malé klastry O-glykanů mucinového typu. Tato glykosylační místa jsou charakteristicky lokalizována v pantové nebo spojovací oblasti mezi složenými a globulárními doménami v multidoménových proteinech. Příkladem může být molekula IgA1, která je glykosylována v pantovém regionu mezi Fab a Fc částmi těžkého řetězce, o níž bude ještě v této práci pojednáno podrobněji. Dalším příkladem je makrofág-mannosový receptor, který je glykosylován v několika spojovacích částech, které oddělují domény rozpoznávající globulární cukry.

Přesnou úlohu O-glykanů ve spojovacích oblastech je velmi obtížné stanovit, ale zdá se, že propůjčují pevnost jinak flexibilním segmentům polypeptidů. Tyto cukry mohou také poskytovat rezistenci segmentů proteinů vůči proteasám, neboť jsou jinak obzvláště náchylné ke štěpení, pokud nejsou pokryty glykany (Maureen & Drickamer., 2003a).

3.7 Glykosylace hraje kritickou roli ve zdraví organismů

Vzhledem k tomu, že struktura a biosyntetická dráha glykanů je evolučně zakonzervována od jednobuněčných kvasinek až po člověka, lze očekávat její enormní biologickou důležitost. Ovšem specifické biologické funkce glykosylace byly pro vědce po dlouhý čas velkou záhadou. Až v posledních dekáдах se ukázalo evidentní, že pokud vykazuje jeden z biosyntetických enzymů glykanů chybnou funkci, nemohou být buňky v těle správně glykosylovány. Je evidováno několik vrozených lidských chorob, nazývaných jako vrozené vady glykosylace (CGD-„congenital disorders of glycosylation“), které jsou spojeny s deficiencí v biosyntetické dráze glykanů. Dopad takového defektu na struktury

a funkce proteinů se velmi liší. Proto jsou odlišné i klinické symptomy, které závisí na tom, který enzym vykazuje abnormalitu (Freeze, 2006; Freeze & Aebi, 2005).

CDG jsou instruktivním příkladem toho, jak chybná funkce nebo absence specifické glykosyltransferasy, glykosidasy nebo proteinu přenášejícího aktivovaný cukr, může mít přímou souvislost s nějakou nemocí. Většina identifikovaných glykosylačních poruch se vztahuje k syntéze N-glykanů. Celkem bylo charakterizováno šest drah (N-glykan, O-mannosa, O-xylosa, O-GalNAc, glykolipidové kotvy a glykosfingolipidy), ve kterých byly nalezeny geneticky podmíněné poruchy glykosylace. Prozatím je klasifikováno 19 typů CDG, každý s vlastním defektním enzymem (Freeze & Aebi, 2005). Takovéto defekty jsou v mnoha případech následkem mutace v jedné aminokyselině proteinu. Stanovení molekulární podstaty poruchy zodpovědné za chorobný fenotyp může proto odhalit normální funkci individuálního produktu genové exprese (Schachter, 2000). Je však nutné si uvědomit, že glykany hrají kritickou roli ve fertilizaci a vývoji organismu (Rosati *et al.*, 2000), což znamená, že mnohé nedostatečnosti v glykosylaci jsou letální pro embrya zkoumaných zvířecích modelů. Ačkoliv je tento fakt důležitý z hlediska zdraví jedince, neboť tak dochází k prevenci potenciálně závažným metabolickým odchylkám, výsledkem je nekompletní porozumění glykosylačním procesům v buňce (Marek *et al.*, 1999).

4. Analýza glykosylace

4.1 Překážky v analýze glykosylace

Analýzu struktury glykanů stěžuje hned několik faktorů. Jsou to:

- (a) Biosyntéza glykanů je proces, který není řízen podle templátu. Na syntéze složitých glykanů se podílí mnoho různých enzymů, které jsou charakteristické velmi definovanou specifičností a tak neexistují žádné biologické amplifikační metody ve stylu polymerasové řetězové reakce (PCR) jako je tomu v případě DNA. V praxi to znamená, že glykany musejí být analyzovány při jejich fyziologických koncentracích. Z tohoto pohledu je hlavním problémem vyvinout vysoce citlivé analytické metody, které budou schopny detekovat velmi malá množství materiálu (von der Lieth, 2009).
- (b) Druhým hlavním problémem je komplexita glykanových struktur. Každý pár monosacharidových reziduí může být navzájem propojen hned několika způsoby a jedno reziduum může být spojeno se třemi nebo čtyřmi dalšími (větvené struktury). Informační obsah, který je potenciálně kódován sekvencí glykanů je také obrovský. Čtyři nukleotidy v DNA mohou být kombinovány do 256 možných čtyřjednotkových struktur (4^4), aminokyselinová sekvence již dává 160 000 možných čtyřjednotkových konfigurací (20^4). Ovšem strukturní variabilita

monosacharidových stavebních bloků nalezená v přírodě je mnohem větší, než biologická informace kódující makromolekuly a potenciálně lze vytvořit více než 15 milionů čtyřčlenných konfigurací. Ačkoliv mají oligosacharidy potenciálně takto vysokou kapacitu pro uložení biologické informace, v přírodě je využívána jen její malá část. Analýza databáze glykanů KEGG z roku 2004 (Kaneshisa *et al.*, 2004), která obsahuje 4107 unikátních glykanových struktur (Kawano *et al.*, 2005) obsahujících nejčastěji 9 monosacharidů (glukosa, galaktosa, manna, N-acetylglukosamin, N-acetylgalaktosamin, fukosa, xylosa, glukuronová kyselina a sialová kyselina) ukázala, že pouze 302 (54 %) z 558 (devět monosacharidů, dva anomery, 31 substitučních možností) teoreticky možných disacharidů se v této databázi objevuje. Dále existuje enormní počet teoreticky možných kombinací reakčních schémat, ovšem pouze 2178 z těchto možností se opravdu v databázi vyskytuje. Tato čísla naznačují, že strukturní rozmanitost glykanů je opravdu obrovská, ale že kombinace reakčních schémat, která ve skutečnosti existují v buněčném prostředí, jsou limitována schopností enzymů podílejících se na biosyntéze glykanů stavět a modifikovat jejich struktury (von der Lieth, 2009).

- (c) Ačkoliv je v dané buňce pro všechny proteiny stejná glykosylační mašinerie, většina glykoproteinů se vyvine s charakteristickými glykosylačními motivy a heterogenní populací glykanů v každém glykosylačním místě - glykoformy (Rudd & Dwek, 1997; Chalabi *et al.*, 2006; Arnold *et al.*, 2007). Na jedno glykosylační místo proteinu bylo nalezeno i více než 100 glykoform a obvykle je pozorováno více než 10 glykoform (Rudd & Dwek, 1997). Další unikátní vlastností komplexních glykanů jsou ne-stechiometrické modifikace a množství chemických substitucí, což vyžaduje vývoj zcela nových konceptů analýzy. Příkladem může být statistický výskyt sulfátových skupin na specifických pozicích v glykosaminoglykanech, jako jsou heparin nebo heparan sulfát (Coombe & Kett, 2005; Capila & Linhardt, 2002).
- (d) Proteiny vázající glykany se podílejí na mnoha aspektech buněčné biologie. Podílejí se na rozpoznávání patogenů, buněčném transportu, endocytoze a modulaci buněčné signalizace (Collins & Paulson, 2004). Přiřazení biologické funkce cukrům v rozpoznávání je ovšem složité, protože individuální glykany vykazují velmi slabé interakce s proteinovým povrchem (Herrmann *et al.*, 1997).

Z těchto důvodů je detailní analýza glykanů včetně všech strukturních aspektů velmi obtížná. Procedury jsou časově velmi náročné a je potřeba relativně velké množství (v řádu mikrogramů) izolovaných oligosacharidů. Často jsou aplikovány metody, které neumožňují detekci všech strukturních detailů glykanů. Moderní analytické metody jsou však schopné objasnit většinu strukturních znaků v rozmezí koncentrací vyžadovaných v proteomických/glykomických projektech (von der Lieth, 2009).

4.2 Analýza glykoproteinů

Abychom mohli dávat do souvislosti funkční vlastnosti s definovanými strukturálními parametry, je zapotřebí provádět detailní analýzy struktury glykanů připojených ke glykoproteinům. Nejběžnější způsob charakterizace glykosylace proteinů zahrnuje následující kroky: (a) enzymatické nebo chemické uvolnění připojených glykanů; (b) derivatizace uvolněných glykanů reduktivní aminací aromatickými nebo alifatickými aminy nebo permethylací; (c) analýza glykanů. Kompletní vyhodnocení struktury glykanů vyžaduje stanovení složení cukrů, cukerné sekvence, monosacharidového větvení, interglykosidových vazeb a anomerních konformací. Glykoproteiny mohou navíc nést několik rozdílných glykanů. Často se jedná o směsi N- a O-glykanů, které se mohou vyskytovat na glykosylačních místech v rozdílných množstvích s rozdílnými variantami stupně obsazení těchto míst. Následkem toho vyžaduje analýza glykanů zapojení hned několika analytických technik. (Morelle & Michalski, 2007).

Jedním z nevhodnějších přístupů (zdaleka ne však jediným) pro výzkum glykoproteinů je studium N- a O-glykanů z rekombinantních glykoproteinů nebo více komplexních biologických vzorků jako jsou nefrakcionované buněčné extrakty nebo fyziologické tekutiny. N-glykany jsou uvolněny použitím peptidové N-glykosidasy F tj. PNGasy F (Tarentino & Plummer, 1994) a O-glykany jsou uvolněny z N-deglykosylovaných proteinů/peptidů alkalickou β -eliminací (Taylor *et al.*, 2006). Izolované N- a/nebo O-glykany jsou derivatizovány permethylací (Ciucanu & Kerek, 1984) a methylované deriváty jsou analyzovány použitím hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS („matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight“) nebo nano-ESI MS/MS („nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry“; Zaia, 2004). Dále jsou glykany podrobeny analýze vazeb a štěpeny exoglykosidasami pro identifikaci monosacharidů a jejich anomerních konfigurací (Jacob & Scudder, 1994). Analýza vazeb je uskutečněna získáním částečně methylovaných alditolových acetátů permethylovaných vzorků (PMAA), které jsou analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem jako detektorem (GC-MS; Hellerqvist, 1990). Stanovení struktury je založeno na určení molekulové hmotnosti, tvorbě iontových fragmentů (později vytvořených tandemovou MS (MS/MS; Dell, 1987), náchylností k exoglykosidasovému štěpení a datech o vazbách (Hellerqvist, 1990). Tento robustní a vysoce citlivý přístup využívající MS pro charakterizaci glykosylačních schémat proteinů, buněk, tkání a fyziologických tekutin dovoluje jak rychlou analýzu glykoforem, tak jejich relativní kvantifikaci (Morrelle *et al.*, 2006; Faid *et al.*, 2007).

4.3 Příprava vzorku pro MS analýzu glykoproteomu

Glykoproteomika je odvětví glykomického výzkumu, který zahrnuje všechny glykokonjugáty s proteiny a zaměřuje se především na analýzu glykosylací vyskytujících se

na Asn rezidíích (N-glykosylace) nebo Ser/Thr (O-glykosylace). Glykoproteomická analýza uvolněných oligosacharidů a glykopeptidů poskytuje dva různé typy informací. Jednak je to globální identifikace oligosacharidů a dále charakterizace glykosylačního místa na proteinu. Toto rozdělení analýzy má své opodstatnění, neboť reflektuje dva rozdílné biologické procesy v buňce. Stanovení místa ukazuje na počátek glykosylace (často kotranslační), zatímco konečná oligosacharidová struktura je výsledkem posttranslačního elongačního mechanismu glykosylace v ER a GA (Karlsson & Packer, 2009).

Glykoproteomický experiment využívající jako klíčovou metodu hmotnostní spektrometrii se převážně provádí buď na uvolněných oligosacharidech z glykoproteinu, nebo na glykopeptidech. Tradičnější glykoproteomický přístup napodobuje ten proteomický, kdy se k izolaci glykoproteinů používá gelová elektroforéza. Následuje enzymové nebo chemické uvolnění oligosacharidů a jejich chromatografická separace popřípadě analýza hmotnostní spektrometrií. Druhou možností je analýza glykopeptidů získaných proteolytickým štěpením v gelu. Tento přístup může být aplikován jak na celkovou směs glykoproteinů a proteinů v proteomu, tak také po obohacení glykoproteinů např. izolací pomocí lektinů (Wilson *et al.*, 2006).

Jiný přístup glykomické analýzy je založen na analýze všech uvolněných oligosacharidů ze směsi proteinů. Tato globální analýza může být použita jako první průzkumná metoda, která naznačí syntetickou dráhu glykosylace v buňce. Odtud lze poté celkovým srovnáním glyko-profilů nalézt odchylky glykosylace, které jsou výsledkem pozměněné glykosylační mašinérie a mohou příčinou nějaké nemoci. Poměrně nedávno byly vyvinuty alternativní glykomické strategie pro identifikaci glykopeptidů, kde je glykosylační místo stanoveno izolací glykopeptidového komplementu buňky (Zhang *et al.*, 2003; Kaji *et al.*, 2003). Oba tyto přístupy generují komplementární data pro výzkum glykoproteomu. V glykomických aplikacích se začínají také prosazovat sofistikovanější techniky, jako je značení glykokonjugátů stabilními izotopy pro kvantifikaci (Yuan *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2004) a 2D metody k zobrazení a kvantifikaci hmotnostně spektrometrických dat oligosacharidů z MS a LC-MS (hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií; Niñonuevo *et al.*, 2005).

4.4 Fragmentace glykanů

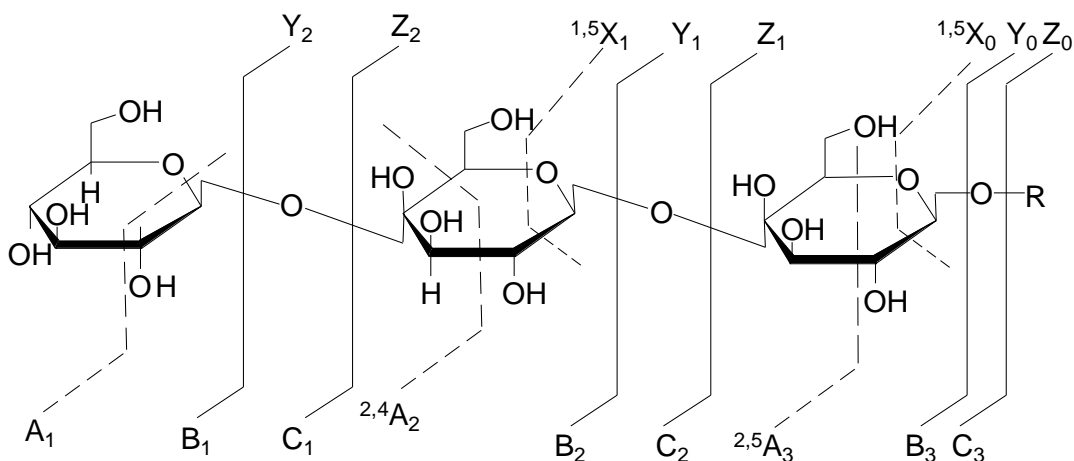
V počáteční fázi používání hmotnostní spektrometrie pro analýzu glykosylace metodami FAB-MS/LSIMS („fast atom bombardement mass spectrometry“; „liquid secondary ion mass spectrometry“) nebo tradičních technik ionizace elektronem EI („electron impact“) bylo vypořazováno, že glykokonjugáty, jako jsou volné oligosacharidy a glykosfingolipidy, vykazují výraznou fragmentaci oligosacharidové kostry spolu s pseudomolekulárním iontem. Na základě těchto poznatků byla vytvořena nomenklatura

fragmentace oligosacharidů (obr. 7; Domon & Costello, 1988) , která je s menšími úpravami (Karlsson *et al.*, 1996) stále základem pro vysvětlování dějů odehrávajících se při hmotnostní spektrometrii glykanů. Je nutné si však uvědomit, že nomenklatura pouze popisuje fragmentaci oligosacharidů, ale nepředpovídá fragmentaci jako takovou. Míra fragmentace může být ovlivněna použitím různých fragmentačních technik, ionizačními módy (negativní nebo pozitivní), nábojovými stavy rodičovského iontu, typem hmotnostního spektrometru a přenosem energie při kolizi (tab. 3; Morrele & Michalski, 2005).

Tab. 3

Parametry ovlivňující fragmentaci oligosacharidů (přepřacováno z Morrele & Michalski, 2005).

Parametr	Příklad
Mód	Pozitivní (+) a negativní (-)
Nábojový stav	$[M + H]^+$, $[M + 2H]^{2+}$, $[M + 3H]^{3+}$
Adukty	$[M + Na]^+$, $[M + 2Na]^{2+}$, $[M - 2H]^-$, $[M + Cl]^-$
Derivatizace	Permethylace, redukce, reduktivní aminace redukujícího konce
Přenos energie	Kolizí indukovaná/asociovaná disociace (CID, CAD „collision-induced/associated dissociation“), disociace záchytem elektronu (ECD „electron capture dissociation“), fragmentace za iontovým zdrojem (PSD „post source decay“)
Kolizní energie	Vysoko-energetické srážky (>1 keV), nízko-energetické srážky (<0,5 keV)



Obr. 7

Nomenklatura podle Domona a Costella popisující fragmentaci oligosacharidů. V této nomenklatuře jsou ionty mající náboj na neredukujícím konci označeny A, B a C a ionty nesoucí náboj na redukujícím konci X, Y a Z. A a X odpovídají štěpení kruhu, zatímco B, C, Y a Z odpovídají štěpení glykosidových vazeb. Dolní indexy označují pozici štěpení, začínající od redukujícího konce pro X, Y a Z ionty a od neredukujícího konce pro ostatní. V případě štěpení kruhu označují indexy štěpenou vazbu.

-přepřacováno z Domon & Costello, (1988) pomocí programu Chemscketch;

<http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemscketch/>

Fragmenty komplexních cukrů dávají vzniknout dvěma hlavními typům iontů, které jsou výsledkem dvou typů štěpení: (a) štěpení glykosidových vazeb, kdy dochází k prasknutí vazby mezi cukernými kruhy; (b) štěpení uvnitř kruhu, kdy praskají dvě vazby na jednom cukerném reziduu. Štěpení glykosidových vazeb dává informaci o monosacharidové sekvenci a větvení. Štěpení kruhů je obvykle méně časté a může být využito ke stanovení vazeb (Morrele & Michalski, 2005).

Významný efekt na fragmentaci oligosacharidu má typ rodičovského iontu. Poločasy života protonovaných iontů jsou kratší než u iontů koordinovaných alkalickými kovy. U iontů tvořených alkalickými kovy klesají poločasy života ve směru Li^+ , Na^+ , K^+ a Cs^+ . Exotermicita vázání iontu klesá ve stejném pořadí, což naznačuje, že proponované a lithiované ionty jsou tvořeny s přebytečnou energií a mohou být využity k iniciaci fragmentace. Dále bylo vypořazováno, že nejvíce větvené oligosacharidy produkují nejmenší množství fragmentových iontů. Tento jev se přisuzuje koordinaci kovového iontu na cukr. Nejmenší alkalický kov produkuje největší množství fragmentových iontů. Přítomnost kvazimolekulárního iontu je tak závislá jak na velikosti kovového iontu, tak na velikosti cukru. Všechny tyto vztahy jsou společnými znaky fragmentace u různých ionizačních technik (Ngoka *et al.*, 1994; Cancilla *et al.*, 1996)

4.5 Fragmentace u MALDI-MS

Fragmentace u techniky MALDI-MS může být provedena několika různými způsoby: fragmentace v iontovém zdroji (ISD „in-source decay“), rozpadem za iontovým zdrojem (PSD „post source decay“) a kolizí indukovaná disociace (CID „collision-induced dissociation“). ISD fragmentové ionty pochází z nestabilních molekulárních iontů, velmi rychle se rozpadají a odpovídají iontům vzniklým uvnitř iontového zdroje před akcelerací do hmotnostního analyzátoru. Mohou být pozorovány analyzátozem TOF („time of flight“; Naven *et al.*, 1997) nebo přístroji vybavenými magnetickým sektorem (Harvey *et al.*, 1995). PSD ionty odpovídají fragmentům vzniklých z metastabilních iontů po jejich extrakci z iontového zdroje. K rozpadu dochází mezi iontovým zdrojem a reflektorem při použití analyzátozem TOF v reflektromovém modu. CID ionty jsou tvořeny ze stabilních iontů uvnitř kolizní cely naplněné neutrálním plynem. Parametry, jako je vlnová délka laseru a energie, extrakční napětí a volba matrice, mají přímý vliv na typ a stupeň fragmentace iontů (Luo *et al.*, 2002).

Při použití techniky PSD na iontech $[M + Na]^+$ z větvených oligosacharidů získaných z glykoproteinů byly pozorovány charakteristické rozdíly odpovídající místům větvení a vazebným pozicím (Spengler *et al.*, 1994). V PSD spektrech se dominantně objevují fragmenty odpovídající štěpení glykosidových vazeb, zatímco štěpení kruhu je velmi ojedinělé. Hlavními typy iontů jsou proto B, C, Z a Y, které poskytují informace o sekvenci a větvení. V experimentech využívajících CID fragmentaci lze v hmotnostních spektrech pozorovat kromě iontů série B, C a Y také mnohem častěji fragmenty tvořené přerušením vazeb uvnitř kruhu. Nejdůležitějšími pozorovanými fragmenty jsou $^{1,5}X$, které ukazují celkovou konstituci monosacharidových reziduí, což poskytuje velmi hodnotné informace o sekvenci a větvení. Přítomnost těchto fragmentů dovoluže identifikovat Y ionty a následně i B a C ionty, a tak lze získat informaci o sekvenci zcela neznámého nederivatizovaného neutrálního glykanu (Harvey *et al.*, 1997; Spina *et al.*, 2000).

4.6 Hmotnostní spektrometrie uvolněných oligosacharidů

Jak již bylo naznačeno dříve, ESI a MALDI MS hrají kritickou roli v charakterizaci glykosylací (Zaia, 2004). MALDI-TOF MS nabízí relativně jednoduchý způsob pro „screening“ komplexních směsí. MS/MS metody využívající elektrosprej a jako fragmentační techniku nízkoenergetickou kolizi indukovanou disociací CID („collision-induced dissociation“) jsou zase velmi vhodnými technikami pro produkci fragmentových iontů, díky nimž lze zjistit sekvenci a dokonce i určit vazby mezi glykany.

MALDI-TOF MS je velmi často používána v prvním kroku analýzy. Důvodem je unikátní schopnost této metody rychle generovat informace o charakteru a diverzitě glykanů uvolněných z nativního či rekombinantního glykoproteinu nebo dokonce více komplexního

biologického vzorku. Neutrální glykany poskytují intenzivní signály v pozitivním modu odpovídajícím vzniku molekulárních iontů typu $[M + Na]^+$. Tento iont je často doprovázen slabším signálem iontu $[M + K]^+$. Obtížněji se tímto způsobem analyzují sialované glykany, které dávají vzniknout směsi iontů jako je např. $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$, $[M - nH + (n + 1)Na]^+$ a $[M - nH + (n + 1)K]^+$. Navíc mohou sialované glykany velmi lehce ztratit významné množství sialových kyselin v iontovém zdroji nebo po extrakci iontů z iontového zdroje a vznikají tak špatně rozlišené fragmenty z metastabilních iontů, které jsou často vidět v MALDI-TOF spektrech. Aby se předešlo těmto ztrátám, analyzují se sialované glykany v lineárním negativním modu (Morrele & Michalski, 2007). Dnes se používá několik metod derivatizace ke zlepšení stability sialových kyselin neutralizací jejich záporného náboje. Jednou z nich je methylesterifikace karboxylových skupin sialových kyselin, kde reagují jejich sodné soli s methyljodidem, což dovoluje simultánní analýzu neutrálních a sialovaných oligosacharidů v pozitivním modu (Powell & Harvey, 1996). Další metodou je permethylace glykanů použitím technik popsaných Ciucanu a Kerek, které také stabilizují sialové kyseliny (Ciucanu & Kerek, 1984). Existuje několik prací, které tento přístup ještě značně zefektivňují (Ciucanu & Costello, 2003; Kang *et al.*, 2005).

Derivatizace permethylací zůstává daleko nejdůležitějším typem modifikace ve hmotnostní spektrometrii glykanů a nabízí hned několik výhod: (a) velmi snadné odstranění solí použitím lipofilní extrakce; (b) významné vylepšení citlivosti detekce molekulárních iontů; (c) umožňuje simultánní analýzu neutrálních a sialovaných oligosacharidů v pozitivním modu; (d) tento přístup vede k předpověditelné fragmentaci, která poskytuje charakteristické „mapy“ fragmentových iontů pro každé cukerné reziduum; (e) po MALDI-TOF MS analýze permethylovaných glykanů mohou být methylace navíc použity pro stanovení všech interglykosidových vazeb analýzou GC-MS (plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií) chemicky modifikovaných monosacharidů, které jsou získány methylací, hydrolýzou, redukcí a acetylací glykanů (Morrele & Michalski, 2007).

Analýza vazeb použitím methylace probíhá následujícím způsobem. Nejprve jsou všechny volné hydroxylové skupiny intaktního glykanu methylovány. Následuje hydrolýza glykanového řetězce a tvorba monosacharidů. Jejich redukcí se otevře kruh a vytvoří cukerný alkohol. Hydroxylové skupiny, které se před hydrolýzou podílely na glykosidové vazbě, jsou acetylovány a výsledná směs těkavých cukerných derivátů je analyzována pomocí GC-MS. Fragmentační schéma pro každou cukernou složku může být použito pro identifikaci pozic různých modifikací, z čehož lze odvodit, která z hydroxylových skupin se podílela na glykosidové vazbě (Maureen & Drickamer, 2003b).

4.7 Analýza glykopeptidů

Aby mohl být vyřešen problém suprese hmotnostně spektrometrických signálů glykopeptidů v přítomnosti neglykosylovaných peptidů, bylo nutné zdokonalit metodiku obohacování glykopeptidů použitím různých afinitních metod. Použití specifických proteas, jako je trypsin, k přípravě peptidových směsí má jak své výhody, tak nevýhody. Jednou z výhod je, že pokud je analyzován známý protein, hmoty peptidů mohou být lehce předpovězeny a stejný vzorek lze použít jak k identifikaci proteinu, tak k charakterizaci glykosylace. Negativní stránkou použití trypsinu je omezená kontrola nad velikostí glykopeptidů. Běžné tryptické štěpy totiž mohou mít hmoty přesahující 2000 Da i mnohem více (suma hmoty tryptického peptidu a hmoty oligosacharidu; Karlsson & Packer, 2009). Separace a obohacení tryptických glykopeptidů chromatografií jsou velmi komplikované z důvodu rozdílných nábojů a velikosti peptidu a oligosacharidu. Proto byly navrženy alternativní metody pro izolaci glykopeptidů, které využívají méně specifické proteasy, jako jsou proteinasa K a pronasa. Tyto enzymy štěpí peptidy v okolí glykosylačního místa a v kombinaci se znalostí peptidové sekvence a charakterizace uvolněných oligosacharidů přítomných na glykoproteinu je možné vydedukovat identitu a místo připojení oligosacharidu. Výhodou tohoto přístupu je, že malé glykopeptidy mohou být izolovány standardními chromatografickými metodami používanými pro analýzu oligosacharidů, protože peptidová část má jen velmi malý vliv na chromatografické vlastnosti glykopeptidu (An *et al.*, 2003; Larsen *et al.*, 2005).

Alternativně lze použít pro izolaci glykopeptidů hydrofilní interakce mezi oligosacharidy a pevnou fází, jako je např. celuloza a sepharosa, jak bylo demonstrováno při obohacování velkých glykopeptidů fibronektinu (Tajiri *et al.*, 2005), které byly poté separovány chromatografií na obrácené fázi.

4.8 Analýza intaktních glykopeptidů

Hlavním cílem při analýze glykopeptidů je získat najednou informace jak o strukturální heterogenitě oligosacharidů, tak o peptidové sekvenci. Pokud se má pracovat v glykoproteomickém kontextu, musí být takováto analýza provedena na globální úrovni hned s několika glykoproteiny najednou z jedné tkáně. Prvním praktickým aspektem analýzy glykopeptidů je fakt, že je obecně složité je detekovat použitím standardních technik analýzy peptidů. Jestliže se překonají problémy se supresí ionizace glykopeptidů, které lze obecně pozorovat u MALDI-MS, stále zde zůstává problém se stanovením heterogenity glykosylace v jednom glykosylačním místě. Z důvodu heterogenní glykosylace individuálních glykopeptidů jsou obvykle vidět v hmotnostním spektru mnohem méně než neglykosylované peptidy, a to dokonce i v případě, kdy je peptidová směs připravena z jednoho glykoproteinu (Karlsson & Packer, 2009). Použitím 2D SDS-PAGE mohou být jednotlivé isoformy

glykoproteinů separovány do několika skupin podle náboje (sialové kyseliny a sulfáty) a velikosti. Často jsou rozpoznatelné jako sled skupin s několika hodnotami pI a zvyšující se kyselostí (Wilson *et al.*, 2002). Takováto separace různých glykoforem poskytuje homogennější tryptické směsi. Použitím techniky IRMPD („infrared multiphoton dissociation“) bylo demonstrováno, že FT („Fourier Transform“)-MS může být použita pro sekvencování oligosacharidů sialovaných glykopeptidů z cerebrospinální tekutiny (Håkansson *et al.*, 2003a). LC-MS v kombinaci s rozdílnými fragmentačními technikami, jako jsou IRMPD a ECD („electron capture dissociation“) spolu s vysoko rozlišující FT-MS, jsou v současnosti nejpreciznějším přístupem pro sekvencování glykanů a proteinů z jednoho vzorku (Håkansson *et al.*, 2003 b). ECD byla také použita pro analýzu O-glykosylovaných peptidů, obsahujících několik glykosylačních míst. Při použití ECD se preferenčně štěpí peptidová kostra bez ovlivnění oligosacharidové části, zatímco technikou IRMPD se fragmentuje přednostně oligosacharid před peptidovou kosterou (Renfrow *et al.*, 2005).

K analýze obohacených peptidových frakcí ze séra byla v jedné práci použita technika MALDI-QIT („quadrapol ion trap“) s využitím sekvenční fragmentace v iontové pasti za účelem sekvenace cukrů (MS^2) a peptidů (MS^3 ; Wada *et al.*, 2004). Existuje několik dalších prací popisujících analýzu glykopeptidů z purifikovaných proteinů, které vykazují enormní množství informací získaných obvykle manuální interpretací hmotnostně spektrometrických dat. Praktikování tohoto druhu analýzy v globálním měřítku je ovšem nejen obrovsky časově náročné, ale také interpretace dat a jejich vyhodnocování jsou velmi obtížné (Karlsson & Packer, 2009).

5. Modelové glykoproteiny

5.1 Alfa-2-HS-glykoprotein

Alfa-2-HS glykoprotein (AHSG), známý také jako fetuin-A, je sérový glykoprotein syntetizovaný a sekretovaný játry dospělých jedinců a mnoha orgány během embryogeneze (Terkelsen *et al.*, 1998). Název „fetuin“ pochází z latinského slova „*fetus*“ (plod) a důvodem pro jeho pojmenování je jeho majoritní zastoupení z celkového proteinového obsahu v krvi plodu (Triffitt *et al.*, 1976).

Fetuin-A obsahuje vysoký obsah glykosylací, které se vyznačují výskytem sialových kyselin (Nie, 1992; Brown *et al.*, 1992a). Proto je jeho molekulová hmotnost značně závislá na obsahu cukrů a pohybuje se v rozsahu od 51 do 67 kDa (Brown *et al.*, 1992b). Ačkoliv AHSG ztratil během vývoje schopnost inhibovat cysteinové proteasy, řadí se do velké cystatinové rodiny proteinů (Ochieng & Chaudhuri, 2010). Výzkum naznačuje, že fetuin-A je multifunkčním proteinem (Reynolds *et al.*, 2005). Na základě studie myši, jimž byl

„knock-outován“ gen pro A-fetuin, mu byla přisouzena klíčová fyziologická role spočívající v jeho schopnosti inhibovat ektopickou kalcifikaci, která je patologická (Schafer *et al.*, 2003).

5.2 Cytokinin oxidasa/dehydrogenasa (CKO)

Cytokinin oxidasy/dehydrogenasy [EC 1.5.99.12] jsou enzymy katalyzující ireverzibilní degradaci cytokininů s isoprenoidním řetězcem, ale i aromatickým řetězcem. Přeměňují cytokininy a jejich ribonukleosidy s nenasyceným řetězcem na adenin nebo adenosin a odpovídající aldehyd: (Galuszka *et al.*, 2001)

N^6 -isopentenyladenin + akceptor + H₂O \longrightarrow adenin + 3-methylbut-2-enal + redukovaný akceptor

Aktivita CKO byla poprvé pozorována v roce 1971 v surovém extraktu tabáku (Pačes *et al.*, 1971) a od té doby byla nalezena v několika dalších rostlinách jako je kukuřice, pšenice, topol a fazole (Hare & van Staden, 1994)

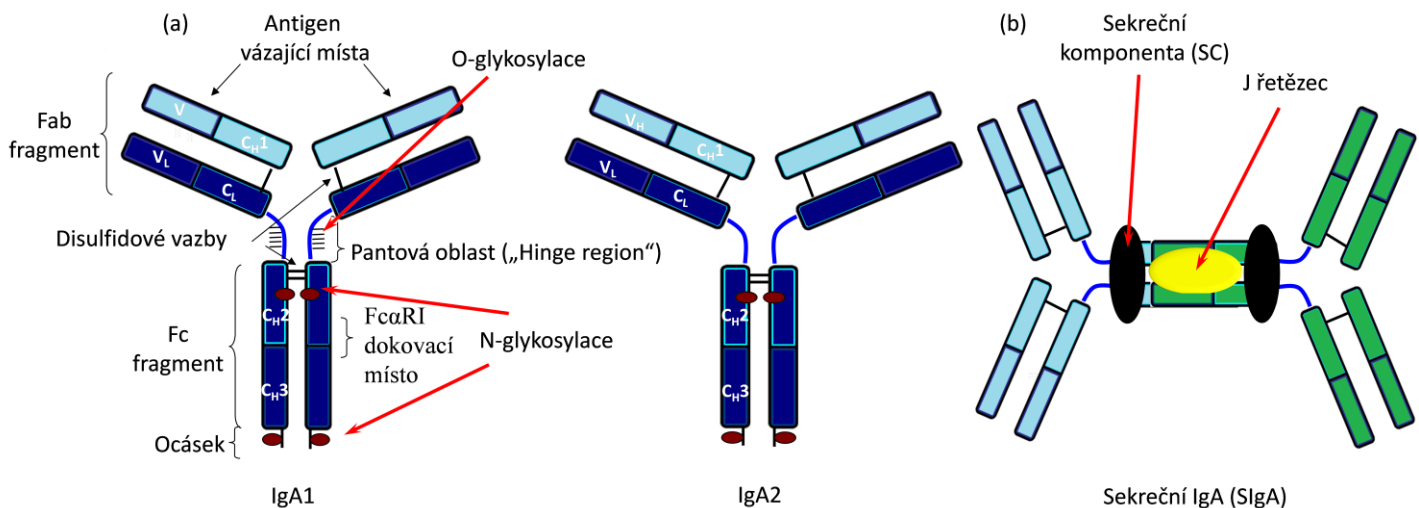
CKO jsou zodpovědné za většinu katabolismu cytokininů a jsou schopny inaktivace hormonu v jediném enzymatickém kroku. Protože změny v CKO aktivitě mění koncentrace cytokininů v pletivech, jsou CKO důležité při kontrole lokálních hladin těchto hormonů a podílejí se na regulaci procesů závislých právě na cytokininech (Bilyeu *et al.*, 2001).

Molekulové hmotnosti rostlinných CKO apoenzymů vypočtené z genových sekvencí jsou spíše uniformní a pohybují se mezi 56 000-64 900 Da. Některé rozdíly v hmotách lze vysvětlit přítomností posttranslačních modifikací. Ukázalo se, že CKO z většiny rostlinných zdrojů jsou glykosylovány. Např. enzym z kukuřice má osm předpověděných glykosylačních míst, přičemž u pěti z nich je pravděpodobnost glykosylace vyšší než 50 %. Ostatní CKO obsahují jedno až osm predikovaných glykosylačních míst (Bilyeu *et al.*, 2001).

5.3 Imunoglobulin A (IgA)

IgA se vyskytuje ve dvou strukturně a funkčně odlišných podtřídách. První podtřídou je IgA1 a druhou IgA2 (obr. 8a; Mestecky, 1988). IgA1 obsahuje na rozdíl od IgA2 unikátní inzerci v jeho pantové oblasti mezi první a druhou konstantní doménou (Fragione & Wolfenstein-Todel, 1972). V této oblasti je koncentrován velký obsah aminokyselinových reziduí Pro, Ser a Thr, což jsou potenciální oblasti připojení až pěti O-glykanových řetězců skládajících se z *N*-acetylgalaktosaminu s β -1,3-navázanou galaktosou, která může být sialována (Baeyinger & Kornfeld, 1974; Renfrow *et al.*, 2005). Sialová kyselina může být připojena k *N*-acetylgalaktosaminu také α -2,6-vazbou. Cukerné složení těchto O-glykanů v pantové oblasti normálního cirkulačního IgA1 je variabilní. Převažujícími formami jsou *N*-acetylgalaktosamin-galaktosový disacharid a jeho mono- a di-sialované formy (Tomana *et al.*, 1997; Novak *et al.*, 2000; Mattu *et al.*, 1998).

U většiny savců IgA cirkuluje v jeho polymerní formě. V lidském séru je převážně monomerní a představuje 15-20 % z celkového množství imunoglobulinů v séru. V oblastech mukosálních tkání je však nejvíce zastoupenou třídou protilátek, kde je jeho hlavní role ochrana před patogeny. Zde je IgA exprimován spolu s peptidem označovaným J, který stimuluje dimerizaci (Kerr, 1990). Následným vázáním na polymerní imunoglobulinový receptor pIgR, který je exprimován na basolaterálním povrchu mukosálních epiteliálních buněk, je dimerní IgA aktivně transportován transcytozou skrz buňku (Mostov, 1994). Na apikální straně membrány jsou externí domény pIgR odštěpeny a vzniklý komplex je vypuštěn do sekretu. Zbytek pIgR označovaný jako sekreční komponenta (SC) je kovalentně vázaný k dimernímu IgA a tvoří spolu komplex SC-dIgA, který se značí jako SIgA (obr. 8b; Kerr, 1990)



Obr. 8

(a) IgA isotypy. IgA je složen ze dvou těžkých (modrá) a dvou lehkých (světle modrá) řetězců. Těžké řetězce se skládají ze tří konstantních oblastí (C_{H1}, C_{H2} a C_{H3}) a jedné variabilní oblasti (V_H), zatímco lehké řetězce se skládají z jedné konstantní oblasti (C_L) a jedné variabilní oblasti (V_L). Dále jsou označeny pozice pro dokovací místa na FcαRI a červenými šipkami je ukázáno na místa O- a N-glykosylace. (b) Sekreční IgA (SIgA) se skládá ze dvou IgA molekul (jedna světle modrá, druhá zelená). Vyznačen je také spojovací peptid J (oranžová) a sekreční komponenta (černá).

-přepřacováno z van Egmond *et al.*, (2001)

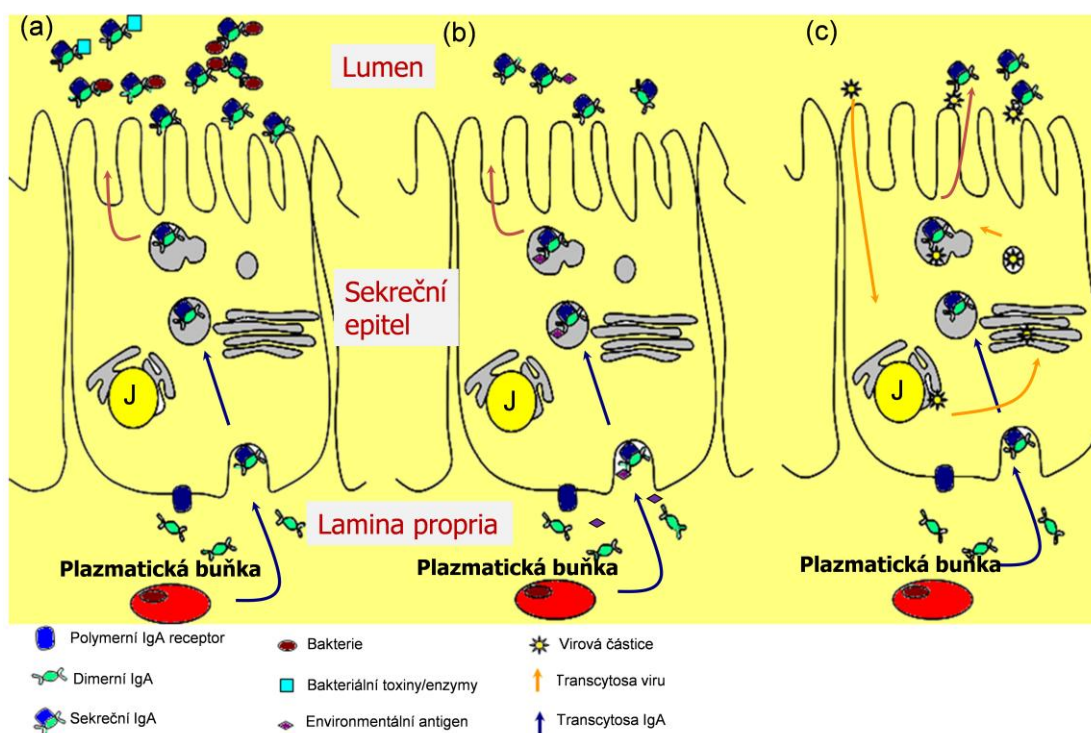
5.3.1 Fyziologická role IgA

Hlavním úkolem IgA v organismu je ochrana mukosálních povrchů. Díky převaze hydrofilních aminokyselin v Fc oblasti IgA a hojně glykosylaci na IgA i SC je komplex SIgA hydrofilní a negativně nabitý (Kerr, 1990). Takovéto vlastnosti umožňují SIgA obklopit mikroorganismy hydrofilní ulitou a inhibovat tak jejich přilnavost k mukosálním povrchům, které je odpuzují. Další schopností SIgA je aglutinace mikrobů a interference

jejich mobility prostřednictvím interakce s jejich flagelami. SIgA navíc váže produkty metabolismu patogenů (enzymy a toxiny), čímž neutralizuje jejich účinky (obr. 9a).

Z důvodu nadbytku komponent ze stravy a mikrobiální flóry v oblastech intestinálního traktu je sliznice (*lamina propria*) neustále vystavována antigenům, které tam procházejí difuzí nebo transcytozou. Lokálně produkované IgA interaguje s těmito antigeny a vzniknuvší imunokomplexy jsou buď fagocytovány, nebo transcytozou navráceny zpět do lumenu (obr. 9b). IgA má v tomto případě roli „imunitní eliminace“, která poskytuje efektivní způsob odstraňování nadbytečných imunokomplexů ze sliznice (van Egmond *et al.*, 2001).

Velmi zajímavou schopností IgA je intracelulární neutralizace virů (obr. 9c). Zatímco protilátky obvykle poskytují malou ochranu proti intracelulárním patogenům, IgA může interagovat s virovými částicemi přímo v buňce a inhibovat tak jejich replikaci nebo je shromažďovat na povrchu infikované epiteliální buňky, kde mohou být zneškodněny (van Egmond *et al.*, 2001).



Obr. 9

Fyziologická role IgA v mukosální oblasti. Plazmatické buňky v *lamina propria* produkují dimerní IgA (dIgA), které se váže na polymerní Ig receptor (pIgR) exprimovaný na basolaterální straně membrán epiteliálních buněk. Tento komplex je transportován skrz epiteliální buňky do lumenu, kde je pIgR štěpen a uvolňuje se sekreční IgA (SIgA). (a) SIgA chrání sliznici před bakteriální penetrací. Aglutinuje bakterie, interferuje jejich pohyblivost a neutralizuje bakteriální produkty. (b) Antigeny v *lamina propria* jsou vázány IgA a mohou tak být transportovány skrz epiteliální buňky stejnou cestou jako volné pIgA, čímž se ze sliznice odstraňují nadbytečné antigeny. (c) Během transcytozy může IgA zachytit virové antigeny a bránit tak virové syntéze a/nebo nashromáždit virus v lumenu a následně ho zneškodnit.

-přepřacováno z van Egmond *et al.*, (2001)

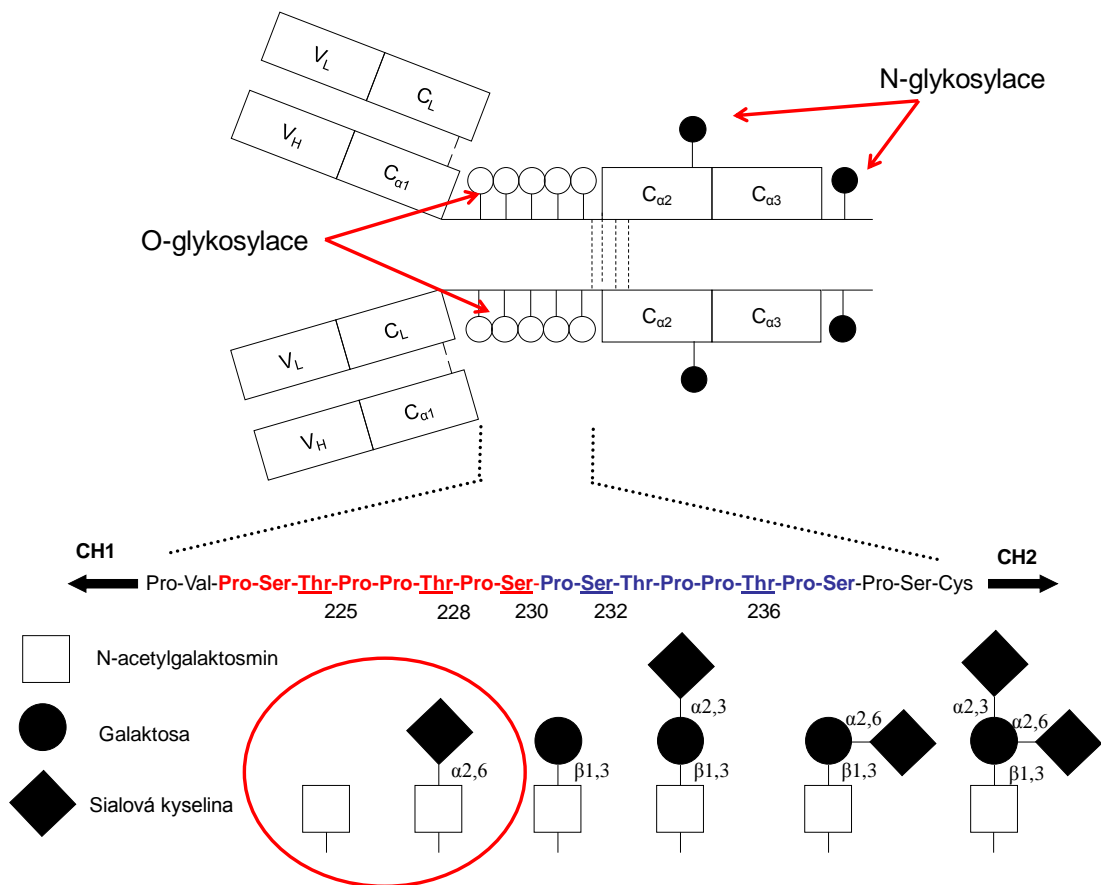
6. Příklad aplikace analýzy glykosylace

6.1 Studium IgA nefropatie (IgAN)

IgAN (Bergerova nemoc) byla popsána v roce 1968 (Berger & Hinglais, 1968) na základě imunohistochemického nálezu IgA a IgG imunokomplexů v glomerulárním mesangiu ledvin a dnes je nejčastější primární chronickou glomerulonefritidou známou po celém světě (Julian *et al.*, 1988). V počátečních fázích nemoci dochází k nadměrné proliferaci buněk mesangia a expanzi extracelulárního matrix. Při progresi nemoci může nastat během 20 let u 30-40% pacientů glomerulární a intersticiální skleroza a je nutná transplantace ledvin (D'Amico, 2000).

IgA nacházející se v mesangiálních imuno-depozitech je výhradně podtřídou IgA a nejčastěji je v polymerní formě (Conley *et al.*, 1980; Russell *et al.*, 1986). Vyznačuje se aberantní glykosylací v pantové oblasti (obr. 10; Novak *et al.*, 2008). Konkrétně se v tomto místě vyskytují O-glykosylace, které jsou deficientní na galaktosu (Mestecky *et al.*, 1993; Hiki *et al.*, 2001). IgA1 cirkulující u pacientů trpících IgAN také nese O-glykany s deficiencí galaktosy, přičemž tyto molekulární varianty IgA1 se jen zřídka nacházejí v séru zdravých jedinců (Novak *et al.*, 2008; Barratt *et al.*, 2007). Produkce těchto defektních IgA1 molekul je způsobena změnou exprese specifických glykosyltransferas v buňkách produkujících IgA1 (Buck *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2008).

Vázání imunokomplexů obsahujících aberantně glykosylované IgA1 (Tomana *et al.*, 1999) na mesangiální buňky indukuje patologické procesy v ledvinách charakteristické pro IgAN (Novak *et al.*, 2005; Novak *et al.*, 2007). Ovšem toto je pouze výsledkem dříve započatého patologického procesu, jenž je s nejvyšší pravděpodobností extrarenálního původu. Důkazem může být fakt, že u více než 50 % pacientů s IgAN, kterým byla provedena transplantace, se nemoc vrací během 2 let (Berger, 1988). Z tohoto důvodu jsou faktory, které nějakým způsobem souvisí s tvorbou cirkulujících imunokomplexů u pacientů s IgAN předmětem velkého vědeckého zájmu. Ačkoliv je dnes známo, že aberantně glykosylované IgA1 molekuly jsou rozpoznávány protilátkami IgG nebo IgA1 vykazující specifickou specifičnost na glykany a to jak u pacientů s IgAN, tak zdravých jedinců (Tomana *et al.*, 1997; Tomana *et al.*, 1999), jen velmi málo se ví o přesné specifikaci a molekulárních vlastnostech protilátek.



Obr. 10

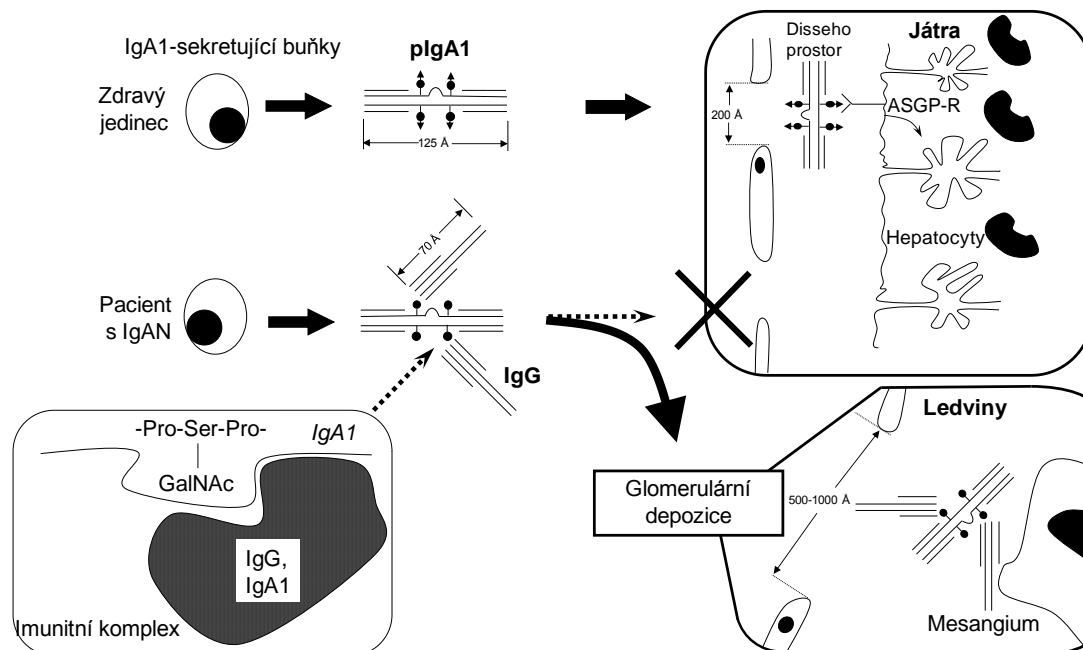
Na obrázku je IgA1 s označenou O-glykosylací v pantové oblasti a N-glykosylací. Dále je zvýrazněna sekvence odpovídající pantové oblasti, kde jsou podtrženy a očíslovány pozice aminokyselinových reziduí s nejčastějším výskytem O-glykanů (Mattu *et al.*, 1998; Renfrow *et al.*, 2005). Červené a modré rozdělení sekvence označuje tandemovou repetici, která vznikla insercí genového segmentu kódujícího pantovou oblast do fylogeneticky staršího izotypu IgA2, čímž vznikl izotyp IgA1 (Fragione & Wolfenstein-Todel, 1972). Ve spodní části obrázku jsou různé varianty O-glykanů vyskytující se v pantové oblasti cirkulujícího lidského IgA1 (Field *et al.*, 1989; Mattu *et al.*, 1998). V červených kruzích jsou označeny galaktosa deficientní varianty O-glykosylace. Přerušované čáry značí dusířidové vazby mezi podjednotkami.

-přepřacováno z Novak *et al.*, (2008)

6.2 Hypotetický model patogeneze IgAN

Na základě velkého množství publikovaných dat byl vytvořen model patogeneze IgAN. Některé IgA1 molekuly produkované buňkami sekretujícími imunoglobulin u pacientů s IgAN vykazují deficienci galaktosy a následkem toho jsou rozpoznány jako epitopy protilátkami IgG (nebo IgA1) specifickými na glykany. Výsledné imunokomplexy jsou příliš objemné na to, aby mohly vstoupit do Disseho prostoru, v játrech a být metalizovány normální cestou. Disseho prostor se nachází mezi sinusoidy a hepatocyty a je fyziologicky významným pro výměnu látek právě mezi sinusoidy a hepatocyty. Imunokomplexy se proto dostávají do renální cirkulace, kde projdou většími póry endoteliálních buněk glomerulárních kapilár obklopujících mesangium. Poté se vážou na mesangiální buňky a indukují glomerulární defekty (obr. 11). Tímto způsobem lze IgAN

charakterizovat jako autoimunitní nemoc, kde aberantně glykosylované IgA1 hraje roli autoantigenu (Novak *et al.*, 2008).



Obr. 11

Model patogeneze IgAN. Některé polymerní IgA1 (pIgA1) produkované B buňkami a plazmatickými buňkami vykazují deficienci galaktosy a jsou rozpoznány jako epitopy IgG nebo IgA1 protilátkami. Výsledné imunokomplexy jsou příliš objemné, než aby mohly vstoupit do Disseho prostoru a dosáhnout asialoglykoproteinového receptoru (ASGP-R) v hepatocytech, ale jsou schopny projít většími póry v epiteliálních buňkách glomerulárních kapilár obklopujících mesangium. Výsledné imunodepozity indukují glomerulární poškození.

-přepřacováno z Novak *et al.*, (2008)

6.3 Proteomika může pomoci v diagnóze a progóze IgAN

Zatím jediným rozhodujícím diagnostickým vyšetřením IgAN je imunofluorescenční mikroskopie biopsií získané tkáně ledviny. Charakteristickým nálezem jsou výhradní nebo převládající difuzní depozita IgA v mesangiu glomerulů (D'Amico, 1987).

Proteomická charakterizace a analýza celkových proteinů ze séra a moči pacientů s IgAN je novou, vzrušující a ve velké míře neprozkoumanou oblastí IgAN. Předběžné studie ukázaly, že tento přístup může poskytnout nové neinvazivní metody diagnózy IgAN a navíc může mít přidanou hodnotu v podobě prognozy nemoci (Haubitz *et al.*, 2005).

Abnormálně glykosylované IgA1 molekuly v pantové oblasti, které jsou charakteristické deficiencí galaktosy a nadbytkem sialových kyselin hrají rozhodující roli v patologii IgAN (Barratt *et al.*, 2007). Tento objev odkrývá obrovskou příležitost provádět profilace pacientů s podezřením na IgAN na základě citlivého stanovení sérových hladin těchto abnormálních IgA1 molekul (Moldoveanu *et al.*, 2007). Existuje totiž možnost, že

patogenní molekuly IgA1 (a jejich autoprotilátky) se vyskytují v těle pacienta o mnoho měsíců nebo dokonce roků dříve, než se objeví klinické příznaky zjevné pro IgAN. Z toho je jasné, že porozumění abnormality O-glykosylace Ser/Thr reziduí v pantové oblasti IgA1 molekul je klíčovým pro výzkum IgAN. Velmi užitečnou informací by bylo např. zjištění, zdali je abnormalita IgA1 obecnou vlastností těchto molekul, nebo zdali má jejich distribuce lokální charakter (např. mandle, kostní dřeň, lymfatické tkáně ve střevech; Glassock, 2008).

6.4 Složitost analýzy glykosylace na IgA1 molekule

Analýza O-glykosylace na IgA1 molekule je obtížná hned z několika důvodů:

- (a) V pantové oblasti je 9 (10) Ser/Thr reziduí jenž jsou potenciálními místy O-glykosylace, která jsou navíc v klastru (Frangione & Wolfenstein-Todel, 1972)
- (b) O-glykany v IgA1 vykazují heterogenní složení (Novak *et al.*, 2000)
- (c) Glykany v pantové oblasti mají všechny podobné nebo identické složení (obr. 10)
- (d) Aminokyselinová sekvence HR je tandemově repetitivní (Frangione & Wolfenstein-Todel, 1972)

Všechny tyto faktory brání selektivnímu odstranění jediného glykanového řetězce a následnému stanovení místa jeho připojení a velmi komplikují jejich analýzu (Allen, 1999).

Aplikace metod hmotnostní spektrometrie k analýze IgA1 O-glykosylací by mohly poskytnout možnosti detekce rozdílů na molekulární úrovni v populacích IgA1 mezi zdravými kontrolami a pacienty s IgAN. Dále zbývá zodpovědět otázky, které IgA1 molekuly obsahují O-glykosylace, jenž vedou ke tvorbě imunodepozitů v glomerulu pacientů s IgAN, nebo zdali nastává deficiencie galaktosy u IgA1 náhodně nebo preferenčně na specifických místech.

Jedním z cílů tohoto výzkumu může tedy např. být vyvinutí přímé metody, kterou by bylo možné stanovit populaci IgA1 O-glykanových isoformů z jediného zdroje, což je kritický krok směrem k cíli definovat rozdíly v IgA1 O-glykosylacích mezi pacienty s IgAN a normálními zdravými kontrolami (Renfrow *et al.*, 2005).

Experimentální část

7. Materiál a metody

7.1 Biologický materiál

Vzorky IgA byly získány od Dr. Jana Nováka z Department of Microbiology, University of Alabama v Birminghamu. Konkrétně se jednalo o vzorky rekombinantního polymerního imunoglobulinu A (pIgA) vykazujícího deficienci galaktosy na O-glykosylačních místech v pantové oblasti. Tento protein simuluje IgA produkované pacienty trpícími IgAN, a proto je vhodným modelem pro charakterizaci abnormální O-glykosylace, která hraje hlavní roli v patogenezi této choroby (Barratt *et al.*, 2007). Dalšími studovanými glykoproteiny byly rekombinantní asialofetuin z fetálního hovězího séra zakoupený od firmy Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Německo) a rekombinantní cytokininoxidasa 1 z kukuřice (ZmCKO1) exprimovaná v *Yarrowia lipolytica*.

Ke štěpení byly použity rafinosou modifikovaný hovězí trypsin (Šebela, 2006), prolyl endoproteasa z *Aspergillus Niger* purifikovaná z komerčního enzymového přípravku Brewer's Clarex od firmy DMS Food Specialties (Seclin, Francie). MALDI matrice α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina, ferulová kyselina, sinapová kyselina a peptidová směs pro externí kalibraci hmotnostního spektrometru Microflex LRF20 („peptide calibration standard II“) byly zakoupeny od firmy Bruker Daltonics (Bremen, SRN). Peptidová směs („Six peptide mix“) pro externí kalibraci přístroje 4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer byla získána od firmy Applied Biosystems (Framingham, MA, USA).

7.2 Chemikálie a další materiál

Následující chemikálie byly většinou od firmy Sigma Aldrich Chemie, pokud není uvedeno jinak:

- SDS-PAGE: 30% akrylamid/0,8% *N, N'*-metylen-bisakrylamid, 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), vodou saturovaný n-butanol, 10% (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS), 10% (w/v) peroxodisíran amonný (APS) vše od firmy Bio-Rad (Herkules, CA, USA)
- elektrodový pufr: 0,025M Tris/HCl, 0,192M glycin, 0,1% SDS (pH 8,3)
- vzorkovací pufr: Laemmliho vzorkovací pufr - 62,5mM Tris-HCl (pH 6,8), 25% glycerol, 2% SDS, 0,01%, roztok bromfenolové modři, 5% β -merkptoethanol od Fluka BioChemika (Steinheim, Německo); 2x koncentrovaný vzorkovací pufr - 0,125 M Tris/HCl (pH 6,8), 20% glycerol, 4% SDS, 0,02% bromfenolová modř, 0,2M DTT)

- HCl na úpravu pH pufru, Bio-Safe Coomassie Stain, kyselina octová, methanol
- úprava vzorku pro MS: kyselina trifluoroctová (TFA), kyselina mravenčí (FA), dithiothreitol (DTT), jodacetamid (IAM), octan amonný, hydrogenuhličitan amonný, deionizovaná voda, hydrogencitrát amonný (DAHC)
- odsolování a zahuštění peptidů: acetonitril (ACN), Empore Disk C₁₈ od firmy 3M (St. Paul, USA), POROS Oligo R3 (50 µm částice, reverzní fáze) od firmy PerSeptive Biosystems (Framingham, MA, USA)

7.3 Přístrojová technika

Hmotnostní spektrometrie:

hmotnostní spektrometr MALDI-TOF Microflex LRF20 (Bruker Daltonics, Bremen, SRN), tandemový hmotnostní spektrometr 4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA), MALDI terčik MSP AnchorChip™ 600/96 (Bruker Daltonics, Bremen, SRN), MALDI terčik Opti-TOF™384 Well Insert (Applied Biosystems, USA), vakuová centrifuga Concentrator plus (Eppendorf, Hamburg, SRN)

Odsolování a separace peptidů

programovatelná pumpa na mikrostríkačku (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), mikrostríkačka 50 µl (ILS, SRN), kapiláry (Agilent Technologies, USA) (vnitřní/vnější průměr) 200/360 µm laboratorně naplněné 5 µm částicemi AQ - C₁₈ (Dr. Maisch GmbH, NDR), dávkovací smyčka o objemu 7,85 µl a průměru 150/360 µm, teflonové spojky, injekční jehly, plynový hořák s úzkým plamenem na přípravu kolon (Micro torch), inzulinové stríkačky BD – Micro – Fine Plus o objemu 0,5 ml a rozměrech 0,33 mm x 12,7 mm (Becton, Dickinson and Company, Francie), Combitip (Eppendorf, SRN), GelLoader špičky (Eppendorf, SRN)

Software:

flexAnalysis 2.4, Biotoools 3.0, RapiDeNovo (Bruker Daltonics, Bremen, SRN), Mascot Server 2.2 (Matrix Science, London, UK), 4000 Series Explorer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA), Origin 7.5 (OriginLab, Northampton, MA, USA), Paint Shop Pro 8 (Jasc Software, USA), Data Explorer™ Software (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA), mMass (Institut chemické technologie v Praze, Česká republika), GlycoWorkbench (Ceroni *et al.*, 2008)

Další použité přístroje a pomůcky:

souprava pro gelovou elektroforézu Protean Mini (Bio-Rad, USA), zdroj pro elektroforézu BioRad PowerPac Universal (Bi-Rad, USA), vortex mixer (Stuart, UK); váhy (Sartorius,

SRN); pH metr (Multical WTW, SRN); magnetická míchačka (IKA, SRN); termostat Grant (UK); mrazicí box; lyofilizátor; sonifikátor; mikropipety 10 a 25 µl (Halmilton, USA); pipety 5000, 1000, 200, 20, 10 a 2,5 µl (Eppendorf, SRN)

7.4 Metody

7.4.1 SDS-PAGE

Separace podjednotek proteinů byly provedeny metodou 1-D SDS-PAGE s použitím 10 % T dělicího a 4 % T zaostřovacího (2,6 % C) gelu na soupravě Mini protean cell firmy Bio-Rad (USA; Laemmli, 1970). Vzorky proteinů byly smíchány s připraveným redukčním vzorkovacím pufrem (62,5mM Tris-HCl o pH 6,8, 25% glycerol, 2% SDS, 0,01%, roztok bromfenolové modři, 5% β-merkapt ethanol) nebo 2x koncentrovaným redukčním vzorkovacím pufrem (0,125 M Tris/HCl o pH 6,8, 20% glycerol, 4% SDS, 0,02% bromofenolová modř, 0,2M DTT) v poměru 1:1. Výsledné roztoky byly zahřívány při 95°C po dobu 5 minut a poté ochlazeny tekoucí vodou. Aparatura pro SDS-PAGE byla sestavena ze soupravy Protean Mini (Bio-Rad, USA). Spodní (10 % T dělicí - „running“) a horní (4 % T zaostřovací - „stacking“, 2,6 % C) gely byly připraveny podle tabulky 4.

Tab. 4. Složení gelu (množství na 2 skla, varianta minigel v aparatuře Mini Protean)

^a30% Akrylamid/0,8% *N,N'*-metylenbisakrylamid, ^bdodecylsírán sodný,

^c*N,N,N',N'*-tetramethylendiamin, ^dperoxodisírán amonný

Spodní (separační gel)		Horní (zaostřovací gel)	
AA/BIS ^a	3,4 mL	AA/BIS	0,65 mL
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 mL	0,5M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 mL
Destilovaná voda	3,8 mL	Destilovaná voda	2,95 mL
10% SDS ^b	0,100 mL	10% SDS	0,100 mL
10% TEMED ^c	0,015 mL	10% TEMED	0,015 mL
10% APS ^d	0,050 mL	10% APS	0,060 mL

Po umístění skel s připravenými polyakrylamidovými gely do elektroforetické cely byl na její dno a do prostoru mezi skla s gelem a plastovou náhradu až po okraj nalit elektrodový pufr (0,025M Tris/HCl, 0,192M glycin, 0,1% SDS - pH 8,3). Vzorky byly dávkovány tak, aby v každé jamce bylo cca 3 µg proteinu. Cela byla připojena ke zdroji konstantního napětí (120 V) a po uplynutí cca 1,5 hodiny byla elektroforéza zastavena. Gely byly vyjmuty ze skel a pro jejich vizualizaci vloženy do barvicího roztoku o složení 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) methanol, 10% (v/v) ledová kyselina octová a ponechány k barvení přes noc. Obarvené gely byly poté odbarveny v odbarvovacím roztoku obsahujícího 7% (v/v) kyselinu octovou a 5% (v/v) methanol. Pokud byla prováděna

alkylace proteinů před elektroforézou, ke zredukovaným vzorkům byl cca 20 min před zahájením elektroforézy přidán alkylační roztok. Alkylace probíhala 30 min při laboratorní teplotě ve tmě. V případě vzorkovacího pufru obsahujícího 5% β -merkaptoethanol byl přidán jodacetamid tak, aby finální poměr koncentrací β -merkaptoethanolu a IAM byl 1:1,5 a v případě vzorkovacího pufru obsahujícího 0,2M DTT byl přidán jodacetamid tak, aby finální poměr DTT a IAM byl 1:3.

7.4.2 Štěpení proteinů v gelu, redukce a alkylace

Jednotlivé obarvené pásy gelu odpovídající proteinům byly vyříznuty skalpelem a přeneseny do čistých plastových zkumavek. Tyto proužky byly dále rozděleny na cca 4-5 menších dílků. Následovalo odbarvení kousků gelu odbarvovacím roztokem o složení 100mM NH_4HCO_3 a ACN v poměru 1:1. Pro úspěšné odbarvení bylo zapotřebí alespoň dvakrát vyměnit odbarvovací roztok. Odbarvené kousky gelu byly umyty destilovanou vodou (15 min) a sušeny v ACN dokud se nestaly bílé. ACN byl odstraněn a k vysušeným gelovým kouskům bylo přidáno 40 μl 10mM DTT v 0,1M NH_4HCO_3 . Redukce probíhala 30 min při 56 °C. Po odstranění redukčního roztoku byly kousky gelů opět vysušeny ACN a následovala alkylace ve 40 μl 55mM IAM v 0,1M NH_4HCO_3 po dobu 20 min při laboratorní teplotě ve tmě. V následujících krocích byl odstraněn alkylační roztok, kostičky gelu byly řádně opláchnuty ve 200 μl 0,1M NH_4HCO_3 a vysušeny ve 150 μl ACN. Zásobní roztok trypsinu o koncentraci 2 μM byl připraven ředěním v 50mM NH_4HCO_3 . Do vzorků bylo přidáno 50 μl zásobního roztoku trypsinu a v tomto roztoku byly inkubovány 1 hodinu v ledničce. Zbytek roztoku, který nebyl nasát kousky gelů, byl odstraněn a bylo přidáno 40 μl 25mM NH_4HCO_3 . Vzorky ponořené ve štěpicím gelu byly inkubovány 24 hodin při 37°C.

7.4.3 Příprava laboratorně plněných kolon

K inzulinové stříkačce BD – Micro – Fine Plus o objemu 0,5 ml s rozměry 0,33 mm x 12,7 mm s upilovanou jehlou byla přes teflonovou spojku na kapiláry připojena asi 30 cm kolona s průměrem (vnitřní/vnější) 200/360 μm od firmy Agilent Technologies. Fáze, kterou se měla plnit kolona, byla rozsuspendována v methanolu a nechala se usadit na dně plastové zkumavky. Usazená fáze byla přidána do další plastové zkumavky s methanolem v poměru 1:1. Plnění kolony probíhalo tak, že se volný konec kolony vložil do plastové zkumavky s připravenou fází a její nasávání pomocí napojené inzulinové stříkačky probíhalo za současného sonifikování fáze, aby se neusazovala na dně zkumavky. Tímto způsobem bylo do kolony nasáto asi 5 μl fáze, která se usazovala v místě připojení kolony a injekční jehly. Poté byla kolona naaranžována tak, aby visela ve svislé poloze nad stolem. Na její spodní volný konec bylo zavěšeno 100 g závaží. Následovně byla kolona pár centimetrů nad

závažím přetavena plynovým hořákem s úzkým plamenem. Působením gravitační síly závaží se v místě tavení kolony vytáhla špička vhodná pro nano sprej. Pomocí inzulinové stříkačky byla fáze stlačena do nano špičky. Tímto způsobem byl vytvořen sloupec usazené obrácené fáze o délce 35 mm. Nakonec se připravená kolona uřízla tak, aby měla asi 10 cm.

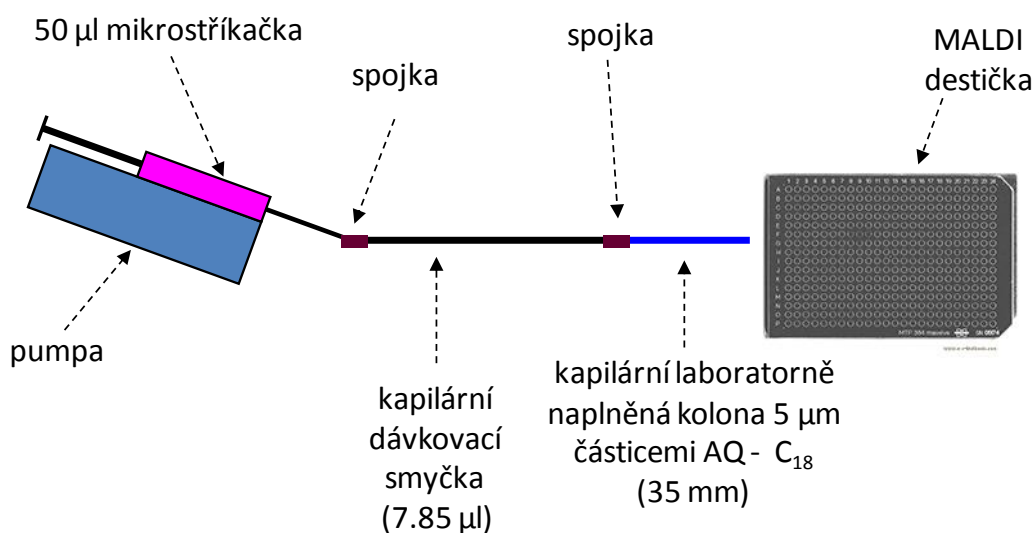
7.4.4 Odsolení, zahuštění a separace peptidů

Po štěpení v gelu byly vzorky odsoleny a zahuštěny přes špičky GelLoader, do nichž byla aplikována reverzní fáze (Rappsilber *et al.*, 2007) Příprava špičky probíhala následujícím způsobem: pomocí ztupené injekční jehly byl z Empore Disku C₁₈ vykrojen malý kousek, který zůstal v jehle. Následně se jehla napojená na injekční stříkačku vložila z vrchu GelLoaderu co nejvíce do jeho nitra a prudkým stlačením pístu stříkačky byl vykrojený kousek Empore Disku vypuzen vzduchem do špičky GelLoaderu. Do takto připravené špičky bylo poté přidáno 10 µl 60% ACN v 0,1% TFA z vrchu GelLoaderu tak, aby se tento roztok přichytil asi 0,5 cm pod vrchním ústím GelLoaderu. Do roztoku zachyceného na stěně GelLoaderu se přidalo 0,5 µl suspenze POROS Oligo R3 částic v ACN a pomocí Combitipu se stlačením vzduchu z vrchu Gelloaderu protlačila fáze až do místa, kde byl zachycen Empore Disk. Částice vytvořily sloupec a tím byla špička pro odsolení vzorku připravena k použití. Samotné odsolení a zahuštění probíhalo následovně: fáze v GelLoaderu byla zvlhčena 10 µl 60% roztoku ACN v 0,1% TFA. Protlačení roztoku se provádělo na základě stejného principu jako aplikace obrácené fáze pomocí Combitipu. Poté byla provedena ekvilibrace protlačením 10 µl 0,1% TFA. Protlačení všech 40 µl vzorku z jedné jamky GelLoaderem byly zachyceny peptidy vzniklé štěpením v gelu (viz štěpení proteinů v gelu). Ke zbytku peptidů uvězněných v gelu bylo přidáno 40 µl 1% TFA a zkumavka byla umístěna na 10 min do sonifikátoru. Extrahovaný vzorek byl protlačen GelLoaderem a peptidy zachycené na sorbentu byly propláchnuty 10 µl 2% ACN v 0,1% TFA a eluovány 10 µl 60% ACN v 0,1% TFA.

Další varianta odsolení vzorku byla prováděna přímo na MALDI terčiku - „on target washing“ (Vorm *et al.*, 1994). Vzorek ve štěpicím pufru byl nanesen na MALDI terčik metodou zaschlé kapky a nechán uschout při laboratorní teplotě. Zaschlý vzorek byl poté překápnut 0,5 µl 1%TFA a kapalina byla odsáta jednorázovým papírovým ubrouskem. Tento způsob odsolení vzorku přímo na MALDI terčiku byl proveden ve třech opakováních.

Separace odsoleného a zahuštěného vzorku, ze kterého byl odpařen ACN (v případě asialofetuinu nebyla procedura odsolování na obrácené fázi prováděna), byla provedena pomocí mikrostríkačky o objemu 50 µl v mikrogradientu ACN v 0,1% TFA s použitím laboratorně naplněné kolony o délce 3,5 mm a průměru (vnitřní/vnější) 200/360 µm 5µm částicemi AQ - C₁₈ (Moravcová *et al.*, 2009). Na mikrostríkačku se ztupenou jehlou byla připojena přes teflonovou spojku dávkovací smyčka o objemu 7,85 µl a průměru 150/360

μm . Poté bylo přes dávkovací smyčku nasáto do mikrostříkačky 10 μl 60%ACN v 0,1%TFA. Takto naplněná mikrostříkačka byla umístěna do programovatelné pumpy (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). V dalším kroku byla na dávkovací smyčku připojena přes spojku již připravená kolona (obr. 12). Nastavení pumpy bylo následující: objem 10 μl ; průměr mikrostříkačky 1,03 mm; rychlost průtoku 0,5 $\mu\text{l min}^{-1}$. Po ukončení promytí kolony byla stejným způsobem provedena ekvilibrace 10 μl 2%ACN v 0,1%TFA. Vlastní separace vzorku byla provedena v gradientu ACN v 0,1% TFA. Gradient ACN byl v 50 μl mikrostříkačce vytvořen následujícím způsobem: postupně bylo nataženo do mikrostříkačky s napojenou dávkovací smyčkou 12 μl 60% ACN v 0,1% TFA, 4 μl 35% ACN v 0,1% TFA, 4 μl 20% ACN v 0,1% TFA, 9 μl 2% ACN v 0,1% TFA, 5 μl vzorku a 1 μl 2% ACN v 0,1% TFA. Takto naplněná mikrostříkačka byla umístěna do programovatelné pumpy. Nastavení pumpy bylo následující: objem 35 μl , průměr mikrostříkačky 1,03 mm, rychlost průtoku 0,5 $\mu\text{l min}^{-1}$. Vytékající eluent byl manuálně kapán přímo z kolony na MALDI destičku, na které již byla zaschlá CHCA matrice, přičemž prvních 7 μl bylo odkapáno do odpadu. Separace byla ukončena po protečení celého eluentu kolonou (70 min).



Obr. 12

Nákres aparatury pro separaci peptidů pomocí mikrostříkačky v mikrogradientu ACN v 0,1% TFA na 35 mm koloně laboratorně naplněné obrácenou fází 5 μm částicemi AQ - C₁₈.

7.4.5 Štěpení proteinů v roztoku

Ze zásobního roztoku proteinu (pouze asialofetuin) rozpuštěného v deionizované vodě o koncentraci 10 mg ml⁻¹ byl odebrán alikvot 40 μl , do kterého bylo přidáno 200 μl 50 mM NH₄HCO₃. Tento roztok byl smíchán s 20 μl 100 mM DTT a celá směs byla inkubována 45 min při 56 °C. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 25 μl 400mM jodacetamidu a roztok se nechal za temna 30 min stát. Alkylační reakce byla ukončena

přidáním 25 μl 200 mM DTT a směs byla poté 15 min inkubována při laboratorní teplotě. Do roztoku alkylovaného proteinu bylo přidáno 100 μl roztoku trypsinu v 50mM NH_4HCO_3 o koncentraci 200 ng μl^{-1} (poměr trypsin/protein 1:20) a vzniklá směs se nechala inkubovat přes noc při 37 °C. Pro měření na hmotnostním spektrometru byl vzorek 20 krát zředěn.

7.4.6 Štěpení tryptických peptidů v roztoku PSE

Pokud byla použita varianta štěpení vzorku IgA kombinací štěpících enzymů trypsinu a PSE (Sebela *et al.*, 2009), z 10 μl odsolených zahuštěných alkylovaných tryptických peptidů IgA v 60% ACN a 0,1% TFA byl odebrán alikvot 5 μl a ten byl smíchán se 14 μl 100mM DAHC. Do vzniklého roztoku byl přidán 1 μl PSE o koncentraci 5 mg ml^{-1} a směs se nechala inkubovat přes noc při 37 °C. Stejným způsobem byl připraven vzorek peptidů vzniklých tryptickým štěpením asialofetuinu (viz předchozí odstavec), který však nebyl odsolen a zahuštěn, ale 5 μl alikvot byl odebrán přímo z 20 krát zředěného zásobního zředěného roztoku tryptických peptidů.

7.4.7 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Odsolené a zahuštěné peptidy byly analyzovány na hmotnostním spektrometru. MALDI-TOF MS bylo prováděno na přístroji Microflex LRF20 (Bruker Daltonics) vybaveném iontovým zdrojem microScout a dusíkovým laserem o vlnové délce 337 nm. Na MALDI terčik MSP AnchorChipTM 600/96 - Bruker Daltonics (Vorm *et al.*, 1994) bylo nanášeno 0,6 μl vzorku a 0,6 μl matrice (5 mg ml^{-1} α -kyano-4-hydroxyskořicové v ACN/0,1% TFA, 1:1, v/v nebo 10 mg ml^{-1} ferulové kyseliny v ACN/0,1% TFA, 7:3, v/v) metodou zaschlé kapky - „dried droplet“ (Thomas *et al.*, 2004). Hmotnostní spektra byla naměřena v refletronovém nebo lineárním modu (pouze CKO) pro pozitivně nabitě ionty na přístroji Microflex LRF20 s takto nastavenými parametry: akcelerační napětí 19,0 kV; extrakční napětí 16,3 kV; napětí na iontové optice 9,4 kV; refletronové napětí 20 kV; zpožděná pulzní extrakce 300 ns. Zařízení bylo externě nakalibrováno směsí peptidových standardů (Bruker Daltonics). Získaná spektra byla zpracována softwary flexAnalysis 2.4 a Biotools 3.0 (Bruker Daltonics).

7.4.8 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Měření metodou MALDI-TOF/TOF byla provedena v pozitivním refletronovém modu na přístroji ABI 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). Přístroj byl vybaven Nd: YAG laserem (355 nm) s délkou impulzů 3–7 ns a frekvencí 200-Hz. Spektra MS a MS/MS byla získána použitím dvojstupňového refletronového zrcadla. Akcelerační napětí aplikované při MS a MS/MS analýzách bylo nastaveno na 20 kV respektive 8 kV. V modu MS/MS byla použita kolizní energie 1 kV. Pro měření s peptidy

byla použita matrice CHCA (5 mg ml^{-1}) rozpuštěná v roztoku acetonitrilu/0,1% TFA (3:2, v/v) nebo sinapová kyselina (10 mg ml^{-1}) a přístroj byl externě nakalibrován šesti peptidy jako standardy. Odsolené a zahuštěné peptidy získané štěpením proteinů trypsinem v gelu popřípadě v kombinaci s PSE v roztoku byly nanášeny na MALDI terčík, smíchány s matricí a vzorky se nechaly uschnout za laboratorních podmínek způsobem popsaným dříve. MS a MS/MS data byla dále zpracována použitím softwaru 4000 Series Explorer 3.5.3 (Applied Biosystems).

Pokud byly peptidy separovány pomocí mikrostříkačky v mikrogradientu ACN v 0,1% s použitím monolitické kolony (Moravcova *et al.*, 2009) nebo laboratorně naplněné kolony $5 \mu\text{m}$ částicemi, nanášení vzorku probíhalo následovně. Na MALDI terčík byla nanášena matrice CHCA (5 mg ml^{-1}) rozpuštěná v roztoku acetonitrilu/0,1% TFA (3:2, v/v) a nechala se zaschnout při laboratorní teplotě. Vzorek byl manuálně nanášen na pozici s matricí v průběhu separace přímo z kolony. Po ukončení separace byly tyto pozice překapány roztokem acetonitrilu/0,1% TFA (3:2, v/v) a po uschnutí při laboratorní teplotě byl vzorek odeslán k analýze na hmotnostním spektrometru.

Seznam použité literatury

- Aikawa J., Grobe K., Tsujimoto M., Esko J. D. (2001) Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/GlcN N-sulfotransferase. Structure and activity of the fourth member, NDST4. *J. Biol. Chem.* **276**, 5876-5882.
- Allen A. C. (1999) Methodological approaches to the analysis of IgA1 O-glycosylation in IgA nephropathy. *J. Nephrol.* **12**, 76-84.
- An H. J., Peavy T. R., Hedrick J. L., Lebrilla C. B. (2003) Determination of N-glycosylation sites and site heterogeneity in glycoproteins. *Anal. Chem.* **75**, 5628-5637.
- Apweiler R., Hermjakob H., Sharon N. (1999) On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 4-8
- Arnold J. N., Wormald M. R., Sim R. B., Rudd P. M., Dwek R. A. (2007) The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 21-50.
- Baenziger J., Kornfeld S. (1974) Structure of the carbohydrate units of IgA1 immunoglobulin II. Structure of the O-glycosidically linked oligosaccharide units. *J. Biol. Chem.* **249**, 7270-7281.
- Barratt J., Smith A. C., Feehally J. (2007) The pathogenic role of IgA1 O-linked glycosylation in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Nephrology (Carlton)* **12**, 275-284.
- Benz I., Schmidt M. A. (2002) Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **2**, 267-276
- Berger J. (1988) Recurrence of IgA nephropathy in renal allografts. *Am. J. Kidney Dis.* **12**, 371-372.
- Berger J., Hinglais N. (1968) [Intercapillary deposits of IgA-IgG]. *J. Urol. Nephrol. (Paris)* **74**, 694-695.
- Bilyeu K. D., Cole J. L., Laskey J. G., Riekhof W. R., Esparza T. J., Kramer M. D., Morris R. O. (2001) Molecular and Biochemical Characterization of a Cytokinin Oxidase from Maize. *Plant Physiol.* **125**, 378-386.
- Bishop J. R., Schuksz M., Esko J. D. (2007) Heparan sulphate proteoglycans finetune mammalian physiology. *Nature* **446**, 1030-1037.
- Brockhausen I. (2006) Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep.* **7**, 599-604.
- Brown W. M., Dziegielewska K. M., Saunders N. R., Christie D. L., Nawratil P., Müller-Esterl W. (1992) The nucleotide and deduced amino acid structures of sheep and pig fetuin. Common structural features of the mammalian fetuin family. *Eur. J. Biochem.* **205**, 321-331. (b)
- Brown W. M., Saunders N. R., Møllgård K., Dziegielewska K. M. (1992) Fetuin-an old friend revisited. *Bioessays.* **14**, 749-755. (a)
- Buck K. S., Smith A. C., Molyneux K., El-Barbary H., Feehally J., Barratt J. (2008) B-cell O-galactosyltransferase activity, and expression of O-glycosylation genes in bone marrow in IgA nephropathy. *Kidney Int.* **73**, 1128-1136.
- Burda P., Aebi M. (1998) The ALG10 locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the alpha-1,2 glucosyltransferase of the endoplasmic reticulum: the terminal glucose of the lipid-linked oligosaccharide is required for efficient N-linked glycosylation. *Glycobiology.* **8**, 455-462.

- Cancilla M. T., Penn S. G., Carroll J. A., Lebrilla C. B. (1996) Coordination of Alkali Metals to Oligosaccharides Dictates Fragmentation Behavior in Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Fourier Transform Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 736-6745.
- Capila I., Linhardt R. J. (2002) Heparin-protein interactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**, 391-412.
- Caterson B., Flannery C. R., Hughes C. E., Little C. B. (2000) Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol.* **19**, 333-344.
- Ciucanu I., Costello C. E. (2003) Elimination of oxidative degradation during the per-O-methylation of carbohydrates. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 16213-16219.
- Ceroni A., Maass K., Geyer H., Geyer R., Dell A., Haslam S. M. (2008) GlycoWorkbench: A Tool for the Computer-Assisted Annotation of Mass Spectra of Glycans. *J. of Proteome Res.* **7**, 1650-1659.
- Ciucanu I., Kerek F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **131**, 209-217.
- Cohen P. (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation-a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 596-601.
- Collins B. E., Paulson J. C. (2004) Cell surface biology mediated by low affinity multivalent protein-glycan interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 617-625.
- Conley M. E., Cooper M. D., Michael A. F. (1980) Selective deposition of immunoglobulin A1 in immunoglobulin A nephropathy, anaphylactoid purpura nephritis, and systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **66**, 1432-1436.
- Coombe D. R., Kett W. C. (2005) Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 410-424.
- D'Amico G. (1987) The commonest glomerulonephritis in the world: IgA nephropathy. *Q. J. Med.* **64**, 709-727.
- D'Amico G. (2000) Natural history of idiopathic IgA nephropathy: role of clinical and histological prognostic factors. *Am. J. Kidney Dis.* **36**, 227-237.
- Dell A. (1987) F. A. B. - mass spectrometry of carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **45**, 19-72.
- Dennis J. W., Granovsky M., Warren C. E. (1999) Protein glycosylation in development and disease. *BioEssays* **21**, 412-421.
- Domon B., Costello C. E. (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J.* **5**, 397-409.
- Ellgaard L., Helenius A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 181-191.
- Faid V., Chirat F., Seta N., Foulquier F., Morelle W. (2007) A rapid mass spectrometric strategy for the characterization of N- and O-glycan chains in the diagnosis of defects in glycan biosynthesis. *Proteomics* **7**, 1800-1813.
- Field M. C., Dwek R. A., Edge C. J., Rademacher T. W. (1989) O-linked oligosaccharides from human serum immunoglobulin A1. *Biochem. Soc. Trans.* **17**, 1034-1035.
- Frangione B., Wolfenstein-Todel C. (1972) Partial duplication in the "hinge" region of IgA1 myeloma proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 3673-3676.

- Freeze H. H. (2006) Genetic defects in the human glycome. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 537-551.
- Freeze H. H., Aebi M. (2005) Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 490-498.
- Funderburgh J. L. (2000) Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* **10**, 951-958.
- Gavel Y., von Heijne G. (1990) Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng.* **3**, 433-442.
- Glasscock R. J. (2008) IgA nephropathy: challenges and opportunities. *Cleve. Clin. J. Med.* **75**, 569-576.
- Hagglund P., Bunkenborg J., Elortza F., Jensen O. N., Roepstorff P. (2004) A new strategy for identification of N-glycosylated proteins and unambiguous assignment of their glycosylation sites using HILIC enrichment and partial deglycosylation. *J. Proteome Res.* **3**, 556-566.
- Håkansson K., Cooper H., Hudgins R., Nilsson C. (2003) High resolution tandem mass spectrometry for structural biochemistry. *Curr. Org. Chem.* **7**, 1503-1525.
- Håkansson K., Emmett M. R., Marshall A. G., Davidsson P., Nilsson C. L. (2003) Structural analysis of 2D-gel-separated glycoproteins from human cerebrospinal fluid by tandem high-resolution mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **2**, 581-588.
- Hale J. E., Gelfanova V., Ludwig J. R., Knierman M. D. (2003) Application of proteomics for discovery of protein biomarkers. *Brief. Funct. Genomic Proteomic* **2**, 185-193.
- Hare P. D., van Staden J. (1994) Cytokinin oxidase: Biochemical features and physiological significance. *Physiol. Plant.* **91**, 128-136.
- Hart G. W. (1992) Glycosylation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 1017-1023.
- Harvey D. J., Bateman R. H., Green M. R. (1997) High-energy collision-induced fragmentation of complex oligosaccharides ionized by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **32**, 167-187.
- Harvey D. J., Naven T. J., Küster B., Bateman R. H., Green M. R., Critchley G. (1995) Comparison of fragmentation modes for the structural determination of complex oligosaccharides ionized by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **9**, 1556-1561.
- Haubitz M., Wittke S., Weissinger E. M., Walden M., Rupprecht H. D., Floege J., Haller H., Mischak H. (2005) Urine protein patterns can serve as diagnostic tools in patients with IgA nephropathy. *Kidney Int.* **67**, 2313-2320.
- Helenius A., Aebi M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369.
- Helenius A., Aebi M. (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 1019-1049.
- Helenius J., Ng D. T. W., Marolda C. L., Walter P., Valvano M. A., Aebi M. (2002) Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* **415**, 447-450.
- Hellerqvist C. G. (1990) Linkage analysis using Lindberg method. *Meth. Enzymol.* **193**, 554-573.

Herget S., Ranziger R., Thomson R., Frank M., von der Lieth C. W. (2009), v knize *Bioinformatics for Glycobiology and Glycomics* (von der Lieth C. W., Lütteke T., Frank M. ed.), pp. 23-45, John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, UK

Herrmann M., von der Lieth C. W., Stehling P., Reutter W., Pawlita M. (1997) Consequences of a subtle sialic acid modification on the murine polyomavirus receptor. *J. Virol.* **71**, 5922-5931.

Hiki Y., Odani H., Takahashi M., Yasuda Y., Nishimoto A., Iwase H., Shinzato T., Kobayashi Y., Maeda K. (2001) Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy. *Kidney Int.* **59**, 1077-1085.

Chalabi S., Panico M., Sutton-Smith M., Haslam S. M., Patankar M. S., Lattanzio F. A., Morris H. R., Clark G. F., Dell A. (2006) Differential O-glycosylation of a conserved domain expressed in murine and human ZP3. *Biochemistry* **45**, 637-647.

Chambers G., Lawrie L., Cash P., Murray G. I. (2000) Proteomics: a new approach to the study of disease. *J. Pathol.* **192**, 280-288.

Imperiali B., Hendrickson T. L. (1995) Asparagine-linked glycosylation: specificity and function of oligosaccharyl transferase. *Bioorg. Med. Chem.* **3**, 1565-1578.

Ireland B. S., Niggemann M., Williams D. B. (2006) In vitro assays of the functions of calnexin and calreticulin, lectin chaperones of the endoplasmic reticulum. *Methods Mol. Biol.* **347**, 331-342.

Jacob G. S., Scudder P. (1994) Glycosidases in structural analysis. *Meth. Enzymol.* **230**, 280-299.

James, P., (1997). 'Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics'. *Q. Rev. Biophys.* **30**, 279-331.

Julian B. A., Waldo F. B., Rifai A., Mestecky J. (1988) IgA nephropathy, the most common glomerulonephritis worldwide. A neglected disease in the United States? *Am. J. Med.* **84**, 129-132.

Kaji H., Saito H., Yamauchi Y., Shinkawa T., Taoka M., Hirabayashi J., Kasai K., Takahashi N., Isobe T. (2003) Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins. *Nat. Biotechnol.* **21**, 667-672.

Kanehisa M., Goto S., Hattori M., Aoki-Kinoshita K. F., Itoh M., Kawashima S., Katayama T., Araki M., Hirakawa M. (2006) From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res.* **34** (Database issue), D354-357.

Kanehisa M., Goto S., Kawashima S., Okuno Y., Hattori M. (2004) The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res.* **32** (Database issue), D277-280.

Kang P., Mechref Y., Klouckova I., Novotny M. V. (2005) Solid-phase permethylation of glycans for mass spectrometric analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **19**, 3421-3428.

Kaplan H. A., Welply J. K., Lennarz W. J. (1987) Oligosaccharyl transferase: the central enzyme in the pathway of glycoprotein assembly. *Biochim. Biophys. Acta.* **906**, 161-173.

Karlsson N. G., Karlsson H., Hansson G. C. (1996) Sulphated mucin oligosaccharides from porcine small intestine analysed by four-sector tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* **31**, 560-572.

Karlsson N. G., Packer N. H. (2009), v knize *Bioinformatics for Glycobiology and Glycomics* (von der Lieth C. W., Lütteke T., Frank M. ed.), pp. 223-252, John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, UK

Kawano S., Hashimoto K., Miyama T., Goto S., Kanehisa M. (2005) Prediction of glycan structures from gene expression data based on glycosyltransferase reactions. *Bioinformatics* **21**, 3976-3982.

- Kerr M. A. (1990) The structure and function of human IgA. *Biochem J.* **271**, 285-296.
- Kingsmore S. F., Patel D. D. (2003) Multiplexed protein profiling on antibody-based microarrays by rolling circle amplification. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 74-81.
- Kopečný D., Pethe C., Sebela M., Houba-Herín N., Madzak C., Majira A., Laloue M. (2005) High-level expression and characterization of *Zea mays* cytokinin oxidase/dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*. *Biochimie* **87**, 1011-1022.
- Kornfeld R., Kornfeld S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai E. (2001) Application of SNP technologies in medicine: lessons learned and future challenges. *Genome Res.* **11**, 927-929.
- Larsen M. R., Højrup P., Roepstorff P. (2005) Characterization of gel-separated glycoproteins using two-step proteolytic digestion combined with sequential microcolumns and mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* **4**, 107-119.
- Lisowska E. (2002) The role of glycosylation in protein antigenic properties. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 445-455
- Liu J., Pedersen L. C. (2007) Anticoagulant heparan sulfate: structural specificity and biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 263-272.
- Lowe J. B., Marth J. D. (2003) A genetic approach to Mammalian glycan function. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 643-691.
- Luo G., Marginean I., Vertes A. (2002) Internal energy of ions generated by matrix-assisted laser desorption/ionization. *Anal. Chem.* **74**, 6185-6190.
- Mann M., Jensen O. N. (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* **21**, 255-261.
- Marek K. W., Vijay I. K., Marth J. D. (1999) A recessive deletion in the GlcNAc-1-phosphotransferase gene results in peri-implantation embryonic lethality. *Glycobiology* **9**, 1263-1271.
- Marshall R. (1972) Glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* **41**, 673-702.
- Mattu T. S., Pleass R. J., Willis A. C., Kilian M., Wormald M. R., Lellouch A. C., Rudd P. M., Woof J. M., Dwek R. A. (1998) The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc alpha receptor interactions. *J. Biol. Chem.* **273**, 2260-2272.
- Maureen E. T. & Drickamer K., (2003) *Introduction to Glycobiology*, pp.58-78, Oxford University Press, NY, USA (a)
- Maureen E. T. & Drickamer K., (2003) *Introduction to Glycobiology*, pp.48-57, Oxford University Press, NY, USA (b)
- McDonald W. H., Yates J. R. (2002) Shotgun proteomics and biomarker discovery. *Dis. Markers* **18**, 99-105.
- Mestecky J. (1988) Immunobiology of IgA. *Am. J. Kidney Dis.* **12**, 378-383.

- Mestecky J., Tomana M., Crowley-Nowick P. A., Moldoveanu Z., Julian B. A., Jackson S. (1993) Defective galactosylation and clearance of IgA1 molecules as a possible etiopathogenic factor in IgA nephropathy. *Contrib. Nephrol.* **104**, 172-182.
- Medzihradzky K. F., Gillece-Castro B. L., Hardy M. R., Townsend R. R., Burlingame A. L. (1996). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **7**, 319-328.
- Moldoveanu Z., Wyatt R. J., Lee J. Y., Tomana M., Julian B. A., Mestecky J., Huang W. Q., Anreddy S. R., Hall S., Hastings M. C., Lau K. K., Cook W. J., Novak J. (2007) Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels. *Kidney Int.* **71**, 1148-1154.
- Moravcova D., Kahle V., Rehulková H., Chmelik J., Rehulka P. (2009) Short monolithic columns for purification and fractionation of peptide samples for matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry analysis in proteomics
J. Chromatogr. A, **1216**, 3629-3636.
- Morelle W., Flahaut C., Michalski J., Louvet A., Mathurin P., Klein A. (2006) Mass spectrometric approach for screening modifications of total serum N-glycome in human diseases: application to cirrhosis. *Glycobiology* **16**, 281-293.
- Morelle W., Michalski J. (2007) Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2**, 1585-1602.
- Morelle W., Michalski J. C. (2005) The mass spectrometric analysis of glycoproteins and their glycan structures. *Curr. Anal. Chem.* **1**, 27-55.
- Mostov K. E. (1994) Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 63-84.
- Naven T. J., Harvey D. J., Brown J., Critchley G. (1997) Fragmentation of complex carbohydrates following ionization by matrix-assisted laser desorption with an instrument fitted with time-lag focusing. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1681-1686.
- Ngoka L. C., Gal J. F., Lebrilla C. B. (1994) Effects of cations and charge types on the metastable decay rates of oligosaccharides. *Anal. Chem.* **66**, 692-698.
- Nie Z. (1992) Fetuin: its enigmatic property of growth promotion. *Am. J. Physiol.* **263**, C551-562.
- Nilsson C. L., Davidsson P. (2000) New separation tools for comprehensive studies of protein expression by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **19**, 390-397.
- Niñonuevo M., An H., Yin H., Killeen K., Grimm R., Ward R., German B., Lebrilla C. (2005) Nanoliquid chromatography-mass spectrometry of oligosaccharides employing graphitized carbon chromatography on microchip with a high-accuracy mass analyzer. *Electrophoresis.* **26**, 3641-3649.
- Novak J., Julian B. A., Tomana M., Mestecky J. (2008) IgA glycosylation and IgA immune complexes in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin. Nephrol.* **28**, 78-87.
- Novak J., Moldoveanu Z., Renfrow M. B., Yanagihara T., Suzuki H., Raska M., Hall S., Brown R., Huang W. Q., Goepfert A., Kilian M., Poulsen K., Tomana M., Wyatt R. J., Julian B. A., Mestecky J. (2007) IgA nephropathy and Henoch-Schoenlein purpura nephritis: aberrant glycosylation of IgA1, formation of IgA1-containing immune complexes, and activation of mesangial cells. *Contrib. Nephrol.* **157**, 134-138.
- Novak J., Tomana M., Kilian M., Coward L., Kulhavy R., Barnes S., Mestecky J. (2000) Heterogeneity of O-glycosylation in the hinge region of human IgA1. *Mol. Immunol.* **37**, 1047-1056.

- Novak J., Tomana M., Matousovic K., Brown R., Hall S., Novak L., Julian B. A., Wyatt R. J., Mestecky J. (2005) IgA1-containing immune complexes in IgA nephropathy differentially affect proliferation of mesangial cells. *Kidney Int.* **67**, 504-513.
- Ochieng J., Chaudhuri G. (2010) Cystatin superfamily. *J. Health Care Poor Underserved* **21**(1 Suppl.), 51-70.
- Ozdian T. (2009) Analýza glykoproteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. (diplomová práce, pp. 48)
- Pačes V., Werstiuk E., Hall R. H. (1971) Conversion of N⁶-(Δ²-Isopentenyl)adenosine to Adenosine by Enzymen Activity in Tobacco Tissue. *Plant. Physiol.* **48**, 775-778.
- Parodi A. J. (2000) Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 69-93.
- Peluso P., Wilson D. S., Do D., Tran H., Venkatasubbaiah M., Quincy D., Heidecker B., Poindexter K., Tolani N., Phelan M., Witte K., Jung L. S., Wagner P., Nock S. (2003) Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays. *Anal. Biochem.* **312**, 113-124.
- Pisano A., Jardine D. R., Packer N. H., Farnsworth V., Carson W., Cartier P., Redmond J. W., Williams K. L., Gooley A. A. (1996) v knize *Techniques in glycobiology* (Townsend R. R., Hotchkiss A. T. Jr. ed.), pp. 299-320, Marcel Dekker, New York, USA.
- Powell A. K., Harvey D. J. (1996) Stabilization of sialic acids in N-linked oligosaccharides and gangliosides for analysis by positive ion matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1027-1032.
- Raman R., Sasisekharan V., Sasisekharan R. (2005) Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions. *Chem. Biol.* **12**, 267-277.
- Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* **2**, 1896-1906
- Renfrow M. B., Cooper H. J., Tomana M., Kulhavy R., Hiki Y., Toma K., Emmett M. R., Mestecky J., Marshall A. G., Novak J. (2005) Determination of aberrant O-glycosylation in the IgA1 hinge region by electron capture dissociation fourier transform-ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **280**, 19136-19145.
- Reynolds J. L., Skepper J. N., McNair R., Kasama T., Gupta K., Weissberg P. L., Jahnen-Dechent W., Shanahan C. M. (2005) Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2920-2930.
- Rosati F., Capone A., Giovampaola C. D., Brettoni C., Focarelli R. (2000) Sperm-egg interaction at fertilization: glycans as recognition signals. *Int. J. Dev. Biol.* **44**, 609-618.
- Rudd P. M., Dwek R. A. (1997) Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **32**, 1-100.
- Russell M. W., Mestecky J., Julian B. A., Galla J. H. (1986) IgA-associated renal diseases: antibodies to environmental antigens in sera and deposition of immunoglobulins and antigens in glomeruli. *J. Clin. Immunol.* **6**, 74-86.

- Sebela M., Rehulka P., Kabrt J., Rehulková H., Ozdian T., Raus M., Franc V. Chmelik J. (2009) Identification of N-glycosylation in prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and evaluation of the enzyme for its possible application in proteomics *J. Mass. Spectrom.* **44**, 1587-1595.
- Sebela, M., Stosova, T., Havlis, J., Wielsch, N., Thomas, H., Zdrahal, Z. and Shevchenko, A., (2006) Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* **6**, 2959-2963.
- Seo J., Lee K. (2004) Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 35-44.
- Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J. V., Mann M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856-2860.
- Schafer C., Heiss A., Schwarz A., Westenfeld R., Ketteler M., Floege J., Muller-Esterl W., Schinke T., Jahnen-Dechent W. (2003) The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J. Clin. Invest.* **112**, 357-366.
- Schachter H. (2000) Diseases with deficiencies in asparagine-linked glycosylation, v knize *Molecular and Cellular Glycobiology* (Fukuda M., Hindsgaul O., ed.), pp. 1-61, Oxford University Press, UK.
- Schmutz J., Wheeler J., Grimwood J., Dickson M., Yang J., Caoile C., Bajorek E., Black S., Man Y. C., Denys M., Escobar J, Flowers D., Fotopulos D., Garcia C., Gomez M., Gonzales, E., Haydu L, Lopez F., Ramirez L., Retterer J., Rodriguez A., Rogers S., Salazar A., Tsai M., Myers R., M. (2004) Quality assessment of the human genome sequence. *Nature* **429**, 365-368.
- Schneider T. D., Stephens R. M. (1990) Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6097-6100.
- Sigrist C. J. A., Cerutti L., Hulo N., Gattiker A., Falquet L., Pagni M., Bairoch A., Bucher P. (2002) PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief. Bioinformatics* **3**, 265-274.
- Spengler B., Kirsch D., Kaufmann R., Lemoine J. (1994) Structure analysis of branched oligosaccharides using post-source decay in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **29**, 782-787.
- Spina E., Cozzolino R., Ryan E., Garozzo D. (2000) Sequencing of oligosaccharides by collision-induced dissociation matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **35**, 1042-1048.
- Spiro R. G. (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**, 43R -56R.
- Spiro R. G. (2004) Role of N-linked polymannose oligosaccharides in targeting glycoproteins for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 1025-1041.
- Suzuki H., Moldoveanu Z., Hall S., Brown R., Vu H. L., Novak L., Julian B. A., Tomana M., Wyatt R. J., Edberg J. C., Alarcón G. S., Kimberly R. P., Tomino Y., Mestecky J., Novak J. (2008) IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *J. Clin. Invest.* **118**, 629-639.
- Tajiri M., Yoshida S., Wada Y. (2005) Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment. *Glycobiology* **15**, 1332-1340.

- Takahashi K., Wall S. B., Suzuki H., D. Smith A. D., Hall S., Poulsen K., Kilian M., Mobley J. A., Julian B. A., Mestecky J., Jan Novak J., Matthew B., Renfrow M. B. (2010) Clustered O-Glycans of IgA1: Defining macro- and microheterogeneity by use of electron capture/transfer dissociation. *Mol. Cell. Proteomics* **9**, 2545-2557.
- Tarentino A. L., Plummer T. H. (1994) Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. *Meth. Enzymol.* **230**, 44-57.
- Taylor A. M., Holst O., Thomas-Oates J. (2006) Mass spectrometric profiling of O-linked glycans released directly from glycoproteins in gels using in-gel reductive beta-elimination. *Proteomics* **6**, 2936-2946.
- Terkelsen O. B., Jahnen-Dechent W., Nielsen H., Moos T., Fink E., Nawratil P., Müller-Esterl W., Møllgård K. (1998) Rat fetuin: distribution of protein and mRNA in embryonic and neonatal rat tissues. *Anat. Embryol.* **197**, 125-133.
- Thomas H., Havlis J., Peychl J., Shevchenko A. (2004) Dried-droplet probe preparation on AnchorChipTM targets for navigating the acquisition of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight spectra by fluorescence of matrix/analyte crystals. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 923-930.
- Tomana M., Matousovic K., Julian B. A., Radl J., Konecny K., Mestecky J. (1997) Galactose-deficient IgA1 in sera of IgA nephropathy patients is present in complexes with IgG. *Kidney Int.* **52**, 509-516.
- Tomana M., Novak J., Julian B. A., Matousovic K., Konecny K., Mestecky J. (1999) Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *J. Clin. Invest.* **104**, 73-81.
- Triffitt J. T., Gebauer U., Ashton B. A., Owen M. E., Reynolds J. J. (1976) Origin of plasma alpha2HS-glycoprotein and its accumulation in bone. *Nature* **262**, 226-227.
- Tyers M., Jorgensen P. (2000) Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 54-64.
- van Egmond M., Damen C. A., van Spriel A. B., Vidarsson G., van Garderen E., van de Winkel J. G. (2001) IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol.* **22**, 205-211.
- Varki A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130.
- Varki A., Cummings R., Esko J., Freeze H., Hart G., Marth J. (1999) *Essentials of Glycobiology*, pp. 101-263, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.
- von der Lieth (2009), v knize *Bionformatics for Glycobiology and Glycomics* (von der Lieth C. W., Lütteke T., Frank M. ed.), pp. 3-17, John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, UK
- von der Lieth & Lütteke (2009) v knize *Bionformatics for Glycobiology and Glycomics* (von der Lieth C. W., Lütteke T., Frank M. ed.), pp. 143-159, John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, UK
- Vorm O., Roepstorff P., Mann M. (1994) Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. *Anal. Chem.* **66**, 3281-3287.

- Vorm O., Roepstorff P., Mann M. (1994) Matrix surfaces made by fast evaporation yield improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF. *Anal. Chem.* **66**, 3281-3287.
- Vosseller K., Sakabe K., Wells L., Hart G. W. (2002) Diverse regulation of protein function by O-GlcNAc: a nuclear and cytoplasmic carbohydrate post-translational modification. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 851-857.
- Wada Y., Tajiri M., Yoshida S. (2004) Hydrophilic affinity isolation and MALDI multiple-stage tandem mass spectrometry of glycopeptides for glycoproteomics. *Anal. Chem.* **76**, 6560-6565.
- Wells L., Hart G. W. (2003) O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Lett.* **546**, 154-158.
- Willer T., Valero M. C., Tanner W., Cruces J., Strahl S. (2003) O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 621-630.
- Williams D. B. (2006) Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Sci.* **119**, 615-623.
- Wilson N. L., Schulz B. L., Karlsson N. G., Packer N. H. (2002) Sequential analysis of N- and O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins. *J. Proteome Res.* **1**, 521-529.
- Wilson N., Karlsson N., Packer N. (2006) Enrichment and Analysis of Glycoproteins in the Proteome, v knize *Separation Methods In Proteomics* (Smejkal G., B., Lazarev A., ed.), pp. 345-359, CRC Press, New York, USA
- Wopereis S., Lefeber D. J., Morava E., Wevers R. A. (2006) Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: a review. *Clin. Chem.* **52**, 574-600.
- Xie Y., Liu J., Zhang J., Hedrick J. L., Lebrilla C. B. (2004) Method for the comparative glycomic analyses of O-linked, mucin-type oligosaccharides. *Anal. Chem.* **76**, 5186-5197.
- Yan Q., Lennarz W. J. (1999) Oligosaccharyltransferase: a complex multisubunit enzyme of the endoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 684-689.
- Yet M. G., Chin C. C. Q., Wold F. (1988) The covalent structure of individual N-linked glycopeptides from ovomucoid and asialofetuin. *J. Biol. Chem.* **263**, 111-117.
- Yuan J., Hashii N., Kawasaki N., Itoh S., Kawanishi T., Hayakawa T. (2005) Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1067**, 145-152.
- Zaia J. (2004) Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom. Rev.* **23**, 161-227.
- Zhang H., Li X., Martin D. B., Aebersold R. (2003) Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **21**, 660-666.

Seznam použitých zkratek

ACR	akrylamid
AHSG	Alfa-2-HS glykoprotein
ALG	enzymy spojené s glykosylací asparaginu („asparagin-linked glycosylation“)
CDG	vrozené vady glykosylace („congenital disorders of glycosylation“)
CFG	Konzorcium pro funkci glykomiku („Consortium for Functional Glycomics“)
CHCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
CID	kolizi indukovaná disociace („collision induced dissociation“)
CNX	calnexin („calnexin“)
CKO	cytokinin oxidasa/reduktasa
CRT	kalretikulín („calreticulin“)
DAHC	hydrogencitrát amonný
DTT	dithiothreitol
ECD	disociace zachycením elektronu („electron capture dissociation“)
EI	ionizace elektronem („electron impact“)
ERAD	protein zodpovědný za degradaci nesprávně sbalených proteinů v ER (ER-associated degradation“)
ER	endoplazmatické retikulum
FAB	ionizace bombardováním rychlými atomy („fast atom bombardment“)
FA	ferulová kyselina
FT-ICR MS	hmotnostní spektrometrie s Fourierovou transformací a iontovou cyklotronovou rezonancí („Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry“)
GA	Golgiho aparát
GC	plynová chromatografie („gass chromatography“)
GPI	glykosylfosfatidylinositol
GT	glykosyltransferasa
IAM	jodacetamid
IRMPD	disociace infračerveným multifotonem („infrared multiphoton dissociation“)
ISD	rozpad v iontovém zdroji („in-source decay“)
KEGG	Kjótská Encyklopedie Genů a Genomů („Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“)

LC-MS	hmotností spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií („liquid chromatography-mass spectrometry“)
LSIMS	hmotnostní spektrometrie s tvorbou sekundárních iontů z kapalného vzorku („liquid secondary ion mass spectrometry“)
MALDI	laserová ionizace a desorpce za účasti matrice („matrix-assisted laser desorption/ionization“)
MS	hmotnostní spektrometrie („mass spectrometry“)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie („tandem mass spectrometry“)
nano ESI	nano ionizace elektrosprejem („nano-electrospray ionization“)
OST	oligosacharidyltransferasa
PDI	disulfidisomerasa („protein disulphid isomerase“)
pIgA1	polymerní imunoglobulin A 1
PSD	rozpad za iontovým zdrojem („post source decay“)
PSE	prolylendoproteasa („prolyl specific endoprotease“)
PTM	posttranslační modifikace
QIT	kvadrupolová iontová past („quadrupol ion trap“)
SA	sinapová kyselina
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl sulfátu sodného („sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electroforesis“)
SNP	jednonukleotidové polymorfismy („single nucleotide polymorphism“)
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethyldiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
TOF	analyzátor doby letu („time of flight“)
UGGT	glukosyltransferasa
UTP	nukleotid uridin trifosfát