

„SLADKÝ“ SVĚT BAKTERIÍ: METODICKÉ PŘÍSTUPY VYUŽÍVANÉ V ANALÝZE BAKTERIÁLNÍCH GLYKOPROTEINŮ

^{1,2}Lucie BALONOVÁ, ¹Lenka HERNYCHOVÁ, ²Zuzana BÍLKOVÁ, ¹Jiří STULÍK

¹Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Ústav molekulární patologie, Hradec Králové

²Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, katedra analytické chemie a biologických a biochemických věd, Pardubice

Souhrn

Glykosylace proteinů hraje významnou úlohu v patogenitě některých bakterií. V předloženém příspěvku uvádíme jednak přehled současných analytických metod, které se využívají v analýze glykosylací eukaryotických proteinů, a dále pak metody s experimentálně ověřenými modifikacemi, které mohou být aplikovány při studiu prokaryotických glykoproteinů.

Klíčová slova: Glykosylace; Glykan; Glykoprotein; Chromatografie; Hmotnostní spektrometrie.

„Sweet“ World of Bacteria: Methodical Approaches Used in Bacterial Glycoproteins Analysis

Summary

Protein glycosylation plays an important role in the pathogenicity of certain bacteria. In this article, we provide an overview of up-to-date analytical methods, which are utilized in the analysis of protein glycosylation of eukaryotic origin. The methods with experimentally verified modifications can be applied in a study of prokaryotic glycoproteins as well.

Key words: Glycosylation; Glycan; Glycoprotein; Chromatography; Mass spectrometry.

Úvod

Posttranslační modifikace (PTM) jsou modifikace kovalentní, které regulují funkce proteinů, určují jejich buněčnou lokalizaci a dynamické interakce s ostatními proteiny. Dnes je známo více než tři sta typů PTM a stále nové jsou nalézány (30).

Mezi nejběžněji se vyskytující a rovněž nejlépe prozkoumané PTM patří glykosylace proteinů. Jedná se o kovalentní připojení oligosacharidových struktur nazývaných glykany k polypeptidovému řetězci proteinů, dávající tak vznik glykoproteinům. Zatímco o glykosylaci proteinů eukaryotických organismů nebylo pochyb, existence glykoproteinů u prokaryot, a to zejména bakteriálních, byla ještě nedávna zpochybňována. Zásadní přelom však nastal s objevem glykoproteinů a objasnění glykosylační dráhy gramnegativní enteropatogenní bakterie *Campylobacter jejuni* (34). V současné době je známo několik mikroorganismů schopných glykosylovat své proteiny a je zcela evidentní, že tyto glykosylace sehrávají důležitou úlohu v patogenitě mikroba a podílejí se na jeho invazi do hostitelského organismu (2, 15, 33). Přesná biologická role bakteriálních glykoproteinů však nadále zůstává předmětem zkoumání.

Vzhledem k markantním odlišnostem mezi eukaryoty a prokaryoty není překvapující, že i glykosylace organismů těchto dvou říší se značně liší (3). Základní rozdíl je především v kvalitativním složení glykanů. Zatímco glykany eukaryotního původu jsou tvořeny výhradně kombinací glukózy (Glc), galaktózy (Gal), manózy (Man), N-acetyl-glukosaminu (GlcNAc), N-acetyl-galaktosaminu (GalNAc), N-acetylneuraminové kyseliny (NeuAc) a fukózy (Fuc), glykany prokaryot bývají velice často složeny z neobvyklých monosacharidových jednotek z řad amino- a deoxysacharidů (22), jako je např. bacilosamin. Existence těchto netypických sacharidů značně ztěžuje identifikaci výsledné glykanové struktury i určení glykosylačního místa.

Jak eukaryotní, tak prokaryotní glykosylace můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin, a to podle typu vazby mezi glykanem a proteinem. První skupinu tvoří N-glykosylace, ve kterých je glykanová složka připojena k proteinu přes amidickou skupinu asparaginu (Asn). Asparagin nesoucí glykosylaci je součástí tzv. glykosylačního motivu, který je u eukaryot tvořen sekvencí tří aminokyselin Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa je jakákoli aminokyselina s výjimkou Pro) (4, 11) a u prokaryot sekvencí pěti aminokyselin Asp/Glu-Xaa-Asn-Xbb-Ser/Thr (Xaa

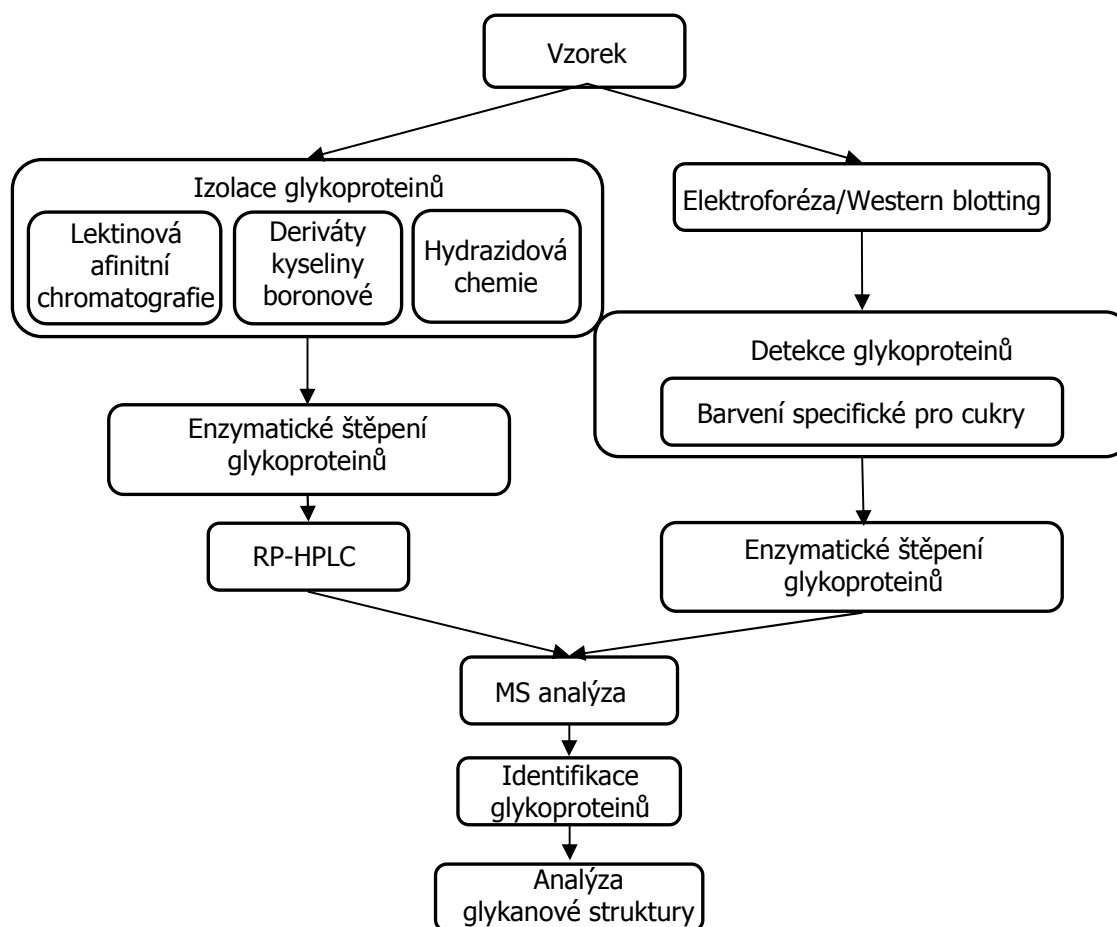


Schéma 1: Strategie pro analýzu glykoproteinů

a Xbb je jakákoli aminokyselina s výjimkou Pro) (17, 26). Přítomnost N-glykosylačního motivu v aminokyselinové sekvenci proteinu je podmínkou nutnou pro glykosylaci, avšak ne dostačující. Zásadní úlohu zde sehrává rovněž konformace proteinu v místě glykosylačního motivu (26). Druhou skupinu představují O-glykosylace, v nichž je glykan připojen k proteinu přes hydroxylovou skupinu serinu (Ser) či threoninu (Thr) (viz barevná příloha s. I, obr. 1). Glykosylační motiv u tohoto typu glykosylace nebyl popsán, takže prakticky každý Ser/Thr v aminokyselinové sekvenci proteinu může být potenciálním nositelem O-glykosylace. Vzhledem k tomuto faktu a dále existenci velkého počtu variant oligosacharidových struktur, které mohou daný protein modifikovat, je identifikace glykosylací zahrnující objasnění struktury glykanu včetně určení glykosylačního místa, ne zcela banální úkol.

Jelikož přítomnost glykosylace mění hmotnost proteinu, je pro správné určení struktury glykanu zcela nezbytné přesné určení molekulové hmotnosti. Pro tento účel je ideální analytickou technikou hmotnostní spektrometrie (24, 30, 39).

Analýza glykosylací proteinů

Studium bakteriálního glykoproteomu je založeno na kombinaci elektroforetických a chromatografických separačních metod s vysoce senzitivní metodou hmotnostní spektrometrie (1, 8, 20, 23). Vzhledem k tomu, že většina bakterií není schopna glykosylace, je vhodné nejdříve přítomnost glykosylace ověřit. Teprve potom by mělo následovat obohacení vzorku o glykoproteiny a jejich následná identifikace. Možná strategie při analýze bakteriálních glykoproteinů je znázorněna ve schématu 1.

Mapování výskytu glykoproteinů

Detekce přítomnosti glykosylace ve vzorku se provádí po rozdělení proteinů jedno- nebo dvourozměrnou gelovou elektroforézou. Separované glykoproteiny jsou poté detekovány pomocí značky, jež specificky reaguje s cukry (31).

V současné době existuje celá řada komerčně dostupných detekčních kitů. Jeden z nejpoužívanějších kitů je založen na reakci fluorescenční značky obsahující reaktivní hydrazidovou funkční skupinu

s aldehydickými skupinami vznikajícími oxidací oligosacharidových jednotek glykoproteinů (viz barevná příloha s. I, obr. 2) (13). Takto detekované potenciální glykoproteiny je možné vyříznout z gelu a poté identifikovat hmotnostní spektrometrií.

Detekci glykoproteinů je možno také provést na nitrocelulóзовé membráně, na kterou byly separované proteiny přeneseny z gelu v procesu Western blotting. Detekce na membráně využívá vlastnosti lektinů – proteinů, které specificky rozpoznávají a vážou určité oligosacharidové struktury. Lektiny jsou značeny digoxigeninem, který reaguje se substrátem značeným antidigoxigeninem. Po přidání vhodného substrátu se přítomnost glykoproteinů projeví vznikem barevných skvrn (32). I takto detekované potenciální glykoproteiny je možné identifikovat, zde je však nutné přiřadit skvrny detekované na membráně odpovídajícím skvrnám na reprezentativním gelu a tyto pak analyzovat hmotnostní spektrometrií.

Obohacování glykoproteinů

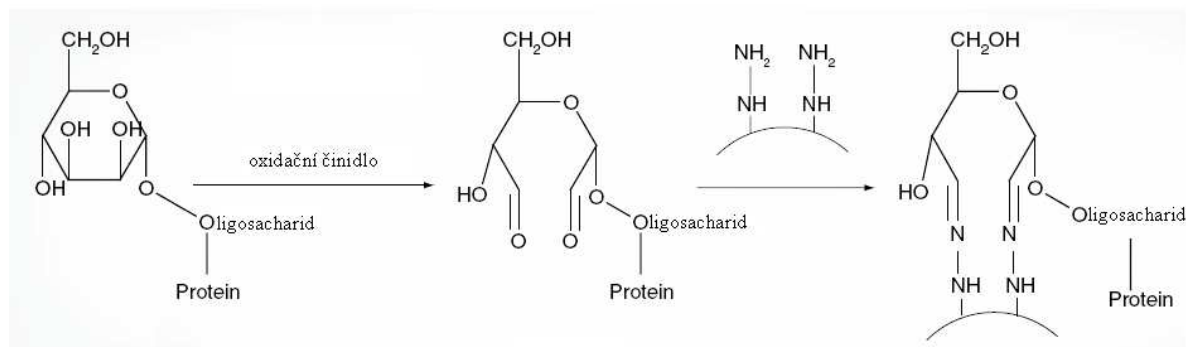
Při analýze bakteriálních glykoproteinů je nutné si uvědomit, že proteiny nesoucí glykosylaci jsou v komplexních biologických vzorcích zastoupeny v minimálním množství ve srovnání s proteiny neglykosylovanými. Proto je nezbytné nejdříve glykoproteiny ze vzorku izolovat nebo vzorek obohatit o glykoproteiny. K tomuto účelu je k dispozici celá řada separačních technik. Ačkoli se principy těchto technik pro izolaci glykoproteinů liší, jejich provedení je v podstatě stejné. V zásadě mohou být použita dvě experimentální uspořádání. V prvním uspořádání je vzorek nanášen na kolonu obsahující látku, která váže glykoproteiny, zatímco neglykosylované proteiny procházejí. Zachycené glykoproteiny jsou poté z kolony uvolněny vhodným elučním činidlem. Druhé uspořádání se provádí vsádkově ve zkumavkách s využitím centrifugy.

Další aspekt, který je nutné brát v úvahu, je povaha bakteriálního vzorku. Například při analýze glykoproteinů gramnegativních bakterií je žádoucí nejprve odstranit přítomný lipopolysacharid, který by jinak interferoval s použitými technikami.

Lektinová afinitní chromatografie je založena na reverzibilní biospecifické interakci určitých glykoproteinů, resp. jejich glykanů, s lektiny, jež jsou imobilizovány na pevném nosiči. Jako nosič může například sloužit biopolymer typu agaróza (9), dále magnetické partikule, čipy (36), silika (21) a další (viz barevná příloha s. I, obr. 3). Podle typu použitého lektinu je možné izolovat vybrané skupiny glykoproteinů. Některé lektiny rozpoznávají struktury s manózovými či glukózovými zbytky, zatímco jiné mohou vázat galaktózové zbytky sacharidů.

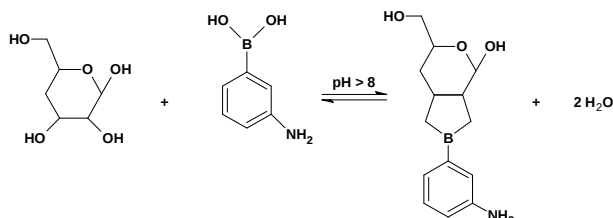
Při použití této izolační metody je velice důležité složení vazebného/ekvilibračního pufru. Ten často obsahuje dvojmocné ionty, jež jsou nezbytné pro vazbu glykanu. Pro uvolnění navázaných glykoproteinů se používá eluční pufr složený z vazebného pufru a monosacharidu o vysoké koncentraci, který je analogem cukerného ligandu vázaného glykoproteinu.

Hydrazidová chemie je dvoukroková obohacovací technika, která využívá oxidace *cis*-diol skupin oligosacharidů za vzniku aldehydů (5), které pak reagují s imobilizovanými hydrazidovými skupinami, což vede k tvorbě kovalentních hydrazonových vazeb (obr. 4) (27). Tyto vazby jsou natolik pevné, že zachycené glykoproteiny z nich již nelze uvolnit. Identifikace glykoproteinů je však možná, a to tak, že se proteinové části glykoproteinů podrobí enzymatickému štěpení proteolytickým enzymem trypsinem a vzniklé peptidy se analyzují na hmotnostním spektrometru.



Obr. 4: Princip izolace glykoproteinů pomocí hydrazidové chemie

Chromatografie na derivátech kyseliny boronové využívá tvorby kovalentní vazby mezi kyselinou aminofenylboronovou a glykany obsahující galaktózu či manózu za vzniku diesterů (obr. 5). Tato reakce probíhá v alkalickém prostředí. Snížením pH či použitím sorbitolu jsou zachycené glykoproteiny z kyseliny boronové uvolněny (19).



Obr. 5: Princip izolace glykoproteinů pomocí aminofenylboronové kyseliny

Určení struktury glykanů

Pro určení struktury glykanů je žádoucí glykanovou složku z glykoproteinu uvolnit. Pro tento účel se dají použít dva přístupy – uvolnění glykanů enzymaticky či chemicky. Uvolněné glykany jsou poté obvykle separovány od proteinů s využitím vhodné chromatografické techniky. Následuje jejich identifikace na hmotnostním spektrometru (18). V praxi osvědčená strategie při analýze glykanů je znázorněna ve schématu 2.

Enzymatické uvolnění glykanů je bezesporu nejúčinnější a nejvíce používané z důvodu velké specifity používaných enzymů. Nejčastěji používaným enzymem je peptid-N-glykosidáza F (PNGáza F), která štěpí amidickou vazbu mezi terminálním N-acetylgalaktosaminem a asparaginem, čímž dojde k uvolnění intaktních N-glykanů (viz barevná příloha s. I, obr. 6) (35). Bohužel takovýto typ vazby se nachází pouze u glykoproteinů eukaryotického původu, a proto tento postup nelze aplikovat u bakterií (40). Z tohoto důvodu se k uvolnění bakteriálních glykanů a rovněž také O-glykanů eukaryot používá chemické štěpení.

Chemické uvolnění glykanů zahrnuje celou řadu chemických reakcí vedoucích k odštěpení glykanů. Mezi ně patří hydrazinolýza (29), alkalická β -eliminace (6) či amoniakální β -eliminace (12, 14). Pro značnou pracovní náročnost a riziko vedlejších reakcí hydrazinolýzou se dnes spíše preferuje použití β -eliminace.

Separace uvolněných glykanů

Komplexní směs uvolněných glykanů je dále podrobena separaci od neglykosylovaných a degly-

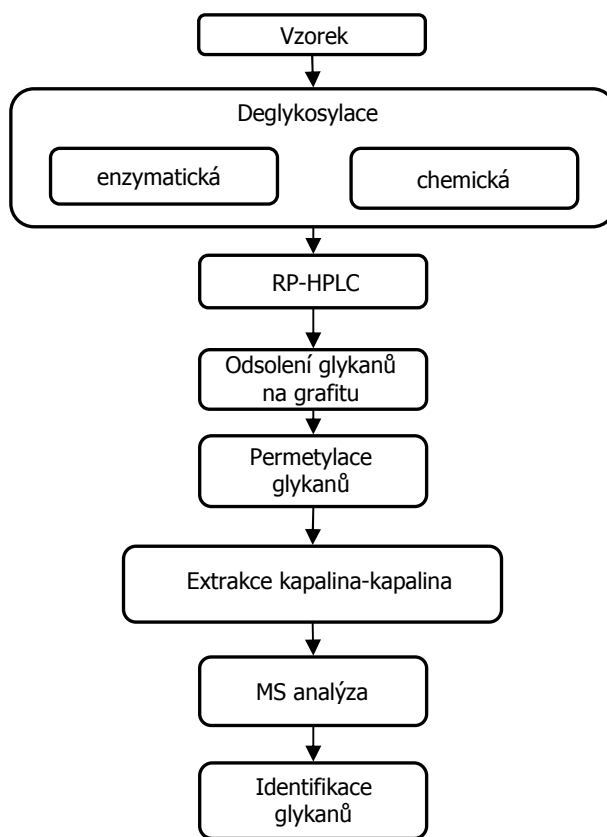


Schéma 2: Strategie pro analýzu glykanů

kosylovaných proteinů. Pro tento účel je možno použít kapalinovou chromatografii na obrácených fázích (RP-HPLC), která je založena na hydrofobních interakcích separovaných látek s nepolární stacionární fází, např. oktadecylovou. Použitím vody jako mobilní fáze se na této fázi zachytí málo polární či nepolární proteiny a peptidy, zatímco více polární glykany jsou eluovány ven z kolony.

Při použití grafitu (GCC) jako stacionární fáze je separační proces založen na adsorpci a umožňuje zbavit glykany nečistot a solí. Glykany se váží na grafit a jsou eluovány z kolony použitím mobilní fáze, obsahující vyšší procento organického rozpouštědla (např. 25% acetonitrilu) (16, 25).

Permetylace glykanů

Ačkoli glykany mohou být analyzovány na hmotnostním spektrometru v nativní formě, z mnoha důvodů je výhodnější provést jejich derivatizaci, což zvýší senzitivitu měření, protože metylované formy glykanů jsou snadněji ionizovány. Navíc permetylace čili náhrada vodíků za metylové skupiny umožňuje měřit všechny typy glykanů, včetně těch, jež obsahují terminální sialové kyseliny, v pozitivním módu. V současné době je nejvyužívanější perme-

tylační metoda podle Ciucanu a Kereka (7), která je založena na přidavku metyljodidu k dimethylsulfoxidu obsahujícímu práškový hydroxid sodný (viz barevná příloha s. I, obr. 7).

Hmotnostní spektrometrie

Identifikace glykoproteinů hmotnostní spektrometrií se provádí naprosto stejně jako identifikace proteinů neglykosylovaných. Glykoproteiny detekované na gelech či blotech jsou podrobeny enzymatickému štěpení. Výsledkem je směs peptidů a glykopeptidů, která je dále analyzována na hmotnostním spektrometru. V případě glykoproteinů, jež byly získány izolací některou z výše uvedených obohacovacích technik, je nutné nejdříve takto složitou směs peptidů a glykopeptidů rozdělit kapalinovou chromatografií RP-HPLC, po níž následuje hmotnostně-spektrometrická analýza.

Jak již bylo řečeno dříve, hmotnostní spektrometrie se rovněž uplatňuje při identifikaci cukerných složek glykoproteinů – glykanů (10, 37, 38). Nejoblíbenější ionizační technika využívaná k tomuto účelu je technika MALDI (matrix assisted laser/desorption ionization), při níž se tvoří jednou nabití ionty. Jako matrice se pro analýzu neutrálních glykanů používá 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB). Vzhledem k nízkému detekčnímu limitu a nežádoucí fragmentaci není tato matrice vhodná pro analýzu glykanů kyselé povahy. Místo DHB se v tomto případě používá 2,4,6-trihydroxyacetofenon (28).

Závěr

Vzhledem k rozmanitosti glykanových struktur modifikujících proteiny představuje analýza nejen bakteriálních glykosylací náročný úkol, k jehož splnění je nutno kombinovat celou škálu analytických metod, na jejichž konci stojí hmotnostní spektrometrie. Identifikace glykoproteinů a určení struktury glykanů v těchto glykoproteomických studiích však zdaleka nic nevypovídají o funkci glykoproteinů. Výsledky glykoproteomických analýz jsou dále použity ve funkční proteomice, kde je objasněn vztah přítomné glykosylace a její biologické role ve vztahu k hostiteli.

Poděkování

Předložená práce byla provedena v rámci grantů MŠMT ČR č. 0021627502 a č. ME08105, vojenského výzkumného záměru č. FVZ0000604 a č. MO0FVZ0000501 a Grantové agentury ČR č. GA203/09/0857.

Literatura

1. ALLEY, WR., Jr. – MECHREF, Y. – NOVOTNY, MV. Use of activated graphitized carbon chips for liquid chromatography/mass spectrometric and tandem mass spectrometric analysis of tryptic glycopeptides. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 2009, vol. 23, no. 4, p. 495–505.
2. ARORA, SK., et al. Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections. *Infect. Immun.*, 2005, vol. 73, no. 7, p. 4395–4398.
3. BALONOVA, L. – HERNYCHOVA, L. – BILKOVA, Z. Bioanalytical tools for the discovery of eukaryotic glycoproteins applied to the analysis of bacterial glycoproteins. *Expert. Rev. Proteomics*, 2009, vol. 6, no. 1, p. 75–85.
4. BAUSE, E. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem. J.*, 1983, vol. 209, no. 2, p. 331–336.
5. BOBBITT, JM. Periodate oxidation of carbohydrates. *Adv. Carbohydr. Chem.*, 1956, vol. 48, no. 11, p. 1–41.
6. CARLSON, DM. Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *J. Biol. Chem.*, 1968, vol. 243, no. 3, p. 616–626.
7. CIUCANU, I. – KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.*, 1984, vol. 131, p. 209–217.
8. CLAVEROL, S., et al. Characterization of protein variants and post-translational modifications: ESI-MSn analyses of intact proteins eluted from polyacrylamide gels. *Mol. Cell. Proteomics*, 2003, vol. 2, no. 8, p. 483–493.
9. CUMMINGS, RD. Use of lectins in analysis of glycoconjugates. *Methods Enzymol.*, 1994, vol. 230, p. 66–86.
10. DUFFIN, KL., et al. Characterization of N-linked oligosaccharides by electrospray and tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 1992, vol. 64, no. 13, p. 1440–1448.
11. GAVEL, Y. – HEIJNE, G., von. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein. Eng.*, 1990, vol. 3, no. 5, p. 433–442.
12. GOETZ, JA., et al. Glycomic profiling of invasive and non-invasive breast cancer cells. *Glycoconj. J.*, 2009, vol. 26, no. 2, p. 117–131.
13. HART, C., et al. Detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots using Pro-Q Emerald 488 dye, a fluorescent periodate Schiff-base stain. *Electrophoresis*, 2003, vol. 24, no. 4, p. 588–598.
14. HUANG, Y. – MECHREF, Y. – NOVOTNY, MV. Microscale nonreductive release of O-linked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 2001, vol. 73, no. 24, p. 6063–6069.
15. KARLYSHEV, AV., et al. The *Campylobacter jejuni* general glycosylation system is important for attachment to human epithelial cells and in the colonization of chicks. *Microbiology*, 2004, vol. 150, Pt 6, p. 1957–1964.
16. KOIZUMI, K. High-performance liquid chromatographic separation of carbohydrates on graphitized carbon columns. *J. Chromatogr. A.*, 1996, vol. 720, no. 1/2, p. 119–126.
17. KOWARIK, M., et al. Definition of the bacterial N-glycosylation site consensus sequence. *Embo. J.*, 2006, vol. 25, no. 9, p. 1957–1966.
18. KYSELOVA, Z., et al. Breast cancer diagnosis and prog-

- nosis through quantitative measurements of serum glycan profiles. *Clin. Chem.*, 2008, vol. 54, no. 7, p. 1166–1175.
19. LEE, JH., et al. Immobilization of aminophenylboronic acid on magnetic beads for the direct determination of glycoproteins by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 2005, vol. 16, no. 9, p. 1456–1460.
 20. MADERA, M., et al. High-sensitivity profiling of glycoproteins from human blood serum through multiple-lectin affinity chromatography and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2007, vol. 845, no. 1, p. 121–137.
 21. MADERA, M. – MECHREF, Y. – NOVOTNY, MV. Combining lectin microcolumns with high-resolution separation techniques for enrichment of glycoproteins and glycopeptides. *Anal. Chem.*, 2005, vol. 77, no. 13, p. 4081–4090.
 22. MAKI, M. – RENKONEN, R. Biosynthesis of 6-deoxyhexose glycans in bacteria. *Glycobiology*, 2004, vol. 14, no. 3, p. 1R–15R.
 23. MECHREF, Y. – NOVOTNY, MV. Glycomic analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Mass. Spectrom. Rev.*, 2009, vol. 28, no. 2, p. 207–222.
 24. MECHREF, Y. – NOVOTNY, MV. Structural investigations of glycoconjugates at high sensitivity. *Chem. Rev.*, 2002, vol. 102, no. 2, p. 321–369.
 25. NINONUEVO, M., et al. Nanoliquid chromatography-mass spectrometry of oligosaccharides employing graphitized carbon chromatography on microchip with a high-accuracy mass analyzer. *Electrophoresis*, 2005, vol. 26, no. 19, p. 3641–3649.
 26. NITA-LAZAR, M., et al. The N-X-S/T consensus sequence is required but not sufficient for bacterial N-linked protein glycosylation. *Glycobiology*, 2005, vol. 15, no. 4, p. 361–367.
 27. O'SHANNESY, DJ. Hydrazido-derivatized supports in affinity chromatography. *J. Chromatogr.*, 1990, vol. 510, p. 13–21.
 28. PAPAC, DI. – WONG, A. – JONES, AJ. Analysis of acidic oligosaccharides and glycopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 1996, vol. 68, no. 18, p. 3215–3223.
 29. PATEL, T., et al. Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both N- and O-linked oligosaccharides from glycoproteins. *Biochemistry*, 1993, vol. 32, no. 2, p. 679–693.
 30. SALZANO, AM. – CRESCENZI, M. Mass spectrometry for protein identification and the study of post translational modifications. *Ann. Ist. Super. Sanita.*, 2005, vol. 41, no. 4, p. 443–450.
 31. STEINBERG, TH., et al. Rapid and simple single nanogram detection of glycoproteins in polyacrylamide gels and on electroblots. *Proteomics*, 2001, vol. 1, no. 7, p. 841–855.
 32. STERBA, J., et al. Flagellin and outer surface proteins from *Borrelia burgdorferi* are not glycosylated. *J. Bacteriol.*, 2008, vol. 190, no. 7, p. 2619–2623.
 33. SZYMANSKI, CM. – BURR, DH. – GUERRY, P. Campylobacter protein glycosylation affects host cell interactions. *Infect. Immun.*, 2002, vol. 70, no. 4, p. 2242–2244.
 34. SZYMANSKI, CM., et al. Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.*, 1999, vol. 32, no. 5, p. 1022–1030.
 35. TARENTINO, AL. – GOMEZ, CM. – PLUMMER, TH. Jr. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F. *Biochemistry*, 1985, vol. 24, no. 17, p. 4665–4671.
 36. UEDA, K., et al. Targeted serum glycoproteomics for the discovery of lung cancer-associated glycosylation disorders using lectin-coupled ProteinChip arrays. *Proteomics*, 2009, vol. 9, no. 8, p. 2182–2192.
 37. VISEUX, N. – DE HOFFMANN, E. – DOMON, B. Structural assignment of permethylated oligosaccharide subunits using sequential tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 1998, vol. 70, no. 23, p. 4951–4959.
 38. WEISKOPF, AS. – VOURES, P. – HARVEY, DJ. Characterization of oligosaccharide composition and structure by quadrupole ion trap mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 1997, vol. 11, no. 14, p. 1493–1504.
 39. WUHRER, M., et al. Glycoproteomics based on tandem mass spectrometry of glycopeptides. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2007, vol. 849, no. 1/2, p. 115–128.
 40. YOUNG, NM., et al. Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, no. 45, p. 42530–42539.

Korespondence: Mgr. Lucie Balonová
Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: balonova@pmfhk.cz

Do redakce došlo 17. 8. 2009