

Abstrakt

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