

Структурный анализ

олигосахаридов и полисахаридов

Зачем нужно знать об углеводном составе?

- Гликозилирование влияет/опосредует биологическую функцию белка
(норма-патология; старение, активность белков)
- Полисахариды бактерий – мишени для иммунной системы, инструмент адаптации к агрессивной среде
(создание вакцин, изучение механизма возникновения резистентности, типирование штаммов бактерий)

Задачи структурного анализа

- ☞ Степень гликозилирования
- ☞ Количество сайтов гликозилирования
- ☞ Тип цепей: N-, O- или др.
- ☞ Оценка степени гетерогенности (гликоформы)
- ☞ Полная структура олигосахаридных цепей (и полисахаридов)

Гликозилирован ли ваш белок?

Окрашивание прямо на блоте:

1. NaIO_4 , затем реактив Шиффа (фуксинсернистая кислота)
2. лектины или антитела

Предварительное отщепление углеводов:

1. $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$, ОС гидролизуется до МС, пептидная часть остается нативной
2. гликозидазы (эндо-, экзо-)

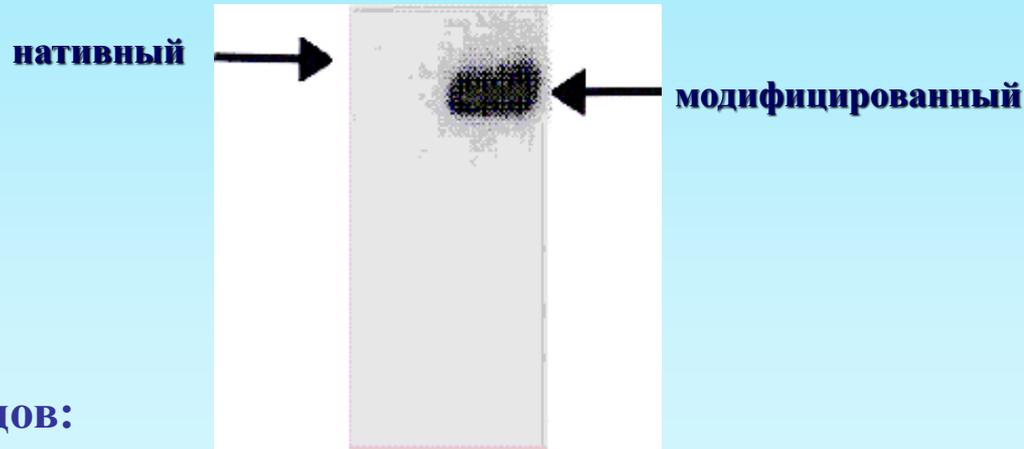
Метаболическое определение гликозилирования

Выращивание клеток в среде с добавлением радиоактивно-меченного моносахарида (или с химически-активной группой) с последующим гель-электрофорезом фракций.

Использование белковых баз данных

В ряде баз данных указываются потенциальные сайты гликозилирования.

Например, <http://www.uniprot.org/help/carbohydr>



Этапы структурного анализа

1. Определение моносакхаридного состава углеводных цепей

Что дает:

степень гликозилирования,
моносакхаридный состав (Glc, Gal, Man, GlcNAc, GalNAc, Fuc),
предварительная информация о типе цепей
(N-, O-, гибридные, маннозобогатые, лактозаминовые и т.п.)

Тотальный гидролиз:

2M TФУ/HCl, 100°C, ночь. Затем
ре-N-ацетилирование аминсахаридов
(например, Ac₂O в смеси пиридин-абс. метанол)

Разрушаются Neu и, частично, Fuc

HPAE разделение (Dionex):

Без модификаций
Колонка CarboPak PA-1 (4×250°мм, Dionex),
градиент NaOAc в NaOH,
амперометрический детектор (высокая чувствительность)

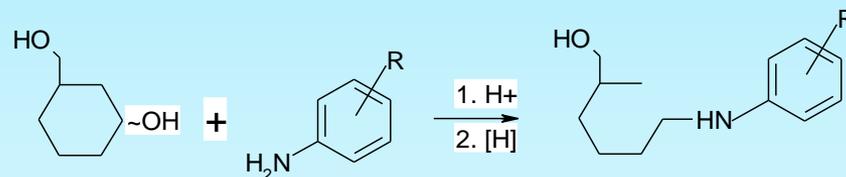
Нужны стандарты!

Газовая хроматография:

Необходимо перевести в летучие соединения
(метилловые или TMC-производные),
Масс-спектрометрический детектор (высокая чувствительность)

HPLC разделение, капиллярный электрофорез:

Моносахариды предварительно модифицируют
(вводят хромофорную либо флуоресцентную метку по 1-ОН)



Метод восстановительного аминирования – самый распространенный метод введения метки

HPLC: колонка с C18 или др., элюент подбирают в зависимости от метки и колонки,
детекция: УФ- либо флуориметрическая

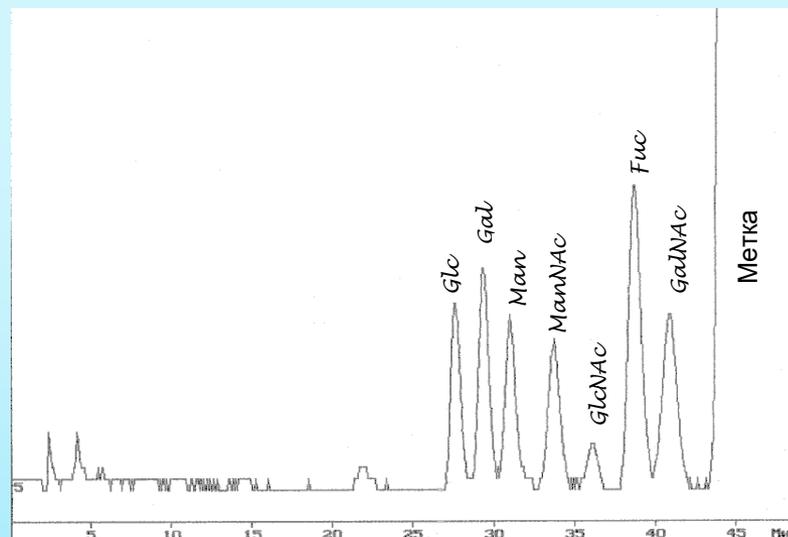
Капиллярный электрофорез: вводят заряженную метку

Стандарты?

Внешний и внутренний стандарт – «положительный» контроль.

Используют моносахарид, не встречающийся в данном образце и который максимально близок по свойствам к определяемым моносахаридам

Определяется соотношение площадей – компенсация ошибки при пробоподготовке



Определение нейраминовой кислоты

Что можно определить: степень сиалирования, тип сиаловой кислоты (ацил-, гликолил-)

Отщепление:

0.1 М ТФУ, либо нейраминидаза, либо 0.25 М NaHSO_4

HPAE разделение (Dionex):

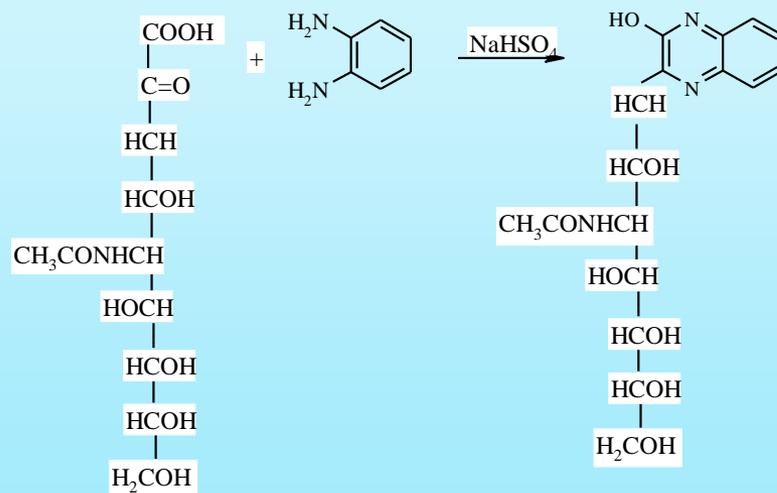
Проводится сразу после гидролиза
Колонка CarboPak PA-1 (4×250°мм, Dionex)
Элюент: NaOAc в NaOH,
амперометрический детектор

Можно определять не отщепляя -
резорциновый метод.

- Низкая чувствительность
- Требуется большое количество образца
- Метод не делает различий между видами Sia

Определение в виде флуоресцентных производных:

После гидролиза проводится реакция с о-фенилендиамином (либо с др. ароматическим о-диамином) с последующим разделением на ВЭЖХ, флуориметрическая детекция (Neu5Pr – в качестве внутреннего стандарта, 3'SL – внешний стандарт)



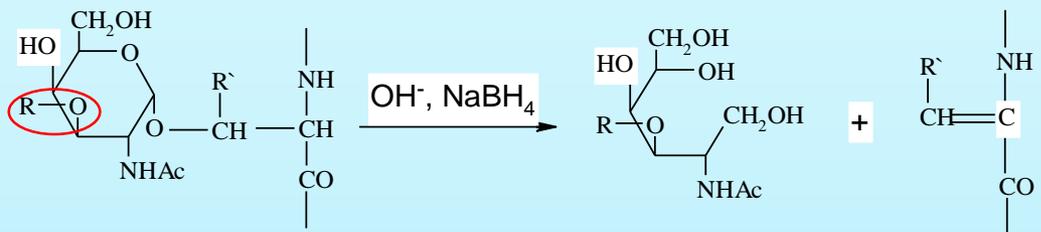
Этапы структурного анализа

2. Определение структуры ОС

2.1. Отщепление ОС от пептида/белка

О-цепи (щелочеллабильные)

Отщепление NaOH-NaBH_4



Белок частично разрушается. Без восстановителя протекает «пилинг»

O-цепи - реакция «пилинга» (β -элиминирования)

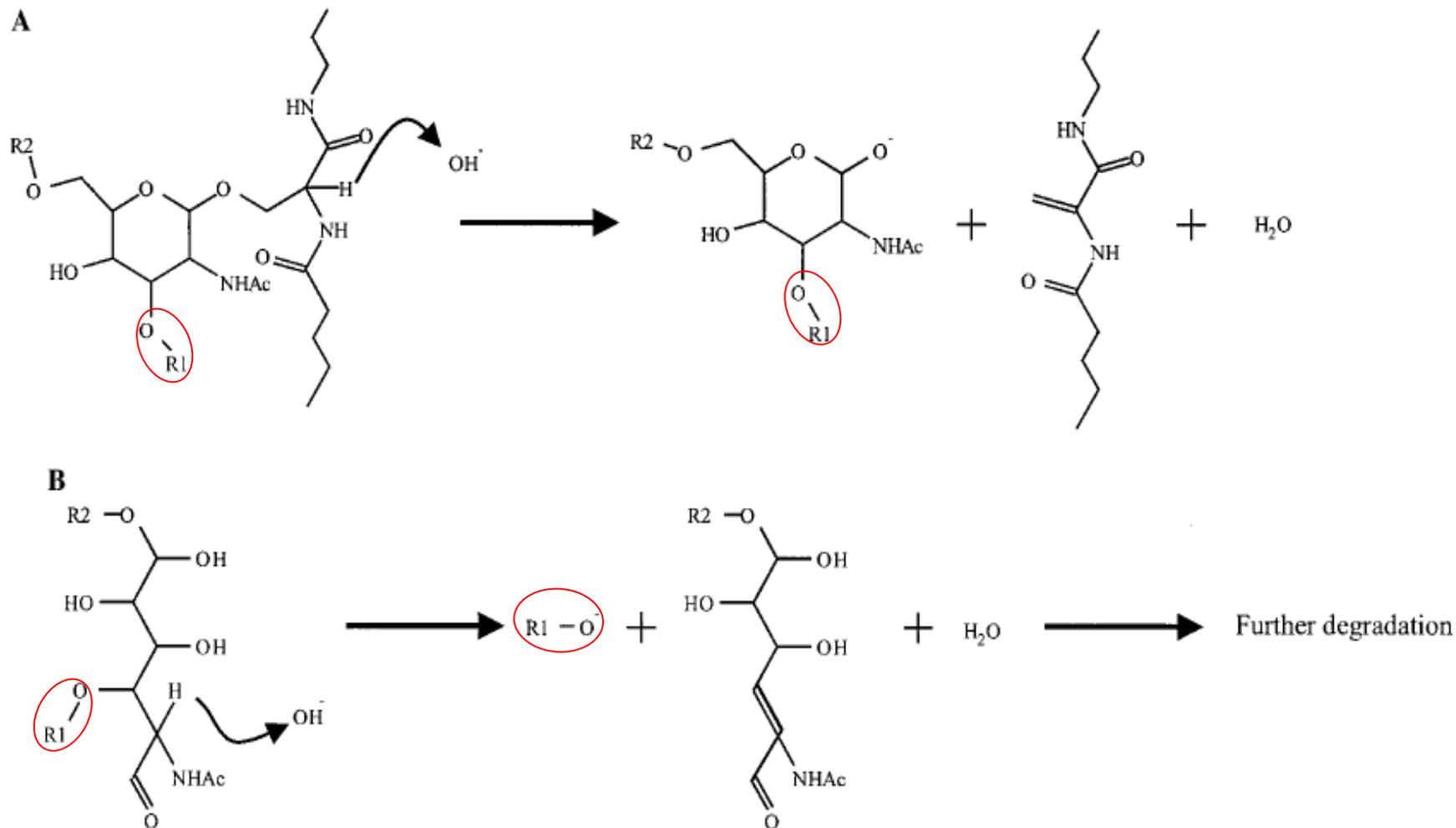
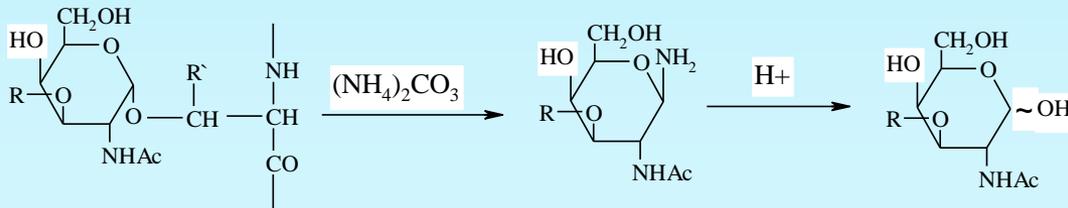


FIG. 1. The mechanism of alkaline β -elimination (A) and degradation (“peeling”) of oligosaccharides in an alkaline environment (B). R1 and R2 are extensions of the GalNAc at C-3 and C-6, respectively.

O-цепи (щелочеллабильные)

Отщепление карбонатом аммония



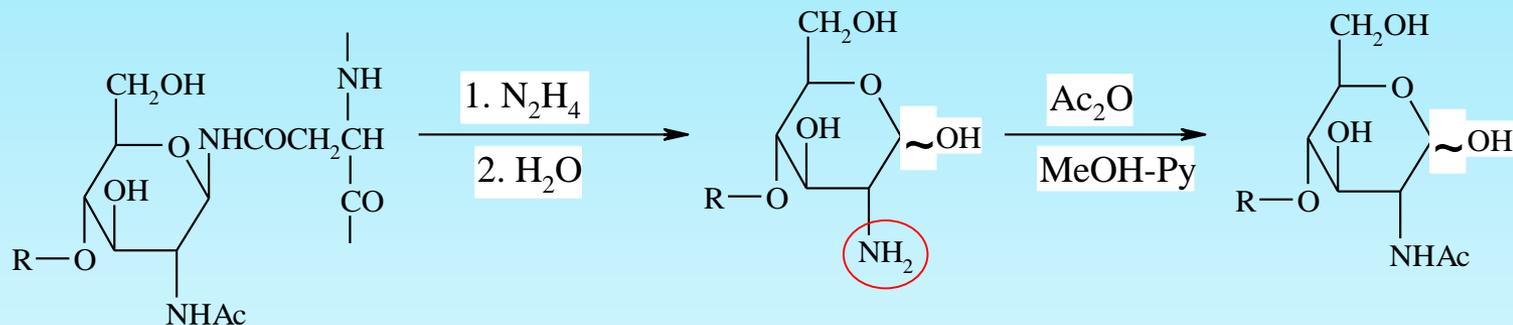
Обработка нас. раствором $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ в конц. аммиаке.

Минимален «пилинг» и дезацетилирование. Очень низкий выход

Ферменты используют только в тех случаях, когда известны коровые структуры (у них очень узкая специфичность)

N-цепи

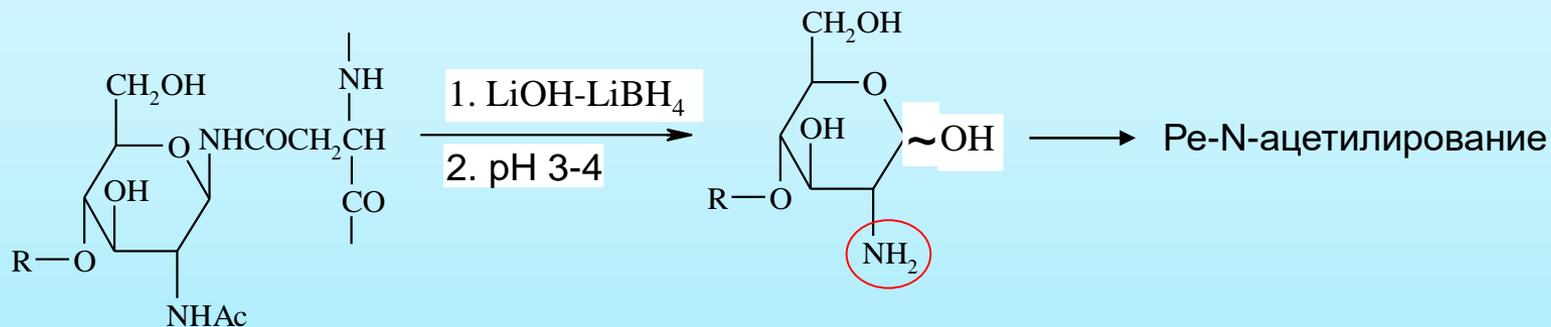
Гидразинолиз



Белок полностью разрушается.

Возможно проведение в микромасштабе

Отщепление LiOH-LiBH_4 или $\text{LiBH}_4\text{-NaBH}_4\text{-LiOH}$



Белок расщепляется до пептидов. В микромасштабе не применяется.

ОС можно получить виде аминокальдитолов

N-цепи

Отщепление ферментами



Пептид-N-гликаназа F (PNG-asa F из *Flavobacterium meningosepticum*)

Широкая специфичность.

Не активна по отношению к гликанам, имеющим $\alpha(1\rightarrow3)$ -заместители у первого GlcNAc (часто это Fuc $\alpha 1-3$, т.е. большинство гликанов растительного происхождения)

Пептид-N-гликаназа А (PNG-asa А из миндаля)

Самая широкая специфичность. Активна по отношению ко всем гликанам. Не отщепляет ОС от больших ГП, любит гликопептиды

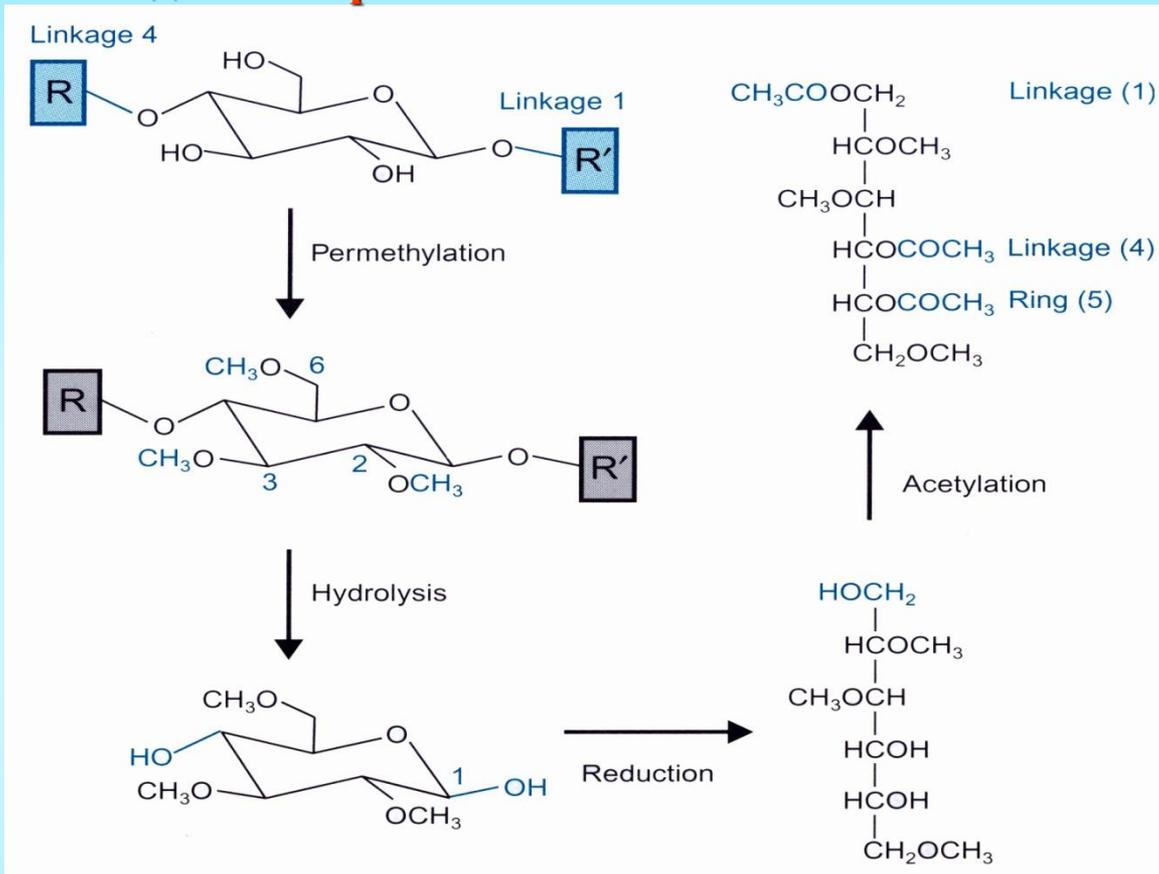
Эндогликозидаза Endo H (из *Streptomyces plicatus*)

Отщепляет большинство цепей комплексного типа и маннозобогатые цепи. **НО!** Расщепляет связь между двумя остатками GlcNAc в хитобиозном коре – в ОС остается только один остаток GlcNAc.



2.2. Установление структуры

Метод метилирования



Метанолиз:

иодистый метил в DMF в присутствии оксидов серебра или бария (*метод Куна*), либо диметилсульфат в присутствии щелочи (*метод Хеурса*)

Гидролиз:

2 М ТФУ

Ацетилирование:

Ac₂O в пиридине.

Как альтернатива: ТМС-производные

Анализ продуктов:

ГХ-МС

Достоинства:

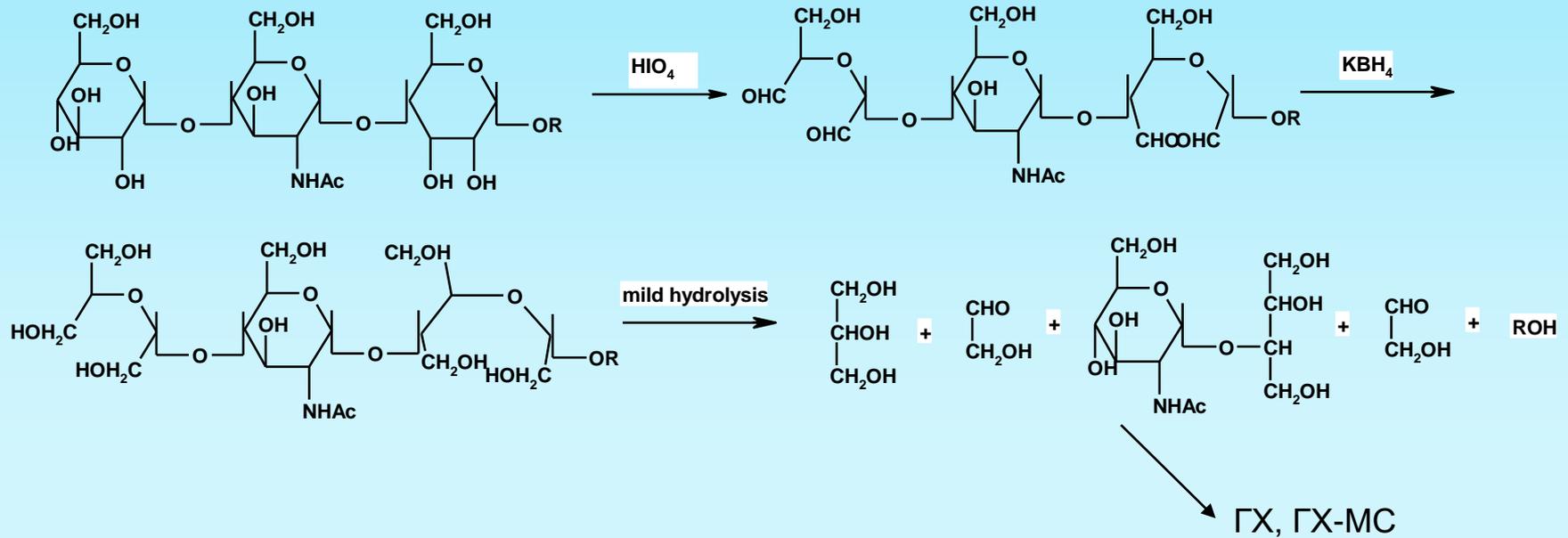
можно выяснить: моносahаридный состав, тип связи между остатками, заместители и т.д.

Недостатки:

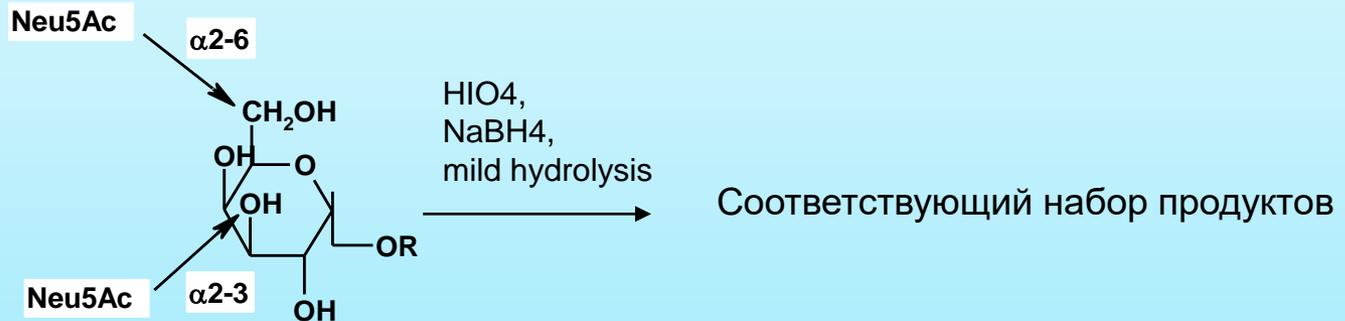
Метод очень трудоемок, нет информации о последовательности и аномерной конфигурации связи, при гидролизе разрушается Neu

Удобен при анализе полисахаридов и O-цепей

Метод периодатного окисления



Можно определить тип связи между ОС и нейраминовой кислотой:



Хроматографическое разделение

Задача: разделить ОС на максимальное количество фракций. В идеале – на индивидуальные ОС

1. Анионообменная хроматография (HPAEC) –

Специально разработанная ионо-обменная смола, в качестве элюента – раствор щелочи
градиент ацетата натрия (pH >12), детектор – PAD

Позволяет: разделять немеченные ОС сразу после выделения, тонкое разделение аномерных, структурных изомеров, по типу связи, по антенности.

2. Прямофазная хроматография (HILIC) –

амино-, амидо-модифицированный силикагель + модификторы в элюент

Позволяет: определить относительный размер сахаридов, степень сиалирования

3. Обращеннофазная хроматография (RPLC) –

силикагель с привитыми C₁₈-группами.

Позволяет: разделить ОС по гидрофобности (в зависимости от наличия/отсутствия Sia, количества ацетамидных групп, Fuc), разделение на аномеры.

4. Эксклюзионная хроматография (SEC) –

полимерный носитель с различным размером пор

Позволяет: разделить ОС по размеру, больше всего подходит для больших ОС

5. Другие виды хроматографии

C₁₈-IP, катионо-, анионообменники, лектин-аффинная и др.

Для повышения чувствительности разделения в ОС предварительно вводят метку

Хроматографическое картирование

Как правило, используют комбинацию из хроматографий – 2D и 3D-картирование

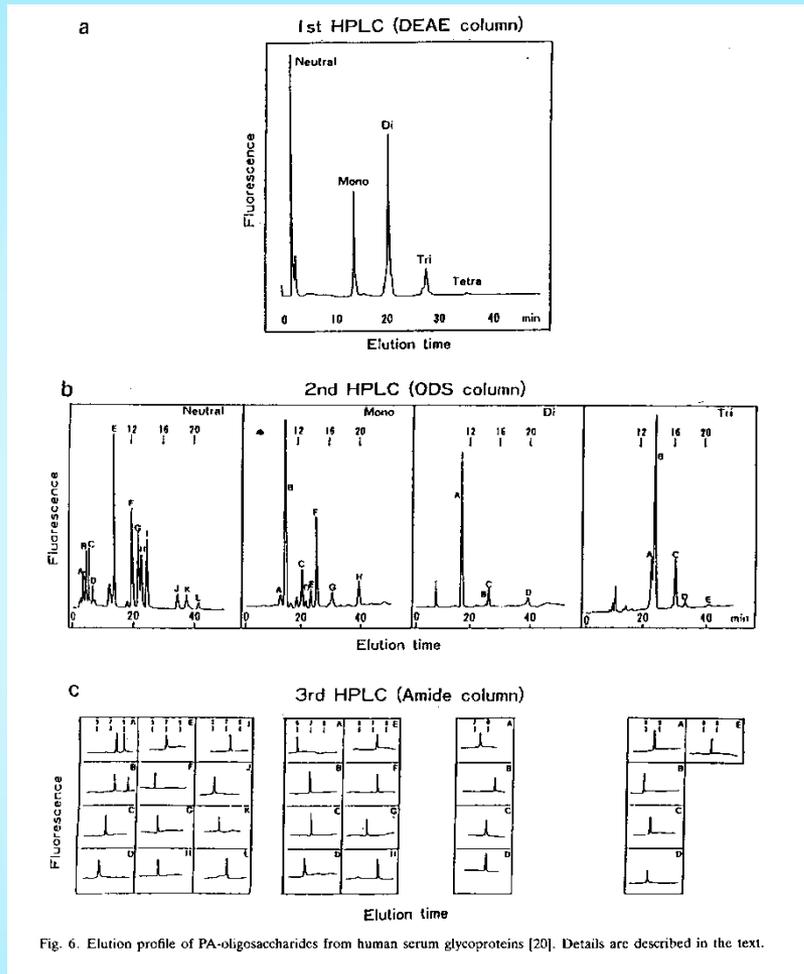
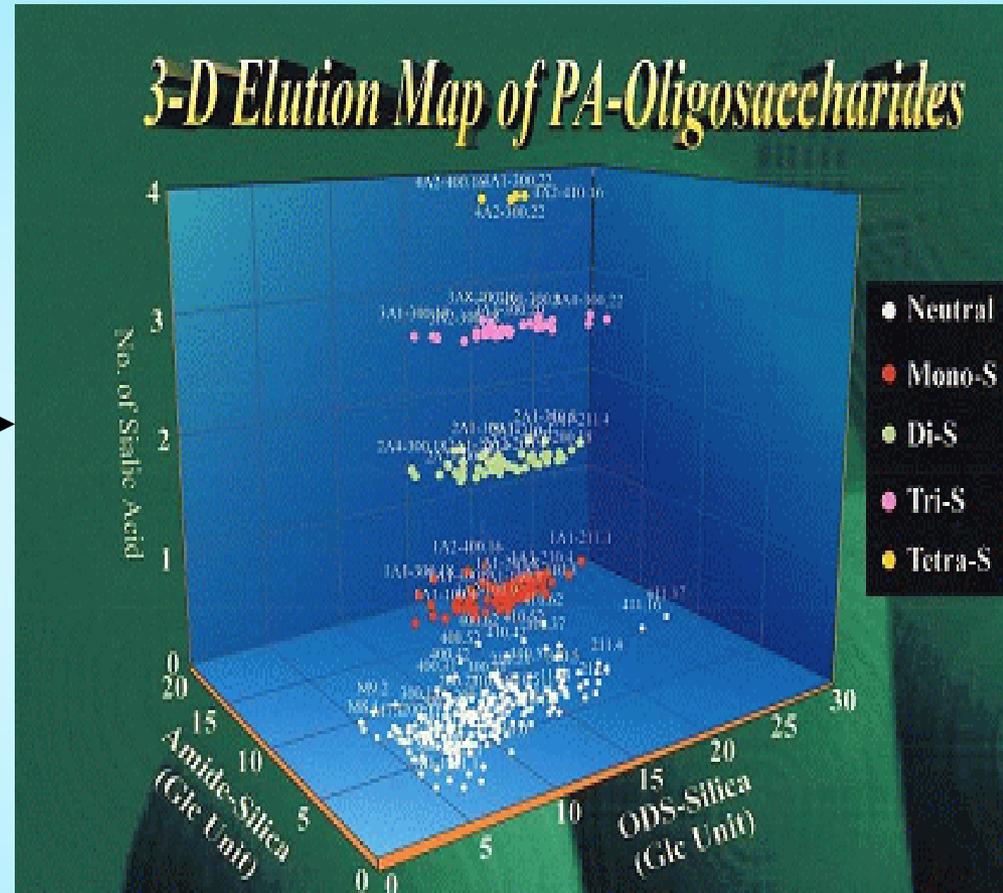


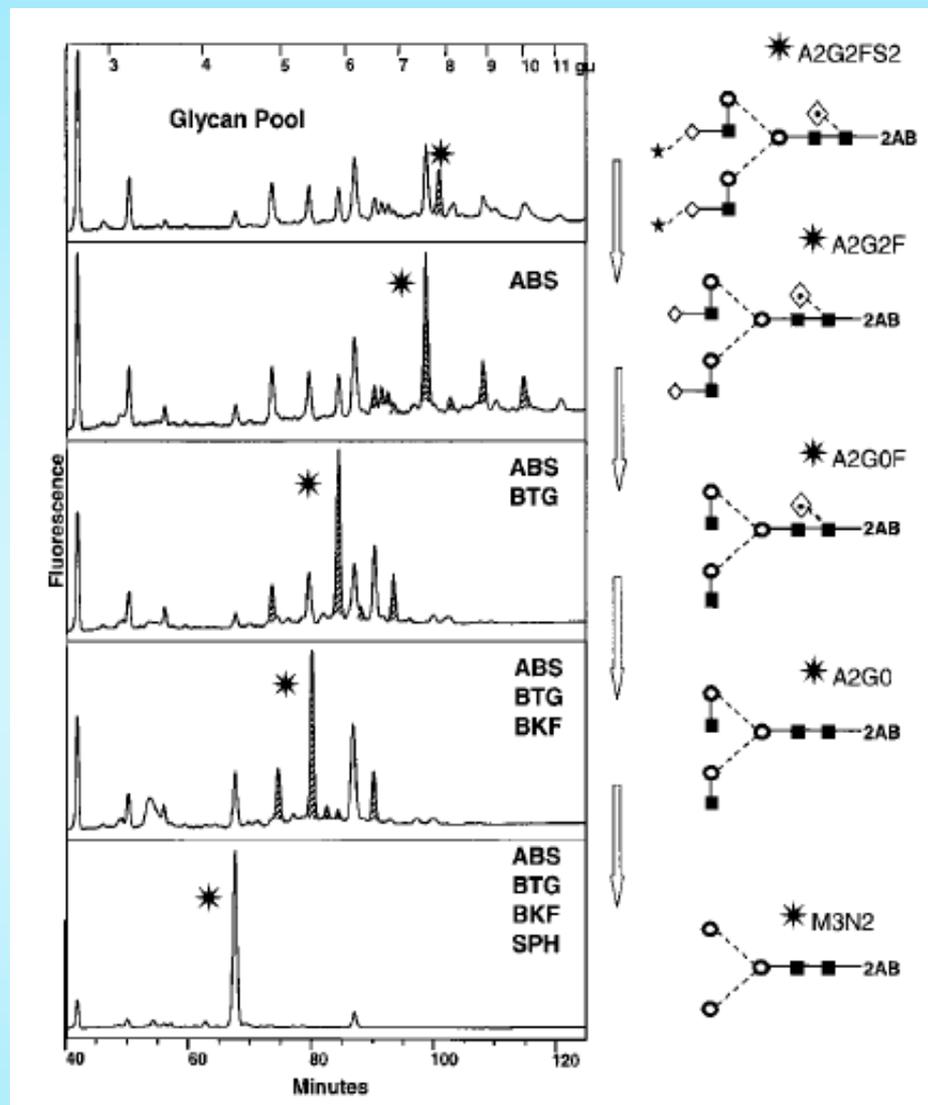
Fig. 6. Elution profile of PA-oligosaccharides from human serum glycoproteins [20]. Details are described in the text.



Основное понятие – глюкозная единица

Глюкозные единицы – это число остатков глюкозы (n) в олигодекстрани, используемых для калибровки колонки, однако в приложении к другим олигосахаридам - это условные единицы, характеризующие молекулярный размер олигосахаридов.

Последовательное ферментативное щепление



Определение α Gal-терминации – только ВЭЖХ с отщеплением α -галактозидазой

Что дает: определение степени и типа сиапирования, типа связей, положение фукозы и др. заместителей (HSO_3^- , PO_4^{3-}), аномерная конфигурация каждого остатка
Недостатки: трудоемкость (стандарты), доступность ферментов

Электрофорез

Как правило, в ОС предварительно вводят заряженную метку, что облегчает разделение

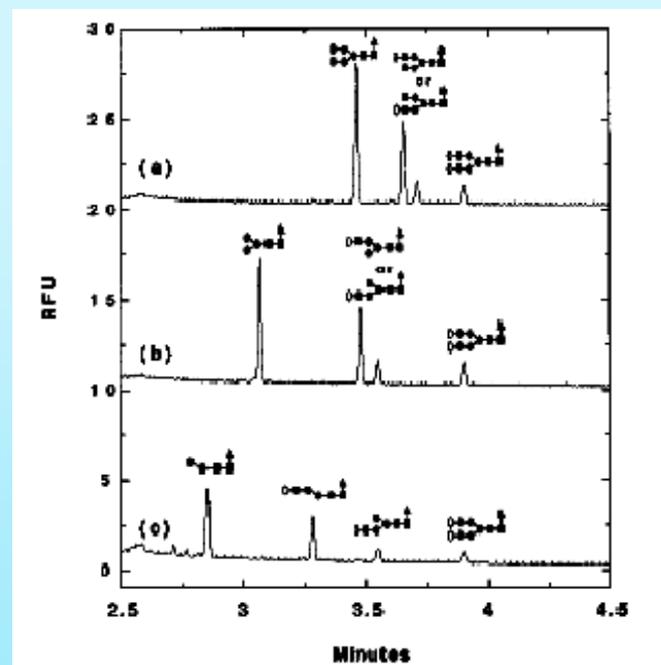
ПАГЭ

- Удобен для разделения большого количества ОС, не требует дорогого оборудования,
- в сочетании лазерной детекцией (предварительно ОС метят флуорофором) – достаточно чувствительный метод

CE-LIF (capillary electroforesis with laser-induced fluorescent detection)

Можно добиться высокой чувствительности и степени разделения выбором метки, буфера, системы детекции

Также применим в последовательном ферментативном щеплении и в комбинации с ВЭЖХ



Хроматографическое картирование – поставлено на коммерческие рельсы



<https://www.ludger.com/glycan-analysis-services/>

Какие сервисы предоставляют:

- ◆ Моносахаридный анализ
- ◆ Анализ на сиаловую кислоту
- ◆ Соотношение одно-, двух-, трех- и т.д. антенных олигосахаридов в пуле N-цепей
- ◆ Наличие фукозы в коре N-цепей
- ◆ Определение терминальных остатков
- ◆ Определение типа N-цепей
- ◆ Определение структуры некоторых O-цепей

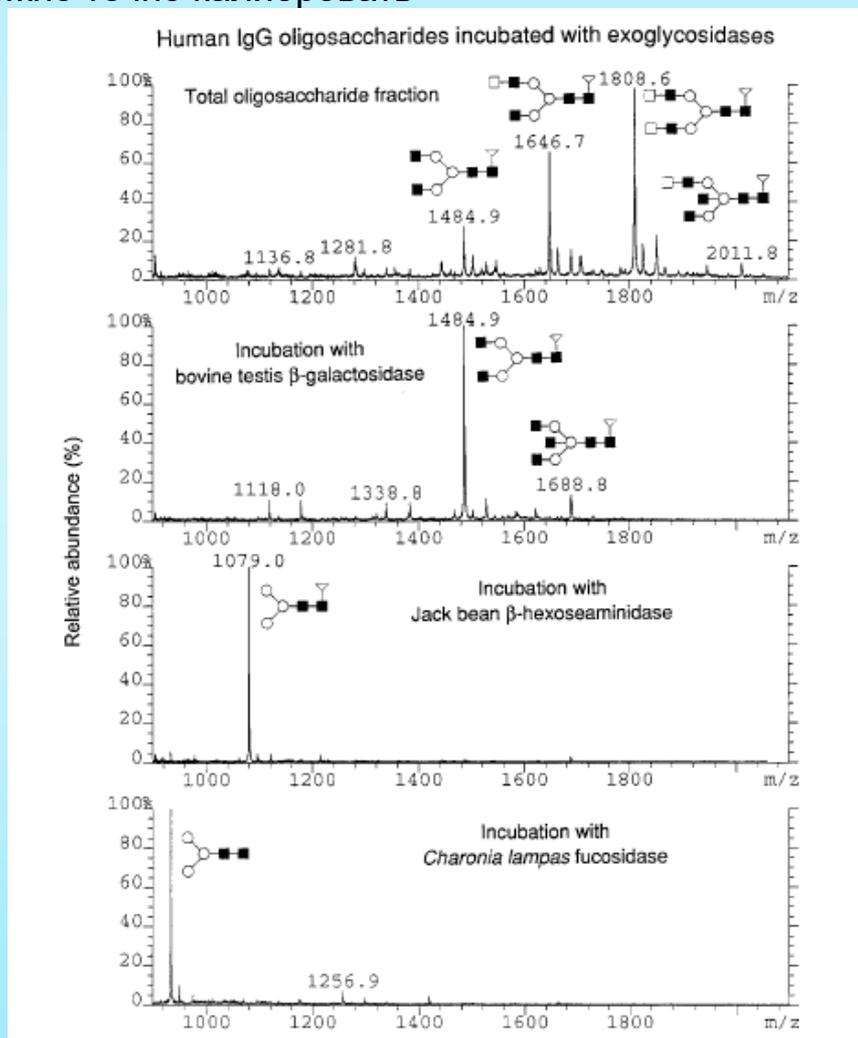
Масс-спектрометрия

MALDI (matrix-assisted laser desorption-ionization) — самый распространенный метод на сегодняшний день

ESI (electrospray-ionization) — удобен, но нужно точно калибровать

Масс-спектрометрия в сочетании с экзогликозидазным отщеплением

Анализ гликопептидов — определение сайтов гликозилирования



Масс-спектрометрия

MSⁿ (tandem MS) — тандемная масс-спектрометрия

- при наличии опыта можно установить полную структуру
- иногда гликаны модифицируют (закрепление восстанавливающего конца и несвязанных OH)

Схема тандемной MS:

Ионизация
1 анализатор
Камера соударений, фрагментация
2 анализатор
Детектор

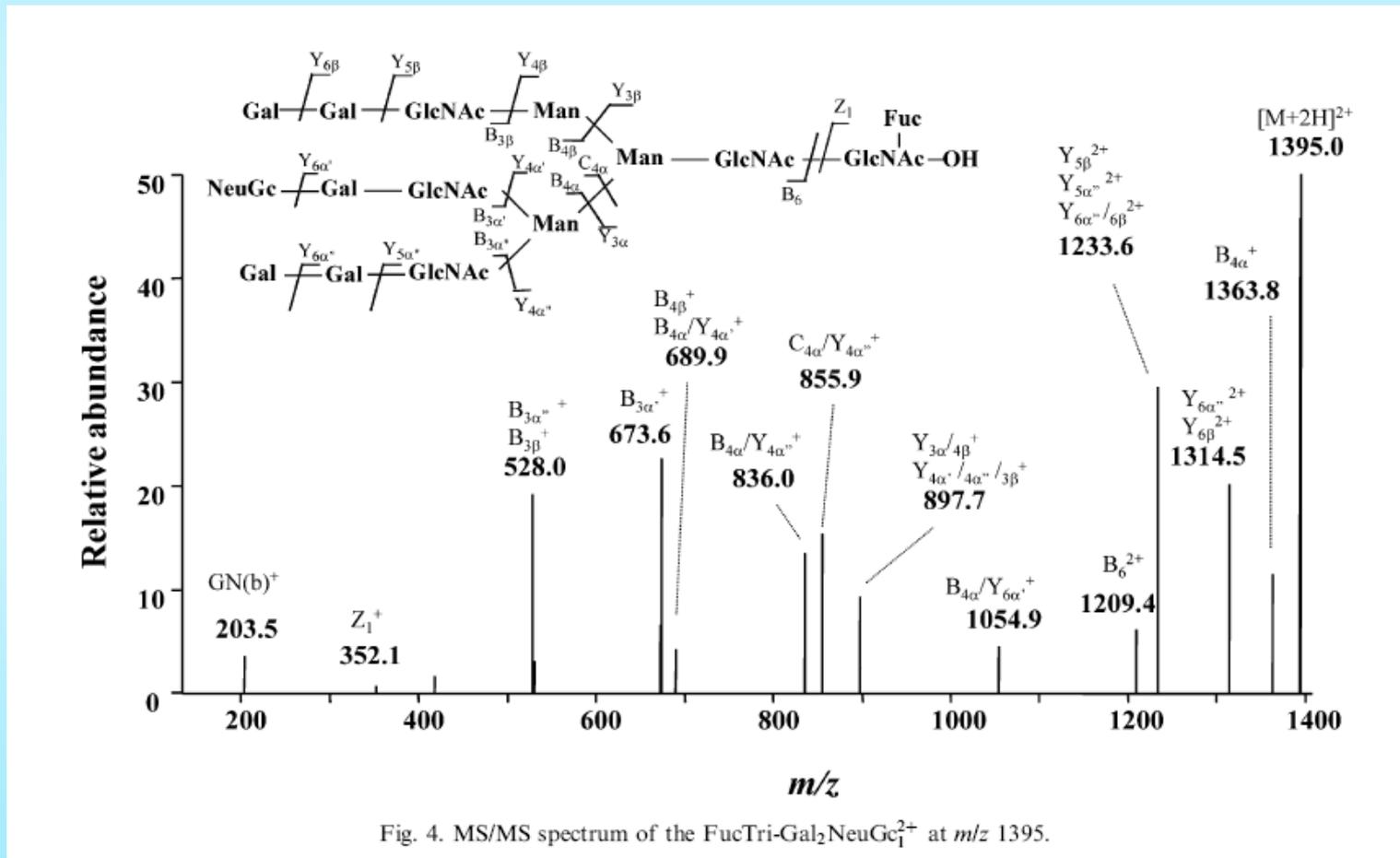
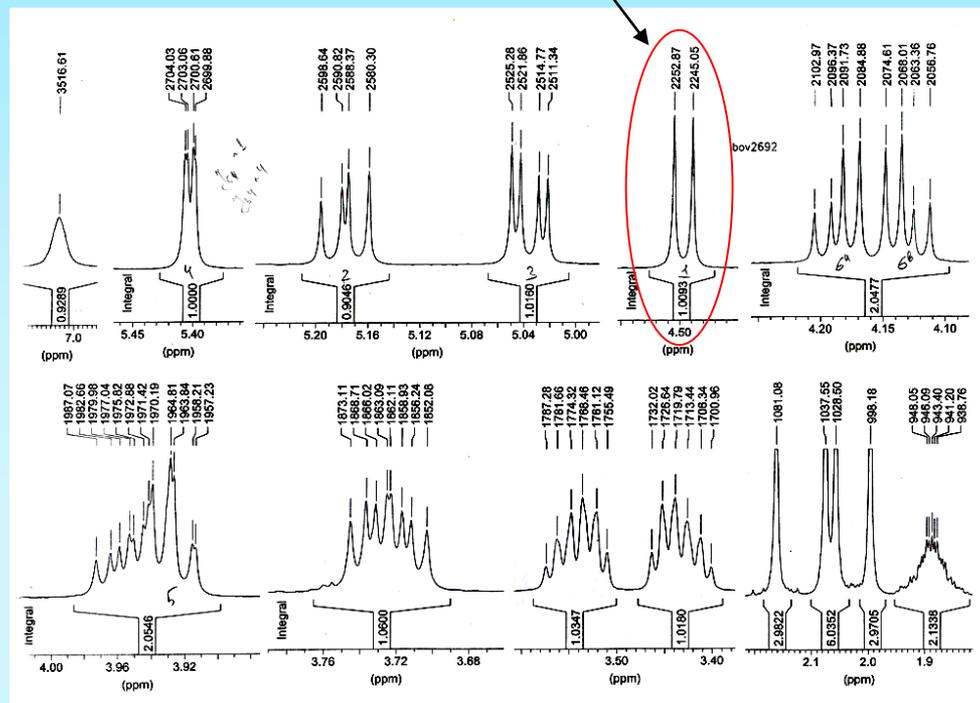
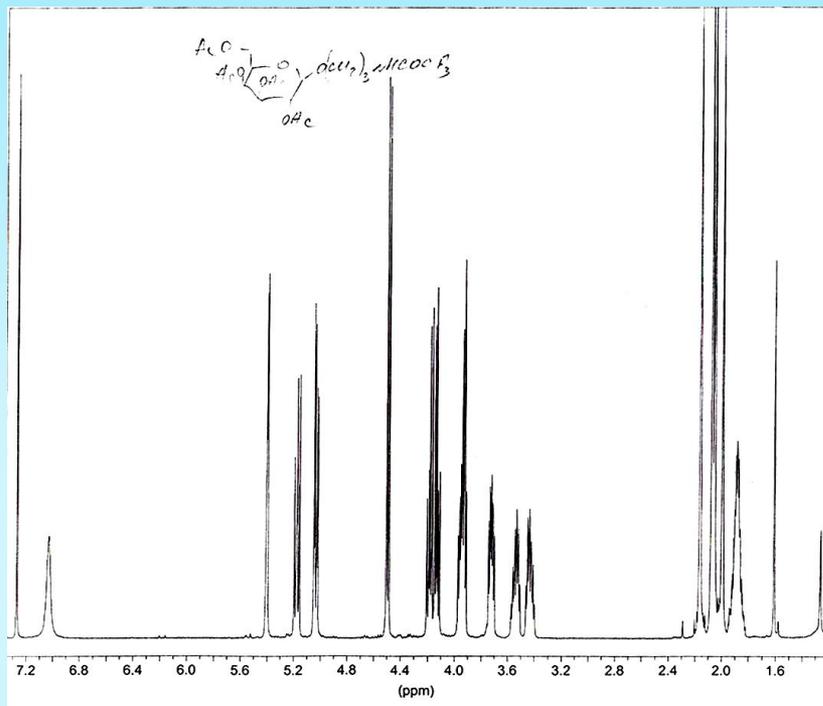


Fig. 4. MS/MS spectrum of the FucTri-Gal₂NeuGc₁²⁺ at m/z 1395.

Недостаток: заместители в 3 и 4 положении различить невозможно



¹H-ЯМР-спектр: информация о взаимном расположении протонов

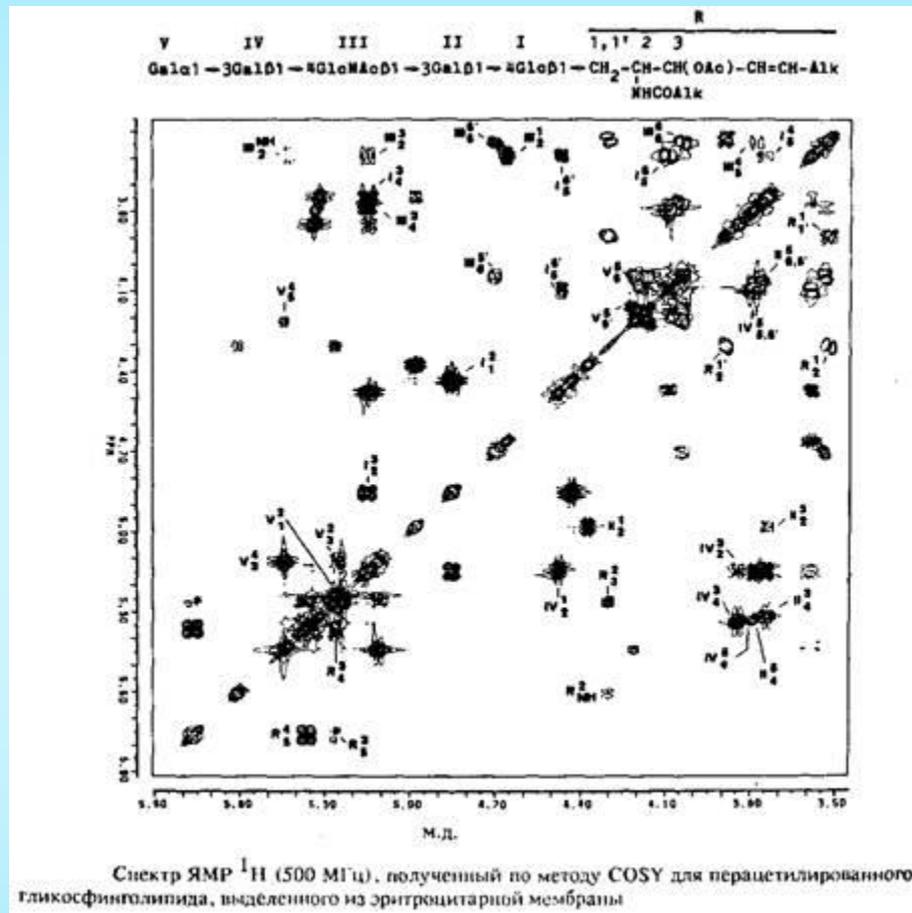
¹³C-ЯМР – информация об абсолютной конфигурации атомов в отдельных моносахаридных остатках

Преимущества: можно узнать практически все о структуре (зависит от опыта)

Недостатки: нужно много материи – минимум 0.5 мг индивидуального вещества, однако приборы последних поколений позволяют работать с десятками мкг.

Двумерный ЯМР – основной метод установления структуры полисахаридов

COSY (correlated spectroscopy (протонные взаимодействия) – стандартный метод двумерной ЯМР-спектроскопии.



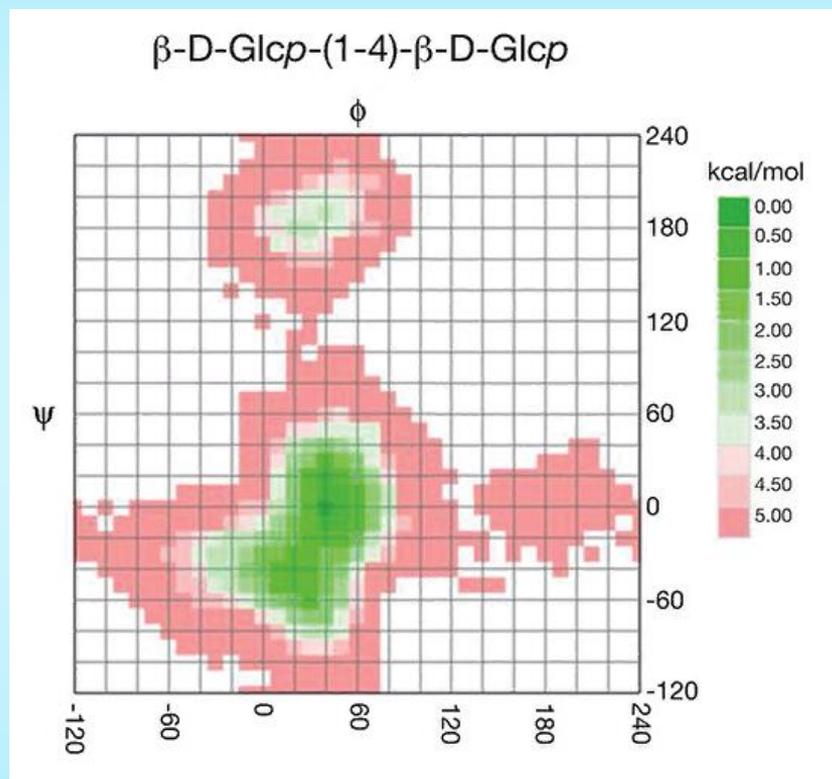
Есть и другие варианты двумерного ЯМР:

- TOCSY (протонные взаимодействия более высокого порядка);
- HSQC и HMQC (гетероядерные взаимодействия) и др.

Позволяет определить как именно атомы находятся относительно друг друга и/или как они соединены друг с другом.

Nuclear Overhauser effect (NOE) – позволяет на основании данных спектра построить 3D-модель гликана

NOE учитывает меж-ядерные и протон-протонные взаимодействия



NOE – ядерный эффект Оверхаузера

Энергетическая карта торсионного угла гликозидной связи между остатками Glc