

Структурный анализ олигосахаридов и полисахаридов

Добрый день. Меня зовут Шилова Надежда Владимировна, и сегодня я представляю вам лекцию, посвященную структурному анализу олигосахаридов. В лекции рассказ пойдет, в основном, анализу структуры О- и N-цепей гликопротеинов, а также полисахаридов. При анализе углеводной составляющей гликолипидов используются все описываемые в лекции подходы

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)

2

Зачем нужно знать об углеводном составе? Во-первых, гликозилирование опосредует и/или влияет на биологическую функцию белка. Приведу очень яркий пример с небезызвестным эритропоэтином, который у всех на слуху в связи с анти-допинговыми скандалами. Но, вообще-то, это очень важное и нужное лекарство, которое особенно нужно людям, прошедшим химиотерапию. Его научились получать рекомбинантно в клеточной системе. И все бы хорошо, но полученный белок не работал. Оказалось, что все дело в гликозилировании этого белка. Для правильного выполнения им своих функций степень гликозилирования (т.е. соотношение (по массе) углеводных остатков и белковой части) должна быть не менее 60%, а степень сиалилирования – не менее 17%. Гликозилирование в целом влияло на выполнение белком его функций, а сиалилирование – на время циркуляции препарата в крови – чем ниже была степень сиалилирования, тем быстрее препарат выводился, и тем ниже была его эффективность. Полученные рекомбинантные белки не «дотягивали» до нужных показателей. Пришлось ввести контроль гликозилирования, в частности, сиалилирования. И эта стадия контроля внесена даже в фармакопейную статью по этому препарату.

Во-вторых, полисахариды бактерий. Для бактерий их полисахариды (я имею в виду в первую очередь грамм-отрицательные бактерии) – это механизм адаптации к окружающей среде. С помощью них они могут мимикрировать, маскироваться, уходить от иммунного надзора. Однако

знание состава их полисахаридов поможет нам создавать высокоэффективные вакцины, изучать механизмы возникновения резистентности к тем или иным препаратам.

Задачи структурного анализа

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

3

В задачи структурного анализа входят следующие пункты: Отмечу, что здесь и далее речь пойдет именно о гликопротеинах. О полисахаридах я скажу отдельно.

1. Степень гликозилирования. Под степенью гликозилирования подразумевается соотношение (по массе) углеводных остатков и белковой части. Известно, что более 50% белков млекопитающих гликозилировано. Степень гликозилирования может варьироваться в очень широком диапазоне – от 1-2% для молекулы IgG, у которого всего 2 углеводных цепи на молекулу белка, до 100% у муцинов.
2. Количество сайтов гликозилирования. Сайты гликозилирования гликопротеинов хорошо известны – это Ser/Thr для O-цепей и триплет аспарагин-X-серин или аспарагин-X-треонин, где X является любой аминокислотой, за исключением пролина. Однако не все сайты могут нести углеводные цепи, т.е. конечная степень гликозилирования может быть очень далекой от ожидаемой.
3. Тип углеводных цепей – O-цепи или N-цепи. Для разных белков характерны разные типы цепей: для каких-то только N-цепи (например IgG)? Для каких-то только O-цепи (например, муцины), есть бели, в которых есть и O- и N-цепи, например все тот же эритропоэтин.
4. Необходимо оценить и степень гетерогенности гликопротеина. Что это такое можно продемонстрировать на примере IgG: у него всего 2

сайта гликозилирования и всего 2 N-цепи, однако к одному сайту одной молекулы может быть присоединен гликан одной структуры, а в другой молекуле к этой же сайту может быть присоединен гликан уже совсем с другой структурой и все эти IgG могут одновременно циркулировать в крови. Иногда гликопротеины могут быть очень близкими по ряду свойств, например, по общему заряду, настолько, что их можно разделить на несколько фракцией – получаются гликоформы. Например, у основного воспалительного белка крови – альфа-кислого гликопротеина – их несколько и отличаются эти гликоформы как степень сиалилирования, так и составом углеводных цепей.

5. И финалом любой структурной работы является установление полной структуры олигосахаридных цепей гликопротеинов или гликолипидов, а также полных структур полисахаридов. Т.е. Какой моносахарид к какому моносахариду прикреплен, в каком положении, с какой конфигурацией гликозидной связи, а также какие заместители в нем есть – фосфаты, сульфаты и т.д. (т.н. элементы декорирования).

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

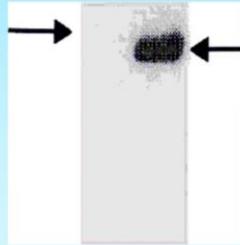
Выращивание клеток в среде с добавлением радиоактивно-меченного моносахарида (или с химически-активной группой) с последующим гель-электрофорезом фракций.

Использование белковых баз данных

В ряде баз данных указываются потенциальные сайты гликозилирования.

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

нативный



модифицированный

4

Итак, первый шаг – как проверить, гликозилирован ли ваш белок.

Можно окрасить белок прямо на блоте. Для этого надо аккуратно провести окисление периодатом, а затем добавить т.н. реактив Шиффа – фуксинсернистую кислоту, которая свяжется с образовавшимися альдегидными группами и окрасит полоску, если белок гликозилирован. Можно окрасить белок специфическими антителами или лектинами (углевод-связывающими белками не иммунной природы), но для этого нужно иметь хотя бы общее представление о том, какие углеводные структуры могут быть на белке.

Можно предварительно отщепить все углеводы и сравнить молекулярный вес до и после. Как это сделать:

1. Обработать с помощью трифторметансульфо кислоты – углеводная часть полностью гидролизуется до моносахаридов, а полипептидная цепь остается без изменений
2. Последовательная обработка экзогликозидазами (т.е. ферментами, которые отщепляют определенные моносахаридные остатки с невозстанавливающего конца гликана) или эндо-гликозидазами (т.е. расщепляющие связь между углеводом и белком). Но об этих ферментах чуть позже. Суть в том, чтобы избавить полипептидную цепь от углеводных остатков.

1-2% изменения мол. веса на электрофорезе можно и не заметить, но если использовать масс-спектрометрию, то можно.

При производстве рекомбинантных белков часто используют метаболический подход. Для этого в питательную среду добавляют радиоактивный моносахарид или с химически-активной группой с последующим анализом белка на гель-электрофорезе.

Если известно, что за белок, то можно посмотреть в белковых базах данных есть ли у него сайты гликозилирования (например, UniProt). Но помните, что наличие сайта гликозилирования не означает реального наличия углеводного остатка.

Этапы структурного анализа

1. Определение моносахаридного состава углеводных цепей

Что дает:

степень гликозилирования,
моносахаридный 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 аминоксахаридов
(например, Ac₂O в смеси пиридин-абс. метанол)

Разрушаются Neu и, частично, Fuc

HPAE разделение (Dionex):

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

Газовая хроматография:

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

5

Как только становится понятно, что белок гликозилирован можно приступать к структурному анализу и начинается он с определения моносахаридного состава.. Что он дает? Собственно, моносахаридный состав (какие моносахариды входят в состав гликанов - Glc, Gal, Man, GlcNAc, GalNAc, Fuc), можно посчитать степень гликозилирования, получить предварительную информацию о типе цепей (N- (есть много GlcNAc), O- (есть GalNAc), маннозобогатые (много Man), лактозаминовые (повышенное содержание Gal и GlcNAc) , гибридные (есть и повышенное содержание Gal и GlcNAc, а также Man) и т.п.).

Анализ проводится следующим образом:

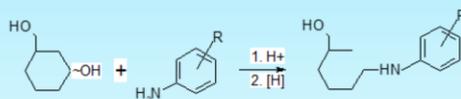
Гликопротеин подвергается тотальному гидролизу с помощью смеси летучих кислот, после упаривания проводится ре-N-ацетилирование для возвращения N-ацетилмов на аминокгруппы, которые теряются в процессе гидролиза. При тотальном гидролизе полностью разрушается нейраминавая кислота, поэтому ее необходимо определять отдельно, а также частично разрушается фукоза, но эти потери можно скомпенсировать введением внешних стандартов, о которых я позже расскажу.

Для того, чтобы определить содержание моносахаридов количественно чаще всего прибегают к хроматографии. Наиболее эффективный, но дорогой вариант - это ионообменная хроматография Дайонекс с пульсамперометрической детекцией. Разделение проводится без дополнительной модификации моносахаридов, а запатентованный

состав сорбента колонки позволяет достоверно разделять все наиболее часто встречающиеся у млекопитающих моносахариды. Если перевести моносахариды в метиловые или триметилсилильные производные, то их можно анализировать с помощью газовой хроматографии.

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

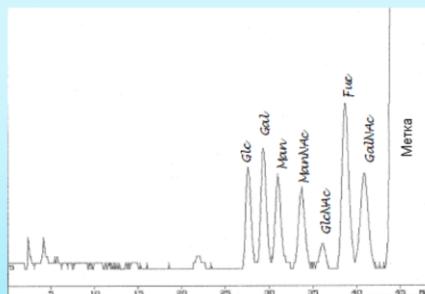
Капиллярный электрофорез: вводят заряженную метку

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



6

Не менее часто прибегают и к введению флуоресцентной метки по восстанавливаемому концу моносахарида. После чего смесь можно разделить и посчитать количественное соотношение с помощью ВЭЖХ или капиллярного электрофореза. В последнем случае метка должна быть заряженной. Наиболее часто для введения метки используется метод восстановительного аминирования – схема реакции приведена на слайде. После введения метки проводят хроматографирование с использованием обращенной фазы (относительно гидрофобная метка также способствует разделению). Во всех хроматографических разделениях для получения достоверных количественных величин необходимо использовать стандарт. Есть 2 типа стандартов – внешний и внутренний. Внутренний стандарт – это моносахарид, максимально близкий по свойствам к определяемым веществам, но не встречающийся в данном образце. Для анализа состава гликопротеинов млекопитающих удобно использовать ManNAc. Но для того, чтобы оценить потери при гидролизе (например, фукозы), необходим внешний стандарт – смесь моносахаридов в известном количестве. Определяя соотношение площадей, можно рассчитать соответствующие поправочные коэффициенты.

Определение нейраминной кислоты

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

Отщепление:

0.1 М ТФУ, либо нейраминидаза, либо 0.25 М NaHSO_4

НРАЕ разделение (Dionex):

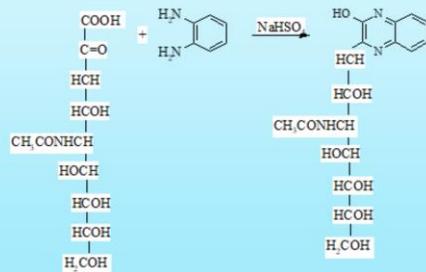
Проводится сразу после гидролиза
Колонка CarboPak PA-1 (4×250 мм, Dionex)
Элюент: NaOAc в NaOH,
амперометрический детектор

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)



Отдельно идет определение сиаловой (или нейраминной) кислоты, т.к. в ходе тотального гидролиза, она полностью разрушается. Какую информацию мы можем получить? Можем определить степень сиалирования, что важно для некоторых фармакологических препаратов (вспомните историю с эритропоэтином), тип сиалирования – N-ацетил или N-гликолил нейраминная кислота. Первая – нормальный компонент человека и животных, вторая – встречается только у животных и является ксено-антигеном, контролировать содержание которых крайне важно.

Отщепляют сиаловую кислоту в мягких кислых условиях и далее проводят разделение либо с помощью ионообменной хроматографии Дайонекс без предварительной модификации, либо на ВЭЖХ, предварительно введя метку. Метку можно ввести избирательно, т.к. сиаловая кислота – это кетокислота, которая реагирует с ароматическими диаминами, например, с о-фенилендиамином. Полученный продукт – флуоресцирует. Здесь тоже важны стандарты. В качестве внутреннего стандарта удобно использовать N-пропионилнейраминную кислоту, а в качестве внешнего – 3'-сиалиллактозамин.

Для фармакологических препаратов, когда степень сиалирования велика и проблем с количеством препарата нет, используют т.н. резорциновый метод. Метод основан на том, что при нагревании сиаловых кислот с резорцином в присутствии минеральных кислот

образуется хромоген, структура которого до сих пор неизвестна. Однако реакция достаточно хорошо отработана и, используя калибровочные кривые растворов с заведомо известной концентрацией сиаловой кислоты, можно определить ее содержание в исследуемом образце от 5 до 30 мкг/мл. Т.е. чувствительность невысокая, а также нельзя сделать дифференцировку между N-ацетил или N-гликолил нейраминовой кислотой, но для производства метод очень удобен, т.к. он делается быстро и не требует сложного оборудования.

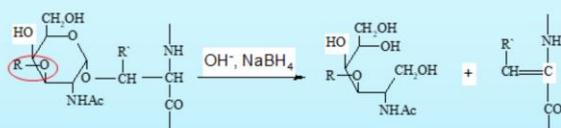
Этапы структурного анализа

2. Определение структуры ОС

2.1. Отщепление ОС от пептида/белка

О-цепи (щелочеллабильные)

Отщепление NaOH-NaBH₄



Белок частично разрушается. Без восстановителя протекает «пилинг»

8

Итак, переходим к следующему этапу - к определению структуры олигосахаридов. Для этого надо отщепить гликан от белка или пептида. Здесь нам очень пригодится информация, которую мы получили ранее в ходе анализа моносахаридного состава – у нас N-цепи или O? От этого зависит стратегия отщепления.

Если это O-цепи, то гликаны присоединены через Серин-Треонин простой эфирной связью. Такие цепи являются щелочеллабильными и легко отщепляются в присутствии основания как показано на схеме. Белок при этом частично разрушается. А зачем же здесь восстановитель – боргидрид натрия? Дело в том, что если отщепляемый гликан не восстанавливать, то с большой долей вероятности пойдет реакция т.н. пилинга, и мы рискуем потерять весь гликан.

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

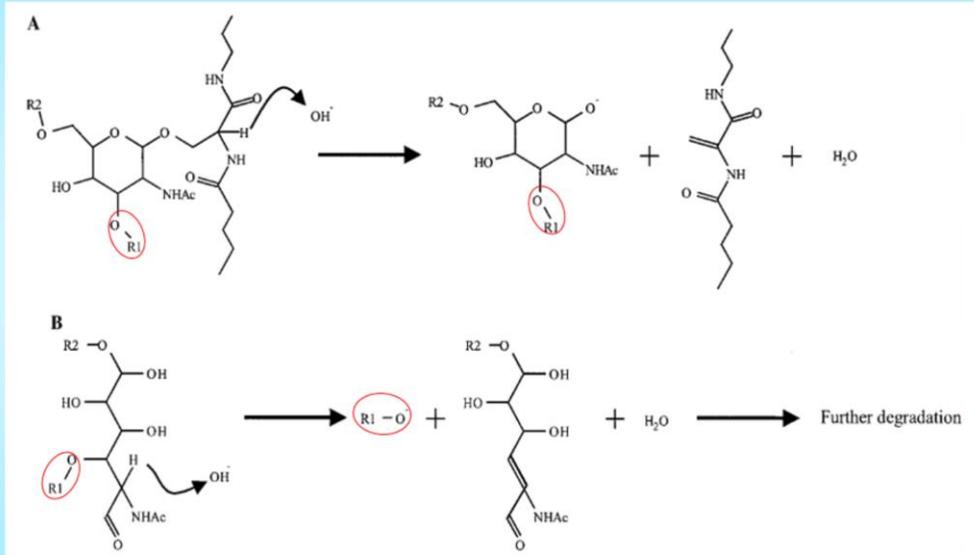
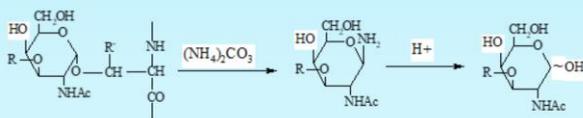


FIG. 1. The mechanism of alkaline β -elimination (A) and degradation ("peeling") of oligosaccharides in an alkaline environment (B). R1 and R2 are extensions of the GalNAc at C-3 and C-6, respectively.

На слайде представления реакция «пилинга», которая хорошо известна из пептидной химии как бета-элиминирование. В результате атаки гидроксила гликан отщепляется в виде карбаниона. А если у него есть заместитель в 3-ем положении (обведено красным), являющийся хорошей уходящей группой, то происходит перегруппировка, расщепление гликозидной связи в результате чего опять образуется карбанион R1, а первый моносахаридный остаток уходит в «покалеченном виде». Если в R1-остатке снова есть заместитель в 3-ем положении, то реакция элиминирования продолжается, т.е. моносахаридные остатки сшелушиваются как при пилинге и этот процесс останавливается, только если у карбаниона не такого заместителя. Либо можно остановить эту реакцию в самом начале, если добавить восстановитель – например, боргидрид натрия. На выходе мы получим стабильный альдитол.

О-цепи (щелочелabileные)

Отщепление карбонатом аммония



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

Минимален «пилинг» и дезацетилирование. Очень низкий выход

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

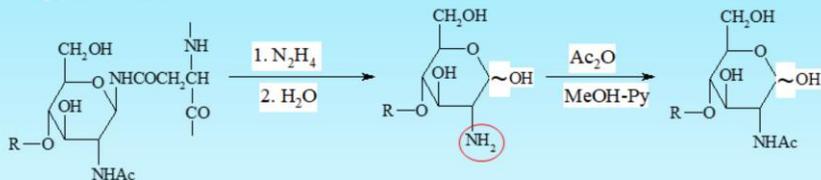
10

Устранить проблему пилинга можно, если уменьшить количество воды в реакционной смеси (как источник гидроксила). Как возможный вариант – это обработка насыщенным раствором карбоната аммония. Однако, наш опыт использования этой реакции показал, что выход отщепления настолько низок, что использовать эту реакцию нецелесообразно.

Отдельно отмечу возможность использования ферментов. Следует отметить, что углевод-превращающие ферменты, как правило, имеют очень узкую специфичность. Поскольку разнообразие коровых частей О-цепей очень большое, то ферменты используют только в тех случаях, когда они известны или есть какие-то предпосылки к ним.

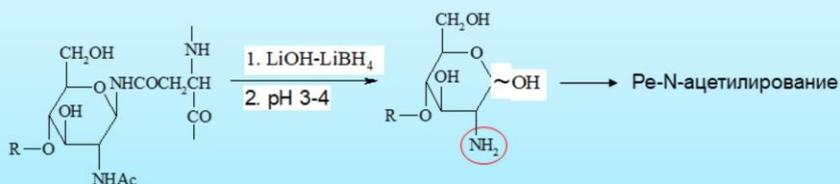
N-цепи

Гидразиолиз



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 аминоальдитолов

11

Химическое отщепление N-цепей проходит в более жестких условиях, т.к. гликан присоединен к пептидному кору амидной связью. Белок, как правило, разрушается полностью или до пептидов, теряются т.н. элементы декорирования – ацетаты, сульфаты и т.д. Отщепить можно либо безводным гидразином, либо смесью гидроксида лития с соответствующим боргидридом (для закрепления восстанавливающего конца). В первом случае проведение отщепление возможно в микромасштабе, во втором – нет, т.к. требуется стадия очистки от пептидов.

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 A (PNG-asa A 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.



12

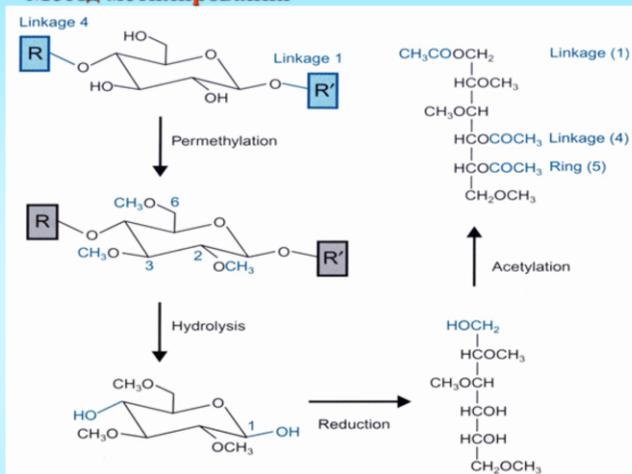
Несмотря на свою химическую стабильность, T-цепи весьма эффективно можно отщепить с помощью ферментов, т.к. коровая структура у них почти всегда одна и та же – см. верхнюю часть слайда. Легкость отщепления ферментами, а также их доступность в рекомбинантной форме, сделало этот способ очень популярным и свело практически на нет химические способы отщепления. Наиболее популярной является пептид-N-гликаназа F из *Flavobacterium meningosepticum*. Она отщепляет практически все N-цепи с единственным ограничением – она не активна по отношению к гликанам, имеющим $\alpha(1-3)$ -заместители у первого GlcNAc

(часто это Fuc $\alpha 1-3$, т.е. большинство гликанов растительного происхождения). Менее популярна, но не менее полезна пептид-N-гликаназа A из миндаля. У нее самая широкая специфичность и единственным ограничением является лишь то, что белок надо сначала пощепить на пептиды. Интересен фермент эндогликозидаза Endo H из *Streptomyces plicatus*. Этот фермент отщепляет большинство цепей комплексного типа и маннозобогатые цепи. **НО!**

Расщепляет связь между двумя остатками GlcNAc в хитобиозном коре как показано на рисунке – в олигосахариде остается только один остаток GlcNAc.

2.2. Установление структуры

Метод метилирования



Метанолиз:

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

Гидролиз:

2 М ТФУ

Ацетилирование:

As₂O в пиридине.

Как альтернатива: ТМС-производные

Анализ продуктов:

ГХ-МС

Достоинства:

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

Недостатки:

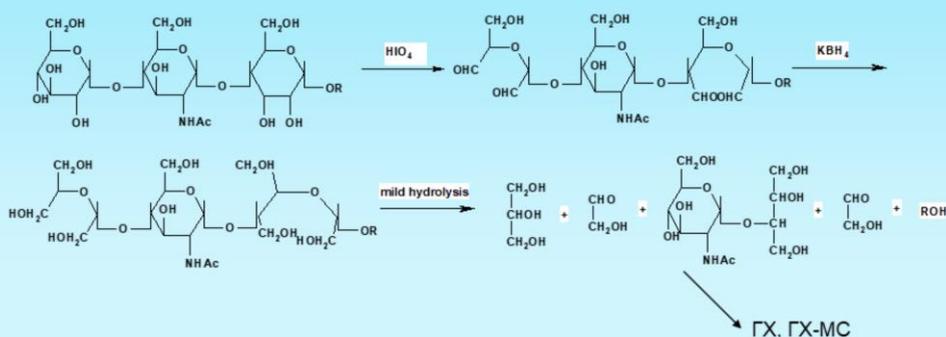
Метод очень трудоемок, нет информации о последовательности и аномерной конфигурации связи, при гидролизе разрушается Neu

Удобен при анализе полисахаридов и O-цепей

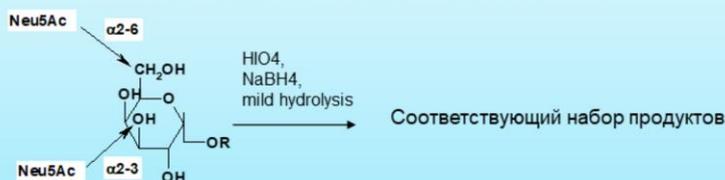
13

После того, как олигосахарид отщепили переходим к процессу установления структуры. Начну с метода, который был одним из первых, но, тем не менее, актуальности своей не потерял и по-прежнему применяется для анализа структуры полисахаридов, а иногда и O-цепей. Итак, метод метилирования. На первой стадии в этом методе проводят метилирование всех свободных гидроксильных групп по методу Куна или Хеурса. Затем тотально гидролизуют, восстанавливают до альдитолов и гидроксильных групп, которые были заняты в гликозидных связях, ацетилируют, либо переводят в тетраметил-силильные производные. Далее анализируют состав получившихся продуктов методом газовой хроматографии, сопоставляя их со стандартами, и получают следующую информацию о структуре: моносахаридный состав, тип связи между остатками, заместители и т.д. Однако, метод очень трудоемок, нет информации о последовательности и аномерной конфигурации связи, при гидролизе разрушается сиаловая кислота.

Метод периодатного окисления



Можно определить тип связи между ОС и нейраминовой кислотой:



14

Для анализа полисахаридов и в ряде других случаев отлично используют метод периодатного окисления. Он основан на способности периодата окислять вицинальные гидроксилы. После окисления проводится восстановление образовавшихся альдегидов с последующим тотальным гидролизом. Продукты реакции анализируются с помощью газовой хроматографии, часто в сочетании с масс-спектрометрией и результаты сравниваются со стандартами. С помощью этого метода можно красиво определить тип связи между гликаном и сиаловой кислотой. Известно, что сиаловая кислота присоединяется к галактозе либо по 3, либо по 6 положению. Если связь 2-6, то в галактозе остается вицинальные диолы, которые можно окислить периодатом, а если связь 2-3, то диолов нет и окисление по галактозе не происходит. Т.е. после окисления-восстановления-гидролиза получается 2 совершенно разных набора продуктов, что позволяет сделать заключение о типе связи уже не переживая за то, что при тотальном гидролизе нейраминовая кислота разрушится.

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 (HPLC) –

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

15

Очевидно, что для более тонкого анализа олигосахаридов их необходимо разделить на максимально число компонентов, в идеале – на индивидуальные олигосахариды. Однако если вспомнить, насколько разнообразны могут быть гликаны, сделать это не просто. На помощь нам приходит ВЭЖХ во всех ее видах – основные виды ВЭЖХ, которые применяются для разделения гликанов приведены на слайде. Каждый вид пригоден для своего, определенного шага в разделении – где по размеру, где по заряду и т.д. Наибольшей разделяющей способностью обладает анионообменная хроматография от Dionex, в которой можно использовать гликаны в нативном виде, сразу после отщепления. Для остальных же видов ВЭЖХ для увеличения чувствительности требуется вводить флуоресцентную метку.

Хроматографическое картирование

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

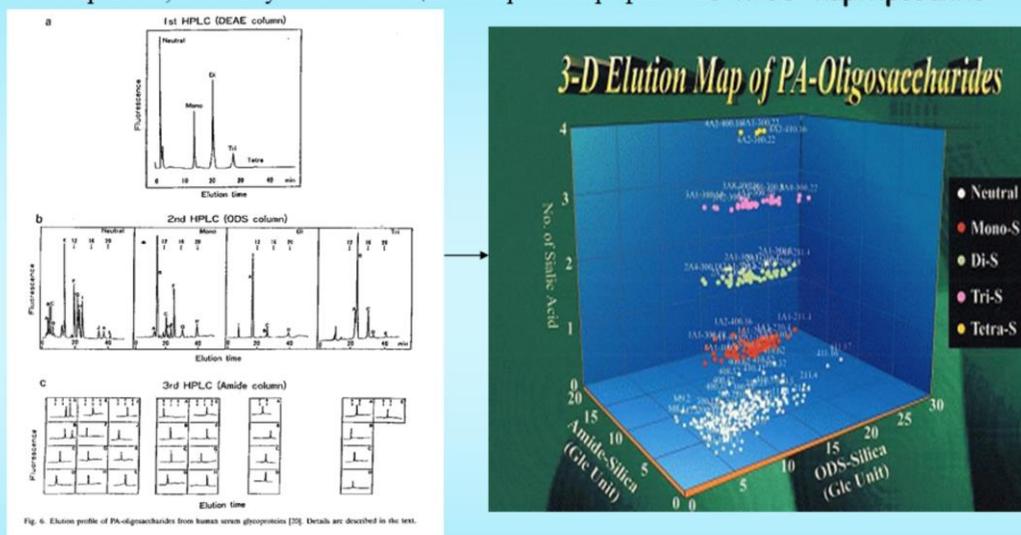


Fig. 6. Elution profile of PA-oligosaccharides from human serum glycoproteins [25]. Details are described in the text.

Основное понятие – **глюкозная единица**

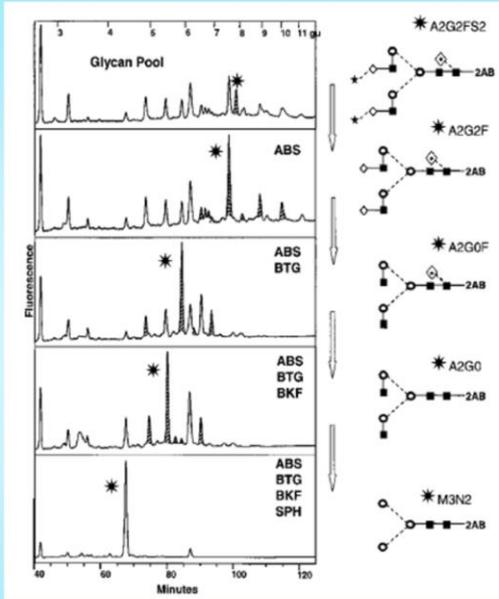
Глюкозные единицы – это число остатков глюкозы (n) в олигодекстрине, используемых для калибровки колонки, однако в приложении к другим олигосахаридам - это условные единицы, характеризующие молекулярный размер олигосахаридов.

16

На этом этапе известно: размер ОС, информация о заряде, об антенности, о наличии доп. заместителей

Также очевидно, что одного вида хроматографии не достаточно для того, чтобы разделить на максимальное число компонентов (даже если использовать Dionex). Поэтому используют т.н. 2-х и 3-х мерное картирование, т.е. комбинацию хроматографических разделений, когда фракции, получаемые после разделения одним видом хроматографии направляют на другую хроматографию и т.д. (как показано на схеме слева). Для того, чтобы как-то стандартизовать результаты было введено понятие «глюкозная единица», т.е. число остатков глюкозы (n) в олигодекстрине, используемых для калибровки колонки, однако в приложении к другим олигосахаридам – это условные единицы, характеризующие молекулярный размер олигосахаридов. На основании глюкозных единиц строят 2- или 3-D-карты (рисунок справа) и далее каждый новый образец подвергают разделению на калиброванных колонках в нежной последовательности и полученные координаты из глюкозных единиц наносят на карту. Т.о. можно узнать о размере олигосахида, информацию о заряде, об антенности, о наличии доп. заместителей. Особенно в этом вопросе преуспели японские исследователи.

Последовательное ферментативное щепление



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

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

17

Для установления более тонких элементов структуры (положение и тип связи у заместителей, например) прибегают к т.н. последовательному ферментативному щеплению. Здесь мы используем высокую специфичность гликозидаз – они очень чувствительны к заместителям, типу связи между остатками, размеру гликана и т.д. Общая схема приведена на слайде: на первом этапе мы имеем хроматографический профиль и нас интересует гликан со звездочкой. Мы подвергаем смесь десиалалированию с помощью нейраминидазы и видим, что хроматографический анализ полученной смеси показывает, что пик сместился, т.е. гликан был сиалилированным. Далее обрабатываем галактозидазой – и опять наблюдаем смещение пиков, т.е. если заместители и есть, то они не у остатка галактозы, иначе фермент не сработал бы. Далее обрабатываем фукозидазой – опять наблюдаем смещение некоторых пиков, что означает наличие фукозы в качестве заместителя. Пики сместились не все – значит, фукоза есть не на всех гликанах. Финальная обработка ферментом, отщепляющим GlcNAc приводит нас к одному пику – т.н. 5-OS, коровой структуре всех N-цепей, что также дает нам информацию о том, что у GlcNAc, которые были на антенне заместителей не было, иначе фермент не сработал бы. Т.е. имея представительный набор лигандов в сочетании с ВЭЖХ можно сказать практически все о структуре олигосахаридов. Это и определение степени и типа сиалирования, типа связей, положение фукозы и др. заместителей (HSO_3^- , PO_4^{3-}), аномерная конфигурация каждого

остатка. К

Недостаткам можно отнести трудоемкость (стандарты) и доступность ферментов. Тем не определить наличие ксеноантигена на углеводных цепях (т.е. α Gal-терминации) можно только с помощью α -галактозидазы и ВЭЖХ (или масс-спектрометрии, о которой я расскажу позже).

Электрофорез

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

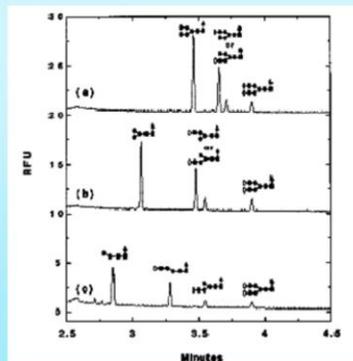
ПАГЭ

- 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



Не могу не отметить использование электрофоретических методов анализа в сочетании с флуоресцентной детекцией для установления структуры. Как правило, в ОС предварительно вводят заряженную метку, что облегчает разделение. Применяется для этой цели относительно масштабный полиакриламид-гель-электрофорез, который хорош, когда образца много. Часто используют капиллярный форец, в котором можно добиться высокой чувствительности и степени разделения выбором метки, буфера, системы детекции. Также он применим в последовательном ферментативном щеплении и в комбинации с ВЭЖХ.

На недавней конференции по гликобиологии был представлен прибор для капиллярного электрофореза от Agilent, разработанный специально для анализа гликанов рекомбинантных иммуноглобулинов с соответствующей базой данных по электрофоретической подвижности наиболее распространенных олигосахаридов для применения в фармацевтической промышленности (для контроля качества).

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

19

В связи с возрастающим интересом к гликозилированию белков сам анализ был поставлен на коммерческие рельсы. Первый пример – это прибор для капиллярного электрофореза от Agilent, о котором был рассказ на предыдущем слайде, второй пример – компания Ладгер, которая использует хроматографический метод и оказывает полный спектр услуг начиная от моносахаридного состава и заканчивая определением структуры.

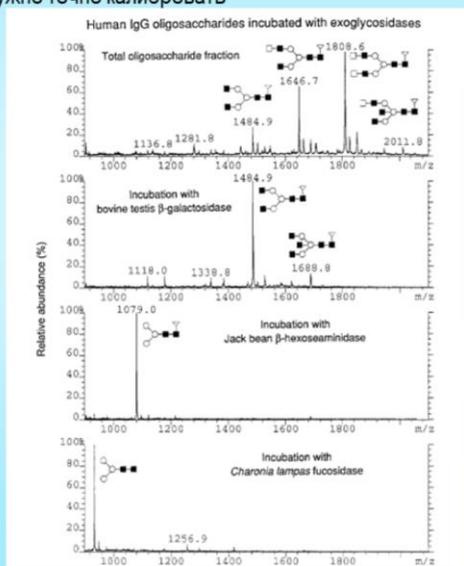
Масс-спектрометрия

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



20

Не менее популярным методом для анализа структуры гликанов является масс-спектрометрия. В последние 10 лет он занял лидирующие позиции в этой области. Используется и формат Малди и электроспрей. Последний требует тщательной калибровки, поэтому менее популярен. Применяют масс-спектрометрию и в сочетании с экзогликозидазным щеплением (на слайде вы видите аналогичную ВЭЖХ схему анализа). Однако с помощью масс-спектрометрии можно пойти и глубже – можно определять реальные сайты гликозилирования, анализируя гликопептиды.

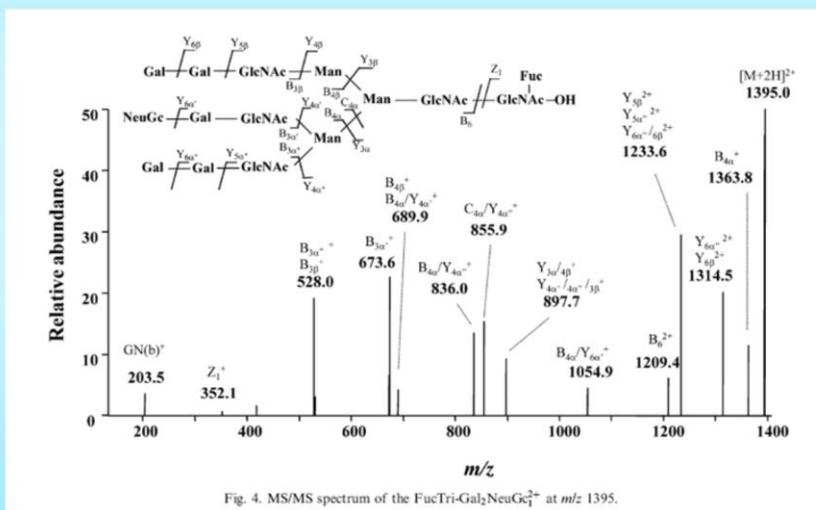
Масс-спектрометрия

MSⁿ (tandem MS) — tandemная масс-спектрометрия

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

Схема tandemной MS:

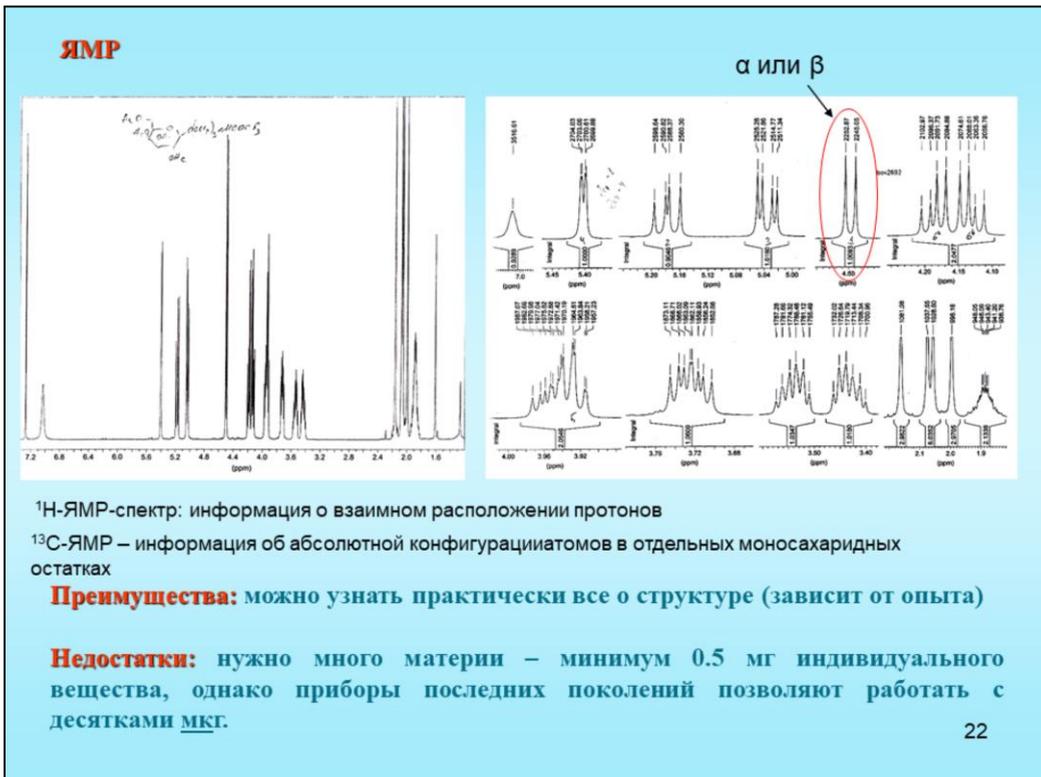
Ионизация
1 анализатор
Камера соударений, фрагментация
2 анализатор
Детектор



Недостаток: заместители в 3 и 4 положении различить невозможно

21

Особую популярность в структурном анализе олигосахаридов масс-спектрометрия приобрела благодаря возможностям tandemной масс-спектрометрии, которая позволяет проводить дефрагментацию выбранных ионов. Связи, по которым происходит дефрагментация уже хорошо известны (они показаны на рисунке), поэтому имея прибор с хорошей разрешающей способностью и хороший опыт, то можно сказать о структуре очень много. Однако когда речь идет о сложной смеси, то без хроматографического разделения, конечно, не обойтись. Кроме того, с помощью масс-спектрометрии невозможно различить заместители в 3 и 4 положении, в то время как некоторые виды ВЭЖХ это сделать позволяют.

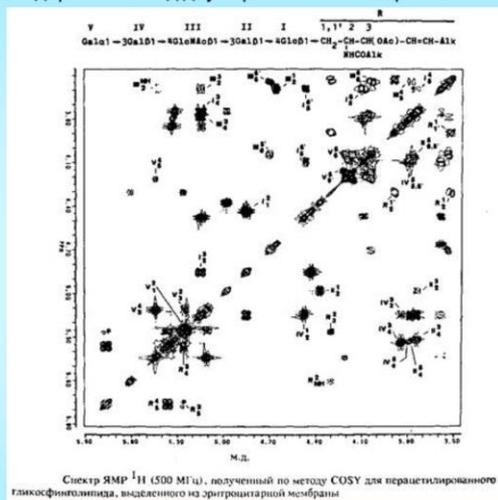


Конечно, нельзя не сказать о методе ЯМР при установлении структуры олигосахаридов. Для этого используют, в основном, вариант протонного магнитного резонанса. Реже – углеродного. Все протоны олигосахаридов обладают специфическим положением пика или пиков в спектре, которое зависит от соседних протонов. На рисунке приведен пример ПМР-спектра для полностью замещенной галактозы. Наиболее характерным является сигнал, соответствующий положению протона при аномерном углероде: если тип связи бета, то сигнал расщепляется и мы видим дублет, если альфа – то синглет. Углеродный ЯМР используют для получения информации об абсолютной конфигурации атомов в моносахаридных остатках. Т.е. используя ЯМР можно узнать все о структуре гликана, если

- Смесь гликанов относительно несложная
- гликаны есть в достаточном количестве. Для хорошего спектра требуется минимум 0.5 мг индивидуального вещества, в последнее время появились более чувствительные приборы, где требуется десятки мкг. Но вещества должны быть индивидуальными, т.е. без разделения тоже не обойтись.

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.

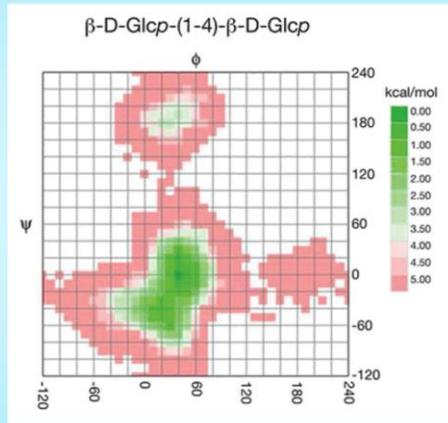
Позволяет определить как именно атомы находятся относительно друг друга и/или как они соединены друг с другом.

23

Для полисахаридов, ЯМР – основной метод установления структуры. Чаще всего его используют в двумерном варианте, когда изучают атомные взаимодействия разных порядков - как гомоядерные (например, протонные), так и гетероядерные. Такие подходы позволяют определить как именно атомы находятся относительно друг друга и/или как они соединены друг с другом. Наиболее часто применяемым является режим COSY – гомоядерная корреляционная спектроскопия.

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

24

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453059/>

Для изучения трех-мерной структуры гликанов используют ядерный эффект Оверхаузера – это явление увеличения ядерного магнитного резонанса в спектрах ЯМР, связанное с межядерным расстоянием. Междоатомные расстояния, определяемые по методу NOE способны помочь в определении трёхмерной структуры молекулы и уточнении моделей молекулярной механики и динамики. В качестве примера на рисунке приведена энергетическая карта торсионного угла гликозидной связи в целлобиозе.

Конец лекции.