

УДК 543.635.24:543.544:543.215/216:616.15

ФРАКЦІОНУВАННЯ ПО ЗАРЯДУ ВІЛЬНИХ ОЛІГОСАХАРИДІВ ПЛАЗМИ КРОВІ ПРАКТИЧНО ЗДОРОВИХ ДОНОРІВ

Письменецька І.Ю.¹, Баттерс Т.Д.²

¹*Дніпропетровська державна медична академія, Дніпропетровськ, Україна*

²*Інститут глікобіології Оксфордського університету, Оксфорд, Велика Британія*

E-mail: pirina2004@list.ru

Внутрішньоклітинні вільні олігосахариди можуть бути як нейтральними, так і зарядженими, в залежності від їхнього джерела. Робота присвячена дослідженню гетерогенності по заряду вільних олігосахаридів плазми крові, джерела яких досі не з'ясовані. Вільні олігосахариди плазми крові практично здорових донорів розподіляли на фракції незаряджених (нейтральних) та заряджених (кислих) гліканів шляхом іонообмінної хроматографії. Глікани фракцій аналізували нормальнофазовою високоефективною рідинною хроматографією. Показано, що більша частина вільних олігосахаридів – це незаряджені глікани, які концентрувалися у 7 головних піках ВЕРХ-спектру та склалися з 4-8 моносахаридних залишків. Спектр заряджених олігосахаридів характеризувався двома головними піками гліканів з 4-5 та 8-9 моносахаридних залишків.

Ключові слова: вільні олігосахариди, плазма крові, іонообмінна хроматографія гліканів, ВЕРХ-спектри гліканів.

ВСТУП

Вільні олігосахариди (ВО) – незв'язані аналоги гліканів глікокон'югатів – виникають при синтезі та деградації глікопротеїнів, гліколіпідів, протеогліканів та глікозилфосфотидилінозитольних якорів. Внутрішньоклітинні ВО можуть бути як нейтральними, так і зарядженими, в залежності від їхнього джерела.

Глікозилювання глікокон'югатів відбувається шляхом котрансляційного (у ендоплазматичному ретикулумі - ЕПР) чи посттрансляційного (у апараті Гольджі) перенесення вуглеводів на протеїн чи ліпід з подальшою їх модифікацією.

Особливість контрансляційного глікозилювання – це синтез вуглеводу – попередника. Початок синтезу здійснюється на зовнішньому боці мембрани ЕПР поетапним приєднанням моносахаридів до доліхолдіфосфату, а продовжується всередині ЕПР до утворення структури $\text{Glu}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$, де Glu -це глюкоза, Man - маноза, GlcNAc - N-ацетилглюкозамін. На будь-якій стадії синтезу глікани можуть відщеплюватися від доліхолу з утворенням фосфорильованих (з цитозольного боку) чи нефосфорильованих (всередині ЕПР) вільних олігосахаридів (ВО), які потрапляють до цитоплазми, а потім до лізосом та у обох компартментах клітини поступово розщеплюються [1]. Так, на цитозольному боці ЕПР процес деглікозилювання під дією пірофосфатази призводить до появи олігоманозидфосфатів – фосфорильованого $\text{Man}_5\text{-GlcNAc}_2$ та, можливо, $\text{Man}_5\text{-}$

GlcNAc₂ [2]. Всередині ЕПР зрілий глікан-попередник може відщеплюватися від носія та переноситися до цитозолу. Таким чином з'являються нейтральні вільні олігосахариди – поліманозні глікани з залишками глюкози [3].

Асоційована з ендоплазматичним ретикулулом деградація (ERAD – endoplasmic reticulum associated degradation) є також джерелом нейтральних ВО – продуктів розщеплення глікопротеїнів з порушенням фолдінгу – Man₇-GlcNAc₂, Man₆-GlcNAc та Man₅-GlcNAc [4–6].

Процес глікозилювання у апараті Гольджі може бути джерелом ВО за рахунок зворотної ретротранслокації до ЕПР глікопротеїнів з аберантною структурою [7, 8]. Деградація глікокон'югатів у лізосомах призводить до появи сialьованих гліканів та продуктів їхнього поетапного розщеплення [9].

З якого компарменту чи компартментів клітини (цитозолу, ЕПР, апарату Гольджі чи лізосом), за яким механізмом та які саме вільні олігосахариди потрапляють до плазми крові – невідомо. Ретельний аналіз структури гліканів може дати на це відповідь.

У попередніх дослідженнях були отримані ВЕРХ-спектри загального пулу вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів [10]. Метою даної роботи було з'ясування того, гомогенний чи гетерогенний цей пул по заряду.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Плазма крові практично здорових донорів (n=10) була зібрана у Дніпропетровській медичній академії. Донори були у віці від 46 до 52 років.

У роботі застосовували реактиви фірм VWR International та Sigma-Aldrich.

Депротейнізацію нативної плазми проводили шляхом осадження білків 10% трихлорцтовою кислотою (ТХО) з наступним центрифугуванням впродовж 10 хвилин при 3000 об/хв. [11]. Залишки білків з плазми вилучали шляхом фільтрації за допомогою фільтру з гідрофільною поліфлуороетиленовою (PTFE) мембраною (Millex-LH, 0.45 μm, Millipore Corp., США) згідно [12]. Для вилучення глюкози з біологічної рідини застосовували адсорбційну хроматографію на пористому графіті з використанням колонки PGC (Thermo Electron Corp., Runcorn, UK) на 1мл (25мг/мл) згідно з методикою [12].

Вільні олігосахариди маркували 2-амінобензойною (антраніловою) кислотою - 2-AA (Sigma - Poole, Dorset, Велика Британія) згідно з методикою, наведеною у роботі Neville D.C.A. et.al. [13]. Очищення 2-AA-маркованих олігосахаридів проводили шляхом твердофазної екстракції на колонках Speed SPE Cartridges Amide-2, (Applied Separations, США) [12].

Марковані глікани поділяли на нейтральні та заряджені іонообмінною хроматографією на QAE- Sephadex (Q25-120) після нанесення їх на колонку та промивки Milli-Q™ H₂O шляхом елюції нейтральних гліканів оцтовою кислотою, а заряджених - амоній ацетатом згідно з Neville D.C.A. et al.[13].

Аналіз маркованих олігосахаридів проводили шляхом нормальнофазової вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на хроматографі фірми Waters (Велика Британія) з колонкою 4.6x250-mm TSK gel-Amide 80 (Anachem, Luton, Beds, Велика Британія) згідно з методикою, наведеною у роботах Neville D.C.A. et.al.

[13,14]. Хроматографічні піки характеризували у глюкозних одиницях (ГО) шляхом порівняння із глюкозними олігомерами частково гідролізованого декстрану в якості зовнішнього стандарту згідно з Neville D.C.A. et al.[13].

Для збору та обробки даних застосовували комп'ютерні програми Waters Millennium чи Waters Empower, Peak Time та Microsoft Office Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Загальний пул вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів було проаналізовано с точки зору поліморфності по заряду. ВО розподіляли на 2 фракції – нейтральні (незаряджені) та кислі (заряджені) глікани – шляхом іонообмінної хроматографії та аналізували загальний пул та кожну з фракцій нормальнофазовою високоефективною рідинною хроматографією. Досліджували олігосахариди, що мали у своєму складі 4 та більше моносахаридних залишків, тому аналізували ВЕРХ-спектри у відрізку часу від 20 до 45 хвилин.

Аналіз спектрів виявив гетерогенність ВО плазми крові по заряду – рис.1. Переважну більшість гліканів складала нейтральні ВО (1В) і лише незначна частина приходилася на кислі олігосахариди (1С).

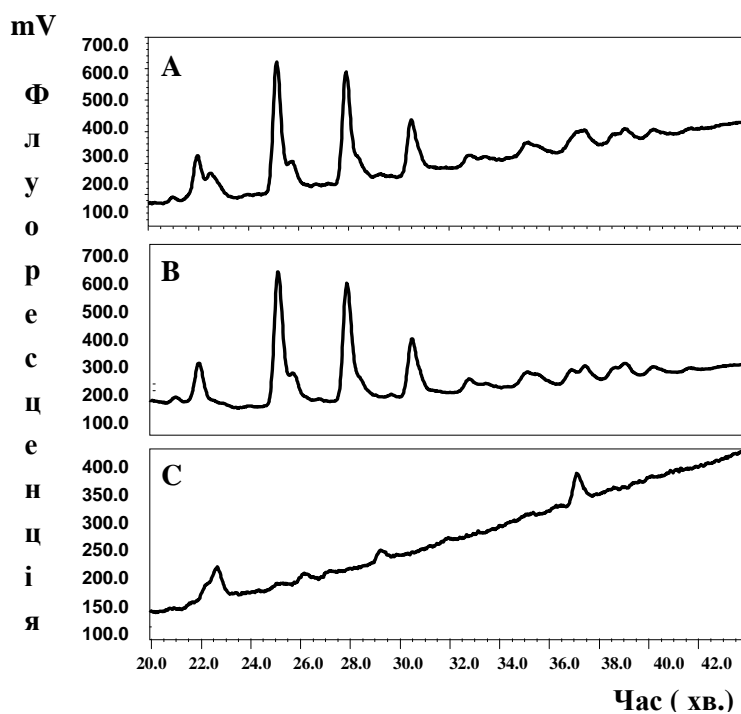


Рис.1. ВЕРХ-спектри загальних (А), незаряджених (В) та заряджених (С) вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів

Фракція незаряджених ВО – це 7 з 9 головних піків загального ВЕРХ- спектру, серед яких всі піки з найбільшою концентрацією: I - $4,08 \pm 0,003$ ГО, III – $4,40 \pm 0,009$ ГО, IV – $5,01 \pm 0,003$ ГО, V – $5,69 \pm 0,002$ ГО, VI – $6,40 \pm 0,003$ ГО, VII – $7,08 \pm 0,01$ ГО, VIII – $7,85 \pm 0,008$ ГО. ВО цієї фракції складаються з 4-8 моносахаридних залишків (рис.2). Фракція заряджених ВО – це 2 піки загального ВЕРХ-спектру з протилежних кінців хроматограми: II – $4,28 \pm 0,006$ ГО та IX – $8,62 \pm 0,02$ ГО. Крім того, хроматографія виявила деяку кількість кислих ВО з дуже низькою концентрацією, на що вказують мініорні піки між 2-х попередньо вказаних.

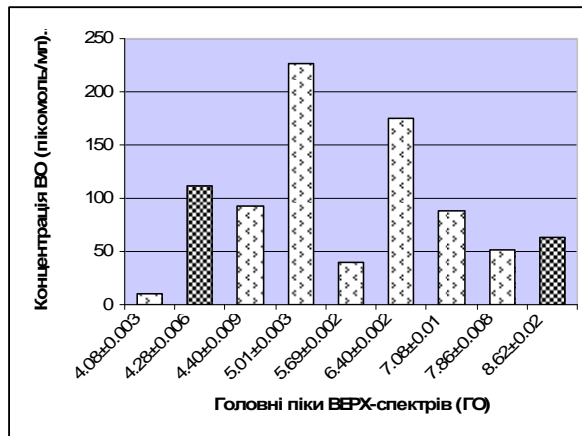


Рис.2. Розподіл вільних олігосахаридів головних піків ВЕРХ-спектрів плазми по заряду:

□ – нейтральні (незаряджені), ▨ - кислі (заряджені) олігосахариди

Всередині клітини головним джерелом незаряджених вільних олігосахаридів, що складаються з 5-7 моносахаридних залишків, є цитозоль. Тому можна припустити, що вільні олігосахариди плазми крові практично здорових донорів – це переважно глікани цитозолу клітин – продукти початкового етапу синтезу глікокон’югатів та асоційованої з ендоплазматичним ретикуломом деградації. Але остаточно це може підтвердити тільки детальний структурний аналіз. Джерел кислих ВО плазми крові може бути декілька – внутрішньоклітинні (ЕПР, лізосоми) чи зовнішні (в наслідок відщеплення гліканів від глікокон’югатів глікозидазами на поверхні клітин чи ферментами плазми). Але дуже мала кількість кислих ВО наштовкує на думку про якісь незначні порушення у внутрішньоклітинному везикулярному транспорті ВО (наприклад, від апарату Гольджі чи зовнішньої мембрани клітини до лізосом). Але це – лише припущення, яке потребує додаткових досліджень.

ВИСНОВКИ

1. Вільні олігосахариди плазми крові практично здорових донорів гетерогенні по заряду. Серед них зустрічаються як нейтральні, так і заряджені молекули.

2. Більша частина вільних олігосахаридів – 7 головних піків спектру – плазми крові практично здорових донорів – це незаряджені глікани, що складаються переважно з 4-8 залишків моносахаридів. Лише незначна частина незаряджених гліканів має 9 та більше моносахаридів у своєму складі.
3. Фракція заряджених гліканів має 2 головних піки – це олігосахариди, які складаються переважно з 4-5 моносахаридів (перший пік) та з 8-9 моносахаридів (другий пік). Невелика кількість заряджених гліканів з дуже низькою концентрацією розподілилася в інтервалі хроматограми між 2 головними піками.

ПОДЯКИ

Роботу було виконано при підтримці міжнародного гранту EMBO (ASTF201-2010) та Інституту глікобіології Оксфордського університету (м.Оксфорд, Велика Британія) у лабораторії доктора Террі Д. Баттерса (Terry D. Butters).

Список літератури

1. Vleugels W. Identification of phosphorylated oligosaccharides in cells of patients with a congenital disorders of glycosylation (CDG-I) / W.Vleugels, S. Duvet, R. Peanne, A.M.Mir [et al.] // *Biochimie*. – 2011. – Vol. 93, №5. – P.823– 833.
2. Different fates of the oligosaccharide moieties of lipid intermediates / R. Cacan, C. Villers, M. Belard [et al.]. // *Glycobiology*. – 1992. – Vol. 2. – P. 127–136.
3. Moore S.E. Endoplasmic reticulum-to- cytosol transport of free polymannose oligosaccharides in permeabilized HepG2 cells / S.E. Moore, C. Bauvy, P. Cordogno // *EMBO J*. – 1995. – Vol.14. – P. 6034–6042.
4. Benyair R. Protein quality control, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum / R Benyair., E. Ron, G.Z. Lederkremer // *Int Rev Cell Mol Biol*. – 2011. – Vol. 292. – P.197–280.
5. Parodi A.J. Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation / A.J. Parodi // *Biochem J*. – 2000. – Vol. 348. – P.1–13.
6. Hoseki J. Mechanism and components of endoplasmic reticulum associated degradation / J. Hoseki, R. Ushioda, K. Nagata // *J. Biochem*. – 2010. – Vol.147, № 1. – P.19–25.
7. Yanagida K. Structural diversity of cytosolic free oligosaccharides in the human hepatoma cell line, HepG2 / K.Yanagida, S. Natsuka, S. Hase // *Glycobiology*. – 2006. – Vol.16, № 4. – P. 294–304.
8. Kukushkin N.V. Demonstration that endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins can occur downstream of processing by endomannosidase / N.V.Kukushkin, D.S. Alonzi , R.A. Dwek, T.D. Butters // *Biochem J*. – 2011.– Vol.438, №1. – P.133–142.
9. Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins / B. Winchester // *Glycobiology*.- 2005. – Vol.15, № 6. – P.1R–15R.
10. Письменецька І.Ю. Вільні олігосахариди плазми крові практично здорових донорів / І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс // *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия»*. – 2012. –Т.25 (64) , №1. – С.182–187.
11. Письменецька І.Ю. Хроматографічний аналіз іммобілізованих на паперових носіях модельних олігосахаридів / І.Ю. Письменецька, Т.Д. Баттерс // *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия»*. – 2011. –Т.24 (63) , №4. – С.183–191.
12. Glucosylated free oligosaccharides are biomarkers of endoplasmic- reticulum alpha-glucosidase inhibition / D.S. Alonzi, D.C. Neville, R.H. Lachman [et al.] // *Biochem J*. – 2008. – Vol. 409, №2. – P.571–580.
13. Analysis of fluorescently labelled glycosphingolipid-derived oligosaccharides following ceramide glycanase digestion and anthranilic acid labelling / D.C. Neville, V. Coquard, D.A. Priestman [et al.] // *Anal Biochem*.-2004. – V.331. – P.275–282.

14. Neville D.C. Development of a single column method for the separation of lipid- and protein-derived oligosaccharides / D.C. Neville, R.A. Dwek, T.D. Butters // J. Proteome Res. – 2009. – Vol.8. – P.681–687.

Письменецкая И.Ю. Фракционирование по заряду свободных олигосахаридов плазмы крови практически здоровых доноров / И.Ю. Письменецкая, Т.Д. Баттерс // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25 (64), № 2. – С.126-131.

Внутриклеточные свободные олигосахариды могут быть как заряженными, так и нейтральными, в зависимости от источника. Работа посвящена исследованию гетерогенности по заряду свободных олигосахаридов плазмы крови, источники которых пока не выяснены. Свободные олигосахариды плазмы крови практически здоровых доноров разделяли на фракции незаряженных (нейтральных) и заряженных (кислых) гликанов методом ионообменной хроматографии. Гликаны фракций анализировали нормальнофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ). Было показано, что большая часть свободных олигосахаридов – это незаряженные гликаны, которые концентрировались в 7 главных пиках ВЭЖХ-спектра и состояли из 4-8 остатков моносахаридов. Спектр заряженных олигосахаридов характеризовался двумя главными пиками гликанов из 4-5 и 8-9 моносахаридных остатков.

Ключевые слова: свободные олигосахариды, плазма крови, ионообменная хроматография гликанов, ВЭЖХ-спектры гликанов.

Pismenetskaya I.U. Fractionation by charge of blood plasma free oligosaccharides of practically healthy volunteers / I.U. Pismenetskaya, T.D. Butters // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 2. – P. 126-131.

Intracellular free oligosaccharides can be both neutral and charged depending on their sources. The work is devoted to the study of charge heterogeneity of blood plasma free oligosaccharides, the sources of which are still not understood. Blood plasma free oligosaccharides of practically healthy donors were separated into fractions of uncharged (neutral) and charged (acidic) glycans with ion-exchange chromatography. Glycans of the fractions were analyzed by normal-phase high performance liquid chromatography (NPHPLC). It has been shown that most of the free oligosaccharides are uncharged glycans concentrated in 7 main peaks of the HPLC-profiles and consisted of 4-8 monosaccharides. The spectrum of charged oligosaccharides has been characterized by two main peaks of glycans with 4-5 and 8-9 monosaccharides.

Keywords: free oligosaccharides, blood plasma, ion-exchange chromatography of glycans, HPLC-profiles of glycans.

Поступила в редакцию 21.04.2012 г.