

УДК 543.635.24:612.1-074

АНАЛІЗ ЗАРЯДЖЕНОЇ ФРАКЦІЇ 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

Вільні олігосахариди плазми крові містять як нейтральні, так і заряджені (кислі) глікани у своєму складі. Дана стаття присвячена вивченню будови кислих вільних олігосахаридів з використанням ферментативної деградації сіалідазою і порівнянням із олігосахаридами відомої структури - гліканами трансферину. Головний пік заряджених вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів містив сіалований двоохантений N- глікан. У фракції з меншою молекулярною масою також були виявлені сіаловані вільні олігосахариди. Крім того, положення деяких піків ВЕРХ-спектрів не змінювалося при обробці гліканів сіалідазою, що може свідчити про те, що їх негативний заряд обумовлений присутністю залишків кислот, відмінних від сіалової, наприклад, фосфорної.

Ключові слова: заряджені вільні олігосахариди, ВЕРХ-спектри гліканів, розщеплення сіалідазою, плазма крові людини.

ВСТУП

Заряджена фракція вільних олігосахаридів (ВО) – незв'язаних аналогів гліканів глікокон'югатів – може мати три внутрішньоклітинних джерела: ендоплазматичний ретикулум (ЕР), апарат Гольджі та лізосоми [1-3].

У ендоплазматичному ретикулумі заряджені (кислі) ВО виникають на початкових етапах N-глікозилування, а саме при синтезі глікана-попередника ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$) на ліпіді - доліхолфосфаті, який відбувається спочатку на цитоплазматичному боці мембрани ЕР до стадії утворення базового глікана $\text{Man}_5\text{GlcNac}_2$, а потім продовжується всередині ЕР. Глікан-попередник утворюється шляхом поетапного переносу залишків моносахаридів з їх активованих форм (УДФ-N-ацетилглюкозаміну, ГДФ-манози та УДФ-глюкози) на ліпід за допомогою відповідних трансфераз. Відомо, що кількість синтезованого глікана-попередника завжди більше, ніж потрібно для переносу на поліпептидний ланцюг білка, що синтезується у ЕР[1]. Тому надлишки олігосахаридів у вигляді фосфорильованого $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$, а також його попередників відщеплюються від доліхолфосфату, що й призведе до появи вільних олігосахаридів. Фосфорильовані глікани з'являються тому, що розрив між ліпідом та гліканом відбувається під дією пірофосфатази, яка гідролізує зв'язок між двома залишками фосфорної кислоти. Один з них залишається на доліхолі, а інший – на глікані.

Інше можливе джерело заряджених ВО – це мідіум- та транс-компарменти апарату Гольджі. Але інформації щодо цього шляху виникнення вільних гліканів ще немає у наукових публікаціях. Теоретично ця органела клітини може постачати іншу групу заряджених ВО – сіальовані глікани [1, 2].

Більш вивченим постачальником сіальованих вільних олігосахаридів є лізосоми [3], де розщеплюються різноманітні глікокон'югати (глікопротеїни, гліколіпіди, протеоглікани). Лізосомальна деградація вуглеводного компонента глікопротеїнів починається тільки після повного протеолізу білкової частини лізосомальними катепсинами, коли глікан залишається приєднаним лише до останньої амінокислоти. У разі N-глікопротеїнів це аспарагін. Дія глікозидаз строго детермінована. Першими діють α -фукозидази, що відщеплюють залишки фукози від кору та антен глікану. Після цього аспартіл-N-ацетилглюкозамінідаза відщеплює залишок аспарагіну і виникає вільний олігосахарид. Якщо розщеплюється сіальований двохантений комплексний N-глікан, то це буде саме його вільна форма з двома залишками N-ацетилглюкозаміну. Потім ендо-N-ацетилглюкозамінідаза відщеплює один залишок N-ацетилглюкозаміну і виникає вільний сіальований двохантений N-глікан з одним залишком N-ацетилглюкозаміну. І тільки після цього починає діяти сіалідаза, яка відщеплює один, а потім інший залишок сіалової кислоти, що на першій стадії сприяє появленню вільного двохантеного комплексного N-глікану з одним залишком сіалової кислоти. У разі деградації гліканів з більш складною структурою, наприклад, з великою кількістю антен, з'являються заряджені ВО з відповідною будовою.

Ці знання про внутрішньоклітинні ВО суттєво допомагають для передбачення можливих структур вільних гліканів біологічних рідин та розробки стратегії їх аналізу.

У попередніх дослідженнях нами були отримані хроматографічні спектри вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів [4], а також їх нейтральної та зарядженої фракції [5]. Крім того, було запропоновано можливі структури гліканів різних піків спектру на основі застосування відкритої інформації та електронних баз даних [6]. Мета даної роботи - експериментально перевірити теоретично передбачену будову зарядженої фракції за допомогою порівняння її із гліканами з відомою структурою та часткового ферментативного гідролізу.

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% трихлороцтовою кислотою (ТХО) з наступним центрифугуванням впродовж 10 хвилин при 3000 об/хв. [7]. Залишки білків з плазми вилучали шляхом фільтрації за допомогою фільтру з гідрофільною поліфлуороетиленовою (PTFE) мембраною (Millex-LH, 0.45 μ m, Millipore Corp., США) згідно [8]. 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 [8].

Вільні олігосахариди маркували 2-амінобензойною (антраніловою) кислотою - 2-АА (Sigma - Poole, Dorset, Велика Британія) згідно з методикою, наведеною у роботі Neville D.C.A. et.al. [9]. Очищення 2-АА-маркованих олігосахаридів проводили шляхом твердофазної екстракції на колонках Speed SPE Cartridges Amide-2, (Applied Separations, США) [8].

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 гліканив оцтовою кислотою, а заряджених - амоній ацетатом згідно з Neville D.C.A. et al.[9].

Аналіз маркованих олігосахаридів проводили шляхом нормальнофазової високоефективної 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. [9, 10]. 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.[9].

Для вивчення структури марковані глікани розщеплювалися сіалідазою (*Artrobacter ureafaciens*, OGS, Велика Британія) згідно з інструкцією до ферменту. 100 мкл 2-АА-маркованих гліканив висушували за допомогою вакуумного концентратора SPD SpeedVac (Thermo Scientific), ресуспендували у 5 мкл необхідного для роботи сіалідази буфера, додавали 5 мкл сіалідази та інкубували при 37°C впродовж не менш ніж 18 годин. Очистку гліканив від сіалідази проводили із застосуванням центрифугування крізь колонку Microcon з фільтром Amicon®Ultra 0.5 ml Centrifugal Filter (Millipore). Колонку заздалегідь промивали 100 мл Milli-Q™ H₂O, центрифугували впродовж 10 хв. при 15000 об/хв. та переносили у чисту пробірку. До суміші гліканив з сіалідазою додавали 90 мкл Milli-Q™ H₂O та переносили на колонку Microcon, центрифугували впродовж 10 хв. при 15000 об/хв. Наносили на колонку Microcon додаткові 100 мл Milli-Q™ H₂O та центрифугували ще впродовж 10 хв. при 15000 об/хв. Зразок висушували вакуумним концентратором SPD SpeedVac (Thermo Scientific) та ресуспендували у 100 мкл Milli-Q™ H₂O.

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

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Попередні дослідження авторів виявили у складі вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів невелику за концентрацією піків та їх кількістю фракцію заряджених (кислих) гліканив [5]. Досліджували олігосахариди, що мали у своєму складі 4 та більше моносахаридних залишків, тому аналізували ВЕРХ-спектри у відрізку часу від 20 до 45 хвилин. Фракція заряджених ВО мала на цьому відрізку 2 головних піки: I – 4,28±0,006 ГО, II – 8,62±0,02 ГО та декілька значно менших піків між ними. Перший пік мав подпіки (1,2,3), а форма другого (4)

свідчила про вірогідну наявність лише однієї структури глікану у його складі (рис.1, А). Порівняння характеристик отриманих піків з характеристиками піків внутрішньоклітинних вільних олігосахаридів, що наведені у наукових публікаціях [8], та гліканів глікопротеїнів, які зібрано у електронних базах даних, дозволило припустити, що у складі другого піку може бути двохантений комплексний N-глікан з двома залишками сіалової кислоти [6].

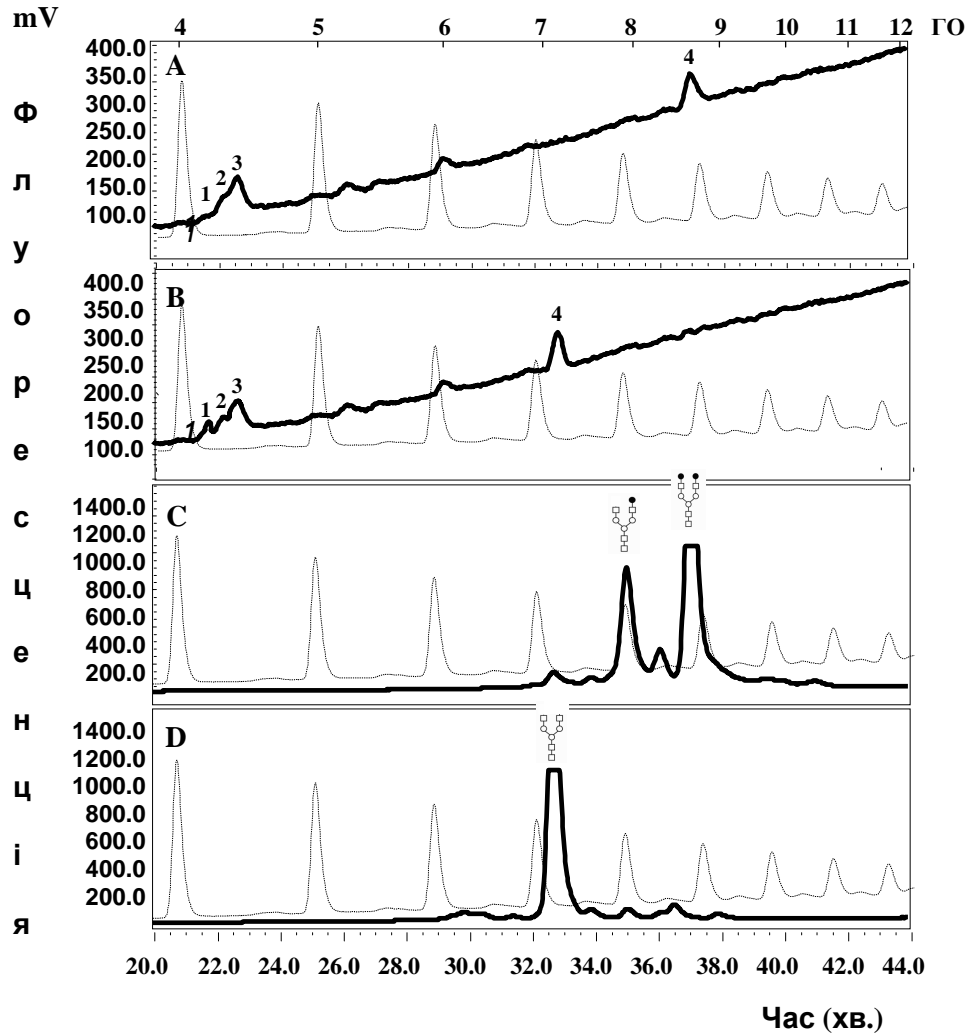


Рис.1. ВЕРХ-спектри заряджених вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів (А,В, суцільна лінія) в порівнянні з ВЕРХ-спектрами глікана трансферину (С, D, суцільна лінія)
 А – глікани плазми до перетравлення ферментом, В – глікани плазми після перетравлення ферментом, С – глікани трансферину до перетравлення ферментом, D – глікани трансферину після перетравлення ферментом, ВЕРХ-спектри зовнішнього стандарту – частково гідролізованого декстрану (пунктирна лінія)

Спрогнозувати структури гліканів першого піку значно складніше. Три підпіки вказують на наявність щонайменш 3 різних ВО. Мала кількість залишків моносахаридів (4-5) у їх складі та детермінована послідовність дії лізосомальних глікозидаз при деградації гліканів вказують на те, що вірогідніше це залишки сіалованих О-гліканів чи фосфорильованих N-гліканів з початкових ступенів синтезу глікана-попередника.

Для перевірки цієї гіпотези провели розщеплення фракції кислих ВО плазми крові здорових донорів сіалідазою *Artrobacter ureafaciens*, яка має досить широкий спектр дії і тому відщеплює сіалові кислоти різної будови та в різному положенні як від N-, так і О-гліканів. Результат деградації представлений на рисунку 1, В. Порівняння ВЕРХ-спектрів кислих ВО до ферментативної деградації (рис.1, А) та після неї свідчить про те, що у складі обох головних піків були присутні сіаловані глікани. Перший пік мав такі глікани у 2-му та/чи 3-му підпіках в невеликій кількості. Досить вірогідно, що основна кількість гліканів цих підпіків – це фосфорильовані олігосахариди.

Другий головний пік спектру мав сіалований глікан тільки однієї структури, про що свідчить повна зміна його положення на хроматограмі після ферментативної деградації. Для уточнення будови саме цього глікану порівняли його хроматограму із хроматограмою глікану з відомою будовою. Для порівняння обрали глікани трансферину, які складаються з двох головних олігосахаридів - двохантеного комплексного N-глікану з двома залишками сіалової кислоти та двохантеного комплексного N-глікану з одним залишком цієї кислоти. На рисунку 1С наведена хроматограма гліканів трансферину до розщеплення сіалідазою, а на рисунку 1D – після розщеплення з зазначеними структурами олігосахаридів у вигляді піктограм. Однакове положення на хроматограмі піку 4 кислих ВО плазми крові (рис.1, А) та другого головного піку гліканів трансферину (рис.1, С) до ферментативної деградації, а також піку 4 кислих ВО плазми крові (рис.1, В) та єдиного піку гліканів трансферину (рис.1, D) після розщеплення сіалідазою підтверджує, що пік 4 кислих ВО плазми крові практично здорових донорів – це двохантений комплексний N-глікан з двома залишками сіалової кислоти.

ВИСНОВКИ

1. Застосування ферментативної деградації сіалідазою зарядженої (кислої) фракції вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів виявило присутність сіалованих гліканів у обох головних піках цієї фракції.
2. Порівняння ВЕРХ-спектрів другого головного піку зарядженої фракції зі спектрами реперних гліканів трансферину до і після розщеплення сіалідазою дозволило підтвердити гіпотезу, що цей пік ($8,62 \pm 0,02$ ГО) має будову двохантеного комплексного N-глікану з двома залишками сіалової кислоти.
3. Положення деяких піків ВЕРХ-спектрів не змінювалося при обробці гліканів сіалідазою, що може свідчити про те, що їх негативний заряд обумовлений присутністю залишків кислот, відмінних від сіалової, наприклад, фосфорної.

ПОДЯКИ

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

Список літератури

1. Chantret I. Free oligosaccharide regulation during mammalian protein N-glycosylation / I. Chantret, S.E.H. Moore // *Glycobiology*. – 2008. – Vol.18, № 3. – P. 210–224.
2. Zhao W. The CMP-sialic acid transporter is localized in the medial-trans Golgi and possesses two specific endoplasmic reticulum export motifs in its carboxyl-terminal cytoplasmic tail / W. Zhao, T.L. Chen, B.M. Vertel, K.J. Colley // *J Biol Chem*. – 2006. – Vol.281(41). – P.31106 – 31118.
3. Winchester V. Lysosomal metabolism of glycoproteins / V. Winchester // *Glycobiology* – 2005. – Vol.15, № 6. – P.1R – 15R.
4. 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.
5. Письменецька І.Ю. Фракціонування по заряду вільних олігосахаридів 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) , №2. – С.126–131.
6. Письменецька І.Ю. Прогнозування структур вільних олігосахаридів 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) , №3. – С.158–164.
7. 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.
8. Alonzi D.S. 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.
9. Neville D.C. 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.
10. 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. Анализ заряженной фракции 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), № 4. – С.159-165.

Свободные олигосахариды плазмы крови включают как нейтральные, так и заряженные (кислые) гликаны. Данная статья посвящена изучению строения кислых свободных олигосахаридов с использованием ферментативной деградации сиалидазой и сравнением с олигосахаридами известной структуры – гликанами трансферрина. Основной пик заряженных свободных олигосахаридов плазмы крови практически здоровых доноров содержал сиалированный двухантенный N-гликан. Во фракции с меньшей молекулярной массой также были выявлены сиалированные свободные олигосахариды. Кроме того, положение некоторых пиков ВЭЖХ-хроматограммы не изменялось при обработке гликанов сиалидазой, что может свидетельствовать о том, что их отрицательный заряд обусловлен присутствием остатков кислот, отличных от сиаловой, например, фосфорной.

Ключевые слова: заряженные свободные олигосахариды, ВЭЖХ-спектры гликанов, плазма крови человека, деградация сиалидазой.

Pismenetskaya I.U. Analysis of plasma free oligosaccharide charged fraction of practically healthy donors / I.U. Pismenetskaya, T.D. Butters // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 4. – P. 159-165.

Plasma free oligosaccharides include both neutral and charged (acidic) glycans. This article is devoted to a study of the free acidic oligosaccharide structures by using a sialidase enzymatic degradation and by comparison with the known structures of transferrin glycans. The main HPLC-peak of plasma free oligosaccharide charged fraction of practically healthy donors contained the two-antennary complex type of N-glycan with two residues of sialic acid. In the fraction with lower molecular weight there were also found free oligosaccharides with sialic acid. In addition, the positions of some HPLC peaks were not changed after the glycan digestion with sialidase, which may indicate that their negative charge is due to the presence of acid residues other than sialic, such as, for example, phosphoric one.

Keywords: charged free oligosaccharides, HPLC-profiles of glycans, human blood plasma, sialidase digestion.

Поступила в редакцію 21.11.2012 г.