

# Derivatizacija N-glikana Imunoglobulina G u visokoprotočnim metodama analize

Kemijski seminar 1

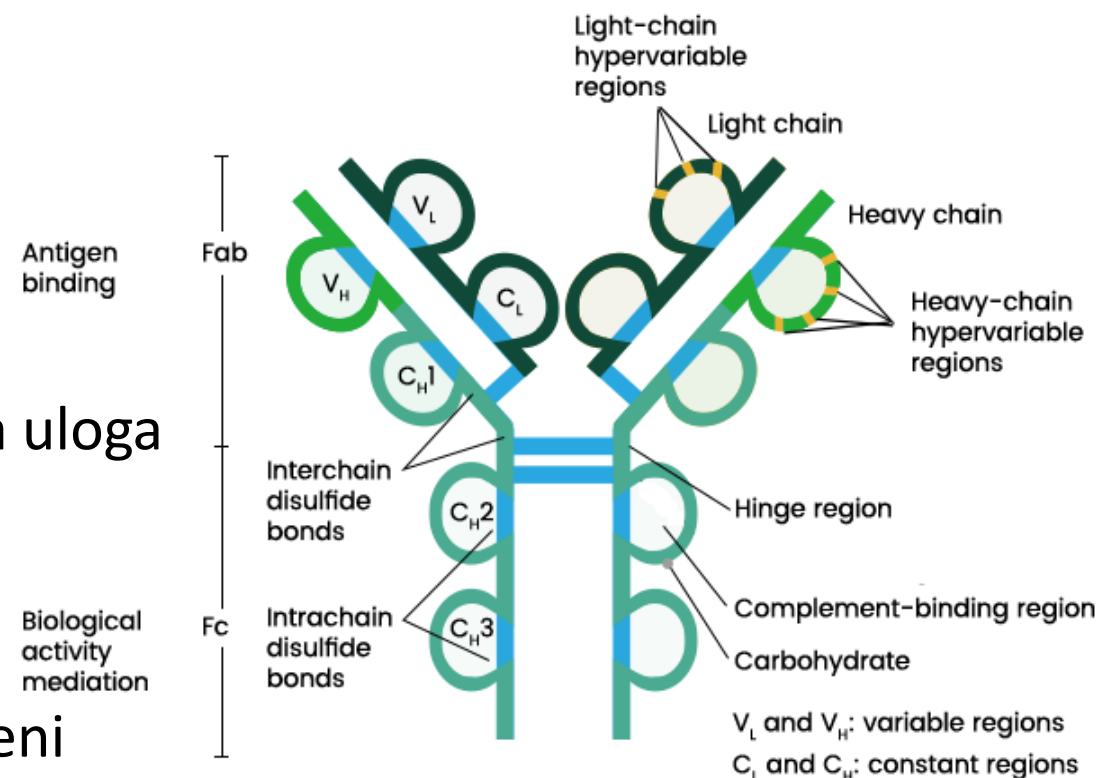
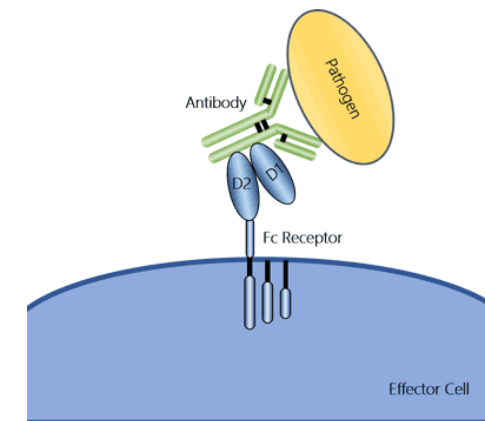
smjer: Biokemija

HELENA DERIŠ

2021.

# IMUNOGLOBULIN G (IgG)

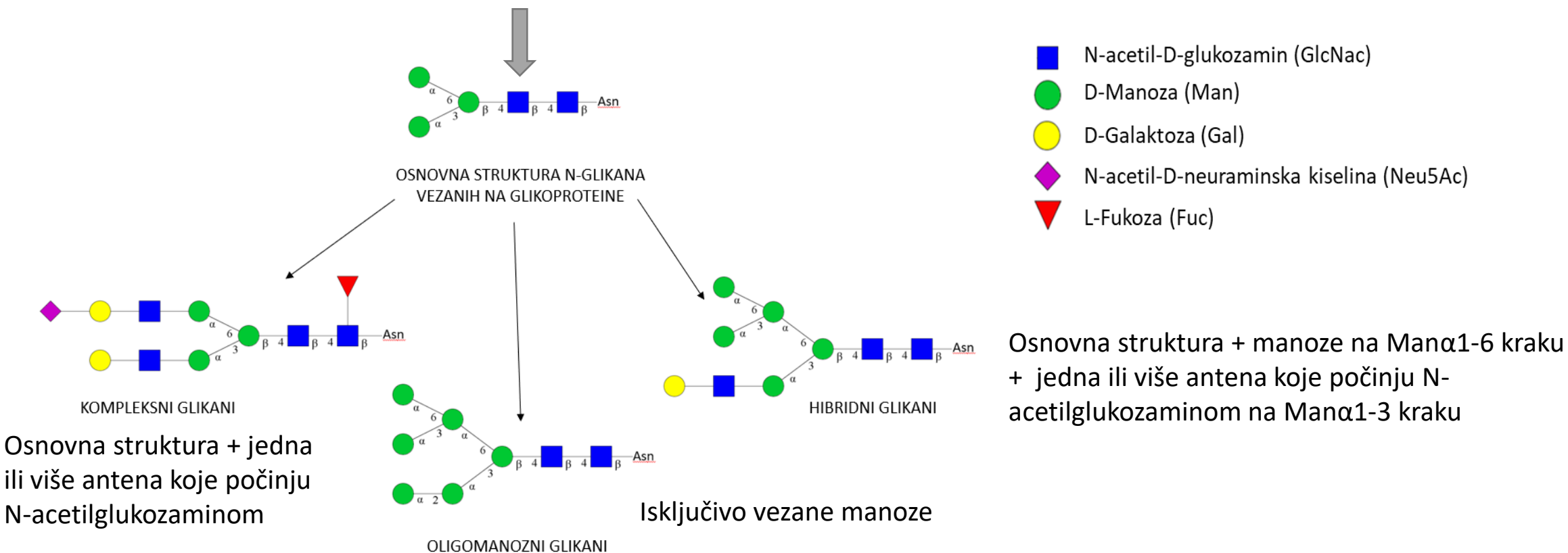
- protutijelo (IgG, IgA, IgM, IgD, IgE)
- plazma stanice - sinteza
- 2 teška (H) + 2 laka lanca (L)
- 2 domene: Fab, Fc
- Fab – specifično vezanje antigena (hipervarijabilne regije  $V_L$  i  $V_H$ )
- Fc – vezanje na receptore (FcγR), efektorska uloga (konzervirane regije  $CH_2$  i  $CH_3$ )
- Fc ( $CH_2$ : Asn297 – N-vezani-glikani)
- N-glikozilacija: Asn-X-Ser ili Asn-X-Thr
- 15-20% molekula IgG N-glikani na Fab domeni



# N-GLIKANI

\* ovisno o položaju nukleofila (O, N) u odnosu na anomerni ugljikov atom i monosaharidni prsten, razlikujemo  $\alpha$ -glikozidnu i  $\beta$ -glikozidnu vezu

- svi eukarioti – jednaka “srž” N-glikana (osnovna struktura):



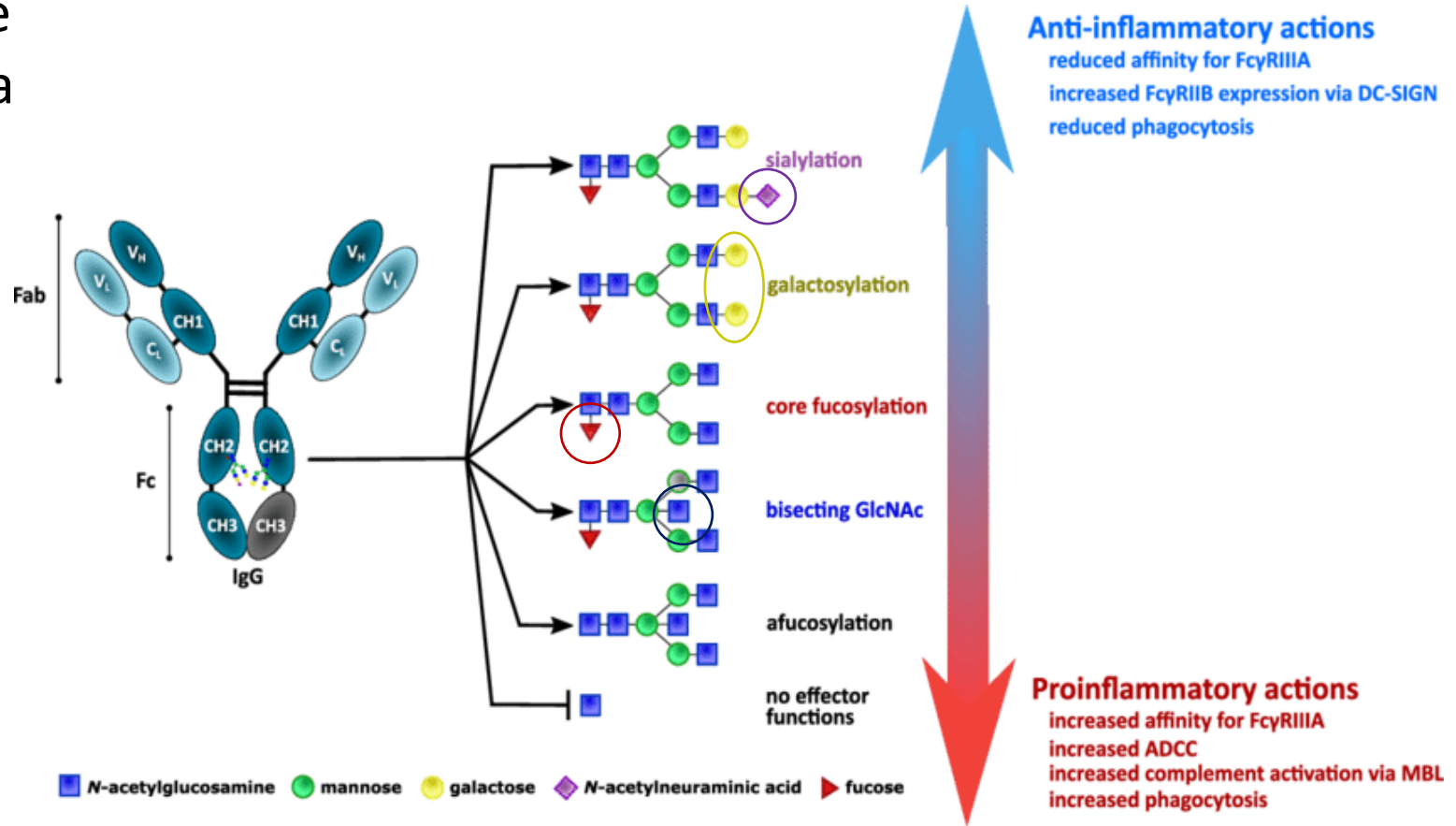
# UTJECAJ GLIKOZILACIJE NA FUNKCIJU IgG-a

- promjena Fc glikozilacije – razne bolesti – promjena funkcije IgG-a
  - smanjenje galaktoziliranih struktura
  - smanjenje sijaliniziranih struktura
  - povećan broj struktura s račvajućim N-acetilglukozaminom

→ **potencijalni BIOMARKERI (1)**

- IVIg – intravenska primjena IgG
  - sijaliniziran IVIg
- glikoforme protuupalnog djelovanja

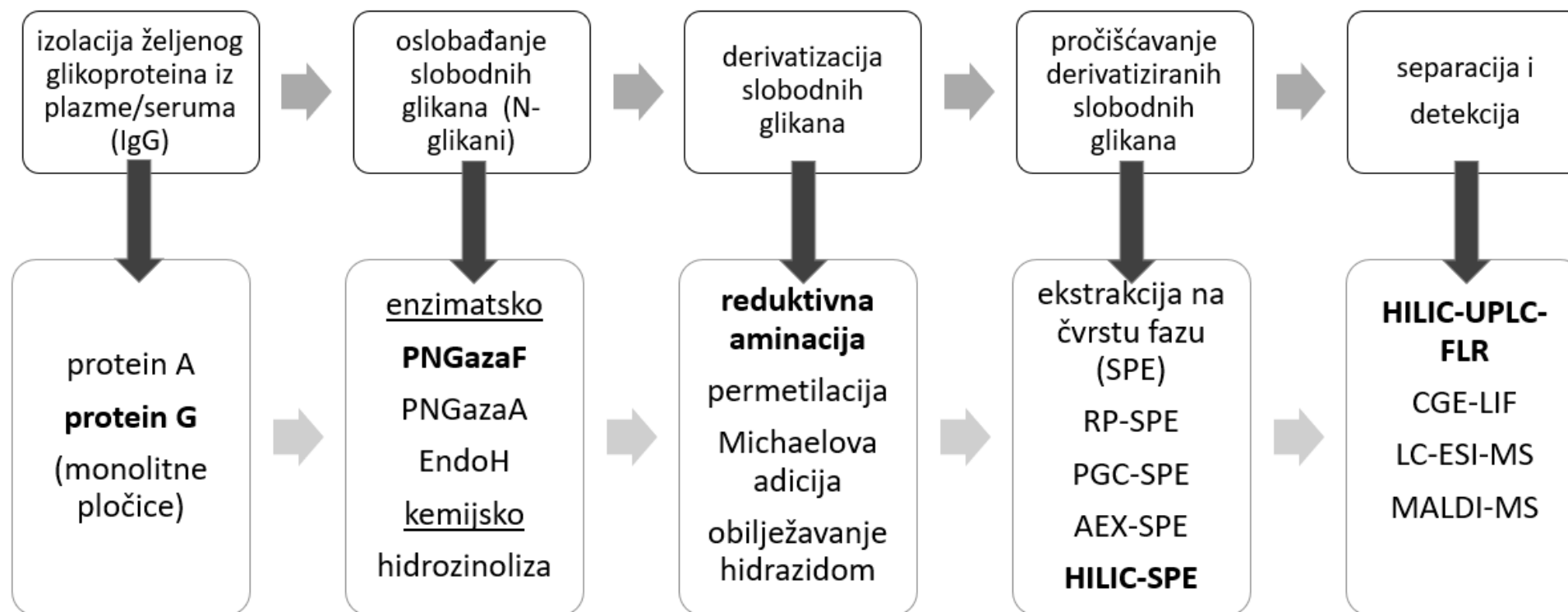
→ **uspješnost mAb terapije (2)**  
(mAb = monoklonsko protutijelo)



# VISOKOPROTOČNE ANALIZE

- velike studije s ogromnim brojem uzoraka → usporedba obrazaca glikozilacije između zdravih pojedinaca (kontrola) i određene bolesti/stanja → otkrivanje **glikanskih biomarkera** → smjer i vrsta terapije
- dugotrajne → osjetljive, robusne, pristupačne (što je finija implementacija) tehnike:
  - separacijske tehnike s optičkom detekcijom: HILIC-UHPLC-FLR , CGE-LIF
  - maseno spektrofotometrijska detekcija: LC-ESI-MS, MALDI-(TOF)-MS
  - **derivatizacija glikana** → uvođenje kromofora / poboljšanje ionizacijskih svojstava/ omogućavanje detekcije vezanja na lektine
    - \* HILIC-UHPLC-FLR = tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti temeljena na hidrofilnim interakcijama s fluorescencijskom detekcijom
    - \* CGE-LIF = kapilarna gel elektroforeza s laserom potpomognutom detekcijom
    - \* LC-ESI-MS = tekućinska kromatografija spregnuta s elektronsprej masenom spektroskopijom
    - \* MALDI-(TOF-)MS - matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija s masenom spektroskopijom (s detekcijom vremena preleta elektrona)

# VISOKOPROTOČNE ANALIZE – SHEMA:



- 1 analiza = 96 uzoraka (8 x 12)



<https://www.bionity.com/en/products/1129244/deepwell-storage-plates-with-low-extractables-moulded-in-automated-class-8-cleanrooms-in-ireland.html>

<https://www.mt.com/au/en/home/products/pipettes/manual-pipettes/multichannel-pipettes.html>

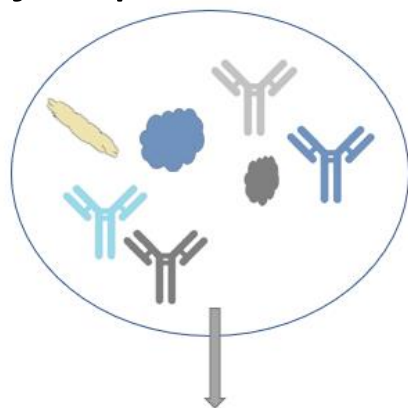
<https://uvison.com/chromatography-supplies/waters-hplc-columns-spare-parts/waters-sample-vials-plates/waters-sample-vials/waters-vial-holder-48-well-for-2-ml-vials-405003743>

# IZOLACIJA IgG-a

- afinitetna kromatografija
- imobilizirani bakterijski protein A ili G (češće)

(+) regeneracija pločice

(-) prisutstvo soli



$K_d$  (prot. A - IgG1/IgG2/IgG4)  $\approx 2 \times 10^{-9}$  mol/dm<sup>3</sup>

$K_d$  (prot. G - IgG1/IgG2/IgG3/IgG4)  $\approx 2 \times 10^{-10}$  mol/dm<sup>3</sup>



EKVILIBRACIJA  
PROTEIN G  
PLOČICE



NANOŠENJE UZORKA  
SERUMA/PLAZME U  
NEUTRALNOM pH

ISPIRANJE



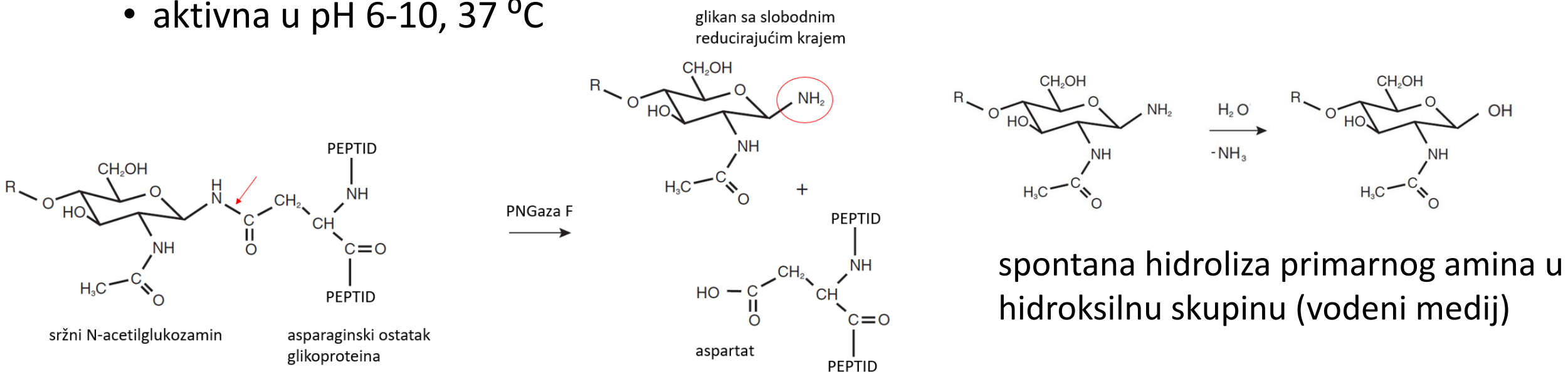
ELUIRANJE  
IgG-a  
u KISELOM pH



obavezna  
neutralizacija  
eluiranog IgG-a!

# ENZIMATSKO OTPUŠTANJE N-GLIKANA

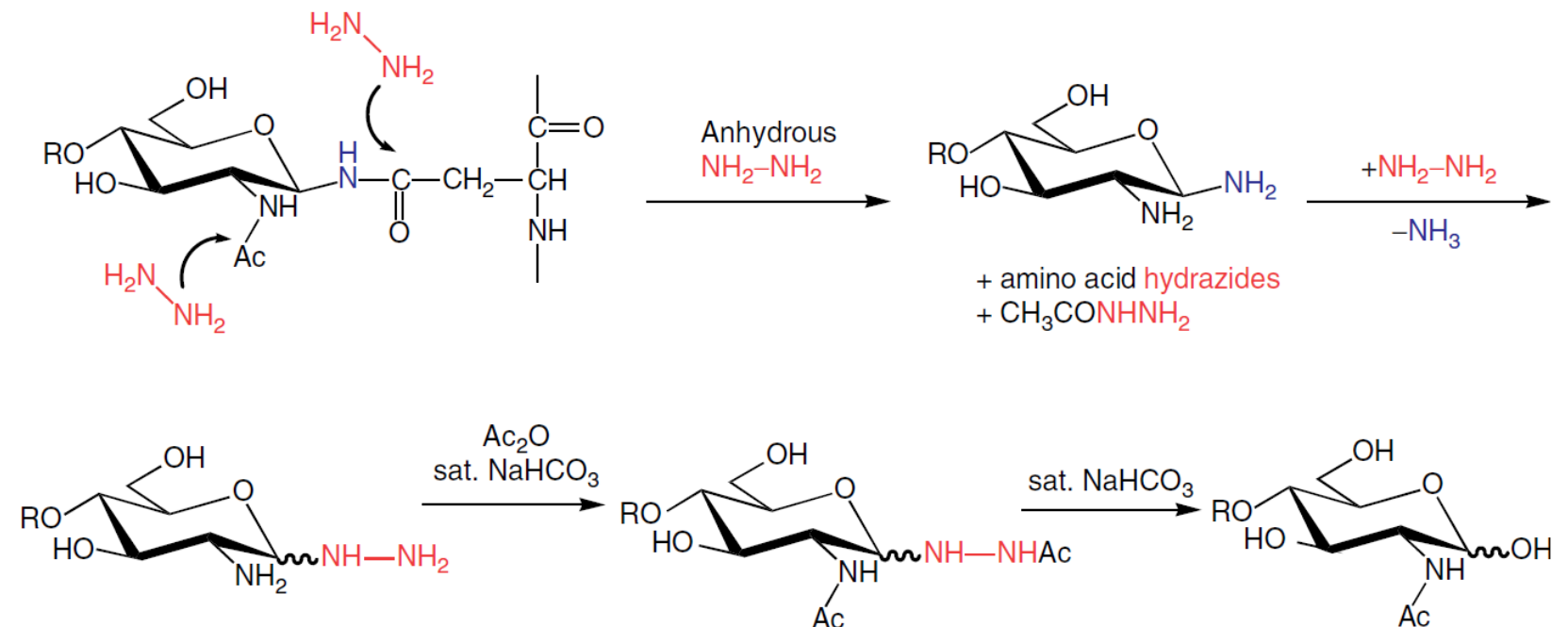
- denaturacija (SDS-natrijev dodecil sulfat,  $\beta$ -merkaptoetanol, DTT-ditiotreitol) + povišena temperatura
- **endoglikozidaze - PNGaza F** (peptidil-N4-(N-acetil- $\beta$ -glukozaminil) asparagin amidaza F)
- nastaje glikan sa slobodnim reducirajućim krajem (glikozilamin) + protein s asparaginom deaminiranim u asparaginsku kiselinu
- aktivna u pH 6-10, 37 °C





# KEMIJSKO OTPUŠTANJE N-GLIKANA

- alkalna hidroliza – “hidrazinoliza”
- komplicirani uvjeti analize – 8-12h, 100°C; hidrazin - toksičan
- pretpostavljeni mehanizam reakcije:
- reacetilacija glikana
- cijepanje dobivenih acetohidrazonskih derivata

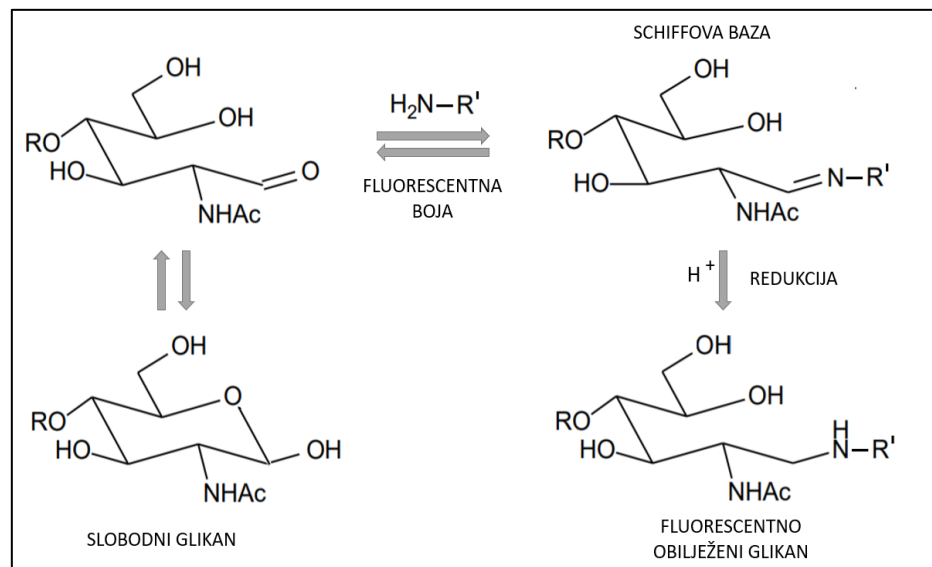


# METODE DERIVATIZACIJE N-GLIKANA

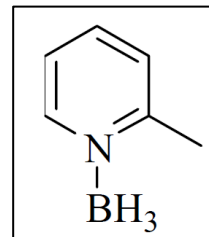
1. obilježavanje reducirajućeg kraja slobodnih N-glikana **reduktivnom aminacijom** (najčešće), **Michaelovom adicijom** ili **obilježavanjem hidrazidom** → separacija UHPLC, CGE, MALDI ili ESI MS; tehnika lektinskih mikročipova
2. **permetilacija** svih slobodnih hidroksilnih, karboksilnih, amino skupina → MALDI ili ESI MS
3. nativni i neobilježeni reducirajući kraj glikana moguće je analizirati MALDI-TOF

# REDUKTIVNA AMINACIJA

Fluorescentna boja	Struktura	Primjena
2-aminobenzoična kiselina (2-AA)		Obilježavanje u vodi/metanolu, pH 5.0, 80 °C, 15–60min. 1 negativan naboj – CGE, MS <sup>+/-</sup>
2-aminobenzamid (2-AB)		Obilježavanje u DMSO/octena kiselina (7:3), 60 °C, 120 min. Neutralna – kromatografija.
2-aminopiridin (2-PA)		Obilježavanje u octenoj kiselini, 90 °C, 95 min. Neutralna – kromatografske analize.
8-aminopiren-1,3,6-trisulfonat (APTS)		Obilježavanje u limunskoj kiselini, 37 °C, 16 h. Sadrži tri negativna naboja – CGE.
4-amino-N-[2-(dietilamino)etil] benzamid (prokainamid, ProA)		Obilježavanje u DMSO/octena kiselina (7:3), 60 °C, 120 min. Tercijarni amin – kromatografija, ESI-MS <sup>+</sup>

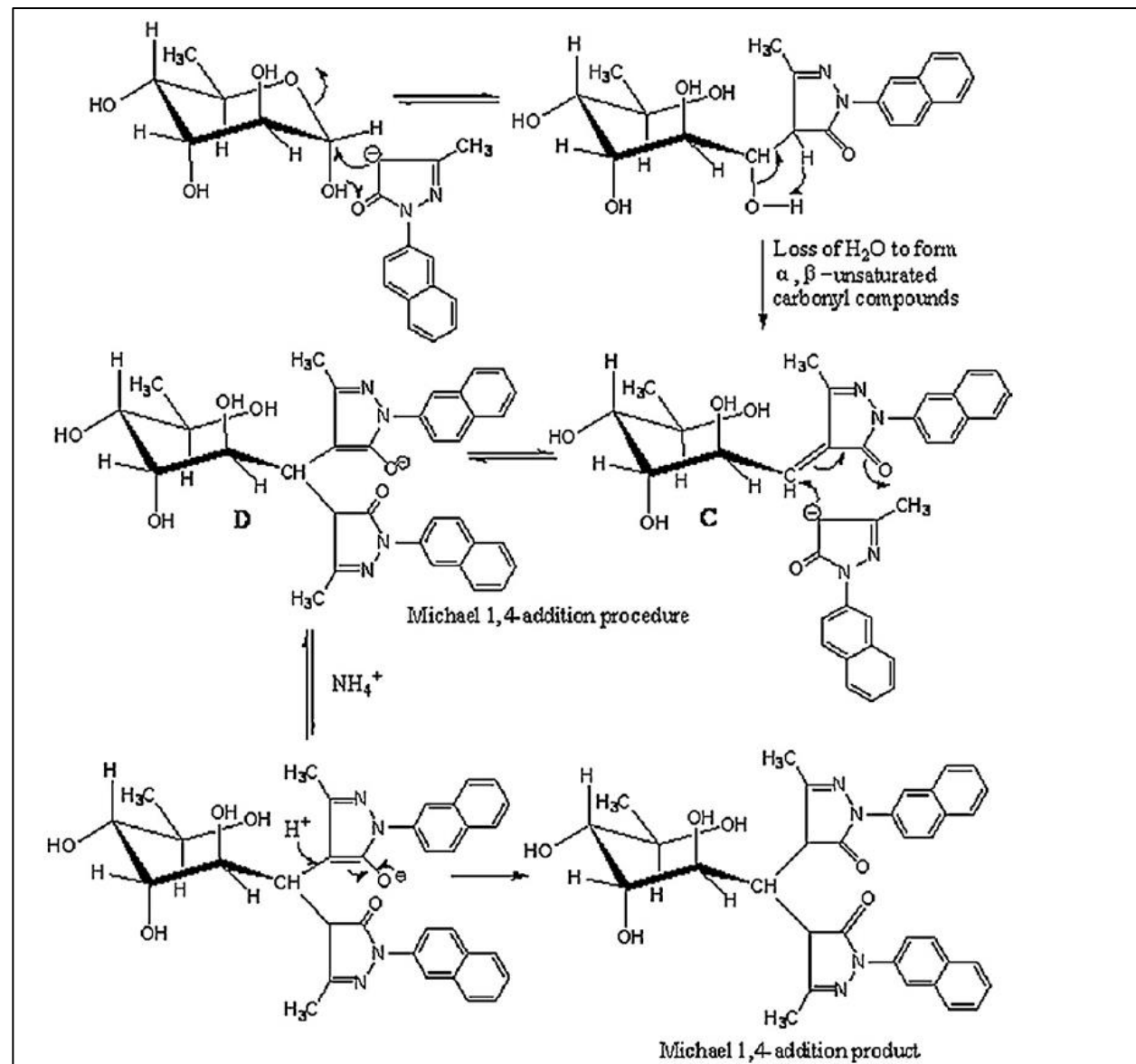


- Stehiometrijski odnos boja/glikan 1:1 – laka kvantifikacija
- Reducensi!
- NaBH<sub>3</sub>CN (→HCN, NaCN)
- **2-metilpiridin boran**



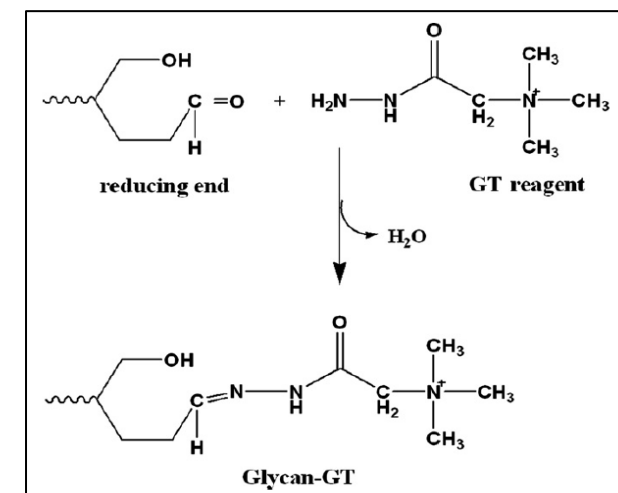
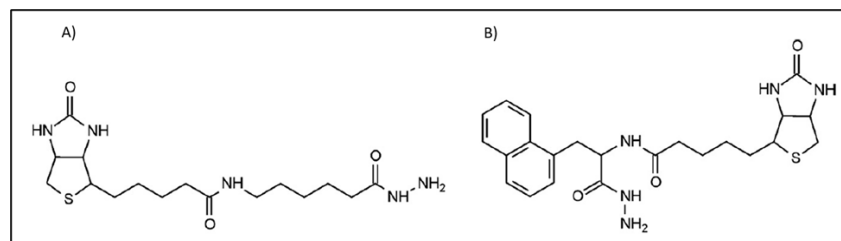
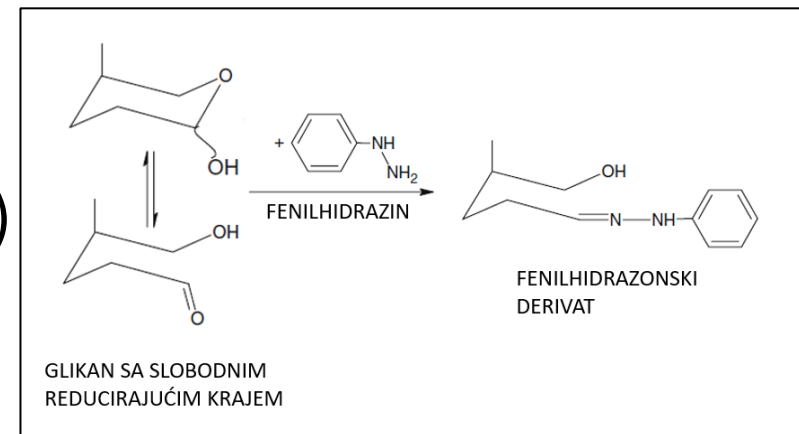
# MICHAELOVA ADICIJA

- alkalna kataliza (najčešće  $\text{NH}_4\text{OH}$ )
- ↓ gubitak sijalinskih kiselina
- 1-fenil-3-metil-5-pirazolon (**PMP**), p-metoksi-PMP, 1-(2-naftil)-3-metil-5-pirazolon (**NMP**) – **UV apsorpcija**
- 1. korak: vezanje donora (boje) na slobodni reducirajući kraj glikana →  $\alpha$ ,  $\beta$ -nezasićeni karbonil
- 2. korak: konjugacija →  $\alpha$ ,  $\beta$ -nezasićenog karbonila s drugom molekulom boje → Michaelov 1,4-adicijski produkt
- stehiometrijski odnos boja/glikan 2:1
- nepovoljno za razdvajanje izomera



# OBILJEŽAVANJE HIDRAZIDOM

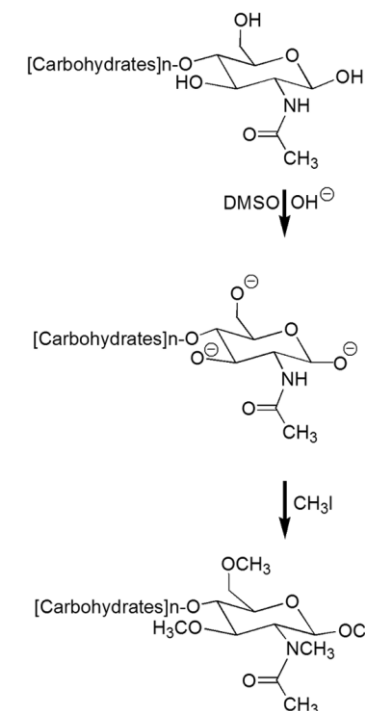
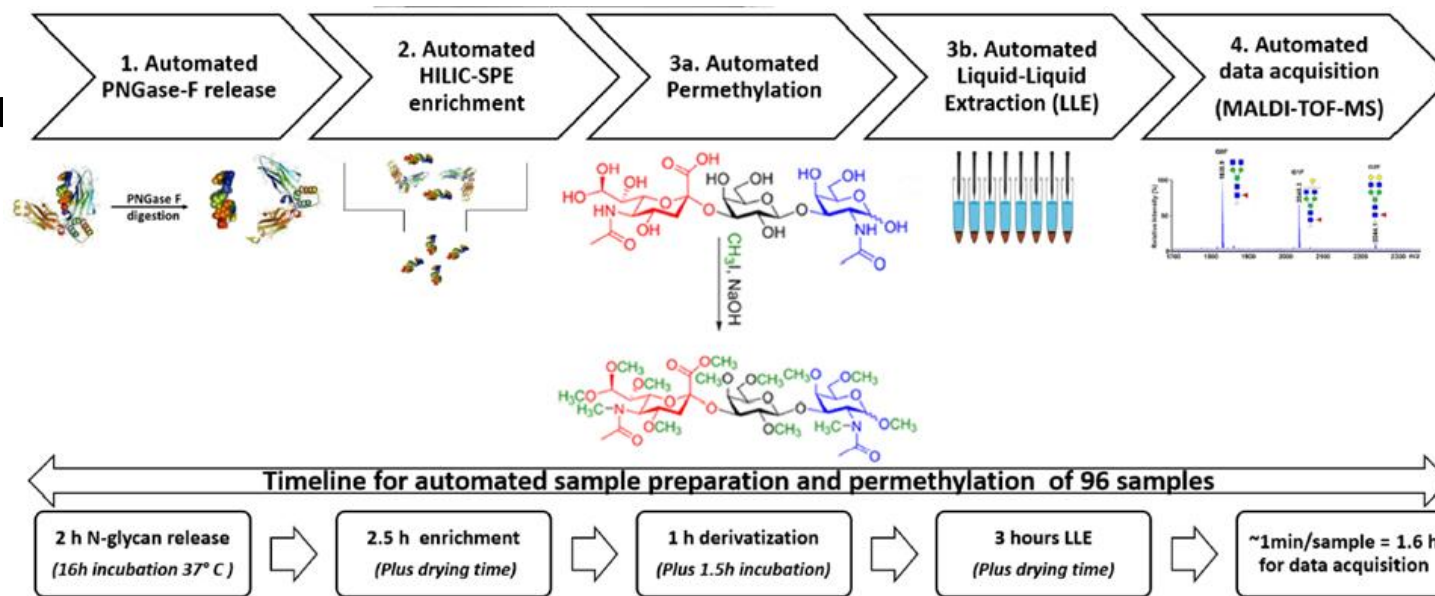
- derivati hidrazida – njč. arilhidrazini (**fenilhidrazin**, nitrofenilhidrazin) - **UV-detekcija**
- ne stvara se suvišak soli (eliminacija koraka pročišćavanja)
- karbonilna skupina glikana reagira s arilhidrazinima → arilhidrazonski derivati glikana
- Girardov T reagens (karboksimetil-trimetilamonijev hidrazid) – trajni pozitivni naboj (MALDI-TOF-MS)
- Lektinski mikročipovi – obilježavanje derivatima hidrazina i biotina (BACH – A, BNAH – B)
- 6-(biotinil)-aminokaproil hidrazid
- biotinil-L-3-(2-naftil)-alanin hidrazid



# PERMETILACIJA

- metiliranje SVIH slobodnih hidroksilnih, amino i karboksilnih skupina → izuzetno hidrofobni derivati glikana
- stabilizacija sijalinskih kiselina + poboljšanje ionizacije kod istovremene analize neutralnih i kiselih glikanskih struktura u MALDI-MS<sup>+</sup>

- setovi za automatiziranu permetilaciju metil jodidom (CH<sub>3</sub>I) u DMSO-u:

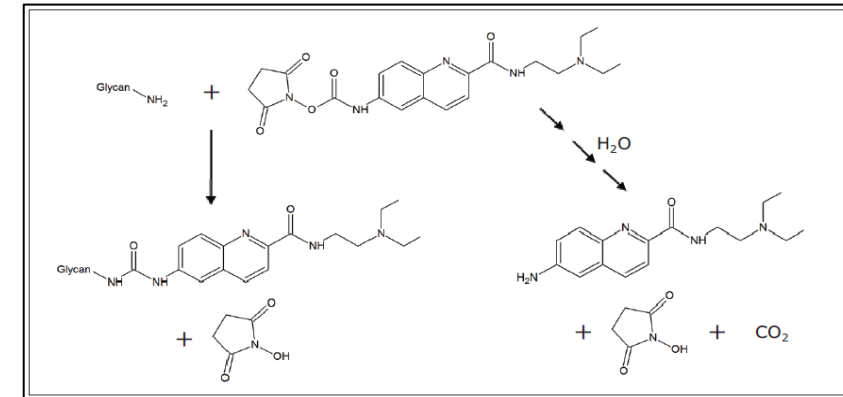


# PROČIŠĆAVANJE DERIVATIZIRANIH GLIKANA

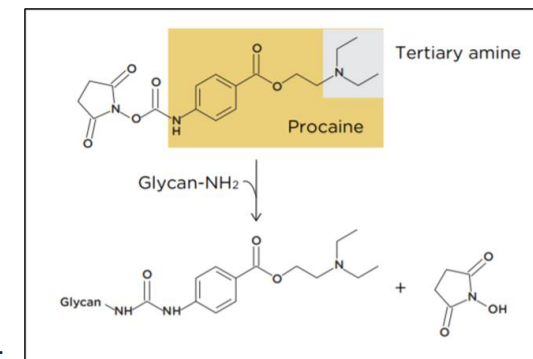
- suvišak reagensa za derivatizaciju, zaostala količina proteina i soli
- filtracija na gelu (Bio-gel, Sephadex smole) – razdvajanje molekula prema veličini
- precipitacije (rijetko!) – precipitacija proteina u acetonu
- ekstrakcija tekućina s tekućinom – nakon Michaelove adicije i permetilacije (kloroform – voda)
- **ekstrakcije na čvrstu fazu (SPE):**
  - **RP-SPE** (kromatografija obrnutim fazama, hidrofobno vezanje na C18 stacionarnu fazu)
  - **PGC-SPE** (kromatografija na poroznom grafitnom ugljiku, nerazjašnjen mehanizam, najčešće za nederivatizirane glikane, no moguće i za obilježene – ukoncentriravanje)
  - **AEX-SPE** (kromatografija anionske izmjene – glikani obilježeni 2-aminopiridinom ili 2-aminobenzamidom, odvajanje neutralnih od sijaliniziranih struktura)
  - **HILIC-SPE** (pločice s raznim polimernim adsorbensima, potrebno ih je prvo prekondicionirati kako bi se aktivirale polarne skupine, zatim se nanose obilježeni glikani otopljeni u visoko koncentriranom organskom otapalu (acetonitril), ispiru i eluiraju u polarnom otapalu – voda)

# KOMERCIJALNI SETOVI ZA BRZU PRIPREMU UZORAKA

- setovi za deglikozilaciju, bojanje i pročišćavanje
- GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan Kit (Waters Corp.)
- rekombinantna Rapid-PNGaza F<sup>TM</sup> u kombinaciji s RapiGest-SF<sup>TM</sup> anionskim surfaktantom (natrijev 3-[(2-metil-2-undecil-1,3-dioksolan-4-il)metoksil]-1-propanosulfonat<sup>TM</sup>) i 250mM HEPES puferom osigurava kvantitativnu denaturaciju IgG-a unutar 3 minute na 99 °C i deglikozilaciju na 50 °C unutar 5 minuta
- oslobođeni glikani u reakcijskim uvjetima su u obliku glikozilamina što omogućava brzo bojanje RapiFluor-MS<sup>TM</sup> bojom (rapidna hidroliza N-hidroksisukcinimidne karbamatne skupine) otopljenom u anhidričnom dimetilformamidu (5 minuta na sobnoj temperature)
- HILIC-SPE - GlycoWorks μElution Plate<sup>TM</sup>
- Agilent AvanceBio Gly-x N-Glycan Prep with InstantPC Kit
- sličan princip, InstantPC boja – derivat prokaina



Waters Corp. GlycoWorks Rapi Fluor-MS N -Glycan Kit – 96 Sample. Care and use manual.

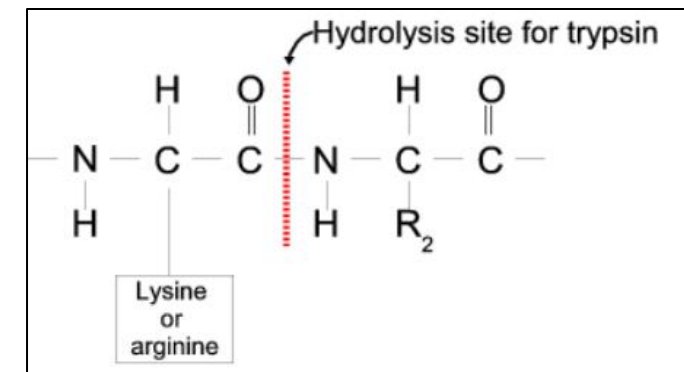


Agilent Technologies. Agilent AvanceBio Gly-X N-Glycan Prep with InstantPC Kit, 96-ct (formerly ProZyme). User manual.



# ANALIZA GLIKOPEPTIDA

- određivanja specifičnosti mjesta glikozilacije na proteinu
- analiza LC-ESI-MS, MALDI-MS
- specifično proteolitičko cijepanje izoliranog IgG-a – TRIPPSIN
- serinska proteaza, cijepa protein na karboksilnom kraju lizina ili agrinina
- inkubacija na 37 °C, nastaju peptidi i glikopeptidi
- denaturacija – gvanidin hidroklorid, urea, acetonitril; ditiotretiol, β-merkaptotanol
- alkilirajuće sredstvo – jodoacetamid (stabilizacija reduciranih sulfhidrilnih skupina)
- ukoncentriravanje i pročišćavanje – RP-SPE (C18), HILIC-SPE



# SEPARACIJA I DETEKCIJA

## HILIC-UHPLC-FLR

- visoka reproducibilnost i robusna kvantifikacija glikana
- odvajanje izomera glikana i istovremena analiza neutralnih i nabijenih glikana

## LC-ESI-MS

- glikopeptidi Fc fragmenta određenog podrazreda IgG-a, nakon separacije na C8 ili C18 koloni (RP-LC-ESI-MS)
- slobodni glikani nakon razdvajanja na koloni s poroznim grafitnim ugljikom (PGC- LC-ESI-MS) – izomeri
- permetilirani LC-MS<sup>+</sup>

**MS/MS – fragmentacijski spektar - detaljna analiza struktura**

## CGE-LIF

- xCGE-LIF – teoretski moguće istovremeno provoditi 96 analiza na 96 kapilara – brzo!
- osjetljiva i robusna metoda, uspješno odvaja izomere glikana i pouzdano kvantificira glikane sa sijalinskim kiselinama u strukturu (glikani obilježeni nekom nabijenom bojom, APTS)

## MALDI-MS

- najčešće TOF detekcija
- permetilirani glikani, derivatizirani Girardovim T reagensom ili obilježeni reduktivnom aminacijom (2-aminobenzoična kiselina)

# TEHNIKA LEKTINSKIH MIKROČIPOVA

- nije kvantitativna metoda, ne daje detaljnu informaciju o strukturi → jeftina!
- kombinirana karakterizacija struktura s analizom biomolekularnih interakcija
- komparativne svrhe → analizu razlika između glikanskih profila (procjena karakteristika tumora)
- LEKTINI – proteini koji specifično vežu određene monosaharide i oligosaharidne slijedove
- DIREKTNI TEST – lektini imobilizirani na nosače (mikročipove) + inkubacija s fluorescentno obilježenim glikoproteinom
- OBRNUTI TEST – glikoproteini se pročiste i ukoncentriraju pomoću kolone obložene lektinima (RP-HPLC), obilježe, imobiliziraju na mikročipove i zatim inkubiraju lektinima
- “SENDVIČ TESTOVI” – češće za analizu glikana drugih glikoproteina uz pomoć imobiliziranih protutijela na koje se zatim vežu glikoproteini te na njih obilježeni lektini ili se lektini imobiliziraju pa se zatim inkubiraju ispitivanim glikoproteinima na koje se na koncu vežu obilježena protutijela (ispitivanje tumorskih glikoproteina)

# Budućnost visokoprotočnih analiza glikozilacije

- **standardizacija protokola → interlaboratorijsko uspoređivanje**
- nadogradnja online baza podataka N-glikanskih struktura za razne kombinacije derivatizacijskih metoda i metoda separacije i detekcije
- automatizacija