

**УДК 577.112.85:543.635.24**

## **ПРОГНОЗУВАННЯ СТРУКТУР ВІЛЬНИХ ОЛІГОСАХАРИДІВ ПЛАЗМИ КРОВІ ПРАКТИЧНО ЗДОРОВИХ ДОНОРІВ**

*Письменецька І.Ю.<sup>1</sup>, Баттерс Т.Д.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Дніпропетровська державна медична академія, Дніпропетровськ, Україна*

<sup>2</sup>*Інститут глікобіології Оксфордського університету, Оксфорд, Велика Британія*  
*E-mail: pirina2004@list.ru*

Вільні олігосахариди (ВО) – це не пов'язані з глікокон'югатами глікани, продукти їх синтезу та деградації. Ретельний аналіз гліканів є надзвичайно складним через їх величезне структурне різноманіття. Стаття присвячена вивченню можливості використання інформації про внутрішньоклітинні ВО та електронні бази даних гліканів глікокон'югатів для передбачення структур ВО плазми крові. Експериментально отримані хроматографічні спектри ВО плазми крові здорових донорів порівнювали зі структурами гліканів та їх спектрами, що наведені в наукових публікаціях та електронних базах даних GlycoBase і EUROCarbDB. Такий підхід дозволив запропонувати можливі структури вуглеводів для основних піків хроматографічних спектрів ВО плазми крові з метою розробки шляхів їх подальшого експериментального аналізу.

**Ключові слова:** вільні олігосахариди, плазма крові, ВЕРХ-спектри гліканів, електронні бази даних GlycoBase і EUROCarbDB.

### **ВСТУП**

Вільні олігосахариди (ВО) – це не пов'язані з глікокон'югатами глікани та продукти їх деградації, що утворюються в процесі глікозилування, клітинного контролю фолдингу у ендоплазматичному ретикулуму і лізосомального розпаду глікопротеїнів, гліколіпідів, протеогліканів та глікозилфосфотидилінозитольних якорів. Яким шляхом та з яких саме джерел ВО клітин потрапляють до плазми крові ще невідомо, але інформацію про будову внутріклітинних гліканів та олігосахаридної частки глікокон'югатів, яка доступна з публікацій та баз даних, цілком доречно застосувати для передбачення можливих структур ВО плазми крові.

Існує 3 головних портали інформаційних баз даних: 1) Міжнародний консорціум з функціонального глікому (Consortium for Functional Glycomics – [www.functionalglycomics.org](http://www.functionalglycomics.org)) 2) Кіотська енциклопедія генів і геномів (KEGG GLYCAN – [www.genome.jp/kegg/glycan](http://www.genome.jp/kegg/glycan)) 3) Глікобіологічна ініціатива інституту раку Німеччини (Glycosciences – [www.glycosciences.de](http://www.glycosciences.de)) та окремі бази даних з детальною інформацією по вузьким питанням глікобіології: про лектини тварин (A Genomics Resource for Animal Lectins – [www.imperial.ac.uk/research/animalleclectins/](http://www.imperial.ac.uk/research/animalleclectins/)), про тривимірні структури лектинів (Three-dimensional Lectin Database – [www.cermav.cnrs.fr/lectines/](http://www.cermav.cnrs.fr/lectines/)), про вуглеводи бактерій (Bacterial Glycan Database –

csdb.glycoscience.ru/bacterial/), про ферменти, що беруть участь в синтезі вуглеводів (CAZy – [www.cazy.org/Enzyme-Glyco-Resources.html](http://www.cazy.org/Enzyme-Glyco-Resources.html)) та інші [1–5].

В якості джерела інформації для нашої роботи було вибрано дві електронні бази даних GlycoBase ([www.glycobase.nibr.ie/glycobase/show\\_nibr.action](http://www.glycobase.nibr.ie/glycobase/show_nibr.action)) та EUROCarbDB ([www.eurocarbdb.org/](http://www.eurocarbdb.org/)). Перша створена і підтримується Dublin-Oxford Glycobiology Lab., а EUROCarbDB – продукт роботи міжнародного колективу, що був створений за фінансовою підтримкою 6-ї Рамкової програми Євросоюзу. Обидві бази містять дані про хроматографічні профілі гліканів в глікопротеїнах. GlycoBase включає більше 675 структур N-гліканів, O-гліканів та продуктів їх деградації екзоглікозидазами. З них 168 структур було виявлено в плазмі крові людини. EUROCarbDB серед 50000 гліканів містить більше 2000 структур вуглеводів, які було знайдено в глікопротеїнах людини та їх хроматографічні характеристики [6–9].

У попередніх дослідженнях нами були отримані хроматографічні спектри загального пулу вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів [10] та з'ясована його гетерогенність по заряду [11]. Метою даної роботи було вивчення можливості застосування інформації з відкритої літератури та електронних баз даних GlycoBase, EUROCarbDB про структури внутрішньоклітинних вільних гліканів та гліканів глікокон'югатів для аналізу структури вільних олігосахаридів плазми крові.

## 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. [12]. Залишки білків з плазми вилучали шляхом фільтрації за допомогою фільтру з гідрофільною поліфлуороетиленовою (PTFE) мембраною (Millex-LH, 0.45  $\mu$ m, Millipore Corp., США) згідно [13]. 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 [13].

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. [14]. Очищення 2-AA-маркованих олігосахаридів проводили шляхом твердофазної екстракції на колонках Speed SPE Cartridges Amide-2, (Applied Separations, США) [13].

Марковані глікани поділяли на нейтральні та заряджені іонообмінною хроматографією на QAE- Sephadex (Q25-120) після нанесення їх на колонку та промивки Milli-Q™ H<sub>2</sub>O шляхом елюції нейтральних гліканів оцтовою кислотою, а заряджених - амоній ацетатом згідно з Neville D.C.A. et al.[14].

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.

[14,15]. 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.[14].

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

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Досліджували олігосахариди, що мали у своєму складі 4 та більше моносахаридних залишків, тому аналізували ВЕРХ-спектри у відрізку часу від 20 до 42 хвилин. Порівнювали характеристики піків – глюкозні одиниці (ГО) – загального пулу, нейтральних (незаряджених) та кислих (заряджених) вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів із відомими з наукових публікацій характеристиками піків внутрішньоклітинних вільних олігосахаридів та гліканів глікопротеїнів, які зібрані у електронних базах даних.

На рис.1 наведені ВЕРХ-спектри ВО плазми крові в порівнянні з ВЕРХ-спектрами частково гідролізованого декстрану для визначення ГО кожного піку.

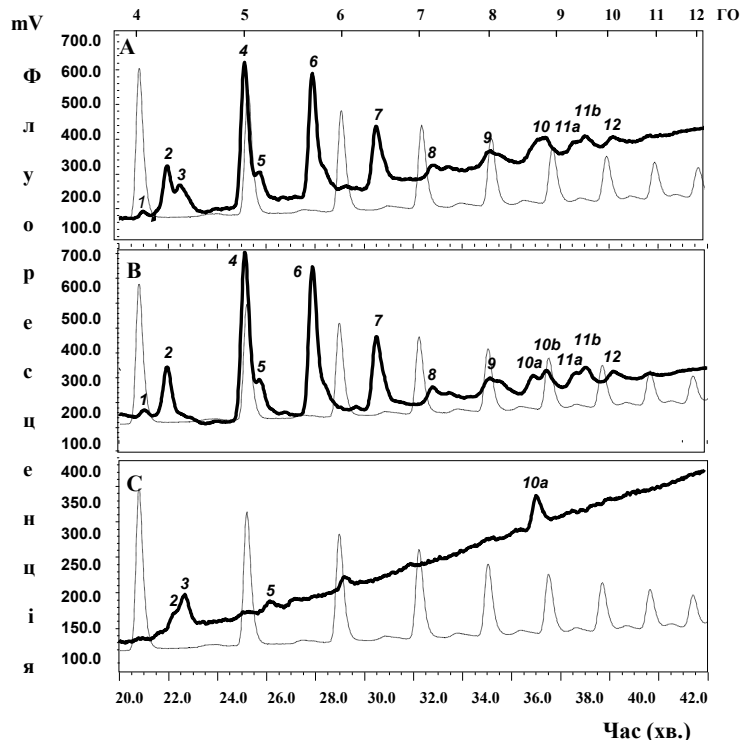

























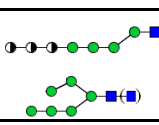
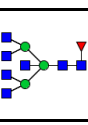
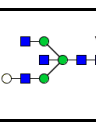
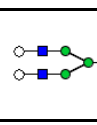




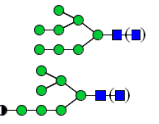
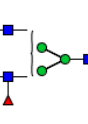
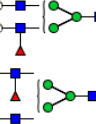
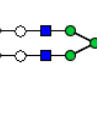




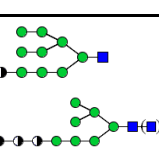

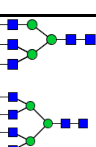
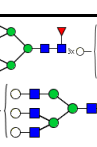


Рис.1. ВЕРХ-спектри вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів (суцільна лінія) та ВЕРХ-спектри зовнішнього стандарту – частково гідролізованого декстрану (пунктирна лінія)

А – загальні ВО, В – незаряджені ВО, С – заряджені ВО

Таблиця 1

Характеристики ВЕРХ-піків ВО плазми крові і відповідні структури внутрішньоклітинних ВО та гліканів глікопротеїнів

№ піку	ВО плазми (ГО)	Структури внутрішньоклітинних ВО	Структури гліканів глікопротеїнів з баз даних		
1	4,08 ±0,01				
2	4,28 ±0,01				
3	4,40 ±0,01				
4	5,01 ±0,01				
5	5,17 ±0,03				
6	5,69 ±0,01				
7	6,40 ±0,01				
8	7,08 ±0,01				
9	7,85 ±0,01				
10	8,62 ±0,02				
11	9,40 ±0,02				
12	9,93 ±0,03				

■ -N-ацетилглюкозамін, ● -маноза, ○ -глюкоза, ○ -галактоза, ◆ -сіалова кислота, ▼ -фукоза  
□ -N-ацетилгалактозамін

В табл.1 представлені характеристики 12 визначених піків ВЕРХ-спектрів ВО плазми та структури гліканів з відповідними глюкозними одиницями. Нумерація піків в таблиці відповідає нумерації на рис.1.

Всередині клітини головними джерелами вільних олігосахаридів є початкові етапи N-глікозилювання, асоційована з ендоплазматичним ретикуломом деградація білків, які не пройшли клітинного контролю фолдингу, та лізосомальна деградація зрілих глікокон'югатів [16, 17]. До джерел ВО біологічних рідин можуть додаватися ще зовнішні – процеси відщеплення гліканів від глікокон'югатів глікозидазами на поверхні клітин чи ферментами плазми крові.

Структури вільних олігосахаридів, що виникають на початкових етапах N-глікозилювання та в процесі контролю фолдингу, добре відомі та вивчені детально [18]. Перш за все, це сам кор N-глікану –  $\text{Man}_3\text{GlcNac}_2$  – та його попередники в синтезі. А також велика кількість поліманозних олігосахаридів, що синтезуються до утворення так званого олігосахариду-попередника, з якого буде з'являтися усе різноманіття N- гліканів, –  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$  – та їх глюкозильовані похідні. Пул цих гліканів може мати один чи два залишки N-ацетилглюкозаміну, що відмічено у таблиці дужками. Відповідні характеристики (ГО) ВЕРХ-спектрів цієї сукупності гліканів було взято з роботи [13], в якій умови проведення нормальнофазової вискоєфективної рідинної хроматографії повністю збігалися з умовами методу, застосованому в наших дослідженнях. Структури гліканів з цих джерел, характеристики спектрів яких відповідають глюкозним одиницям експериментальних ВЕРХ-спектрів ВО плазми крові, наведені у таблиці як «Структури внутрішньоклітинних ВО». Лізосомальна та зовнішньоклітинна деградація глікокон'югатів – це джерела ВО із значно більшим різноманіттям структур. Велику кількість таких структур з відповідними глюкозними одиницями було знайдено в базах даних. Головні з них наведені у таблиці.

Зібрані дані свідчать про те, що для 11 з 12 піків існують відповідні структури серед внутрішньоклітинних ВО – високоманозні нейтральні глікани. Але пік 3 не може бути нейтральним згідно з розподілом ВО плазми по заряду. Тому тільки 10 піків можуть включати такі структури. Деякі піки, наприклад 10 та 11, складаються з 2 підпіків (а та b), що свідчить про присутність щонайменш 2-х структур у кожному. Згідно з таблицею, пік 10a може бути двохантним комплексним гліканом з двома залишками сілових кислот, а пік 10b – високоманозним нейтральним гліканом з 1 чи 2 залишками N-ацетилглюкозаміну. Він може включати також залишок глюкози, чи бути більш складною структурою - двохантним комплексним гліканом з залишками фукози. Обидва підпіки піку 11-це незаряджені глікани. Можливо один з них – високоманозний глікан  $\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$ , а другий – комплексний глікан. На загальній хроматограмі 2 та 5 піки на підпіки не розділяються, але розподіл по заряду виявляє в них як нейтральні, так і заряджені олігосахариди.

Отримана таблиця гліканових структур дозволяє розробити стратегію подальшого аналізу вільних олігосахаридів плазми крові. Афінна хроматографія з лектином коновалії (ConA) дозволить відділити високоманозні та нейтральні двох

антенні комплексні глікани від інших. Ферментативна деградація може дати ще більш детальну інформацію про будову вільних олігосахаридів плазми.

### ВИСНОВКИ

1. Використання характеристик хроматографічних спектрів внутрішньоклітинних вільних олігосахаридів та інформації стосовно структур гліканів глікопротеїнів, яка надана в електронних базах даних GlycoBase і EUROCarbDB, дозволило визначити сукупність найбільш ймовірних структур вуглеводів для усіх піків ВЕРХ-спектрів вільних олігосахаридів плазми крові практично здорових донорів.
2. Наявність передбачуваних структур дає можливість розробити стратегію подальшого експериментального аналізу ВЕРХ-спектрів.

### 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. Aoki-Kinoshita K.F. Bioinformatics approaches in glycomics and drug discovery / K.F. Aoki-Kinoshita, M. Kanehisa // *Curr Opin Mol Ther.* – 2006. – Vol.8(6): – 514–520.
2. Ranzinger R. GlycomeDB – integration of open-access carbohydrate structure Databases / R. Ranzinger, S. Herget, T. Wetter [et al.] // *BMC, Bioinformatics* – 2008. – Vol.19. – P.379–384.
3. Kanehisa M. The KEGG database / M. Kanehisa // *Novartis Found Symp.* – 2002. – Vol.247. – P.91–101.
4. Hashimoto K. KEGG as a glycome informatics resource / K. Hashimoto, S. Goto, S. Kawano [et al.] // *Glycobiology* – 2006. – Vol.16(5). – P.63R–70R.
5. Lütke T. GLYCOSCIENCES.de: an Internet portal to support glycomics and glycobiology research / T. Lütke, A. Bohne-Lang, A. Loss [et al.] // *Glycobiology* – 2006. – Vol.16 (5). – P.71R–81R.
6. Campbell M.P. GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis / M.P. Campbell, L. Royle, C.M. Radcliffe [et al.] // *Bioinformatics* – 2008. – Vol.1, №24 (9). – P.1214–1216.
7. Harvey D. J. Proposal for a standard system for drawing structural diagrams of *N*- and *O*-linked carbohydrates and related compounds / D.J. Harvey, A.H. Merry, L.P. Royle [et al.] // *Proteomics* – 2009. – Vol.9. – P.3796–3801.
8. Harvey D.J. Symbol nomenclature for representing glycan structures: Extension to cover different carbohydrate types / D.J. Harvey, A.H. Merry, L. Royle // *Proteomics* – 2011. – Vol.11 (22). – P.4291–4295.
9. von der Lieth C.-W. EUROCarbDB: An open-access platform for glycoinformatics / C.-W. von der Lieth, A.A. Freire, D. Blank // *Glycobiology* – 2011. – Vol.21 (4). – P. 493–502.
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. 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.
12. 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.

13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Parodi A.J. Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation // *Biochem J.* – 2000. – Vol. 348. – P.1–13.
17. Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins / B. Winchester // *Glycobiology* – 2005. – Vol.15, № 6. – P.1R–15R.
18. 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.

**Письменецкая И.Ю. Прогнозирование структур 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), № 3. – С.158-164.**

Свободные олигосахариды (СО) – это не связанные с гликоконъюгатами гликаны, продукты их синтеза и деградации. Точный анализ структур гликанов чрезвычайно сложен из-за их огромного разнообразия. Данная статья посвящена изучению возможности использования информации о внутриклеточных СО и электронных баз данных по гликанам гликоконъюгатов для предсказания структур СО плазмы крови. Экспериментально полученные хроматографические спектры СО плазмы крови практически здоровых доноров сравнивали со структурами гликанов и их спектрами, приведенными в научных публикациях и в электронных базах данных GlycoBase и EUROCarbDB. Такой подход позволил предложить возможные структуры углеводов для основных пиков хроматографических спектров СО плазмы крови для разработки путей их дальнейшего экспериментального анализа.

**Ключевые слова:** свободные олигосахариды, ВЭЖХ-спектры гликанов, электронные базы данных GlycoBase и EUROCarbDB.

**Pisnenskaya I.U. A structure prediction of blood plasma free oligosaccharides of practically healthy donors / I.U. Pisnenskaya, T.D. Butters // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2012. – Vol. 25 (64), No. 3. – P. 158-164.**

Free oligosaccharides (FOS) are glycans unbound to glycoconjugates, the products of their synthesis and degradation. An accurate analysis of glycan structures is extremely complex because of their enormous diversity. This article is devoted to exploring the possibility of using the information on intracellular FOS and electronic databases on glycans of glycoconjugates to predict blood plasma FOS structures. The chromatographic profiles of plasma FOS of healthy donors obtained experimentally were compared with the structures of glycans and their profiles shown in scientific publications and electronic databases GlycoBase and EUROCarbDB. This approach allowed us to offer the possible structures of carbohydrates for the main peaks of the chromatographic spectrum from blood plasma to develop the ways to further experimental analysis.

**Keywords:** free oligosaccharides, HPLC-profiles of glycans, electronic databases GlycoBase and EUROCarbDB.

*Поступила в редакцию 11.09.2012 г.*