

Anàlisi dels glicans de l'alfa-1-glicoproteïna àcida humana. Optimització de l'extracció i separació dels glicans per μ ZIC-cHILIC-ESI-TOF-MS

I. Compte, E. Giménez, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot

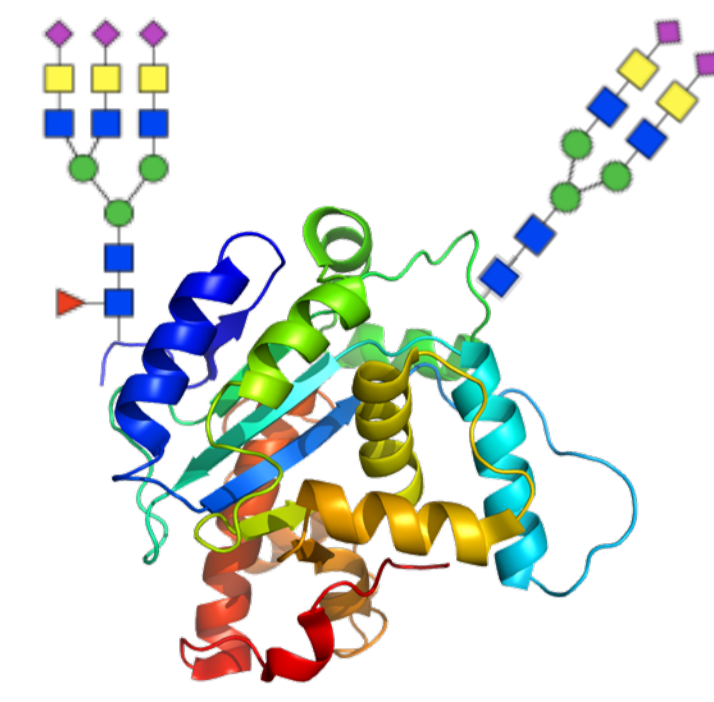
Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica, Universitat de Barcelona



Introducció

La glicosilació és una modificació post-traduccional (PTM) de les proteïnes que juga un paper fonamental en molts processos biològics. L'alteració de l'estructura o de la composició dels glicans units a la cadena peptídica sovint està relacionada amb l'aparició de diverses patologies, entre d'altres el càncer.

Per aquest motiu, la correcta caracterització dels glicans d'una glicoproteïna esdevé de gran importància per avaluar la seva utilitat com a possibles biomarcadors [1].



Exemple de dos N-glicans units a una proteïna

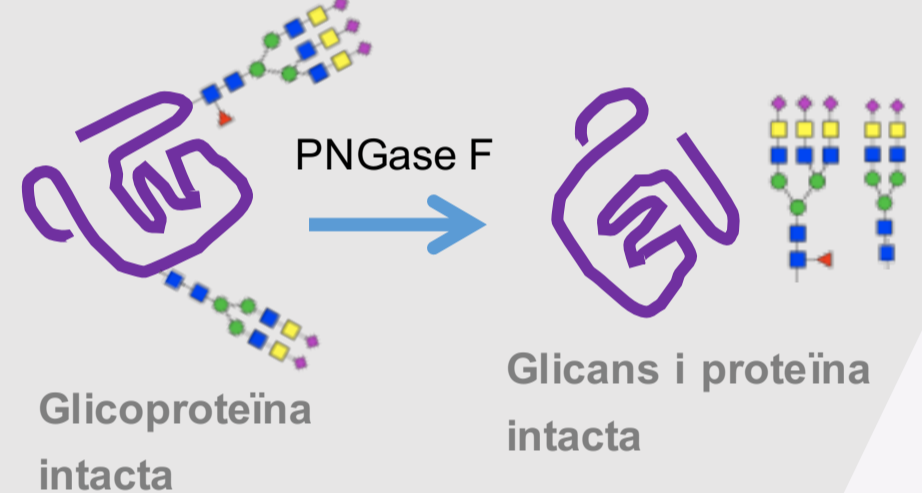
En aquest treball s'ha optimitzat una metodologia analítica μ ZIC-HILIC-TOF-MS, desenvolupada prèviament en el nostre grup de recerca, per a la caracterització dels isòmers dels glicans de l'alfa-1-glicoproteïna àcida humana (AGP), actualment estudiada com a biomarcador potencial del càncer de pàncrees [2 i 3]. S'ha avaluat una columna ZIC-cHILIC, amb diferent selectivitat, per tal de millorar la separació dels isòmers dels glicans i s'ha modificat el procediment de purificació dels glicans, emprant microplaques d'elució amb reblliment HILIC, amb l'objectiu d'augmentar el senyal de les mostres i aconseguir millores en els límits de detecció que permetin l'aplicació del mètode a mostres biològiques.

Tractament de mostra

1 Digestió amb PNGase F

Les mostres es redueixen en una solució 50 mM de Na_3PO_4 al 0,5 % de SDS i β -ME, es porten a ebullició durant 30 min.

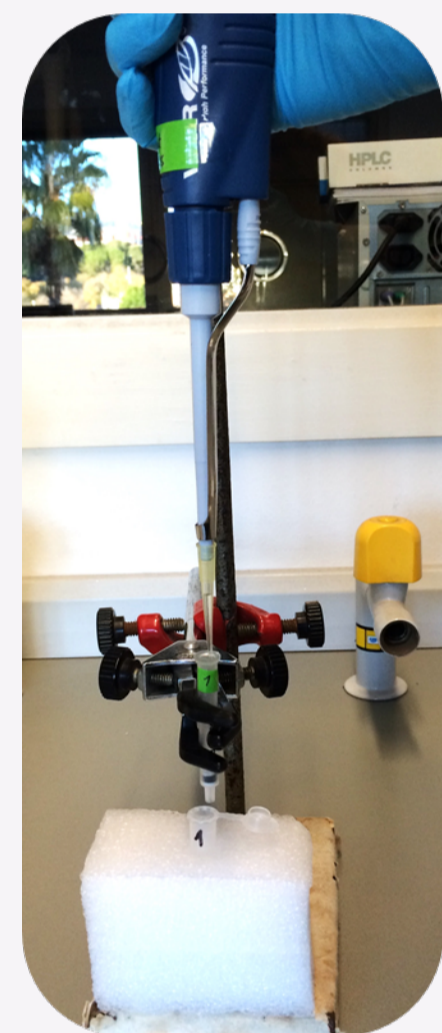
S'afegeix el reactiu NP-40 per preservar l'activitat de l'enzim i 1 U de PNGase F.



2 Purificació dels glicans

Els digestos es purifiquen emprant dos mètodes diferents:

A) Mètode PGC

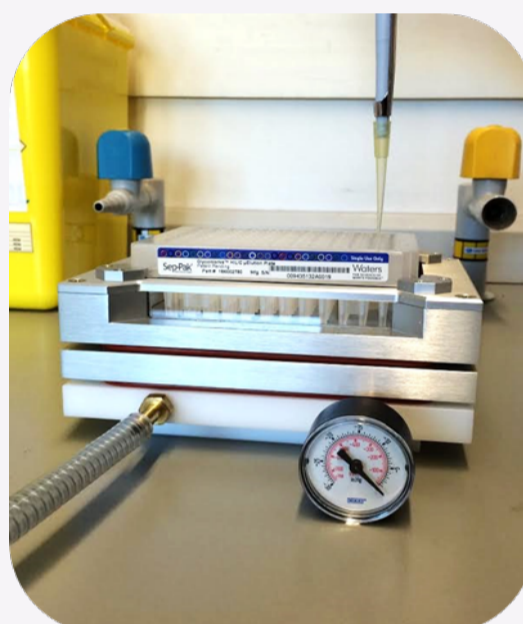


Cartutxos d'extracció en fase sòlida (SPE) HYPERCARB, Thermo. (Rebliment de Porous Graphite Carbon, PGC)



Elució amb aigua al 60 % de ACN i al 0.1 % d'àcid fòrmic

B) Mètode HILIC



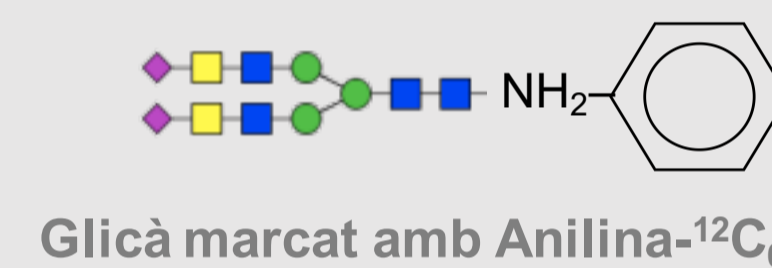
Microplaca d'elució, Waters. (Rebliment HILIC) Elució amb Tris-citrat sòdic 1mM

- ✓ Poca quantitat de mostra
- ✓ Procés més ràpid

3 Marcatge isotòpic

S'afegeix als glicans secs 10 μL d'una solució de 0.35 M d'anilina- $^{12}\text{C}_6$ i 1 M NaCNBH_3 en DMSO al 30 % d'àcid acètic.

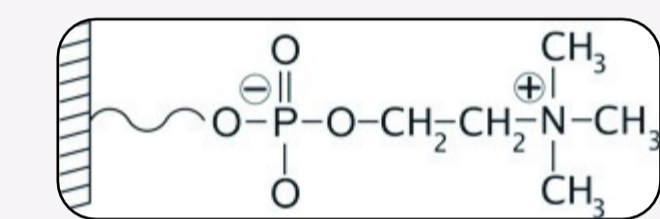
S'incuben a 70 $^\circ\text{C}$ durant 2 h.



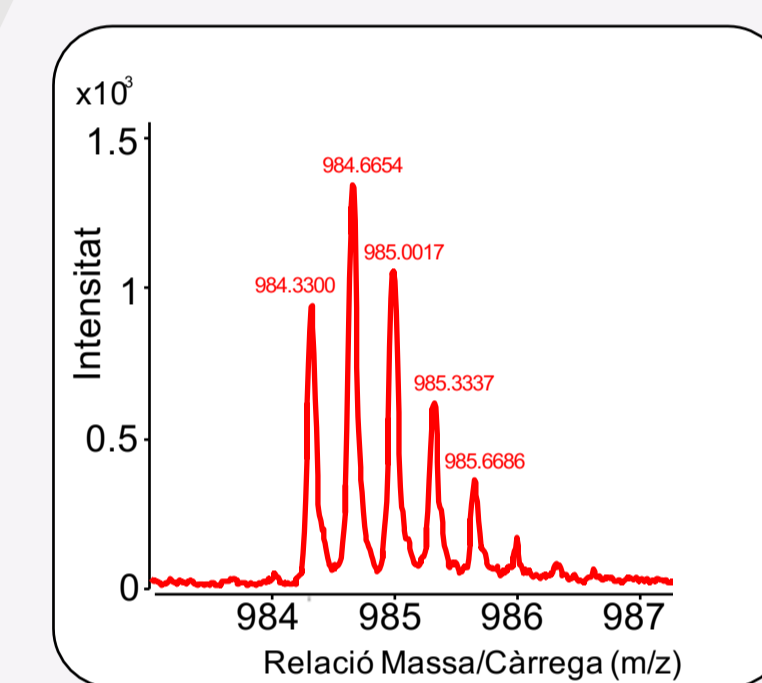
Glicà marcat amb Anilina- $^{12}\text{C}_6$

4 Separació i caracterització dels glicans

Els glicans són separats per cromatografia de líquids capil·lar d'interacció hidrofílica zwitteriònica (ZIC-cHILIC).



Fase estacionària ZIC-cHILIC

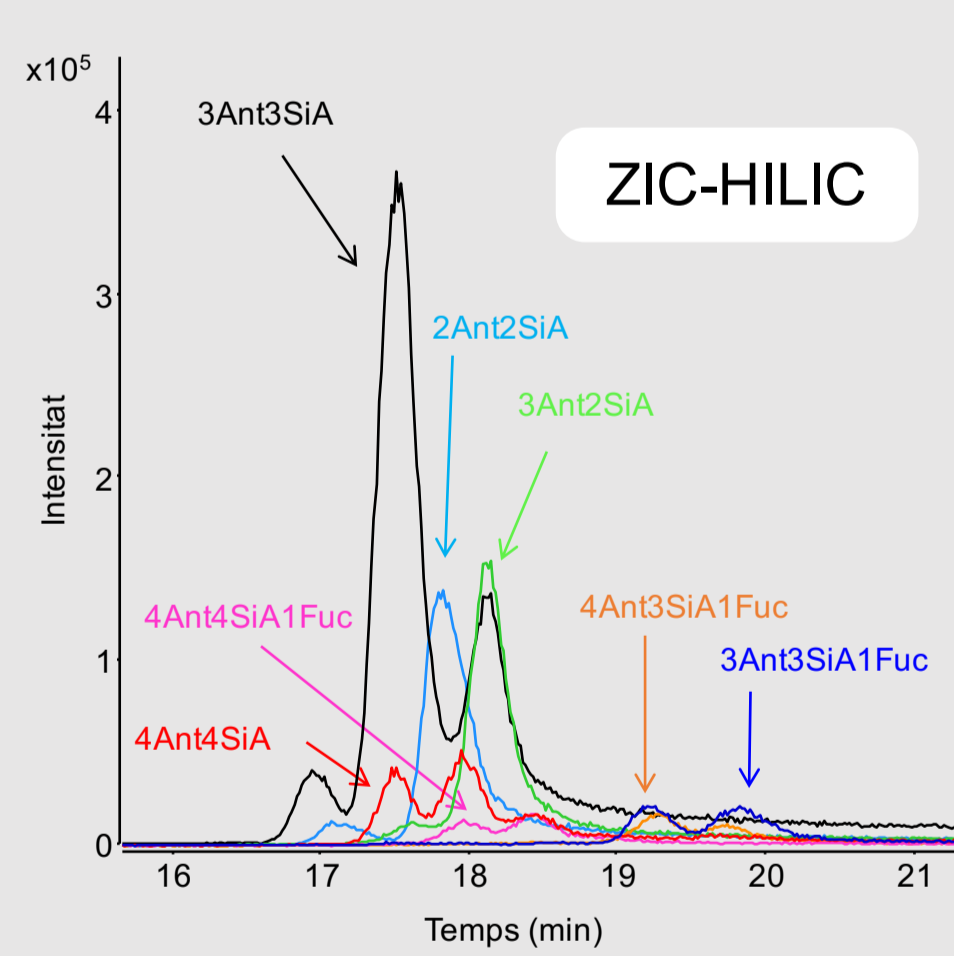


Els glicans són analitzats per espectrometria de masses

Resultats i discussió

Optimització de la separació de N-glicans

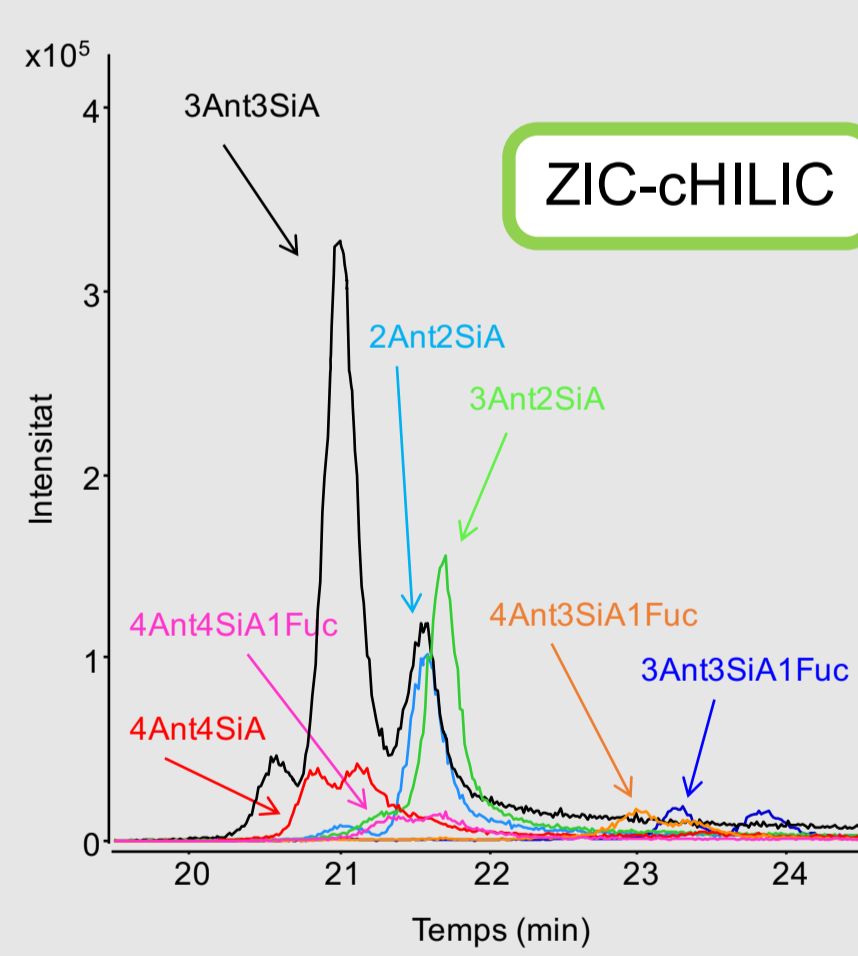
Optimització de la columna cromatogràfica



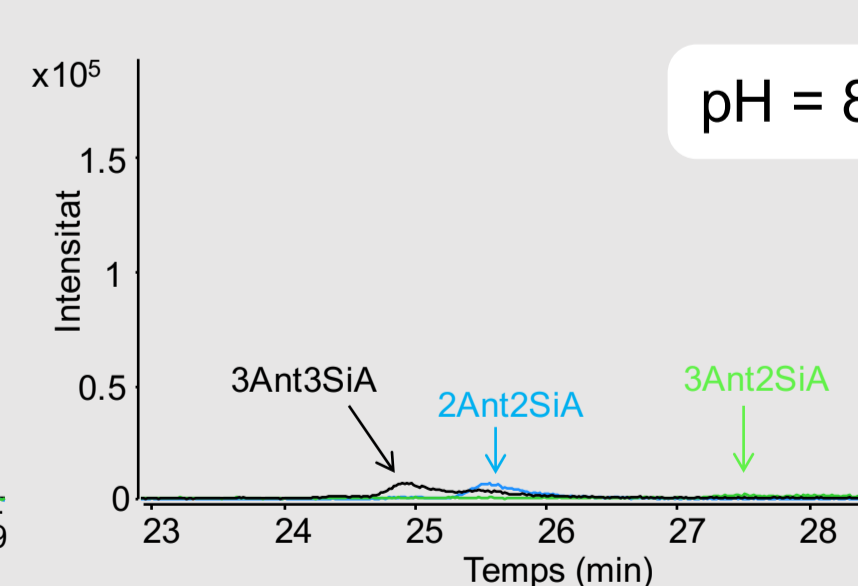
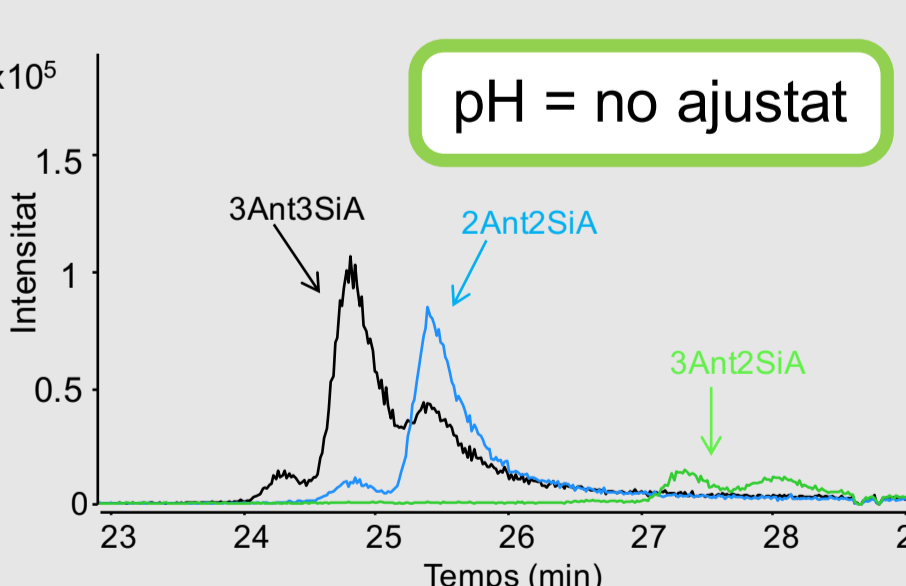
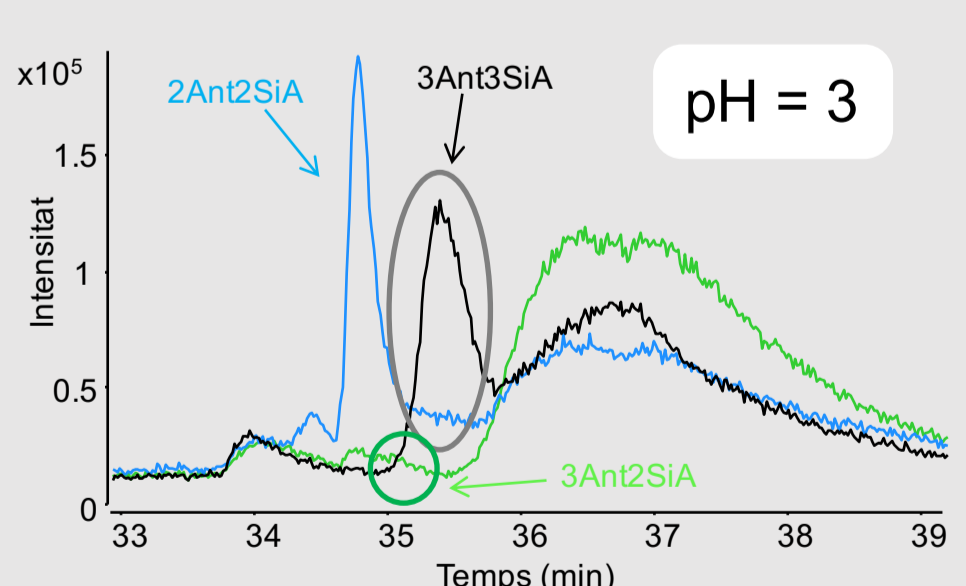
S'observa que els glicans minoritaris es troben més ben separats utilitzant la columna ZIC-cHILIC.

L'ordre d'elució varia entre les dues columnes degut al canvi de la càrrega dels zwitterions en la fase estacionària.

(Mostra: 25 μg de AGP digerida, digerida amb PNGase F i ajustada a una concentració de 12,5 pmol/ μL)



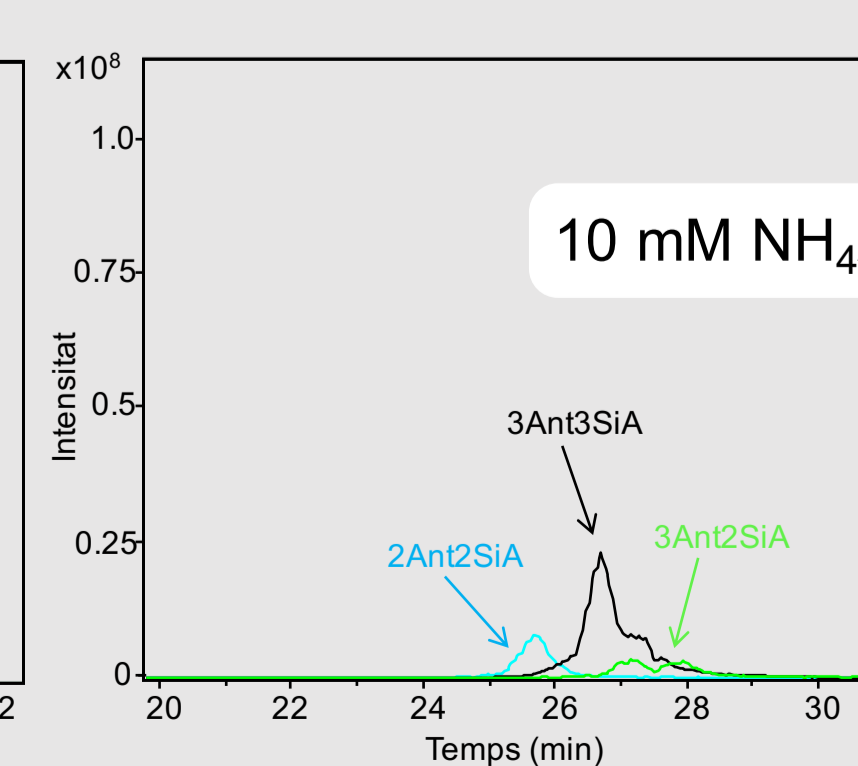
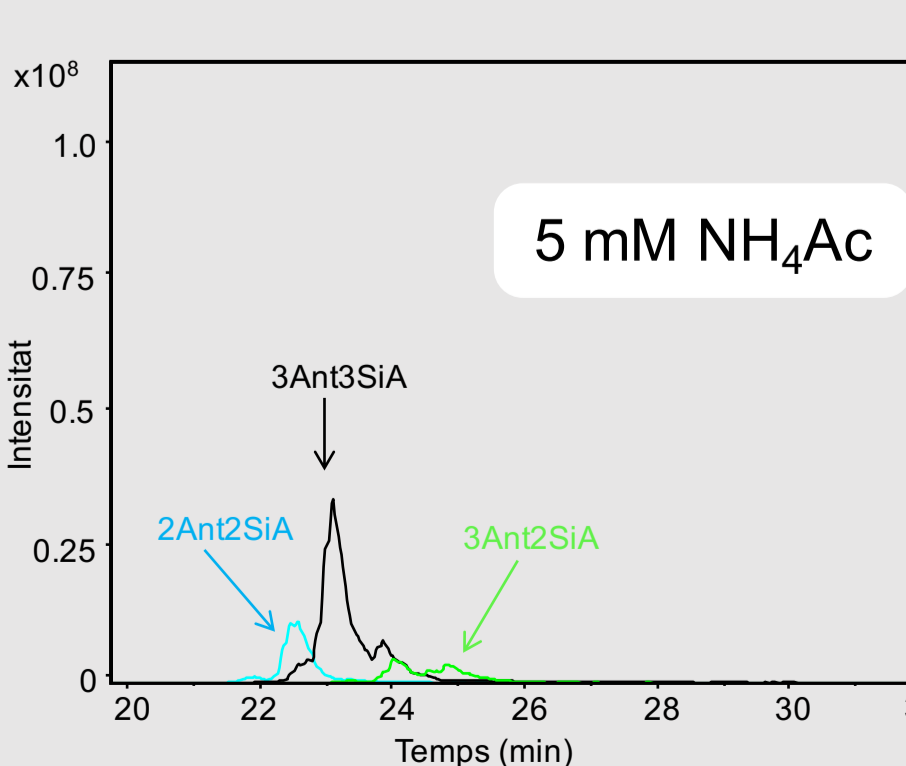
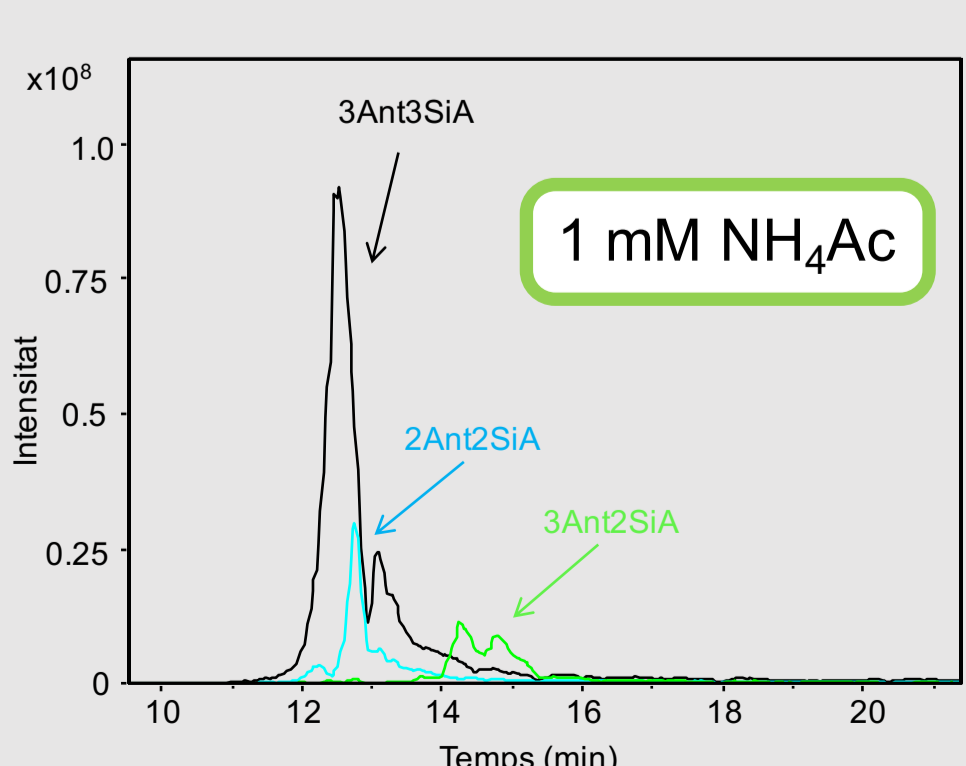
Optimització del pH de la fase mòbil



(Mostra: 25 μg de AGP digerida, digerida amb PNGase F i injectada amb la columna ZIC-cHILIC a una concentració de 12,5 pmol/ μL)

Canvis en el pH de la fase mòbil no milloren la separació i la intensitat dels glicans es veu reduïda. Fase mòbil seleccionada amb el pH sense ajustar.

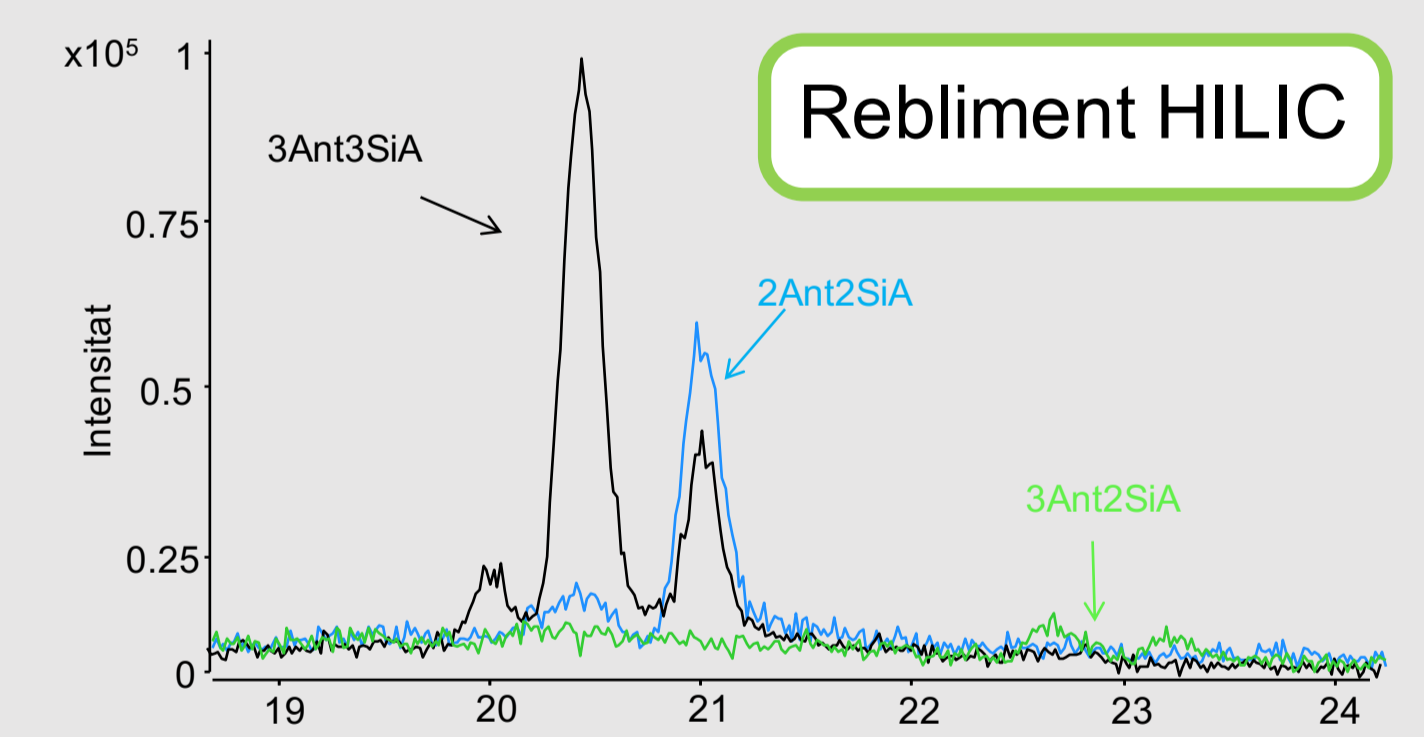
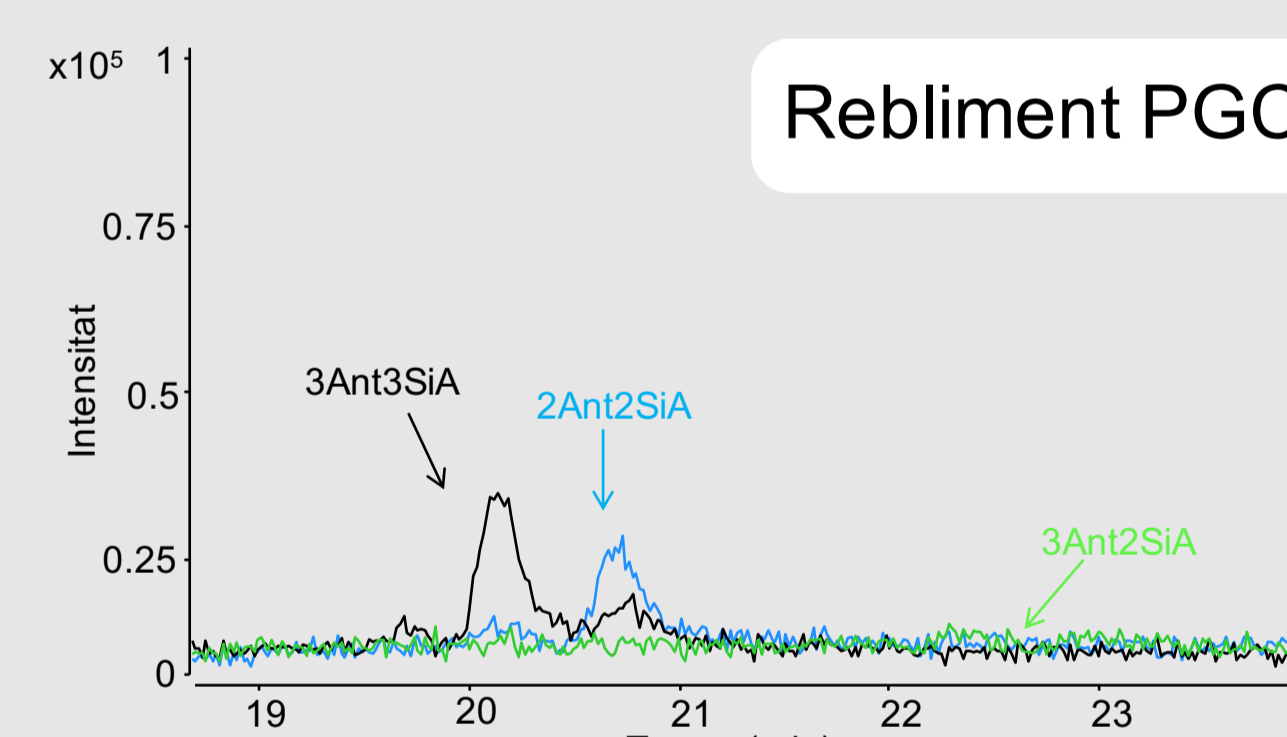
Optimització de la força iònica



(Mostra: 25 μg de AGP digerida, digerida amb PNGase F i injectada amb la columna ZIC-cHILIC a una concentració de 12,5 pmol/ μL)

Com menys força iònica, més intensos i definits es veuen els glicans. Fase mòbil seleccionada: 1 mM de NH_4Ac amb el pH sense ajustar.

Avaluació dels mètodes de purificació



(Mostra: s'han escollit 2 μg de AGP ja que és una concentració propera al límit de detecció (LOD). S'ha digerit amb PNGase F i injectada a una concentració de 12,5 pmol/ μL amb les condicions cromatogràfiques optimitzades)

Glicà	2Ant2SIA	2Ant2SIA1Fuc	3Ant3SIA	3Ant3SIA1Fuc	3Ant2SIA	4Ant4SIA	4Ant4SIA1Fuc	4Ant3SIA1Fuc
2 μg PGC	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✓	✗
2 μg HILIC	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Amb quantitats de proteïna properes al límit de detecció (2 μg), alguns glicans minoritaris purificats amb PGC no s'observen, però sí que s'observen amb la purificació realitzada amb la microplaca HILIC.

Conclusions

S'han optimitzat les condicions de separació dels N-glicans de l'AGP, optimitzant el pH i la força iònica de la fase mòbil. La columna ZIC-cHILIC permet separar millor els glicans minoritaris.

La millora de la sensibilitat obtinguda mitjançant la microplaca d'elució amb reblliment HILIC ha comportat disminuir els límits de detecció dels N-glicans dels digestos.

El mètode permetrà analitzar mostres biològiques així com altres glicoproteïnes amb menor percentatge de glicosilació.

Referències

- [1] Varki, A., Kannagi, R., & Toole, B. P. (2009). *Essentials of Glycobiology*. Chapter 44.
- [2] Giménez, E., Balmaña, M., Figueras, J., Fort, E., Bolós, C. De, Sanz-Nebot, V., Rizzi, A. (2015). *Analytica Chimica Acta*, 866, 59–68.
- [3] Mancera-Arteu M., Giménez, E., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., (2016). *Analytica Chimica Acta*, Enviat.