

Charakterisierung der Oligosaccharide von Glycoproteinen in Pikomolmengen durch ^1H -NMR-Spektroskopie**

Meike Fellenberg, Atilla Çoksezen und Bernd Meyer*

Die NMR-Spektroskopie ist ein wertvolles Analyseverfahren für Kohlenhydratstrukturen. Allerdings ist ihre Anwendbarkeit eingeschränkt, falls nur geringe Substanzmengen verfügbar sind. Für Messungen mit kommerziellen Probenköpfen müssen laut Literatur einige Nanomol an Substanz vorhanden sein.^[1,2] Dies entspricht bei einem Decasaccharid mehreren Mikrogramm an Substanz. Um Oligosaccharide aus biologischen Proben mithilfe von NMR-Spektroskopie zu charakterisieren, ist es wünschenswert, mit wesentlich weniger Substanz als einem Nanomol auszukommen, da diese Oligosaccharide häufig aus Glycoproteinen stammen, die nur in geringsten Mengen isolierbar sind. Eine solche NMR-spektroskopische Analyse würde die massenspektrometrische Analyse (MS) ergänzen, die zwar wesentlich empfindlicher ist als die NMR-Spektroskopie, aber auch wesentlich weniger Informationen zur Struktur liefert.

Hier zeigen wir am Beispiel von Sucrose und von einem komplexen N-Typ-Decasaccharid, dass man mit moderner analytischer Ausrüstung in der Lage ist, Spektren von Oligosacchariden bis herab zu 15 Pikomol Substanzmenge aufzunehmen. Um NMR-Spektren von solch geringen Mengen messen zu können, sind spezielle Techniken für die Probenpräparation und spezielle instrumentelle Einstellungen nötig. Besonders bedeutsam für die Aufnahme dieser Spektren war es, eine Wasserunterdrückung um einen Faktor von 500 000 zu erreichen. Zu diesem Zweck wurde die Wasserunterdrückung nach dem „Excitation-Sculpting“-Prinzip modifiziert. Dadurch war es zudem möglich, Signale im Abstand von nur 50 Hz zum Lösungsmittelsignal zu beobachten. Weiterhin wurden die Auswahl der NMR-Röhrchen und die Probenpräparation optimiert. Die Daten wurden auf einem 700-MHz-NMR-Spektrometer erhalten, das mit einem kommerziell verfügbaren Tripelresonanz-Kryoprobenkopf ausgerüstet war.

Die Aufklärung der Kohlenhydratkomponenten von Glycoproteinen ist ein sehr wichtiger Schritt auf dem Weg zum Verständnis der biologischen Funktion der Oligosac-

charide. Obwohl mehr als 60 % der humanen Proteine glycosyliert sind, ist die Rolle vieler Glycanstrukturen bis jetzt noch nicht aufgeklärt. Die Oligosaccharidketten, die mit Proteinen verknüpft sind, tragen unter anderem zur Zellerkennung, zur Faltung von Proteinen und zu Signaltransduktionsprozessen bei.^[3,4] Fehlerhafte Glycosylierungen können schwere Erkrankungen auslösen, z. B. bei angeborenen Glycosylierungsstörungen (congenital disorders of glycosylation, CDG).^[5] Auch bei vielen Tumoren wird ein verändertes Glycosylierungsmuster auf den Zelloberflächen beobachtet. Diese Erkenntnis wird zurzeit für die Entwicklung von Impfstoffen und neuen diagnostischen Verfahren in der Onkologie verwendet.^[6]

Heutzutage sind Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie die Haupttechniken, mit denen man die Struktur von Glycanen aufklärt. NMR-Spektroskopie ist dabei durch die relativ geringe Empfindlichkeit im Vergleich zur Massenspektrometrie eingeschränkt.^[7] Allerdings ist die NMR-Spektroskopie der Massenspektrometrie bei der Analytik von Oligosacchariden weit überlegen, da Information zur Struktur erhalten werden kann, die durch MS nicht verfügbar ist, wie 1) die Konfiguration von Zuckerbausteinen, die das gleiche Molekulargewicht haben, 2) die anomere Konfiguration (α oder β), 3) die Position, an der die Glycoside verknüpft sind, 4) die Position von Substituenten, die an OH-Gruppen geknüpft sind, wie Phosphat- oder Sulfatgruppen, oder 5) die Position von anderen funktionellen Gruppen am Zucker als OH-Gruppen. Zurzeit wird davon ausgegangen, dass für die NMR-Analytik von Molekülen mit kommerziellen Probenköpfen etliche Nanomol Substanz benötigt werden.^[1,2] Die Einführung von Kryoprobenköpfen hat jedoch die Empfindlichkeit um einen Faktor von 4 verbessert, wodurch eine Reduktion der Messzeit um einen Faktor von 16 erreicht wird.^[8,9]


Hier zeigen wir, dass es möglich ist, mithilfe eines hochauflösenden 700-MHz-NMR-Spektrometers, das mit einem Kryoprobenkopf ausgerüstet ist, NMR-Spektren von Molekülen bis herab zu wenigen pmol Substanzmenge aufzunehmen. Dies ist besonders wichtig, weil die meisten Verbindungen aus biologischen Quellen nur in äußerst geringen Mengen verfügbar sind. Sucrose und ein N-verknüpftes komplexes Decasaccharid wurden als Beispiele ausgewählt. Das Decasaccharid wurde durch Vliegenthart et al. charakterisiert und kann mithilfe des Strukturreportergruppen-Konzepts (structural reporter group concept) leicht auch allein anhand der 1D- ^1H -Spektren zugeordnet werden (Abbildung 1).^[10–12]

Die untere Detektionsgrenze eines Signals ist so definiert, dass es mindestens die dreifache Höhe des quadratischen Mittelwerts des Rauschens haben muss.^[1,13] Nach Informa-

[*] M. Fellenberg, Dr. A. Çoksezen,^[†] Prof. Dr. B. Meyer
Fachbereich Chemie, Universität Hamburg
Martin-Luther-King-Platz 6, 20146 Hamburg (Deutschland)
E-Mail: bernd.meyer@chemie.uni-hamburg.de
Homepage: <http://www.chemie.uni-hamburg.de/oc/meyer>

[†] Jetzige Adresse: IP Bewertungs AG (IPB), Stephansplatz 10, 20354 Hamburg (Deutschland)

[**] Wir bedanken uns bei der DFG für die finanzielle Unterstützung für das 700-MHz-NMR-Spektrometer und außerdem bei Prof. Dr. H. Weller, Hamburg, für die Nutzungsmöglichkeit des Plasmaofens.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200906680> zu finden.

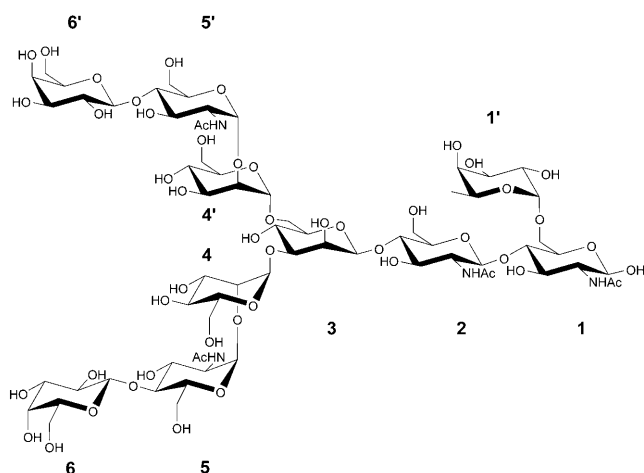


Abbildung 1. Struktur eines N-Typ-Decasaccharids, das von einem Glycoprotein abgespalten wurde.

tionen der Firma Bruker^[18] ist es in Kryoprobenköpfen möglich, bei gleicher Konzentration der Probe in 3-mm-Röhrchen ungefähr das gleiche Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) zu erhalten wie in 5-mm-Röhrchen. Auf unserem Spektrometer erhalten wir bei Proben mit der gleichen Konzentration in einem 3-mm-Röhrchen 90 % des S/N verglichen mit einem 5-mm-Röhrchen. Das bedeutet, dass wir 90 % S/N mit nur 32 % der Substanz erhalten, wodurch die Massensensitivität des Spektrometers um einen Faktor von ungefähr 3 gesteigert wird. Die intrinsische Empfindlichkeit unseres Kryoprobenkopfs bezogen auf das anomere Proton einer Testprobe (2 mM Sucrose in H₂O/D₂O 9:1) in einem 5-mm-Röhrchen betrug S/N = 631 bei 8 Scans. Daraus errechnet sich die minimale Substanzmenge, die für eine Messung mit 40 000 Scans im Spulenvolumen vorhanden sein sollte, zu 18 pmol. Mit 2000 Scans sollten sich dann 60 pmol einer Substanz komfortabel messen lassen. Diese Abschätzung war die Basis für die im Folgenden beschriebenen Experimente.

Die Proben der untersuchten Verbindungen mit niedriger Konzentration wurden aus Stammlösungen in D₂O mit ca. 2 mM Konzentration durch zwei- oder dreimaliges Verdünnen hergestellt (siehe Hintergrundinformationen). Aufgrund der leichteren Handhabbarkeit wurden die 3-mm-NMR-Röhrchen dann mit einem Gesamtvolumen (V_{tot}) von 200 μL befüllt. Das Probenvolumen innerhalb der RF-Spule (V_{obs}) entspricht 80 μL (TXI-Kryoprobenkopf, siehe die Hintergrundinformationen). Die Angaben zu Probenmengen im folgenden Text beziehen sich immer auf das Volumen innerhalb der RF-Spule (V_{obs}).

Anfängliche Versuche, Proben von 60 pmol Substanz zu vermessen, zeigten drei Hauptprobleme auf: 1) Die Intensitäten der Signale von Verunreinigungen waren wesentlich stärker als diejenigen der Saccharide, 2) Signale der Substanzen, die nahe am Lösungsmittelsignal liegen, wurden durch die Wasserunterdrückung in ihrer Intensität drastisch reduziert oder waren gar nicht mehr im Spektrum identifizierbar, und 3) in der Nähe des Wassersignals wurden große Schwingungen der Basislinie durch die Wasserunterdrückung

erzeugt (siehe Abbildung 3 und Abbildung S1). Diese drei Probleme werden im Folgenden diskutiert.

Erstens: Wenn man Oligosaccharide, von denen nur wenige pmol in der Probe vorhanden sind, untersuchen möchte, dann liefern schon Verunreinigungen von nur wenigen Nanogramm Signale, die stärker sind als diejenigen des Oligosaccharids. Wir beobachteten in den ersten Spektren Signale von Verunreinigungen, die bis zu 30fach intensiver waren als die Signale des Oligosaccharids selbst und aufgrund von Überlappungen die Charakterisierung des Kohlenhydrats wesentlich erschwerten (Abbildung S2).

Um reine Spektren der Verbindungen zu erhalten, verwendeten wir Glasmaterial anstelle von Plastikkomponenten. Die Einmalspitzen der Pipetten waren die einzigen Plastikkomponenten, die mit der Probe in Kontakt kamen. Während diese Spitzen aber keinerlei Verunreinigungen mit sich brachten, trugen die Glaswände der NMR-Röhrchen Kontaminationen in der Größenordnung von einigen Nanomol, wobei es sich vermutlich um Rückstände aus dem Produktionsprozess handelte. Wir reinigten daher die Probengefäße aus Glas und die NMR-Röhrchen direkt vor der Benutzung in einem Plasmaofen. Dies führte dann zu Spektren mit keinen oder nur sehr geringen Verunreinigungen (siehe Experimentelles und die Hintergrundinformationen).

Zweitens: Die Wasserunterdrückung stellt eines der typischen Probleme bei der Aufnahme von NMR-Spektren von Biomolekülen dar. In unseren Experimenten ist die „Excitation-Sculpting“-Pulssequenz der Arbeitsgruppe von Shaka das beste Verfahren, um das Wassersignal zu unterdrücken.^[14] Während die publizierten Parameter zu einer sehr guten Wasserunterdrückung führten, lieferten sie auch eine sehr starke Unterdrückung der Oligosaccharidsignale, die nahe an der H₂O/D₂O-Resonanz liegen.

Die Verwendung eines längeren selektiven Pulses führt zu einer immer noch zufriedenstellenden Reduktion des Lösungsmittelsignals, ermöglicht aber die Beobachtung von Oligosaccharidsignalen in der Nähe des H₂O-Signals. Abbildung 2 zeigt die Spektren einer Probe des Decasaccharids mit einer Konzentration von 1 mM in H₂O/D₂O (9:1), die mit selektiven Pulsen in der „Excitation-Sculpting“-Pulssequenz von 2 bzw. 8 ms aufgenommen wurden. Der längere und damit selektivere Puls von 8 ms führt im Abstand zwischen 50 und 200 Hz vom H₂O-Signal zu einer wesentlich verbesserten Intensität der Oligosaccharidsignale. Die anomeren Protonen von Fuc-1', GlcNAc-1 und GlcNAc-2 sind in dem oberen Spektrum von Abbildung 2 mit einem selektiven Puls von 2 ms nicht zu sehen, können aber bei der Verwendung eines selektiven 8-ms-Pulses im unteren Spektrum eindeutig beobachtet werden. Zusätzlich finden wir bei den Signalen der anomeren Protonen der Gal-6/6'- und der GlcNAc-5/5'-Bausteine im Abstand von 210 Hz und 130 Hz zum H₂O-Signal die volle Intensität, was einer Zunahme um den Faktor 2.5 bzw. 10 entspricht. Bei 80 Hz Abstand sehen wir immerhin noch eine Intensität von 35 % des Signals von GlcNAc-2 (H-1) und bei 50 Hz Abstand eine Intensität von 7 % des Signals von GlcNAc-1 (H-1 β). Das heißt, selbst in H₂O/D₂O (9:1) können wir mit der modifizierten Wasserunterdrückung noch Signale in einem Abstand von nur 0.07 ppm zum Wassersignal beobachten.

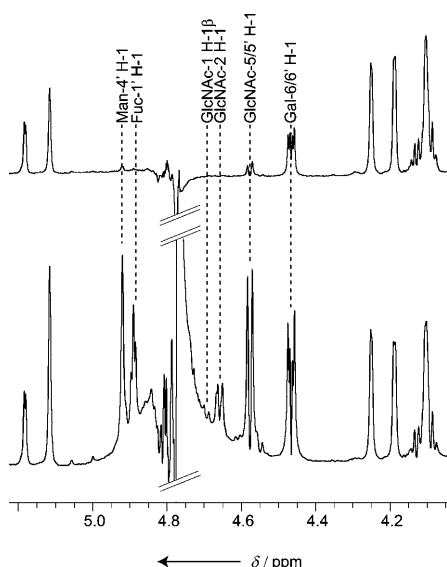


Abbildung 2. Optimierung der Unterdrückung des Lösungsmittelsignals in einer Probe mit 1 mm Decasaccharid (entsprechend 80 nmol/ V_{obs}) in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) mithilfe der „Excitation-Sculpting“-Pulssequenz. Oben: NMR-Spektrum, wie es unter den Standardbedingungen von Hwang et al.^[14] mit einem selektiven Puls von 2 ms erhalten wird. Substanzsignale in der Nähe des HDO-Signals haben extrem geringe Intensitäten oder können überhaupt nicht beobachtet werden. Unten: Ein selektiver Puls von 8 ms innerhalb der Pulssequenz führt zu einer reduzierten Anregungsbreite von ungefähr 30 Hz, die immer noch ausreichend ist, um das Lösungsmittelsignal zu unterdrücken. Dadurch lassen sich Signale, die nahe am HDO-Peak liegen wesentlich besser beobachten. So hat das Signal für H-1 von GlcNAc-2 immer noch ein Drittel seiner Intensität, obwohl es im oberen Spektrum nicht sichtbar ist. Selbst das Signal für H-1 des β -Anomers von GlcNAc-1 kann bei einem Abstand von nur 50 Hz zum HDO-Signal in diesem Spektrum noch mit 7 % seiner normalen Intensität beobachtet werden.

Drittens: Wenn sehr viele Scans akkumuliert werden müssen, führt die Wasserunterdrückung sowohl durch die „Excitation-Sculpting“-^[14] als auch durch die WATERGATE-Sequenz^[15] zu stark verzerrten Basislinien (vgl. Abbildung 3, Mitte, und Abbildung S1). Dieses Artefakt konnte ebenfalls durch den längeren selektiven Puls in der „Excitation-Sculpting“-Sequenz (siehe Experimentelles) eliminiert werden.

Spektren, die in D_2O aufgenommen wurden, enthielten noch 40 μmol H_2O , entsprechend etwa 1 %. Unter optimierten Bedingungen für die Wasserunterdrückung hat das HDO-Signal dieselbe Intensität wie die Oligosaccharidsignale der Probe mit 60 pmol Substanz. Demzufolge wurde mit der modifizierten Wasserunterdrückungssequenz eine Verringerung der Intensität des Lösungsmittelpicks um einen Faktor von mindestens 500 000 erreicht.

Weiterhin wurden als Test 42 pmol Sucrose in V_{obs} mit den optimierten Bedingungen gemessen, wobei 2048 Scans in zwei Stunden akkumuliert wurden (siehe die Hintergrundinformationen). Dies ergab ein S/N-Verhältnis von ungefähr 3. Diese Ergebnisse konnten auch für das Decasaccharid verifiziert werden. Die untere Spur in Abbildung 3 zeigt das NMR-Spektrum des Decasaccharids von 60 pmol in V_{obs} , die ebenfalls mit 2048 Scans gemessen wurden. Durch die opti-

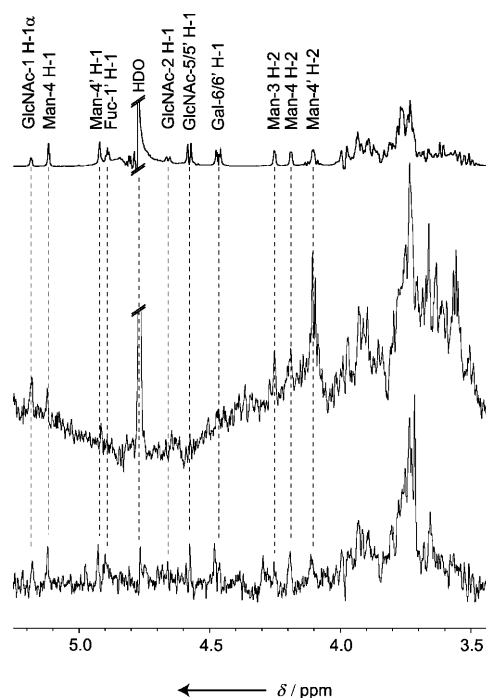


Abbildung 3. NMR-Spektren des N-Typ-Decasaccharids. Oben: Referenzspektrum von 80 nmol Substanz; Mitte: Probe mit 60 pmol Substanz, die vor der Optimierung der Wasserunterdrückung und der Probenpräparation gemessen wurde; unten: Spektrum von 60 pmol des Decasaccharids, das mit optimierten Bedingungen aufgenommen wurden. Die beiden unteren Spektren sind in D_2O aufgenommen worden, das ungefähr 1 % H_2O enthielt. Spektren wurden mit 2048 Scans in jeweils 2 h erhalten. Das mittlere Spektrum hat eine verzerrte Basislinie und zeigt einige Verunreinigungen im Bereich zwischen $\delta = 3.5$ und 3.7 ppm. Das untere Spektrum zeigt eine nichtverzerrte Basislinie, die durch die optimierte Wasserunterdrückung erhalten wurde. Außerdem sind die Signale der anomeren Protonen der Fucose (Fuc), der Glucosamin- (GlcNAc-5/5') und Galactosereste (Gal-6/6') gut zu erkennen.

mierte Lösungsmittelunterdrückung sind nahezu alle Signale der Strukturreportergruppen mit S/N von 4–5 eindeutig charakterisierbar (siehe Tabelle S1).

Es können sogar Proben mit wesentlich geringeren Substanzmengen gemessen werden, wenn man die Zahl der Scans erhöht. Das Spektrum von 25 pmol des Decasaccharids, das mit 32 768 Scans in 27 h gemessen wurde, ist in Abbildung 4 gezeigt. Bei diesen extrem niedrigen Konzentrationen können immer noch die Signale der Strukturreportergruppen eindeutig zugeordnet werden, und damit kann eine eindeutige Charakterisierung des Decasaccharids erfolgen. Man kann sogar Spektren interpretieren, die mit nur 15 pmol Oligosaccharid aufgenommen wurden (siehe Abbildung S5 und Tabelle S1).

Wie wir bereits in früheren Studien gezeigt hatten, können künstliche neuronale Netzwerke auch noch Spektren von Oligosacchariden bei wesentlich kleineren S/N-Werten erkennen, als dies für Wissenschaftler möglich ist. Ungefähr 90 % der N-Typ-Oligosaccharidstrukturen konnten selbst bei einem S/N-Verhältnis von 1.25 noch identifiziert werden.^[16,17] Daher können Spektren auch noch bei wesentlich niedrigeren S/N-Verhältnissen als in Abbildung 3 und 4 gezeigt erkannt

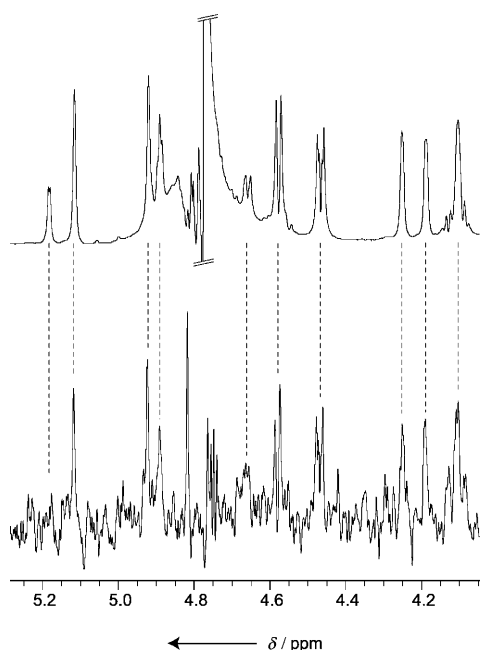


Abbildung 4. NMR-Spektrum von 25 pmol des Decasaccharids (unten; 32 768 Scans in 27 h) im Vergleich mit dem Referenzspektrum von 80 nmol des Decasaccharids (oben). Die anomeren Protonen von Fuc, Man-4/4', GlcNAc-5/5', Gal-6/6' und die H-2-Protonen der Mannose-reste im Zentrum des Oligosaccharids können eindeutig identifiziert werden.

werden, wenn neuronale Netze für die Auswertung eingesetzt werden.

Die hier beschriebenen Ergebnisse steigern das ohnehin schon große Potenzial der NMR-Spektroskopie als ein analytisches Verfahren, mit dessen Hilfe nicht nur differenzierte Strukturinformationen erhalten, sondern auch Oligosaccharide und Glycoproteine in Mengen von wenigen Nano- bzw. Mikrogramm charakterisiert werden können. Damit ist es möglich, Oligosaccharide zu analysieren, die nur in geringsten Mengen zur Verfügung stehen.

Experimentelles

Alle Glasgeräte wurden in einem Plasmaofen (SPI Plasma-Prep II, SPI Supplies/Structure Probe, Inc., West Chester, USA) gereinigt. Die Glasteile wurden 25 Minuten lang einem Sauerstoffplasma ($p = 1.0$ mbar, $I = 60$ mA) ausgesetzt. Alle Proben wurden unter in einer Sterilbank präpariert. NMR-Experimente wurden bei 300 K an einem Bruker Avance 700-MHz-NMR-Spektrometer durchgeführt

(Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany), das mit einem inversen 5-mm-Tripelresonanz-Kryoprobekopf ausgerüstet war. Die besten hier präsentierten Spektren wurden mit einer „Excitation-Sculpting“-Sequenz gemessen, um das HDO- oder H₂O-Signal zu unterdrücken (Akquisitionszeit 2.3 s, Relaxationsdelay zwischen 0.5 und 1 s). Die Länge des selektiven Rechteckpulses in der „Excitation-Sculpting“-Sequenz wurde auf 8 ms gesetzt. Die chemischen Verschiebungen wurden auf Aceton referenziert ($\delta_H = 2.225$ ppm). Weitere Details zu experimentellen Prozeduren können in den Hintergrundinformationen gefunden werden.

Eingegangen am 26. November 2009

Online veröffentlicht am 2. März 2010

Stichwörter: Glycoproteine · NMR-Spektroskopie · Strukturreportergruppen · Oligosaccharide · Wasserunterdrückung

- [1] M. E. Lacey, R. Subramanian, D. L. Olson, A. G. Webb, J. V. Sweedler, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 3133–3152.
- [2] A. Broberg, K. K. Thomsen, J. O. Duus, *Carbohydr. Res.* **2000**, 328, 375–382.
- [3] T. Endo, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **2004**, 80, 128–139.
- [4] C. Bedford, T. Cas, I. Francois, S. Harding, *Drug News Perspect.* **2006**, 19, 163–172.
- [5] H. H. Freeze, *Nat. Rev. Genet.* **2006**, 7, 537–551.
- [6] D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, 4, 477–488.
- [7] J. O. Duus, C. H. Gottfredsen, K. Bock, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4589–4614.
- [8] M. J. Goger, J. M. McDonnell, D. Cowburn, *Spectroscopy* **2003**, 17, 161–167.
- [9] H. Kovacs, D. Moskau, M. Spraul, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, 46, 131–155.
- [10] A. A. Bergwerff, C. J. M. Stroop, B. Murray, A. P. Holtorf, G. Pluschke, J. Vanostrum, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegthart, *Glycoconjugate J.* **1995**, 12, 318–330.
- [11] P. Dewaard, B. R. Leeftang, J. F. G. Vliegthart, R. Boelens, G. W. Vuister, R. Kaptein, *J. Biomol. NMR* **1992**, 2, 211–226.
- [12] G. W. Vuister, P. Dewaard, R. Boelens, J. F. G. Vliegthart, R. Kaptein, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 772–774.
- [13] J. Mocak, A. M. Bond, S. Mitchell, G. Scollary, *Pure Appl. Chem.* **1997**, 69, 297–328.
- [14] T. L. Hwang, A. J. Shaka, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1995**, 112, 275–279.
- [15] M. L. Liu, X. A. Mao, C. H. Ye, H. Huang, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, *J. Magn. Reson.* **1998**, 132, 125–129.
- [16] B. Meyer, T. Hansen, D. Nute, P. Albersheim, A. Darvill, W. York, J. Sellers, *Science* **1991**, 251, 542–544.
- [17] J. P. Radomski, H. Vanhalbeek, B. Meyer, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 1, 217–218.
- [18] M. Spraul, Bruker Nutzertagung **2004**, Rheinstetten.