

Analyza oligosacharidov v moči pacientov s alfa-manozidózou využitím HPLC-FLD

Maroš Krchňák¹, Rebeka Kodríková¹, Marek Nemčovič¹, Zuzana Pakanová¹, Anna Šalingová², Anna Hlavatá³, Peter Baráth¹, Ján Mucha¹

¹Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Centrum glykomiky, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika; chemkrma@savba.sk

²Národný ústav detských chorôb, Centrum dedičných metabolických porúch, Limbová 1, 833 40 Bratislava, Slovenská republika

³Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, Národný ústav detských chorôb, Limbová 1, 833 40 Bratislava, Slovenská republika

Abstract

HPLC-FLD analysis of oligosaccharides in urine of patients with alpha-mannosidosis
Oligosaccharides from urine of six patients suffering from alpha-mannosidosis were purified using SPE columns and labeled with fluorescent tag 2-aminobenzamide. Disease-specific biomarkers (Man₂GlcNAc to Man₉GlcNAc) were detected by MALDI-TOF mass spectrometry. Samples were subjected to HPLC separation on HILIC column and fluorescence detection at 430 nm. The identity of peaks was determined by MALDI-TOF. Oligosaccharides of interest were grouped according to their mannose unit count and quantified relative to the total biomarkers content. Good separation of oligosaccharides based on their size was achieved. Man₂GlcNAc and Man₅GlcNAc were the most abundant in all samples. The presented method will be utilized to determine enzyme therapy progression by measuring biomarker level changes in patients treated with velmanase alfa.

Keywords: alpha-mannosidosis; HPLC; fluorescence detection; oligosaccharides; MALDI-TOF

Úvod a formulácia cieľa

Alfa-manozidóza (AM) je vzácna, autozómovo recesívna dedičná lyzozomálna porucha s odhadovanou prevalenciou 1:500 000 živonarodených detí. Prvý krát bola popísaná v roku 1967. Toto ochorenie je spôsobené zníženou aktivitou lyzozomálneho enzýmu α -D-manozidázy (EC 3.2.1.24) ako výsledok heterogénnych mutácií v géne MAN2B1. Tento enzým katalyzuje hydrolyzu α -(1-2)-, α -(1-3)- a α -(1-6)-manoizidových väzieb v dráhe lyzozomálnej degradácie N-oligosacharidov glykoproteínov. Jeho znížená aktivita spôsobuje akumuláciu vysokomanózových oligosacharidov (OGS) vo všetkých tkanivách. Podľa závažnosti príznakov, medzi ktoré patria napr. imunodeficiencia, mentálna retardácia, poruchy sluchu a motorické poruchy, sa AM delí na tri klinické formy s miernym (Typ 1), stredne závažným (Typ 2) až závažným priebehom (Typ 3) [1, 2].

Diagnostika AM je založená na kolorimetrickom, resp. fluorimetrickom stanovení aktivity lyzozomálnej α -D-manoizidázy v leukocytoch. Prítomnosť charakteristických OGS v moči je možné potvrdiť použitím tenkovrstvovej chromatografie (TLC). Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC), hmotnostná spektrometria (MS) a nukleárna magnetická

rezonancia (NMR) umožňujú v porovnaní s TLC rýchlejšiu a presnejšiu diagnostiku, nízku spotrebu vzorky a odlišenie rôznych typov lyzozomálnych ochorení. Diagnózu je pre vylúčenie falošnej pozitivity vhodné potvrdiť genetickou analýzou [1, 3, 4].

Medzi najviac využívanú metódu liečby AM patrí transplantácia kostnej drene, ktorá je spojená s rizikami, napr. anémiou a pľúcnymi problémami. V roku 2018 bolo Európskou liekovou agentúrou schválené používanie dlhodobej enzýmovej terapie ľudskou rekombinantnou α -manozidázou velmanase alfa. Táto terapia efektívne zlepšuje obraz glykobiomarkerov a spomaľuje progresiu ochorenia [1, 5].

Cieľmi práce boli optimalizácia prípravy vzoriek, fluorescenčného značenia a podmienok HPLC analýzy, priradenie štruktúr k jednotlivým chromatografickým píkom a kvantifikácia charakteristických OGS v moči pacientov s alfa-manozidózou. Použitie HPLC-FLD je v dôsledku nízkeho vplyvu externých faktorov v porovnaní s laserovou desorpčnou ionizačnou hmotnostnou spektrometriou s detektorom doby letu (MALDI-TOF) vhodnejšie pre kvantitatívne analýzy. Kombináciou týchto metód je možné získať kompletne kvalitatívne a kvantitatívne dáta pri analýze OGS. Výsledky práce budú po zavedení enzýmovej terapie na Slovensku slúžiť ako podklad pre monitorovanie jej účinnosti na základe zmien obsahu glykobiomarkerov v moči.

Materiál a metódy

Pre analýzu OGS bolo vybraných šesť vzoriek moču pacientov s α -manozidózou, ktoré poskytol Národný ústav detských chorôb. Roztoky analytických štandardov maltotetraózy (Hex4) a maltohexózy (Hex6) (Elicityl, Francúzsko) boli využité na kalibráciu a výpočet limitov kvantifikácie a detekcie. Zo vzoriek moču bolo odobrané množstvo zodpovedajúce 10 μ g kreatinínu a zriedené ultračistou vodou na výsledný objem 1 ml. Z roztokov štandardov ($c_m = 5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) bolo odobraných 10 μ l a doplnených vodou na objem 1 ml. Vzorky boli po zriedení prečistené použitím kolón pre extrakciu na pevnej fáze (SPE) so 100 mg náplňou Supelclean LC-18 (reverzná fáza) a následne Supelclean ENVI-Carb PGC (grafitizovaný neporózny uhlík). Eluát bol vysušený vo vákuovom centrifugačnom koncentrátore.

Vysušené vzorky boli podrobené fluorescenčnému značeniu pomocou 2-aminobenzamid (2-AB). Zmes na značenie bola pripravená rozpustením 5 mg 2-AB v 100 μ l zmesi ľadovej kyseliny octovej a dimetylsulfoxidu (DMSO) v pomere 3:7 a pridaná k 6 mg kyanobórohydridu sodného (NaBH_3CN). Vzorky boli rozpustené v 5 μ l zmesi na fluorescenčné značenie a inkubované v tme tri hodiny pri teplote 65°C. Po inkubácii boli vzorky zriedené 700 μ l acetonitrilu (ACN) a nadbytok značky bol odstránený prečistením

pomocou *Strata NH₂* (55 μm , 70 \AA , 50 mg) 96-jamkovej platne na princípe hydrofilnej interakčnej chromatografie (HILIC). Eluát bol vysušený vo vákuovom centrifugačnom koncentrátore a rozpustený v 100 μl vody. Vzorka negatívnej kontroly bola spracovaná rovnakým spôsobom.

Na MALDI platňu bolo nanesených 0,7 μl fluorescenčne označenej vzorky s 0,7 μl roztoku matrice (kyselina 2,5-dihydroxybenzoová v TA30 s 1 mM NaOH, $c_m = 20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Po uschnutí boli všetky vzorky analyzované pomocou MALDI-TOF/TOF hmotnostného spektrometra UltrafleXtreme II (Bruker Daltonics, Nemecko) v refletrónovom pozitívnom iónovom móde v rozsahu 500-3000 m/z . Spektrá boli spracované softvérom FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics, Nemecko) a vyhodnotené softvérom GlycoWorkbench 2.1 (<http://www.eurocarbdb.org/>).

Oligosacharidy boli analyzované použitím vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie s fluorescenčnou detekciou (HPLC-FLD) metódou podľa Hanić et al. [6]. Chromatografická separácia prebiehala v HPLC systéme Accela (Thermo Fisher Scientific, USA) na HILIC kolóne ACQUITY UPLC BEH Amide Column, 130 \AA , (1,7 μm , 2,1 mm x 150 mm) pri teplote 60 $^{\circ}\text{C}$ v gradientovej elúcii dvoch mobilných fáz (MF): A – 100 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ mravčan amónny (pH 4) a B – ACN. Fluorescenčný detektor Dionex UltiMate 3100 (Thermo Fisher Scientific, USA) bol nastavený na excitačnú vlnovú dĺžku 250 nm a emisnú vlnovú dĺžku 430 nm.

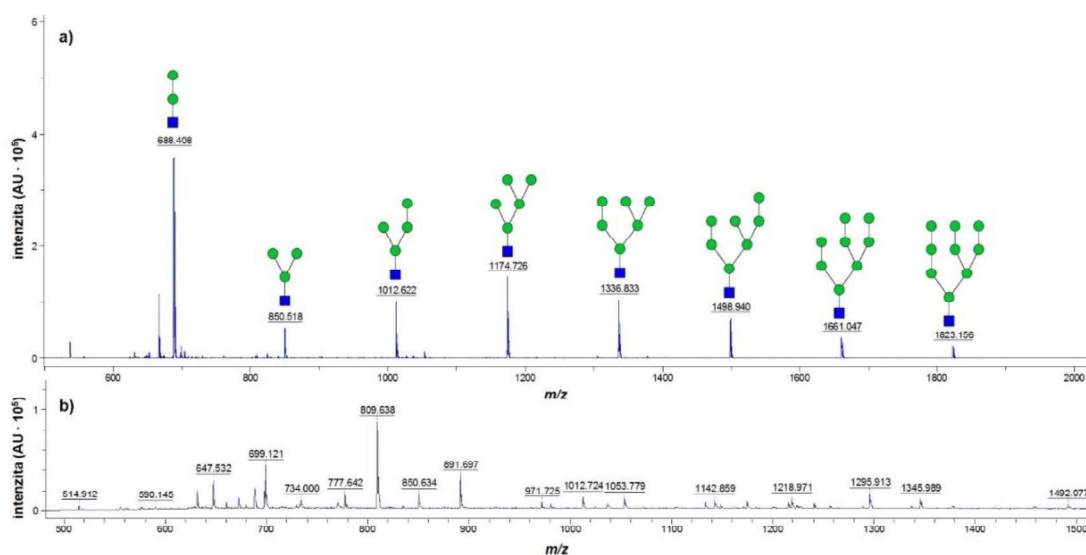
Vzorky boli pred nástrekom zriedené desaťnásobne a dvestonásobne zmesou 70% MF B:30% MF A. Pred analýzou bola kolóna ekvilibrovaná dve minúty v 90% MF B s prietokom 0,4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Po nástreku 10 μl vzorky bol počas 2 min znížený podiel MF B na 80%. V čase od 2 do 36 min klesal podiel MF B na 65%. Následne bol v priebehu minúty znížený prietok na 0,25 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Kolóna bola regenerovaná znížením na 0% MF B počas jednej minúty a dvojminútovou izokratickou elúciou. Po regenerácii bol počas 4 min zvýšený podiel MF B na 90%, nasledovaný postupným zvýšením prietoku na 0,4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ počas 3 min.

Všetky vzorky boli analyzované v dvoch technických opakovaníach. Bol zhotovený kalibračný rad maltotetraózy a maltohexózy s koncentráciou 5, 10, 50, 100, 150 a 200 $\text{nmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a zmeraný v troch opakovaníach. Získané chromatogramy boli vyhodnotené použitím softvéru Chromeleon 7.2.10 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Pre priradenie štruktúr k píkum v chromatograme boli frakcie eluátu z HPLC postupne zachytené do mikroskúmaviiek, odparené na vákuovom centrifugačnom koncentrátore, rozpustené v 3 μl LC-MS vody a analyzované MALDI-TOF/TOF postupom uvedeným vyššie.

Výsledky a diskusia

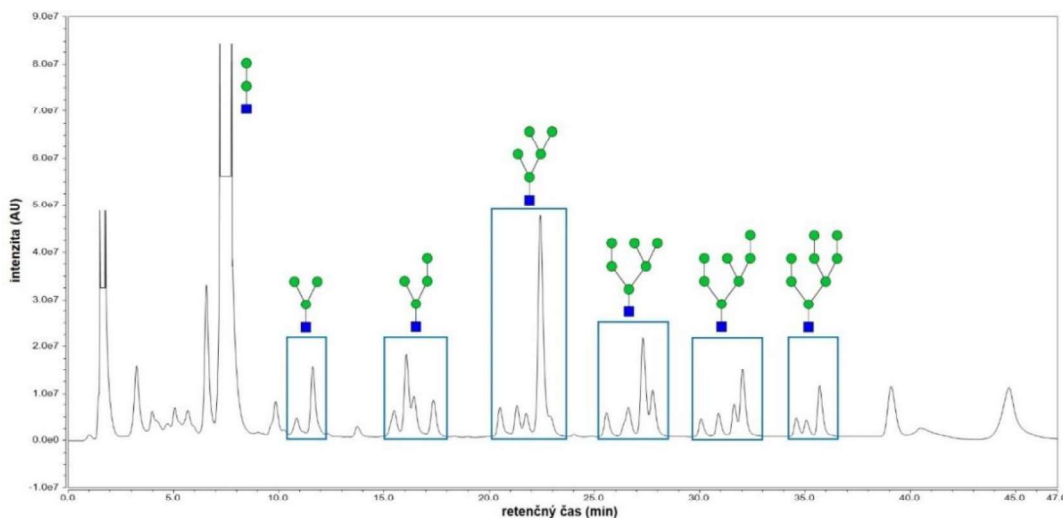
Fluorescenčne značené OGS vo vzorkách pacientov a negatívnej kontroly boli analyzované MALDI-TOF hmotnostnou spektrometriou. Reprezentatívne spektrá vzorky pacienta a negatívnej kontroly sú znázornené na Obr. 1. Vo všetkých vzorkách pacientov boli detegované OGS charakteristické prítomnosťou dvoch až deviatich manózových jednotiek a jedného N-acetylglukóзамínu ($\text{Man}_2\text{GlcNAc} - \text{Man}_9\text{GlcNAc}$). Ich zloženie bolo potvrdené MALDI-TOF/TOF tandemovou MS, presné štruktúry nebolo touto metódou možné určiť. Vyobrazené štruktúry boli k píkum priradené na základe literatúry [7, 8]. Vo vzorke negatívnej kontroly neboli detegované vysokomanóзовé OGS, obsahovala iba bežne prítomné OGS zo stravy. Nízka miera kontaminácie a neprítomnosť neoznačených sacharidov poukazuje na vysokú efektivitu prečistenia a značenia vzoriek.



Obr. 1. MALDI-TOF spektrá a) vzorky pacienta 2; b) negatívnej kontroly priradené štruktúry sú dominantné formy podľa literatúry [7, 8];
legenda: ● – manóza (Man), ■ – N-acetylglukóзамín (GlcNAc)

Na základe meraní kalibračných radov Hex4 a Hex6 boli z rovníc regresnej priamky vypočítané limity detekcie (LOD) a limity kvantifikácie (LOQ) HPLC-FLD metódy: LOD (Hex4) = $0,986 \text{ nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$; LOQ (Hex4) = $2,99 \text{ nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$; LOD (Hex6) = $0,585 \text{ nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$; LOQ (Hex6) = $1,77 \text{ nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. MALDI-TOF/TOF analýzou HPLC eluátu vzorky pacienta 2 boli k skupinám chromatografických píkum priradené dominantné štruktúry príslušných OGS (Obr. 2). Pri analýze vzoriek pacientov bola dosiahnutá dobrá kolónová separácia na základe veľkosti molekúl. Chromatografické profily vzoriek sa navzájom takmer neodlišovali, čo je v súlade s MS meraniami. S rozličnou účinnosťou boli separované aj jednotlivé izoméry, ich

presnú štruktúru však nebolo možné určiť. Jednotlivé píky navyše môžu zodpovedať viacerým izomérom. Z tohto dôvodu boli OGS kvantifikované iba relatívne ako pomer k celkovému obsahu (Tab. 1). Percentuálne zastúpenie OGS bolo medzi vzorkami podobné. Pomery OGS sú s výnimkou vzorky pacienta 4 v súlade s MALDI-TOF meraniami. Oboma metódami bol ako najviac zastúpený OGS stanovený $\text{Man}_2\text{GlcNAc}$, čo koreluje s literatúrou [8, 9].



Obr. 2. Chromatogram vzorky pacienta 2 píky v jednotlivých rámoch zodpovedajú polohovým izomérom; priradené štruktúry sú dominantné formy podľa literatúry [7, 8]; pri píku $\text{Man}_2\text{GlcNAc}$ bola dosiahnutá saturácia detektora, tento OGS bol kvantifikovaný z dvestonásobne riedených vzoriek
legenda: ● – manóza (Man), ■ – N-acetylglukóзамín (GlcNAc)

Tab. 1. Percentuálne zastúpenie oligosacharidov vo vzorkách pacientov

pacient č.	Man_2 GlcNAc	Man_3 GlcNAc	Man_4 GlcNAc	Man_5 GlcNAc	Man_6 GlcNAc	Man_7 GlcNAc	Man_8 GlcNAc
1	34,0	6,26	13,1	18,8	13,1	9,14	5,63
2	36,2	4,92	11,8	20,8	12,6	8,50	5,15
3	34,4	6,59	13,5	20,6	12,6	7,70	4,56
4	20,1	10,6	17,3	27,5	14,1	6,97	3,53
5	49,6	6,52	9,63	14,7	9,25	6,49	3,88
6	39,0	6,64	14,0	19,6	11,2	6,25	3,38

Záver

V práci bola optimalizovaná metodika fluorescenčného značenia oligosacharidov z moču 2-aminobenzamidom, ich separácia a kvantifikácia využitím kvapalinovej chromatografie s fluorescenčnou detekciou. Hmotnostnou spektrometriou bola v moči pacientov s alfa-manozidózou potvrdená prítomnosť oligosacharidových biomarkerov typických pre toto ochorenie ($\text{Man}_2\text{GlcNAc}$ až $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$). Značené vzorky boli úspešne

chromatograficky separované a boli vypočítané relatívne zastúpenia jednotlivých skupín oligosacharidov, líšiacich sa počtom manózových jednotiek v molekule. Najvyšší relatívny obsah bol detegovaný pri biomarkeroch $\text{Man}_2\text{GlcNAc}$ a $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$. Identity chromatografických pík boli určené využitím MALDI-TOF/TOF. Profil oligosacharidov, ako aj ich relatívny obsah sú v súlade s publikovanou literatúrou.

HPLC-FLD metóda je vhodná pre kvantifikáciu vďaka nízkemu vplyvu externých faktorov, spoľahlivej separácii, vysokej citlivosti, linearite, selektivite a možnosti automatizácie. Nevýhodou metódy je, že neposkytuje žiadne štruktúrne informácie, preto je pre presnú identifikáciu analytov v píkoch nutné kombinovať HPLC s MS metódami. Prezentovaná metóda analýzy bude po ďalšej optimalizácii využitá na monitorovanie účinnosti enzýmovej terapie alfa-manozidózy kvantifikáciou glykobiomarkerov v moči. Kombinácia HPLC s tandemovou hmotnostnou spektrometriou s ionizáciou elektrosprejom (ESI-MS/MS) by umožnila vysoko selektívnu kvantifikáciu oligosacharidov nielen vo vzorkách pacientov s alfa-manozidózou, ale aj s inými lyzozomálnymi poruchami či poruchami glykozylácie.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená Ministerstvom zdravotníctva SR v rámci projektu s registračným číslom 2019/7-CHÚSAV-4, APVV-18-0336, a grantom VEGA 2/0060/21. Táto práca vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná štruktúra pre projekt ITMS 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Na práci sa podieľali členovia European Reference Network for Rare Hereditary Metabolic Disorders (MetabERN) - Project ID No. 739543.

Zoznam použitej literatúry

- [1] Ceccarini M. R., Codini M., Conte C., et al. (2018) *Int. J. Mol. Sci.* 19(5), p. 1500
- [2] Malm D., Nilssen Ø. (2008) *Orphanet J. Rare Dis.* 3(1), p. 21
- [3] Semeraro M., Sacchetti E., Deodato F., et al. (2021) *Orphanet J. Rare Dis.* 16(1), p. 24
- [4] Casado M., Ferrer-López I., Ruiz-Sala P., et al. (2017) *Rev. Anal. Chem.* 36(3), p. 20160019
- [5] Harmatz P., Cattaneo F., Ardigò D., et al. (2018) *Mol. Genet. Metab.* 124(2), p. 152
- [6] Hanić M., Lauc G., Trbojević-Akmačić I. (2019) *Curr. Protoc. Protein Sci.* 97(1), p. e95
- [7] Yamashita K., Tachibana Y., Mihara K., et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255(1), p. 5126
- [8] Xia B., Asif G., Arthur L., et al. (2013) *Clin. Chem.* 59(9), p. 1357
- [9] Huang R., Cathey S., Pollard L., et al. (2018) *Clin. Chem.* 64(12), p. 1772