

Structuuranalyse van koolhydraatketens

Structuuronderzoek aan koolhydraatketens is een ingewikkelde zaak. Nieuwe ontwikkelingen in structuuranalyse en scheidingsmethoden hebben grote gevolgen voor onze kennis van de rol van koolhydraten in biologische processen.

Structuuronderzoek aan koolhydraatketens is ingewikkelder dan van andere biopolymeren als nucleïnezuren en eiwitten. Dit moge blijken uit het theoretisch mogelijke aantal isomeren voor een saccharide van het type XX (zie tabel). Beschouwing van trimeren van het type XXX en XYZ leert dat dit aantal fantastisch toeneemt bij verdere ketenverlenging en heteropolymerisatie (1). Dit in tegenstelling tot het aantal isomeren bij peptiden van vergelijkbare ketenlengte. Het is dan ook niet verbazingwekkend dat het onderkennen van de essentiële rol van koolhydraatketens in biologische processen alsmede de mogelijkheden organisch chemische synthese van koolhydraatketens te volgen en te controleren, direct worden beïnvloed door nieuwe ontwikkelingen op het structuuranalytische vlak en verdere verfijningen van scheidingsmethodieken.

In het structuuranalytisch onderzoek van koolhydraatketens kan onderscheid worden gemaakt tussen de bepaling van primaire en van ruimtelijke structuren. Ten behoeve van de ruimtelijke structuurbevestiging zijn evenwel primaire-structuurgegevens nodig. De primaire structuur van (poly)sacchariden en van koolhydraatketens van glycoproteïnen en glycolipiden wordt gedefinieerd door de volgende

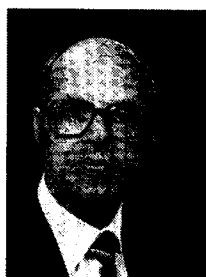
Vergelijking aantal isomere vormen van oligosacchariden en peptiden, waarbij voor de oligosacchariden alleen rekening is gehouden met de D-pyranose-ringvormen (1)

samenstelling monomeren	produkt	aantal isomeren peptiden	sacchariden
XX	dimeer	1	11
XXX	trimeer	1	176
XYZ	trimeer	6	1056

parameters (figuur 1): (i) de aard en het aantal van de samenstellende monosacchariden; (ii) de sequentie en de ringvorm van de monosacchariden; (iii) de positie en configuratie van de glycosidische bindingen. Voor glycoproteïnen moet men daar nog bijrekenen het type koolhydraat-peptidbinding en de positie en de aard van het betrokken aminozuur in de polypeptideketen.

Voor de primaire-structuuranalyse paste men in het verleden verschillende chemische en enzymatische degradatiemethoden toe in samenhang met toen beschikbare relatief eenvoudige chromatografische procedures en colorimetrische bepalingen. Gezien het grote aantal te bepalen parameters liep het structuuronderzoek van iets ingewikkelder structuren langzaam maar zeker vast. De eerste tekenen van nieuwe impulsen werden ongeveer vijftien jaar geleden zichtbaar. Een ware doorbraak in het structuuronderzoek van polysacchariden bleek de mogelijkheid te zijn posities

EEN OLIGOSACCHARIDESTRUCTUUR wordt gedefinieerd door de volgende parameters: (i) aard en aantal van de samenstellende monosacchariden; (ii) sequentie en ringvorm van de monosacchariden; (iii) positie en configuratie van de glycosidische bindingen. Boven: de structuurformule; onder: vereenvoudigde voorstelling van de koolhydraatstructuur. Door deze voorstelling gaat wel de informatie over ringvorm en positie en configuratie van de glycosidische bindingen verloren; ● galactose; ■ N-acetylglucosamine; ◄ glucose; ▲ glucuronzuur (figuur 1).



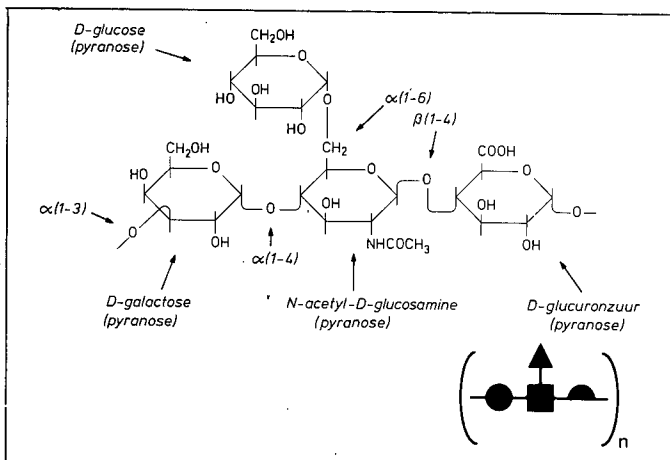
Prof. dr J. F. G. Vliegthart (1936) studeerde chemie aan de RU-Utrecht. Promotie in 1967 (Prof. dr J. F. Arens, promotor). Thans hoogleraar Bio-Organische Chemie aan de RU-Utrecht, President-elect van de International Carbohydrate Organization, voorzitter van het Organizing Committee van het XIIth International Carbohydrate Symposium, en lid van de IUPAC and IUB committees on Biochemical Nomenclature.



Dr. J. P. Kamerling (39) studeerde organische chemie aan de RU Utrecht. Promotie in 1972. Sinds 1969 verbonden aan Werkgroep Bio-Organische Chemie van de vakgroep Organische Chemie van de RU Utrecht. Thans wetenschappelijk hoofdmedewerker. Secretaris Organizing Committee XIIth International Carbohydrate Symposium.



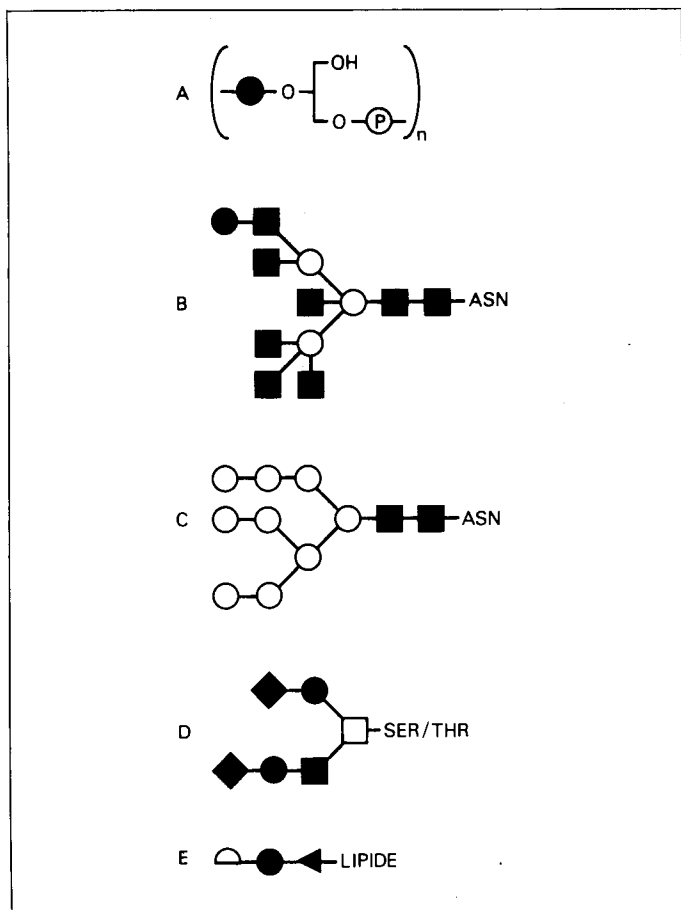
Dr G. A. Veldink (1942) studeerde biochemie aan de RU-Utrecht. Hij promoveerde in 1971 (promotor: Prof. dr J. Boldingh). Hij is als wetenschappelijk hoofdmedewerker werkzaam binnen de afdeling Bio-Organische Chemie van de Vakgroep Organische Chemie van de RU-Utrecht en thans penningmeester van het Organizing Committee van het XIIth International Carbohydrate Symposium.



van glycosidische bindingen m.b.v. GLC-MS na permethylering en solvolyse te bepalen (2, 3). De introductie van GLC-MS stimuleerde ook de ontwikkeling en toepassing van nieuwe chemische degradatiemethoden en betere derivatiseringsprocedures. Uiteraard werd deze nieuwe benadering al snel daarna geïncorporeerd in het glycoproteïne- en glycolipide-onderzoek. Een tweede doorbraak voor het glycoproteïne-onderzoek kwam een aantal jaren later met de toepassing van hoge-resolutie-¹H-NMR-spectroscopie voor het bepalen van vrijwel alle parameters (4, 5). Ook voor glycolipiden betekende de introductie van ¹H-NMR-spectroscopie een grote stap voorwaarts (6). In het polysacchariden-onderzoek bleek vooral ¹³C-NMR-spectroscopie een significante aanvulling te zijn, in bijzondere mate om repeterende eenheden snel te herkennen (7). Deze technieken hebben geleid tot een stormachtige groei van de belangstelling van de zijde van de biochemie, de biologie en de geneeskunde

ENKELE VOORBEELDEN VAN POLYSACCHARIDEN EN KOOLHYDRAATKETENS van glycoproteïnen en glycolipiden (alle monosacchariden komen in de D-pyranose-ringvorm voor): (a) Kapselpolysaccharide van *Neisseria meningitidis* type H, belangrijk in relatie tot vaccinontwikkeling (13); (b) Eén van de koolhydraatketens van hen-ovomucoïde (N-glycosidisch) (14,15); (c) Koolhydraatketen (N-glycosidisch) van prostaglandine-endoperoxide-synthase van het schaap, een enzym dat de omzetting van arachidonzuur naar prostaglandine-G₂ en -H₂ katalyseert (16); (d) O-Glycosidische koolhydraatketen van het bloedplaatjes-glycoproteïne Ib (17); (e) Hematoside, een glycolipidereceptor voor het *E. coli* K-99 antigeen (18);

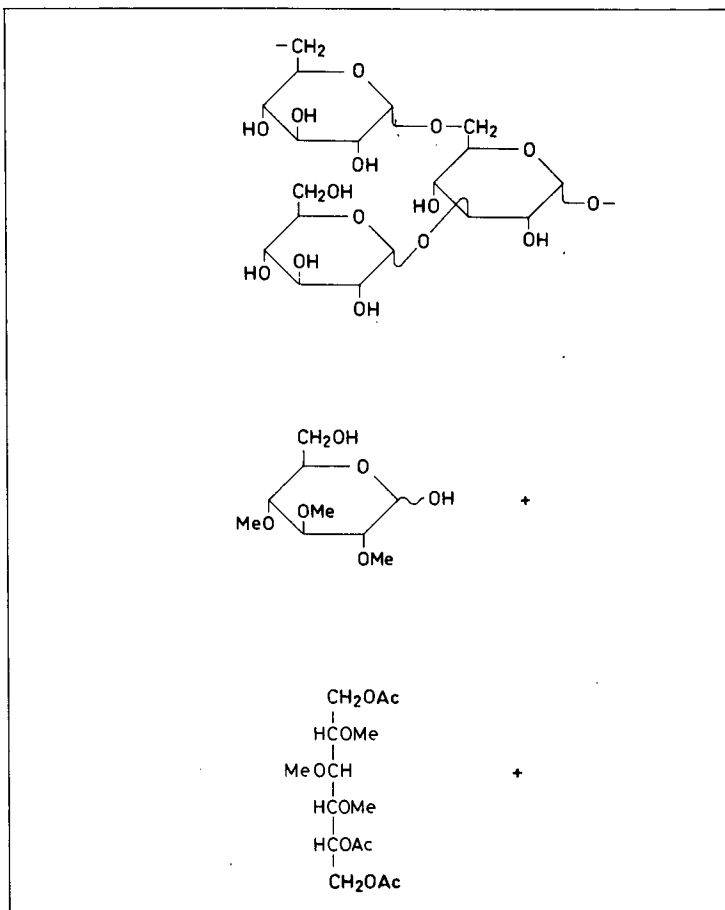
● = galactose; ○ = mannose; ■ = N-acetylglucosamine; Asn = asparagine; ◆ = N-acetylneuraminezuur; □ = N-acetylgalactosamine; Ser = serine; Thr = threonine; △ = N-glycolylneuraminezuur; ◀ = glucose (figuur 2).



voor koolhydraten, o.a. voor biosynthese, biologische herkenningprocessen, aangeboren stofwisselingsziekten en synthetische vaccins.

Ter illustratie van het primaire-structuuronderzoek is in figuur 2 een aantal voorbeelden van polysacchariden en van koolhydraatketens van glycoproteïnen en glycolipiden weergegeven. Bij de structuuropheldering daarvan zijn onderzoekers van ons laboratorium betrokken geweest. Polysacchariden en glycolipiden kan men na zuivering als zodanig onderzoeken. Aangezien in glycoproteïnen verschillende daarvoor in aanmerking komende aminozuurresiduen met koolhydraatketens covalent kunnen zijn gebonden, en er bovendien per glycosyleringsplaats (micro)heterogeniteit in deze ketens kan voorkomen, moeten vóór de aanvang van het eigenlijke structuuronderzoek specifieke degradatiemethoden worden toegepast (8). Deze degradaties moeten er toe leiden dat zuivere oligomeren kunnen worden verkregen, die wel geschikt zijn voor analyse. Voor de bestudering van N-glycosidisch gebonden koolhydraatketens (GlcNAc-Asn-type; koppeling aan amidefunctie van Asn-zijketen) kan het glycoproteïne eerst worden onderworpen aan een uitvoerige pronasagedigestie, leidend tot de vorming van glycopeptiden. Een andere benadering is, de GlcNAc-Asn-binding met waterdrijvend hydrazine te splitsen, gevolgd door N-acetylering en boorhydridreductie; dit resulteert in de vorming van oligosaccharide-alditolen. Ook enzymatische afsplitsingen van koolhydraatketens zijn beschreven (endo-β-N-acetylglucosaminidasen en aspartylglycosylaminasen). De O-glycosidisch gebonden koolhydraatketens (GalNAc-Ser/Thr-type; koppeling aan OH-groep van Ser of Thr) lenen zich slecht voor bestudering in de vorm van glycopepti-

METHYLERINGSANALYSE. Eerst worden vrije OH-groepen gemethyleerd. Na zure hydrolyse en reductie worden de nieuwe OH-groepen geacetyleerd. Uit structuuranalyse van de



den. In dit geval vindt analyse plaats van oligosaccharide-alditolen, verkregen na splitsing van de koolhydraat-peptidbinding met alkalische borohydride. De beschreven de-gradatiemethoden maken tevens de incorporatie van ^{14}C - en ^3H -labels mogelijk.

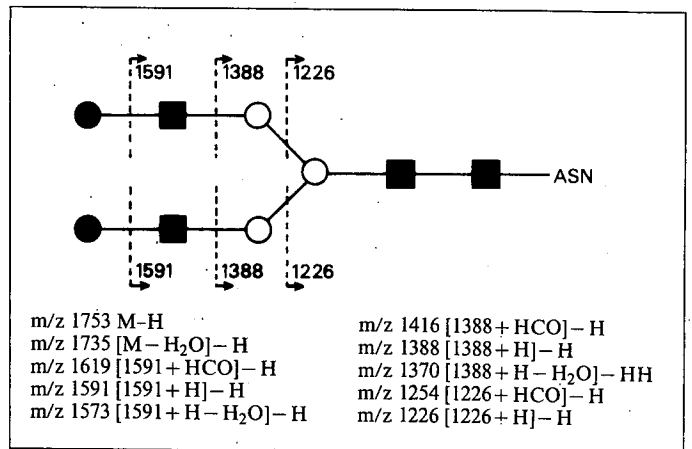
Suikeranalyse

Een essentieel onderdeel van de structuuranalyse van oligo- polysacchariden is de zgn. suikeranalyse, meestal uitge- voerd met GLC na methanolysie of hydrolyse en geschikte derivatiseringsprocedures (8). Als voorbeeld kunnen we de analyse noemen via pertrimethylsilyl-methylglycosiden (9). De bepaling van de absolute configuratie (D of L) van de samenstellende monosacchariden gebeurt via GLC na om- zetting in de corresponderende pertrimethylsilyl(-)-2-bu- tylglycosiden (10).

Informatie omtrent het substitutiepatroon van de aanwe- zige monosacchariden volgt uit de zgn. methyleringsanalyse, voor een eenvoudig deelpolymeer schematisch weerge- geven in figuur 3. De resulterende partieel gemethyleerde alditol-acetaten kunnen met GLC-MS direct worden geka- racteriseerd. Op basis van de zeer karakteristieke EI-massa- spectra samen met de GLC-retentietijden van de derivaten, worden de posities van de glycosidische bindingen in de cor- responderende monosacchariden afgeleid (3).

Oligosacchariden, oligosaccharide-alditolen, glycopepti- den en glycolipiden kunnen ook direct worden onderzocht m. b. v. diverse massaspectrometrische ionisatie-technieken. Voor een aantal ionisatiemethoden (b.v. EI en CI) is eerst derivatisering noodzakelijk. De specifieke fragmentaties geven informatie omtrent de sequentie van de monosaccha-

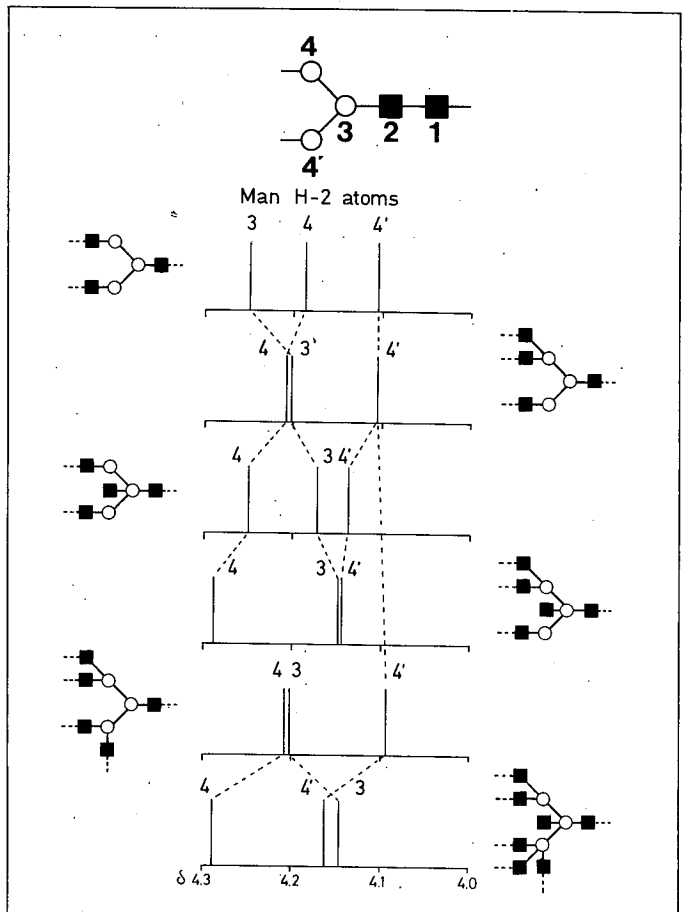
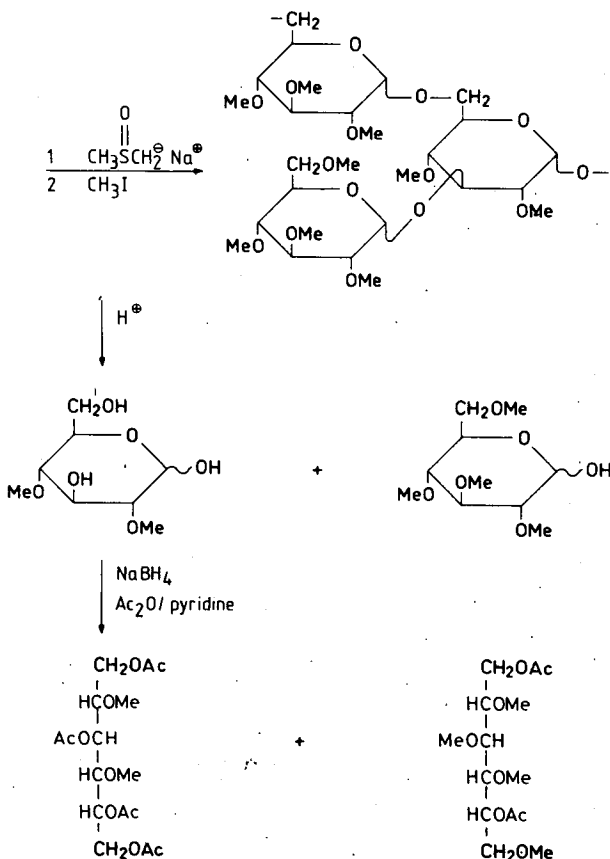
partieel gemethyleerde alditolacetaten is precies na te gaan, hoe de monosacchariden oorspronkelijk waren gesubsti- tuerd (figuur 3).



DIRECTE INFORMATIE over de volgorde in een koolhydraat- keten volgt uit een zgn. FAB-massaspectrum. Het grote voor- deel van deze methode is, dat de stof niet hoeft te worden ge- derivatiseerd, maar direct kan worden geanalyseerd.

● = galactose; ○ = mannose; ■ = N-acetylglucosamine (figuur 4).

KARAKTERISTIEKE PATRONEN van de H-2-atomen ('struc- turele reporter groepen') van de drie mannoseresiduen die deel uitmaken van een invariante pentasaccharidestructuur (boven). Door naar specifieke NMR-patronen te kijken, is het substitutiepatroon te vinden. Elke uitbreiding komt tot uit- drukking in de corresponderende signalen van de structurele reporter groep en in de specifieke beïnvloeding van signalen afkomstig van andere residuen dichtbij en verder weg. In de figuur is de invloed van meerdere N-acetylglucosamineresi- duen te zien. ○ mannose; ■ N-acetylglucosamine (figuur 5).



riden en de posities van de glycosidische bindingen. De recent geïntroduceerde FAB-ionisatietechniek heeft reeds veelbelovende resultaten opgeleverd voor de sequentie-analyse van ongederivatiseerde grote oligosaccharideketens (figuur 4) (11).

NMR

Hoge-resolutie-NMR-spectroscopie speelt een belangrijke rol in het structuuronderzoek van koolhydraatketens. De mogelijkheden van deze techniek zullen worden geïllustreerd aan de hand van het glycoproteïne-¹H-NMR-onderzoek van onze werkgroep (4, 5). 500-MHz-¹H-NMR-spectra van koolhydraatketens, afgeleid van glycoproteïnen verschaffen in principe structurele informatie van primaire en van conformationele aard.

In het spectrum van de koolhydraatketens, opgenomen in D₂O, kan men de volgende groepen van resonanties onderscheiden (zie figuur 6): (i) Een breed signaal samengesteld uit de overlappende resonanties van niet-anomere protonen ('bulk signaal'). Interpretatie van dit gebied is alleen benaderbaar met geavanceerde NMR technieken. (ii) Resonanties van 'structurele reporter groepen', die buiten het onder (i) genoemde signaal worden aangetroffen.

De chemische verschuivingen van deze protonen kunnen zeer nauwkeurig worden bepaald. In combinatie met koppingsconstanten en lijnbreedtes blijken deze signalen karakteristiek te zijn voor de primaire structuur van de te onderzoeken verbindingen. De signalen zijn onder meer afkomstig van anomere protonen, van protonen gebonden aan C-atomen in de directe omgeving van een substitutieplaats in een monosaccharide, van protonen aan deoxy-C-atomen (fucose, siaalzuur) en van N-acetylgroep-protonen van N-acetylleerde aminosuikers en siaalzuren.

De meeste N-glycosidisch gebonden koolhydraatketens worden gekarakteriseerd door de aanwezigheid van een invariante pentasaccharide-kernstructuur (zie top figuur 5). Zoals thans bekend, kan deze kern op diverse manieren worden uitgebreid. Elke uitbreiding komt tot expressie in de corresponderende signalen van de structurele reporter-groep en in de specifieke beïnvloeding van signalen afkomstig van andere residuen dichtbij en wat verder weg. Een sprekend voorbeeld is uitgewerkt in figuur 5, dat de karakteristieke patronen van de protonen aan de C-2-atomen van de

drie kern-mannoseresiduen (○; Man H-2's) laat zien bij aanwezigheid van N-acetylglucosamineresiduen (■) op diverse plaatsen.

Interessante toepassing

Een interessante toepassing van de beschreven NMR-methode is het volgen van enzymatische reacties aan koolhydraten, hetzij direct in het NMR-apparaat, hetzij discontinu na isolatie van de betrokken verbindingen. Deze benadering geeft snel inzicht in de specificiteit van de enzymen.

Tenslotte is de toepassing van NMR-spectroscopie samen met modelbouw en computerprogramma's essentieel te noemen om inzicht te verkrijgen in de ruimtelijke structuur van de koolhydraatketens (12). Dit is belangrijk om immunodeterminanten en andere biologische herkenningsplaatsen in de ruimtelijke structuur te lokaliseren. Hierop voortbouwend zullen in de nabije toekomst belangrijke gegevens beschikbaar kunnen komen over de wijze waarop communicatie van koolhydraatketens in tal van biologische processen tot stand komt.

1. J. R. Clamp, *Biochem. Soc. Symp.* 40 (1974) 3.
2. H. Björndal, C.-G. Hellerqvist, B. Lindberg en S. Svensson, *Angew. Chem.* 82 (1970) 643.
3. P.-E. Jansson, L. Kenne, H. Liedgren, B. Lindberg en J. Lönngrén, *Chem. Commun. Univ. Stockholm* 8 (1976) 1.
4. J. F. G. Vliegthart, H. van Halbeek en L. Dorland, *Pure Appl. Chem.* 53 (1981) 45.
5. J. F. G. Vliegthart, L. Dorland en H. van Halbeek, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 41 (1983) 209.
6. T. A. W. Koerner, J. H. Prestegard, P. C. Demou en R. K. Yu, *Biochemistry* 22 (1983) 2676.
7. P. A. J. Gorin, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 38 (1981) 13.
8. E. G. Berger, E. Buddecke, J. P. Kamerling, A. Kobata, J. C. Paulson en J. F. G. Vliegthart, *Experientia* 38 (1982) 1129.
9. J. P. Kamerling en J. F. G. Vliegthart, *Cell Biol. Monogr.* 10 (1982) 95.
10. G. J. Gerwig, J. P. Kamerling en J. F. G. Vliegthart, *Carbohydr. Res.* 77 (1979) 1.
11. J. P. Kamerling, W. Heerma, J. F. G. Vliegthart, B. N. Green, I. A. S. Lewis, G. Strecker en G. Spik, *Biomed. Mass Spectrom.* 10 (1983) 420.
12. K. Bock, *Pure Appl. Chem.* 55 (1983) 605.
13. A. van der Kaaden, J. I. M. van Doorn-van Wakeren, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegthart en R. H. Tiesjema, *Eur. J. Biochem.* (1984) in druk.
14. J. Paz-Parente, G. Strecker, Y. Leroy, J. Montreuil, B. Fournet, H. van Halbeek, L. Dorland en J. F. G. Vliegthart, *FEBS Lett.* 152 (1983) 145.
15. K. Yamashita, J. P. Kamerling en A. Kobata, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 12809.
16. J. H. G. M. Mutsaers, H. van Halbeek, J. P. Kamerling en J. F. G. Vliegthart, manuscript in voorbereiding.
17. S. A. M. Korrel, K. J. Clemetson, H. van Halbeek, J. P. Kamerling, J. J. Sixma en J. F. G. Vliegthart, *Eur. J. Biochem.* (1984) in druk.
18. H. Smit, W. Gaastra, J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegthart en F. K. de Graaf, manuscript in voorbereiding.

500 MHz-¹H-NMR-SPECTRUM van een glycopeptide in D₂O bij 25 °C en pD = 7. Achtereenvolgens kunnen we onderscheiden de anomere protonen, protonen van aminosuikers (AA), resonanties van niet-anomere protonen, aminosuikerprotonen en H's van N-acetylgroepen.

● = galactose; ○ = mannose; ■ = N-acetylglucosamine (figuur 6).

