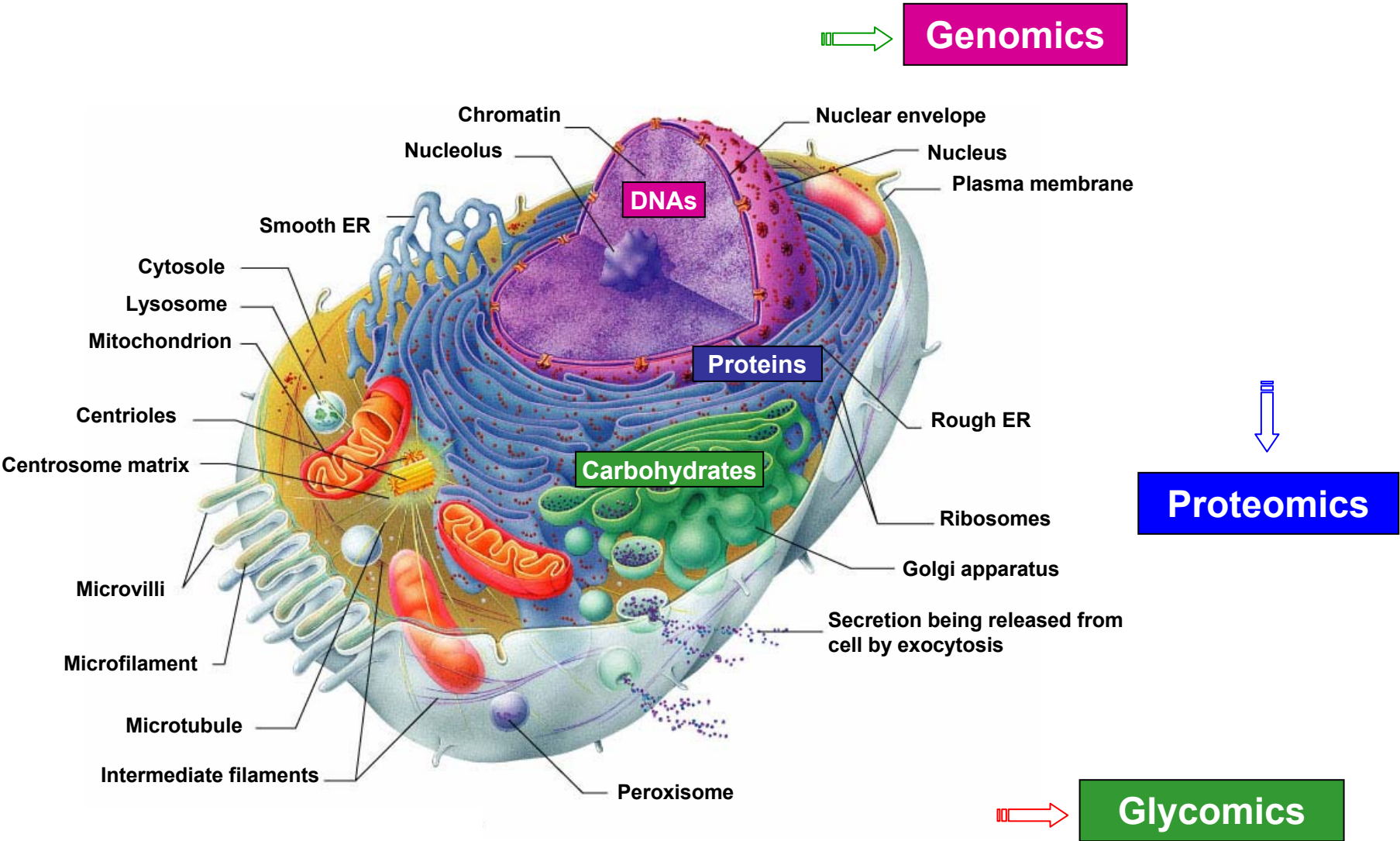


Screening si fragmentare comparativa a ganglioizidelor din creierul fetal uman prin metode avansate de spectrometrie de masa

Alina F. Serb^{1,2} , Eugen Sisu^{2,3}, Corina Flangea^{1,2},
Alina D. Zamfir^{1,4} , Leon Zagrean⁵

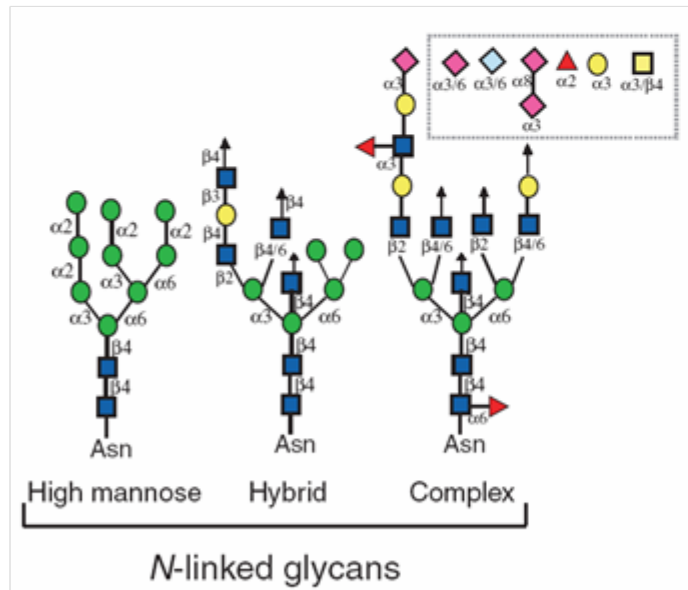
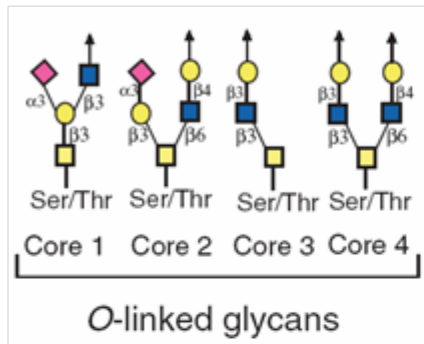
¹Laboratorul de Spectrometrie de Masa, Institutul National de C-D in Electrochimie si Materie Condensata, Timisoara; ²Departamentul de Biochimie, Universitatea de Medicina si Farmacie “Victor Babes”, Timisoara; ³Institutul de Chimie, Academia Romana, Timisoara; ⁴Departamentul de Stiinte Chimice si Biologice, Universitatea “Aurel Vlaicu”, Arad; ⁵Universitatea de Medicina si Farmacie “Carol Davila”, Bucuresti

Domeniile de top in biologia sistemelor

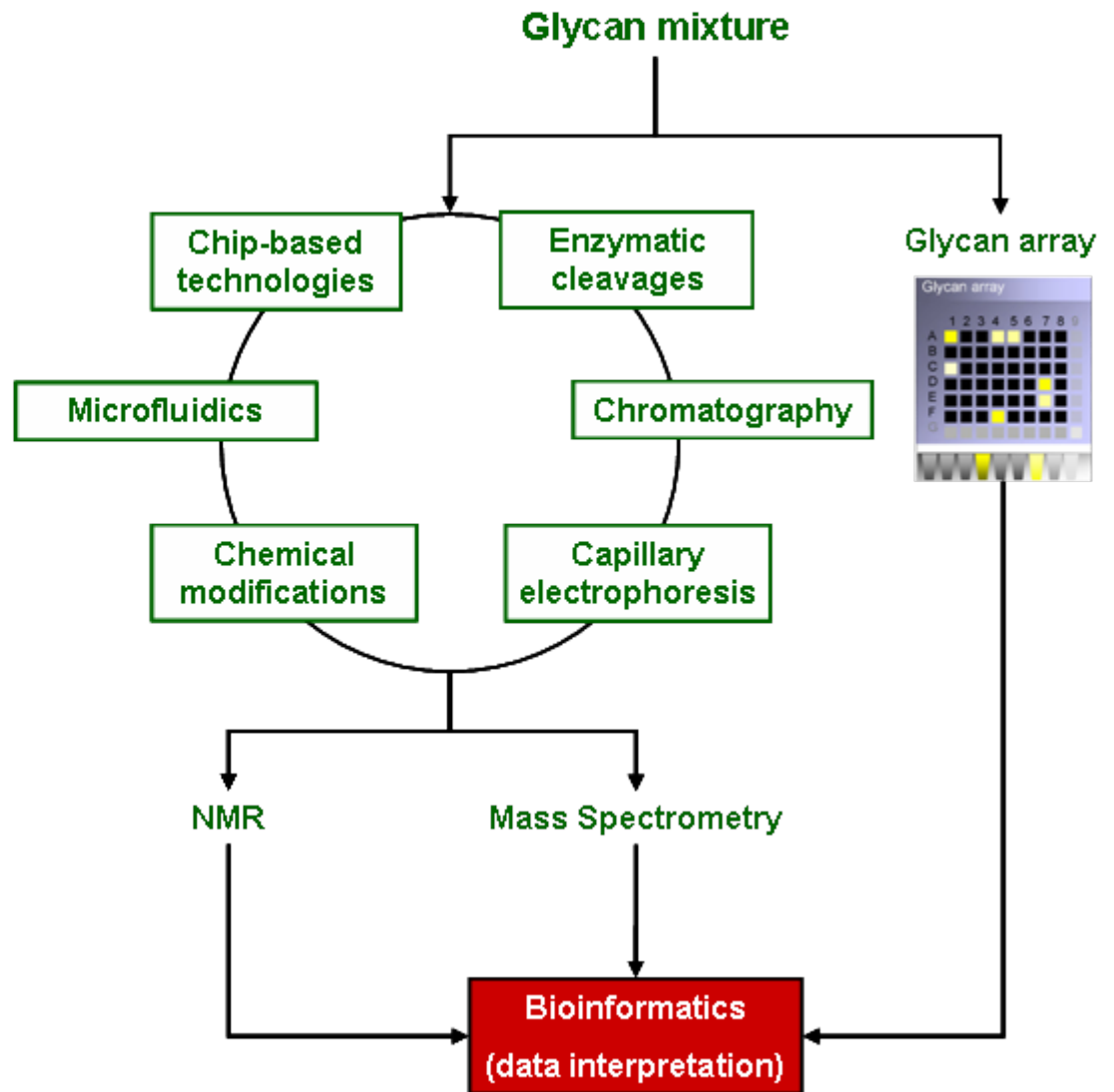


Glycomics

(basic analytical strategies)



- Mannose
- Galactose
- ▲ Fucose
- N-acetyl galactosamine
- N-acetyl glucosamine
- ◆ N-acetyl neuraminic acid
- ◆ N-glycolyl neuraminic acid



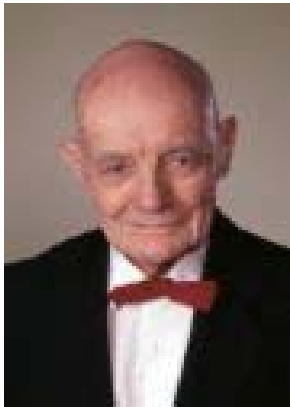
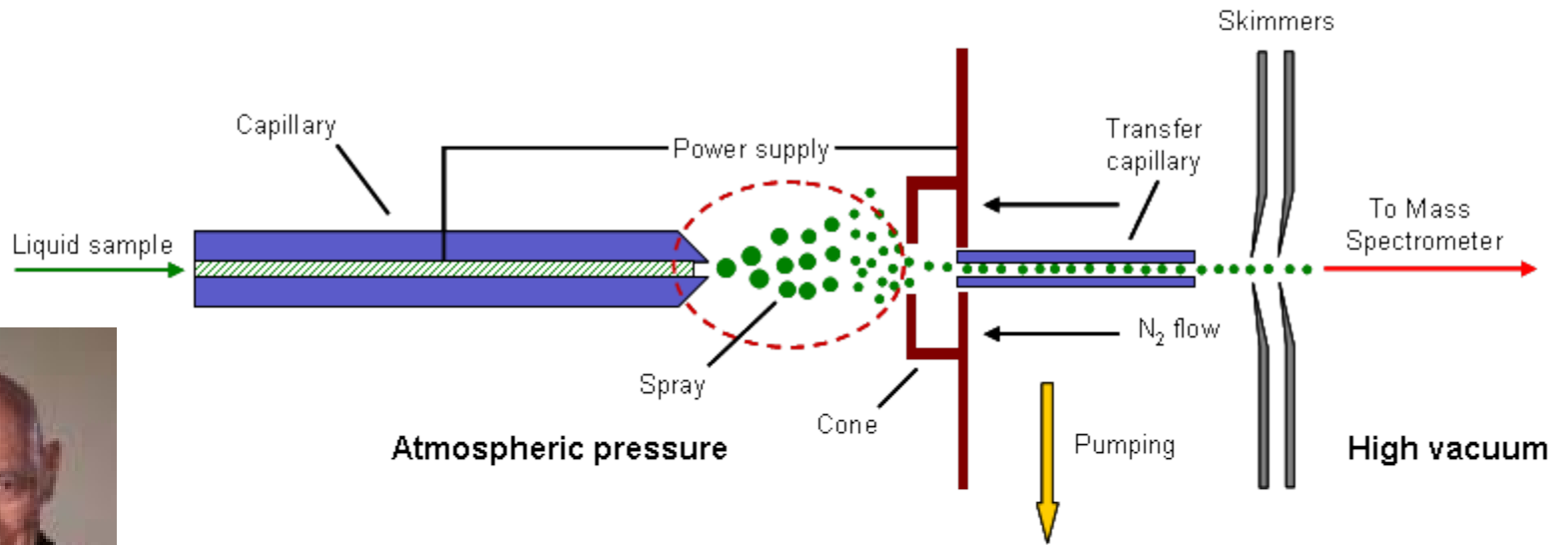
SPECTROMETRIA DE MASA

- tehnica de separare a moleculelor ionizate in faza gazoasa in functie de raportul masa/sarcina (m/z) si de identificare a lor prin determinarea exacta a maselor moleculare ale acestora si ale fragmentelor lor
- o tehnologie ultramoderna pentru :
 - *cercetarea biomedicala*: genomica, proteomica, glicomica, metabolomica
 - *analiza farmaceutica* : descoperirea medicamentelor, metabolismul medicamentelor, chimie combinatorie, farmacocinetica
 - *analiza mediului*: calitatea apei, alimentelor, aerului
 - *medicina legala/cercetarea clinica*

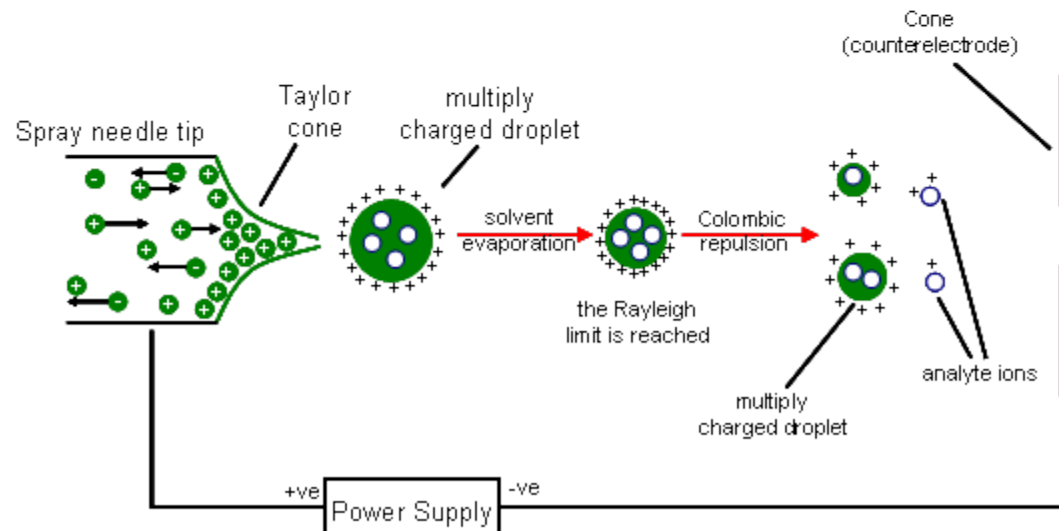
ESI (ionizarea prin electrospray)

- Premiul Nobel pentru Chimie in 2002 : John B. Fenn
- Proba dizolvata intr-o solutie tampon polara, nevolatila este directionata printr-un tub capilar, la capatul caruia este aplicat un o tensiune mare (3-4 kV) → particule incarcate electric ale solutiei analitului
- La capatul tubului capilar, fluxul coaxial al N₂ (gaz de nebulizare) si campul electric puternic creeaza un aerosol fin de “picaturi” incarcate electric. Pe masura ce particulele sunt accelerate fata de varful capilarului, solventul se evaporata pana cand, la un anumit moment, concentratia sarcinilor este asa de mare incat fortele coulombiene depasesc tensiunea superficiala a picaturii, avand drept rezultat dispersia picaturii intr-un spray de picaturi mai mici (**explozie Coulombiana**)
- Aceste picaturi continua sa se evapore si se vor dispersa in sprayuri si mai fine, iar cand solventul s-a evaporat complet se obtin macroioni care vor fi supusi analizei masei
- Tehnica foarte sensibila, necesita mai putin de 1 picomol de proba
- Compusi cu masa moleculara mare – pana la 200,000 Daltoni
- Masuratori in modul ionilor pozitivi (M + H)⁺ (peptide si proteine)
- Masuratori in modul ionilor negativi (M - H)⁻ (acizi nucleici si glucide)
- Poate fi modificata la “**NANOSPRA**Y”: debitul de infuzie de zeci-sute nanolitri/minut

Electrospray

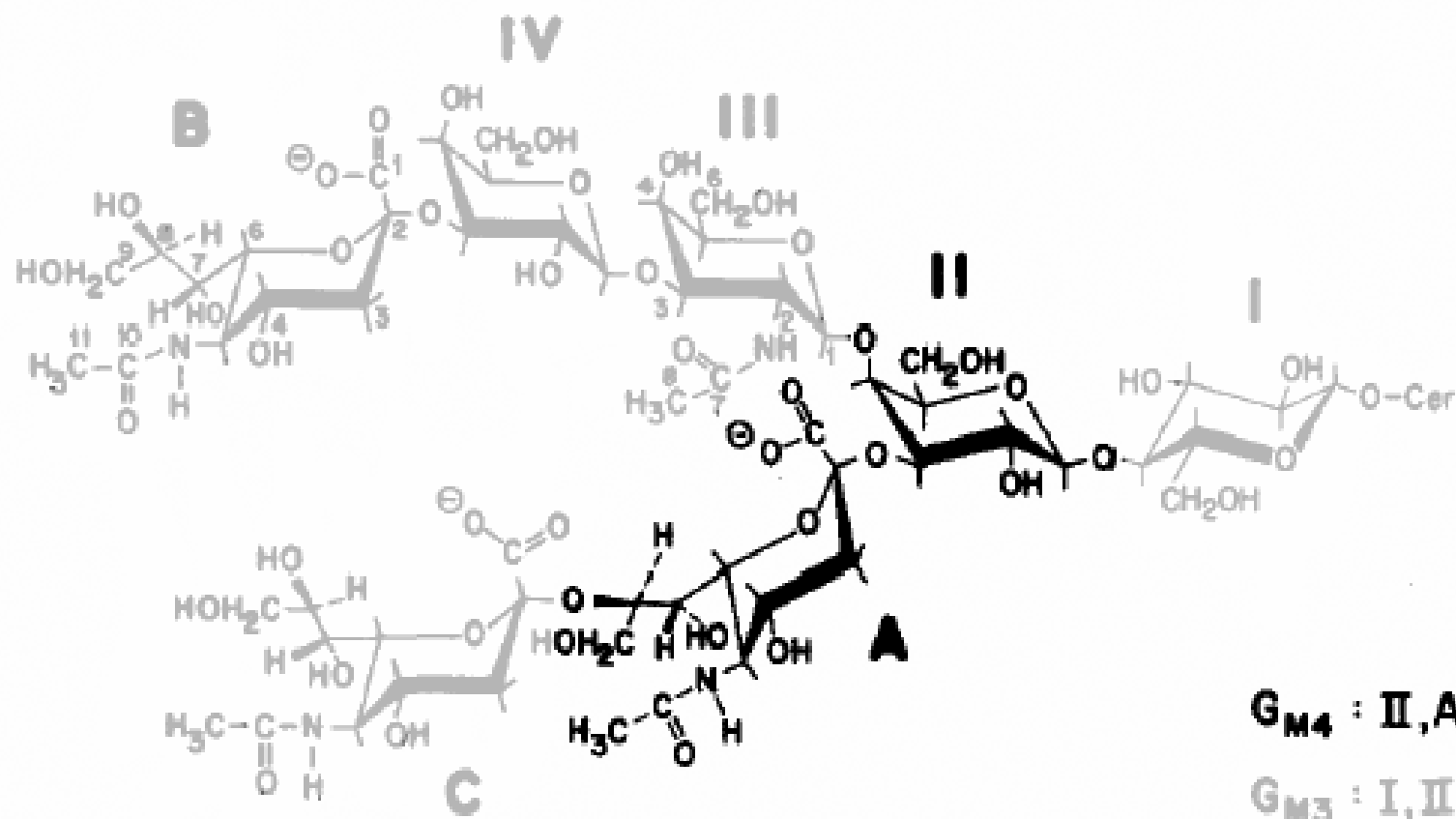


John B. Fenn
Nobel Prize in Chemistry, 2002



Ganglioziidele:

- ◆ Familie complexa de glicosfingolipide acide
- ◆ Contin una sau mai multe unitati de acid sialic intr-un lant oligozaharidic atasat de o catena ceramidica hidrofoba
- ◆ Se gasesc predominant in sistemul nervos : 5-8% din lipidele totale din creier
- ◆ Sunt implicate in :
 - recunoasterea celula-celula, interactiunea celula-substrat, adeziunea celulara, diferentierea celulara, semnalizarea intracelulara
 - dezvoltarea creierului, neurogeneza, sinaptogeneza, formarea memoriei, procesul de imbatranire
 - prin caile aberante de glicozilare – se crede ca sunt implicate in invazia si metastazarea tumorala
- ◆ se cunosc >20 ganglioziide diferite
 - Avand la baza diferentele in structura lantului carbohidrat
- ◆ Ganglioziide comune : **GM1, GM2, GM3, GM4, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b**



$G_{M4} : \text{II, A}$

$G_{M3} : \text{I, II, A}$

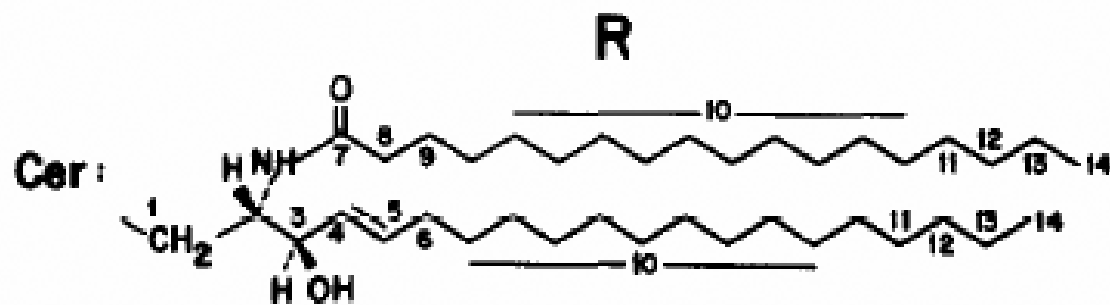
$G_{M2} : \text{I, II, III, A}$

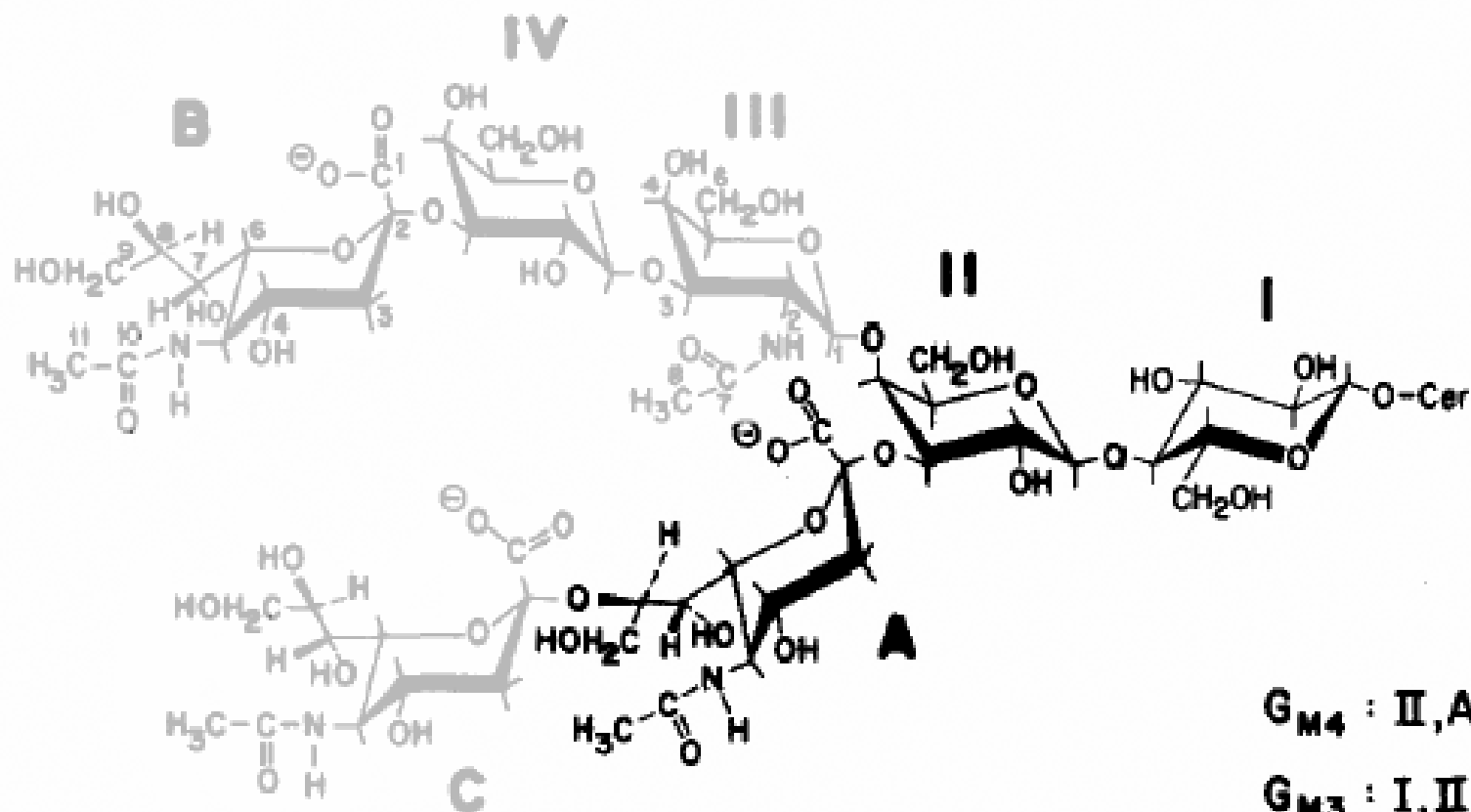
$G_{M1} : \text{I, II, III, IV, A}$

$G_{D1a} : \text{I, II, III, IV, A, B}$

$G_{D1b} : \text{I, II, III, IV, A, C}$

$G_{T1b} : \text{I, II, III, IV, A, B, C}$





G_{M4} : II, A

G_{M3} : I, II, A

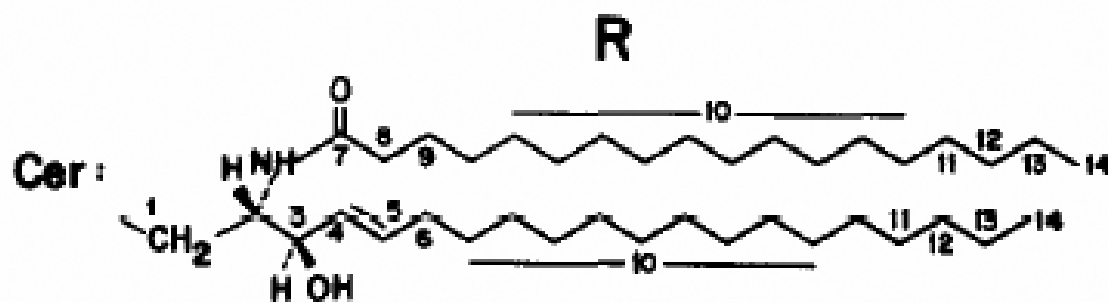
G_{M2} : I, II, III, A

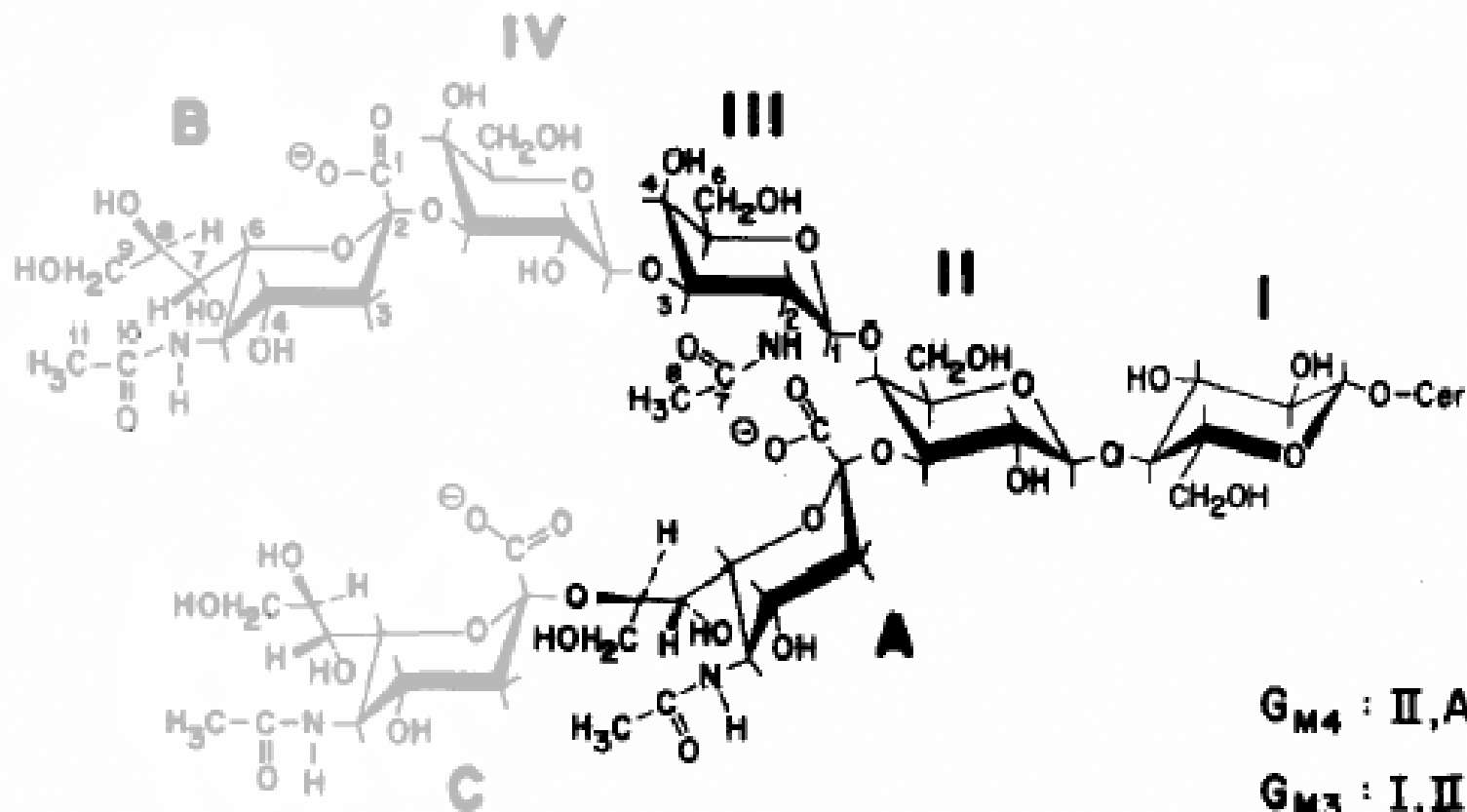
G_{M1} : I, II, III, IV, A

G_{D1a} : I, II, III, IV, A, B

G_{D1b} : I, II, III, IV, A, C

G_{T1b} : I, II, III, IV, A, B, C





G_{M4} : II, A

G_{M3} : I, II, A

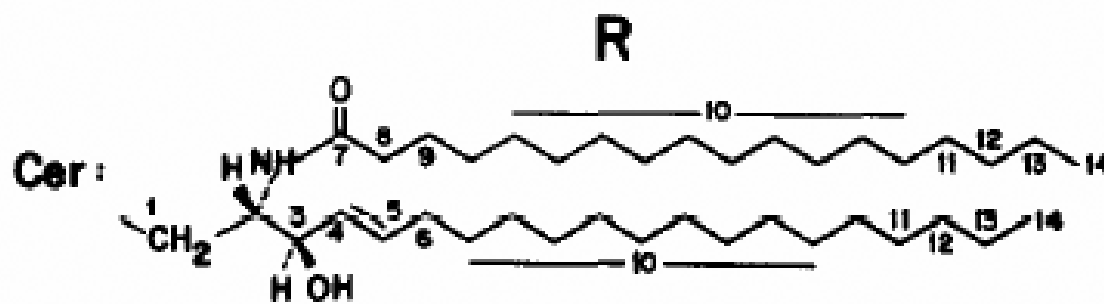
G_{M2} : I, II, III, A

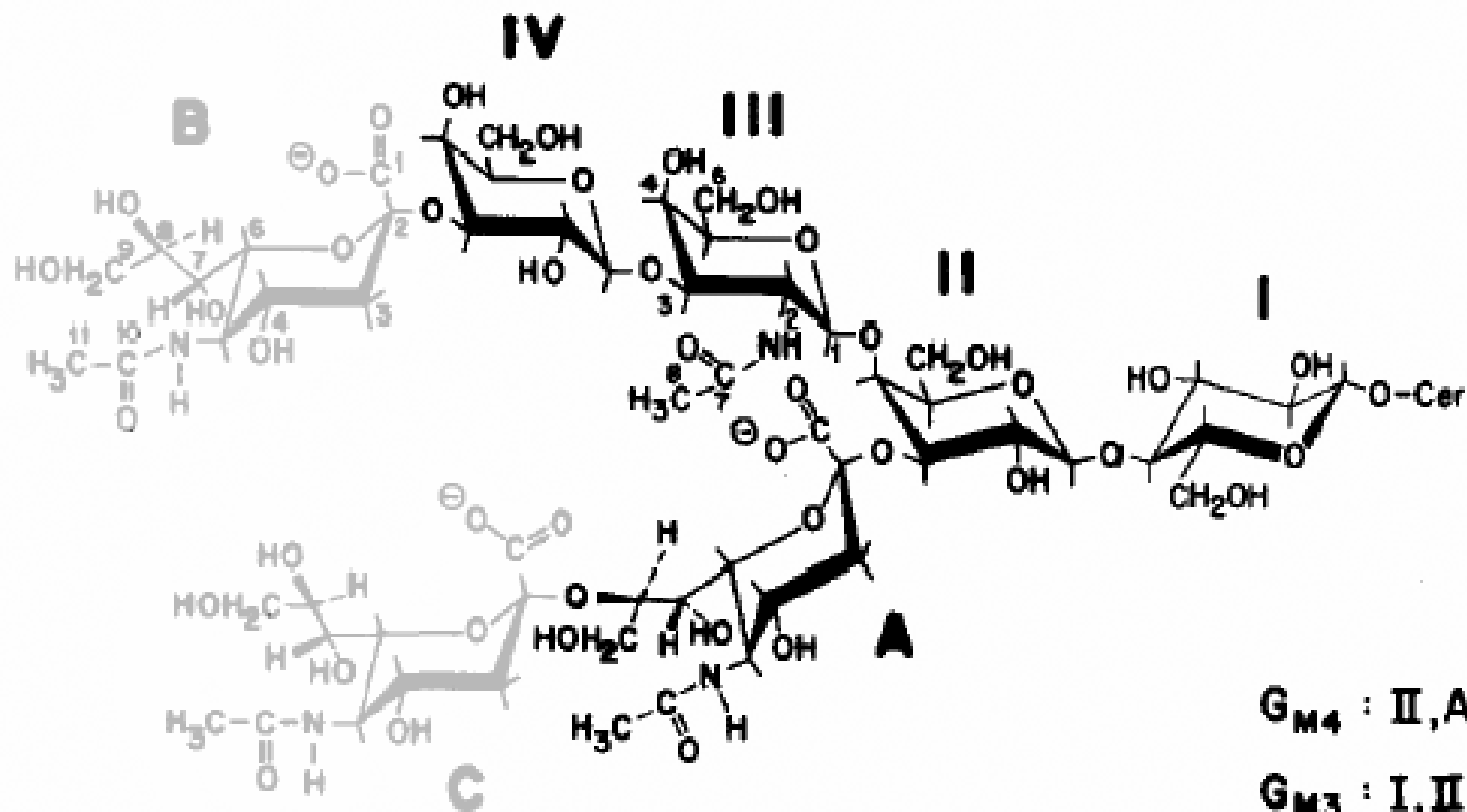
G_{M1} : I, II, III, IV, A

G_{D1a} : I, II, III, IV, A, B

G_{D1b} : I, II, III, IV, A, C

G_{T1b} : I, II, III, IV, A, B, C





G_{M4} : II, A

G_{M3} : I, II, A

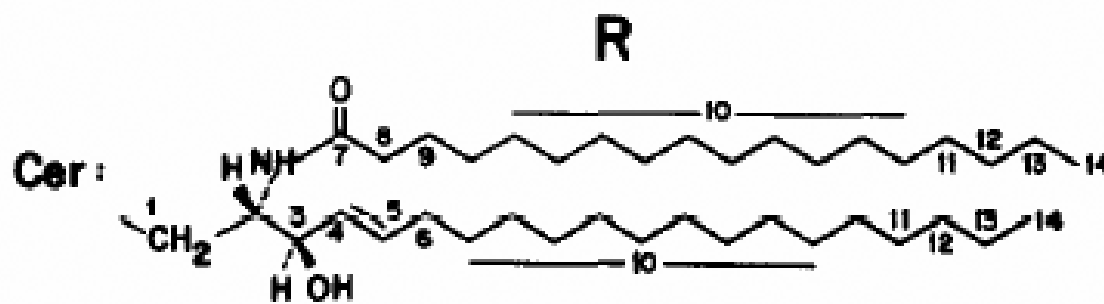
G_{M2} : I, II, III, A

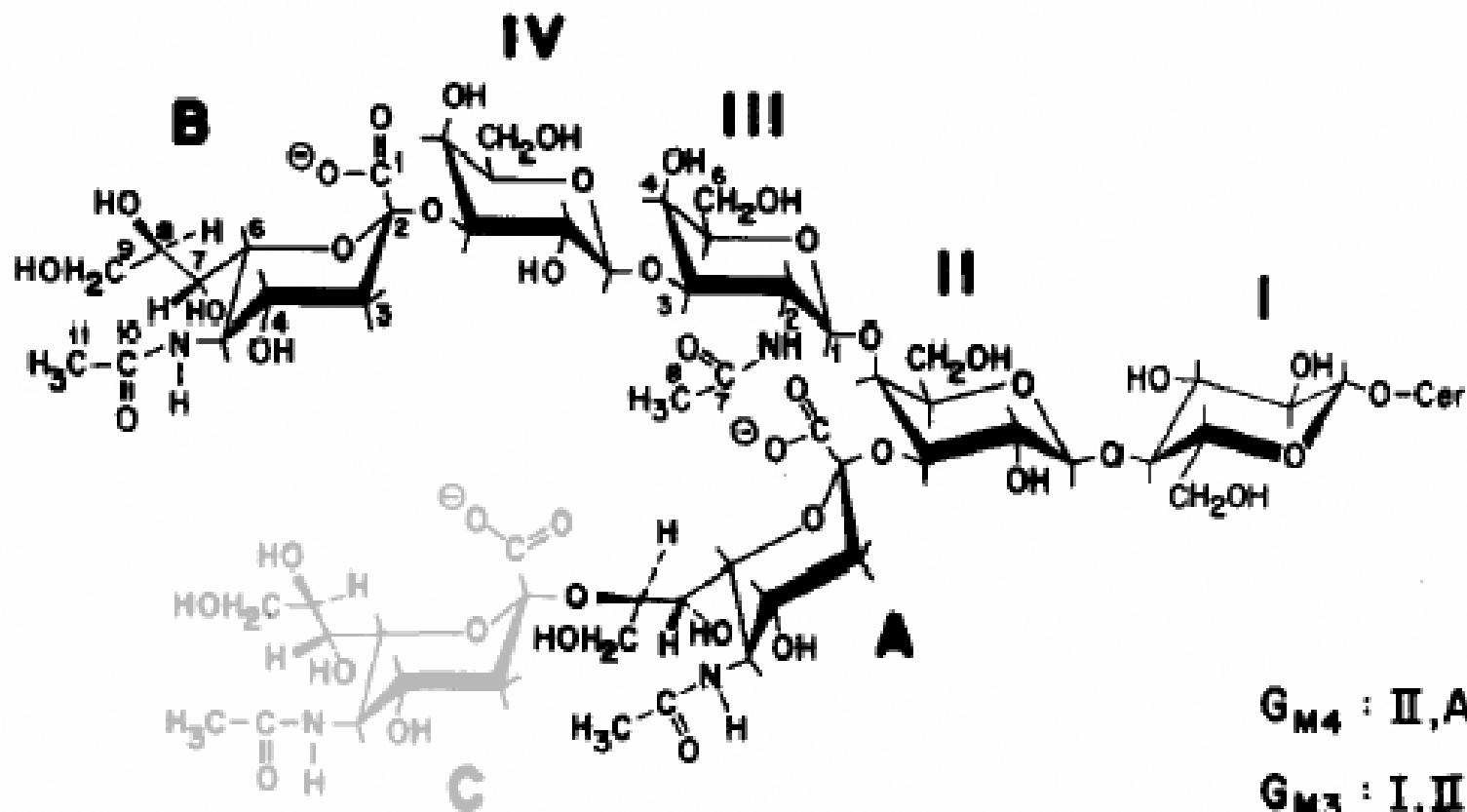
G_{M1} : I, II, III, IV, A

G_{D1a} : I, II, III, IV, A, B

G_{D1b} : I, II, III, IV, A, C

G_{T1b} : I, II, III, IV, A, B, C





G_{M4} : II, A

G_{M3} : I, II, A

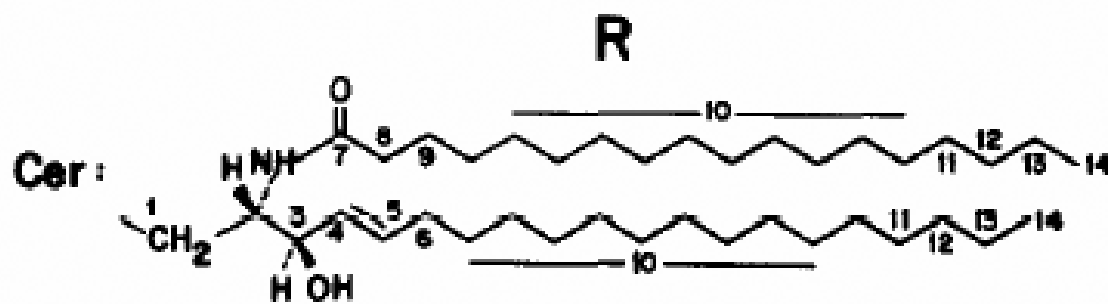
G_{M2} : I, II, III, A

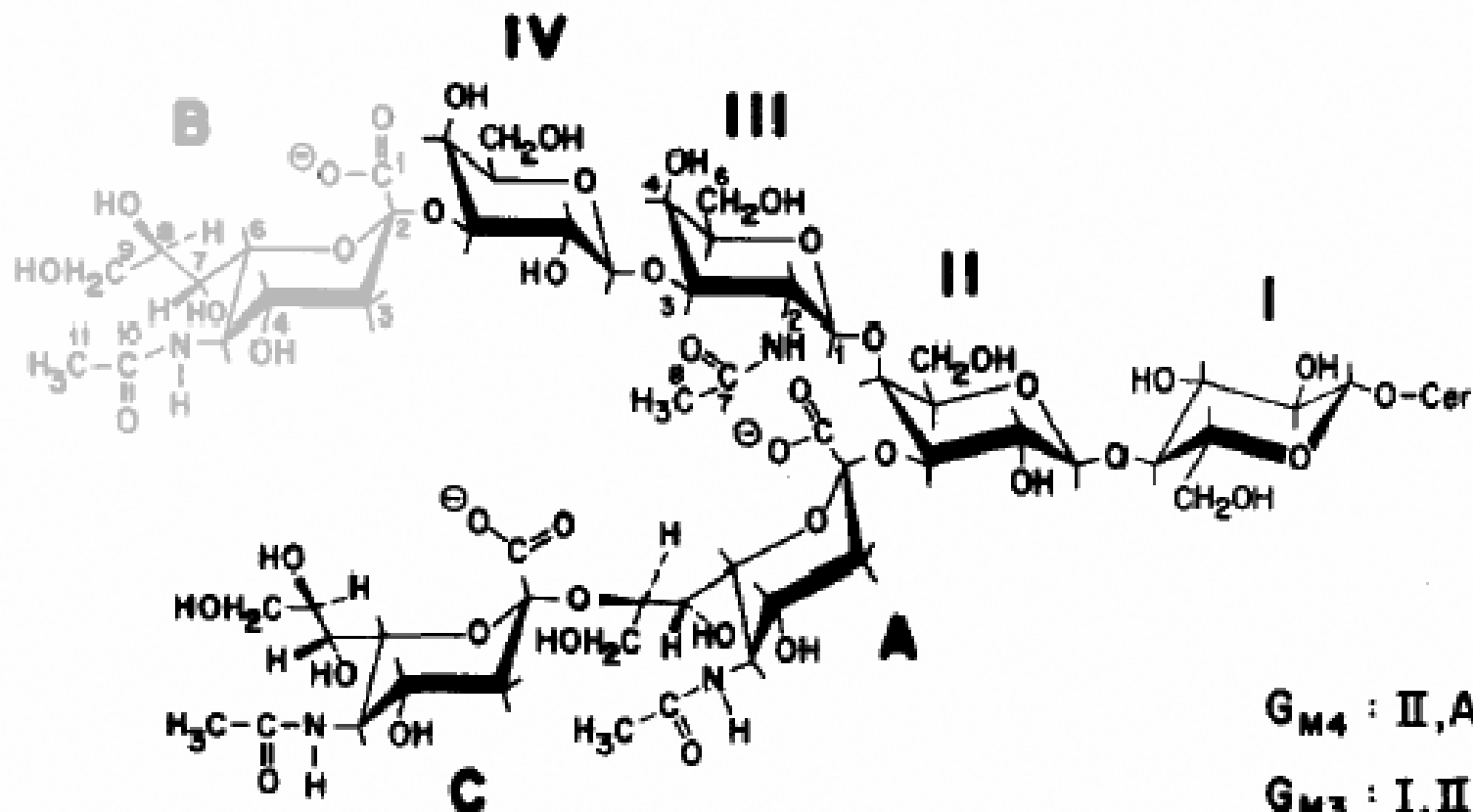
G_{M1} : I, II, III, IV, A

G_{D1a} : I, II, III, IV, A, B

G_{D1b} : I, II, III, IV, A, C

G_{T1b} : I, II, III, IV, A, B, C





G_{M4} : II, A

G_{M3} : I, II, A

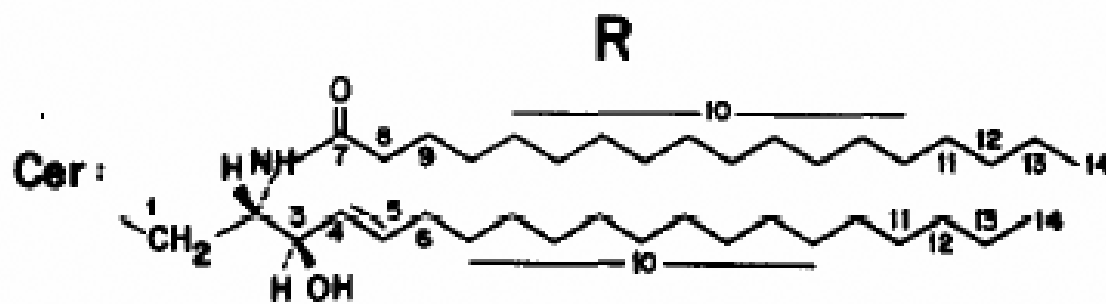
G_{M2} : I, II, III, A

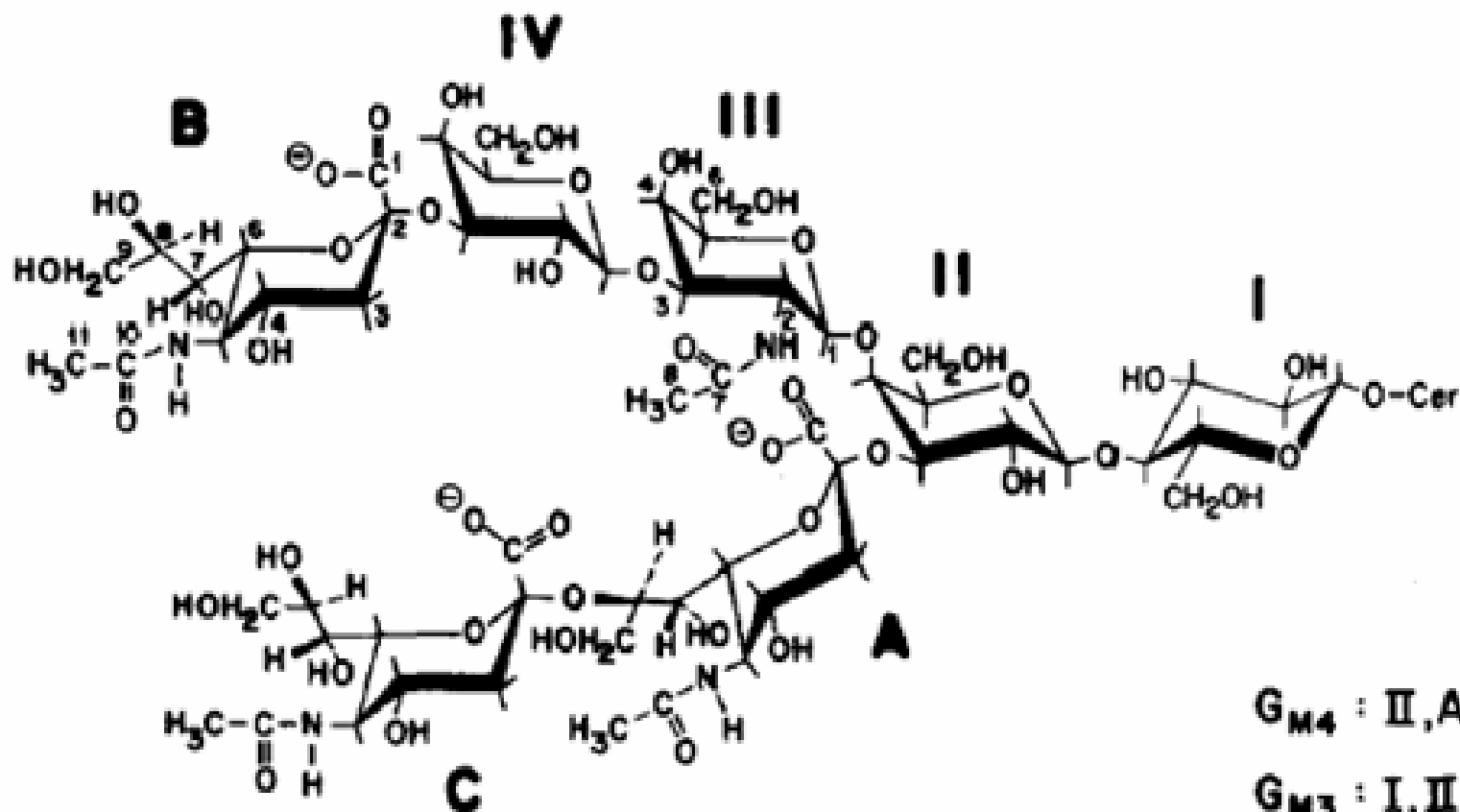
G_{M1} : I, II, III, IV, A

G_{D1a} : I, II, III, IV, A, B

G_{D1b} : I, II, III, IV, A, C

G_{T1b} : I, II, III, IV, A, B, C





$G_{M4} : \text{II, A}$

$G_{M3} : \text{I, II, A}$

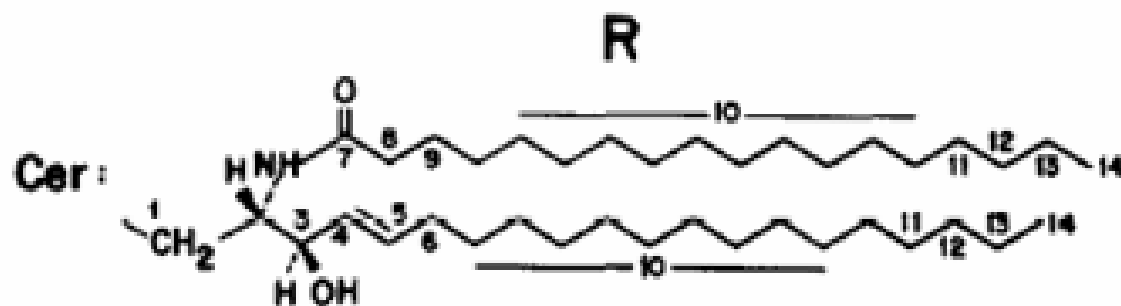
$G_{M2} : \text{I, II, III, A}$

$G_{M1} : \text{I, II, III, IV, A}$

$G_{D1a} : \text{I, II, III, IV, A, B}$

$G_{D1b} : \text{I, II, III, IV, A, C}$

$G_{T1b} : \text{I, II, III, IV, A, B, C}$



Ce se asteapta in glicomica moderna de la spectrometria de masa?

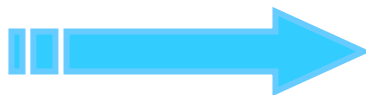
- Sensibilitate
- Viteza de analiza
- Exactitate
- Reproductibilitate
- Potential de a detecta componentele minore din amestecurile complexe
- Identificarea structurala *de novo*

Crescute

- Consum al probei
- Volum al probei
- Cost al analizei

Reduse

Fara



- Contaminare de la proba la proba, respectiv de la analiza la analiza

Experiment

Probele de ganglioziide

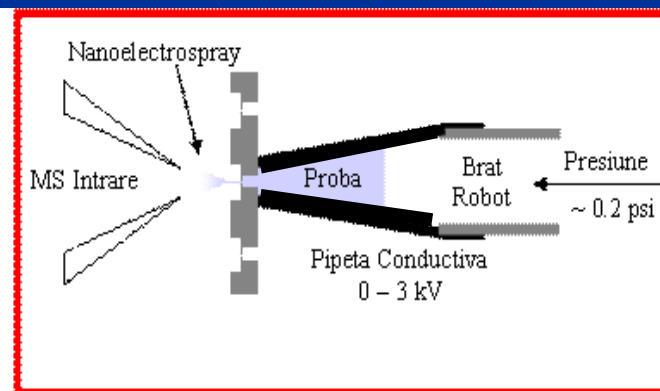
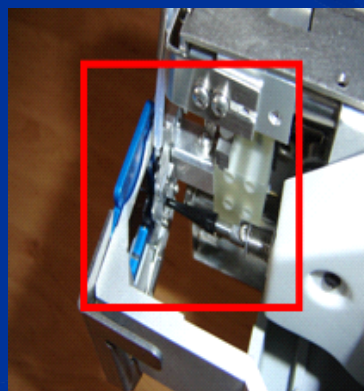
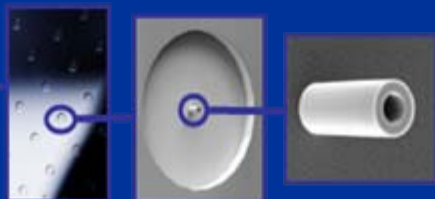
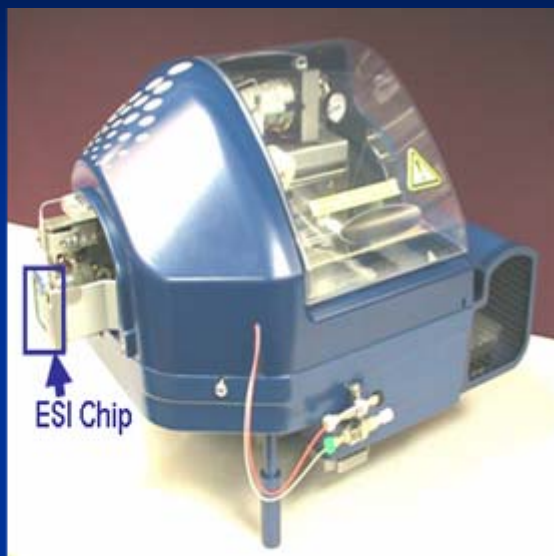
- Amestecurile native de ganglioziide au fost extrase din regiuni diferite ale aceluiași creier uman fetal în a 36-a săptămână de gestație : neocortex frontal (NEO36), substanța albă a lobului frontal (FL36) și substanța albă a lobului occipital (OL36).*
- Examinarea anatomopatologică : țesut normal , fără afecțiuni neurologice sau malformații
- **Extractia gangliozidelor** – utilizând metoda lui Svennerholm și Fredman la care am adus unele modificări
- **Purificarea gangliozidelor** – etapa finală
- Pentru analizele prin nanoESI chip MS și MS/MS, fiecare amestec de ganglioziide a fost dizolvat în metanol (MeOH) pur până la o concentrație finală de 2-3 pmol/μL

*Permisinea pentru experimente cu țesut uman în scopuri științifice a fost obținută de la Comisia de Etică a Facultății de Medicină din Zagreb. Au fost respectate toate regulile etice în conformitate cu Declarația Asociației Mondiale de Medicină de la Helsinki (revizuită la Edinburgh, 2000) .

Spectrometria de masa

- **Toate experimentele au fost realizate utilizand un spectrometru de masa (MS) cu capcana ionica de inalta capacitate (HCT Ultra, PTM discovery) de la firma Bruker Daltonics, Bremen, Germany**
- **Ionizarea prin nanoelectrospray (nanoESI) complet automatizata bazata pe chip s-a realizat utilizand robotul NanoMate 400, care incorporeaza tehnologia ESI Chip (Advion BioSciences, Ithaca, NY), cuplat la HCT MS printr-un sistem de montaj realizat in laborator**
- **Toate spectrele de masa au fost obtinute in modul ionilor negativi**
- **Toate cele 3 probe au fost analizate utilizand aceleasi conditii instrumentale: tensiunea pe capilara, potentialul contraelectrodului MS, temperatura si debitul gazului de desolvatare, timpul de achizitie**
- **Parametrii nanoESI au fost optimizati pentru a asigura ionizarea si transferul adecvat al componentelor ganglioizidice in MS**

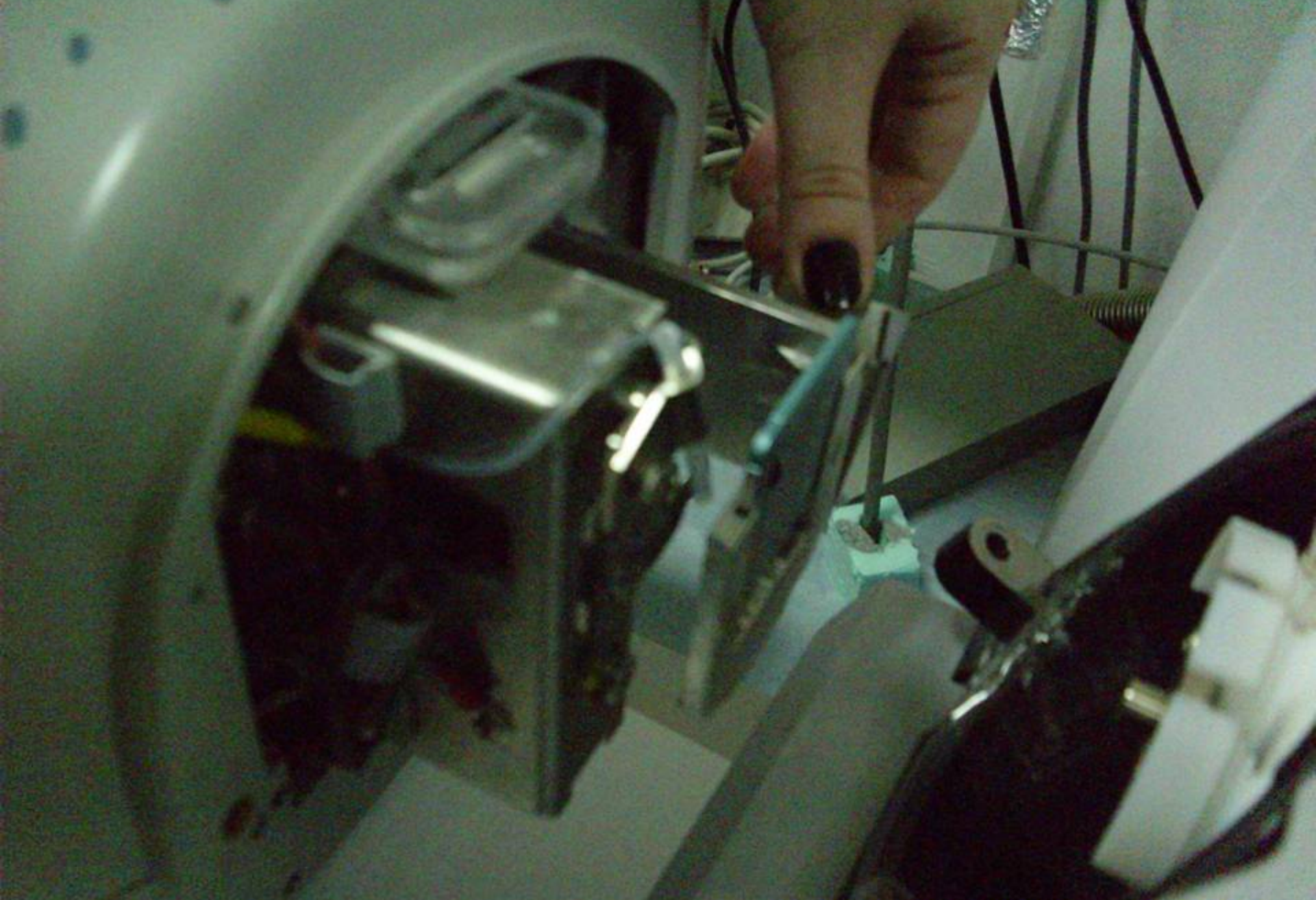
ROBOT DE INFUZIE AUTOMATA PRIN CHIP-ELECTROSPRAY, NANOMATE ADVION BIOSCIENCES, NORWICH, UK



CUPLAJUL ROBOTULUI NANOMATE CU SPECTROMETRUL DE MASA HCT MS

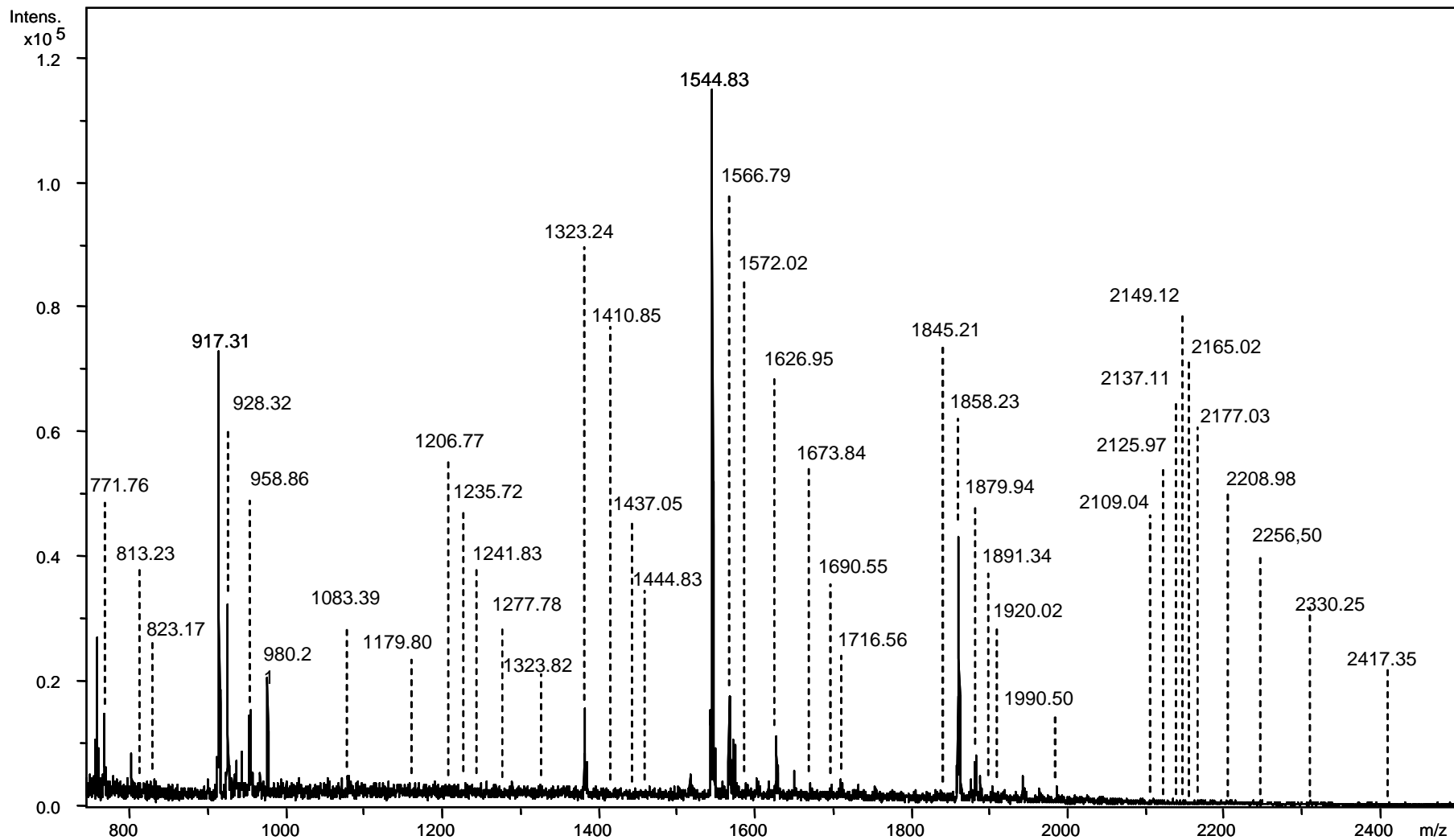


Laboratorul de Spectrometrie de Masa, Institutul National de C-D
pentru Electrochimie si Materie Condensata, Timisoara



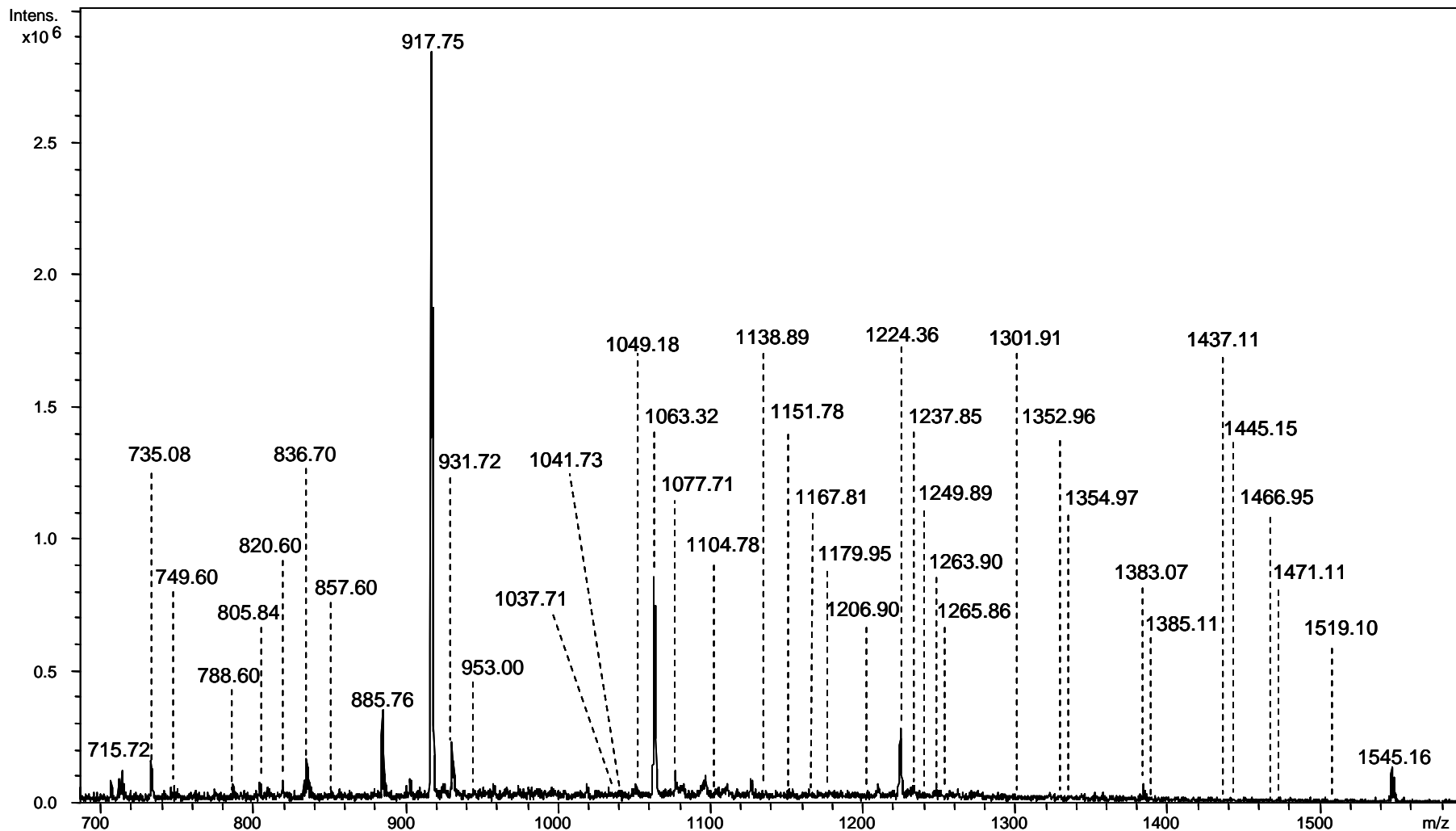
**Laboratorul de Spectrometrie de Masa, Institutul National de C-D
pentru Electrochimie si Materie Condensata, Timisoara**

Spectrul de masa MS¹ al amestecului de ganglioze din NEO36 obtinut prin (-) nanoESI chip HCT MS



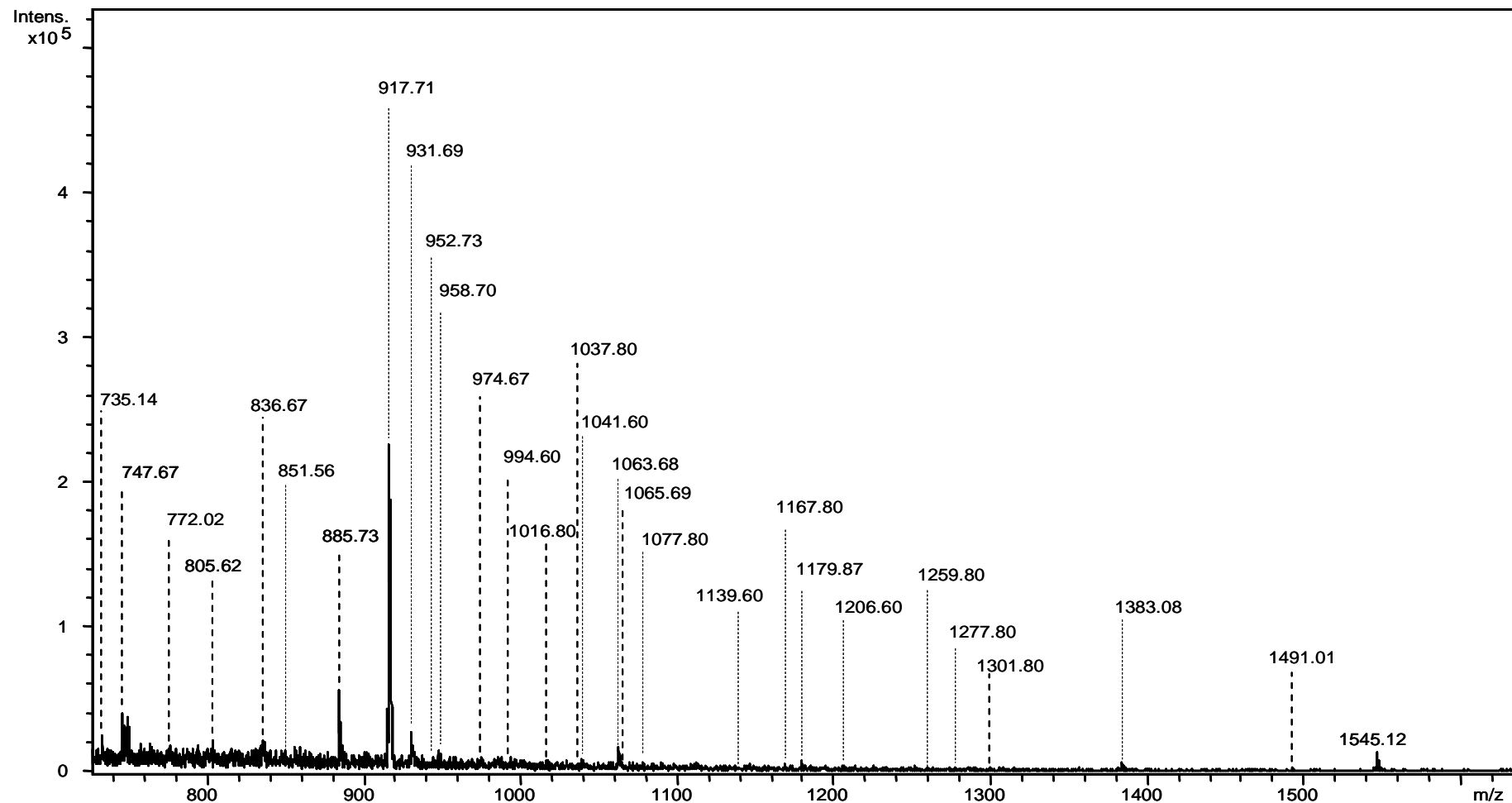
Solvent: MeOH; concentratia probei: 3 pmol/ μ L; timpul de achizitie : 3 min; Chip ESI : 0,85 kV.

Spectrul de masa MS¹ al amestecului de ganglioze din FL36 obtinut prin (-) nanoESI chip HCT MS



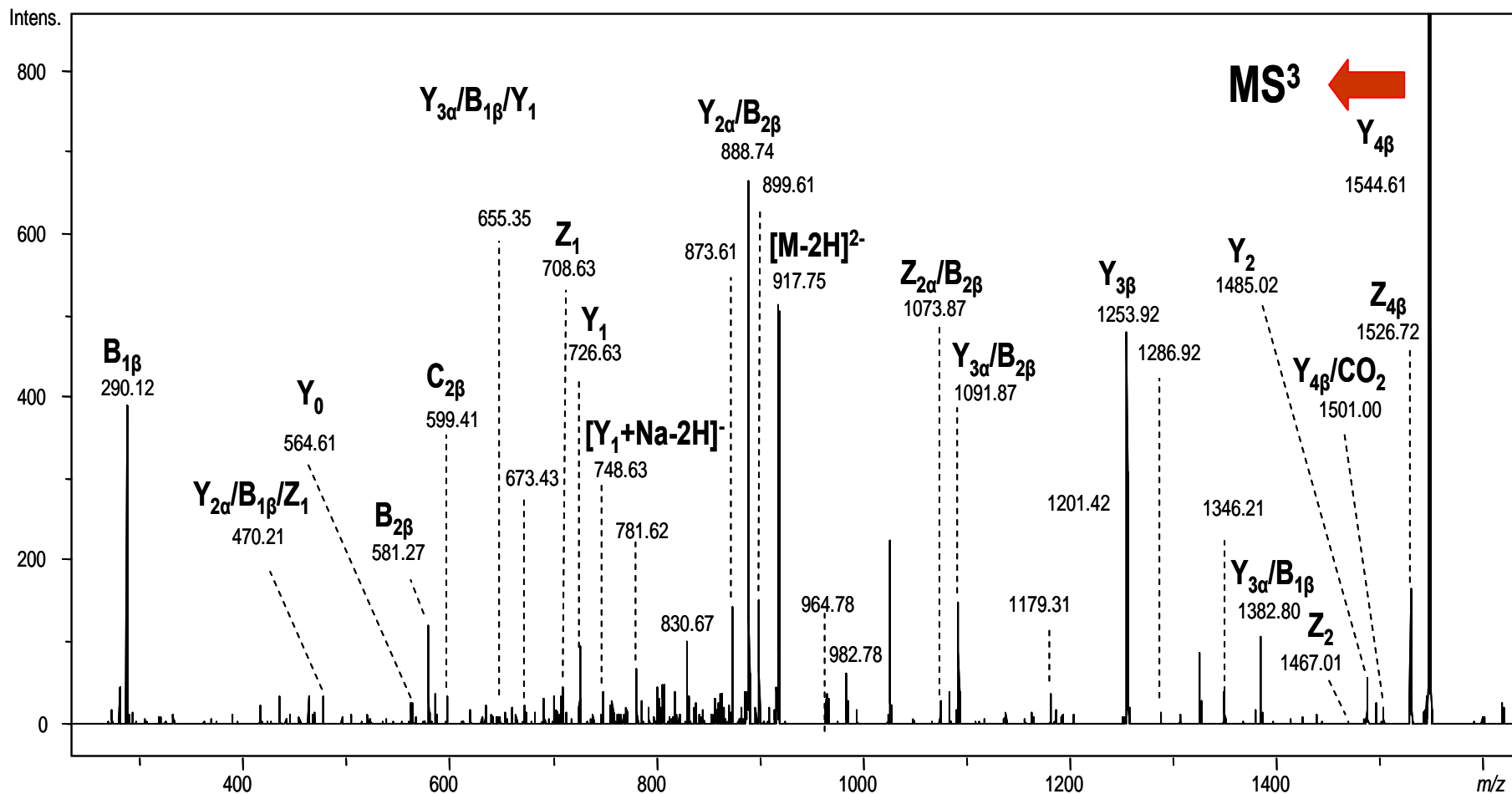
Solvent: MeOH; concentratia probei: 3 pmol/ μ L; timpul de achizitie : 3 min; Chip ESI : 0,85 kV.

Spectrul de masa MS¹ al amestecului de ganglioze din OL36 obtinut prin (-) nanoESI chip HCT MS

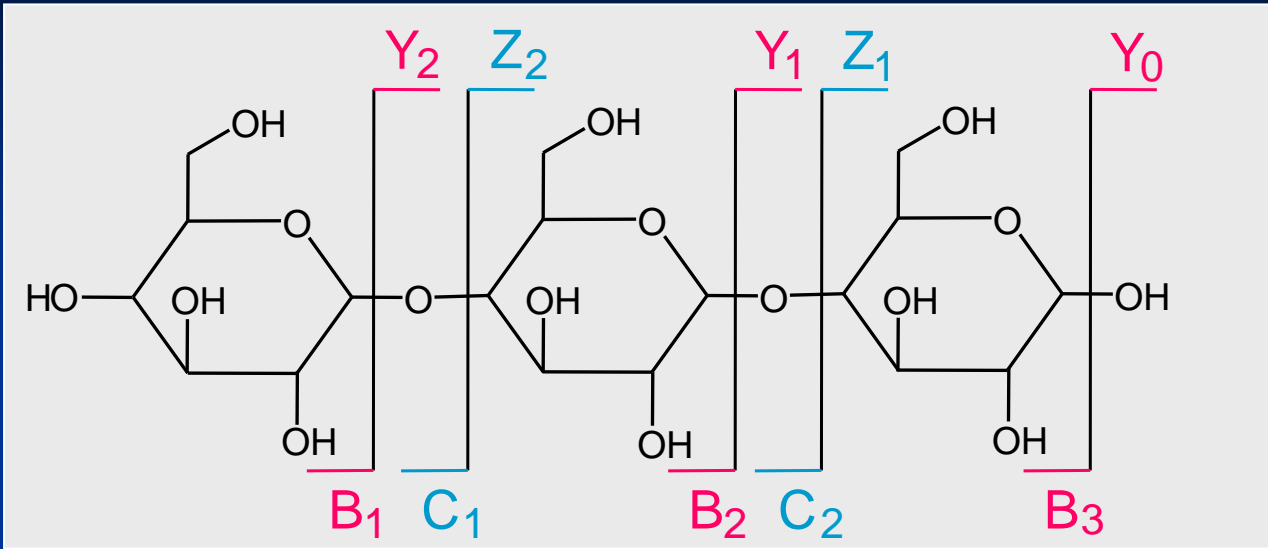


Solvent: MeOH; concentratia probei: 3 pmol/ μ L; timpul de achizitie : 3 min; Chip ESI : 0,85 kV.

**Spectrul de fragmentare MS² pentru ionul dublu incarcat de la *m/z* 917.75
corespunzator speciei gangliozidice GD1 (d18:1/18:0)
detectata in amestecul NEO36**

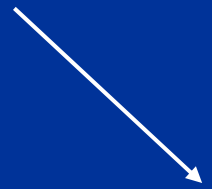
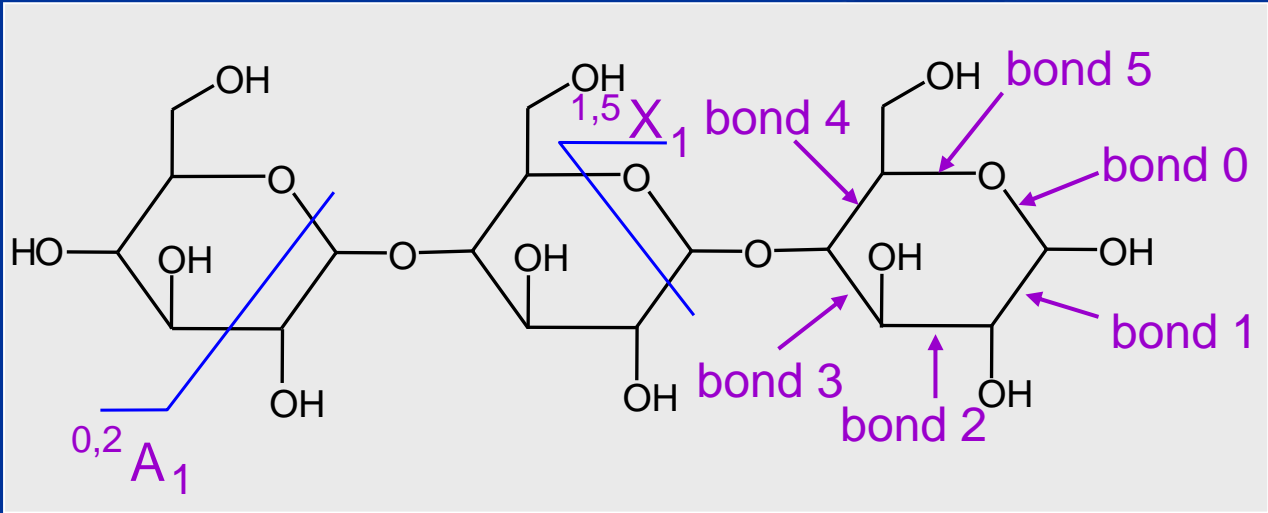


Nomenclatura ionilor fragment de carbohidrat*



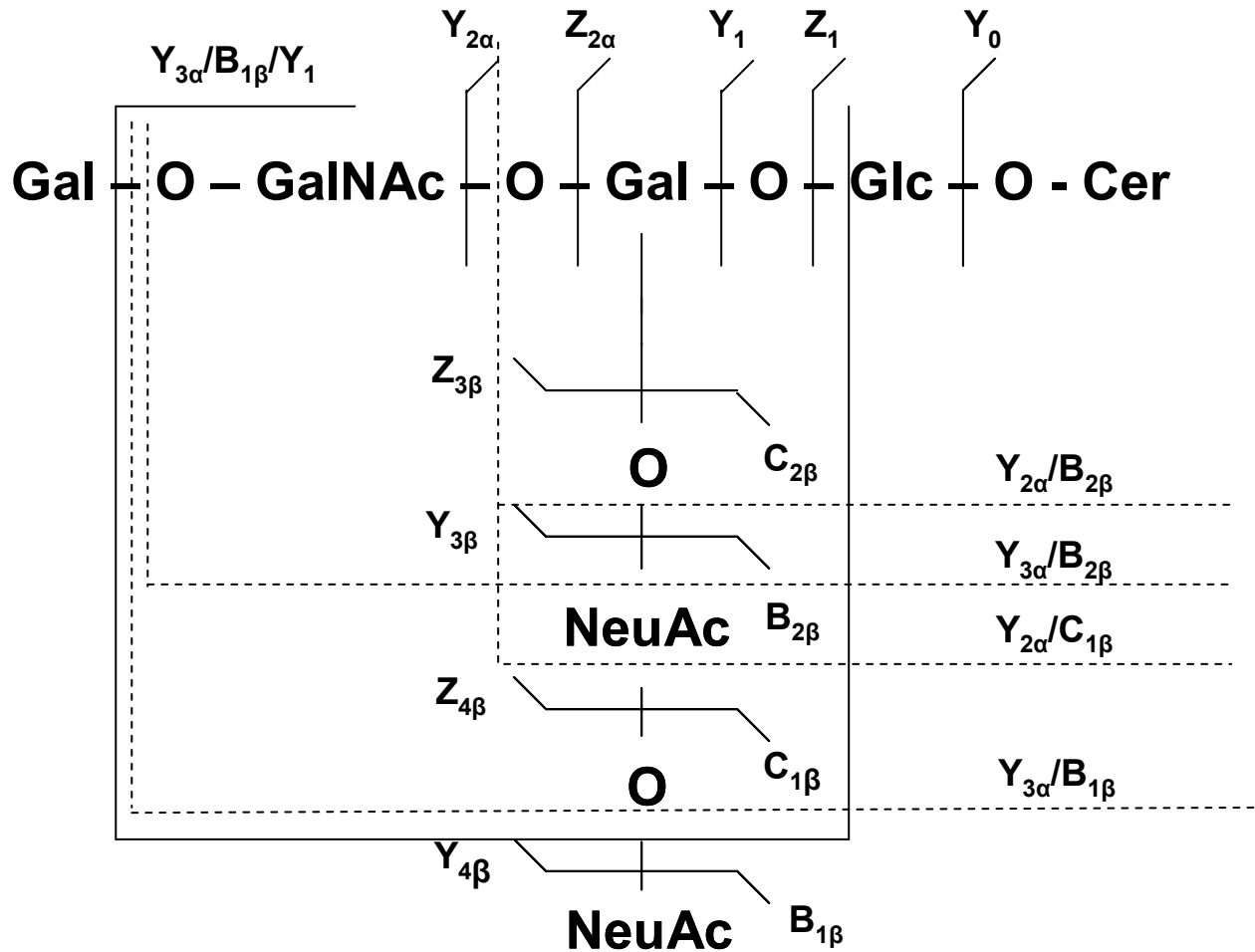
non reducing end

reducing end

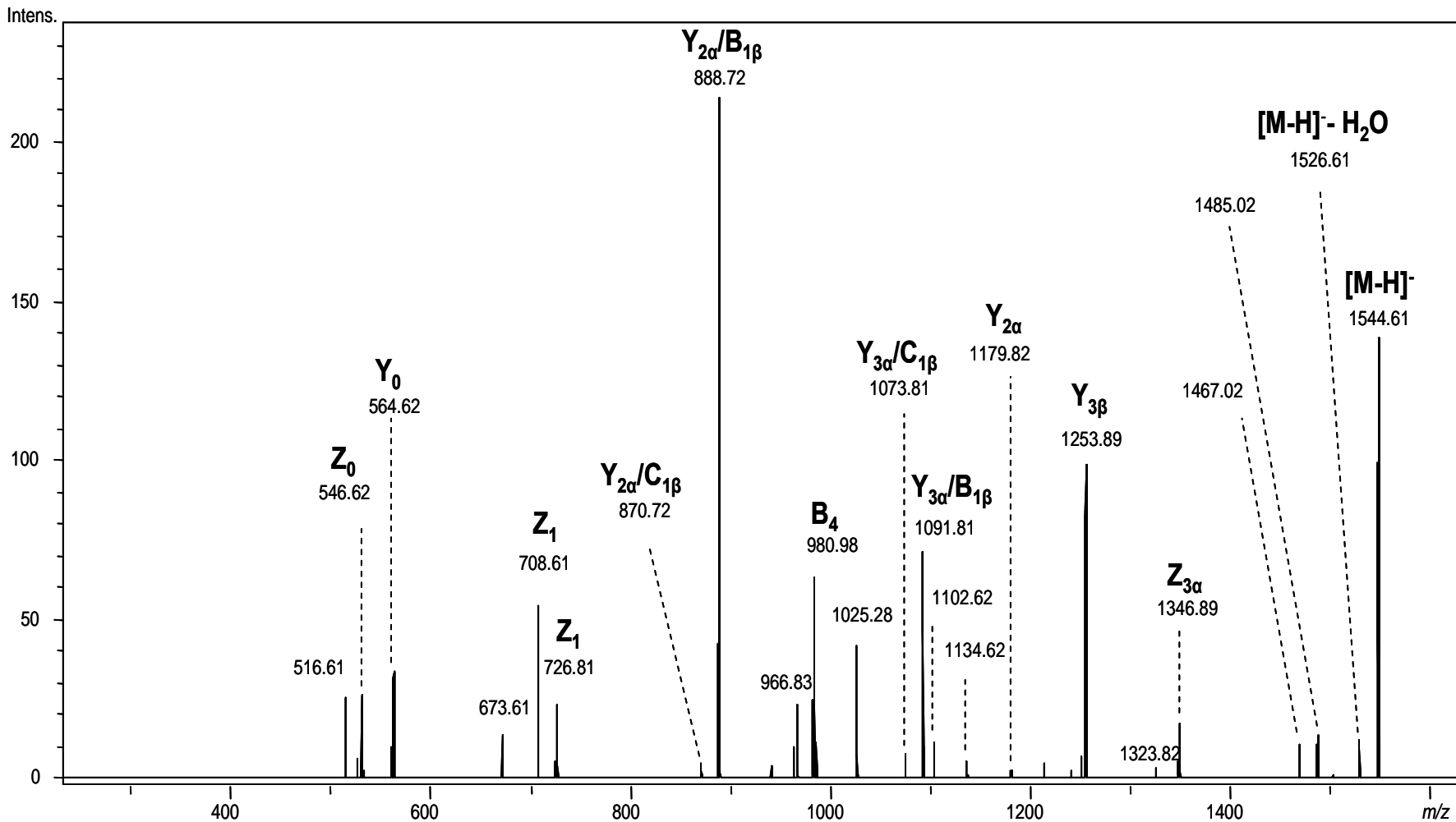


* B. Domon, C.E. Costello, Glycoconjugate J. 5 (1988) 397-409.

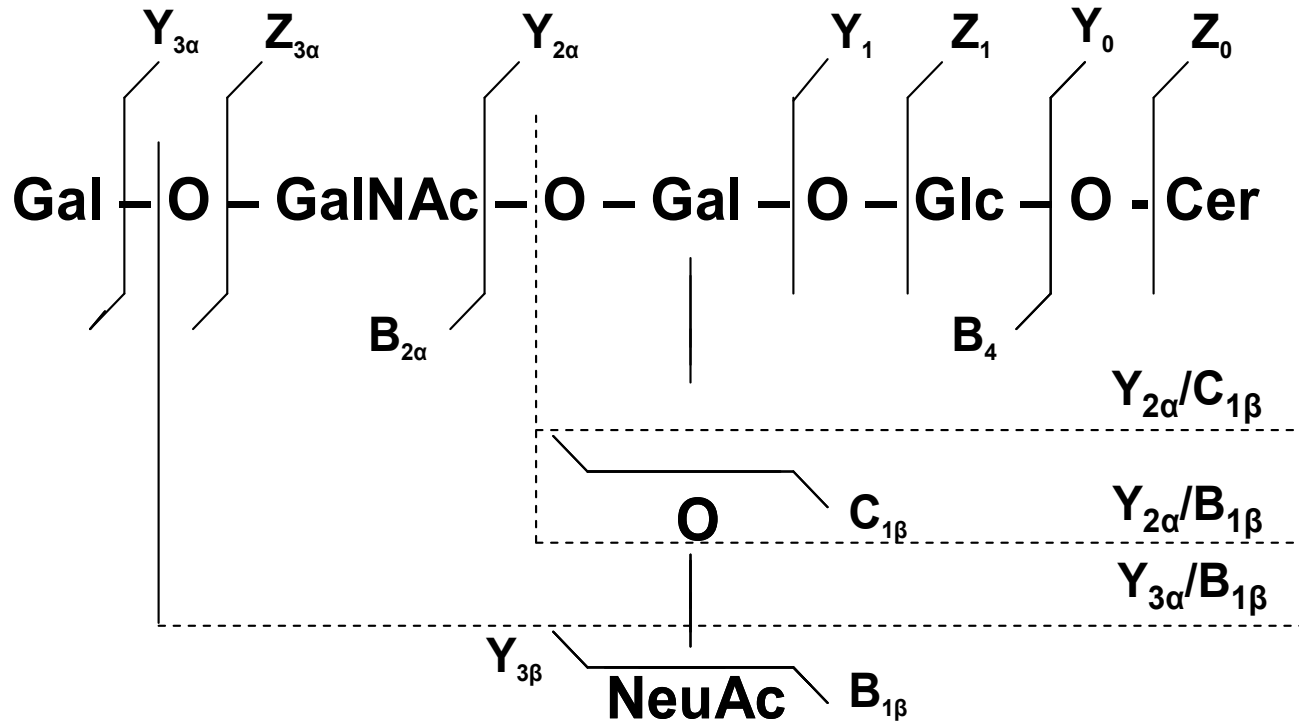
Schema de fragmentare in MS² a ionului [M-2H]²⁻ la *m/z* 917.75



Spectrul de fragmentare MS³ utilizand ca si precursor ionul simplu incarcat Y_{4β}⁻ detectat la m/z 1544.61 in MS²



Schema de fragmentare in MS³ a ionului [M-H]⁻ de la *m/z* 1544.61



Concluzii

- » Utilizand sistemul automatizat de infuzie prin chip-electrospray cuplat cu HCT MS si a tehnicilor de fragmentare prin CID s-a reusit identificarea unui numar foarte mare de specii ganglioizidice in structurile analizate: cea mai mare varietate de specii ganglioizidice (108) a fost identificata in NEO36, pe cand in FL36 si OL36 s-au identificat doar 37, respectiv 30 specii ganglioizidice
- » Diversitatea mare a speciilor ganglioizidice identificate in NEO36 poate fi corelata cu complexitatea functiilor coordonate de aceasta regiune noua filogenetic a cortexului cerebral
- » Cea mai pregnantă diferență a expresiei ganglioizidice a fost observată în NEO36 *vs.* OL36, atât în ceea ce privește numărul mult mai mare de specii ganglioizidice identificat în NEO36, cât și a prezentei speciilor polisialilate, GQși GP, cât și a celor fucozilate, care au fost identificate doar în NEO36
- » NU au fost identificate diferențe semnificative în ceea ce privește expresia ganglioizidelor în FL36 *vs.* OL36
- » Prin tehnicile de fragmentare utilizând disocierea indusă prin coliziune (CID MS_n) a platformei chip-nano-ESI-HCT s-a reusit **identificarea izomerului GD1b** în NEO36 fara necesitatea unor investigatii suplimentare prin alte metode analitice sau biochimice

Acknowledgements

**Mulumim grupului Prof. Dr. Željka Vukelić de la
Facultatea de Medicina din Zagreb pentru fructuoasa
colaborare .**