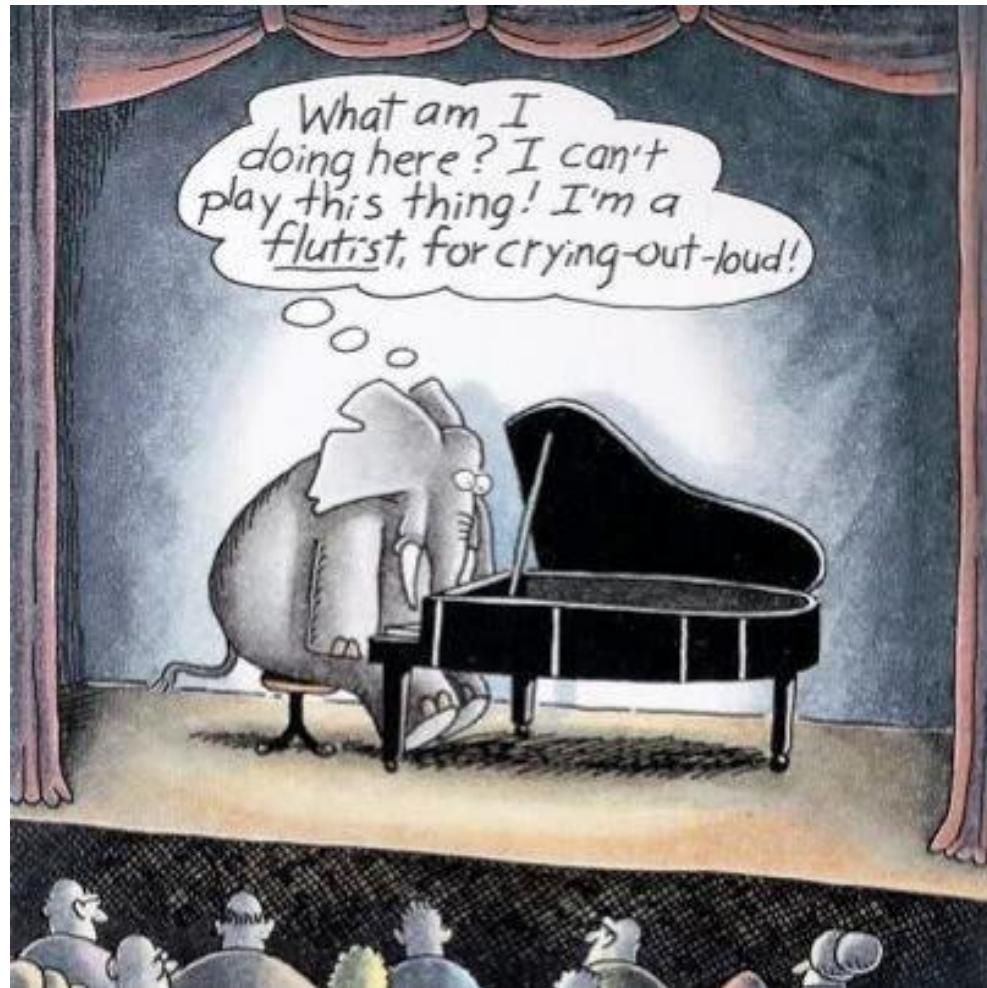


LC-MS glykanprofiler av cerebrospinalvätska - en källa till nya biomarkörer för Alzheimers sjukdom?



Stefan Gaunitz, Britt Lundin, Lars Tjernberg
Medicinsk Diagnostik Karolinska, Karolinska
Universitetslaboratoriet, Klinisk Kemi, Kromatografi

Cellbiolog på sjukhuskemistmöte...



- Sjukhuskemist på Klinisk Kemi, kromatografi, Karolinska Universitetssjukhuset i Huddinge
- Jobbat många år med kolhydratanalyser (glykaner) under doktorandtid och postdoc

Översikt

Bakgrund

- Alzheimer
 - Biomarkörer
- Proteomik och glykomik
 - Möjligheter och tekniska utmaningar

Mål

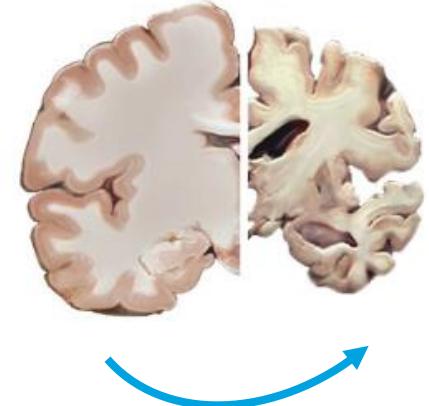
- Identifiera nya tidiga AD biomarkörer

Resultat

- Proteinglykosylering i AD
 - LC-MS studier på CSF och hjärna
 - Ny förbättrad analysmetod på Karolinska Universitetssjukhuset, Klinisk Kem

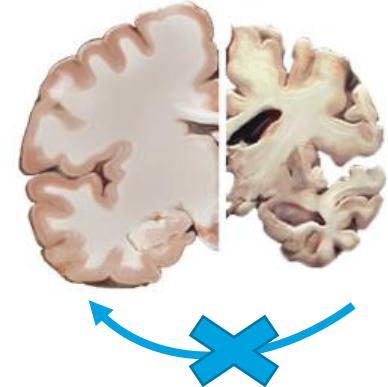
Framtida studier

- Testa analysmetod på 2st Alzheimer cohorter på Karolinska Institutet



Bakgrund: Alzheimer

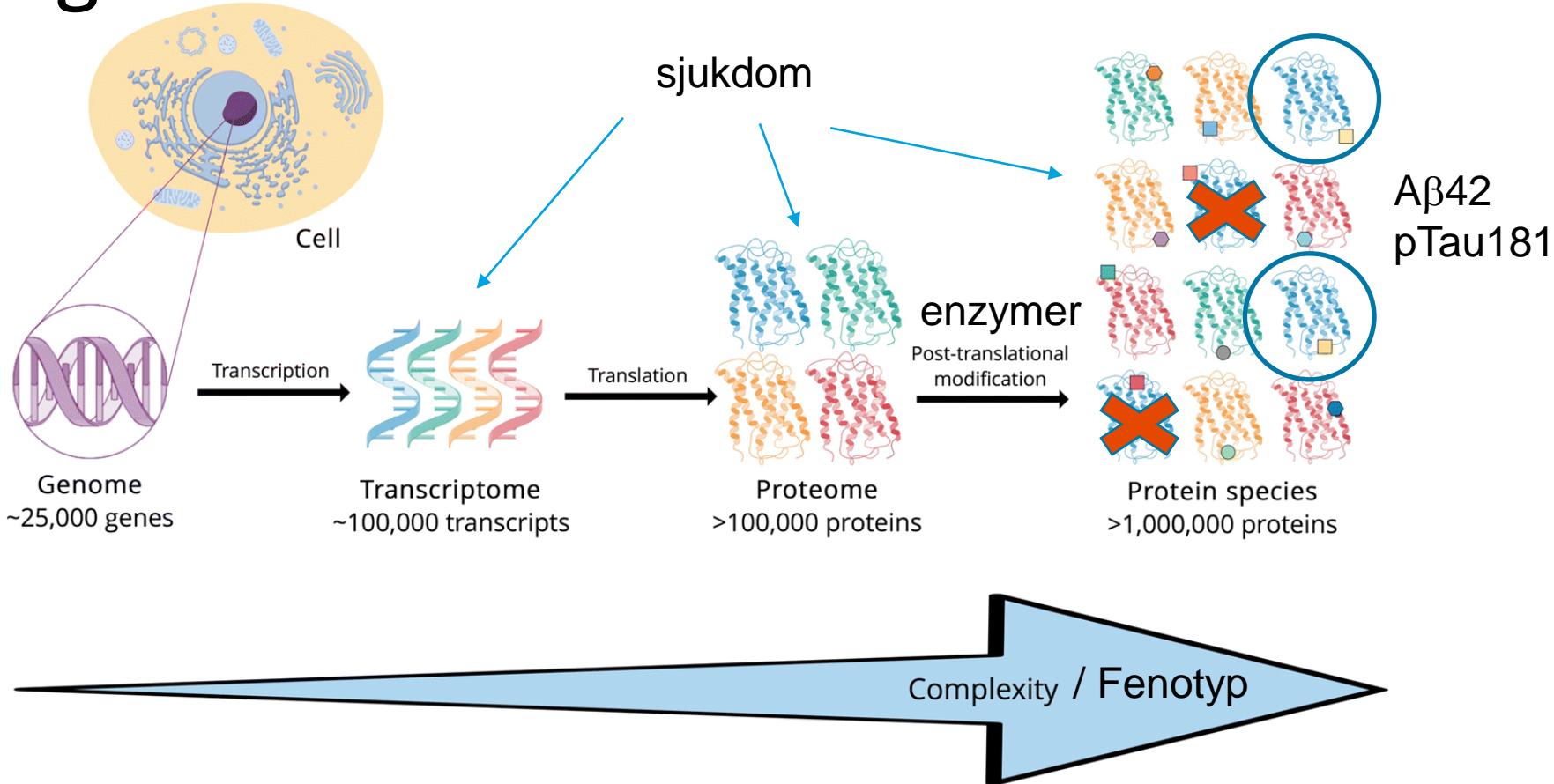
- Först beskriven av Dr Alois Alzheimer 1906
- Nervcellerna dör i hjärnan
- Långsam process som tar årtionden
- Patologiska kännetecken:
 - Amyloida plack, amyloid β-peptid (Aβ)
 - Neurofibrillära nystan (NFT), proteinet Tau
- Finns behov av biomarkörer för tidig diagnos och att följa sjukdom och behandling – allvarlig skada kan inte reverseras



Bakgrund: Alzheimer

- Diagnos:
 - Standardiserat minnestest
 - A β och Tau nivå mäts i cerebrospinalvätska i CSF (som är i direktkontakt med hjärnan)
 - A β inlagring i hjärnan detekteras med PET
- Behandling:
 - Symptomatisk, läkemedel som förstärker signalsystem
 - Antikropp mot A β (ny)
 - Många läkemedelsstudier pågår
- Framtida Diagnos och behandling:
 - A β och Tau i plasma (Karolinska Universitetssjukhuset, Sahlgrenska m fl.) – högkänsliga analysmetoder – 100x lägre koncentration av proteiner i CSF

Bakgrund: Proteomik och PTMs

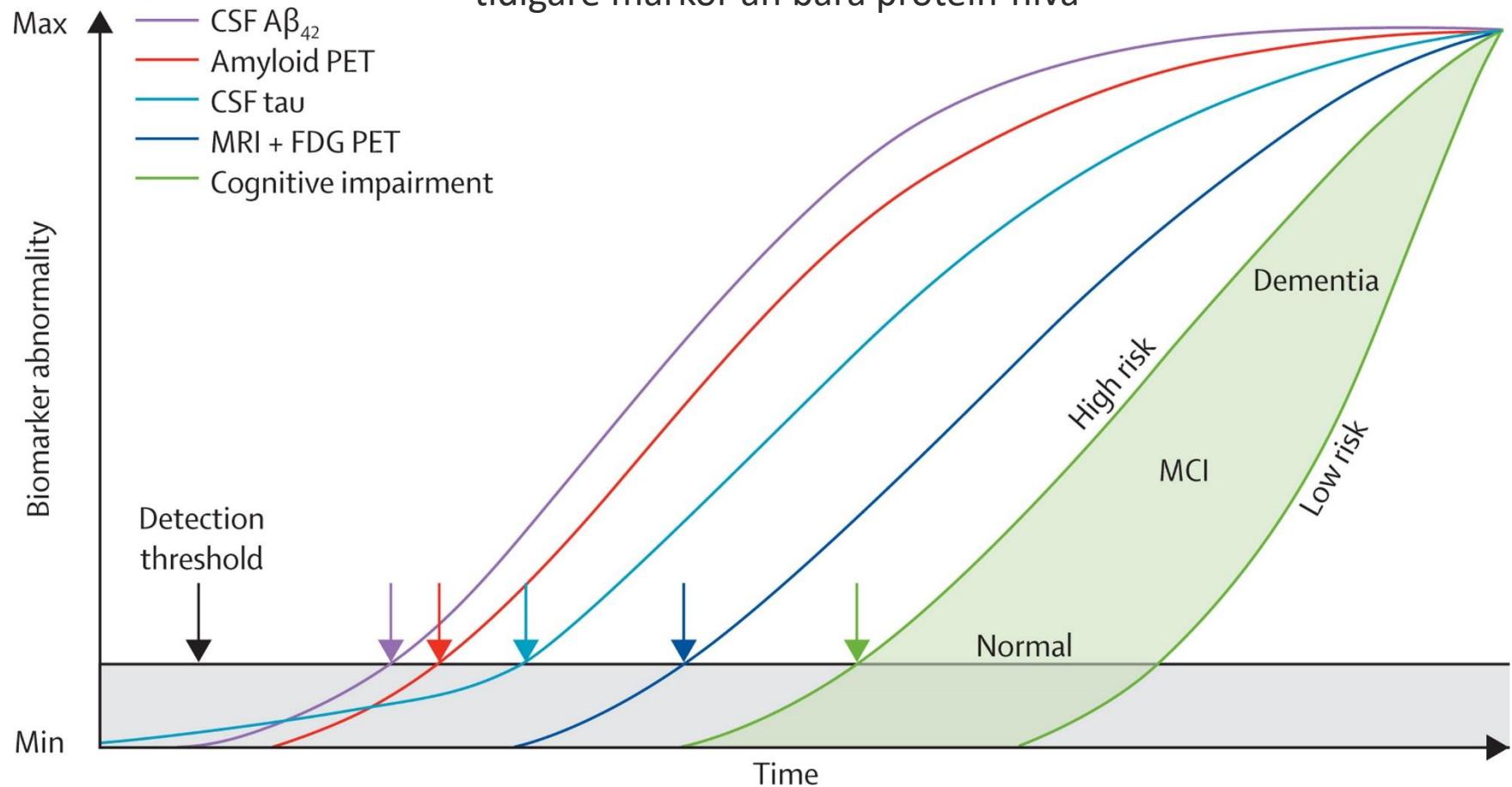


- Post-translationella modifieringar avkodas inte i genomet!
- Varje enskilt protein består av en heterogen population molekyler
- Vad är klinisk relevant nivå av karakterisering?
- Vad är praktiskt möjligt att mäta vid en snabb analys?
- Terapeutiska proteiner

6 Anpassad från Current Trends in the Analysis of Post-translational Modifications, *Chromatographia* volume 83, pages 1–10 (2020)

Model integrating Alzheimer's disease immunohistology and biomarkers

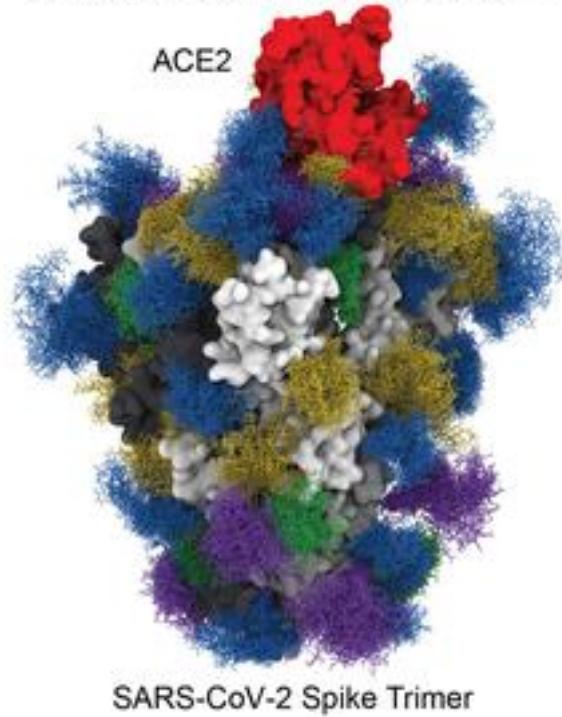
Tes: Glykosylering störs lätt – kan vara en tidigare markör än bara protein-nivå



Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, Shaw LM, Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Lesnick TG, Pankratz VS, Donohue MC, Trojanowski JQ. Lancet Neurol. 2013 Feb;12(2):207-16. PMID: 23332364; PMCID: PMC3622225.

Bakgrund: Proteomik och glykomik

Glycomics-informed glycoproteomics
& molecular dynamics simulations



Kolhydratkedjor (glykosylering)
påverkar proteiners funktion

Glykaners struktur och mängd är
möjligt att studera med
masspektrometri

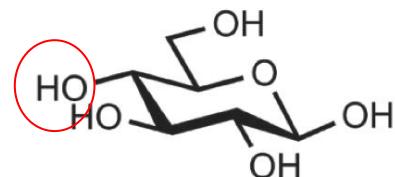
- De flesta proteiner i blodcirkulationen och exponerade på cellytan är glykoproteiner
- Troligen tusentals olika N-glykanstrukturer i människa
- Glykankoden är inte helt avkodad

² Zhao et al., 2020, Cell Host & Microbe 28, 1–16

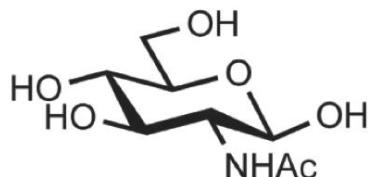


Vårt mål är att hitt nya glykanbaserade biomarkörer för AD

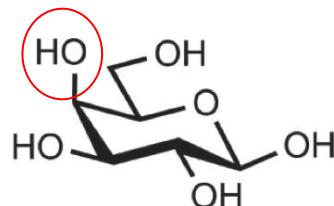
Common monosaccharides found in vertebrates – their similarity makes structural identification challenging



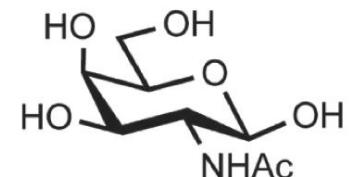
D-Glucose
(Glc)



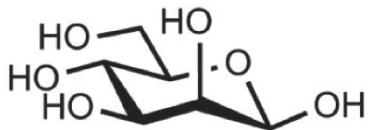
N-Acetyl-D-glucosamine
(GlcNAc)



D-Galactose
(Gal)



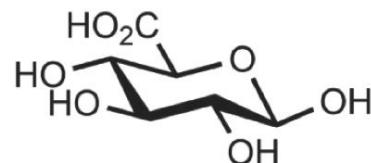
N-Acetyl-D-galactosamine
(GalNAc)



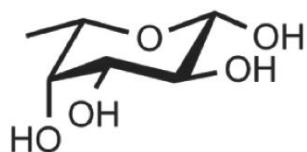
D-Mannose
(Man)



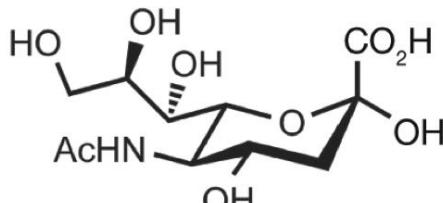
D-Xylose
(Xyl)



D-Glucuronic acid
(GlcA)



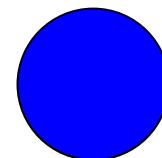
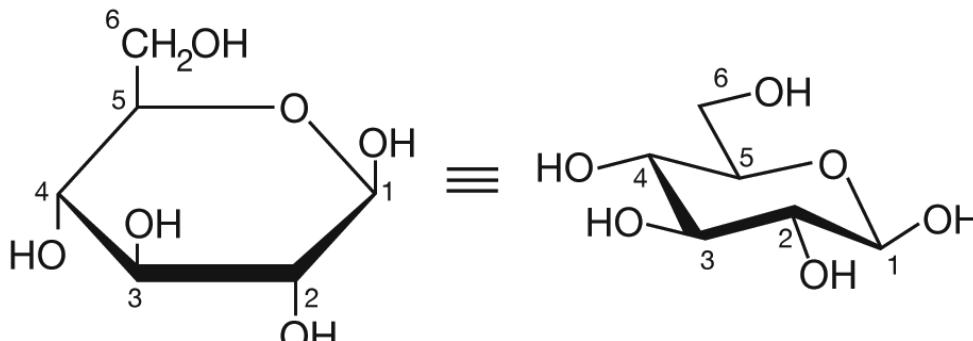
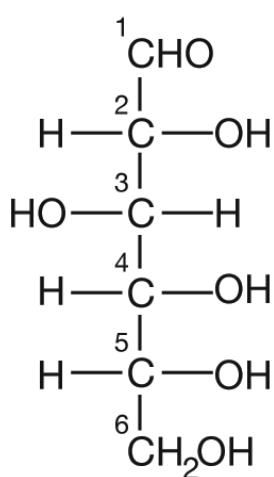
L-Fucose
(Fuc)



N-Acetylneurameric acid
(NeuAc)

Nomenclature- Glycobiology

Monosackarider är de grundläggande byggstenarna i kolhydrater och dessa kan åskådliggöras på flera olika sätt.

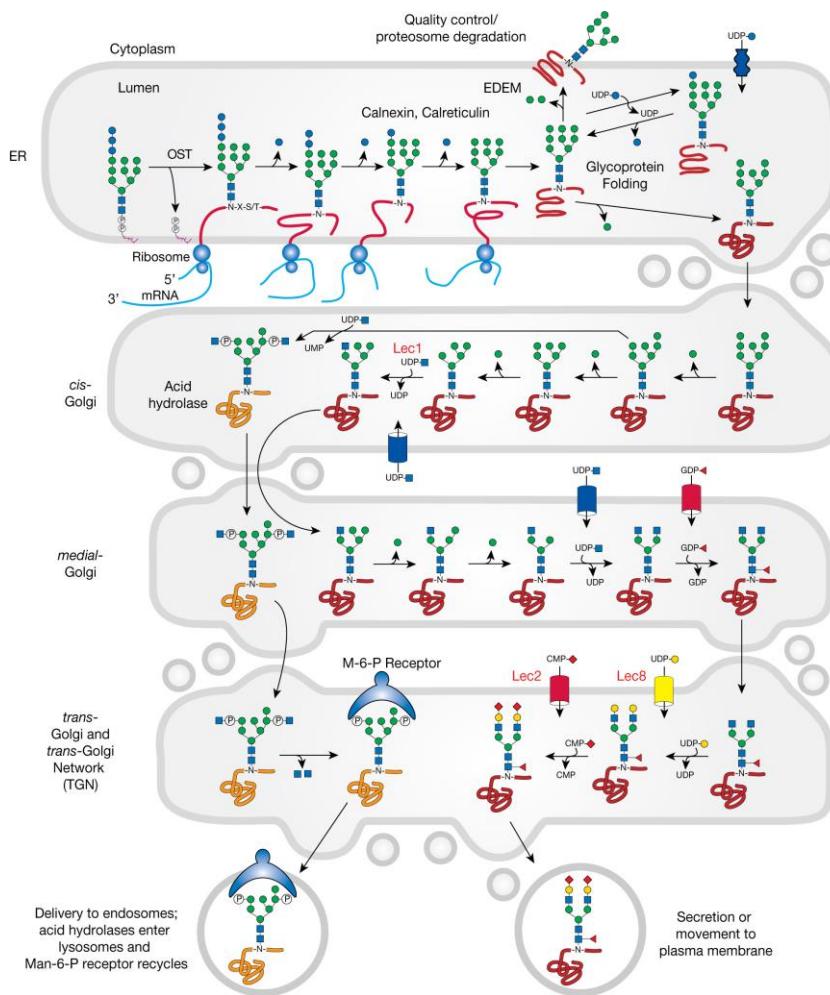


Glc

Open-chain and ring forms of glucose

Processing and Maturation of an N-Glycan

Dekoreringsmönstret är inte direkt avkodad i genomet utan resultatet av en stor mängd enzymer (glykosyltransferaser och glykosidaser)



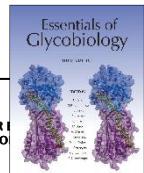
Glycosyltransferase
och glykosidaser



Strukturell
karakterisering med
LC-MS

Chapter 9, Figure 4. Essentials of Glycobiology, Third Edition

Symbol Nomenclature for Glycans (SNFG)



Bakgrund: glykosylering i AD

Flera proteiner som är direkt involverade i AD uppkomst är glykosylerade proteiner

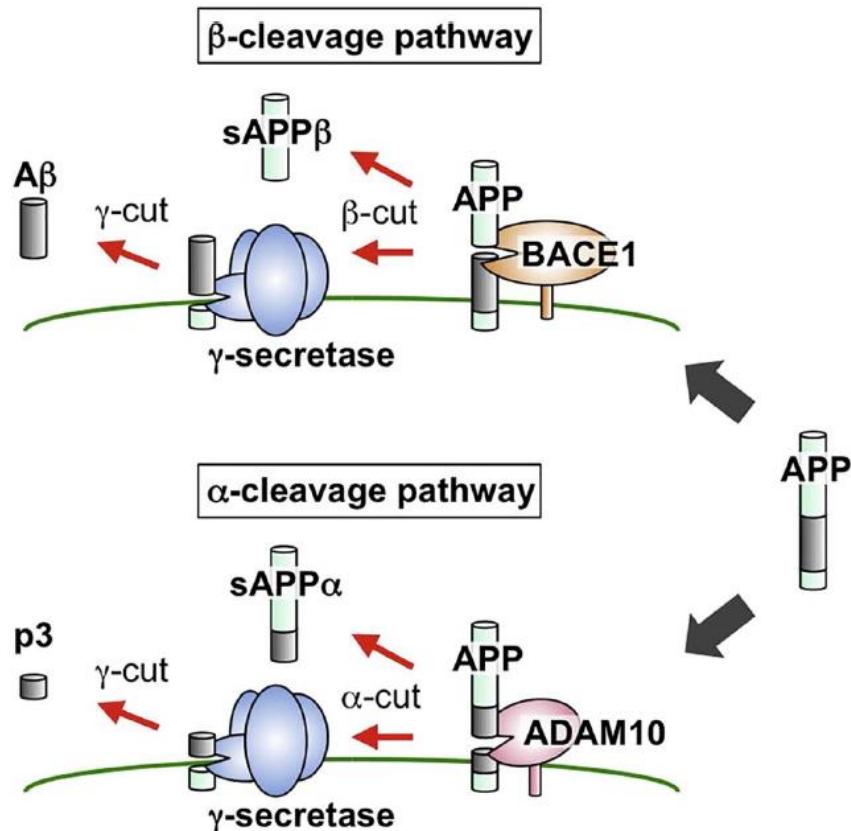


Fig. 1. Two proteolytic pathways of APP are shown. The α -cleavage pathway is dominant, and the β -cleavage pathway produces A β peptide.

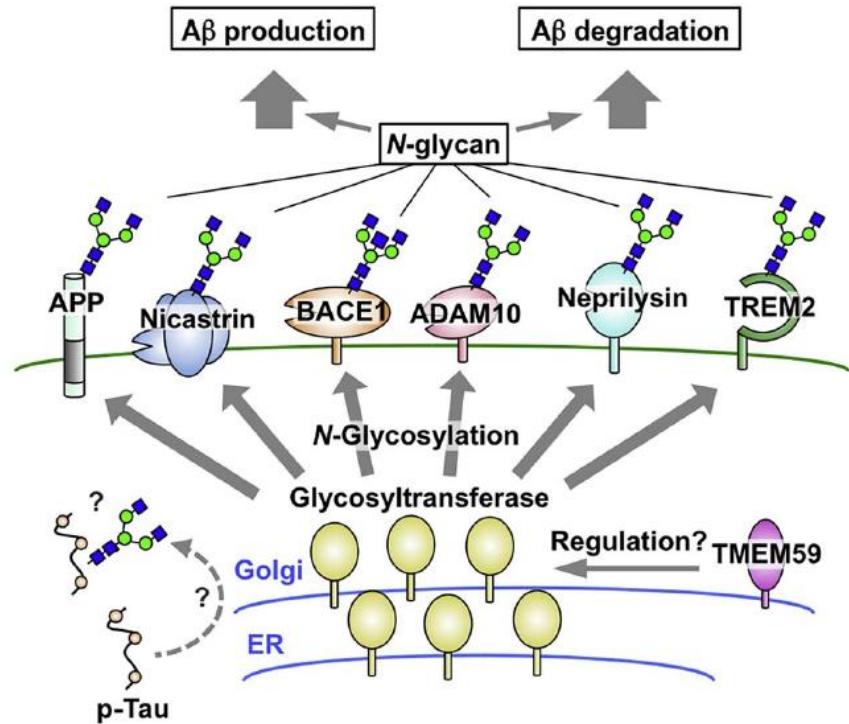
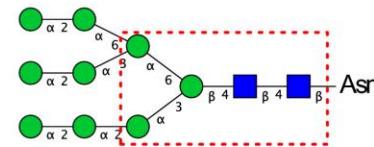


Fig. 2. Key AD-related molecules are all N-glycosylated, including APP, nicastrin, BACE1, ADAM10, neprilysin and TREM2. AD-dependent aberrant N-glycosylation of tau is also suggested. TMEM59 regulates N-glycosylation of these molecules probably by regulating Golgi-resident glycosyl enzymes.

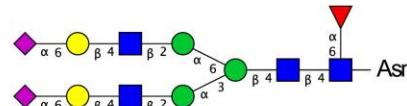
Klasser av N-glykaner

1

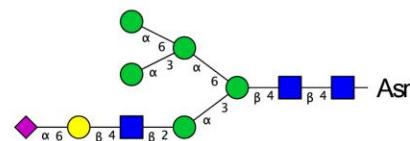
A) Oligomannose



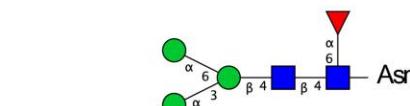
B) Complex



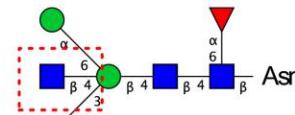
C) Hybrid



D) Paucimannose



E) Bisecting GlcNAc



■ GlcNAc

◆ Sia

● Gal

● Man

▲ Fuc

Verktygslåda att studera glykomet i CSF

- Avvägning mellan high-throughput och tid
(komposition, sekvens och linkage)
- **Masspektrometri (LC-MS)**
 - Isomerer kan separeras med kromatografi
 - MS2 har svårt att skilja isomerer
 - MS2 spektrumtolkning är komplex
- HPLC-UV
- NMR
- Glycan microarrays
- Lectin arrays
- Lectin western blot / chromatography

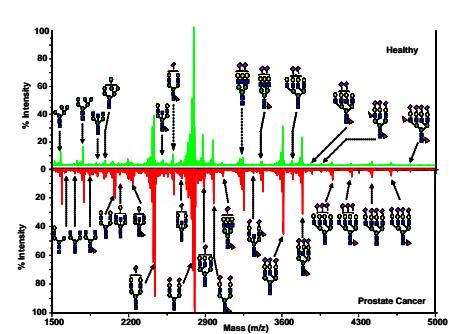




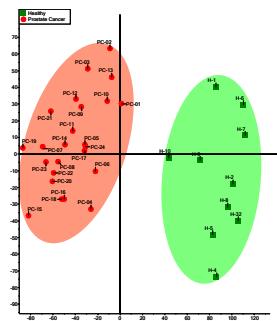
NATIONAL CENTER FOR GLYCOMICS AND GLYCOPROTEOMICS



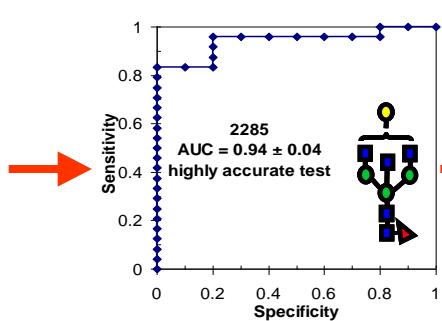
National Center for
Research Resources



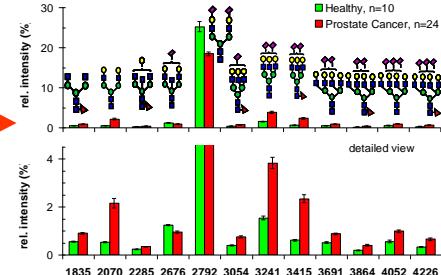
MALDI-MS



PCA



ROC



Potential Glycan
Biomarkers

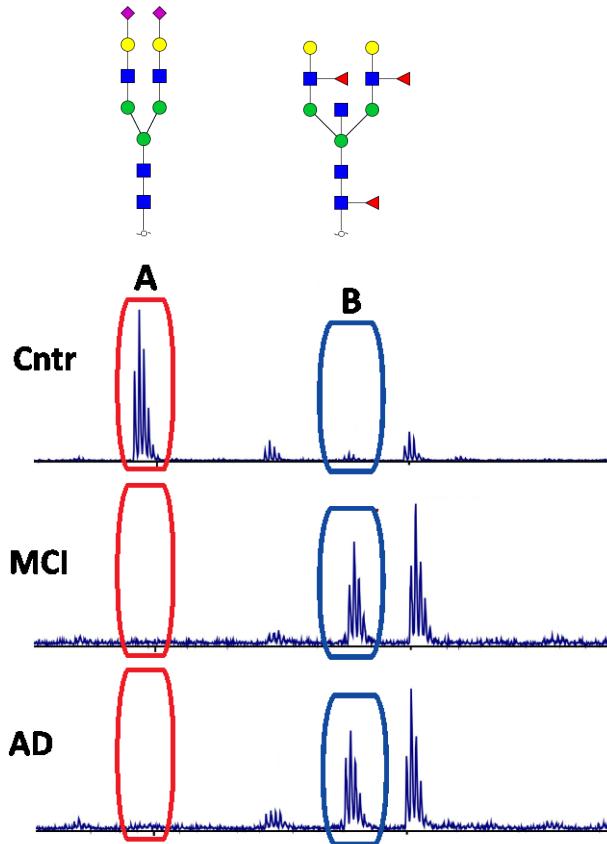
Discovery of potential glycan biomarkers

Prostate cancer diagnostic and prognostic approach based on MALDI-MS glycomic profiling of permethylated N-glycans derived from 10 µl of human blood serum. The approach leads to statistical distinction between the glycomic profiles derived from 10 healthy individuals and 24 prostate cancer patients. Statistical tests such as PCA, ROC and ANOVA are employed to determine prostate cancer potential glycan biomarkers.

Kyselova, Z.; Mechref, Y.; Al Bataineh, M.; Dobrolecki, L.; Hickey, R.; Vinson, J.; Sweeney, C.; Novotny, M.V. *J. Proteome Res.*, 6 (2007) 1822-1832.



N-glycans released from CSF of pooled groups



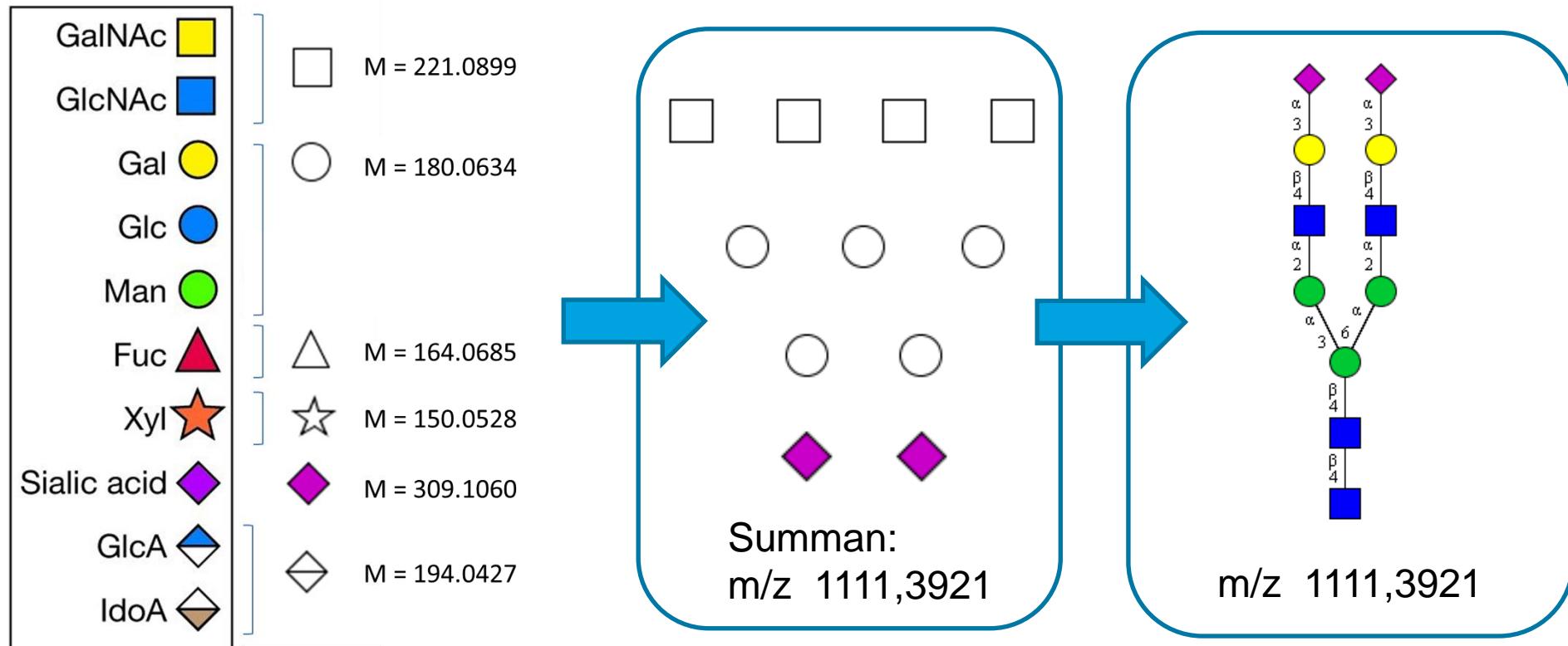
Derivatized glycans analyzed with MALDI MS

16
Schedin-Weiss S, Gaunitz S, Sui P, Chen Q, Haslam SM, Blennow K, Winblad B, Dell A, Tjernberg LO. Glycan biomarkers for Alzheimer disease correlate with T-tau and P-tau in cerebrospinal fluid in subjective cognitive impairment. FEBS J. 2020 Aug;287(15):3221-3234. doi: 10.1111/febs.15197. Epub 2020 Jan 14. PMID: 31889402; PMCID: PMC7496940.

1 september 2022



N-glykaner identifieras med massa, fragmentering och kromatografi med LC-MS



Masspektrometri kan inte särskilja alla monosackarider baserat på massan men med **massan** (m/z) kan sammansättningen av en glykanmolekyl bestämmas.

Med kunskap om **cellbiologi**, **kromatografi** och **fragment** kan glykanstrukturen identifieras. Jämförelse mot en känd standard underlättar men är inte alltid nödvändigt.

Glycoworkbench, free downloadable cross-plattform java based tool for glycan MS-analy

* C...\S2A2 standard annotated RT30.gwp - GlycoWorkbench

Home Edit View Structure Tools

Workspace

Workspace - C...\S2A2 standard annotated RT30.gwp

- RT 26.0 [precursor m/z= 1112,000]
 - Structures*
 - Fragments
 - Spectra
 - PeakList
 - Annotated PeakList
 - Notes
 - Annotation report
- Scan
- Scan
- Scan

m/z: 1112,3988 [MONO,Und,2H,0,freeEnd]

Linkage Chirality Ring
2nd bond

PeakList, MS

Intensity

m/z ratio

PeakList Fragments Annotation Search Profiler

Stats Details Summary Calibration

Mass to charge	Intensity	Relative intensity	
366,0000	18879,0000	58,4127	
454,1000	596,0000	1,8441	
470,0000	114,0000	0,3527	
528,1000	2395,0000	7,4103	
587,2000	118,0000	0,3651	
638,9000	627,0000	1,9400	
657,1000	32320,0000	100,0000	
690,1000	2281,0000	7,0575	

Intensity

m/z ratio

Ms

File Edit View Structure Tools

Save As Open Recent Find Replace Undo Redo

Print Preview

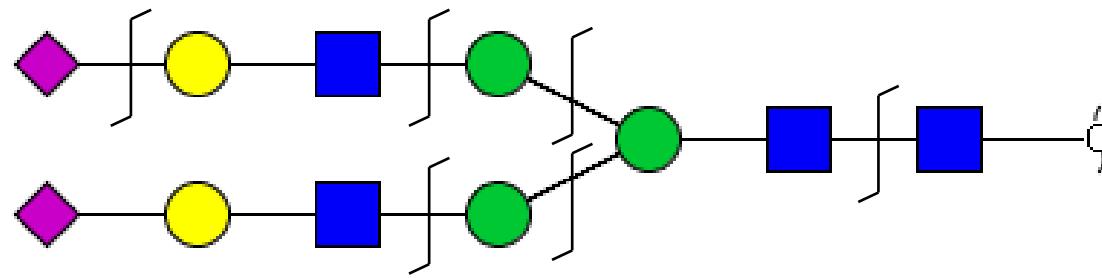
Annotations

Search

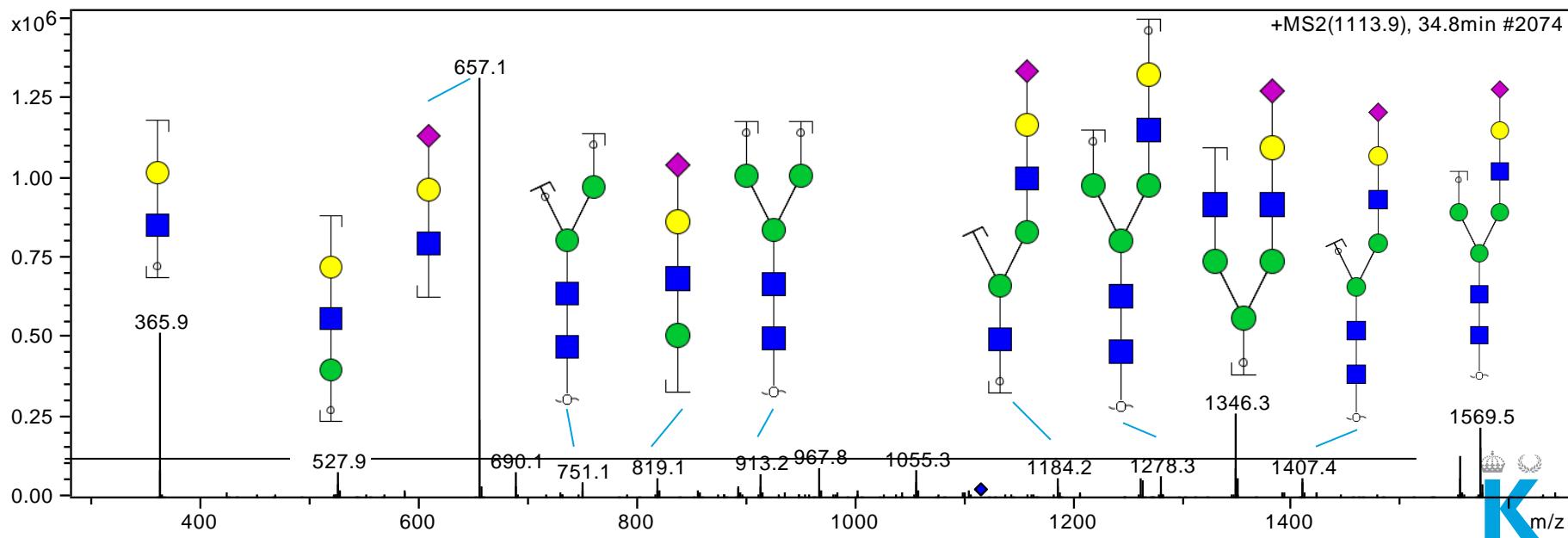
Help

K

Interpretation of MS/MS fragments is used to determine the sequence and the tentative structure



MS spectrum RT 34.8 min



LC-MS analys av frisatta glykaner på en liten cohort (n=9) visar på stora skillnader mellan kontroller och AD i CSF

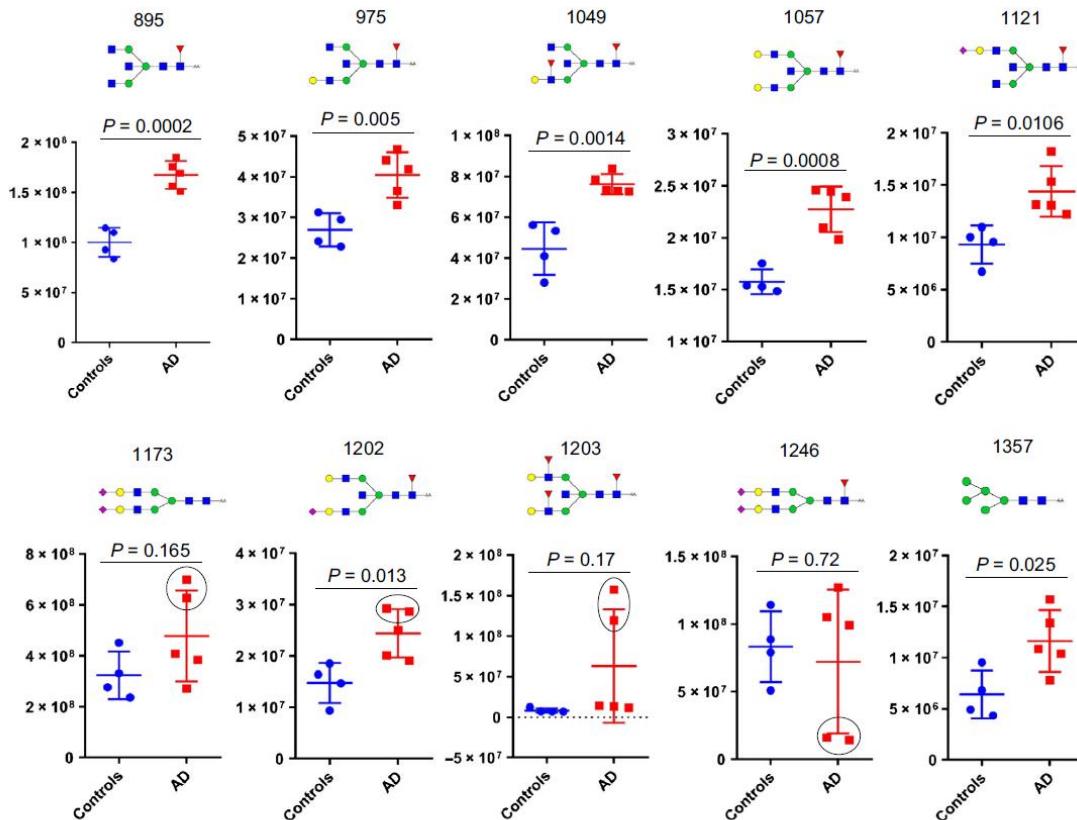


Fig. 5. Nanospray LC-MS/MS of 2-AA-labeled N-glycans. Total area from extracted base peak chromatograms of the ten most abundant N-glycans was plotted for four control and five AD samples from the Clinical Neurochemistry Laboratory. Lines represent mean values \pm SD. The significance between the groups was calculated using two-tailed unpaired Student's *t*-test. The m/z value and the cartoon glycan structure are displayed above each graph. Not that two of the AD samples differed from other AD samples for the peaks at m/z 1173, 1202.5, 1203, and 1246 (marked with a black circle).

Viktiga överväganden

- Begränsad provmängd av CSF
- Låg koncentration av proteiner I CSF (1/100 plasma)
- Känslighet på LC-MS påverkas av kolonn-storlek och jonkälla:
 - Normal flow, 2mm ID kolonn, 0,4ml/min
 - **Mikro flow, 1mm ID kolonn, 50µl/minn - vårt val**
 - Nano flow (75µm ID kolonn, nl/min
- Nanosystem har ofta lägre tillförlitlighet/stabilitet och smutsar ner MS systemet snabbt
- Hur många N-glykaner behöver detekteras – 10-200st, tidsåtgång och komplexitet – **ca 50st strukturer vårt val**
- Hur viktig är exakt identifiering (komposition (massa), sekvens (MS2), struktur (LC-MS2+derivatisering) - **vårt val:** isomerisk separation av **nativa reducerade** glykaner med **grafitkolonn, MS2 fragmentering** för identifiering (ingen derivatisering för att öka MS signal eller linkage specifik inmärkning)
- Ej alltför giftiga kemikalier



LC-MS N-glykanprofilerering, 1 dags protokoll



1. N-glykan frisättning:

CSF/serum (90µl/5µl) denatureras med Rapigest + enzymatisk klyvning 37°C ÖN

2, N-glykan proteinseparation och avsaltning:

Kol solid-phase extraction (SPE) platta på Hamilton robot

3. Reducering

Ammonium Borohydride. Indunsta med ren tryckluft

4. LC-MS analys av nativa socker:

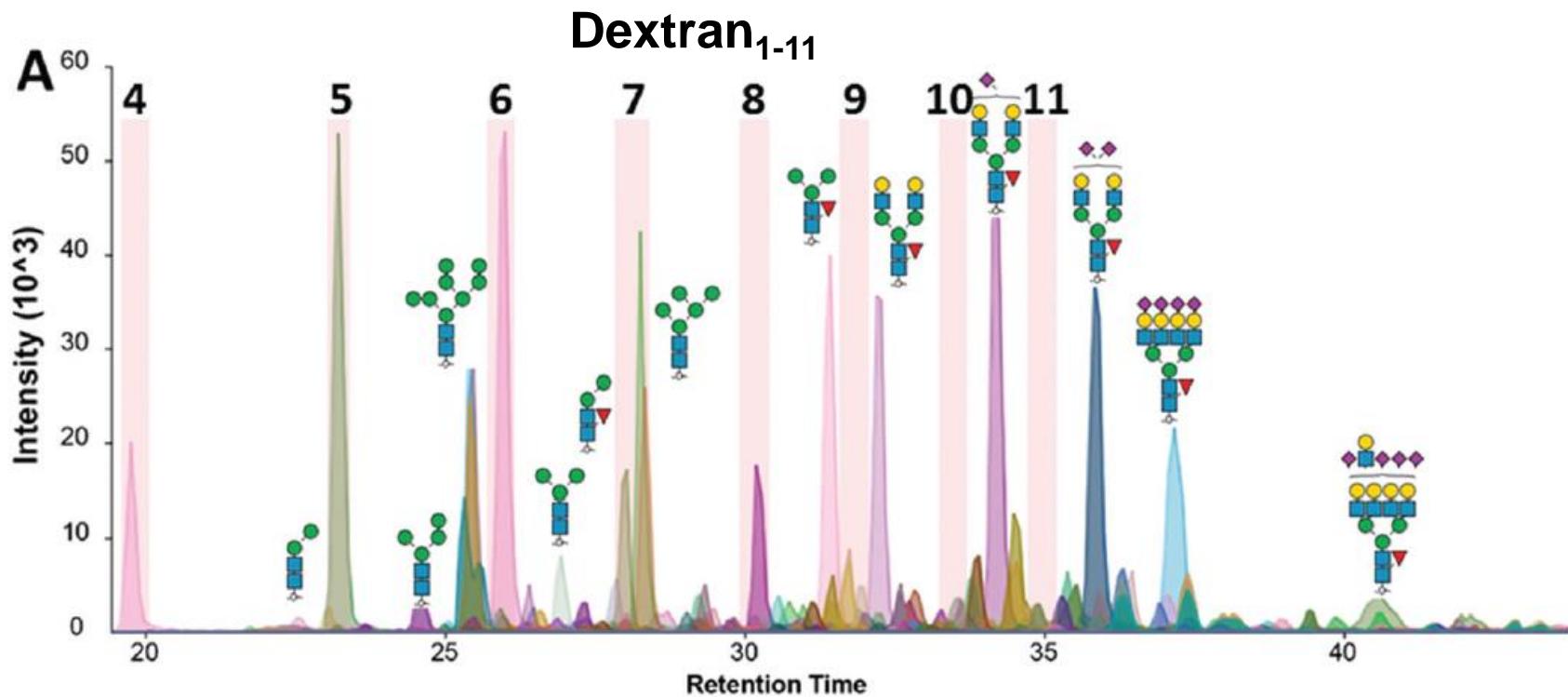
Porous graphitized carbon (PGC) kromatografi med högupplöst MS detektion. Avsaltning med trapkolonn.



5. Dag 2; Data analys:

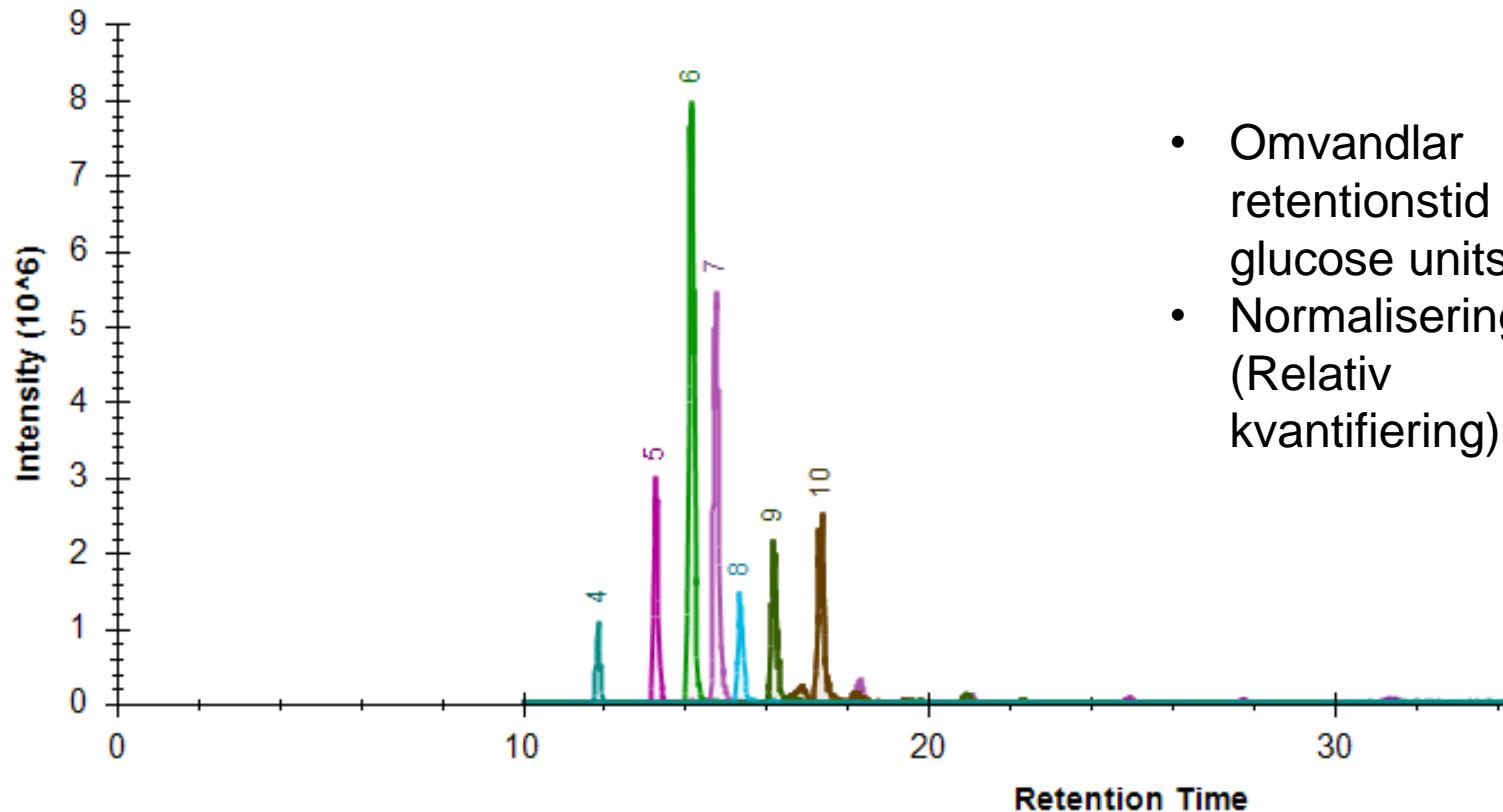
Identifiering och kvantifiering

En förutsättning för automatiskt identifiering av strukturer (Skyline) är god reproducerbarhet. Dextran internstandard underlättar normalisering (retentionstid och topparea)

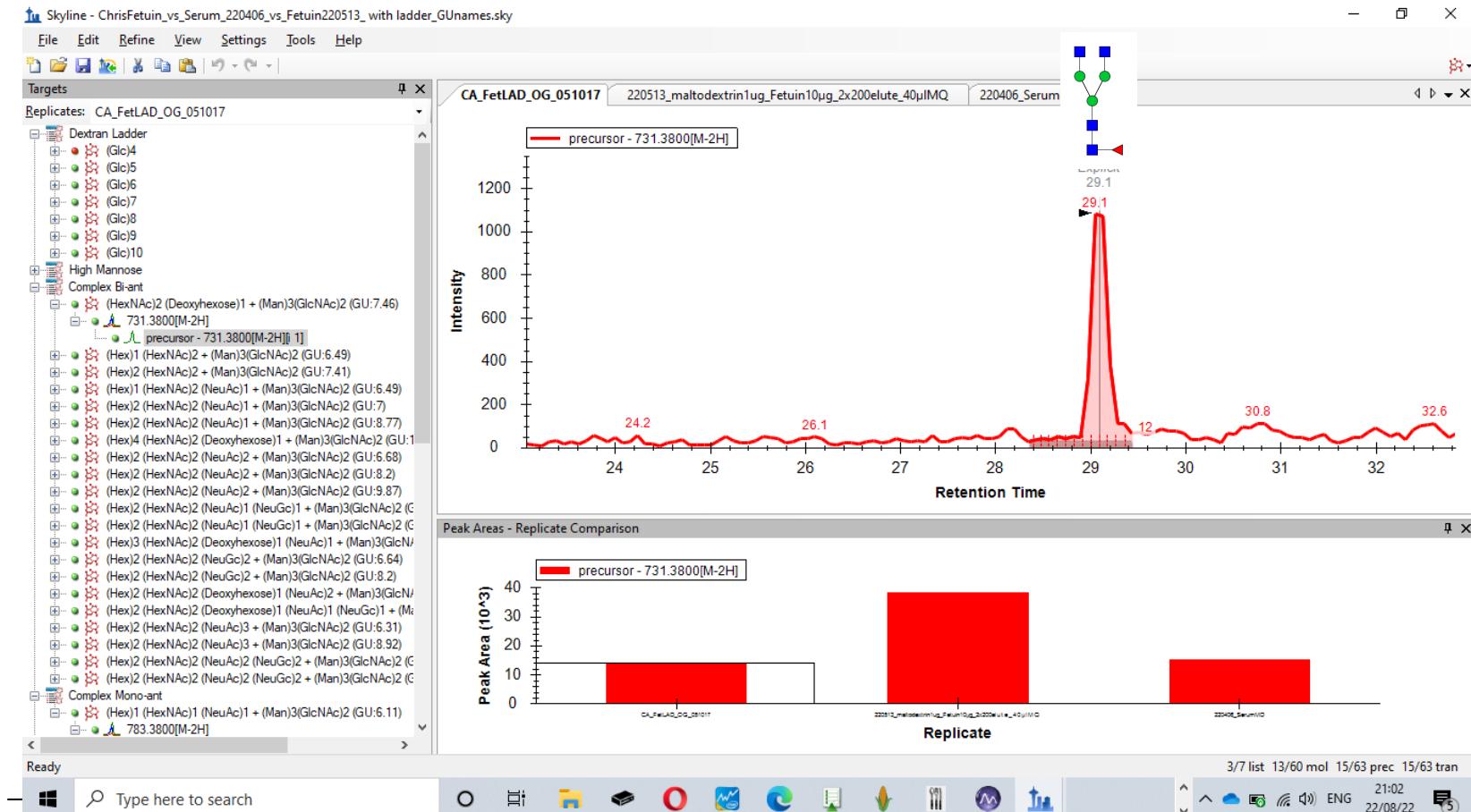
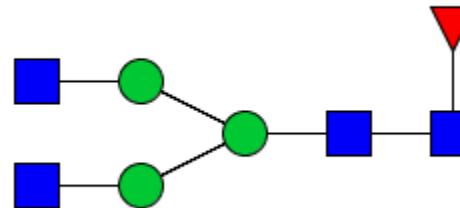


23 Ashwood, C. et al. (2019) 'Standardization of PGC-LC-MS-based glycomics for sample specific glycotyping.', *The Analyst*, 144(11), pp. 3601–3612. doi: 10.1039/c9an00486f.

Maltodextrin Glc-ladder

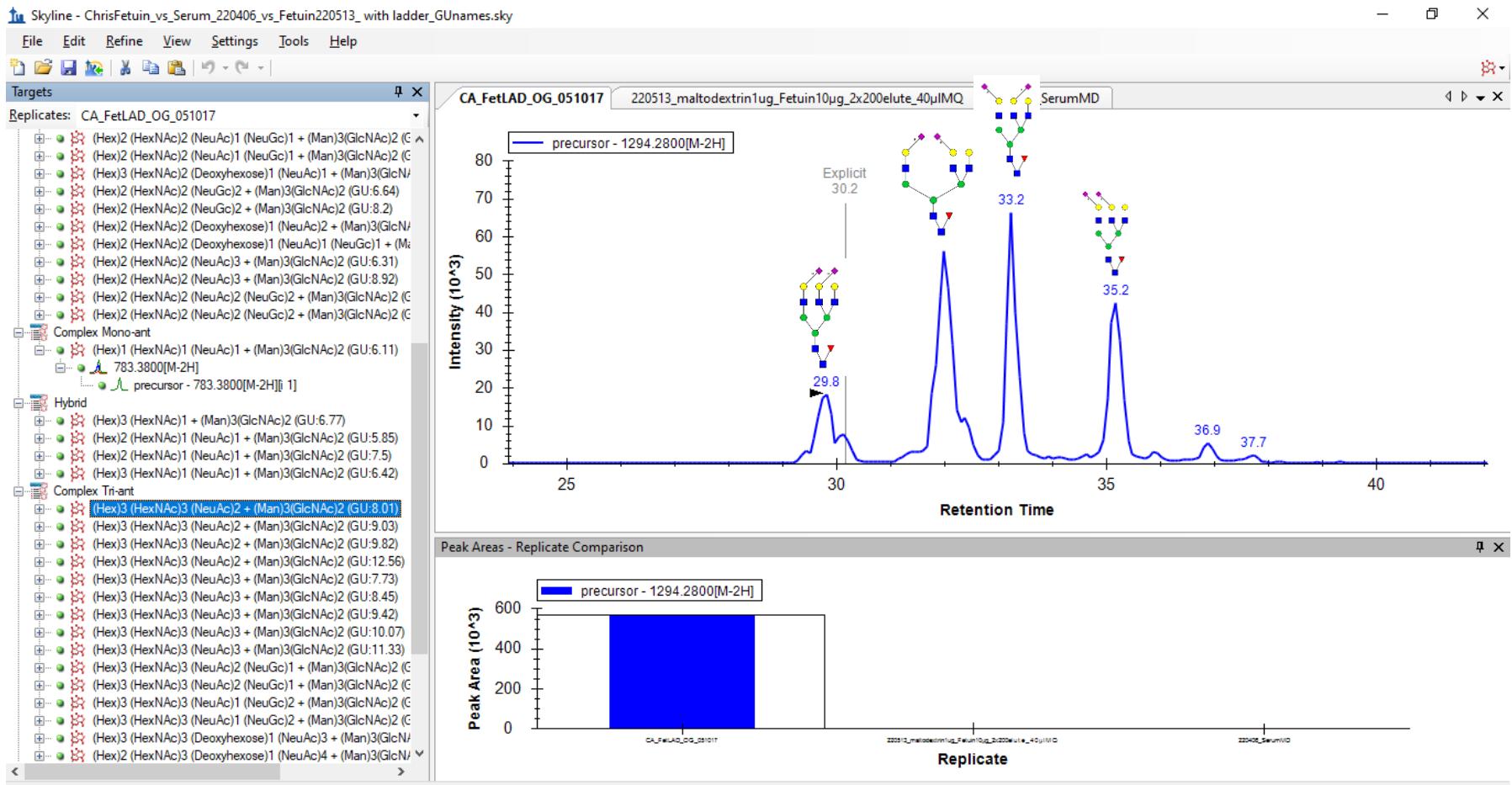
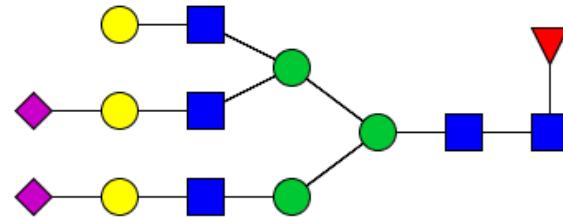


m/z 731, GU 6,11

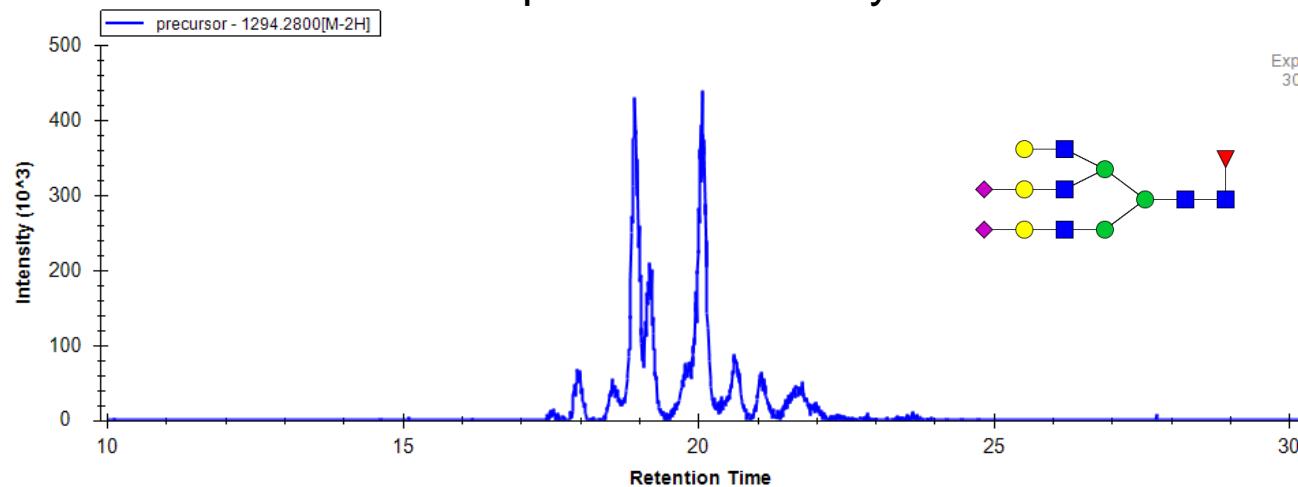


m/z 1294.28

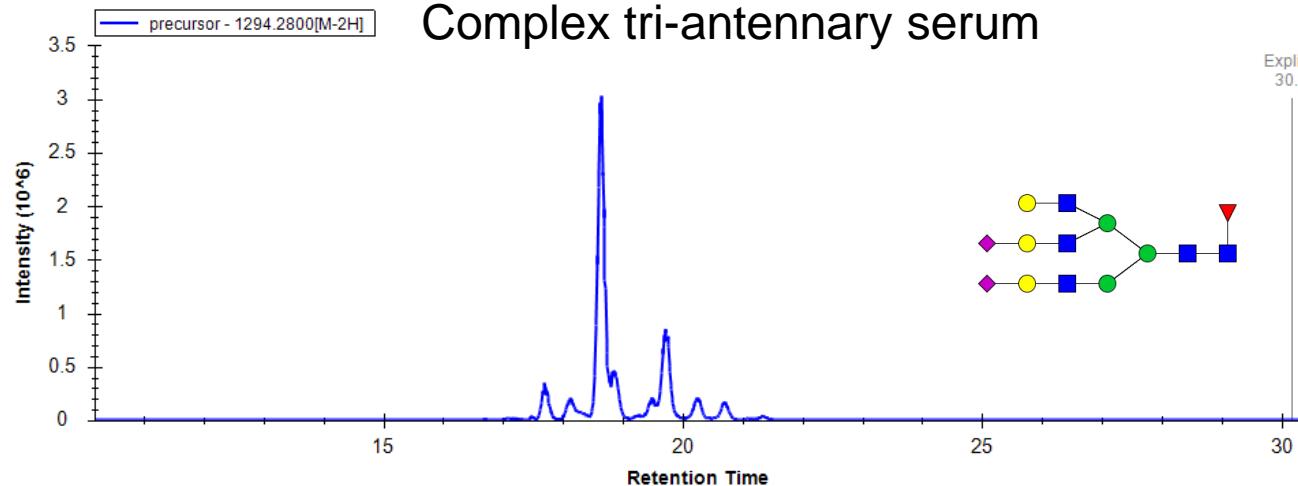
GU 8.01 / 9.03 / 9.82 / 12.56 /



Complex tri-antennary CSF



Complex tri-antennary serum



Hjärnans N-glykosylering vs CSF glykosylering

- Hjärna:
 - hög andel fukosylering, låg andel sialinsyra, hög andel high mannose
- CSF:
 - liknande N-glykaner som hjärna men mer sialinsyra – möjligen härsammande från proteiner i blodet
 - Terminal GlcNAc, bisecting GlcNAc,
 - Färre proteiner än blod (1/100), lägre dynamik
 - Färre proteiner är glykosylerade

Gaunitz S, Tjernberg LO, Schedin-Weiss S. The N-glycan profile in cortex and hippocampus is altered in Alzheimer disease. J Neurochem. 2021 Oct;159(2):292-304. doi: 10.1111/jnc.15202. Epub 2020 Oct 24. PMID: 32986846; PMCID: PMC8596851.

Schedin-Weiss S, Gaunitz S, Sui P, Chen Q, Haslam SM, Blennow K, Winblad B, Dell A, Tjernberg LO. Glycan biomarkers for Alzheimer disease correlate with T-tau and P-tau in cerebrospinal fluid in subjective cognitive impairment. FEBS J. 2020 Aug;287(15):3221-3234. doi: 10.1111/febs.15197. Epub 2020 Jan 14. PMID: 31889402; PMCID: PMC7496940.



Framtida försök

- Validera metoden med semi-automatisk identifiering och kvantifiering av MS-toppar
 - Unika CSF glykaner – inte så troligt
 - unika CSF glykanmönster i MCI och AD
 - Kvoter av glykaner i MCI och AD
- Ca 90 prover i 2st olika cohorter med olika grader av demens och Alzheimer
 - Enzyme-linked lectin assay (ELLA), Lars Tjernberg grupp KI



Tack till:

- FoU-light bidrag för 2020 och 2021
- Britt Lundin, BMA, Klinisk kemi, Kromatografi
- Anna Lindahl och Leila Zamani, sjukhuskemister, Klinisk kemi, Kromatografi (tidigare jobbat i projektet)
- Lars Tjernberg, sektionschef Klinisk kemi, Kromatografi
- Sophia Schedin-Weiss, Karolinska Institutet, NVS, Neurogeriatrik
- Alla kollegor på Klinisk Kemi, sektion Kromatografi!