

Glikokonjugati kao modeli u biomedicinskim istraživanjima

KUI 04/2004
Prispjelo 25. rujna 2002.
Prihvaćeno 4. ožujka 2003.

I. Jerić* i Š. Horvat

Institut "Ruđer Bošković", P. P. 180, 10002 Zagreb

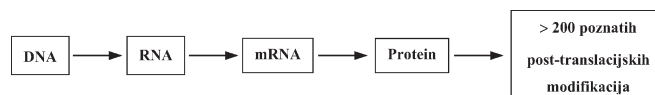
Projekt ljudskog genoma gurnuo je proteine i njihove konjugate na prvu liniju biomedicinskih istraživanja. U biološkim procesima, glikoproteini, kao derivati proteina i šećera, imaju presudnu ulogu u međustaničnom prijenosu informacija, interakciji stanice s okolinom i reguliranju rasta stanica. Glikokonjugati s esterskim tipom veze između peptida i šećerne molekule pokazali su se kao pogodni modelni spojevi za izučavanje vrlo važne skupine reakcija između ugljikohidrata i proteina, koje se odvijaju u svakom živom organizmu. U ovom radu dan je prikaz opsežnih istraživanja koja su uključivala kemijsku sintezu, NMR spektroskopiju i spektrometriju mase. Opisana je sinteza modelnih glikopeptidnih estera te studija njihove reaktivnosti u uvjetima koji pogoduju intramolekularnoj ciklizaciji. NMR spektroskopska analiza i molekularno modeliranje otkrili su neke zanimljive konformacijske značajke izoliranih cikličkih šećer-peptid adukata. Nadalje, u masenoj spektrometrijskoj analizi priređeni glikokonjugati iskorišteni su kao mala biblioteka spojeva za traženje fragmentnih iona karakterističnih za određeni tip glikoproteinske strukture.

Ključne riječi: *Glikopeptidni esteri, Maillard, NMR spektroskopija, molekularno modeliranje, spektrometrija mase*

Uvod

Projekt ljudskog genoma (HGP; *human genome project*) uveo nas je u 21. stoljeće i dao novu nadu u borbi protiv niza poremećaja i bolesti koje ugrožavaju ljudski život. Međutim, s vremenom je postalo jasno da su organizmi daleko složeniji nego što bi se moglo zaključiti na temelju genoma i da razlog tome treba ponajprije tražiti u strukturi proteina. Proteini su glavni funkcionalni proizvod stanice (shema 1) i može se očekivati da upravo oni sadrže relevantnije podatke o promatranom biološkom procesu. Bolest, stres ili starenje multigenetski su procesi i jednostavan uvid u slijed baza RNA ne može dati informacije o promjenama u biološkom sustavu koje su ih izazvale. Također, mnogi faktori, kao što su pH, hipoksija i uzimanje lijekova utječu na ekspresiju gena. Nadalje, proteini podliježu nizu post-translacijskih modifikacija koje nisu zapisane u RNA, a koje definiraju protein u strukturnom i funkcionalnom smislu. Stoga se težište istraživanja u biomedicinskim znanostima pomiče u smjeru **genomics** → **proteomics**.^{1,2} Proteomika ima cilj identificirati i karakterizirati sve proteine koji se sintetiziraju u promatranom organizmu, uključujući i njihovo djelovanje u fiziološkim i patofiziološkim procesima. Dovoljno je samo pomisliti na epidemiju AIDS-a, tuberkuloze i malarije ili na kronične bolesti kao što su Alzheimerova bolest ili multipla skleroza da se dobije uvid u opsežnost posla koji tek predstoji. Kako sada stvari stoje, to je daleko veći izazov nego što je to bio HGP prije deset godina. Interesantno je u ovom kontekstu prisjetiti se preporuke koju je prije tridesetak godina izrekao poznati molekularni biolog *Matthew Melselson* s Harvard University:

"Proučavajte nukleinske kiseline, nemojte ponoviti Paulinovu pogrešku! Proteini su suviše složeni; to je prevelik izazov!"² Međutim, upravo se proteini nameću kao najveći znanstveni izazov na početku novog tisućljeća.



Shema 1 – Prijenos genetske informacije s DNA na proteine
Scheme 1 – Genetic information transfer from DNA to proteins

Rezultati i diskusija

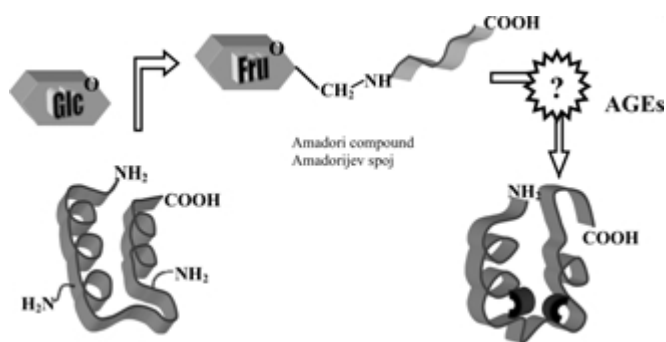
Glikokonjugati u biološkim sustavima

Spojevi koji strukturno objedinjuju proteine i ugljikohidrate čine jednu od najvažnijih skupina biomakromolekula. Glikoproteini obavljaju niz važnih funkcija tijekom međustaničnog prepoznavanja, interakcije između stanice i okoline te reguliranja rasta stanice.³ Također, sudjeluju u interakciji s enzimima, hormonima, bakterijama i virusima. Glikokonjugati su oduvijek bili svojevrsan izvor frustracije u životu kemičara i biologa. Zbog postojanja ugljikohidratne molekule glikokonjugati nisu pod izravnom genetskom kontrolom, a njihova heterogenost onemogućava uobičajeni pristup u biološkim istraživanjima. S druge strane, glikokonjugati su za kemičare izuzetno zahtjevan sintetski cilj, jer objedinjuju svu složenost oligosaharidne kemije, uključujući uporabu mnoštva zaštitnih skupina, mala iskorištenja u kondenzacijskim reakcijama i složene procese izolacije i karakterizacije. Međutim, činjenica da upravo ugljikohidratni dio molekule određuje konformaciju pepti-

*Autor za komunikaciju: Dr. sc. Ivanka Jerić; Institut "Ruđer Bošković"; P. P. 180, Zagreb; tel. 45 60 998; fax 46 80 195; e-mail: ijeric@rudjer.irb.hr

da ili proteina, inter- i intrastanični transport, vezanje na receptore i međustanični prijenos informacija, uvijek je prisutan motiv u biokemijskim istraživanjima. Istodobno, utrošeno vrijeme u istraživanjima nije zanemariv čimbenik. Poznavanje složenih procesa na molekularnoj razini, strukture molekula koje su u njega uključene i njihov međusobni odnos preduvjeti su za uspješnu intervenciju u slučaju bolesti, dakle za razvoj odgovarajućih terapeutika. Stoga u procesu razumijevanja tih bioloških procesa veliku važnost imaju modelni sustavi, kao što su glikopeptidni mimetici i neoglikokonjugati. Glikopeptidni mimetici su spojevi koji oponašaju funkcije prirodnih glikopeptida ili glikoproteina, a njihova struktura ne mora nužno biti glikopeptidne prirode. Neoglikokonjugati su nasuprot tome peptidi ili proteini koji nisu glikozilirani u prirodi, već se kemijski modificiraju ugljikohidratnim molekulama. Prednost takvih modela je prije svega dobra strukturna definiranoost, za razliku od biomolekula koje se odlikuju heterogenošću u strukturi i konformaciji.

U biološkim sustavima nailazimo na niz procesa od fundamentalnog značenja u kojima sudjeluju glikokonjugati s esterskim tipom veze između aminokiselinskog ostatka i molekule monosaharida. Tako su esteri aminokiselina i ugljikohidrata ključni međuprodukti u procesu djelovanja β -glikozidaza,⁴ aktivirani su prekursori u sintezi proteina,⁵ a u bakterijskom svijetu esterifikacija je čest mehanizam prilagodbe različitim okruženjima.⁶ Istraživanja u Laboratoriju za kemiju ugljikohidrata, peptida i glikopeptida Instituta "Ruđer Bošković" pokazala su da glikokonjugati s esterskim tipom veze mogu biti pogodni modeli za izučavanje složenih reakcija koje se odvijaju između peptida i ugljikohidrata, a poznate su pod zajedničkim imenom Maillardova reakcija. Naime, slobodne amino skupine aminokiselina, peptida ili proteina mogu reagirati neenzimski s reducirajućim šećerima, npr. aldozama, dajući nestabilne Schiffove baze, koje Amadorijevim pregrađivanjem daju derivat ketoze, poznate i kao Amadorijevi spojevi, shema 2. U fiziološkim uvjetima nastali Amadorijevi spojevi podliježu nizu složenih i ne potpuno razjašnjenih reakcija dajući tzv. AGE produkte (AGEs; *advanced glycation end products*), nestabilne specije koje reakcijom s proteinima stvaraju kovalentna umreženja, shema 2.⁷ Glikacija proteina koja se odvija *in vivo* interferira s nizom bioloških procesa. Kovalentni adukti na proteinu mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva, konformaciju, a time i funkciju proteina. Stupanj glikacije ovisi poglavito o vremenu poluživota proteina i

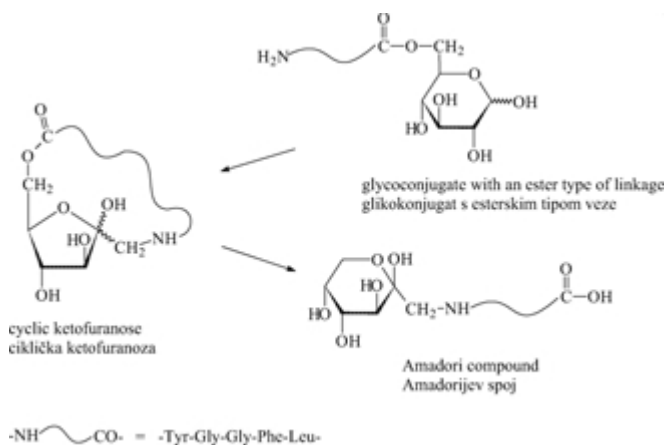


Shema 2 – Maillardova reakcija između proteina i reducirajućih šećera

Scheme 2 – Maillard reaction between proteins and reducing sugars

koncentraciji slobodne glukoze u organizmu, pa time pridonosi nizu poteškoća koje su povezane s procesom starenja, bolestima krvožilnog sustava i posebno dijabetesa.^{8,9} Također, vjeruje se da je umreženje proteina jedan od čimbenika uključenih u razvoj Alzheimerove bolesti.¹⁰ Važno je naglasiti da do glikacije dolazi i tijekom termičke obrade i skladištenja namirnica, pri čemu nastaju spojevi koji pridonose organoleptičkim značajkama hrane, spojevi s antioksidativnim ili antibiotskim djelovanjem, ali također i spojevi s mutagenim i kancerogenim djelovanjem.

Istraživanja u našem Laboratoriju pokazala su da glikokonjugati leucin-enkefalina s esterskim tipom veze u uvjetima kiselo-bazne katalize podliježu intramolekulskom Amadorijevom pregrađivanju dajući cikličke ketofuranoze iz kojih je moguće hidrolizom esterske veze dobiti odgovarajuće Amadorijeve spojeve, shema 3.¹¹ Pitanja koja se nameću su da li je opisana reakcija karakteristika promatranog peptida ili se može razmatrati i za druge peptide te da li i na koji način ovisi o duljini i strukturi peptidnog dijela molekule. Da bismo došli do odgovora na ova pitanja poduzeta su opsežna istraživanja koja su uključivala sintezu odgovarajućih modelnih estera, studij intramolekulske reakcije, konformacijsku analizu dobivenih produkata i masenu spektrometrijsku analizu niza pogodnih spojeva.



Shema 3 – Intramolekulsko Amadorijevo pregrađivanje glikokonjugata s esterskim tipom veze

Scheme 3 – Intramolecular Amadori rearrangement of glycoconjugates with an ester type of linkage

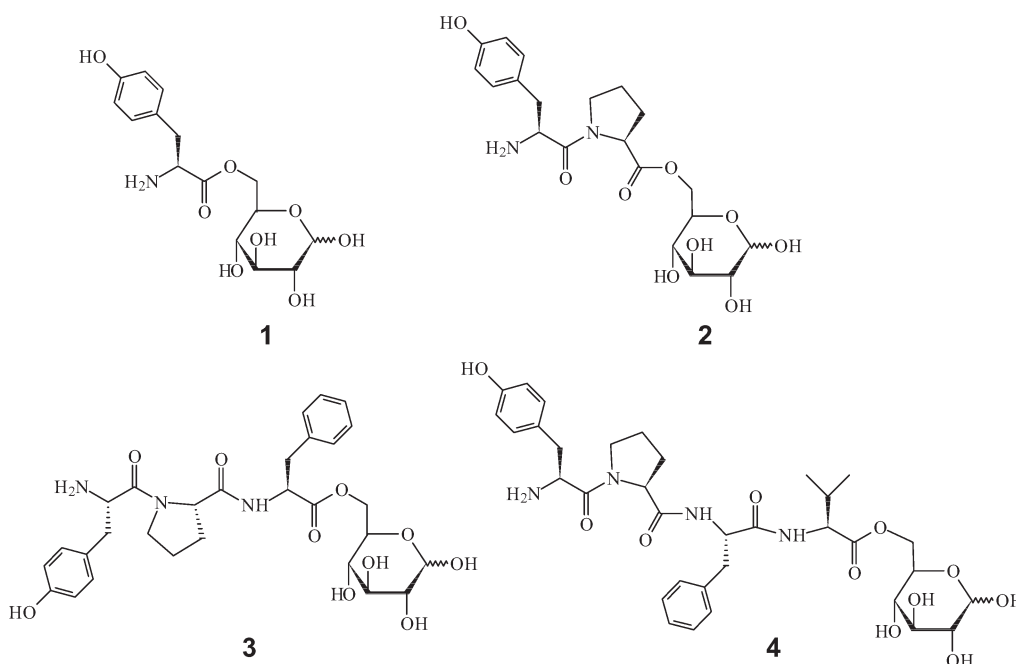
Sinteza i reaktivnost modelnih glikopeptidnih estera

Da bismo odredili utjecaj duljine i strukture peptidnog dijela molekule na reaktivnost glikopeptidnih estera, priredjen je niz spojeva u kojima su Tyr (1), Tyr-Pro (2), Tyr-Pro-Phe (3) i Tyr-Pro-Phe-Val (4) vezani preko C-terminalne karboksilne skupine na primarnu C-6 hidroksilnu skupinu D-glukoze, slika 1. Važno je naglasiti da svi promatrani spojevi imaju identični peptidni N-terminalni dio (tirozin) i slobodni anomerni centar na D-glukozi, a razlikuju se upravo u duljini i aminokiselinskom slijedu peptida.

Za regioselektivnu esterifikaciju D-glukoze korišteni su pentaklorfenilni esteri N-terminalno zaštićene aminokiseline ili peptida u prisustvu imidazola kao katalizatora.¹² Uklanjanjem zaštitnih skupina dobiveni su slobodni esteri 1–4 koji su upotrebljeni za izučavanje reaktivnosti.

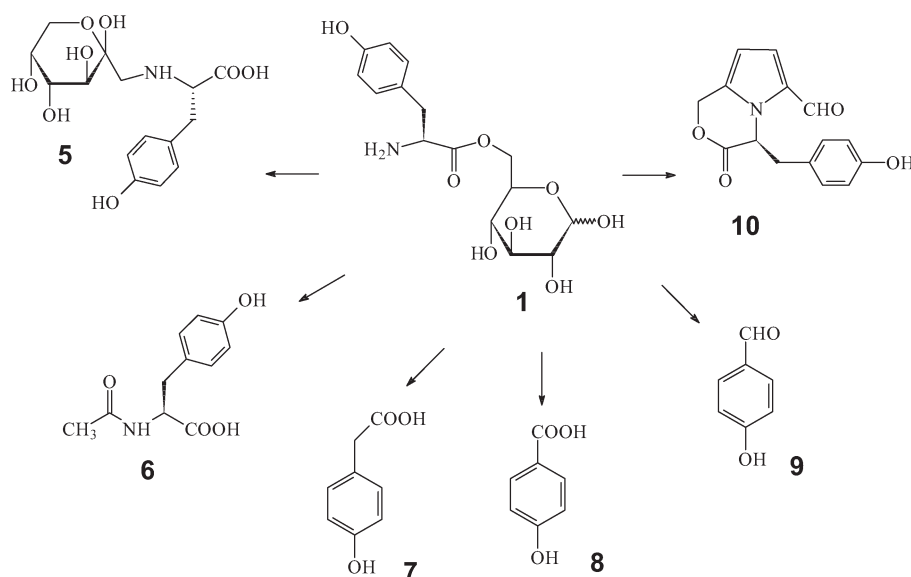
Inkubacijom estera **1** u smjesi piridina i octene kiseline u obujamnom omjeru 1:1, koja čini pogodno otapalo za studij Maillardove reakcije budući da djeluje i kao proton donor i proton akceptor, na 50 °C dobivena je heterogena smjesa produkata, od kojih su izolirani i nedvojbeno karakterizirani spojevi **5–10** prikazani na slici 2. Amadorijev derivat tirozina **5** rezultat je intramolekuskog Amadorijevog pregrađivanja uz istodobnu hidrolizu esterske veze. Nastajanje *N*-acetil-L-tirozina (**6**), 4-hidroksifenilactone kiseline (**7**), 4-hidroksibenzojeve kiseline (**8**) i 4-hidroksibenzaldehida (**9**) rezultat je složenog mehanizma koji uključuje enolizaciju, nastajanje dikarbonilnih spojeva i Streckerovu razgradnju.¹² Pirololakton **10** izoliran je kao glavni produkt reakcije, a nastaje pregrađivanjem nestabilnog 3-deoksiglukozonskog međuprodukta uz očuvanje esterske veze.

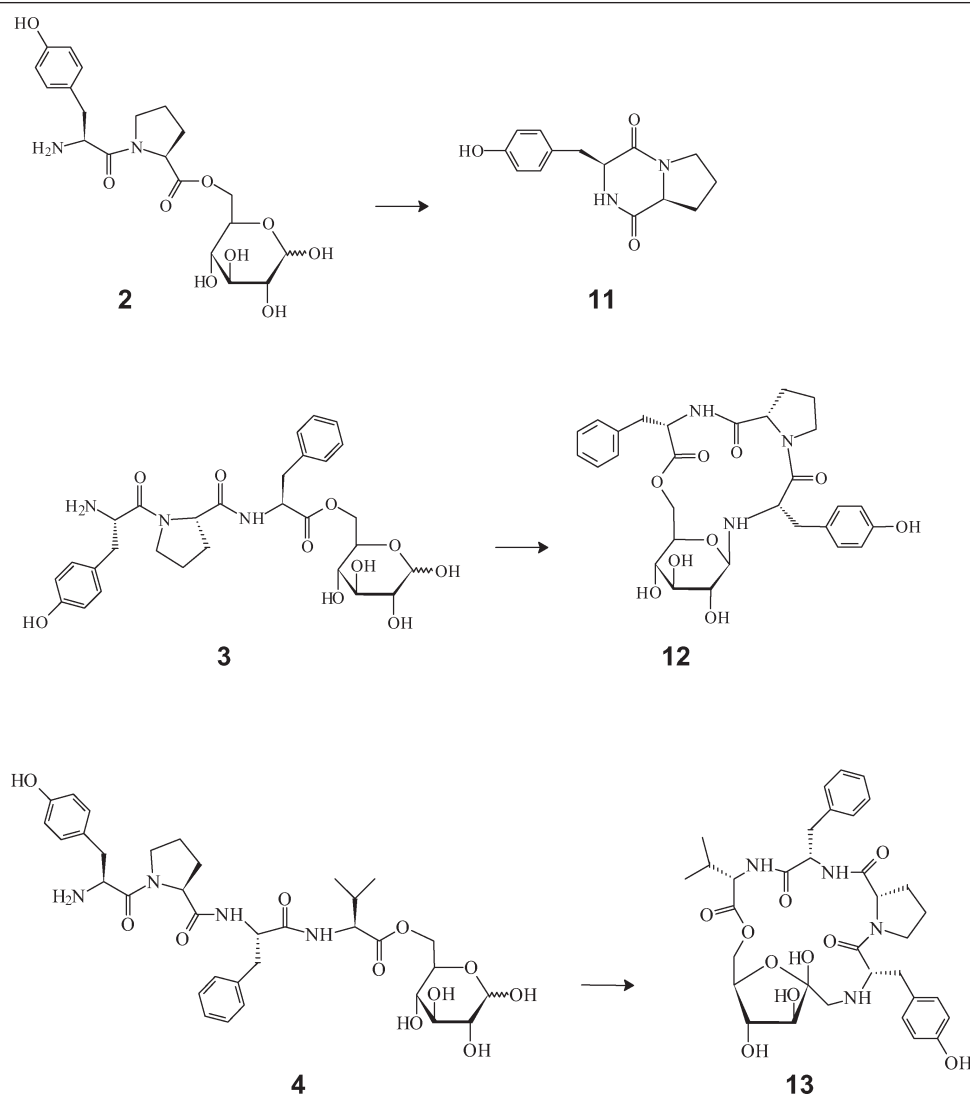
Suprotno tirozinskom glikokonjugatu **1**, inkubacijom estera dipeptida **2** na svim promatranim temperaturama (4 – 50 °C) nastaje jedan produkt koji je identificiran kao Tyr-Pro diketopiperazin (**11**), slika 3.¹³ Intramolekulska aminoliza, tj. nukleofilni napad *N*-terminalne amino skupine na karbonilni ugljikov atom susjedne aminokiseline vrlo je čest kod estera dipeptida zbog dobre izlazne skupine (alkohola) te kod dipeptida koji u svojoj strukturi sadrže prolin, glicin ili *N*-alkiliranu aminokiselinu.¹⁴ Reakcija ciklizacije derivata dipeptida zahtijeva *cis* konformaciju kod homokiralnih dipeptida, odnosno *trans* konformaciju kod heterokiralnih dipeptidnih slijedova. Budući da je za ester **2** nađena isključivo *trans* konformacija Tyr-Pro peptidne veze u otopini, jasno je da za nastajanje diketopiperazina **11** treba doći najprije do *trans* → *cis* izomerizacije peptidne ve-



Slika 1 – Strukture modelnih glikokonjugata

Fig. 1 -- Structures of model glycoconjugates

Slika 2 – Izolirani produkti inkubacije glikokonjugata **1**Fig. 2 – Products isolated from the incubation reaction of glycoconjugate **1**



Slika 3 – Produkti inkubacije glikokonjugata 2–4

Fig. 3 – Products of incubation reactions of glycoconjugates 2–4

ze.¹³ Na taj se način mijenja konformacija peptidnog dijela molekule i amino skupina tirozina dolazi u položaj povoljan za intramolekulsku ciklizaciju.

Inkubacijom tripeptidnog estera **3** na 37 °C izoliran je produkt intramolekulske reakcije, koji je okarakteriziran kao ciklički glikozilamin **12** (Slika 3).¹³ Glikozilamini kao međuprodukti Amadorijevog pregrađivanja između monosaharida i aminokiselina ili peptida smatraju se nestabilnim spojevima, koji se vrlo brzo pregrađuju u keto-šećerne derivate.¹⁵ Međutim, svi pokušaji da se glikozilamin **12** pregradi u odgovarajući Amadorijev spoj grijanjem na višoj temperaturi u smjesi otapala piridin/octena kiselina ili etanol/dietil-malonat nisu dali rezultata. Nasuprot tome, reakcijom D-glukoze i tripeptida Tyr-Pro-Phe u istim uvjetima dolazi do pregrađivanja i nastaje Amadorijev spoj, pri čemu nisu detektirani ni tragovi odgovarajućeg glikozilamina.¹³ Pretpostavili smo da razloge za stabilnost spoja **12** treba u prvom redu tražiti u povoljnoj konformaciji cikličkog međuprodukta, što je i potvrđeno detaljnom konformacijskom analizom (dalje u tekstu).

Inkubacijom tetrapeptidnog estera **4** na sobnoj temperaturi dobiven je ciklički Amadorijev spoj **13**, kao rezultat in-

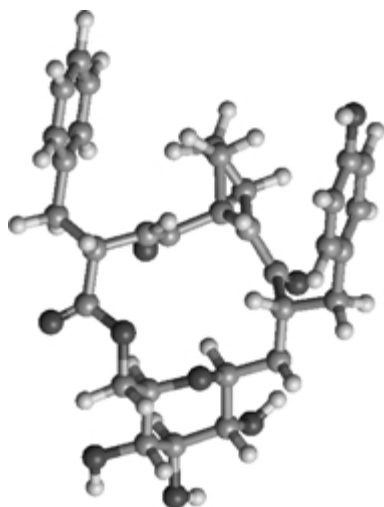
tramolekuskog Amadorijevog pregrađivanja, slika 3.¹³ Potrebno je naglasiti da u reakcijskoj smjesi nije detektiran spoj koji bi odgovarao glikozilaminu kao međuproduktu. Amadorijev derivat **13** također je uključen u detaljniju konformacijsku analizu.

NMR analiza cikličkih šećer-peptid adukata **12** i **13**

Ciklički peptidi i njihovi derivati čine vrlo važnu skupinu spojeva, koja naveliko služi u istraživanju 3D strukture biomolekula, oponašanju aktivnog mjesta enzima, u sintezi biblioteka spojeva¹⁶ te kao predložak u sintezi proteina koji formiraju pore.¹⁷ Ciklizacija peptida koja uključuje molekulu šećera prilično je nov, ali i obećavajuć pristup. Naime, pokazano je da ciklički hibrid peptida i nukleinske kiseline pokazuje stabilnost prema hidrolizi kataliziranoj nukleazom S1.¹⁸ Nadalje, stalna potreba za strukturnim elementima sposobnim smanjiti fleksibilnost peptida i zadržati ih u bioaktivnoj konformaciji jedan je od motiva za detaljniji uvid u konformacijske karakteristike cikloadukata **12** i **13**.¹⁹

Jedno od prvih pitanja koje se postavlja kod NMR analize glikokonjugata anomerna je konfiguracija šećernog dijela

molekule. Ako peptidni dio molekule sadrži peptidil-prolil amidnu vezu koja je podložna *trans-cis* izomerizaciji, potrebno je identificirati konformer, odnosno odrediti njihov omjer, ako se oba nalaze u otopini. Postojanje samo jednog seta signala u NMR spektrima glukozilamina **12** upućuje na jedinstvenu konformaciju u otopini DMSO i CH₃CN. Vicinalna konstanta sprege $^3J_{H1,H2} = 7,70$ Hz u skladu je s β -anomernom konfiguracijom D-glukopiranoze.²⁰ Nadalje, na temelju kemijskog pomaka α protona prolina u visokom magnetnom polju te karakterističnog NOE kontakta između α protona tirozina i prolina potvrđena je *cis* konformacija Tyr-Pro peptidne veze. Velik broj NOE kontakata u NOESY spektrima spoja **12** ukazuje na dobro uređenu strukturu u otopini. Rezultat molekulskog modeliranja na temelju NMR podataka je konformacija globalnog minimuma prikazana na slici 4. Osnovna karakteristika ove strukture je ukočena, dobro definirana konformacija središnjeg 14-članog glikopeptidnog prstena i šećernog dijela molekule ($^{13}C_1$ konformacija), koja dovodi bočne lance aminokiselina u takav položaj da je prolin smješten u "sendviču" između aromatskih jezgri susjednih tirozina i prolina.¹⁹ Ovakav razmještaj karakterističan je za tip VI β -okreta, gdje glavni izvor stabilizacije proizlazi iz bliskih "stacking" interakcija između prolina i aromatskih aminokiselina.²¹ Na temelju toga je zaključeno da upravo u takvim povoljnim hidrofobnim interakcijama treba tražiti uzrok opaženoj stabilnosti glukozilamina **12** prema Amadorijevom pregrađivanju.



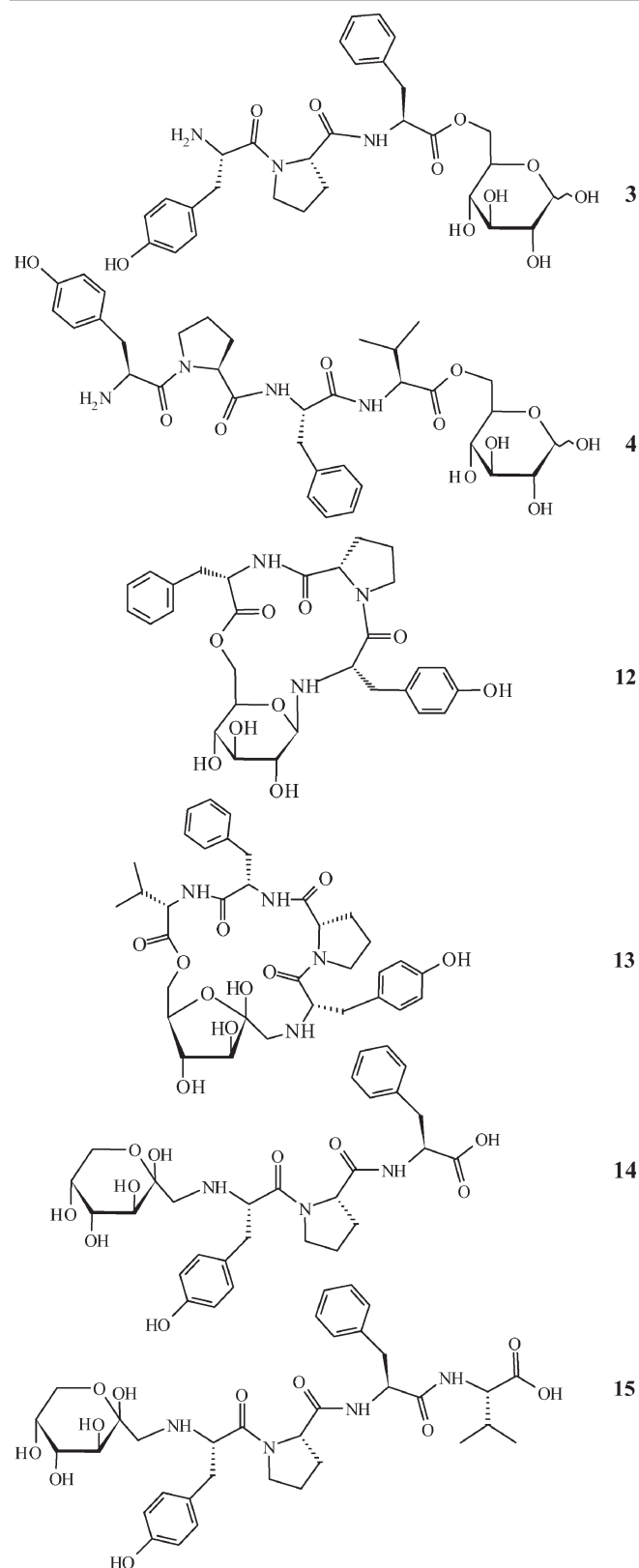
Slika 4 – Konformacija globalnog minimuma glukozilamina **12**
Fig. 4 – The global minima conformation of glycosylamine **12**

Otopine Amadorijevih spojeva obično sadrže smjesu tautomernih formi, kao rezultat procesa mutarotacije.²² Međutim, jedan set signala u spektrima cikličkog Amadorijevog spoja **13** u otopini DMSO ukazuje na postojanje samo jedne anomerne forme D-fruktofuranoze, koja je na temelju konstanti sprege i NOE kontakata identificirana kao β konfiguracija. Određeno je nadalje da je Tyr-Pro peptidna veza smještena u *cis* konformaciji. Pokušaji da se na temelju NOE podataka izračuna konformacija globalnog minimuma, slično kao i za spoj **12**, u ovom slučaju nisu dali rezultata. Naime, rezultat simulacije je velik broj konformacija niske energije za središnji 18-člani glikopeptidni prsten koje zadovoljavaju postavljene NOE kriterije, iz čega je zaključeno da je molekula previše fleksibilna za

eksplicitni opis geometrije u otopini.¹⁹ Ako usporedimo strukture **12** i **13**, odnosno njihove prekurzore **3** i **4**, može se zaključiti da povećanje peptidnog lanca za jednu aminokiselinu osigurava dovoljno konformacijskog prostora za Amadorijevu pregrađivanje u cikloadukt **13**. Međutim, do mutarotacije koja bi rezultirala smjesom tautomernih formi ipak ne dolazi. Treba naglasiti da NMR spektri odgovarajućeg cikličkog Amadorijevog spoja pentapeptida leucin enkefalina sadrže smjesu α i β furanozne forme.¹¹ Iz ovog se može zaključiti da duljina i sastav peptidnog dijela molekule u glikokonjugata s esterskim tipom veze utječu na produkte intramolekulskih ciklizacija. Nadalje, veličina središnjeg glikopeptidnog prstena u izravno je vezi s fleksibilnošću cijele molekule i definira razmještaj aminokiselinskih ostataka. Treba svakako uzeti u obzir i postojanje prolina u spojevima **12** i **13** koji čini te sustave tricikličkim. Prolin je aminokiselina koja svojom cikličkom strukturom uvijek unosi određena konformacijska ograničenja, dok s druge strane *trans-cis* izomerizacija peptidil-prolil amidne veze otvara interesantne mogućnosti u kreiranju novih spojeva.

Masena spektrometrijska analiza šećer-peptid adukata

Napredak biomedicinskih znanosti u posljednjih desetak godina traži podršku u odgovarajućoj analitičkoj tehnici sposobnoj davati brze i precizne odgovore na mnoga otvorena pitanja. Moderne metode spektrometrije masa koje uključuju blage ("soft") ionizacije, kao što su ionizacija elektro-raspršenjem (Electro Spray Ionization, ESI) i desorpcija/ionizacija laserom u matrici (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI), nametnule su se kao nezabornu u određivanju aminokiselinskog sastava proteina, post-translacijskih modifikacija biopolimera, nekovalentnog udruživanja i konformacijskih promjena molekula. Jednako kao i za razumijevanje složenih bioloških procesa, mimetici i modelni sustavi od velike su pomoći i za spektrometriju mase. Na primjer, neke studije stabilnosti hemoglobina pretpostavile su formiranje imidazolidinonskog tipa adukata,²³ međutim tek MS analiza modelnih šećer-peptid spojeva s uključenom imidazolidinonskom jedinicom dala je detaljne informacije o fragmentaciji i definirala dijagnostičke ione za takvu vrstu modifikacije.²⁴ Raznovrsnost i složenost ugljikohidratnih struktura koje nalazimo u glikoproteinima od biološkog značenja traži svojevrsne biomarkere, strukture karakteristične za određeni tip strukture. Takvi biomarkeri olakšali bi identifikaciju i karakterizaciju složenih glikopeptidnih struktura, bilo da potječu iz prirodnog izvora ili su dobiveni sintetskim putem. Imajući sve ovo na umu, neki od glikokonjugata dobivenih tijekom ovog istraživanja nametnuli su se kao pogodni modelni spojevi za MS analizu. Kao što se može vidjeti na slici 5, svi izabrani spojevi derivati su tripeptida Tyr-Pro-Phe ili tetrapeptida Tyr-Pro-Phe-Val, a razlikuju se strukturom šećerne jedinice i tipom šećer-peptid veze. Spojevi **3** i **4** sadrže estersku vezu između C-terminalnog peptidnog kraja i C-6 hidroksilne skupine D-glukoze. Spojevi **12** i **13** primjeri su cikličkih šećer-peptid adukata, koji uključuju D-glukopiranozu, odnosno D-fruktofuranozu. Amadorijevi spojevi **14** i **15** sadrže 1-deoksi-D-fruktozu na N-terminalnom peptidnom kraju. Svi navedeni spojevi imaju vrlo slične molekulske mase, ali je analiza ESI-MS pokazala neke karakteristične razlike u fragmentaciji.²⁵ Pri tom je kao analikator

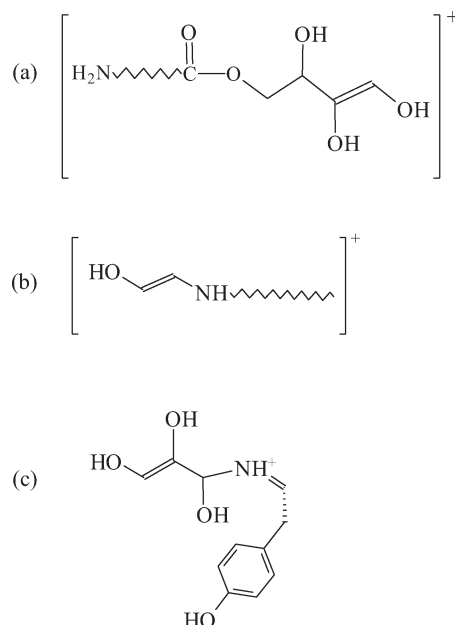


Slika 5 – Strukture spojeva uključenih u analizu MS
Fig. 5 – Structures of compounds involved in MS analysis

MS primijenjen spektrometar masa vremenom proleta ("time-of-flight", TOF), a sprega ESI-TOF MS predstavlja idealnu kombinaciju za istraživanje biomolekula.

Ako molekulsku masu peptida označimo s M , tada pojavljivanje mase $M+162$ u MS spektrima ukazuje na ugljiko-

hidratnom molekulom uzrokovanu modifikaciju peptida, ali ne daje informacije o tipu i mjestu modifikacije ili o strukturi šećerne molekule. Uvidom u MS/MS spektre spojeva **3** i **4** utvrđeno je da fragmenti najvećeg intenziteta potječu od eliminacije jedne, dvije ili tri molekule vode. Nadalje, C-terminalni peptidni fragmenti također pokazuju eliminaciju molekula vode, što ukazuje da je mjesto modifikacije smješteno na peptidnom C-terminusu. Karakteristično je za promatrane estere i cijepanje šećernog prstena, pa nastaju fragmenti koji odgovaraju gubitku od 60 i 120 Da, tj. dvije ili četiri molekule $\text{HOCH}=\text{CHOH}$, čime nastaju strukture prikazane na slici 6(a). Međutim, primijećeno je i nastajanje peptidnih N-terminalnih fragmenata s masom $M+42$ i $M+90$, kao što je prikazano na slici 6(b) i (c). Nastajanje takvih fragmenata iz estera **3** i **4** može se objasniti isključivo intramolekulskom ciklizacijskom reakcijom do koje dolazi u uvjetima analize ESI-MS. Tako nastaju cikličke Schiffove baze i glikozilamini iz kojih onda fragmenatcijom nastaju navedene strukture.



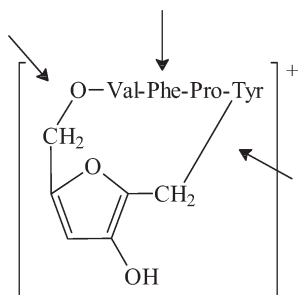
Slika 6 – Fragmentni ioni karakteristični za glikopeptidne estere **3** i **4**

Fig. 6 – Fragment ions characteristic for the glycopeptide esters **3** and **4**

Molekulska je masa glikozilamina **12** za 18 Da manja od mase estera **3** i ako se usporede maseni spektri molekuskog iona spoja **12** sa spektrom $[M-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ iona spoja **3** (mase su identične), dolazi se do zaključka da su spektri praktički identični. Međutim, detaljnija analiza otkriva neke zanimljive razlike. Intenziteti iona koji nastaju cijepanjem $\text{Ca}-\text{CO}$ i $\text{CO}-\text{NH}$ veza veći su u spektrima glikozilamina **12** nego estera **3** i upravo ta razlika u intenzitetu se, u ovom slučaju, može dovesti u vezu s različitim "porijeklom" ishodnih iona.

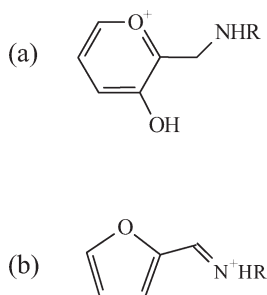
Ciklički Amadorijev spoj **13** pokazuje prilično složeni model za analizu MS, zbog strukture koja uključuje postojanje esterske veze kao u spojevima **3** i **4** te Amadorijev tip veze kao u spojevima **14** i **15**. Analiza spektara je pokazala da daleko najstabilniji ion nastaje eliminacijom dviju molekula

la vode, čime nastaje hidroksifuranska struktura koja premošćuje terminalne krajeve peptida, slika 7. Daljnja fragmentacija uključuje cijepanje jedne od veza unutar glikopeptidnog prstena i može se podijeliti u tri skupine, slika 7. Cijepanjem C1–N(Tyr) veze nastaju C-terminalno modificirani peptidni fragmenti mase M+108. Cijepanjem esterske veze nastaju N-terminalno modificirani fragmenti mase M+126, M+108 i M+90. U konačnici, cijepanjem jedne od veza u peptidnom dijelu molekule nastaju različite strukture hidroksifurana s peptidnim fragmentima na svojim krajevima.



Slika 7 – Fragmentacija $[M-2H_2O+H]^+$ iona spoja **13**
Fig. 7 – Fragmentation of the $[M-2H_2O+H]^+$ ion of compound **13**

Amadorijevi spojevi **14** i **15** imaju iste molekulske mase kao i glikopeptidni esteri **3**, odnosno **4**, međutim fragmentacijski slijed im je bitno različit. Kod ovih spojeva N-terminalni peptidni fragmenti pokazuju eliminaciju molekula vode, što ukazuje da je šećerna modifikacija smještena na N-terminalnoj amino-skupini. Gubitkom tri molekule vode nastaju M+108 fragmenti poznati i kao pirilijum ioni, slika 8(a). Najstabilniji ioni u spektrima odgovaraju gubitku 84 Da (tri molekule vode i molekule formaldehida), čime nastaju M+78 modifikacije peptidnog dijela molekule i najvjerojatnije predstavljaju modificirane imonijeve ione, slika 8(b).



Slika 8 – Karakteristični ioni za Amadorijev tip spojeva
Fig. 8 – Ions characteristic for the Amadori type of compounds

Navedena istraživanja MS pokazala su da se položaj šećera u glikokonjugatima može odrediti iz povećanja masa N- ili C-terminalnih peptidnih fragmenata. Karakteristika glikopeptidnih estera je eliminacija molekula vode i cijepanje šećernog prstena, kao i intramolekulska ciklizacija koja dovodi do nastajanja M+42 modificiranih N-terminalnih peptidnih fragmenata. Suprotno tome, najkarakterističniji fragmenti za Amadorijeve spojeve su M+108 i M+78 modificirani N-terminalni fragmenti.

Zaključak

Studija reaktivnosti modelnih glikopeptidnih estera pokazala je da duljina i struktura peptidnog dijela molekule određuju produkte intramolekulskih reakcija. Analizom cikličkih šećer-peptid adukata NMR spektroskopijom i molekularnim modeliranjem dokazano je da veličina glikopeptidnog prstena utječe na pokretljivost molekule i konformaciju aminokiselinskih ostataka u molekuli. Neki od priređenih spojeva iskorišteni su nadalje kao biblioteka spojeva u analizi spektrometrijom mase te su pronađeni fragmentni ioni koji mogu poslužiti kao markeri za određeni tip glikoproteinske strukture.

Popis simbola List of symbols

NMR	– nuklearna magnetska rezonancija – nuclear magnetic resonance
MS	– spektrometrija mase – mass spectrometry
HGP	– projekt ljudskog genoma – human genome project
AGEs	– produkti uznapredovale glikacije – advanced glycation end products
DMSO	– dimetil-sulfoksid – dimethylsulfoxide
CH ₃ CN	– acetonitril – acetonitrile
NOE	– efekt nuklearnog Overhauserovog pojačanja – nuclear Overhauser enhancement
NOESY	– spektroskopija nuklearnog Overhauserovog efekta – nuclear Overhauser effect spectroscopy
ESI	– ionizacija elektro-raspršenjem – electro spray ionization
MALDI	– desorpcija/ionizacija laserom u matrici – matrix-assisted laser desorption ionization,
MS/MS	– tandemska spektrometrija mase – tandem mass spectrometry

Literatura References

1. R. E. Banks, M. J. Dunn, D. F. Hochstrasser, J. C. Sanchez, W. Blackstock, D. J. Pappin, P. J. Selby, *Lancet* **356** (2000) 1749.
2. J. C. Wooley, *Trends Biotech.* **20** (2002) 316.
3. L. A. Marcaurelle, C. R. Bertozzi, *Chem. Eur. J.* **5** (1999) 1384.
4. D. L. Zechel, L. Konermann, S. G. Withers, D. J. Douglas, *Biochemistry* **37** (1998) 7664.
5. S. A. Martinis, P. Plateau, J. Cavarelli, C. Florentz, *Biochimie* **81** (1999) 683.
6. M. P. Heaton, F. C. Neuhaus, u E. L. Foo (Uredn.), *The lactic acid bacteria*, Horizont Scientific Press, Nortfolk, 1999, str. 89–98.
7. P. J. Thornaley, *Cell Mol. Biol.* **44** (1998) 1013.
8. D. S. C. Raj, D. Choudhury, T. C. Welbourne, M. Levi, *Am. J. Kidney Dis.* **35** (2000) 365.
9. A. L. Carrington, J. E. Litchfield, *Diabetes Rev.* **7** (1999) 275.

10. G. Münch, R. Schinzel, C. Loske, A. Wong, N. Durany, J. J. Li, H. Vlassara, M. A. Smith, G. Perry, P. Riederer, *J. Neural Trans.* **105** (1998) 439.
11. Š. Horvat, M. Roščić, L. Varga-Defterdarović, J. Horvat, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1999) 909.
12. I. Jerić, L. Šimičić, M. Stipetić, Š. Horvat, *Glycoconjugate J.* **17** (2000) 273.
13. I. Jerić, Š. Horvat, *Eur. J. Org. Chem.* (2001) 1533.
14. M. del Fenso, J. Alsina, M. Royo, G. Barany, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **39** (1998) 2639.
15. M. Monsigny, C. Quétyard, S. Bourgerie, D. Delay, C. Pichon, P. Midoux, R. Mayer, C. Roche, *Biochimie* **80** (1998) 99.
16. J. N. Lambert, J. P. Mitchell, K. D. Roberts, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (2001) 471.
17. J. Sanchez-Quesada, M. R. Ghadiri, H. Bayley, O. Braha, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 11757.
18. C. F. Blecinski, C. Richert, *Org. Lett.* **2** (2000) 1697.
19. I. Jerić, P. Novak, M. Vinković, Š. Horvat, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (2001) 1944.
20. K. Linek, J. Alföldi, M. Ďurindová, *Chem. Pap.* **47** (1997) 247.
21. J. Yao, V. A. Veher, B. P. Espejo, M. T. Reymond, P. E. Wright, H. J. Dyson, *J. Mol. Biol.* **243** (1994) 736.
22. V. V. Mossine, G. V. V. Glinsky, M. S. Feather, *Carbohydr. Res.* **262** (1994) 257.
23. B. A. Kerwin, M. J. Akers, I. Apostol, C. Moore-Einsel, J. E. Etter, E. Hess, J. Lippincott, J. Levine, A. J. Matthews, P. Revilla-Sharp, R. Schubert, D. L. Looker, *J. Pharm. Sci.* **88** (1999) 79.
24. M. Roščić, C. Versluis, A. J. Kleinnijenhuis, Š. Horvat, A. J. R. Heck, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15** (2001) 1022.
25. I. Jerić, C. Versluis, Š. Horvat, A. J. R. Heck, *J. Mass Spectrom.* **37** (2002) 803.

SUMMARY

Glycoconjugates as Models in Biomedical Studies

I. Jerić and Š. Horvat

It is becoming evident that the main outcome of the Human Genome Project is not only identification of human genes, but more important, the conception of proteins and their conjugates being the key structural and functional players in biological systems. The main goal in post-genomic era is to find the most important therapeutic targets for drug discovery, which include understanding of structure and function of all biomolecules involved in biological process. Having in mind complexity and heterogeneity of macromolecules, the demand for suitable model compounds to probe the nature of biological processes is well understandable.

Our approach involves glycoconjugates with an ester type of linkage between the C-terminus of the amino acid Tyr (**1**), or peptides Tyr-Pro (**2**), Tyr-Pro-Phe (**3**) and Tyr-Pro-Phe-Val (**4**), and the C-6 hydroxy group of the D-glucose as model compounds, to study phenomena associated with a complex group of reactions, collectively known as the Maillard reaction. The main issue was to clear up the influence of the structure and the length of the peptide residue on the overall reactivity of studied glycopeptide esters. It is found that changes in the length of glycopeptides with an identical N-terminal part give rise to specific chemical reactions, resulting in the formation of diketopiperazine **11**, glycosylamine **12** or keto-sugar derivative **13**. In addition, NMR spectroscopy and molecular modelling were used to determine the conformational features of cyclic sugar-peptide adducts **12** and **13**, and the obtained results were correlated with the observed chemical behavior. Finally, a small library of glycoconjugates with distinct structural differences was used in mass spectrometric study to establish fragmentation pattern and to find characteristic structures that can be used as markers for identification of complex systems, either naturally occurring or synthetically obtained.

Ruđer Bošković Institute, PO Box 180, 10002 Zagreb, Croatia

Received September 25, 2002

Accepted March 4, 2003