

ANÁLISIS DE N-GLICANOS POR UHPLC (HILIC) EN CÉLULAS HEK293T

Rubio Blancas Emiliano¹, López Ruiz Daniel², Salinas Marín Roberta¹. Laboratorio de Glicobiología Humana y Diagnóstico Molecular, Centro de Investigación en Dinámica Celular¹ Facultad de Farmacia², UAEM.

1.0 INTRODUCCIÓN

La glicosilación es un proceso co- y post-traducciona l que permite la adición covalente de glicanos o carbohidratos a proteínas, lípidos y ARNs formando los llamados glicoconjugados. Este proceso tiene lugar en el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi.

Existen dos tipos principales de glicosilación: N- y O-glicosilación. La N-glicosilación consiste en la unión covalente de glicanos al átomo de nitrógeno de un residuo de asparagina en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr; donde X puede ser cualquier aminoácido, excepto prolina. Por otro lado, en la O-glicosilación, los glicanos se unen a un átomo de oxígeno de serina o treonina. En los seres vivos existen tres tipos principales de N-glicanos : complejos, de alto contenido de manosa e híbridos. Los N-glicanos complejos poseen residuos terminales de ácido neuroamínico o ácido siálico (Neu5Ac) y son los más abundantes en células de

mamífero.

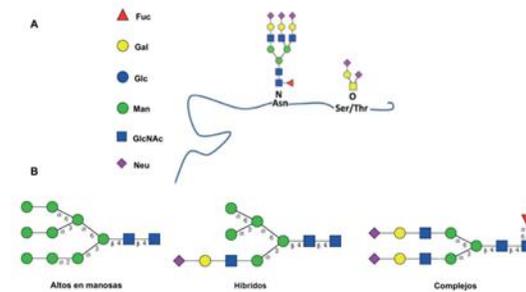


Figura 1: A) Esquema de glicoproteína con ejemplos de estructuras de N- y O- glicanos. B) Estructuras de los principales tipos de N-glicanos encontrados en proteínas humanas. Fuc, Fucosa; Gal, Galactosa; Glc, Glucosa; Man, Manosa; GlcNAc, N-Acetilglucosamina; Neu, ácido N-acetil-neuramínico o ácido siálico.

La glicosilación es un proceso que necesita de varios elementos, como enzimas glicosiltransferasas, nucleótidos carbohidratos y transportadores nucleótido-carbohidrato. El transportador de CMP-ácido siálico (CST) es crucial para la incorporación del sustrato CMP-ácido siálico al lumen del Golgi, donde las sialiltransferasas transfieren el ácido siálico a los glicoconjugados.

El CST es una proteína codificada por el gen SLC35A1 que juega un papel importante en diversas funciones celulares

porque de su actividad transportadora depende la cantidad de ácido siálico en las células y su silenciamiento puede estrés en las células, deficiencia en la sialilación de glicoconjugados y perturbación de la morfología del Golgi, entre otros. Su importancia en aplicaciones biotecnológicas destaca que el ácido siálico es considerado parámetro de calidad en la liberación de bioterapéuticos por que la vida media de algunas proteínas como eritropoyetina depende de su grado de sialilación.

En el laboratorio trabajamos con una línea celular derivada de HEK293 (células embrionarias de riñón humano), que son HEK293T WT (derivadas de HEK293 que expresan el antígeno SV40) y HEK293T KO. Es esta última es una mutante del *SLC35A1* generada por CRISPR/Cas y presenta un sialofenotipo disminuido a un 25-30% de acuerdo análisis por citometría de flujo.

Por lo anteriormente mencionado, el objetivo de este proyecto fue establecer una metodología de análisis del perfil de N-glicosilación de las células HEK293T WT y KO y determinar diferencias en el perfil de N-glicanos.

2.0 METODOLOGÍA

2.1 Cultivo Celular

Los cultivos celulares de las líneas celulares HEK293T y HEK293T KO se realizaron en frascos T-25 con 5 mL de medio DMEM (12100-038, Gibco) suplementado con 1 % de antibiótico penicilina/estreptomicina (15140148, Gibco) y 10 % de suero fetal bovino (SFB) (1600044, Gibco). Las líneas celulares HEK293T y HEK293T KO fueron amablemente donadas por A. Banning.

2.2 Extracción de proteína de las células HEK293T.

Las células se lisaron las células utilizando 350 µL de buffer RIPA. El pellet de células se lavó con PBS 1X y se resuspendió con buffer RIPA. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13,500 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un microtubo limpio.

2.3 Cuantificación de proteína total.

La cuantificación de los lisados se realizó por el método de BCA (ácido bicinconínico). Se utilizó una curva estándar de albúmina bovina (BSA) con 5 niveles de concentración 125, 250, 500, 750 y 1000 µg/mL. La cuantificación se realizó en una placa de 96 pocillos, colocando 25 µL de blanco (agua), muestra

y de estándar. Las muestras de lisados de HEK293T WT y KO fueron diluidas 1:10 y 1:50 previamente. Posteriormente se les agregaron 200 μ L de mezcla ácido biconínico: sulfato de cobre 1:8. La placa se incubó a 37 °C durante 30 minutos y las muestras se leyeron a 562nm.

Las densidades ópticas de BSA se graficaron en el eje de las “y” versus la concentración (μ g/mL) en el eje de “x”. Para obtener las concentraciones de cada muestra se utilizó la ecuación de la recta obtenida de la regresión lineal de la curva estándar.

2.4 Deglicosilación de N-glicanos y derivación con 2AB.

Se cuantificaron los lisados de proteínas y se tomaron 100 μ g para su análisis. Luego de un proceso de secado, Las proteínas se desnaturalizaron con 2.5 μ L de solución desnaturalizante (beta-mercaptoetanol, SDS y agua) a 100°C y posteriormente se añadieron 5 μ L de solución IGEPAL que solubiliza las proteínas de membrana y 5 μ L de buffer 10X PNGasa F para facilitar la acción de la enzima PNGasa F. Finalmente, se incubó la muestra a 37°C para permitir la actividad enzimática.

2.5 Análisis por UHPLC

En viales de HPLC, se adicionaron 2 μ L de

la escalera de calibración de dextran (2AB) y 23 μ L de acetonitrilo. Para el blanco, se realizó una mezcla de formato de amonio 50mM pH 4.4 y acetonitrilo (ACN) 80:20. Las muestras se prepararon diluyendo 10 μ L en ACN para obtener 25 μ L de volumen final. Se utilizó un flujo de 0.5mL/min y una temperatura de columna a 30°C. El gradiente de corrida de la fase móvil se indica en la tabla 1.

Tabla 1: Gradiente de concentración del método de análisis

Tiempo (min)	%Línea A (formato de amonio 50 mM pH 4.4)	%Línea B (ACN 100%)
0	25	75
30	50	50
30.5	60	40
32	60	40
32.5	25	75
40	25	75

2.6 Obtención de los cromatogramas

Con ayuda del software *Chromeleon* se obtuvo un cromatograma. Los tiempos de retención se convirtieron a unidades de glucosa (UG) con un estándar de glucosa (dextrán) que es un polímero de unidades de glucosa. Con esta información, bases de datos y literatura se propusieron estructuras de glicanos, las cuales fueron realizadas en el software *DrawGlycan*. Se utilizó el software *Graphpad Prism 8* para

el diseño de los cromatogramas correspondientes al perfil de N-glicosilación de las células HEK293T WT y KO.

3.0 RESULTADOS

3.1 Análisis de proteína total de células HEK293T WT Y KO.

La concentración de proteínas presentes en las muestras se obtuvo al sustituir la D. O en la ecuación de la recta $y = 0.0008x + 0.1109$, con un $R^2 = 0.95$, obtenida de la curva estándar de BSA. En la tabla 2 se muestran las concentraciones de proteína total determinadas de los lisados obtenidos de las células HEK293T WT y KO.

Tabla 2. Concentración de proteína total en las células HEK293T WT y HEK293T KO.

Muestra	Concentración [mg/ml]
HEK293T WT	4.93
HEK293T KO	2.59

3.2 Análisis del perfil de N-glicosilación de las células HEK293T WT y KO

Posterior a la determinación de proteína, los de N-glicanos recuperados se derivaron con 2AB y fueron analizados por UHPLC. En la figura 2, se muestran los cromatogramas correspondientes al perfil

de N-glicanos de los lisados de las células HEK293T WT y KO.

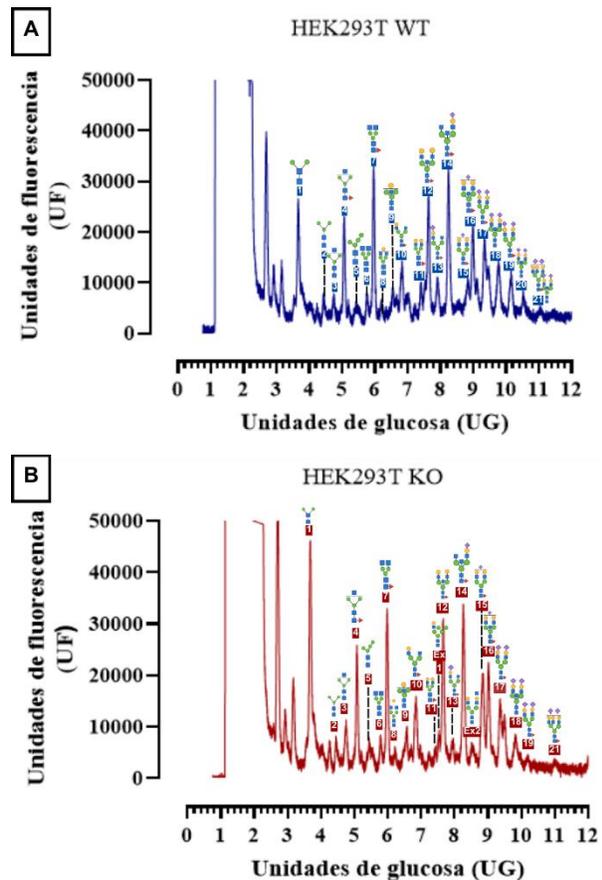


Figura 2: Perfil de N-glicanos. En la figura se muestra el cromatograma del perfil de N-glicanos obtenidos en las células HEK293T WT (fig. 2A) y KO (fig. 2B).

Como principales diferencias en las células HEK293T KO se puede apreciar dos picos adicionales no identificados en el perfil de las WT. También se observó la desaparición del pico 20 tomando como referencia las células HEK293T WT (fig.3)

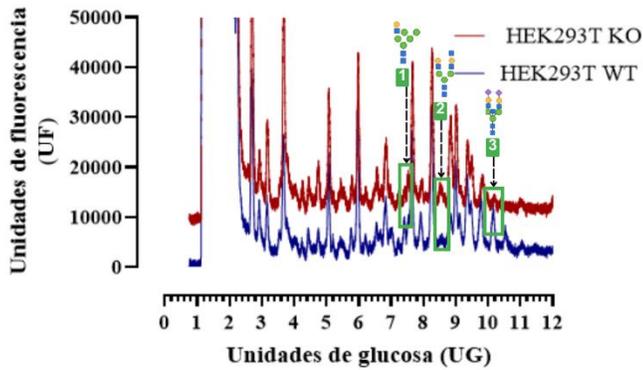


Figura 3: Comparación del perfil de N-glicanos. Cromatogramas de HEK293T WT (azul) y HEK293T KO (rojo) en donde se aprecia la presencia del pico E1 (recuadro 1), E2 (recuadro 2) y desaparición del pico 20 (recuadro 3) en las células HEK293T KO.

En las células HEK293T WT se identificó un total de 21 N-glicanos en cambio en las células HEK293T KO se identificaron 22 glicanos, con la aparición de dos glicanos extras, el primero **E1** (M5A1G(4)1) con un tiempo de retención de 15.63 min. y 7.53 UG. El segundo **E2** (A2G2GlcNAc) con un tiempo de retención de 17.84 min y 8.51 UG. Por otro lado, se registró la desaparición del pico 20 correspondiente al glicano A2BG(4)2S(6,6)2 (ver tabla 3).

Tabla 3: Comparación del perfil de N-glicanos. Se describe el número de pico, tiempo de retención en minutos (T.R), unidades de glucosa (UG), nombre y estructura del glicano en función de los cromatogramas obtenidos. Las células HEK293T WT (A) y HEK293T KO (B)

Células HEK293T WT				
Pico	T.R	UG	Glicano	E estructura
1	5.98	3.67	M2	
2	7.35	4.24	M3	
3	8.63	4.75	A1	
4	9.43	5.07	FA1	
5	10.35	5.43	M4	
6	11.22	5.76	A2	
7	11.74	5.97	FA2	
8	12.36	6.21	A2[3/6]G(4)1	
9	13.25	6.56	A2[6]BG(4)1	
10	13.93	6.83	F(6)A2[3]G(4)1	
11	15.36	7.42	F(6)A2G(4)2	
12	15.90	7.65	F(6)A2BG(4)2	
13	16.51	7.91	F(6)A2[3]G(4)1S(6)1	
14	17.28	8.25	F(6)A2[6]BG(4)1S(3)1	
15	18.56	8.84	F(6)A2G(4)2S(6)1	
16	18.89	9.00	F(6)A2BG(4)2S(6)1	
17	19.57	9.34	F(6)A2G(4)2S2	
18	20.42	9.78	A2BG(4)2S(6,6)2	
19	21.14	10.16	F(6)A2G(4)2S(3/6,6)2	
20	21.80	10.53	A2BG(4)2S(6,6)2	
21	22.69	11.04	F(6)A3G(4)3S(3/6,3)2	

Células HEK293T KO				
Pico WT	T.R	UG	Glicano	Estructura
1	6.02	3.69	M2	
2	7.87	4.45	M3	
3	8.63	4.75	A1	
4	9.46	5.08	FA1	
5	10.39	5.44	M4	
6	11.28	5.79	A2	
7	11.78	5.98	FA2	
8	12.39	6.22	A2[3/6]G(4)1	
9	13.28	6.57	A2[6]BG(4)1	
10	13.98	6.85	F(6)A2[3]G(4)1	
11	15.32	7.40	F(6)A2G(4)2	
E1	15.63	7.53	M5A1G(4)1	
12	15.95	7.67	F(6)A2BG(4)2	
13	16.61	7.95	F(6)A2[3]G(4)1S(6)1	
14	17.31	8.26	F(6)A2[6]BG(4)1S(3)1	
E2	17.848	8.51	A2G2GbcNAc	
15	18.57	8.85	F(6)A2G(4)2S(6)1	
16	18.92	9.02	F(6)A2BG(4)2S(6)1	
17	19.63	9.37	F(6)A2G(4)2S2	
18	20.50	9.82	A2BG(4)2S(6,6)2	
19	21.14	10.16	F(6)A2G(4)2S(3/6,6)2	
21	22.69	11.04	F(6)A3G(4)3S(3/6,3)2	

3.3 Abundancia relativa de N-glicanos en las células HEK293T WT y KO

Con base en la abundancia (área relativa %) se obtuvieron las siguientes diferencias: en las células HEK293T KO se identificó un 7% más glicanos altos en manosa y un 4% más glicanos neutros. En contraste, se obtuvo una reducción del 10% aproximadamente en glicanos sialilados y una disminución del 2% aproximadamente para glicanos fucosilados.

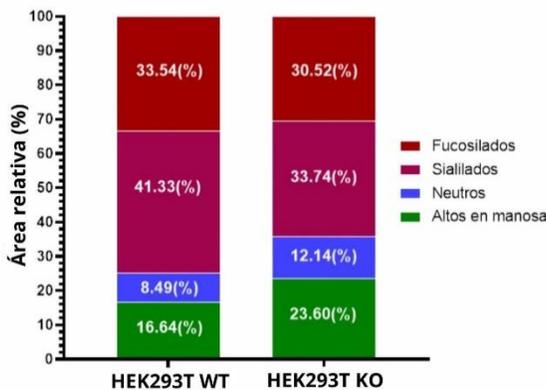


Figura 4 Porcentaje de N-glicanos. De acuerdo con su tipo de estructura en verde altos en manos, en azul neutros, en rosa sialilados y en rojo fucosilados. Células HEK293T WT (izq) y HEK293T KO (der)

4.0 CONCLUSIONES

La metodología para comparar el perfil de N-glicanos de las células HEK293T y HEK293T KO mediante UHPLC fue establecida. Se encontró una disminución del 10% aproximadamente de glicanos sialilados en células HEK293T KO. Es necesario confirmar las estructuras de los

glicanos obtenidos por espectrometría de masas. También se propone analizar el perfil de O-glicosilación de las células HEK293T KO.

5.0 REFERENCIAS

1. Signal™ 2-AB labeling kit. (2019). Technical Notes Tech. Prozyme. <https://explore.agilent.com/advancing-glycosciences-together>.
2. Apweiler, R., Hermjakob, H. & Sharon, N. (1999). *Biochim. Biophys. Acta*, 1473, 4–8.
3. Zielinska, D. F., Gnad, F., Wiśniewski, J. R. & Mann, M. (2010). *Cell*, 141, 897–907
4. Fisher, P. The N-Glycosylation Processing Potential of the Mammalian Golgi Apparatus. *Front Cell Dev Biol.* 2019 Aug 13;7:157. doi: 10.3389/fcell.2019.00157. PMID: 31457009; PMCID: PMC6700225.
5. Stanley P, Moremen KW, Lewis NE, et al. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 4th edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022. Chapter 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579964/> doi: 10.1101/glycobiology.4e.9