

Кононов Леонид Олегович

ХИМИЯ УГЛЕВОДОВ И ГЛИКОБИОЛОГИЯ

<https://углеводы.su>

ЛЕКЦИИ:

1. Введение в гликобиологию. Стереохимия углеводов.
2. Химические свойства. Синтез.
3. Гликопротеины
4. Гликолипиды, полисахариды, протеогликаны
5. Структурный анализ гликопротеинов и олигосахаридов.
6. Углевod-связывающие белки.
7. Медицинская гликобиология.

СЕМИНАРЫ:

1. Стереохимия углеводов (основы: проекции Фишера, Хеуорса для моносахаридов).
2. Стереохимия углеводов (более сложные вопросы стереохимии).

ЭКЗАМЕН:

- 1) задача (см. семинары),
- 2) два вопроса: химия + гликобиология (см. вопросы к экзамену).

Лекция 3

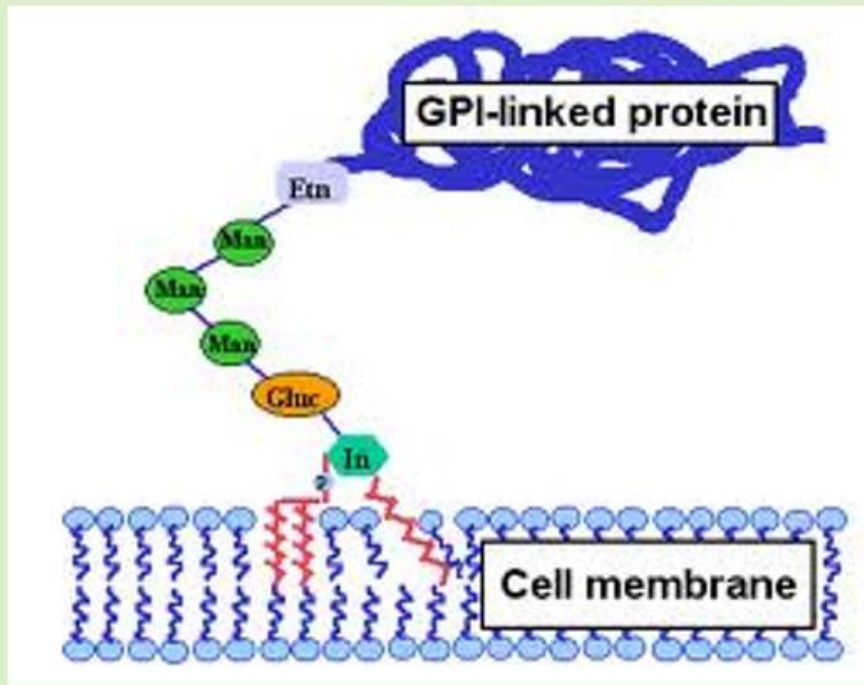
Гликопротеины:

типы, структура, биосинтез, функции

6. *Essentials of glycobiology*, A. Varki, et al. (Eds.), **3d edn., 2017.**
Ch. 9, Ch. 10, Ch. 39; Ch. 4, Ch. 14 , Ch. 6, Ch. 5, Ch. 12.
Открытый доступ к книге (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274>).

Полярность гликозилирования (топология)

4



GPI-заякоренный белок
(GPI – гликозилфосфатидилинозит)



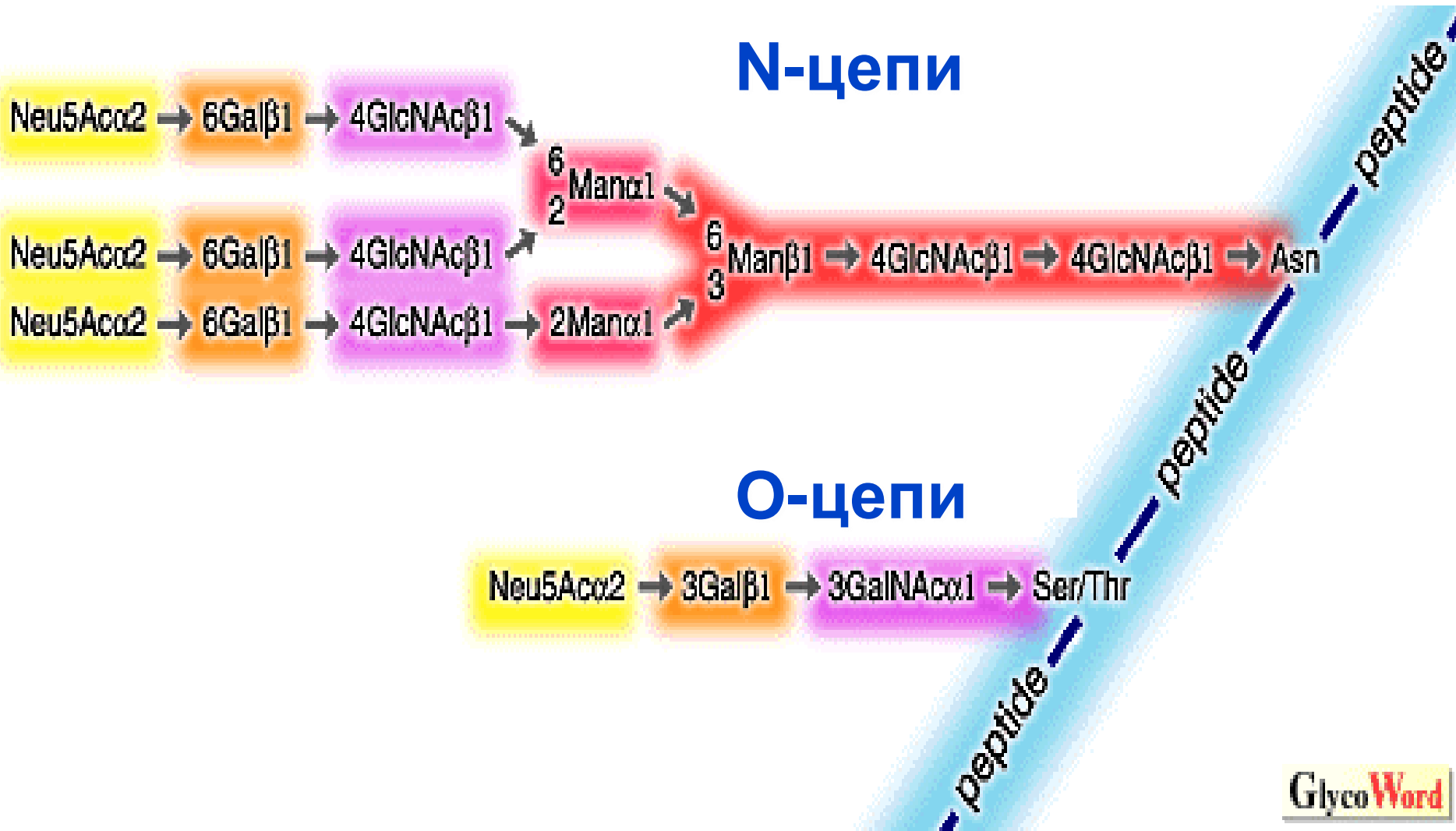
Гликопротеины

N-Цепи и O-цепи

Два главных типа цепей гликопротеинов (примеры) и узлы их присоединения к белку

6

- N-гликозидные: –GlcNAc β –Asn
- O-гликозидные: –GalNAc α –Ser/Thr

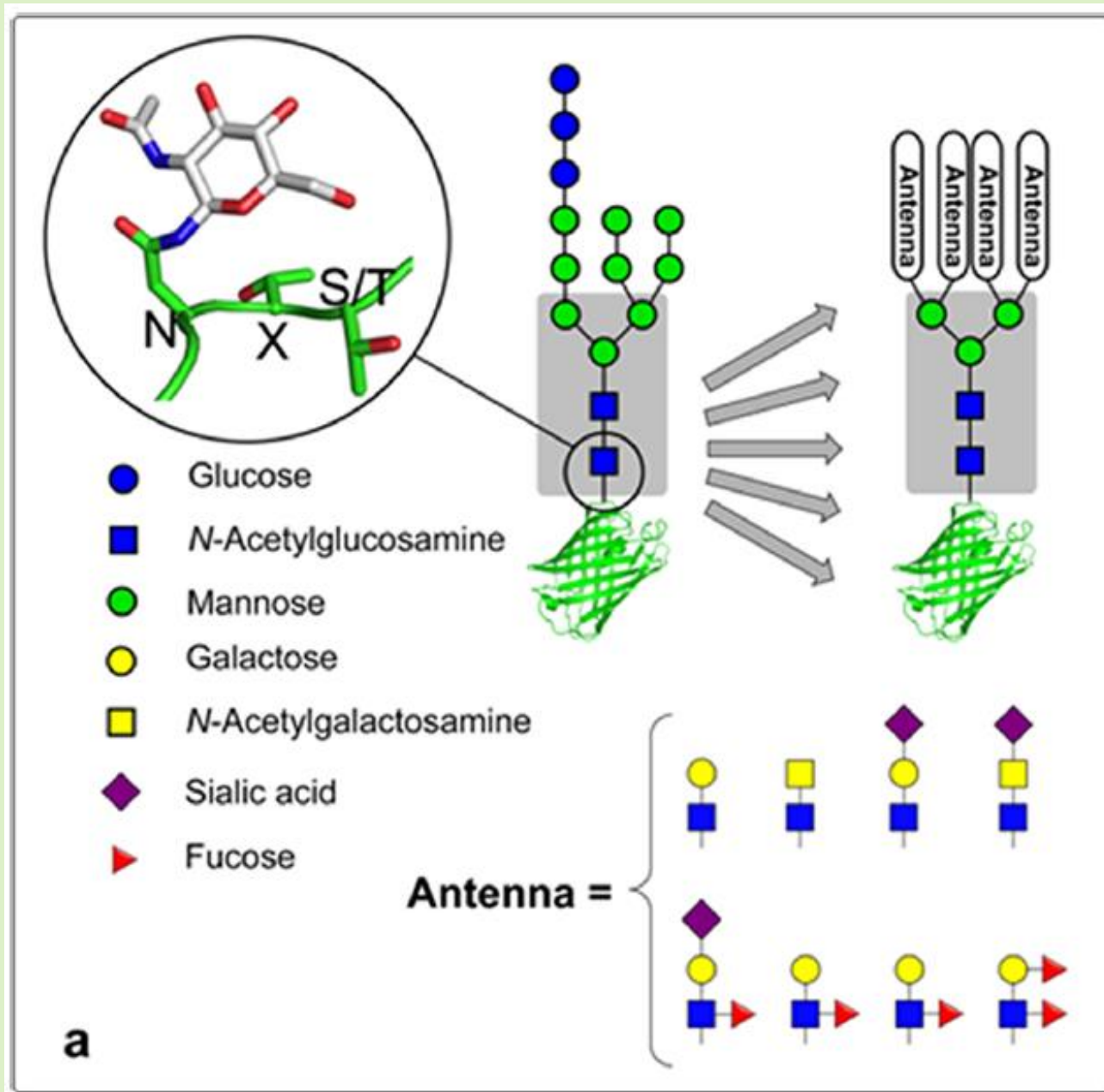


N-Цепи гликопротеинов

Структура

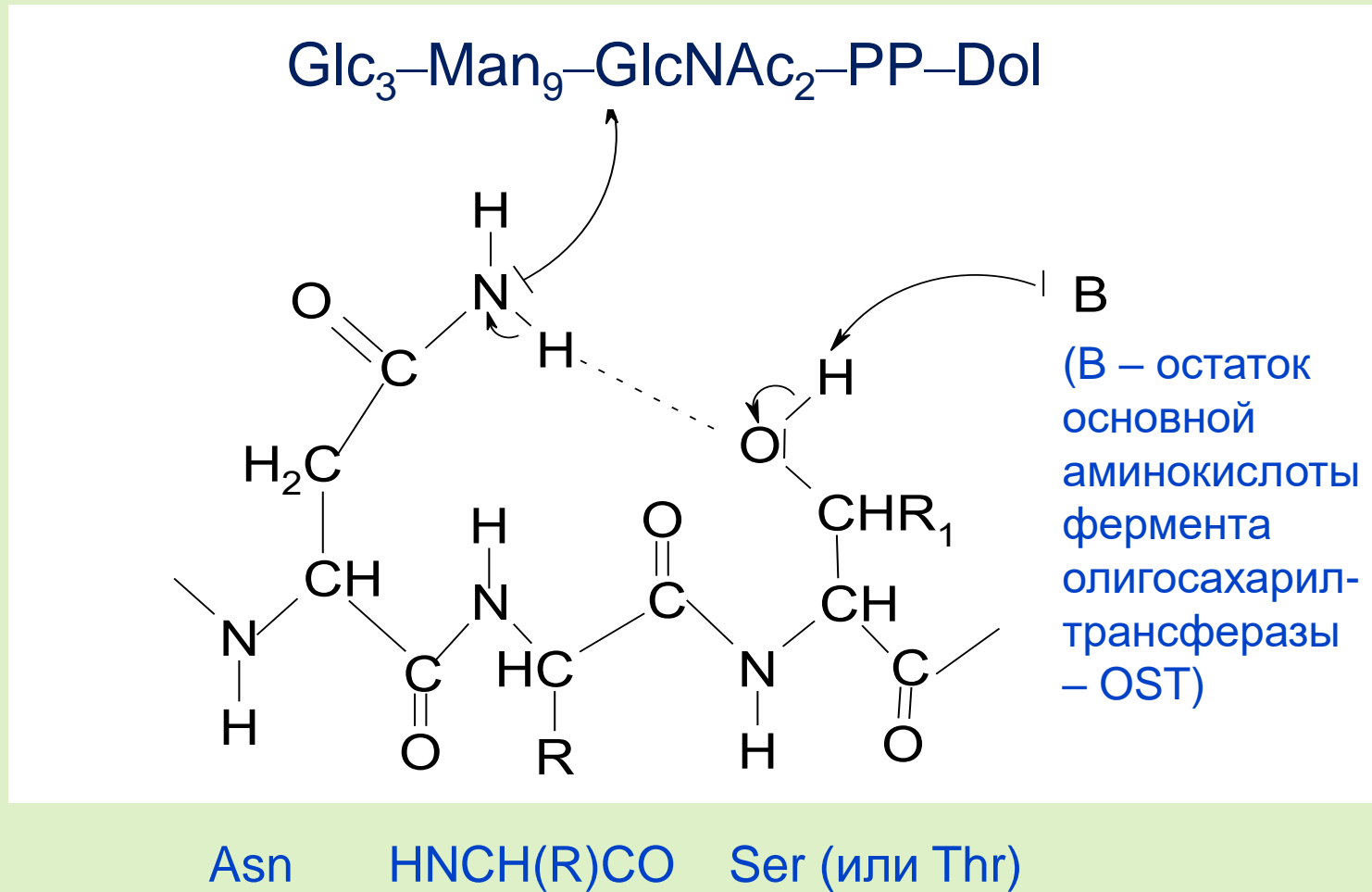
N-Цепи гликопротеинов: секвон Asn-X-Ser/Thr

8

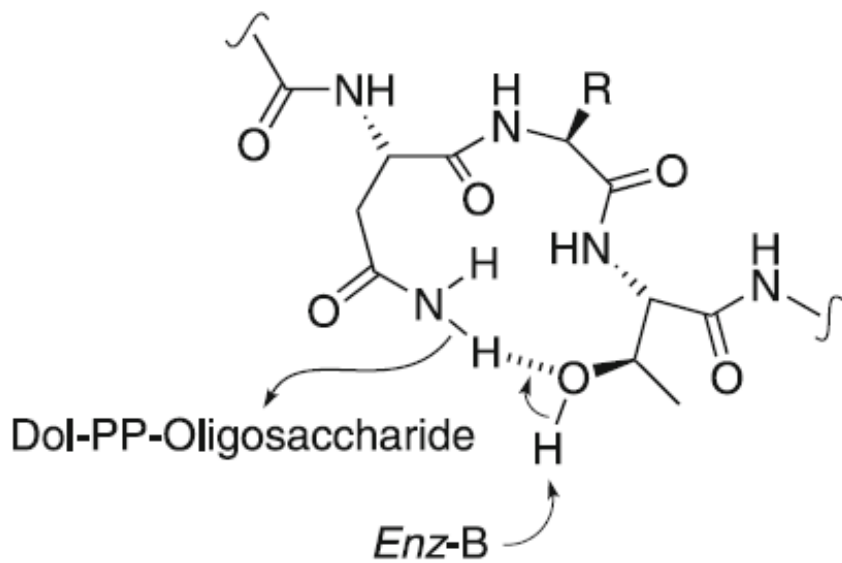
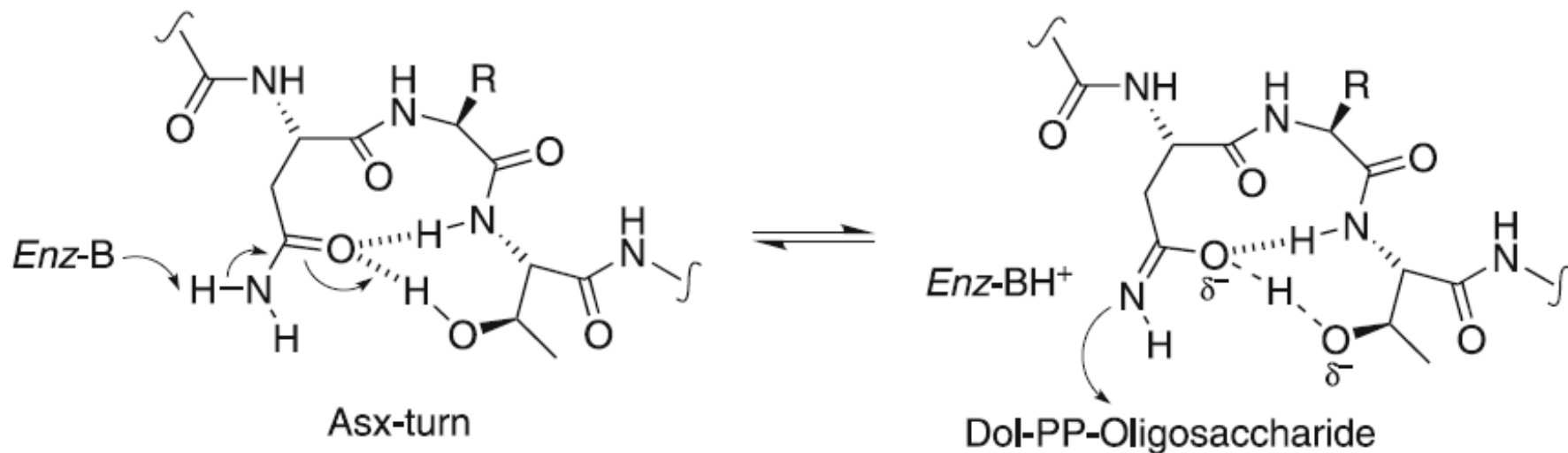


Потенциальные сайты гликозилирования

Почему гликан присоединен к Asn-X-Ser/Thr?



Механизмы активации Asn для реакции с OST 10

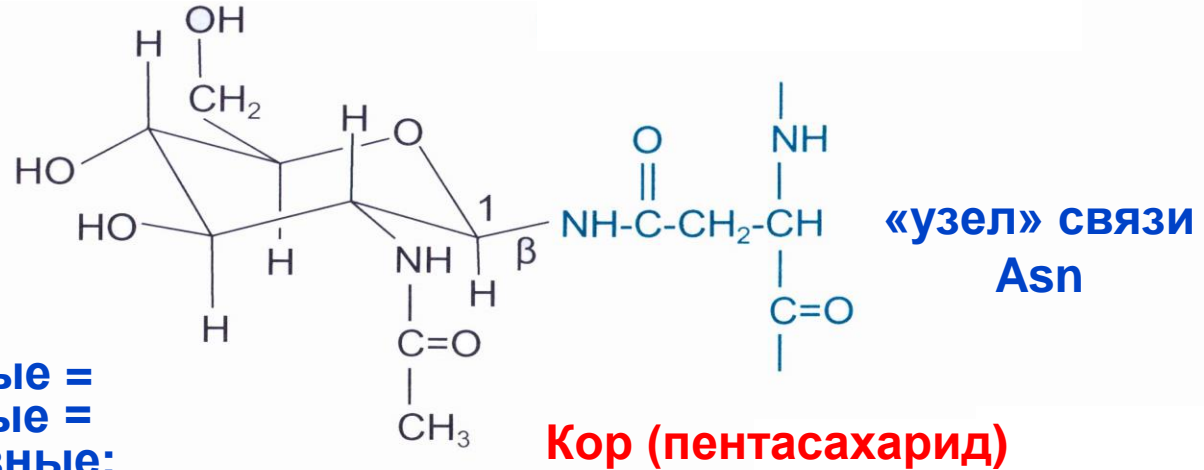


- ▶ 70% белков имеют потенциальный сайт N-гликозилирования
- ▶ у 50% белков (изученных) углеводная цепь влияет на активность

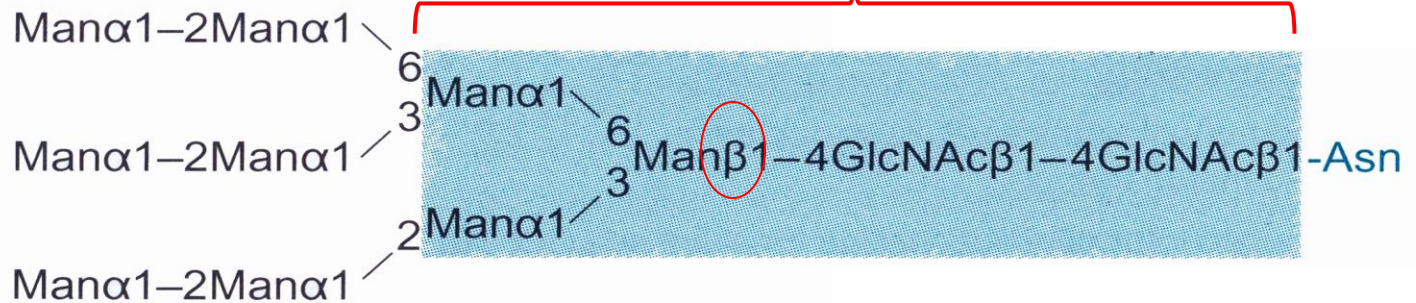
НО:

- ▶ только 5% белков классифицированы как «гликопротеины»

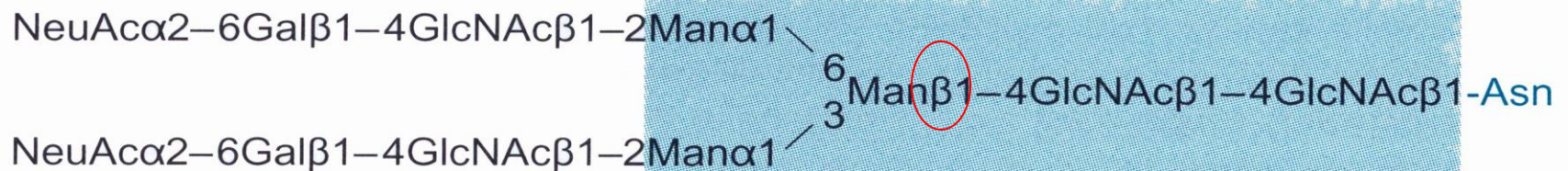
На восстанавливающем конце – GlcNAc



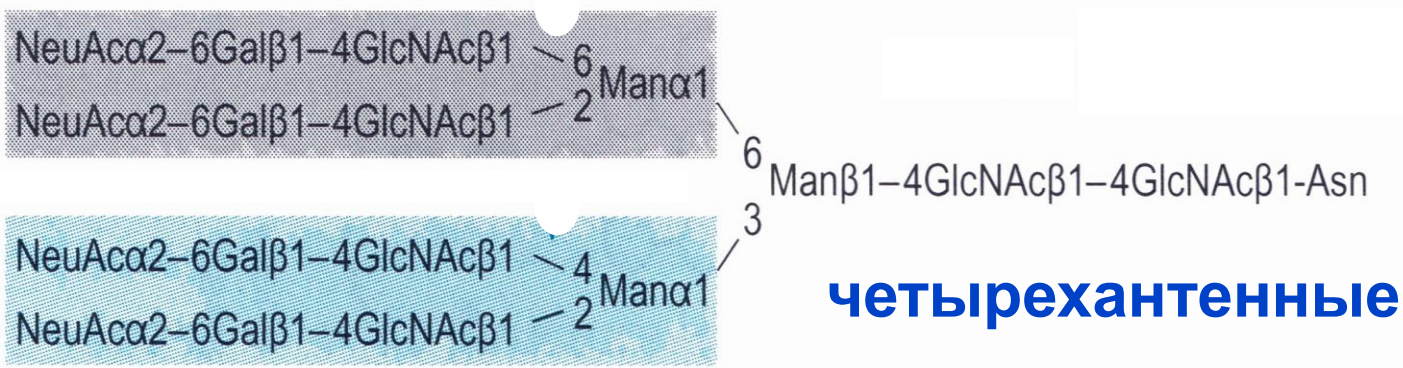
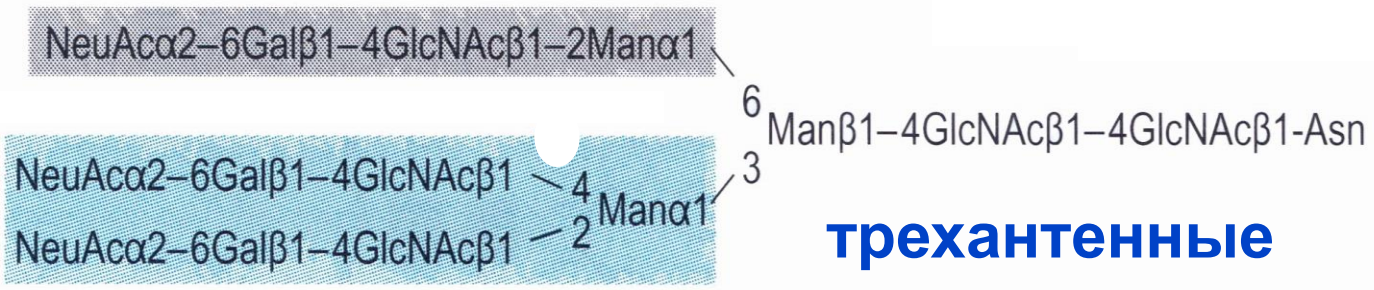
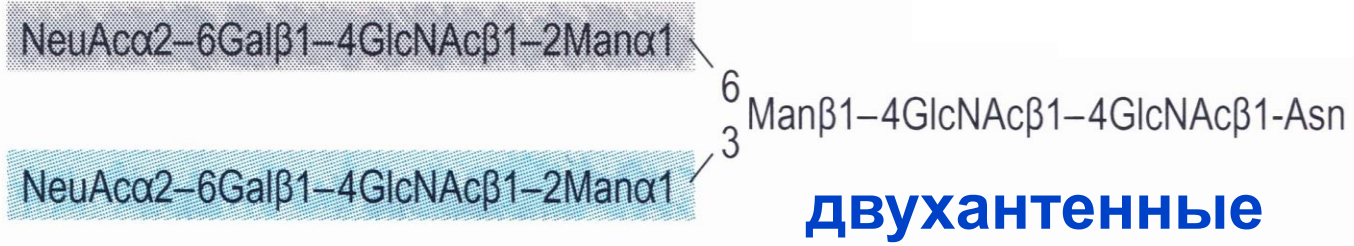
Олигоманнозные =
маннозо-богатые =
высоко-маннозные:



Комплексные:



«Антенность» N-цепей (комплексные цепи)

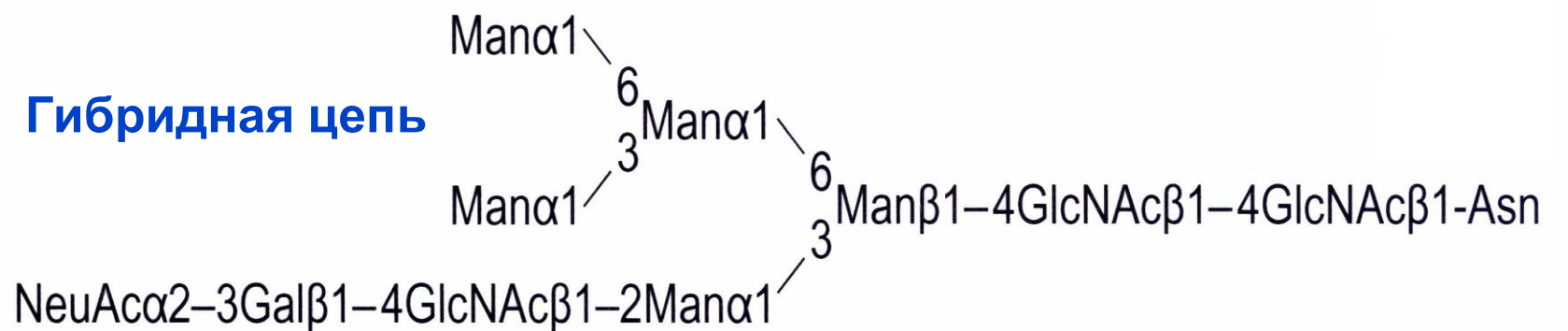


... и ещё большее разнообразие





















Neu5Ac α 2-3/6
Neu5Gc
(Neu5Ac)₀₋₁

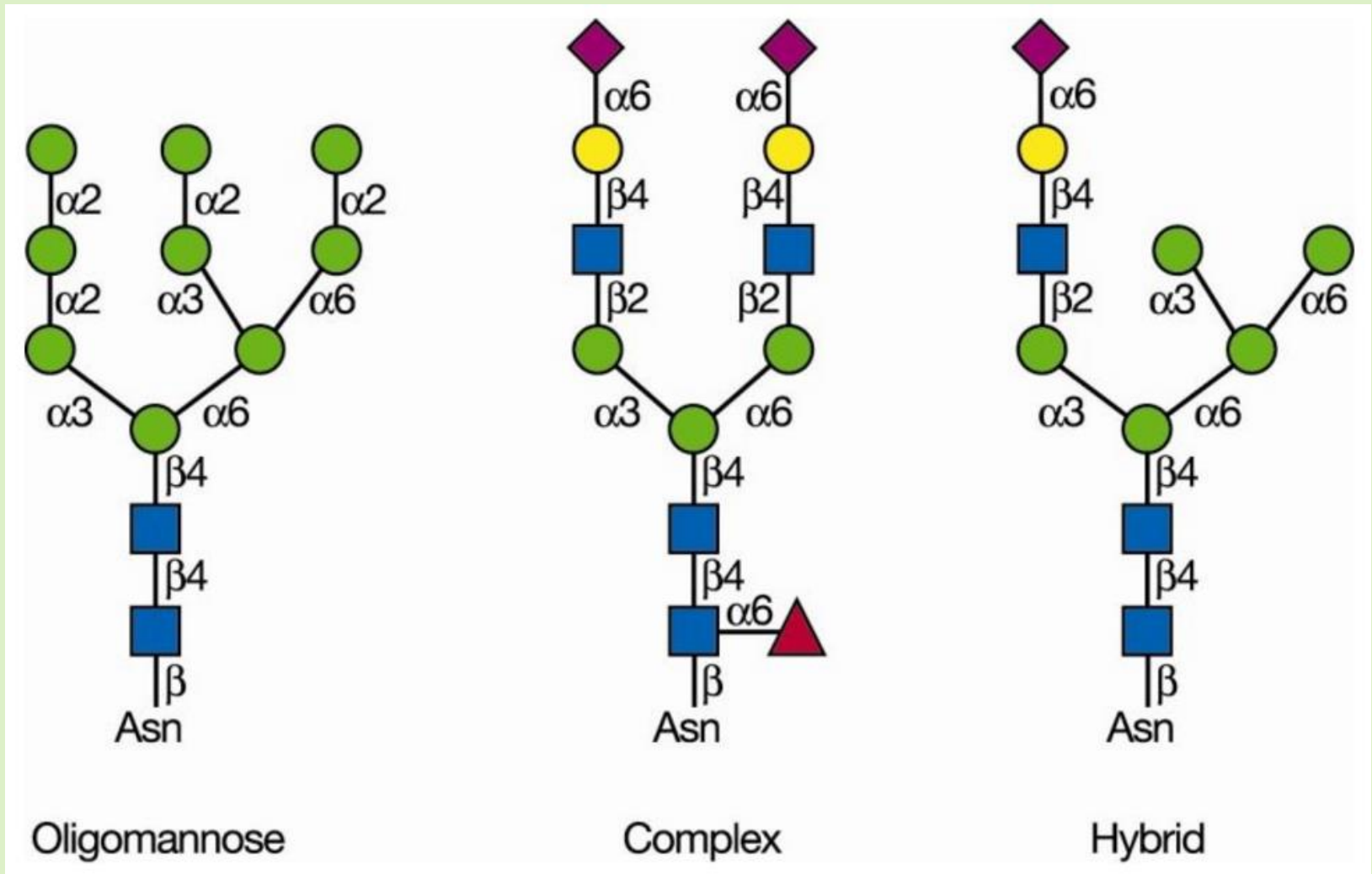
... плюс декорирование
сульфатом, фосфатом,
ацетатом и т.д.



Символы моносахаридов (новая система)

15

 Galactose (Gal)	 Xylose (Xyl)
 <i>N</i> -Acetylgalactosamine (GalNAc)	 <i>N</i> -Acetylneuraminic acid (Neu5Ac)
 Galactosamine (GalN)	 <i>N</i> -Glycolylneuraminic acid (Neu5Gc)
 Glucose (Glc)	 2-Keto-3-deoxynononic acid (Kdn)
 <i>N</i> -Acetylglucosamine (GlcNAc)	 Fucose (Fuc)
 Glucosamine (GlcN)	 Glucuronic acid (GlcA)
 Mannose (Man)	 Iduronic acid (IdoA)
 <i>N</i> -Acetylmannosamine (ManNAc)	 Galacturonic acid (GalA)
 Mannosamine (ManN)	 Mannuronic acid (ManA)



Oligomannose

Complex

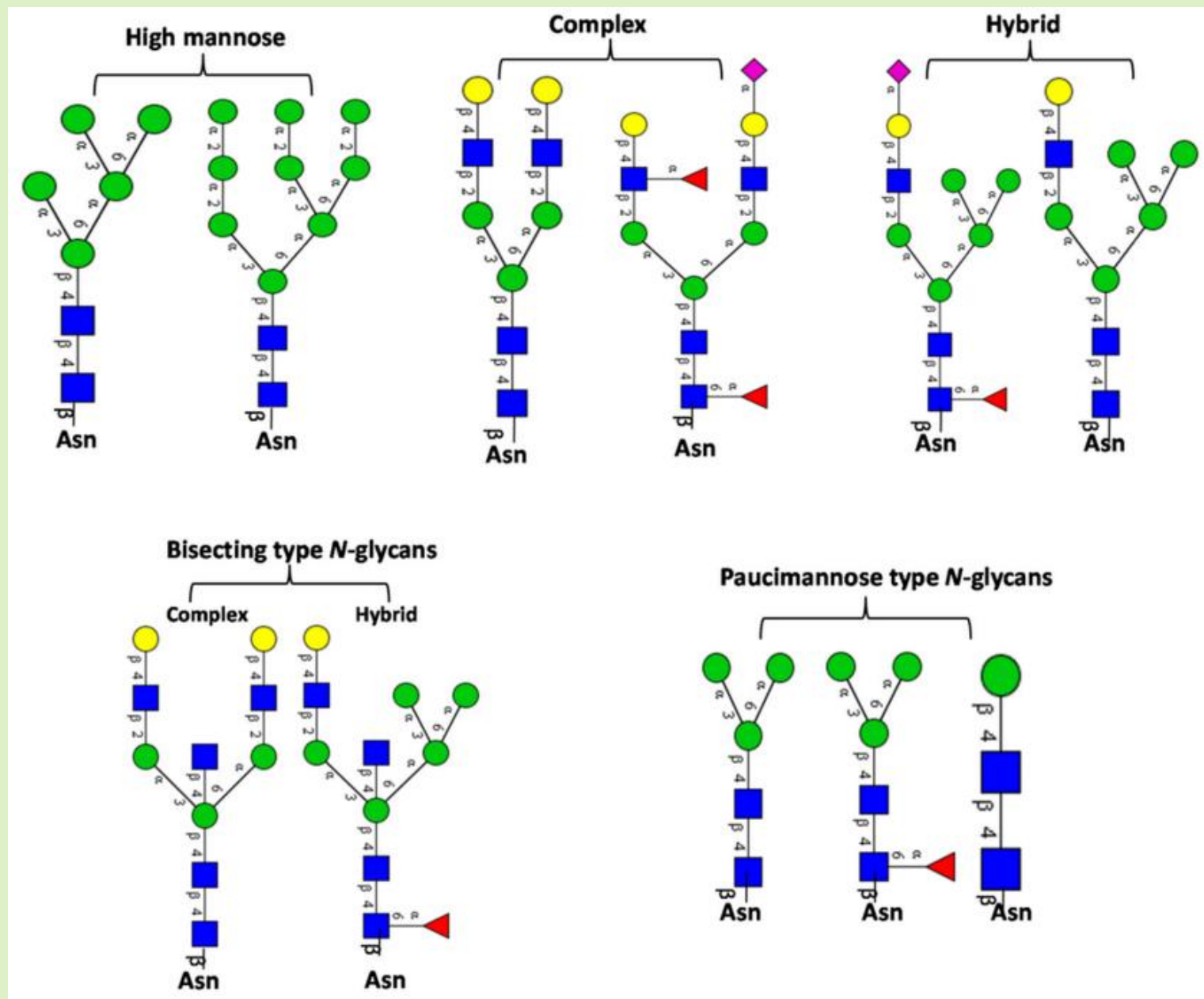
Hybrid

Олигоманнозные

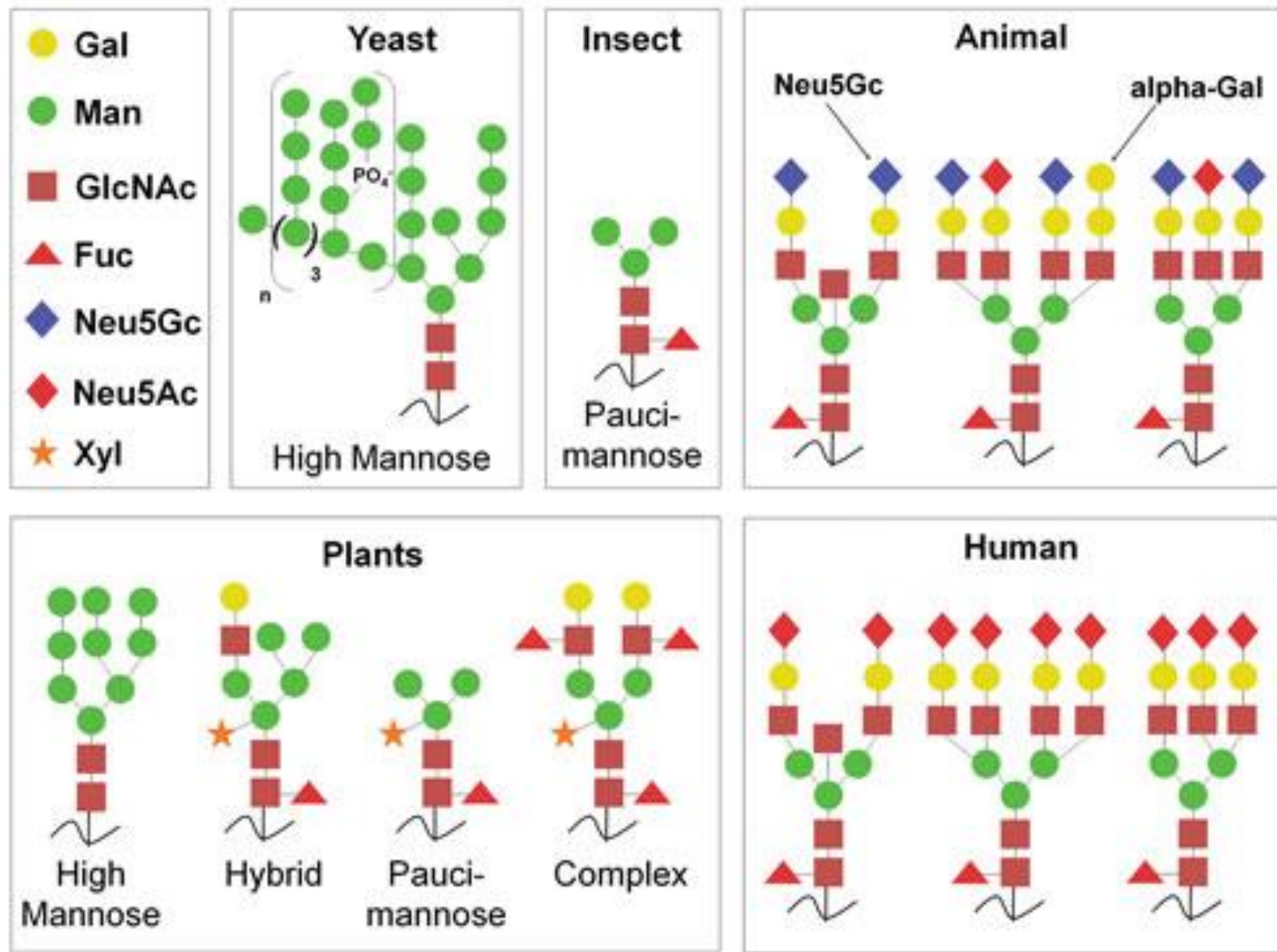
Комплексные

Гибридные

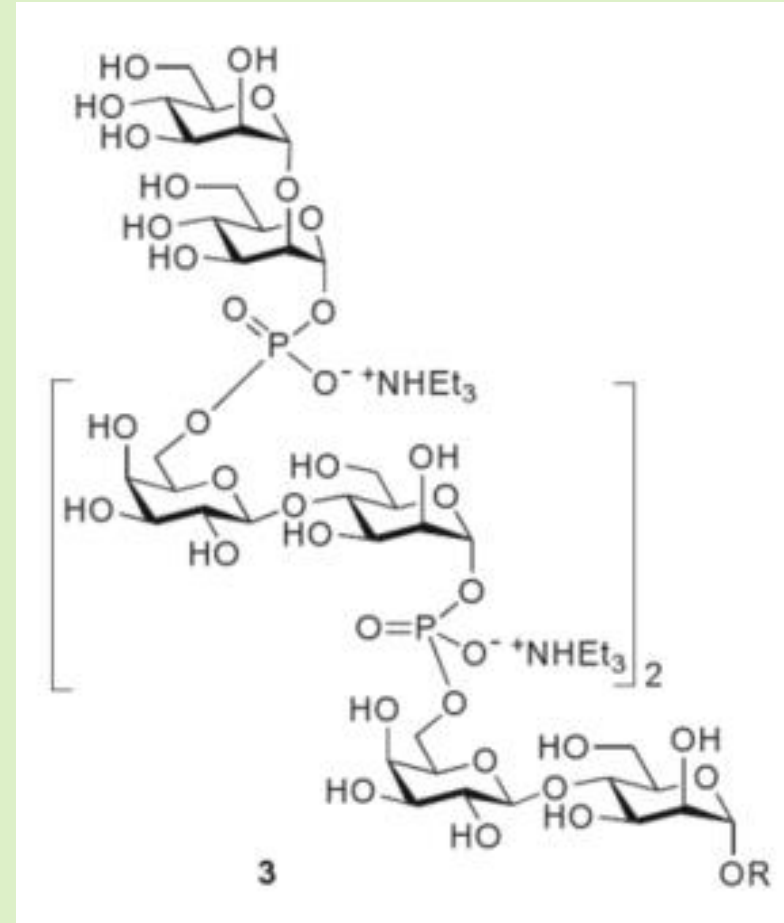
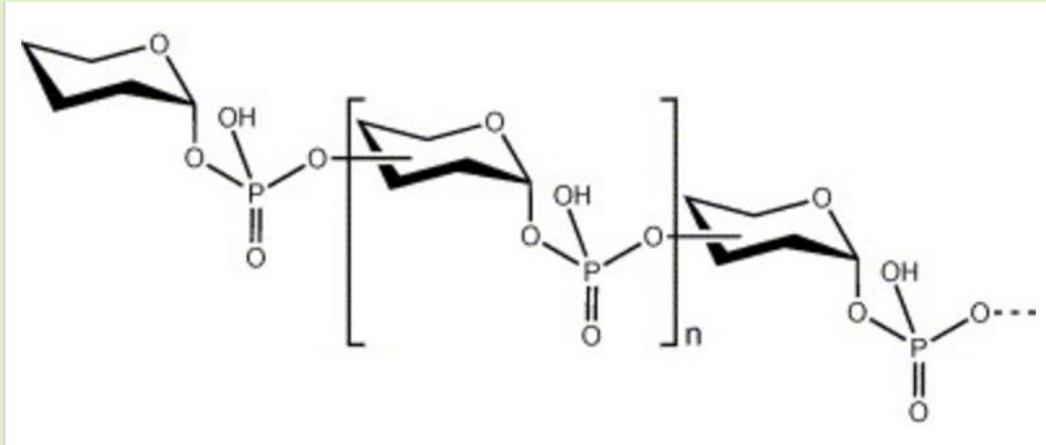
«Все» типы N-цепей гликанов



Варианты N-цепей гликанов (различия)

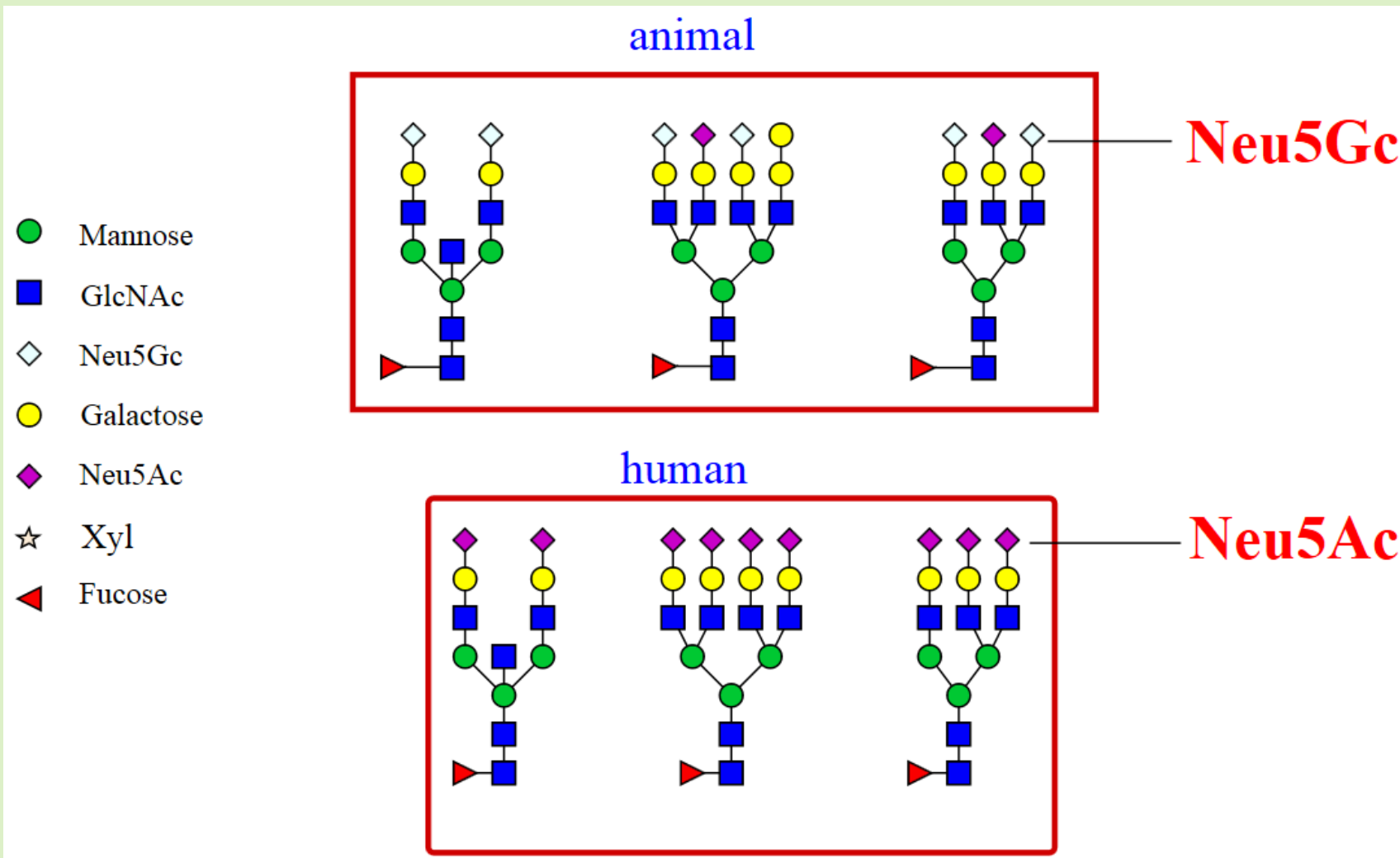


Фосфодиэфирная межсахаридная связь (дрожжи)



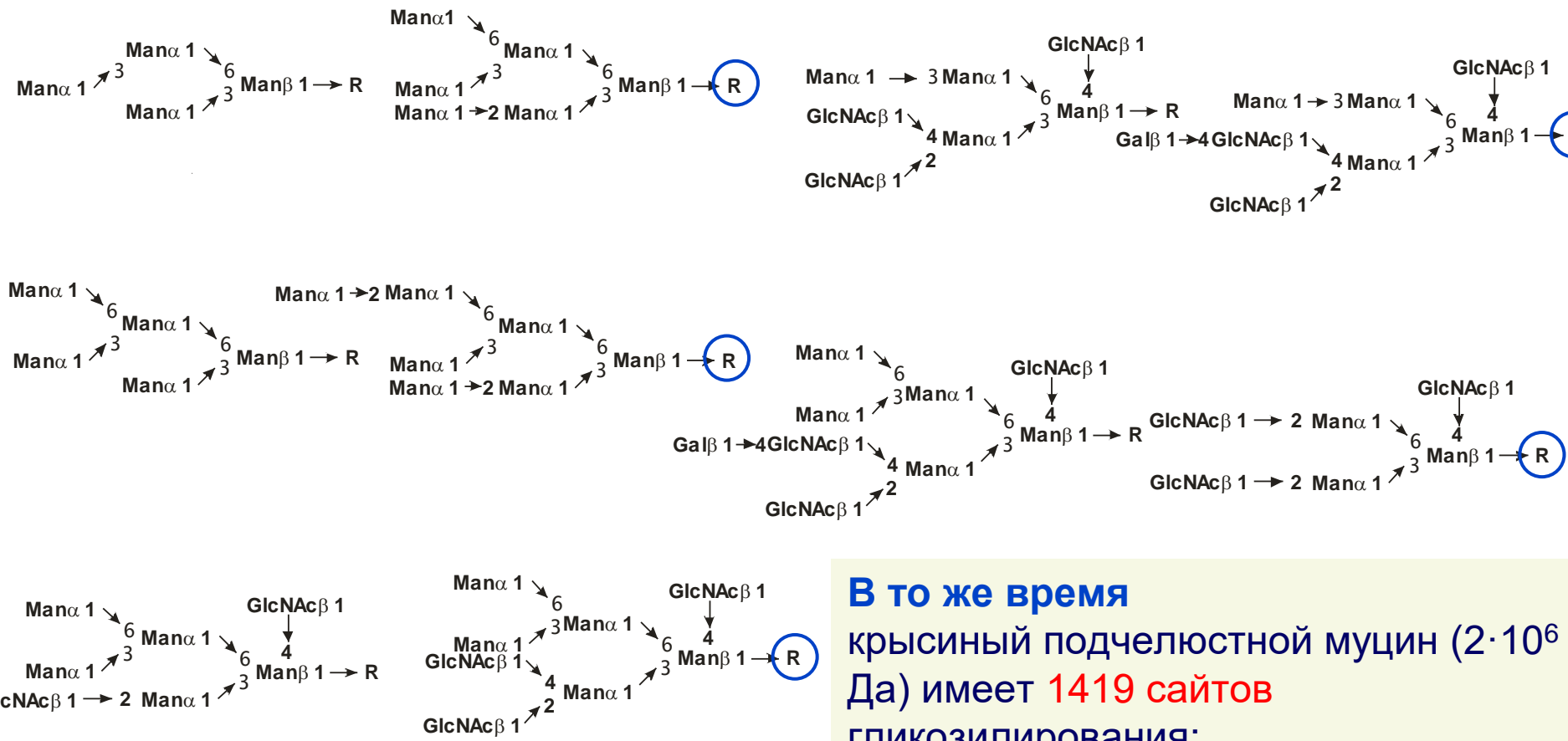
Чем человек отличается от животных?

Neu5Ac, но не Neu5Gc



Гетерогенность цепей на примере овальбумина: гликоформы белка 21

Только один сайт гликозилирования

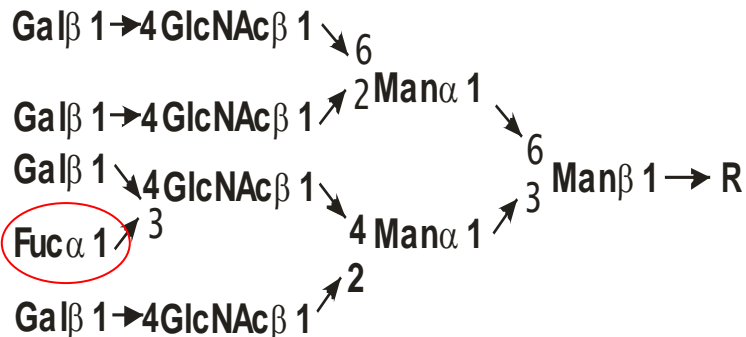
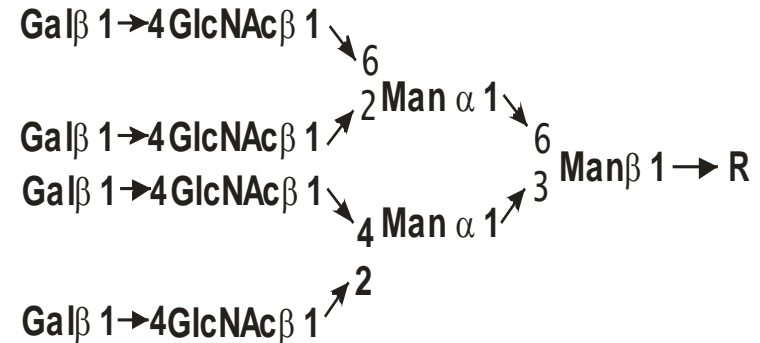
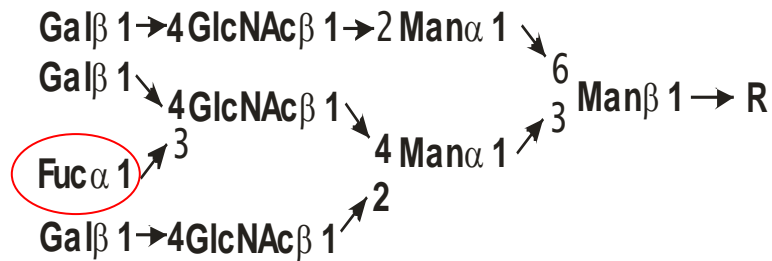
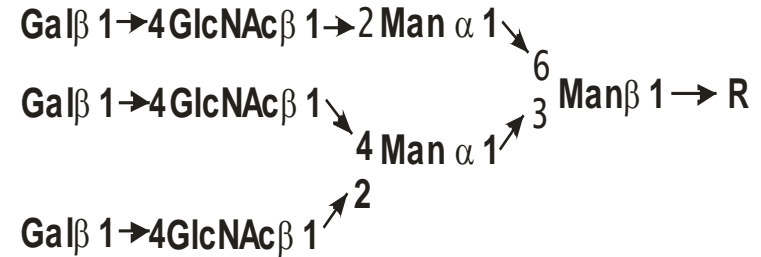
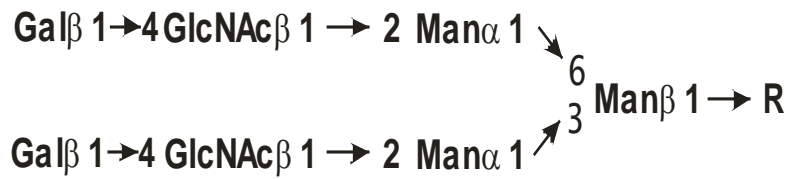


R = GlcNAcβ1-4GlcNAc-Asn

В то же время крысиный подчелюстной муцин ($2 \cdot 10^6$ Да) имеет **1419 сайтов** гликозилирования:

- **1342** O-гликана одного вида и
- **77** N-гликанов одинаковой структуры

N-цепи α 1-кислого гликопротеина (показаны десиалилированные гликаны)



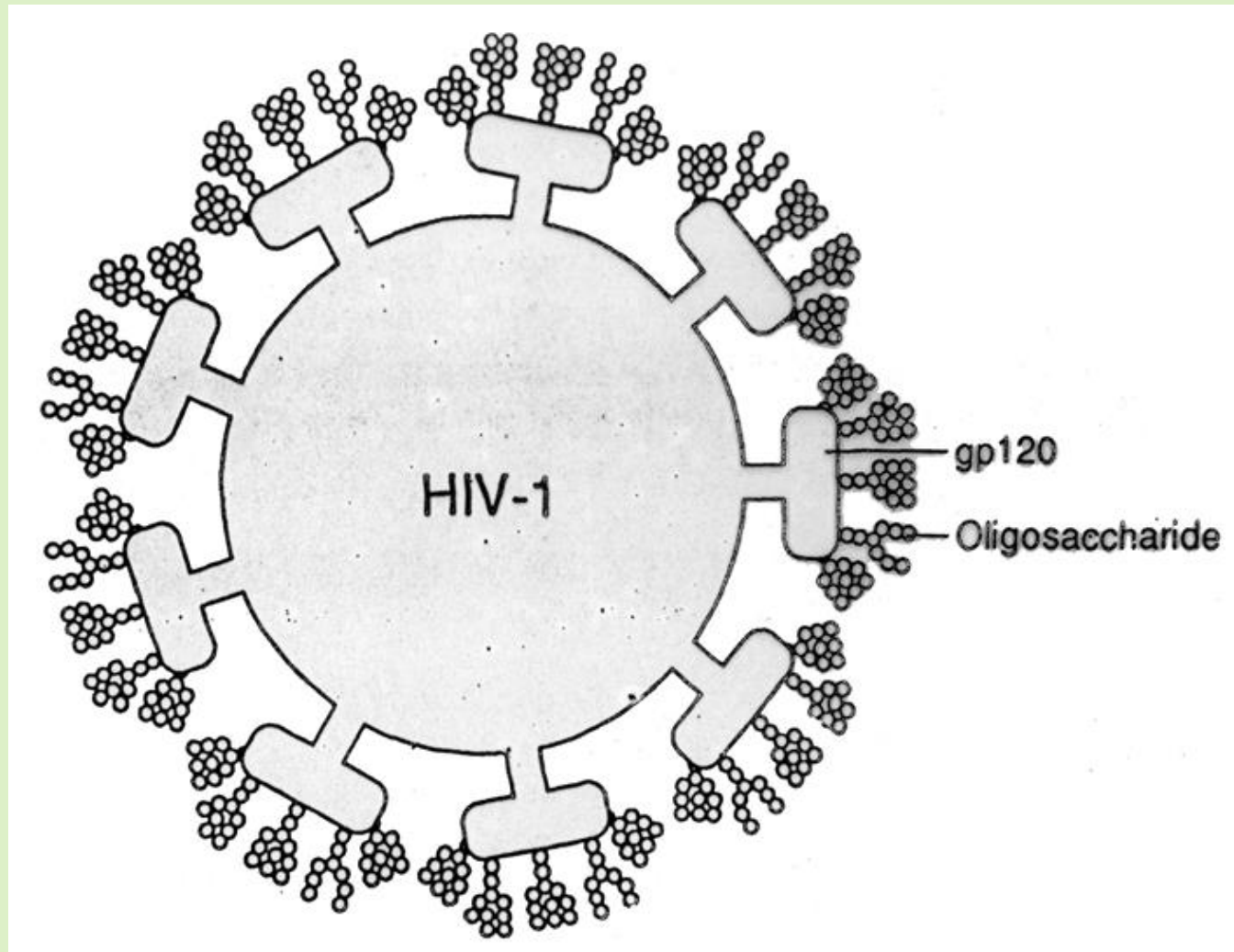
**Пять сайтов
гликозилирования:
в каждом – свой набор
гликанов**

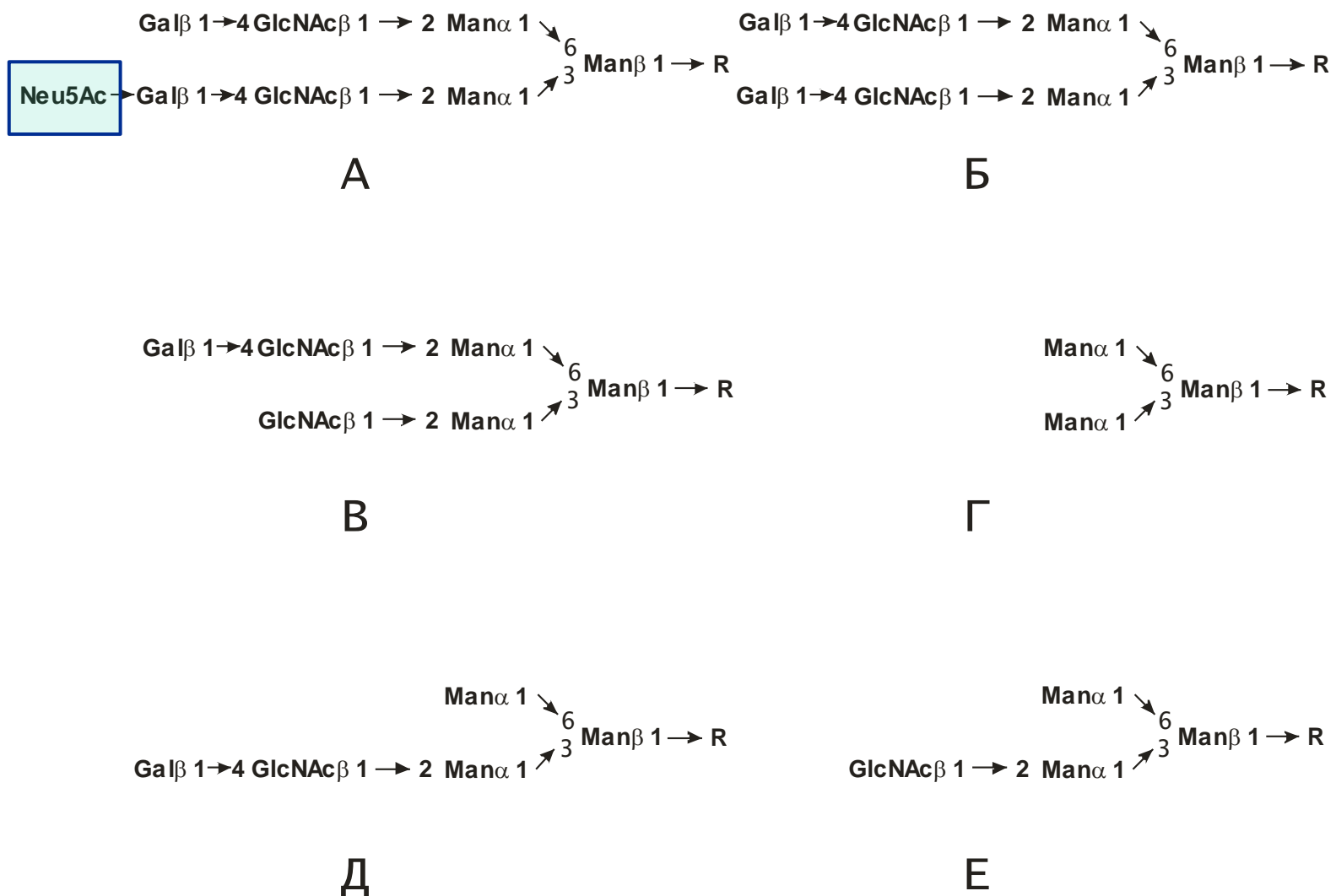
R = GlcNAc β 1-4GlcNAc-Asn

Гетерогенность GP120 ВИЧ (HIV-1)

более 90 видов цепей

23





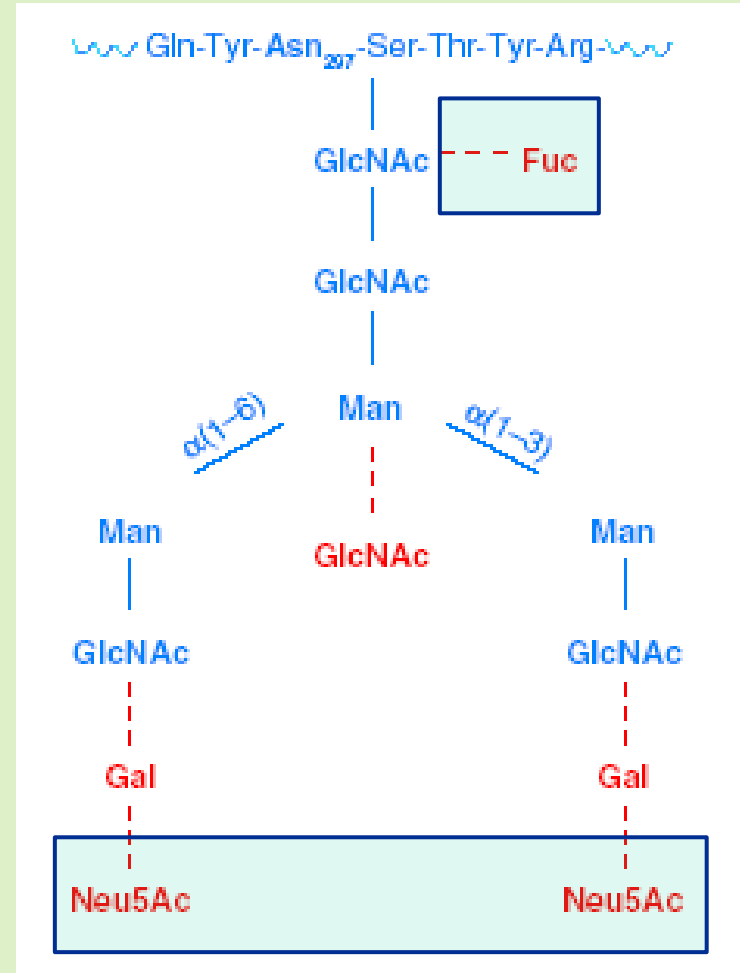
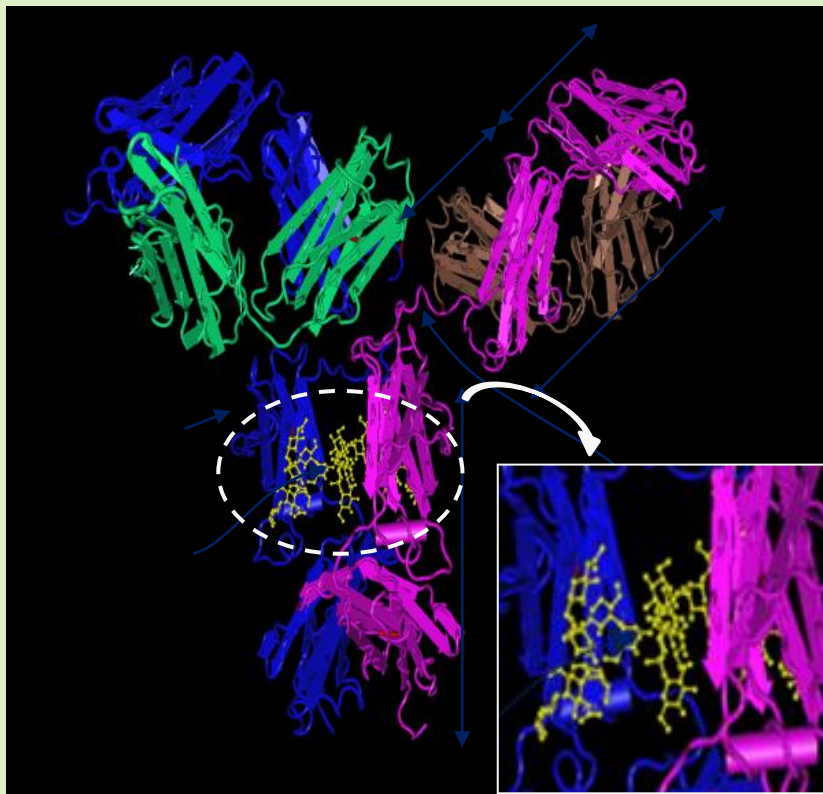
А также аналогичные бисектные цепи

**R = GlcNAcβ1-4GlcNAc-Asn или GlcNAcβ1-4GlcNAc-Asn
Fucα1-6**

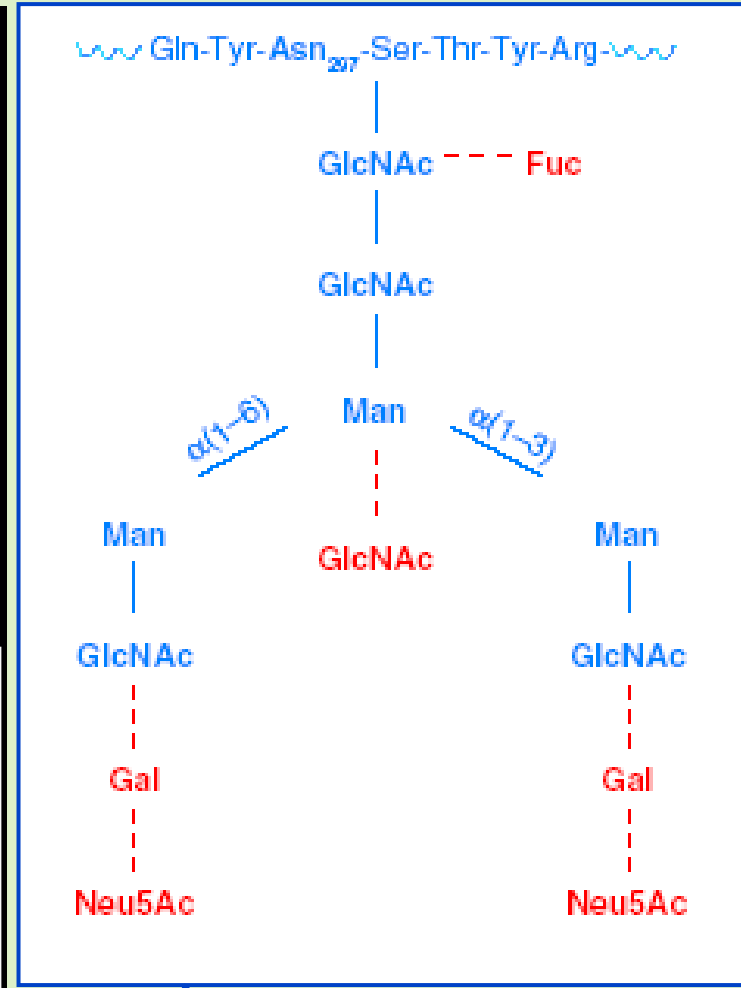
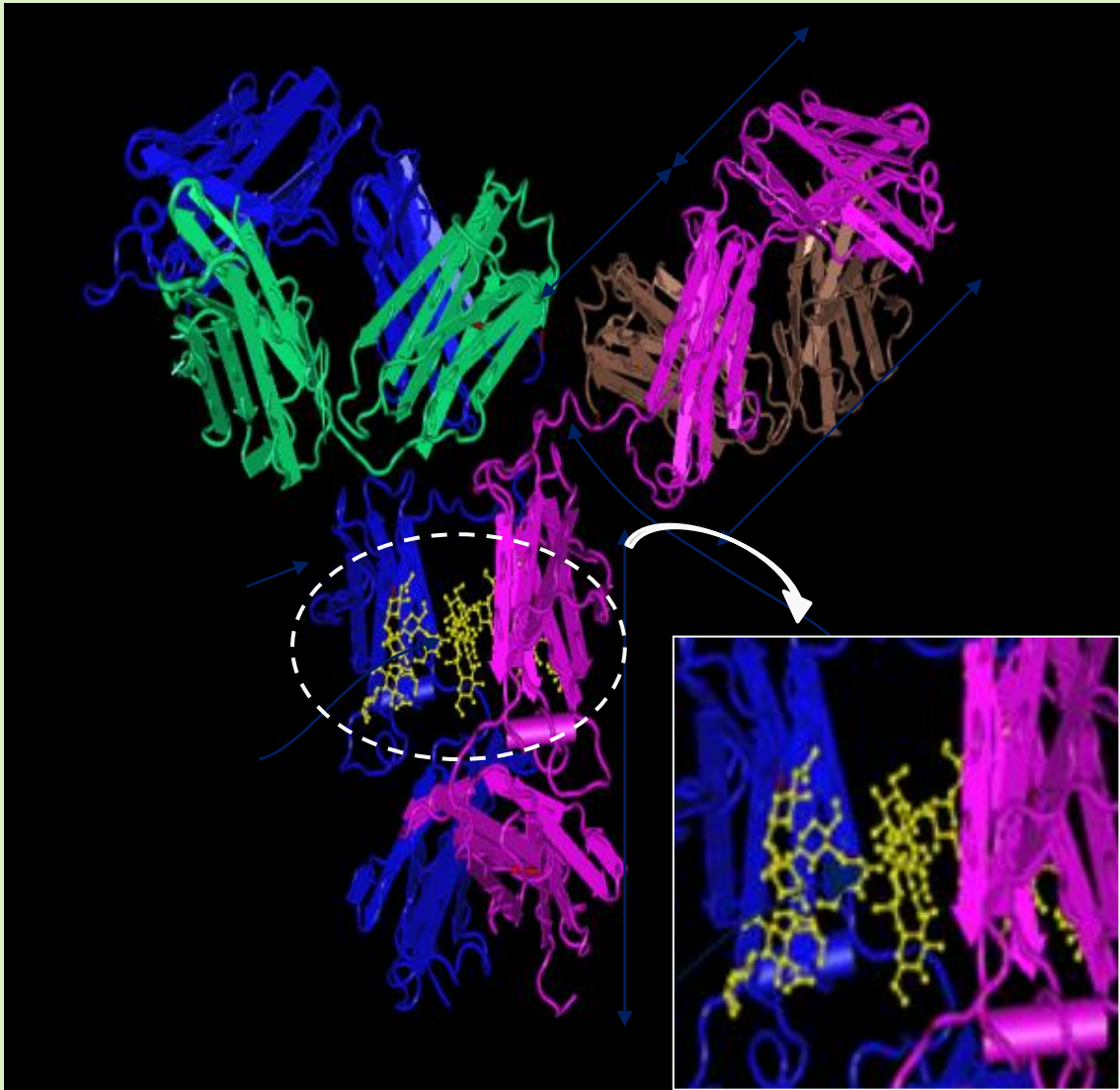
N-цепи иммуноглобулина IgG человека

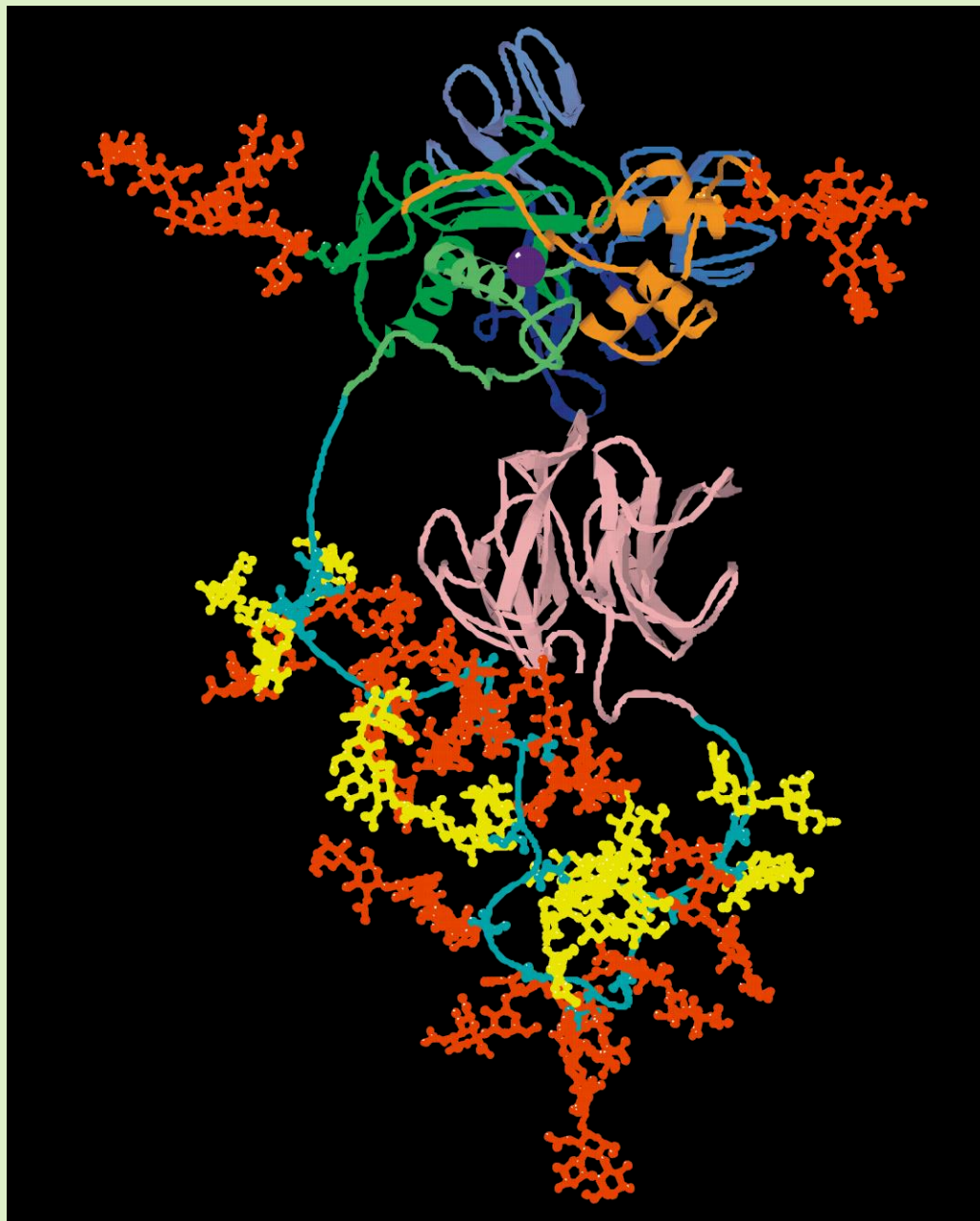
Только вариант без фукозы взаимодействует с цитотоксичными клетками

Противовоспалительный эффект Neu5Ac-варианта



Необычная топография N-цепей IgG человека 26



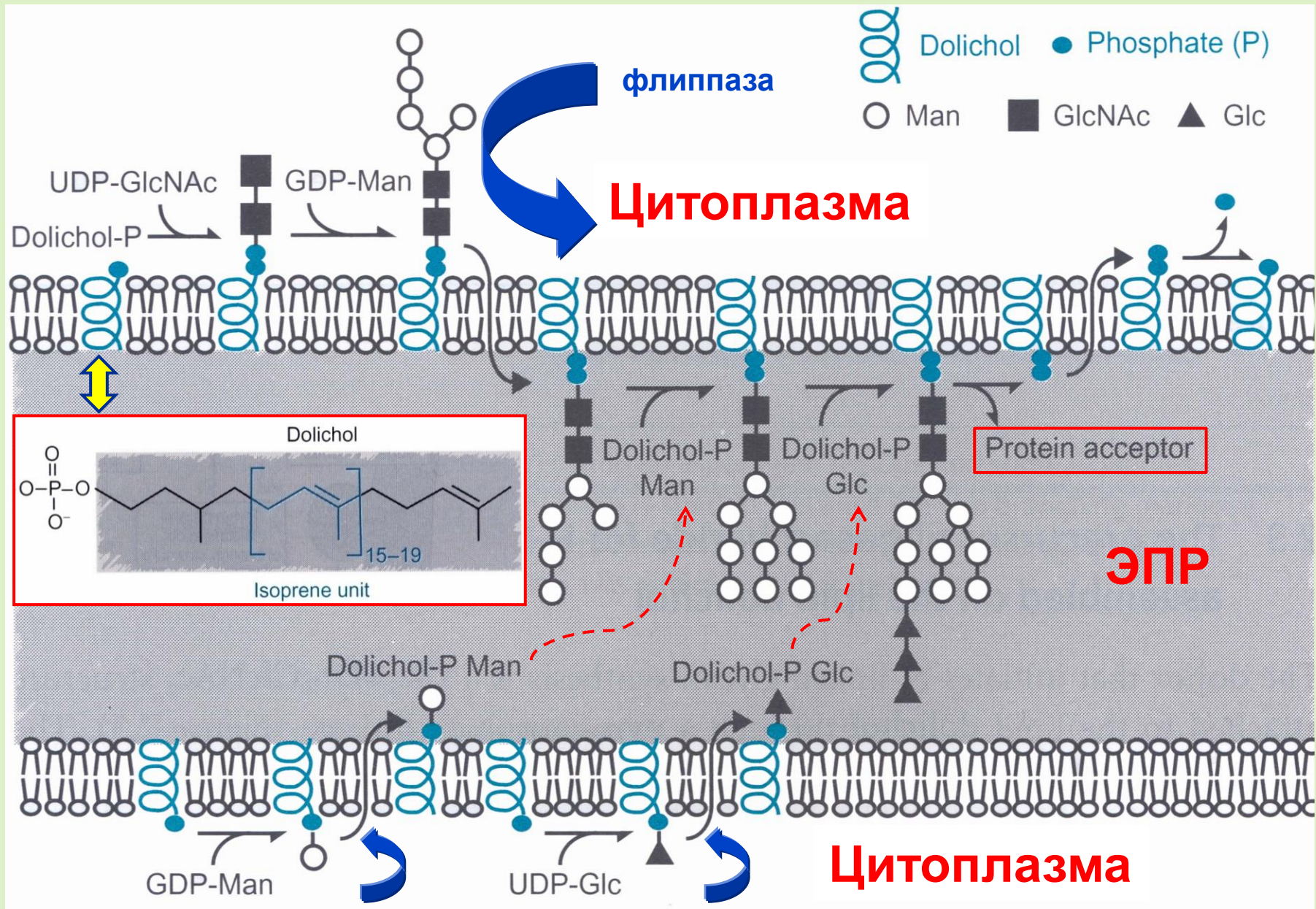


N-Цепи гликопротеинов

Биосинтез

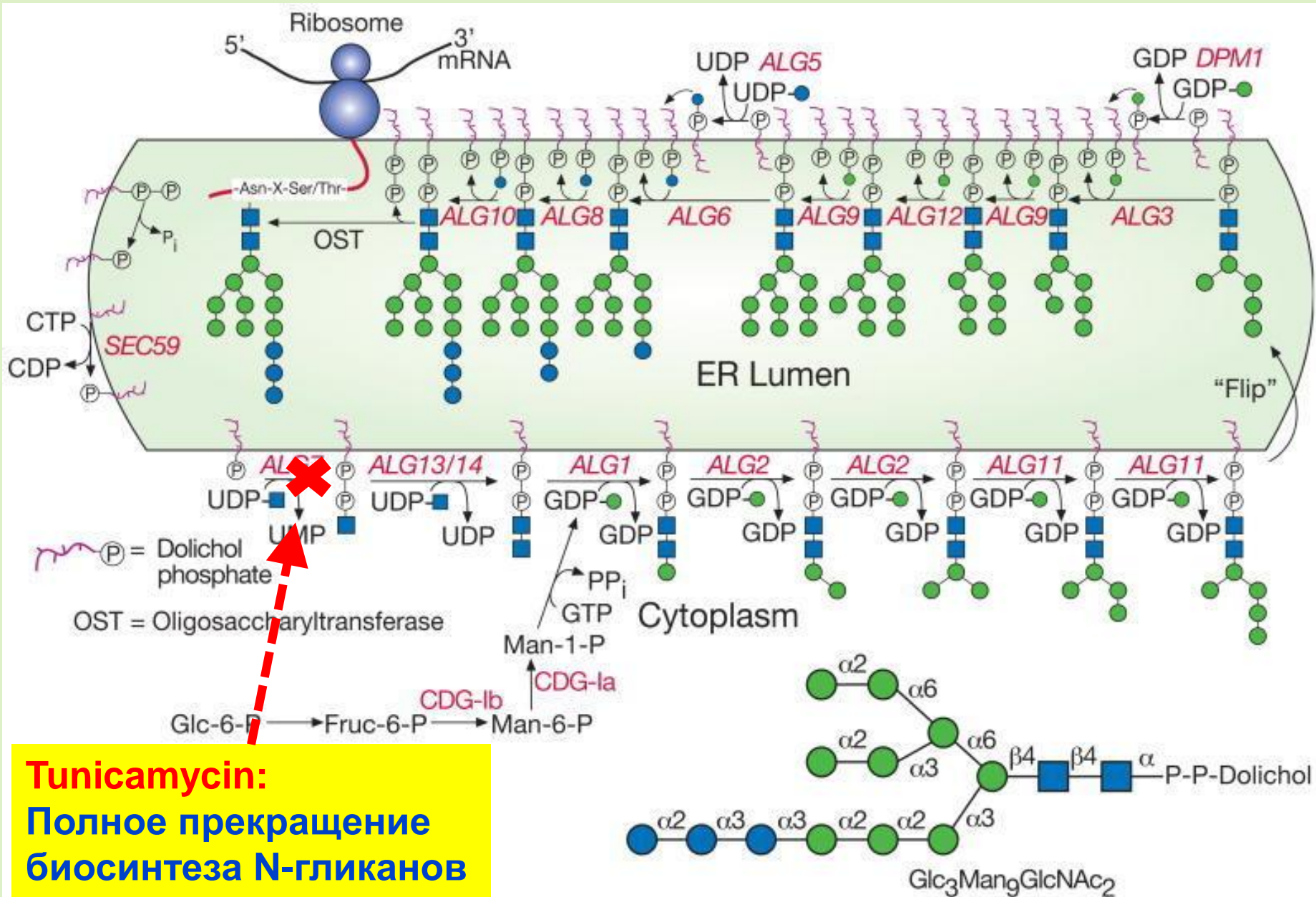
Сборка 14-сахаридного предшественника

Синтез 14-OS предшественника N-гликана в ЭПР: сумасшедший «флип-флоп» 29



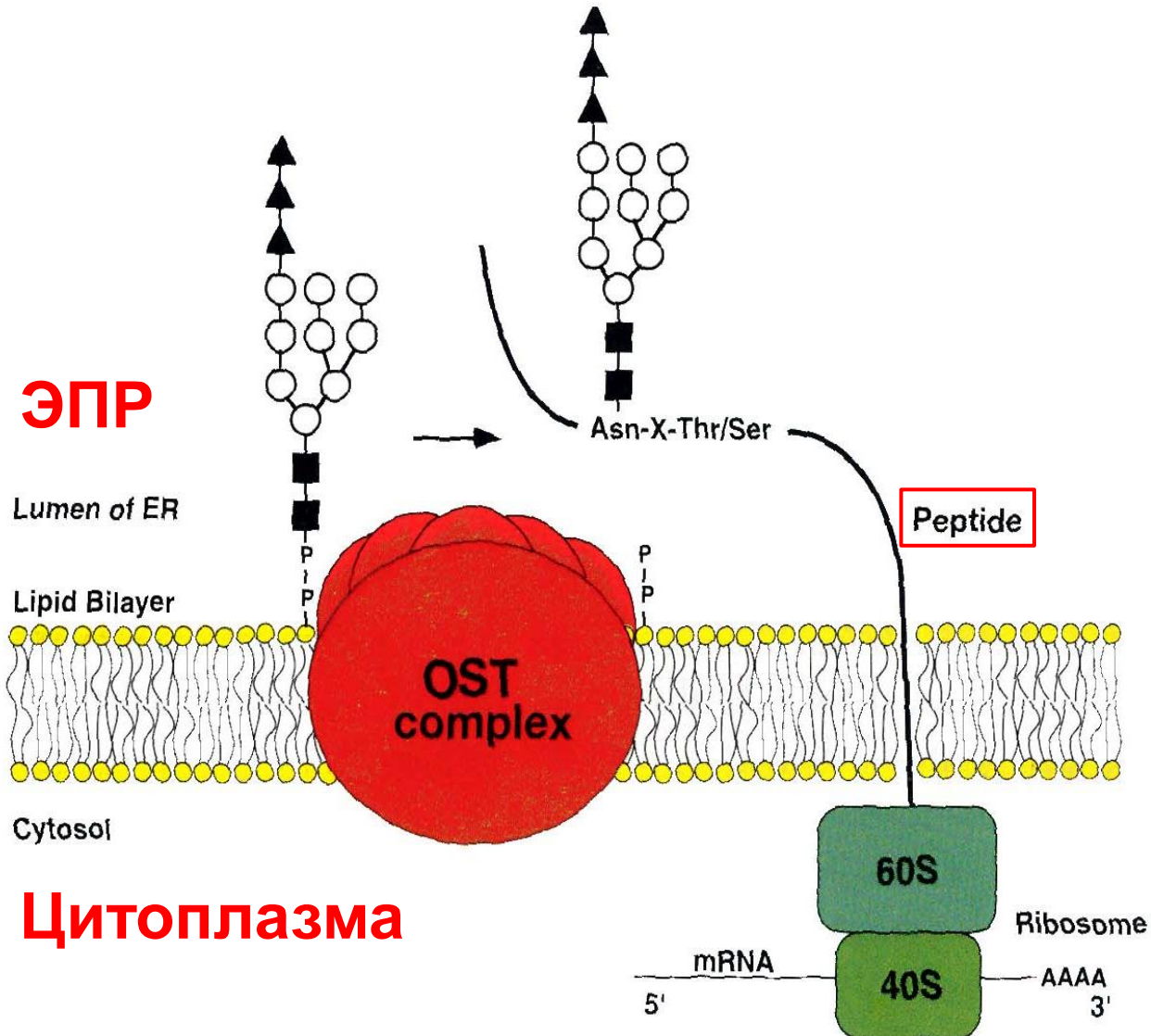
Детали биосинтеза $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$

30



Предшественник N-цепи (14-OS) переносится на Asn растущей полипептидной цепи целиком

31

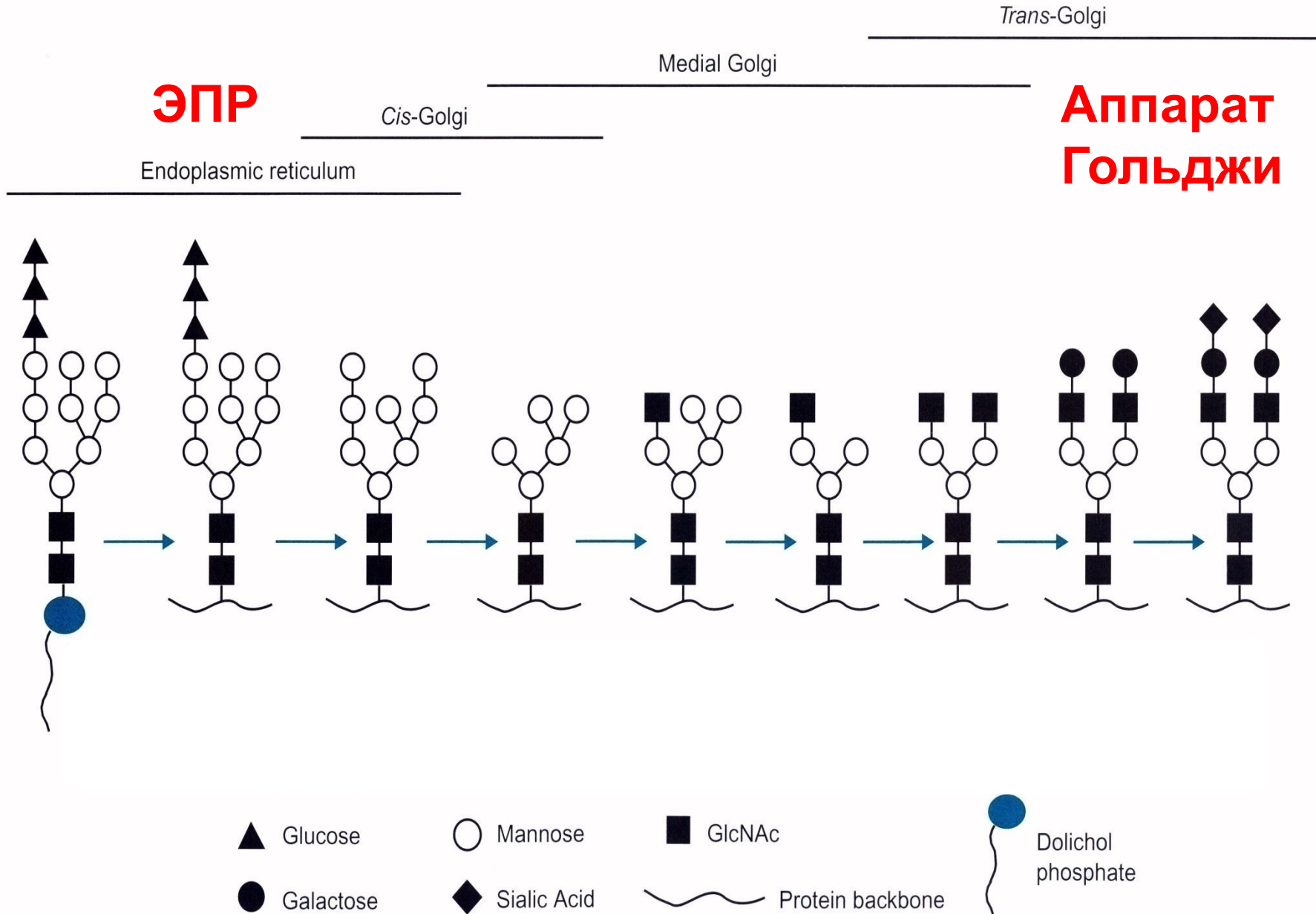


N-Цепи гликопротеинов

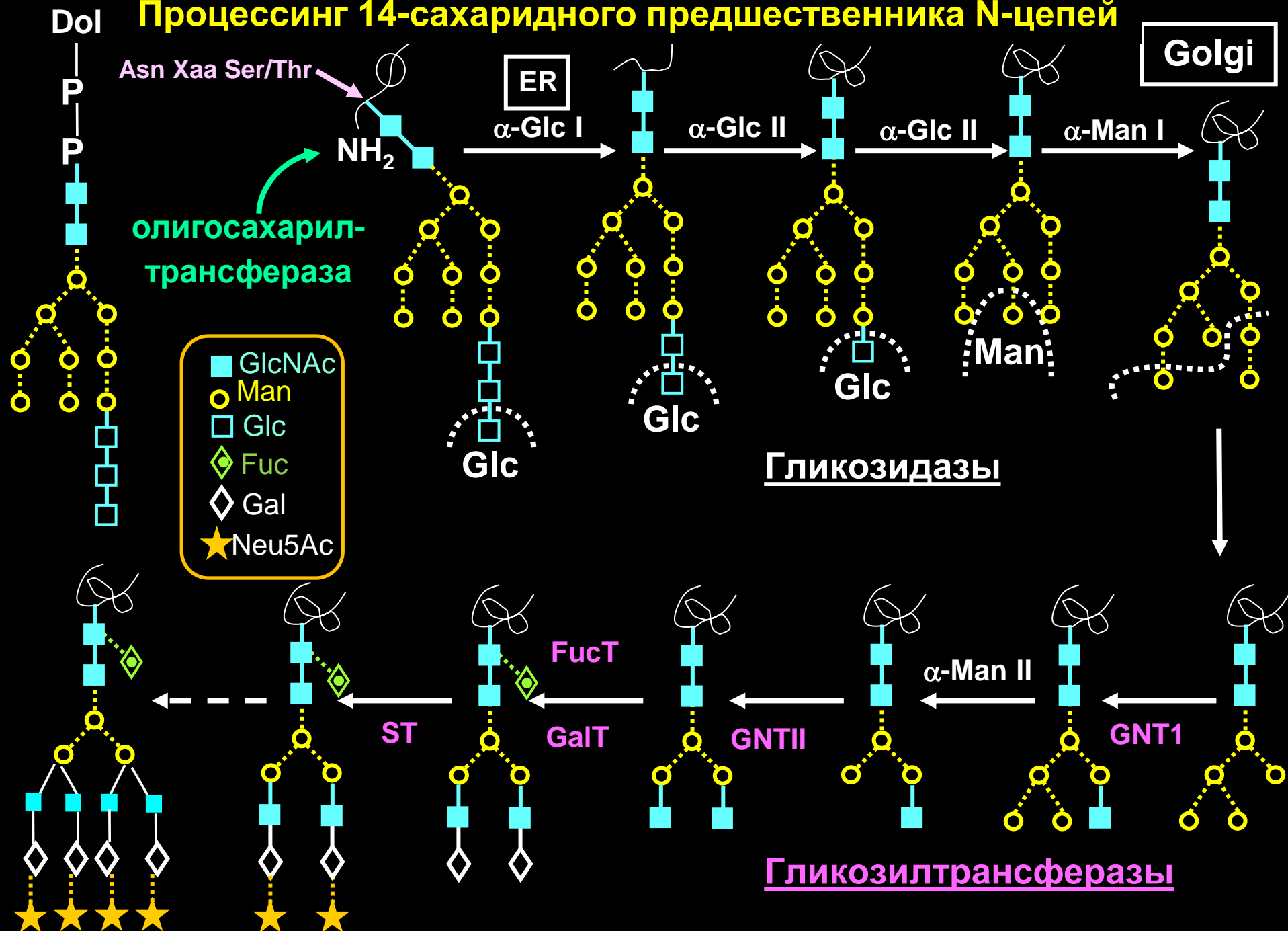
Биосинтез

Процессинг 14-сахаридного предшественника

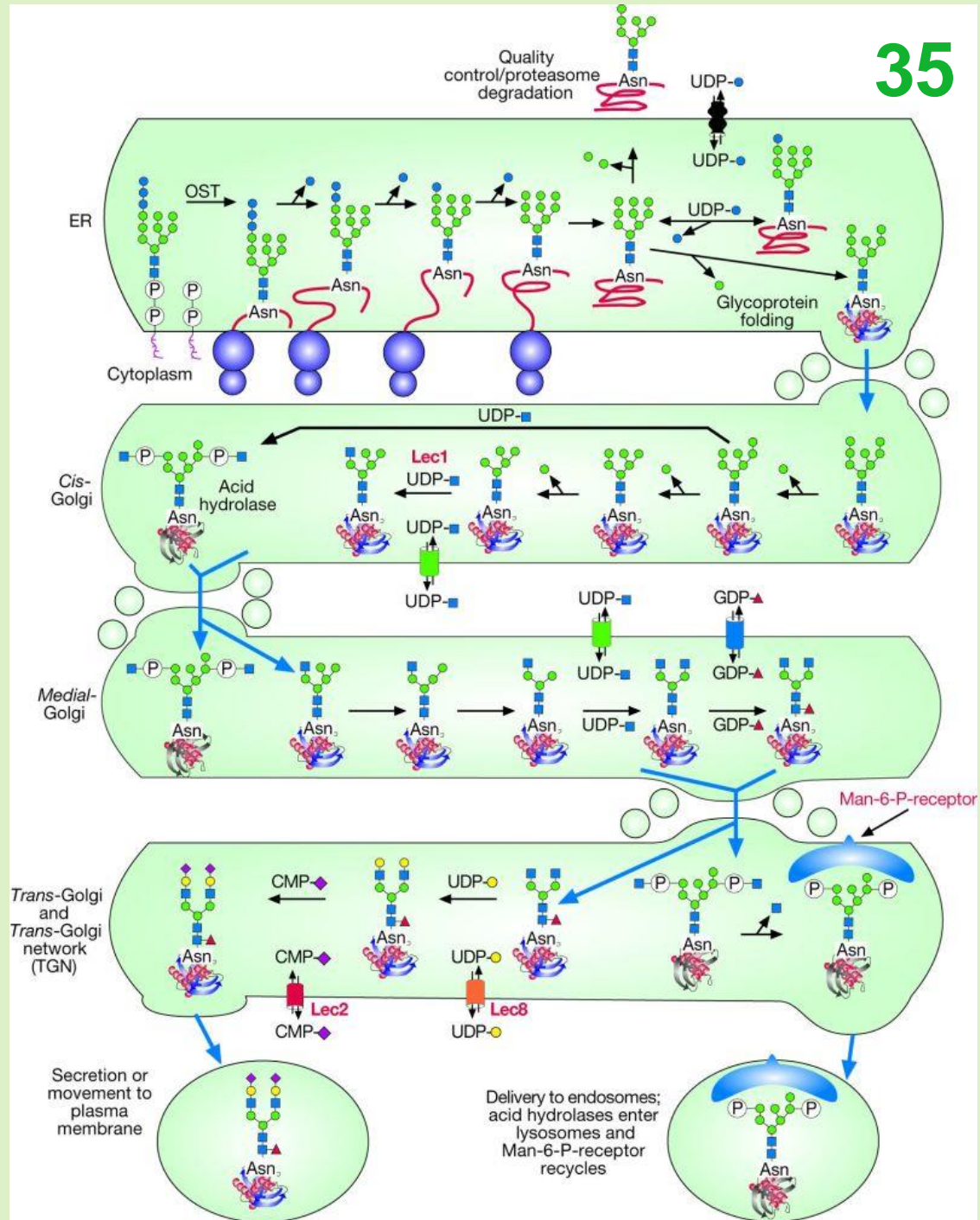
Где и как идет синтез N-цепей?



Процессинг 14-сахаридного предшественника N-цепей

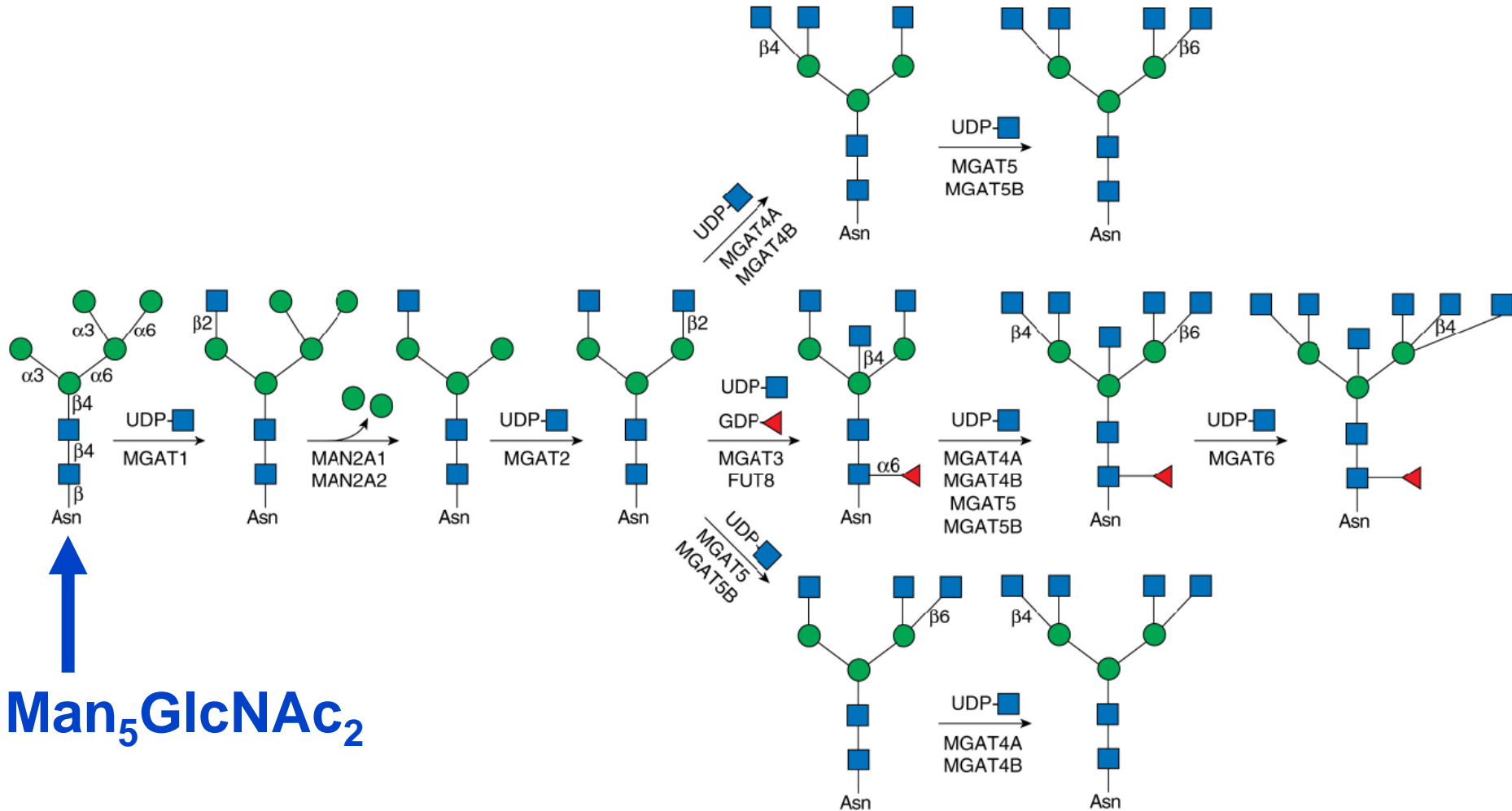


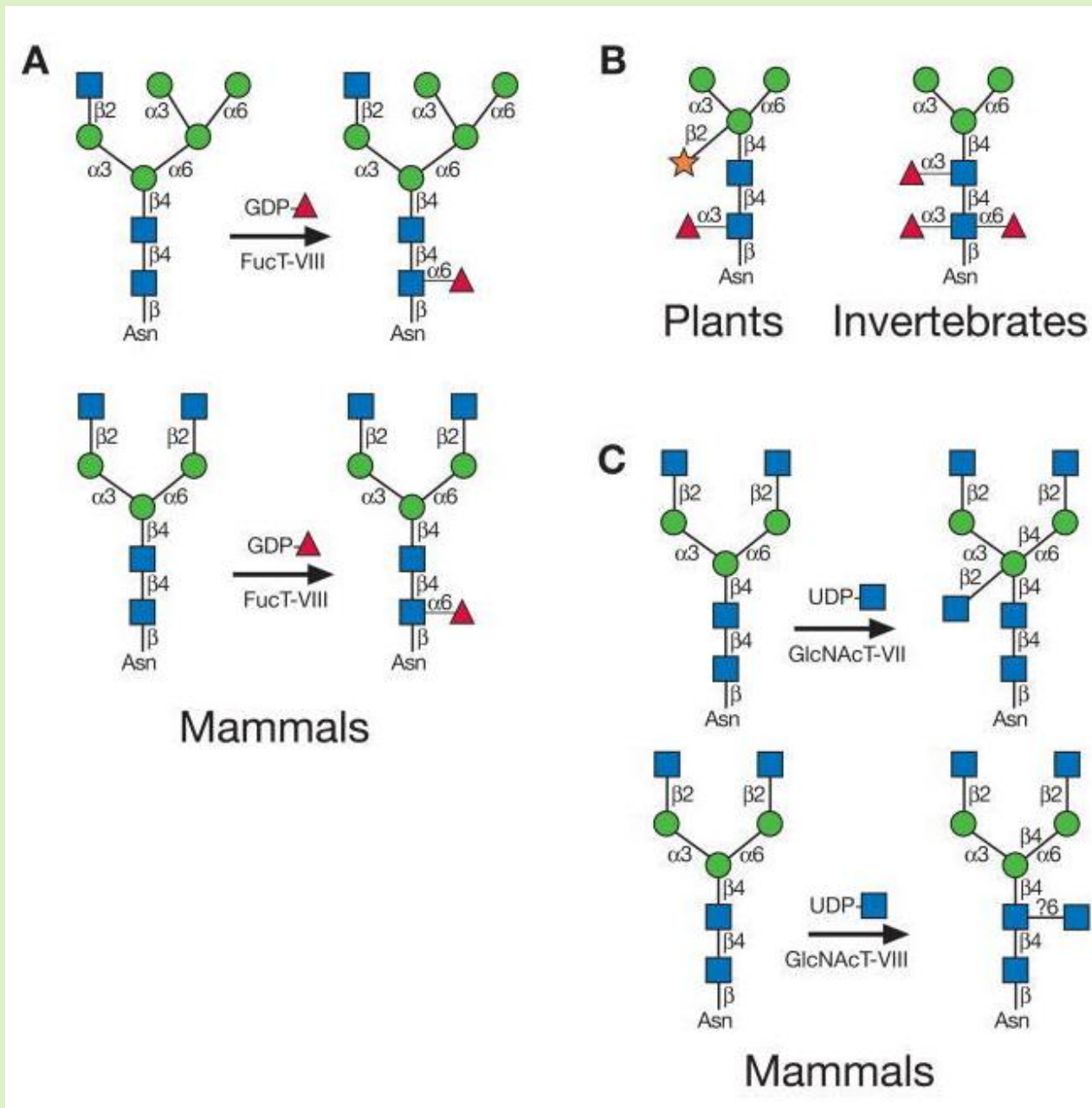
Процессинг 14-сахаридного предшественника N-цепей (подробно)



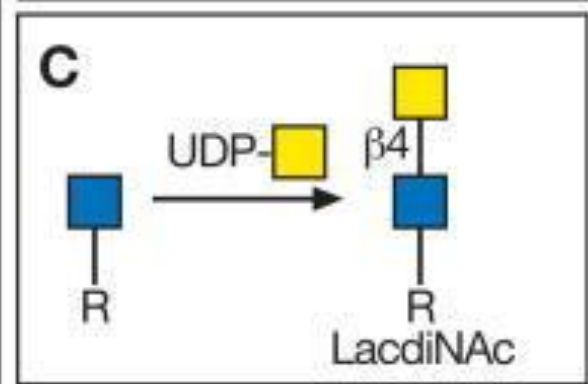
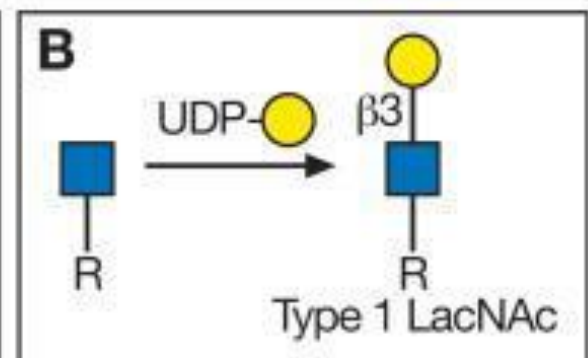
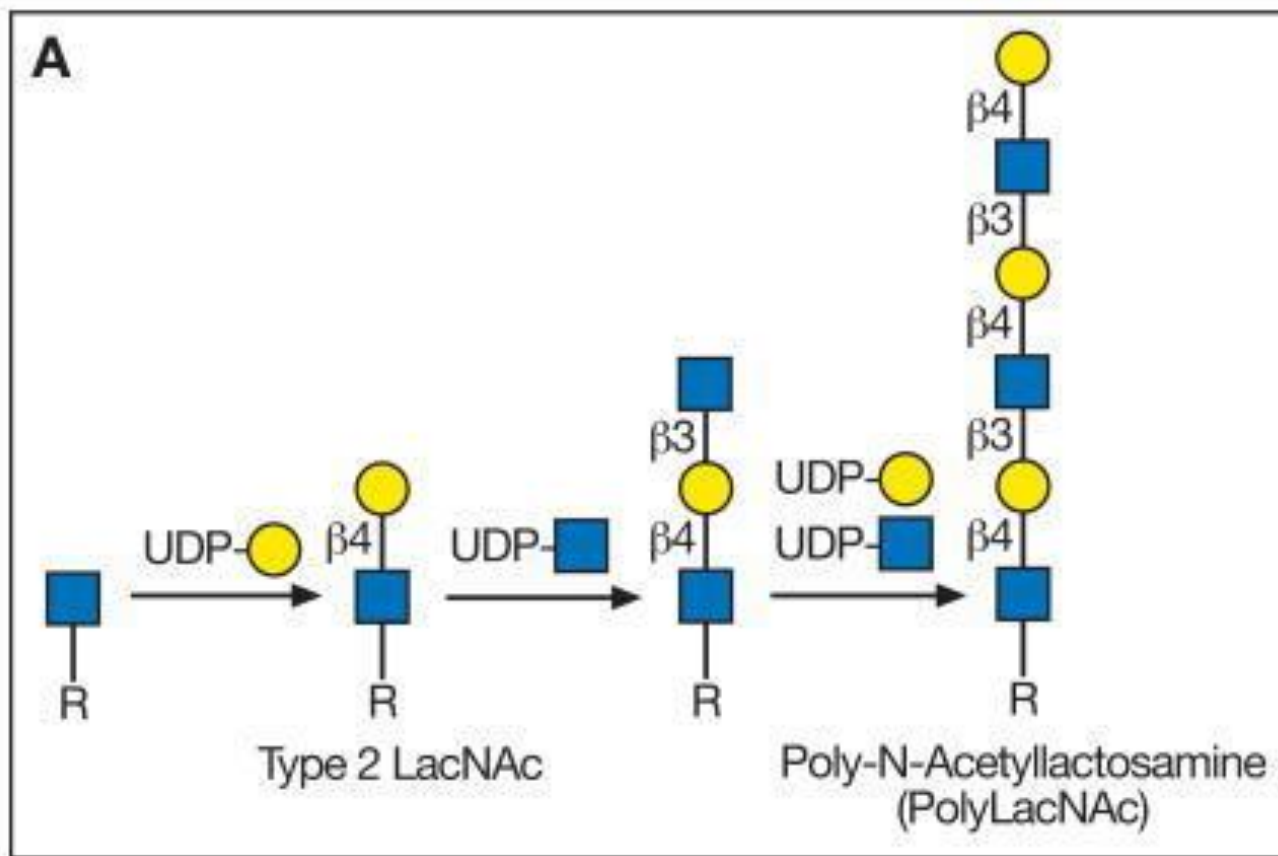
Введение разветвлений в $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (детали)

38



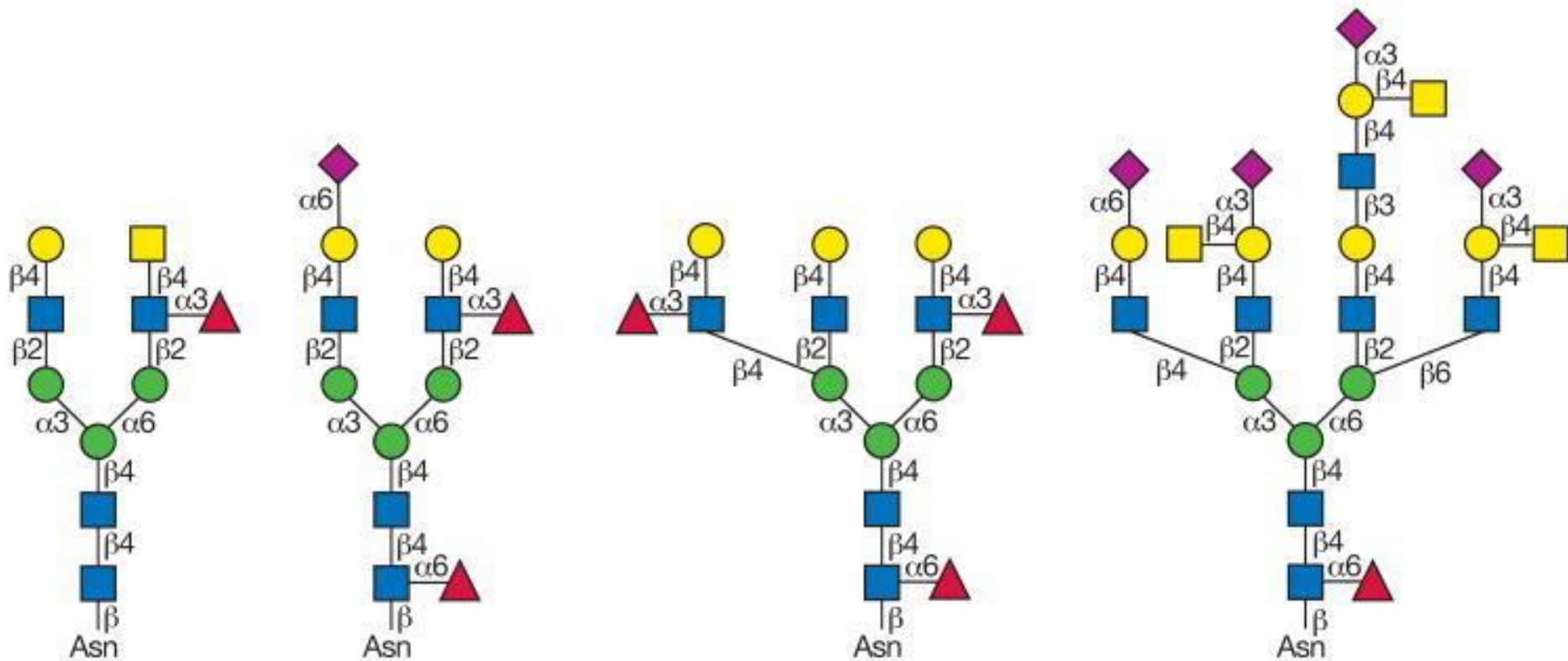


Удлинение цепи на остатках GlcNAc N-гликанов 40



Типичные структуры N-цепей «зрелых» ГП

41



Группоспецифические А- и В-трансферазы

The ABH(0) system of antigens on erythrocytes and antibodies and glycosyltransferases in plasma

Geno- type	Phenotype	Blood group antigens on red cells (minimal determinant structure)	Antibodies in plasma	Glycosyltransferases in plasma
AA AO	A	A	anti-B	α 1,3-GalNAcT
BB BO	B	B	anti-A	α 1,3-GalT
AB	AB	A and B	–	α 1,3-GalNAcT, α 1,3-GalT
OO	O	H	anti-A, anti-B	–

Гликозилтрансферазы, определяющие группу крови:

Известная классификация групп крови АВ0 основана на определении гликозилтрансфераз трёх аллельных форм: А, В и 0. Аллель А кодирует фермент, который переносит N-ацетилгалактозамин, аллель В — галактозу, а аллель 0 содержит делецию, делающую фермент неактивным. Поскольку у каждого человека имеются два аллеля этого гена, образуются четыре группы крови: 00 (первая), А0 и АА (вторая), В0 и ВВ (третья) и АВ (четвертая).

Группоспецифические А- и В-трансферазы

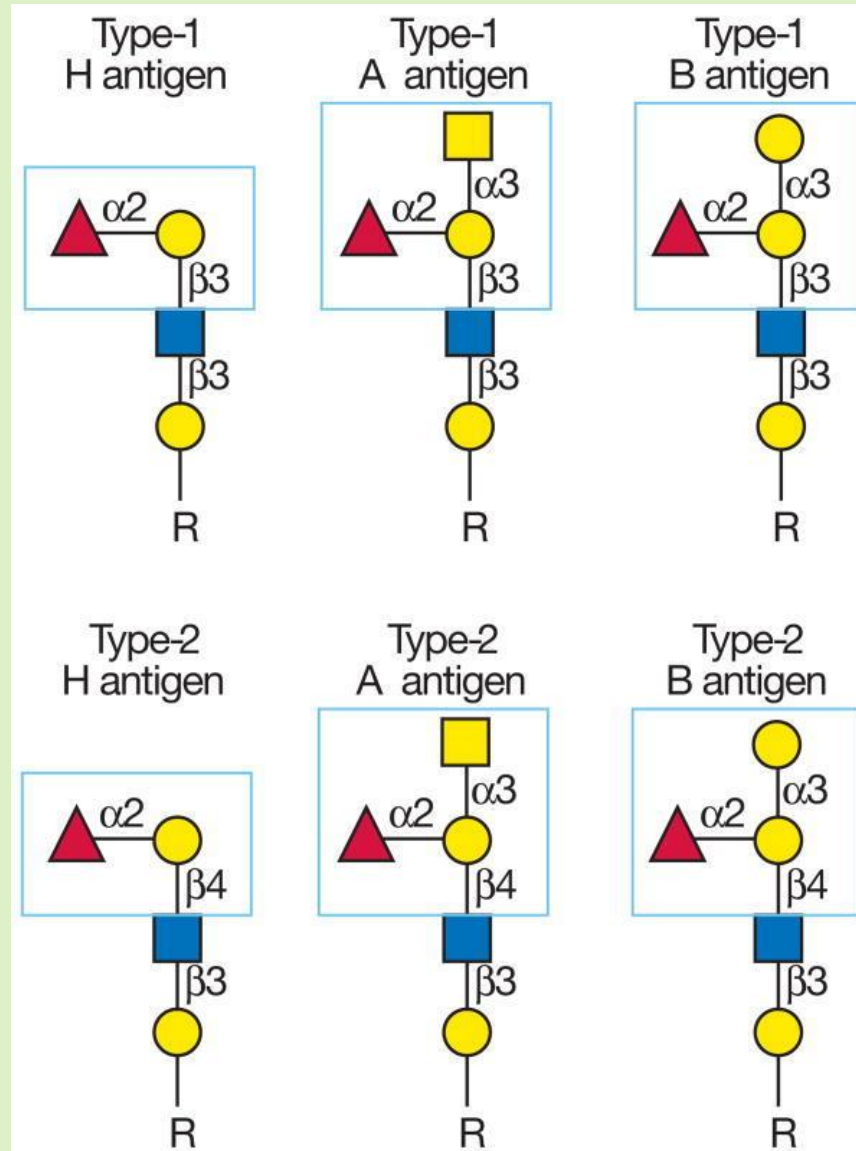
The ABH(0) system of antigens on erythrocytes and antibodies and glycosyltransferases in plasma

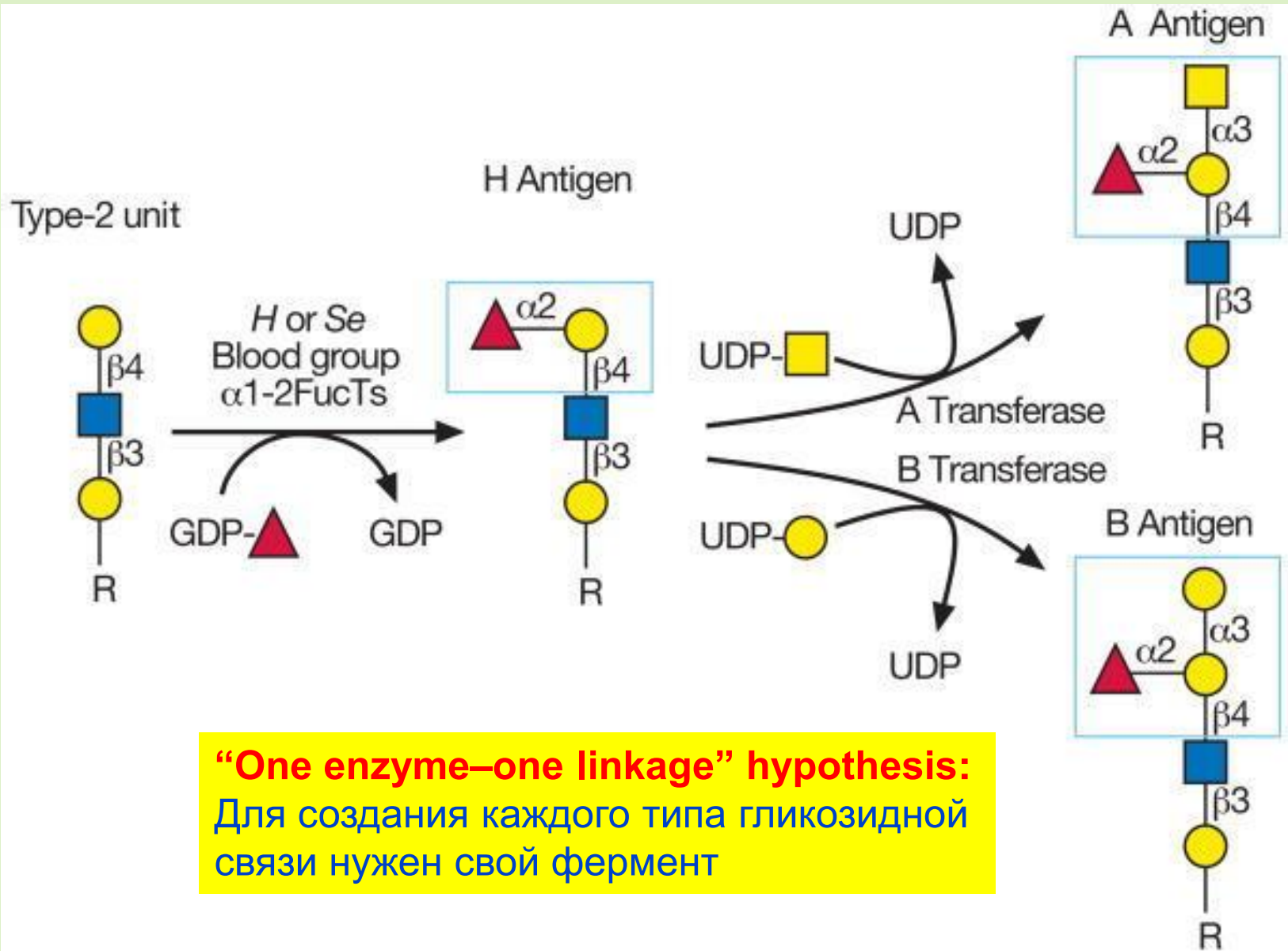
Группа	Geno- type	Phenotype	Blood group antigens on red cells (minimal determinant structure)	Antibodies in plasma	Glycosyltransferases in plasma
II	AA AO	A	A	anti-B	α 1,3-GalNAcT
III	BB BO	B	B	anti-A	α 1,3-GalT
IV	AB	AB	A and B	–	α 1,3-GalNAcT, α 1,3-GalT
I	OO	O	H	anti-A, anti-B	–

Гликозилтрансферазы, определяющие группу крови:

Известная классификация групп крови АВО основана на определении гликозилтрансфераз трёх аллельных форм: А, В и О. Аллель А кодирует фермент, который переносит N-ацетилгалактозамин, аллель В — галактозу, а аллель О содержит делецию, делающую фермент неактивным. Поскольку у каждого человека имеются два аллеля этого гена, образуются четыре группы крови: OO (**первая**), AO и AA (**вторая**), BO и BB (**третья**) и АВ (**четвертая**).

Антигены H, A и B (типы 1 и 2), являющиеся детерминантами групп крови H (0), A и B



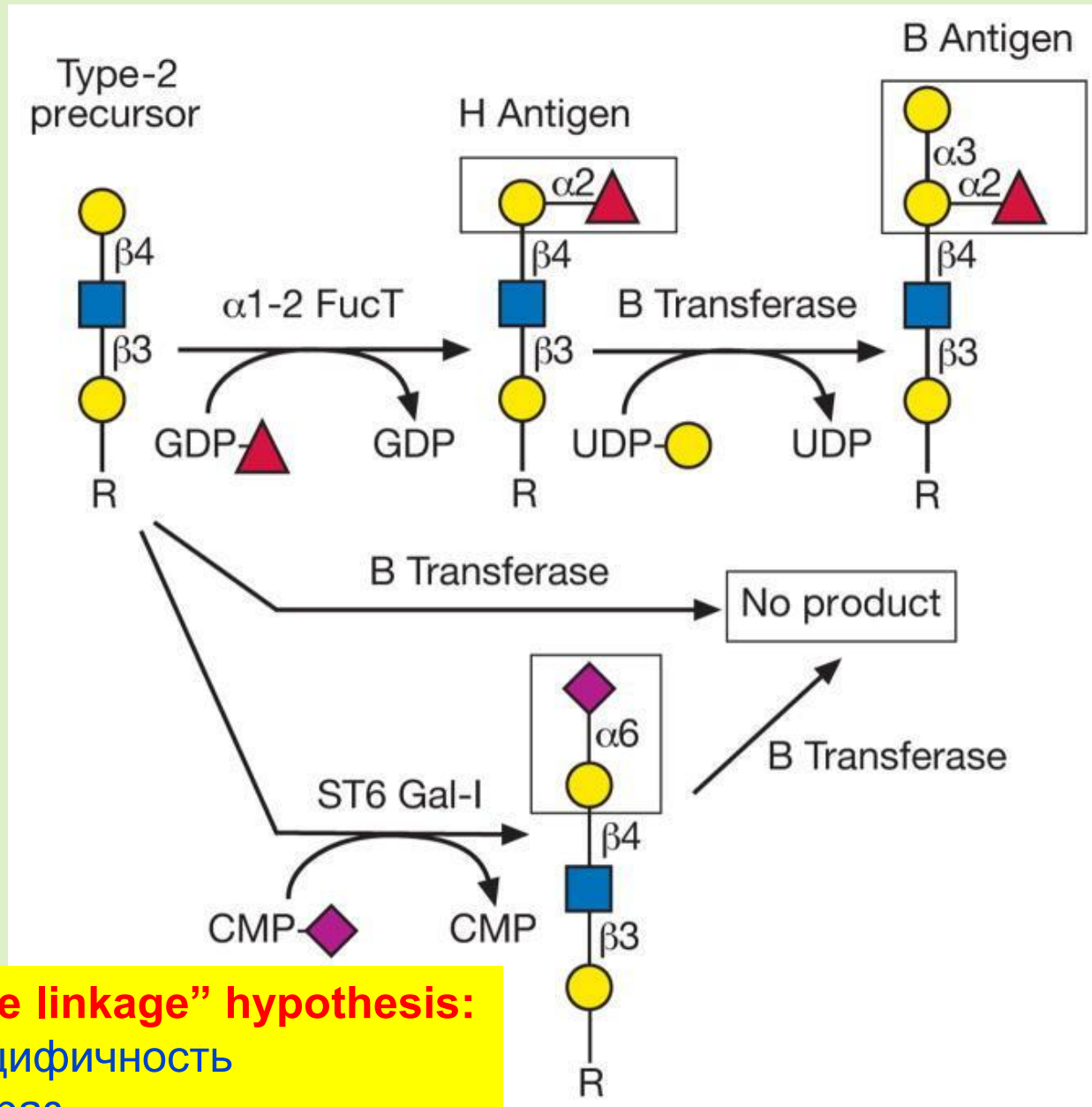


“One enzyme–one linkage” hypothesis:

Для создания каждого типа гликозидной связи нужен свой фермент

α 1–3-Галактозилтрансфераза группы крови В

46

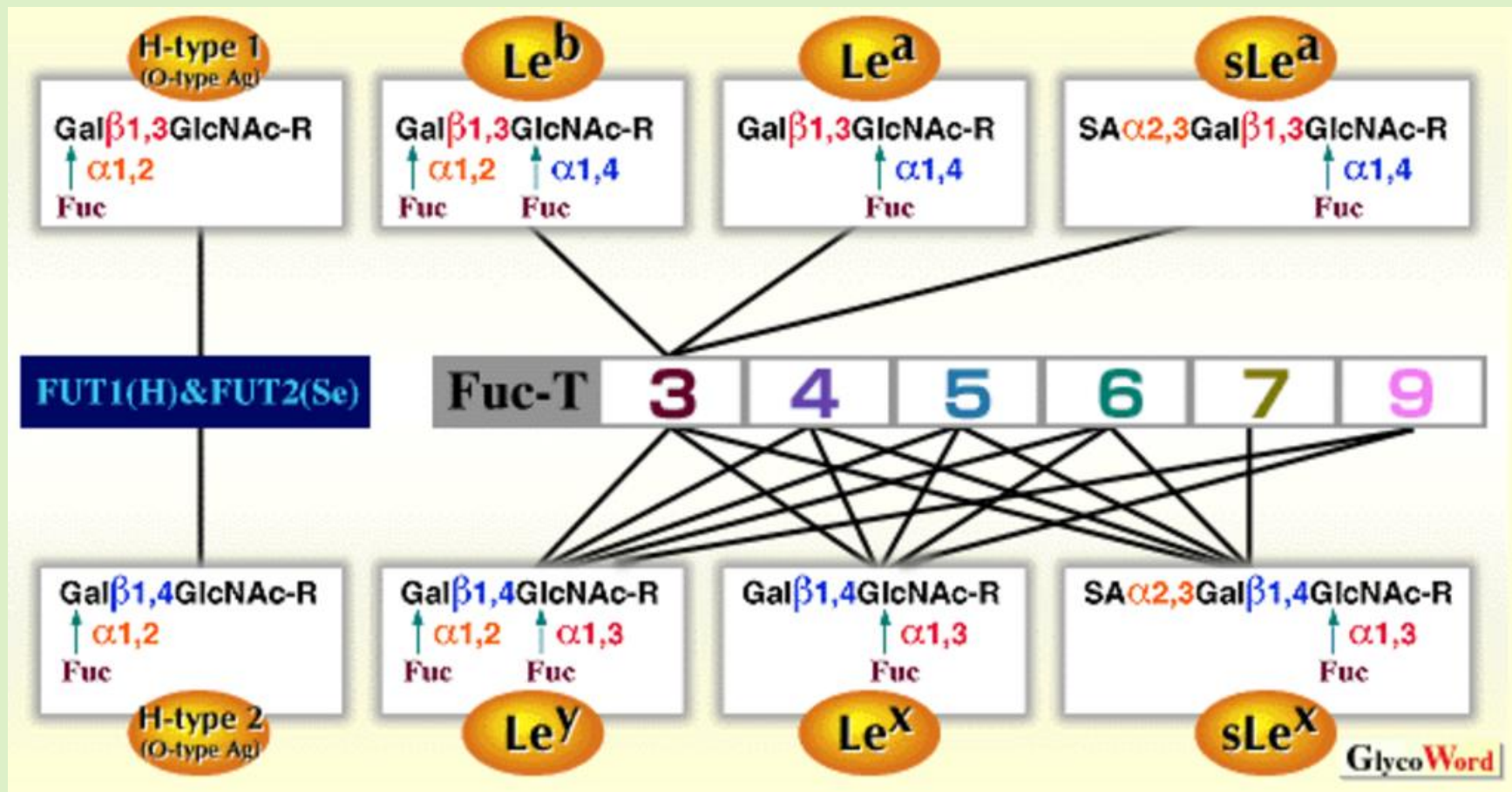


“One enzyme–one linkage” hypothesis:
Субстратная специфичность гликозилтрансфераз

Субстратная специфичность α 1–2- и α 1–3-фукозил-трансфераз (Fuc-T) (исключение?)

47

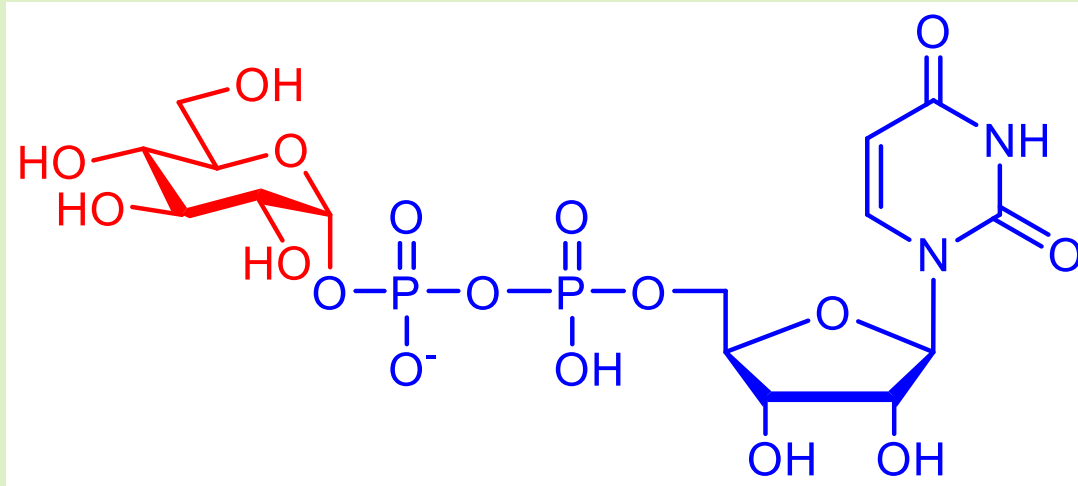
- Одну и ту же гликозидную связь могут создавать несколько гликозилтрансфераз
- Одна гликозилтрансфераза может создавать несколько гликозидных связей



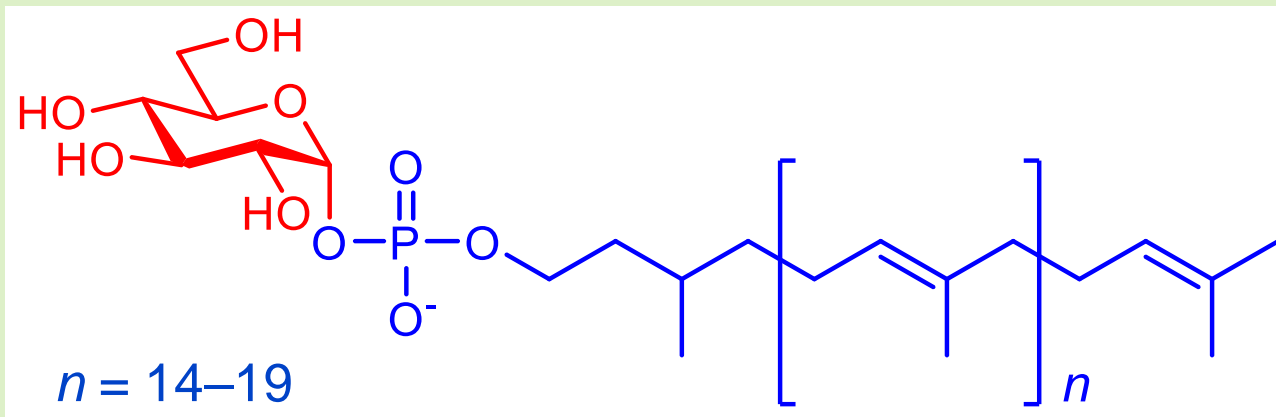
Два типа гликозил-доноров (Glc, Man)

48

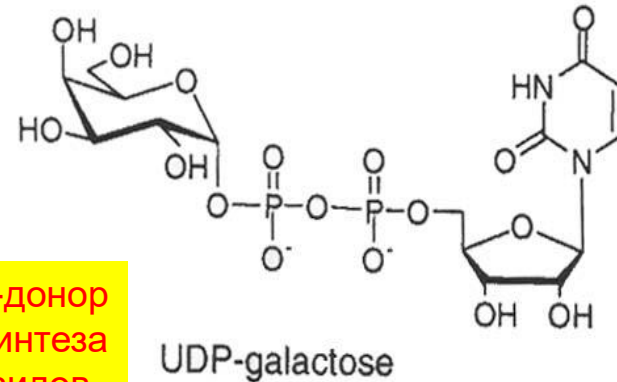
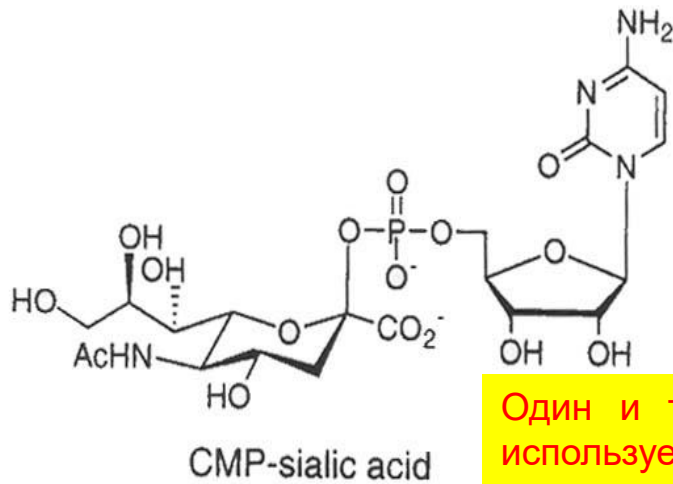
UDP-Glc



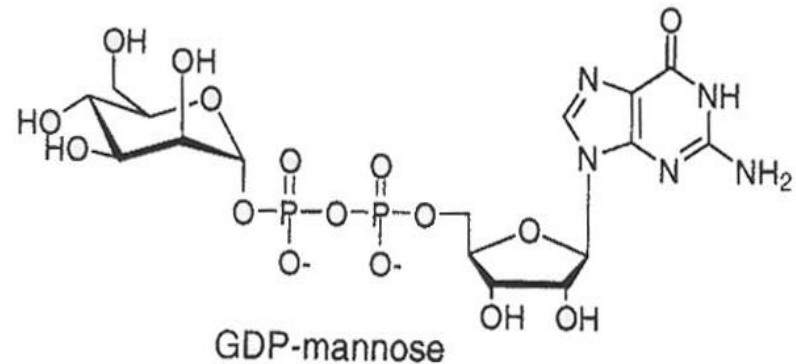
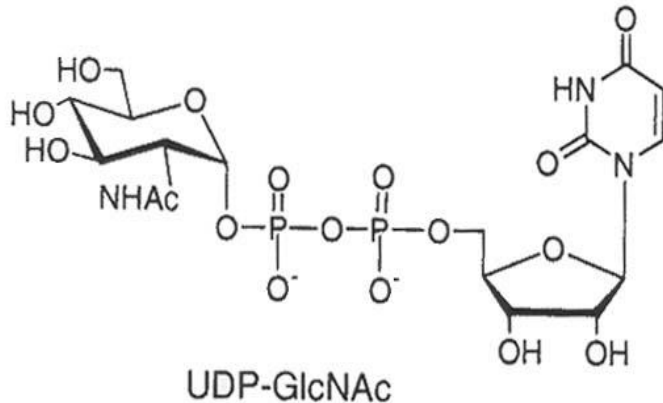
Dol-P-Glc



Структура гликозил-доноров: нуклеотидсахара 49



Один и тот же α -донор используется для синтеза как β -, так и α -гликозидов

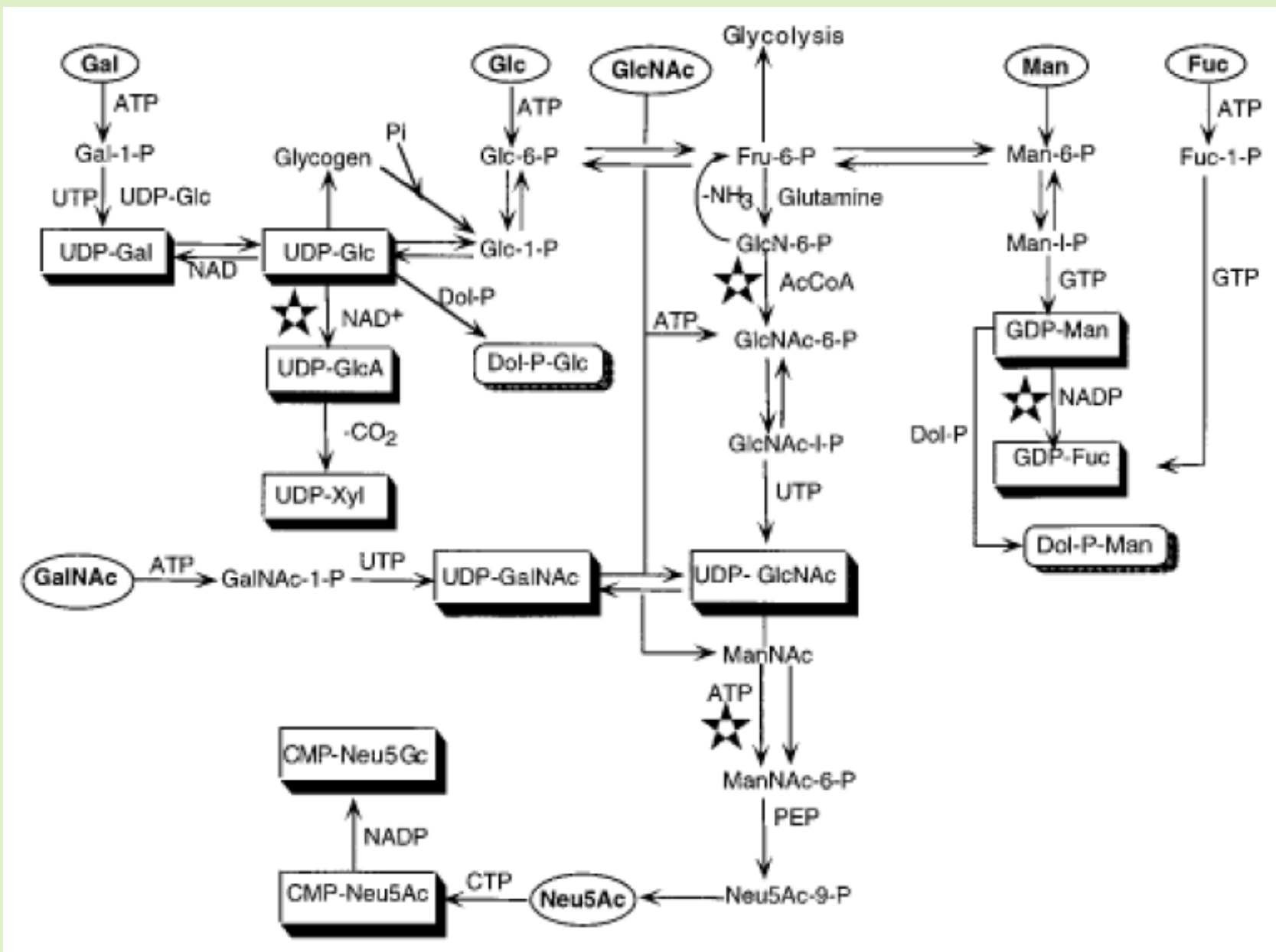


А также:

UDP-Glc, UDP-GalNAc, UDP-GlcA, UDP-Xyl,
GDP-Fuc

Биосинтез моносахаридных доноров

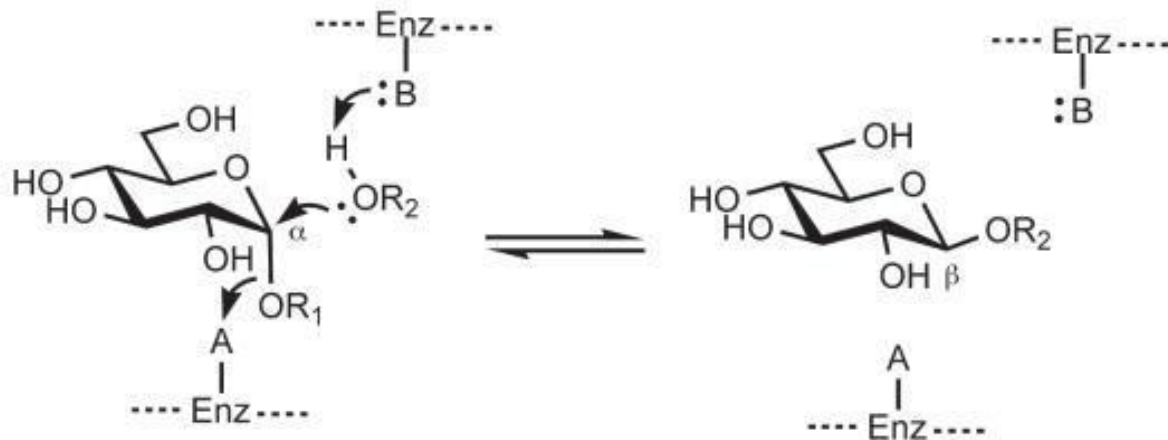
50



Inverting

Обращение конфигурации C(1)

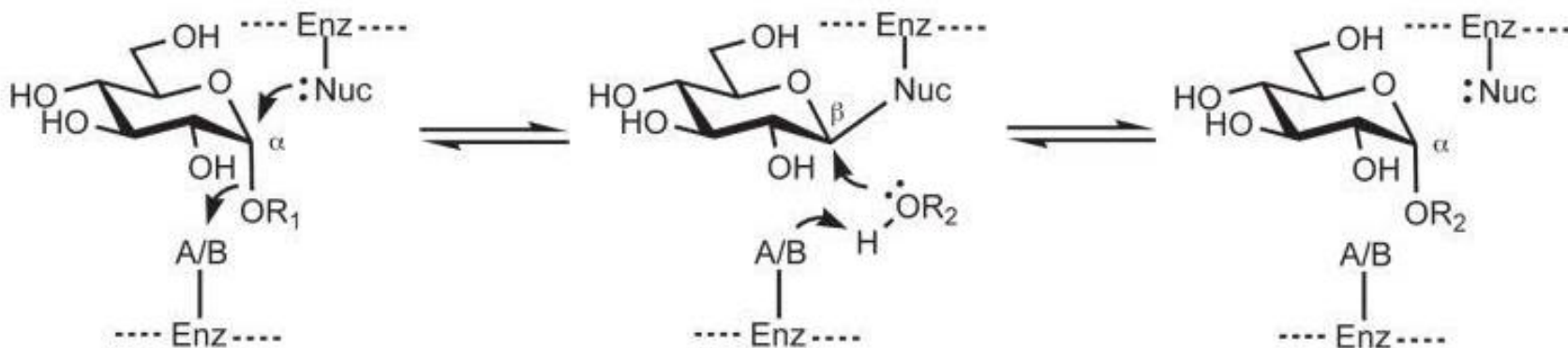
a)



Retaining

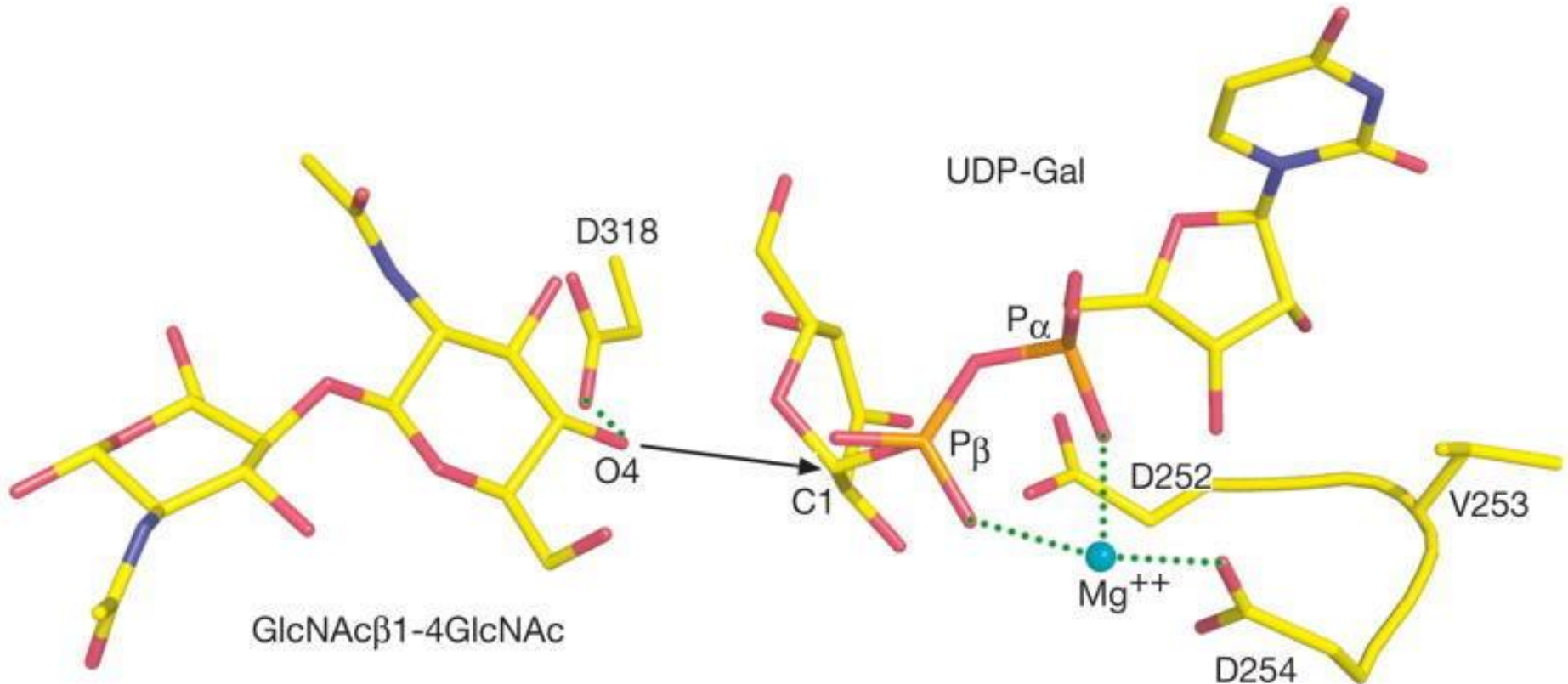
Сохранение конфигурации C(1)

b)



β 1–4-Галактозил-трансфераза (Gal-T) + донор (UDP- α -Gal) + акцептор (GlcNAc β 1–4GlcNAc)

53



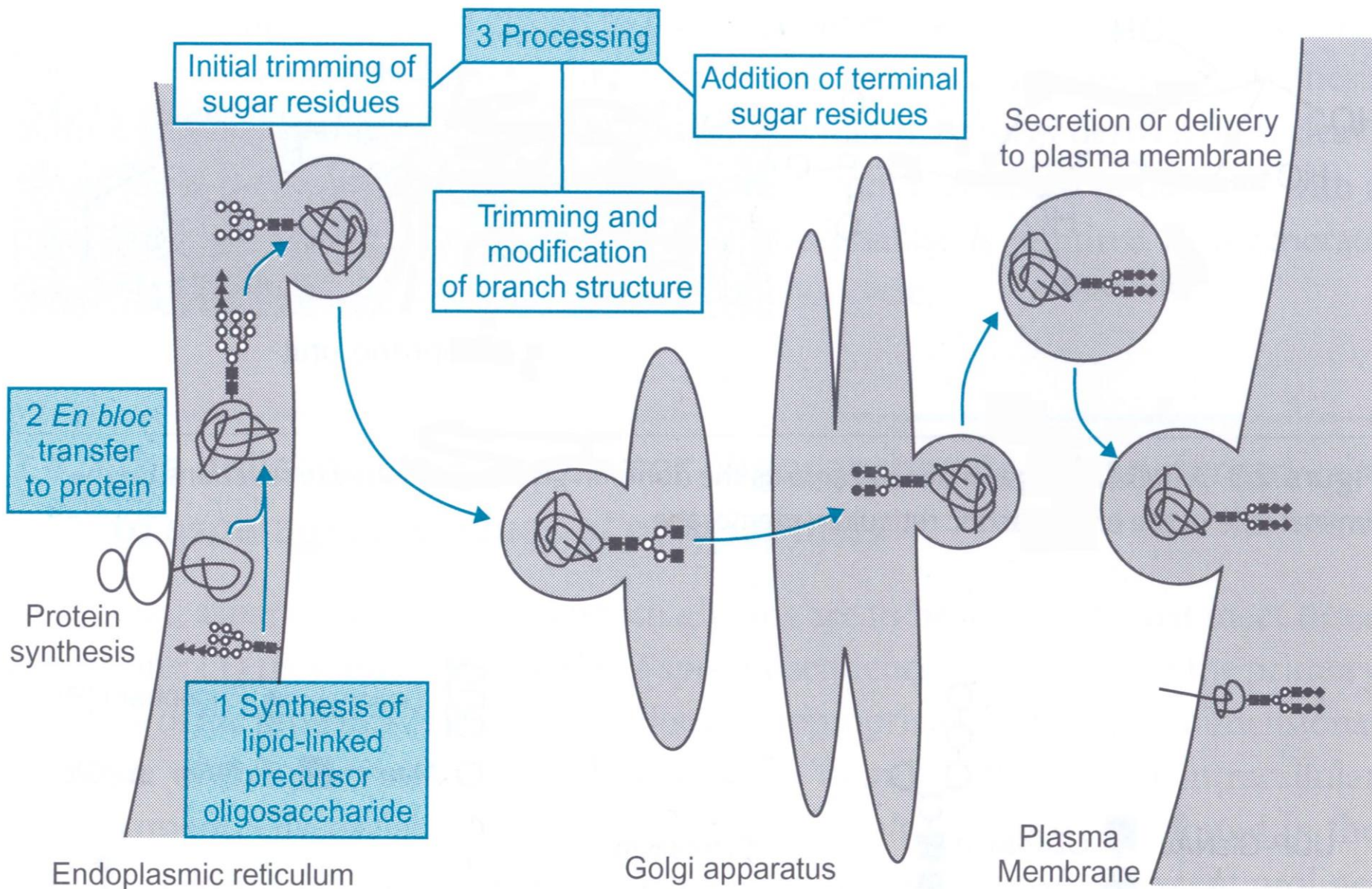
Gal-T: субстрат – GlcNAc, продукт – LacNAc

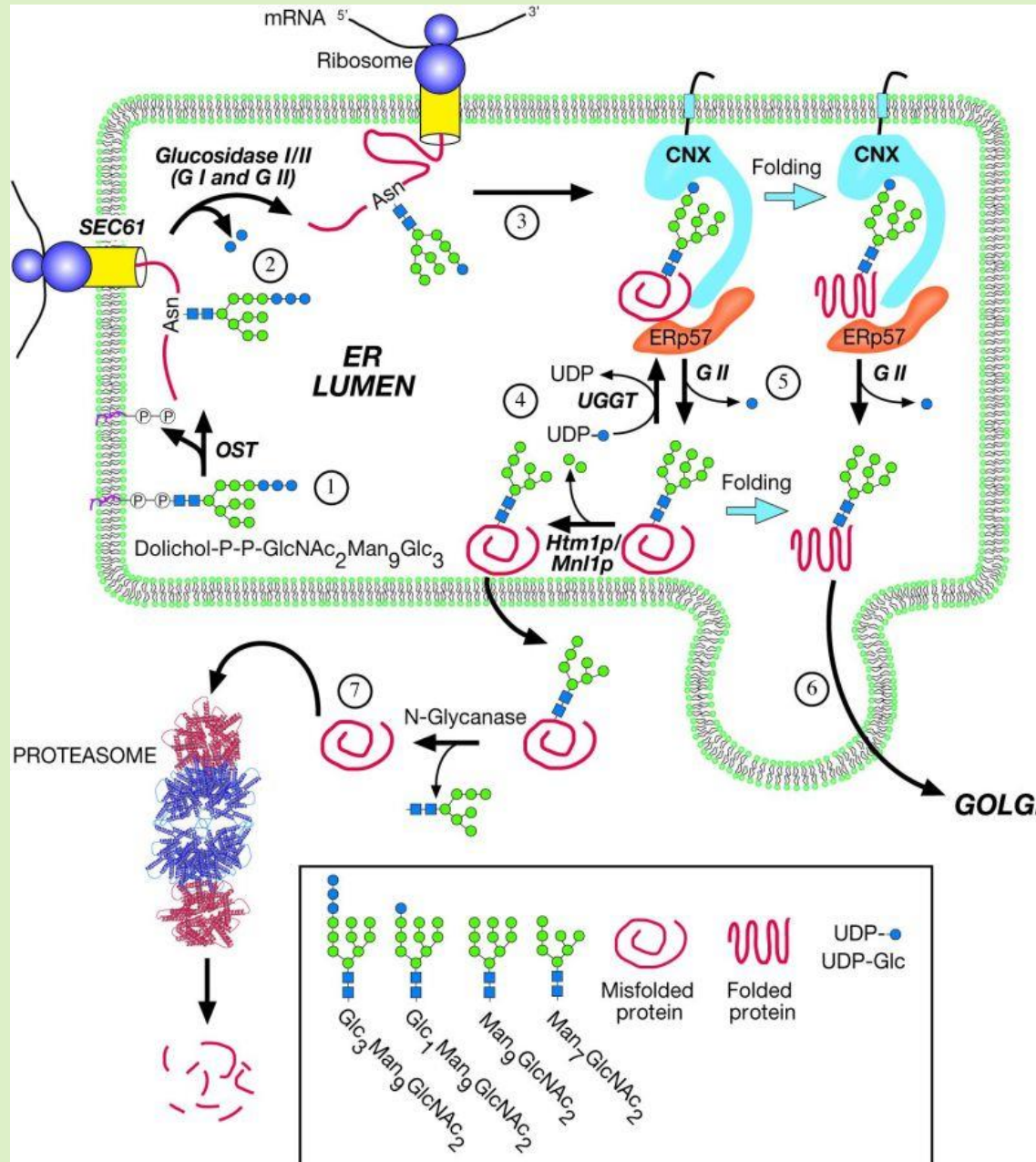
Gal-T + α -лактальбумин = синтетаза лактозы:
субстрат – Glc, продукт – Lac

От чего зависит результат биосинтеза, опосредованного гликозилтрансферазами?

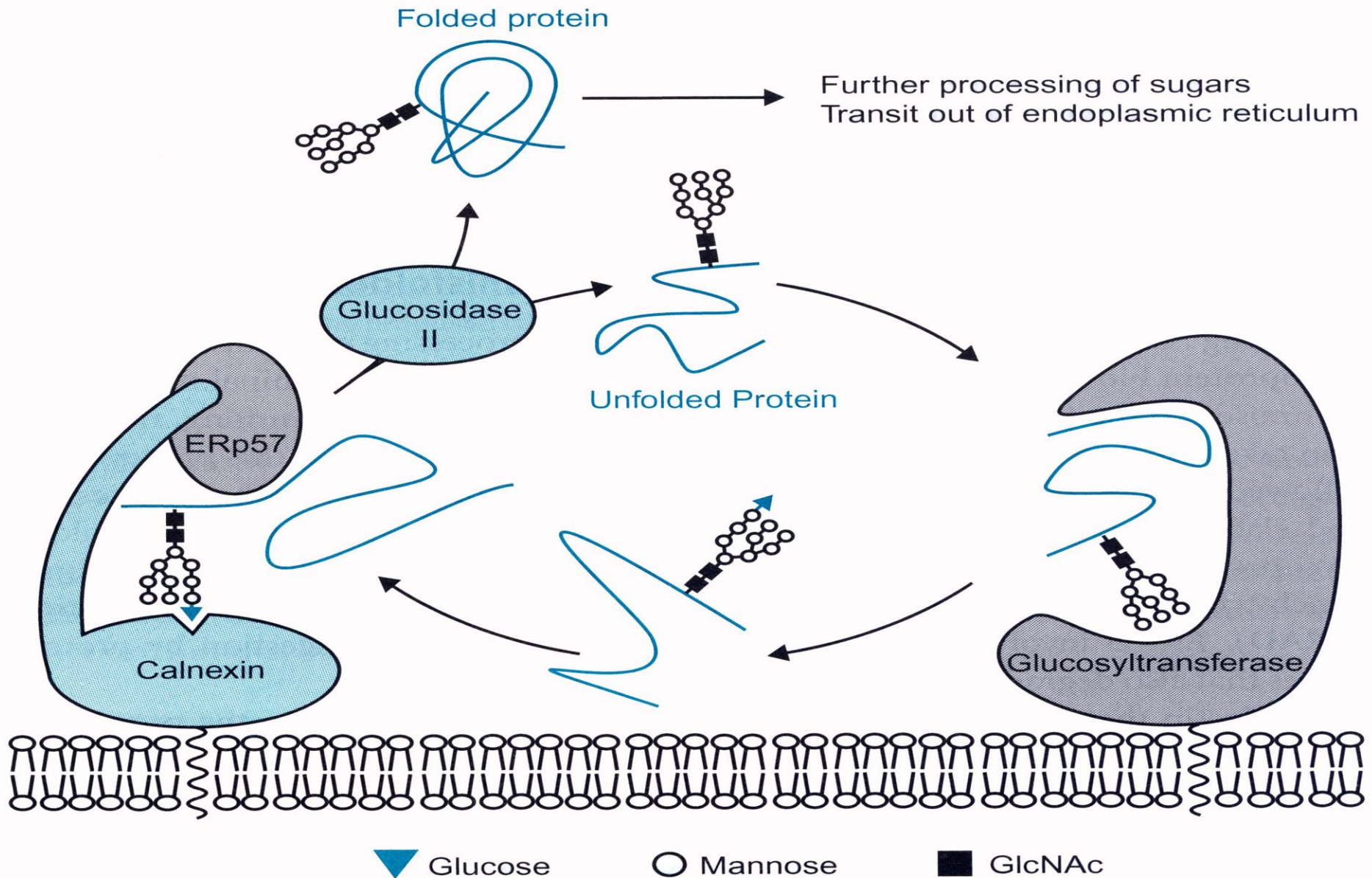
- ▶ Природа и концентрация донора
- ▶ Первичная структура акцептора (Fuc-T, см. ранее)
- ▶ Конформация углеводной цепи и белковой цепи
- ▶ Компартмент
- ▶ Mn^{2+} / Mg^{2+}
- ▶ РР-аза
- ▶ Специализированные активаторы (например, синтез лактозы), ингибиторы (например, ингибитор α Gal-трансферазы), а также разнообразные белки-транспортеры.

Топология биосинтеза определяет ориентацию углеводных цепей

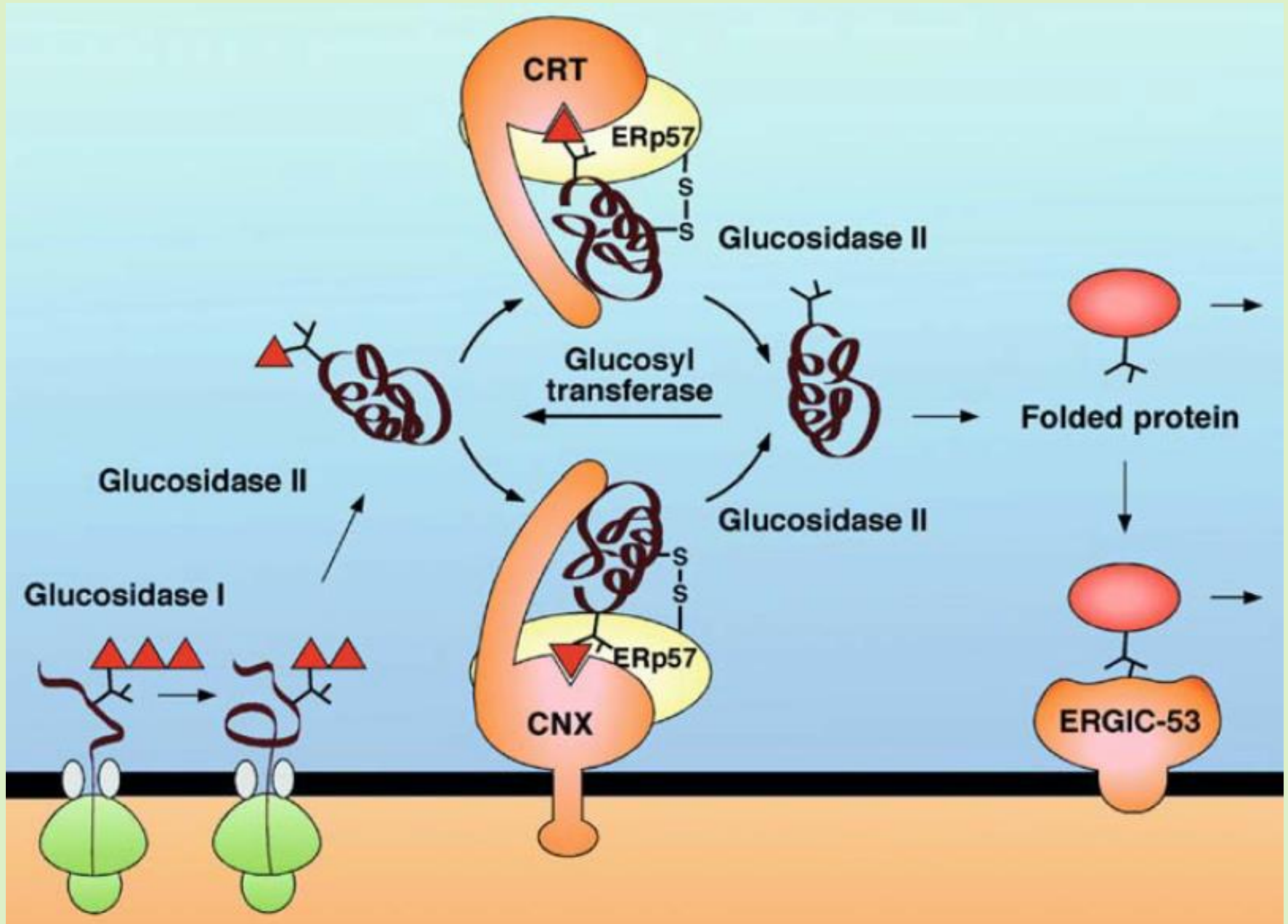


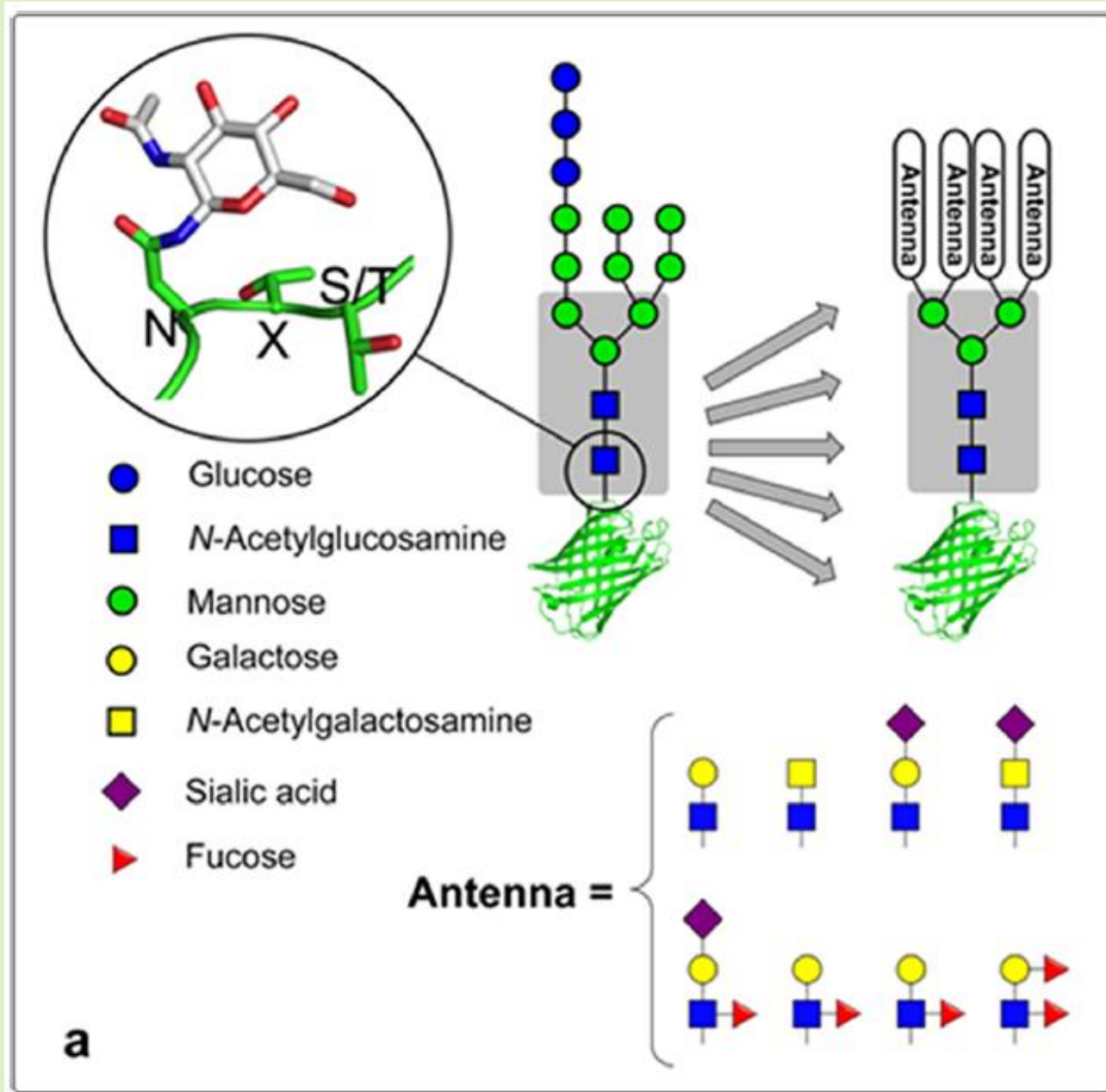


Контроль качества сворачивания белков в ЭПР 57 (кратко)



Сворачивание белков в ЭПР: лектины-шапероны 58





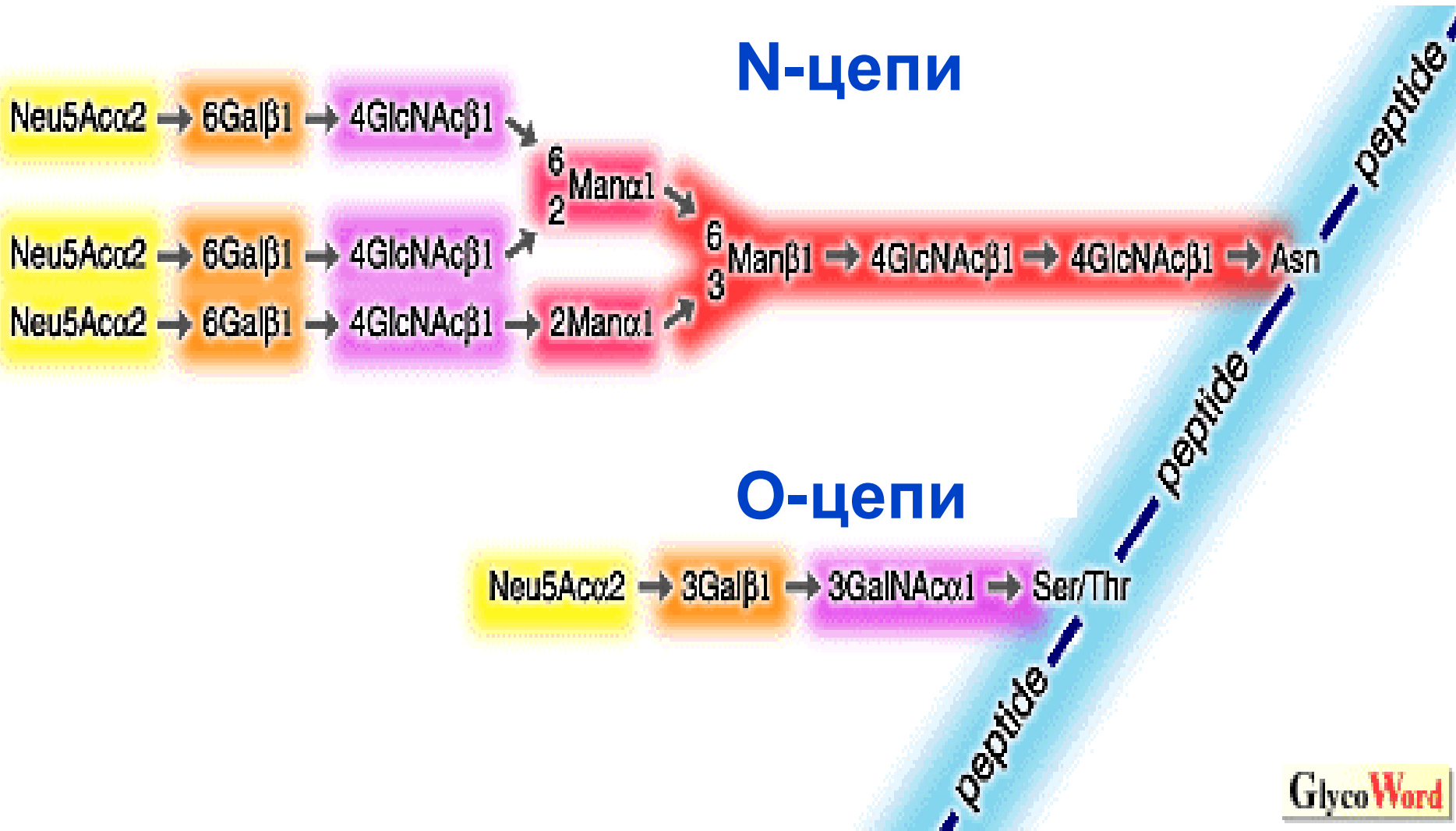
О-Цепи муциновых гликопротеинов

Структура

Два главных типа цепей гликопротеинов (примеры) и узлы их присоединения к белку

61

- N-гликозидные: –GlcNAc β –Asn
- O-гликозидные: –GalNAc α –Ser/Thr



Структура О-цепей гликопротеинов: все коры 62

GalNAc α -Ser (Тн-антиген)

Gal β 1-3GalNAc α -Ser (кор 1 = Т-антиген)

(GlcNAc β 1-6)(Gal β 1-3)GalNAc α -Ser (кор 2)

GlcNAc β 1-3GalNAc α -Ser (кор 3)

(GlcNAc β 1-6)(GlcNAc β 1-3)GalNAc α -Ser (кор 4)

GalNAc α 1-3GalNAc α -Ser (кор 5)

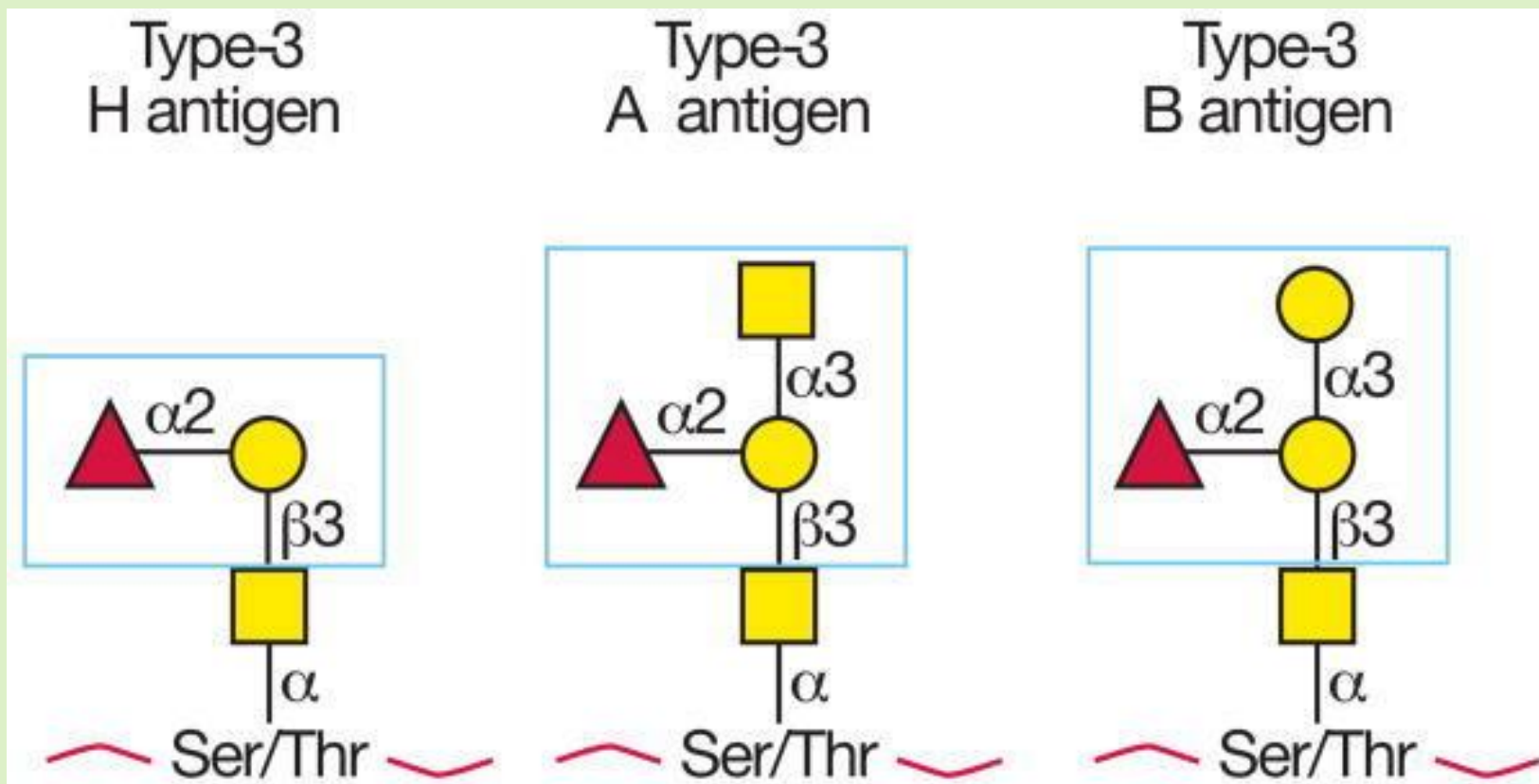
GlcNAc β 1-6GalNAc α -Ser (кор 6)

GalNAc α 1-6GalNAc α -Ser (кор 7)

Gal α 1-3GalNAc α -Ser (кор 8)

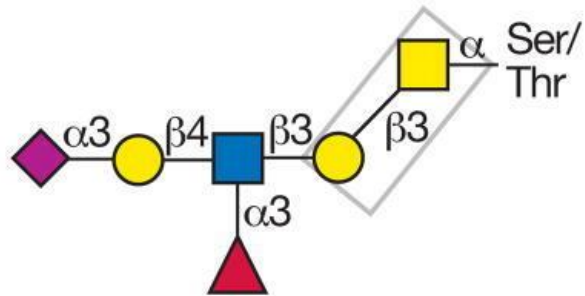
Sialyl-Tn antigen	Sia α 2-6GalNAc α -Ser/Thr
Blood groups O, H	Fuc α 1-2Gal-
Blood group A	GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal-
Blood group B	Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal-
Linear B	Gal α 1-3Gal-
Blood group I	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal-
Blood group I	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)Gal-
Blood group Sd(a), Cad	GalNAc β 1-4(Sia α 2-3)Gal-
Blood group Lewis ^a	Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc-
Blood group Lewis ^x	Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc-
Blood group sialyl-Lewis ^x	Sia α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc-
Blood group Lewis ^y	Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc-

Антигены H, A и B (тип 3), являющиеся детерминантами групп крови H (0), A и B

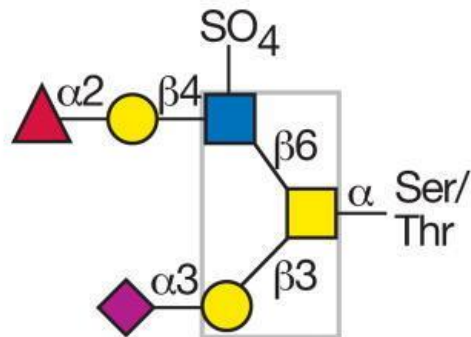


Сложные О-гликаны с разными корами

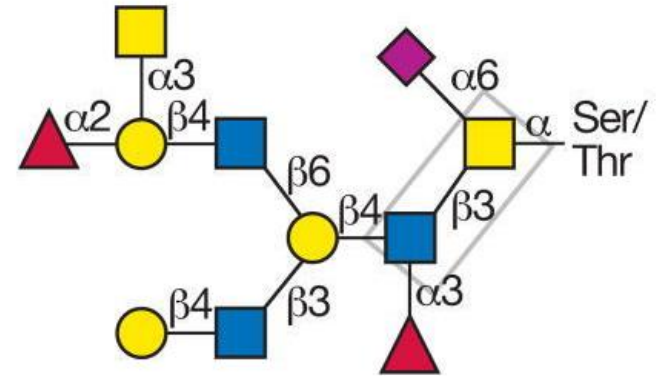
Extended core 1



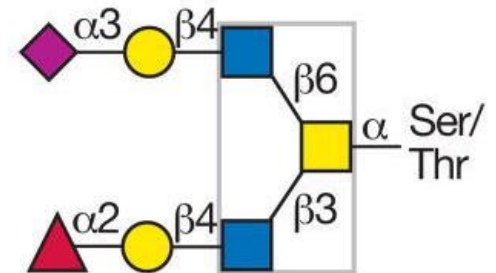
Extended core 2



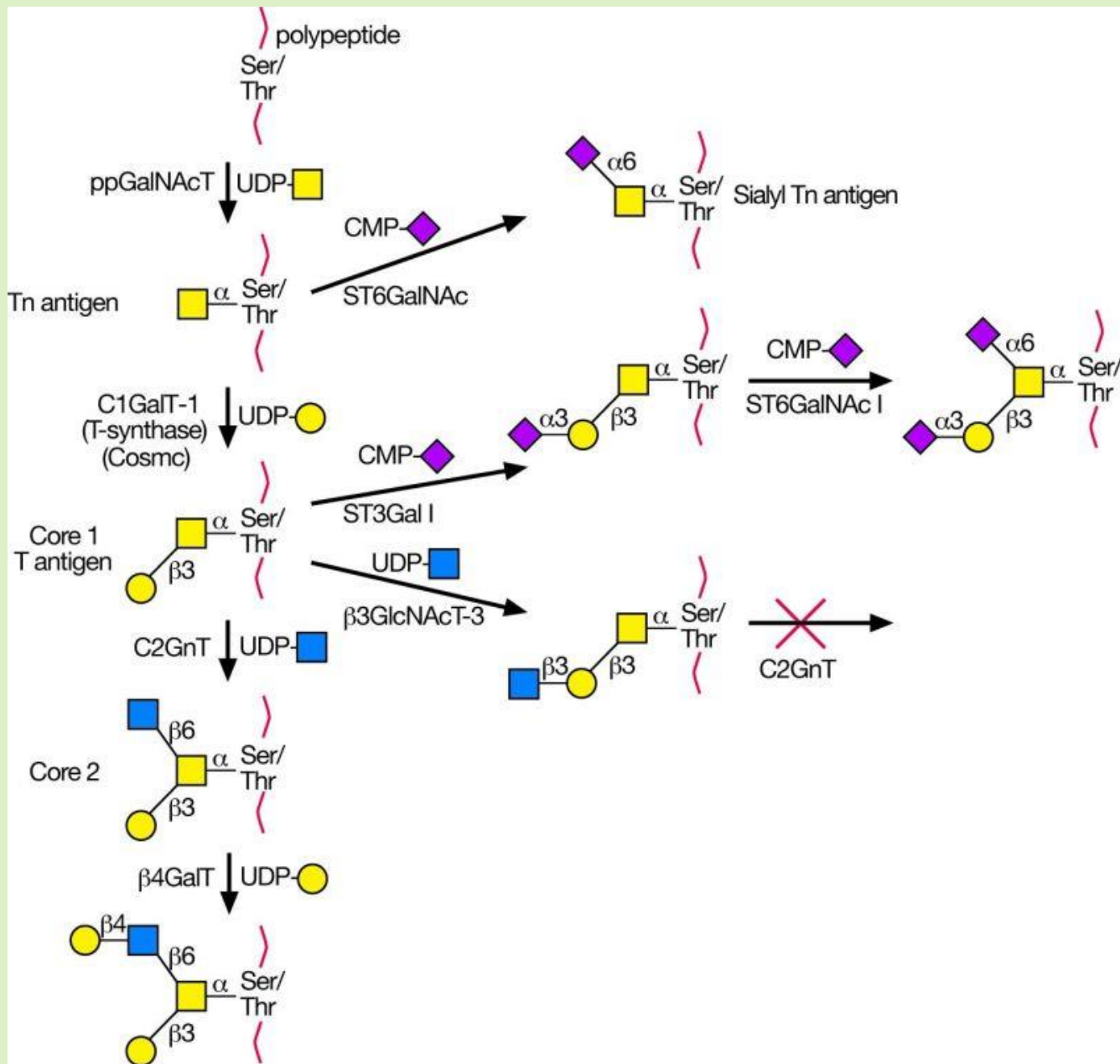
Extended core 3



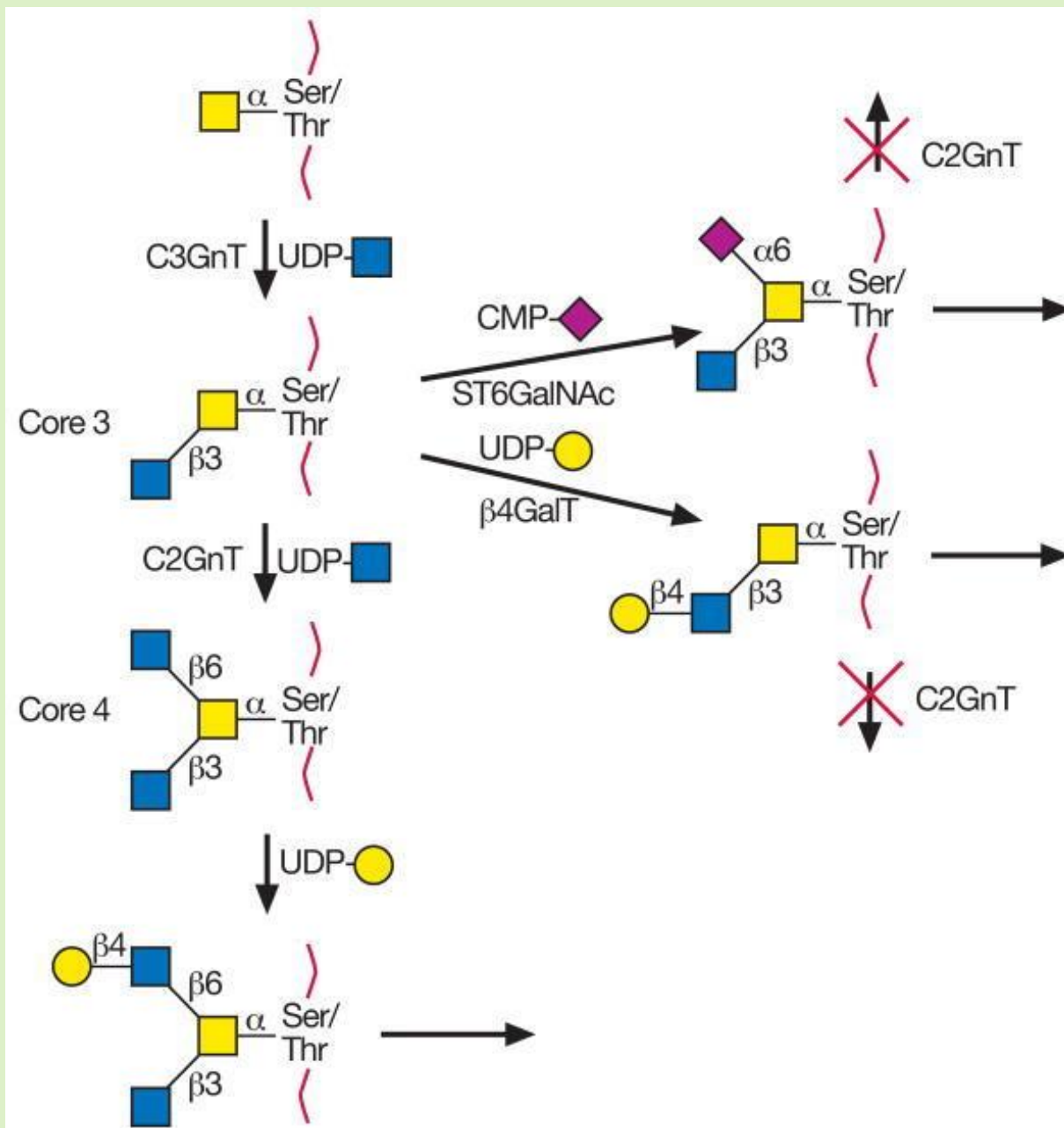
Extended core 4



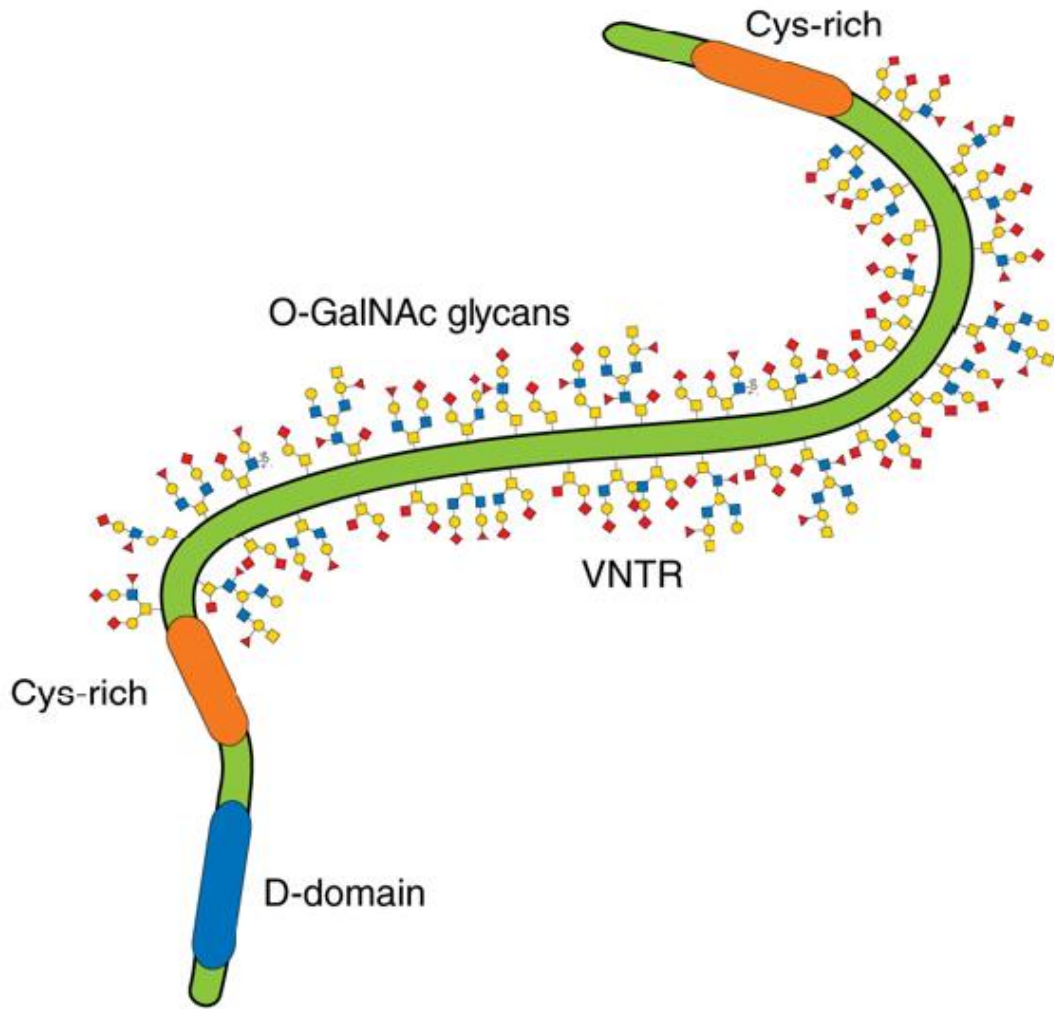
Биосинтез некоторых О-гликанов с корами 1 и 2 66



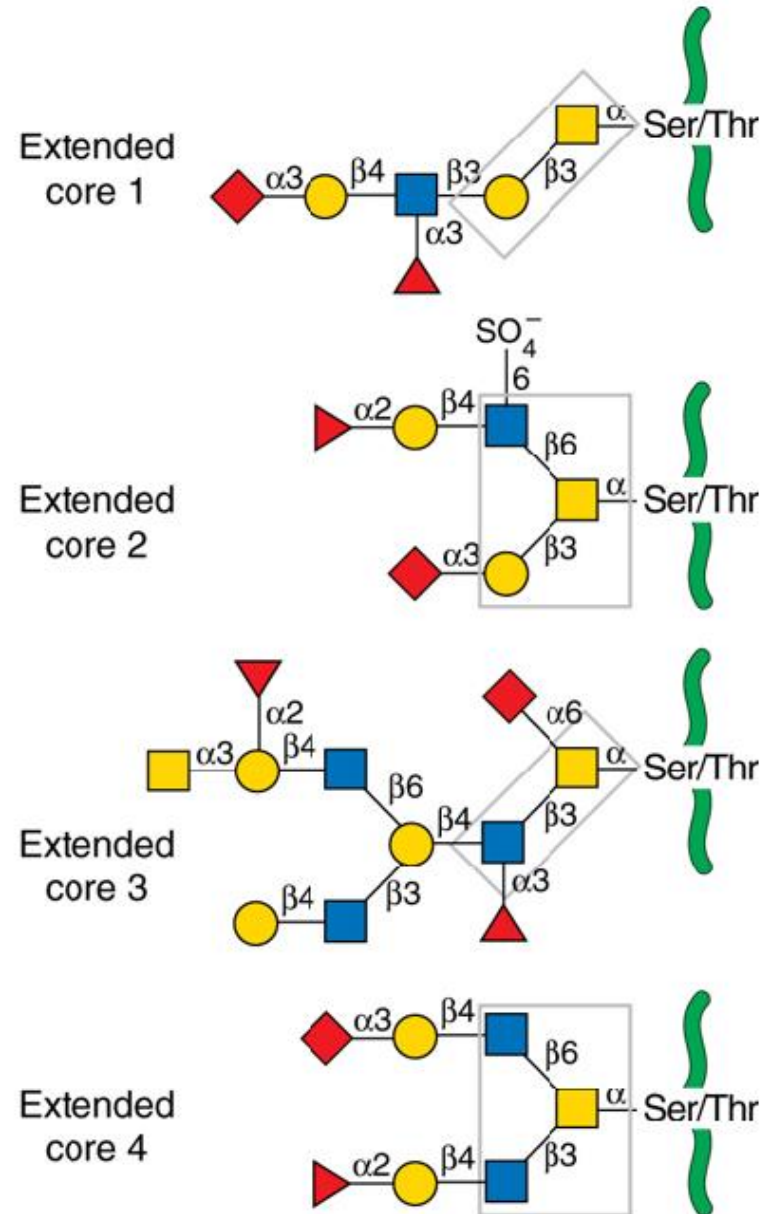
Биосинтез некоторых О-гликанов с корами 3 и 4 67



Модель секретиремого муцина



VNTR = variable number of tandem repeat



Есть ли консервативная последовательность аминокислот?

70

MUC1

Tandem repeat region

Неуникальность аминокислотной последовательности и обилие углеводных цепей говорят об отсутствии специфических функций пептидной части муцинов

(GlySerThrAlaProProAlaHisGlyValThrSerAlaProAspThrArgProAlaPro)_x

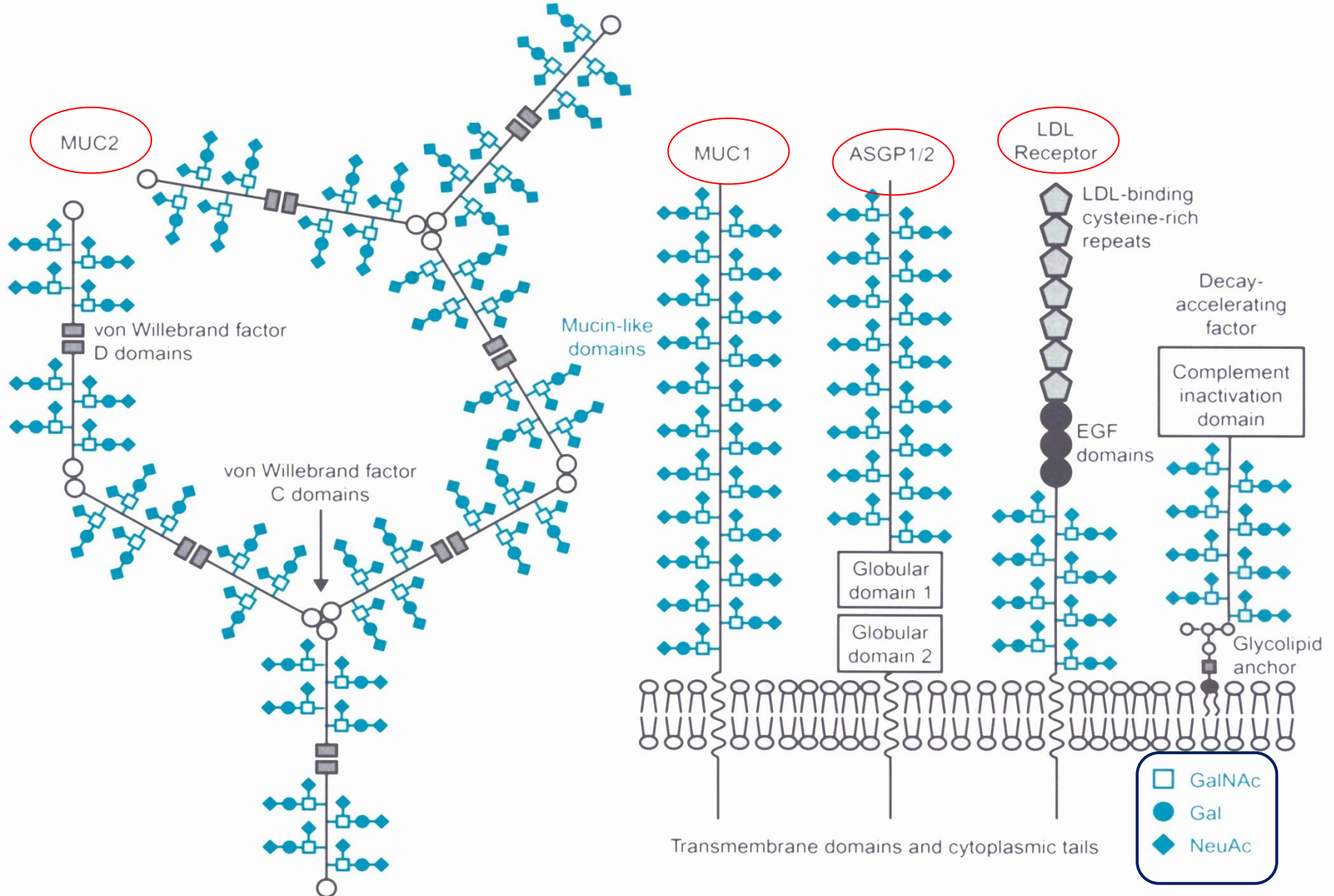
MUC2

Tandem repeat region 1

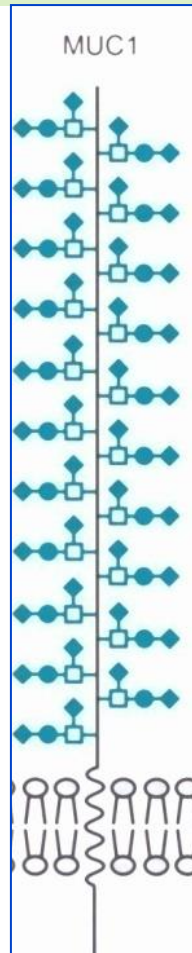
Tandem repeat region 2

(ProThrThrThrProLeuThrThrThrThrThrValThrProThrProThrProThrGlyThrGlnThr)_x

Примеры «тяжело гликозилированных» белков 71

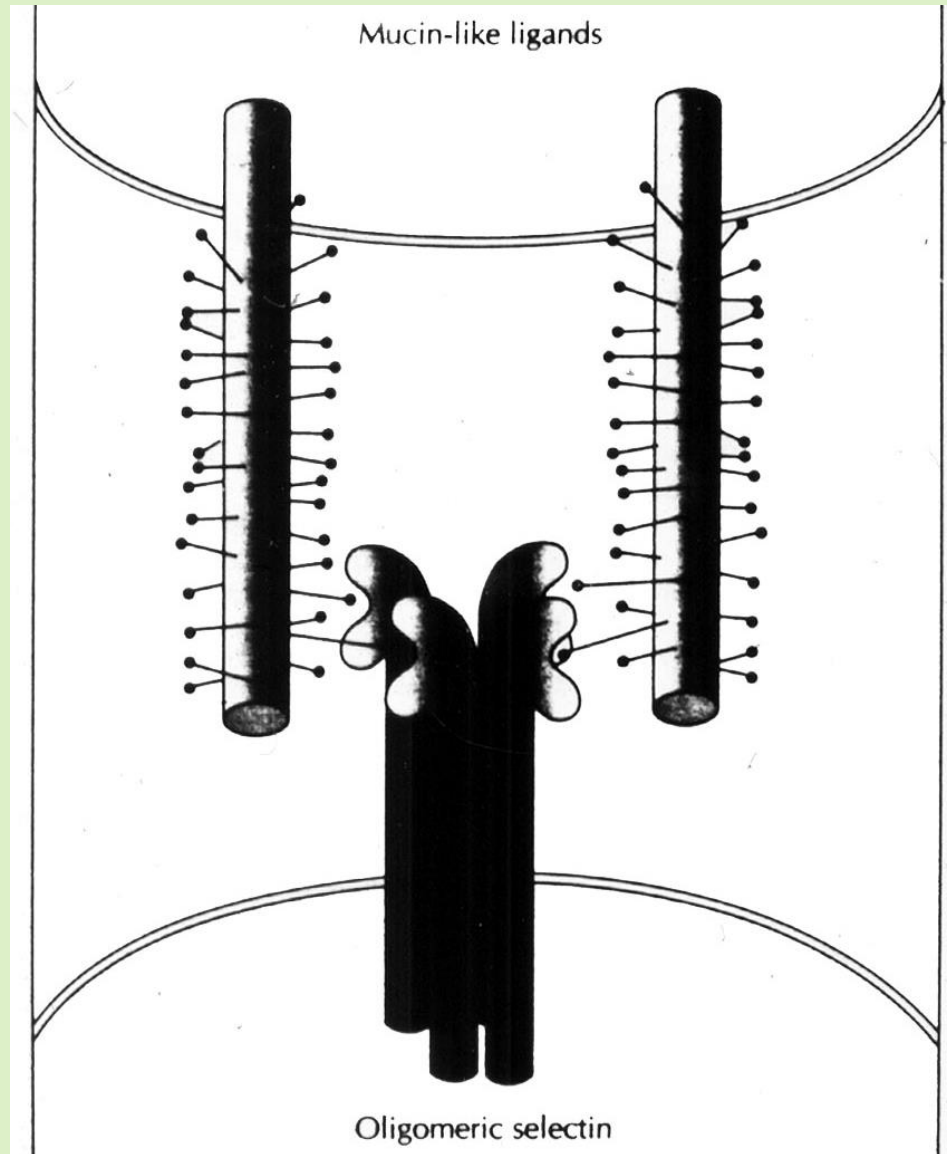


- ▶ мембранные и секретируемые
- ▶ высокая молекулярная масса
- ▶ много S–S связей
- ▶ отрицательный заряд: -COOH, -OSO₃H
- ▶ чередование сильно гликозилированных (кластеры) и «голых» участков
- ▶ необычно высокая гетерогенность ОС (зачем?)
- ▶ характерные пептидные мотивы (тандемные повторы)
- ▶ развернутая конформация
- ▶ характерные физические свойства



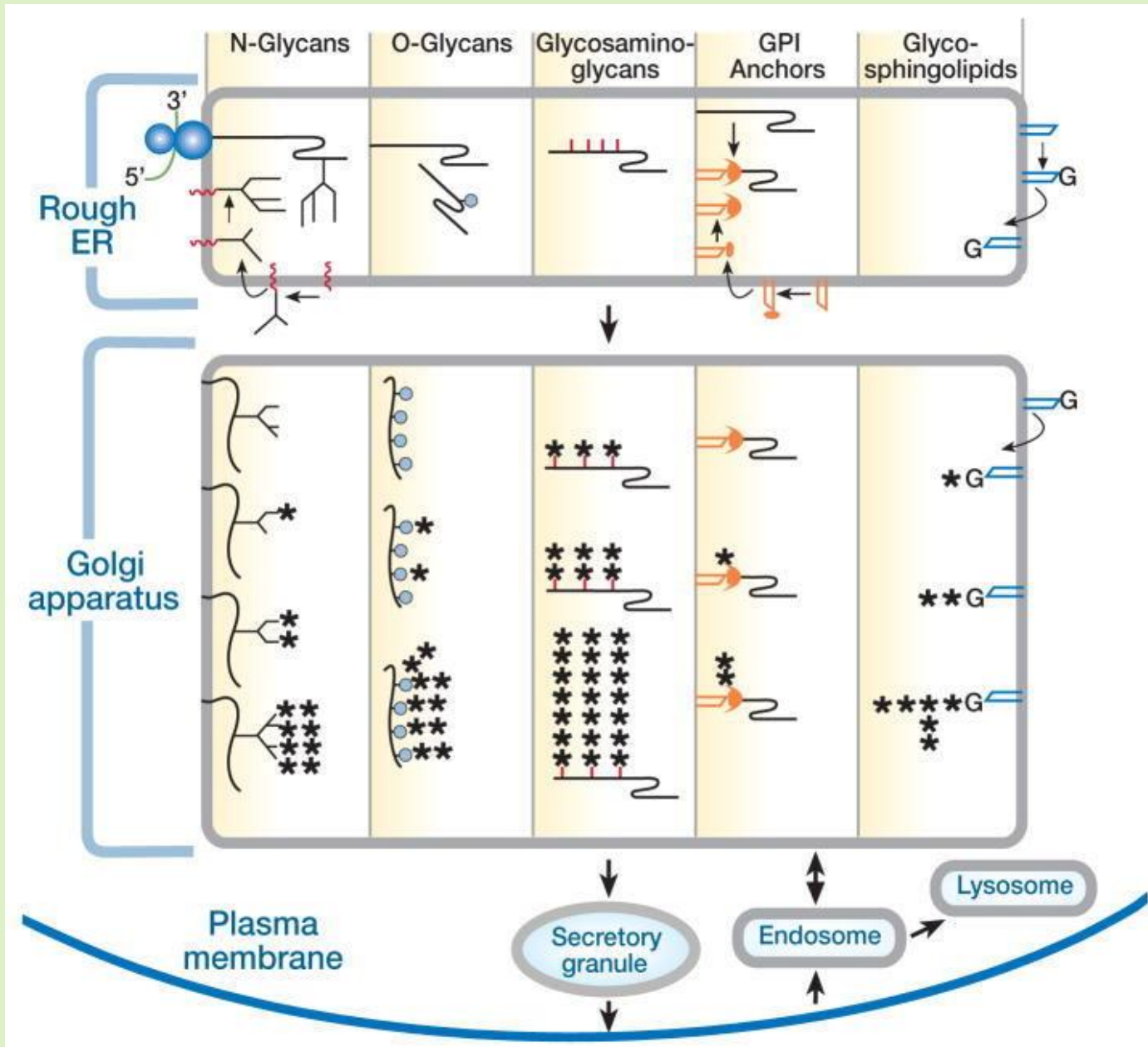
Муцины – периферия гликокаликса

73



Blood groups O, H	Fuca1-2Gal-
Blood group A	GalNAca1-3(Fuca1-2)Gal-
Blood group B	Galα1-3(Fuca1-2)Gal-
Linear B	Galα1-3Gal-
Blood group I	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Gal-
	Galβ1-4GlcNAcβ1-6(Galβ1-4GlcNAcβ1-3)Gal-
Blood group I	
Blood group Sd(a), Cad	GalNAcβ1-4(Siaα2-3)Gal-
Blood group Lewis ^a	Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAc-
Blood group Lewis ^x	Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAc-
Blood group sialyl-Lewis ^x	Siaα2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAc-
Blood group Lewis ^y	Fuca1-2Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAc-

Биосинтез гликоконъюгатов в эукариотах



Конец лекции 3