

Кононов Леонид Олегович

**ХИМИЯ УГЛЕВОДОВ И
ГЛИКОБИОЛОГИЯ**

<https://углеводы.su>

Добрый день!

Темы занятий

2

ЛЕКЦИИ:

1. Введение в гликобиологию. Стереохимия углеводов.
2. Химические свойства. Синтез.
3. Гликопротеины
4. Гликолипиды, полисахариды, протеогликаны
5. Структурный анализ гликопротеинов и олигосахаридов.
6. Углевод-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).

Сначала вы прослушаете семь лекций.

А затем у нас будет два семинара, на который мы будем решать задачи по темам, которые, с одной стороны, обычно представляют наибольшую трудность, а с другой - наверняка вам пригодятся в дальнейшем.

Семинары необходимо посещать, т.к. на экзамене наряду с теоретическим вопросом вам будет предложено решить задачу. Если теорию можно прочитать в книгах, то с задачами ситуация посложнее.

Я не буду останавливаться на программе курса. С ней вы можете ознакомиться самостоятельно.

А вот пару слов о рекомендуемой литературе скажу.

Лекция 3

Гликопротеины:

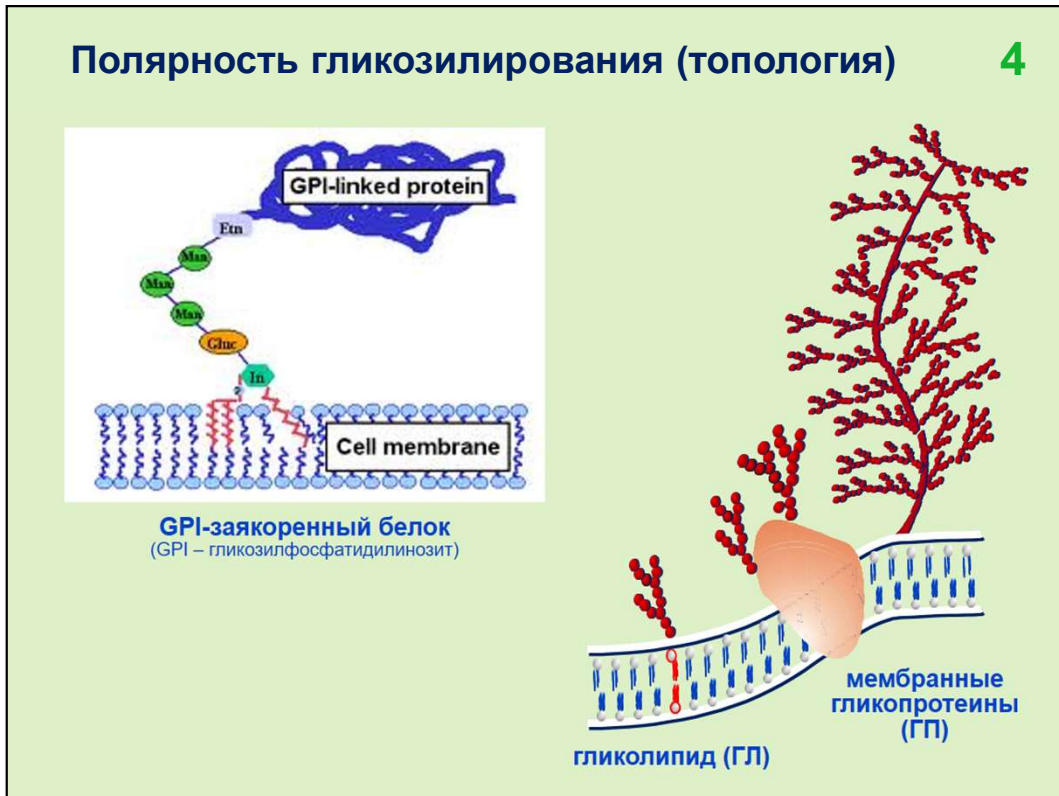
типы, структура, биосинтез, функции

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>).

Сегодня речь пойдет о гликопротеинах. Мы рассмотрим различные типы гликопротеинов, их структуру, биосинтез и функции. Всю информацию по данной теме можно найти в книге «Основы гликобиологии». Номера глав перечислены в соответствии с ходом изложения материала.

Полярность гликозилирования (топология)

4



Прежде всего надо отметить, что гликопротеины на мембранах расположены несимметрично, обычно они располагаются на внешней стороне мембраны. Говорят о полярности гликозилирования. Это так называемая топология гликозилирования.

Гликопротеины

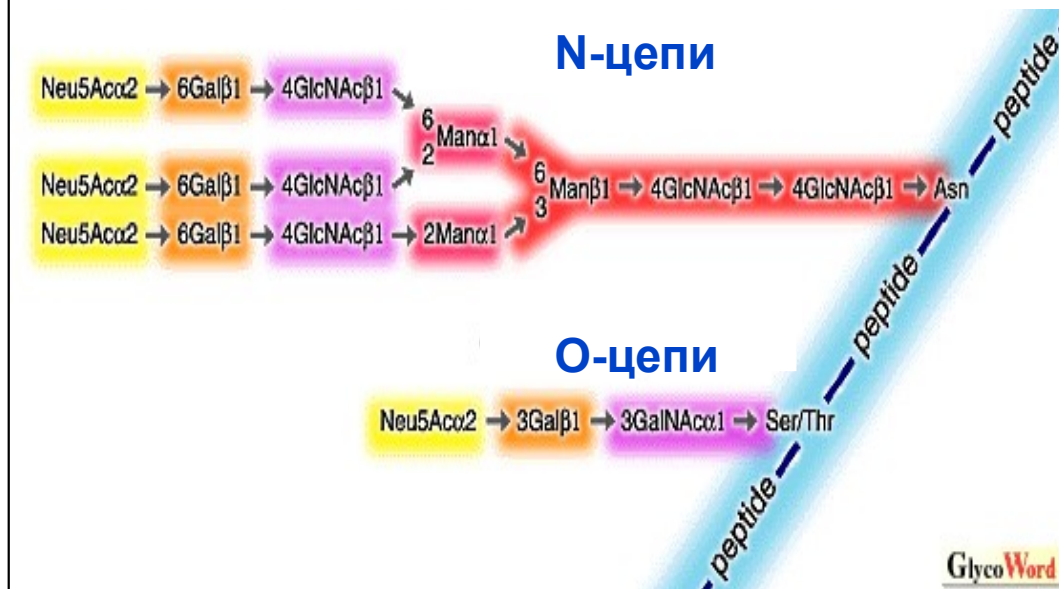
N-Цепи и O-цепи

Различают гликопротеины с N- и O- углеводными цепями.

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

6

- N-гликозидные: $\text{–GlcNAc}\beta\text{–Asn}$
- O-гликозидные: $\text{–GalNAc}\alpha\text{–Ser/Thr}$



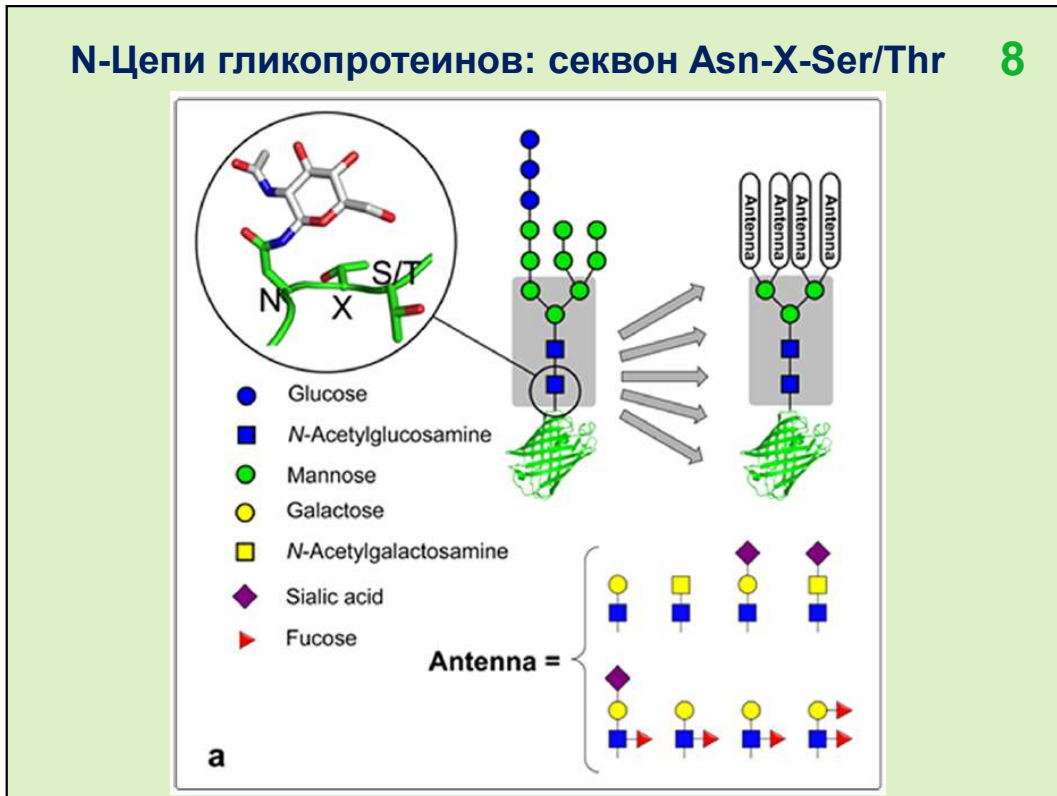
Различают два основных типа гликопротеинов: содержащие N- и O-углеводные цепи. N-цепи – это олигосахаридные цепи, которые присоединены к атому азота аспарагина, на восстанавливаемом конце этой цепи находится остаток бета-N-ацетилглюкозамина. O-цепи присоединены к остаткам серина или треонина, которые гликозилированы остатком альфа-N-ацетилгалактозамина. Часто на одной полипептидной цепи могут встречаться как N- так и O-углеводные цепи. Именно этот вариант показан на слайде.

N-Цепи гликопротеинов

Структура

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

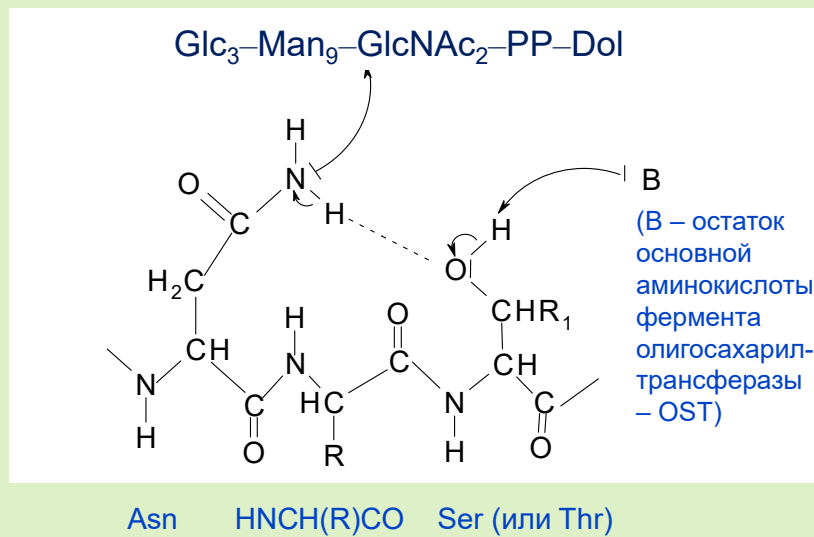
8



Общим для всех N-цепей является присоединение остатка бета-N-ацетилглюкозамина к амидному атому азота остатка аспарагина. Оказывается, не все остатки аспарагина способны нести углеводную цепь. Потенциальным сайтом гликозирования может быть только определенная последовательность аминокислот, которая называется «секвон». Остаток аспарагина должен быть присоединен через один аминокислотный остаток к остатку серина или треонина. Это так называемый секвон Asn-X-Ser/Thr. В роли центрального аминокислотного остатка X может выступать любая аминокислота кроме пролина. Поэтому присутствие в полипептидной цепи секвонов Asn-X-Ser/Thr обозначает сайты ПОТЕНЦИАЛЬНОГО гликозирования.

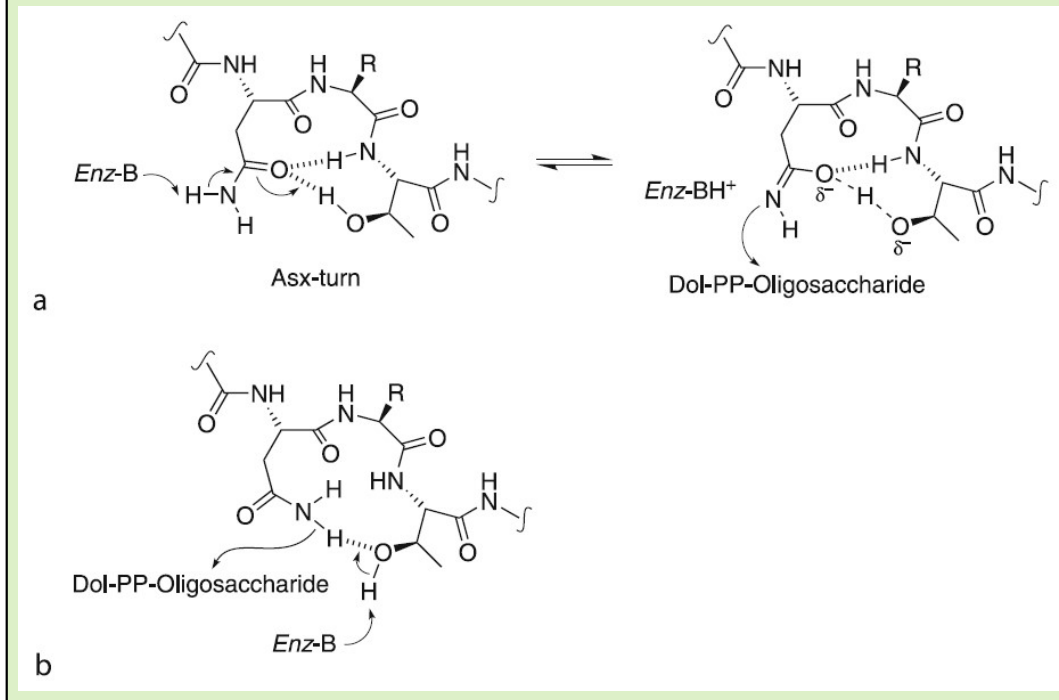
Потенциальные сайты гликозилирования Почему гликан присоединен к Asn-X-Ser/Thr?

9



Для того чтобы предшественник гликановых цепей был присоединен к полипептидной цепи, необходимо активировать остаток аспарагина, что достигается в результате взаимодействия гидроксильной группы серина или треонина с амидной группой аспарагина. Именно это объясняет жесткое требование присутствия серина или треонина через один аминокислотный остаток от аспарагина.

Механизмы активации Asn для реакции с OST 10



При этом предполагают несколько механизмов активации, когда гидроксильная группа выступает в качестве акцептора или донора водородной связи. Так или иначе, в активации аспарагинового остатка участвует олигосахарилтрансфераза (OST) – фермент, который присоединяет гликан к остатку аспарагина полипептидной цепи.

N-Цепи гликопротеинов

11

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

НО:

- ▶ только 5% белков классифицированы как «гликопротеины»

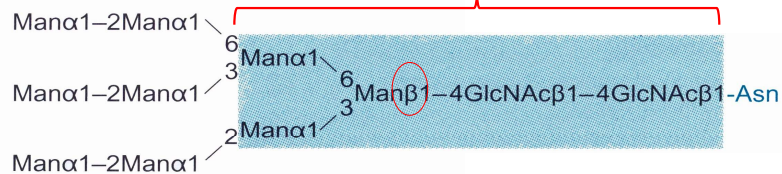
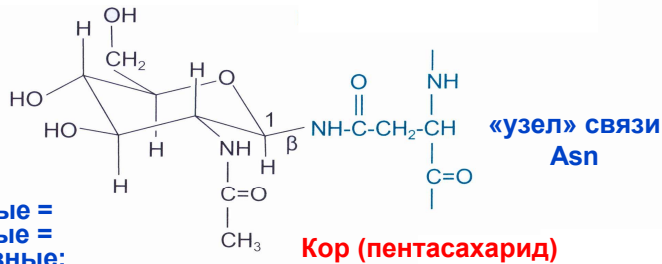
Анализ нуклеотидной последовательности, кодирующей белки, показывает, что 70% белков имеют потенциальный сайт гликозилирования. У половины проанализированных белков есть углеводная цепь, влияющая на их активность. Однако только 5% белков классифицированы как «гликопротеины». Вот такая странная ситуация, которая связана с историческими причинами. Основная догма молекулярной биологии, о которой мы говорили на первой лекции, прочно укоренилась в учебниках и головах ученых.

Место связи с белком и два типа N-цепей

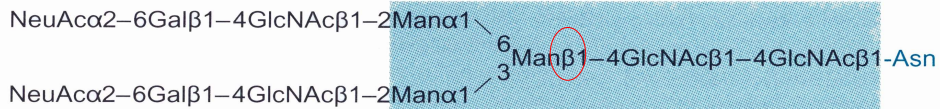
12

На восстанавливающем конце – GlcNAc

Олигоманнозные =
маннозо-богатые =
высоко-маннозные:



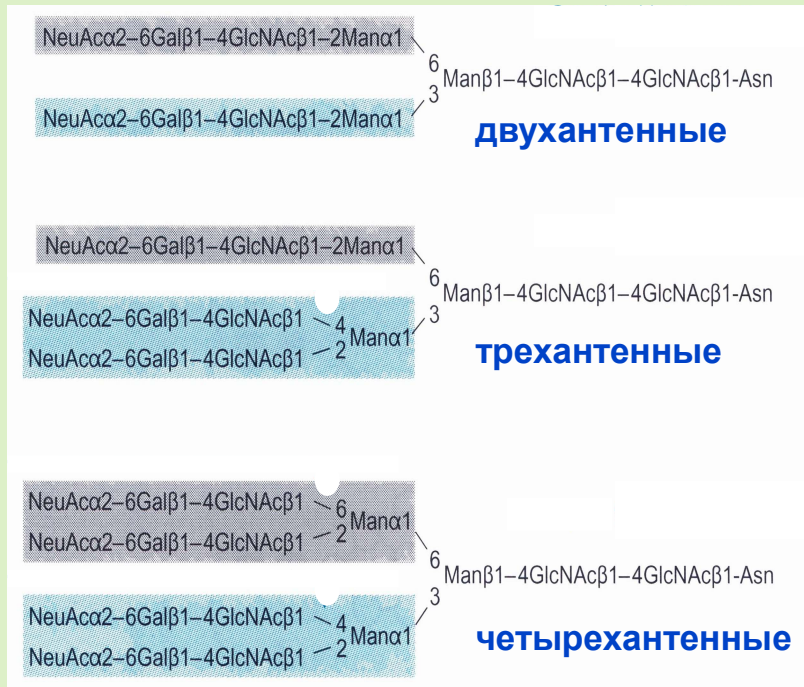
Комплексные:



Последовательность углеводных остатков, присоединяющихся к полипептидной цепи, строго консервативна, включает пять моносахаридных остатков и называется пентасахаридным кором. Это два 1,4-связанных остатка бета-D-N-ацетилглюкозамина и остаток бета-D-маннозы, присоединенной к ним 1,4-связью. В этом остатке маннозы происходит разветвление. По третьему и шестому положениям этого остатка маннозы альфа-гликозидными связями присоединены два остатка D-маннозы. Моносахаридный состав углеводных цепей, присоединенных к кору, может состоять из остатков альфа-маннозы (это так называемые олигоманнозные цепи). Встречаются также комплексные цепи, включающие остатки галактозы, N-ацетилглюкозамина и иногда N-ацетилнейраминовой кислоты.

«Антенность» N-цепей (комплексные цепи)

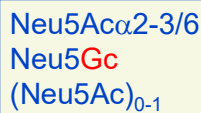
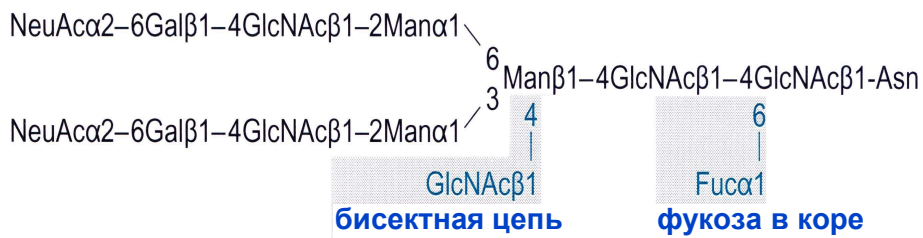
13



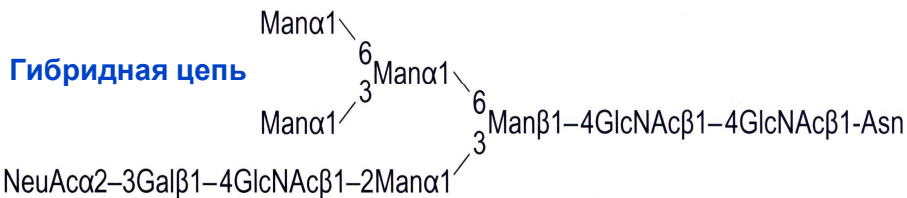
Количество разветвлений в комплексных цепях определяет их «антенность». Встречаются двух-, трех-, четырех-антенные цепи. Известны примеры большего числа антенн.

... и ещё большее разнообразие

14





















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



Гибридные цепи получаются при сочетании маннозных и комплексных цепей. Углеводные остатки кора также могут иметь ряд заместителей. Например, узловой остаток бета-D-маннозы в коре может быть замещен также и по четвертому положению N-ацетилглюкозамином (это так называемая бисектная цепь). Остаток N-ацетилглюкозамина в коре может быть замещен L-фукозой. Часто присутствует остаток N-ацетил- или N-гликолилнейраминовой кислоты. Углеводные остатки могут быть также сульфатированы, фосфорилированы или ацетилированы.

Символы моносахаридов (новая система)

15

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



Essentials of Glycobiology
Second Edition

Chapter 1, Figure 5

Структуры N-цепей гликопротеинов не очень удобно изображать с помощью трехбуквенных обозначений моносахаридов.

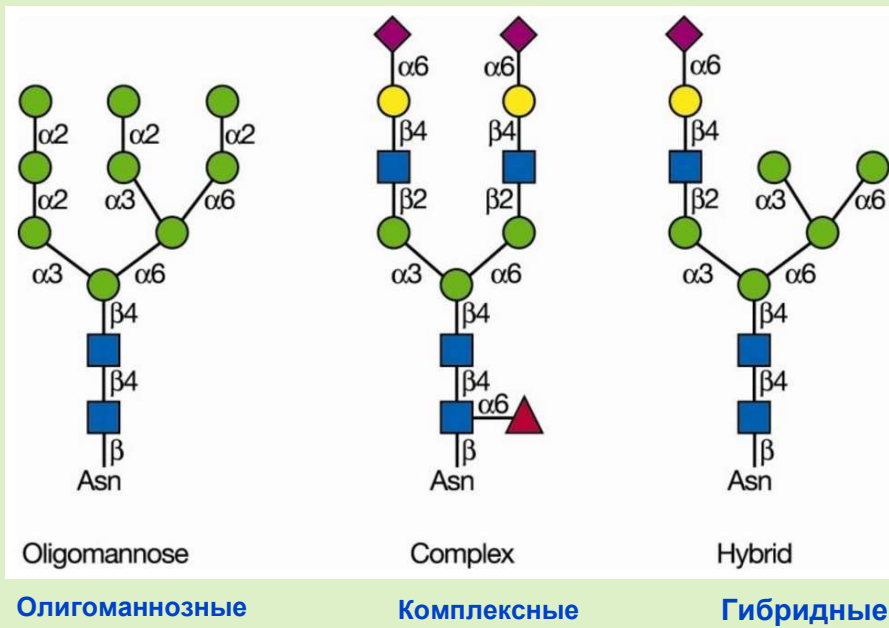
В последние годы используют вот такую систему обозначений, которая в настоящее время она является общепринятой.

Форма пиктограмм совпадает у моносахаридов, относящихся к одному классу (например, символы всех гексоз круглые, аminosахара – квадраты, все кислоты - ромбы).

Для различения отдельных представителей добавлен цвет.

Базовые типы N-цепей гликанов

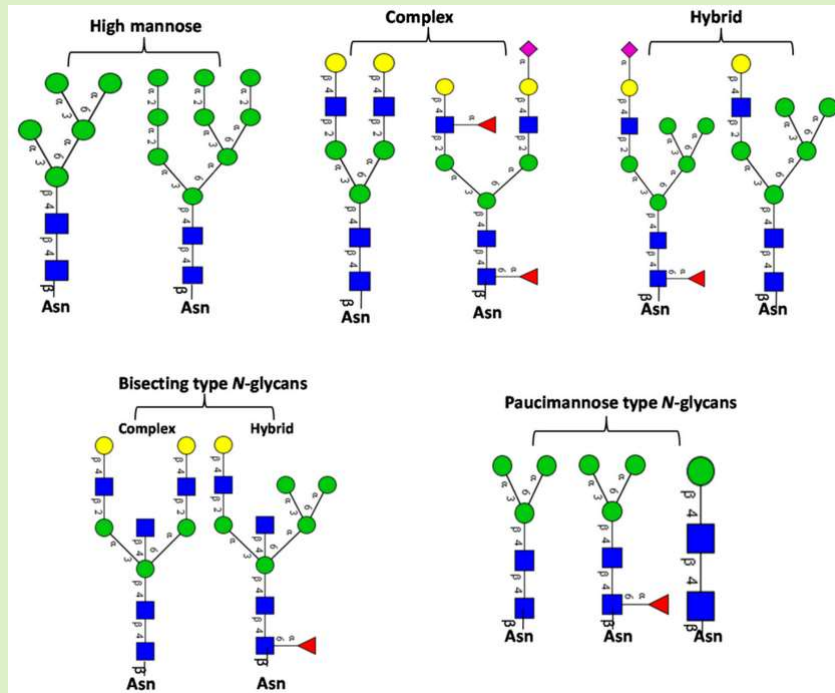
16



Базовые типы N-цепей гликанов, представленные в форме пиктограмм: олигоманнозные, комплексные и гибридные.

«Все» типы N-цепей гликанов

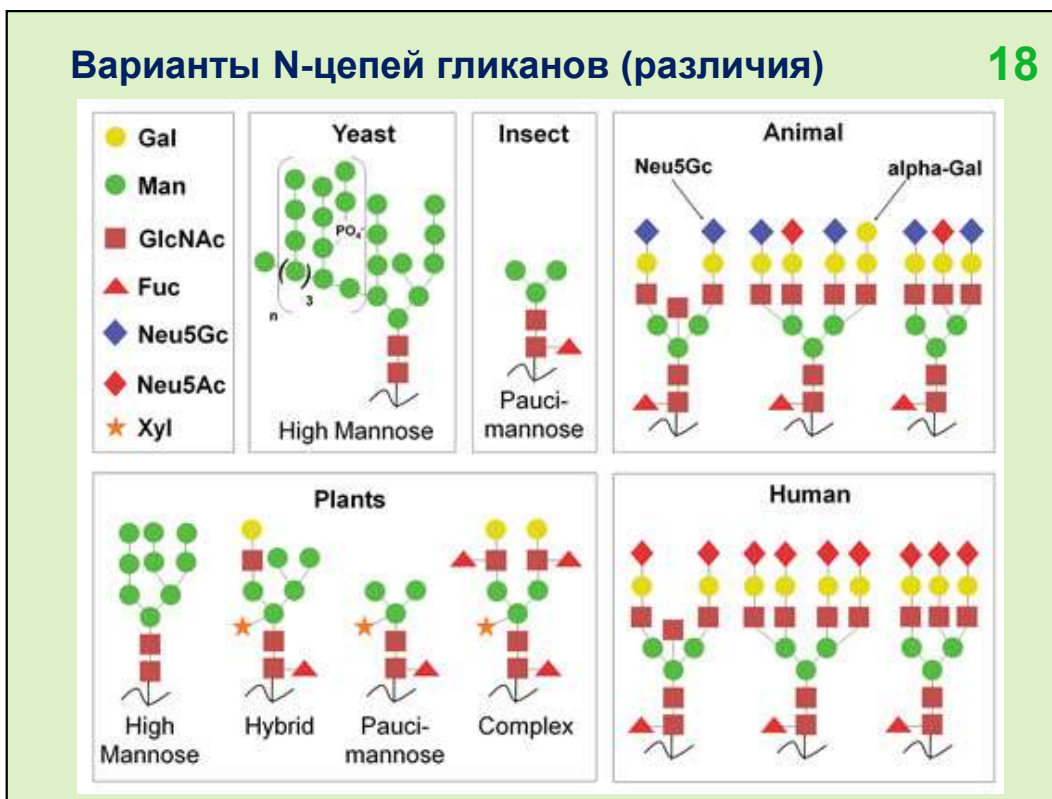
17



Помимо перечисленных встречаются также высокоманнозные, бисектные N-цепи, а также цепи, представленные только пентасахаридным кором или содержащие только один остаток маннозы (paucimannose chains – «маломаннозные цепи» (русский термин не устоялся), от англ. **paucity** – малочисленность, скудность).

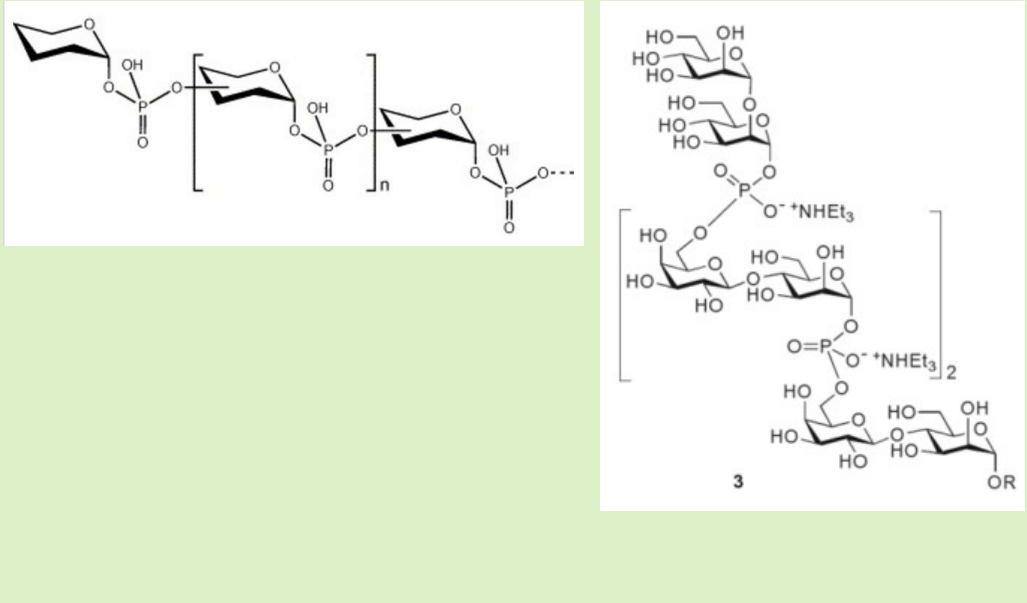
Варианты N-цепей гликанов (различия)

18



В живых организмах могут быть представлены различные варианты N-цепей. В растениях остатки маннозы в N-цепях могут быть замещены ксилозой. N-цепи человека и животных отличаются присутствием остатков N-ацетилнейраминовой или N-гликолилнейраминовой кислоты соответственно. Для дрожжей характерны высоко-маннозные N-цепи, а цепи, представленные только пентасахаридным кором, характерны для насекомых.

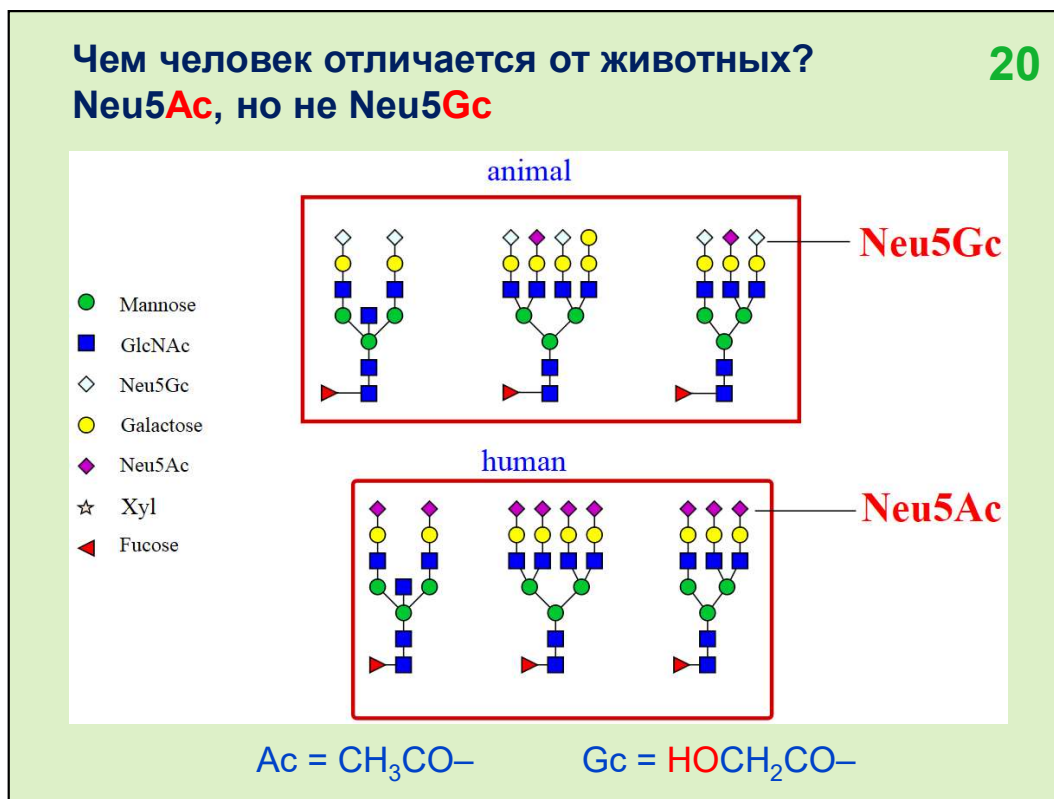
Фосфодиэфирная межсахаридная связь (дрожжи) ¹⁹



Нередко в высоко-маннозных цепях остатки маннозы соединены не гликозидной, а фосфодиэфирной связью, представленной на слайде. При этом возможны варианты, в которых гликозидно-связанные фрагменты соединены между собой фосфодиэфирными связями, как это показано на структуре справа.

Чем человек отличается от животных? Neu5Ac, но не Neu5Gc

20



Чем человек отличается от животных? Оказывается, ответить на этот вопрос можно, сравнивая структуры гликанов. В норме в организме человека присутствует только N-ацетилнейраминовая кислота. Присутствие у человека гликанов, содержащих не N-ацетилнейраминовую кислоту, а ее гидроксильный аналог - N-гликолилнейраминовую кислоту, что характерно для животных, может быть диагностическим признаком некоторых заболеваний. Принято считать, что N-гликолилнейраминовая кислота может поступать в организм человека только с пищей, т.к. ген, кодирующий соответствующий фермент - гидроксилазу, был утрачен в ходе эволюции при переходе от приматов к человеку.

Гетерогенность цепей на примере овальбумина: 21 гликоформы белка

Только один сайт
гликозилирования



N-цепи, гликозилирующие один и тот же белок характеризуются высокой степенью гетерогенности. Поэтому гликопротеин (белок с уникальной полипептидной цепью) представлен сразу множеством гликоформ, образованных разными N-цепями. Это можно увидеть на примере овальбумина, который имеет только один сайт гликозилирования. Это так называемая мИкрогетерогенность гликозилирования. В то же время встречаются гликопротеины (на слайде в качестве примера показан муцин крысы), у которых множество сайтов гликозилирования (в случае муцина крысы в общей сложности почти полторы тысячи сайтов гликозилирования). Однако полипептидная цепь гликозилирована только одной формой N-цепи (отметим, что большинство сайтов гликозилировано O-гликанами). Возможны комбинации таких вариантов: много сайтов и много типов гликанов.

Часть из потенциальных сайтов гликозилирования может вообще не иметь углеводных цепей. Присутствие или отсутствие гликанов в том или ином потенциальном сайте гликозилирования характеризует так называемую мАкрогетерогенность гликозилирования.

Это означает в данном конкретном препарате гликопротеина обычно присутствуют различные варианты этого белка (гликоформы), различающиеся как наличием/отсутствием гликанов в определенных сайтах гликозилирования (мАкрогетерогенность), так и распределением

гликанов с различной структурой по сайтам гликозилирования (мИкрогетерогенность). Т.е. природный гликопротеин – это практически всегда СМЕСЬ молекул разной структуры (с совпадающей полипептидной цепью). Эта гетерогенность гликозилирования гликопротеинов явно функциональна, т.к. варьирует у разных индивидов и меняется при патологиях.

N-цепи α1-кислого гликопротеина (показаны десиалилированные гликаны)

22

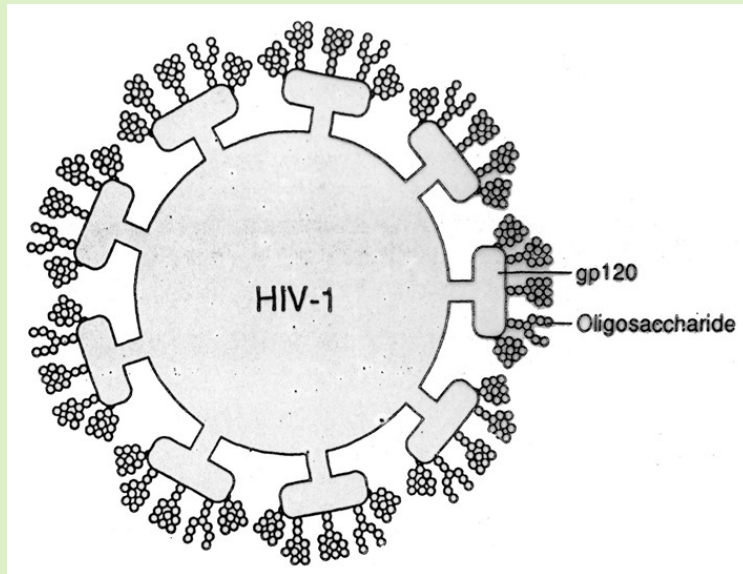


Встречаются гликопротеины, полипептидная цепь которых имеет несколько сайтов связывания, и несет разные наборы N-цепей.

Гетерогенность GP120 ВИЧ (HIV-1)

23

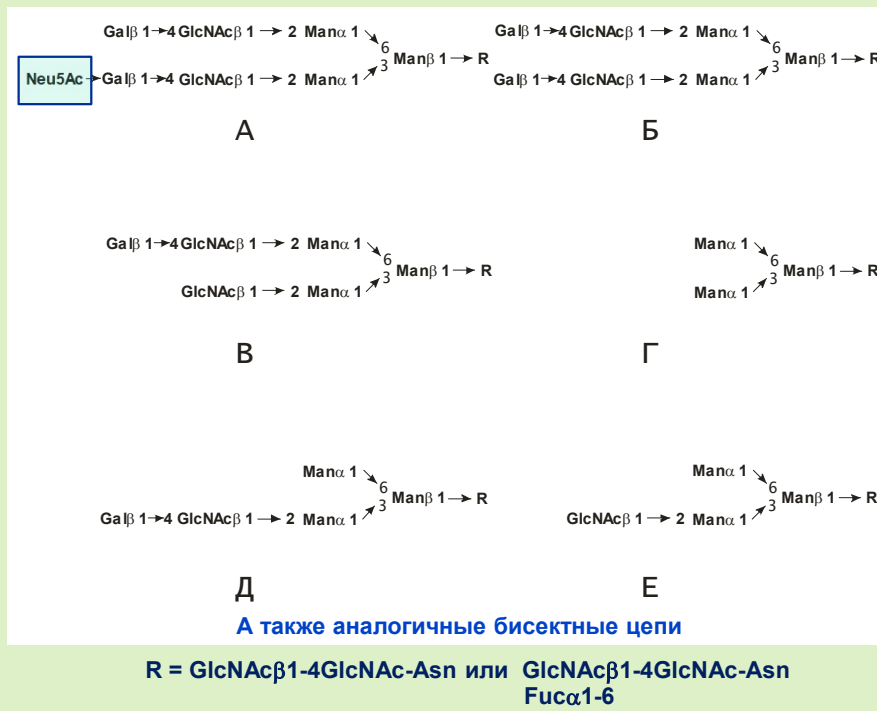
более 90 видов цепей



Еще пример гетерогенности – гликопротеин вируса иммунодефицита человека GP120, который имеет более 90 различных видов цепей.

N-Цепи иммуноглобулина IgG человека

24

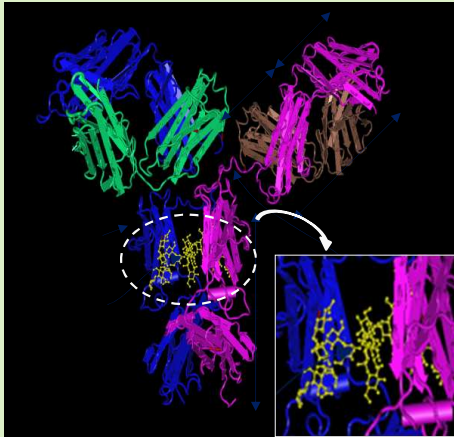


Разнообразные N-цепи можно обнаружить в иммуноглобулинах человека. Подчеркнем, что наряду с показанными на слайде структурами гликанов в иммуноглобулинах присутствуют аналогичные бисектные цепи, т.е. содержащие дополнительный остаток N-ацетилглюкозамина в четвертом положении узлового остатка бета-маннозы. Встречаются также гликаны, содержащие в коре остаток фукозы.

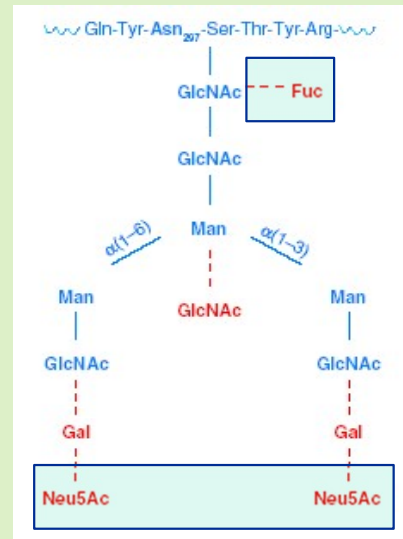
N-цепи иммуноглобулина IgG человека

25

Только вариант без фукозы взаимодействует с цитотоксичными клетками



Противовоспалительный эффект Neu5Ac-варианта



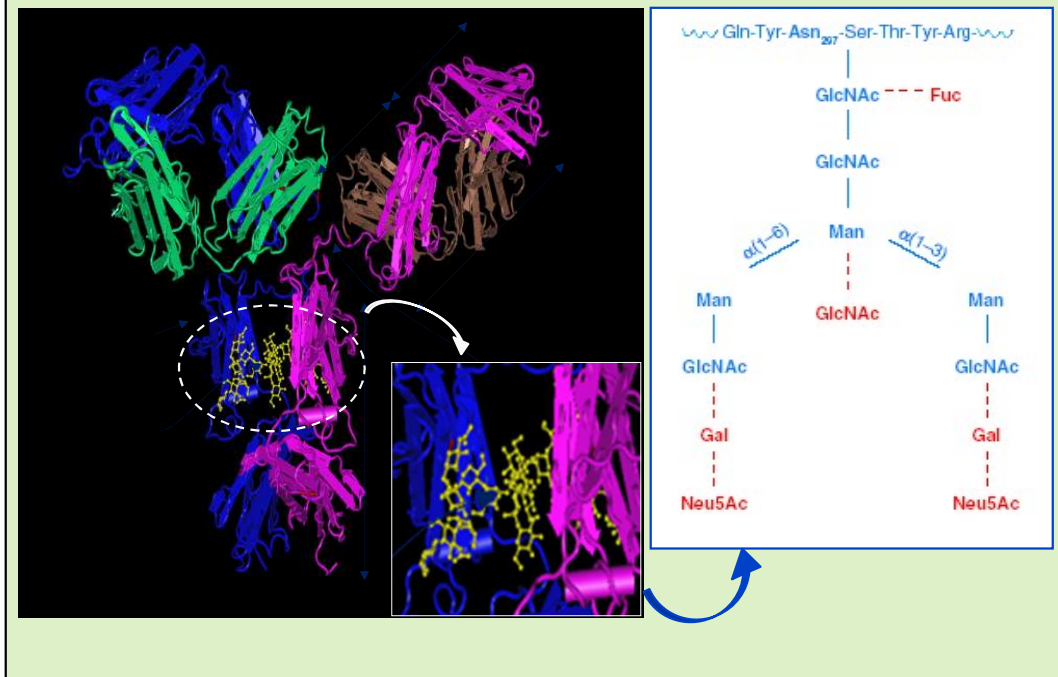
Эти вариации структуры гликанов функциональны.

Оказывается, в зависимости от строения олигосахаридных цепей этого гликопротеина зависят его свойства, и очевидно, функции.

Так, только вариант без внутренней фукозы взаимодействует с цитотоксичными клетками.

А вариант этого белка, несущий дополнительно остатки N-ацетилнейраминовой кислоты (обозначается как Neu5Ac) проявляет противовоспалительный эффект.

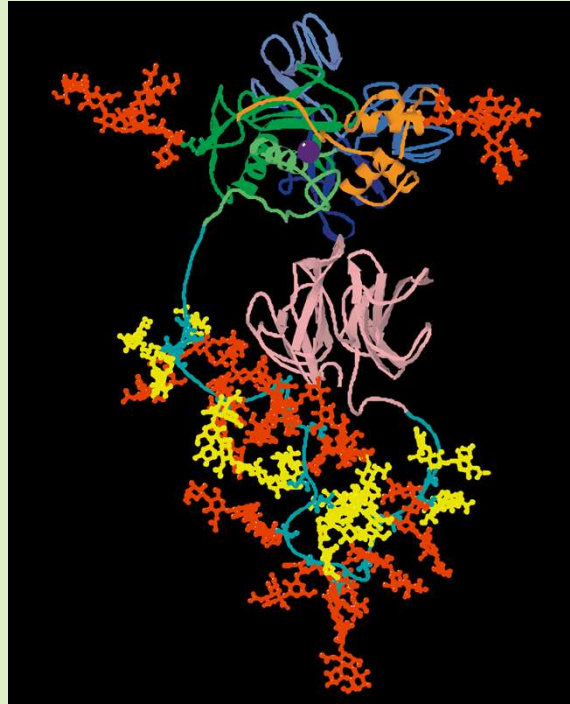
Необычная топография N-цепей IgG человека 26



Здесь уместно напомнить про необычную топографию гликозилирования иммуноглобулинов. Гликаны расположены как бы «в глубине» белка., что не мешает им влиять на свойства гликопротеина.

Обычная топография гликанов: желатиназа

27



Обычная топография гликанов на полипептидной цепи показана на примере желатиназы. Цепи экспонированы во внешнюю область макромолекулы гликопротеина и доступны для взаимодействия.

N-Цепи гликопротеинов

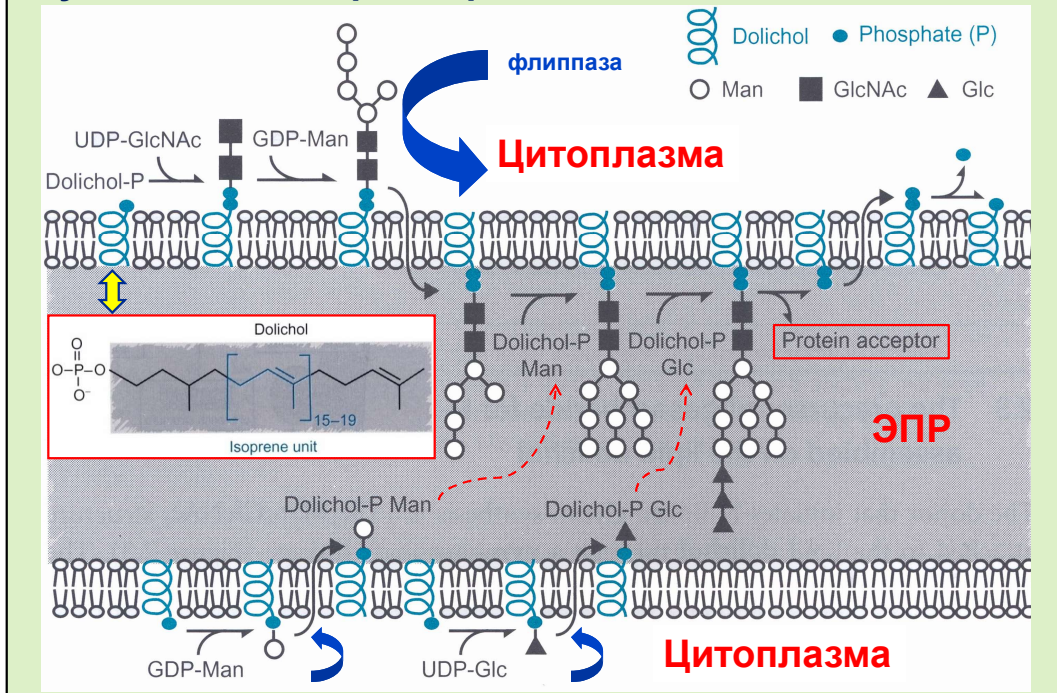
Биосинтез

Сборка 14-сахаридного предшественника

А теперь рассмотрим то, как в клетке синтезируется такое разнообразие гликоформ гликопротеинов.

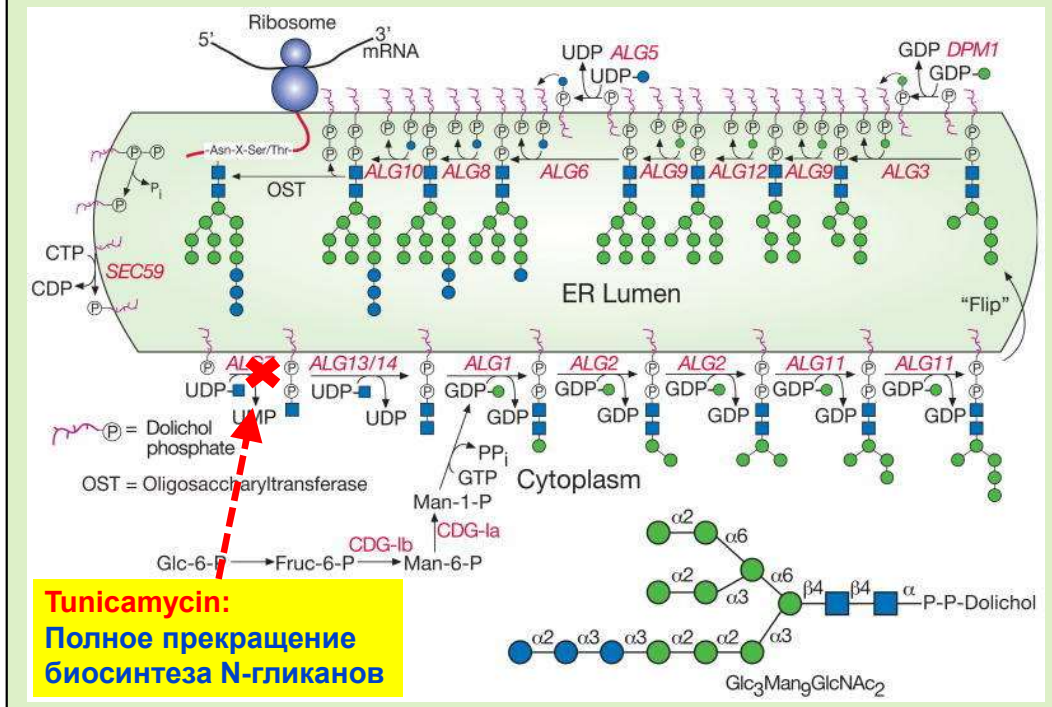
Начнем с биосинтеза N-цепей гликопротеинов, а именно со сборки 14-сахаридного предшественника всех N-гликанов.

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



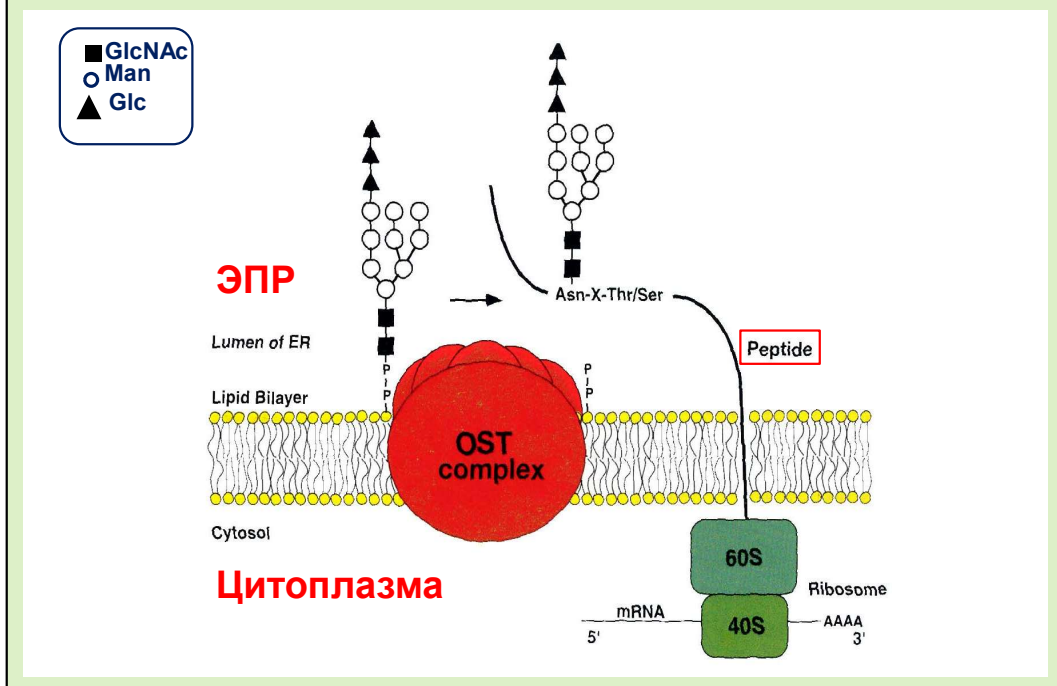
На первом этапе синтезируется четырнадцатичленный олигосахаридный предшественник гликановых цепей, содержащий два остатка N-ацетилглюкозамина, девять остатков маннозы и три остатка глюкозы. Биосинтез начинается на цитоплазматической стороне мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭПР), где долихолфосфат дополнительно фосфорилируется, давая долихолпирофосфат, а далее на него переносятся два остатка N-ацетилглюкозамина (в качестве гликозил-донора используется уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамин). После чего к продукту присоединяются пять остатков маннозы (в качестве гликозил-донора используется гуанозиндифосфо-манноза). Затем полученный олигосахаридный блок, присоединенный к долихолу, с помощью флиппазы транспортируется на внутреннюю сторону мембраны ЭПР, где к нему присоединяются еще остатки маннозы, но уже с использованием представителя другого типа гликозил-доноров – долихолфосфо-маннозы. Последние три остатка глюкозы присоединяются с помощью долихолфосфо-глюкозы в качестве гликозил-донора. Отметим, что эти долихолфосфо-сахара синтезируются на цитоплазматической стороне мембраны ЭПР.

Детали биосинтеза $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ 30



Каждая стадия биосинтеза катализируется ферментами. Олигосахарилтрансфераза (OST) переносит финальный четырнадцатичленный углеводный предшественник (его структура показана в правом нижнем углу слайда) на растущую полипептидную цепь, которая синтезируется в рибосомах на поверхности ЭПР. Многие антибиотики ингибируют тот или иной этап биосинтеза олигосахаридных цепей.

Предшественник N-цепи (14-OS) переносится на Asn растущей полипептидной цепи целиком 31



Необходимо подчеркнуть, что олигосахарилтрансфераза КО-трансляционно переносит одним блоком четырнадцатичленный углеводный предшественник N-цепей на аспаригин в секвоне полипептидной цепи, которая синтезируется в рибосомах на поверхности ЭПР. По этой причине гликозилирование белков не совсем корректно называть ПОСТ-трансляционной модификацией, т.к. синтез полипептидной цепи и ее гликозилирование протекают параллельно. Более того, КО-трансляционно протекают и первые этапы процессинга 14-сахаридного предшественника, к рассмотрению которого мы сейчас и перейдем.

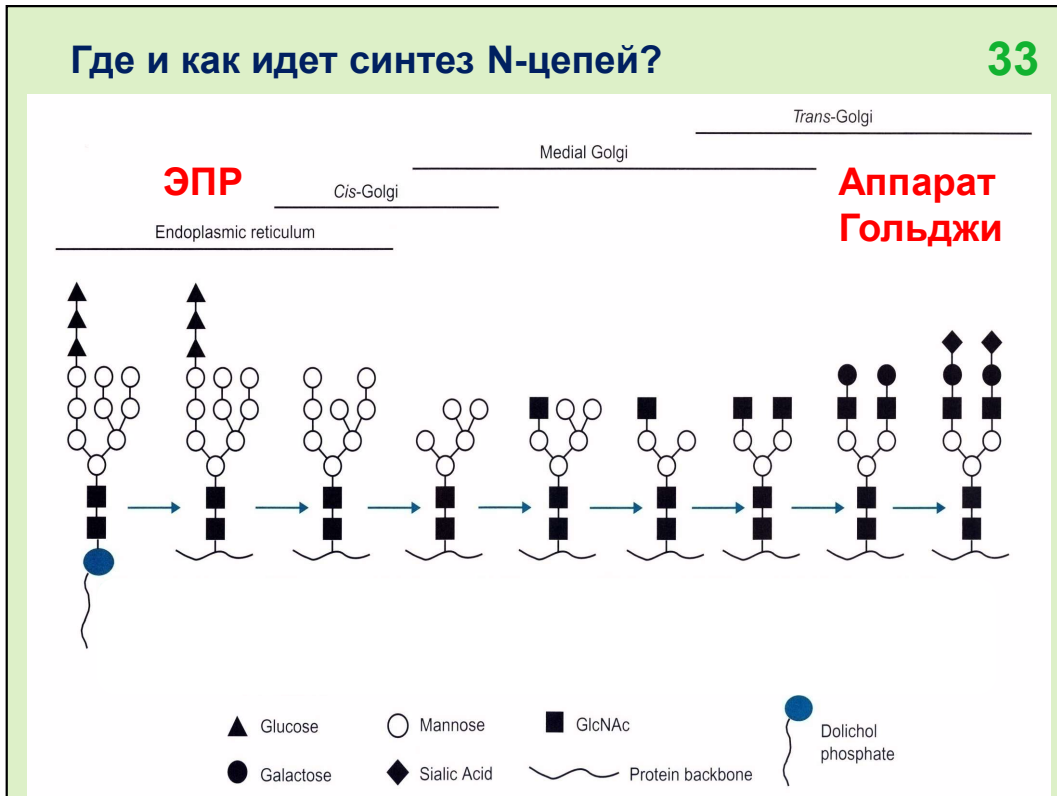
N-Цепи гликопротеинов

Биосинтез

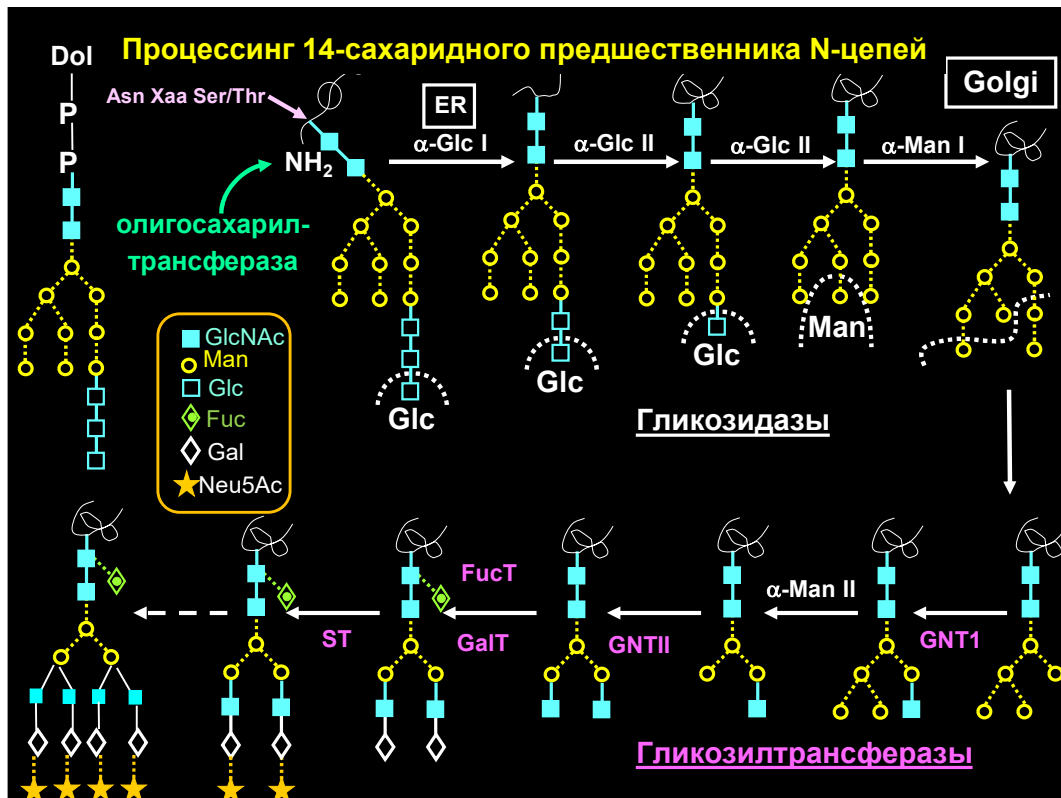
Процессинг 14-сахаридного предшественника

Где и как идет синтез N-цепей?

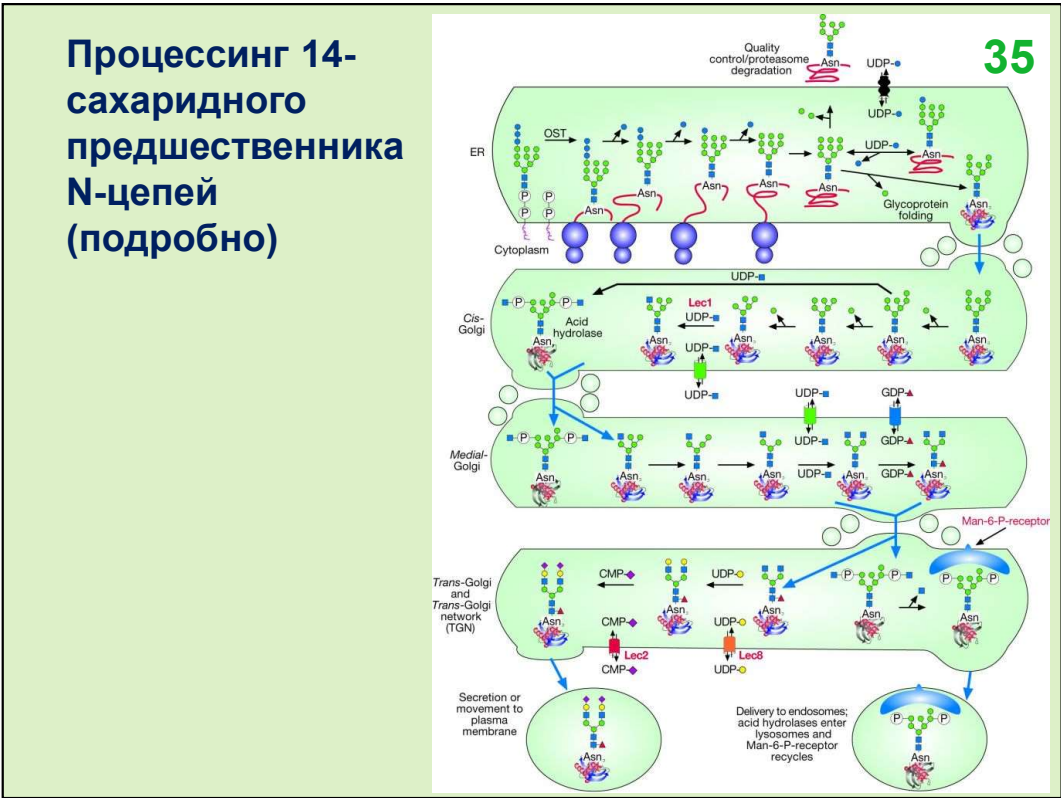
33



Преобладающая часть белков, синтезируемых в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), подвергается гликозилированию. Процессинг гликопротеинов происходит в ЭПР и затем в аппарате Гольджи. При этом разные этапы процессинга происходят в разных компартментах.

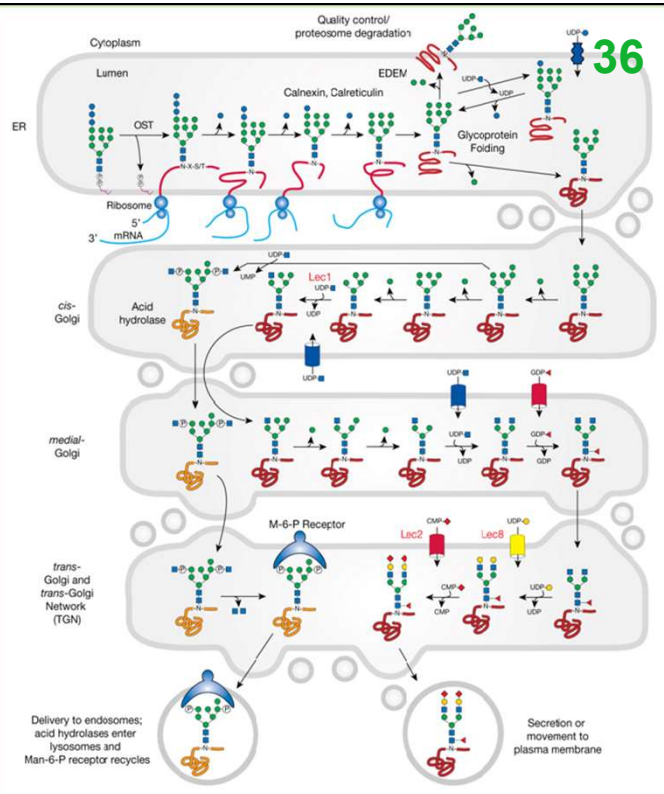


Специфичные ферменты (гликозидазы) последовательно отщепляют моносахаридные остатки от углеводной цепи. При этом глюкозидаза отщепляет первый, второй и третий остатки глюкозы, затем маннозидаза отщепляет сначала четыре остатка маннозы, а после присоединения остатка N-ацетилглюкозамина с помощью глюкозаминилтрансферазы, отщепляются еще два остатка маннозы. Так синтезируется ключевой фрагмент олигосахаридной цепи, из которого затем могут синтезируются комплексные цепи с помощью специфичных ферментов, присоединяющих различные моносахаридные остатки.

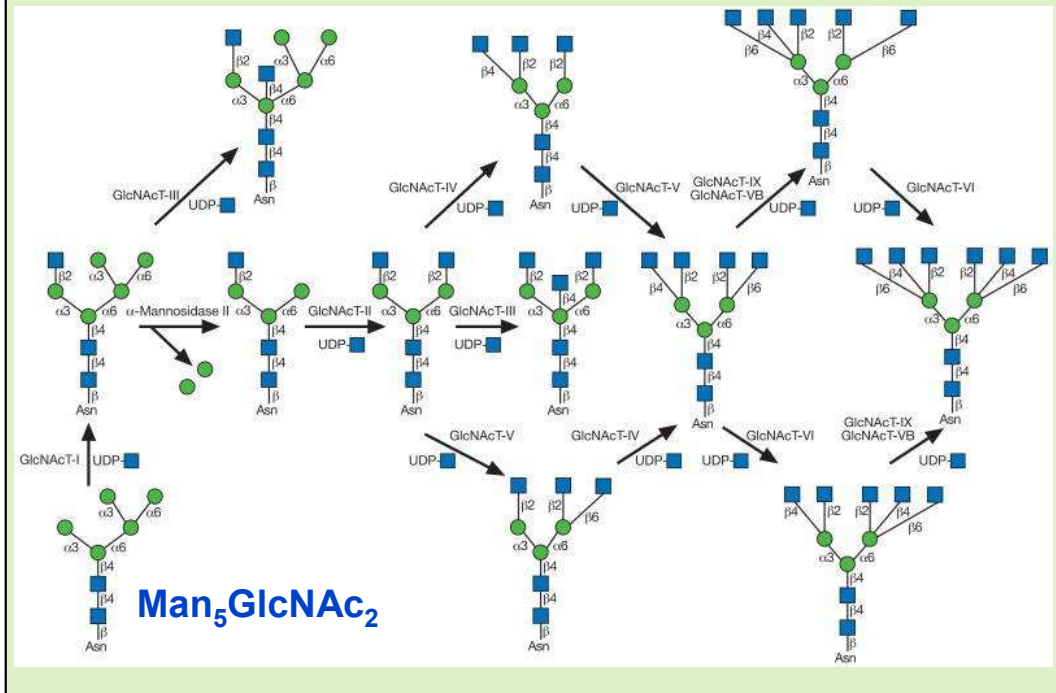


На этом слайде показаны компартменты ЭПР и аппарата Гольджи, в которых происходит синтез и процессинг гликопротеинов.

Процессинг 14-сахаридного предшественника N-цепей (подробно)

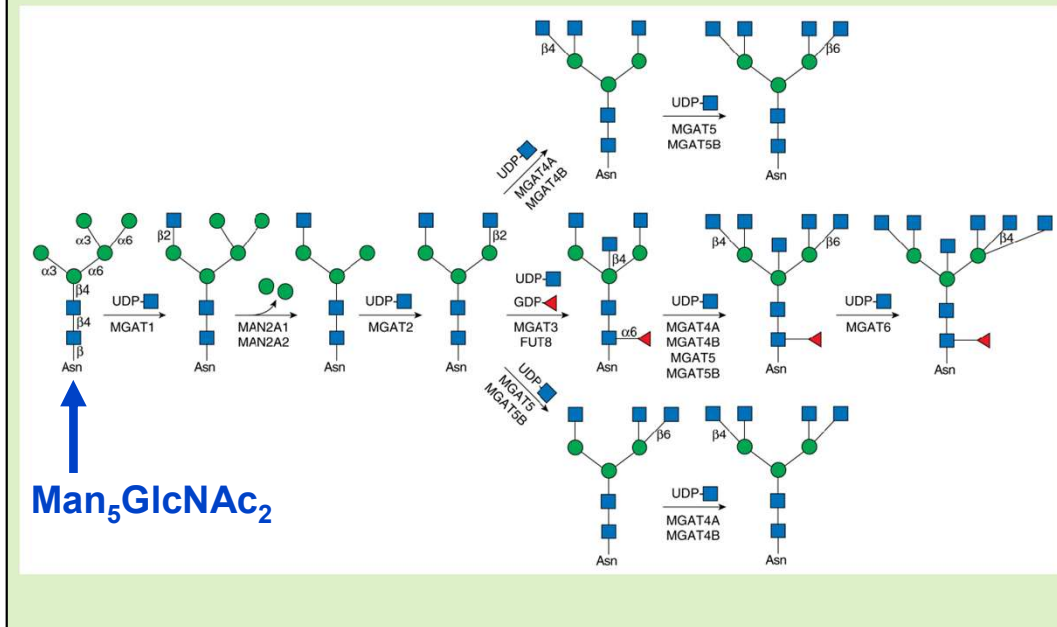


Введение разветвлений в $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (детали) 37

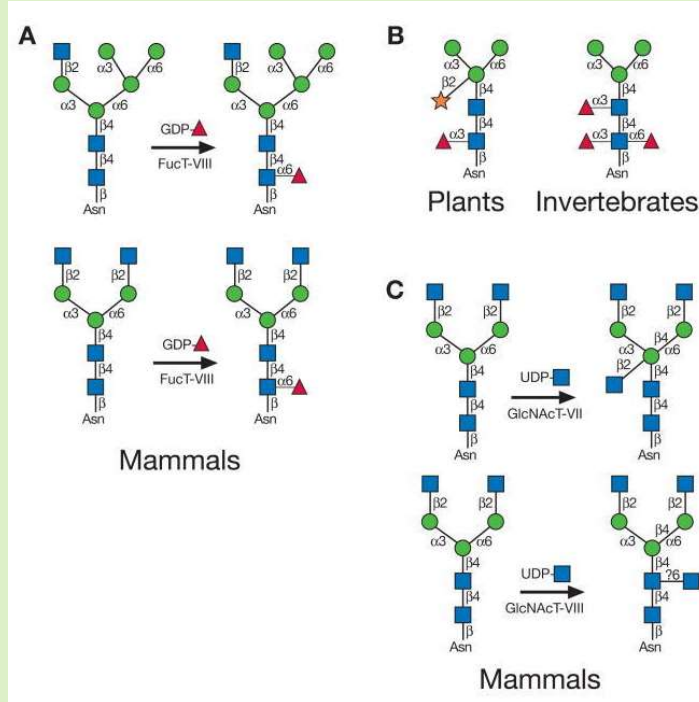


Branching of complex N-glycans. The hybrid and mature, biantennary, complex N-glycans shown in Figure 8.4 may contain more branches due to the action of branching N-acetylglucosaminyltransferases in the Golgi. The latter can act only after the prior action of GlcNAcT-I. GlcNAcT-III transfers N-acetylglucosamine to the β -linked mannose in the core to generate the bisecting N-acetylglucosamine. The presence of this residue inhibits the action of α -mannosidase II, thereby generating hybrid structures. A biantennary N-glycan may also accept the bisecting N-acetylglucosamine. More highly branched N-glycans are generated by the action of GlcNAcT-IV, GlcNAcT-V, and GlcNAcT-VI and may also carry the bisecting N-acetylglucosamine. The most highly branched structures with seven N-acetylglucosamine residues (including the bisecting N-acetylglucosamine) on the core of N-glycans have been found in a bird glycoprotein. Mammals have the potential for generating similarly complex structures. Each N-acetylglucosamine branch may be elongated with galactose, poly-N-acetylglucosamine, sialic acid, and fucose, as described in Chapter 13. The bisecting N-acetylglucosamine is not further elongated unless the branch initiated by GlcNAcT-II is missing.

Введение разветвлений в $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (детали) 38

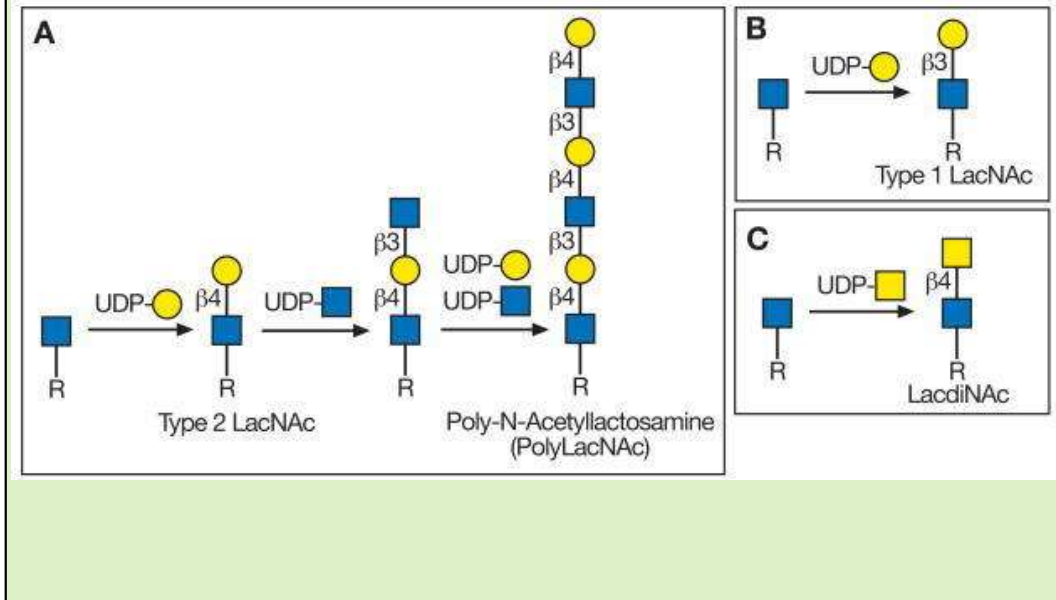


Модификация и разветвление N-гликановых цепей катализируется множеством ферментов. При этом если ферменты альфа-маннозидазы II MAN2A1 или MAN2A2 не действуют, образуется гибридный N-гликан. Когда активируются N-ацетилглюкозаминил-трансферазы (MGAT2) синтезируется двухантенные N-гликановые цепи.

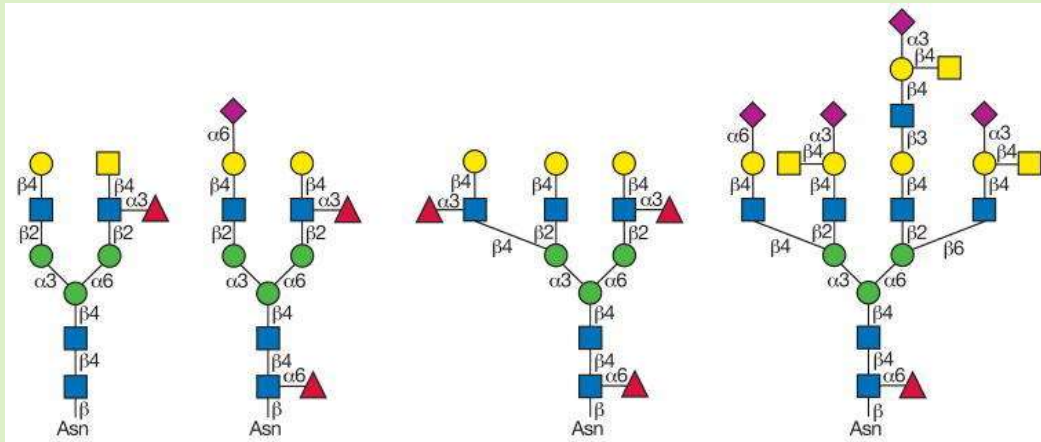


На этом слайде показаны известные модификация кора N-гликанов. Например, модификация кора у растений и беспозвоночных осуществляется введением в цепь остатков фукозы, присоединенных к остаткам N-ацетилглюкозамина, а также остатков ксилозы, присоединенной к узловому остатку бета-маннозы.

Удлинение цепи на остатках GlcNAc N-гликанов 40



На этом слайде показано удлинение цепи на остатках GlcNAc N-гликанов последовательным присоединением остатков галактозы и N-ацетилглюкозамина. Так синтезируются полилактозаминовые цепи. При этом возможны варианты: если на остаток GlcNAc переносится галактоза, то образуется N-ацетиллактозамин (LacNAc); а если на остаток GlcNAc переносится остаток N-ацетилгалактозамина, то образуется LacdiNAc.



Это примеры типичных олигосахаридных цепей «зрелых» гликопротеинов, отличающиеся разнообразием и включающие типичный для них кор.

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).

Гликозилтрансферазы трех аллельных форм катализируют реакции присоединения разных моносахаридных остатков в гликопротеинах антигенов групп крови человека. Аллель А кодирует фермент, который переносит N-ацетилгалактозамин, аллель В — галактозу, а аллель 0 содержит делецию, делающую фермент неактивным.

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	–

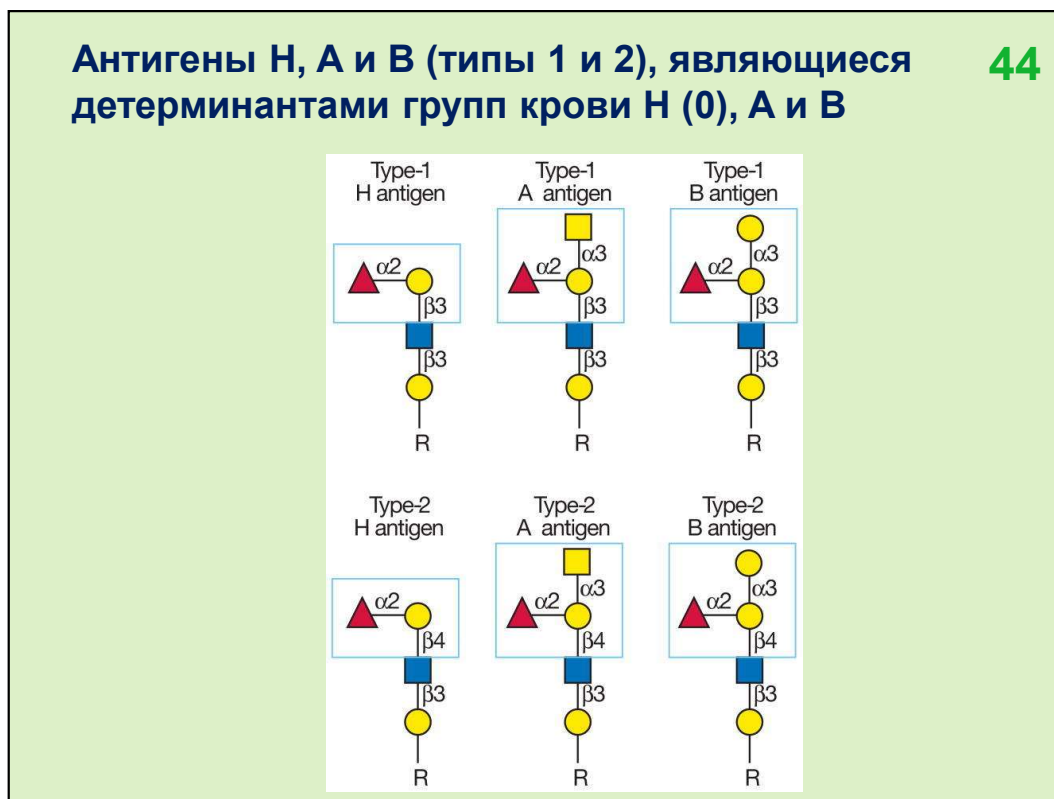
Гликозилтрансферазы, определяющие группу крови:

Известная классификация групп крови 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**).

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). На этом основана известная классификация групп крови АВ0.

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

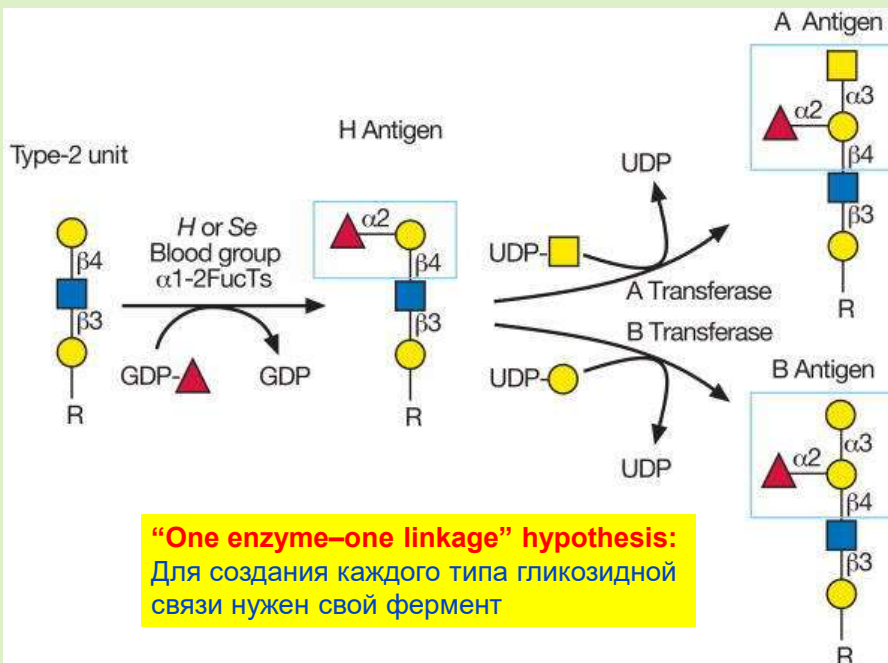
44



Углеводные детерминанты антигенов первой группы крови (H (0)) не имеют дополнительных заместителей на базовом дисахаридном антигене (H-антиген, обведен в рамку), группы A – имеют остаток N-ацетилглюкозамина, а группы B – остаток галактозы, образуя ключевые ди- и трисахариды. В зависимости от того, каким типом связи присоединяются эти ди- и трисахариды к более глубоко лежащим моносахаридным остаткам различают их варианты (тип 1 и 2).

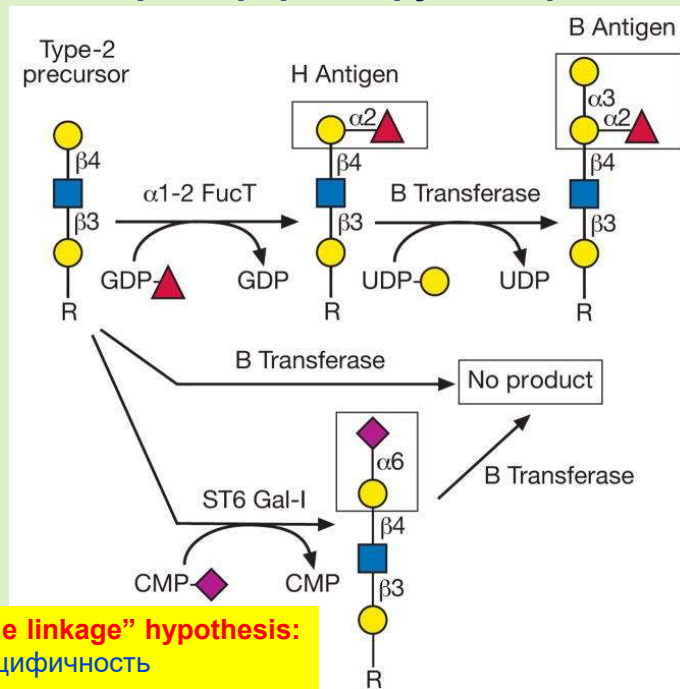
Синтез детерминант групп крови H (0), A и B

45



Пример синтеза углеводных цепей детерминант групп крови наглядно демонстрирует, что для создания каждого типа гликозидной связи имеется специфичный фермент. Это так называемая гипотеза «одна связь – один фермент».

α 1–3-Галактозилтрансфераза группы крови В 46



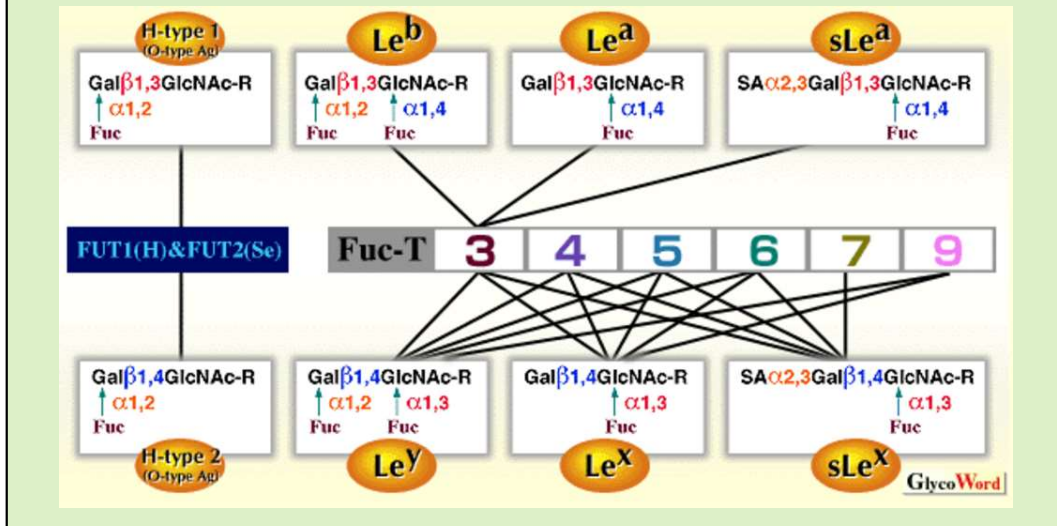
“One enzyme–one linkage” hypothesis:
Субстратная специфичность
гликозилтрансфераз

Для этих (и многих других) гликозилтрансфераз характерна строгая субстратная специфичность. Это и явилось основой гипотезы гипотеза «одна связь – один фермент».

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

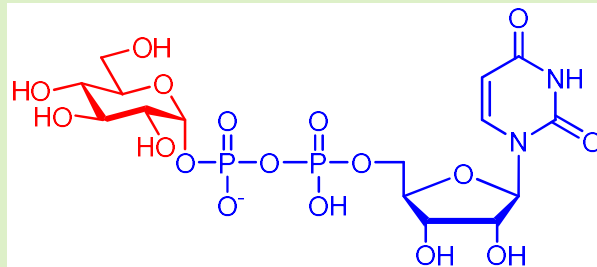


На этом слайде представлены факты, иллюстрирующие то, как эта теория гипотеза «одна связь – один фермент» была опровергнута. Так, например, одна и та же фукозил-трансфераза может создавать несколько типов гликозидных связей, а одну и ту же связь могут образовывать несколько фукозил-трансфераз.

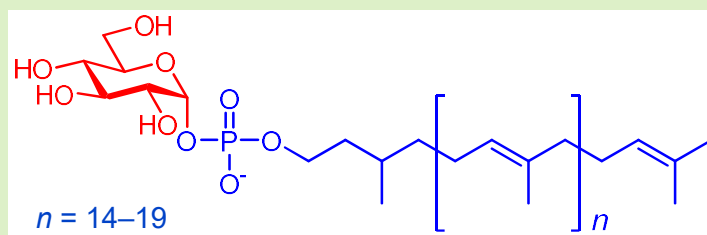
Два типа гликозил-доноров (Glc, Man)

48

UDP-Glc

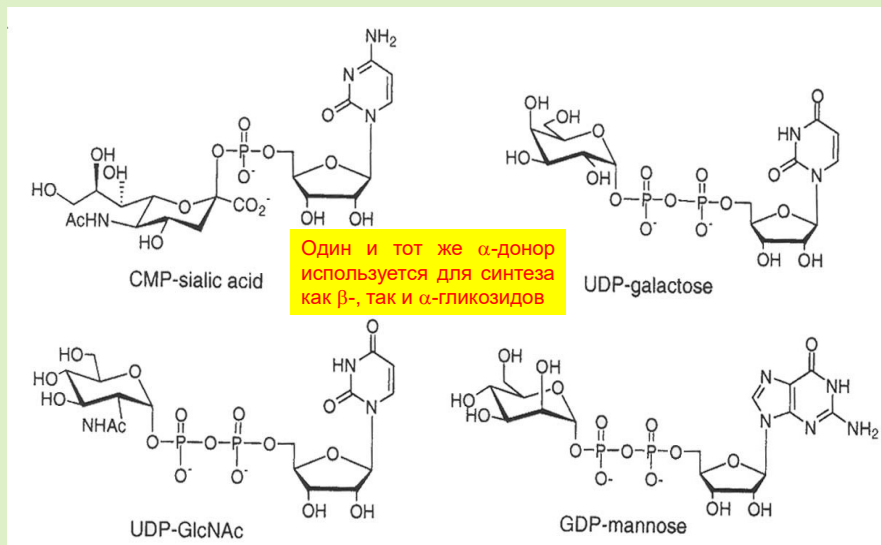


Dol-P-Glc



На слайде представлены два типа гликозил-доноров, которые используются гликозил-трансферазами: уридин-дифосфо-глюкоза и полипренил-фосфо-глюкоза или долихилфосфо-глюкоза, которые встречаются у бактерий или млекопитающих, соответственно. Мы сталкивались с ними при обсуждении биосинтеза 14-сахаридного предшественника.

Структура гликозил-доноров: нуклеотидсахара 49



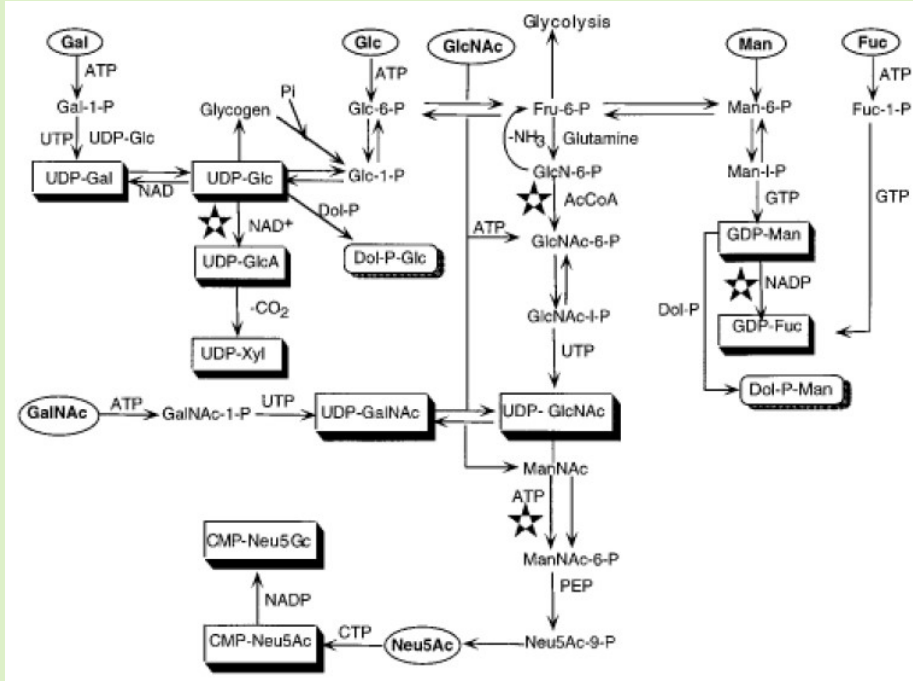
А также:

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

На слайде представлены структуры нуклеотидсахаров, выступающих как гликозил-доноры. Один и тот же альфа-донор используется для синтеза как альфа-, так и бета-гликозидов.

Биосинтез моносахаридных доноров

50



На этом слайде показан биосинтез моносахаридных гликозил-доноров. Это фрагмент огромной таблицы по биосинтезу углеводов, которая занимает целую стену.

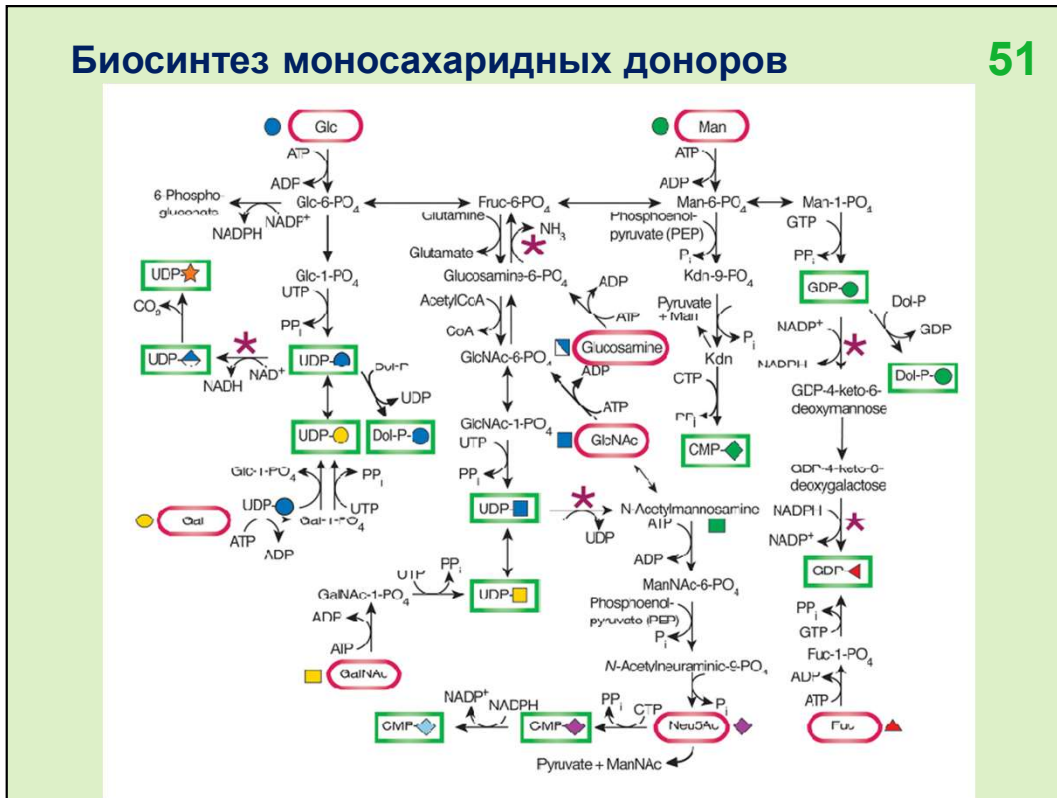


FIGURE 5.1. Biosynthesis and interconversion of monosaccharides. The relative contributions of each pathway under physiological conditions are unknown. (Rectangles) donors; (ovals) monosaccharides; (asterisks) control points; (KDN) 2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactonononic acid; (Dol) dolichol. See Online Appendix 1B for full names and designated symbols for monosaccharides.

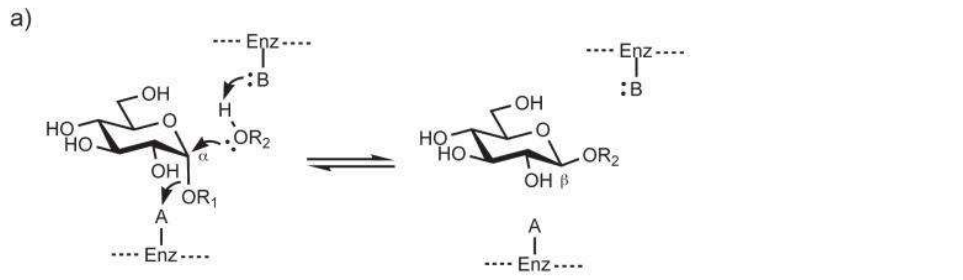
(Note: For a key to symbols used for monosaccharides, use the SNFG link. Embedded links are present but live only in the slide display mode.)

Два типа гликозил-трансфераз и гликозидаз

52

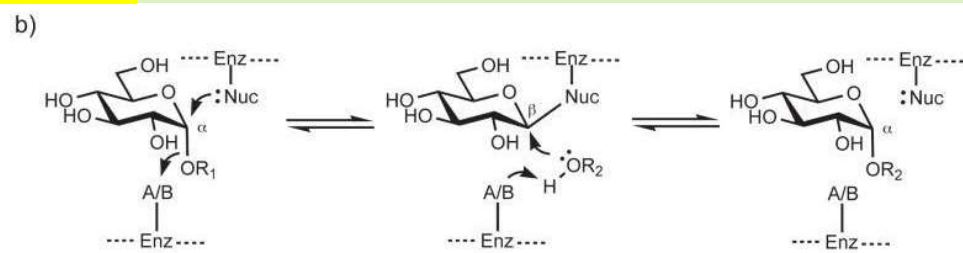
Inverting

Обращение конфигурации C(1)



Retaining

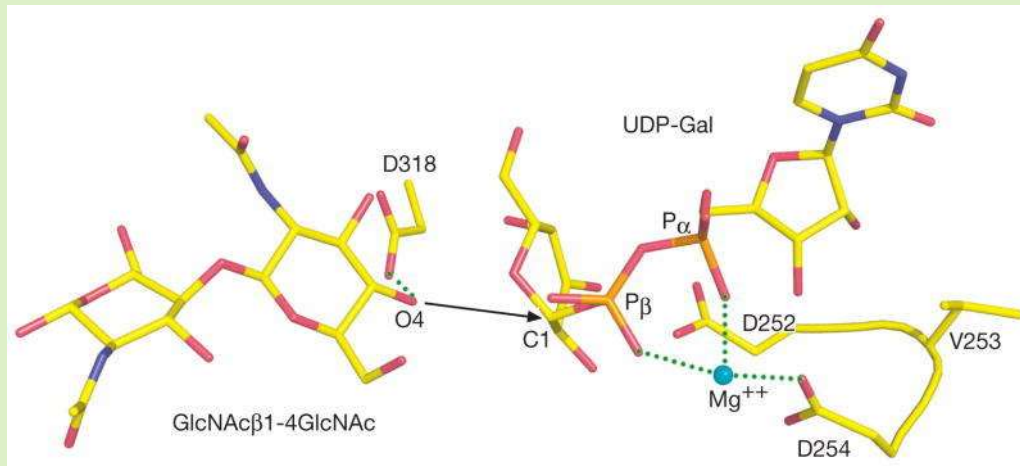
Сохранение конфигурации C(1)



Различают два типа гликозил-трансфераз и гликозидаз – инвертирующие и сохраняющие: первые обращают конфигурацию аномерного центра в результате прямой SN₂-подобной атаки нуклеофила на производное сахара; вторые - сохраняют конфигурацию аномерного центра в результате двукратного обращения, когда промежуточно образуется ковалентный субстрат-ферментный интермедиат.

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**

Для образования связи между остатком галактозы в составе уридиндифосфо-галактозы с дисахаридным гликозил-акцептором, состоящим из двух остатков N-ацетилглюкозамина, необходимы ионы двухвалентных металлов, фермент, расщепляющий образующийся пиродифосфат – пиродифосфатаза, и фермент бета-1-4-галактозил-трансфераза, содержащая остатки аспарагиновой кислоты в активном центре.

Обычно бета-1-4-галактозил-трансфераза переносит остаток галактозы на остаток N-ацетилглюкозамина. Однако если бета-1-4-галактозил-трансфераза будет катализировать реакцию в ПРИСУТСТВИИ лактальбумина, продуктом реакции будет не производные лактозамина, а лактоза. Т.е. в ПРИСУТСТВИИ лактальбумина меняется субстратная специфичность гликозил-трансферазы вследствие образования комплекса бета-1-4-галактозил-трансферазы с лактальбумином (он называется синтетазой лактозы). Такая реакция идет при образовании лактозы в молоке.

От чего зависит результат биосинтеза, опосредованного гликозилтрансферазами?

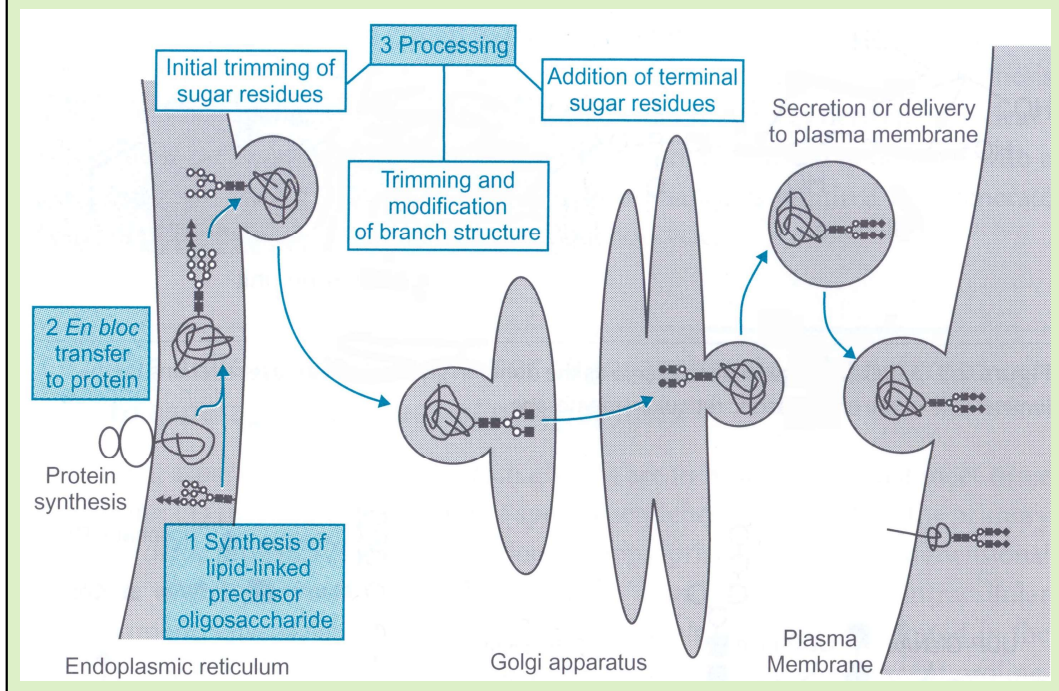
54

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

Таким образом, результат биосинтеза, опосредованного гликозилтрансферазами, зависит от:

- Природы и концентрации гликозил-донора
- Первичной структуры гликозил-акцептора (Fuc-T, см. ранее)
- Конформации углеводной цепи и белковой цепи
- Компартмента, в котором идет эта реакция гликозилирования
- Присутствия ионов двухвалентных металлов (Mn^{2+} / Mg^{2+})
- Присутствия пиррофосфатазы
- На результат реакции влияют специализированные активаторы (напр., синтез лактозы), ингибиторы (например, ингибитор α -галактозил-трансферазы), а также разнообразные белки-транспортеры

Топология биосинтеза определяет ориентацию углеводных цепей 55



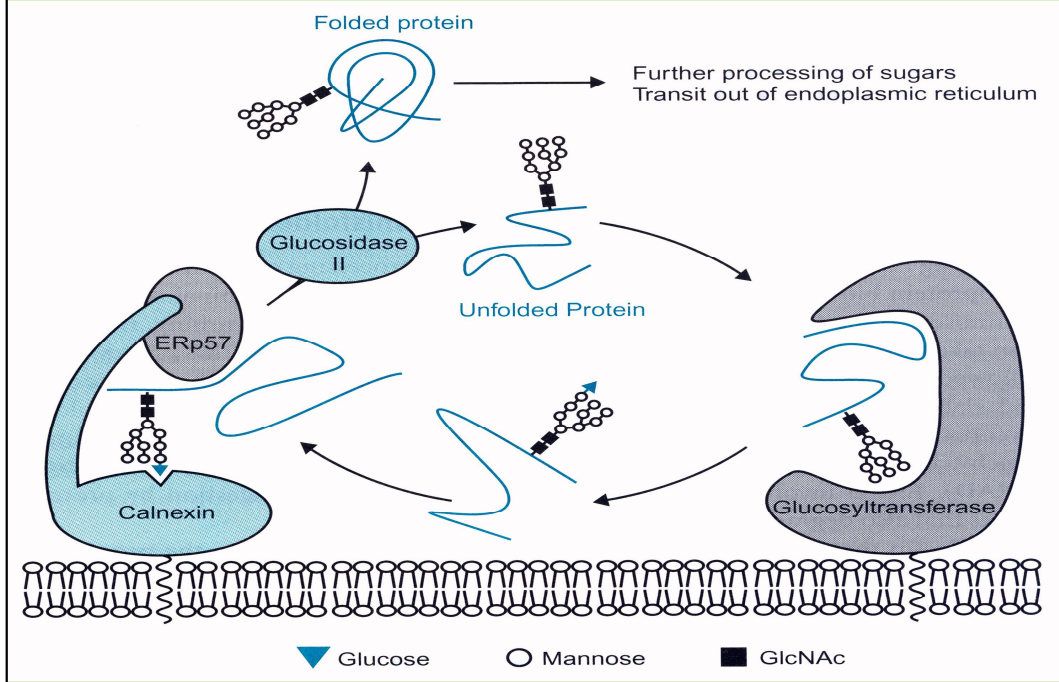
Топология распределения углеводных цепей (полярность гликозилирования) определяется тем, что гликопротеины, которые синтезируются в просвете ЭПР и аппарата Гольджи, оказываются на внешней стороне плазматической мембраны или секретируются из клетки.

Контроль качества сворачивания белков в ЭПР 56



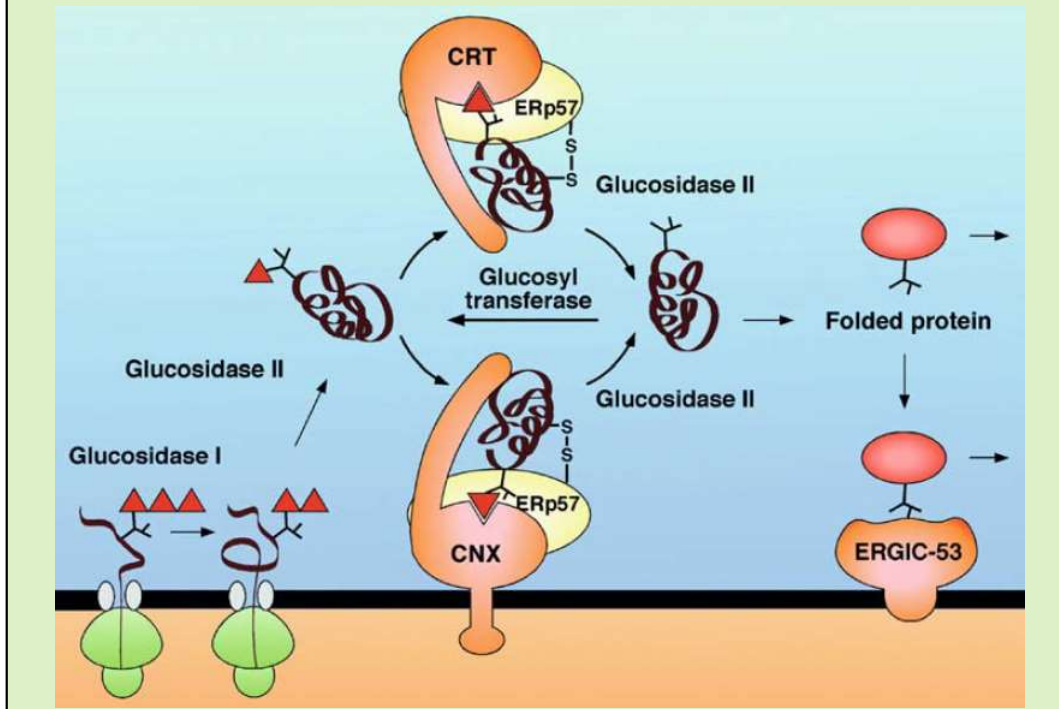
На этапе процессинга четырнадцатичленного углеводного предшественника, когда от него отщепляются остатки глюкозы и остается только один остаток глюкозы, осуществляется контроль сворачивания (укладка, фолдинг) полипептидной цепи. Этот контроль осуществляют белки шапероны (мембраноассоциированный калнексин и растворимый калретикулин). Эти белки являются лектинами: если они распознают присутствие единственного остатка глюкозы в гликопротеине, то образуют с ним комплекс (включающий также белок ERp57), в котором вспомогательный белок ERp57 способствует правильной укладке полипептидной цепи (фолдинг). После диссоциации этого комплекса из гликопротеина ферментом глюкозидазой (GII) отщепляется последний остаток глюкозы. В случае когда полипептидная цепь в гликопротеине сворачивается правильно (все гидрофобные области погружены внутрь свернувшейся цепочки), гликопротеин транспортируется в аппарат Гольджи. Гидрофобные фрагменты на неправильно свернутых полипептидных цепях распознаются ферментом глЮкозил-трансферазой (UGGT), которая снова глЮкозилирует гликановую цепь, что делает гликопротеин снова способным образовывать комплекс с шаперонами (калнексин и калретикулин). И процесс укладки полипептидной цепи начинается заново. Белки с неправильно свернутой полипептидной цепью переносятся в цитоплазму, где подвергаются деградации в протеасоме. Это так называемый калнексиновый цикл.

Контроль качества сворачивания белков в ЭПР 57 (кратко)

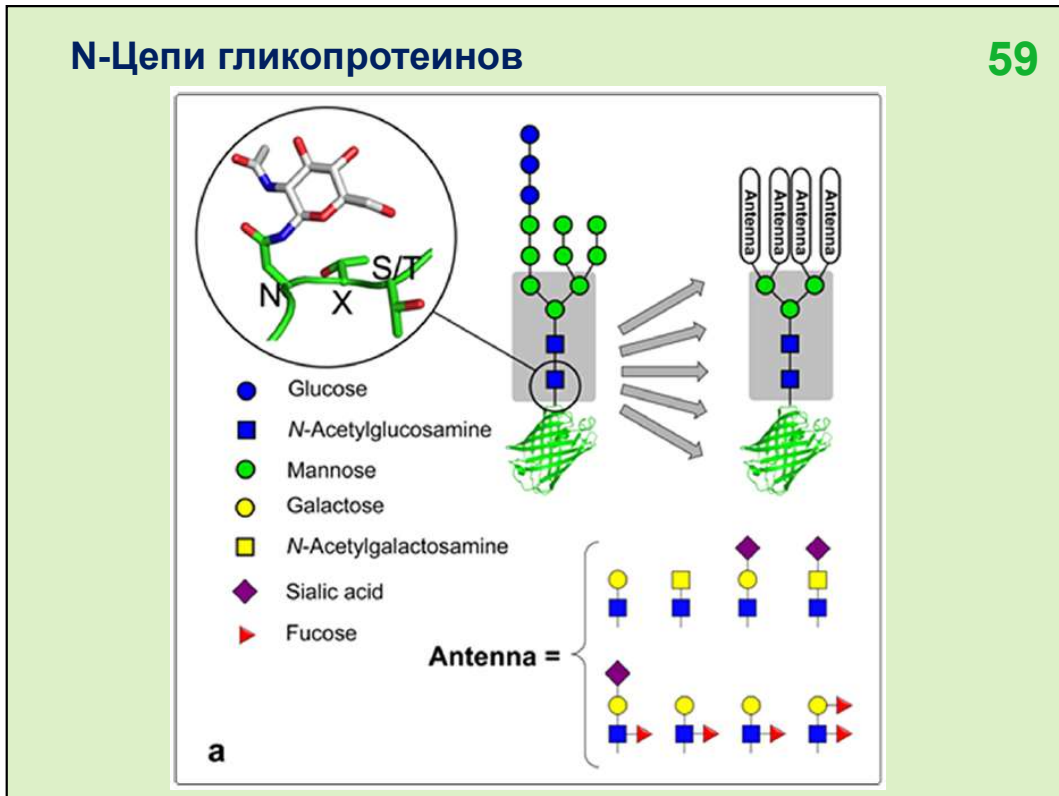


Здесь хорошо видно, что это цикл. Полипептидная цепь сворачивается правильным образом, когда гликозилированный гликопротеин находится в комплексе с калнексином. Глюкозидаза отщепляет остаток глюкозы. Правильно свернувшийся белок НЕ является субстратом глюкозилтрансферазы. Такие белки переносятся из ЭПР в аппарат Гольджи. Неправильно свернувшийся белок ЯВЛЯЕТСЯ субстратом глюкозилтрансферазы, которая переносит остаток глюкозы, что необходимо связывания гликопротеина с калнексином. Цикл замыкается.

Сворачивание белков в ЭПР: лектины-шапероны 58



Здесь показано, что сворачивание полипептидной цепи в N-гликопротеинах контролируют два лектина-шаперона: мембраноассоциированный калнексин и растворимый калретикулин, находящийся в просвете ЭПР.



Таким образом, следует запомнить, что все многообразие структур N-цепей гликопротеинов возникает из единственного четырнадцатичленного углеводного предшественника, который котрансляционно переносится на остаток аспарагина в составе секвона Asn-X-Ser/Thr, где в роли центрального аминокислотного остатка X может выступать любая аминокислота кроме пролина. Затем набор гликозидаз и гликозилтрансфераз модифицирует углеводные цепи. Важно, что все они являются модификациями консервативного пентасахаридного кора (серый прямоугольник).

О-Цепи муциновых гликопротеинов

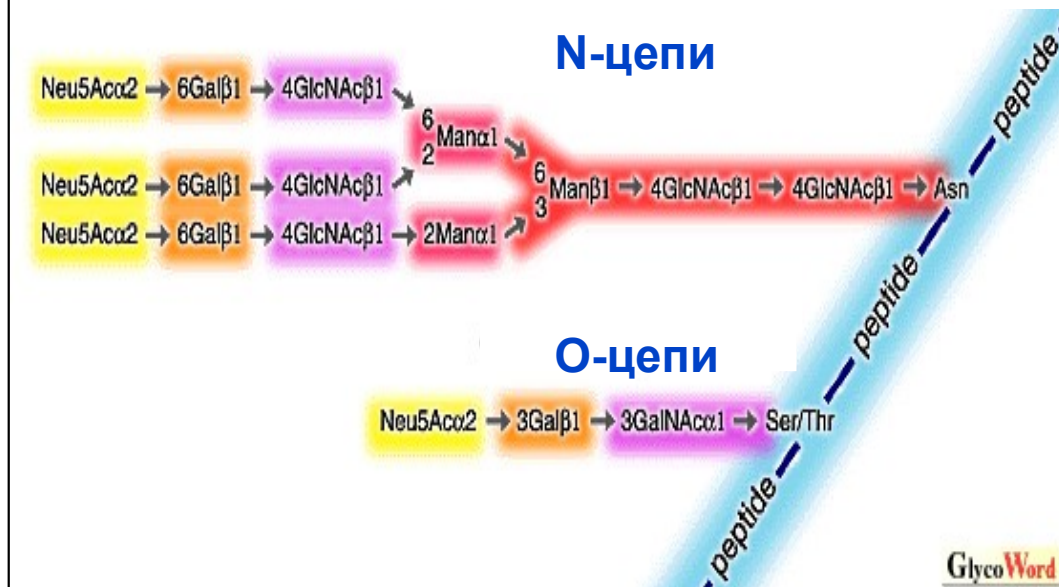
Структура

Теперь перейдем к О-цепям гликопротеинов, которые часто относятся к классу муцинов, способных образовывать вязкие растворы (слизи).

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

61

- N-гликозидные: $\text{—GlcNAc}\beta\text{—Asn}$
- O-гликозидные: $\text{—GalNAc}\alpha\text{—Ser/Thr}$



Часто муциновые гликопротеины наряду с N-цепями имеют и O-цепи. В них гликановые цепи присоединены к остаткам серина или треонина, которые гликозилированы остатком альфа-N-ацетилгалактозамина.

Структура О-цепей гликопротеинов: все коры 62



В отличие от N-цепей, где был один тип кора, в О-цепях много типов кора, но они имеют общее. О-Цепь всегда содержит остаток N-ацетилгалактозамина, который [альфа]-гликозидной связью присоединяется к остатку серина в полипептидной цепи.

Простейший тип кора - Тн-антиген – содержит один остаток N-ацетилгалактозамина, а далее различные вариации моносахаридных остатков, которые присоединяются к остатку N-ацетилгалактозамина, связанному с остатком серина, образуют различные коры О-цепей.

Антигенные эпитопы в муцинах

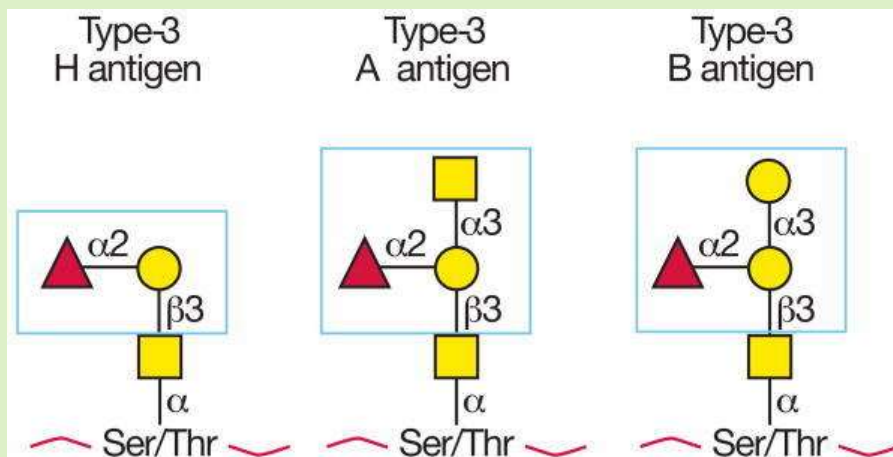
63

Sialyl-Tn antigen	Sia α 2-6GalNAc α -Ser/Thr
Blood groups O, H	Fuca1-2Gal-
Blood group A	GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal-
Blood group B	Gal α 1-3(Fuca1-2)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(Fuca1-4)GlcNAc-
Blood group Lewis ^x	Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc-
Blood group sialyl-Lewis ^x	Sia α 2-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc-
Blood group Lewis ^y	Fuca1-2Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc-

Важно, что эти олигосахаридные цепочки несут функциональную значимость муцинов. Они являются антигенами, например, систем групп крови.

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

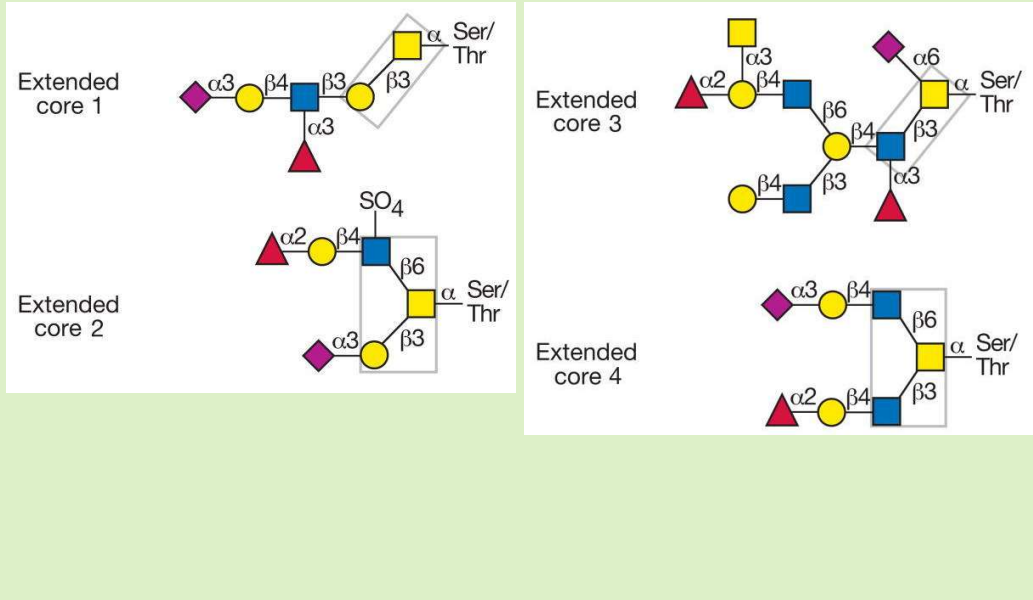
64



На гликопротеинах с O-цепями обнаружены антигены группы крови АВ0 тип 3. Это ди- и трисахариды, образованные остатками галактозы и [альфа]-N-ацетилгалактозамина, которые несут кор, отличный от типов 1 и 2.

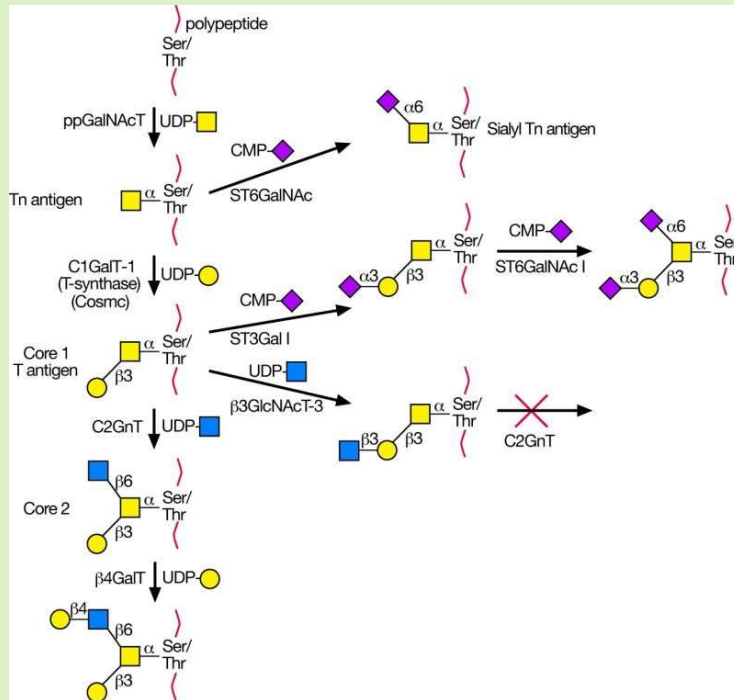
Сложные О-гликаны с разными корами

65



Здесь представлены структуры сложных О-гликанов с разными корами, являющиеся антигенными детерминантами. Это показывает, что антигенные структуры О-цепей широко распространены.

Биосинтез некоторых О-гликанов с корами 1 и 2 66

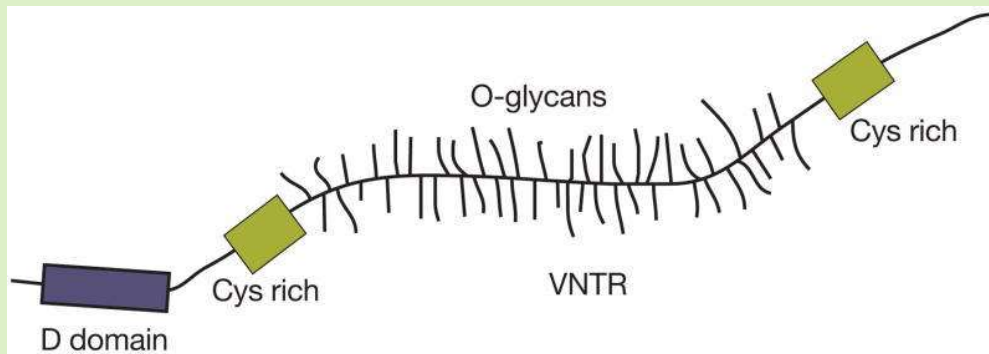


Первый этап биосинтеза – это присоединение к остатку серина или треонина N-ацетилгалактозамина, после чего гликозилтрансферазы переносят остатки моносахаридов и синтезируются короткие коры О-гликанов.

Биосинтез некоторых О-гликанов с кораи 3 и 4 67



Моносахаридные остатки на этапе биосинтеза присоединяются последовательно. Это осуществляется благодаря специфичности ферментов.

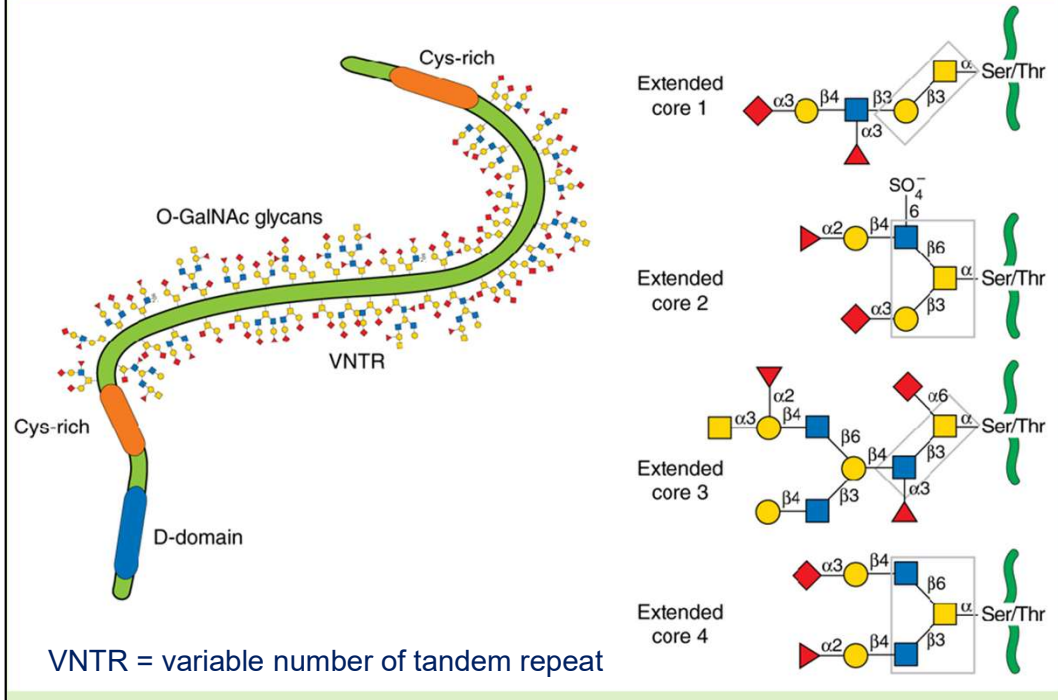


VNTR = variable number of tandem repeat

A simplified model of a large secreted mucin. The VNTR (variable number of tandem repeat) region rich in serine, threonine, and proline is highly O-glycosylated and the peptide assumes an extended “bottle brush” conformation. Hundreds of O-GalNAc glycans with many different structures may be attached to serine or threonine residues in the VNTR domains. The cysteine-rich regions at the ends of the molecules are involved in disulfide bond formation to form large polymers of several million daltons. D domains have similarity to von Willebrand factor and are also involved in polymerization.

Модель секретируемого муцина

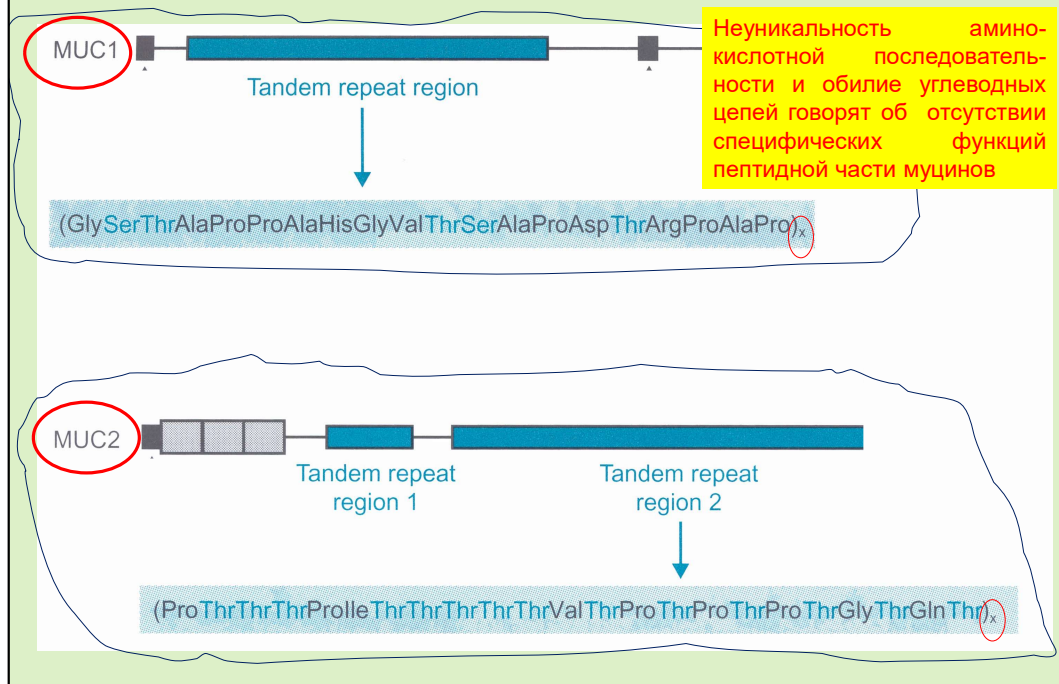
69



Муцины характеризуются длинной полипептидной цепью, имеющей вытянутую конформацию. Полипептидная цепь имеет тандемные повторы. Это области полипептидной цепи, обогащенные остатками серина и треонина, которые несут огромное количество разных олигосахаридных цепей. Есть области, где олигосахаридов нет («лысые» участки), а также участки, богатые цистеином, которые образуют дисульфидные связи, давая огромные полимеры.

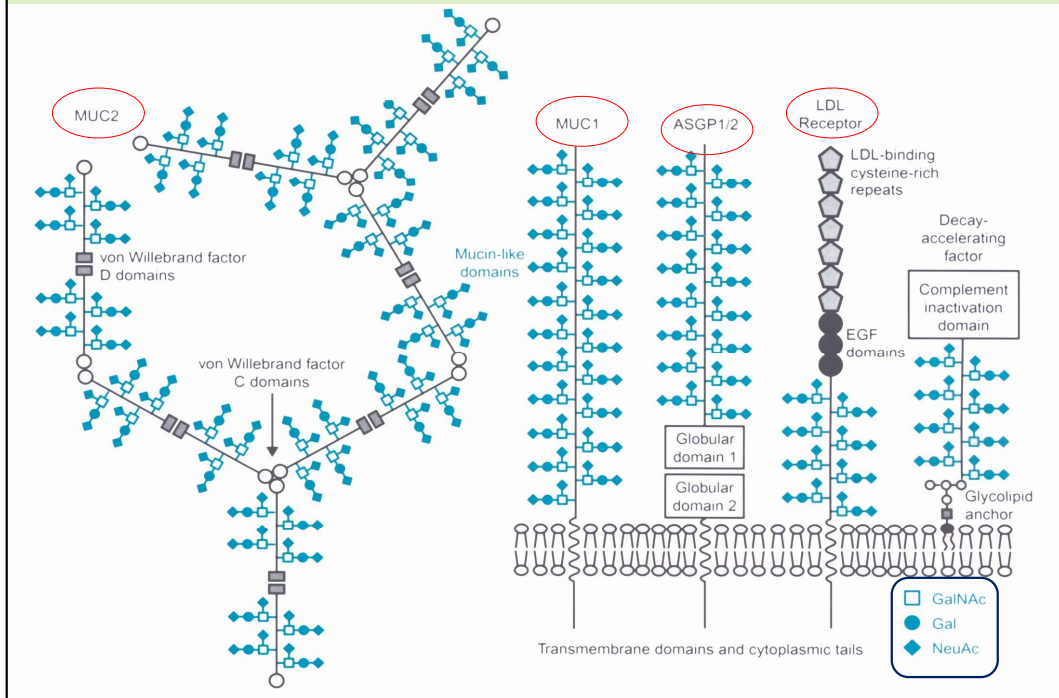
Есть ли консервативная последовательность аминокислот?

70



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

Примеры «тяжело гликозилированных» белков 71

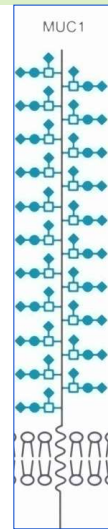


На слайде представлены примеры, муцинов, несущих большое количество сложных О-связанных углеводных цепей. Эти цепи часто связаны дисульфидными связями, что приводит к еще более сложной организации. Известны как растворимые (секретируемые), так и мембрано-связанные муцины.

Гликопротеины муцинового типа

72

- ▶ 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

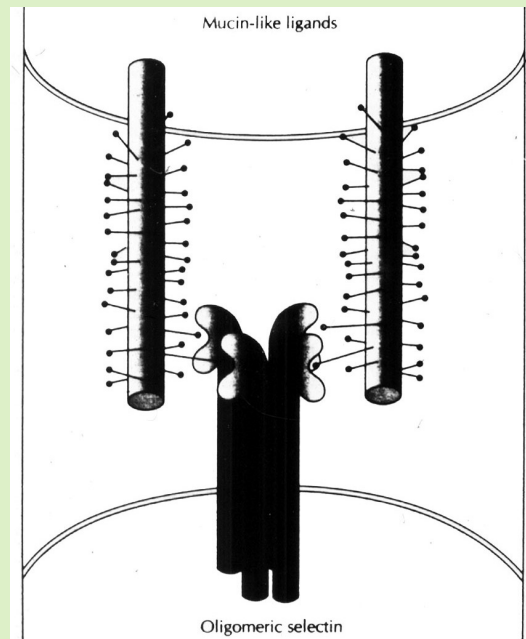


Характерные свойства муцинов:

- 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



Эти свойства муцинов делают их идеальной структурой гликокаликса, где они обеспечивают сигнальную функцию для взаимодействия клеток посредством узнавания углеводных структур.

Антигенные эпитопы в муцинах

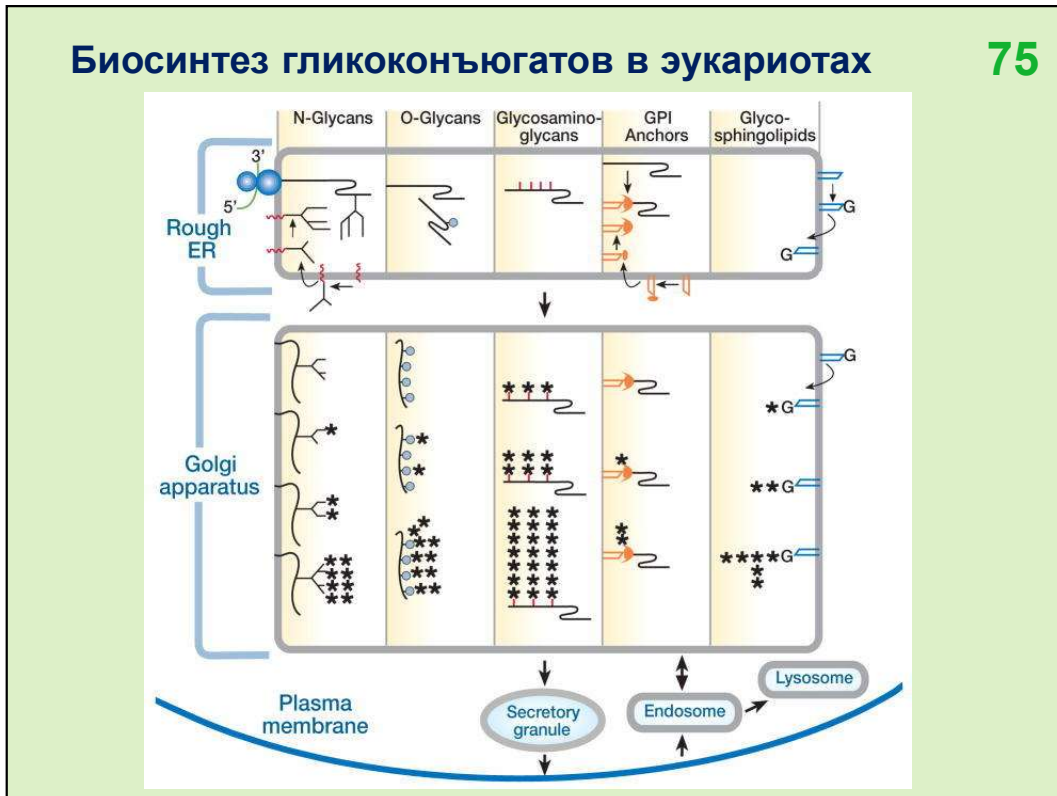
74

Blood groups O, H	Fuca1-2Gal-
Blood group A	GalNAc α 1-3(Fuca1-2)Gal-
Blood group B	Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal-
Linear B	Gal α 1-3Gal-
Blood group I	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal-
	Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-3)Gal-
Blood group I	
Blood group Sd(a), Cad	GalNAc β 1-4(Sia α 2-3)Gal-
Blood group Lewis ^a	Gal β 1-3(Fuca1-4)GlcNAc-
Blood group Lewis ^x	Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc-
Blood group sialyl-Lewis ^x	Sia α 2-3Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc-
Blood group Lewis ^y	Fuca1-2Gal β 1-4(Fuca1-3)GlcNAc-

Именно по этой причине большинство олигосахаридных цепей муцинов являются антигенами, например, систем групп крови.

Биосинтез гликоконъюгатов в эукариотах

75



Биосинтез О-гликанов, как и N-гликанов начинается в шероховатом ЭПР, на поверхности которого есть рибосомы, откуда в просвет ЭПР выходит полипептидная цепь. Далее к этой цепи присоединяется остаток N-ацетилгалактозамина, после чего в аппарате Гольджи присоединяются другие моносахаридные остатки.

Конец лекции 3