

Кононов Леонид Олегович

**ХИМИЯ УГЛЕВОДОВ И  
ГЛИКОБИОЛОГИЯ**

<https://углеводы.su>

Добрый день!

## Лекция 4

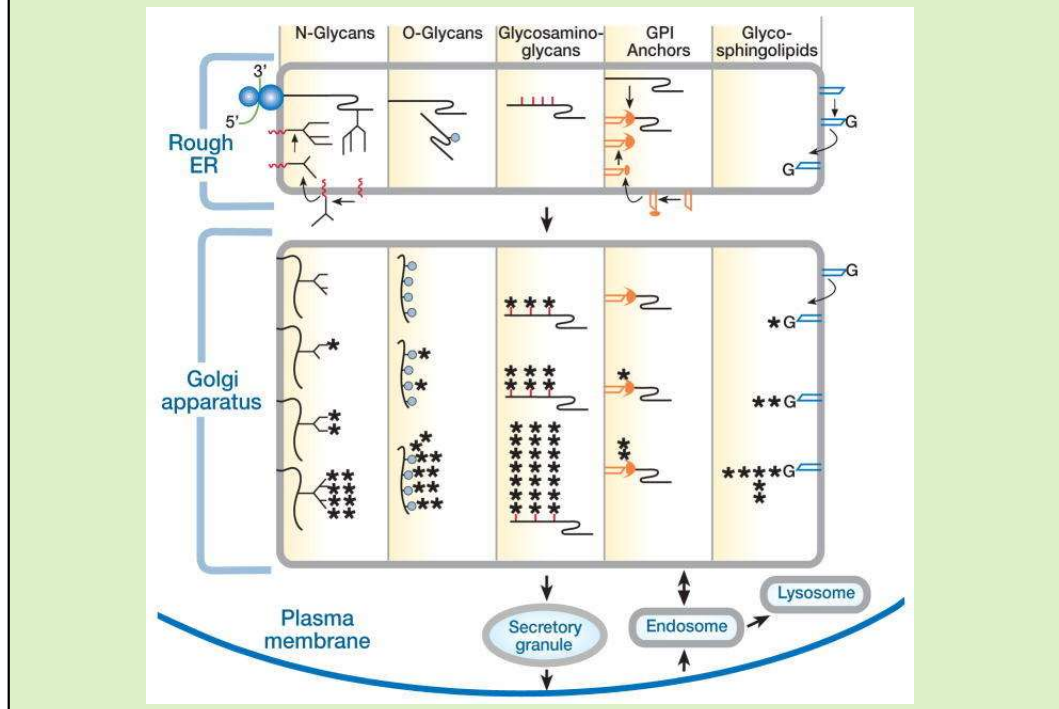
GPI-Заякоренные белки  
Протеогликаны и гликозаминогликаны  
Полисахариды  
Гликаны клеточной стенки бактерий  
Гликолипиды  
Углевод-углеводные взаимодействия

6. *Essentials of glycobiology*, A. Varki, et al. (Eds.), 3d edn., 2017, Ch. 11, 12, 16, 17, 38.
7. *Comprehensive Glycoscience*. 2007, Ch. 3.05, p. 79 (1796); Ch. 3.31, p. 733 (2440); Ch. 3.34, p. 787 (2491).
8. *Glycoscience. GlycoChemistry and Chemical Biology*, 2008, Ch. 6.5; Ch. 7.1; Ch. 7.3; Ch. 7.4.
24. *Bacterial Lipopolysaccharides*, 2011, Ch. 1; Ch. 2; Ch. 3; Ch. 8, Ch. 9, Ch. 10; Ch. 12, Ch. 13.


Сегодня мы поговорим о других классах гликоконъюгатов. Внизу перечислена литература, включая главы, в которых можно найти все, о чем мы будем говорить. Главное в книге под номером 6.

## Биосинтез гликоконъюгатов в эукариотах

3



На прошлой лекции вы уже видели эту схему, в которой кратко изложена идея о биосинтезе гликоконъюгатов в эукариотах. В прошлый раз мы смотрели биосинтез гликопротеинов, а именно N-гликанов и O-гликанов. Сегодня мы пойдем дальше.



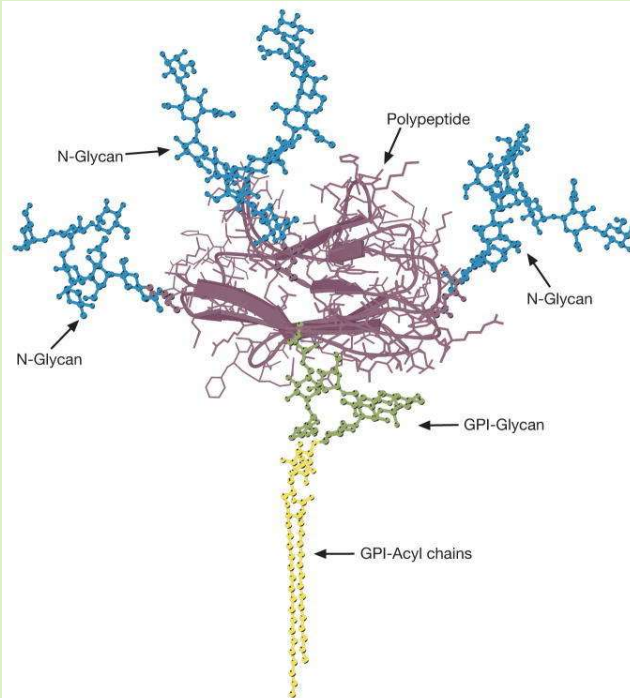
## GPI-Заякоренные белки

Начнем с GPI-заякоренных белков

## Пример GPI-заякоренного белка

5

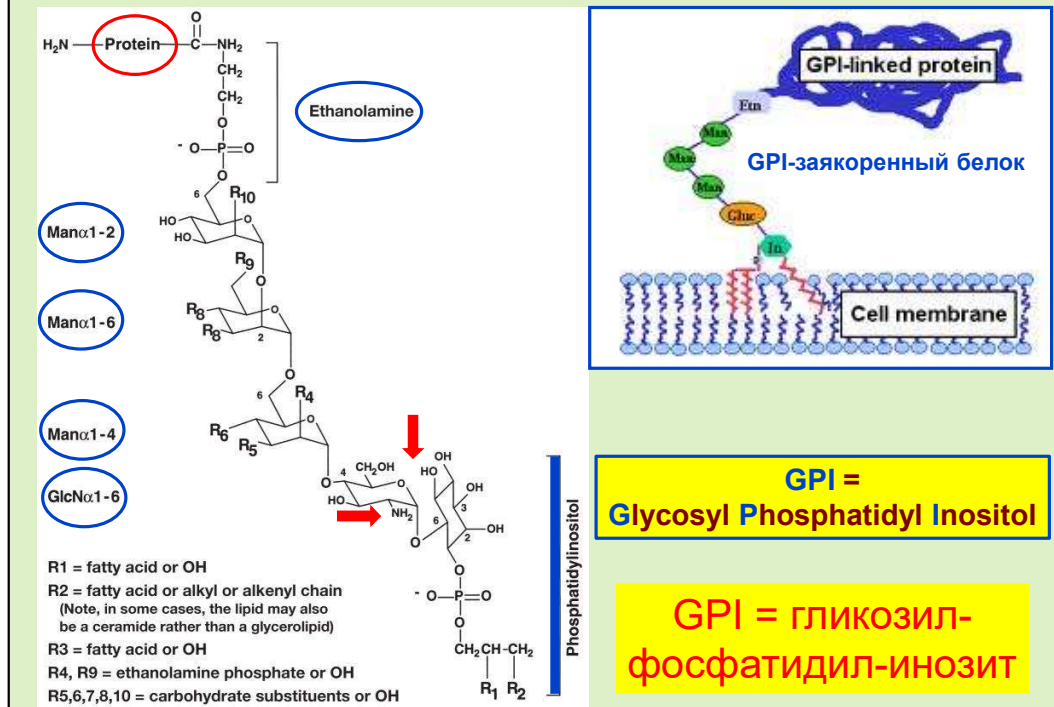
Гликопротеин Thy-1  
(THYmocyte differentiation antigen 1)



Пример такого белка у нас был в первой лекции. Здесь представлены полипептидные и N-цепи и фрагмент GPI-гликана. Рассмотрим его поближе. Зеленым помечен углеводный фрагмент гликозилфосфатидинозитного якоря, который закрепляет этот белок в клеточной мембране.

## Общая схема строения GPI-якоря (кор)

6



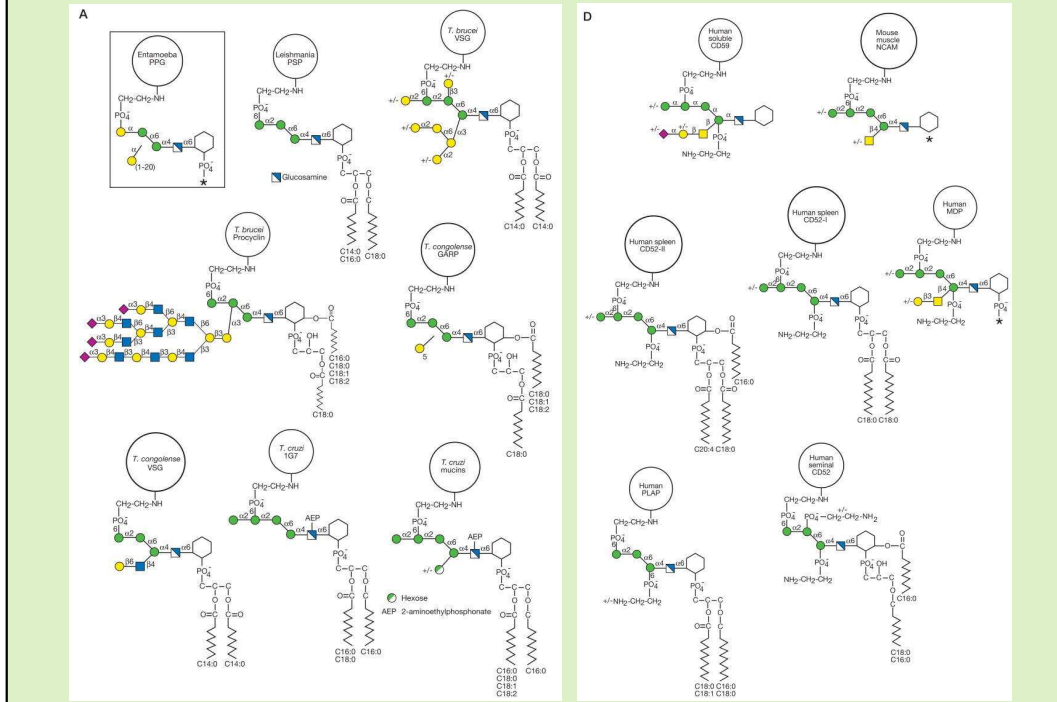
К этому классу гликопротеинов относятся белки, которые соединены с углеводами необычным образом. В отличие от N- и O-гликанов, в GPI-связанных белках олигосахаридная цепь присоединяется к полипептидной цепи не своим восстанавливающим концом, а своим невосстанавливающим концом. При этом полипептидная цепь присоединена амидной связью к аминогруппе фосфоэтаноламина, который в свою очередь присоединен фосфодиэфирной связью к терминальному остатку маннозы, расположенному на невосстанавливаемом конце гликана.

Общим для всех этих гликопротеинов является присутствие цепи из трех остатков [альфа]-связанной маннозы, которая присоединена к остатку глюкозамина. И здесь я хочу подчеркнуть, что в отличие от N-связанных цепей, это [АЛЬФА]-глюкозамин, и более того - аминогруппа не ацелирована, т.е. эти гликоконъюгаты имеют свободную аминогруппу. Далее присоединяется инозит и фосфатидная кислота. Подобный тип связи характерен для всех GPI-белков. А эта группировка, включающая гликозил-фосфатидил-инозит, называется «якорь». Аббревиатура GPI складывается из первых букв английских названий гликозильного Фрагмента (Glycosyl), фосфатидной кислоты (Phosphatidyl) и инозита (Inositol). Остатки маннозы могут нести различные заместители, представленные на слайде как R3-R10, а R1 и R2 - это остатки жирных

КИСЛОТ.

## Варианты структур GPI-якоря

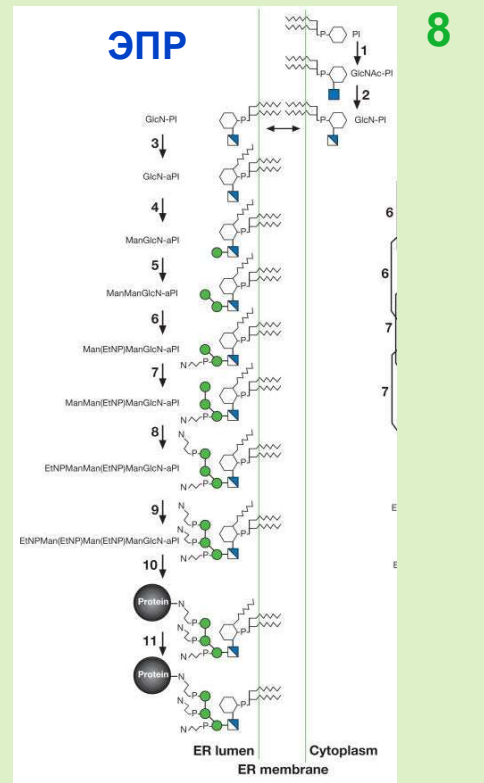
7



Подробное рассмотрение разнообразия структур GPI-якоря в различных организмах показывает, что практически все они содержат три остатка маннозы и инозит с фосфатидной кислотой. Исключением является протеофосфогликан амебы (*Entamoeba proteophosphoglycan* (PPG)), выделенный на слайде в рамку (A, box). Остатки маннозы могут быть модифицированы добавлением моно-или олигосахаридов. Эти олигосахаридные цепочки или моносахаридные остатки могут определять различные функции белков с GPI-якорем.

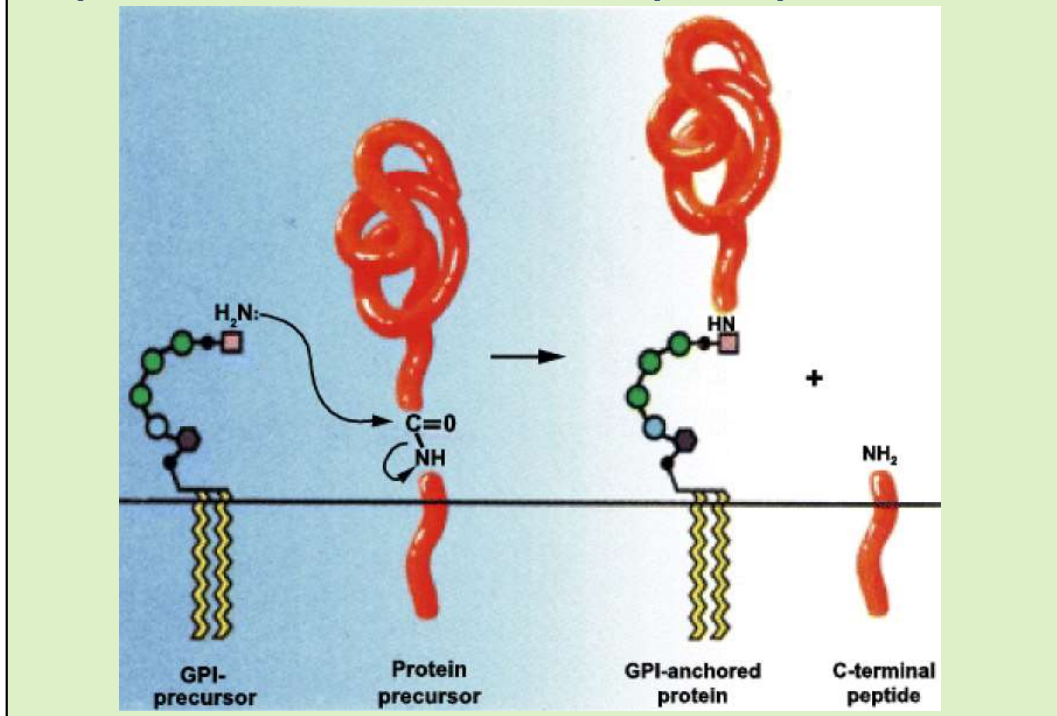


## Биосинтез GPI-якоря



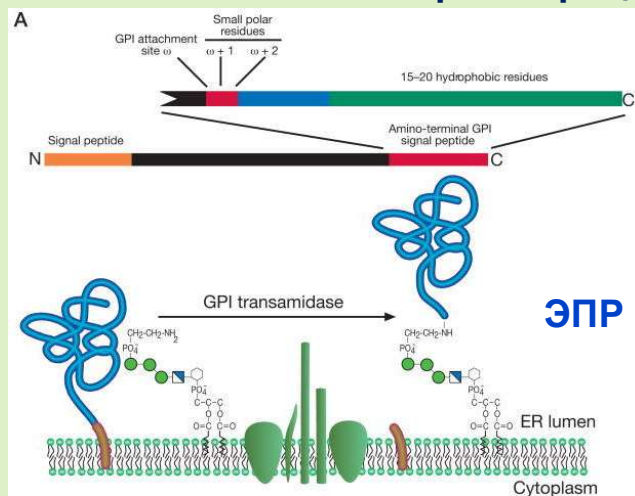
Биосинтез «якоря» начинается на цитоплазматической стороне мембраны эндоплазматического ретикулума и реализуется следующим образом. Сначала к инозиту, который фосфорилирован фосфатидной кислотой, присоединяется остаток N-ацетилглюкозамина, который деацетилируется, после чего вся эта конструкция переносится на внутреннюю сторону мембраны. Далее происходит наращивание цепи, благодаря тому, что по очереди присоединяются остатки маннозы и фосфоэтанолamina. Затем эта конструкция присоединяется к белку. На последнем этапе осуществляется процессинг, в результате которого удаляются лишние элементы, и синтезируется финальный гликопротеин, связанный через GPI-якорь с мембраной.

## Присоединение белка к GPI-якорю + процессинг 9



Следует сказать несколько слов о процессе присоединения белка к «якорю». На слайде схематично показан процесс трансамидирования, в котором участвуют мембраносвязанный белок-предшественник и связанный с мембраной олигосахарид, тот самый фосфоинозитный «якорь» с аминогруппой. Реакция катализируется ферментом GPI-трансамидазой, в результате чего пептидная связь в белке-предшественнике разрывается, и своим С-концом белок присоединяется к аминогруппе «якоря», а оставшийся «довесок» (пептид с бывшим С-концом) остается погруженным в мембрану.

## Присоединение белка к GPI-якорю + процессинг 10



Protein	GPI signal sequence	
Acetylcholinesterase ( <i>Torpedo</i> )	NQFLPKLLNATAC	DGELSSSGTSSSKGIIFVLFSLYLIFY
Alkaline phosphatase ( <i>placenta</i> )	TACDLAPPAGTTD	AAHPGRSVVPALLPLLAGTLLLETATAP
Decay accelerating factor	HETTPNKCSGTTT	GTTRLLSGHTCFTLTGLLGLVTMGLLT
PARP ( <i>T. Brucei</i> )	EPEPEPEPEPEPG	AATLKSVALPFAIAAALVAAF
Prion protein ( <i>hamster</i> )	QKESQAYYDGRRS	SAVLFSSPPVILLISFLIFLMVG
Thy-1 ( <i>rat</i> )	KTINVIRDKLVKC	GGISLLVQNTSWLLLLLSLFLQATDFISI
Variant surface glycoprotein ( <i>T. Brucei</i> )	ESNCKWENNACKD	SSILVTKKFALTVVSAAFVALLF

Boldfaced amino acid is the site of attachment of the GPI. Sequence to the right of the space is cleaved from the protein by the transpeptidase upon anchor addition.

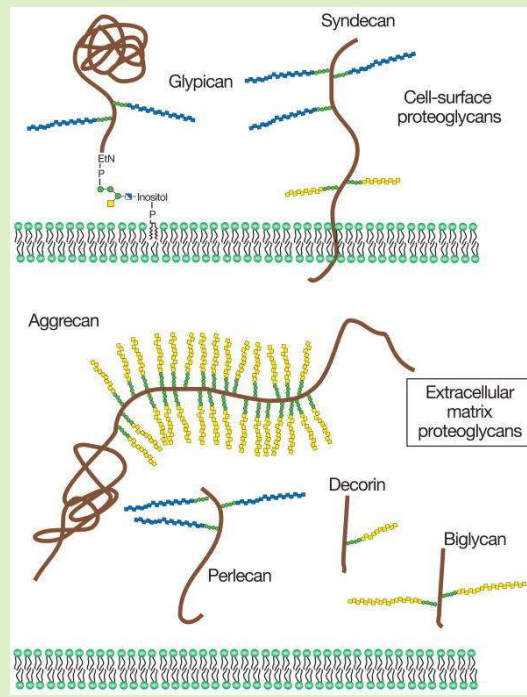
Присоединение белка возможно благодаря тому, что этот полипептид, который будет потом присоединен к GPI-якорю, содержит на С-конце ряд сигнальных последовательностей аминокислот. Оказывается эти сигнальные последовательности аминокислот консервативны, они различаются у разных организмов, однако у всех есть нечто общее, а именно то, что все они несут липофильные остатки, которые распознаются специальным ферментом GPI-трансамидазой. В результате трансамидирования происходит разрыв амидной связи в полипептиде и образование новой амидной связи белка с «якорем». Все это происходит с внутренней стороны ЭПР, как это происходит в случае с N- и O-гликопротеинами.

Немного забегаю вперед, скажу, что в результате этот «заякоренный» белок приобретает новые свойства. С одной стороны он также как и прежде связан с мембраной, но теперь он имеет лабильные связи (две фосфоэфирные и гликозидные), которые могут быть селективно расщеплены специальными ферментами. Поэтому один и тот же белок может быть ассоциирован с мембраной, а может быть отщеплен и стать секретуемым, что активно используется организмом.

## Протеогликаны и гликозаминогликаны

Следующий класс гликоконъюгатов, которые мы рассмотрим, – это протеогликаны и непосредственно связанный с ним класс полисахаридов, который называется гликозаминогликаны.

## Примеры протеогликанов: архитектура



— Кор (полипептид)

Гликозаминогликаны (ГАГ):

— Гепарансульфат

— Хондроитинсульфат  
/дерматансульфат

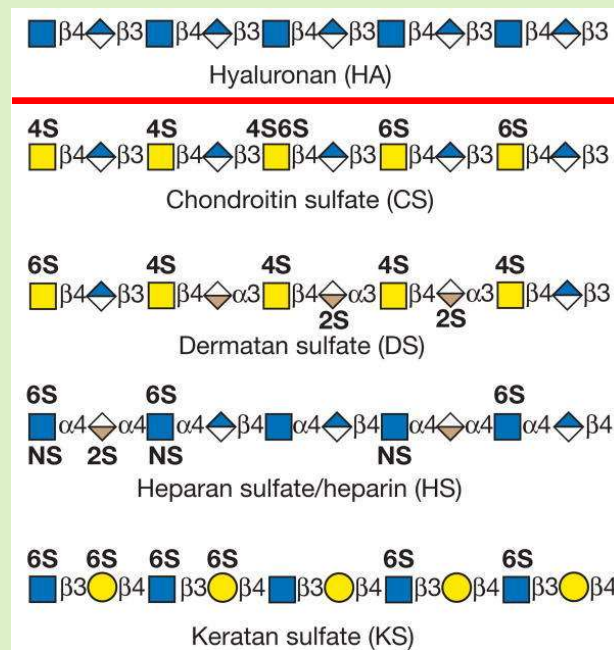
Протеогликан	Кор (кДа)	Число цепей ГАГ
Агрекан	208–220	~100
Перлекан	400	1–3
Глипиканы 1–6	~60	1–3
Синдеканы 1–4	31–45	1–3
Бигликан	38	1–2
Декорин	36	1

Структура протеогликанов образуется полипептидным кором, представленным на слайде коричневыми линиями, к которому привязаны длинные олигосахаридные цепи. При этом олигосахаридные цепи могут иметь разную природу. Наиболее известны структуры, родственные гепарансульфату и хондроитинсульфату. Это гликозаминогликаны.

Число гликозаминогликановых цепей может сильно различаться в протеогликанах, например, сотни в случае агрекана или одна цепь в случае декорина, или две – в случае протеогликана, который так и называется бигликан. Протеогликианы могут быть растворимыми, могут быть мембраносвязанными, при этом это может присутствовать трансмембранный домен полипептидной цепи или фрагмент, привязанный к мембране через GPI-якорь. Но в целом эти олигосахаридные цепи имеют некую структурную общность. А если посмотреть на молекулярную массу кора, то следует сказать, что в состав протеогликанов входят довольно большие белки.

## Гликозаминогликаны (ГАГ) позвоночных

13



НЕ связан  
ковалентно с  
белком

~80 остатков в  
цепи ГАГ  
(20 кДа)

Ср.: 10–12  
остатков в  
типичном 2-х-  
антенном N-  
гликане ГП

Углеводные цепи протеогликанов - это гликозаминогликановые цепи, которые характеризуются следующим:

- 1) Практически все они связаны с полипептидом, кроме гиалуронана или гиалуроновой кислоты, как раньше называли этот полисахарид, которая показана в верхней части слайда. Гиалуронан – пример полисахарида, который не содержит неуглеводные заместители. Это один из немногих таких примеров, встречающихся у животных.
- 2) Так или иначе, можно увидеть, что все представленные углеводные цепи содержат аminosахара (на слайде показаны квадратами) и уроновые кислоты (глюкуроновая и идуроновая; на слайде показаны ромбами). Уроновые кислоты не встречаются только в кератансульфате, который содержит просто остатки N-ацетилглюкозамина и галактозы, т.е. это поли-N-ацетиллактозамин.
- 3) Практически всегда углеводные остатки гликозаминогликановых цепей имеют сульфатные группы, т.е. они образуют сложные эфиры с серной кислотой.
- 4) Углеводные цепи гликозаминогликанов – это по сути полисахаридные цепочки, количество остатков в которых нередко достигает 80 остатков, что соответствует молекулярной массе 20 кДа. Это на порядок больше, чем число остатков в типичном N-гликане. Т.е. там

олигосахариды, а гликозаминогликаны часто относят к полисахаридам.

## Гепарансульфат и гепарин – «родственники»

14

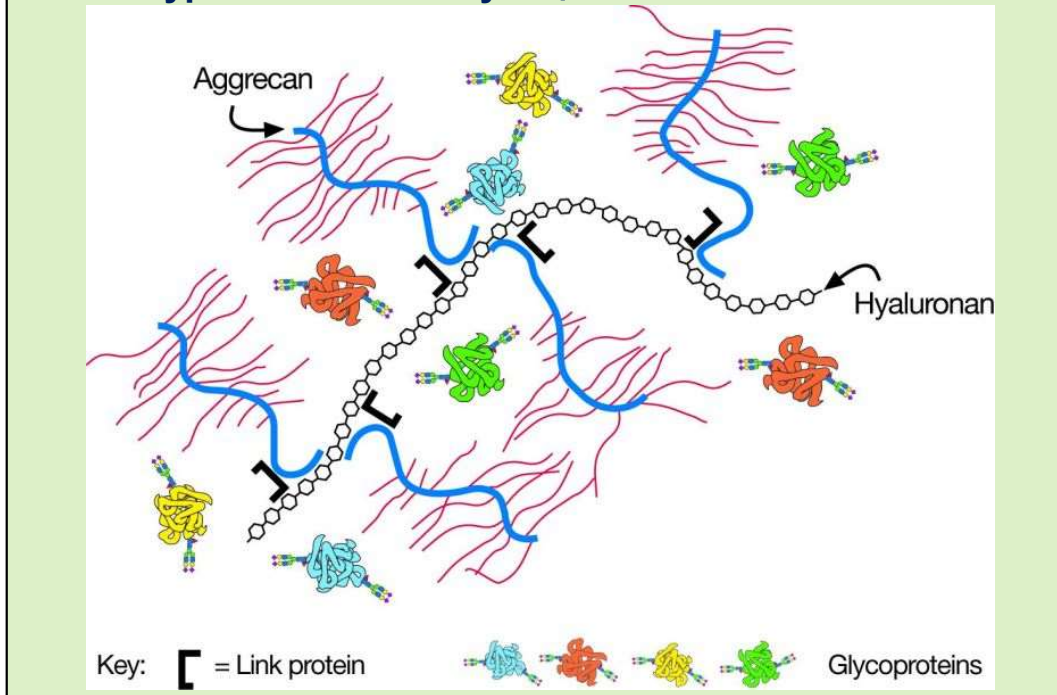
Characteristics	Heparan sulfate	Heparin
Soluble in 2 M potassium acetate (pH 5.7, 4°C)	yes	no
Size	10–70 kD	7–20 kD
Sulfate/hexosamine ratio	0.8–1.8	1.8–2.6
GlcNSO <sub>3</sub>	40–60%	≥80%
Iduronic Acid	30–50%	≥70%
Binding to antithrombin	0–0.3%	~30%
Site of synthesis	virtually all cells	Heparin is made solely as serglycin proteoglycan by connective-tissue-type mast cells

Многие предыдущие структуры содержали двойное название. Например, гепарансульфат и гепарин. По сути это полимеры, содержащие одни и те же моносахаридные остатки. Разница в пропорциях между этими моносахаридными остатками, что обуславливает различия в физических свойствах полисахаридов, например, растворимость в ацетате калия, размере. Важным отличием является то, что в гепарине гораздо выше степень сульфатирования, и более того этот сульфат находится в остатках глюкозамина. В гепарине гораздо больше остатков идуроновой кислоты. И что важно для использования протеогликанов в практике, где гепарин применяется как ингибитор образования тромбов, гепарин гораздо лучше гепарансульфата связывается с антитромбином – основным белком, участвующим в каскаде тромбообразования. Кроме того, в отличие от гепарансульфата, который синтезируется всеми типами клеток, гепарин синтезируется тучными клетками соединительной ткани, где он присутствует в составе протеогликана серглицина.



## Агрегат хрящевого протеогликана (агрекана) с гиалуронатом и связующим белком

15

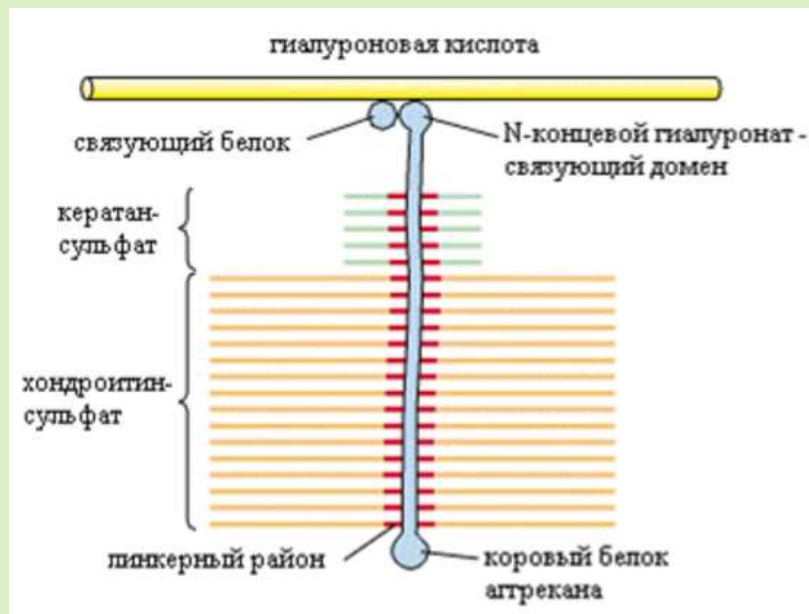


На этом слайде можно видеть, как образуется агрегат протеогликана агрекана, в котором виден кор (синие линии) с углеводными цепочками (фиолетовые линии), с гиалуронатом (незакрашенные звенья цепи). Этот агрегат образуется при помощи связующих белков. Это еще один из примеров использования протеогликанов в практике. Поскольку многие протеогликаны входят в состав хрящевой ткани и образуют суставы, многие болезни суставов лечат инъекциями протеогликанов или их компонентов.

Протеогликаны – основной структурный элемент хрящевой ткани.

## Агрегат хрящевого протеогликана (агрекана) с гиалуронатом и связующим белком

16

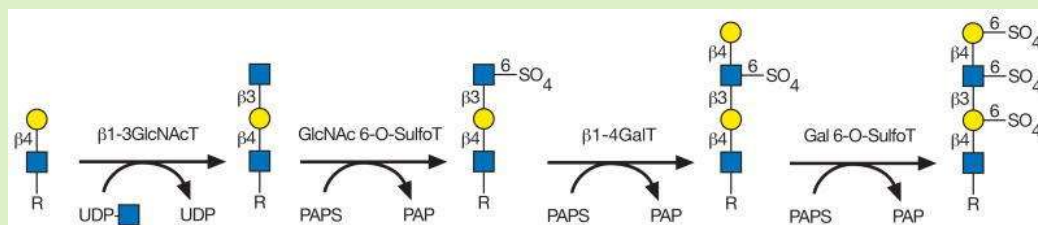


Здесь схематично представлено строение агрегата. Здесь можно видеть длинную цепь гиалуронана (желтая полоса) и полипептидную цепь агрекана (синяя полоса), которая несет разные типы углеводных цепей. Это довольно длинные цепи хондроитинсульфата (оранжевые полосы), насчитывающие десятки моносахаридных остатков, и более короткие цепи кератансульфата (зеленые полосы) – поли-N-ацетиллактозамина. Красным здесь показано место присоединения полисахаридных цепей к полипептидному кору (красные полосы). Это так называемая линкерная область, которая схожа у всех протеогликанов.



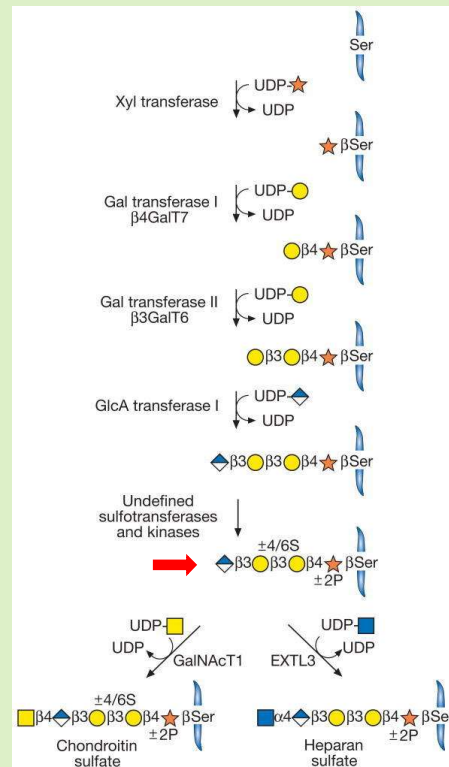
## Синтез кератансульфата: две различные сульфотрансферазы

18



Биосинтез кератансульфата осуществляется при помощи нескольких гликозилтрансфераз. Интересно то, что для введения сульфатных групп используются разные сульфотрансферазы. При этом сначала сульфатируется N-ацетилглюкозамин по шестому положению, и только потом сульфатируются остатки галактозы.

## Инициация биосинтеза хондроитинсульфата и гепарансульфата: синтез линкерного тетрасахарида

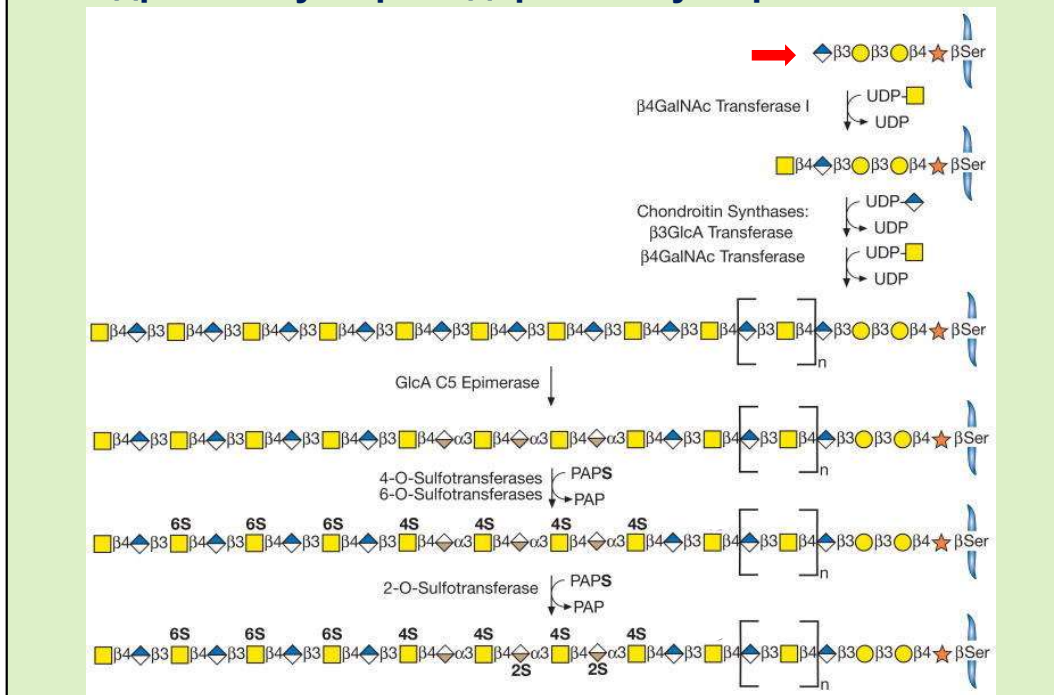


Биосинтез линкерной области/линкерного олигосахарида в протеогликах напоминает гликозилирование серина и треонина О-гликановыми цепями гликопротеинов. При этом в случае линкерного сахара гликозилируется исключительно остаток серина, а первый моносахаридный остаток – это всегда [бета]-связанная ксилоза, к которой далее присоединяются два остатка галактозы ([бета]-связанные) и остаток глюконовой кислоты. Далее происходит сульфатирование, а в некоторых случаях фосфорилирование, которые катализируются сульфотрансферазами (фосфорилирование катализируется киназами).

Этот линкерный тетрасахарид (отмечен красной стрелочкой), структура которого представлена на слайде, является ключевым для протеогликов. В зависимости от того, какой моносахаридный остаток присоединяется дальше к остатку глюконовой кислоты этого линкерного тетрасахарида, может быть синтезирована серия полисахаридов, родственных хондроитинсульфату, если это N-ацетилгалактозамин, или же, если этот остаток – это N-ацетилглюкозамин, мы получаем серию полисахаридов, родственных гепарансульфату. Таким образом синтезируются протеоглики с разными цепями.

## Биосинтез цепей хондроитинсульфата/дерматансульфата

20



На слайде показан биосинтез цепей хондроитинсульфата или дерматансульфата, который включает следующие этапы:

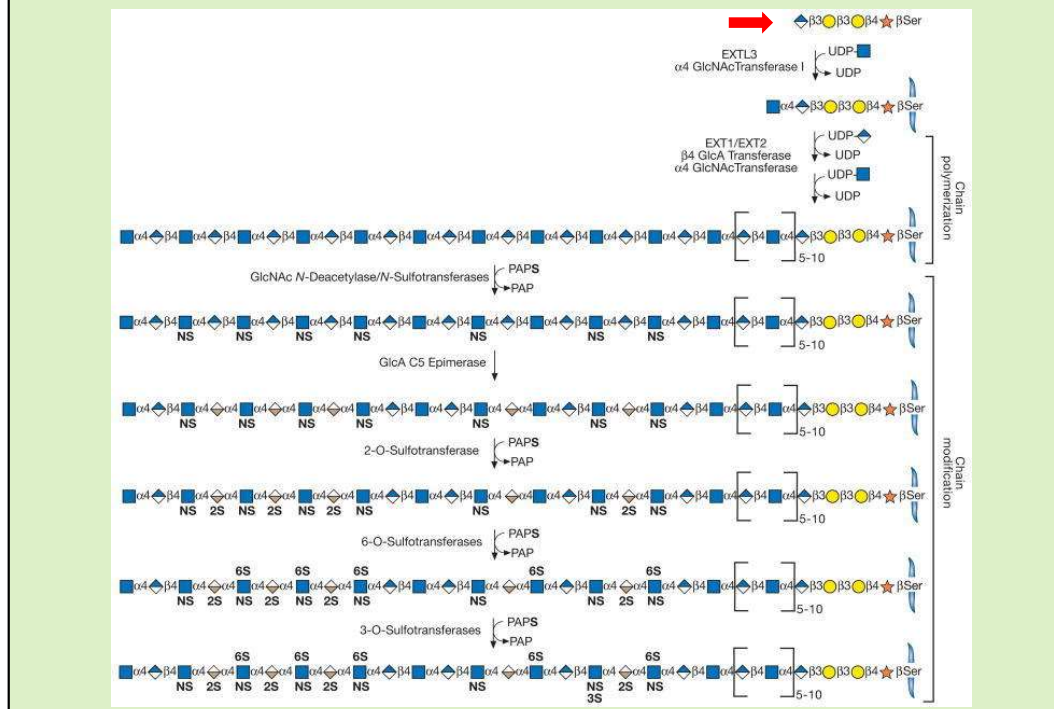
- 1) Во-первых, к линкерному тетрасахариду присоединяется остаток N-ацетилгалактозамина, а далее чередуется присоединение остатков глюконовой кислоты и **N-ацетилгалактозамина**. Происходит ступенчатая полимеризация, в результате чего синтезируется цепочка с чередующимися звеньями.
- 2) При этом до завершения построения этой полимерной цепи начинается ее процессинг, при котором наблюдается частичная эпимеризация остатков глюконовой кислоты, в результате чего в углеводную цепь встраивается L-идуриновая кислота.
- 3) И только после этого начинается сульфатирование. При этом остатки N-ацетилгалактозамина сульфатируются как по четвертому, так и по шестому положению. По четвертому положению сульфатируются те остатки N-ацетилгалактозамина, которые соседствуют с L-идуриновой кислотой. Завершающий этап сульфатирования - это сульфатирование остатков идуриновой кислоты.

Таким образом, хондроитин- и дерматансульфаты различаются распределением сульфатных групп, а также числом и характером расположения остатков идуриновой и глюконовой кислот,

обуславливающие различия в свойствах этих родственных полимеров.

## Биосинтез цепей гепарансульфата/гепарина

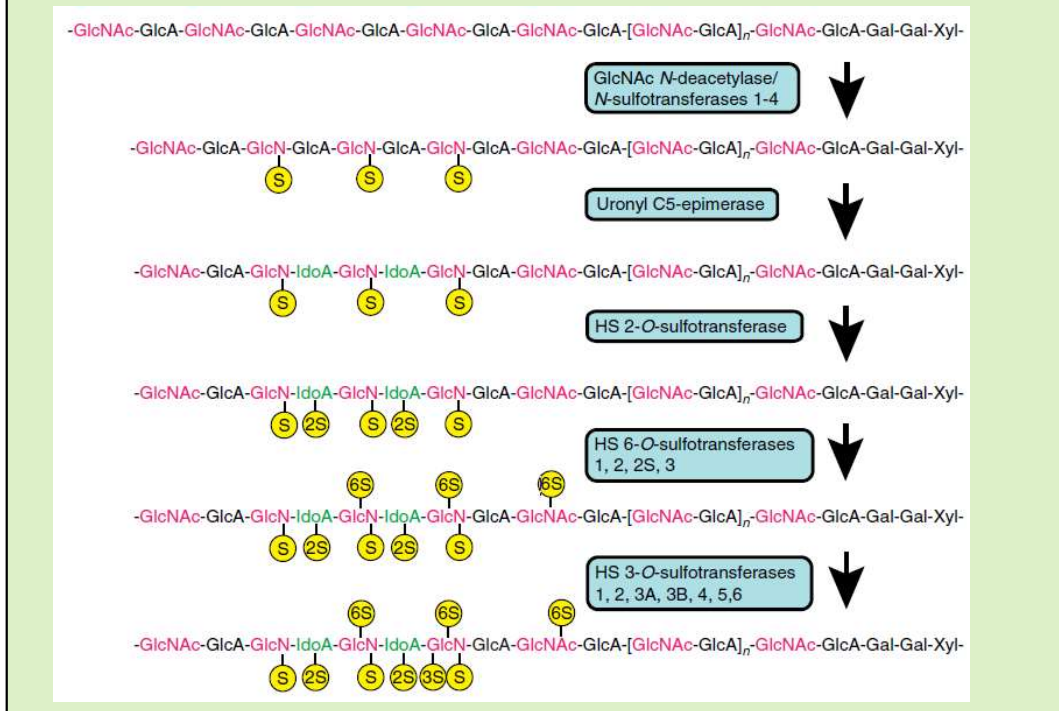
21



В случае биосинтеза гепарина к линкерному тетрасахариду присоединяется остаток N-ацетилглюкозамина, а затем присоединяются остатки глюконовой кислоты и N-ацетилглюкозамина, присоединение которых затем чередуется и происходит полимеризация с образованием полимерной цепи. Далее осуществляется сульфатирование остатков N-ацетилглюкозамина, и только затем эписмераза превращает глюконовую кислоту в идуроновую. А далее происходит сульфатирование остатков идуроновой кислоты по второму положению, а остатков N-ацетилглюкозамина - по третьему и шестому положению.

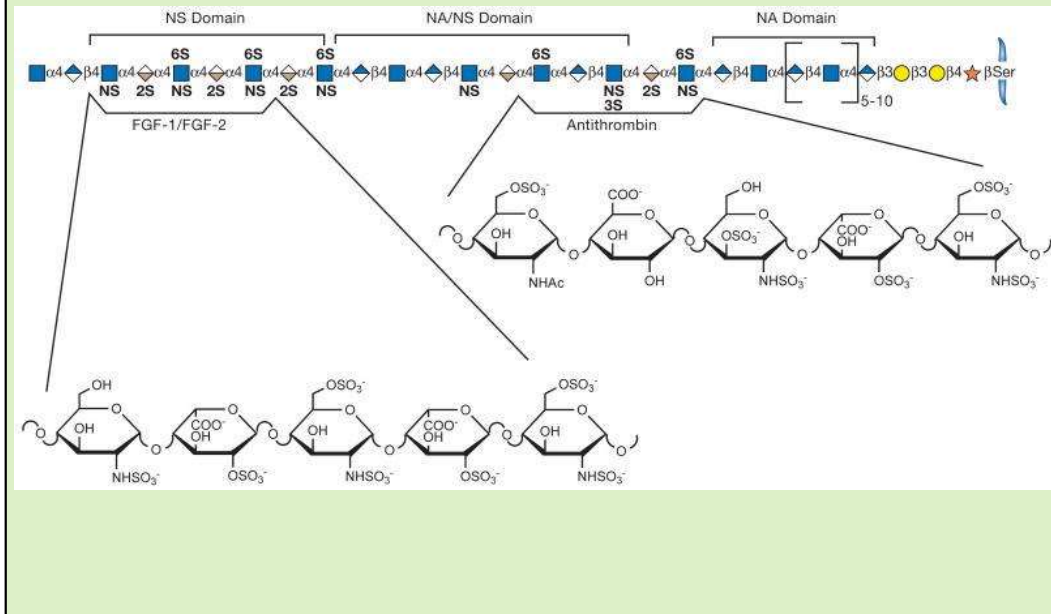


## Модификация цепей гепарансульфата/гепарина 22



На этом слайде хорошо видно, что первоначально сульфатируются остатки N-ацетилглюкозамина, далее в результате эпимеризации встраиваются остатки идуроновой кислоты, которые сульфатируются во вторую очередь, а уже далее сульфаты распределяются по другим остаткам.

## Доменная структура гепарансульфата/гепарина: 23 сайты связывания с различными лигандами



Это важно для этого гликозаминогликана, потому что в гепарансульфате или в гепарине можно выделять области, которые мало- или сильно сульфатированы по аминогруппе. Где малосульфатированы, там только глюконовая кислота, а где сильно – там идуроновая кислота. Есть области смешанные. Распределение этих доменов не случайно, что приводит к тому, что они селективно распознаются белками. Например, фактор роста фибробластов распознает области, сильно сульфатированные по азоту (N-сульфатированный домен), в то время как антитромбин распознает области смешанных доменов, в которых есть и N-ацетильные и N-сульфатные группы.

## Примеры олигосахаридов, которые предпочтительно узнаются ГАГ-связывающими белками

24

Protein	Glycosaminoglycan partner	Oligosaccharide
Antithrombin	heparin/heparan sulfate	
Fibroblast growth factor 2	heparin/heparan sulfate	
Lipoprotein lipase	heparin/heparan sulfate	
Heparin cofactor II	dermatan sulfate	
Herpes simplex virus Glycoprotein gD	heparin/heparan sulfate	



Essentials of Glycobiology  
Second Edition

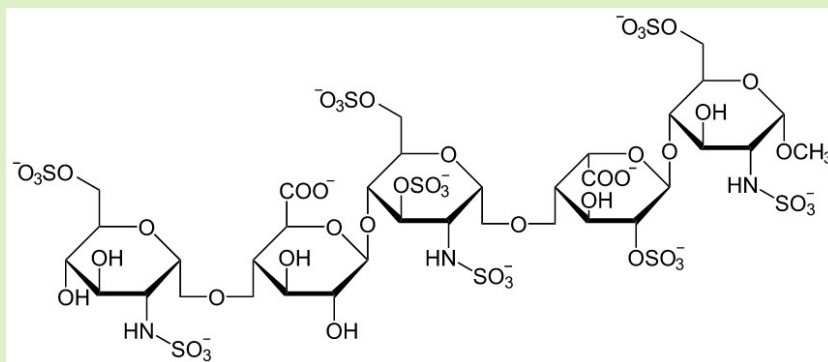
Chapter 35, Table 35.3

В целом, если анализировать последовательность моносахаридных остатков в олигосахаридных блоках (доменах) гликозаминогликанов, видно, что структуры очень отличаются, что определяет разнообразие их функций.

## Пентасахаридный фрагмент гепарина – полностью синтетический антикоагулянт прямого действия

25

Антитромботическая активность является результатом селективного угнетения фактора Ха, опосредованного антитромбином III. Избирательно связываясь с антитромбином III, фондапаринукс натрия потенцирует (примерно в 300 раз) исходную нейтрализацию фактора Ха антитромбином III. Нейтрализация фактора Ха прерывает цепочку коагуляции и ингибирует как образование тромбина, так и формирование тромбов.



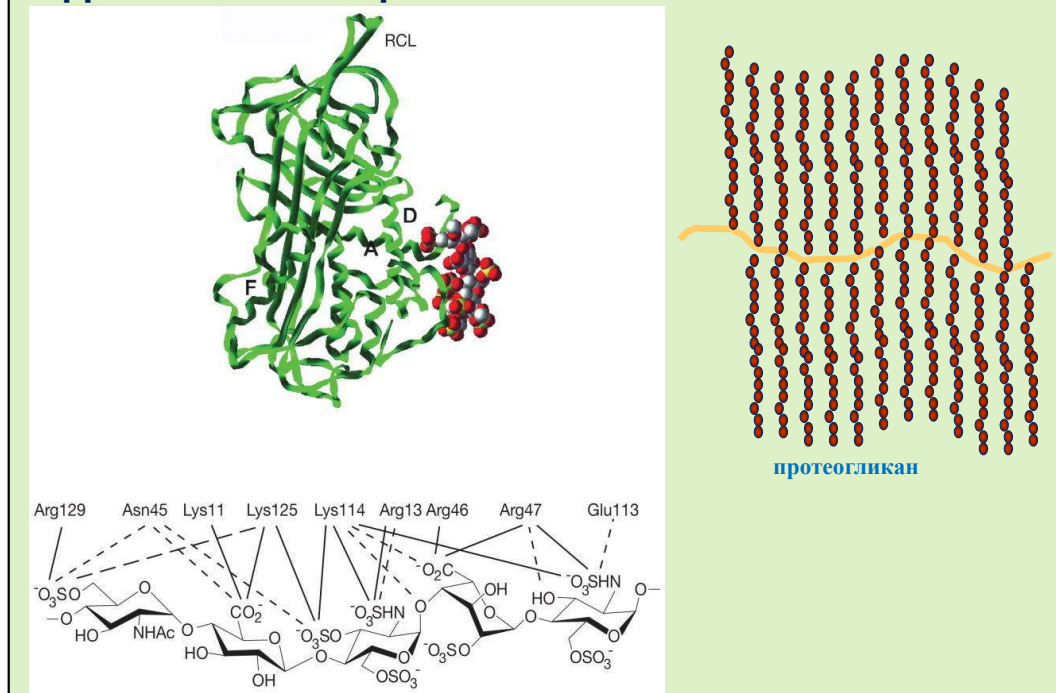
Торговая марка «Арикстра» (Arixtra)

действующее вещество – фондапаринукс натрия (fondaparinux sodium )

Знание о порядке распределения моносахаридов в гепарине позволило создать полностью синтетический антикоагулянт. Это не нерегулярный полисахарид, а сульфатированный пентасахарид, который ингибирует образование тромба. Этот пентасахарид синтезируется в килограммовых количествах. Его можно купить в аптеке.

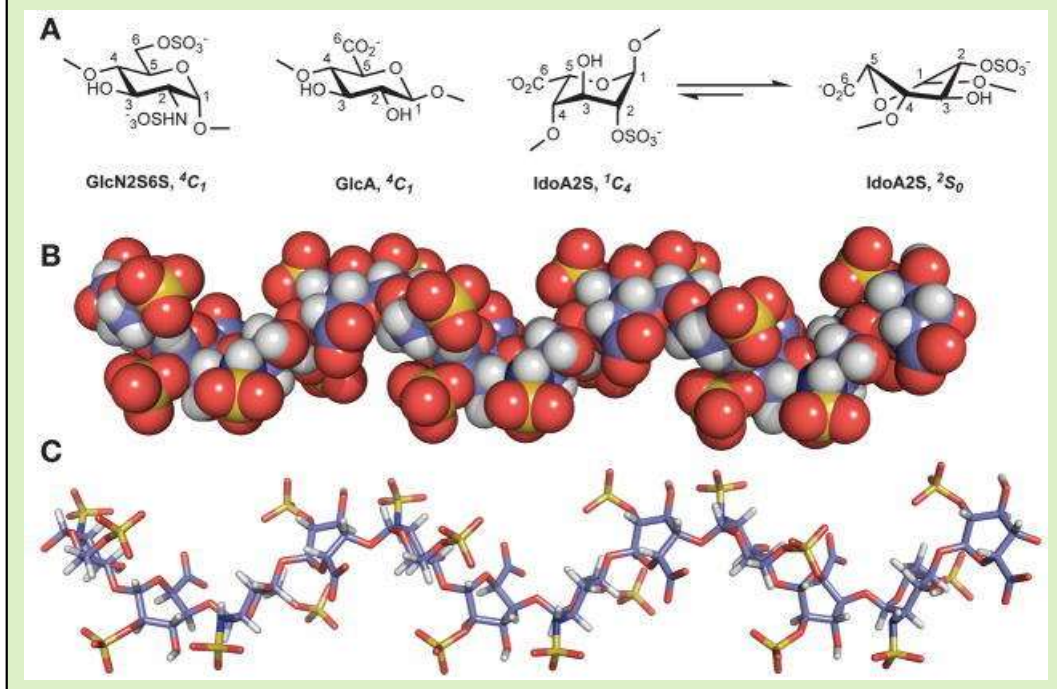
## Комплекс антитромбина с пентасахаридным фрагментом гепарина

26



Механизм антитромбинового действия этого пентасахарида активно изучался на различных моделях. Здесь показан комплекс антитромбина с пентасахаридом и схематически изображено взаимодействие групп углевода с разными аминокислотами. Нетрудно понять, что карбоксильные группы реагируют с положительно заряженными остатками аргинина, лизина. Справа показана структура соответствующего протеогликана с гепариновыми цепями. Поражает то, как антитромбин способен распознать пентасахаридную последовательность в этой огромной молекуле.

## Конформации гепариновых фрагментов (ЯМР) 27



Еще одной особенностью гликозаминогликанов является их особая конформация в растворе. В то время как моносахаридные остатки глюкозамина и глюкуроновой кислоты принимают обычную кресловидную конформацию ( ${}^4C_1$ ), остаток идуроновой кислоты гораздо более гибок. Он может принимать различные конформации, которые находятся в равновесии. Это приводит к тому, что полисахаридная цепь приобретает гибкость. Она может легко «изогнуться» по остаткам идуроновой кислоты и подстроиться для оптимального взаимодействия с белком.

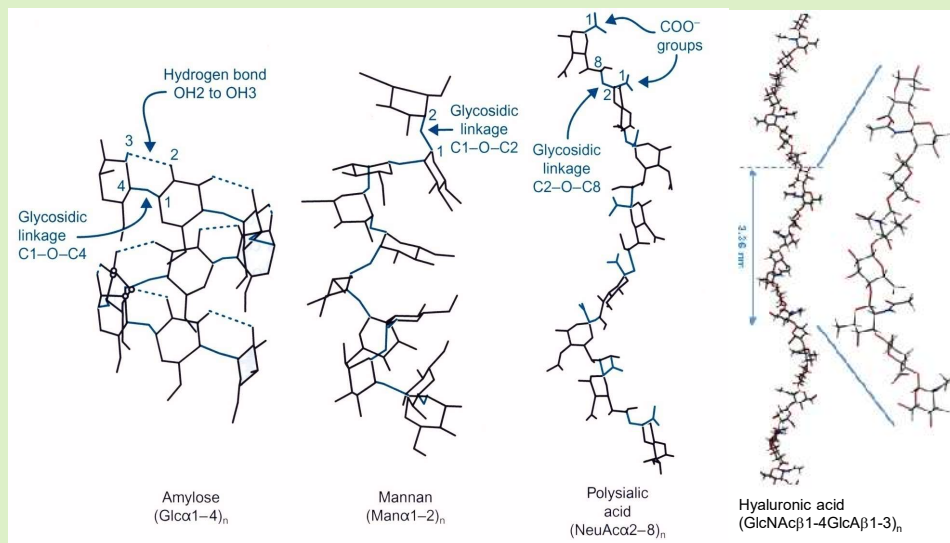


Полисахариды

Перейдем к полисахаридам

## Примеры полисахаридов млекопитающих. Пространственная структура

29

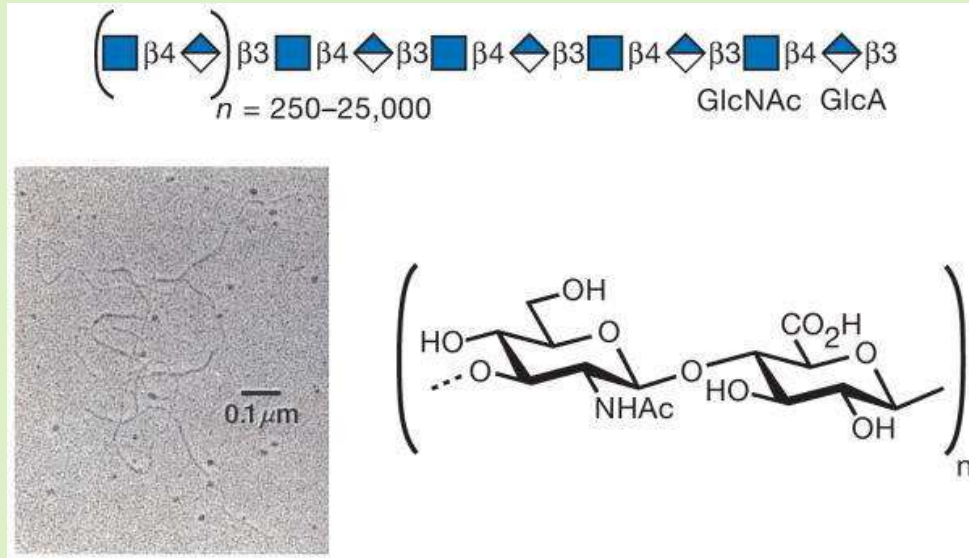


Здесь представлены примеры полисахаридов млекопитающих: амилоза, образующая в пространстве характерную структуру за счет водородных связей, а также маннаны, полисиаловая и гиалуроновая кислоты, имеющие спиралевидную пространственную структуру.



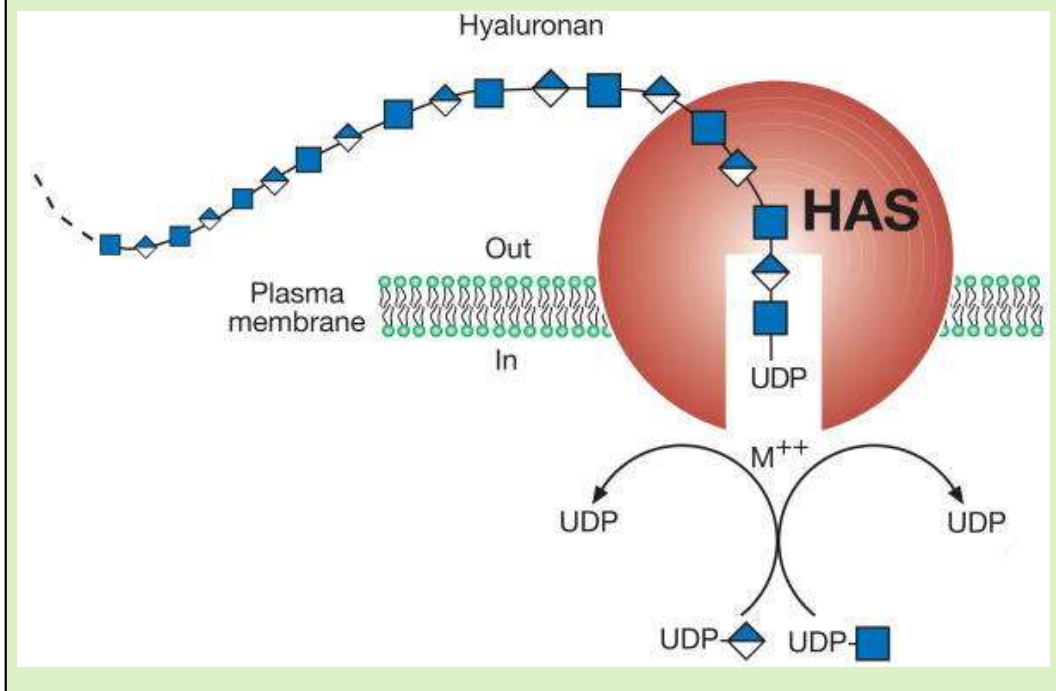
**Гиалуронан (гиалуроновая кислота) – самый крупный полисахарид позвоночных (~3.7 × 10<sup>6</sup> Да)**

30

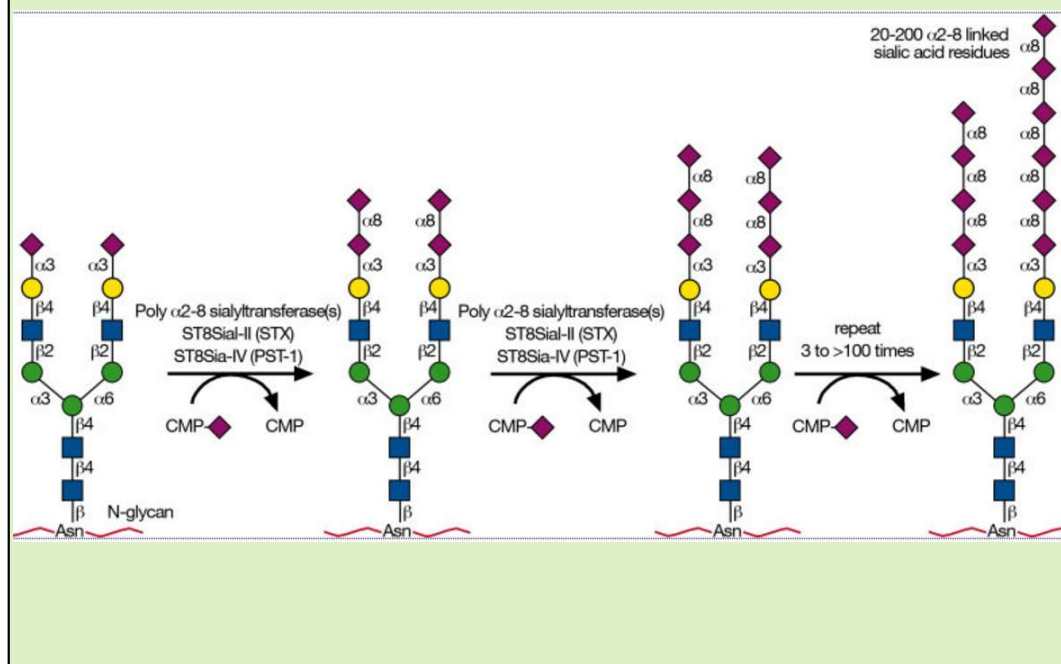


Гиалуронан – это гексаминогликан, состоящий из остатков N-ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты. Все моносахаридные остатки - [бета]-связанные в третье или в четвертое положение. Они имеют довольно длинные цепи с молекулярной массой до миллиона Да, образованные десятками тысяч остатков.

Hyaluronan consists of repeating disaccharides composed of N-acetylglucosamine (GlcNAc) and glucuronic acid (GlcA). It is the largest polysaccharide found in vertebrates, and it forms hydrated matrices.



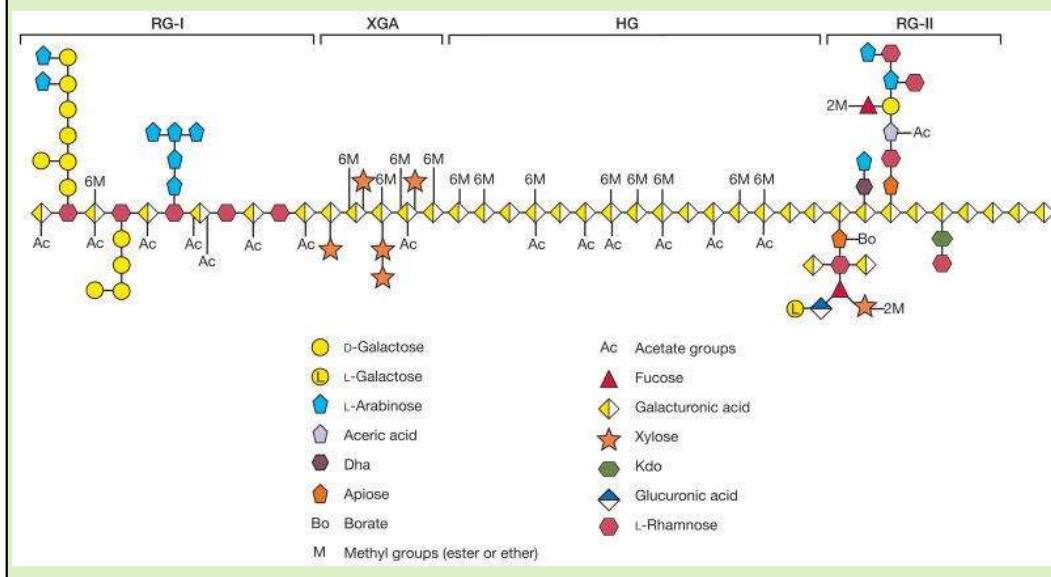
Синтезируется гиалуроновая кислота на плазматической мембране, где есть специальный фермент гиалуронансинтаза, который, синтезирует полимерную цепь, используя предшественники уридиндифосфаты N-ацетилглюкозамина и глюконовой кислоты в присутствии ионов металлов.



На N-гликанах встречаются полисиаловые кислоты, например N-ацетилнейраминная (у людей) и N-гликолилнейраминная кислота (у животных) синтезируется при помощи полисиалилтрансферазы. Степень полимеризации полисиалового фрагмента при этом может достигать 200 остатков. Этот фрагмент полисиаловой кислоты присоединен к полипептиду через кор N-цепей (9-сахарид). По своим свойствам этот полисахарид - это полианион. Именно фрагмент полисиаловой кислоты определяет свойства таких молекул.

## Пектиновые полисахариды растений: гомогалактуронан (HG), рамногалактуронан I (RG-I), рамногалактуронан II (RG-II), ксилогалактуронан (XGA)

33



Пектиновые полисахариды представляют большой класс полисахаридов растений. Они используются в пищевой промышленности в качестве загустителей и гелеобразователей.

На слайде схематично изображена структура пектинов, состоящая из разных блоков: гомогалактуронана, рамногалактуронана I и II, а также ксилогалактуронана. Гомогалактуронановый фрагмент образован остатками [альфа]-1,4-связанной галактурановой кислоты. Карбоксильные группы остатков галактурановой кислоты могут нести метиловые эфиры, формируя частично метилированный галактуранан, а также ацетильные группы. От степени метилирования зависят свойства пектинов, в том числе и способность образовывать гели. Ксилогалактуранан образуется, если остатки галактурановой кислоты в пектине замещены остатками ксилозы.

В нерегулярном полисахариде рамногалактуранане I остатки галактурановой кислоты чередуются с остатками L-рамнозы. Этот полисахарид разветвленный, разветвления идут по остаткам рамнозы и содержат остатки галактозы или арабинозы.

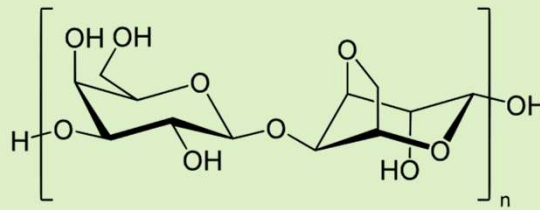
Встречается очень консервативный фрагмент рамногалактуранана II, содержащий редкие моносахаридные остатки.

Есть версия, что все эти фрагменты составляют единую молекулу

пектина, и все связи разрушаются в процессе экстракции. По другой версии эти фрагменты являются отдельными самостоятельными углеводными молекулами. Также есть данные, что эти полисахаридные структуры на самом деле являются гликопротеинами, где полисахаридные фрагменты связаны химической связью с полипептидной цепью.

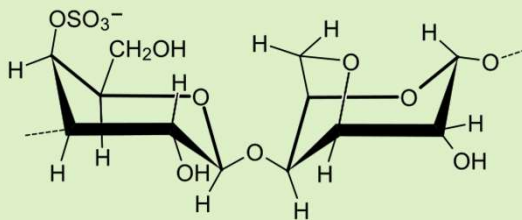
## Полисахариды красных водорослей

### Агароза



$\rightarrow 3$ )-β-D-galactose- (1→4)-3,6-anhydro-α-L-galactose- (1→

### Каррагинан



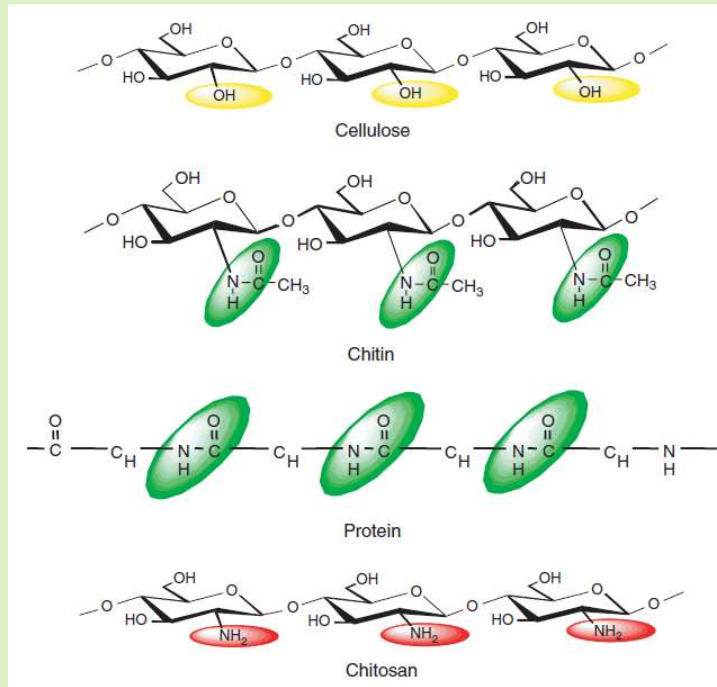
(κ)  $\rightarrow 3$ )-β-D-galactose-4-sulfate-(1→4)-3,6-anhydro-α-D-galactose-(1→

κ-carrageenan

Следует упомянуть еще один класс гелеобразующих полисахаридов. Это полисахариды красных водорослей: агароза и каррагинан. В пищевой промышленности применяют препараты агар-агара и каррагинана. Каррагинан по строению очень похож на агарозу, в которой остатки [бета]-D-галактопиранозы чередуются с остатками [альфа]-L-галактопиранозы, в которой есть еще 3,6-ангидромостик. Отличие каррагинана в том, что сахар с ангидромостиком - это не L-, а D-галактопираноза, а также присутствие сульфатных групп.

# Целлюлоза, хитин и хитозан – «родственники»?

35



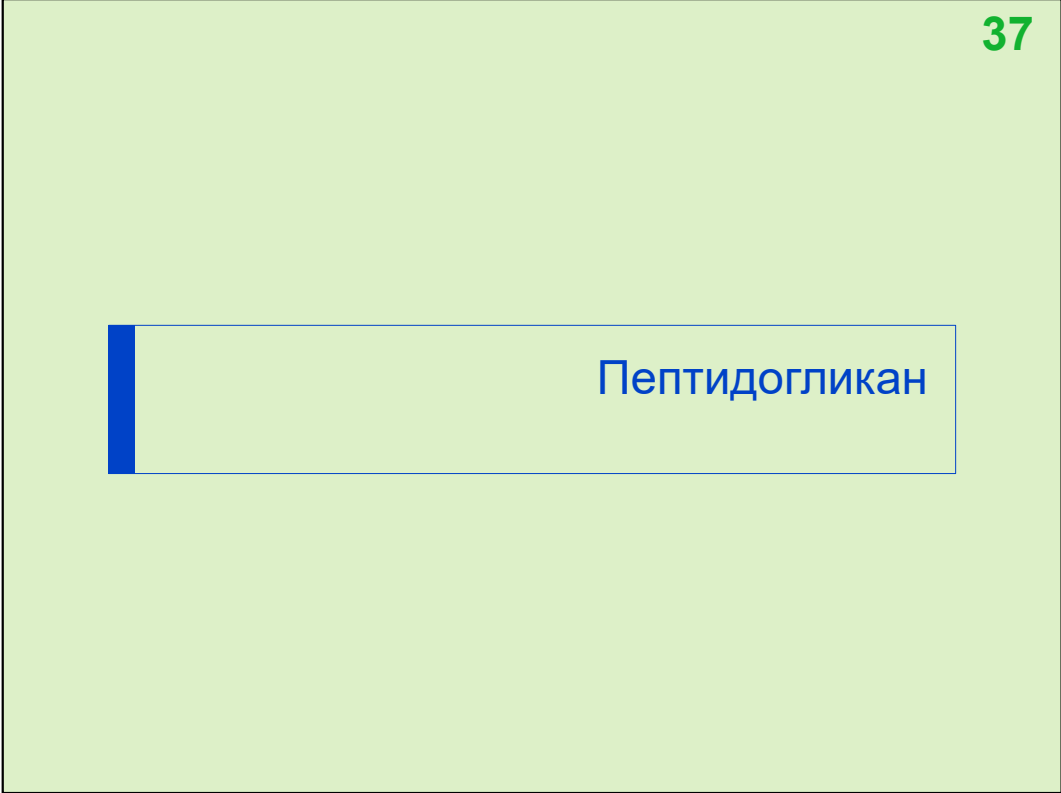
## Гликаны клеточной стенки бактерий

**Пептидогликан**  
**Липополисахариды**

С медицинской точки зрения очень важны гликаны клеточной стенки бактерий.

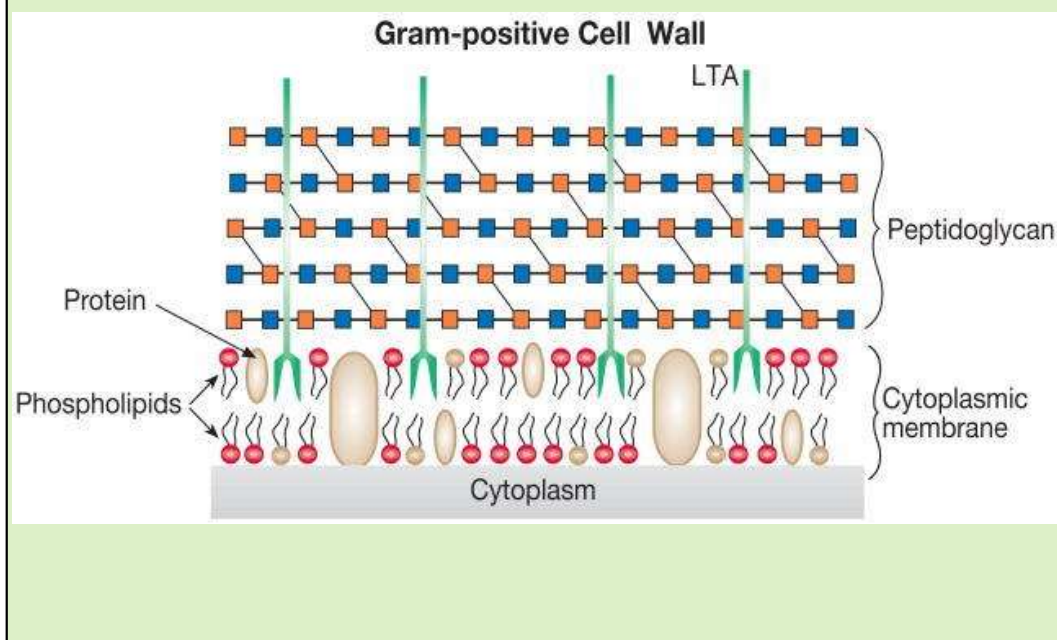
Среди гликанов клеточной стенки бактерий выделяют два класса: пептидогликан и липополисахариды.





Пептидогликан

Начнем с пептидогликана

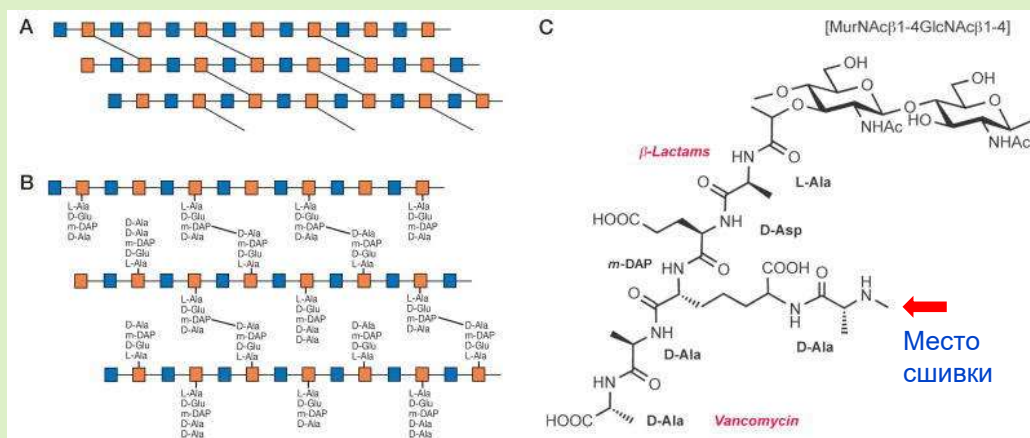


Перед вами схематичное строение клеточной стенки грам-положительных бактерий, основной компонент которой – это толстый слой пептидогликана, располагающийся на внешней стороне цитоплазматической мембраны. Именно присутствие пептидогликана на поверхности обеспечивает окрашивание красителем этих бактерий в синий цвет.

Пептидогликан включает полисахаридные цепи, образованные чередующимися остатками аминокислот, которые соединены пептидными мостиками. Кроме того с пептидогликаном связаны липотейхоевые кислоты (LTA).

## Структура пептидогликана клеточной стенки

39



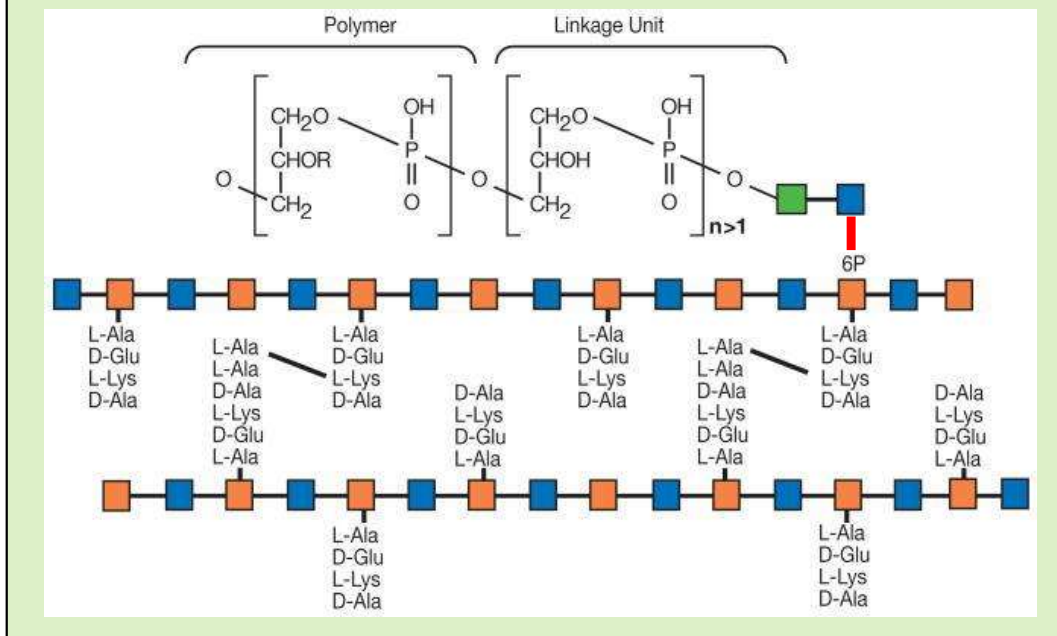
- $\beta$ -Лактамные антибиотики блокируют сборку пентапептида
- Ванкомицин блокирует сшивку гликановых цепей, которой предшествует удаление терминального остатка D-Ala

На этом слайде структура пептидогликана представлена более подробно. Пептидогликан образуют цепочки N-ацетилглюкозамина (синие квадраты) и N-ацетилмурамовой кислоты (оранжевые квадраты). Цепочки эти связаны между собой пептидными мостиками. Здесь можно подробнее рассмотреть последовательность аминокислот, которые образуют пептидные мостики. Это пентапептид, который начинается L-аланином (L-Ala), амидирующим N-ацетилмурамовую кислоту. Далее мостики включают D-глутамат (D-Glu), диаминопимелиновую кислоту (m-DAP) и заканчиваются D-аланином (D-Ala). Сшивка (амидная связь) образуется между карбоксильной группой D-Ala и аминогруппой m-DAP.

Часть антибиотиков, проявляющих антибактериальную активность, препятствуют созданию пептидогликановой оболочки, защищающей бактериальную клетку, ингибируя сборку этого пептида. Например, ванкомицин блокирует сшивку гликановых цепей, а [бета]-лактамы ингибируют синтез пентапептида.

## Пептидогликан *Streptococcus pyogenes* с привязанной тейхоевой кислотой

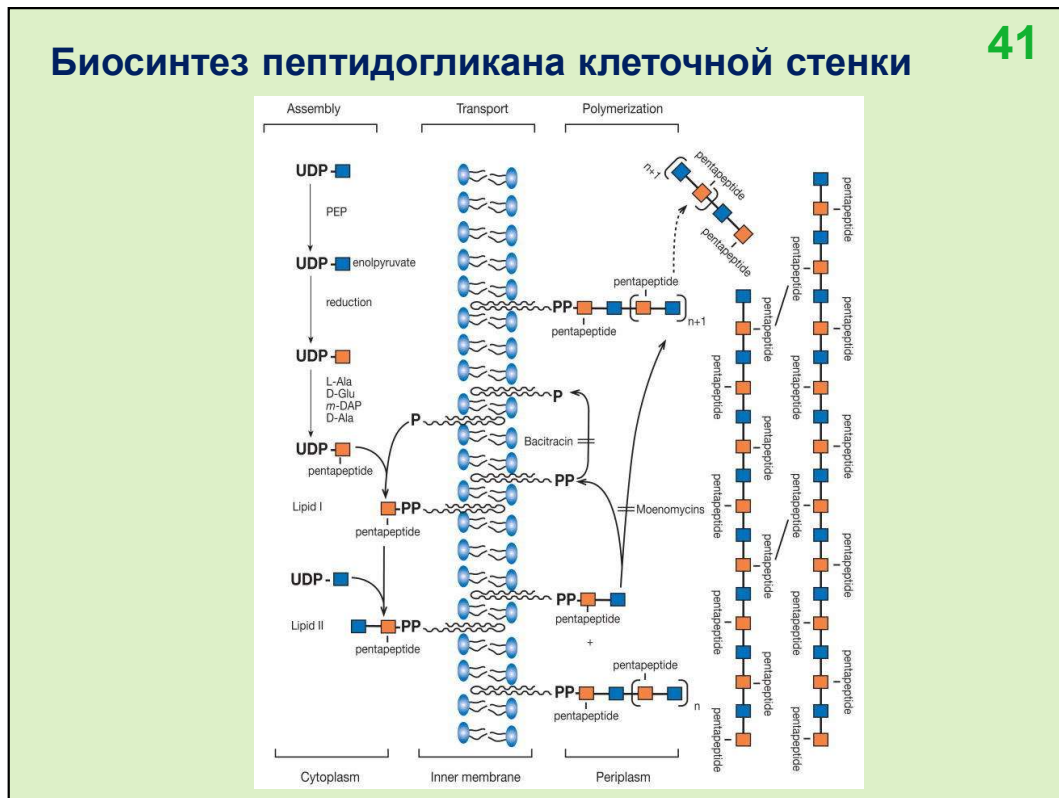
40



Перед вами пример пептидогликана *Streptococcus pyogenes*. Часто на внешней поверхности пептидогликанового слоя располагаются отрицательно заряженные тейхоевые кислоты, содержащие фосфаты или уроновые кислоты, которые химически связаны с остатками аминокислот пептидогликана.

## Биосинтез пептидогликана клеточной стенки

41



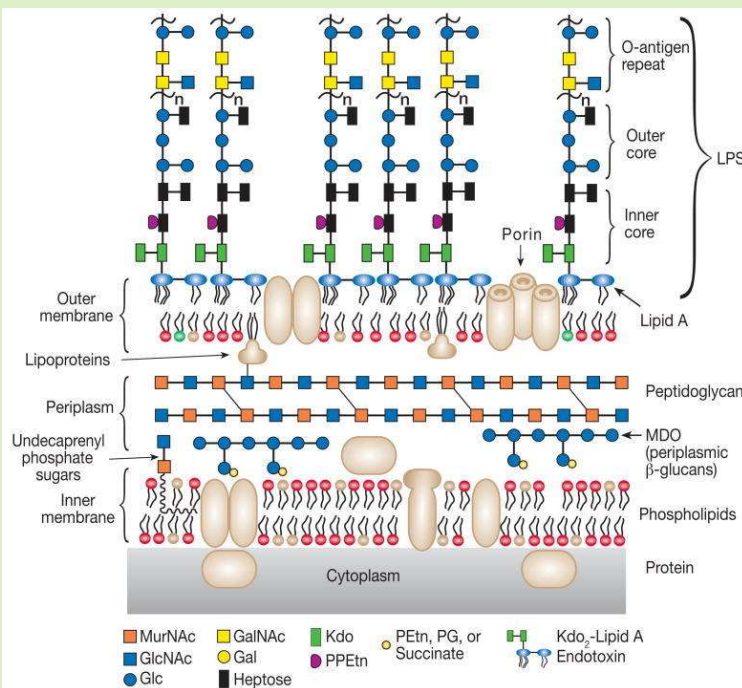
Синтез пептидогликана включает сборку дисахаридного предшественника (пирофосфат с липидным хвостом) и пентапептида в цитоплазме, их последующий перенос на внешнюю сторону мембраны, и полимеризацию, завершающуюся сшивкой полимерных углеводных цепей пептидными связями.

## Липополисахариды бактерий

Липополисахариды присутствуют только в грам-отрицательных бактериях

## Клеточная стенка грам-отрицательных бактерий

43

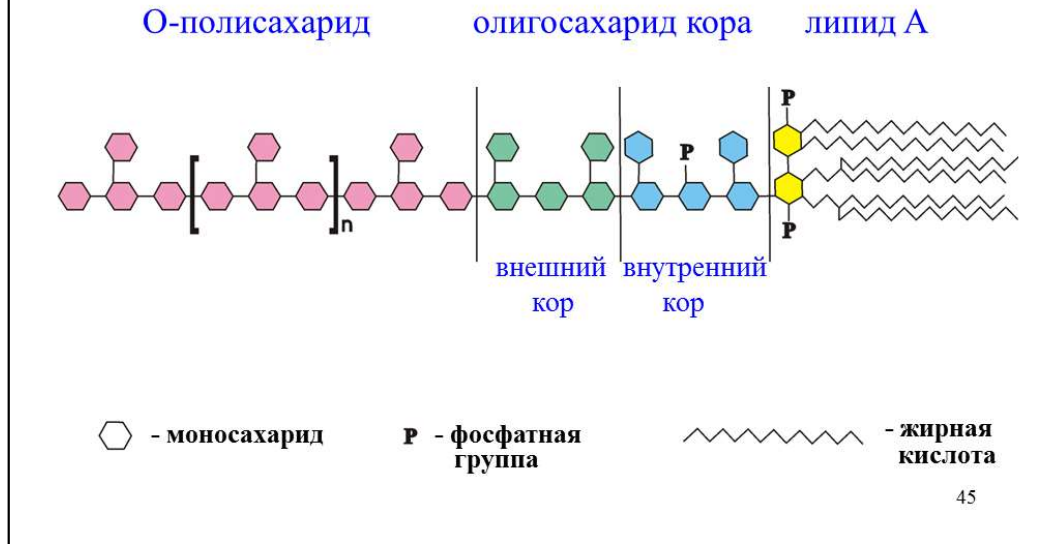


На этом слайде представлена клеточная стенка грам-отрицательных бактерий. Остановимся сначала на том, почему бактерии грам-положительные или грам-отрицательные. При окраске красителем по методу Грама грамположительные бактерии окрашиваются в синий цвет в отличие от грам-отрицательных бактерий.

У грам-положительных бактерий цитоплазматическая мембрана окружена только пептидогликановым слоем, тогда как у грам-отрицательных бактерий над пептидогликановым слоем располагается вторая внешняя мембрана, включающая липидный слой и липополисахарид (LPS), в котором выделяют внутренний и внешний коры, а также O-антиген, который определяет специфичность определенного штамма бактерий.

## Строение липополисахарида (ЛПС)

### S-форма



Бактерии могут продуцировать ЛПС разного строения.

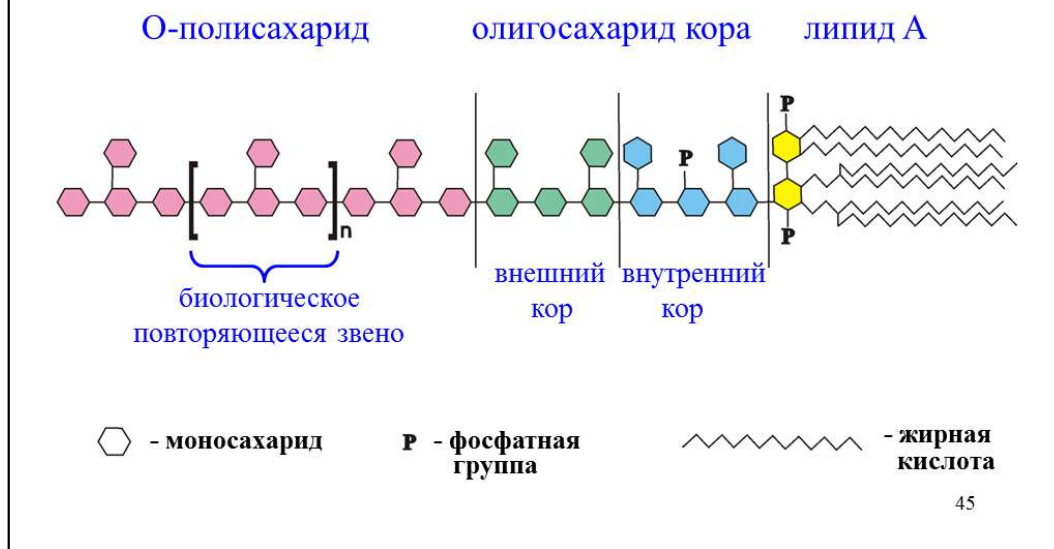
Бактерии, дающие колонии гладкой (smooth = S) формы, продуцируют полный ЛПС. Полная молекула ЛПС, - так называемая, S-форма (smooth)- содержит гидрофобную часть - липид А, олигосахарид кора, который обычно разделяют на внутренний и внешний кор, и О-полисахаридную цепь. Т.е. для одной бактерии олигосахариды внутреннего кора ЛПС абсолютно консервативны, олигосахариды внешнего кора могут варьироваться, а О-полисахаридные (или О-антигенные) цепи различаются у разных штаммов одной и той же бактерии.

Эта форма ЛПС характерна для большинства встречающихся в природе диких штаммов бактерий с колониями гладкой (smooth = S) формы.



## Строение липополисахарида (ЛПС)

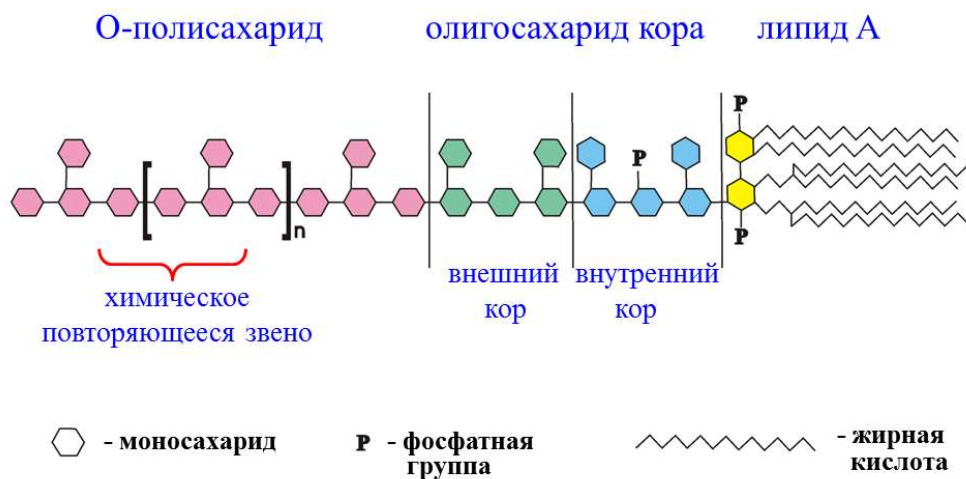
### S-форма



О-полисахарид строится в процессе биосинтеза из олигосахаридных повторяющихся звеньев, называемых **биологическими** повторяющимися звеньями.

## Строение липополисахарида (ЛПС)

### S-форма



45

А при структурном анализе О-полисахарида устанавливается строение **химического** повторяющегося звена - произвольного олигосахарида, который при полимеризации дает такую же последовательность моносахаридов в полимерной цепи.

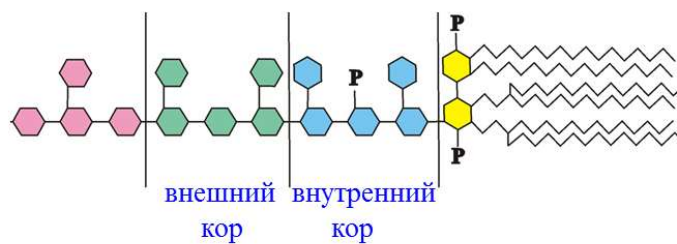
## Строение липополисахарида (ЛПС)

### SR-форма

первое повторяющееся  
звено O-полисахарида

олигосахарид кора

липид А



⬡ - моносахарид

P - фосфатная группа

~~~~~ - жирная кислота

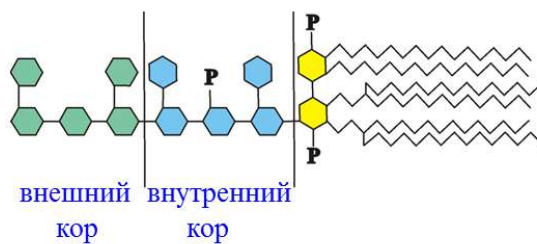
45

S-форма содержит много повторяющихся звеньев. Обычно в гладких штаммах наряду с S-формой ЛПС одновременно присутствует SR-форма ЛПС где O-полисахарид представлен одним повторяющимся звеном.

## Строение липополисахарида (ЛПС)

### R-форма

олигосахарид кора      липид А



⬡ - моносахарид

P - фосфатная группа

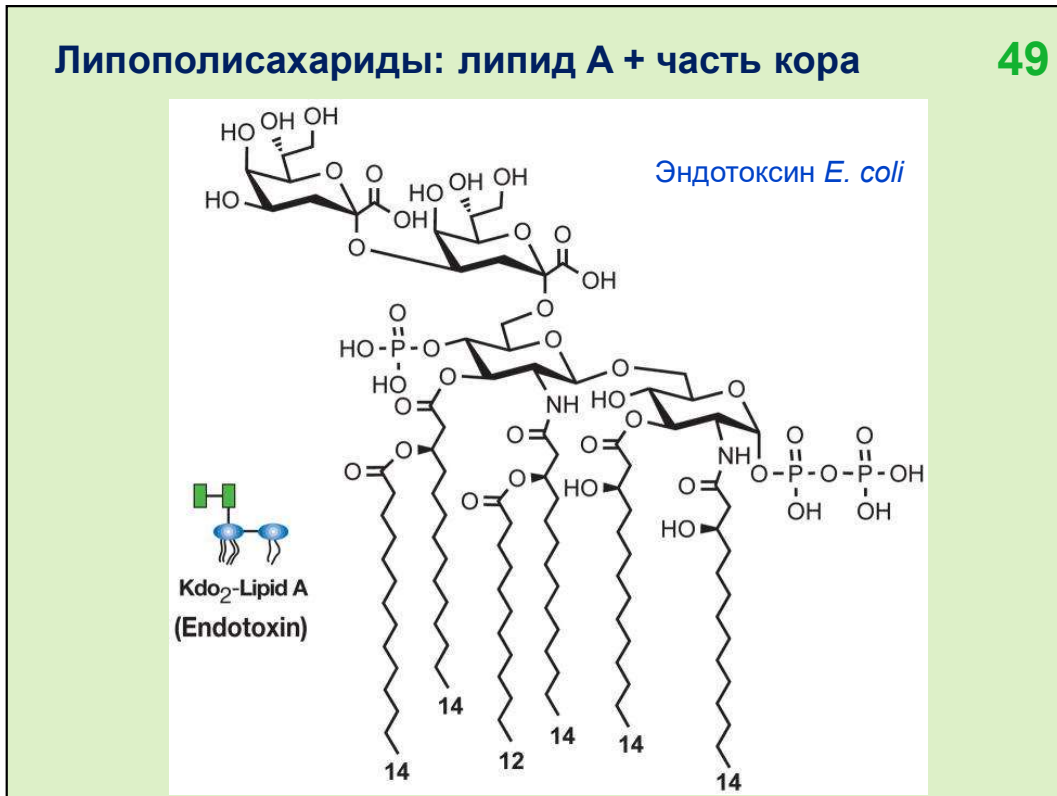
~~~~~ - жирная кислота

45

Микроорганизмы, дающие колонии шероховатой (rough = R) формы, продуцируют ЛПС в R-форме, лишенный O-полисахаридной цепи.

## Липополисахариды: липид А + часть кора

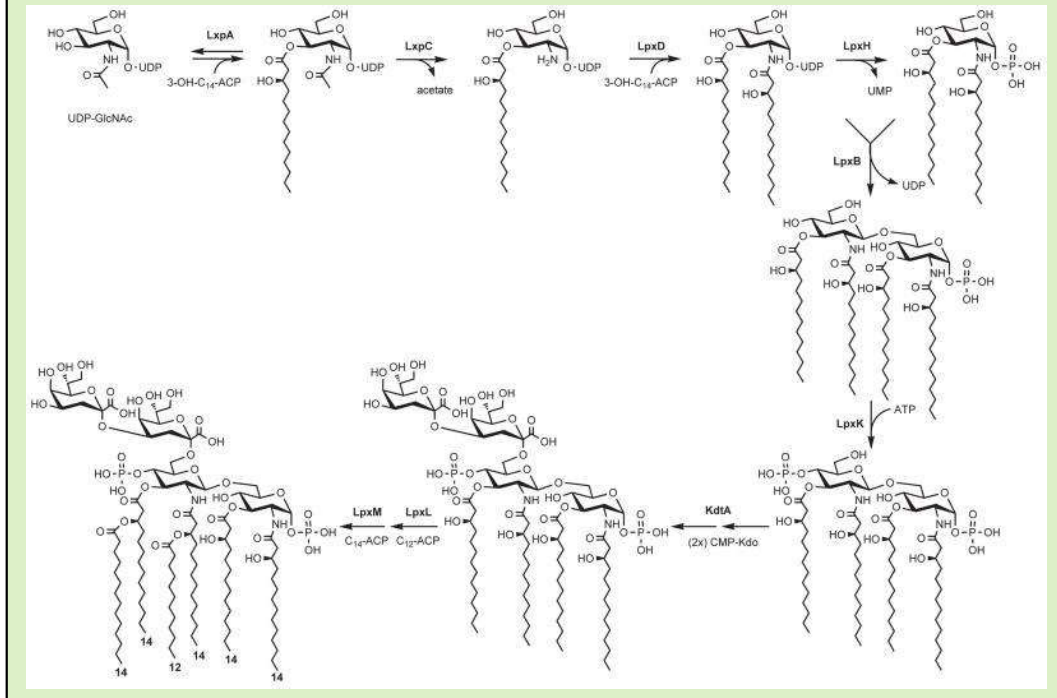
49



Липид А состоит из двух остатков глюкозамина, связанных гликозидной связью и несущих фосфатные и пиррофосфатные группы. При этом азот и кислород ацилирован жирными кислотами, число и тип которых определяют токсичность ЛПС бактерии.

## Сборка Kdo<sub>2</sub>-липид A в *E. coli*

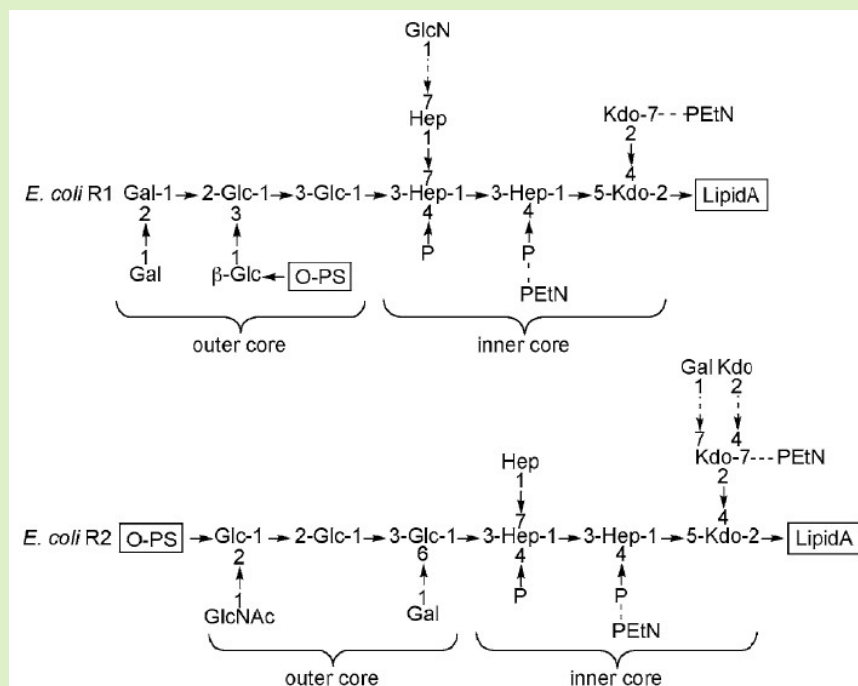
50



Синтез липида А показан на примере липида А в *E. coli*. Сначала к стандартному предшественнику гликозил-донора (уридиндифосфо-N-ацетилглюкозамин) добавляется один остаток жирной кислоты, после чего N-ацетильная группа отщепляется деацетилазой и ацилируется жирной кислотой, в результате чего этот гликозил-донор превращается в гликозил-акцептор. После чего два таких мономера связываются гликозидной связью, и образуется дисахарид с четырьмя жирными кислот. Далее происходит фосфорилирование, присоединение КДО и введение дополнительных остатков жирных кислот.

## Примеры структур кора ЛПС

51



Внутренний кор состоит прежде всего из КДО и гептоз. Характерно присутствие фосфоэтаноамина.

Для внешнего кора типично присутствие других сахаров

# Моносахаридные компоненты О-полисахаридов 52

3 Structure of O-Antigens 43

**Table 3.1** Monosaccharide components of OPSs

|  |  |
|--|--|
| <i>Penicillins, heptoses, heptoses and their deoxy derivatives</i>               |  |
| D-arabinose (Ara)  | D-glucose (Glc)                                  |
| D-, L-xyllose (Xyl, LXyl)  | D-mannose (Man)                                  |
| D-ribose (Rib)   | D-galactose (Gal)                                |
| 4-deoxy-D-arabino-hexose (4daraHex)  | 6-deoxy-D-gulose (6dGal)                         |
| 6-deoxy-L-glucose (L-quinovose, LQui)  | 3,6-dideoxy-D-arabino-hexose (tyvelose, Tyv)     |
| 6-deoxy-D-, L-galactose (D-, L-fucose; Fuc, LFuc)                                | 3,6-dideoxy-L-arabino-hexose (ascarylose, Asc)   |
| 6-deoxy-D-, L-mannose (D-, L-rhamnose; Rha, LRha)                                | 3,6-dideoxy-D-ribo-hexose (paratose, Par)        |
| 6-deoxy-L-altrose (L6dAlr)   | 3,6-dideoxy-D-xyllo-hexose (abcaquose, Abc)      |
| 6-deoxy-D-, L-talose (L6dTal, L6dTal)  | 3,6-dideoxy-L-xyllo-hexose (collinose, Col)      |
| D-glycero-D-manno-heptose (rhamHep)  | L-glycero-D-manno-heptose (LrhamHep)             |
| D-glycero-D-galacto-heptose (mgalHep)  | 6-deoxy-D-manno-heptose (6dmanHep)               |
| <i>2-Amino-2-deoxyhexoses, amino and diamino 6-deoxyhexoses</i>                  |  |
| D-glucosamine (GlcN)   | 3-amino-3-deoxy-D-fucose (Fuc3N)                 |
| D-galactosamine (GalN)   | 4-amino-4-deoxy-D-quinovose (Qui4N)              |
| D-mannosamine (ManN)   | 4-amino-4-deoxy-D-, L-rhamnose (Rha4N, LRha4N)   |
| D-, L-quinovosamine (QuiN, LQuiN)  | 4-amino-4-deoxy-D-fucose (Fuc4N)                 |
| L-rhamnosamine (LRhaN)   | 2,3-diamino-2,3-dideoxy-L-rhamnose (LRhaN3N)     |
| D-, L-fucosamine (FucN, LFucN)   | 2,4-diamino-2,4-dideoxy-D-quinovose (Qui4N4N)    |
| 6-deoxy-L-talosamine (L6dTalN)   | 2,4-diamino-2,4-dideoxy-D-fucose (Fuc4N4N)       |
| <i>3-amino-3-deoxy-D-, L-quinovose (Qui3N, LQui3N)</i>                           |  |
| <i>Hexuronic acids, amino and diamino hexuronic acids</i>                        |  |
| D-glucuronic (GlcA)  | D-glucosaminuronic (GlcNA)                       |
| D-mannuronic (ManA)  | D-mannosaminuronic (ManNA)                       |
| D-galacturonic (GalA)  | D-, L-galactosaminuronic (GalNA, LGalNA)         |
| L-alturonic (LAltA)  | L-altrosaminuronic (LAltNA)                      |
| L-iduronic (LIdoA)   | L-gulosaminuronic (LGalNA)                       |
| 3-amino-3-deoxy-D-glucuronic (Glc3NA)  | 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucuronic (GlcN3NA)   |
| 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-mannuronic (ManN3NA)                                   | 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-galacturonic (GalN3NA) |
| 2,3-diamino-2,3-dideoxy-L-galuronic (LGalN3NA)                                   | 2,4-diamino-2,4-dideoxyglucuronic (GlcN4NA)      |
| <i>Keto sugars</i>   |  |
| D-, L-lyxose pent-2-ulose (D-, L-xylulose; Xlu, LXlu)                            |  |
| 2-amino-2,6-dideoxy-D-xyllo-hexos-4-ulose  |  |
| 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulonic acid (ketodeoxyoctonic acid, Kdo)                   |  |
| 5-amino-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulonic acid (neuraminic acid, Neu) |  |

(continued)

44

Y.A. Knirel

**Table 3.1** (continued)

|  |
|--|
| 5,7-diamino-5,7,9-trideoxynon-2-ulonic acid <sup>a</sup>   |
| 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradecyloxy-L-glycero-L-manno-non-2-ulonic (pseudaminic acid (Pse)           |
| 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradecyloxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulonic (legionaminic acid (Leg)        |
| 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradecyloxy-D-glycero-D-talo-non-2-ulonic (4-epilegionaminic acid (4eLeg)    |
| 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradecyloxy-L-glycero-D-galacto-non-2-ulonic (8-epilegionaminic acid (8eLeg) |
| 5,7,8-triamino-3,5,7,8,9-pentadecoxynon-2-ulonic acid <sup>b</sup>                                 |
| 3-deoxy-D-lyxo-hept-2-ulosaric acid  |
| <i>Branched sugars<sup>c</sup></i>   |
| 3-C-methyl-D-mannose (Man3CMe)   |
| 3-C-methylrhamnose (Rha3CMe) <sup>a</sup>  |
| 3,6-dideoxy-4-C-[(R)-, (S)-1-hydroxyethyl]-D-xyllo-hexose (yersiniose A, yersiniose B)             |
| 3,6,8-trideoxy-4-C-[(R)-1-hydroxyethyl]-D-gulo-octose (erwiniose)                                  |
| 3,6,10-trideoxy-4-C-[(R)-hydroxyethyl]-D-erythro-D-gulo-decose (caryophillose)                     |
| 2-amino-4-C-(2-carbamoyl-2,2-dihydroxyethyl)-2,6-dideoxy-D-galactose (shewanellose)                |
| 4,8-cyclo-3,9-dideoxy-L-erythro-D-ido-nonose (caryose)   |

<sup>a</sup>The configuration of the monosaccharide remains unknown.

<sup>b</sup>The monosaccharide has the L-glycero-L-manno or D-glycero-L-manno configuration.

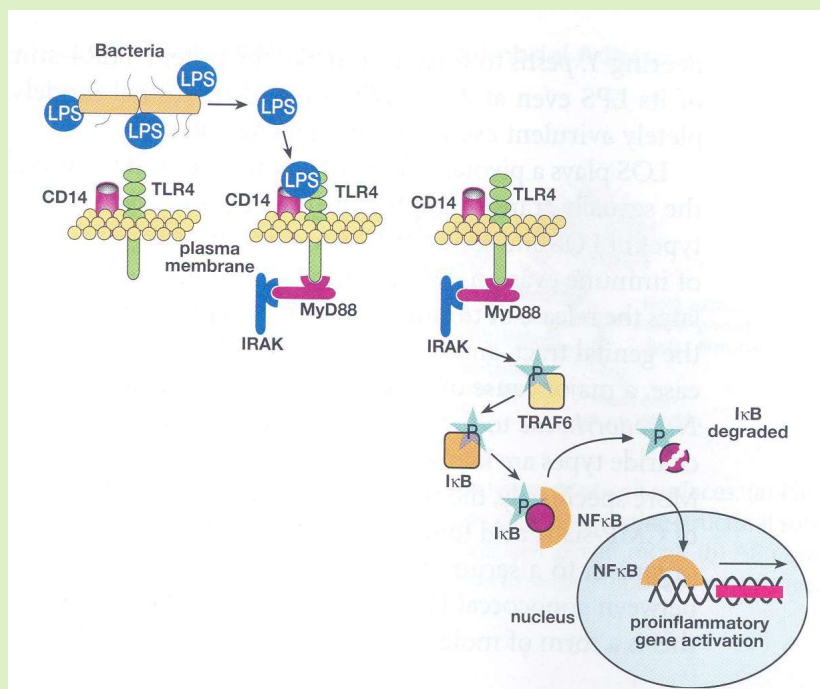
<sup>c</sup>For structures of branched monosaccharides see also review [7].

Углеводные цепи бактериальных полисахаридов включают огромное количество редких моносахаридов. Установление структуры новых моносахаридных звеньев позволяет разрабатывать новые мишени для антибактериальных препаратов.

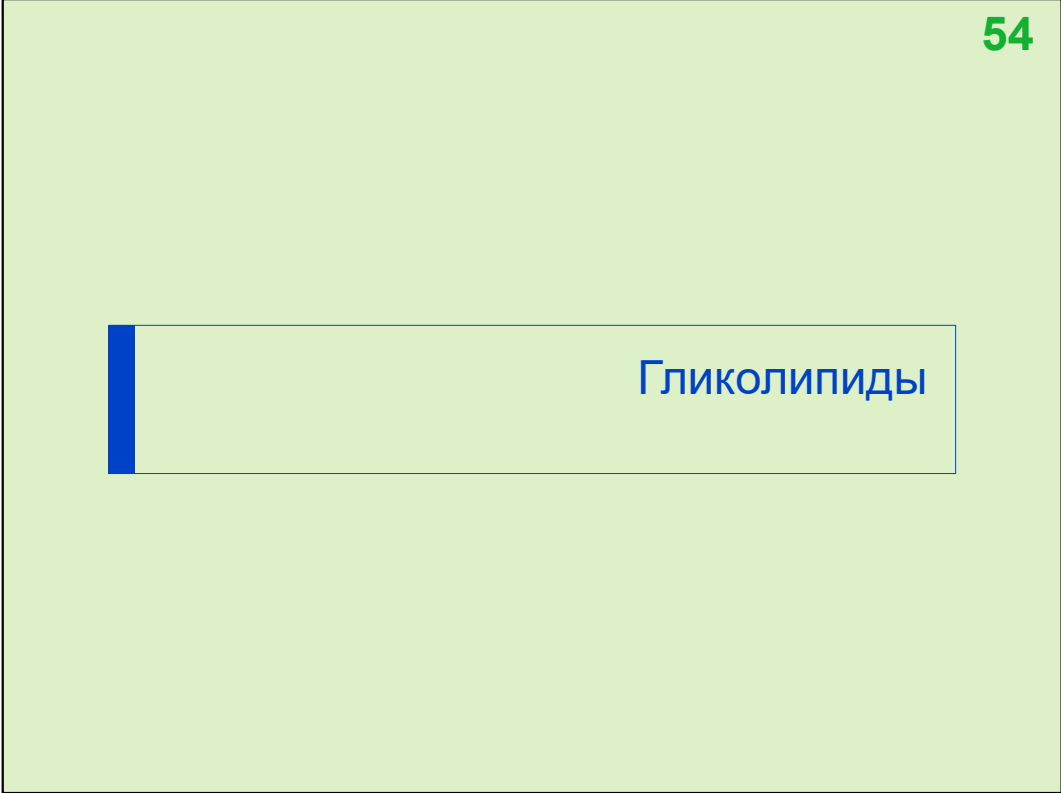


## ЛПС взаимодействует с TLR4

53



ЛПС взаимодействует с системой врожденного иммунитета и распознается Toll-подобными рецепторами, вызывая воспалительные реакции.

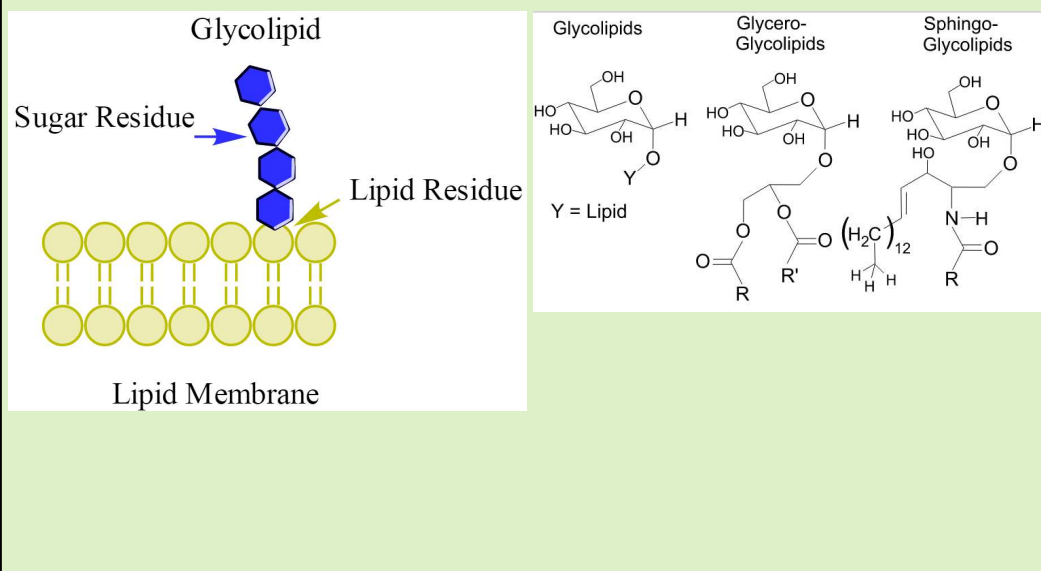


Гликолипиды

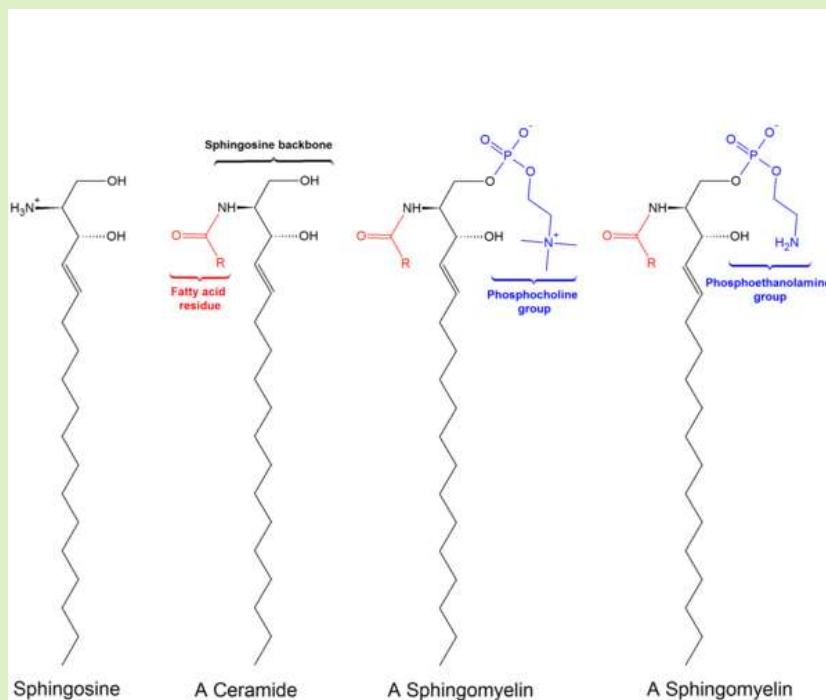
Важным классом гликонъюгатов являются гликолипиды.

## Гликолипиды: гликоглицеролипиды и гликофинголипиды

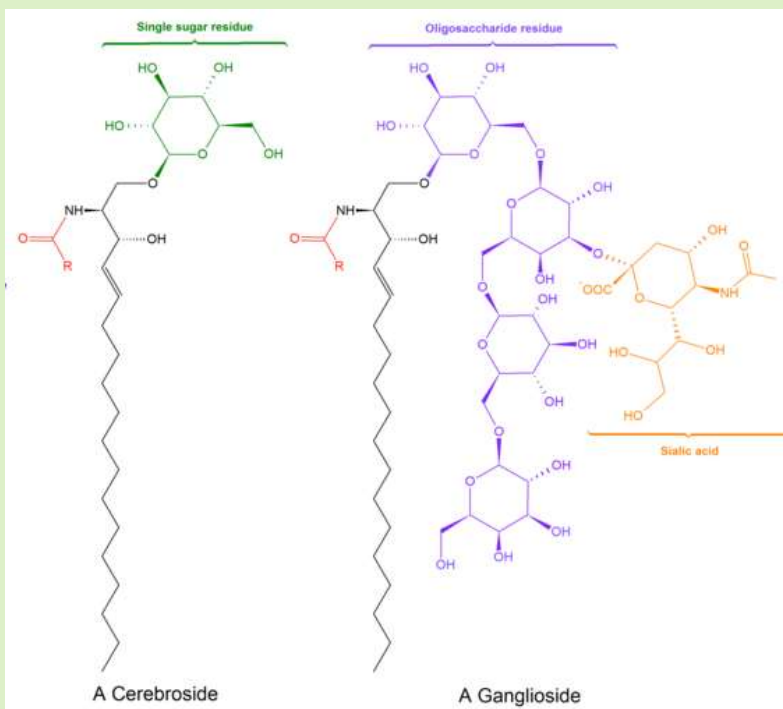
55



Гликолипиды содержат липидную и углеводную часть. Различают гликоглицеролипиды, в которых наряду с углеводным фрагментом есть остаток глицерина, связанный с ацильными или алкильными жирными кислотами, и гликофинголипиды, которые являются углеводными производными сфинголипидов.



Простейший сфинголипид – это сфингозин. Ацилирование его аминогруппы жирной кислотой приводит к образованию церамида. Разнообразие жирных кислот позволяет получить целый набор церамидов. Сфингомиелин образуется, когда гидроксильная группа в церамиде замещается остатками фосфоэтаноламина или фосфохолина.



Гликофинголипиды образуются, когда углеводные остатки присоединяются к сфингозину. Цереброзид – это гликофинголипид, содержащий один углеводный остаток.

Ганглиозиды образуются в присутствии олигосахаридного фрагмента, содержащего остатки сиаловых кислот.

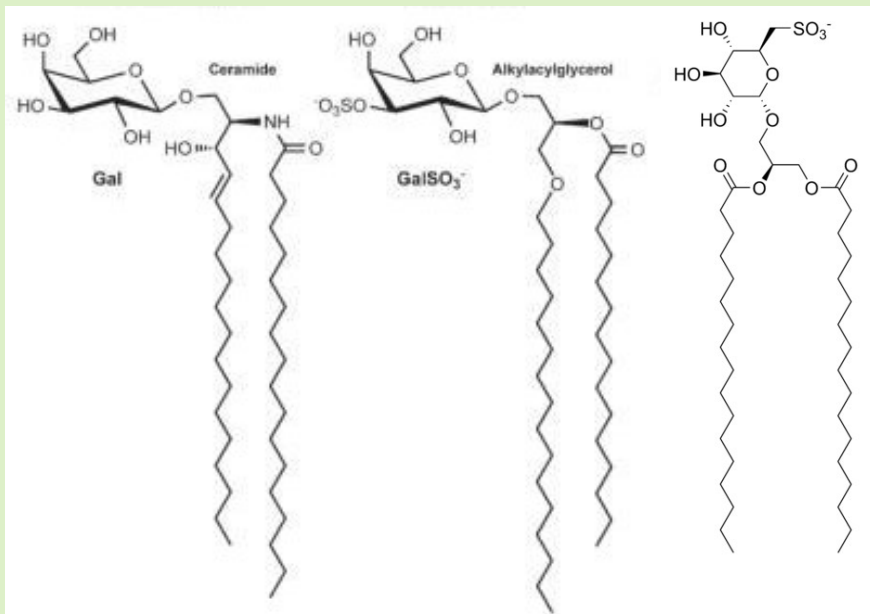
## Гликоглицеролипиды и гликофинголипиды

58

Галактозилцерамид

Семинолипид

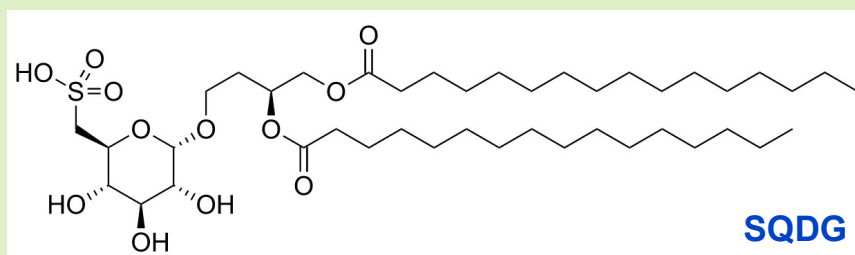
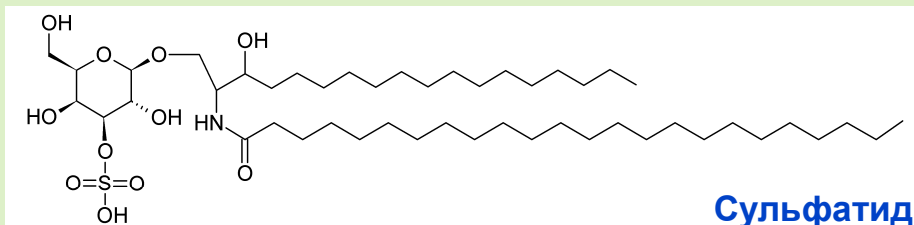
SQDG



Гликофинголипиды могут состоять из углеводного остатка и церамида, например галактозилцерамид. Встречаются сульфатированные глицеролипиды, такие как семинолипид, который состоит из липидного фрагмента и глицерина, гликозилированного остатком сульфатированной галактозы.

**Сульфатид (3-О-сульфо-β-D-галактозилцерамид) и SQDG  
(гликосфинголипид и гликоглицеролипид)**

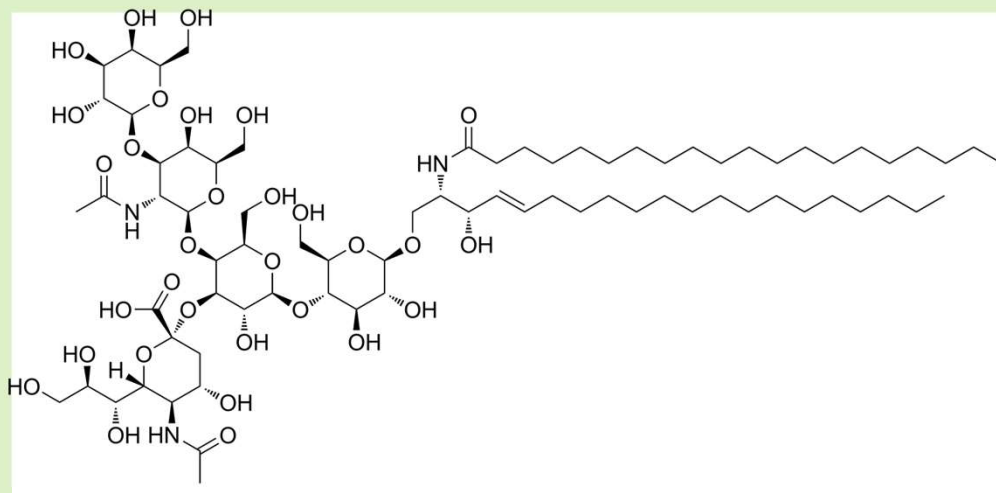
59



Здесь представлены еще примеры сульфатированных гликосфинго- и гликоглицеролипидов.

## Ганглиозид GM1 (гликосфинголипид)

60

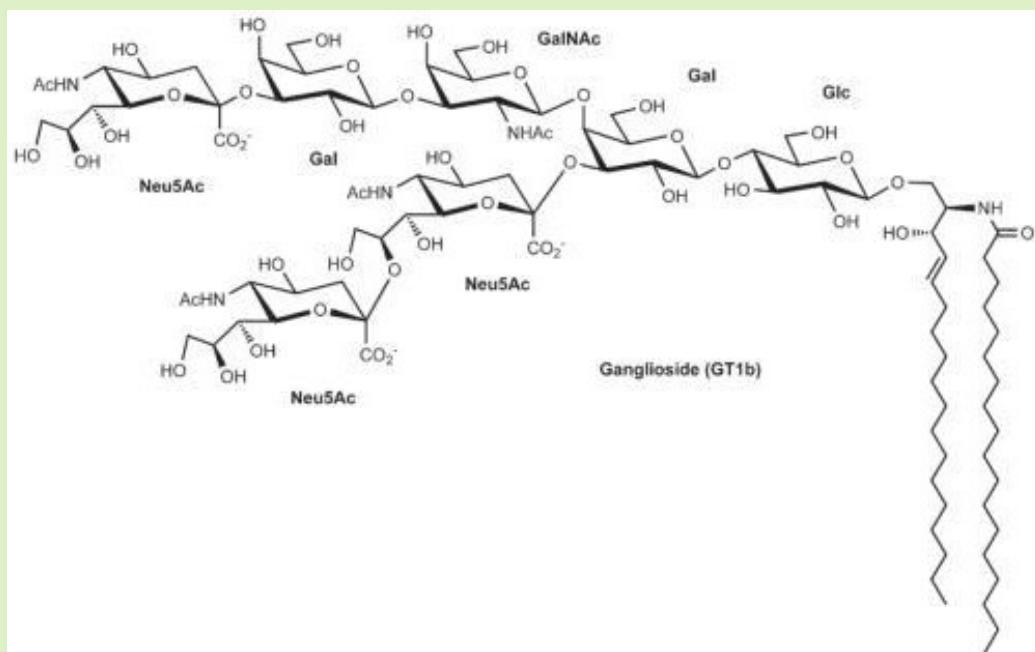


Это пример сложного гликосфинголипида (ганглиозида), состоящий из церамида и пентасахарида.



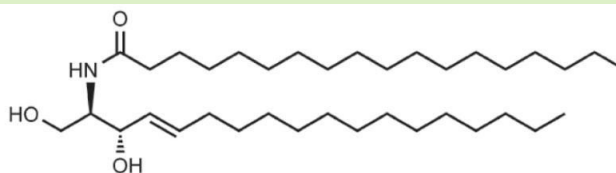
## Ганглиозид GT1b (гликосфинголипид)

61

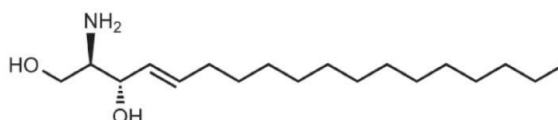


Пример сложного гликосфинголипида GT1b, содержащего три остатка сиаловой кислоты.

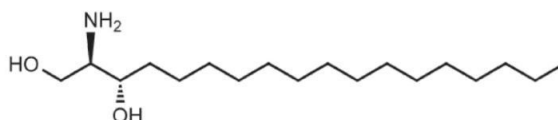
Церамид



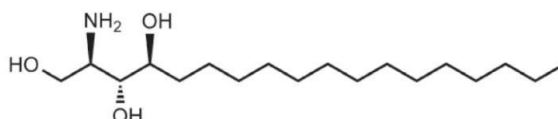
Сфингозин



Сфинганин



Фитосфингозин



В гликофинголипидах встречаются разнообразные варианты агликонов, т.е. неуглеводных фрагментов. Все они образуются на основе сфингозина, но могут отличаться наличием функциональных групп, двойных связей или количеством и строением остатков жирных кислот. Длина сфингоидного основания и амида жирной кислоты, стереохимия и структура могут влиять на функции гликофинголипидов.

## Основные “серии” (коры) гликофинголипидов 63

| Subfamily series | Structure  | Abbreviation         |
|------------------|--|----------------------|
| Lacto            | <u>GlcNAc</u> $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ Cer  | Lc <sub>3</sub> Cer  |
|                  | <u>Gal</u> $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ Cer                                   | Lc <sub>4</sub> Cer  |
| Neolacto         | Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ Cer  | nLc <sub>4</sub> Cer |
|                  | Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3 <u>Gal</u> $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ Cer | nLc <sub>6</sub> Cer |
| Ganglio          | <u>GalNAc</u> $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ Cer  | Gg <sub>3</sub> Cer  |
|                  | <u>Gal</u> $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ Cer                                   | Gg <sub>4</sub> Cer  |
| Globo            | <u>Gal</u> $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ Cer  | Gb <sub>3</sub> Cer  |
|                  | GalNAc $\beta$ 1-3 <u>Gal</u> $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ Cer                                 | Gb <sub>4</sub> Cer  |

Структуры, названия и сокращения основных серий гликофинголипидов. Их иногда называют корами. Они подчеркнуты.

## Структуры, тривиальные и систематические названия: “ose”-номенклатура

64

(root name)(root size)osylceramide

| Structure   | Trivial name              | Symbol                  |
|---|---------------------------|-------------------------|
| Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcCer                                 | Globotriaosylceramide     | GbOse <sub>3</sub> Cer  |
| GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcCer | Globotetraosylceramide    | GbOse <sub>4</sub> Cer  |
| Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcCer                                 | Isoglobotriaosylceramide  | iGbOse <sub>3</sub> Cer |
| GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcCer | Isoglobotetraosylceramide | iGbOse <sub>4</sub> Cer |
| Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcCer                                  | Mucotriaosylceramide      | McOse <sub>3</sub> Cer  |
| Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcCer     | Mucotetraosylceramide     | McOse <sub>4</sub> Cer  |
| GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcCer                               | Lactotriaosylceramide     | LcOse <sub>3</sub> Cer  |
| Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcCer  | Lactotetraosylceramide    | LcOse <sub>4</sub> Cer  |
| Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcCer  | Neolactotetraosylceramide | nLcOse <sub>4</sub> Cer |
| GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcCer                               | Ganglotriaosylceramide    | GgOse <sub>3</sub> Cer  |
| Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcCer  | Ganglotetraosylceramide   | GgOse <sub>4</sub> Cer  |
| Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4GalCer  | Galabiosylceramide        | GaOse <sub>2</sub> Cer  |
| Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4GalCer                                | Galatriaosylceramide      | GaOse <sub>3</sub> Cer  |

Структуры, тривиальные и систематические названия: ose-номенклатура

**«Продвинутая» “ose”-номенклатура**

## Abbreviated structure

II<sup>3</sup>NeuAc-LacCer  
II<sup>3</sup>NeuAc-GgOse<sub>3</sub>Cer  
II<sup>3</sup>NeuAc-GgOse<sub>4</sub>Cer  
II<sup>3</sup>(NeuAc)<sub>2</sub>-LacCer  
II<sup>3</sup>(NeuAc)<sub>2</sub>-GgOse<sub>3</sub>Cer  
IV<sup>3</sup>NeuAc,II<sup>3</sup>NeuAc-GgOse<sub>4</sub>Cer  
II<sup>2</sup>(NeuAc)<sub>2</sub>-GgOse<sub>3</sub>Cer  
II<sup>3</sup>(NeuAc)<sub>2</sub>-GgOse<sub>4</sub>Cer  
IV<sup>3</sup>(NeuAc)<sub>2</sub>,II<sup>3</sup>NeuAc-GgOse<sub>4</sub>Cer  
IV<sup>3</sup>NeuAc,II<sup>3</sup>(NeuAc)<sub>2</sub>-GgOse<sub>4</sub>Cer  
II<sup>3</sup>(NeuAc)<sub>3</sub>-GgOse<sub>4</sub>Cer  
IV<sup>3</sup>(NeuAc)<sub>2</sub>,II<sup>3</sup>(NeuAc)<sub>2</sub>-GgOse<sub>4</sub>

«Продвинутая» *ose*-номенклатура

## Номенклатура Свеннерхольма (для ганглиозидов)

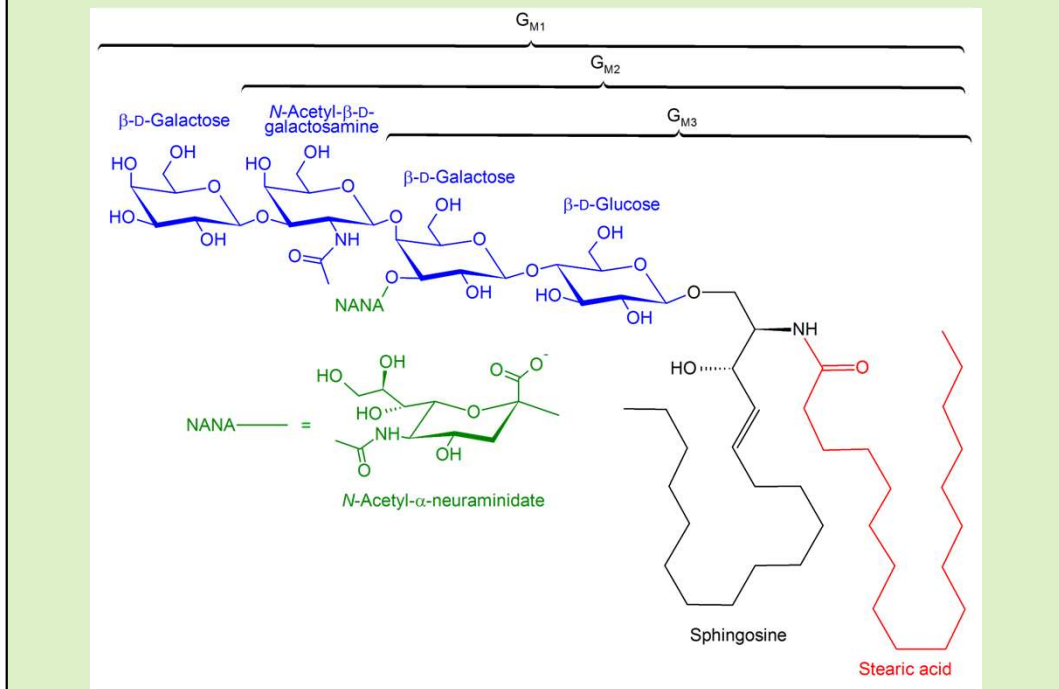
66

| Svennerholm designation | Abbreviated structure  |
|-------------------------|--|
| GM3                     | II <sup>3</sup> NeuAc-LacCer   |
| GM2                     | II <sup>3</sup> NeuAc-GgOse <sub>3</sub> Cer   |
| GM1                     | II <sup>3</sup> NeuAc-GgOse <sub>4</sub> Cer   |
| GD3                     | II <sup>3</sup> (NeuAc) <sub>2</sub> -LacCer   |
| GD2                     | II <sup>3</sup> (NeuAc) <sub>2</sub> -GgOse <sub>3</sub> Cer                                   |
| GD1a                    | IV <sup>3</sup> NeuAc,II <sup>3</sup> NeuAc-GgOse <sub>4</sub> Cer                             |
| GD1b                    | II <sup>2</sup> (NeuAc) <sub>2</sub> -GgOse <sub>3</sub> Cer                                   |
| GD1c                    | II <sup>3</sup> (NeuAc) <sub>2</sub> -GgOse <sub>4</sub> Cer                                   |
| GT1a                    | IV <sup>3</sup> (NeuAc) <sub>2</sub> ,II <sup>3</sup> NeuAc-GgOse <sub>4</sub> Cer             |
| GT1b                    | IV <sup>3</sup> NeuAc,II <sup>3</sup> (NeuAc) <sub>2</sub> -GgOse <sub>4</sub> Cer             |
| GT1c                    | II <sup>3</sup> (NeuAc) <sub>3</sub> -GgOse <sub>4</sub> Cer                                   |
| GQ1b                    | IV <sup>3</sup> (NeuAc) <sub>2</sub> ,II <sup>3</sup> (NeuAc) <sub>2</sub> -GgOse <sub>4</sub> |

Номенклатура Свеннерхольма (для ганглиозидов)

## Номенклатура Свеннерхольма (ганглиозиды GM1, GM2, GM3)

67



Номенклатура Свеннерхольма (ганглиозиды GM1, GM2, GM3)

## Состав гликофинголипидов (ГСЛ): сравнение с N- и O-цепями гликопротеинов (ГП)

68

### ▶ РАЗЛИЧИЯ:

- ▶ Присутствие глюкозы (Glc):
  - ▶ в ГСЛ почти всегда есть Glc
  - ▶ в N-цепях ГП Glc присутствует только временно
- ▶ Присутствие маннозы (Man):
  - ▶ в ГСЛ никогда нет Man
  - ▶ в N-цепях ГП Man есть всегда
- ▶ Фрагмент Neu5Ac $\alpha$ 2-8Neu5Ac $\alpha$ 
  - ▶ в ГСЛ типичны олигомеры Neu5Ac (до тримера включительно)
  - ▶ на цепях ГП может присутствовать полисиаловая кислота

### ▶ СХОДСТВО:

- ▶ Функционально значимые терминации часто бывают одинаковыми в ГСЛ и в N- и O-цепях ГП (см. примеры)

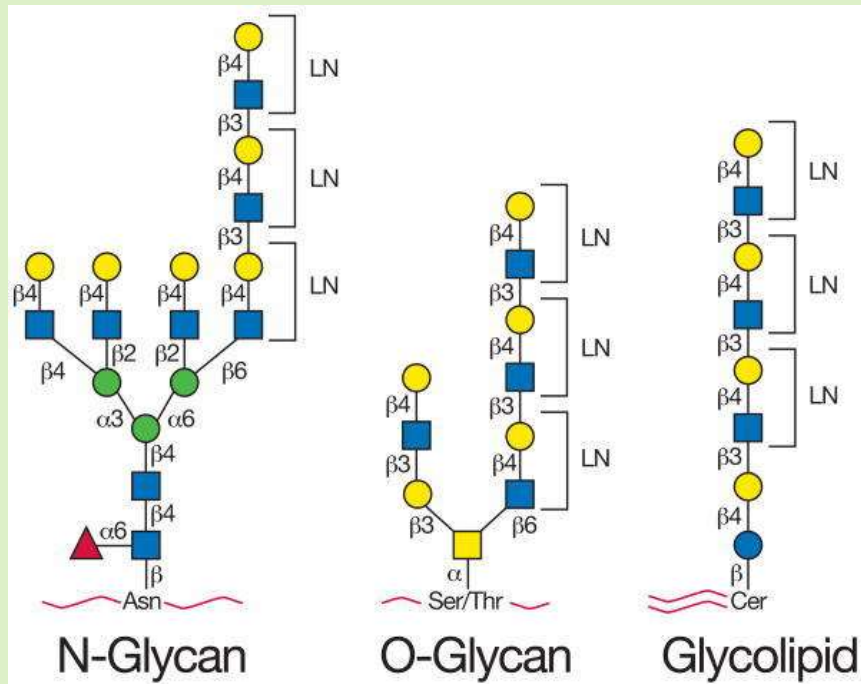
В отличие от углеводных цепей гликопротеинов, углеводные цепи в гликолипидах почти всегда содержат глюкозу, но там никогда нет остатков маннозы. Для гликофинголипидов типичны небольшие фрагменты олигомеров N-ацетилнейраминной кислоты (до трех остатков включительно).

Однако функционально значимые терминальные олигосахаридные цепочки (терминации) часто совпадают в углеводных цепях гликофинголипидов и гликопротеинах.



## Полилактозаминные цепи в ГП и ГЛ

69

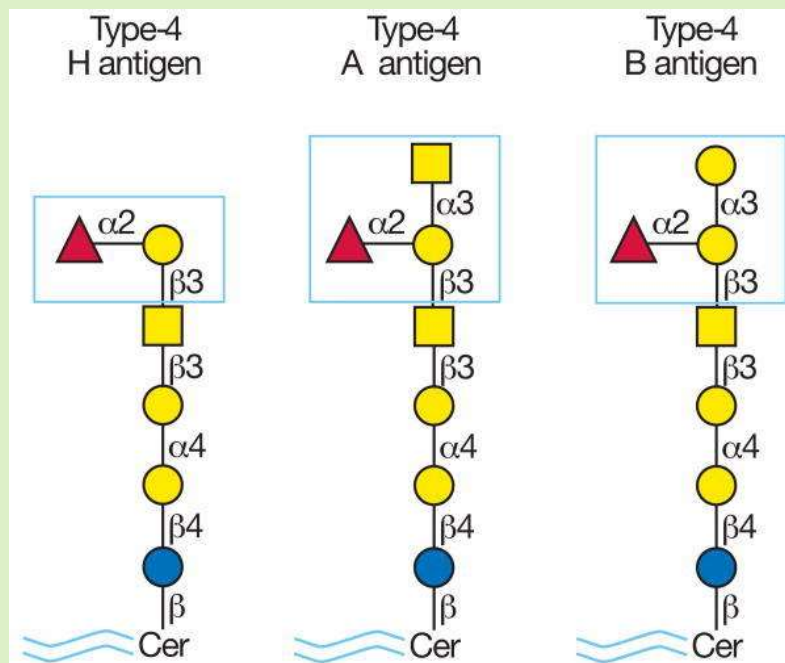


Далее представлены несколько примеров таких терминаций:

Поли-N-ацетил-лактозамин, который присутствует как в N- и O-гликанах, так и в гликолипидах.

**Антигены H, A и B (тип 4), являющиеся детерминантами групп крови H (0), A и B**

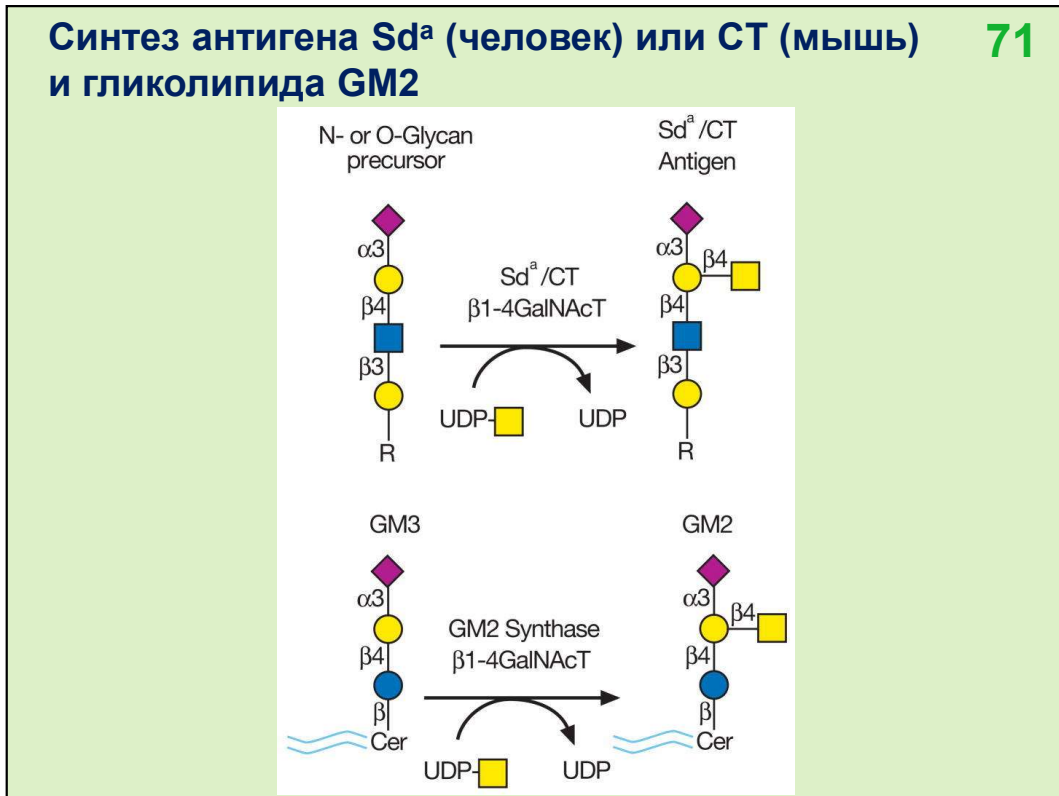
70



Эти углеводные цепочки очень похожи, но даже небольшие различия терминальных остатков обуславливают функциональные различия. Как например, в антигенах H, A и B (тип 4), являющихся детерминантами групп крови H (0), A и B, экспрессирующихся на гликолипидах.

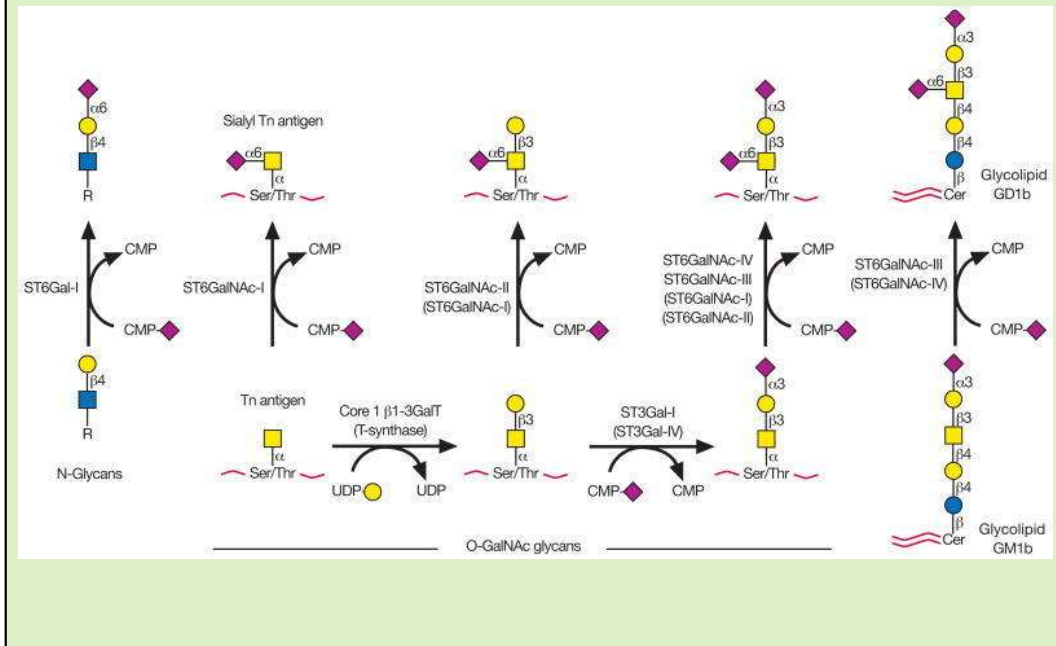
**Синтез антигена Sd<sup>a</sup> (человек) или CT (мышь) и гликолипида GM2**

**71**



Синтез антигена Sda (человек) или CT (мышь) и гликолипида GM2. Сходства и различия. Терминации совпадают, а коры различаются.

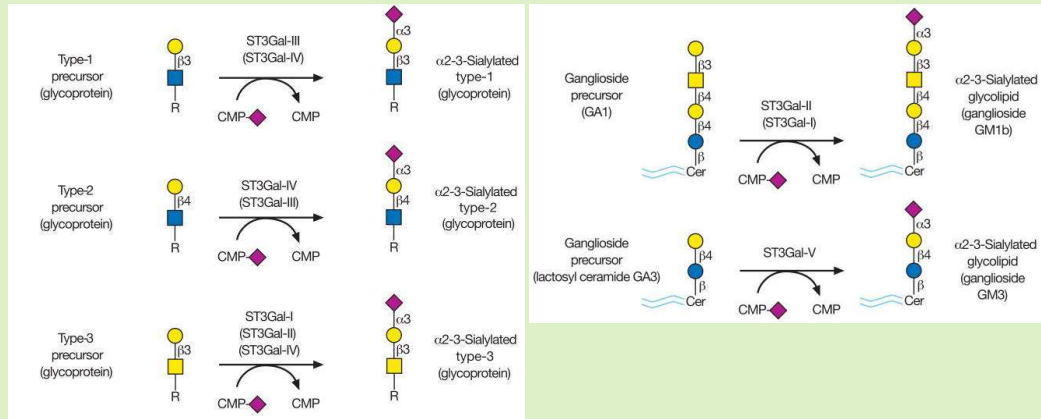
## Синтез цепей ГП и ГЛ, содержащих $\alpha$ 2–6-связанную сиаловую кислоту (Neu5Ac)



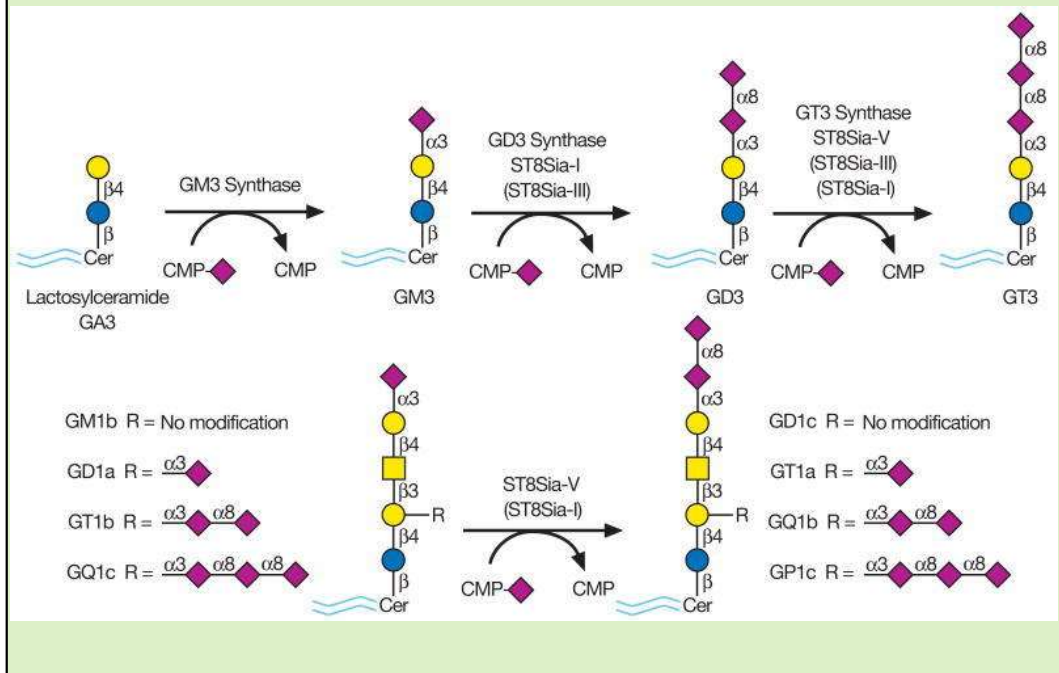
В синтезе гликолипидов, содержащих [альфа]2-6-связанную сиаловую кислоту, участвуют ферменты сиалилтрансферазы.

## Синтез цепей ГП и ГЛ, содержащих $\alpha$ 2-3-связанную сиаловую кислоту (Neu5Ac)

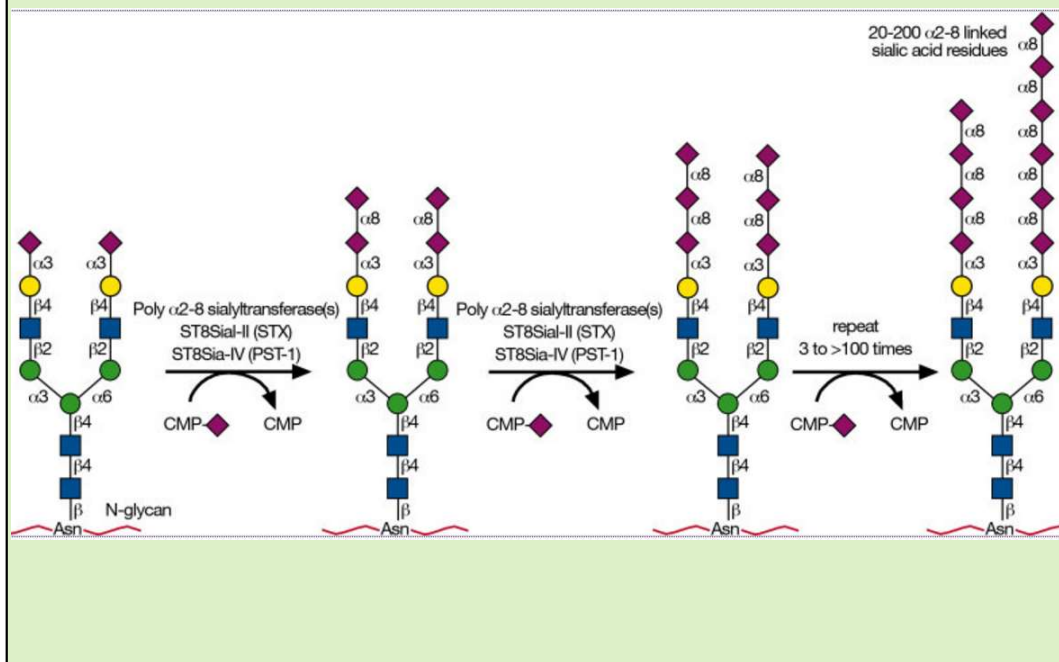
73



В синтезе гликопротеинов и гликолипидов, содержащих [альфа]2-3-связанную сиаловую кислоту, участвуют другие сиалилтрансферазы.



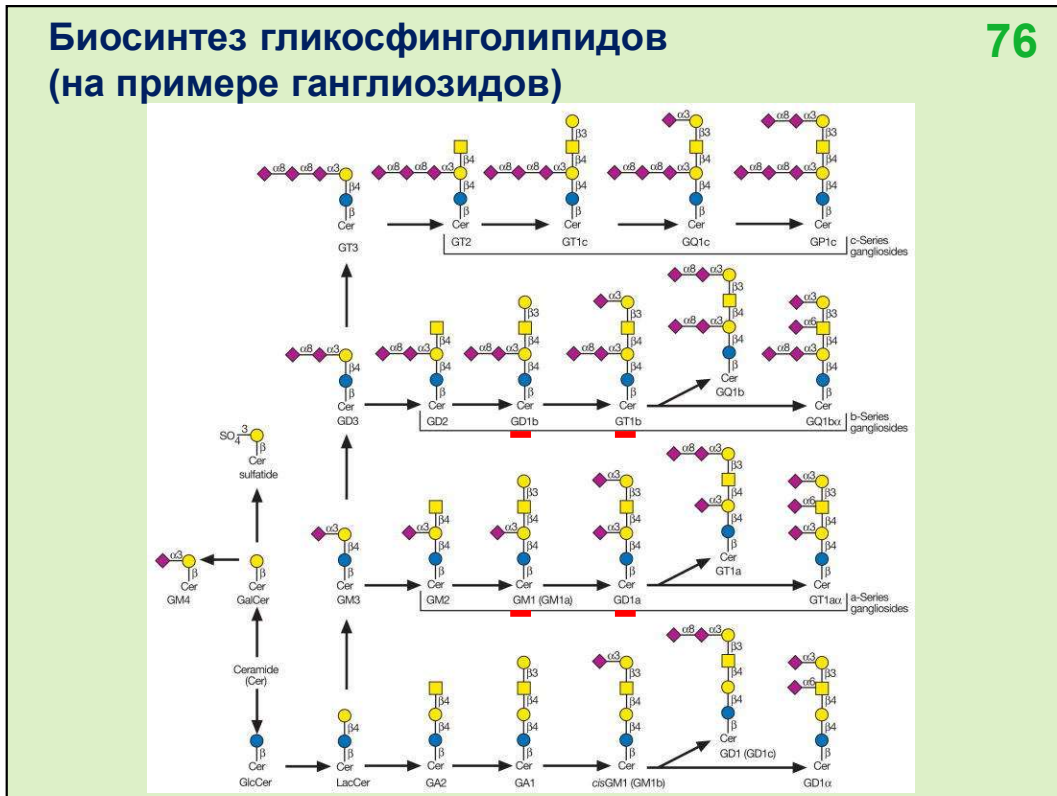
На гликолипидах синтезируется олигосиаловая кислота. Она довольно коротка.



В результате работы полисиалилтрансферазы на N-гликанах гликопротеинов синтезируется полисиалиловая кислота. Обычно это длинный полимер.

## Биосинтез гликофинголипидов (на примере ганглиозидов)

76



Гликофинголипиды синтезируются путем поэтапного добавления углеводных остатков к церамиду, а затем в растущий гликан. Затем к остатку галактозы в третье положение присоединяется остаток сиаловой кислоты., который может быть затем сиалилирован в 8 положение.

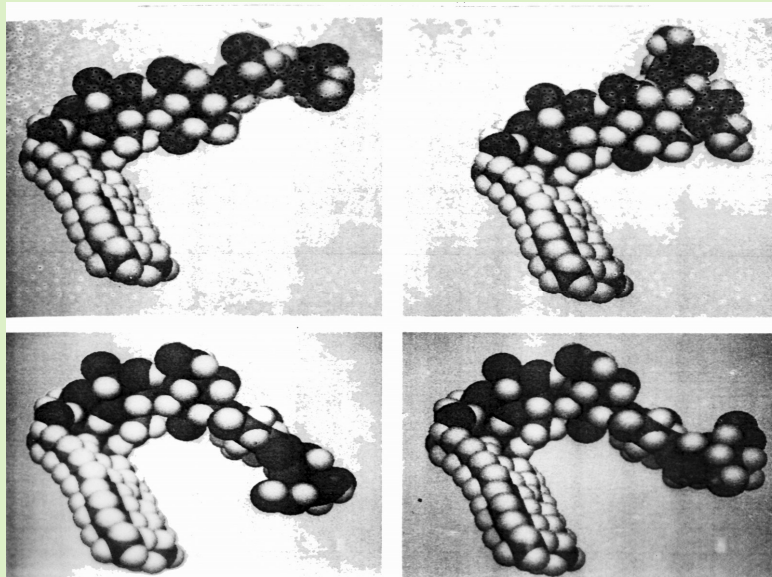


## Модели четырех коровых фрагментов ГСЛ

77

Gg (ганглио)

Gb (глобо)

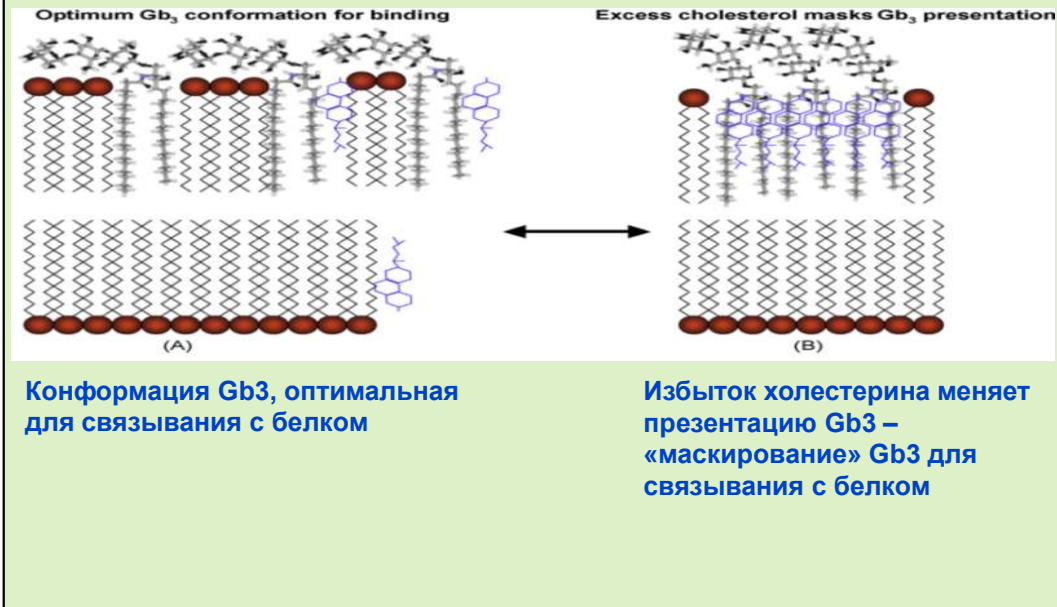


Lc (лакто)

nLc (неолакто)

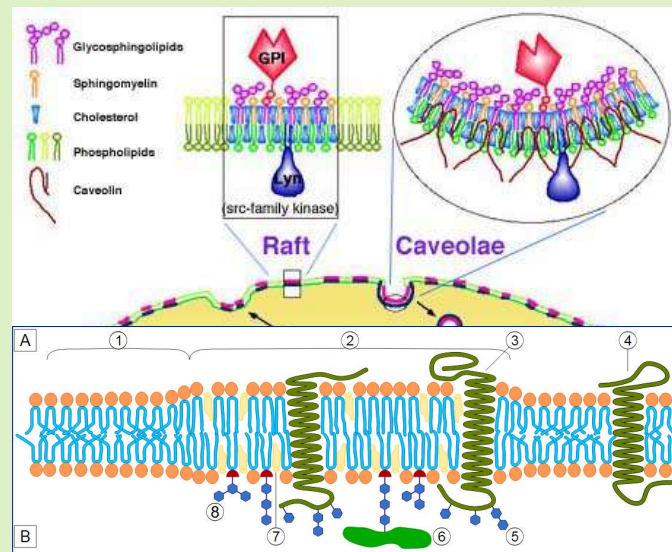
Пространственное расположение атомов, входящих в остатки сахаров, образующих углеводный фрагмент гликофинголипидов, определяет различие в пространственном расположении четырех коровых фрагментов гликолипидов и, как следствие, их функции.

## Холестерин как триггер взаимодействия Gb3 с Gb3-связывающими белками 78



Повышение доли холестерина в мембране изменяет структуру мембраны, в результате чего изменяется презентация углеводных компонентов ганглиозидов, которые хуже распознаются белками-адгезинами. Говорят, что происходит маскирование углеводных цепей гликолипидов.

**Гликофинголипиды организованы на мембране 79  
в кластеры (микродомены): липидные рафты  
(плоские) и кавеолы (вогнутые)**

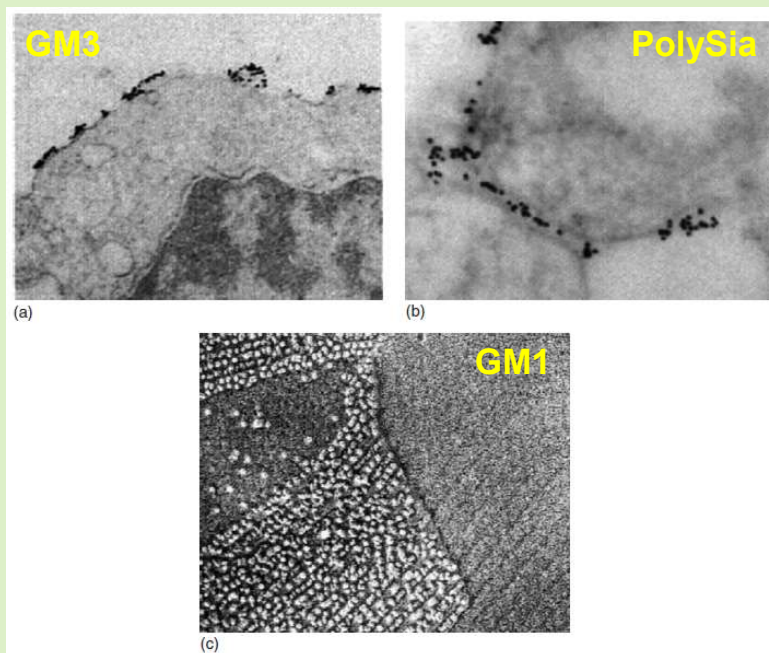


Detergent-Resistant Membranes (DRMs)  
Detergent-Insoluble Glycolipid-Enriched complexes (GEMs, DIGs)

Расположение гликофинголипидов в мембране неслучайно. Гликофинголипиды группируются в кластеры (микродомены), которые могут быть плоскими (рафты) или вогнутыми (кавеолы).

## Гликофинголипиды на поверхности мембраны организованы в кластеры

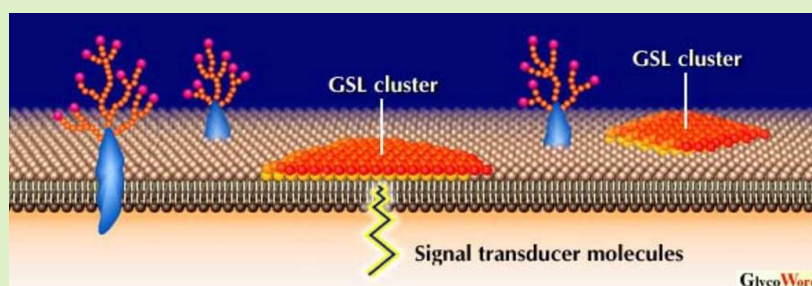
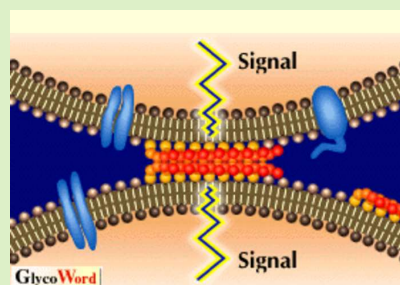
80



Электронные микрофотографии показывают образование кластеров из гликофинголипидов и их расположение на поверхности мембраны.

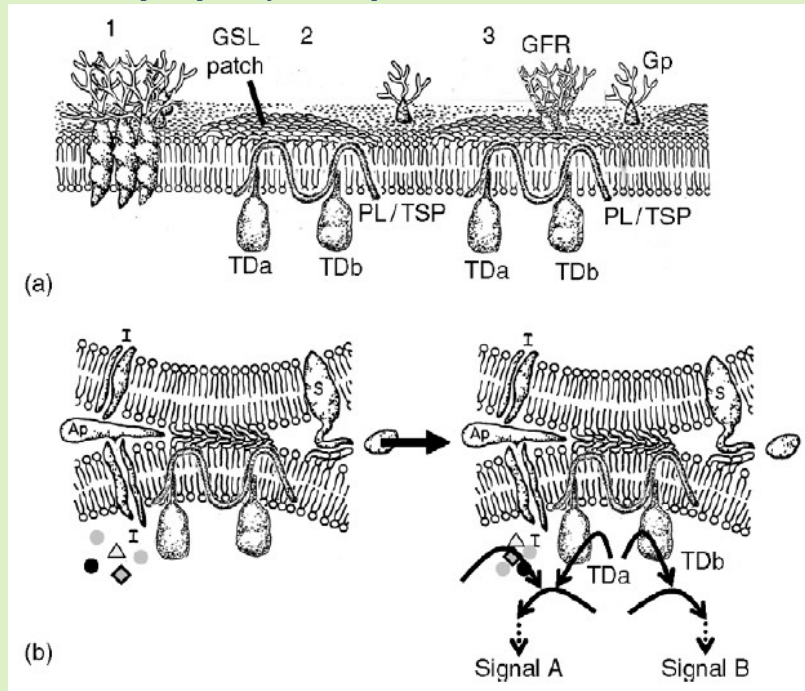
## Кластеры ГСЛ взаимодействуют и передают сигналы

81



Эти кластеры выполняют сигнальную функцию.

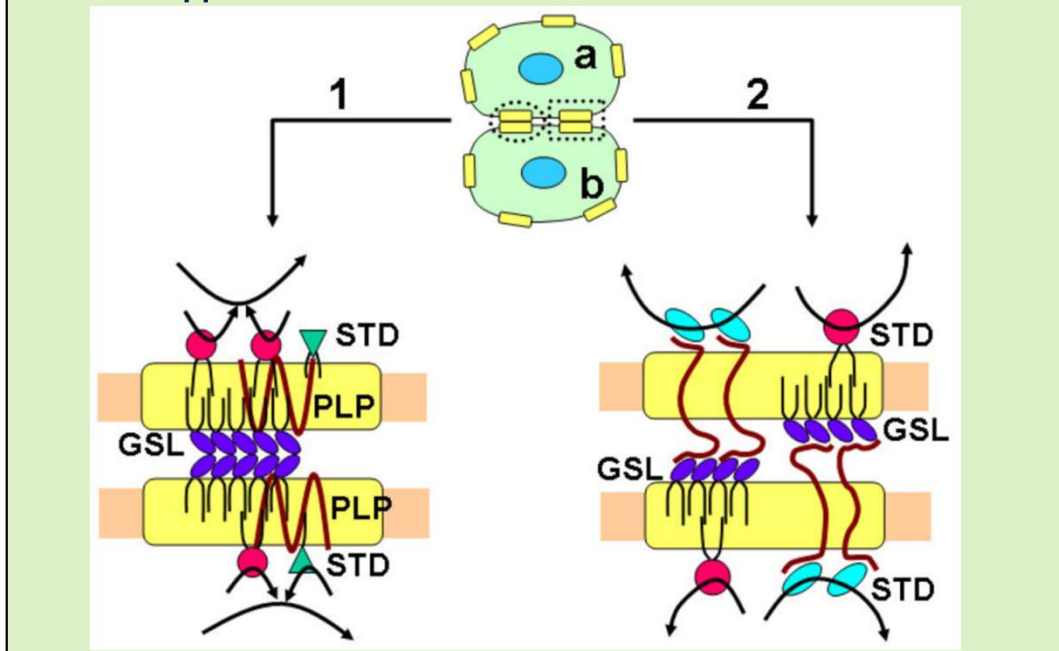
## Гликоинапс: участие микродоменов мембраны (липидные рафты) в передаче сигнала 82



Сигнал между клетками передается по гликоинапсу, в который объединяются липидные рафты на разных клетках.

**Передача сигнала в гликосинапсе:  
углевод-белковые и углевод-углеводные  
взаимодействия**

83



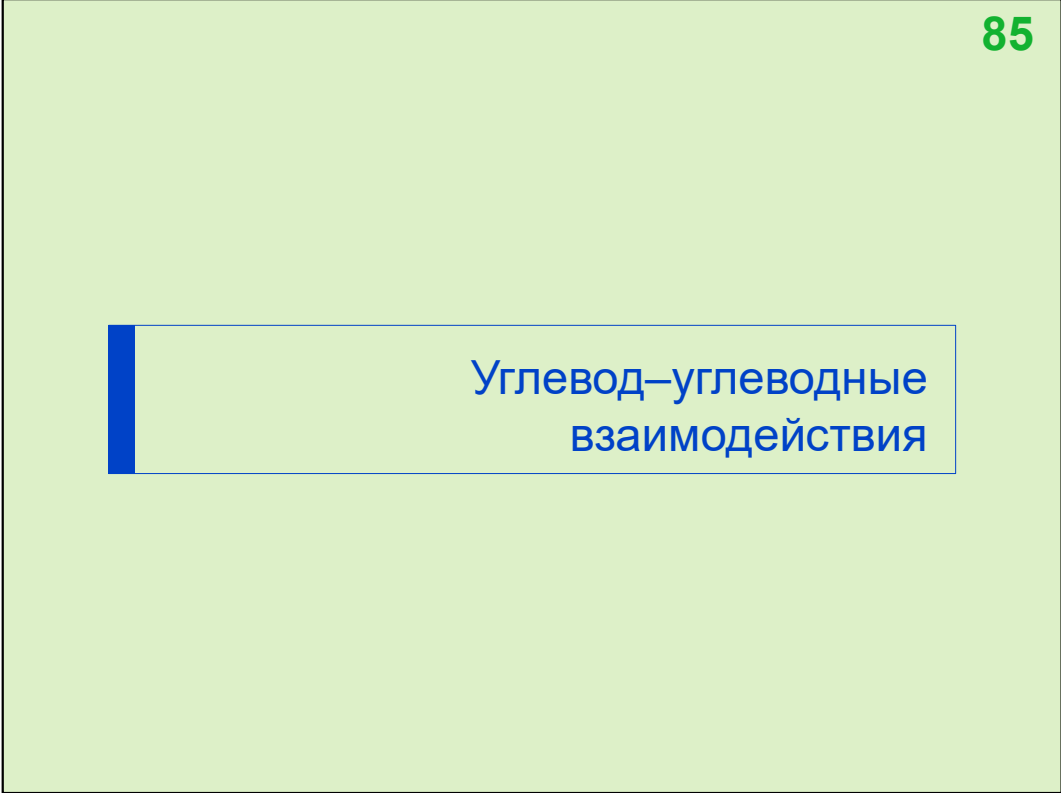
Гликофинголипиды гликосинапса участвуют в клеточной адгезии благодаря углевод-белковым или углевод-углеводным взаимодействиям.

### Некоторые функции гликоинапсов

- ▶ Cell Activation via Lactosyl Ceramide
- ▶ Ganglioside Regulation of Axonal Growth
- ▶ Ganglioside Modification of Cell Membrane Receptor Function
  - ▶ (a) NGF
  - ▶ (b) EGF
  - ▶ (c) Insulin Signaling

Гликоинапсы участвуют в активации клеток, регуляции роста аксонов и рецепторной активности факторов роста клеток и гормонов.





Углевод–углеводные  
взаимодействия

Сейчас мы рассмотрим углевод-углеводные взаимодействия.

## Адгезия клеток, опосредованная различными взаимодействиями

86

|                                     | Белок – белок   | Углевод– белок   | Углевод– углевод  |
|-------------------------------------|---|--|---|
|                                     | <i>PPI (protein-to-protein interaction)</i>   | <i>CPI (hydr-to-protein interaction)</i>   | <i>CCI (hydr-to-hydr interaction)</i>   |
| Examples                            | Integrin<br>$\alpha 3\beta 1$ to LN5<br>$\alpha 5\beta 1$ to FN<br>$\alpha L\beta 2$ to ICAM-1<br>or ICAM-2 | SLe <sup>x</sup> to E-selectin<br>SLe <sup>a</sup> to E-selectin<br>Sialoglycan to siglec<br><br>Galectin to Gal | Sponge oligosaccharide<br>(see Section 3.34.2.2)<br>Le <sup>x</sup> to Le <sup>x</sup><br>Gb4 to Gb5 or nLc <sub>4</sub><br>GM3 to Gg3 or LacCer<br>Le <sup>y</sup> to H<br>GalCer to sulfate |
| Multivalency of epitope             |   |  | Yes; essential for all cases  |
| Ca <sup>2+</sup> requirement        | Yes, for many cases of PPI, e.g., integrin, cadherin  | Yes, for selectin<br>No, for galectin  | Yes, for essentially all types of CCI   |
| Rapidity                            | Slow  | Fast   | Very fast   |
| Affinity ( $K_a$ in M)              | $\sim 10^{-8}$ – $10^{-9}$  | $\sim 10^{-8}$   | Varies; $\sim 10^{-5}$ to $10^{-8}$   |
| Variability                         | Low   | Low  | Very high; depends on degree of clustering and orientation of epitopes  |
| Repulsion                           | Yes <sup>69</sup>   | Not found  | Yes   |
| Cooperativity or synergism with PPI |   | Not known  | Yes, some cases of CCI are synergistic with integrin-mediated adhesion <sup>70</sup>  |
| Orientation of carbohydrate epitope | Unclear   | Unclear  | Yes, for Le <sup>x</sup> -to-Le <sup>x</sup> <sup>60</sup>  |

В этой таблице представлены разные типы взаимодействий между разными классами гликополимеров (белок-белковые, углевод-белковые и углевод-углеводные) при адгезии клеток. Считается, что первый этап адгезии клеток – это слабые (но очень быстрые) углевод-углеводные взаимодействия, далее реализуются более прочные (но не столь быстрые) углевод-белковые взаимодействия, и уже только после этого в игру могут вступать (самые медленные) белок-белковые взаимодействия, которые имеют максимальную аффинность.

Важно отметить, что углевод-углеводные взаимодействия реализуются ТОЛЬКО в присутствии ионов кальция. В случае углевод-белковых или белок-белковых взаимодействий такая зависимость от присутствия ионов кальция наблюдается не для всех систем.

## Углевод-углеводные взаимодействия (обзор)

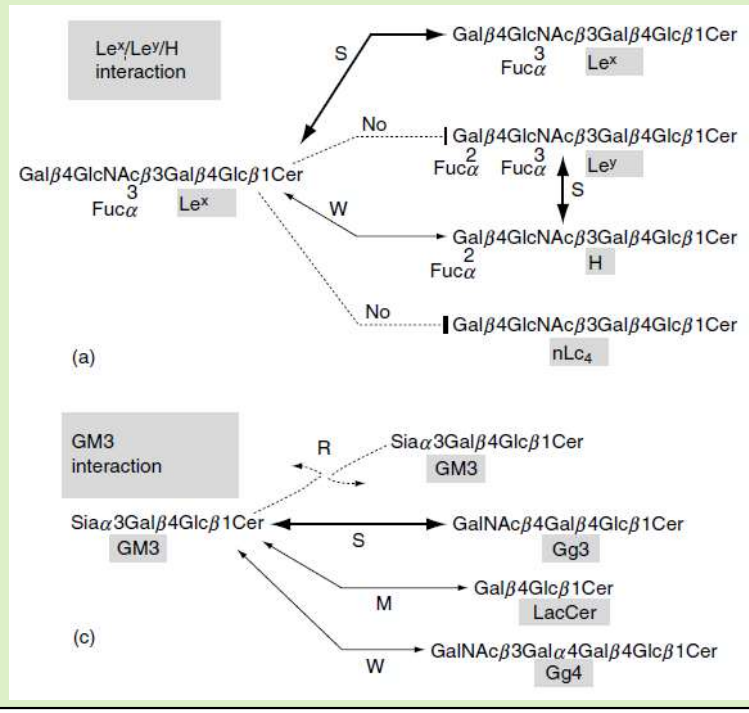
87



Возможные углевод-углеводные взаимодействия между гликофинголипидами в составе липосом.

S, M, W и R обозначают сильные (strong), умеренные (moderate), слабые (weak) и отталкивающие (repulsive) взаимодействия.

Линии серого цвета указывают на отсутствие взаимодействия.

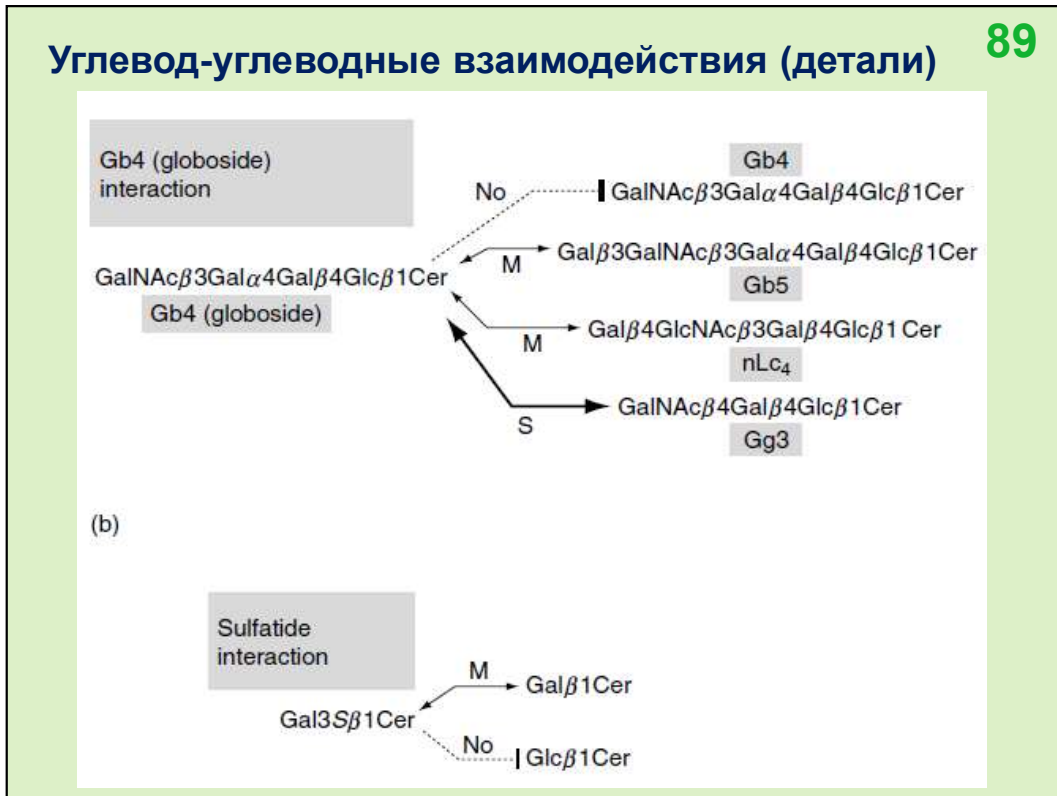


Различные структуры гликофинголипидов обуславливают сильные (S), средние (M), слабые (W), или отгалкивающие (R) взаимодействия. Или отсутствие взаимодействий.

Здесь приведены примеры.

## Угледод-угледодные взаимодействия (детали)

89



Различные структуры гликофинголипидов обуславливают сильные (S), средние (M), слабые (W), или отталкивающие (R) взаимодействия. Или отсутствие взаимодействий.

Здесь приведены примеры.

## Эпитоп Le<sup>x</sup> в эмбриогенезе: компактизация

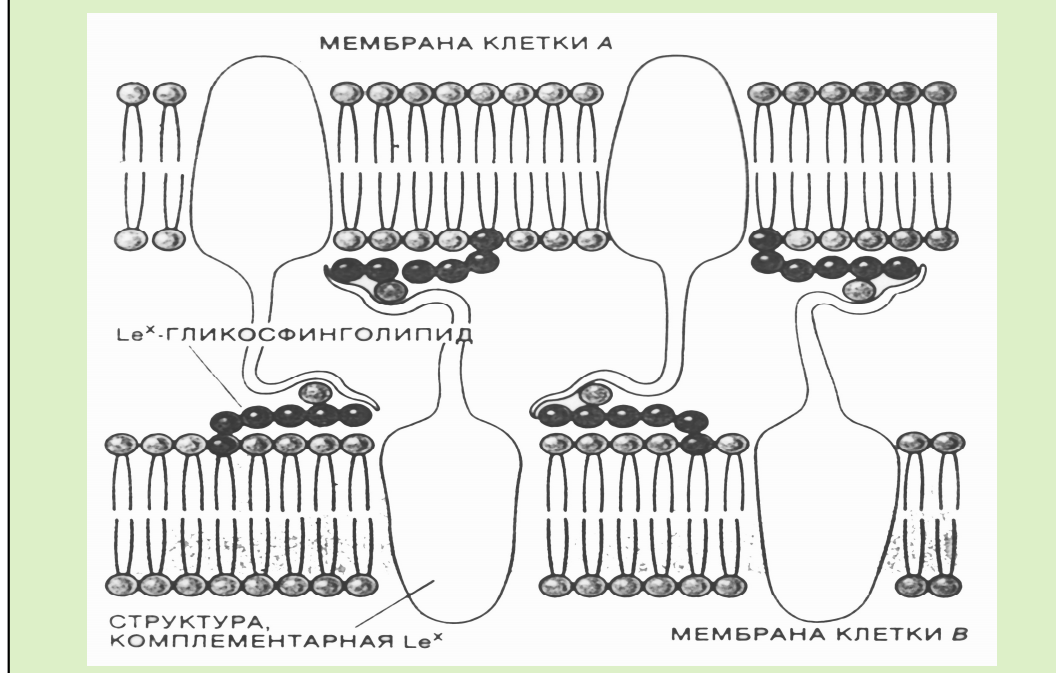
90



Угледод-угледодные взаимодействия очень подробно изучали на примере вот такого трисахарида (LeX), который может быть частью более крупных структур. В ходе эмбриогенеза перед стадией компактизации происходит слипание клеток, которые гиперэкспрессируют LeX, который индуцирует адгезию клеток друг к другу. Добавление к клеткам гликоконъюгатов с эпитопом LeX (слева внизу, красный цвет) конкурентно ингибирует адгезию и последующую компактизацию (фото 1 слева). Добавление к клеткам гликоконъюгатов с эпитопом LeA (справа внизу, синий цвет), который является изомером LeX, не оказывает воздействия на клетки (фото 2 в центре), которые не отличаются от контроля (фото 3 справа). На графиках справа хорошо виден ингибирующий эффект LeX, который приводит к декомпактизации эмбриона. Показаны зависимости от концентрации и времени. Действие LeA не отличается от контроля.

## Гипотеза об узнавании $Le^x$ специфическими белками второй клетки не подтверждается

91



Было показано, что узнавание  $Le^x$  не связано с углевод-белковыми взаимодействиями.

## Агрегация углеводных Au-наночастиц: трисахарид Le<sup>x</sup> (слева), роль аномерной конфигурации (справа) 92



На этом слайде показано использование углевод-содержащих наночастиц золота для изучения углевод-углеводных взаимодействий. Уже не живые системы, а модели.

Здесь два примера.

Слева знакомый нам трисахарид Le<sup>x</sup>. Этот трисахарид присоединили через спейсер к золотым наночастицам, за которыми очень удобно наблюдать в электронный микроскоп. Получили НЕО-глико-конъюгат.

В качестве контроля использовали аналогичный конъюгат с дисахаридом лактозой, никак не проявляющей себя в углевод-углеводных взаимодействиях.

Напомню что углевод-углеводные взаимодействия реализуются ТОЛЬКО в присутствии ионов кальция.

На фото слева (фото 1) показана агрегация конъюгата трисахарид Le<sup>x</sup> в присутствии ионов кальция.

На фото ниже (фото 2) – та же система, к которой добавили ЭДТА, что привело к комплексации кальция с ЭДТА. Агрегация отсутствует.

На самом нижнем фото (фото 3) показан контроль. Это - система с конъюгатом дисахарид лактозы в присутствии ионов кальция. Агрегация отсутствует.



Справа показана другая система, моделирующая агрегацию клеток морских губок, которая опосредована взаимодействием дисахарида 1a.

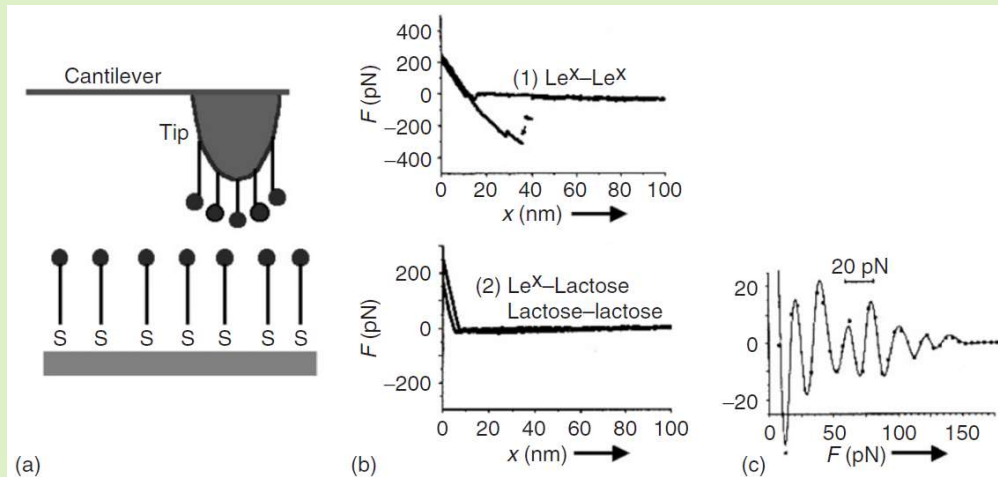
Этот пример иллюстрирует влияние аномальной конфигурации центра, через который углеводный эпитоп присоединен к золотой наночастице. Фактически (несколько упрощая ситуацию), это пример влияния презентации одного и того же сахара на углевод-углеводное взаимодействие.

Фото слева вверху (Фото А) – конъюгат Au-1a в воде. Агрегация отсутствует.

Фото ниже (Фото С) – конъюгат Au-1a в присутствии ионов кальция. Агрегация хороша видна.

Фото справа вверху (Фото В) – конъюгат Au-1b со стереоизомерным дисахаридом 1b в воде. Агрегация отсутствует.

Фото справа снизу (Фото В) – конъюгат Au-1b со стереоизомерным дисахаридом 1b в присутствии ионов кальция. Агрегация почти отсутствует.



Для количественной оценки силы углевод-углеводных взаимодействий с участием трисахарида LeX была использована атомно-силовая микроскопия (АСМ).

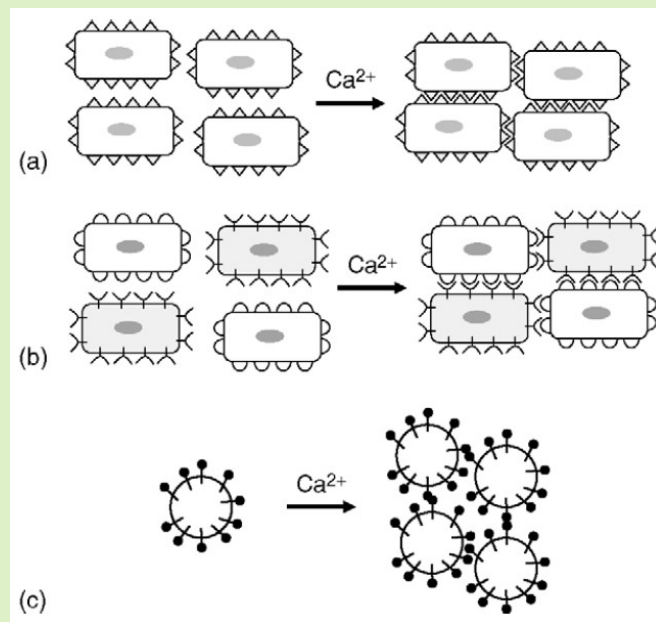
Трисахарид LeX иммобилизовали как на поверхности золотой пластинки, так и на кончике кантилевера, используемого в АСМ.

В качестве контроля использовали иммобилизованный аналогичным образом дисахарид лактозу.

При «отрывании» кантилевера от золотой пластинки регистрировали возникающее усилие. В случае трисахарида LeX (но не в случае лактозы) происходит скачкообразный отрыв, что указывает на притяжение, т.е. углевод-углеводное взаимодействие. Из периода автокорреляционной функции движения кантилевера при «отрыве» можно оценить силу углевод-углеводных взаимодействий с участием трисахарида LeX, которая составила 20 пикоНьютонов в расчете на одно взаимодействие.

## Углевод-углеводные взаимодействия: гомо и гетеро

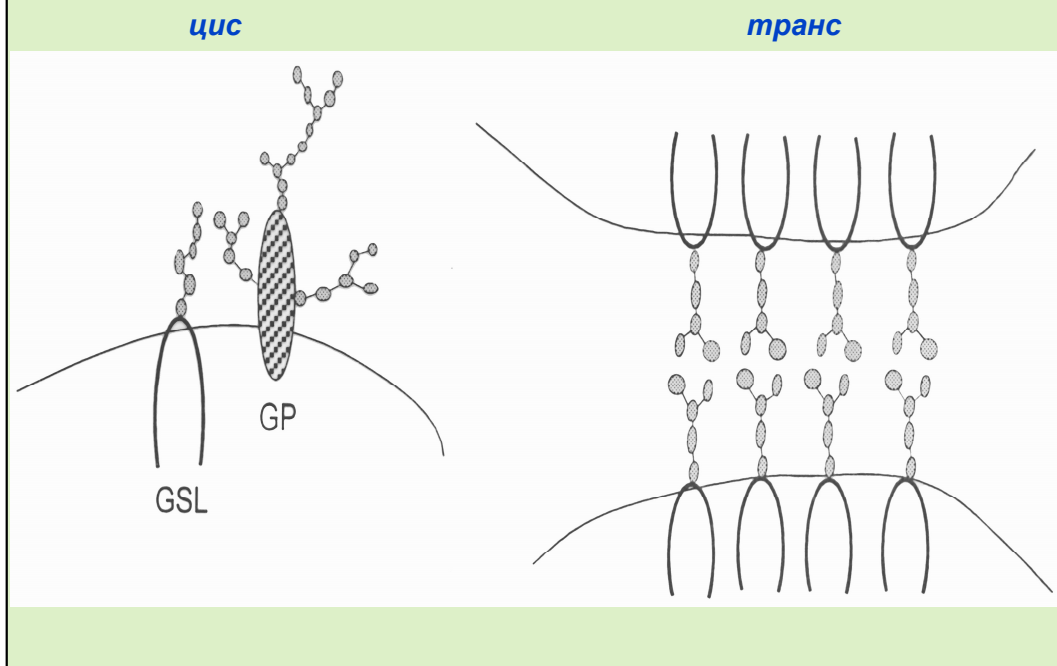
94



Различают гомо- и гетеро-типические углевод-углеводных взаимодействия., т.е. взаимодействие между клетками, экспрессирующими **ОДИНАКОВЫЕ** или **РАЗНЫЕ** углеводные структуры на поверхностях **РАЗНЫХ** клеток. Это две верхних картинке (a и b). На нижней картинке показаны модели, используемые для изучения таких взаимодействий. Мы сегодня их уже видели.

Углевод-углеводные взаимодействия:  
цис и транс

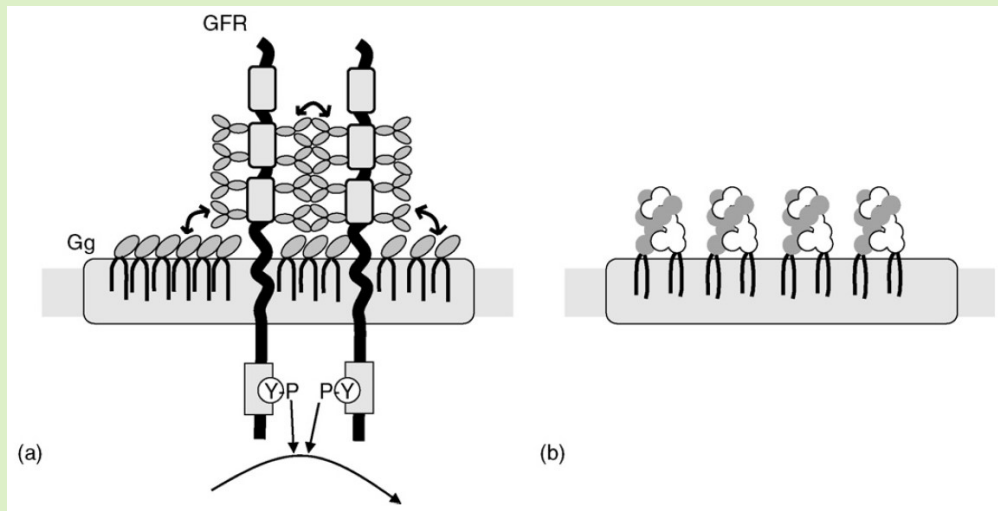
95



Различают цис- и транс-углевод-углеводные взаимодействия., т.е. взаимодействия между клетками, экспрессирующими углеводные структуры на поверхностях **ОДНОЙ** и той же или на поверхностях **РАЗНЫХ** клеток.

## Углевод-углеводные взаимодействия: цис

96



**EGFR + GM3**  
Как GM3<sup>exo</sup>, так и GM3<sup>endo</sup> ингибируют автофосфорилирование рецептора (тирозин-киназа)  
EGFR = epidermal growth factor receptor

**GD1a + GD1b**  
Комплекс GD1a + GD1b имеет иные антигенные свойства, чем GD1a или GD1b

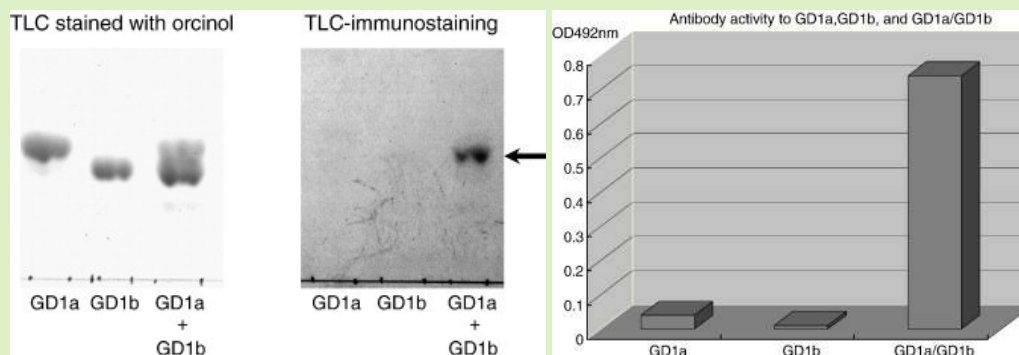
Пример цис-углевод-углеводных взаимодействий.

Слева показано, как взаимодействие гликановой части ганглиозида GM3 с N-связанным гликаном, присутствующим на рецепторе фактора роста, происходящее в микродоменах клеточной мембраны, приводит к ингибированию автофосфорилирования рецептора ассоциированной с рецептором тирозин-киназой. Это приводит к изменению передачи сигнала.

Справа показано, как взаимодействие между ганглиозидами GD1a и GD1b, происходящее в микродоменах клеточной мембраны, приводит к образованию комплекса (GD1a + GD1b), который имеет иные антигенные свойства, чем GD1a или GD1b по отдельности.

## Гликолипиды формируют устойчивые комплексы: GD1a + GD1b

97



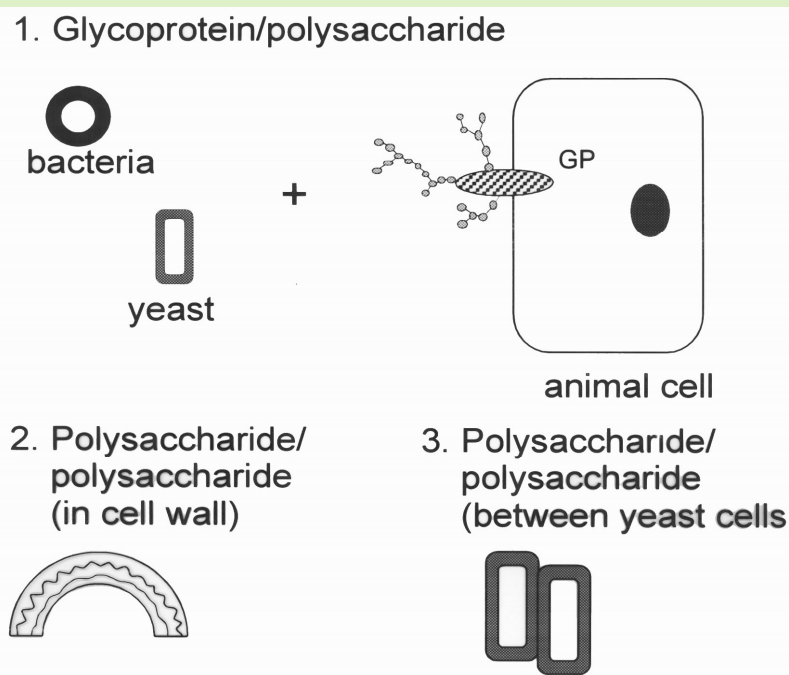
Это хорошо видно на этом слайде.

На пластинке ТСХ, которая проявлена орцином (реагент на углеводы), видны пятна отдельных ганглиозидов GD1a и GD1b и их комплекса (GD1a + GD1b) (который выглядит вроде бы как два пятна с разной интенсивностью). В то же время, если ту же пластинку ТСХ проявить с помощью антител, специфичных к комплексу, то видно ровно одно пятно комплекса. Его компоненты не проявляются антителом. Если провести аналогичное взаимодействие в формате иммуно-ферментного анализа, то хорошо видно, что отдельные ганглиозиды GD1a и GD1b на порядки хуже распознаются специфическим антителом, чем их комплекс (GD1a + GD1b).

Эту ситуацию можно уподобить различиям между отдельно стоящими деревьями и деревьями в лесу, который представляет собой уже новую систему, с новыми свойствами. Лес – это не набор деревьев, а что-то новое.

## Углеввод-углевводные взаимодействия с участием полисахаридов

98



Полисахаридные цепи на поверхности бактериальных клеток и дрожжей могут взаимодействовать с углеводными компонентами гликопротеинов и гликолипидах животных клеток, что приводит к инфицированию.

## Углевод-углеводные и углевод-белковые взаимодействия

99

- ▶ слабые (на моновалентном уровне)
- ▶ мультивалентные
- ▶ часто динамические, первичные в ступенчатом процессе

Таким образом, углевод-углеводные и углевод-белковые взаимодействия довольно слабые и динамические, характеризуются мультивалентной природой благодаря разнообразию углеводных остатков в гликоцепях, что обеспечивает эффективное взаимодействие и на первичном этапе связывания клеток эти взаимодействия оказываются очень важными.



Конец лекции 4