



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 16 * № 1 * 1990

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 547.962'458:543.63

© 1990 г.

КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ ГЛИКОКОНЪЮГАТОВ

Липкинд Г. М.

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР,
Москва

Обзор посвящен конформационному анализу углеводных цепей гликоконъюгатов — гликопротеинов и гликолипидов на основе экспериментальных данных (ЯМР, рентгеноструктурный анализ) и данных теоретического конформационного анализа. Рассмотрено пространственное строение О-гликозидных цепей, выделенных из группоспецифических гликопротеинов, N-гликозидных цепей различных типов (комплексного, бисектного и т. д.) и углеводных цепей гликосфинголипидов.

Гликоконъюгаты, к которым относятся гликопротеины и гликолипиды, представляют собой один из важнейших классов биополимеров. Биологические свойства гликоконъюгатов во многом определяются их углеводными цепями. Эти цепи присутствуют на поверхности клеток, участвуют в межклеточных взаимодействиях и взаимодействиях клетки с внешней средой, определяют иммунологическую специфичность организма [1—9].

Поскольку углеводные цепи гликоконъюгатов представляют собой олигосахарида, обзор посвящен исследованию конформаций олигосахаридных цепей.

По типу связи с белком углеводные цепи гликоконъюгатов делятся на О- и N-гликаны.

О-Гликозидные углеводные цепи

Среди О-гликозидных цепей наиболее сложными являются олигосахариды, выделенные из группоспецифических гликопротеинов [10, 11]. Они построены по общему плану (табл. 1). Все цепи включают в себя общее дисахаридное звено Gal β 1-3GalNAc (кор.) *. К кору присоединяются ветви из N-ацетиллактозаминовых звеньев, часто называемые антеннами. Реальные О-гликозидные углеводные цепи (табл. 1, см. [10, 11]) отличаются друг от друга количеством антенн и местом их присоединения к коре. Углеводные цепи могут быть одно-, двух- и трехантенные. В гликопротеине со специфичностью Н на певосстановливающих концах имеются также остатки фукозы.

Рассмотрим пространственную структуру О-гликозидных углеводных цепей [12, 13]. Конформации дисахаридных звеньев задаются углами вращения ϕ и ψ ** вокруг гликозидных связей. На рис. 1а показана низкоэнергетическая конформация дисахарида кора Gal β 1-3GalNAc. Пунктир — это внутримолекулярная водородная связь. В звеньях с типом связи 1-6, например GlcNAc β 1-6Gal (рис. 1б), помимо углов вращения ϕ и ψ следует

* Все моносахаридные остатки — D-ряда, кроме одного остатка L-ряда — фукозы.

** Углы вращения вокруг гликозидных связей ϕ (C1—O) и ψ (O—CX) (CX — атом углерода агликона, X = 2, 3, 4 или 6) равны нулю при *цикло*-ориентации связей во фрагментах H1—C1—O—CX и C1—O—CX—HX соответственно.

Таблица 1

О-Гликозидные углеводные цепи группоспецифических гликопротеинов

№ п. п.	Формула
1	Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc Fuc α 1-2Gal β 1
2	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1 3 6 GalNAc
3	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1 3 6 Gal β 1-3GalNAc
4	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1 3 6 Gal β 1-3GalNAc
5	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1 3 6 Gal β 1-3GalNAc GlcNAc β 1-6 GalNAc
6	GlcNAc α 1-4Gal β 1-4GlcNAc β 1 3 6 Gal β 1-3 GalNAc Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1 3 6 GalNAc Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1 3 6 GalNAc

рассматривать еще один конформационный параметр — угол вращения ω вокруг связи C5—C6. Так как эта связь простая, ω принимает три значения. На рис. 1 показан случай, когда экзоциклическая связь C6—Ob располагается в *транс*-положении к связи C5—O5 и *гош*-положении к связи C5—C4 остатка галактозы, т. е. *tg*-конформер по углу ω .

В конформационных расчетах * О-гликозидных углеводных цепей при минимизации потенциальной энергии в зависимости от углов вращения φ , ψ и ω для всех дисахаридных звеньев были найдены оптимальные конформации [12, 13]. Приведем некоторые из них.

В диантенных октасахаридах (структуры 3 и 4 в табл. 1) кор вместе с β 1-3-связанной ветвью образует стержнеобразную структуру. Это видно на молекулярной модели октасахарида 3 (рис. 2). В звене со связью 1-6 преобладает *tg*-конформер, так как только при *tg*-ориентации подвижной антенны относительно C5—O5 остатка галактозы кора обе антенны оказываются рядом и возможны дополнительные ван-дер-ваальсовы взаимодействия между остатками антени. В этом случае олигосахарид принимает Y-образную форму.

В трехантенных цепях (олигосахарид 6 в табл. 1) особенно важны взаимодействия 1-6-связанных ветвей. Самой низкоэнергетической является структура с конформерами *tg* в звеньях 1—6 (рис. 3). Все три антенны в виде лучей отходят от дисахаридного кора таким образом, что остатки центральной антенны находятся на расстояниях ван-дер-ваальсова взаимодействия с остатками крайних антени, т. е. это компактная структура.

* Принципы конформационного анализа углеводов изложены в монографии [14].

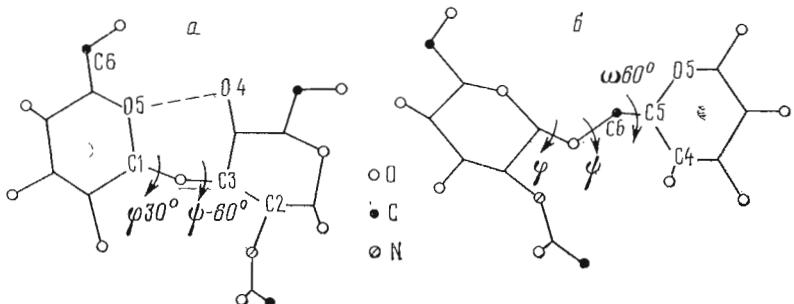


Рис. 1. Молекулярные модели дисахаридов с 1—3-(*a*) и 1—6-связями (*b*) с указанием углов вращения ϕ , ψ и ω . Здесь и далее все моносахариды — природной конформации: галактоза, глюкоза, манноза, N-ацетилглюказамин, N-ацетилгалактозамин — D, фукоза — L

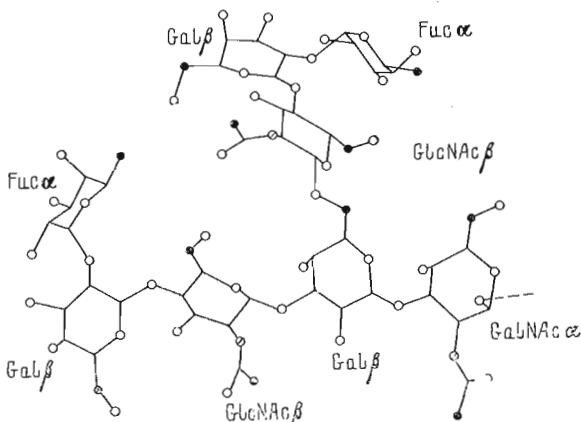


Рис. 2. Молекулярная модель диантенного О-гликана
(структура 3 в табл. 1)

Возможность образования компактных пространственных структур с эффективными углевод-углеводными взаимодействиями — важное свойство углеводных цепей группоспецифических гликопротеинов.

Сами группоспецифические гликопротеины обладают рядом необычных структурных особенностей. Полипептидная цепь таких белков несет очень большое число (несколько сотен) сложных олигосахаридных цепей, так что доля углеводов достигает 80% [2, 15, 16]. Обычно полагают, что групповые вещества — это неупорядоченные образования [1]. Однако, согласно недавно полученным данным акваметрического титрования, рассматриваемые гликопротеины представляют собой вытянутые глобулы, покрытые плотной оболочкой из углеводных цепей [17].

Найденные пространственные структуры О-гликозидных цепей хорошо вписываются в такую модель групповых веществ, поскольку они сами компактны, а их форма допускает плотный стэкинг между собой.

Из теоретического анализа [18] следует, что в столь высокой степени О-гликозилированной полипептидной цепи невозможны традиционные α -спирали и β -структур. Наиболее приемлемый структурный мотив групповых веществ — β -шпилька, представляющая собой два развернутых пептидных тяжа, объединенных в вершине β -изгибом, который осуществляет поворот пептидной цепи на 180° [19].

Характерная особенность гликозилированной β -шпильки состоит в том, что углеводные цепи в ней могут быть направлены только во внешнюю область шпильки [20]. Когда β -шпильки располагаются одна над другой на расстояниях ван-дер-ваальсовых контактов углеводных цепей соседних шпилек, образуется компактная структура гликопротеина с внешней углеводной оболочкой и пептидным каркасом в форме туннеля внутри, т. е. структура, которая находится в согласии с данными акваметричес-

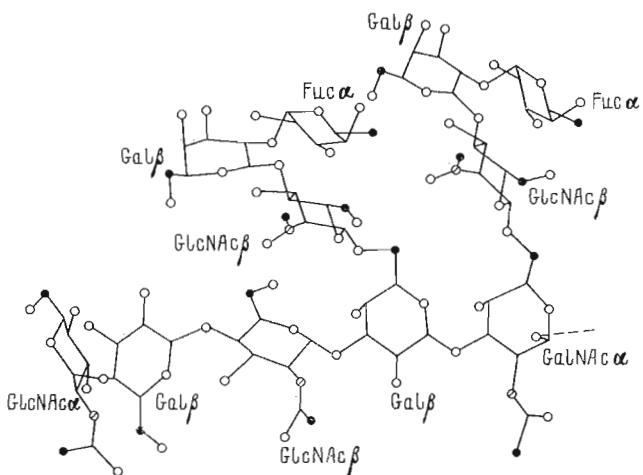


Рис. 3. Молекулярная модель трехантенного О-гликана
(структура б в табл. 1)

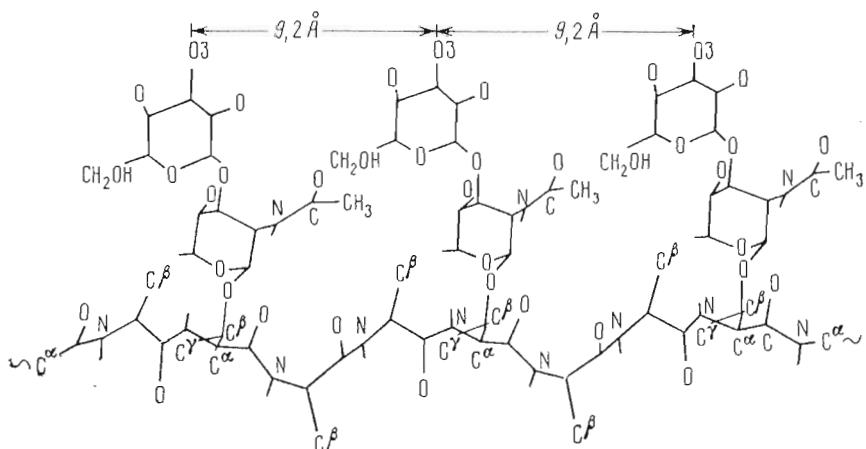
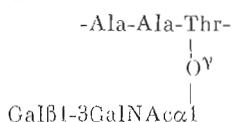


Рис. 4. Молекулярная модель антифризного гликопротеина

кого титрования. Пространственная модель группоспецифических гликопротеинов в виде такого β -баррела рассмотрена в работе [20].

То, что углевод-углеводные взаимодействия в гликопротеинах могут играть первостепенную роль в определении их пространственной структуры, можно показать на примере антифризного гликопротеина:



В его полипептидной цепи каждый третий остаток треонина гликозилирован дисахаридным кором. Этот гликопротеин, выделенный из сыворотки полярных рыб, обеспечивает их выживание в замерзающей воде при -2°C [21, 22].

Без углеводных остатков сама полипептидная цепь может образовать обычную α -спиральную конформацию с эффективными взаимодействиями аминокислотных остатков соседних витков. Однако наличие углеводных цепей обусловливает иную структуру антифризного гликопротеина. На рис. 4 показана конформация, найденная расчетным путем [23]. Она подтверждается данными ядерного магнитного резонанса и кругового диахроизма [24—26]. В этой структуре пептидный остов имеет форму развернутой спирали с осью симметрии 3-го порядка, а так как каждый третий остаток гликозилирован, то все дисахаридные звенья располагаются

Детерминантные олигосахариды (тип 1) в системах групп крови АВН и Le

Группа крови	Формула
H	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc
A	Fuc α 1 2 Gal β 1-3GlcNAc 3 GalNAc α 1
B	Fuc α 1 2 Gal β 1-3GlcNAc 3 Gal α 1
Le ^a	Gal β 1-3GlcNAc 4 Fuc α 1
Le ^b	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc 4 Fuc α 1

по одну сторону от пептидной цепи и взаимодействуют между собой. В итоге доступными для межмолекулярных взаимодействий оказываются только внешние гидроксильные группы остатков галактозы. Далее, гидроксилы в положении 3 соседних остатков находятся друг от друга на расстоянии 9,2 Å. Это расстояние равно удвоенному расстоянию между атомами кислорода в кристаллографической решетке льда вдоль оси *a*. Отсюда следует механизм функционирования антифризного гликопротеина, который сводится к образованию им водородных связей с зародышами кристаллического льда и ингибированию дальнейшего роста таких зародышей [27, 28], что и приводит к понижению температуры замерзания воды. Действительно, химические модификации С3, С4-гидроксилов остатков галактозы полностью инактивируют гликопротеин [29, 30].

Антигенная специфичность групповых веществ крови определяется О-гликозидными углеводными цепями, прежде всего остатками на невосстанавливющих концах (табл. 2). В системе групп крови АВН детерминаント со специфичностью H имеет на конце остаток фукозы, при присоединении к концу еще одного остатка, N-ацетилгалактозамина или галактозы, H-детерминант превращается либо в A-, либо в B-детерминант. В табл. 2 даны также детерминантные олигосахариды в системе группы крови Le.

С помощью теоретических расчетов были найдены пространственные структуры детерминантных олигосахаридов [31—34]. Поскольку концевые остатки углеводных цепей экспонированы во внешнюю водную среду, образование водородных связей не учитывалось. Оказалось, что для каждого детерминантного олигосахарида реальна только одна конформация. Такая структурная жесткость обусловлена нивалентными взаимодействиями остатков, непосредственно не связанных между собой.

Модель структуры детерминаанты H [34] приведена на рис. 5. Концевые остатки фукозы и N-ацетилглюкозамина пространственно сближены, что ограничивает свободу вращения вокруг гликозидных связей каждого звена. То, что этот олигосахарид имеет именно такую конформацию, следует из данных ядерного магнитного резонанса. Так, в этой модели метильная группа остатка фукозы (черный кружок) пространственно сближена с протоном H2 N-ацетилглюкозамина, и это доказано с помощью ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО). Далее, при изменении температуры

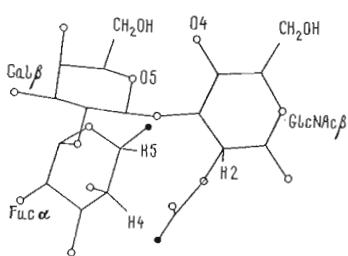


Рис. 5.

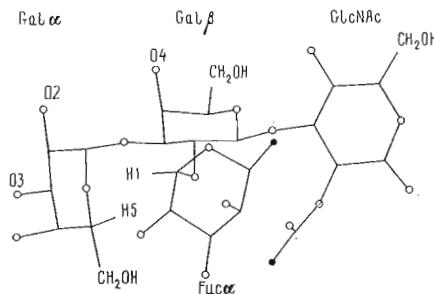


Рис. 6

Рис. 5. Молекулярная модель трисахарида со специфичностью Н (см. табл. 2)

Рис. 6. Молекулярная модель тетрасахарида со специфичностью В (см. табл. 2)

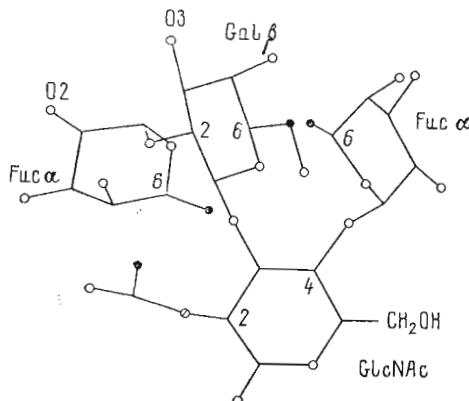


Рис. 7

Рис. 7. Молекулярная модель тетрасахарида со специфичностью Le^b (см. табл. 2)

от 5 до 70° С спектры ЯЭО этого трисахарида не изменяются [35, 36]. Отсюда следует, что его конформация жесткая и она стабилизируется не внутримолекулярными водородными связями, а только невалентными взаимодействиями соседних остатков.

На рис. 6 показана конформация тетрасахарида со специфичностью В [33, 34]. Обратим внимание на расположение детерминантного остатка галактозы. Все отличие между детерминантами А и В сводится только к замещению у атома С2 этого остатка. Вместе с тем ацетамидная группа (в случае N-ацетилгалактозамина) и гидроксил (в случае галактозы) в этом положении находятся на самой периферии молекул, т. е. различия между детерминантами А и В легко идентифицируются соответствующими антителами. Конформация детерминанты В, как и детерминанты А, подтверждается ЯЭО. Так, в этой модели пространственно сближены протон Н5 галактозы и протон Н1 фукозы. При облучении Н5 ЯЭО на протоне Н1 действительно наблюдается [33].

В итоге остается допустить, что конформационная жесткость олигосахаридных детерминант в системах групп крови АВН и Le^- — важный фактор в процессах их взаимодействия с антителами.

Знание пространственных структур углеводных антигенов открывает пути для исследования механизмов и природы связывания таких антигенов с антителами. Канадскими учеными были получены моноклональные антитела к антигенам с разной специфичностью групп крови АВН и Le^- и изучено взаимодействие антител с детерминантными олигосахаридами и их производными [37—43].

В случае детерминанты В (рис. 6) оказалось, что 2-дезокси- и 3-дезоксипроизводные по остатку α -галактозы и 4-дезокси производное по остатку β -галактозы вовсе не связываются анти-В-антителом [42]. Все три гидроксильные группы находятся рядом и на периферии молекулы. Этот кластер из двух полярных гидроксильных групп осуществляет ключевые полярные взаимодействия антигена В с антителом. Однако наряду с полярными в образовании комплекса антиген-антитело важны также гидрофобные взаимодействия. Покажем это на примере детерминантного

тетрасахарида Le^b. На рис. 7 дана его расчетная конформация [32, 34]. Обратим внимание на два детерминантных остатка фукозы, которые с обеих сторон охватывают центральное N-ацетиллактозаминное звено и сближаются своими метильными группами при атомах C5 колец (черные кружки). Замещение этих метилов на протоны понижает сродство к антителу в сотни раз. Более того, замещение рядом расположенной гидроксиметильной группы остатка β -галактозы на метил увеличивает активность тетрасахарида на порядок. Обратим внимание и на метильную группу N-ацетилглюкозамина. Все указанные неполярные группы расположены рядом и образуют гидрофобную поверхность тетрасахарида Le^b, и именно этой своей стороной он участвует в гидрофобном взаимодействии с активным центром антитела [41]. Полярные взаимодействия детерминанты Le^b обеспечивают гидроксил в положении 2 α -2-связанной фукозы и гидроксил в положении 3 остатка галактозы.

Итак, образование комплекса между антителом и углеводным антигеном включает в себя два противоположных по своей природе взаимодействия: полярное и гидрофобное. Полярные взаимодействия определяют узнавание антителом своего антигена, т. е. обеспечивают специфичность связывания. Энергетическая стабильность комплекса обеспечивается, напротив, гидрофобными взаимодействиями.

Углеводные цепи гликосфинголипидов

В мембранах эритроцитов антигены групп крови системы АВН и Le сосредоточены главным образом в углеводных цепях гликосфинголипидов [44–48]. В табл. 3 приведены формулы углеводных цепей гликосфинголипидов с активностью Н и А. Углеводные цепи гликосфинголипидов имеют строение, близкое к углеводным цепям группоспецифических гликопротеинов. Здесь лактозаминные ветви присоединяются связями β 1-3 или β 1-6 также к остатку галактозы. Сами цепи терминируются остатками фукозы и N-ацетилгалактозамина.

Во всех известных гликосфинголипидах углеводные цепи соединены с липидом церамидом через лактозное звено. Однако в гликолипидах

Таблица 3
Углеводные цепи лактосерии гликосфинголипидов со специфичностью Н и А
(Сер — церамид)*

Специфичность	Формула
H	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
H	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1 6 Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
A	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc β 1 2 GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer
A	Fuc α 1 2 GalNAc α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1 6 Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer

* Кор углеводных цепей подчеркнут.

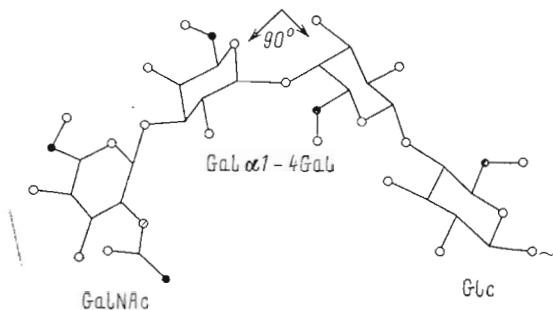


Рис. 8. Молекулярная модель углеводной цепи глобосерии гликофинголипидов

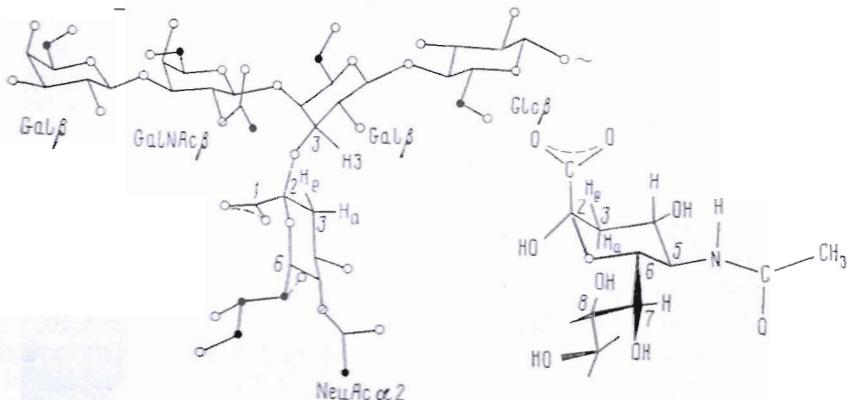


Рис. 9. Молекулярная модель углеводной части ганглиозида GM1 (см. текст). Отдельно показана конформация бокового остатка нейраминовой кислоты

с активностью групп крови АВН общим является больший тетрасахаридный фрагмент (в табл. 3 он подчеркнут). Он включает еще лактозаминное звено. Структуры с таким общим кором составляют лактосерию гликофинголипидов.

Пространственную структуру фрагментов из лактозаминных ветвей, отходящих от остатка β -галактозы, а также структуры детерминантных олигосахаридов мы уже рассмотрели. Что касается структуры тетрасахаридного кора, то он принимает вытянутую прямолинейную форму.

В системе группы крови Р углеводные цепи гликофинголипидов включают в себя остаток галактозы, присоединенный связью $\alpha 1-4$ к концевому лактозному звену, как, например, в антигене Р — гликолипиде глобозиде $\text{GalNAc}\beta-1-3\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1-\text{Cer}$ или в антигене Форссмана:

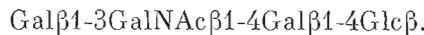


Структуры с тетрасахаридным кором, включающим звеном $\text{Gal}\alpha 1-4\text{Gal}$, образуют вторую глобосерию гликофинголипидов.

Гликофинголипиды глобосерии взаимодействуют с бактериями *E.coli*, т. е. на поверхности клеток они выступают в качестве рецепторов для *E.coli*. Вместе с тем *E.coli* узнают только участок из двух $\alpha 1-4$ -связанных остатков галактозы, так как связывание не зависит ни от длины цепи, ни от положения этого звена [49, 50].

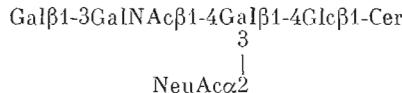
В чем же причина столь избирательного узнавания этого дисахаридного звена? На молекулярной модели олигосахаридной части антигена Р (рис. 8) видно, что в этом звене углеводная цепь делает резкий изгиб на 90° , поэтому оно оказывается обособленным от остальной части молекулы и в наибольшей степени доступным для специфических взаимодействий [51]. В какой-то степени изгибы в линейной углеводной цепи выполняют функцию боковых остатков разветвленных цепей, которые в первую очередь определяют иммунологические свойства олиго- и полисахаридов.

Третий тип гликофинголипидов — ганглиозиды — содержат в своем составе нейраминовые кислоты. Ганглиозидами богаты ткани мозга, из которых они были впервые выделены Кленком в 1936 г. Углеводные цепи ганглиозидов имеют общий кор — тетрасахарид ганглио-N-тетраозу:



Остатки нейраминовой кислоты присоединяются только к остаткам галактозы.

Остановимся на пространственной структуре углеводной цепи моносиалоганглиозида GM1 [52]:

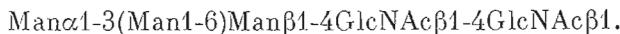


(рис. 9). Основная углеводородная цепь имеет форму стержня. Ориентация бокового остатка нейраминовой кислоты была найдена в эксперименте ЯЭО; при облучении протона Н3 остатка галактозы отклик наблюдался только на аксиальном протоне в положении 3 остатка нейраминовой кислоты, на экваториальном протоне отклика нет. Это может быть только в случае, если карбоксильная группа занимает антиперипланарную ориентацию к остатку галактозы, т. е. угол между связями С1—С2 остатка NeuAc и О-С3 остатка Gal равен 180°. В обычных дисахаридных звеньях угол между связями Н1—С1 и О—С3 близок к нулю. Что касается конформации самой нейраминовой кислоты в составе ганглиозида (она показана отдельно в правой части рис. 9), то она совпадает с конформацией, найденной в рентгеноструктурном анализе свободной кислоты [53]. Карбоксильная группа нейраминовой кислоты находится во внешней сфере молекулы и обеспечивает специфичность связывания ганглиозида.

Для ряда гликофинголипидов, включая липидную часть, проведен рентгеноструктурный анализ [54—56], из которого следуют несколько неожиданные результаты. Две вытянутые неполярные цепи церамида разделены плоскостью пептидной связи, тем не менее они дают плотный стэкинг между собой. Амидный протон этого пептида образует водородную связь с кислородом О1 первого углеводного остатка, в результате вся углеводная цепь оказывается направленной перпендикулярно к липиду и гликофинголипид приобретает форму ковша, т. е. имеет форму буквы L. Поэтому углеводные цепи гликофинголипидов располагаются вдоль поверхности мембранны, перпендикулярно к липидной части, погруженной в саму мембрану [57—59]. Углеводные цепи гликофинголипидов оказываются в какой-то степени прикрытыми углеводными цепями гликопroteинов. Сами мембранные гликопротеины несут как О-, так и N-гликозидные цепи.

N-Гликозидные углеводные цепи

Все N-гликозидные углеводные цепи, несмотря на разнообразие их строения, имеют также общий кор [2—9] — пентасахарид



Своеобразие этого кора — наличие триманнозидного фрагмента. В О-гликозидных цепях остатки маннозы вообще отсутствуют. Антеннами по-прежнему являются N-ацетиллактозаминные звенья (табл. 4). Диантennальная цепь (структура 1 в табл. 4) лежит в основе структуры всех N-гликанов и обнаружена во многих белках.

Прежде всего остановимся на пространственной структуре кора [60]. В его трисахаридном фрагменте из β1-4-связанных остатков возможно образование внутримолекулярных связей О5...О3, таких же, как в целлюлозе, и он имеет форму прямолинейного стержня. Характерная структурная особенность триманнозидного фрагмента состоит в том, что при любых допустимых конформационных состояниях звеньев Manα1-3Man и Manα1-6Man концевые остатки α-D-маннозы оказываются пространст-

Таблица 4

Углеводные цепи N-гликопротеинов (примеры)

венно удаленными друг от друга и не взаимодействуют между собой. В итоге конформация кора напоминает букву Т. Более того, в маннобиозных звеньях невозможно образование каких-либо внутримолекулярных водородных связей. Таким образом, триманнозидный фрагмент, расположенный в центральной части N-гликанов, представляет собой внутренний гибкий шарнир таких цепей.

Такая конформация триманнозидного фрагмента кора приводит к тому, что антенные ветви N-гликанов оказываются направленными в разные стороны и не взаимодействуют между собой [60—73] — резкий контраст к ситуации в O-гликозидных углеводных цепях. В зависимости от конформаций маннобиозных звеньев в одном случае (рис. 10) две антенны N-гликозидной цепи располагаются под прямым углом друг к другу [74]. Тогда остатки кора и (α 1-3)-связанной ветви образуют вытянутый, прямолинейный стержень. Во второй характерной пространственной форме

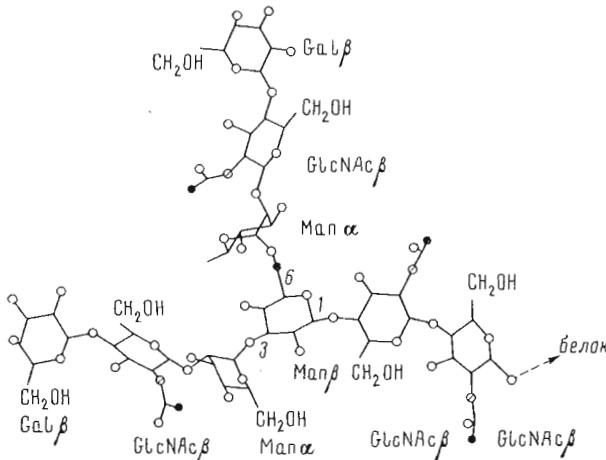


Рис. 10. Молекулярная модель N-гликозидной углеводной цепи (структуря 1 в табл. 4)

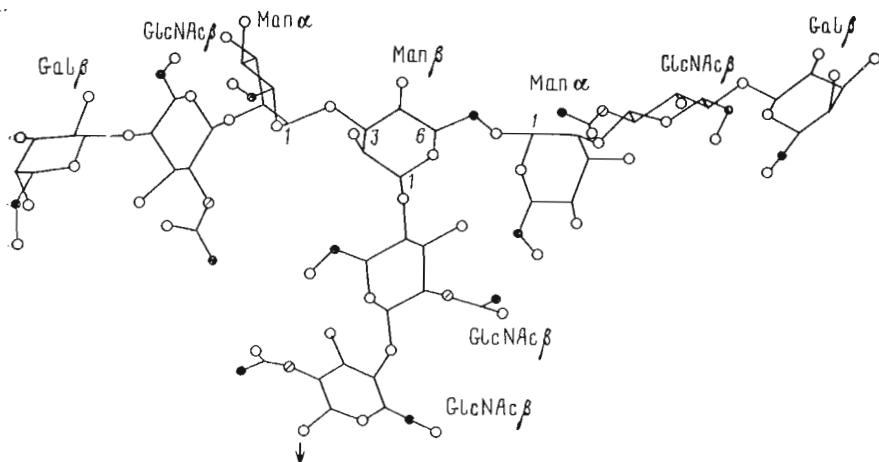


Рис. 11. Молекулярная модель N-гликозидной углеводной цепи (структуря 1 в табл. 4)

N-гликанов (рис. 11) угол между двумя антеннами составляет $\sim 180^\circ$, т. е. обе ветви оказываются на одной прямой, которая перпендикулярна трем остаткам основания кора [74], т. е. молекула принимает форму буквы Т. В литературе ее иногда называют моделью птицы.

Таким образом, для N-гликозидных цепей характерны раскрытые конформации, в которых антенны не взаимодействуют друг с другом. Вместе с тем такие структуры стабилизируются взаимодействиями остатков ветви $\alpha 1\text{-}6$ с остатками основания кора. В этом случае звено со связью $\alpha 1\text{-}6$ имеет gg- или gt-конформацию [74].

В гликопротеинах встречаются и более сложные цепи, как, например, четырехантенная цепь из кислого α -гликопротеина (структуря 2 в табл. 4). Местами разветвления в диантененной цепи являются определенные атомы углерода остатков α -манноз: у остатка $\text{Man}\alpha 1\text{-}6$ замещается гидроксил в положении 6, а у остатка $\text{Man}\alpha 1\text{-}3$ — только гидроксил в положении 4. Действительно, в этом случае дополнительные N-ацетиллактозаминные ветви не вносят каких-либо стерических ограничений в структуру исходной диантененной цепи.

Теперь сопоставим выводы теоретических расчетов с экспериментальными данными. В двух случаях удалось определить пространственную структуру N-гликозидных углеводных цепей непосредственно на поверхности гликопротеинов (иммуноглобулинов) методом рентгеноструктур-

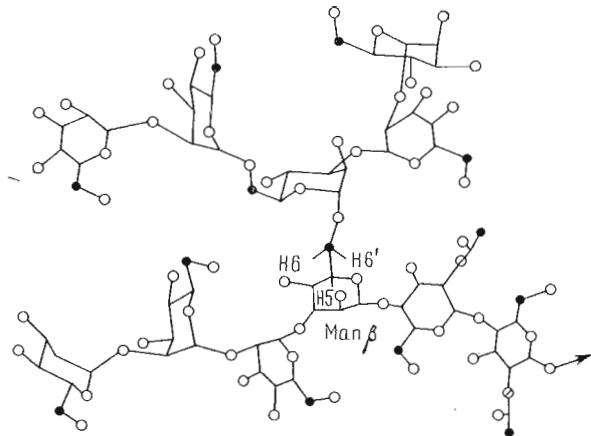


Рис. 12. Молекулярная модель олигоманнозидной углеводной цепи (структура 3 в табл. 4)

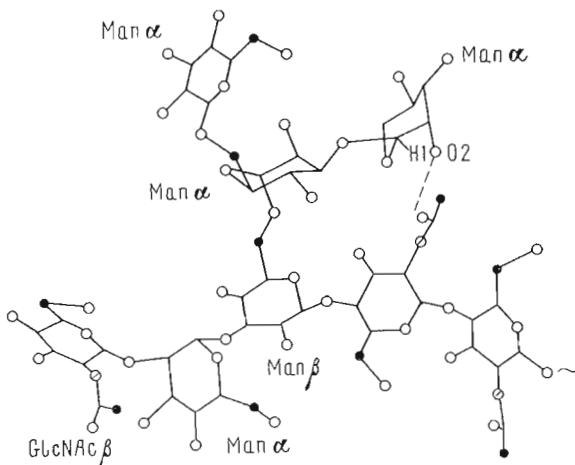


Рис. 13. Молекулярная модель N-гликозидной цепи гибридного типа (структура 4 в табл. 4)

ного анализа [75, 76]. Каждая цепь в Fc-части иммуноглобулинов G гликозилирована N-гликаном. В иммуноглобулине G кролика [76] диантенная цепь имеет форму буквы Г (или птицы) (рис. 11). В случае иммуноглобулина G человека [75] наблюдается другой шейп олигосахаридной цепи, когда ветвь α 1-3 вместе с кором образует один стержень, а ветвь α 1-6 идет перпендикулярно к нему (рис. 10). В двух случаях антены действительно удалены друг от друга. С поверхностью белка сближена ветвь α 1-6, которая прикрывает от внешней среды такие гидрофобные остатки, как пролин, фенилаланин, которые, как ни странно, оказались на поверхности белковой глобулы, т. е. углеводная цепь в какой-то мере выполняет функцию гидрофильной аминокислоты.

Нами были рассмотрены N-гликозидные цепи комплексного типа. Однако в белках представлены N-гликаны также других типов: олигоманнозидного и гибридного.

На начальном этапе биосинтеза N-гликозидных цепей [3, 77] белок гликозилируется олигоманнозидной цепью,ключающей 9 остатков маннозы (структура 3 в табл. 4). Из данных по КССВ между протонами H5 и H6 в замещенных по положению 6 остатках маннозы следует, что оба звена со связями α 1-6 имеют одну и ту же конформацию gg [68]. Отсюда можно заключить, что эта олигоманнозидная цепь принимает уникальную структуру, показанную на рис. 12. Отметим, что нетransформирован-

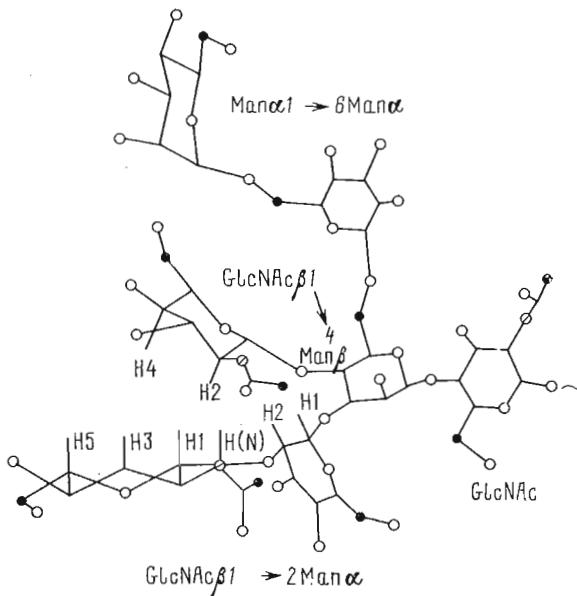


Рис. 14. Молекулярная модель бисектного N-гликана (структура 5 в табл. 4)

ные олигоманнозидные цепи обнаружены и в реальных белках, например в иммуноглобулинах M.

В гибридных N-гликозидных цепях (рис. 13) имеются как лактозаминные, так и маннозные ветви. Конформация показанной гибридной цепи (*gt* в звене α 1-6) доказывается наличием ЯЭО на протоне H1 остатка Man α 1-3 при облучении метильной группы ацетамида N-ацетилглюкозамина кора. Данная гибридная структура является субстратом для целого ряда ферментов, как гликозидаз, так и гликозилтрансфераз, в процессинге N-гликозидных углеводных целей. В образовании самых различных фермент-субстратных комплексов обязательно участвует дисахаридное звено GlcNAc β 1-2Man (в табл. 4 оно подчеркнуто) [77], которое само не подвергается какой-либо химической модификации. Конформация этого N-гликана такова, что это дисахаридное звено свободно от внутримолекулярных контактов и открыто для межмолекулярных взаимодействий, т. е. оно вполне может связываться с ферментом.

Однако, если в этом олигосахариде окажется замещенным по положению 4 центральный остаток β -D-маннозы кора, все его субстратные свойства исчезают. N-Гликозидные цепи с остатком N-ацетилглюкозамина в этом положении называются бисектными (структура 5 в табл. 4). Бисектный N-ацетилглюкозамин заполняет щель между двумя ветвями и располагается в непосредственной близости от остатков упомянутого дисахарида и как бы нависает над ними (рис. 14). Это доказано в эксперименте ЯЭО [64, 65, 78, 79], так как при облучении протона H4 бисектного остатка наблюдаются отклики на атомах H5 и H3 GlcNAc и даже на атоме H2 Man ветви 1—3. Таким образом, бисектный остаток блокирует тот сайт дисахаридного звена GlcNAc β 1-2Man, который необходим для образования фермент-субстратных комплексов. Этот сайт образован практически только атомами водорода (NH, H1, H3, H5, H6 остатка GlcNAc и H2, H1 остатка Man), т. е. он обеспечивает гидрофобное связывание с ферментом.

При обсуждении биологической роли N-гликозидных углеводных цепей следует иметь в виду, что их число в белках невелико (буквально единицы), они отстоят далеко вдоль пептидной цепи и не взаимодействуют между собой. Вместе с тем развернутые структуры N-гликанов с удаленными друг от друга антенными ветвями могут прикрывать значительные участки белковой поверхности и взаимодействовать с ней. В небольших белках, таких, как кислый α -гликопротеин и трансферрин плазмы человека,

оказывается достаточным имеющихся в наличии пяти углеводных цепей, чтобы окружить глобулу белка. Это вытекает из исследований гликопротеинов методом малоуглового рассеяния нейтронов [80]. В итоге такие защищенные белки обладают большей структурной стабильностью, оказываются устойчивыми к действию протеиназ и проявляют пониженную антигennую активность.

Приведенные данные конформационного анализа позволяют сопоставить принципы пространственной организации О- и N-гликозидных цепей [74]. Оба класса углеводных цепей включают в себя как конформационно-лабильные, так и конформационно-жесткие участки. Конформационно-лабильные фрагменты локализованы в центральной части углеводных цепей. Возможные пространственные формы олигосахаридов определяются конформацией остатки кора, замещенного по атому С6. Галакто-конфигурация этого остатка в О-гликозидных углеводных цепях определяет преимущественность компактных Y-образных пространственных форм. Такие структуры оказываются оптимальными для образования плотноупакованных углеводных оболочек группоспецифических гликопротеинов. Манно-конфигурация остатков шарнириного узла N-гликанов предопределяет преобладание раскрытых T-образных пространственных форм. Поэтому N-гликозидные углеводные цепи могут эффективно участвовать во взаимодействиях с поверхностью белковой глобулы.

Таким образом, конформационные особенности N-гликозидных углеводных цепей обусловливают их участие прежде всего в углевод-белковых взаимодействиях, тогда как О-гликозидных углеводных цепей — в углевод-углеводных взаимодействиях.

Автор выражает благодарность В. А. Деревицкой за помощь в работе над обзором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Watkins W. M. // Glycoproteins. V. 5. / Ed. Gottschalk A. BBA Library, 1972. Part B. P. 830—891.
2. Деревицкая В. А. Прогресс химии углеводов / Ред. Торгов И. В. М.: Наука, 1985. С. 97—125.
3. Хьюз Р. Гликопротеины. М.: Мир, 1985.
4. Sharon N., Lis H. // The proteins. V. 5 / Eds Neurath H., Hill R. I. 3rd ed. N. Y.; L.: Acad. Press, 1982. P. 1—144.
5. Montreuil J. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1980. V. 37. P. 157—223.
6. Montreuil J. // Comprehensive biochemistry. V. 19B / Eds Neuberger A., Deenen L. L. M. Amsterdam: Elsevier, 1982. Part H. P. 1—188.
7. Montreuil J. // Pure Appl. Chem. 1975. V. 42. № 3. P. 431—477.
8. Montreuil J. // Pure Appl. Chem. 1984. V. 56. № 7. P. 859—877.
9. Berger E. G., Buddeke E., Kamerling J. P., Kobata A., Paulson J. C., Vliegenthart J. F. G. // Experientia. 1982. V. 38. № 10. P. 1129—1258.
10. Derivitskaya V. A. // Pure and Appl. Chem. 1981. V. 53. № 4. P. 89—106.
11. Dervitskaya V. A., Arbatsky N. P., Kochetkov N. K. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 86. № 2. P. 423—437.
12. Липкинд Г. М., Вереский В. Е., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 7. С. 963—970.
13. Вереский В. Е., Липкинд Г. М., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 2. С. 254—265.
14. Дащесский В. Г. Конформация органических молекул. М.: Химия, 1974.
15. Goodwin S. D., Watkins W. M. // Eur. J. Biochem. 1974. V. 47. № 2. P. 371—382.
16. Derevitskaya V. A., Likhoshcerstov L. M., Martynova M. D., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1983. V. 120. P. 85—94.
17. Хургин У. И., Шерман Ф. Б., Лихошерстов Л. М., Мартынова М. Д. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 268. № 2. С. 502—505.
18. Липкинд Г. М., Аванов А. Я., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 4. С. 512—523.
19. Шульц Г., Ширмер Р. Принципы пространственной организации белков. М.: Мир, 1982.
20. Липкинд Г. М., Аванов А. Я. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 6. С. 821—835.
21. Yeh Y., Feeney R. E. // Accounts Chem. Res. 1978. V. 11. № 4. P. 129—135.
22. Feeney R. E., Yeh Y. // Adv. Protein Chem. 1978. V. 32. P. 191—282.
23. Аванов А. Я., Липкинд Г. М., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 5. С. 616—620.
24. Bush C. A., Feeney R. E., Osuga D. T., Ralapati S., Yeh Y. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1981. V. 17. № 1. P. 125—129.

25. Bush C. A., Ralapati S., Matson G. M., Yamasaki R. B., Osuga D. T., Yeh Y., Feeney R. E. // Arch. Biochem. and Biophys. 1984. V. 232. № 2. P. 624—631.
26. Bush C. A., Feeney R. E. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1986. V. 28. № 4. P. 386—397.
27. Raymond J. A., De Vries A. L. // Cryobiology. 1972. V. 9. № 3. P. 541—547.
28. Tomimatsu Y., Scherer S. R., Yeh Y., Feeney R. E. // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. № 8. P. 2290—2298.
29. Ahmed A. I., Osuga D. T., Feeney R. E. // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. № 4. P. 8524—8527.
30. Vandenhende J. R., Ahmed A. I., Feeney R. E. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 24. P. 7885—7889.
31. Lemieux R. U. // Chem. Soc. Rev. 1978. V. 7. № 4. P. 423—452.
32. Lemieux R. U., Bock K., Delbare L. T. J., Koto S., Rao V. S. // Can. J. Chem. 1980. V. 58. № 6. P. 631—653.
33. Thøgersen H., Lemieux R. U., Bock K., Meyer B. // Can. J. Chem. 1982. V. 58. № 1. P. 44—57.
34. Веросский Б. Е., Липкинд Г. М., Кочетков Н. К. // Биоорганическая химия. 1984. Т. 10. № 12. С. 1680—1687.
35. Rao B. N. N., Dua V. K., Bush C. A. // Biopolymers. 1985. V. 24. № 12. P. 2207—2229.
36. Yan Z.-Y., Rao B. N. N., Bush C. A. // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. № 25. P. 7663—7669.
37. Lemieux R. U. // Frontiers of Chemistry / Ed. Laidler K. J. Oxford; N. Y.: Pergamon Press, 1982. P. 3—24.
38. Hindsgaul O., Norberg T., LePendu J., Lemieux R. U. // Carbohydr. Res. 1982. V. 109. № 1. P. 109—142.
39. Hindsgaul O., Khar D. P., Bach M., Lemieux R. U. // Can. J. Chem. 1985. V. 63. № 10. P. 2653—2658.
40. Spohr U., Hindsgaul O., Lemieux R. U. // Can. J. Chem. 1985. V. 63. № 10. P. 2644—2652.
41. Spohr U., Morishima N., Hindsgaul O., Lemieux R. U. // Can. J. Chem. 1985. V. 63. № 10. P. 2659—2663.
42. Lemieux R. U., Venot A. P., Spohr U., Bird P., Mandal G., Morishima N. // Can. J. Chem. 1985. V. 63. № 10. P. 2664—2668.
43. Lemieux R. U., Hindsgaul O., Bird P., Narasimhan S., Young W. N. // Carbohydr. Res. 1988. V. 178. P. 293—305.
44. Hakomori S. // Annu. Rev. Biochem. 1980. V. 50. P. 733—764.
45. Hakomori S. // Biochim. et biophys. acta. 1975. V. 417. P. 55—89.
46. Hakomori S., Watanabe K., Laine R. A. // Pure Appl. Chem. 1977. V. 49. № 8. P. 1215—1227.
47. Wiegandt H. // Adv. Neurochem. 1982. V. 4. P. 149—223.
48. Смирнова Г. П. // Прогресс химии углеводов / Ред. Торгов И. В. М.: Наука, 1985.
49. Karlsson K.-A. // Structure of biological membranes / Eds Abrahamsson S., Pascher I. N. Y.: Plenum Press, 1977. P. 245—274.
50. Karlsson K.-A. // Chem. and Phys. Lipids. 1986. V. 42. № 1. P. 153—172.
51. Bock K., Breimer M. E., Brignole A., Hansson G. C., Karlsson K.-A., Larsson G., Leffler H., Samuelsson B. E., Strömberg N., Eden C. S., Thurin J. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 14. P. 8545—8551.
52. Sabesan S., Bock K., Lemieux R. U. // Can. J. Chem. 1984. V. 62. № 6. P. 1034—1045.
53. Flippin J. L. // Acta Crystallogr. 1973. V. B29. № 9. P. 1881—1886.
54. Pascher I., Sundell S. // Chemistry and Physics Lipids. 1977. V. 20. № 1. P. 175—191.
55. Pascher I. // BBA. 1976. V. 455. № 2. P. 433—451.
56. Abrahamsson S., Dahlen B., Pascher I. // Acta crystallogr. 1977. V. B33. P. 2008—2013.
57. Abrahamsson S., Dahlen B., Löfgren H., Pascher I., Sundell S. // Structure of biological membranes / Eds Abrahamsson S., Pascher I. N. Y.: Plenum Press, 1977. P. 1—23.
58. Platt E., Robson B., Hiller J. H. // J. Theoret. Biol. 1981. V. 88. № 2. P. 333—353.
59. Pascher I. // Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 455. № 2. P. 433—451.
60. Липкинд Г. М., Веросский Б. Е., Кочетков Н. К. // Биоорганическая химия. 1982. Т. 8. № 7. С. 963—969.
61. Bock K., Arnarp J., Lönnqvist J. // Eur. J. Biochem. 1982. V. 129. № 1. P. 171—178.
62. Brisson J.-R., Carver J. P. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 6. P. 1362—1368.
63. Brisson J.-R., Carver J. P. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 15. P. 3671—3679.
64. Brisson J.-R., Carver J. P. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 15. P. 3680—3686.
65. Carver J. P., Brisson J.-R. // Biology of carbohydrates. V. 2. / Eds Ginsburg V., Robbins Ph. N. Y.: J. Wiley, 1984. P. 289—331.
66. Homans S. W., Dwek R. A., Fernandes D. L., Rademacher T. W. // FEBS Lett. 1983. V. 164. № 2. P. 231—235.
67. Homans S. W., Dwek R. A., Fernandes D. L., Rademacher T. W. // FEBS Lett. 1982. V. 150. № 2. P. 503—506.

68. Homans S. W., Dwek R. A., Boyd J., Mahmoudian M., Richards W. G., Rademacher T. W. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 20. P. 6342—6350.
69. Homans S. W., Dwek R. A., Rademacher T. W. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 20. P. 6553—6560.
70. Homans S. W., Dwek R. A., Rademacher T. W. // Biochemistry. 1987. V. 26. № 21. P. 6571—6578.
71. Paulsen H., Peters T., Sinnwell V., Lebuhn R., Meyer B. // Liebigs Ann Chem. 1984. № 5. S. 951—976.
72. Paulsen H., Peters T., Sinnwell V., Lebuhn R., Meyer B. // Liebigs Ann. Chem. 1985. № 3. S. 489—509.
73. Paulsen H., Peters T., Sinnwell V., Heume M., Meyer B. // Carbohydr. Res. 1986. V. 156. P. 87—107.
74. Веровский В. Е. Теоретический конформационный анализ углеводных цепей гликопротеинов. Дисс. канд. хим. наук. М., 1986.
75. Deisenhofer J. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 9. P. 2361—2370.
76. Sutton B. J., Phillips D. C. // Biochem. Soc. Trans. 1983. V. 11. № 2. P. 130—132.
77. Деревицкая В. А. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 12. С. 1605—1625.
78. Brisson J.-R., Carver J. P. // Can. J. Biochem. Cell Biol. 1983. V. 61. № 9. P. 1067—1076.
79. Brisson J.-R., Carver J. P. // Can. J. Biochem. Cell Biol. 1983. V. 61. № 9. P. 1077—1087.
80. Li Z.-Q., Perkins S. J., Loucheux-Lefebvre M. H. // Eur. J. Biochem. 1983. V. 130. № 2. P. 270—279.

Поступила в редакцию
21.III.1989

CONFORMATIONAL ANALYSIS OF CARBOHYDRATE CHAINS OF GLYCOCOCONJUGATES

LIPKIND G. M.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A problem of conformations of carbohydrate chains of glycoconjugates — glycoproteins and glycolipids — is reviewed. Experimental data (NMR, X-Ray) and theoretical conformational analysis data are discussed. Spatial structures of O-linked oligosaccharides from blood-group glycoproteins, N-linked oligosaccharides of different types (oligo-mannosidic, complex, hybrid, bisect) and carbohydrate chains of glycosphingolipids are considered.