



УДК 547.962.458; 543.63

© 1990 г.

А. Я. Аванов, Г. М. Липкинд *

КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ САЙТА N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ
Asn-X-Thr/Ser В ГЛИКОПРОТЕИНАХ

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван;

* Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва

Выполнен теоретический конформационный анализ олигопептидов $\text{CH}_3\text{CO}-\text{Asn}-\text{X}-\text{Thr}-\text{NHCH}_3$ (где X — Gly, Ala и Pro), моделирующий сайт N-гликозилирования в гликопротеинах, а также их гликозилированных производных $\text{CH}_3\text{CO}-(\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1)\text{Asn}-\text{X}-\text{Thr}-\text{NHCH}_3$. Найдены активные конформации сайта, удовлетворяющие структурным условиям протекания реакции N-гликозилирования: нахождению остатка Asn в β -изгибе пептидной цепи и образованию водородной связи между боковыми цепями остатков Asn и Thr/Ser. В этом случае для остатка в центральном положении (X) наиболее вероятно конформационное состояние L. У остатка Pro это состояние отсутствует, поэтому последовательности с X=Pro не гликозилируются. Показано, что N-гликозилирование сайта сопровождается в основном переориентацией боковой цепи остатка Asn.

В N-гликозилпротеинах N-гликозидная связь образуется между остатками Asn пептидной цепи и GlcNAc кора олигосахаридных цепей (см., например, [1]). Показано, что в подавляющем большинстве случаев при соединении N-гликанов осуществляется в аминокислотной последовательности Asn-X-Thr/Ser, именуемой сайтом N-гликозилирования [2]. Согласно последним, наиболее полным данным по анализу аминокислотных последовательностей 105 гликопротеинов [3], в положении X обнаружены все аминокислотные остатки, за исключением пролина. Однако не все потенциальные сайты N-гликозилирования несут боковые углеводные цепи [3]. Это обстоятельство означает, что наличие указанной трипептидной последовательности не является достаточным условием для протекания реакции N-гликозилирования.

По мнению ряда исследователей (см., например, [4]), для гликозилирования остатка Asn последний должен располагаться на таком участке пептидной цепи, который экспонирован во внешнюю среду. К таким структурам относится, в частности, β -изгиб — характерный элемент вторичной структуры белков, на котором происходит поворот пептидной цепи приблизительно на 180° . Рентгеноструктурный анализ иммуноглобулина G [5] и гемагглютинаина вируса гриппа [6] показал, что гликозилированные остатки Asn входят в состав именно β -изгибов.

К числу характерных особенностей сайта N-гликозилирования относится наличие в нем остатка оксиаминокислоты. Предполагается, что остатки Thr и Ser играют важную роль как в процессе узнавания ферментом нужного остатка Asn, так и каталитической реакции трансгликозилирования. Исходя из модельных построений, Маршалл [2] предположил, что наличие оксиаминокислоты необходимо для образования водородной связи между боковыми цепями остатков Asn и оксиаминокислоты. В принципе возможно образование водородной связи трех типов (рис. 1). Так, согласно Маршаллу [7], водородная связь образуется между атомом кислорода карбамидной группы остатка Asn и протоном гидроксильной группы остатка Thr или Ser (рис. 1а). По мнению Бозе с сотр. [8], водородная связь образуется между протоном амидной группы аспарагина и кислородом гидроксильной группы оксиаминокислоты (рис. 1б, в). Такая водородная связь способствует переносу протона с указанной гидроксильной группы на основную группу гликозилтрансферазы и индуцированию отри-

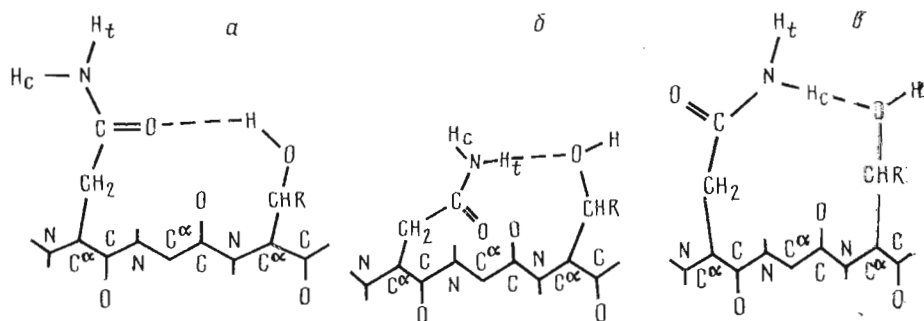


Рис. 1. Возможные типы водородных связей между боковыми цепями остатков Asn и Thr в сайте N-гликозилирования Asn-X-Thr согласно Маршаллу [7] (а) и Бозе с сотр. [8] (б, в)

цательного заряда на атоме азота остатка Asn, который подвергается нуклеофильной атаке карбокатионом углеводного остатка [9]. Очевидно, что из двух возможных вариантов водородной связи по схеме Бозе (б и в на рис. 1) только водородная связь типа 1б с участием *транс*-протона (H_t) может способствовать N-гликозилированию. Реальность такой водородной связи подтверждена в ряде химических модификаций сайта [8, 9], а также в исследованиях методом ЯМР [10] синтетических пептидов, включающих сайт N-гликозилирования.

Таким образом, можно считать установленным, что для успешного протекания реакции N-гликозилирования необходимо одновременное выполнение следующих, по-видимому взаимосвязанных, условий: наличие оксиаминокислоты вблизи гликозилируемого остатка Asn, нахождение остатка Asn в β -изгибе пептидной цепи и образование водородной связи между боковыми цепями остатков Asn и Thr/Ser.

Цель настоящей работы заключалась в определении тех конформационных состояний сайта N-гликозилирования, которые удовлетворяют названным выше условиям. В частности, следует уточнить, в каком конкретно положении β -изгиба должен находиться остаток Asn; каковы конформационные состояния остатков Asn и оксиаминокислоты при образовании постулируемой водородной связи; каковы стереохимические ограничения, налагаемые остатком Pro в сайте, для реализации перечисленных выше условий N-гликозилирования.

Чтобы ответить на поставленные вопросы, нами предпринят конформационный анализ маркерного пептида Asn-X-Thr, в котором X представлен остатками Gly, Ala, Pro, а также его гликозилированного производного (GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1) Asn-X-Thr. Указанное дисахаридное звено входит в состав кора N-гликанов и присутствует во всех углеводных цепях такого типа.

Расчет проводили для традиционных в конформационном теоретическом анализе пептидов моделей — метиламидов и N-ацетильных производных указанных пептидов и гликопептидов. На рис. 2 представлена модель гликопептида $CH_3CO-(GlcNAc\beta 1-4GlcNAc\beta 1) Asn-Ala-Thr-NHCH_3$ с указанием углов вращения. В пептидной цепи это углы $\varphi(N-C^\alpha)$ и $\psi(C^\alpha-C')$, в боковых цепях остатка Asn — углы $\chi_1(C^\alpha-C^\beta)$, $\chi_2(C^\beta-O)$ и остатка Thr — углы $\chi_1(C^\alpha-C^\beta)$, $\chi_2(C^\beta-O)$. В гликозилированном остатке Asn к названным выше добавляются углы вращения вокруг межзвеньевой гликозидной связи $\varphi_g(C1'-O)$, $\psi_g(O-C4)$ и углы $\tau_1(C1-N)$, $\tau_2(C2-N)$, $\tau_3(C2'-N)$. Отсчет двугранных углов вращения соответствует принятой международной номенклатуре [11]. Значения углов χ_1 и χ_2 остатка Asn, соответствующие их исходному положению, показаны на ньюменовских проекциях (рис. 2). За нуль отсчета углов τ_1 , τ_2 , τ_3 принята *цис*-ориентация связей $C(i)-H$ ($i=1, 2$) и $N-H$. Аналогично для углов вращения φ_g и ψ_g : связи $C1'-H$, $O-C4$ и $C1'-O$, $C4-H4$ находятся в этом случае в *цис*-положениях друг относительно друга.

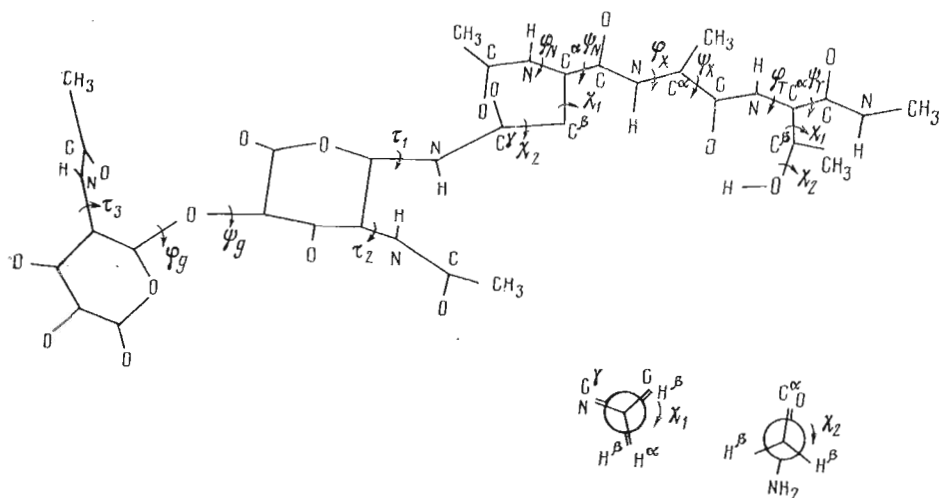


Рис. 2. Модель гликопептида $\text{CH}_3\text{CO}(\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1)\text{Asn-Thr-NHCH}_3$ с указанием углов вращения. На ньюменовских проекциях показаны положения атомов остатка Asn при углах χ_1 и χ_2 , равных 0°

Геометрические параметры (валентные углы и длины связей) аминокислотных остатков, N-гликозидной связи и углеводных остатков взяты из соответствующих данных рентгеноструктурного анализа [12, 13].

В расчете учитывали энергию невалентных взаимодействий, электростатическую и торсионную энергию, а также возможность образования водородных связей. Они составляют потенциальную энергию молекулы, которую минимизировали при варьировании переменных, показанных на рис. 2. Параметры потенциальных функций атом-атомных взаимодействий, водородных связей и парциальные заряды на атомах пептидной цепи взяты из работ [14–16]. Заряды на атомах углеводных остатков взяты из работы [4]. Для межзвеньевой связи $\text{C1}'-\text{O}-\text{C4}$ между остатками глюкозаминов барьер в торсионном потенциале равен 0,9 ккал/моль [17], а для N-гликозидной связи — 0,6 ккал/моль [4].

$\text{CH}_3\text{CO-Asn-X-Thr-NHCH}_3$. В согласии с постулируемыми условиями N-гликозилирования нас прежде всего интересовали такие конформации сайта N-гликозилирования, в которых состояния остатка Asn соответствуют одному из положений в β -изгибе, а между боковыми цепями остатков Asn и Thr образуется водородная связь типа б (рис. 1).

Конформации β -изгиба, состоящего из 4 остатков ($i+i+3$), определяются значениями углов ϕ и ψ двух центральных остатков в положениях $i+1$ и $i+2$ и могут быть трех основных типов [18]: $R'R'$ ($\phi_{i+1}-60^\circ$, $\psi_{i+1}-30^\circ$; $\phi_{i+2}-60^\circ$, $\psi_{i+2}-30^\circ$), $R'B'$ ($\phi_{i+1}-60^\circ$, $\psi_{i+1}-30^\circ$; $\phi_{i+2}-90^\circ$, $\psi_{i+2} 0^\circ$), $B'L'$ ($\phi_{i+1}-60^\circ$, $\psi_{i+1} 120^\circ$; $\phi_{i+2} 80^\circ$, $\psi_{i+2} 0^\circ$) (символ t указывает на принадлежность остатка к β -изгибу). Хотя конформация остатка в β -изгибе не соответствует оптимальным значениям его энергии, тем не менее в составе белковой структуры она может быть в достаточной степени стабилизирована дополнительными внутримолекулярными взаимодействиями.

Расчет конформации триплетного сайта N-гликозилирования проводился в два этапа: сначала центральное положение (X) моделировали остатком Gly и находили стереохимические условия образования водородной связи, затем проверяли возможность реализации этих условий для модельных триплетов с остатками Pro и Ala в положении X. Напомним, что пролин препятствует гликозилированию; аланин моделирует все остальные аминокислотные остатки с боковыми цепями.

$\text{CH}_3\text{CO-Asn-Gly-Thr-NHCH}_3$. В том случае, когда остаток Asn занимает положение i в β -изгибе, конформацию сайта с водородной связью между боковыми цепями остатков Asn и Thr нельзя признать удовлетворительной. Как следует из модельных построений, боковые цепи этих остатков в такой конформации ориентированы во внутреннюю область β -изгиба, по-

Таблица 1

Конформации пептида $\text{CH}_3\text{CO-Asn-Gly-Thr-NHCH}_3$ с остатками Asn в положении $i+2$ β -изгиба, в которых возможно образование водородной связи b между боковыми цепями остатков Asn и Thr

Конформация	Углы, град *										E, ккал/моль	Водородная связь
	φ_N	ψ_N	χ_1	χ_2	φ_G	ψ_G	φ_T	ψ_T	χ_1	χ_2		
$R_{31}^t LB_{13}^{**}$	-85	-30	170	79	30	106	-80	155	-60	-178	-24,4	b^{***}
$R_{22}^t LB_{13}$	-71	-32	76	-52	59	94	-81	150	-55	175	-25,0	»
$B_{21}^t LB_{13}$	-90	15	70	89	50	98	-100	148	-60	-179	-18,1	»

* N, G, T — остатки Asn, Gly, Thr соответственно.

** Подстрочные индексы 1, 2, 3 соответствуют значениям углов χ_1 и χ_2 —60, 60 и 180°; надстрочный индекс t указывает на принадлежность остатка Asn к конформации β -изгиба.

*** См. рис. 1.

Таблица 2

Низкоэнергетические конформации трипептида $\text{CH}_3\text{CO-Asn-Gly-Thr-NHCH}_3$ с остатком Asn в положении $i+3$ β -изгиба *

Конформация	Углы, град										E, ккал/моль	Водородная связь
	φ_N	ψ_N	χ_1	χ_2	φ_G	ψ_G	φ_T	ψ_T	χ_1	χ_2		
$B_{22}BB_{13}$	-94	136	70	-92	-65	121	-117	155	-57	177	-23,8	b
$B_{31}BB_{13}$	-103	114	-178	88	-116	129	-116	139	-49	-179	-19,9	»
$B_{31}BB_{13}$	-61	120	165	89	-64	116	-115	140	-63	180	-19,2	»
$B_{31}RB_{23}$	-93	152	-179	90	-116	-25	-49	157	53	178	-21,6	»
$B_{31}RB_{23}$	-99	119	170	91	-67	-40	-80	153	67	171	-24,5	»

* Обозначения приведены в табл. 1.

этому боковая цепь аспарагина оказывается недоступной для реакции N-гликозилирования.

Если остаток Asn находится в положении $i+1$ β -изгиба, то в этом случае в положении $i+2$ окажется остаток Gly. Проведенный анализ показал, что в этом случае ни в одной из конформаций β -изгиба искомая водородная связь образоваться не может.

Рассмотрим конформацию этого пептида с остатком Asn в положении $i+2$ β -изгиба. По данным Чу и Фасмана [19], в этом положении β -изгиба остаток Asn обнаруживается чаще, чем другие остатки. В этом случае остаток Thr находится за пределами конформации β -изгиба, поэтому нами рассмотрены следующие пространственные формы сайта: $R'RB$, $R'BB$, $B'RB$, $B'BB$, $R'LB$, $B'LB$. Поскольку значение угла ψ пептидной цепи C-концевого остатка Thr не влияет на основные конформационные параметры пептидного фрагмента, этот остаток учтен только в одном состоянии — B. Расчет показал, что к образованию водородной связи приводят лишь конформации развернутых форм $R'LB$ и $B'LB$ (табл. 1), когда боковые цепи остатков Asn и Thr располагаются по одну сторону от плоскости пептидного остова. В этих конформациях возможны лишь два сочетания углов χ_1 остатков Asn и Thr: 60, -60° и 180, -60° соответственно (табл. 1).

Рассмотрим, наконец, случай, когда остаток Asn находится в положении $i+3$ β -изгиба. В этом случае учтены конформации следующих пространственных форм сайта: RRB , RBB , RLB , BRB , BBB , BLB . Расчет показал, что образование водородной связи в этом случае возможно только

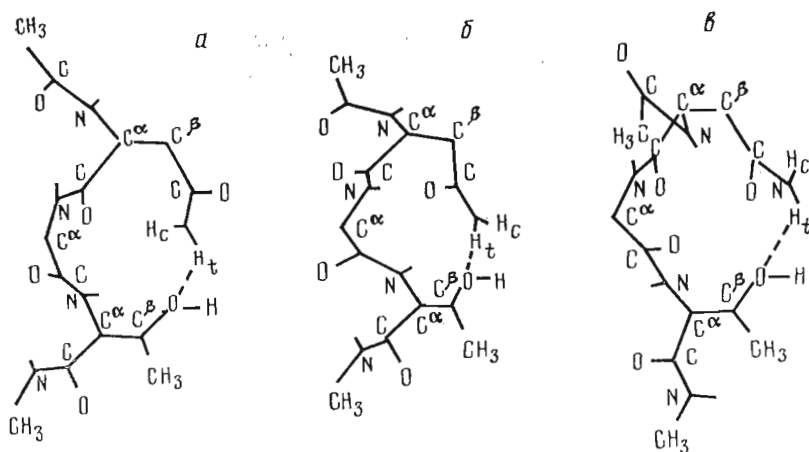


Рис. 3. Молекулярные модели пептида $\text{CH}_3\text{CO-Asn-Gly-Thr-NHCH}_3$ в конформациях с водородной связью типа δ (рис. 1): а) $R_{31}^t\text{LB}_1$, б) $R_{22}^t\text{LB}_1$, в) $B_{21}^t\text{LB}_1$

для конформаций двух пространственных форм пептидной цепи — развернутой $B\bar{B}\bar{B}$ и полусвернутой $B\bar{R}\bar{B}$ (табл. 2).

Итак, конформационный анализ модельного пептида $\text{CH}_3\text{CO-Asn-Gly-Thr-NHCH}_3$ показал, что одновременное выполнение условий N-гликозилирования (присутствие остатка Asn в β -изгибе и наличие водородной связи типа δ (рис. 1)) возможно в том случае, когда остаток Asn находится в положениях $i+2$ или $i+3$ β -изгиба. Соответствующие конформации относятся к развернутым и полусвернутым формам пептидной цепи, причем для конформаций развернутых форм значение χ_1 остатка Thr равно -60° , а для конформаций полусвернутых форм 60° . Кроме того, для конформаций развернутых форм возможны три комбинации углов χ_1 и χ_2 боковой цепи остатка Asn ($180, 90; 60, -90; 60, 90^\circ$), тогда как для конформаций полусвернутой формы — лишь одна ($180, 90^\circ$, табл. 2).

Однако конформации, в которых остаток Asn находится в положении $i+3$ β -изгиба, были выделены нами по формальному признаку. На самом деле это обычные конформации, которые могут быть представлены в развернутых участках пептидной цепи, например в β -структуре, т. е. в положении $i+3$ β -изгиба остаток Asn экспонирован не в большей степени, чем в любом положении β -структурного тяжа. Поэтому, если бы остаток Asn гликозилировался в положении $i+3$ β -изгиба, не видно причин, почему он не мог бы гликозилироваться в любом ином положении β -структурного тяжа. Кроме того, из данных табл. 2 следует, что в этом случае нахождение остатка Pro в положении X также не будет препятствовать гликозилированию, так как возможны конформации, в которых значение угла ϕ остатка Gly близко таковому в остатке Pro ($-60 \div -70^\circ$).

$\text{CH}_3\text{CO-Asn-Pro-Thr-NHCH}_3$. Действительно, выполненный нами конформационный анализ этого модельного пептида показал, что во всех конформациях, приведенных в табл. 2, в которых значение угла ϕ центрального остатка (X) равно $-60 \div -70^\circ$, также возможно образование водородной связи типа δ (рис. 1). Как видно из моделей таких конформаций, пирролидиновое кольцо остатка Pro ориентировано в этом случае в противоположную сторону от водородной связи и не может препятствовать ее образованию. Тем не менее, как известно, такая последовательность не гликозилируется. А поскольку остаток Pro может встраиваться в конформацию β -структурного тяжа, «активная» конформация сайта, по-видимому, должна быть иной.

Таким образом, конформации, показанные в табл. 2, хотя и приводят к образованию водородной связи, однако не являются «активными» в реакции N-гликозилирования. Этот факт можно объяснить отсутствием стереохимического соответствия указанных конформаций активному

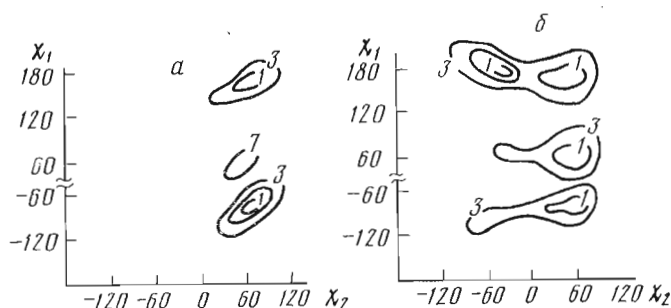


Рис. 4. Конформационные карты χ_1 - χ_2 гликопептида $\text{CH}_3\text{CO}-(\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1)\text{Asn-NHCH}_3$ при следующих состояниях остатка аспарагина: а) $R(\varphi - 60^\circ, \psi - 60^\circ)$, б) $B(\varphi - 120^\circ, \psi 160^\circ)$

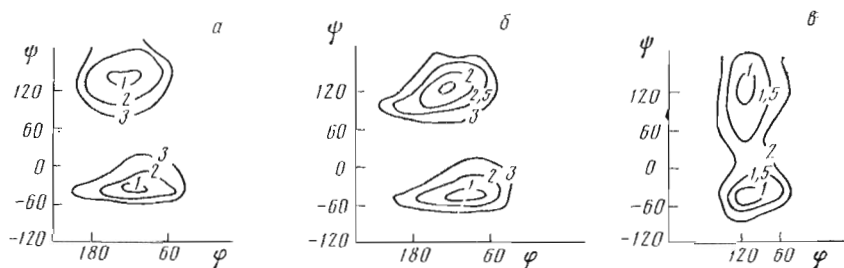


Рис. 5. Сечения потенциальной поверхности φ - ψ гликопептида $\text{CH}_3\text{CO}-(\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1)\text{Asn-NHCH}_3$ при следующих значениях угла χ_1 : 60 (а), 180 (б), -60° (в). Остальные углы вращения фиксированы при следующих значениях: $\chi_2 = 90^\circ$, $\tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = 155^\circ$, $\varphi_g = 60^\circ$, $\psi_g = 0^\circ$

центру соответствующей гликозилтрансферазы. Это обстоятельство позволяет предположить, что «активной» конформации сайта N-гликозилирования соответствует одна из структур $R'LB$ и $B'LB$ (табл. 1), которые удовлетворяют стереохимическим условиям реакции N-гликозилирования: остаток Asn находится в вершине β -изгиба и образует водородную связь типа б (рис. 1) с остатком Thr. Важным подтверждением того, что структуры $R'LB$ и $B'LB$ являются «активными» конформациями сайта N-гликозилирования, служит тот факт, что последовательность Asn-Pro-Thr/Ser не гликозилируется вообще: дело в том, что у остатка Pro отсутствует состояние L и в результате указанная последовательность не может принимать «активные» конформации $R'LB$ или $B'LB$.

$\text{CH}_3\text{CO-Asn-Ala-Thr-NHCH}_3$. Расчет «активных» конформаций сайта N-гликозилирования (см. табл. 1) с остатком Ala в центральном положении показал, что наличие боковой цепи у остатка в этом положении не препятствует формированию ни β -изгиба, ни водородной связи. В этой последовательности соотношения энергий для оптимальных конформеров такие же, как приведенные в табл. 1. Таким образом, все аминокислотные остатки, за исключением пролина, могут находиться в «активных» конформациях сайта N-гликозилирования. Подчеркнем, что сайты с остатками Gly и Ala, обладающими наименьшими боковыми радикалами и, в отличие от остальных остатков, наибольшей склонностью принимать состояние L , гликозилируются практически все без исключения [3].

Таким образом, конформационный анализ сайта N-гликозилирования показал, что принятым критериям для протекания реакции N-гликозилирования удовлетворяют только те его конформации, в которых остаток Asn находится в положении $i+2$ β -изгиба, а центральный остаток (X) имеет состояние L (рис. 3). Ввиду отсутствия такого состояния у остатка Pro последовательность Asn-Pro-Thr/Ser не гликозилируется.

$\text{CH}_3\text{CO}-(\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1)\text{Asn-X-Thr-NHCH}_3$. Рассмотрим, к каким структурным изменениям может привести присоединение углеводной цепи

к сайту N-гликозилирования. Для этого нами выполнен конформационный анализ этого модельного гликопептида при $X=\text{Ala}$, Gly (дисахарид $\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1$ обозначается далее символом CHO).

Прежде чем рассмотреть гликозилированный сайт, коротко остановимся на результатах конформационного анализа гликозилированного производного аспарагина $\text{CH}_3\text{CO-Asn(CHO)-NHCH}_3$. Анализ этого гликопептида выполняли в три этапа, на каждом из которых проводили поиск допустимых значений углов путем построения конформационных карт τ_1 — τ_2 , φ_g — ψ_g , χ_1 — χ_2 , ϕ — ψ . Оптимальные значения их были найдены при минимизации потенциальной энергии всей молекулы.

Расчет показал, что углы τ_1 , τ_2 , τ_3 принимают значение 155° , соответствующее *транс*-положению связей C—N и N—H . Это обусловлено невалентными взаимодействиями между заместителями при соседних атомах углерода углеводного остатка. Оптимальные значения углов φ_g и ψ_g в дисахаридном звене равны соответственно 60 и 0° и обусловлены возможностью образования внутримолекулярной водородной связи $\text{O5} \dots \text{O3}$ между остатками GlcNAc . Гликозилирование остатка Asn накладывает определенные ограничения на величину угла χ_2 : близкие углевод-пептидные взаимодействия приводят к предпочтительности значений в узкой области около 90° (рис. 4), тогда как в остатке Asn значения угла χ_2 90 и -90° равновероятны [16]. Три возможных значения угла χ_1 (-60 , 60 и 180°) в гликозилированном остатке Asn равновероятны, что согласуется с данными ЯМР [20]. При этом значение угла χ_1 60° допустимо для конформеров B , R' и B' , тогда как для конформера R оно маловероятно (рис. 4). На рис. 5 показаны допустимые области значений углов ϕ и ψ основной цепи остатка Asn(CHO) при трех значениях угла χ_1 и фиксированных оптимальных значениях остальных углов ($\chi_2=90^\circ$, $\varphi_g=60^\circ$, $\psi_g=0^\circ$, $\tau_1=\tau_2=\tau_3=155^\circ$). Важно отметить, что углы вращения ϕ и ψ могут принимать значения, соответствующие таковым в остатках, расположенных в положениях $i+1$ и $i+2$ β -изгиба. После минимизации энергии эти состояния (R' и B') становятся изоэнергетичными состояниям R и B , что обусловлено наличием олигосахаридного звена в боковой цепи аспарагина и близкими углевод-пептидными взаимодействиями, прежде всего между N-ацетиламидной группой проксимального остатка GlcNAc и пептидным звеном основной цепи.

В конформационном анализе гликопептида $\text{CH}_3\text{CO--Asn(CHO)-X-Thr-NHCH}_3$ были рассмотрены все пространственные формы его основной цепи. Расчет конформаций RRB , RBB , BRB и BBB был проведен на модели с остатком Ala в положении X . Пространственные формы, в которых центральный остаток имеет состояние L , а именно RLB , BLB , а также $R'LB$ и $B'LB$ были рассмотрены для последовательности с $X=\text{Gly}$ (см. табл. 3).

Из полученных данных следует, что гликозилированный остаток Asn может встраиваться практически в любую пространственную форму пептидной цепи. В табл. 3 приведено по одному наиболее низкоэнергетическому представителю каждой из разрешенных пространственных форм. Однако допустимы не все комбинации углов χ_1 остатков Asn(CHO) и Thr . Некоторые значения углов χ_1 , возможные в исходном сайте, становятся нереальными после его гликозилирования, так как присоединяемая олигосахаридная цепь оказывается в непосредственной близости к боковой цепи остатка Thr , что приводит к сильным невалентным отталкиваниям между ними. Таким образом, после гликозилирования следует ожидать изменений в «активной» конформации сайта N-гликозилирования, которые наиболее вероятны за счет переориентации боковой цепи аспарагина, но не трансформации пространственной формы пептидной цепи. Так, конформация $R_{22}'LB_{13}$ с углом χ_2 аспарагина в области отрицательных значений, которые запрещены для остатка Asn(CHO) , переходит в конформацию $R_{21}'LB_{13}$ (табл. 3) с положительными значениями этого угла. Другая «активная» конформация сайта $R_{31}'LB_{13}$ после гликозилирования также становится нереальной и при минимизации энергии переходит в конформацию $R_{21}'LB_{13}$. Что касается конформации $B_{21}'LB_{13}$, то наиболее вероятно,

Низкоэнергетические конформации гликопептида
 $\text{CH}_3\text{CO}-(\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1)\text{Asn-X-Thr-NHCH}_3$ (X=Gly, Ala) *

Конформация	E, ккал/моль	Углы, град									
		φ_N	ψ_N	χ_1	χ_2	φ_X	ψ_X	φ_T	ψ_T	χ_1	χ_2
$B_2^tLB_3$	-33,9	-87	12	-45	91	60	94	-92	161	-176	-174
$R_2^tLB_1$	-37,1	-63	-28	61	88	59	43	-63	165	-58	-175
$R_2^tLB_3$	-37,8	-119	-66	61	75	48	41	-128	155	-177	171
$R_1^tRB_1$	-31,0	-54	-44	-59	55	-73	-30	-69	162	-54	177
$B_2^tBB_3$	-32,2	-72	9	53	48	-96	123	-61	154	-175	179
B_2BB_3	-38,8	-61	168	63	80	-54	151	-119	161	-176	178
B_2RB_2	-35,1	-71	163	62	89	-61	-40	-81	145	60	-171
R_3BB_3	-34,6	-125	-51	-178	79	-59	154	-88	151	175	-174
R_3RB_2	-34,0	-148	-56	169	58	-46	-53	-51	154	76	179

* Обозначения приведены в табл. 1.

Таблица 4

Распределение числа конформеров остатка аспарагина в сайте
 N-гликозилирования ($\Delta E = 10$ ккал/моль)

Модельное соединение	Число конформеров		
	R_1^t	R_2^t	R_3^t
$\text{CH}_3\text{CO-Asn-X-Thr-NHCH}_3$	2	9	9
$\text{CH}_3\text{CO-Asn(CHO)-X-Thr-NHCH}_3$	8	7	0

что угол χ_1 аспарагина после гликозилирования изменит свое значение с $+60^\circ$ на -60° и конформация перейдет в форму $B_{11}^tLB_{13}$.

Сравнение числа конформеров остатка аспарагина до и после гликозилирования (табл. 4) показывает, что в исходном сайте преобладают конформеры, приводящие к образованию водородной связи между боковыми цепями остатков Asn и Thr или стабилизированные невалентными взаимодействиями между ними. Таковыми являются конформеры B_2, B_3, B_2^t ,

R_2^t и R_3^t остатка Asn. В гликозилированном сайте, напротив, преобладают конформации, в которых углеводная боковая цепь остатка Asn(CHO) ориентирована в сторону, противоположную остатку Thr. Боковая цепь последнего настолько мала по сравнению с боковой цепью остатка Asn(CHO), что ее ориентация практически не влияет на потенциальную энергию конформаций гликопептида $\text{CH}_3\text{CO-Asn(CHO)-X-Thr-NHCH}_3$. В общих чертах аналогичная тенденция отмечена в работе [20] по исследованию методом ЯМР модельного пептида $\text{Woc-Asn-Gly-Ser-NH}_2$ и его гликозилированного производного (Woc-трет-бутилоксикарбонил), где было показано увеличение доли конформеров со значением угла $\chi_1 -60^\circ$ и уменьшением доли конформеров со значением 180° угла χ_1 остатка Asn(CHO). Такая переориентация громоздкой боковой цепи от C- к N-концевому фрагменту пептидного остова в гликопротеине возможна лишь в том случае, если этот остаток находится в положении $i+2$ β -изгиба.

Таким образом, гликозилированный маркерный трипептид может принимать любую пространственную форму пептидного остова. Однако, поскольку углеводная цепь присоединяется к сайту N-гликозилирования в том случае, когда остаток Asn находится в положении $i+2$ β -изгиба, наибольшее

лее вероятно, что гликозилированный сайт сохранит исходную конформацию пептидной цепи.

Итак, конформации трипептидного сайта N-гликозилирования Asn-X-Thr/Ser, которые удовлетворяют как условию наличия остатка Asn в β -изгибах, так и условию образования водородной связи между боковыми цепями остатков Asn и Thr/Ser, характеризуются состоянием *L* центрального остатка. У остатка Pro это состояние отсутствует, поэтому последовательности, в которых X=Pro, гликозилироваться не могут. После гликозилирования имеет место переориентация боковой цепи аспарагина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rothman J. E., Lodish H. F. // *Nature*. 1977. V. 269. № 5631. P. 775-780.
2. Marshall R. D. // *Ann. Rev. Biochem.* 1972. V. 41. P. 673-702.
3. Mononen I., Karjalainen E. // *Biochim. et biophys. acta*. 1984. V. 788. № 2. P. 364-367.
4. Bush C. A. // *Biopolymers*. 1982. V. 21. № 3. P. 535-545.
5. Deisenhofer I. // *Biochemistry*. 1981. V. 20. № 9. P. 2361-2370.
6. Wilson L. A., Ladner R. C., Skehel J. J., Wiley D. C. // *Biochem. Soc. Trans.* 1983. V. 11. № 2. P. 145-147.
7. Marshall R. D. // *Biochem. Soc. Symp.* 1974. V. 40. P. 17-26.
8. Bause E., Hettkamp H., Legler G. // *Biochem. J.* 1982. V. 203. № 3. P. 761-768.
9. Bause E., Legler G. // *Biochem. J.* 1981. V. 195. № 3. P. 639-644.
10. Ishii H., Suzuki A., Inoue Y., Chujo R. // *Polymer J.* 1983. V. 15. № 8. P. 617-620.
11. IUPAC - IUB Commission on Biochemical Nomenclature. // *J. Mol. Biol.* 1970. V. 52. № 1. P. 1-17.
12. Гурская Г. В. Структура аминокислот. М.: Наука, 1966.
13. Ohanessian J., Avenel D., Neuman A., Gillier-Pandraud H. // *Carbohydr. Res.* 1980. V. 80. № 1. P. 1-13.
14. Scott R. A., Scheraga H. A. // *J. Chem. Phys.* 1966. V. 45. № 6. P. 2091-2101.
15. Poland D., Scheraga H. A. // *Biochemistry*. 1967. V. 6. № 12. P. 3791-3800.
16. Lipkind G. M., Arkhipova S. F., Popov E. M. // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1973. V. 5. № 6. P. 381-397.
17. Tvaroška I., Bleha T. // *Tetrahedron Lett.* 1975. № 4. P. 249-252.
18. Zimmerman S. S., Scheraga H. A. // *Biopolymers*. 1977. V. 16. № 4. P. 811-843.
19. Chou P. Y., Fasman G. D. // *J. Mol. Biol.* 1977. V. 115. № 2. P. 135-175.
20. Ishii H., Inoue Y., Chujo R. // *Polymer J.* 1985. V. 17. № 5. P. 693-700.

Поступила в редакцию

21.11.1989

После доработки

22.V.1989

А. Я. АВАНОВ, Г. М. ЛИПКИН *

CONFORMATIONAL ANALYSIS OF N-GLYCOSYLATION SITE Asn-X-Thr/Ser IN GLYCOPROTEINS

*Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR,
Yerevan;*

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

Theoretical conformational analysis of oligopeptides $\text{CH}_3\text{CO-Asn-X-Thr-NHCH}_3$ (X = Gly, Ala, Pro), modelling N-glycosylation site, and their glycosylated derivatives $\text{CH}_3\text{CO-(GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1)Asn-X-Thr-NHCH}_3$ has been carried out. Active conformations of the site are found, corresponding to structural prerequisites of N-glycosylation: Asn residue's position in β -turn and hydrogen bond formation between side chains of Asn and Thr/Ser residues. In this case the *L* conformation of the central residue X is most probable. Since Pro residue does not possess this conformation, sequences with X = Pro are not glycosylated. It is shown that glycosylation of the above-mentioned sites is accompanied by reorientation of the Asn residue's side chains.