



УДК 547.458.02:541.63

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ
УГЛЕВОДНОЙ ЦЕПИ КИСЛОГО α -ГЛИКОПРОТЕИНА

Липкин Г. М., Веровский В. Г., Кочетков Н. К.

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

С использованием атом-атомных потенциальных функций проведен теоретический конформационный анализ олигосахаридной цепи кислого α -гликопротеина, имеющего «диантенную» структуру. Показано, что в молекуле можно выделить конформационно-гибкие и конформационно-жесткие фрагменты. Низкоэнергетические конформации имеют \perp -образную форму, в которой одна олиголактозаминная цепь перпендикулярна к остальной части молекулы. Найдено соответствие между рассчитанной оптимальной конформацией олигосахарида и структурой углеводной цепи, обнаруженной в рентгеноструктурном анализе Fc-фрагмента иммуноглобулина.

Исследованиями последних лет показано, что углеводные фрагменты многих гликопротеинов, в которых олигосахаридные цепи присоединены к белку N-гликозидной связью, в большинстве случаев построены приблизительно по одному и тому же типу — лактозаминные фрагменты присоединены к стандартному кору, состоящему из остатков глюкозамина и маннозы. В зависимости от количества полилактозаминных цепей эти олигосахариды носят условные названия «диантенных», «триантенных» и т. д. [1]. Углеводные цепи гликопротеинов выполняют в живом организме важные биологические функции, играют первостепенную роль в межклеточных взаимодействиях, а также в контактном торможении роста клеток (см., например, [2]).

В настоящем сообщении изложены результаты теоретического конформационного анализа одной из таких олигосахаридных цепей (рис. 1), обнаруженной в кислом α -гликопротеине* [3]. Конформационный анализ рассматриваемого олигосахарида проведен с использованием эмпирических атом-атомных функций при минимизации потенциальной энергии всей молекулы (см. [4]).

Конформации олиго- и полисахаридных цепей (при допущении жесткости пиранозных колец) определяются углами вращения вокруг гликозидных связей $C1-O$ (φ) и $O-C_i$ (ψ), где атом C_i относится к моносахариду агликона (i 2, 3, 4 или 6 в зависимости от типа связывания углеводных остатков), а при наличии связей типа $1\rightarrow6$ — и углами вращения вокруг связей $C5-C6$ (ω).

Значения углов φ и ψ отсчитываются от такого расположения колец, при котором связи $C1-N$ и $O-C_i$, а также $O-C_i$ и C_i-N находятся в *цис*-ориентации. Угол ω равен нулю при *цис*-ориентации связей $O-C6$ и $C5-N$. Положительное направление вращения соответствует движению по часовой стрелке, если смотреть в направлении от атома $C1$ к гликозидному атому кислорода и от кислорода — к атому углерода C . Конформационные параметры рассматриваемого олигосахарида приведены на рис. 1.

Пространственные структуры остатков α - и β -GlcNAc, α - и β -Man, β -Gal взяты из рентгенографических и нейтронографических исследований [5–8]. Атомы кислорода O_6 фиксировались в положениях, найден-

* Все сахара принадлежат к D-ряду.

Таблица 1

Энергетические (U , ккал/моль) и геометрические (град) параметры дисахаридных звеньев

GlcNAc β 1-4GlcNAc			GlcNAc β 1-2Man			Man α 1-6Man	
Номера конформаций	φ_1, ψ_1	U	Водородные связи		Номера конформаций	φ_3, ψ_3	U
			GlcNAc	GlcNAc			
1	60, 0	-4,8	O5...	O3	1	40, 10	-4,5
2	20, -30	-4,8	O5...	O3	2	10, -40	-4,3
3	20, 180	-3,2			3	15, 40	-3,5
Man β 1-4GlcNAc					4	-30, -10	-3,0
					Gal β 1-4GlcNAc		
Номера конформаций	φ_2, ψ_2	U	Водородные связи		Номера конформаций	φ_3, ψ_3	U
			Man	GlcNAc			
1	60, 0	-4,4	O5...	O3	1	50, 0	-4,3
2	20, -40	-4,1	O5...	O3	2	10, -40	-4,0
3	-40, -10	-2,9			3	10, 180	-3,0
4	30, 180	-2,7					
					Man α 1-3Man		
Номера конформаций	φ_3, ψ_3	U	Водородные связи		Номера конформаций	φ_6, ψ_6	U
			Gal	GlcNAc			
1	-55, -30	-3,7	O5...	O3	1	ω 60°	-2,5
2	-20, 50	-3,7	O5...	O3	2	-60, -130	-2,0
					3	-60, 120	-1,9
					4	40, 170	-1,8
					5	40, -100	-1,6
						ω 180°	
					1	-50, -170	-2,5
					2	-40, -130	-2,0
					3	-60, 100	-1,4
					4	40, 180	-1,4
					5	40, -120	-1,0
						ω -60°	
					1	-40, -120	-2,5
					2	-60, -160	-2,0
					3	-40, 100	-1,9
					4	40, 80	-1,1

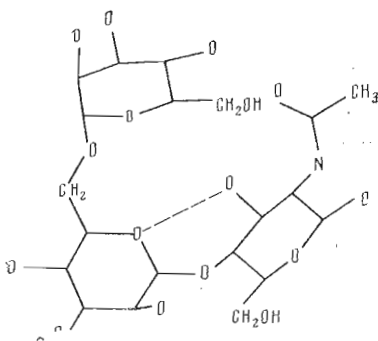


Рис. 2

Рис. 2. Молекулярная модель трисахарида $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ (φ_2 60° , ψ_2 0° , φ_6 -40° , ψ_6 -120° , ω -50°). Пунктиром показана водородная связь

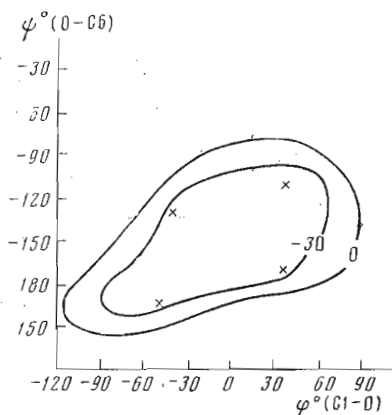


Рис. 3

Рис. 3. Сечение $\varphi_6-\psi_6$ (ω 180°) потенциальной поверхности олигосахарида. Дисахаридные звенья находятся в конформации 1 (знаком \times помечены положения минимумов)

второе положение менее удовлетворительно по критерию экзоаномерного эффекта [13]. Кроме того, в данном дисахариде конформации с φ_6 40° более высокоэнергетичны по невалентным взаимодействиям (табл. 1). В случае равенства угла φ_6 -60° оптимальные значения угла ψ_6 находятся вблизи -120 , 180 и 120° . В самых предпочтительных вариантах энергии *tg*-, *gg*- и *gt*-конформеров близки, т. е. по ближайшим взаимодействиям все три значения ω для звена со связью 1→6 не исключены.

Отметим, что во фрагменте $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}$ внутримолекулярные водородные связи не образуются, т. е. отсутствует важный фактор, способствующий выделению низкоэнергетического и «жесткого» конформационного состояния.

Конформации трисахаридных звеньев. Цель этого этапа расчета состояла в выяснении степени влияния дополнительных (средних) взаимодействий между концевыми остатками трисахаридных звеньев на конформационную детерминацию фрагментов олигосахарида.

Для трисахаридов, в которых два мономера соединены связью типа 1-4 ($\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$, $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}$ и $\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}$), такие взаимодействия незначительны и энергии конформеров представляют собой сумму энергий соответствующих дисахаридов (табл. 1). Конформации с внутримолекулярными водородными связями предпочтительны и для трисахаридов.

Таблица 2

Энергии взаимодействия между концевыми остатками (U_{2-7} , ккал/моль) в различных конформациях трисахарида $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ Углы φ_2 , ψ_2 равны $60,0^\circ$

Углы вращения на звене Ман-Ман *	ω		
	60°	180°	-60°
1	0	-1,4	-2,5
2	0	-3,1	-1,7
3	0	∞	-1,9
4	0	-1,5	-1,2
5	0	-1,1	

* Цифровые идентификаторы — номера конформеров, приведенные в табл. 1.

**Энергии (ккал/моль) оптимальных конформаций олигосахаридов
кислого α -гликопротеина (рис. 1)**

Конформеры звена Man α 1—6Man (X)	Конформации олигосахаридов *			
	11111-X11	11131-X31	11211-X11	11231-X31
ω 60°				
1	-33,7	-33,3	-33,6	-33,5
2	-32,9	-32,9	-32,9	-32,9
3	-38,4	-38,0	-33,0	-33,1
4	-32,3	-32,8	-32,7	-32,5
5	-32,4	-32,5	-32,3	-32,0
ω 180°				
1	-36,0	-35,8	-35,8	-35,6
2	-38,2	-38,5	-38,1	-38,0
3	∞	∞	∞	∞
4	-34,1	-34,2	-34,3	-34,3
5	-31,7	-31,8	-31,8	-31,8
ω -60°				
1	-38,6	∞	-39,0	∞
2	-33,6	-32,9	-33,6	-32,6
3	-35,2	-35,4	-35,1	-35,0
4	-32,7	-33,2	-33,0	-33,0

* Цифровые идентификаторы — номера конформеров, приведенные в табл. 1. Первая цифра определяет значение углов ϕ_1 , ψ_1 , вторая — ϕ_2 , ψ_2 и т. д. Дефисом отделена боковая цепь.

На структуре Man α 1—3Man β 1—4GlcNAc следует остановиться особо, так как для этого трисахаридов проведено рентгеноструктурное исследование [14]. Экспериментальные значения углов в дисахаридных звеньях Man-Man и Man-GlcNAc (-57,6, -19,4 и 48,1, -0,56° соответственно) очень близки к найденным расчетным путем в самых низкоэнергетических конформациях этих дисахаридов (-55, -30 и 60, 0°, см. табл. 1). Как эксперимент, так и теоретический анализ приводят к заключению о наличии водородной связи в звене Man-GlcNAc (O5...O3) и об ее отсутствии в звене Man-Man.

В случае трисахаридов GlcNAc β 1—2Man α 1—3Man, в котором центральный остаток соединен с предшествующим связью типа 1→2, виртуальный вектор между концевыми остатками значительно короче, чем в других трисахаридов, что приводит к большому сближению остатков β -GlcNAc и β -Man. Энергия дисперсионных взаимодействий между ними, когда звено GlcNAc-Man находится в конформации 3 или 4, составляет ~-1,5 ккал/моль независимо от конформации звена Man-Man. Эти взаимодействия несколько стабилизируют не содержащие водородных связей конформеры звена GlcNAc β 1—2Man в результате для него в олигосахариде состояния 1 и 3 (без внутримолекулярной водородной связи, табл. 1) становятся равновероятными.

В рассматриваемом олигосахариде средние взаимодействия (U_{2-7}) наиболее существенны в пределах фрагмента Man α 1—6Man β 1—4GlcNAc. Наличие для одной из связей дополнительной степени свободы (ω) может привести к сближению концевых остатков α -Man и β -GlcNAc на расстоянии ван-дер-ваальсовых контактов. В табл. 2 приведены энергии взаимодействия концевых остатков (U_{1-3}) трисахаридов для всех конформационных состояний звена Man-Man при условии, что дисахарид Man β 1—4GlcNAc стабилизирован внутримолекулярной водородной связью O5...O3 (конформер 1 табл. 1), так как только в этом случае концевые остатки могут взаимодействовать между собой.

В рассматриваемом трисахариде дисперсионные взаимодействия остатков α -Man и β -GlcNAc существенны только при значениях угла ω 180 и -60°, т. е. при реализации в звене Man-Man *gg*- или *gt*-конформеров, их энергия в среднем составляет около -2 ккал/моль.

Таким образом, дополнительные по сравнению с близкими взаимо-

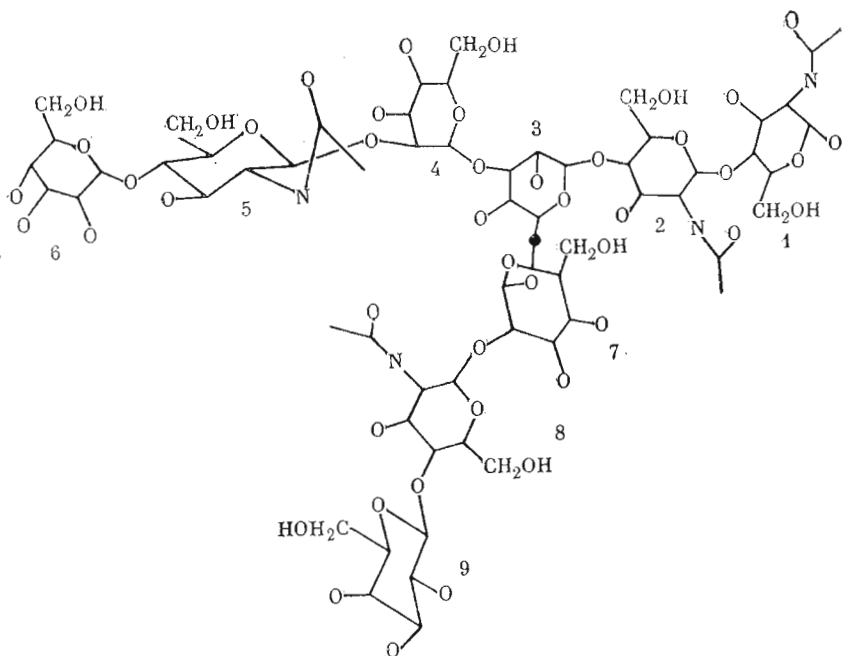


Рис. 4. Молекулярная модель двантенного олигосахарида в конформации 11111-211 (ω 180°)

действия могут обуславливать большую предпочтительность *gg*- и *gt*-конформеров для дисахаридных фрагментов со связью типа 1→6, что наблюдается в кристаллических структурах олигосахаридов [10].

В двух характерных конформациях звена Man α 1-6Man — в конформации 2 (ω 180°) и 1 (ω -60°), невозстанавливающий остаток маннозы располагается приблизительно под прямым углом к дисахариду Man β 1-4GlcNAc, вследствие чего концевые остатки оказываются пространственно сближенными (рис. 2). Для трисахарида Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc указанные конформации являются самыми низкоэнергетическими.

Конформации олигосахаридной цепи (рис. 1). Расчет конформаций олигосахарида проведен с учетом данных, полученных при анализе ближних и средних взаимодействий во фрагментах всей молекулы. Для дисахаридных звеньев GlcNAc-GlcNAc, Man-GlcNAc, GlcNAc-Man и GlcNAc-Man, в которых имеет место образование внутримолекулярной водородной связи O5...O3, при расчете учитывались только самые предпочтительные состояния (конформеры 1, табл. 1). Для звена GlcNAc-Man также учитывалась конформация 3, а для дисахаридов Man α 1-3Man и Man α 1-6Man приняты во внимание все оптимальные конформации, приведенные в табл. 1.

Из сказанного следует, что в рассматриваемом олигосахарида одна его часть, а именно Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc (остатки 1-6), (рис. 1) представляет собой относительно жесткую структуру. Если звено Man α 1-3Man находится в конформации 1, в которой значения углов φ , ψ совпадают с углами, обнаруженными при рентгеноструктурном анализе [14], то фрагмент 1-6 имеет вытянутую структуру в виде стержня и все остатки располагаются приблизительно вдоль одной линии. Предположение Монтре [1], что дисахарид Gal β 1-4GlcNAc на невозстанавливаемом конце цепи должен располагаться перпендикулярно кору, неверно, так как связывание по типу 1→2 в звене GlcNAc β 1-2Man обуславливает прямолинейное расположение этого фрагмента.

Оптимизированные значения энергий рассчитанных конформаций всего олигосахарида кислого α -гликопротеина приведены в табл. 3, откуда следует, что общая энергия олигосахарида определяется прежде всего

состоянием звена со связью 1→6, т. е. звена $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}$. Изменение углов вращения в других звеньях, за единичными исключениями, на величинах общей энергии сказывается незначительно. Так, для дисахарида $\text{Man}\alpha 1-3\text{Man}$ одинаково допустимы состояния 1 и 2, а для дисахарида $\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}-1$ и 3 (табл. 1 и 3). Таким образом, пространственные формы всего олигосахарида можно разделить на три группы: *tg*-, *gg*- и *gt*-конформеры.

На рис. 3 приведена зависимость энергии всего олигосахарида от углов вращения φ_6 и ψ_6 при равенстве угла ω 180° . Это сечение характеризует допустимые положения фрагмента 7-9 (второй антенны) относительно прямолинейного стержня молекулы (остатки 1-6). В олигосахаридах диапазон возможных значений угла φ_6 такой же, как в свободном дисахаридах $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}$ ($-60-40^\circ$), а угла ψ_6 — значительно меньше и находится в границах $-110-180^\circ$. Тем не менее оба диапазона достаточно велики ($\sim 90^\circ$). Поэтому молекулу можно представить в виде стержня, с которым через конформационно-лабильный узел (дисахарид $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}$) связан весьма подвижный фрагмент (вторая антенна).

Характерной особенностью *gg*- и *gt*-конформеров олигосахарида является приблизительно перпендикулярное расположение второй антенны по отношению к трисахариду $\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ кора. Такие структуры имеют \perp -образную форму. Какие-либо стабилизирующие взаимодействия между остатками обеих антенн в них отсутствуют.

При обсуждении общей энергии *gg*-конформеров следует иметь в виду, что при ω 180° могут быть существенны средние взаимодействия в пределах трисахарида $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ (табл. 2). Именно это обстоятельство обуславливает предпочтительность конформера 2 в данном семействе (табл. 3). Молекулярная модель такой конформации (11111-211, ω 180) дана на рис. 4. Ей соответствуют углы вращения φ_1 $59,4$, ψ_1 $0,1$, φ_2 $62,3$, ψ_2 $0,1$, φ_3 $-54,5$, ψ_3 $-29,2$, φ_4 $40,8$, ψ_4 $-8,9$, φ_5 $49,8$, ψ_5 $0,4$, φ_6 $-38,1$, ψ_6 $-134,1$ и ω $-171,3$; углы φ_7 , ψ_7 и φ_8 , ψ_8 адекватны соответствующим углам в первой антенне. В этой конформации молекула имеет приблизительно плоское строение, подвижная антенна занимает положение, перпендикулярное кору.

В следующем по энергетической стабильности *gg*-варианте, в которой звено $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}$ находится в конформации 1, остаток N-ацетилглюкозамина подвижной антенны контактирует с одноименным остатком кора (остаток 2). В целом энергия этого взаимодействия невелика ($U_{2-8} -1,5$ ккал/моль). Пространственно эта конформация подобна конформации, приведенной на рис. 4. Переход от одного конформера к другому осуществляется за счет движения подвижной антенны в одной и той же плоскости, т. е. за счет изменения только угла ψ_6 в «шарнирном узле» $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}$. Конформация 3, допустимая в дисахаридах (табл. 1), в олигосахаридах переальна из-за невалентных отталкиваний остатков 2 и 7.

В низкоэнергетических конформациях *gt*-семейства, в которых звено $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}$ принимает конформацию 1, возможны дисперсионные взаимодействия остатков 2 и 7 (см. табл. 2), а также 2 и 8 ($U_{2-8} -1,5$ ккал/моль). Углы вращения в оптимальной конформации 11111-111 (ω -60°) следующие: φ_1 $60,1$, ψ_1 $0,0$, φ_2 $63,2$, ψ_2 $1,3$, φ_3 $54,9$, ψ_3 $-29,8$, φ_4 $40,1$, ψ_4 $-9,5$, φ_5 $49,9$, ψ_5 $0,4$, φ_6 $-22,6$, ψ_6 $-114,5$, ω $-46,1^\circ$. Структура фрагмента $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ в такой конформации показана на рис. 2. Дисперсионные взаимодействия остатков подвижной антенны и кора возможны и в вариантах, где звено $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}$ находится в конформации 3 (ω -60°); при этом невозстанавливающий остаток галактозы оказывается сближенным с восстанавливающим остатком N-ацетилглюкозамина. Не исключено, что при такой ориентации подвижной антенны могут возникнуть неблагоприятные контакты между ней и поверхностью белка.

В семействе *tg*-конформеров обе антенны располагаются приблизительно одинаково по отношению к кору и структуры имеют Y-образную форму. Если звено $\text{Man}\alpha 1-6\text{Man}$ принимает ориентации, определяемые идентификаторами 1, 2, 4 и 5 (табл. 1), то обе антенны удалены и не взаимодействуют друг с другом. В случае конформации 3, в которой

бодного диантенного олигосахарида, которая является оптимальной по внутримолекулярным ближним и средним взаимодействиям. Взаимодействия углеводной цепи с белком не сопровождаются деформацией ее структуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Montreuil J. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1980, v. 37, p. 157-224.
2. Morell A. G., Irvine R. A., Sternblieb O. O., Scheinberg I. H., Ashwell G. *J. Biol. Chem.*, 1968, v. 243, № 1, p. 155-159.
3. Fournet B., Montreuil J., Strecker G., Dorland L., Haverkamp J., Vliegthart J. F. G., Binette J. P., Schmid K. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 24, p. 5206-5214.
4. Липкин Г. М., Кочетков Н. К. *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 12, с. 1817-1829.
5. Mo F., Jensen L. H. *Acta Cryst.*, 1975, B31, № 12, p. 2867-2873.
6. Jeffrey G. A., McMullan R. K., Takagi S. A. *Acta Cryst.*, 1977, v. B33, № 3, p. 728-737.
7. Neuman A., Giller-Pandraud H., Longchambon F. *Acta Cryst.*, 1975, v. B31, № 11, p. 2628-2631.
8. Sheldrick B. *Acta Cryst.*, 1976, v. B32, № 4, p. 1016-1020.
9. Arnott S., Scott W. E. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1972, № 3, p. 324-335.
10. Tvaroška J., Perez S. S., Marchessault R. H. *Carbohydr. Res.*, 1978, v. 61, p. 97-106.
11. Scott R. A., Scheraga H. A. *J. Chem. Phys.*, 1966, v. 44, № 8, p. 3054-3068.
12. Липкин Г. М., Архипова С. Ф., Ионов Е. М. *Ж. структурной химии*, 1970, т. 11, № 1, с. 121-126.
13. Строддарт Дж. *Стереохимия углеводов*. М.: Мир, 1975.
14. Warin V., Baert F., Fouret R., Strecker G., Spik G., Fournet B., Montreuil J. *Carbohydr. Res.*, 1979, v. 76, p. 11-22.
15. Deisenhofer J. *Biochemistry*, 1981, v. 20, № 9, p. 2361-2370.

Поступила в редакцию
11.1.1982

THEORETICAL CONFORMATIONAL ANALYSIS OF A CARBOHYDRATE CHAIN OF α -ACID GLYCOPROTEIN

LIPKIN G. M., VEROVSKY V. G., KOCHETKOV N. K.

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

Theoretical conformational analysis of oligosaccharide chain of α -acid glycoprotein having «diantenna» structure has been carried out. The conformationally rigid and conformationally flexible fragments were distinguished in the molecule. Low-energy conformations have \perp -like shape, in which one oligolactosamine chain is perpendicular to the remainder of the molecule. An accordance was revealed between the calculated optimal conformation of «diantenna» oligosaccharide and the X-ray structure of a carbohydrate chain in the immunoglobulin Fc-fragment.