



УДК 577.112.853.012.6

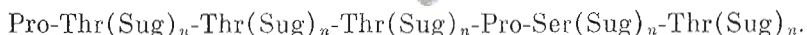
ПРИНЦИПЫ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
ГРУППОСПЕЦИФИЧЕСКИХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ

Липкин Г. М., Аванов А. Я.

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

Проведен теоретический конформационный анализ O-гликозилированной полипептидной цепи. Показано, что в этом случае возможно образование регулярной структуры, в которой пептидный остов покрыт слоем из плотноупакованных боковых углеводных цепей. Предложена пространственная модель группоспецифических гликопротеинов в виде β -баррела, состоящего из взаимодействующих между собой гликозилированных β -шпилек. В этой структуре пептидная цепь образует внутренний «туннель», который изолирован компактной углеводной оболочкой.

Группоспецифические гликопротеины (ГСГП) системы АВО(Н) определяют групповую принадлежность и иммунологическую специфичность организма [1, 2]. Они имеют молекулярную массу порядка 10^5 – 10^6 [1]. Структурное своеобразие таких гликопротеинов состоит в наличии большого числа (нескольких сотен) сложных олигосахаридных цепей, так что в целом содержание углеводов достигает 80–85% [2]. ГСГП представляют собой O-гликозилпротеины, в которых олигосахаридные цепи связаны с аминокислотными остатками серина и треонина. Полипептидная цепь ГСГП необычно обогащена этими остатками, а также остатками пролина. Их общее содержание в пептидной цепи составляет 60–70%. При этом практически все остатки Thr и Ser гликозилированы [3]. В качестве примера приведем фрагмент, выделенный из ГСГП со специфичностью А [4]:



Боковые углеводные цепи ГСГП близки по составу и строению [5], в среднем их длина составляет 6 остатков. Практически все цепи включают дисахаридное звено Gal β 1-3GalNAc α 1, представляющее собой кор O-гликозидных углеводных цепей, который непосредственно присоединен к остаткам Thr или Ser. Концевые участки таких цепей содержат остатки, которые определяют антигенную активность ГСГП (Fuc, Gal, GalNAc).

Акваметрическое исследование гидратации препарата ГСГП со специфичностью Н из слизистой оболочки желудка свиньи [6] показало, что только незначительная часть потенциальных центров гидратации взаимодействует с молекулами воды. Полученные результаты позволяют сделать вывод о компактности пространственной структуры ГСГП. На основе этого факта в работах [6] и [7] предложена модель ГСГП в виде стержня, покрытого углеводным чехлом. То, что углеводы находятся во внешней сфере молекулы ГСГП, подтверждается также устойчивостью их полипептидной цепи к протеолитическим ферментам [8]. Таким образом, молекулы ГСГП не представляют собой статистические клубки, как предполагалось ранее [4].

Важно отметить, что объемные олигосахаридные цепи в ГСГП расположены очень близко друг от друга или разъединены чаще всего одним аминокислотным остатком [3]. Это обстоятельство также позволяет предположить, что углевод-углеводные взаимодействия играют очень важную роль в ГСГП и в конечном счете определяют их пространственную структуру.

Отмеченное своеобразие молекул ГСГП — преобладание трех аминокислотных остатков (Thr, Ser, Pro) в пептидной цепи и наличие компактной внешней углеводной оболочки — делает актуальным ответ на вопрос:

при каких стереохимических условиях в высокогликозилированной пептидной цепи может образоваться структура с пептидным стержнем внутри и углеводным чехлом снаружи?

Ранее в работе [7] нами был проведен теоретический конформационный анализ в приближении механической модели молекулы небольших гликопептидов. Показано, что взаимодействия боковой углеводной цепи с пептидным остовом допускают лишь ограниченный набор значения углов вращения, определяющих конформации гликозилированных остатков. Боковые углеводные цепи соседних вдоль пептидной цепи остатков могут эффективно взаимодействовать между собой и образовывать структуры из плотноупакованных углеводных фрагментов [7].

В этой работе нами рассмотрены возможные пространственные структуры длинных фрагментов ГСПП с большим содержанием остатков Ser и Thr. С этой целью был предпринят конформационный расчет гликозилированного политреонина. Углеводные цепи были ограничены дисахаридным кором Gal β 1-3GalNAc α 1 (в дальнейшем он будет обозначаться символом СНО), поскольку только его остатки участвуют во взаимодействиях с пептидной цепью гликопротеина [7].

Естественно, что конформационный анализ гликозилированного политреонина был начат с наиболее устойчивых вторичных структур обычных полипептидов — α -спирали и β -структуры. Из полученных результатов вытекала необходимость анализа других, более сложных структурных элементов белков — β -шпильки и β -баррела (см. [9]), которые были нами также рассмотрены.

Модель гликозилированного остатка Thr и конформационные параметры — углы вращения φ ($C^\alpha-N$) и ψ ($C^\alpha-C'$) в основной и χ_1 ($C^\alpha-C^\beta$), χ_2 ($C^\beta-O'$) в боковой цепях треонина, а также углы вращения вокруг гликозидных связей χ_3 ($C1-O$), φ_g ($C1-O$), ψ_g ($O-C3$) дисахаридного звена, а также угол τ ($C2-N$) — показаны на рис. 1. При определении значений углов вращения использована международная номенклатура [10]. На ньюменовских проекциях (рис. 2) даны положения боковой цепи Thr при трех возможных значениях угла χ_1 — 60, 60 и 180°. Здесь также следует отметить, что на конформационной карте φ ($C^\alpha-N$) — ψ ($C^\alpha-C'$) остатка Thr выделяются две низкоэнергетические области, которым соответствуют оптимальные конформеры R (φ, ψ — 60, —50°), b (—120, 150°) и B (—70, 120°) [11]. Эти обозначения локальных конформеров будут сохранены и в этой работе. Далее, для обозначения углов вращения χ_1 — 60, 60 и 180° введены цифровые идентификаторы — 1, 2 и 3 соответственно. Таким образом, конформации с углами вращения φ, ψ и χ_1 — 70, 120 и 60° соответствует идентификатор B_2 .

При минимизации потенциальной энергии гликозилированного пептида в качестве нулевых приближений для углов вращения были использованы их оптимальные значения, полученные в расчетах небольших гликопептидов [7]. Для углов $\chi_2, \chi_3, \varphi_g \psi_g$ и τ они равны 150, —40, 60, 20 и 180° соответственно. При оценке потенциальной энергии конформеров учитывались невалентные и электростатические взаимодействия, водородные связи и торсионная энергия. Атом-атомные функции невалентных взаимодействий взяты из работы Скотта и Шераги [12]. О параметризации других функций, а также о других расчетных деталях подробно изложено в работе [7].

α -Спираль. Известно, что в структуре α -спирали пространственно наиболее сближены аминокислотные остатки с номерами i и $i+3$, а также i и $i+4$ вдоль цепи. Для молекулы ГСПП, богатой углеводными цепями, вполне вероятно, что в указанных положениях могут оказаться гликозилированные остатки Ser и Thr.

В расчете α -спиральной конформации (...RRRRR...) гликозилированного политреонина нулевое приближение для углов φ и ψ основной пептидной цепи соответствовало значениям этих углов в стандартной α -спирали: —56 и —47° [9]. Найдено, что в конформации α -спирали, даже в случае наиболее оптимальной упаковки боковых углеводных цепей на поверхности пептидного остова, между дисахаридными звеньями

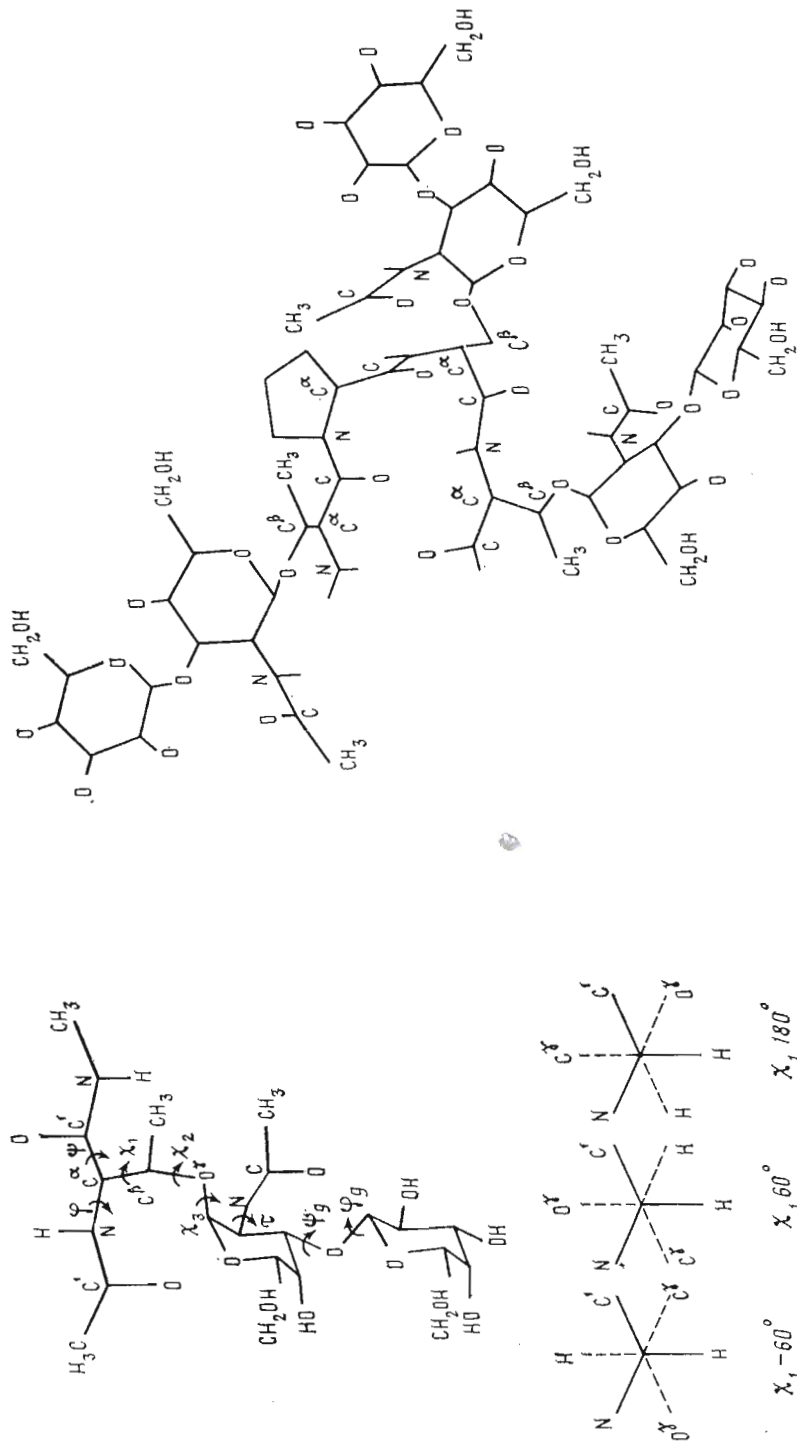


Рис. 1

Рис. 2

Рис. 1. Модель гликозилированного остатка Thr с указанием углов вращения. На ньютоновских проекциях показаны возможные положения по углу χ_1 боковой цепи

Рис. 2. Молекулярная модель β -изгиба в цепи Thr(SHO)-Pro-Ser(SHO)-Thr(SHO) в конформации $b_1RR_1b_1$

Gal β 1-3GalNAc, прежде всего принадлежащих остаткам с номерами i и $i+4$, возникают недопустимые ван-дер-ваальсовы контакты. Поэтому в молекулах ГСГП такая вторичная структура реализоваться не может.

Например, в реальном фрагменте, выделенном из ГСГП [4], Pro-Thr-(Sug) $_n$ -Thr(Sug) $_n$ -Thr(Sug) $_n$ -Pro-Ser(Sug) $_n$ -Thr(Sug) $_n$ α -спираль не сформируется из-за недопустимого пространственного сближения боковых цепей остатков в положениях 2 и 6 или 3 и 7. Кроме того, присутствие остатков Pro также делает α -спираль в этом фрагменте нереальной.

Для образования витка α -спирали нужно, чтобы по крайней мере 5 остатков приняли конформацию $RRRRR$, что в молекулах ГСГП практически невозможно. Однако короткие участки ГСГП (2–3 остатка) могут находиться в свернутых конформациях $RR(RB)$ или $RRR(RRB)$, которые стабилизируются невалентными взаимодействиями между боковыми углеводными цепями [7].

β -Изгибы. Вместе с тем на нерегулярных участках глобулярных белков звенья в конформациях RR (или RB) часто образуют β -изгибы, на которых происходит изменение направления хода пептидной цепи на $\sim 180^\circ$ и которые представляют собой особую разновидность вторичной структуры белков [9]. В β -изгибах высока вероятность присутствия остатков, которыми обогащены ГСГП: Pro и Ser [13]. Естественно допустить, что полипептидный остов ГСГП образует большое число β -изгибов, которые в отличие от β -изгибов в обычных белках дополнительно стабилизируются взаимодействиями между углеводными цепями.

β -Изгиб включает 4 остатка (с i по $i+3$), причем 1-й и 4-й остатки могут образовывать между собой водородную связь C=O...H-N. Для образования β -изгиба достаточно, чтобы расстояние между атомами C $^\alpha$ остатков i и $i+3$ не превышало 7 Å [14]. Конформации β -изгиба задаются углами вращения φ , ψ центральных остатков $i+1$ и $i+2$ [14]:

$$\overline{RR}(\varphi_{i+1}, \psi_{i+1}, \varphi_{i+2}, \psi_{i+2} \quad -60, -30, -60, -30^\circ) \text{ и}$$

$$\overline{RB}(\varphi_{i+1}, \psi_{i+1}, \varphi_{i+2}, \psi_{i+2} \quad -60, -30, -90, 0^\circ);$$

здесь, чтобы подчеркнуть отличие β -изгибов от обычных конформаций RR и RB , в записи структур использована скоба. Третий тип β -изгиба \overline{BL} для цепи, преимущественно состоящей из остатков Ser, Thr и Pro, энергетически невыгоден [7].

Приведем результаты расчета β -изгибной конформации в реальном фрагменте Thr(Sug) $_n$ -Pro-Ser(Sug) $_n$ -Thr(Sug) $_n$, выделенном из ГСГП [4]. Найдено, что оптимальная упаковка трех олигосахаридных цепей гликозилированных остатков Ser и Thr возможна в том случае, когда значения углов χ_1 в боковых цепях равны -60° . Таким образом, конформации $b_1\overline{RR}b_1$ (рис. 2) и $b_1\overline{RB}b_1$ наиболее энергетически выгодны для этого гликотетрапептида, когда он образует β -изгиб. Оптимизированные значения углов вращения φ , ψ и χ_1 в этих конформациях приведены в табл. 1. Из этого расчета следует, что по стереохимическим критериям образование β -изгибов в цепи ГСГП благоприятно.

β -Структура. Прежде всего следует отметить, что гомополипептиды Ser и Thr, остатков, столь характерных для ГСГП, образуют β -структуры [15]. Поэтому можно предположить, что в том случае, если в ГСГП представлены упорядоченные структурные элементы, ими скорее всего являются β -структуры.

Одиночные полипептидные цепи, из которых состоит β -слой, представляют собой β -тяжи. Нами выполнен расчет развернутой конформации (β -тяжа) гликозилированного политреопина. Найденные оптимальные значения углов вращения φ , ψ основной цепи полипептида (табл. 2) близки таковым в антипараллельной β -структуре [9]. Что касается взаимной ориентации углеводных боковых цепей, то в низкоэнергетических конформациях значения углов χ_1 соседних остатков либо одинаковы, либо разли-

Параметры низкоэнергетических конформаций β -изгиба гликопептида
 Thr(CHO)-Pro-Ser(CHO)-Thr(CHO) *

Конформации	E, ккал/моль	Углы вращения, град									
		Thr(CHO)			Pro	Ser(CHO)			Thr(CHO)		
		φ	ψ	χ_1	ψ	φ	ψ	χ_1	φ	ψ	χ_1
$b_1\overline{RB}b_1$	-92,6	-129	164	-58	-36	-90	-8	-59	-152	150	-62
$b_1\overline{RR}b_1$	-91,9	-128	155	-61	-38	-62	-26	-51	-167	161	-81

* Здесь и далее в формулах CHO = Gal β 1-3GalNAc α 1.

Таблица 2

Параметры низкоэнергетических развернутых конформаций
 гликозилированного политреонина (Thr(CHO))_n

Конформации	\overline{E}^* Thr(CHO), ккал/моль	Углы вращения, град					
		b_1			b_2		
		φ	ψ	χ_1	φ	ψ	χ_1
$(b_1b_2)_n$	-22,3	-139	155	-59	-132	158	61
$(b_1b_1)_n$	-19,6	-139	150	-56	-145	158	-59
$(b_1b_3)_n$	-18,4	-149	145	-56	-138	161	180

* \overline{E} — средняя энергия на остаток.

Таблица 3

Параметры низкоэнергетических конформаций β -шпильки полиаланина

Конформации	Углы вращения φ, ψ в остатках, град						\overline{E}^* ккал/моль
	β -тяжей	β -изгиба					
		i	$i+1$	$i+2$	$i+3$		
$(b)_n\overline{bRBb}(b)_n$	-145; 153	-155; 164	-62; -33	-90; -11	-150; 153	-10,9	
$(b)_n\overline{bRRb}(b)_n$	-146; 155	-151; 164	-61; -28	-61; -32	-146; 165	-9,7	

* \overline{E} — средняя энергия на остаток в β -изгибе.

чаются, причем в последнем случае имеет место чередование вдоль цепи не более двух значений углов χ_1 . Следовательно, повторяющимся структурным звеном гликозилированного политреонина является дипептид. Это находит отражение в записи конформаций β -тяжей рассматриваемой модели в табл. 2.

Самой низкоэнергетической является конформация $(b_1b_2)_n$, в которой все боковые цепи располагаются по одну сторону от пептидной цепи, благодаря чему остаток с номером i вступает в эффективные дисперсионные взаимодействия не только с остатком $i+2$, но и с остатком $i+1$. Кроме того, в этой структуре олигосахаридные цепи остатков, разделенных вдоль цепи одним остатком, располагаются параллельно друг другу.

Однако в случае ГСГП традиционные β -структуры, образуемые, например, фибриллярными белками, невозможны. Это связано со своеобразием ориентации углеводных цепей гликозилированных остатков, которые направлены приблизительно параллельно плоскости развернутого пептидного остова. Поэтому такие боковые цепи, которые уже в случае дисаха-

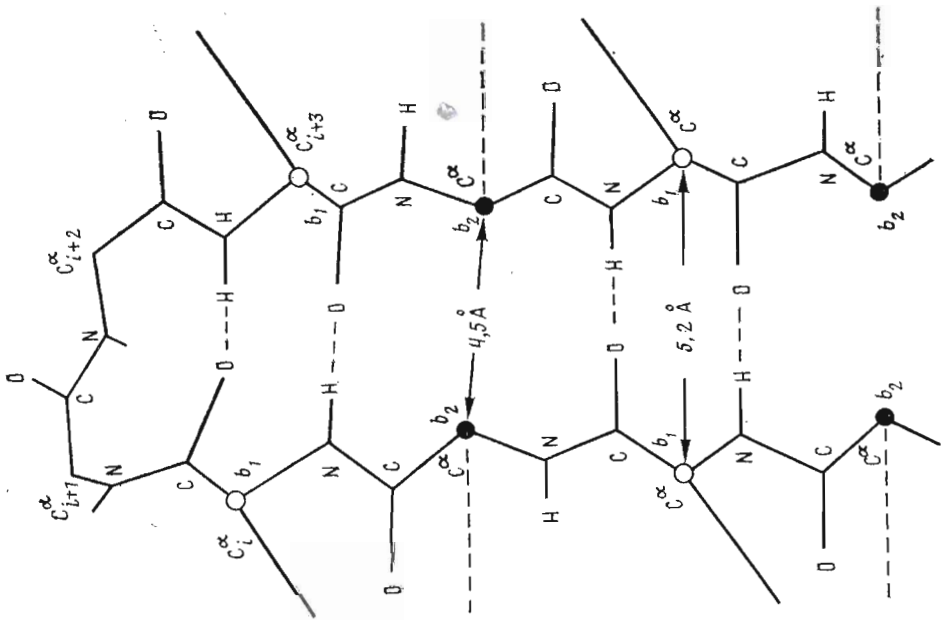


Рис. 3. Схематическая структура β -пириды. Сплошные линии с внешней стороны пириды показывают направление боковых углеводных цепей, расположенных над плоскостью β -пириды, интримольные — под плоскостью. Черные кружки означают атомы C_{α} противоположных β -тяжей, которые находятся на расстоянии 4,5 Å; светлые — 5,2 Å

Рис. 4. Молекулярная модель гликозидированной β -пириды

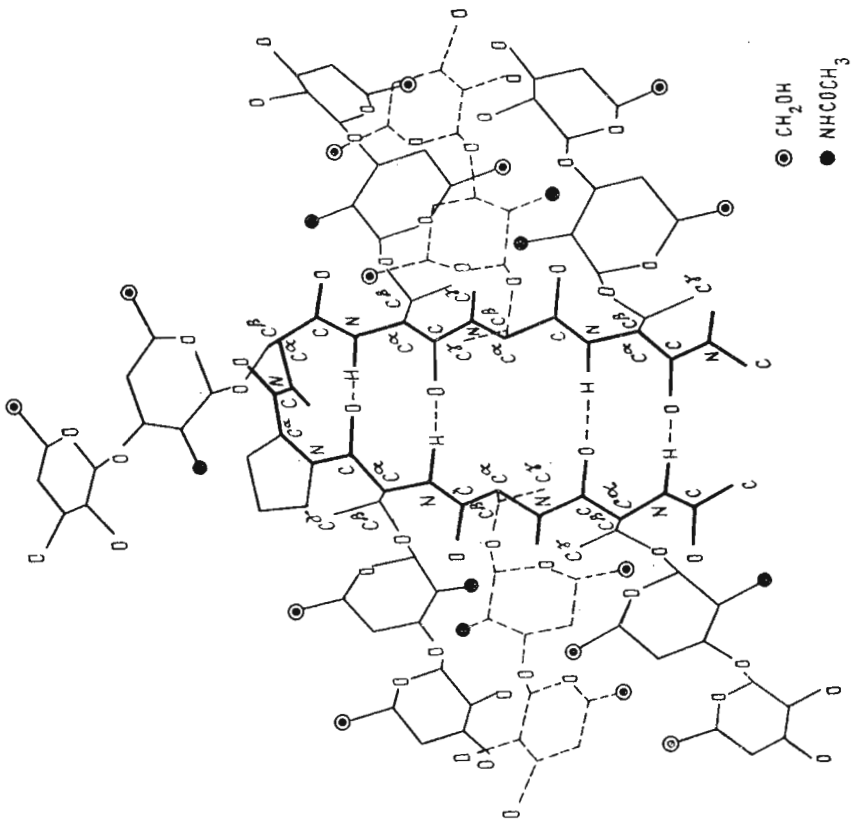


Рис. 4

Допустимые (+) и запрещенные (-) комбинации углов вращения χ_1 (град) боковых цепей противоположных остатков (S и S') в β -шпильке гликозилированного политреонина

$\chi_1(S\uparrow)$	$\chi_1(S'\uparrow)$			$\chi_1(S\downarrow)$	$\chi_1(S'\downarrow)$		
	-60	60	180		-60	60	180
-60	+	-	+	-60	-	-	-
60	-	-	-	60	-	+	-
180	+	-	+	180	-	-	-

ридного кора Gal β 1-3GalNAc по своим размерам превышают расстояние между пептидными тяжами β -структуры, должны испытывать значительные невалентные возмущения внутри β -структурного слоя. Кроме того, реализация обычной β -структуры маловероятна также из-за высокого содержания в ГСПП остатков Pro [9].

Вместе с тем в молекулах ГСПП не исключены β -структурированные участки, состоящие только из двух β -тяжей. С одной стороны, в такой структуре боковые олигосахаридные цепи могут быть ориентированы во внешнее пространство, не вызывая каких-либо невалентных возмущений соседних β -тяжей. С другой стороны, известно, что остатки Pro могут находиться во внешних граничных пептидных тяжах β -структуры, что обнаружено, например, в иммуноглобулинах [16].

β -Шпилька. Потенциальную предрасположенность высокогликозилированной полипептидной цепи ГСПП к образованию развернутых конформаций и β -изгибов можно объединить в модели β -шпильки. Такая шпилька представляет собой два развернутых, соединенных водородными связями пептидных тяжа, между которыми находится, как правило, β -изгиб.

Однако вследствие значительного содержания остатков Pro, а также Ser β -тяжи β -шпильки в ГСПП невелики. Для них приемлемы размеры, обнаруженные в β -шпильках глобулярных белков. Так, в α -химотринсине и карбоксипептидазе они составляют в среднем 7–9 аминокислотных остатков [17, 18].

Расчет β -шпильки проводили в три этапа: сначала для полиаланина были получены значения углов ϕ и ψ пептидного остова, удовлетворяющие критериям образования β -шпильки, затем на политреонине рассматривали взаимодействия боковых цепей остатков Thr, расположенных в соседних тяжах β -шпильки, и, наконец, на гликозилированном производном политреонина выясняли возможность встраивания в β -шпильку остатков с олигосахаридными боковыми цепями.

Параметры наиболее низкоэнергетических конформаций β -шпильки полиаланина даны в табл. 3, где использованы следующие обозначения элементов β -шпильки: $(b)_n$ — β -структурный тяж; $b\overline{X}b$ — β -изгиб, в котором остатки i и $i+3$ находятся в конформации b , независимо от разновидности β -изгиба.

Конформация β -шпильки (рис. 3) держится за счет водородных связей между пептидными группами антипараллельных тяжей, а также водородной связи в самом β -изгибе между остатками i и $i+3$. Плоскость пептидного звена между остатками $i+1$ и $i+2$ β -изгиба перпендикулярна средней плоскости β -шпильки. Связи $C^\alpha-C^\beta$ также ориентированы перпендикулярно плоскости β -шпильки, при этом у противоположных остатков двух β -тяжей они направлены одинаково. Если атомы C^α таких остатков сближены ($r=4,5$ Å), связи $C^\alpha-C^\beta$ относительно плоскости на рис. 3 идут вниз (соответствующие ориентации боковых цепей будем обозначать символом $S\downarrow$), если атомы C^α удалены ($r=5,2$ Å), эти связи идут вверх ($S\uparrow$). Два вида атомов C^α на рис. 3 выделены черными и белыми кружками.

Параметры низкоэнергетической конформации β -структурной шпильки гликозилированного политреонина

Конформация	Углы вращения в остатках, град												$E_{S\uparrow-S\uparrow}^{**}$ ккал/моль	
	β -тяжей						β -изгиба *							
	b_1		b_2		i		$i+1$		$i+2$		$i+3$			
$(b_1 b_2)_n b_1 R_1 b_1 (b_2 b_1)_n$	Φ	χ_1	Φ	χ_1	Φ	χ_1	Φ	Ψ	Φ	Ψ	Φ	Ψ	-23,9	-20,7
	-143	153	-63	-144	255	59	-153	163	-61	-34	-88	-10		

* Углы вращения χ_1 равны -60° .

** Энергии взаимодействия между остатками двух β -тяжей шпильки, направленными «вверх» и «вниз».

Конформации звена β/β баррела и энергии взаимодействия (ккал/моль) между боковыми дисахаридными цепями остатков двух β -тяжей

«Стэкин»	Конформации	Взаимодействующие остатки			
		$K_N^{**}-(K-1)_C$	K_N-K_C	$K_N-(K+1)_C$	$K_N-(K+2)_C$
A-B* A-B B-C B-C	$(b_1 b_2)_n l (b_2 b_1)_n$ $(b_1 b_2)_n l (b_1 b_2)_n$ $(b_2 b_1)_n l (b_2 b_1)_n$ $(b_2 b_1)_n l (b_1 b_2)_n$	-7,5	-16,5	-8,5	-8,6
			-7,4	-16,4	
			Баррел с параллельными шпильками		
			Баррел с антипараллельными шпильками		
A-B A-B	$(b_1 b_2)_n l (b_1 b_2)_n$ $(b_1 b_2)_n l (b_2 b_1)_n$	-8,1	-17,5	-8,7	
			Баррел с параллельными шпильками		

* Взаимодействующие шпильки A, B и C показаны на рис. 5.

** K_N и K_C — остатки на N- и C-концах β -шпильки.

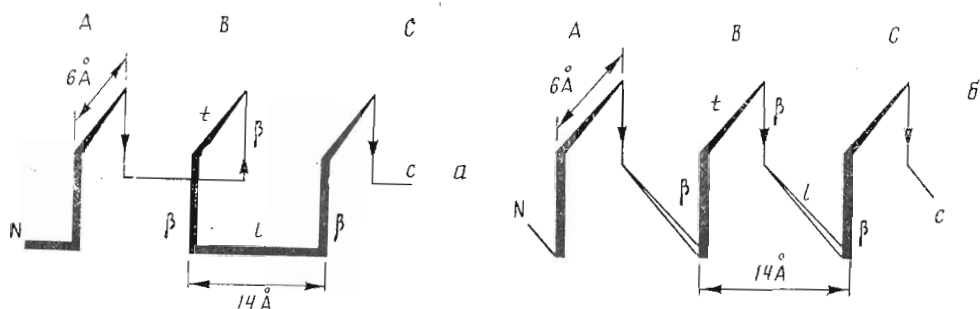


Рис. 5. Схематические структуры β -баррелов с антипараллельным (а) и параллельным (б) расположением β -шпильки; стрелки показывают ход пептидов цепи от N-к С-концу

Самая низкоэнергетическая структура β -шпильки политреонина — конформация $(b_1)_n b_1 \overline{R} \overline{B} b_1 (b_1)_n$. В этой шпильке боковые цепи противоположных остатков β -тяжей сближены до расстояний ван-дер-ваальсовых контактов, энергия взаимодействия между такими боковыми цепями ($E_{s_i-s_i}$) составляет $-4,5$ ккал/моль.

Переходя к рассмотрению гликозилированной β -шпильки, следует отметить, что в тех случаях, когда гидроксильные группы остатков Thr оказываются направленными во внутреннюю полость β -шпильки, соответствующие конформации являются запрещенными из-за недопустимого сближения боковых углеводных цепей с β -тяжами шпильки. Таким образом, возможны только те конформации β -шпильки, в которых гидроксильные группы остатков Thr, а следовательно и углеводные боковые цепи, располагаются во внешней сфере β -шпильки.

Результаты конформационного анализа β -шпильки гликозилированного политреонина в обобщенной форме даны в табл. 4, в которой представлены допустимые (+) и запрещенные (—) сочетания значений углов χ_1 гликозилированных боковых цепей двух противоположных остатков в β -шпильке, когда эти цепи направлены вверх или вниз относительно плоскости β -шпильки. Из табл. 4 видно, что боковые цепи, ориентированные вниз, могут принимать только одно значение угла χ_1 — 60° . Для «верхних» боковых цепей в принципе возможно больше комбинаций значений углов χ_1 . Однако, как показывает проведенный расчет, в таких остатках оптимально только значение угла χ_1 , равное -60° .

Таким образом, β -тяжи шпильки принимают только одну конформацию — $(b_1 b_2)_n$. При иных конформациях β -тяжей энергетически напряженной становится структура β -изгибного фрагмента шпильки. Направленность боковых цепей остатков i и $i+3$ в β -изгибе вверх (рис. 3) означает, что углы χ_1 этих остатков равны -60° . В этом случае также однозначно определяются значения углов χ_1 остатков $i+1$ и $i+2$, которые также могут быть равны только -60° . Следовательно, для гликозилированной β -шпильки оптимальна конформация $(b_1 b_2)_n b_1 \overline{R} \overline{B} b_1 (b_2 b_1)_n$. Все углы вращения и энергетические параметры приведены в табл. 5. Молекулярная модель гликозилированной β -шпильки показана на рис. 4. Если вектор между атомами C^α пептидной цепи и C1 остатка GalNAc, образующего O-гликозидную связь, направлены почти перпендикулярно к плоскости β -шпильки, то сами углеводные цепи располагаются почти параллельно к этой плоскости, во внешней области шпильки. Ориентация боковых углеводных цепей в β -шпильке схематически показана также на рис. 3.

Следует отметить, что для остатков Thr высока тенденция находиться в β -структуре [13]. Можно предположить, что фрагменты ГСГП с повышенным содержанием этих остатков образуют развернутые тяжи β -шпильки. Напротив, последовательности типа Pro-Ser(Sug) $_n$ или Ser(Sug) $_n$ -Ser(Sug) $_n$ с высокой степенью вероятности образуют β -изгибы [13].

С учетом ван-дер-ваальсовых радиусов пептидного звена и углеводного остатка толщина гликозилированной β -шпильки, в которой углеводные цепи отходят с обеих сторон ее средней плоскости, составляет ~ 14 Å. Ширина β -шпильки равна ~ 55 Å, если исходить из ширины самого β -изгиба (~ 6 Å) и средних размеров олигосахаридных цепей в ГСГП (~ 25 Å). Длина β -шпильки, включающей ~ 10 остатков в одном β -тяже с учетом размеров пептидного звена (4 Å) и углеводных цепей в положениях $i+1$ и $i+2$ β -изгиба, составляет ~ 70 Å.

Проведенный анализ показывает, что в полипептидной цепи с большим числом гликозилированных остатков образование β -шпильки допустимо только в том случае, если углеводные цепи направлены в стороны, противоположные водородным связям в шпильке. Конформации углеводных цепей при аминокислотных остатках, которые в шпильке находятся один против другого и образуют между собой водородные связи, должны быть одинаковы. Боковые цепи остатков в положениях $i+1$ и $i+2$ β -изгиба направлены во внешнее пространство β -шпильки. Таким образом, в β -шпильке, включая β -изгиб, пептидный остов окружен плотноупакованными олигосахаридными цепями, невосстанавливающие концы которых находятся в контакте с внешней средой.

Таким образом, β -шпилька может служить доминирующим структурным элементом в пространственной организации молекул ГСГП.

Конформация зигзага. Помимо β -шпильки плотная упаковка боковых углеводных цепей возможна также в конформации... *RBRBRB*... полипептидной цепи, имеющей зигзагообразную форму. Углы вращения ϕ и ψ в самой низкоэнергетической конформации такого типа $(R_i, B_i)_n$ гликозилированного полипептида таковы, что в любое ее положение могут встраиваться остатки R и B , которыми обогащены ГСГП. Однако, если остаток R находится в состоянии B , конформация R предшествующего остатка становится столь высокоэнергетической, что такую зигзагообразную структуру для фрагментов ГСГП следует признать маловероятной.

β -Баррел. Выше было показано, что основным структурным мотивом ГСГП может быть β -шпилька. Однако размеры β -шпилек (~ 20 остатков) по сравнению с размерами молекул ГСГП (~ 500 остатков) незначительны. Естественно возникает вопрос: каким образом они располагаются друг относительно друга с образованием компактной структуры гликопротеина с углеводами во внешней сфере?

Анализ структурных образований, встречающихся в белках, позволяет предположить, что оптимальная укладка гликозилированных β -шпилек между собой может реализоваться в структуре β -баррела.

β -Баррел, обнаруженный в целом ряде глобулярных белков, представляет собой цилиндрическую супервторичную структуру из β -структурных фрагментов, которые располагаются в параллельных плоскостях [9]. Например, в структуре α -химотрипсина [17] имеется β -баррел (на участке цепи 16—118), в котором в параллельных плоскостях одна за другой располагаются три β -шпильки, а в плоскостях, перпендикулярных шпилькам,— соединяющие их фрагменты цепи.

Взаимная ориентация соседних β -шпилек в барреле может быть антипараллельной или параллельной (рис. 5). В барреле 1-го типа сочленения между шпильками также располагаются в параллельных плоскостях (на переднем и заднем плане рис. 5а). Такую структуру имеет баррел в α -химотрипсине [17]. В барреле 2-го типа (рис. 5б) ход пептидной цепи в соседних шпильках одинаков. Такой баррел обнаружен в триозофосфатизомеразе [19].

Таким образом, в барреле следует отличать β -структурные тяжи $\beta t \beta$ (β - β -тяж, t - β -изгиб), которые участвуют в образовании водородных связей, от β -тяжей, расположенных в параллельных плоскостях и принадлежащих звеньям $\beta l \beta$ (l -сочленение, петля между двумя шпильками). Эти β -тяжи водородных связей между собой не образуют. Согласно принятым обозначениям, структуру баррела можно представить в виде ... $\beta t \beta l \beta t \beta l \beta$...

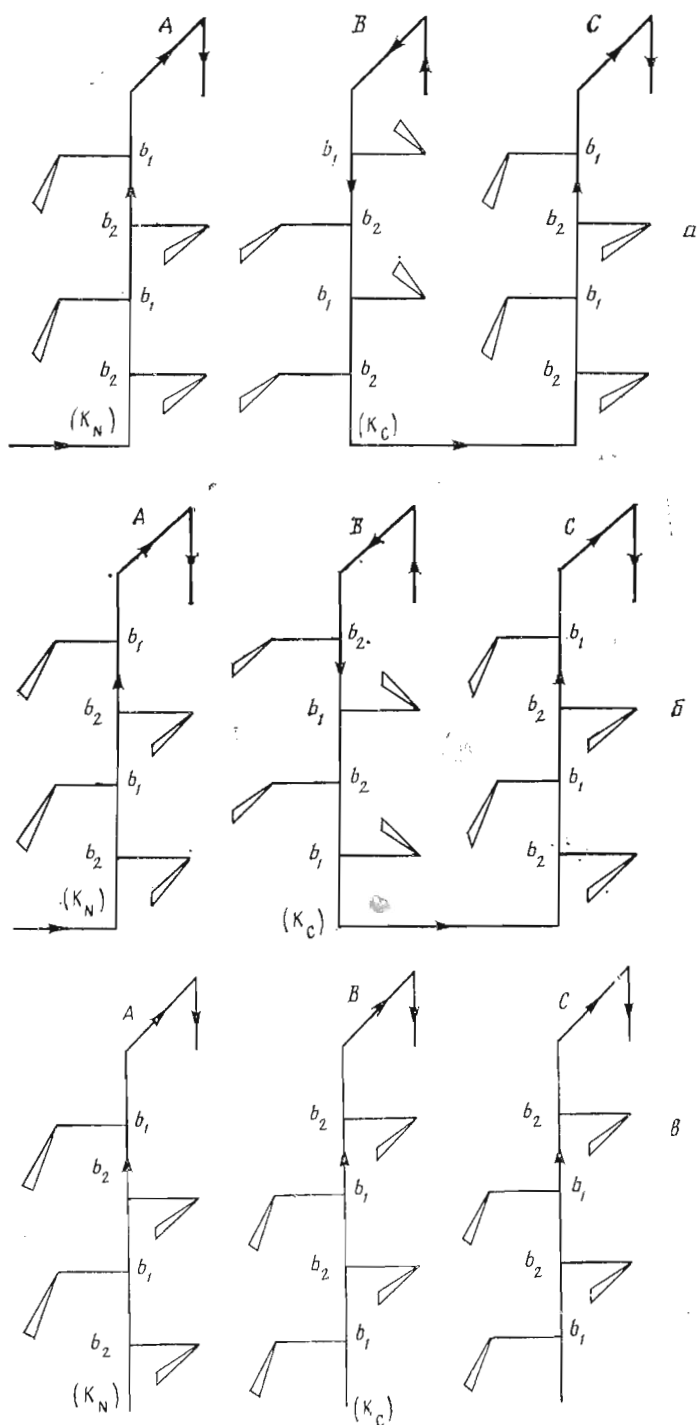


Рис. 6. Модели относительного расположения углеводных цепей (вытянутые треугольнички) в антипараллельном (а и б) и параллельном барреле (в): А, В и С — β-шпильки баррела, b_1 и b_2 — конформации остатков, K_N и K_C — остатки на N- и C-концах шпильки

Рассмотрим стереохимические условия для образования гликозилированной полипептидной цепи структуры баррела с плотноупакованными углеводными цепями во внешней сфере.

При отборе геометрических параметров баррела критерием может служить наличие стабилизирующих невалентных контактов между боковыми углеводными цепями соседних шпилек. Так как толщина гликозилирован-

ной β -шпильки равна $\sim 14 \text{ \AA}$, то и расстояния между шпильками в барреле не должны заметно отличаться от этой величины.

Конформационные особенности β -шпильки рассмотрены выше. Здесь нам предстоит определить взаимную ориентацию олигосахаридных цепей в звеньях $\beta l\beta$. Отметим, что указанная дистанция между шпильками может быть достигнута при наличии в сочленении l по меньшей мере четырех пептидных единиц — например, в последовательности из пяти остатков Pro-X-X-X-Pro (X — любой остаток). Такой фрагмент в пептидной цепи благодаря наличию остатков пролина на концах с высокой долей вероятности формирует два поворота цепи на $\sim 90^\circ$, которые необходимы для перехода от β -тяжей к сочленению l . В этом случае для этого фрагмента оптимальна конформация $RbbbR$.

В структурном анализе звена $\beta l\beta$ (он выделен жирной линией на рис. 5) во внимание принята самая низкоэнергетическая конформация β -тяжей в шпильках $(b_1 b_2)_n$ (табл. 2), в которой значения углов χ_1 боковых цепей чередуются: $-60, 60, -60^\circ \dots$. Поэтому полный набор взаимных ориентаций углеводных цепей двух β -тяжей звена $\beta l\beta$ равен четырем $(60, 60; -60, -60, -60, 60; 60, -60^\circ)$. Очевидно, что взаимодействия между углеводными цепями в звене $\beta l\beta$ идентичны взаимодействиям углеводных цепей с противоположной стороны β -шпилек (эти тяжи на рис. 5 показаны тонкой линией), поскольку в β -шпильке противоположные гликозилированные остатки имеют одинаковые конформации.

Таким образом, расчетная процедура сводилась к поиску оптимального расположения β -тяжей в звене $\beta l\beta$. Для этого помимо расстояния l между β -шпильками учитывался дополнительный переменный параметр — смещение β -тяжей друг относительно друга в параллельных плоскостях. В соответствии с длиной пептидного звена $C_i^\alpha - C_{i+1}^\alpha$ шаг этой переменной взят равным 4 \AA . Минимизация потенциальной энергии выполнялась синхронным варьированием углов вращения χ_1 только в тех боковых цепях, которые направлены навстречу друг другу и могут взаимодействовать между собой.

Относительное расположение углеводных цепей между β -шпильками баррела показано на схемах рис. 6. В барреле с антипараллельными шпильками возможны два типа «стэкинга» между ними. Так, между шпильками A и B на рис. 6а и б между собой взаимодействуют только те боковые цепи, в которых значение угла χ_1 равно 60° (конформеры b_2), тогда как между шпильками B и C — боковые цепи со значением угла $\chi_1 - 60^\circ$ (конформеры b_1). Напротив, в барреле с параллельным расположением шпилек в «стэкинге» участвуют углеводные цепи β -тяжей звена $\beta l\beta$ в разных конформациях (рис. 6в). Так, в одном β -тяже углы χ_1 равны -60° , в другом $+60^\circ$. Естественно, не исключена также возможность баррела смешанного типа с антипараллельной и параллельной упаковкой β -шпилек.

Баррелы, изображенные на рис. 6, различаются смещением пептидных цепей друг относительно друга на один остаток в «стэкинге» как между шпильками $A-B$, так и между шпильками $B-C$. Поэтому в барреле с антипараллельным расположением β -шпилек в «стэкинге» $A-B$ могут возникнуть две ситуации, когда остаток в конформации N-концевого тяжа шпильки A (остаток K_N на N-конце цепи) располагается напротив остатка K_C C-концевого тяжа шпильки в такой же конформации b_2 (рис. 6а) или в другой конформации b_1 (рис. 6б). В том случае, когда противоположные остатки в звене $\beta l\beta$ K_N и K_C имеют одну и ту же конформацию b_2 , углеводные цепи соседних β -шпилек располагаются параллельно друг другу (рис. 6а), и энергия стабилизирующих дисперсионных взаимодействий между ними составляет -16 ккал/моль (табл. 6). Такой «стэкинг» $A-B$ можно записать в виде $(b_1 b_2)_n l (b_2 b_1)_n$, где символ последнего остатка в первом, N-концевой β -тяже и символ первого остатка во втором, C-концевом β -тяже определяют конформации противоположных остатков K_N и K_C . В другом варианте «стэкинга» $A-B$ $(b_1 b_2)_n l (b_1 b_2)_n$, который образуется при смещении β -тяжей друг относительно друга на один остаток,

боковые цепи остатков K_N и K_C в конформациях b_2 и b_1 оказываются пространственно удаленными друг от друга (рис. 6б) и не взаимодействуют между собой. В этом случае остаток K_N N-тяжа звена $\beta l\beta$ взаимодействует с остатками C-тяжа, расположенными рядом с остатком K_C : $(K+1)_C$ и $(K-1)_C$, которые также имеют конформацию b_2 . Тем не менее суммарная энергия взаимодействий олигосахаридной цепи остатка K_N с цепями остатков $(K+1)_C$ и $(K-1)_C$ также равна -16 ккал/моль (табл. 6).

С аналогичной ситуацией мы сталкиваемся и в «стэкинге» между шпильками B и C , в котором участвуют только боковые цепи остатков со значениями угла $\chi_1 -60^\circ$. В этом случае направленность олигосахаридных цепей в пространстве такова, что две цепи образуют плотную упаковку между собой тогда, когда в одном тяже звена $\beta l\beta$ олигосахаридной цепи соответствует номер K_N , а в другом — $(K+1)_C$ (рис. 6б). Энергия дисперсионных взаимодействий между указанными остатками в варианте $(b_2b_1)_n l(b_2b_1)_n$ «стэкинга» $B-C$ равна ~ -16 ккал/моль (табл. 6). В другом варианте «стэкинга» $(b_2b_1)_n l(b_1b_2)_n$ остаток K_N взаимодействует с остатками K_C и $(K+2)_C$ (рис. 6а), суммарная энергия таких взаимодействий также составляет ~ -16 ккал/моль (табл. 6).

Таким образом, плотная упаковка между любыми β -шпильками в антипараллельном барреле может быть одинаково эффективной.

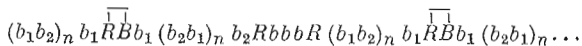
Принимая во внимание, что β -изгиб в шпильке имеет конформацию



а сочленение l в звене $\beta l\beta$ можно смоделировать конформацией $Rbb\overline{b}bR$, конформационный шейп антипараллельного баррела можно записать следующим образом: $(b_1b_2)_n b_1 \overline{R \overline{B} b_1} (b_2b_1)_n Rbb\overline{b}bR (b_1b_2)_n b_1 \overline{R \overline{B} b_1} (b_2b_1)_n \cdot Rbb\overline{b}bR (b_2b_1)_n \dots$

В барреле с параллельным расположением β -шпилек также возможны две ситуации, когда остатки K_N и K_C имеют разные или одинаковые конформации (рис. 6в). В первом случае в пространстве между шпильками A и B их боковые цепи направлены навстречу друг другу, при этом обе цепи располагаются на расстояниях ван-дер-ваальсовых контактов атомов. Энергия дисперсионных взаимодействий между углеводными цепями в таком «стэкинге» $(b_1b_2)_n l(b_1b_2)_n$ составляет ~ -17 ккал/моль (табл. 6). Если же остатки K_N и K_C имеют одинаковые конформации, как, например, в «стэкинге» $(b_1b_2)_n l(b_2b_1)_n$, показанном в правой части рис. 6в, в пространстве между β -шпильками B и C оказываются сближенными боковые цепи остатков K_N и $(K\pm 1)_C$ (значение угла χ_1 остатка K_N равно 60° , а остатков $(K+1)_C$ и $(K-1)_C - -60^\circ$). Энергия взаимодействия гликозилированного остатка K_N как с остатком $(K+1)_C$, так и с остатком $(K-1)_C$ равны ~ -8 ккал/моль (табл. 6), и в сумме также составляют ~ -17 ккал/моль.

Конформационный шейп параллельного баррела можно представить в следующем виде:



Из приведенных выше расчетных результатов следует, что и в этом типе баррела смещение одного тяжа относительно другого на один остаток в звене $\beta l\beta$ не сопровождается проигрышем в энергии невалентных взаимодействий между углеводными цепями этих β -тяжей (табл. 6). Поэтому можно предположить, что как для баррела с параллельными шпильками, так и для баррела с антипараллельными шпильками существует возможность практически свободного скольжения соседних β -шпилек друг относительно друга в параллельных плоскостях. Далее, близость энергетических параметров «стэкинга» в двух типах баррела указывает на возможность параллельного и антипараллельного расположения β -шпилек в молекуле ГСПП.

Важно подчеркнуть, что энергетическая стабильность упаковки β -шпилек в барреле обусловлена только углевод-углеводными невалентными взаимодействиями, энергии которых приведены в табл. 6.

Также следует отметить, что для самих О-гликозидных углеводных цепей, выделенных из ГСПП, характерно образование компактных Y-об-

разных структур с эффективными невалентными взаимодействиями моносахаридных остатков разных антенн [20]. Более того, эти углеводные цепи имеют такую пространственную форму, которая допускает межмолекулярные взаимодействия между ними.

Из изложенного следует, что структура β -баррела для гликопротеина с большим содержанием О-гликозидных углеводных цепей удовлетворяет критерию плотной упаковки углеводных цепей вокруг пептидного остова, который был сформулирован на основе экспериментальных исследований ГСП [6]. Более того, возможность смещения β -шпилек в барреле друг относительно друга позволяет образовать молекуле ГСП наиболее компактную структуру. Вместе с тем в структуре баррела концевые остатки углеводных цепей, представляющие собой детерминантные сахара, доступны для межмолекулярных взаимодействий, например, с антителами, благодаря чему ГСП могут выполнять свои биологические функции. Эти соображения позволяют считать β -баррел важным структурным элементом рассматриваемого класса гликопротеинов.

В заключение остановимся на оценке размеров баррела, который может образовать молекула ГСП. Образец ГСП со специфичностью Н, на котором было проведено акваметрическое исследование [6], представляет собой фрагмент полной цепи ГСП, который включает все гликозилированные остатки Ser и Thr. Этот фрагмент имеет длину ~ 440 остатков. Помимо Ser и Thr в нем представлены еще практически только остатки трех видов: Pro, Ala и Gly [3].

Поскольку β -шпилька вместе с петлей l звена β/β состоит из 20–25 остатков, молекула ГСП может представлять собой β -баррел, включающий в себя ~ 20 β -шпилек. С учетом размеров β -шпилки (толщина ~ 14 Å, длина ~ 70 Å, ширина ~ 55 Å) такой баррел имеет высоту ~ 280 Å и ширину ~ 60 – 70 Å. Следовательно, в данной модели молекула ГСП имеет форму удлинненного стержня с осевым отношением $\sim 0,25$. Экспериментально определенный фактор дисимметрии молекул ГСП составляет 0,25 [6].

Таким образом, в данной работе удалось показать, что по стереохимическим условиям образование О-гликозилпротеиновой структуры, в которой полипептидный остов покрыт слоем плотноупакованных углеводных цепей, возможно. Наличие компактной углеводной оболочки в молекулах ГСП демонстрирует уникальную ситуацию, когда в первую очередь углевод-углеводные взаимодействия определяют пространственную структуру гликопротеина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Watkins W. M.* // *Glycoproteins*. V. 5./Ed. Gottschalk A. BBA Library. 1–72. Pt B. P. 830–831.
2. *Деревицкая В. А.* // *Прогресс химии углеводов/Ред. Торгов И. В. М.: Наука, 1985. С. 97–115.*
3. *Derevitskaya V. A., Likhoshervstov L. M., Martynova M. D., Kochetkov N. K.* // *Carbohydr. Res.* 1983. V. 120. P. 85–94.
4. *Goodwin S. D., Watkins W. M.* // *Eur. J. Biochem.* 1974. V. 17. № 2. P. 371–382.
5. *Derevitskaya V. A., Arbatsky N. P., Kochetkov N. K.* // *Eur. J. Biochem.* 1978. V. 86. № 2. P. 423–437.
6. *Хургин Ю. И., Шерман Ф. Б., Лихошерстов Л. М., Маргынова М. Д.* // *Докл. АН СССР.* 1983. Т. 268. № 2. С. 502–505.
7. *Липкинд Г. М., Аванов А. Я., Кочетков Н. К.* // *Биоорганическая химия.* 1982. Т. 8. № 4. С. 512–523.
8. *Деревицкая В. А., Лихошерстов Л. М., Маргынова М. Д., Кочетков Н. К.* // *Докл. АН СССР.* 1972. Т. 203. № 3. С. 700–703.
9. *Шульц Г., Ширмер Р.* *Принципы структурной организации белков.* М.: Мир, 1982.
10. IUPAC – IUB Commission on Biochemical Nomenclature // *J. Mol. Biol.* 1970. V. 52. № 1. P. 1–17.
11. *Kreissler M. A., Arkhipova S. F., Lipkind G. M., Popov E. M.* // *J. chim. phys.* 1974. V. 71. № 6. P. 907–912.
12. *Scott R. A., Scheraga H. A.* // *J. Chem. Phys.* 1966. V. 44. № 8. P. 3054–3068.
13. *Chou P. Y., Fasman G. D.* // *Biochemistry.* 1974. V. 13. № 2. P. 211–222.
14. *Chou P. Y., Fasman G. D.* // *J. Mol. Biol.* 1977. V. 115. № 2. P. 135–175.
15. *Bohak Z., Katchalski E.* // *Biochemistry.* 1963. V. 2. № 2. P. 228–237.
16. *Poljak R. Y., Amzel L. M., Phizackerly R. P.* // *Progr. Biophys. and Molec. Biol.* 1976. V. 31. P. 67–93.
17. *Birktoft J. J., Blow D. M.* // *J. Mol. Biol.* 1972. V. 68. № 1. P. 187–240.

18. Quijcho F. A., Lipscomb W. N. // *Adv. Protein Chem.* 1972. V. 25. P. 1-78.
19. Banner D. W., Bloomer A. C., Petsco C. A., Phillips D. C., Pogson C. I., Wilson I. A., Corran P. H., Furth A. J., Millman J. R., Offord R. E., Priddle J. D., Waley S. G. // *Nature*. 1975. V. 255. № 5510. P. 609-614.
20. Вероевский В. Е., Липкинд Г. М., Кочетков Н. К. // *Бюллетень химии*. 1983. Т. 9. № 2. С. 254-265.

Поступила в редакцию
31.X.1988

PRINCIPLES OF SPATIAL ORGANIZATION OF BLOOD GROUP GLYCOPROTEINS

LIPKIND G. M., AVANOV A. Ja.

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

Theoretical conformational analysis of O-glycosylated polypeptide chain has been carried out. It is shown that formation of a regular structure is possible, in which the peptide backbone is covered by a layer of well-packed carbohydrate side chains. A β -barrel is proposed as the spatial model of blood group-specific glycoproteins; it consists of glycosylated β -hairpins, which interact if they are sterically close. In this β -barrel the peptide backbone forms an inner «tunnel» which is isolated by the compact carbohydrate coat.