

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

MAŁGORZATA PRZYBYŁO Zakład Fizjologii Zwierząt Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński R. Ingardena 6, 30-060 Kraków E-mail: kloc@zuk.iz.uj.edu.pl

## BUDOWA I SYNTEZA ŁAŃCUCHÓW CUKROWYCH GLIKOPROTEIN

### GLIKOPROTEINY

Glikoproteiny są białkami posiadającymi kowalencyjnie przyłączone łańcuchy cukrowe (rys. 1). Połączone z białkiem glikany są dużymi, hydrofilowymi strukturami fizycznie dominującymi na powierzchni polipeptydu. Mogą one stanowić od 2% do 65% całej masy glikoproteiny (tab. 1). Wysycenie łańcuchów polipeptydowych jednostkami oligosacharydowymi jest odmienne i charakterystyczne dla danego białka. Oligosacharydy mogą być rozłożone w miarę równomiernie wzdłuż całego łańcucha (jak np. w kwaśnej  $\alpha_1$ -glikoproteinie; SCHMID i współaut. 1977) lub też mogą być skupione tylko w ściśle określonym fragmencie polipeptydu danej glikoproteiny (jak np. na C-końcu polipeptydu glikoprotein błonowych).



Rys. 1. Różne typy łańcuchów cukrowych występujących w glikoproteinach.

# PODŁOŻE STRUKTURALNEJ RÓŻNORODNOŚCI ŁAŃCUCHÓW OLIGOSACHARYDOWYCH

Strukturalna różnorodność łańcuchów oligosacharydowych, znajdowanych w glikoproteinach, jest ogromna. Ma ona podłoże zarówno biologiczne, jak i chemiczne. Biologiczna różnorodność wynika z faktu, że podczas gdy białka są bezpośrednimi produktami genów,

Tabela 1. Zawartość	% węglowodanów	w wybranych
glikoproteinach		

Glikoproteina	% zawartość węglowodanów		
monoklonalne przeciwciała	od 2 do 10		
erytropoetyna	40		
hormony	od 15 do 30		
gp 120	40		
tkankowy aktywator plazminogenu	30		
GM-CSF*	20		
lamp-1, lamp-2**	od 55 do 65		

<sup>•</sup>GM-CSF — czynnik stymulujący kolonie granulocytow i makrofagów, <sup>••</sup>lamp-1, lamp-2 — białka związane z błoną lizosomów (ang. lysosome-associated membrane proteins)

glikany są tylko ich pośrednimi produktami. Oznacza to, że glikozylacja danego białka zależy od gatunku, typu komórki czy tkanki, w której jest syntezowane oraz że łańcuch polipeptydowy koduje informacje określające jego własny wzór glikozylacji. Na chemiczną różnorodność glikanów wpływa fakt, że oligosacharydy w przeciwieństwie do innych dużych biologicznych polimerów, kwasów nukleinowych czy białek, są cząsteczkami rozgałęzionymi, a ich monomery mają zdolność do łączenia się ze sobą na więcej niż jeden sposób. Parametry warunkujące chemiczne zróżnicowanie to:

— liczba i rodzaj monosacharydów — oligosacharydy są budowane zasadniczo z kilku różnych cukrów prostych (tab. 2), przy czym w skład poszczególnych jednostek wchodzi tylko kilka z nich; wszystkie monosacharydy z wyjątkiem L-fukozy należą do szeregu D-; fukoza i kwasy sjalowe występują jedynie w formie anomerycznej  $\alpha$ , N-acetyloglukozoamina w formie  $\beta$ , a pozostałe cukry proste zarówno w postaci  $\alpha$ , jak i  $\beta$ ; aminocukry występują jedynie jako N-acylowe pochodne; dotychczas zidentyfikowano 35 różnych kwasów sjalowych wywodzących się z dwóch podstawowych kwasów: N-acetyloneuraminowego i N-glikoliloneuraminowego i będących ich O-acylowymi, O-metylowymi, O-siarczanowymi lub O-fosforanowymi pochodnymi;

— anomeryczność wiązania glikozydowego wszystkie cukry proste są połączone za pomocą wiązań O-glikozydowych, które mogą być izomerami α lub β-pozycja wiązania glikozydowego — wiązanie glikozydowe jest tworzone między węglem C-1 jednego cukru prostego (z wyjątkiem kwasów sjalowych, w których jest tworzone między węglem C-2) a jedną z grup hydroksylowych drugiego monosacharydu w pozycji C-2, C-3, C-4 lub C-6 dla heksoz, lub w pozycji C-3, C-4 lub C-6 dla N-acetyloheksozoamin;

 tworzenie rozgałęzień – do danego cukru prostego może być przyłączonych od 2 do 4 monosacharydów;

 kowalencyjne modyfikacje – przyłączenie grup siarczanowych, fosforanowych, acylowych i metylowych do monosacharydów.

Wszystkie te parametry dają możliwość tworzenia olbrzymiej liczby różnorodnych struktur ze stosunkowo niewielkiej liczby monosacharydów. Jednak wiele teoretycznie możliwych struktur nie zostało do tej pory znalezionych w glikoproteinach wyższych *Eukaryota*.

Tabela 2. Monosacharydy występujące w glikanach *Eukaryota.* Reszty glukozy nie występują w "dojrzałych" glikanach

Monosacharyd	Skrót	Donor cukru	Anomer	Miejsce wiązania przy węglu
D-galaktoza	Gal	UDP-Gal	alfa i beta	alfa 3, beta 3, 4, 6
N-acetylo-D-galaktozoamina	GalNAc	UDP-GalNAc	alfa i beta	alfa 3, beta 4
D-glukoza	Glc	UDP-GLc, Dol-P-Glc	alfa	alfa 2, 3
N-acetylo-D-glukozoamina	GlcNAc	UDP-GlcNAc	beta	beta 2, 3, 4, 6
D-mannoza	Man	GDP-Man, Dol-P-Man	alfa i beta	alfa 2, 3, 6; beta 4
l-fukoza	Fuc	GDP-Fuc	alfa	alfa 2, 3, 4, 6
kwas N-acetyloneuraminowy	NeuNAc	CMP-NeuNAc	alfa	alfa 3, 6, 8
kwas N-glikoliloneuraminowy	NeuGc	CMP-NeuGc	alfa	alfa 3, 6

### BUDOWA ŁAŃCUCHÓW CUKROWYCH U WYŻSZYCH EUKARYOTA

Łańcuchy cukrowe przyłączone do glikoprotein klasyfikuje się ze względu na rodzaj wiązania glikozydowego z polipeptydem. Oligosacharydy mogą być połączone z polipeptydem wiązaniem N-glikozydowym lub O-glikozydowym, w związku z czym dzieli się je na dwie grupy: N-glikany i O-glikany. Większość białek ma kilka miejsc N- i/lub O-glikozylacji. N-glikany są usytuowane zwykle na  $\beta$ -skręcie łańcucha polipeptydowego, a O-glikany wykazują tendencję do skupiania się. Dodatkowo, glikoproteiny powierzchniowe komórek mogą łączyć się z warstwą lipidową błony za pośrednictwem kotwicy glikozylofosfatydyloinozytolowej.

#### BUDOWA N-GLIKANÓW

N-glikany posiadają N-acetyloglukozoaminę na redukującym końcu i są połączone z łańcuchem polipeptydowym za pośrednictwem azotu grupy amidowej asparaginy. Wszystkie posiadają wspólną pentasacharydową część korową – zwaną trimannozylową strukturą korową (rys. 2): Man $\alpha$ 1-6 (Man $\alpha$ 1-3) Man $\beta$ 1-4 GlcNAc β1-4 GlcNAc. Na podstawie budowy i położenia struktur dołączonych do trimannozylowej struktury korowej N-glikany dzieli się na cztery grupy (Kornfeld i Kornfeld 1985, Żak 1990): – N-glikany typu wielomannozowego: są najstarszymi jednostkami z punktu widzenia ewolucji i posiadają tylko reszty mannozylowe dołączone do trimannozylowej struktury korowej; u ssaków największe jednostki tej klasy zawierają 6 reszt mannozylowych dołączonych do struktury korowej, a mniejsze jednostki są uboższe o od 1 do 5 reszt mannozylowych; w hydrolazach lizosomowych stwierdzono obecność reszt fosforanowych połączonych wiązaniami estrowymi z węglem C-6 mannoz łańcucha zewnętrznego oligosacharydu.

– N-glikany typu hybrydowego: mają cechy glikanów typu kompleksowego i wielomannozowego: jedna lub dwie reszty α-mannozylowe są przyłączone do mannozy α1-6 trimannozylowej struktury korowej, jak w przypadku typu wielomannozowego, a zewnętrzne łańcuchy (anteny), takie jak w N-glikanach typu kompleksowego, są przyłączone do mannozy α1-3 trimannozylowej struktury korowej. Obecność lub brak przyłączonych do trimannozylowej struktury korowej dodatkowych monosacharydów: korowej fukozy (tj. Fuc przyłączonej w pozycji C-6 do proksymalnej N-acetyloglukozoaminy) i przedzielającej N-acetyloglukozoaminy (tj. GlcNAc przyłączonej w pozycji C-4 do  $\beta$ -mannozy) powoduje dalsze strukturalne zróżnicowanie tej grupy.

— N-glikany typu kompleksowego: nie posiadają innych reszt mannozylowych niż te dołączone do trimannozylowej struktury korowej; ich zewnętrzne łańcuchy (anteny) z N-acetyloglukozoaminą na redukującym końcu są przyłączone do dwóch reszt  $\alpha$ -mannozylowych trimannozylowej struktury korowej przez różne wiązania; budowa łańcuchów bocznych jest inicjowana przez działanie czterech GlcNAc-transferaz (I, II, IV i V), a dalsza ich elongacja następuje przez dodanie galaktozy, fukozy, kwasów sjalowych i





Fragment w ramce przedstawia trimannozylową strukturę korową wspólną dla wszystkich N-glikanów.

siarczanów. U ssaków liczba anten waha się od dwóch do czterech, a w kurzym jajowodzie stwierdzono ponadto obecność pentaantenowych jednostek (piąta antena powstaje na skutek działania GlcNAc-transferazy VI) (YAMASHITA i współaut. 1982). Obecność lub brak korowej fukozy oraz przedzielającej N-acetyloglukozoaminy, przyłączonych do trimannozylowej struktury korowej, wpływa dodatkowo na ich strukturalne zróżnicowanie. Różne struktury znajdowane na łańcuchach zewnętrznych N-glikanów typu kompleksowego przedstawiono na rysunku 3.

—N-glikany typu poli-N-acetylolaktozoaminowego: zawierają powtarzające się jednostki Galβ1-4GlcNAcβ1-3 przyłączone do trimannozylowej struktury korowej. Powtarzające się jednostki mogą być rozgałęzione na skutek



А

### 2. diantenowa

+/- GlcNAc $\beta$ 1 +/- Fuc $\alpha$ 1 GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1 4 GlcNAc $\beta$ 1 4

## 3. triantenowa 2,4 - rozgałęziona

+/- GlcNAc $\beta$ 1 +/- Fuc $\alpha$ 1 GlcNAc $\beta$ 1-2 Man $\alpha$ 1 4 GlcNAc $\beta$ 1 6 GlcNAc $\beta$ 1 4 Han $\alpha$ 1 4 GlcNAc $\beta$ 1 4 Han $\alpha$ 1

### 4. triantenowa 2,6 - rozgałęziona

 $\begin{array}{c} GlcNAc\beta I & +/- \ GlcNAc\beta I & +/- \ Fuc \, \alpha I \\ & 6 \\ GlcNAc\beta I & 2 \\ GlcNAc\beta I & -2 \\ GlcNAc\beta I & -2 \\ Man \, \alpha I & -4 \\ GlcNAc\beta I & -4$ 

### 5. tetraantenowa

### 6. pentaantenowa

 $\begin{array}{c|c} GlcNAc\beta1 & +/- \ GlcNAc\beta1 & +/- \ Fuc\alpha1 \\ GlcNAc\beta1 & 4 \ Man \alpha1 & | & | \\ GlcNAc \beta1 & 2 \\ GlcNAc \beta1 & 4 \ Man \alpha1 & 3 \\ \end{array}$ 

NeuNAcα2 | 6 NeuNAcα2----Galβ1-----3GlcNAcβ1-----

B

GalBI-3GlcNAcBI-

Fucα1-2Galβ1-3GlcNAcβ1-

NeuNAcα2-2Galβ1-3GlcNAcβ1-4 4 Fucα1

NeuNAc $\alpha$ 2-----6(3)Gal $\beta$ 1-----4GlcNAc $\beta$ 1-----

Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-

+/- Fucα 1-2Galβ 1-4GlcNAcβ 1----3 | Fucα 1

NeuNAc
$$\alpha$$
2-----3Gal $\beta$ I-----4GlcNAc $\beta$ I-----  
|  
|  
Fuc $\alpha$ 1

SO4 --- 4 Galβ1--- 4GlcNAcβ1----

Rys. 3. Jednostki kompleksowe. A – typy rozgałęzień, B – różne łańcuchy zewnętrzne (anteny).

działalności  $\beta$ 1,6 GlcNAc-transferazy tworzącej struktury Gal $\beta$ 1-4 GlcNAc $\beta$ 1-6 (Gal $\beta$ 1-4 GlcNAc $\beta$ 1-3)Gal. Jednostki te mogą zawierać przedzielającą N-acetyloglukozoaminę i korową fukozę.

#### BUDOWA O-GLIKANÓW

O-glikany w przeciwieństwie do N-glikanów wykazują mniej strukturalnych reguł. Przeważnie posiadają N-acetylogalaktozoaminę na redukującym końcu i są połączone z grupą hydroksylową seryny lub treoniny łańcucha polipeptydowego. Nie mają one jednej wspólnej struktury korowej, lecz może ona być różna, co stanowi podstawę ich klasyfikacji (BROCKHAU-SEN 1993). Najczęściej w O-glikanach występują struktury korowe (przedstawione na rys. 4). W



## BUDOWA KOTWIC GLIKOZYLOFOSFATYDYLOINOZYTOLOWYCH

Kotwice glikozylofosfatydyloinozytolowe (kotwice GPI) są złożonymi glikofosfolipidami



najczęściej występujących w O-glikanach (zaznaczone w ramkach).

Rys. 4. Cztery typy struktur korowych

nielicznych białkach stwierdzono obecność Oglikanów, mających następujące struktury korowe: GlcNAc  $\beta$ 1-6 GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr oraz Gal-NAc  $\beta$ 1-3 GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr. kowalencyjnie przyłączonymi do wielu zewnętrznie umieszczonych białek błony komórkowej *Eukaryota* (THOMAS i współaut. 1990, STEVENS 1995). Wszystkie kotwice GPI mają konserwatywną strukturę korową (rys. 5): etanoloamina-



Rys. 5. Budowa kotwic glikozylofosfatydyloinozytolowych Eukaryota.

Strukturę korową kotwicy GPI wyróżniono kolorem szarym. Etn — Etanolamina, Ins inozytol, Man — mannoza, GlcN — glukozoamina, P — reszta fosforanowa. PO4-6Manα1-2Manα1-6Manα1-4GlcNAcα1-6 myo-inozytol-1-PO4, a jej substytucja i struktura lipidu jest gatunkowo i tkankowo zależna (McCONVILLE i współaut. 1993). Kotwice GPI są dołączane do białek przez wiązanie peptydowe za pośrednictwem grupy amidowej fosfoetanoloaminy. Podstawową ich funkcją jest zapew-



nienie stabilnej asocjacji białek z błonową warstwą lipidową (rys. 6). Ten typ połączenia łańcucha cukrowego do proteiny nie jest procesem glikozylacji, ponieważ cukier nie jest wiązany z łańcuchem polipeptydowym wiązaniem glikozydowym.

> Rys. 6. Porównanie białka transmembranowego i kotwiczonego przez GPI.

> Białko transmembranowe klasy I posiada N-terminalną domenę zewnątrzkomórkową, domenę trans-membranową tworzoną przez około 20 hydrofobowych aminokwasów zwiniętych w  $\alpha$ -helisę i C-terminalną domenę wewnątrzkomórkową. Białko kotwiczone przez GPI ma tylko domenę zewnątrzkomórkową i wiąże się z warstwą lipidową błony za pośrednictwem kotwicy GPI.

### BIOSYNTEZA N-GLIKANÓW W KOMÓRKACH SSAKÓW

Biosynteza N-glikozydowo wiązanych łańcuchów cukrowych glikoprotein obejmuje cztery oddzielne etapy: (i) syntezę prekursora oligosacharydowego, (ii) inicjację N-glikozylacji łańcuchów polipeptydowych, (iii) obróbkę (ang. processing) łańcucha oligosacharydowego związanego z białkiem, (iv) elongację łańcucha oligosacharydowego drogą glikozylacji sekwencyjnej (tj. kolejno następującego po sobie przyłączania reszt monosacharydowych do łańcucha), prowadzącej do jednostek hybrydowych, kompleksowych i poli-N-acetylolaktozoaminowych.

#### SYNTEZA PREKURSOROWEGO OLIGOSACHARYDU

Synteza prekursorowego oligosacharydu związanego z fosfodolicholem zachodzi kotranslacyjnie. Prekursorowy oligosacharyd jest tworzony na lipidowym nośniku — fosforanie dolicholu (Dol-P) zlokalizowanym w błonach RER i stanowiącym kotwicę dla rosnącego prekursora. Fosfodolichol zawiera 17–24 reszt izoprenoidowych w tkankach kręgowców, a 14–17 reszt u drożdży. Jego droga biosyntezy jest identyczna ze szlakiem biosyntezy cholesterolu (cykl kwasu mewalonowego u zwierząt) do pirofosforanu farnezylu (HUBBARD i IVATT 1981).

Prekursor oligosacharydowy powstaje na drodze wieloetapowej enzymatycznej glikozylacji w tak zwanym cyklu fosfodolicholowym (Żak 1990, ABEIJON i HIRSCHBERG 1992). Obejmuje on kolejne przeniesienia określonych reszt monosacharydowych z aktywnych donorów na specyficzne akceptory za pośrednictwem swoistych glikozylotransferaz związanych z błoną RER (rys. 7). Donory monosacharydów uczestniczące w reakcji glikozylacji podczas syntezy N-glikanów przedstawiono w tabeli 2. Nukleotydowe pochodne monosacharydów powstają przede wszystkim w cytoplazmie, z wyjątkiem CMP-SA, który jest tworzony w jądrze komórkowym. Synteza Dol-P-Man i Dol-P-Glc następuje na powierzchni cytoplazmatycznej RER.

Glikozylacja fosfodolicholu rozpoczyna się po stronie cytoplazmatycznej od przeniesienia reszty GlcNAc-1-P z UDP-GlcNAc na Dol-P, w wyniku czego powstaje difosfodolichylo-Nacetyloglukozoamina, która jest następnie wydłużana o drugą resztę GlcNAc. Następnym krokiem jest sekwencyjna mannozylacja prowadząca do powstania Man5GlcNAc2-P-P-Dol. Reakcja ta przebiega w cytosolu ponieważ GDP-Man (podobnie jak UDP-GlcNAc) nie może przechodzić przez błonę do wnętrza RER. Struktura ta jest następnie przenoszona do przestrzeni luminalnej RER, gdzie do rosnącego prekursora są dołączane następne cztery reszty mannozylowe i trzy reszty glukozy dostarczane przez fosforan dolicholu (odpowiednio Dol-P-Man i Dol-P-Glc).



Rys. 7. Etapy N-glikozylacji przebiegające w szorstkim retikulum endoplazmatycznym: cykl fosfodolicholowy, inicjacja Nglikozylacji i deglukozylacja.

#### INICJACJA N-GLIKOZYLACJI POLIPEPTYDU

Przeniesienie prekursorowego oligosacharydu (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) z lipidowego nośnika na białko zachodzi *en block* i jest katalizowane przez oligosacharydylo transferazę zależną od Dol-P, związaną z błoną wewnętrzną RER (HUB-BARD i IVATT 1981, KORNFELD i KORNFELD 1985). W komórkach ssaków obecność reszt glukozy w dolichylodifosfotetradekasacharydzie

(Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-P-P-Dol) jest niezbędna do efektywnego przeniesienia oligosacharydu na białko, choć u niższych organizmów obecność Glc nie zawsze jest wymagana.

Oligosacharydylo transferaza zależna od Dol-P, przenosi prekursorowy oligosacharyd na asparaginę tripeptydowej sekwencji Asn-X-Thr/Ser (ang. sequon), gdzie X jest dowolnym aminokwasem z wyjątkiem proliny (KORNFELD i KORNFELD 1985, LIS i SHARON 1993). Czas, w którym N-glikozylacja może zachodzić jest ograniczony. Akceptorowa Asn jest częścią rosnącego polipeptydu, który się zwija. A kiedy białko już ulegnie zwinięciu, potencjalne miejsca Nglikozylacji mogą nie być dostępne dla oligosacharydylo transferazy. Konformacja polipeptydu wokół tripeptydowej sekwencji jest również ważnym czynnikiem. Efektywnej glikozylacji ulegają bowiem te trypletowe sekwencje, które są zlokalizowane na sekwencjach łańcucha polipeptydowego ułatwiających tworzenie β-skrętu i pętli, co zapewnia oligosacharydylotransferazie odpowiednią dostępność (HUB-BARD i IVATT 1981, KORNFELD i KORNFELD 1985).

#### OBRÓBKA ŁAŃCUCHA OLIGOSACHARYDOWEGO ZWIĄZANEGO Z BIAŁKIEM

Po przeniesieniu Glc3Man9GlcNAc2 z donora na łańcuch polipeptydowy, początkowo homogenna pula prekursorowego oligosacharydu podlega serii modyfikacji prowadzących do powstania różnych struktur N-glikanów znajdowanych w dojrzałych glikoproteinach. Poziom, do jakiego łańcuch polipeptydowy jest obrabiany przez glikozydazy, w połączeniu z następującą po tym terminalną glikozylacją, determinuje ostateczną strukturę danego glikanu.

Proces obróbki inicjowany jest niemal niezwłocznie po przeniesieniu prekursorowego oligosacharydu. Glukozydaza I, związany z błoną RER homotetramer, usuwa zewnętrznie położoną  $\alpha 1,2$  wiązaną resztę glukozy, a następnie α1,3 glukozydaza II, będąca homodimerem lub tetramerem, odcina dwie wewnętrznie położone reszty Glc, przekształcając prekursor w jednostkę wielomannozową (MOREMEN i współaut. 1994). Szybkość deglukozylacji jest charakterystyczna dla każdego białka, a czas półtrwania każdej z form jest coraz dłuższy. Powodem, dla którego monoglukozylowane formy mają dłuższy czas półtrwania niż formy diglukozylowane, a te ostatnie — niż triglukozylowane, może być przynajmniej częściowo fakt, że łańcuchy oligosacharydowe pozbawione trzech reszt glukozy mogą ulegać przejściowej reglukozylacji (HELE-NIUS 1994, HAMMOND i współaut. 1994).

Proces reglukozylacji odgrywa istotną rolę podczas zwijania się łańcuchów polipeptydowych w ER, gdyż jest częścią systemu, przez który komórka rozpoznaje nieprawidłowo zwinięte struktury (JAENICKE 1993, HELENIUS 1994, HAMMOND i współaut. 1994). Ponieważ glukozydazy I oraz II retikulum endoplazmatycznego działają wcześnie w procesie obróbki łańcucha oligosacharydowego, jest możliwe, że pewne białka uległy deglukozylacji zanim jeszcze miały okazję związać się z białkami opiekuńczymi ER (ang. chaperones) - kalneksynami (ang. calnexin) i prawidłowo zwinąć. Jeśli białko jest nadal nie zwinięte po usunięciu trzech reszt glukozy, to zachodzi ponowna glukozylacja katalizowana przez glukozylotransferazę UDP-Glc:glikoproteina. Enzym ten działa tylko na nie zwinięte lub zdenaturowane substraty, a glukoza jest dodawana do struktur Man7-9GlcNAc2. Monoglukozylowane oligosacharydy mogą wówczas być wiązane przez kalneksyny, co ułatwia białkom zwijanie się i oligomeryzację.

Po usunięciu trzech reszt glukozy z prekursorowego oligosacharydu i utworzeniu struktury Man9GlcNAc2 następuje usunięcie jednej reszty  $\alpha$ -mannozylowej (KORNFELD i KORNFELD 1985, DANIEL i współaut. 1994, WENG i SPIRO 1996). Odcięcie pojedynczej  $\alpha$  1,2 wiązanej terminalnej reszty mannozylowej ze środkowego odgałęzienia Man9GlcNAc2 jest katalizowane przez  $\alpha$ -mannozydazę I retikulum endoplazmatycznego, co prowadzi do powstania izomeru 8a struktury Man8GlcNAc2 (rys. 8). Początkowe etapy biosyntezy N-glikanów, prowadzące do powstania izomeru 8a struktury Man8GlcNAc<sub>2</sub> zachodzą tak samo w komórkach roślin, drożdży, owadów i ssaków. Niedawno w wątrobie szczura odkryto inny enzym — α-mannozydazę II retikulum endoplazmatycznego, która jest zdolna do hydrolizowania pojedynczej terminalnej reszty Man z α1,6 łańcucha Mang-GlcNAc<sub>2</sub>, w efekcie czego powstaje izomer 8b struktury Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (rys. 8). Trzeci izomer Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> - 8c (rys. 8) może być tworzony przez endomannozydazę, która w normalnych warunkach *in vivo* preferencyjnie hydrolizuje Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Jej obecność stwierdzono w obszarze *cis* aparatu Golgiego.

Białka zatrzymywane normalnie w ER mogą podlegać w jego obrębie dalszej obróbce prowadzącej do powstania łańcuchów oligosacharydowych posiadających pięć - sześć reszt mannozylowych. Jeden enzym zdolny do katalizowania tego procesu — Man9-mannozydazę wyizolowano z wątroby cielęcia i świni (DANIEL i współaut. 1994). Usuwa ona trzy  $\alpha$ 1,2 wiązane reszty mannozylowe z Man9GlcNAc2, w wyniku czego powstaje izomer 6b struktury Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (rys. 8). Ostateczna lokalizacja białka w komórce ma więc wpływ na to, jak dane białko będzie glikozylowane. Białka rezydujące w ER, nie wystawione na działanie glikozylotransferaz zlokalizowanych w aparacie Golgiego mogą mieć tylko oligosacharydy typu wielomannozowego.

Dla większości białek dalsze etapy obróbki łańcuchów oligosacharydowych o strukturze Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> przebiegają w aparacie Golgiego.



Rys. 8. Obróbka N-glikanów w obrębie retikulum endoplazmatycznego (ER) i aparatu Golgiego (AG) katalizowana przez enzymy: 1 — glukozylotransferazę UDP-GlcNAc:glikoproteina ER, 2 —  $\alpha$ -mannozydazę I ER, 3 —  $\alpha$ -mannozydazę II ER, 4 — Mang-mannozydazę ER, 5 — endomannozydazę AG, 6 — mannozydazę I AG.

Enzymy lizosomowe w obszarze cis aparatu Golgiego podlegają fosforylacji reszt mannozylowych, co prowadzi do powstania mannozylo-6-fosforanu (Man-6-P), warunkującego ich późniejszy transport do wnętrza lizosomów (CREEK i SLY 1984, SLEAT i LOBEL 1997). Wbudowywanie reszt fosforanowych w łańcuch oligosacharydowy jest procesem dwuetapowym (VON FIGURA i HASILIK 1986, BARANSKI i współaut. 1990). W pierwszym etapie GlcNAc-1-fosfotransferaza UDP-GlcNAc przenosi jedną lub dwie reszty GlcNAc-1-P z donorowej UDP-GlcNAc na grupę hydroksylową przy C-6 wyselekcjonowych reszt mannozylowych oligosacharydu (rys. 9). W wyniku reakcji powstaje





Rys. 9. Wbudowywanie reszt fosforanowych w łańcuchy oligosacharydowe enzymów lizosomowych.

\* mannozy ulegające fosforylowaniu, # miejsca uprzywilejowane

wiązanie diestrowe, tak zwany przykryty fosforan (ang. covered phosphate). Transport ten jest specyficzny, ponieważ enzym rozpoznaje domenę obecną tylko na enzymach lizosomowych. W drugim etapie zewnętrzne reszty GlcNAc ulegają selektywnemu wycięciu przez N-acetyloglukozoaminylo-1-fosfodiester Nacetyloglukozoaminidazę, co przekształca fosfodiester w tak zwany odkryty mannozylo-6-fosforan (ang. uncovered phosphate). Łańcuchy wielomannozowe mogą zawierać jedną lub dwie reszty fosforanowe.

W aparacie Golgiego wielomannozowe jednostki oligosacharydowe mogą być dalej hydrolizowane przez mannozydazę I aparatu Golgiego, w wyniku czego powstaje Man5GlcNAc2 (rys. 10). Następnie dochodzi do konwersji Man5GlcNAc2 do GlcNAc1Man5GlcNAc2 na skutek działania GlcNAc-transferazy I (rys. 10). Produkt ten jest substratem wyjściowym do syntezy oligosacharydów typu kompleksowego, hybrydowego i poli-N-acetylolaktozoaminowego (KORNFELD i KORNFELD 1985, ŻAK 1990).

Obecność  $\beta$ 1,2 wiązanej reszty GlcNAc w strukturze GlcNAc<sub>1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub> zmienia własności steryczne otoczenia dwóch reszt αmannozylowych wiązanych α1,3 i α1,6 glikozydowo, tak że mogą one być usunięte przez rydu typu hybrydowego (rys. 10).

Czynnikiem determinującym czy N-glikan pozostanie wielomannozowego typu (Man5GlcNAc2) czy będzie dalej obrabiany jest struktura obrabianego białka. Jeśli zwinięty łańcuch polipeptydowy wokół glikozylowanej reszty Asn sterycznie uniemożliwia działalność GlcNAc-transferazy I, to konwersja do typu kompleksowego, hybrydowego czy poli-N-acetylolaktozoaminowego nie następuje, co powoduje utrzymanie struktury wielomannozowej. Również gdy w komórkach brak jest GlcNActransferazy I, glikoproteiny mają jedynie oligosacharydy typu wielomannozowego. Jednostki oligosacharydowe typu hybrydowego powstają, jeżeli w komórce stężenie mannozydazy II aparatu Golgiego jest zbyt niskie lub kiedy jej aktywność jest zahamowana.

### ELONGACJA ŁAŃCUCHÓW OLIGOSACHARYDOWYCH DROGĄ GLIKOZYLACJI SEKWENCYJNEJ

Rozbudowywanie łańcuchów oligosacharydowych do struktur di-, tri-, tetra- i pentaantenowych typu kompleksowego jest możliwe dzięki obecności w danej komórce specyficznych GlcNAc-transferaz. Punkt wyjścia do syntezy całego spektrum N-glikanów typu kompleksowego stanowi monoantenowa struktura Glc-NAc<sub>1</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (BROCKHAUSEN i współaut. 1988, BROCKHAUSEN 1993). Schemat syntezy struktur rozgałęzionych N-glikanów typu kompleksowego przedstawiono na rysunku 10. GlcNAc-transferaza II działająca na jednostkę GlcNAc1Man3GlcNAc2 powoduje powstanie produktu będącego prekursorem do dalszej syntezy di-, tri- i tetraantenowych struktur. Jeśli na jednostkę GlcNAc1Man3GlcNAc2 działa



Rys. 10. Biosynteza jednostek hybrydowych i kompleksowych N-glikanów.

GlcNAc-transferaza III, to przyłączenie przedzielającej GlcNAc powoduje, że struktura ta nie może być dalej rozgałęziana.

Na produkt działania GlcNAc-transferazy II, o ile nie działała na niego wcześniej GlcNActransferaza III, może działać GlcNAc-transferaza IV dodająca  $\beta$ 1,4 wiązaną resztę GlcNAc do  $\alpha$ 1,3 mannozy (powstaje wtedy triantenowa struktura 2,4-rozgałęziona) lub GlcNAc-transferaza V dodająca  $\beta$ 1,6 wiązaną resztę GlcNAc do  $\alpha$ 1,6 mannozy (powstaje wtedy triantenowa struktura 2,6-rozgałęziona). Jeśli na produkty działania GlcNAc-transferazy IV oraz GlcNActransferazy V nie działała GlcNAc-transferaza III, to struktury triantenowe mogą ulegać dalszej rozbudowie do jednostek tetraantenowych pod wpływem działania GlcNAc-transferazy IV (działającej na jednostki 2,6-rozgałęzione) oraz GlcNAc-transferazy V (działającej na jednostki 2,4-rozgałęzione). Na jednostkę tetraantenową, przedzieloną lub nieprzedzieloną, może działać GlcNAc-transferaza VI, co prowadzi do powstania jednostki pentaantenowej (YAMASHITA i współaut. 1982).

Po zainicjowaniu tworzenia anten na skutek działania GlcNAc-transferaz, następuje ich elongacja drogą glikozylacji sekwencyjnej przy udziale galaktozylotransferaz, sjalilotransferaz i fukozylotransferaz (rys. 11). Przyłączanie laktozoaminowego, a  $\beta$ 1,6 GlcNAc-transferaza powoduje powstawanie rozgałęzień. Polilaktozoaminoglikany mogą podlegać fukozylacji. Przyłączenie fukozy do pozycji C-2 terminalnej Gal przy udziale  $\alpha$ 1,2-fukozylotransferazy tworzy determinantę antygenową H prekursora układu grupowego ABO, która może być dalej wydłużany do determinanty antygenowej A przez dodanie GalNAc $\alpha$ 1-3, lub do determinanty antygenowej B przez dodanie Gal $\alpha$ 1-3.

W warunkach panujących w komórce przy wystarczającym poziomie nukleotydowych donorów monosacharydów ostateczna struktura anten łańcuchów N-oligosacharydowych zależy od względnego stężenia glikozylotransferaz oraz ich specyficzności substratowej, a także od dostępności miejsca glikozylacji, na który działa enzym.

#### PROCES N-GLIKOZYLACJI A EWOLUCJA

Proces N-glikozylacji zmieniał się w toku ewolucji. Komórki bakteryjne zasadniczo nie są wyposażone w aparat enzymatyczny umożliwiający im N-glikozylację białek (STANLEY 1992), ale wiele gatunków Archeabacteria i Eubacteria produkuje glikoproteiny, chociaż głównie typy, które nie są znajdowane u innych organizmów (LIS i SHARON 1993). Komórki roślinne posiadają



monosacharydów następuje do wszystkich reszt GlcNAc z wyjątkiem przedzielającej GlcNAc.

W biosyntezie łańcuchów zewnętrznych jednostek typu poli-N-acetylolaktozoaminowego biorą udział trzy enzymy:  $\beta$ 1,4 galaktozylotransferaza,  $\beta$ 1,3 GlcNAc-transferaza i  $\beta$ 1,6 GlcNAc-transferaza (ŻAK 1990). Szlak biosyntezy rozgałęzionych N-acetylolaktozoaminoglikanów przedstawiono na rysunku 12.  $\beta$ 1,3 GlcNAc-transferaza zwana enzymem wydłużania przenosi resztę GlcNAc z UDP-GlcNAc na C-3 Gal uczestnicząc w tworzeniu liniowego łańcucha

Rys. 11. Tworzenie różnorodnych łańcuchów zewnętrznych (anten) jednostek oligosacharydowych typu kompleksowego i hybrydowego.

R — Manal-(3 lub 6) Man<br/>βl-4GlcNAcβl-4-GlcNAcβl-Asn

reszty Gal i GlcNAc tak samo wiązane jak w ssaczych oligosacharydach, ale ich glikany nie są sjalilowane, co jest typowe dla ssaków (Go-OCHEE i współaut. 1991). Ponadto roślinne oligosacharydy zawierają ksylozę, monosacharyd zwykle nie znajdowany w zwierzęcych glikanach.

W komórkach drożdży wczesne etapy obróbki oligosacharydów, prowadzące do powstania Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, przebiegają tak samo, jak w komórkach ssaków (STANLEY 1992). Jednak późniejsza obróbka w obrębie aparatu Golgiego przebiega już inaczej (STANLEY 1992, TRIMBLE i



ATKINSON 1986). U większości szczepów dochodzi do elongacji Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> przez dodawanie reszt Man co prowadzi do powstania rodziny wielomannozowych jednostek rdzeniowych Man<sub>9-14</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, z których część może dalej być wydłużana do struktur zawierających 50 i więcej reszt Man (są to struktury mannan).

Komórki owadów mogą natomiast syntezować zarówno oligosacharydy typu wielomannoRys. 12. Synteza liniowych i rozgałęzionych jednostek poli-N-acetylolaktozoaminowych.

R — jednostki kompleksowe.

zowego, jak i kompleksowego, przy czym te ostatnie często są nietypowe dla ssaczych jednostek kompleksowych (STANLEY 1992), lub są produkowane skrócone oligosacharydy (Go-OCHEE i współaut. 1991). Owady produkują głównie asjaloproteiny, ale u *Drosophila melanogaster* obecność kwasów sjalowych stwierdza się we wszystkich etapach rozwojowych (Lis i SHARON 1993).



Rys. 13. Synteza czterech najczęściej występujących struktur korowych O-glikanów (zaznaczonych w ramkach) i ich pochodnych.

kólko — reakcja zaobserwowana tylko w ludzkim jajniku, prostokąt — reakcja zachodząca bardzo wolno

## BIOSYNTEZA O-GLIKANÓW

Biosynteza O-glikanów różni się zasadniczo od syntezy N-glikanów. Każda reszta monosacharydowa dodawana jest kolejno z nukleotydowego donora na nieredukujący koniec łańcucha oligosacharydowego. Dlatego nie jest syntezowany wspólny prekursorowy oligosacharyd i pociąga to za sobą większą heterogenność struktur korowych (ŻAK 1990, BROCKHAU-SEN 1993). Tworzenie O-glikanów jest procesem potranslacyjnym i zachodzi w aparacie Golgiego. Pierwszy monosacharyd — zwykle GalNAc — łączy się z grupą hydroksylową Ser lub Thr pod wpływem GalNAc-transferazy. Często duże nagromadzenie reszt Pro w sąsiedztwie Thr ułatwia glikozylację. Schemat syntezy i elongacji czterech najczęściej spotykanych struktur korowych O-glikanów przedstawiono na rys. 13.

# STRUCTURE AND BIOSYNTHESIS OF THE OLIGOSACCHARIDE MOIETIES FOUND ON GLYCO-PROTEINS

#### Summary

Glycoproteins are proteins having covalently attached oligosaccharide moieties. The structural diversity of oligosacharides found on glycoproteins is enormous. The origins for this diversity are both of chemical and biological nature. The former result from the ability of monosaccharides to combine with each other in a variety of ways, not differing only in sequence and chain length, but also in position, anomery ( $\alpha$  or  $\beta$ ) of linkages, branching points and covalent attachment of sulfate, phosphate, acetyl or methyl groups. The latter derive from the fact that glycans are secondary gene products (there is no template in their biosynthetic machinery). As a result, glycosylation is species- and cell-specific, and is determined by the structure of the protein

backbone. The glycans of glycoproteins can be classified into two groups: N-glycans and O-glycans. All N-glycans contain Man $\alpha$ 1-6 (Man $\alpha$ 1-3)Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc as a common core, called trimannosyl core. On the basis of the structure and location of glycan residues added to the trimannosyl core, N-glycans are further classified into four subgroups: high mannose type, hybrid type, complex type and poly-N-acetyllactosamine type. O-Linked glycans do not share a common core structure but are based on a number of different cores. In addition some glycoproteins have GPI anchors the basic function of which is to afford a stable association of protein with the membranes. The biosynthesis of N-glycans and O-glycans is presented.

#### LITERATURA

- ABEIJON C, HIRSCHBERG C. B., 1992. Topology of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. TiBS 17, 32–36
- BARANSKI T. J., FAUST P. L., KORNFELD S., 1990. Generation of a lysosomal enzyme targeting signal in the secretory protein pepsinogen. Cell 63, 281–291.
- BROCKHAUSEN I., NARASIMHAN S., CHACHTER H., 1988. The biosynthesis of highly branched N-glycans: studies on the sequential pathway and funktional role of N-acetylglucosaminidases I, II, III, IV, V and VI in the biosynthesis of highly branched N-glycans by hen oviduct membranes. Biochem. Cell Biol. 66, 1134–1151.
- BROCKHAUSEN I., 1993. Clinical aspects of glycoprotein biosynthesis. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 30, 65–151.
- CREEK K. E., SLY W. S., 1984. The role of the phosphomannozyl receptor in the transport of acid hydrolases to lysosomes. In Lysosomes in biology and pathology. Elsevier Science Publishers BV, 63–82.
- DANIEL P. F., WINCHESTER B., WARREN C. D., 1994. Mammalian a-mannosidases – multiple forms but a common purpose? Glycobiology 4, 551–566.
- VON FIGURA K., HASILIK A., 1986. Lysosomal enzymes and their receptors. Annu. Rev. Biochem., 55, 167–193.
- GOOCHEE C. F., GRAMER M. J., ANDERSEN D. C., BAHR J. B., RASMUSSEN J. R., 1991. The oligosaccharides of glycoproteins: factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. Bio/Technology 9, 1347–1355.
- HALTIWANGER R. S., HOLT G. D., HART G. W., 1992. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. J. Biol. Chem. 267, 9005–9013.
- HAMMOND C., BRAAKMAN I., HELENIUS A., 1994. Role of Nlinked oligosaccharides, glucose triming and calnexin in

glycoprotein folding and quality control. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 913–917.

- HART G. W., HOLT G. D., HALTIWANGER R. S., 1988. Nuclear and cytoplasmic glycosylation: novel saccharide linkages in unexpected places. TiBS 13, 380–384.
- HELENIUS A., 1994. How N–linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. Mol. Biol. Cell 5, 253–265.
- HUBBARD S. C., IVATT R. J., 1981. Synthesis and processing of asparagine–linked oligosaccharides. Annu. Rev. Biochem. 50, 555–583.
- JAENICKE R., 1993. Role of accesory proteins in protein folding. Curr. Opin. Struct. Biol. 3, 104–112.
- KORNFELD R., KORNFELD S., 1985. Assembly of asparaginelinked oligosaccharides. Annu. Rev. Biochem. 54, 631– 664.
- LIS H., SHARON N., 1993. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. Eur. J. Biochem. 218, 1–27.
- McConville M. J., FERGUSON M. A. J., 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. Biochem. J. 294, 305–324.
- MOREMEN K. W., TRIMBLE R. B., HERSCOVICS A., 1994. Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. Glycobiology 4, 113–125.
- PAQUET M. R., MOSCARELLO M. A., 1985. The modulation of glycosyltransferase activity in Golgi membranes. [W:] Membrane fluidity in biology, t. 4 Cellular aspect, Academic Press, s. 209–245.
- SCHMID K., NIMERG R. B., KIMURA A., YAMAGUCHI H., BINETTE J. P., 1977. The carbohydrate units of human plasma

alpha 1– acid glycoprotein. Biochim. Biophys. Acta 492, 291–302.

- SLEAT D. E., LOBEL P., 1997. Ligand binding specificities of the two mannose 6-phosphate receptors. J. Biol. Chem. 272, 731–738.
- STANLEY P., 1992. Glycosylation engineering. Glycobiology 2, 99–107.
- STEVENS V. L., 1995. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. Biochem. J. 310, 361–370.
- THOMAS J. R., DWEK R. A., RADEMACHER T. W., 1990. Structure, biosynthesis and function of glycosylphosphatidylinosytols. Biochemistry 29, 5413–5422.
- TRIMBLE R. B., ATKINSON P. H., 1986. Structure of yeast external invertase Man<sub>8-14</sub>GlcNAc processing intermedi-

ates by 500-megahertz 1 H NMR spectroscopy. J. Biol. Chem. 261, 9815-9824.

- YAMASHITA K., KAMERLING J. P., KOBATA A., 1982. Structural study of the carbohydrate moiety of hen ovomucoid. Occurance of a series of pentaantennary complex-type asparagine-linked sugar chains. J. Biol. Chem. 257, 12809–12814.
- WENG S., SPIRO R. G., 1996. Evaluation of the early processing routes of N-linked oligosaccharides of glycoproteins through the characterization of Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> isomers: evidence that endomannosidase functions in vivo in the absence of a glucosidase blockade. Glycobiology 6, 861–868.
- ŻAK I., 1990. Glikoproteiny ssaków. PWN, Warszawa.