



УДК 547.962/458:543.63

КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ АНТИФРИЗНОГО  
ГЛИКОПРОТЕИНА

Аванов А. Я., Липкинд Г. М., Кочетков Н. К.

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

Проведен теоретический конформационный анализ возможных регулярных структур антифризного гликопротеина, повторяющимся звеном которого является гликопептид Ala-Ala-Thr ( $\leftarrow 1\alpha\text{GalNAc3} \leftarrow 1\beta\text{Gal}$ ). Показано, что по стереохимическим критериям для него допустимы как  $\alpha$ -спиральная, так и  $\beta$ -структурная конформации. Найдена развернутая конформация с осью симметрии третьего порядка, в которой гидроксильные группы моносахаридных остатков боковых цепей могут образовывать водородные связи с молекулами воды поверхности льда.

Антифризные гликопротеины, выделенные из сыворотки арктических и антарктических рыб, обладают способностью к аномальному понижению температуры замерзания воды и обуславливают адаптацию этих организмов к специфическим температурным условиям [1, 2]. Они представляют собой полимеры, состоящие из повторяющихся трипептидных звеньев Ala-Ala-Thr, в которых остаток треонина гликозилирован галактозил-N-ацетилгалактозаминном: Ala-Ala-Thr ( $\leftarrow 1\alpha\text{GalNAc3} \leftarrow 1\beta\text{Gal}$ )\*. Такие звеньев в активных молекулах содержится от 17 до 50 [1, 2].

Механизм функционирования антифризных гликопротеинов весьма проблематичен. Ряд исследователей, например, Рэймонд и Де Врис [3], Фини и Йе [1, 2], полагают, что в основе его лежит сродство молекулы гликопротеина к поверхности льда. По их мнению, гидрофильные участки таких молекул способны конкурировать с водородными связями, образуемыми молекулами воды в кристаллической решетке льда. В пользу этого предположения свидетельствует близкое соответствие между структурой моносахаридных остатков и пространственной ячейкой льда. Поэтому достаточно небольших нарушений в пространственной структуре льда, чтобы образование водородных связей гликопротеином с поверхностью льда приводило к напряжению и ослаблению водородных связей между молекулами воды на его поверхности [2]. Возможность связывания гликопротеинов зародышами льда с помощью водородных связей следует из спектров комбинационного рассеяния света замороженных растворов гликопротеинов [4]. Не исключено, что такое взаимодействие, приводит к ингибированию роста кристаллов льда.

В настоящей работе изложены результаты теоретического конформационного анализа возможных регулярных конформаций антифризного гликопротеина. Самыми стабильными представителями вторичной структуры полипептидов являются  $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -структура. Поэтому нами рассматривались конформации гликопротеина, в которых геометрические параметры (углы вращения в основной цепи) близки к таковым в этих двух пространственных формах.

Методика конформационного анализа гликопептидов, параметризация потенциальных функций и отсчет углов вращения описаны нами в сообщении [5]. В качестве начальных приближений для углов вращения в гликозилированном остатке треонина (рис. 1) были взяты значения, полученные при расчете молекулы  $\text{CH}_3\text{CO-Thr} (\leftarrow 1\alpha\text{GalNAc3} \leftarrow 1\beta\text{Gal})-\text{NHCH}_3$  [5]. На-

\* Все аминокислоты — L-конфигурации, моносахариды — D-конфигурации. Дисахаридное звено в изображении молекулы гликопротеина в ряде случаев обозначено символом СНО.

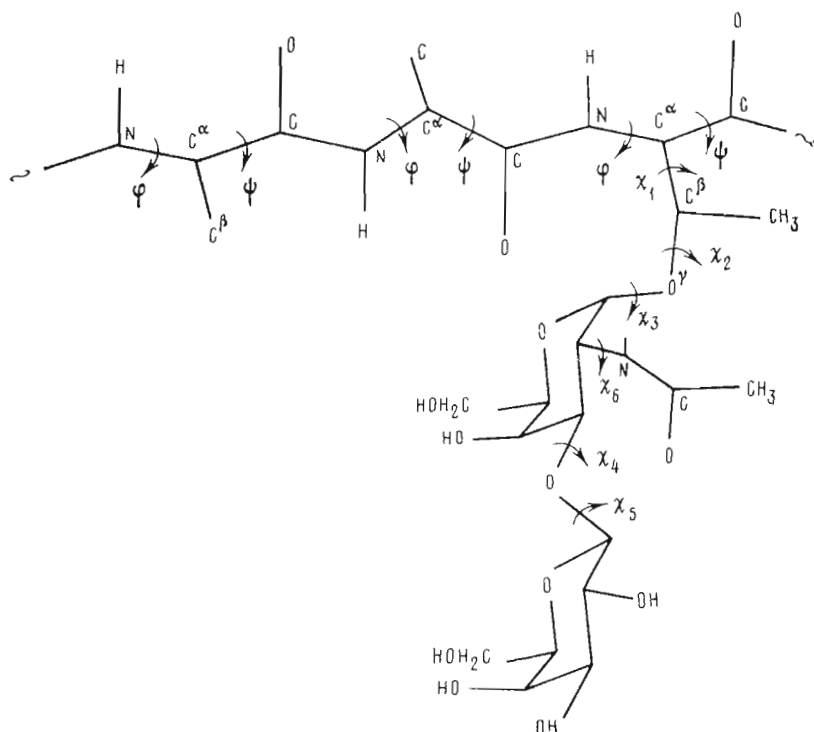


Рис. 1. Модель повторяющегося звена антифризного гликопротеина Ala-Ala-Thr( $\leftarrow 1\alpha\text{GalNAc3}\leftarrow 1\beta\text{Gal}$ ) с указанием углов вращения

помним, что оптимальные углы вращения вокруг связей C1—O и O—C3 ( $\chi_3$  и  $\chi_4$ ) между остатками дисахаридного звена равны 60, 20 или 40 и  $-40^\circ$ . Угол  $\chi_3$  (C1—O') соответствует *gosh*-ориентации связи O'—O<sup>B</sup> относительно связи C1—O5 кольца N-ацетилгалактозамина ( $-60^\circ$ ). Для связей C <sup>$\alpha$</sup> —C <sup>$\beta$</sup>  и O'—C1 наиболее приемлемо *транс*-расположение ( $\chi_2$   $180^\circ$ ). Угол  $\chi_1$  (C <sup>$\alpha$</sup> —C <sup>$\beta$</sup> ) принят равным  $-60^\circ$  (см. рис. 2 в [5]). Это вызвано тем, что, по данным расчета, в  $\alpha$ -спирали ориентации боковой цепи гликозилированного остатка, которым соответствуют значения угла  $\chi_1$  60 или  $180^\circ$ , недопустимы из-за невалентных отталкиваний с пептидным остовом. В случае развернутых конформаций при  $\chi_1$  60 или  $180^\circ$  углы вращения  $\phi$  (C <sup>$\alpha$</sup> —N) и  $\psi$  (C <sup>$\alpha$</sup> —C') у остатков треонина [6] сильно отличаются от тех, которые наблюдаются в  $\beta$ -структуре. В белках угол  $\chi_1$   $-60^\circ$  для остатков треонина представлен с максимальным весом [7].

Поиск оптимальной правой  $\alpha$ -спиральной конформации гликопротеина [Ala-Ala-Thr(CHO)]<sub>n</sub> был разбит на два этапа. На первом этапе проведен расчет правой  $\alpha$ -спирали полиаланина при принятых во внимание средних параметрах пептидной единицы. При минимизации потенциальной энергии получены следующие значения углов вращения в основной цепи:  $\phi$   $-64,6^\circ$  и  $\psi$   $-45,8^\circ$ . Это весьма близко к приводимым в литературе параметрам стандартной  $\alpha$ -спирали ( $-58$  и  $47^\circ$  соответственно [8]). На втором этапе находили допустимую упаковку дисахаридных звеньев на поверхности  $\alpha$ -спирального остова. С этой целью для всего полимера с небольшим шагом ( $5^\circ$ ) строились конформационные карты  $\chi_2$ — $\chi_3$  и затем, с учетом уточненных значений угла  $\chi_2$ , карты  $\chi_1$ — $\chi_2$ . Найденные таким образом допустимые значения углов  $\phi$ ,  $\psi$  и  $\chi_1 \dots \chi_6$  служили нулевыми приближениями при минимизации потенциальной энергии конформации всего гликопротеина, при этом углы вращения остатков аланина и гликозилированных остатков треонина оптимизировались независимо. Углы вращения самой низкоэнергетической  $\alpha$ -спиральной конформации гликопротеина приведены в таблице. В  $\alpha$ -спирали допустимое значение угла  $\chi_1$  более чем на  $25^\circ$  отличается от его значения в конформации R свободного гликозилированного остатка ( $-49^\circ$ , [5]).

Углы вращения (град) низкоэнергетических структур гликопротеина  
Ala-Ala-Thr ( $\leftarrow 1\alpha\text{GalNAc3} \leftarrow 1\beta\text{Gal}$ )

Тип конформации	Ala		Ala	
	$\varphi$	$\psi$	$\varphi$	$\psi$
$\alpha$ -Спираль	-64,3	-45,2	-64,3	-45,2
Антипараллельная $\beta$ -структура	-145,1	160,2	-145,1	160,2
$C_2$ -Симметричная спираль	-94,3	150,9	-94,3	150,9

Тип конформации	Thr							
	$\varphi$	$\psi$	$\chi_1$	$\chi_2$	$\chi_3$	$\chi_4$	$\chi_5$	$\chi_6$
$\alpha$ -Спираль	-64,2	-46	-74,5	155,1	-53,1	18,9	60,2	-4,1
Антипараллельная $\beta$ -структура	-147,1	150	-65	162,4	-42,4	26,0	52,6	180
$C_2$ -Симметричная спираль	-93,5	146,3	-60,1	166,3	-40,5	20,3	58,8	179

Характерной особенностью  $\alpha$ -спиральной структуры является возможность взаимодействия остатков, расположенных вдоль пептидной цепи в первой — пятой и первой — четвертой позициях. В данном конкретном примере энергии взаимодействия гликозилированного  $n$ -го остатка треонина с остатком аланина  $n-4$  и остатком треонина  $n-3$  составляют  $-7,5$  ккал/моль. Энергия дисперсионных взаимодействий соседних дисахаридных звеньев (связанных с первым и четвертым вдоль цепи остатками треонина) равна  $-4,5$  ккал/моль. Таким образом, по стереохимическим критериям образование правой  $\alpha$ -спирали гликопротеином, в котором гликозилирован каждый четвертый аминокислотный остаток, вполне реально. Спектры комбинационного рассеяния света антифризных гликопротеинов с высокой молекулярной массой указывают на присутствие  $\alpha$ -спиральной структуры как в твердых образцах, так и в растворе [4].

Рассмотрим развернутые конформации гликопротеина. Если принять в качестве нулевых приближений (для варьируемых параметров) значения углов вращения в оптимальных конформациях остатков, соответствующих области  $B$  конформационных карт ( $b_i$  и  $B_i$  в случае гликозилированного треонина, см. табл. 2 в [5]), а также значения углов вращения стандартных  $\beta$ -структур ( $\varphi -140^\circ$  и  $\psi 145^\circ$  в случае антипараллельной формы [8]), то при минимизации потенциальной энергии полимера выделяются два типа структур, в которых углы  $\varphi$  и  $\psi$  равны приблизительно  $-130$ ,  $150$  и  $-95$ ,  $150^\circ$  соответственно.

Конформации первого типа обладают осью симметрии второго порядка и практически совпадают с конформациями пептидных тяжей антипараллельной  $\beta$ -структуры. В оптимальной структуре (таблица) взаимодействия между дисахаридными звеньями отсутствуют. Энергия, приходящаяся на один гликозилированный остаток треонина, в данном случае на 5 ккал/моль выше, чем в  $\alpha$ -спирали. Однако эта оценка относится к изолированной цепи и не учитывает энергии межмолекулярных водородных связей в  $\beta$ -структуре. Вместе с тем  $\beta$ -структурные конформации более предпочтительны по сравнению с  $\alpha$ -спиралью по энергии ближних взаимодействий, так как встраивание гликозилированного остатка треонина в правильную  $\alpha$ -спираль сопряжено с определенными локальными напряжениями.

Развернутые конформации второго типа представляют собой спирали с осью симметрии третьего порядка. Так как в рассматриваемом гликопротеине каждый третий остаток — треонин с углеводной цепью, то все дисахаридные звенья  $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow$  в данной структуре располагаются по одну сторону от оси спирали. Модель наиболее предпочтительного варианта (таблица) показана на рис. 2. В этой конформации энергия диспер-

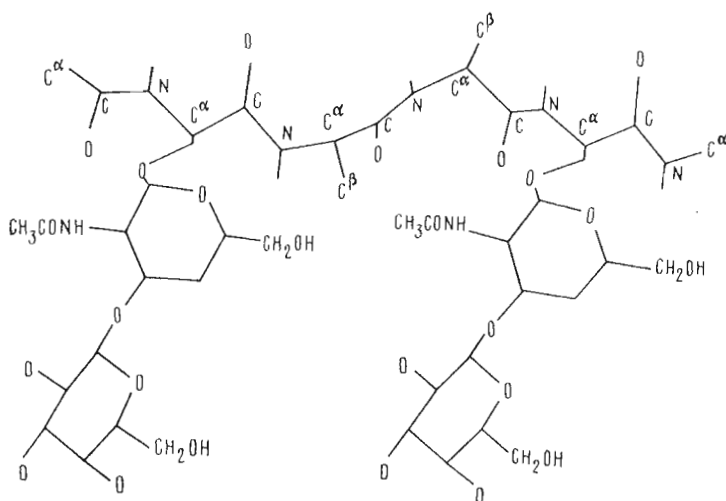


Рис. 2. Молекулярная модель развернутой конформации с осью симметрии третьего порядка фрагмента антифризного гликопротеина

сионных взаимодействий дисахаридных звеньев соседних гликозилированных остатков треонина составляет  $-4,5$  ккал/моль, т. е. они так же эффективны, как и в  $\alpha$ -спирали. В этой структуре также существенны контакты боковой цепи треонина с основными цепями прилежащих остатков. В целом энергия на остаток треонина с углеводной цепью в этой структуре на  $3,5$  ккал/моль выше, чем в  $\alpha$ -спирали.

Физико-химические исследования антифризного гликопротеина показывают, что в твердом состоянии представлены обе формы вторичной структуры полипептидов —  $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -структура с приблизительно одинаковым весом [4], что указывает на энергетическую близость этих двух конформационных состояний. По данным спектров комбинационного рассеяния, в водных растворах гликопротеина имеет место равновесие между  $\alpha$ -спиральной,  $\beta$ -структурной и клубкообразной конформациями [4]. На значительный вклад развернутых структур указывают также измерения квазиупругого рассеяния света [9].

Рассмотрим, в какой из конформаций антифризного гликопротеина возможно его взаимодействие с кристаллической решеткой льда. Естественно допустить, что в такой конформации повторяющиеся расстояния между дисахаридными звеньями должны быть равны или кратны размерам кристаллографической ячейки льда. Лед I имеет гексагональную решетку, в которой размеры ячейки вдоль осей  $a$  и  $c$  равны соответственно  $4,52$  и  $7,35$  Å [10]. Ингибирование зародышей льда вряд ли возможно, когда гликопротеин находится в  $\alpha$ -спиральной или  $\beta$ -структурной конформациях. В первой структуре расстояние между невозстанавливающимися концами ближайших дисахаридных звеньев велики ( $\sim 15$  Å), и эти звенья расходятся от центра спирали в разные стороны под углом  $60^\circ$ . Во второй структуре с осью симметрии второго порядка идентично направленные дисахаридные звенья располагаются также на значительном расстоянии —  $21$  Å. Несмотря на то что это расстояние близко к утроенной длине ячейки льда вдоль оси  $c$  ( $\approx 22$  Å), ингибирование роста кристалла льда вдоль оси  $c$  мало реально по энтропийным соображениям, так как для соответствия решетке необходима жесткая фиксация углов вращения гликопротеина вокруг шести связей вдоль пептидной цепи.

В спиральной конформации с осью симметрии третьего порядка все дисахаридные звенья гликопротеина, как было показано, располагаются параллельно друг другу и по одну сторону от оси спирали, так что все идентичные гидроксильные группы остатков галактозы находятся приблизительно на одной прямой. Повторяющееся расстояние между дисахаридными звеньями равно  $9,7$  Å, что весьма близко к удвоенным размерам ячейки льда вдоль оси  $a$  ( $9,04$  Å). Поэтому не исключено, что в такой кон-

Формации гликопротеин способен ингибировать рост зародышей льда вдоль кристаллографической оси *a*. Действительно, достаточно небольшого изменения углов вращения в пептидной цепи (например, значений углов  $\varphi$  от  $-95$  до  $-85^\circ$ ), чтобы расстояние между углеводными цепями соответствовало  $2a$ . Поляризационные измерения роста кристаллов льда в присутствии антифризного гликопротеина показывают, что в такой ситуации образуются дефектные кристаллы, причем ингибирование роста происходит именно вдоль оси *a* кристалла [4].

В предлагаемой активной конформации гликопротеина ( $\varphi \approx -90^\circ$ ,  $\psi \approx 150^\circ$ ) периферическими являются гидроксильные группы при атомах C3 и C4 остатков галактозы (см. рис. 2). При энергетическом анализе такой структуры было показано, что в ней велики дисперсионные взаимодействия между соседними углеводными цепями, т. е. дисахаридные звенья довольно плотно упакованы. По сравнению с другими свободными гидроксильными группами (при C2- и C6-атомах) указанные выше гидроксилы невосстанавливающих остатков галактозы максимально доступны для межмолекулярных контактов, и скорее всего именно они участвуют в образовании водородных связей с молекулами воды зародышей льда. Для такого утверждения имеются определенные экспериментальные факты. Так, модификация углеводов борагами, при которой имеет место комплексообразование соседних *цис*-гидроксильных групп у атомов C3 и C4 остатков галактозы [11], приводит к инаktivации гликопротеинов. Напротив, энзиматическое окисление гидроксила в шестом положении галактозы не вызывает изменений в активности белка [12]. По данным спектров комбинационного рассеяния света, в образцах антифризных гликопротеинов со значительным весом представлена антипараллельная  $\beta$ -структура. Конформации с осью симметрии третьего порядка пространственно подобны  $\beta$ -структурным тяжам, однако в  $\beta$ -структуру встраиваться не могут. Не исключено, что на границах таких тяжелых полипептидная цепь претерпевает конформационную перестройку, вследствие чего отделившиеся молекулы могут переходить в активную конформацию с осью симметрии третьего порядка. Этому, несомненно, способствует возможность взаимодействий гликопротеина в такой конформации с зародышами льда.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Yeh Y., Feeney R. E. *Accounts Chem. Res.*, 1978, v. 11, № 4, p. 129–135.
2. Feeney R. E., Yeh Y. *Adv. Protein Chem.*, 1978, v. 32, p. 191–282.
3. Raymond J. A., De Vries A. L. *Cryobiology*, 1972, v. 9, № 3, p. 541–547.
4. Tomimatsu Y., Scherer S. R., Yeh Y., Feeney R. E. *J. Biol. Chem.*, 1976, v. 251, № 8, p. 2290–2298.
5. Липкинд Г. М., Аванов А. Я., Кочетков Н. К. *Биоорг. химия*, 1982, т. 8, № 4, с. 512–523.
6. Kreissler M. A., Arkhipova S. F., Lipkind G. M., Popov E. M. *J. Chem. Phys.*, 1974, v. 71, № 6, p. 907–912.
7. Липкинд Г. М., Попов Е. М. *Молекулярн. биология*, 1971, т. 5, № 5, с. 667–679.
8. Ramachandran G. M., Sasisekharan V. *Adv. Protein Chem.*, 1968, v. 23, p. 283–438.
9. Ahmed A. I., Feeney R. E., Osuga D. T., Yeh Y. *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250, № 9, p. 3344–3347.
10. Ормонг Б. Ф. *Структуры неорганических соединений*. М.—Л.: Гос. изд-во техн. лит-ры, 1950.
11. Ahmed A. I., Osuga D. T., Feeney R. E. *J. Biol. Chem.*, 1973, v. 248, № 4, p. 8524–8527.
12. Vandenheede J. R., Ahmed A. I., Feeney R. E. *J. Biol. Chem.*, 1972, v. 247, № 24, p. 7885–7889.

Поступила в редакцию 24.XI.1981

#### CONFORMATIONAL ANALYSIS OF ANTIFREEZE GLYCOPROTEIN

AVANOV A. YA., LIPKIND G. M., KOCHETKOV N. K.

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

Theoretical conformational analysis of possible regular structures of antifreeze glycoprotein with regular repeating unit Ala-Ala-Thr( $\leftarrow 1\alpha\text{GalNac}3\leftarrow 1\beta\text{Gal}$ ) has been carried out. It is shown that  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -structure are possible for glycoprotein on stereochemical grounds. An extended conformation with a 3-fold symmetry axis was found which allows hydrogen bonding between monosaccharide hydroxyls and water molecules of the ice surface.