
Voordracht gehouden in de gewone vergadering van de Afdeling Natuurkunde van de Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen op 29 mei 1995

Structuur en functie van koolhydraatketens van glycoconjugaten

Prof. dr. J.F.G. Vliegthart

Hoogleraar Universiteit Utrecht
Wetenschappelijk Directeur Bijvoet Centrum

Inleiding

Glycoconjugaten zijn verbindingen, die samengesteld zijn uit koolhydraatketens (glyco) covalent gebonden aan andere klassen van verbindingen, bijvoorbeeld eiwitten (glycoproteïnen) of lipiden (glycolipiden).

De koolhydraatgedeelten zijn opgebouwd uit eenvoudige suikers (monosachariden) als bouwstenen. Monosachariden kunnen via glycosidische bindingen oligosachariden vormen. Op deze wijze kan een formidabele diversiteit aan structuren gegenereerd worden uit een beperkt aantal bouwstenen. Deze situatie is opvallend verschillend van die voor andere biopolymeren zoals eiwitten en nucleïnezuren. Bijvoorbeeld voor een trimeer XYZ kunnen voor een peptide 6 isomere structuren uit 3 aminozuren worden afgeleid, terwijl voor een trisacharide bestaande uit 3 verschillende hexoses, 1056 isomeren mogelijk zijn. De enorme diversiteit aan structuren, die bij koolhydraten in principe kunnen optreden, heeft als gevolg dat de structuuropheldering gecompliceerd is, omdat de juiste structuur op rationele gronden onderscheiden moet worden van alle andere (onjuiste) isomere structuren. Voor de structuuropheldering van een grote reeks van koolhydraatketens is door ons de toepassing van hoogveld $^1\text{H-NMR}$ spectroscopie ontwikkeld [1,2].

Glycoproteïnen

De koolhydraatketens van glycoproteïnen worden onderscheiden in N of O type, afhankelijk van het type binding tussen het koolhydraatdeel en een aminozuurzijketen van het eiwit. De N-ketens worden gebonden via N-acetylglucosamine aan de amide stikstof van L-asparagine, en bestaan uit een invariante pentasacharide core die op een aantal manieren kan worden uitgebreid.

De O-ketens kunnen via diverse monosachariden (N-acetyl galactosamine, N-acetylglucosamine, mannose, galactose, glucose, xylose of arabinose) gebonden worden aan de hydroxylgroep van serine, threonine, hydroxylysine, hydroxyproline of tyrosine. De lengte van deze O-ketens kan variëren van monosacharide tot polysacharide. Recent is door ons ontdekt dat aan C-2 van de indolkern van tryptofaan mannose gebonden zijn [3]. Dit is het eerste voorbeeld van C-glycosylering in eiwitten.

In één glycoproteïne kunnen verscheidene glycosyleringsplaatsen bestaan van het N en/of O-type. De ketens kunnen aan ieder van deze glycosyleringsplaatsen het verschijnsel van (micro) heterogeniteit vertonen. Dat wil zeggen dat deze ketens uit een familie van nauw verwante ketens bestaan in een molaire verhouding die karakteristiek is voor het betreffende glycoproteïne. De structuur van de ketens wordt verder gecompliceerd door de mogelijke aanwezigheid van niet-koolhydraat substituenten zoals sulfaat, fosfaat, acyl en alkyl groepen. De bepaling van de primaire structuur kan zelden uitgevoerd worden op het intacte glycoproteïne, meestal is een degradatie tot partiële structuren (glycopeptiden of oligosachariden) noodzakelijk. Glycoproteïnen kunnen zowel in opgeloste vorm als in membraan gebonden vorm voorkomen. In het laatste geval kan het zowel intrinsieke membraan eiwitten betreffen waarin de eiwitketens de biomembraan één of meer malen passeert, als glycoproteïnen die via een glycosyl-fosfatidyl inositol anker aan de membraan gebonden zijn.

Functies

Glycoproteïnen kunnen in levende systemen een grote variëteit aan functies vervullen. Ten dele kunnen deze functies worden toegeschreven aan de eiwitketen en ten dele aan de koolhydraatketens. De koolhydraatketens moduleren zonder enige twijfel de fysico-chemische eigenschappen van deze biomoleculen. De koolhydraatketens bevinden zich vrijwel zonder uitzondering aan de buitenzijde van het molecuul en hebben daardoor een directe invloed op de hydrofobiciteit, lading, hydratatie en driedimensionale structuur. De aanwezigheid van koolhydraatketens geeft een bescherming tegen proteolytische afbraak en tegen thermische denaturering. De antivries glycoproteïnen in antarctische vissen geven een goede illustratie van de betekenis van koolhydraatketens voor de fysico-chemische eigenschappen.

Interessant zijn de biologische functies. Koolhydraatketens van membraan gebonden glycoproteïnen zijn betrokken in cel-cel interacties, en vertonen structuurveranderingen in relatie tot ontwikkeling, groei en onttaarding van groei van de cel; zij fungeren als oppervlakte receptoren voor bacteriën, virussen, lectines, antilichamen, hormonen, en toxines. Voorts spelen de ketens een rol bij het intracellulaire transport en de localisatie van glycoproteïnen; bij de levensduur van circulerende glycoproteïnen; bij de modulatie van immunologische eigenschappen en van activiteit van hormonen en enzymen en bij signaaltransductie.

Herkenningsdeterminanten (Bio-recognition)

Ons onderzoek richt zich in belangrijke mate op de bestudering van koolhydraatstructuren, die betrokken zijn in biologische herkenningprocessen (bio-recognition) en op de moleculaire aspecten van de interactie met complementaire moleculen. In het volgende zullen hiervan enkele recente voorbeelden gegeven worden.

Bevruchting

De interactie tussen de extracellulaire mantel (zona pellucida) van de eicel en een koolhydraatbindend eiwit in de zaadcel speelt een essentiële rol in een herkenningproces dat leidt tot binding en dat met de grootst mogelijke nauwkeurigheid dient te verlopen. De O-gebonden ketens in de zona pellucida worden verantwoordelijk gehouden voor de bioactiviteit in termen van primaire binding. Wij konden aantonen dat de varkens zona pellucida het grootste deel van deze ketens tot een serie met de volgende structuur behoort [4]:



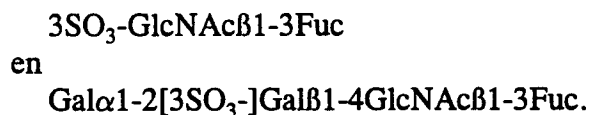
Vastgesteld moet worden of een unieke structuur uit deze serie voor de binding verantwoordelijk is, en zo ja welke. Aangezien eicellen slechts in beperkte mate te verkrijgen zijn, zal het antwoord op deze vraag onder andere via chemische synthese van deze structuren verkregen moeten worden.

Sponscellen

De species specifieke en Ca^{2+} -afhankelijke reaggregatie van gedissocieerde cellen van de marine spons *Microciona prolifera* komt tot stand door middel van een groot extracellulair adhesie glycoproteïne. De koolhydraatketens van dit glycoproteïne zijn voor de aggregatie verantwoordelijk. De oligosacharide determinant in dit herkenningproces, bleek de volgende structuur te hebben [5]:



Dit is een geheel nieuw structuur element. Tevens bleken nog nieuwe gesulfateerde koolhydraatketens een rol te spelen [6]:



Bloedgroepen

Door het monumentale werk van W. Morgan en W.M. Watkins is in de jaren 1950-1965, de structuur van de koolhydraatketens die verantwoordelijk zijn voor de bloedgroep-determinanten A, B en O bekend geworden. Hoewel de aanwezigheid van deze antigenen op de menselijke rode bloedcel heeft geleid tot de classificatie 'bloedgroep antigenen', moet vastgesteld worden dat deze antigenen een wijde verbreiding hebben in weefsels van mens en dier. Naast de hoofdbloedgroepen komen er zeer veel andere voor, die met name

als cel of weefsel antigeen een functie hebben. In dit kader hebben wij onderzoek verricht naar de Sd^a en Cad antigenen. Naast de opheldering van de structuur [7-9] hebben wij thans kunnen vaststellen welke koolhydraatketens in het menselijke Tamm Hosfall glycoproteïne [10] drager zijn van de Sd^a determinant:

Neu Ac α 2-3 [GalNAc β 1-4] Gal β 1-4GlcNAc β 1-

De determinant komt bij mens en dier voornamelijk voor in de nieren en in de darm. Verondersteld wordt dat door de additie van GalNAc β 1-4 aan de adhesie determinant Neu α 2-3Gal β 1-4GlcNAc voor E-coli gemaskeerd wordt. Deze maskering kan dus als een bescherming tegen E-coli infecties worden beschouwd.

Conclusie

Het onderzoek van de complexe koolhydraten ontleent zijn probleemstelling aan biologische fenomenen, in het bijzonder op het gebied van herkenning en interactie. Voor de bestudering van deze processen op moleculair niveau worden methoden aangewend uit de organische, analytische en bio-chemie, terwijl de complexiteit van het gebied een gevolg is van het grote aantal isomere structuren dat voor een eenvoudig oligomeer kan worden gegenereerd.

Afkortingen

NeuAc	N-acetylneuraminezuur
Gal	D-galactose
GlcNAc	N-acetyl-D-glucosamine
Fuc	L-fucose
Pyr	pyruraat

Referenties

- Vliegthart, J.F.G., Dorland, L., en Halbeek, H. van (1983) *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **41**, 209-374
- Kamerling, J.P., en Vliegthart, J.F.G. (1992) *Biol. Magn. Reson.* **10**, 1-194
- Hofsteenge, J., Müller, D.R., Beer, T. de, Löffler, A., Richter, W.J., en Vliegthart, J.F.G. (1994) *Biochemistry* **33**, 13524-13530
- Hokke, C.H., Damm, J.B.L., Penninkhof, B., Aitken, R.J., Kamerling, J.P., en Vliegthart, J.F.G. (1994) *Eur. J. Biochem.* **221**, 491-512
- Spillmann, D., Hard, K., Thomas-Oates, J.E., Vliegthart, J.F.G., Misevic, G., Burger, M.M., en Finne, J. (1993) *J. of Biol. Chem.* **268**, 13378-13387
- Spillmann, D., Thomas-Oates, J.E., Kuik, J.A. van, Vliegthart, J.F.G., Misevic, G., Burger, M.M., en Finne, J. (1995) *J. of Biol. Chem.* **270**, 5089-5097
- Blanchard, D., Cartron, J.-P., Fournet, B., Montreuil, J., Halbeek, H. van, en Vliegthart, J.F.G. (1972) *J. of Biol. Chem.* **258**, 7691-7695
- Williams, J. Marshall, R.D., Halbeek, H. van, en Vliegthart, J.F.G. (1984) in *Carbohydr. Res.* **134**, 141-155

Gillard, B.K., Blanchard, D. Bouhours, J.-F., Cartron, J.-P., Kuik, J.A. van, Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., en Marcus, D.M. (1988) in *Biochemistry* **27**, 4601-4606
Hard, K. Zadelhoff, G. van, Moonen, P., Kamerling, J.P., en Vliegthart, J.F.G. (1992) in *Eur. J. Biochem.* **209**, 895-915