

Ово дело је заштићено лиценцом Креативне заједнице Ауторство – некомерцијално – без прерада¹.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.



¹ Опис лиценци Креативне заједнице доступан је на адреси creativecommons.org.rs/?page_id=74.

"Сва права задржава издавач. Забрањена је свака употреба или трансформација електронског документа осим оних који су експлицитно дозвољени Creative Commons лиценцом која је наведена на почетку публикације."

"Sva prava zadržava izdavač. Zabranjena je svaka upotreba ili transformacija elektronskog dokumenta osim onih koji su eksplicitno dozvoljeni Creative Commons licencom koja je navedena na početku publikacije."



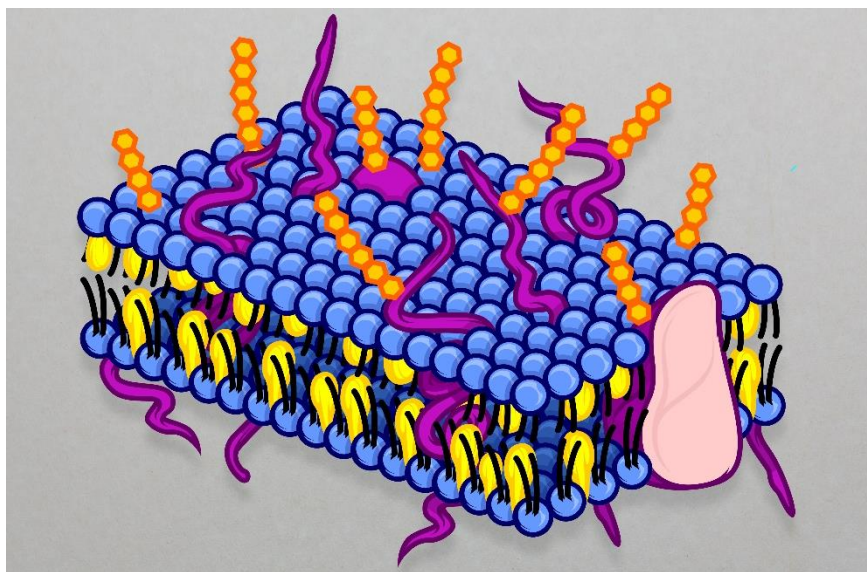
Универзитет у Новом Саду
Природно-математички факултет
Департман за хемију, биохемију и
заштиту животне средине



Др Јована Француз

ГЛИКОБИОЛОГИЈА

УЏБЕНИК



Нови Сад, 2025

Назив уџбеника: Гликобиологија

Аутори: др Јована Француз, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду

Рецензенти: др Дејан Орчић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду

др Бобан Анђелковић, виши научни сарадник, Универзитета у Београду - Хемијског факултета

др Драгана Робајац, виши научни сарадник, Универзитета у Београду - Института за примену нуклеарне енергије

Издавач: Природно-математички факултет, Департман за хемију, биохемију и заштиту животне средине, Трг Доситеја Обрадовића 3, 21000 Нови Сад, Србија

Главни и одговорни уредник: др Срђан Рончевић, редовни професор и декан Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду

ISBN: ISBN-978-86-7031-711-6

CIP - Каталогизација у публикацији
Библиотека Матице српске, Нови Сад

577.1(075.8)

ФРАНЦУЗ, Јована, 1982-

Гликобиологија [Електронски извор] : уџбеник / Јована Француз. - Нови Сад : Природно-математички факултет, Департман за хемију, биохемију и заштиту животне средине, 2025

Начин приступа (URL):

https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/hemija/francuz_glikobiologija.pdf.

- Насл. са насловног екрана. - Опис заснован на стању на дан: 5.5.2025. - Библиографија.

ISBN 978-86-7031-711-6

а) Биохемија - Гликобиологија

COBISS.SR-ID 168034825

Предговор

„Гликобиологија“ је уџбеник намењен студентима мастер академских студија Природно-математичког факултета, смера мастер биохемичар. Намењен је за реализацију теоријског дела наставе у оквиру обавезног предмета Гликобиологија.

Овај материјал треба да помогне студентима да се упознају са терминима гликобиологија, гликом, гликан, гликоконјугати, да лакше савладају градиво из грађе и биосинтезе ових значајних комплексних биомолекула и да повежу њихову структуру са функцијом и могућом биохемијском, фармаколошком, медицинском и технолошком применом.

Први део уџбеника је посвећен структури и биосинтези гликоконјугата у хуманим системима, као и основним појмовима у гликобиологији, а затим следи објашњење њихових до сада откривених функција и могућих примена.

За савладавање овог градива неопходно је основно знање из биохемије, хемије, ћелијске биологије, имунологије и основних експерименталних техника као што су НМР спектроскопија, X-ray кристалографија, масена спектроскопија и друге технике.

Захваљујем се рецензентима на издвојеном времену, уложеном труду и корисним саветима, као и колегама на интересовању и подршци.

Посебно се захваљујем Игору Јоцковићу, Вукашину Ристићу и Душану Басари на помоћи око сређивања слика.

Приликом писања овог уџбеника од велике помоћи су ми биле књиге које покривају област гликобиологије: *Introduction to Glycobiology, 3rd Ed. (2011), M.E. Taylor and K. Drickamer, Oxford University Press Inc., New York;* и *Essentials of Glycobiology, 3rd Ed. (2017), A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, R.L. Schnaar and P.H. Seeberger, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.*

*Владимиру, Ањи и Еми,
мојим родитељима и брату*

Садржај

Скраћенице	1
Поглавље 1 Основни појмови	5
Поглавље 2 Гликопротеини.....	22
Поглавље 3 Гликолипиди.....	59
Поглавље 4 Глико-РНК	71
Поглавље 5 Гликокаликс	74
Поглавље 6 Ензимологија гликоконјугата.....	77
Поглавље 7 Гликом и гликомика	84
Поглавље 8 Анализа и синтеза гликана/гликоконјугата	89
Поглавље 9 Биоортогонална хемија	94
Поглавље 10 Стереохемија гликана	103
Поглавље 11 Биолошке функције гликана.....	114
Поглавље 12 Угљенохидратно препознавање	120
Поглавље 13 Гликобиологија других живих бића.....	155
Поглавље 14 Гликобиологија у физиолошким и патолошким стањима.....	166
Поглавље 15 Гликобиологија у будућности.....	173
Литература	174

Скраћенице

Скраћеница	Назив	Ознака
All	Алоза (D-алопираноза)	●
Alt	Алтроза (L-алтропираноза)	●
Ara	Арабиноза (L-арабинопираноза)	★
Ery	Еритроза	
Fuc	Фукоза (6-деокси-L-галактопираноза)	▲
Gal	Галактоза (D-галактопираноза)	●
GalNAc	N-ацетилгалактозамин (2-ацетамидо-2-деокси-D-галактопираноза)	■
Glc	Глукоза (D-глюкопираноза)	●
GlcA	Глукуронска киселина (D-глюкопирануронска киселина)	◊
GlcN	Глукозамин (2-амино-2-деокси-D-глюкопираноза)	◻
GlcNAc	N-ацетилглукозамин (2-ацетамидо-2-деокси-D-глюкопираноза))	■
Glycero	Глицералдехид	
Gul	Гулоза (D-гулопираноза)	●
Ido	Идоза (L-идопираноза)	●
IdoA	Идуронска киселина (L-идопирануронска киселина)	◊
Lyx	Ликсоза (D-ликсопираноза)	★
Man	Маноза (D-манопираноза)	●
Neu5Ac	N-ацетилнеураминска киселина (5-ацетамидо-3,5-дидеокси-D-глицеро-D-галакто-2-нонулопиранозонска киселина; сијалинска киселина)	◆
Neu5Gc	N-гликолилнеураминска киселина (3,5-дидеокси-5-хидроксиацетамидо-D-глицеро-D-галакто-2-нонулопиранозонска киселина)	◊
Rha	Рамноза (6-деокси-L-манопираноза)	▲
Rib	Рибоза (D-рибопираноза)	★
Tal	Талоза (D-талопираноза)	●
Tho	Треоза	
Xyl	Ксилоза (D-ксилопираноза)	★

Скраћеница писана ћириличким писмом	Назив
АБО	АБО систем крвних група
АК	аминокиселина
ГА	Голџијев апарат
ЗД	тродимензионално
ДНК	деоксирибонуклеинска киселина
енг.	енглески
ЕР	ендоплазматични ретикулум
ЗГ	заштитна група
ЛХ/LH	лутеинизирајући хормон
МАГ/MAG	енг. <i>Myelin-Associated Glycoprotein</i> гликопротеин повезан са мијелином
МО	микроорганизам
МС	моносахарид
МУЦ	муцин
НМР	нуклеарна магнетна резонанца
РНК	рибонуклеинска киселина
ТСХ/TSH	тиреостимулирајући хормон
УГГТ/UGGT	UDP-глюкоза: гликопротеин глюкозилтрансфераза
ФСХ/FSH	фоликулостимулирајући хормон
ХИВ/HIV	енг. <i>human immunodeficiency virus</i> вирус људске имунодефицијенције

Скраћеница писана латиничким писмом	Назив
Ас	ацетил група
Аla	аланин
AMR	енг. <i>Ashwell – Morell receptor</i> Ашвел-Морел рецептор
Asn	аспарагин
ASGPR	енг. <i>asialoglycoprotein receptor</i> асијалогликопротеински рецептор
Вас	Бацилозамин (2,4-диамино-2,4,6-тридеоксиглукопираноза)
CD-MPR	енг. <i>cation dependent mannose 6-phosphate receptor</i> маноза-6-фосфатни рецептор зависан од катјона
CI-MPR	енг. <i>cation-independent mannose 6-phosphate receptor</i> маноза-6-фосфатни рецептор независан од катјона

Скраћеница латиничким писмом	Назив
CNX	<i>енг. calnexin</i> калнексин
CR	<i>енг. carbohydrate-recognition</i> угљенохидратно препознавање
CRD	<i>енг. carbohydrate-recognition domain</i> домен за угљенохидратно препознавање
CRT	<i>енг. calreticulin</i> калретикулин
CTLs	<i>енг. C-type lectins</i> С-тип лектина (лектини С-типа)
Cys	цистеин
DAF	<i>енг. Decay-accelerating factor</i>
ERAD	<i>енг. endoplasmic reticulum– associated protein degradation</i> деградација протеина повезана са ендоплазматичним ретикулумом
ERGIC	<i>енг. ER-Golgi intermediate compartment</i> средишњи компартмент ЕР-Голџи апарата
ERp57/PDI	<i>енг. endoplasmic reticulum protein 57/ protein disulphide isomerase</i> ендоплазматични ретикулум протеин 57/ протеин дисулфид изомераза
Et	етил-група
EtN	етаноламин
FGF	<i>енг. fibroblast growth factor</i> фибробластни фактор раста (фактор раста фибробласта)
GAG	<i>енг. GAG-binding proteins</i> протеини који везују гликозаминогликане
GBP	<i>енг. glycan-binding proteins</i> протеини који везују гликане
GDP	гуанозин-дифосфат
Gln	глутамин
Gly	Глицин
GMP	гуанозин-монофосфат
gp120	гликопротеин 120 (ХИВ)
GPI	<i>енг. glycosylphosphatidylinositol</i> гликозилфосфатидилинозитол
hCG	хумани хорионски гонадотропин
IgA	имуноглобулин А
ITLs	<i>енг. I-type lectins</i> I-тип лектина (лектини I-типа)

Скраћеница	писана латиничким писмом	Назив
LTLs	<i>енг. L-type lectins</i> L-тип лектина (лектини L-типа)	
MASPs-MBP	<i>енг. MASPs-MBP-associated serine proteases</i> серинске протеазе удружене са MBP	
MBL	<i>енг. manose-binding lectin</i> лектин који везује манозу	
MBP	<i>енг. manose-binding protein</i> протеин који везује манозу	
Me	метил-група	
MGAT	<i>енг. mannosyl-glycoprotein N-acetylglucosaminyltransferase</i> манозил-гликопротеин N-ацетилглюкозаминилтрансфераза	
M6P	маноза 6-фосфат	
MTLs	<i>енг. M-type lectins</i> M-тип лектина (лектини M-типа)	
NOE	<i>енг. nuclear Overhauser effect</i> нуклеарни Оверхаузеров ефекат	
P	фосфатна група на шемама	
PAPS	<i>енг. 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate</i> 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосулфат	
Ph	фенил-група	
PTLs	<i>енг. P-type lectins</i> P-тип лектина (лектини P-типа)	
RTLs	<i>енг. R-type lectins</i> R-тип лектина (лектини R-типа)	
Ser	Серин	
SP-A	<i>енг. surfactant protein A</i> сурфактантни протеин A	
SP-D	<i>енг. surfactant protein D</i> сурфактантни протеин D	
SPPS	<i>енг. SPPS – solid phase peptide synthesis</i> синтеза пептида на чврстој фази	
Thr	Треонин	
Trp	Триптофан	
UDP	уридин-дифосфат	
VIP36	<i>енг. vesicular integral membrane protein of 36 kDa</i> везикуларни интегрални мембрански протеин од 36 kDa	
VIPL	<i>енг. VIP36-like protein</i> протеин који личи на VIP36	

Поглавље 1 Основни појмови

Гликобиологија је наука која се бави структуром, биосинтезом и улогом угљених хидрата у живом свету (биолошким системима), до најистанчанијих нивоа као што су међућелијска комуникација, транспорт, и сл.

Већина особа, када им се спомену угљени хидрати, повезује их са глукозом, енергијом и складиштењем енергије, такође са метаболизмом угљених хидрата који нам обезбеђује свакодневно функционисање. Улоге угљених хидрата превазилазе само енергетске потребе, бројне су и много значајније. Те споменуте биохемијске улоге и структуре угљених хидрата ће бити фокус предмета ГЛИКОБИОЛОГИЈА.

Према *Oxford English Dictionary*, појам гликобиологије први је предложио професор Рејмонд Двек (енг. *Raymond Dwek*) дајући потпуно нови значај угљеним хидратима у биохемији. Те 1988. године ће се први пут појавити овај термин и ускоро ће постати саставни део бројних уџбеника и научних кругова.

Данас је гликобиологија наука која се веома брзо развија, и где се са сваким новим даном сазнају и откривају нове чињенице и подаци који обогаћују и унапређују сазнања о значају угљених хидрата у живом свету.

За разумевање гликобиологије неопходно је да на почетку овог уџбеника буду објашњени основни термини који ће се спомињати и обрађивати.

Угљени хидрати (шећери или сахариди) су основни биомолекули који су изграђени углавном од угљеника, водоника и кисеоника, а ређе имају додат још неки други атом као што је азот. Они представљају једну од најраспрострањенијих класа биомолекула. Основна подела је на основу сложености, и то на: моносахариде, олигосахариде и полисахариде.

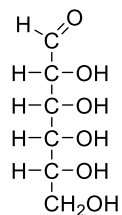
Основа јединица грађе угљених хидрата је моносахарид. У табели 1 су приказани основни моносахариди, а посебно су заокружени они који имају посебан значај за гликобиологију и веома су заступљени у гликанима живих организама.

Табела 1. Структуре алдоза (од 3C до 6C)

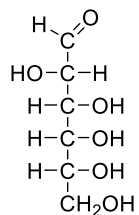
Називи и структуре алдоза са 3 C атома		Називи и структуре алдоза са 4 C атома	
$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$		$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$
D-Глицералдехид D-Glycero		D-Еритроза D-Ery	D-Треоза D-Tho

Називи и структуре алдоза са 5 C атома			
$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$
D-Рибоза D-Rib	D-Арабиноза D-Ara	D-Ксилоза D-Xyl	D-Ликсоза D-Lyx

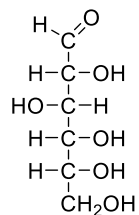
Називи и структуре алдоза са 6 C атома



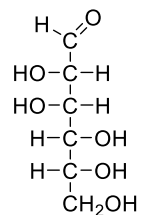
D-Алоза
D-Alf



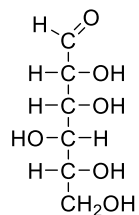
D-Алтроза
D-Alt



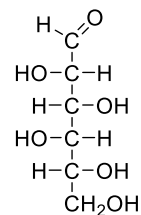
D-Глукоза
D-Glc



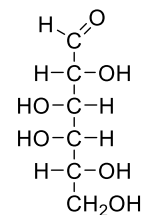
D-Маноза
D-Man



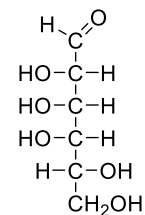
D-Гулоза
D-Gul



D-Идоза
D-Ido



D-Галактоза
D-Gal



D-Талоза
D-Tal

Напомена: у табели су приказана имена основних алдоза, али су приказане и скраћенице које ће се у остатку уџбеника више пута помињати.

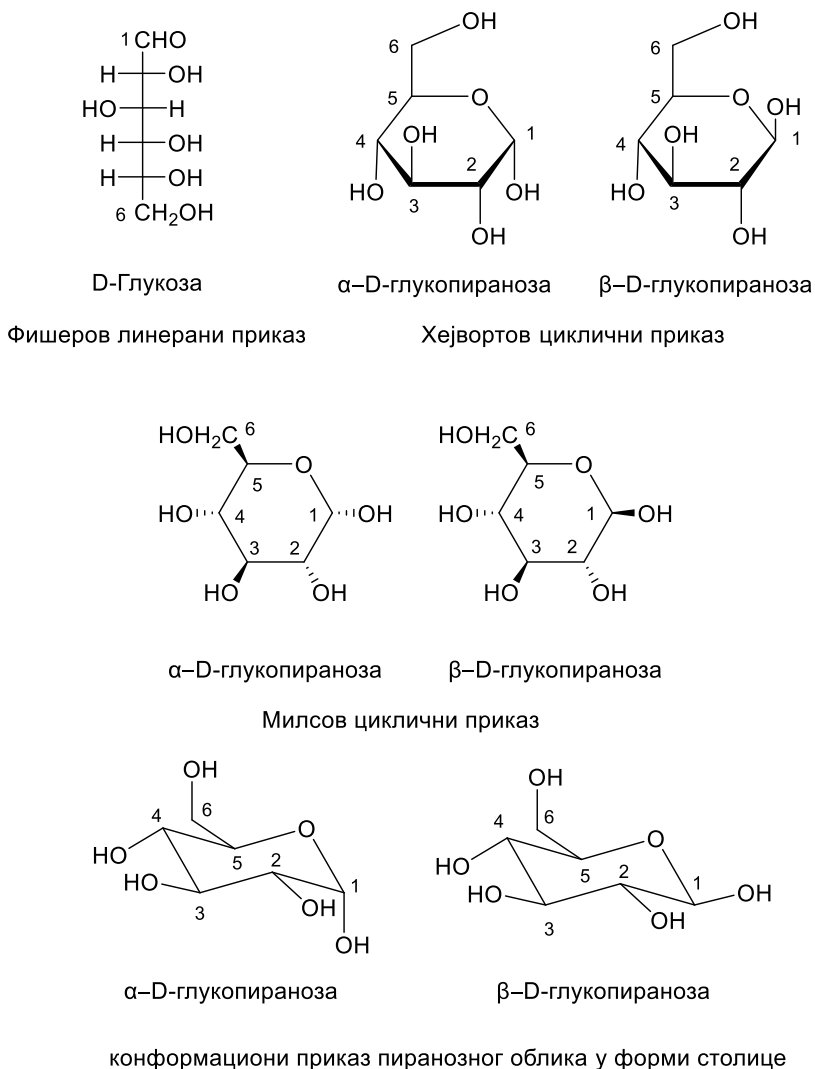
Структуре кетоза неће бити приказиване због тога што њихов значај у гликобиологији још увек није потврђен.

Основне особине моносахарида су:

- садрже алдехидну (алдозе) или кето-групу (кетозе);
- садрже више хидроксилних група;
- поседују хиралне центре;
- могу се приказати на више начина;
- граде хемиацетале или хемикетале;
- аномерни угљеник је или α или β оријентисан;
- они су редукујући реагенси, зато што се карбонилни С атом лако оксидује.

Уобичајени начини приказивања моносахарида су (слика 1):

- Линеарне формуле (Фишерове пројекције; име им је дато у част познатом немачком хемичару, добитнику Нобелове награде Херману Емилу Фишеру (енг. *Hermann Emil Fischer*));
- Хејвортове цикличне формуле (име им је дато у част познатом енглеском хемичару, добитнику Нобелове награде Волтеру Норману Хејворту (енг. *Walter Norman Haworth*));
- Милсове цикличне формуле (име им је дато у част познатом енглеском хемичару Вилијаму Хобсону Милсу (енг. *William Hobson Mills*));
- Конформациони начин приказивања.



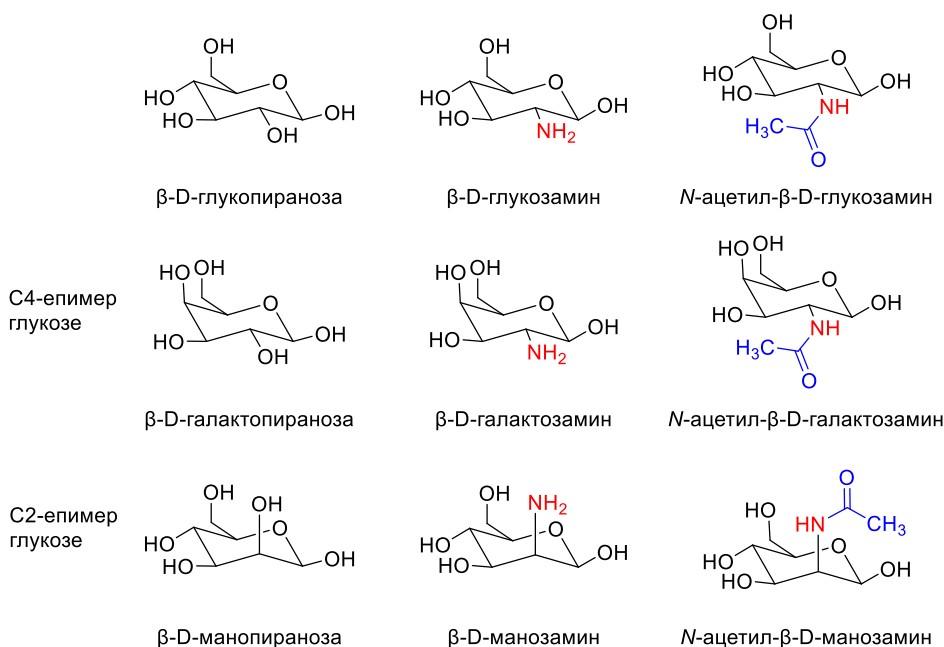
Слика 1. Начини приказивања моносахарида на примеру молекула D-глукозе

Поред наведених алдоза на следећим сликама (слике 2–6.) су приказани деривати моносахарида који ће бити врло често помињани у гликанима, гликоконјугатима и гликобиологији уопштено. То су следеће групе деривата моносахарида: аминокећери и деривати као што су мураминска киселина, потом деокси-шећери (L-фукоза и L-рамноза) и шећерне киселине (посебно уронске киселине).

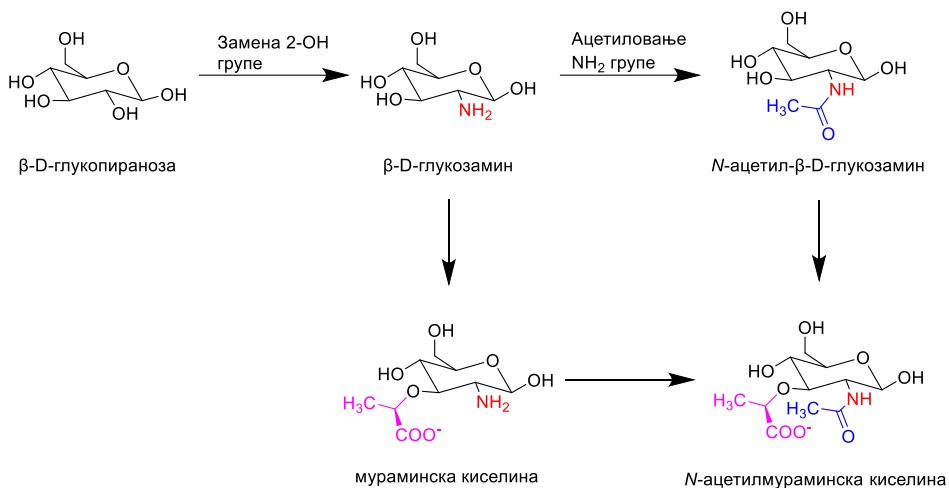
Од аминокећера у гликоконјугатима се најчешће појављују глюкозамин, *N*-ацетилглюкозамин и *N*-ацетилгалактозамин.

Кећерне киселине посебно значајне за изградњу гликана су *D*-глукуронска киселина и *L*-идуронска киселина. Хумани организам користи *D*-кећере да из њих направи одговарајуће *L* облике, па се тако нпр. *L*-идуронска киселина добија из *D*-глукуронске киселине дејством ензима епимеразе.

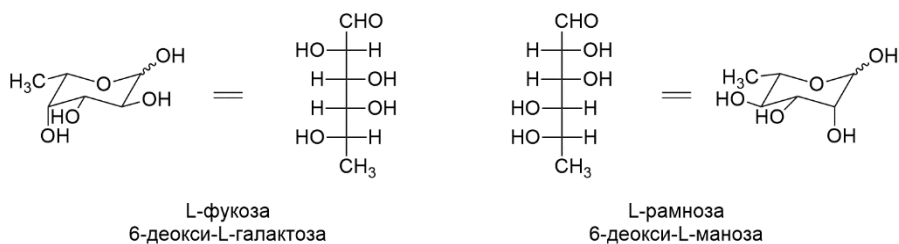
Посебно значајно место у гликоконјугатима човека и сисара имају сијалинске киселине.



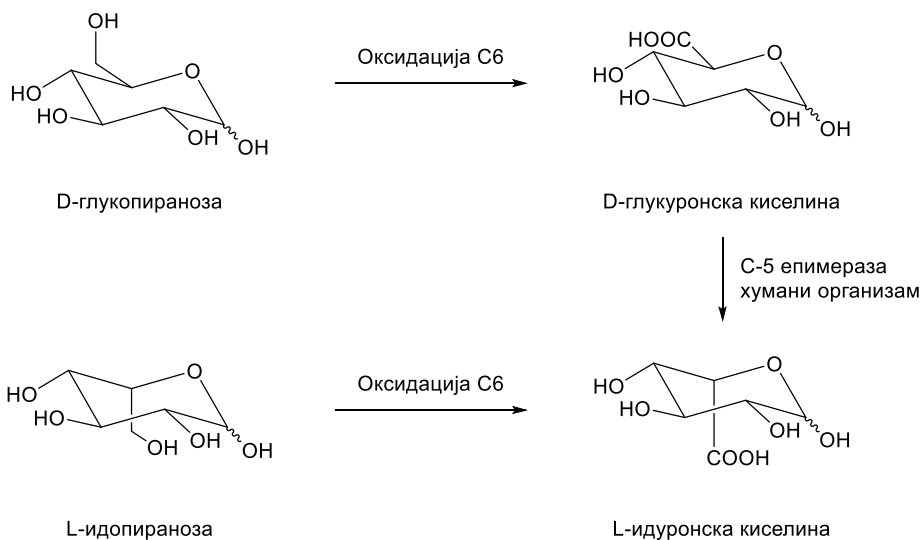
Слика 2. Аминокећери



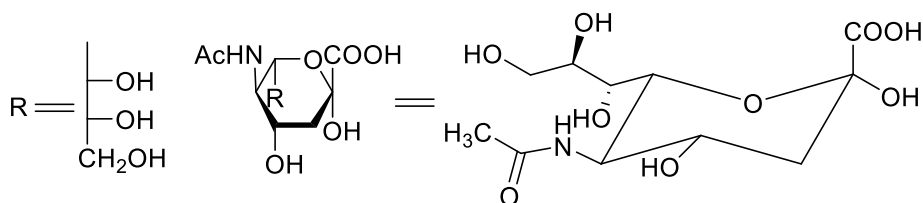
Слика 3. Структурна повезаност између D-глюкозе и мураминске киселине



Слика 4. Деокси-шећери



Слика 5. Шећерне киселине



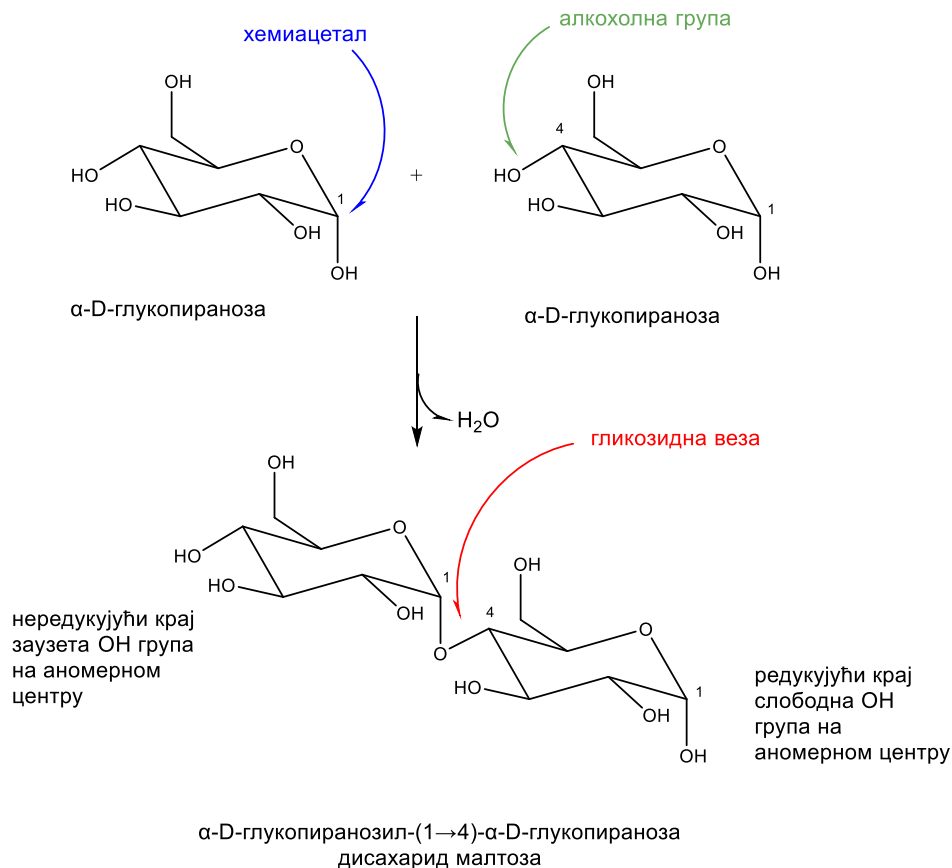
N-ацетилнеураминска киселина

Слика 6. N-ацетилнеураминска киселина (најчешћи облик сијалинске киселине)

Већина L-моносахарида је добијена дејством одговарајућих ензима у организму (није екстерног порекла). Како су моносахариди који изграђују гликане гликоконјугата махом D-шећери, осим неколико изузетака, у наставку ће углавном бити коришћене скраћенице без ознаке да ли је D или L (подразумева се да је D, уколико није наведено другачије).

Грађењем гликозидне везе између две моносахаридне јединице настају дисахариди – подгрупа олигосахарида. Олигосахариди броје до 10 моносахаридних јединица

међусобно повезаних гликозидним везама. Сахариди који броје преко 10 моносахаридних јединица повезаних гликозидним везама називају се полисахариди. Грађење гликозидне везе приказано је на слици 7.



Слика 7. Формирање гликозидне везе између две моносахаридне јединице глюкозе

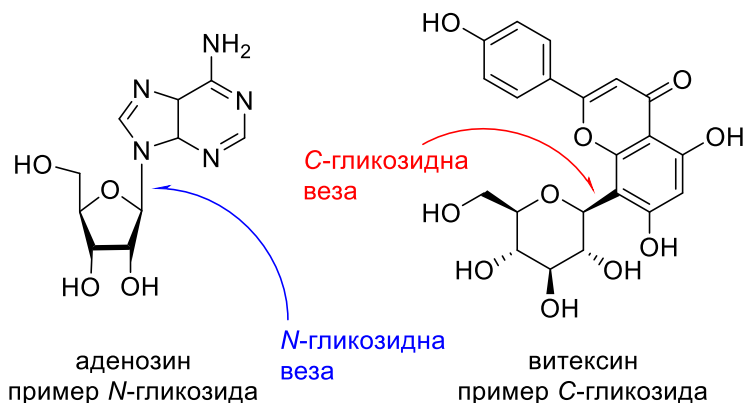
Имена им се дају од нередукујућег краја, а треба пратити следећа правила. Прво одредити конфигурацију на аномерном центру (α или β) од првог моносахарида са леве стране, односно нередукујућег шећера. Потом одредити име нередукујућег краја (префикс) са додатком наставка (инфикс) фурано- или пирано- (5 или 6 атома у прстену) уз наставак (суфикс) -ил (карактеристичан наставак и у органској хемији приликом грађења имена једињења). Затим се гликозидна

веза обележава бројевима и стрелицом нпр. 1→4 (означава се који угљеник гради везу са којом хидроксилном групом) и на крају се одређује име друге моносахаридне јединице са ознаком конфигурације на аномерном центру и назнаком величине прстена. Име се завршава наставком (суфиксом) „оза“ уколико је слободна ОН група на аномерном центру. Уколико је ОН група на аномерном центру заузета име те моносахаридне јединице добија наставак (суфикс) „ид“.

Пример именовања једног дисахарида:

α-D-глюкопиранозил-(1→4)-α-D-глюкопираноза (слика 7).

Ковалентна веза између ОН групе једног моносахарида (или неког алкохола) и аномерног С атома другог моносахарида представља О-гликозидну везу. Реакција је између хемиацетала и алкохола, при чему настаје ацетал. Иако се лако може хидролизовати у киселој средини, прилично је отпорна на базне реакционе услове. N-гликозидна веза настаје између аномерног угљеника једног моносахарида тј. шећера и азота из протеина или нуклеинске базе. Постоји и C-гликозидна веза која се јавља у бројним природним производима, где је аномерни С атом директно везан за С атом неког другог једињења (слика 8). N- и C-гликозиди спадају у неправилне, али уобичајене називе. Сваки олигосахарид (осим разгранатих и цикличних - циклодекстрини), као и поменути дисахариди (осим сахарозе и трехалозе), има два краја: редукујући и нередукујући. Редукујући је онај код којег је слободна алдехидна група у облику хемиацетала, а нередукујући је онај крај где је моносахарид учествовао у изградњи гликозидне везе са аномерним центром.



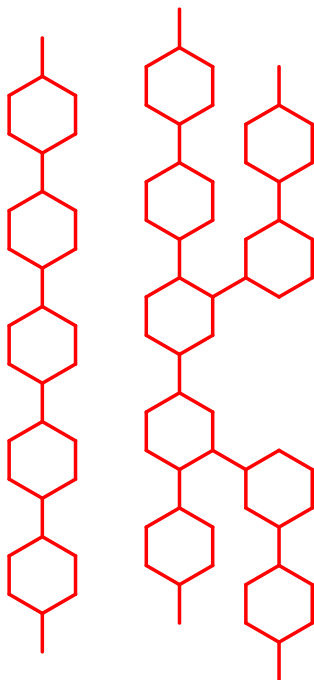
Слика 8. N- и C- гликозиди

Полисахариди су молекули који углавном садрже велик број моносахаридних јединица. Деле се на хомополисахариде и хетерополисахариде. Хомополисахариди су изграђени од једне понављајуће моносахаридне јединице, док су хетерополисахариди изграђени од више различитих моносахаридних јединица које се углавном понављају. Полисахариди се такође могу поделити у линеарне и рачвасте (слика 9).

ХОМОПОЛИСАХАРИДИ

линеарни

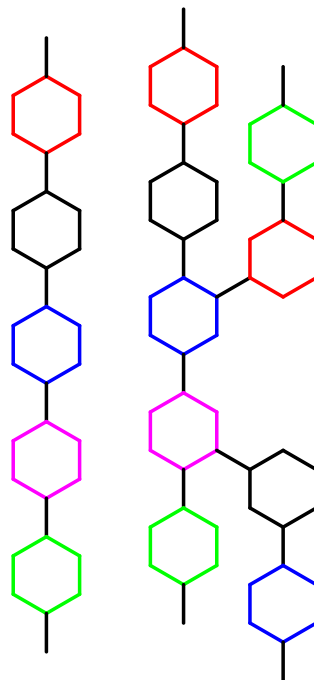
рачvasti



ХЕТЕРОПОЛИСАХАРИДИ

линеарни

рачvasti



Слика 9. Шематски приказ поделе полисахарида

Формирање гликозидне везе није енергетски фаворизовано, катализују га специјални ензими **гликозил-трансферазе** које имају специфичан нуклеотидни донора шећера и акцептор. У имену ензима наведен је нуклеотидни донора шећера, природа акцептора и која се веза формира. Свака гликозил-трансфераза је изузетно специфична (препознаје и разгранатост и све остале стереохемијске детаље).

Раскидање гликозидне везе такође захтева специфичне ензиме, али не захтева утрошак енергије. **Гликозидазе** су ензими који раскидају гликозидну везу и веома су специфични. О самим ензимима који учествују у грађењу и раскидању гликозидних веза биће више речи у поглављу о ензимологији гликоконјугата.

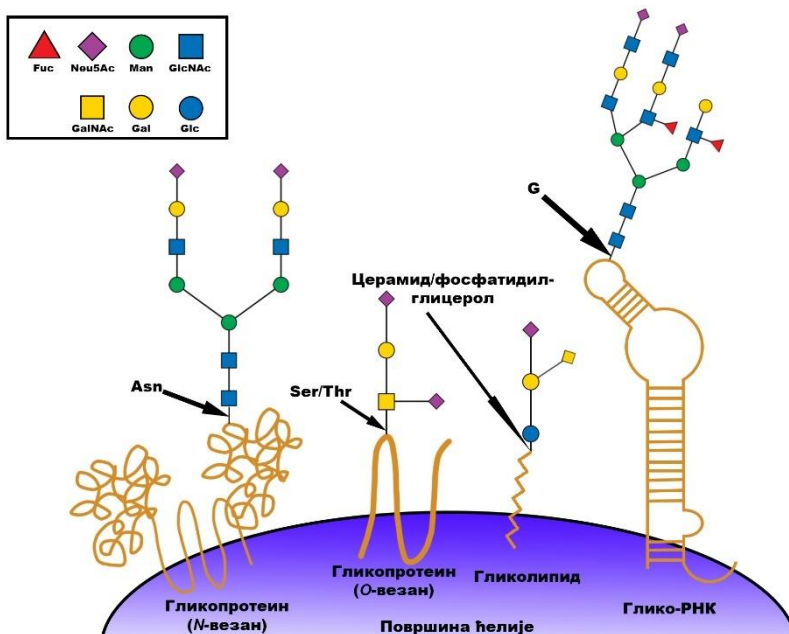
Гликоконјугати су комплексна једињења изграђена од агликона (негликанске/нешећерне компоненте) и гликана. Такви су нпр. гликопротеини, гликолипиди и глико-РНК који настају формирањем гликозидних веза између моно-, олиго- или полисахарида са протеинима, липидима или РНК.

Гликан је угљенохидратни део гликоконјугата (моно-, олиго- или полисахарид).

Агликон је неугљенохидратни део гликоконјугата (протеин, липид или РНК).

Лектини су протеини или гликопротеини неимунског порекла, хемаглутинарајући макромолекули који испољавају изузетно специфичне интеракције са угљеним хидратом, најчешће угљенохидратним делом гликоконјугата (значајни за препознавање и интеракцију).

Основне класе гликоконјугата су гликопротеини (везани преко азота или кисеоника), гликолипиди и од 2021. године и глико-РНК (слика 10). Откриће треће групе гликоконјугата приписује се Каролин Бертози (*енг. Carolyn Bertozzi*) и њеној истраживачкој групи. За допринос гликобиологији и хемији, првенствено употребу „клик“ и биоортогоналне хемије, додељена јој је Нобелова награда за хемију за 2022. годину коју је поделила са Мортеном Мелдалом и Баријем Шарплесом (*енг. Morten Meldal и Barry Sharpless*).



Слика 10. Основне класе гликоконјугата

Које су функције и локализација гликоконјугата?

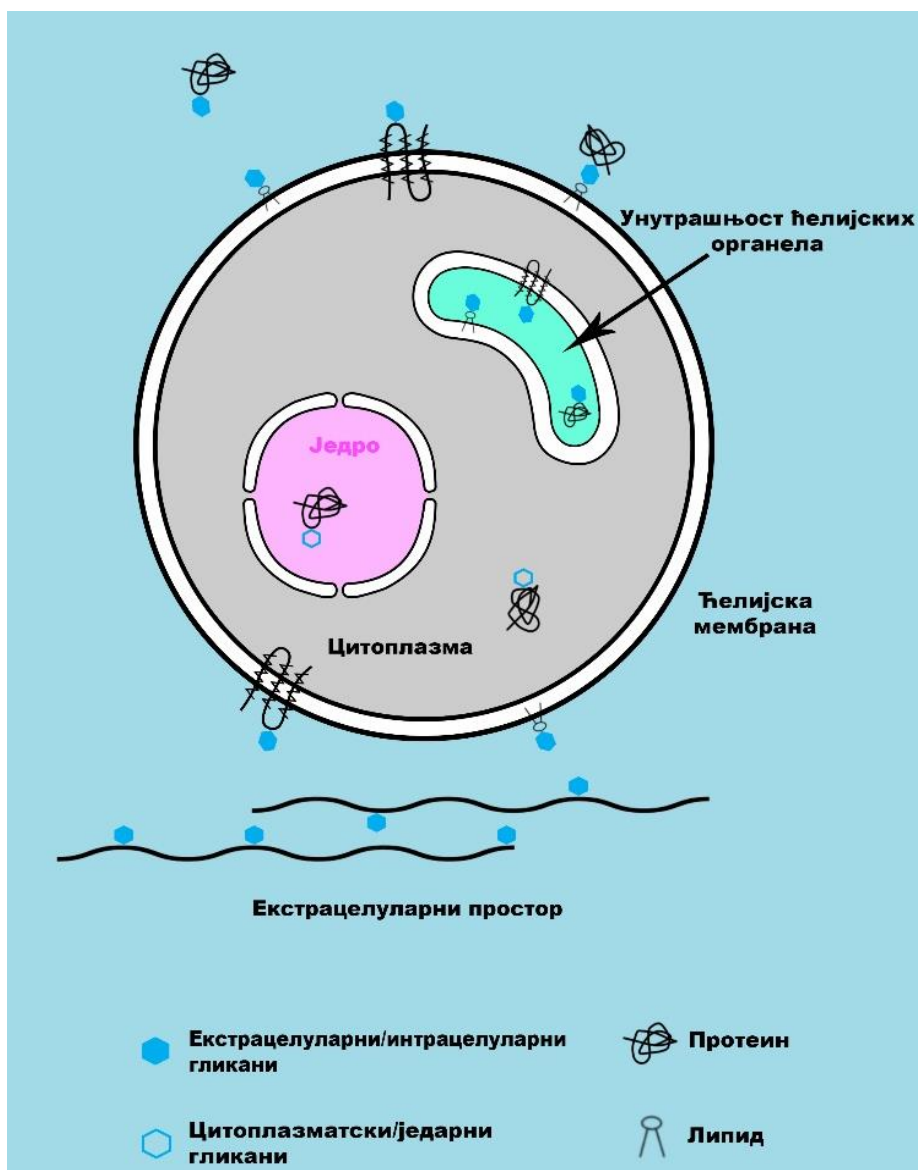
Гликоконјугати се могу пронаћи или као везани молекули или као слободни молекули (слика 11.).

Као везани гликоконјугати се налазе на:

- површини ћелијске мембране,
- површинама мембрана ћелијских органела, при чему могу бити окренути ка лумену ћелијске органеле или ка цитоплазми.

Као слободни молекули могу се пронаћи:

- у једру,
- у цитоплазми,
- у екстрацелуларном (ванћелијском) простору,
- у серуму и осталим телесним течностима.



Слика 11. Положај гликоконјугата

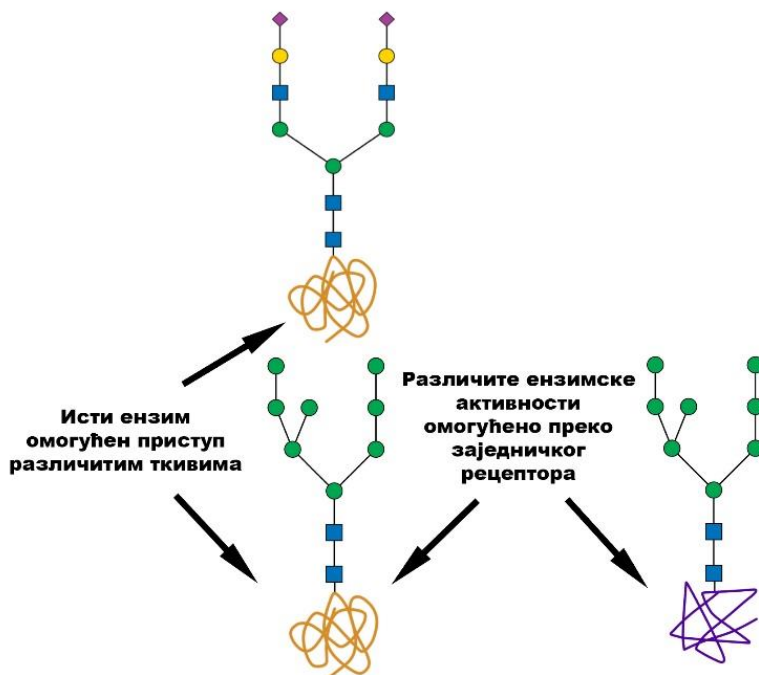
Улоге гликоконјугата су бројне и са сваким новим даном се откривају нове улоге и значај. Генерално се улоге могу поделити на унутрашње и спољашње. Унутрашње улоге су значајне за саму ћелију, односно гликоконјугати обезбеђују структуру и изглед саме ћелијске мембране и осталих

компонената саме ћелије (органела и цитоплазме). Гликани значајно утичу на особине агликона и на тај начин доприносе бољој стабилности и промени других физичко-хемијских особина као што су на пример растворљивост, реактивност, правилно увијање и др. Спољашње улоге гликоконјугата огледају се у интеракцији саме ћелије са околином. Гликоконјугати утичу на интеракције и комуникацију ћелије са међућелијским простором, али и околним ћелијама, утичу на ћелијску адхезију, на транспорт бројних молекула, имунски одговор. Ове спољашње улоге су углавном резултат интеракција гликана са лектинима.

У другом делу овог уџбеника ће бити детаљно објашњене и наведене улоге неких појединачних гликана и гликоконјугата и њихове интеракције са лектинима.

Треба напоменути да се на једном агликону могу појавити различити гликани, али се такође исти гликани могу појавити и на различитим агликонима (слика 12). Ово омогућава да један агликон испољи своју активност на различитим местима односно да различити гликани омогуће приступ везивању на различите рецепторе и на тај начин омогуће агликону да испољи своју активност (активности) на више места. Друга варијанта омогућава да преко истог гликана односно истог рецептора испољи деловање различити број агликона и на тај начин више различитих агликона делује на истом месту.

Гликопротеини који имају исти полипептидни ланац али различите гликане називају се **гликоформе**.



Слика 12. Две комбинације агликона и гликана

Основна разлика између гликана, односно гликоконјугата и осталих биомолекула јесте у начину њихове биосинтезе. Биосинтеза протеина, укључујући и ензиме, кодирана је у геному и тачно одређена, док је њихова активност је директно повезана са прецизно одређеном 3Д структуром која је последица тачно дефинисаног редоследа аминокиселина. За разлику од поменутих биомолекула, биосинтеза гликана, односно шећерног дела гликоконјугата, није директно кодирана у геному. На који начин је биосинтеза гликана индиректно кодирана у геному? За биосинтезу гликана гликоконјугата одговорни су специфични ензими – гликозилтрансферазе и гликозидазе – чија биосинтеза је кодирана у генима, па се утицајем на ове гене може индиректно утицати и на структуру гликана.

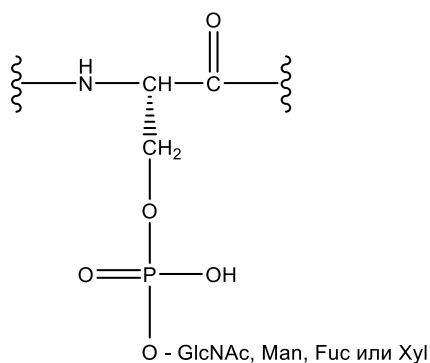
Поглавље 2 Гликопротеини

Гликопротеини су највише испитивани гликоконјугати и до сада највећи број података и информација које су доступне научној заједници потиче од ове групе гликоконјугата. **Гликопротеини су конјугати гликана и протеинског агликона.**

Гликопротеини се деле на две основне групе у зависности како се остварује веза између гликанског дела и протеинског агликона. Подела је на оне који су везани преко атома азота (**N-везани**) и оне који су везани преко атома кисеоника (**O-везани**). Веза преко азота се остварује преко R-остатка аспарагина, док се веза преко кисеоника остварује преко R-остатка серина или треонина.

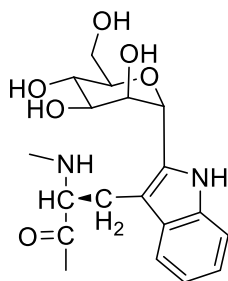
Поред ове две најзначајније групе гликопротеина у природи се могу наћи и гликопротеини код којих се формира такозвана P-, C- и S- веза између гликана и агликона, али њихов значај, структура и функција за сада нису довољно истражени и проучени.

Код P-везаних гликана веза се успоставља између хидроксилне групе серина и остатка моносахарида: GlcNAc, Man, Fuc или Xyl који су у положају C-1 фосфорилизовани (слика 13).



Слика 13. P-везани гликопротеини

Гликопротеини са С-везаним гликанима су заступљени у хуманом организму у појединим молекулима као што су протеини тромбоспондини, рецептори за цитокине и др. За сада им улоге нису у потпуности разјашњене и сматра се да оваква гликозилација штити молекуле од разградње. Најпознатија откривена С-гликозилација је увођење молекула манозе на угљеников атом прве резидуе триптофана у секвенци Trp-X-X-Trp (где је X било која аминокиселина). С-С веза се формира између првог угљеника α -манозе и другог угљеника индоловог прстена триптофана (слика 14). С-манозилација је чешћа ако су као X аминокиселине присутни: Ser, Thr, Ala и Gly. Овакав вид везе није уобичајен, али изазива велику пажњу и интересовање јер постоје подаци о улози С-манозилације у увијању протеина, разврставању и/или секрецији супстрата.



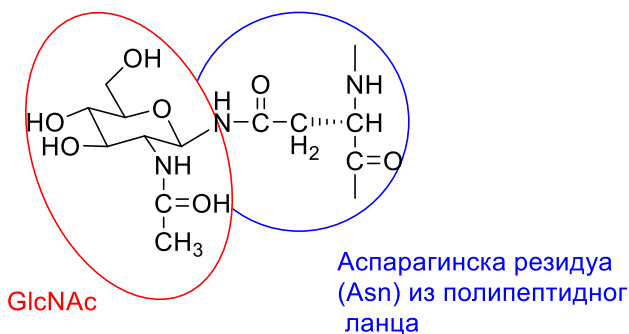
Слика 14. С-С веза између манозе и триптофана

Гликопротеини са S-гликозидном везом су гликоконјугати код којих је веза успостављена између олигосахарида и атома сумпора резидуе цистеина. Овакав вид конјугата је екстремно редак и до сада је откривено само неколико примера код људи и бактерија (пример: Glc-S-Cys).

N-везани гликани

Оно што је заједничко свим гликопротеинима са N-гликозидном везом (у хуманим ћелијама и великом броју

животиња) је место и начин повезивања агликона и гликана. Веза се остварује између прве моносахаридне јединице која је увек *N*-ацетилглюкозамин и азота амидног остатка аспарагина из аминокиселинског низа протеина (слика 15), а који се налази у секвенци Asn-X-Ser/Thr (у којој је X било која аминокиселина осим Pro). Веза је увек у β -положају.

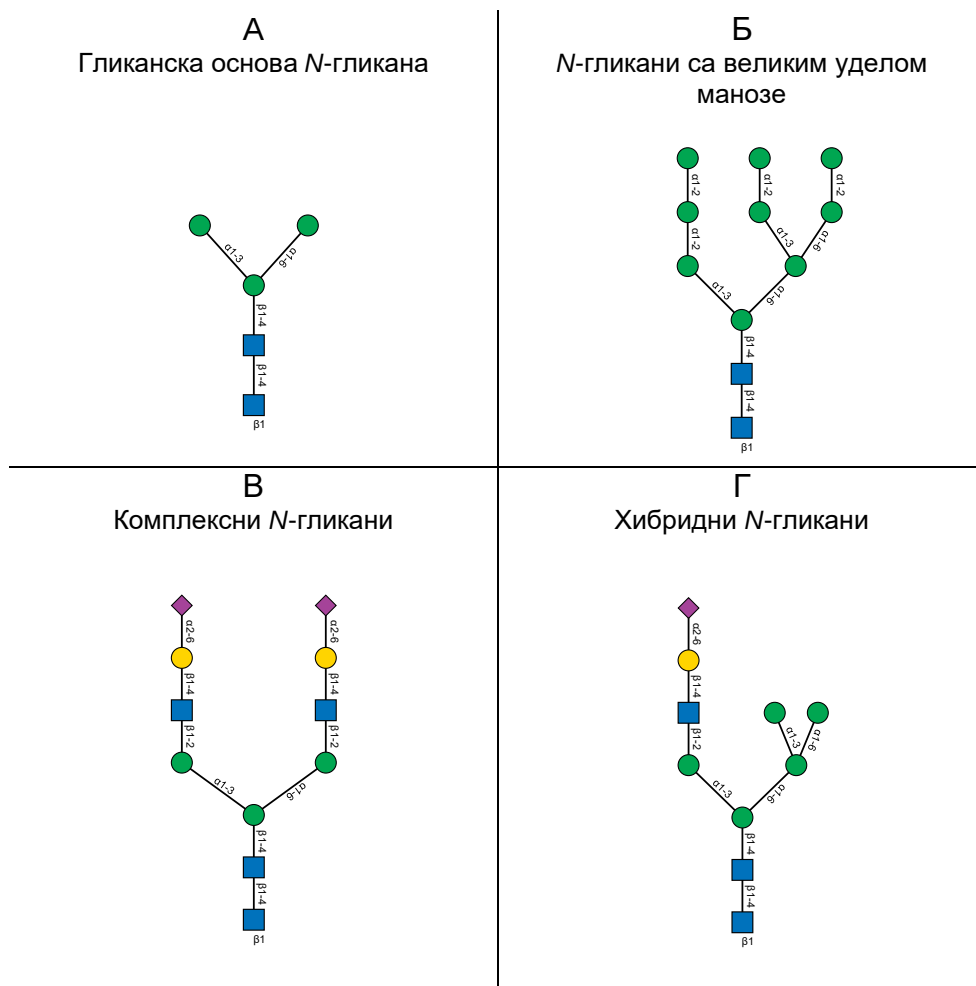


Слика 15. Веза између агликона и гликана код *N*-гликозидне везе

Сви *N*-гликани имају исту основу која започиње *N*-ацетилглюкозамином, на који се ензимски додају још један остатак *N*-ацетилглюкозамина, а потом три остатка манозе (триманозно језгро конзервираног пентасахарида). Оно по чему се овај тип гликопротеина међусобно разликује јесте разноликост самог гликана. То омогућава поделу *N*-гликана у три групе (слика 16).

То су:

- *N*-гликани са великим уделом манозе (високоманозни *N*-гликани),
- комплексни *N*-гликани,
- хибридни *N*-гликани.

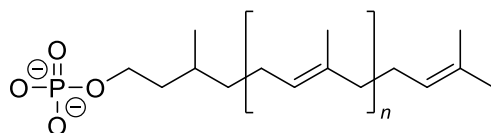


Слика 16. Гликанска основа (А) и три главне групе (Б-Г) *N*-гликана, сви приказани гликани су повезани β -везом за амидни азот остатка аспарагина из полипептидног ланца консензусне секвенце

Биосинтеза гликопротеина са *N*-везаним гликанима је комплексна и одвија се у три корака. Први корак започиње на спољашњој мембрани ендоплазматичног ретикулума (ЕР) и обухвата формирање липидног носача неопходног за почетак биосинтезе, као и формирање гликанске основе *N*-гликана. Други корак обухвата пренос формираног гликана са липидног носача на полипептидни ланац и дешава се унутар лумена

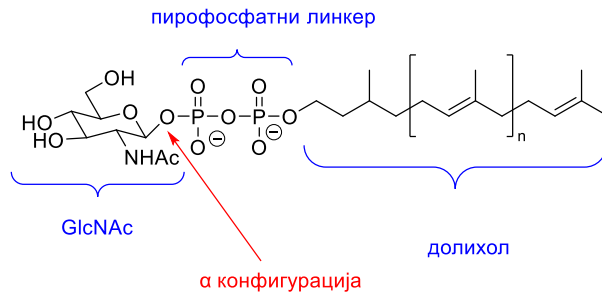
ЕР. Трећи корак обухвата финалне модификације гликанског дела гликопротеина и започиње у ЕР, а завршава се у Голџијевом апарату (ГА). Након завршене биосинтезе овог типа гликопротеина долази до излучивања ових молекула у цитоплазму одакле ће се преко везикула транспортовати даље, нпр. биће уграђени у ћелијску мембрану или транспортовати на друго место деловања, нпр. телесне течности.

Биосинтеза *N*-гликана започиње са спољашње стране ендоплазматичног ретикулума. За први корак биосинтезе неопходан је липидни носач који је уграђен у липидни двослој мембране ендоплазматичног ретикулума. Липидни носач је фосфорилувани долихол (слика 17). Долихол је липид изграђен из изопренских јединица, чији број (*n*) може варирати, али је код еукариота најчешће између 15 и 19. Варирање броја изопрених јединица омогућава уграђивање долихола у мембране различитих дебљина липидног двослоја.



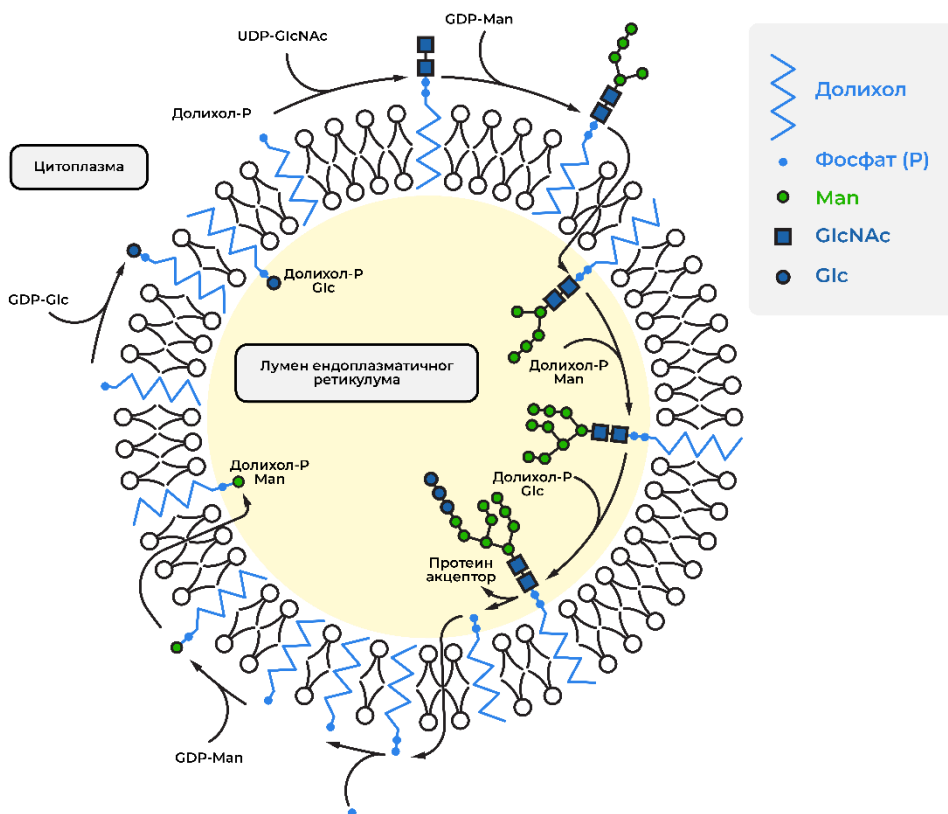
Слика 17. Долихол-фосфат - липидни носач неопходан за почетак биосинтезе N-гликозилованих гликопротеина

Прва реакција биосинтезе *N*-гликозилованих протеина обухвата фосфорилацију долихол-фосфата, а потом и везивање прве моносахаридне јединице. Овако настаје долихол-пирофосфат за који је везан *N*-ацетилглюкозамин. У једној реакцији се и веже први моносахарид и додатна фосфатна група на долихол-фосфат. Донор *N*-ацетилглюкозамина и фосфата је UDP-GlcNAc, који из реакције излази као UMP, док је ензим који каталише ову реакцију GlcNAc-1-фосфотрансфераза. Веза између долихол-пирофосфата и *N*-ацетилглюкозамина је у α -положају (слика 18).



Слика 18. Начин повезивања прве моносахаридне јединице (GlcNAc) за липидни носач долихол

Први корак биосинтезе *N*-гликана сумиран је на слици 19. Шематски приказано, након везивања прве моносахаридне јединице везује се још једна јединица *N*-ацетилглюкозамина, а потом пет остатака манозе. Овакав гликан повезан са долихол-пирофосфатом није више безбедан у цитоплазми и долази до његовог преласка у лумен ендоплазматичног ретикулума где се наставља даља синтеза гликанског дела. На овај начин је гликан заштићен од цитоплазматских ензима. Активирани донори моносахарида су комплекси нуклеотида за које су везани одговарајући моносахариди (слика 20). Тако је UDP нуклеотидни носач за *N*-ацетилглюкозамин (UDP-GlcNAc), глюкозу (UDP-Glc), галактозу (UDP-Gal) и *N*-ацетилгалактозамин (UDP-GalNAc), док је GDP носач за манозу (GDP-Man) и фукозу (GDP-Fuc), док је CMP носач само за сијалинску киселину (CMP-Neu5Ac).

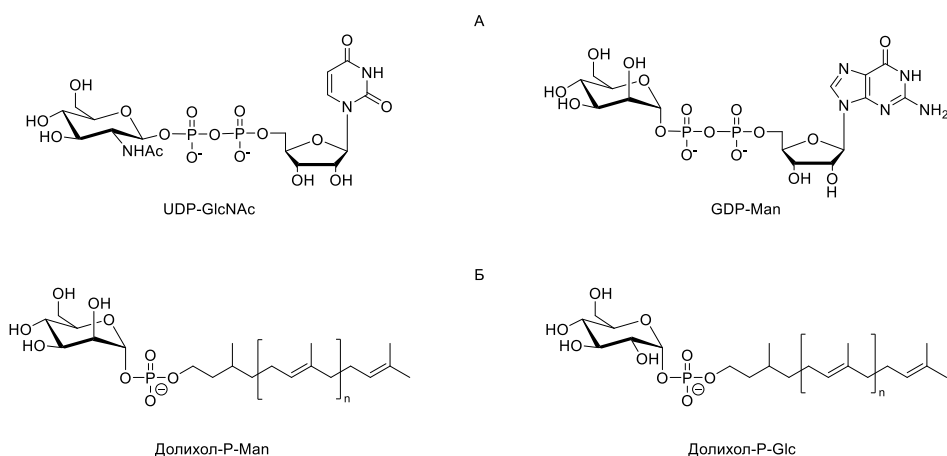


Слика 19. Први корак биосинтезе N-гликана

Обртање овог комплекса - долихол-пирофосфат са $(\text{GlcNAc})_2\text{Man}_5$ је и даље недовољно разјашњен процес. Зна се да га каталише ензим (трансмембрански протеински транспортер) који се у неким књигама описује као флипаза (енг. *flippase*, израз потиче од енглеске речи *flip* што значи обрнути, преврнути).

Унутар лумена ендоплазматичног ретикулума наставља се изградња гликанског дела. На седмочлани олигосахарид се дејством одговарајућих трансфераза додају још четири остатка манозе и три остатка глукозе. Донори моносахарида у лумену ендоплазматичног ретикулума нису нуклеотиди већ комплекси долихола и одговарајућег моносахарида који су повезани преко фосфатног линкера (слика 20.). Овакав гликански део изграђен од 14 моносахаридних резидуа

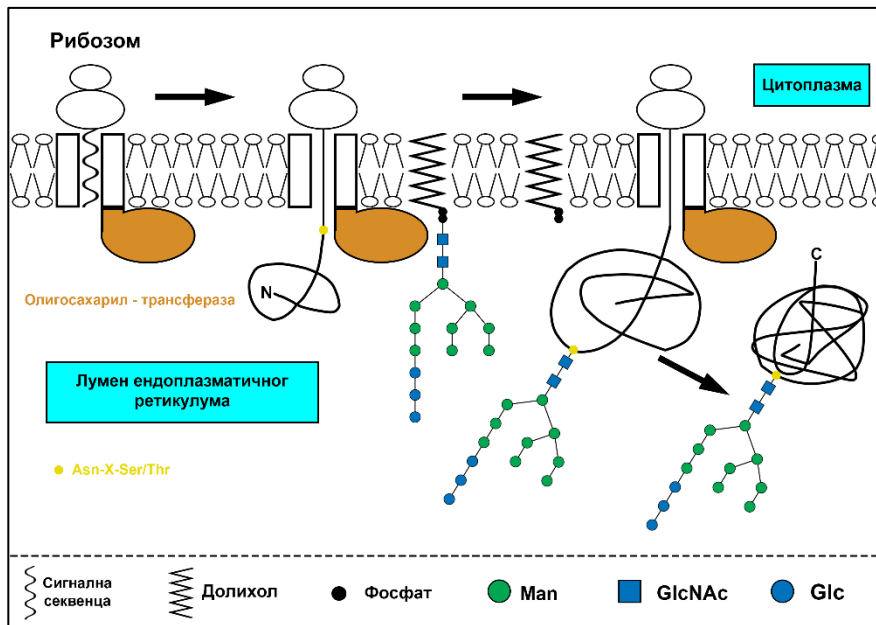
структуре $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ се у целости или *en bloc* премешта са липидног носача долихола на одговарајући Asn полипептидног ланца. Овим процесом преноса гликана се завршава први корак и започиње други корак у биосинтези N-гликана. Пренос олигосахарида са долихола на полипептидни ланац врши ензимски комплекс олигосахарилтрансфераза (долихил-дифосфоолигосахарид-протеин гликотрансфераза). Енергија неопходна за овај процес се добија од раскидања фосфатне везе између олигосахарида и долихол-пирофосфата. Након преноса долихол-пирофосфат се обрће на спољашњу страну мембране ендоплазматичног ретикулума и отпушта један фосфат. Тако настали долихол-фосфат чека поновни циклус где ће на њега поново бити везан нови фосфат и GlcNAc (слика 19).



Слика 20. Примери донора моносахарида у биосинтези гликопротеина: А) у цитоплазми донори су нуклеотиди (UDP-GlcNAc и GDP-Man), Б) унутар лумена ендоплазматичног ретикулума донори су долихил-манозил-фосфат и долихил-глукозил-фосфат

Ензимски комплекс олигосахарилтрансфераза се налази у директном контакту са мембраном ендоплазматичног ретикулума. Овај комплекс повезује рибозом (одговоран за синтезу полипептидног ланца), канал кроз који пролази

полипептидни ланац и долихол - липидни носач за који је везан гликан (слика 21).

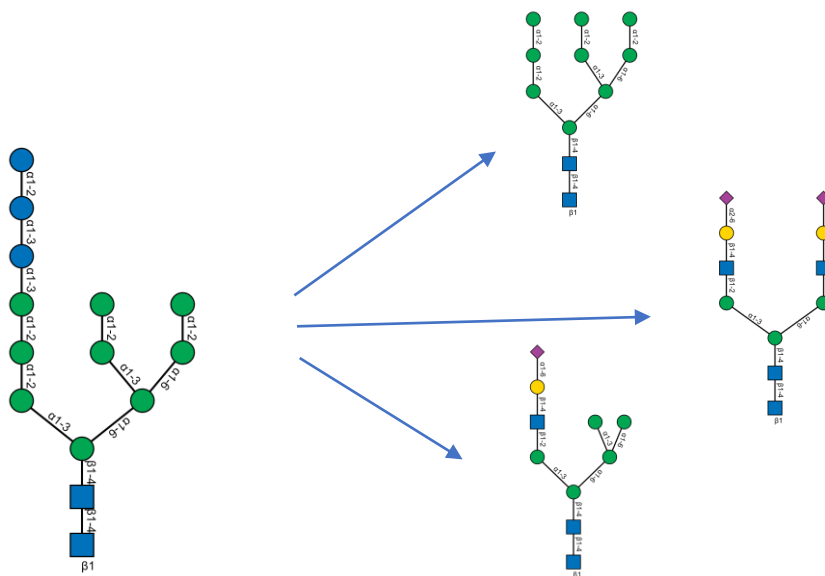


Слика 21. Комплекс на мембрани ендоплазматичног ретикулума који приказује ензимски комплекс олигосахарилтрансферазу, канал за пренос полипептида, рибозом одговоран за синтезу полипептида и липидни носач долихол за који је везан олигосахарид (гликан)

Пренос гликана се не обавља на све остатке аспарагина у полипептидном ланцу. Олигосахарид се преноси на полипептидни ланац односно везује се прва моносахаридна јединица *N*-ацетилглукозамин у β -положај за амидни азот R остатка аспарагина (слика 15). И то само аспарагина који се мора налазити у тачно одређеној секвенци: Asn-X-Ser или Asn-X-Thr (веома ретко може бити и секвенца Asn-X-Cys). Где X може бити било која аминокиселина изузев пролина. Поред поменутих секвенци неопходно је да део полипептидног ланца има одговарајућу конформацију након увијања да би се могао *N*-гликозиловати (у овом моменту полипептидни ланац се налази у неактивној, такозваној насцентној форми; правилан 3Д облик ће добити накнадно у току биосинтетског пута).

Везивање гликана на одговарајуће место на полипептидном ланцу означава крај другог корака у биосинтези *N*-гликозилованих протеина.

Даља модификација гликана започиње у ЕР, а завршава у ГА и представља трећи корак у биосинтези *N*-гликозилованих протеина. На слици 22. је приказано кроз какве ће све промене проћи гликан пре него што буде завршена његова биосинтеза.



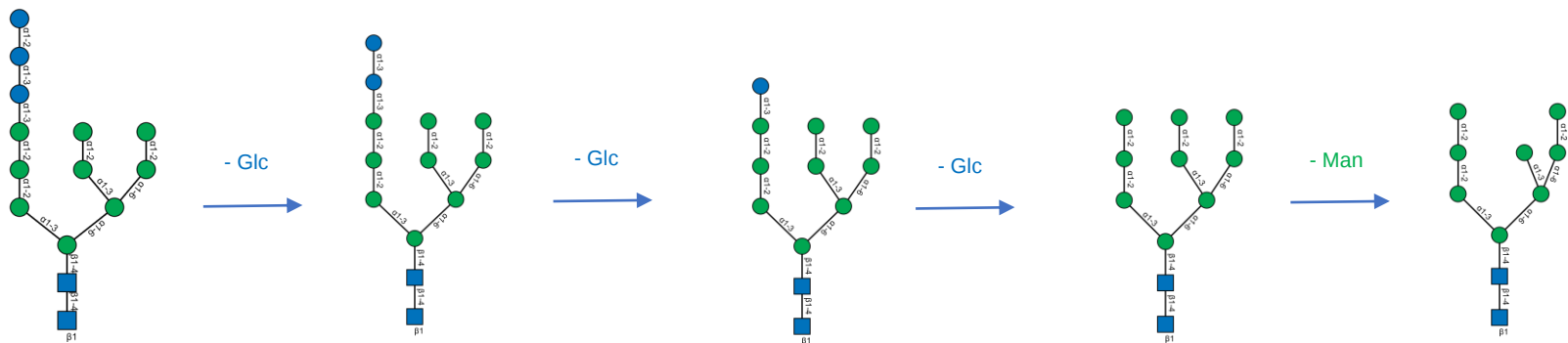
Слика 22. Приказује разлике у глицима почетног олигосахарида са 14 моносахаридних остатака и завршних гликана који могу бити богати манозом, комплексни или хибридни

Даља модификација укључује велики број ензима који су гликозидазе, што значи да ће уклањати одговарајући моносахарид. Име им говори који моносахарид уклањају, па тако глукозидазе уклањају глукозу, манозидазе уклањају манозу итд. Сви ови ензими уклањају моносахарид са нередукуюћег краја гликана. Поред гликозидаза биће укључене и гликозил-трансферазе које ће уводити одговарајуће моносахариде. И овде ће у имену ензима бити

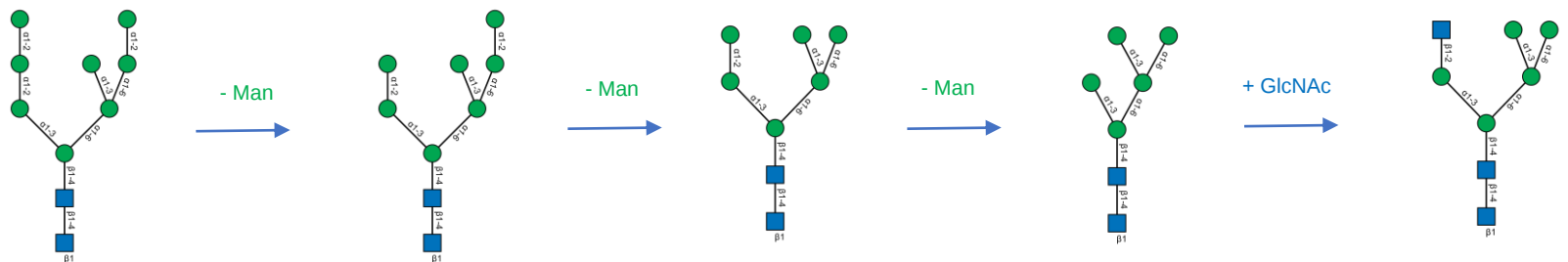
наведен моносахарид који се уводи, као што су GlcNAc-трансфераза која ће уводити *N*-ацетилглюкозамин, галактозил-трансфераза која ће уводити галактозу и тд.

Прве промене у гликану који су трећи корак у биосинтези протеина са *N*-везаним гликанима започињу у лумену ендоплазматичног ретикулума и обухватају уклањање одређених моносахаридних резидуа. Овај процес је приказан на слици 23. Први моносахарид који се уклања је остатак глюкозе. Овај процес чини ензим ЕР глюкозидаза I, поред ове глюкозе уклањају се и још два остатка глюкозе дејством ензима ЕР глюкозидаза II. Уклањање треће резидуе глюкозе дејством поменуте глюкозидазе је повезано са деловањем калнексина/калретикулина и биће објашњено у делу кретања гликопротеина у ћелији и организму. За сада је довољно навести да калнексин/калретикулин су систем који омогућава правилно увијање полипептидног ланца у активну форму (из насцентног у активни 3Д облик) захваљујући присуству тог остатка глюкозе који се уклања након правилног увијања. Глукозни трисахарид представља сигналну секвенцу и контролну тачку, где се ради провера настале структуре. Уколико је све у реду, глюкозидазе ће већ поменутим редом уклонити једну по једну јединицу глюкозе, након чега ће, деловањем ензима ЕР манозидазе бити уклоњен остатак манозе са средње гране гликана. У оваквом облику ће овај гликопротеин бити предат, односно транспортован у Голџијев апарат где се наставља даља модификација гликанског дела (слика 23).

У *cis*-ГА, измене ће обухватати уклањање још неколико манозних остатака (слика 24).



Слика 23. Уклањање првих моносахаридних остатака које се одвија у EP



Слика 24. Уклањање и додавање моносахаридних остатака које се одвија у cis-ГА

Овде треба напоменути да дејству манозидаза неће подлегати *N*-гликани који се у гликопротеинима налазе у високоманозној форми тј. гликопротеини који носе *N*-гликане богате искључиво манозом. Могу прескочити и последњи корак у ендоплазматичном ретикулуму ако је потребно да имају 9 остатака манозе. Такође могу ступити у даље модификације у Голџијевом апарату ако је потребно да имају мање остатака манозе (5-8 резидуа Man). У зависности од њихове потребе зависиће и њихова даља обрада. Ако је потребно да настану гликопротеини чији ће *N*-гликани садржати 9 остатака манозе, њихова синтеза ће се завршити већ у ендоплазматичном ретикулуму. Уколико је потребно да гликопротеин има мање остатака манозе њихова синтеза ће се завршити у *cis*-ГА након уклањања одговарајућег броја манозних резидуа.

Биосинтеза комплексних и хибридних *N*-гликана свакако обухвата уклањање неколико остатака манозе и наставља се и у *cis*-Голџијевом апарату, али и у даљим деловима ГА (*medial* и *trans*).

Након премештања гликопротеина који има 8 остатака манозе у ГА, прво се уклањају три остатка Man и добија се гликопротеин са 5 остатака манозе. Овде се завршава синтеза *N*-гликана богатих манозом. Даље модификације гликанског дела омогућавају биосинтезу гликопротеина богатих комплексним и хибридним *N*-гликанима, што је приказано на сликама 24, 25, и 26. Наредна два корака су значајна у биосинтетском путу комплексних и хибридних *N*-гликана. Прво се дејством GlcNAc-трансферазе I уводи молекул *N*-ацетилглукозамина, док наредни корак омогућава раздвајање биосинтетског пута комплексних и хибридних *N*-гликана. Добијени молекул је полазно једињење за гликопротеине где су *N*-гликани у форми хибрида и таква даља модификација ће зависити од потреба организма. За разлику од њих, комплексни *N*-гликани имају мање остатака манозе (само триманозно језгро) и подлежу уклањању још две резиде манозе дејством манозидаза. Након уклањања два остатка

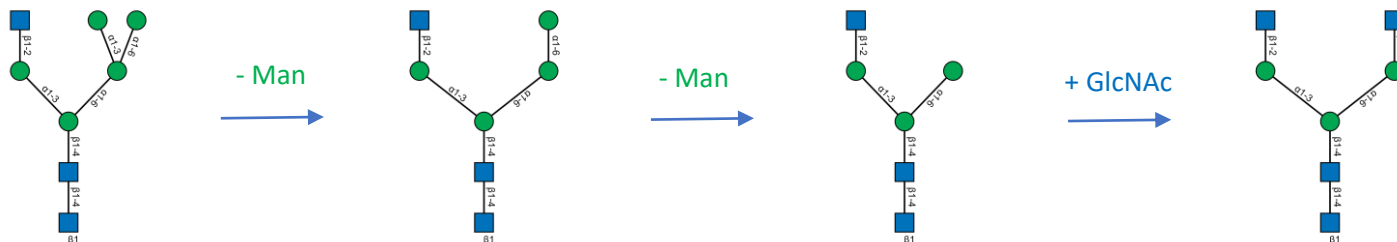
манозе, уводи се још један остатак *N*-ацетилглюкозамина дејством GlcNAc-трансферазе II. Ове реакције се одвијају у средишњем делу или *medialnom*-Голџијевом апарату (слика 25).

Управо у овом кораку могуће је повећање разгранатости гликана. У највећем броју књига комплексни *N*-гликани се приказују са две гране (антене). Иако је овакав тип гранања најчешћи, треба навести да постоје и вишеразгранати комплексни *N*-гликани који могу поседовати три, четири, па чак и пет и шест грана. За ову акцију су неопходни ензими из групе MGAT (енг. *mannosyl-glycoprotein N-acetylglucosaminyltransferase*) који омогућавају гранање и изградњу гликопротеина са разгранатим *N*-гликанима (слика 27). Ови гликани се такође даље модификују након гранања.

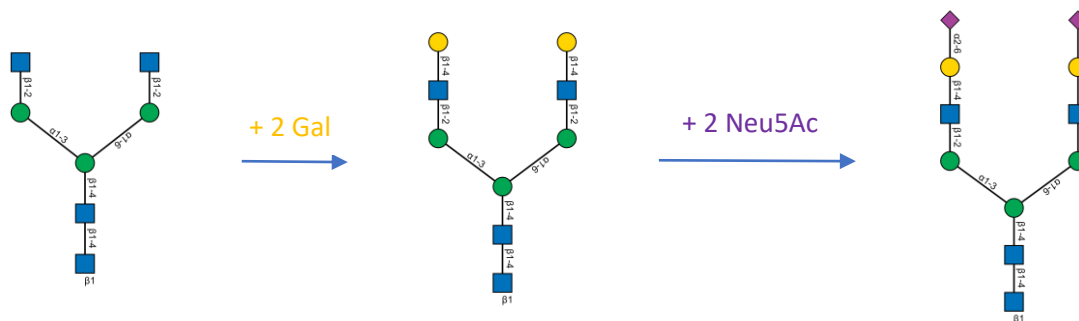
Биосинтеза комплексних *N*-гликана се наставља у *trans*-Голџијевом апарату, што је приказано на слици 26. Ове модификације обухватају увођење различитих моносахаридних јединица и најчешће подразумевају увођење исте моносахаридне резидуе на обе гране (или на више грана). Углавном су то остаци галактозе, као и остаци сијалинске киселине, најчешће у виду *N*-ацетилнеураминске киселине. Завршна моносахаридна јединица је најчешће сијалинска киселина и то у облику *N*-ацетилнеураминске киселине. Секвенца *N*-ацетилглюкозамина и галактозе може и више пута да се понови пре него што се веже остатак сијалинске киселине, па се таква секвенца назива лактозамин. Ако се више пута понавља, назива се полилактозаминском екстензијом.

Често се у комплексне *N*-гликане на први остатак *N*-ацетилглюкозамина који је повезан за аспарагин, односно тик до протеина уводи још једна неуобичајена моносахаридна резидуа, то је остатак фукозе. У тој форми назива се језгарна или енг. *core-Fuc*. Овај моносахарид може се увести и на остатак *N*-ацетилглюкозамина на гранама гликана.

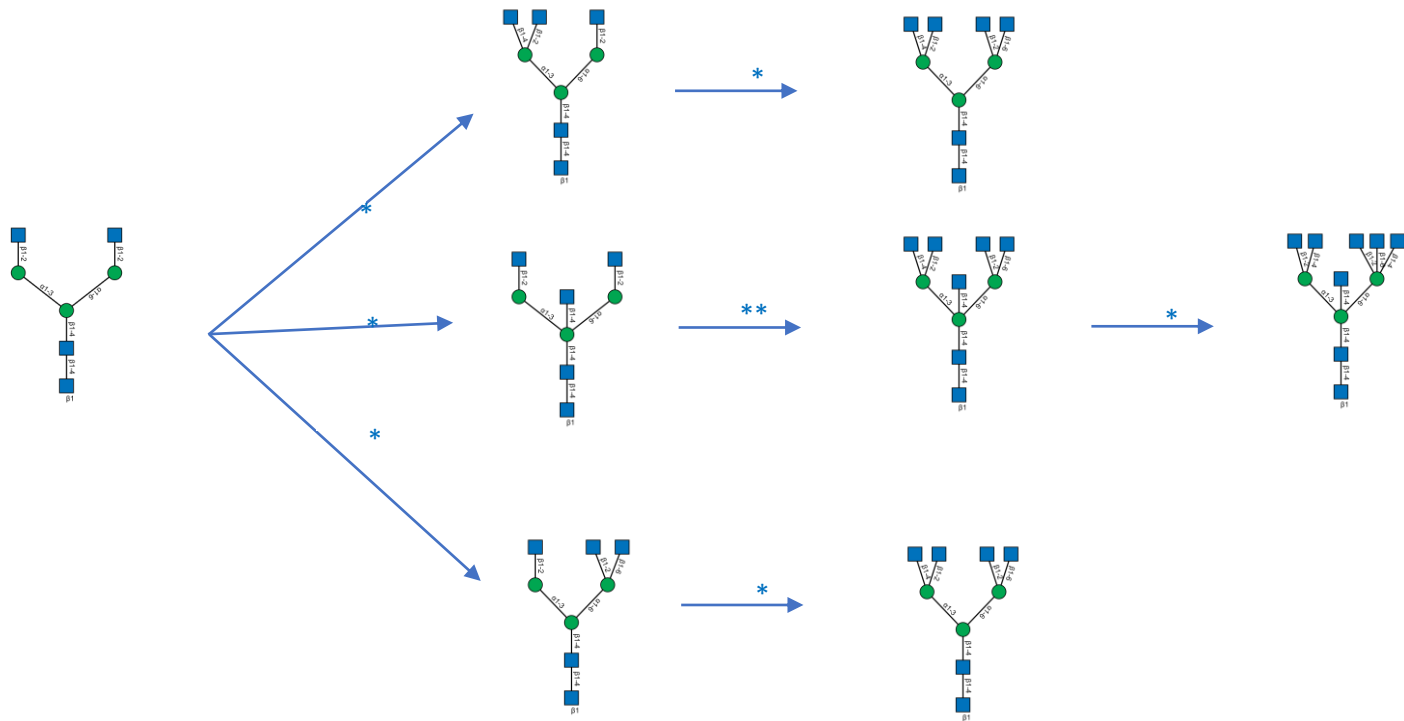
Све ове измене гликанског дела су променљиве и зависе од стања организма, година, али и од потреба за самим гликопротеинима.



Слика 25. Уклањање и додавање моносахаридних остатака које се одвија у *medial*-Голџијевом апарату



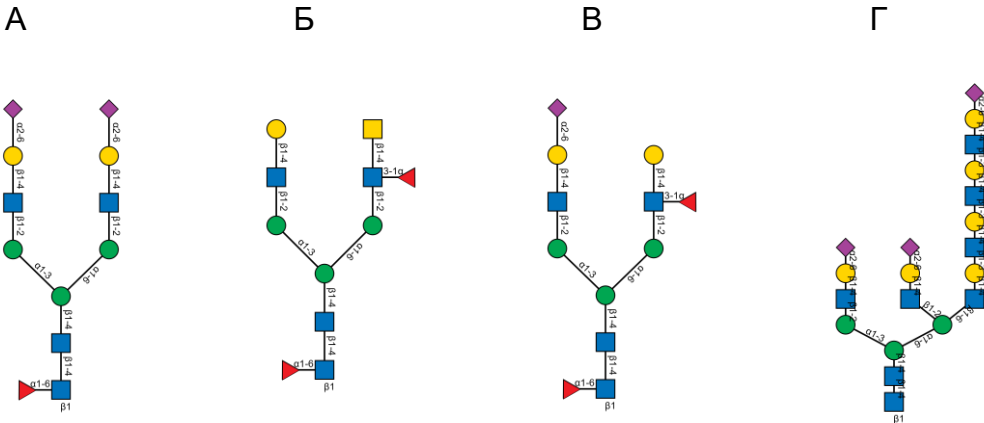
Слика 26. Уклањање и додавање моносахаридних остатака које се одвија у *trans*-Голџијевом апарату, даља модификација комплексних N-гликана



* означава додатак једне резидуе GlcNAc ** означава додатак две резидуе GlcNAc

Слика 27. Изградња разгранатих комплексних N-гликана

На слици 28. су приказани типични комплексни *N*-гликани.



Слика 28. Типични комплексни *N*-везани гликани (тип Г има присутну полилактозаминску екстензију, секвенца $\beta 1 \rightarrow 4 \text{Gal}-\beta 1 \rightarrow 3 \text{GlcNAc}$ може бити поновљена *n* пута)

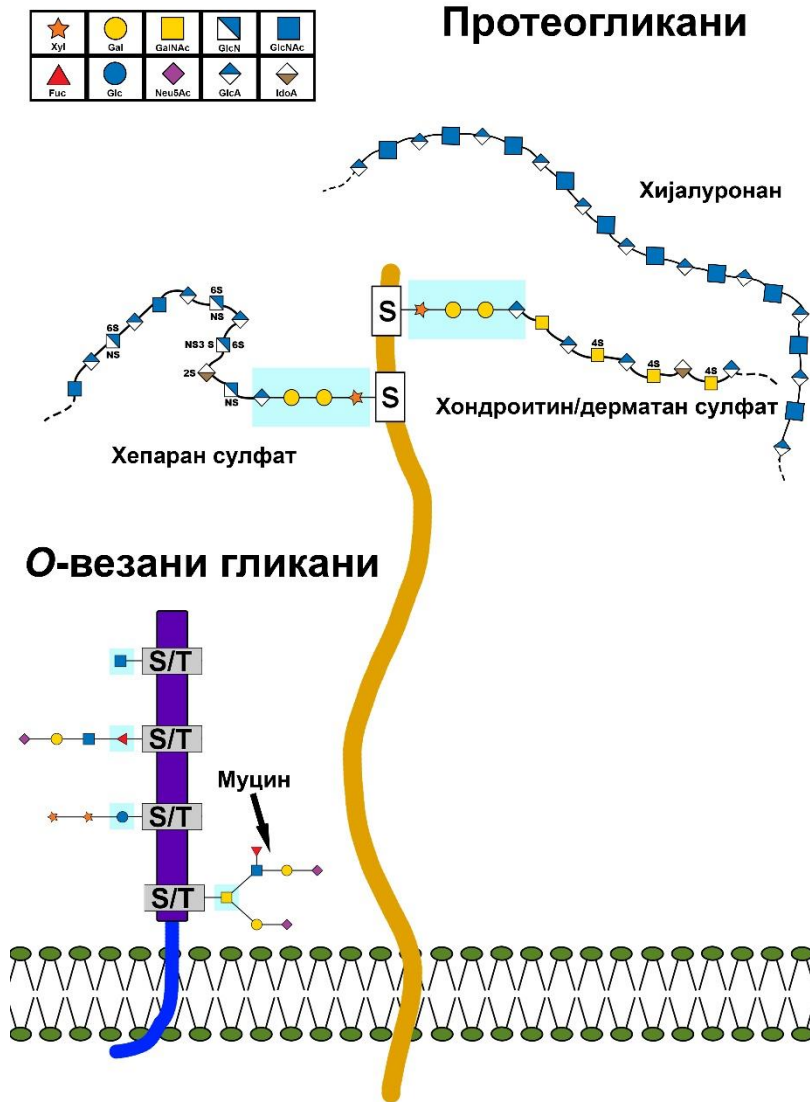
Сви гликопротеини са *N*-везаним гликанима се након синтезе у ЕР и ГА пакују у везикуле и излучују у цитоплазму, одакле одлазе на место где је потребно да се уграде или изврше своју функцију. Овако гликозиловани протеини се најчешће транспортују до ћелијске мембране у коју се уграђују или се даље транспортују у различите телесне течности.

О-везани гликани

Гликопротеини са О-везаним гликанима су класа гликопротеина код којих је гликан повезан са полипептидним ланцем преко хидроксилне групе остатка серина или треонина из полипептидног ланца.

За разлику од различитих типова *N*-везаних гликана, чија је основна структура и биосинтеза имала заједнички почетак и велике сличности, разноликост О-везаних гликана је велика и у биосинтези и у различитим моносахаридним резидуама које

су везане. Ипак О-везани гликани се могу поделити у две велике класе: муцине и протеогликане (слика 29).



Слика 29. Најзаступљеније врсте О-везаних гликана

Заједничко за муцине је да прво имају везану моносахаридну јединицу *N*-ацетилгалактозамина за полипептидни ланац, док је код протеогликана врло често прва моносахаридна јединица

ксилоза, али могу бити и друге моносахаридне резидуе. Поред структурних разлика, муцини и протеоглигани се разликују и у функцији и месту налажења.

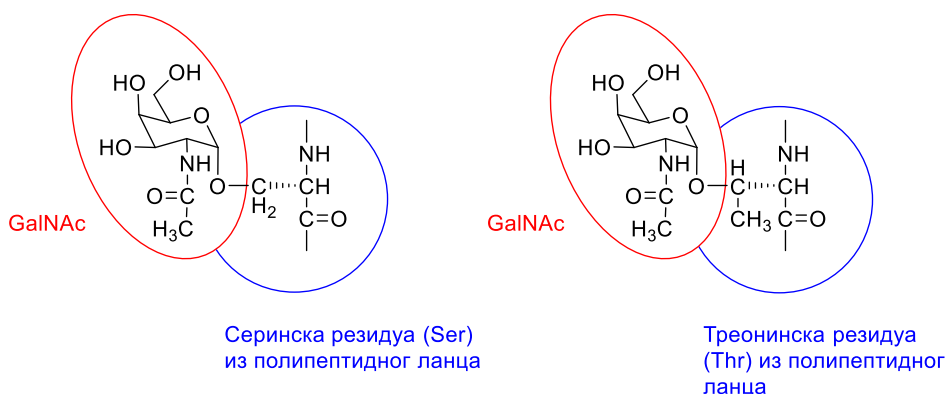
Главне улоге муцина су да задржавају воду најчешће у ткивима и органима који су изложени спољашњој средини, као што је слузокожа, где смањују трење односно делују као лубриканти. Протеоглигани такође задржавају воду, али за разлику од муцина нису лубриканти него пружају чврстину средини у којој се налазе, и најчешће су присутни у потпорним ткивима као што је хрскавица.

МУЦИНИ

Муцини су О-гликозиловани протеини велике молекулске масе чија је главна улога у задржавању воде. Основне функције су заштита од микроорганизама и лубрикантна својства. Заступљени су у великим количинама на слузокожама различитих органа (делови респираторног тракта, урогениталног тракта, гастроинтестиналног тракта и сл.). Због велике молекулске масе и огромне хидрофилне структуре, везују огроман број молекула воде, чије ослобађање је енергетски неповољно, што пружа добру заштиту од испаравања и исушивања слузокоже, те она остаје влажна на додир.

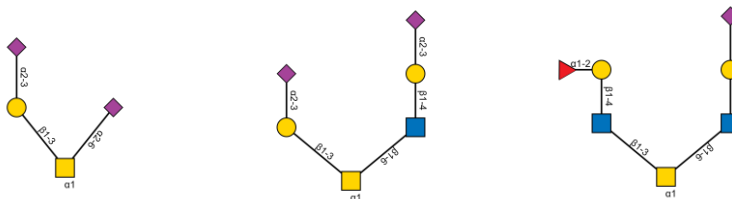
Особина муцина је да се на једном протеину налази преко стотину О-везаних гликана, а врло често се на истом протеину нађе и један до два N-везана гликана. Глигани који су О-везани су краћих ланаца односно имају по неколико моносахаридних јединица (најчешће мање од 10 остатака), али их на једном полипептидном ланцу има пуно, што значи да сам протеин мора имати велик број аминокиселинских остатака серина и/или треонина.

Прва моносахаридна јединица је N-ацетилгалактозамин који је повезан гликозидном везом са хидроксилном групом серина или треонина (слика 30). Ова веза је увек у α -положају.



Слика 30. Веза између агликона и гликана код О-везаних гликана – типа муцина

Гликани који се јављају код муцина имају неколико најчешћих варијанти кратких ланаца чије су структуре приказане на слици 31. У овим глицима су заступљени следећи моносахаридни остаци: *N*-ацетилгалактозамин, галактоза, *N*-ацетилглюкозамин, фукоза и сијалинска киселина (најчешће *N*-ацетилнеураминска киселина).



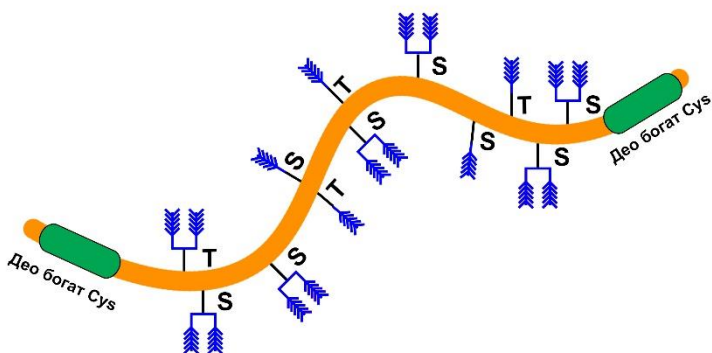
Слика 31. О-везани гликани - типа муцина

Могу ови гликани бити и комплекснији али заједничка карактеристика им је да се најчешће свака грана завршава са остатком сијалинске киселине који је негативно наелектрисан и омогућава везивање воде за себе. Поред присуства већег броја остатака сијалинске киселине, додатно се могу сулфоновати остаци галактозе и *N*-ацетилглюкозамина, што повећава наелектрисање самих муцина тако да се повећава могућност везивања већег броја молекула воде. Сулфатирање регулишу ензими сулфотрансферазе, а као

донор сулфатне групе служи 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосулфат (PAPS).

Муцини се јављају у два облика: као гликопротеини везани за ћелијску мембрану и као секретовани гликопротеини. Секретовани муцини се и додатно умрежавају преко дисулфидних мостова, при чему могу да граде велике олигомере са величином и преко 1 MDa. Ово је неопходно да би се остаци сијалинских киселина довољно одмакли, чиме би се спречиле одбијајуће интеракције између исто наелектрисаних остатака. Секретовани муцини су такође и разгранати управо због поменутих дисулфидних мостова. Ово указује да полипептид који гради муцине, а који поред великог броја остатака серина и/или треонина, мора имати и велик број остатака цистеина (слика 32).

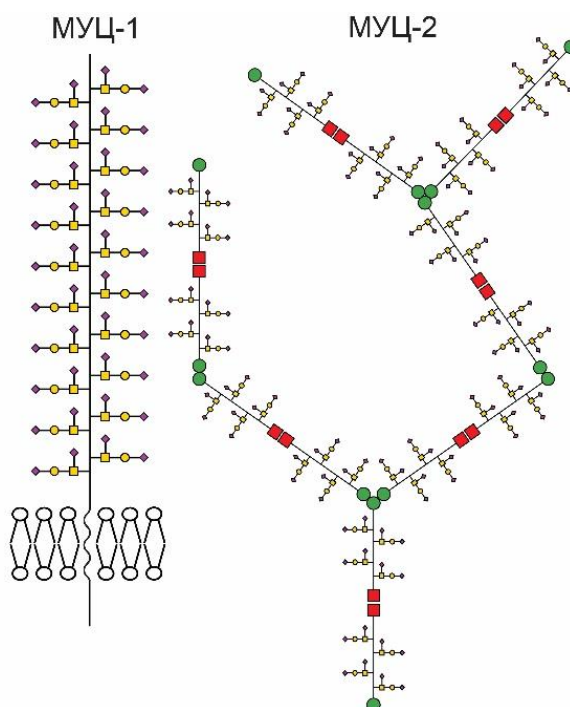
O-GalNAc гликани (тип муцина)



Слика 32. Изглед полипептидног ланца муцина

На слици 33. приказани су примери муцина који су или везани за ћелијску мембрану (МУЦ 1) или слободни - секретовани (МУЦ 2). Може се видети да је секретовани муцин много разгранатији и волуминознији од муцина везаног за мембрану. Ово им омогућава да имају вискозно-еластичне особине које

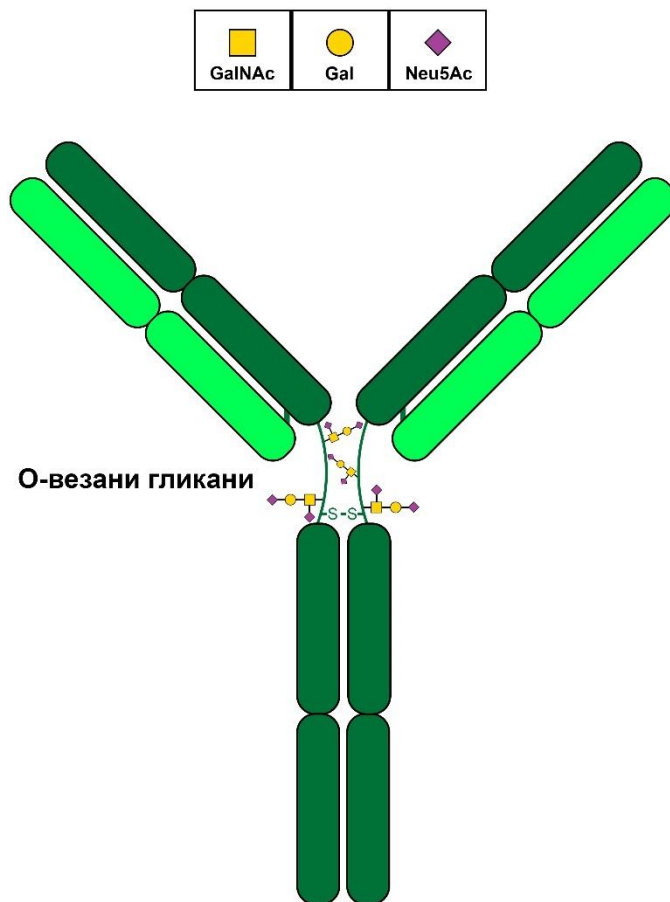
ће утицати на њихову лубрикантну функцију, али и омогућити да делују заштитно, пошто микроорганизми не могу лако да прођу овакву средину и доспеју у организам. Такође ће остаци гликана омогућити и активирање имуног одговора, о чему ће више речи бити у делу о функцији гликана и гликоконјугата.



Слика 33. Пример муцина везаног за мембрану (МУЦ-1) и секретованог муцина (МУЦ-2)

Муцини који су везани за мембрану имају улогу у ћелијској адхезији и препознавању од стране имуног система.

О-везани гликани типа муцина могу се наћи у комплексним протеинима као што су антитела. Пример је IgA који је гликозилован између тешких ланаца. Тачне функције ових гликана се не знају, а највероватније омогућавају крућу структуру (мање флексибилну) и вероватно обезбеђују отпорност на дејство протеаза (стабилност) (слика 34).



Слика 34. Присуство О-везаних гликана типа муцина на антителима (IgA)

Биосинтеза муцина се одвија у Голџијевом апарату. Ту се на формирани полипептидни ланац, на одговарајући остатак серина или треонина везује прва моносахаридна јединица односно *N*-ацетилгалактозамин, дејством ензима GalNAc-трансферазе. Одмах након прве се додају и остале моносахаридне јединице, и то истовремено и у низу ензимских реакција. Битна разлика је и да је *N*-гликозилација катализована комплексом олигосахарилтрансферазом, а преношење GalNAc на Ser или Thr резидуу могу да ураде бројне трансферазе. Ово је значајна разлика у односу на

биосинтезу *N*-везаних гликана. Постоји још неколико значајних разлика у биосинтези *N*- и *O*- везаних гликана. Прва је место биосинтезе - код *O*-везаних гликана процес биосинтезе се у потпуности одвија у Голџијевом апарату, док се код *N*-везаних гликана поред ГА биосинтеза започиње и добрим делом одвија и у ендоплазматичном ретикулуму. Још једна веома значајна разлика у биосинтези *N*- и *O*-гликозилованих протеина је да код синтезе *O*-везаних гликана не постоји специфична аминокиселинска секвенца на којој се одвија гликозиловање, док се код *N*-везаних гликана гликозиловање одвија на тачно дефинисаној олигопептидној секвенци. Ипак постоје одређена истраживања која указују да су делови протеина где долази до формирања *O*-гликозидне везе богатији аминокиселинама пролином и аланином, поред неопходних остатака серина и/или треонина. Треба још напоменути да су донори моносахарида у биосинтези *O*-гликана увек нуклеотидни донори, тј. да биосинтеза *O*-гликана највише подсећа на завршне фазе *N*-гликозилације.

Алтернативно повезивање *O*-гликана

Пре него што се пређе на другу класу гликопротеина са *O*-везаним гликанима – протеогликанима, треба споменути неке, не толико уобичајене гликопротеине са *O*-везаним гликанима, а који се у појединим изворима класификују као посебне групе гликопротеина, односно не спадају у муцине.

Једна од честих моносахаридних јединица која се прва везује за хидроксилну групу остатка серина и/или треонина полипептидног ланца јесте *N*-ацетилглюкозамин у β -положају. Оваква модификација је највише заступљена у цитоплазми, једру и ћелијским органелама. Сматра се да тако модификовани гликопротеини не напуштају ћелије, и да имају извесну сигналну улогу. Протеини који су *O*-гликозиловани са GlcNAc често подлежу и фосфориловању. Поред GlcNAc на хидроксилну групу серина и/или треонина могу се везати и моносахаридне резидеу манозе, галактозе, фукозе и глукозе.

Маноза се везује за остатке серина и/или треонина полипептидног ланца у ендоплазматичном ретикулуму чешће него у Голџијевом апарату, а веза је у α -положају. Овакав тип О-гликана је доста заступљен у мозгу. Дефекти оваквих гликопротеина (нпр. дистрогликана) се повезују са мишићном дистрофијом.

Галактоза се за полипептидни ланац не везује преко хидроксилног остатка серина и/или треонина него хидроксилног остатка хидроксилизина и/или хидроксипролина. Ове модификоване аминокиселине су заступљене у колагену. За галактозу, која се везује у β -положају, везује се и остатак глукозе тако да су остаци хидроксилованих аминокиселина лизина и пролина обогаћени са О-везаним дисахаридима. Ово колагену омогућава формирање правилне структуре троструког хеликса.

Фукоза се за хидроксилну групу серина и/или треонина полипептидног ланца везује у α -положају. Овако модификовани гликопротеини имају значајну улогу у преносу сигнала међу ћелијама.

Глукоза се за остатаке серина и/или треонина полипептидног ланца везује у β -положају. На тај остатак глукозе се често додају један или два остатка ксилозе. Овакви ди- или трисахариди такође имају улогу у преносу сигнала као и претходни О-фукозиловани гликопротеини.

ПРОТЕОГЛИКАНИ

Протеоглигани су О-гликозиловани протеини који су изузетно тешки и велики, везују воду, али им је главни задатак да обезбеђују чврстоћу екстрацелуларном матриксу. Првенствено су значајни за потпору, а не за смањење трења. За разлику од муцина који су имали мали гликански део дугачак свега неколико моносахаридних јединица, глигани протеогликана су изузетно велики и дугачки ланци који могу да садрже и по сто моносахаридних јединица (ови ланци се називају и гликозаминогликани зато што је у структурама обично заступљен и неки аминокиселин-шећер). У зависности у којим

се ћелијама налазе структура им је веома разноврсна. Моносахаридне јединице су поређане у линеарне ланце, уз присуство аминокећера (глюкозамина који може бити ацетилован или сулфонован) и киселине (попут D-глукуронске киселине или L-идуронске киселине). Протеоглици су често називани на основу места где су први пут изоловани (као на пример дерматан-сулфат или хондроитин-сулфат). Управо се дисахаридни мотиви гликозаминогликана (изграђени од аминокећера и киселине) користе за класификовање протеогликана, тј. карактеристични су за одређени протеогликан (табела 2).

Табела 2. Структуре хуманих гликозаминогликана. Дисахаридни мотив је састављен од јединице А (аминокећер) и јединице Б (уронска киселина)

Назив	Јед. А	Јед. Б	Веза са протеинима	Ткиво
Хијалуронан (хијалуронска киселина)	GlcNAc	GlcA	Нема ковалентну везу са протеином, реагује нековалентним интеракцијама са протеоглицима	Везивно ткиво, кожа, хрскавица
Хондроитин-сулфат	GalNAc	GlcA	Ковалентна веза, O-Xyl	Хрскавица, кости, рожњача, кожа
Дерматан-сулфат	GalNAc	GlcA/IdoA	Ковалентна веза, O-Xyl	Кожа, зидови крвних судова, срчани записци
Хепарин-/Хепаран-сулфат	GlcN/GlcNAc	GlcA/IdoA	Ковалентна веза, O-Xyl	Плућа, зидови артерија, површина ћелија
Кератан-сулфат	GlcNAc	Gal	Ковалентна веза, N-GlcNAc, O-GalNAc	Хрскавица, рожњача

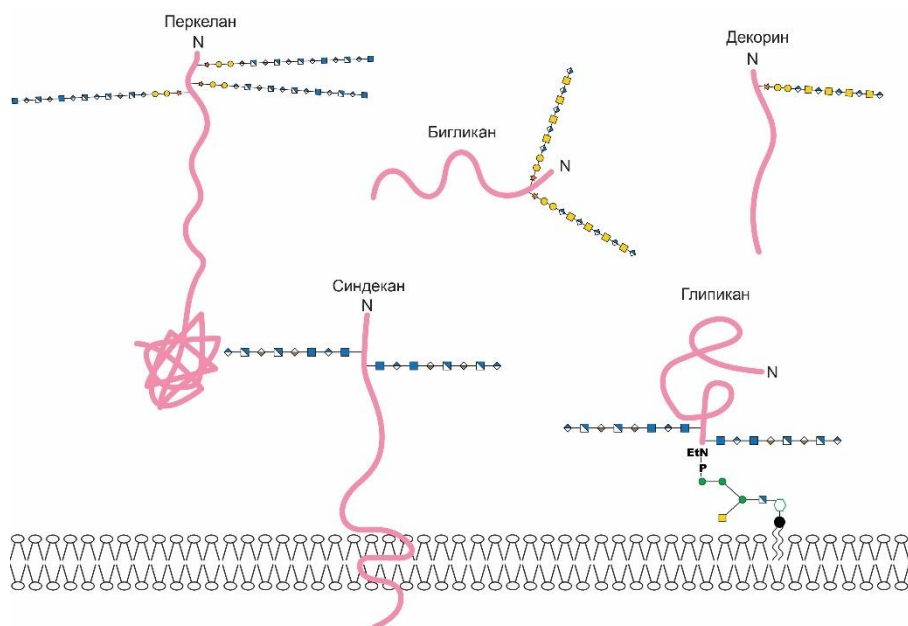
За разлику од свих набројаних гликозаминогликана, једино кератан-сулфат нема у својој структури остатак уронске киселине, него галактозу која може бити сулфонована. Такође је изузетак и због тога што је најчешће везан преко азота (Asn) за протеин мада може бити везан и преко кисеоника (Ser/Thr).

Уједно, једино код кератан-сулфата прва моносахаридна јединица је GalNAc, док је код осталих гликозаминогликана први моносахарид ксилоза која се везује преко кисеоника из хидроксилне групе серина.

Протеоглигани се могу поделити у две велике класе:

- протеоглигани плазмалне мембране и
- протеоглигани екстрацелуларног матрикса.

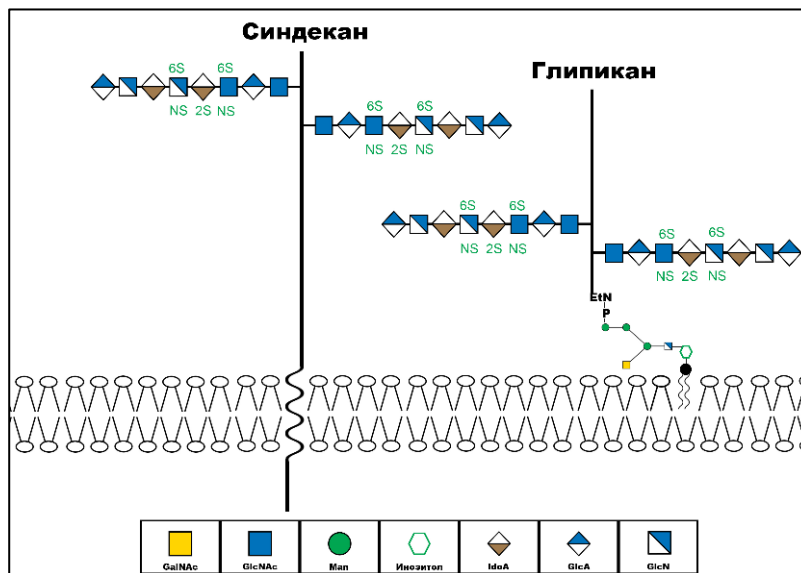
Примери протеогликана присутних у екстрацелуларном матриксу или повезаних са плазмалном мембраном могу се видети на слици 35.



Слика 35. Протеоглигани екстрацелуларног матрикса (декорин, перлекан, бигликан) и протеоглигани плазмалне мембране (глипикан, синдекан)

Протеоглигани плазмалне мембране су повезани са ћелијском мембраном на два начина: или су својим протеинским делом уроњени у липидни двослој (трансмембрански протеини, попут синдекана) или су

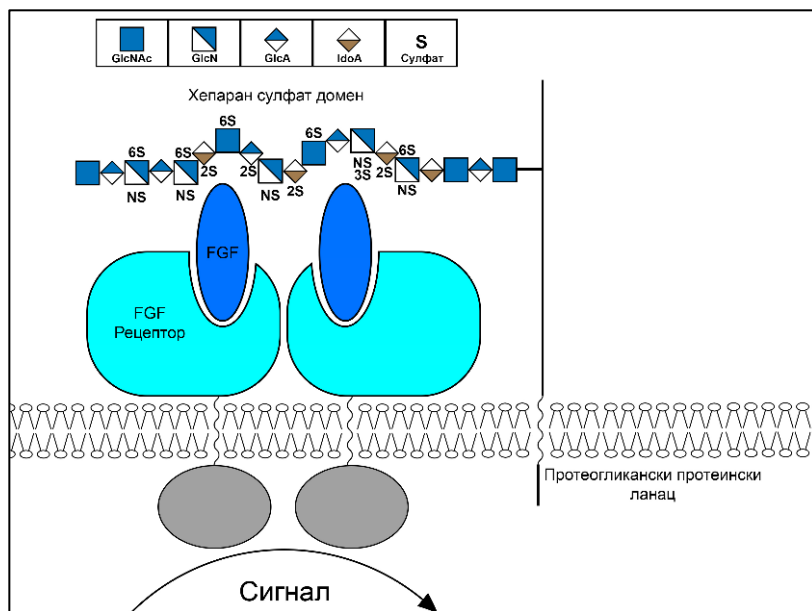
закачени преко продужетка гликозилфосфатидилинозитола (GPI) (попут глипикана), што је приказано на слици 36. У поглављу о гликолипидима биће више речи о гликолипидном продужетку.



Слика 36. Веза синдекана и глипикана са ћелијском мембраном

Фамилију синдекана чине трансмембрански гликопротеини који имају велики екстрацелуларни домен и мали интрацелуларни. Синдекани омогућавају комуникацију ћелије са околином. Најзначајнија група ових молекула су гликани закачени само екстрацелуларним доменом за мембрану. Могу бити типа хепаран-сулфата и хондроитин-сулфата односно дерматан-сулфата. Присуство ланца типа хепаран-сулфата је веома значајно јер омогућава комуникацију са различитим факторима раста (нпр. *fibroblast growth factor*, FGF). Протеоглигани типа синдекана служе као ко-рецептори за факторе раста и омогућавају активацију примарног рецептора за поменуте факторе. Екстрацелуларни домен синдекана има на себи везујућа места за факторе раста, док интрацелуларни домен поседује тирозин-киназну активност. Улога ланца типа хепаран-сулфата је да стабилизује цео

комплекс који настаје између рецептора и фактора раста. Два молекула фактора раста се везују за рецептор док ланци хепаран-сулфата додатно учвршћују везивање (слика 37.). Ове екстрацелуларне акције протеогликана доводе до активирања тирозин-киназне активности унутар ћелија. Без хепаран-сулфатних ланаца димер рецептора FGF-а не би одржао структуру и тиме не би обавио функцију.



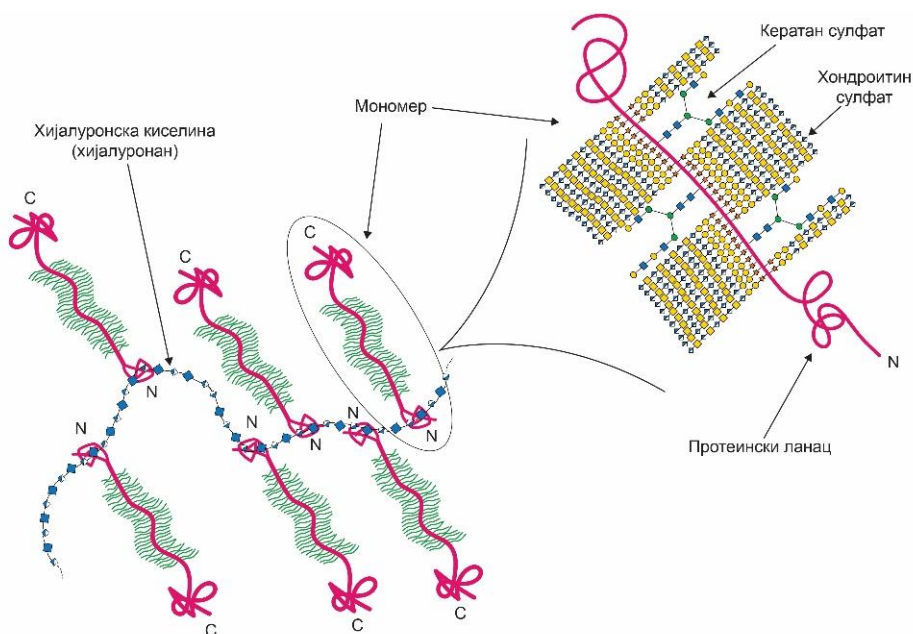
Слика 37. Комплекс рецептора за фактор раста са два молекула фактора раста и синдеканом, где се види утицај хепаран-сулфатних ланаца на везивање и стабилизацију комплекса

За разлику од синдекана, фамилија глипикана нема тако разнолике гликане на протеинском делу јер су на протеину глипикана везани само ланци хепаран-сулфата. Уз то, протеин глипикана није трансмембрански протеин него „штрчи” са спољашње стране плазмалне мембране што му омогућава гликолипидни додатак (гликозилфосфатидилинозитолни (GPI) продужетак) који је повезан са протеином преко С-краја. Глипикани су есенцијални за развој и морфогенезу.

Протеоглигани екстрацелуларног простора су слободни молекули (нису повезани са мембраном) који имају улогу у пружању потпоре екстрацелуларном матриксу и дефинишу остале особине које зависе од ћелије у којој су синтетисани или у чијем окружењу се налазе (нпр. еластичност хрскавице). Њихове биохемијске улоге су директно повезане са њиховом структуром, те њихова грађа омогућава формирање супрамолекулских структура које ће утицати на физичке особине ткива где се налазе. Постоје разнолики облици протеогликана екстрацелуларног матрикса, као што су: перлекан, декорин, бигликан, и највише истражени агрекан (слике 35. и 38.). Морфолошки, могу имати једно или више места за гликозилацију, на пример декорин има само једно место, док агрекан има преко сто потенцијалних места гликозилације. Могу имати везане различите гликозаминогликанске ланце, тако перлекан има само хепаран-сулфатне ланце док бигликан и декорин имају само хондроитин-сулфатне или дерматан-сулфатне ланце. Агрекан, за разлику од осталих, има везане различите гликозаминогликанске ланце и додатно гради агрегате са хијалуронском киселином. Треба навести још једну особину за протеогликане, а то је да протеин може део времена бити слободан; дегликозиковати се када није потребно присуство гликана, тј. "part-time" (превод са *енг. делимично*).

Агрекан, саставни део хрскавице, један је од првих откривених и највише истражених протеогликана екстрацелуларног матрикса. Сегменти овог молекула се могу видети на слици 38. Агрекан је протеогликан који је изграђен од полипептидног ланца (*енг. core protein*) који на себи има велики број гликозаминогликанских ланаца. Ови гликозаминогликански ланци су углавном хондроитин-сулфатни ланци (отприлике око сто оваквих ланаца је везано за сваки полипептидни ланац) од којих сваки ланац садржи око сто моносахаридних јединица. Поред хондроитин-сулфата, у агрекану се може пронаћи и око 30 кератан-сулфатних ланаца (сваки има око педесет моносахаридних јединица), који су за полипептидни ланац везани преко амино-групе. Сваки агрекан је мономер

који представља део агрегата тј. супрамолекулске структуре. Ова комплексна структура настаје тако што се полипептидни ланац агрекана својим *N*-крајем нековалентно везује за један молекул хијалуронске киселине. На једном молекулу хијалуронске киселине се налази отприлике 100 до 200 остатака агрекана. На *C*-крају полипептидног ланца агрекана постоји домен за везивање лектина о којима ће бити више речи у другом делу овог уџбеника. Како ова супрамолекулска структура функционише? Свака моносахаридна јединица може да веже за себе воду, што омогућава да се овај агрегат понаша као сунђер. Када није под притиском за себе има везан велик број молекула воде, а када се притисне отпушта воду и тиме пружа хрскавици еластичност, тј. добро угибање под притиском костију. Везивање воде је омогућено присуством великог броја аминокиселина, шећерних киселина и сулфонованих остатака моносахарида. Волумен овог агрегата је огроман, ако се зна да је само један мономер агрекана величине 2.5×10^6 Da. Постоје и други протеоглици матрикса који могу да граде агрегате као што су неурофан у мозгу, версикан у зидовима крвних судова и тд.



Слика 38. Приказ агрегата (лево) и агрекана (десно), протеогликана екстрацелуларног матрикса који изграђује хрскавицу

Разноликост протеогликана се огледа у различитим гликозаминогликанским ланцима, количини присутних гликанских ланаца, као и њиховим дужинама, дужинама полипептидних ланаца, и наравно финалним декорацијама као што су сулфатни остаци. Ово пружа огромну разноликост и биолошку варијабилност која указује на велик значај ових молекула.

Биосинтеза протеогликана се одвија у Голџијевом апарату. И као и код муцина, додавање моносахарида бива одједном у ензимским реакцијама које су међусобно повезане и настављају се једна на другу. Код већине протеогликана прва моносахаридна јединица ксилоза (изузетак је кератан-сулфат). Ензим ксилозилтрансфераза препознаје секвенцу Ser-Gly као потенцијално место везивања, па се за кисеоник хидросилне групе серина уводи прва моносахаридна

јединица; дозор ксилозе у овој реакцији је UDP-Xyl. На ксилозу се потом везују два остатка галактозе, а потом остаток глукуронске киселине, након чега долази до раздвајања биосинтетских путева хепаран- и хондроитин-сулфата. Тачније, увођењем *N*-ацетилгалактозамина настаје прекурсор хондроитин-сулфата или дерматан-сулфата, а увођењем *N*-ацетилглукозамина настаје прекурсор хепаран-сулфата. Након тог долази до елонгације ланца где се понављају одређене моносахаридне јединице:

- хондроитин-сулфат (GlcA-GalNAc)_n
- дерматан-сулфат (GlcA-GalNAc)_n
- хепаран-сулфат (GlcA-GlcNAc)_n

Познато је да у финалној структури протеогликана поред ових моносахаридних јединица постоје и друге моносахаридне јединице, закључује се да се након биосинтезе у Голџијевом апарату дешавају и завршне модификације ових молекула.

Величина протеогликана односно дужина гликанских ланаца је одређена величином Голџијевог апарата али и односом присутних ензима неопходних за биосинтезу.

Завршне модификације се огледају у епимеризацији D-глукуронске киселине у L-идуронску киселину, као и у деацетилацији амино-група *N*-ацетилглукозамина. Значајне измене представљају и увођења сулфатних група које битно мењају наелектрисање молекула и могућност везивања воде.

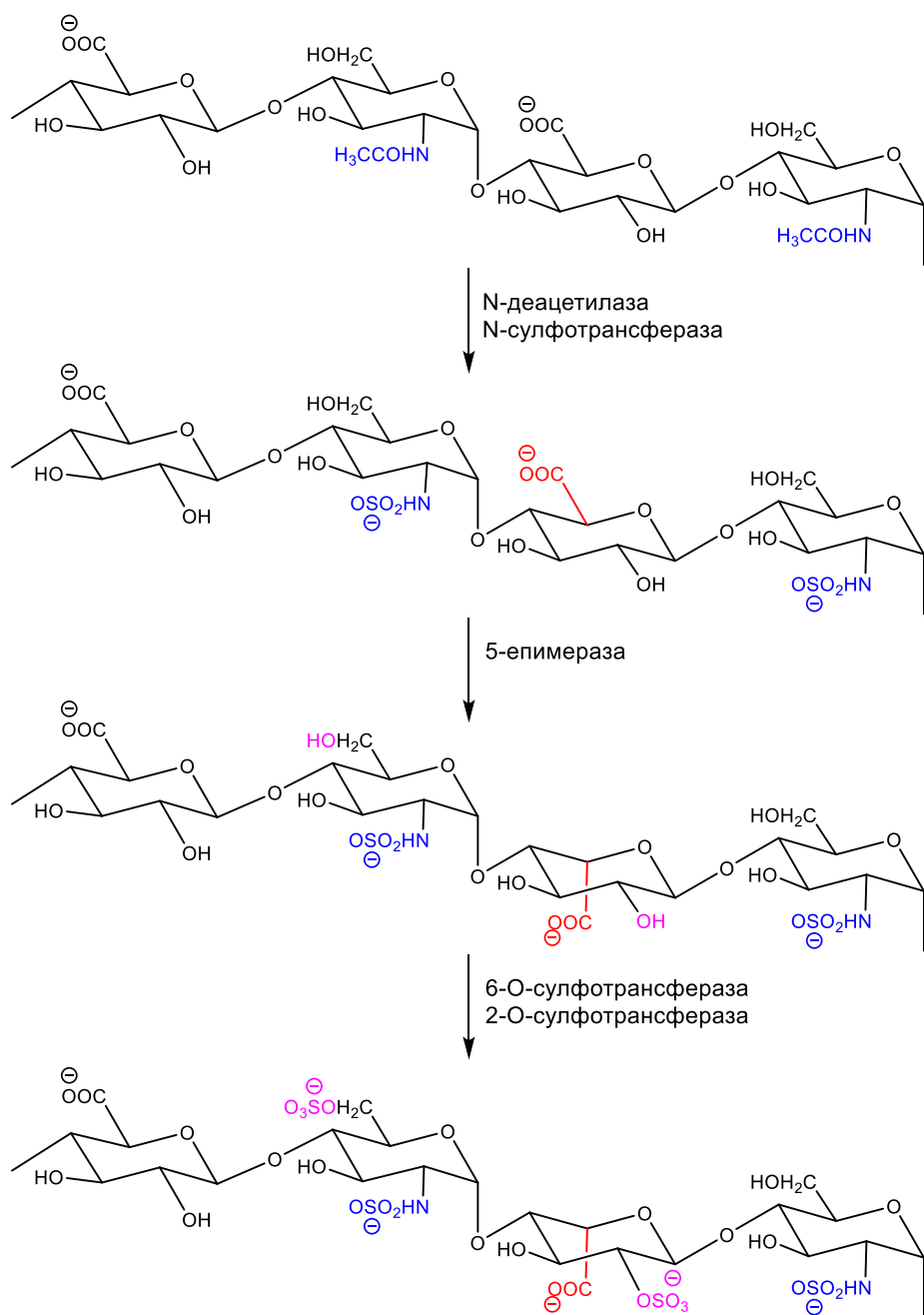
На крају завршне модификације биосинтезе протеогликана добијају се следеће понављајуће секвенце:

- хондроитин-сулфат (GlcA-GalNAc)_n
- дерматан-сулфат (GlcA-GalNAc-IdoA-GalNAc-IdoA-GalNAc-IdoA-GalNAc-GlcA-GalNAc)_n
- хепаран-сулфат (GlcA-GlcNAc-IdoA-GlcN-GlcA-GlcNAc-GlcA-GlcN-IdoA-GlcN)_n

Биосинтеза кератан-сулфата зависи од типа везе. Уколико је везан преко азота, биосинтеза прати пут *N*-везаних гликана уз завршне модификације гликанских ланаца који имају

одговарајућу понављајућу секвенцу (Gal-GlcNAc) и мноштво уведених сулфатних група. Кератан-сулфат који је везан преко кисеоника се синтетише као муцини, са завршном модификацијом гликана где се поново јавља секвенца Gal-GlcNAc са уведеним сулфатним групама.

На слици 39. приказане су финалне модификације у биосинтези хепаран-сулфата као једног од главних представника гликозаминогликана, са значајном биолошком функцијом и великом заступљеношћу у структурама протеогликана.



Слика 39. Финалне модификације хепаран-сулфата

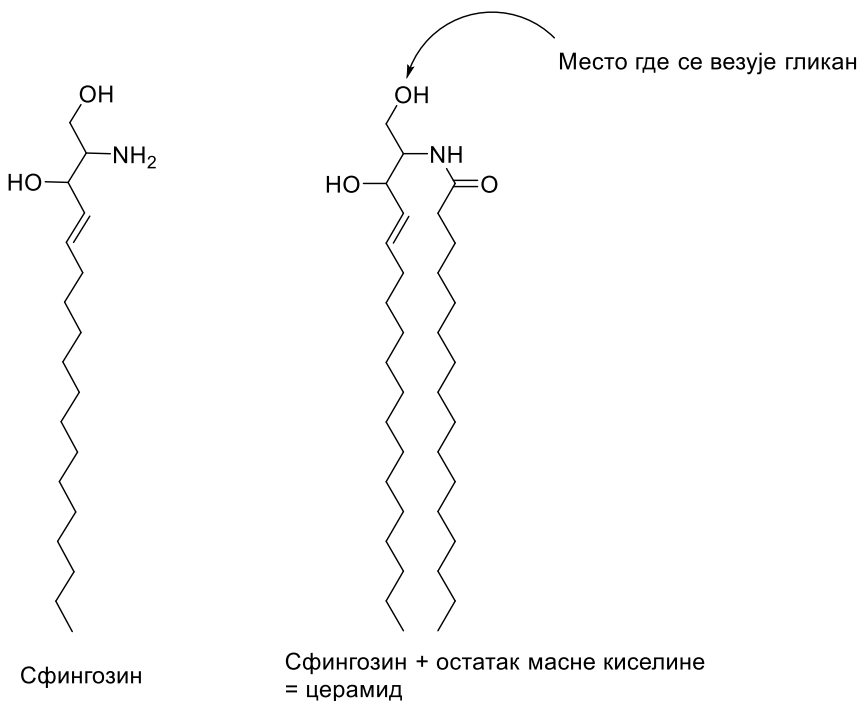
Пре завршетка дела о протеогликанима треба објаснити разлику у хепаран-сулфату и хепарину.

Хепаран-сулфат се синтетише у свим ћелијама организма док хепарин синтетишу само базофили и мастоцити. Структурне разлике јесу у томе што се код хепарина преко 80% остатака GlcNAc деацетиљује и *N*-сулфонује, а преко 70% остатака глукуронске киселине се преводи дејством епимеразе у идуронску киселину. Што се тиче биолошке активности, и хепаран-сулфат може показати антикоагулантне особине које су карактеристичне за хепарин, али знатно слабије од самог хепарина. Комерцијални хепарин је углавном пентасахарид (GlcN-IdoA-GlcN-GlcA-GlcNAc, при чему су сви остаци изузев GlcA сулфоновани) који се синтетише у лабораторији и представља активну секвенцу одговорну за биолошки одговор. Примене синтетског хепарина су: заустављања згрушавања крви у циљу превенција тромбоза постоперативно код пацијената, током трансфузије крви, у току дијализе и код других ризичних група.

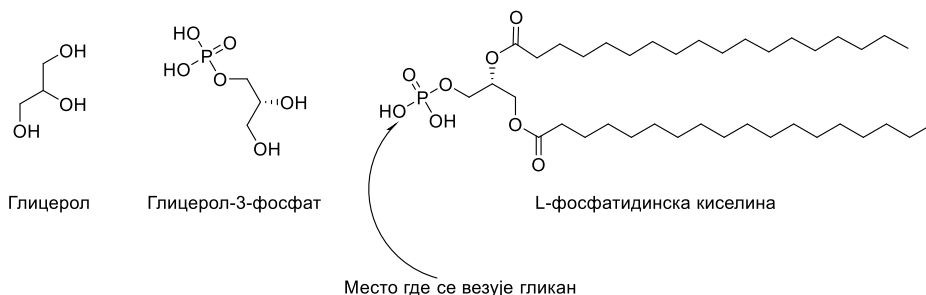
Поглавље 3 Гликолипиди

Гликолипиди су конјугати гликана и липидног агликона. До сада су откривени као саставни део ћелијских мембрана и мембрана ћелијских органела. Основна подела мембранских гликолипида је на гликофинголипиде и гликофосфолипиде. На слици 40. могу се видети делови липидног агликона који изграђује гликолипиде. Липидни агликон гликофинголипида је церамид, који је изграђен од аминок-алкохола сфингозина који је амидном везом повезан са остатком масне киселине, а липидни агликон гликофосфолипида је L-фосфатидинска киселина, која је изграђена од остатка фосфорне киселине повезане естарском везом са глицеролом код ког су друге две хидроксилне групе естерификоване остацима масних киселина.

А



Б

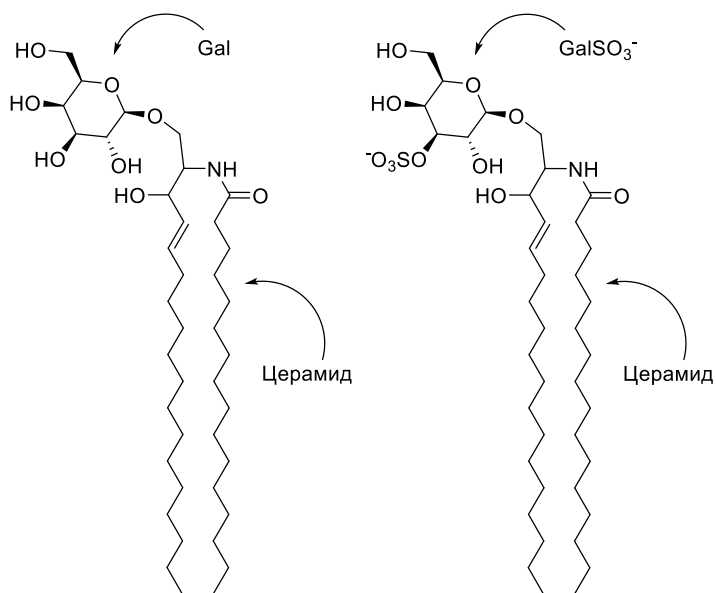


Слика 40. Структуре липидних агликона гликофинголипида (А) и гликофосфолипида (Б)

Варијације гликофинголипида и гликофосфолипида су бројне, како у промени липидног агликона односно врста везаних масних киселина, тако и у гликанском делу у виду разноликости везаних сахара. Деле се на неутралне (немају наелектрисани шећер или јонску групу), сијалиловане (имају један или више остатака сијалинске киселине) и сулфоноване.

Подела гликофинголипида на две групе урађена је на основу прве моносахаридне јединице која је везана за агликон. Прва моносахаридна јединица може бити глукоза или галактоза, па се гликофинголипиди деле на глукофинголипиде (прва Glc) и галактофинголипиде (прва Gal). Када гликофинголипиди имају само једну моносахаридну јединицу везану за агликон (сфинголипид) називају се **цереброзиди**. Међу цереброзидима чешће су заступљени галактофинголипиди, док се код глукофинголипида углавном појављује разгранатији олигосахаридни гликански део.

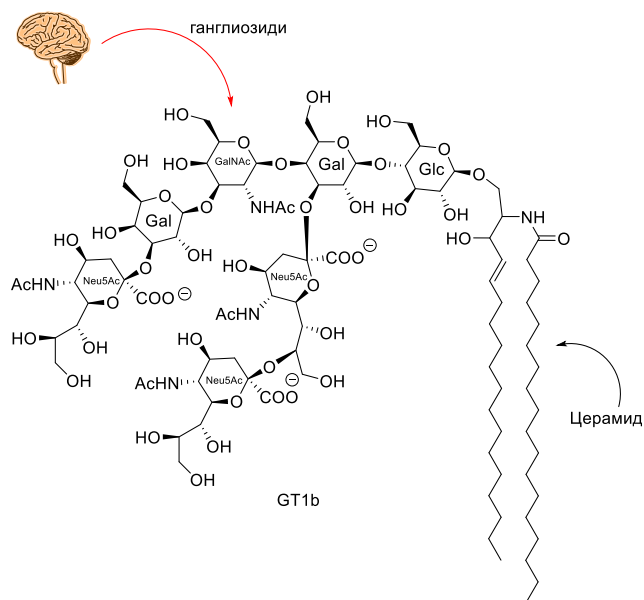
Галактофинголипиди су једноставније грађе и углавном је за агликон увек у β -положају везана једна моносахаридна јединица галактозе која евентуално може бити сулфонована у положају 3 (слика 41.).



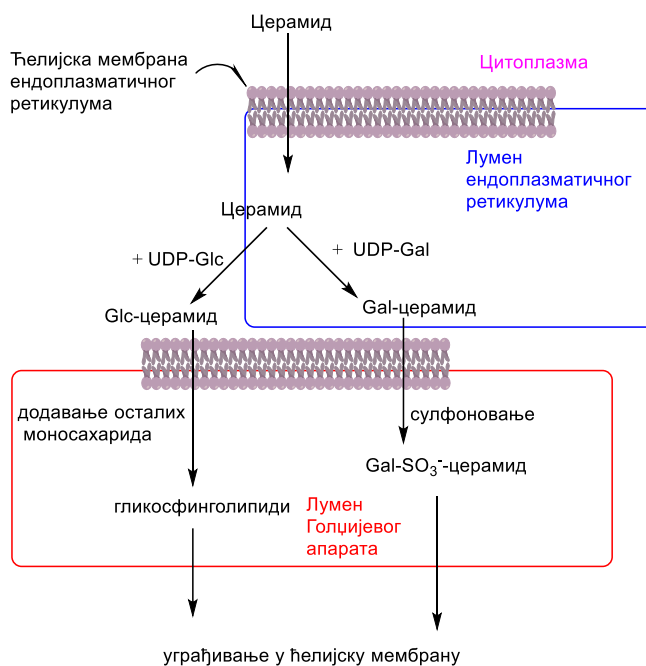
Слика 41. Изглед карактеристичних галактосфинголипида (тип цереброзида)

За разлику од галактосфинголипида, **глюкосфинголипиди** су много сложенији и разноврснији и могу се поделити у неколико група. Заједничко им је да је прва моносахаридна јединица (Glc) исто повезана β -везом са агликоном.

Иако постоји велики број група глюкосфинголипида, овде ће бити наведено најзначајнијих седам, и то су: ганглио-, лакто-, неолакто-, глобо-, изоглобо-, молу- и артро- (слика 42.).



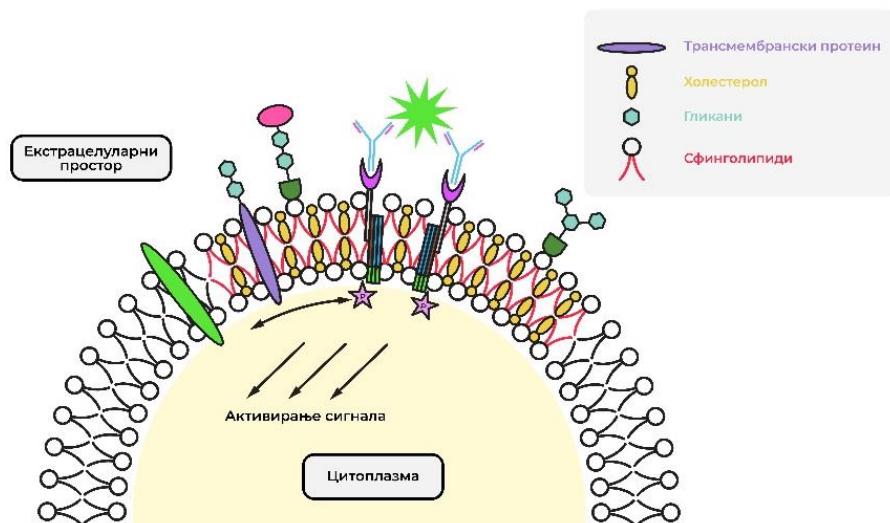
Слика 43. Структура ганглиозида GT1b



Слика 44. Шематски приказ биосинтезе гликофинголипида

Биосинтеза липидног агликаона церамида се одвија на цитоплазматичној страни ендоплазматичног ретикулума, одакле се даље преноси у лумен ЕР. Постоји јасна разлика у преносу церамида у биосинтези глукосфинголипида и галактосфинголипида. Код галактосфинголипида церамид улази у лумен ендоплазматичног ретикулума где се везује прва моносахаридна јединица, тј. галактоза, потом Gal-церамид даље прелази у ГА где се може сулфоновати (може се прескочити радња ако је потребан галактосфинголипид без сулфатне групе у положају 3); након чега излази у цитоплазму одакле ће бити уграђен у ћелијску мембрану. Код глукосфинголипида биосинтеза се нешто дуже одвија на спољашњој страни ЕР. Поред биосинтезе церамида, на спољашњој страни ЕР се везује и прва моносахаридна јединица тј. глукоза. Потом Glc-церамид улази у Голџијев апарат и даља модификација гликанског дела се одвија у ГА под дејством бројних гликозилтрансфераза. Након завршене биосинтезе у ГА, синтетисан глукосфинголипид излази у цитоплазму одакле се уграђује у ћелијску мембрану. Сви гликосфинголипиди се јављају са спољашње стране ћелијске мембране где остварују контакт са екстрацелуларним матриксом, и посебно су заступљени на ћелијским мембранама нервних ћелија.

Значајну улогу гликолипиди имају у деловима ћелијских мембрана које се називају липидним „raft”-ом или острвом, деловима ћелијске мембране који имају другачију вискозност и изгледају као сплавови уроњени у течност. Липидни „raft” је изграђен од сфинголипида (врло често гликосфинголипида), холестерола и мембранских протеина. Ови делови мембране могу да се спајају и раздвајају и да на тај начин омогуће или онемогуће протеин-протеин интеракције. Омогућавају протеинску активност, као и кретање мембранских протеина, и на тај начин регулишу различите ћелијске процесе, као што су неуротрансмисија, кретање рецептора, комуникација и ензимске реакције. Пример липидног „raft”-а дат је на слици 45.

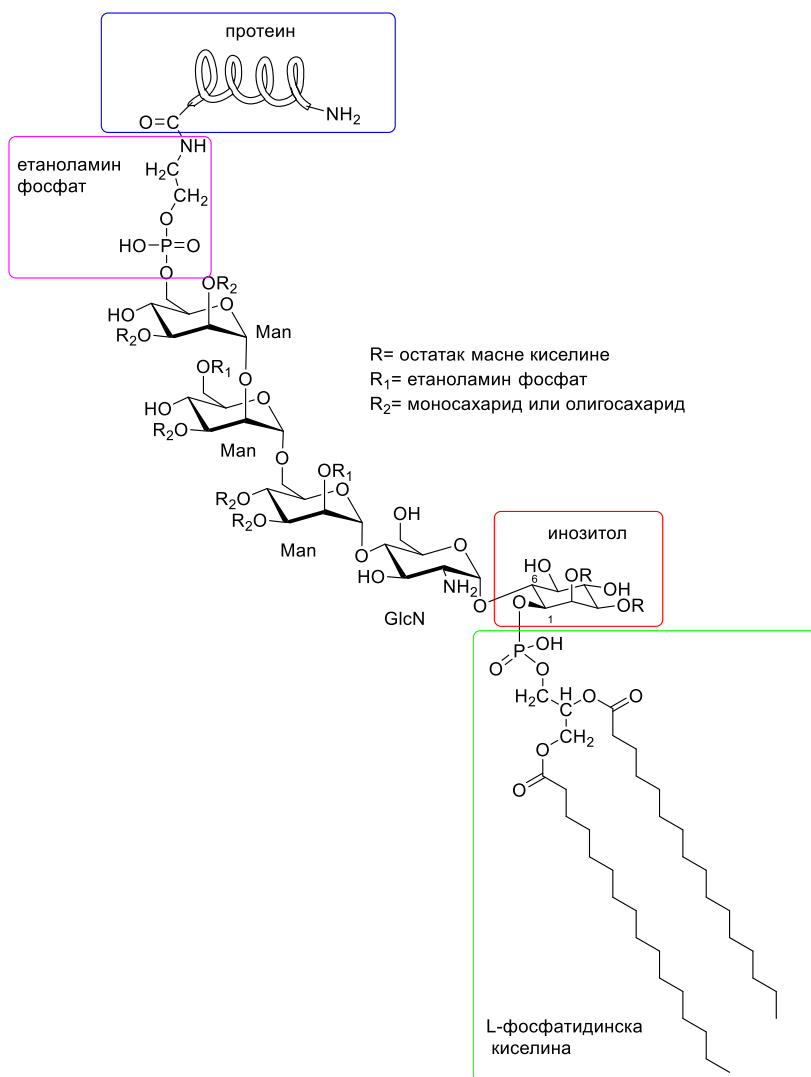


Слика 45. Изглед липидног „raft“-а

Улоге гликолипида су бројне и њихов значај се најбоље може пратити недостатком неког од ензима у метаболизму гликолипида који изазива озбиљна обољења, као што су болести складиштења лизозома, попут Теј-Саксове (енг. *Taj-Sachs*), Фабријеве (енг. *Fabry*) и Гошеове (енг. *Gaucher*) болести.

Гликолипидно „сидро“

Посебну пажњу треба посветити гликолипидним додацима који омогућавају усидравање биомолекула у ћелијску мембрану. Најчешће се протеини преко гликолипидног „сидра“ повезују и чврсто држе везани за ћелијску мембрану окренути ка спољашњој страни. Најчешћи облик овог гликолипидног „сидра“ (енг. **Glycolipid anchor**) је гликозилфосфатидилинозитол (GPI) додатак. Иако је код сваког организма присутна нека варијација, најчешћи облик овог додатка је приказан на слици 46.



Слика 46. Етаноламин-фосфат гликозилфосфатидилинозитолног (GPI) „сидра”

Протеини су повезани ковалентном везом за гликолипидне додатке и то својим С-крајем. Притом се веза углавном формира између карбоксилне групе протеина и амино-групе етаноламина који је саставни део ових додатака. Иако постоји неколико места која су променљива у структури гликозилфосфатидилинозитолног (GPI) „сидра”, одређени

делови су константни и увек присутни. Као на слици 46. то су етаноламин који је фосфорирован, потом минимум три остатка манозе који су повезани за глюкозамин, који је даље α -1 $\rightarrow$ 6 везом повезан са инозитолом, а инозитол је даље преко фосфатног естра повезан са диацилглицеролом.

Променљиви делови су два остатка масних киселина повезани за глицерол, потом инозитол може имати везан један остатак масне киселине у положају 2 или 3. Сваки остатак моносахарида може имати на себи још неки моносахарид, а поред тога врло често је то и остатак фосфорированог етаноламина.

Биосинтеза гликолипидних додатака се одвија у ендоплазматичном ретикулуму и приказана је на слици 47. Биосинтеза започиње са спољашње стране мембране ЕР и то везивањем инозитола за фосфатни остатак диацилглицерола. Потом донор UDP-GlcNAc доноси *N*-ацетилглюкозамин који се везује у положај 6 за инозитол. Након тога је могуће уклањање ацетил групе са *N*-ацетилглюкозамина, те у том случају за инозитол остаје везан глюкозамин. Додатне измене у виду ациловања инозитола се могу дешавати и са спољашње и с унутрашње стране мембране ЕР, што зависи од степена развијености организма. Даље се таква структура преноси на унутрашњу страну мембране ЕР где се наставља изградња GPI додатка. Код еволуционо развијенијих организама прво се дешава ациловање инозитола, а код осталих креће везивање моносахаридних јединица. Прво се везује маноза, чији је донор долихол-фосфат маноза, потом се додају још два остатка манозе. Поред манозе могу се везати и други моносахариди где су донори такође липидни носачи. Измене на остацима маноза у виду увођења остатка фосфоетаноламина се дешавају у одређеним положајима, уз присуство фосфатидилетаноламина као донора. Фосфатидилетаноламин је фосфолипид који је веома заступљен на унутрашњој страни мембране. На крају треће манозне јединице се такође везује фосфоетаноламин који ће

Слика 47. Биосинтеза гликолипидних додатака



Паралелно са изградњом гликолипидног дела, тече и изградња протеина (слика 47.) Протеин се синтетише у рибозому који је повезан са ЕР, и полипептидни ланац улази у ЕР својим N-крајем. Када се заврши транслација, настали полипептидни ланац заузима нативну конформацију и долази до трансамидације, тј. преласка протеина са липидног двослоја на аминок-групу фосфоетаноламина гликолипидног дела додатка. Овај пренос омогућава ензим за трансамидацију који има део изграђен од липофилних остатака аминок-киселина у које се добро уклапа део протеина који је био урођен у липидни двослој мембране. Када се обави пренос, протеин је својим С-крајем повезан амидном везом са гликолипидним додатком и као такав може да се пренесе и угради у ћелијску мембрану, тако да је цео комплекс окренут на спољашњој страни ћелијске мембране, илити ка екстрацелуларном простору.

Улоге протеина који су повезани са мембраном преко гликолипидних додатака су бројне. Код сисара број оваквих протеина није велики, за разлику од неких других организама. Пример су одређени паразити код којих се тај висок удео овако повезаних протеина повезује са заштитом трансмембранских протеина, маскирањем антигена који би активирали имуни одговор домаћина, као и већим потенцијалом за мутације, што такође доводи до превазилажења имуног одговора домаћина. Код сисара улоге протеина повезаних преко гликолипидних додатака су пре свега у комуникацији, као и у диференцијацији и пролиферацији ћелија. Зато су и присутни искључиво на спољашњој страни ћелијских мембрана, где се и одвија комуникација између ћелија. За разлику од трансмембранских протеина, протеини повезани преко гликолипидних додатака имају дужи животни век. Занимљиво је и да се овакви протеини могу размењивати између ћелија, углавном преко егзозома.

Болест пароксизмална ноћна хемоглобинурија (енг. *paroxysmal nocturnal haemoglobinuria*) је узрокована

недостатком гликолипидног додатка. Тако се дешава да на површини крвних ћелија нема заштитног протеина DAF повезаног преко гликолипидних додатака. Поремећај је због недостатка гена који регулише синтезу ензима GlcNAc-трансферазе, који је неопходан за први корак у синтези гликолипидних додатака, а последица је хемолитичка анемија.

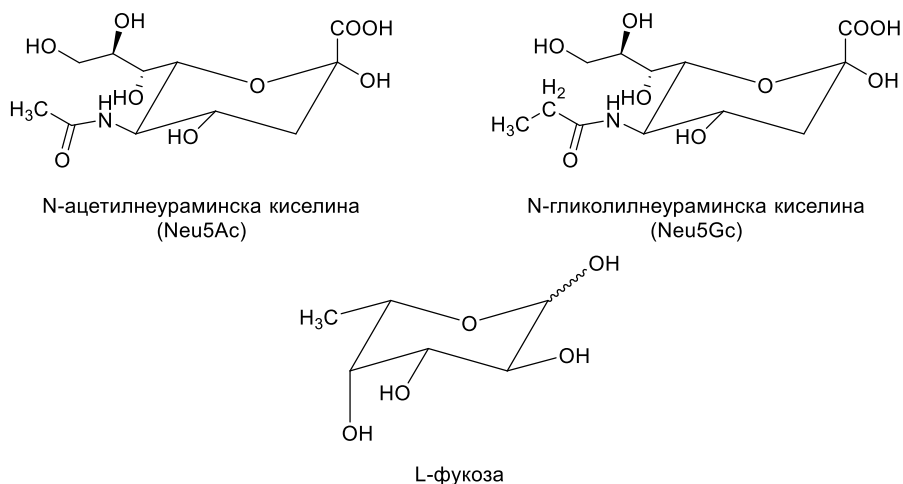
Поред болести које настају као узрок недостатка гликолипидних додатака, протеини који су повезани преко ових додатака могу да изазову различите тегобе код људи када се активирају од стране патогена. Тако, вируси могу да их искористе као рецепторе за улазак у ћелију, као и бактеријски токсини који могу да се повежу за њих као да су рецептори, и на тај начин патогени или изазивају инфекцију или доводе до других симптома и тегоба.

Поглавље 4 Глико-РНК

Поред гликопротеина и гликолипида, године 2021. откривено је постојање и треће групе гликоконјугата, а то су конјугати гликана и РНК. До овог сазнања иницијално је дошла група професора Рајана Флина (*енг. Ryan Flynn*), а пошто је од њиховог открића прошло свега неколико година, информације су оскудне. За сада је сигурно да су присутни на површини ћелијских мембрана и да се највероватније синтетишу слично као и гликопротеини са *N*-везаним гликанима, тј. да користе исте ензимске механизме који су активни приликом синтезе *N*-гликана. Потврђено је учешће ензимског комплекса олигосахарилтрансферазе, као и других ензима који су активни у каснијим модификацијама гликана код *N*-везаних гликанских структура, то директно доводи до закључка да се за синтезу *N*-везаних гликана и глико-РНК највероватније користи иста биохемијска машинерија.

Што се тиче агликона, до сада откривене гликозиловане РНК врсте су: рибозомална РНК, транспортна РНК, снРНК (*енг. small nuclear*, у нуклеусу), сноРНК (*енг. small nucleolar*, у нуклеолусу) и YРНК (*енг. small non-coding*). Не постоје информације о гликозилацији информационе РНК. Све наведено доводи до закључка да су глико-РНК конјугати некодирајући молекули.

Гликани који изграђују глико-РНК су структурно веома слични гликанима који су присутни у гликопротеинима са *N*-везаним гликанима. Једина разлика је у томе што се у гликанима глико-РНК налази знатно више остатака сијалинске киселине. Поред најчешћег облика сијалинске киселине (*N*-ацетилнеураминске киселине, Neu5Ac), у структурама глико-РНК веома је заступљена и *N*-гликолилнеураминска киселина (Neu5Gc). Поред ових измена често се у структури гликана глико-РНК може пронаћи и један или више остатака L-фукозе (слика 48.)



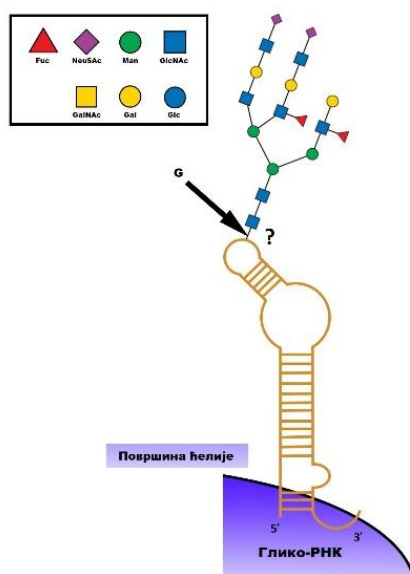
Слика 48. Најзаступљенији моносахариди у структури гликана глико-РНК

Најважније улоге глико-РНК су у међућелијској комуникацији, комуникацији ћелије са околином, интеракцији са лектинима (првенствено онима који се везују за остатке сијалинских киселина), и као најзначајнија улога глико-РНК истиче се улога у имуном одговору. Најактуелнија истраживања баве се повезивањем конјугата глико-РНК са аутоимуним болестима као што је лупус, као и настајањем и растом туморских ћелија. Сматра се да је овде најзначајнија интеракција сијалинске киселине са лектинима, и да је нарушавање ових интеракција одговорно за настајање аутоимуних болести.

Поред до сада откривених података и даље постоје бројне неразјашњене информације код ових новооткривених гликоконјугата. Прва дилема је о месту везивања гликана и агликона, премда за сада постоје подаци који упућују на везу између прве моносахаридне јединице (највероватније GlcNAc као и код *N*-везаних гликана) и хетероатома базе гуанина. Шематски приказ ове везе дат је на слици 49.

Друга важна непознаница је у самом биосинтетском путу ових гликоконјугата. Зна се да се гликозилација не одвија на већ синтетисаној РНК, али се не зна тачан механизам гликозилације. Претпоставка је да се гуанозин на неки начин

модификује или повезује са неким носачем пре него што дође до интеракције са олигосахарилтрансферазом.



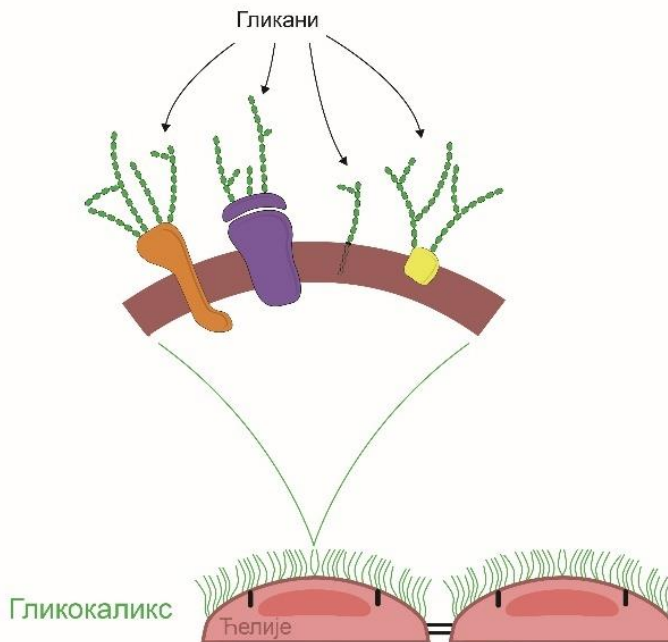
Слика 49. Претпостављени начин повезивања агликона и гликана код глико-РНК

Новија истраживања указују на могућу везу између тРНК и гликана уз посредство линкера, међутим неопходна су додатна истраживања за потврду ове везе.

Узимајући у обзир много мању комплексност гликоРНК у односу на друге гликоконјугате, за очекивати је да наредна, ревидирана издања ове књиге, а пре свега овог поглавља, буду значајно обогаћена новим открићима и сазнањима о структури и функцији глико-РНК.

Поглавље 5 Гликокаликс

Гликокаликс је омотач на површини ћелијске мембране који је изграђен од бројних гликоконјугата. Сви гликоконјугати који изграђују гликокаликс су повезани са ћелијском мембраном. Могу бити саставни део ћелијске мембране, као што су трансмембрански гликопротеини, могу бити везани за спољашњи део ћелијске мембране као што су гликолипиди, а могу бити и нековалентним интеракцијама везани за површину ћелијске мембране. Овај омотач се може замислити као длачице на површини четке које штрче у међућелијском простору, што је шематски приказано на слици 50.



Слика 50. Шематски приказ гликокаликса

Ова структура је динамична и подложна променама. Гликокаликс се разликује од ћелије до ћелије, али се такође разликује и гликокаликс истог типа ћелија у физиолошком/нормалном стању од гликокаликса ћелије која

пролази кроз неке физиолошке или патолошке промене. Тако се може разликовати гликокаликс ендотелних ћелија материце у физиолошком стању (када није присутна оплођена јајна ћелија у унутрашњости материце), од гликокаликса ендотела када је дошло до оплодње. Још интензивније промене у гликокаликсу су присутне приликом патолошких стања. Тако се гликокаликс ендотела крвних судова значајно мења приликом запаљенских процеса (инфламације), а интензивне промене у гликокаликсу дешавају се и приликом инфекције различитим микроорганизмима или приликом туморских промена. Промене у гликокаликсу су најчешће испољене на гликанском делу, мада могу обухватити и промене агликона. Т Процес старења, као нормална физиолошка појава, такође утиче на промене у гликокаликсу.

Заступљеност гликокаликса варира и разликује се од организма до организма, тако и од типа ћелије. Додатно, на истој ћелији може бити различита дебљина слоја овог омотача и углавном јесте у интервалу од неколико нанометара па чак и до неколико микрометара.

Разносврсно и заступљеност гликоконјугата у гликокаликсу је директно одговорна и за изглед и за функцију саме ћелије и ћелијске мембране. Као пример ће бити наведен гликокаликс ендотела крвних судова. Овај омотач има улогу у регулацији пермеабилности крвних судова, што директно утиче на васкуларну хомеостазу, као и на инфламаторне процесе, механотрансдукцију, али и на сам облик ћелије, као и на бројне друге процесе.

Улога гликокаликса је првенствено заштитна: заштита од инфекције микроорганизмима, паразитима, вирусима, а такође и заштита од унутрашњих непожељних фактора (нпр. токсина). Друга важна улога гликокаликса се огледа у комуникацији. Овде су два посебна вида комуникације и то ћелије са суседним тј. другим ћелијама, али и комуникацију ћелије са међућелијским простором. Такође би се и заштитна улога могли сврстати под неки вид комуникације где гликокаликс ћелије домаћина остварује интеракцију са

ћелијама нпр. бактерије или паразита, чиме се активирају и механизми одбране.

На основу свега наведеног може се закључити да је гликокаликс изузетно важан део ћелије, као и да је улога гликана гликокаликса од животног значаја.

Поглавље 6 Ензимологија гликоконјугата

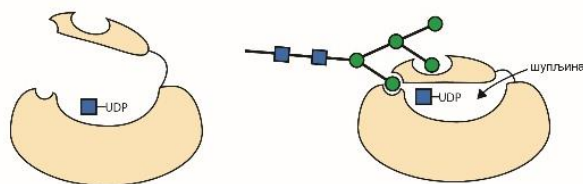
Најзначајнији процес у ензимологији гликоконјугата је процес гликозилације, приликом кога долази до увођења једног остатка моносахарида или олиго/полисахарида на агликон.

У процесу биосинтезе гликоконјугата два типа ензима имају важне улоге. Прву групу обухватају ензими који омогућавају везивање гликана за агликон. Увођење сахараида се одвија уз помоћ **гликозилтрансфераза**, ензима који формирају нову гликозидну везу. Као што им је назив, ови ензими практично преносе (тј. трансферују) моносахарид (или олиго/полисахарид) са једног носиоца на други. Донори су најчешће нуклеотиди мада то могу бити и неке липидне структуре као нпр. долихол, а акцептор је најчешће агликон на који се пребацује сахарид.

Терминологија ензима укључених у процес гликозилације је врло занимљива и, на посебан начин, језиколомка. На пример, треба разликовати имена гликозилтрансфераза. Када имају префикс „гликозил” то значи да могу да преносе било који сахарид, односно није одређен тачан сахарид који преносе, док нпр. глукозилтрансфераза преноси глукозу, а манозилтрансфераза преноси манозу, олигосахарилтрансфераза преноси олигосахарид, и сл. Такође се у имену ензима врло често налазе и места на којима делују, па се у Голџијевом апарату може пронаћи ензим ГА GlcNAc-трансфераза, ензим који трансферује N-ацетилглукозамин искључиво у лумену Голџијевог апарата.

За деловање гликозилтрансфераза неопходна је енергија, као и извор сахараида. Оба неопходна услова обезбеђује донор моносахарида. На слици 20. приказани су донори моносахарида у процесима биосинтезе гликоконјугата. Као што може видети, нуклеотидни, али и липидни донори обезбеђују и моносахарид, као и енергију која се налази у виду фосфодиестарске везе. Иако се гликозилтрансферазе разликују структурно, ипак имају заједничку организацију

везивног и активног дела. Заједничка особина код свих гликозилтрансфераза је везивање нуклеотидног донора шећера, које доводи до конформационих промена ензима и отварања места за везивање акцептора супстрата (сахарида). Шематски приказ процеса везивања донора и акцептора сахараида и гликозилтрансферазе је приказан на слици 51.



Слика 51. Шематски приказ везивања за гликозилтрансферазу: а) везивање нуклеотидног донора моносахарида (приказ лево), б) комплекс нуклеотидног донора моносахарида и ензима са формираним местом за везивање акцептора; ове измене омогућавају да се моносахарид веже искључиво на тачно одређено место на гликану (приказ десно)

Гликозилтрансферазе су изузетно специфични ензими, који: а) делују у тачно одређеном делу ћелије, нпр. само у ендоплазматичном ретикулуму, б) доводе до формирања гликозидне везе између тачно одређеног моносахарида и агликона или гликана где треба да настане гликозидна веза, и в) стереохемијски су изузетно специфични, што значи да ће настати тачно дефинисана гликозидна веза нпр. α -1 $\rightarrow$ 4. Ова специфичност омогућава прецизну синтезу гликоконјугата са мањим грешкама.

Други тип ензима који су значајни у процесу биосинтезе гликоконјугата су ензими **гликозидазе** (други назив за ову групу ензима је гликозидхидролазе, гликозилхидролазе или хидролазе гликозида). Гликозидазе су ензими који доводе до раскидања постојеће гликозидне везе и уклањања једног моносахарида са гликанског дела гликоконјугата. За разлику

од гликозилтрансфераза, овим ензимима није неопходан донор, а ни енергија за раскидање везе. Сличност између ових типова ензима је у изразитој специфичности. Гликозидазе су специфичне, као и гликозилтрансферазе, доводе до раскидања стереохемијски тачно дефинисане гликозидне везе присутне искључиво између два дефинисана моносахарида и делују само у одређеним органелама. Као пример може се навести ЕР глукозидаза I, која раскида гликозидне везе између две моносахаридне јединице глукозе у ендоплазматичном ретикулуму.

Гликозилтрансферазе и гликозидазе су уопштена имена у којима није дефинисан моносахарид, већ у корену речи имају префикс „**глико**” што означава сахарид тј. шећер. Не треба их мешати са глукозилтрансферазама и глукозидазама, који су ензими везани за моносахарид глукозу због чега у корену речи имају префикс „**глуко**” што је префикс односно скраћеница за глукозу.

Деловање ових ензима је повезано и регулисано. За биосинтезу гликоконјугата су одговорне велике машинерије које обухватају велики број ових ензима који су каскадно повезани и надовезују се један на други што значајно умањује грешке.

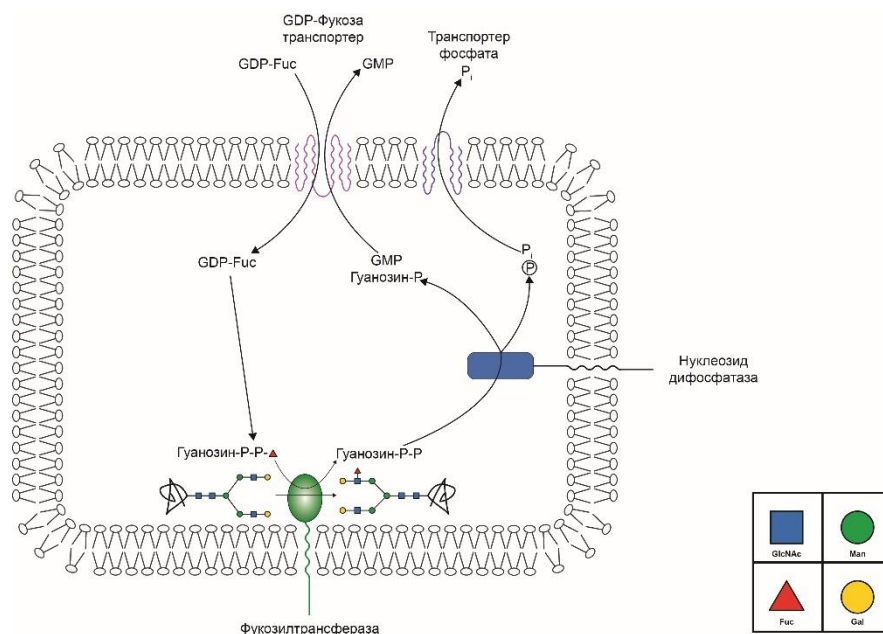
Примери гликозилтрансфераза:

- **церамид** глукозилтрансфераза – уводи остатак β -D-глукопиранозе на церамид и делује у ЕР,
- **α -2,6-сијалилтрансфераза** – уводи остатак сијалинске киселине на последњу моносахаридну резидуу гликана са грађењем α -2,6 гликозидне везе,
- **олигосахарилтрансфераза** – ензим који преноси олигосахарид са липидног на протеински носач у лумену ендоплазматичног ретикулума.

Примери гликозидаза:

- ЕР глукозидаза I и II су ензими који раскидају гликозидну везу и уклањају по једну резидуу глукозе; ознаке I и II дефинишу са које се позиције уклања глукоза и оба ензима делују у ендоплазматичном ретикулуму,
- Голци-манозидаза IA, IB, IC – ово су ензими који раскидају гликозидну везу и одвајају по једну резидуу манозе, а ознаке IA, IB, IC означавају са које гране и на којој позицији уклањају појединачни манозни остатак.

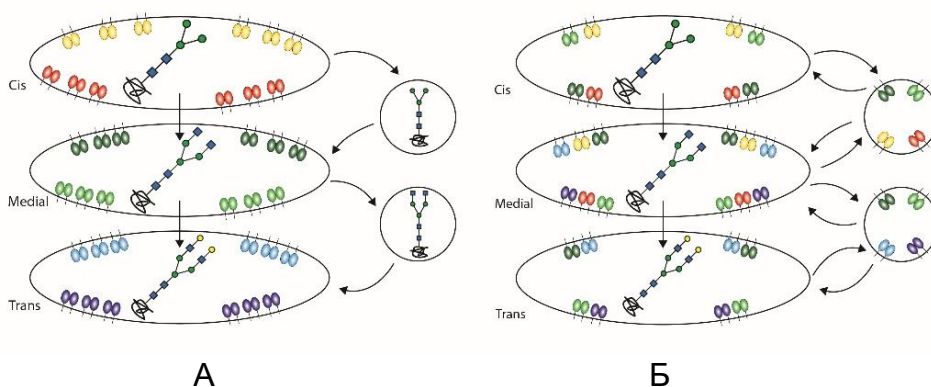
За деловање гликозилтрансфераза је неопходно више услова него за деловање гликозидаза, јер је обавезно присуство донора моносахарида и енергије коју, кроз фосфодиестарске везе, такође обезбеђују донори. Неометан ток биосинтезе на мембранама органела (посебно ЕР и ГА) омогућен је постојањем транспортера који обезбеђују улазак нуклеотидних донора моносахарида. На слици 52. приказан је механизам снабдевања ћелијских органела довољним количинама нуклеотидних донора моносахарида да би ензими гликозил-трансферазе могли да формирају гликозидне везе.



Слика 52. Ћелијска мембрана ГА има транспортер за нуклеотидни дозор моносакхарида, то је GDP-фукосни транспортер. Омогућава довољне количине дозора моносакхарида за рад ензима. Након уграђивања фукозе у гликан (дејством ензима фукозилтрансферазе), гуанозин-дифосфат се ослобађа и када се уклони један фосфат (дејством нуклеозид дифосфатазе), гуанозин-монофосфат напушта ГА кроз исти транспортер кроз који је ушла GDP-фукоза, а фосфат напушта органелу кроз посебан транспортер

Свака органела има своје системе за транспорт и снабдевање свим неопходним молекулима за рад ензима који су присутни у посматраној органели. У откривању механизма биосинтезе гликоконјугата, односно гликозилације, највећи допринос су дале интеракције лектина са одговарајућим гликанима или појединачним резидуама моносакхарида. Неки делови механизма гликозилације ни до данас нису у потпуности разјашњени, попут процеса који се одвијају у Голџијевом апарату. Иако постоји много сазнања о грађи и функцији ГА до сада и даље постоје два тумачења о делу гликозилације који

се одвија у самом ГА. Прво тумачење подразумева транспорт супстрата кроз различите делове ГА (*cis*, *medial* и *trans*-Goldži), тј. у почетку истраживања се сматрало да су ензими укључени у гликозилацију искључиво смештени у одређене делове ГА и да супстрати само пролазе кроз слојеве ГА и подлежу одговарајућим ензимским реакцијама увођења и уклањања моносахаридних резидуа. Новија истраживања укључују и могућност транспорта ензима одговарајућим везикулама. Овај вид транспорта се назива ретроградни и тражи постојање великих везикула који могу да преносе велике молекуле као што су ензимски комплекси укључени у гликозилацију. Како напредују истраживања могуће је да ће се мењати и информације о механизмима гликозилације, али за сада су ензими гликозилације у ГА динамични и користе различите механизме да промене локацију у самој органели и функционишу. Шематски приказ оба механизма гликозилације у Голџијевом апарату дат је на слици 53.



Слика 53. Механизми гликозилације у Голџијевом апарату (ГА), А) механизам у којем се транспортује супстрат кроз различите делове ГА; Б) ретроградни механизам који подразумева транспорт ензимских комплекса кроз различите делове ГА

Поред биосинтезе у ЕР и ГА, постоје и ензими који обављају финалне модификације гликоконјугата и могу бити пронађени у другим деловима ћелије као што су: цитоплазма и митохондрије. То су различите сулфатазе/сулфотрансферазе, фосфатазе/фосфотрансферазе, епимеразе и други типови ензима који не уводе и не уклањају моносахариде већ одређене функционалне групе, и тиме доводе до модификације структуре самих гликанских делова гликоконјугата.

Поглавље 7 Гликом и гликомика

Структура протеина је директно кодирана у геному и биолошка активност им је строго повезана са тачно дефинисаном 3Д структуром. За разлику од протеина, структура гликана није директно повезана са генима, тј. није директно кодирана у генима. Како матрицу гликана диктирају ензими гликозидазе и гликозилтрансферазе, који су протеинске структуре, може се закључити да је структура гликана индиректно и донекле кодирана генима односно геномом. Синтеза гликоконјугата ће тиме бити индиректно под утицајем генетског кода. Биолошка функција гликоконјугата није строго повезана са прецизно дефинисаном 3Д структуром ових комплексних молекула. Исти гликан може се наћи на различитим агликонима, као и то да исти агликони могу имати различите гликане. Закључује се да је биолошка функција гликоконјугата изузетно комплексна и повезана са њиховом матрицом, местом где се појављују, као и са модификацијама које су често присутне.

Геном је комплетан сет свих гена у једном организму (или ћелији), протеом је скуп свих протеина у једној ћелији, ткиву или организму, те се истим принципом долази до израза **гликом**, што је скуп свих гликана у једном организму (или ћелији).

Геном дефинише организам – протеом и гликом дефинишу ћелију!

Према дефиницији, омика (*енг. omics*) представља укупну карактеризацију и квантификацију читавог скупа биолошких молекула, као и испитивање њиховог доприноса у структури, функцији и динамици организма или групе организама.

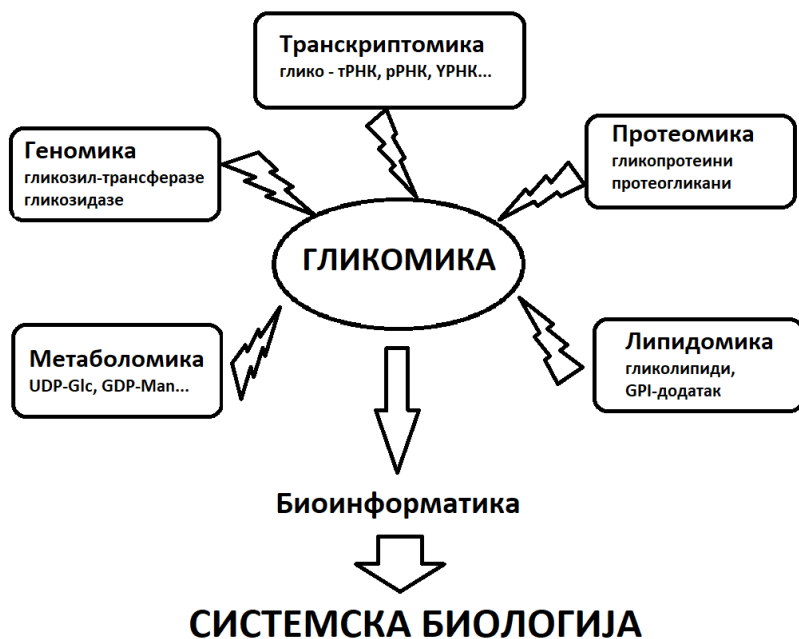
Геномика је грана науке која се бави изучавањем структуре, функције, организације гена, као и мапирањем генома. За разлику од генетике која проучава сваки појединачни ген, геномика изучава комплетну карактеризацију и

квантификацију свих гена у једном организму, као и њихову међусобну везу и утицај на организам.

Протеомика је грана науке која изучава структуре и функције свих протеина односно протеома. Овај израз је добијен по аналогiji са изразом за геномику.

Применом истог принципа када је дефинисан израз гликом одређен је и израз гликомика (*енг. glycomics*). **Гликомика** је област гликобиологије која детаљно анализира структуре и функције гликана како у слободној форми тако и везаних у комплексне структуре тј. гликоконјугате. Фокус испитивања обухвата генетску, структурну, физиолошку, као и патолошку улогу, али и бројне друге аспекте. Све се више открива значај гликана како у физиолошким процесима као што је старење, тако и у патолошким процесима, посебно за настајање аутоимуних и туморских обољења. Будући да се број истраживања и открића сваке године повећава, подграна гликомике која се назива **функционална гликомика** се додатно преусмерила на испитивање улоге гликома у биолошким системима.

Пошто се организам не може посматрати у деловима него као целина у којем сваки сегмент има своју улогу и значај, најбоља опција је повезивање свих ових појмова у једну грану истраживања. **Системска биологија** је интердисциплинарна грана која обједињује геномику, протеомику, гликомику, али и друге гране као што су транскриптомика (транскриптом - скуп свих РНК молекула једног организма/ћелије), метаболомика (метаболом - скуп свих метаболита једног организма/ћелије) и липидомика (липидом – скуп свих липида једног организма/ћелије). Шематски приказ повезаности различитих биомолекула и системске биологије дат је на слици 54.



Слика 54. Гликомика заузима централну улогу у системској биологији будући да повезује све биомолекуле у једној ћелији/организму

На крају овог поглавља, у табели 3. сумирани су неки од бројних сајтова и програма који дају увид у базе података о структури, функцији, али и другим алатима који могу помоћи у раду са гликоконјугатима.

Табела 3. Базе података гликоконјугата и сајтови корисних алата за истраживање гликоконјугата

База података	Линк
Структуре гликана	
KEGG GLYCAN	www.genome.jp/kegg/glycan
CFG	www.functionalglycomics.org www.glycome-db.org
GLYCOSCIENCES.de	www.glycosciences.de
MonosaccharideDB	www.monosaccharidedb.org
UniCarbKB	www.unicarbkb.org
JCGGDB	www.jcggdb.jp/index_en.html
CSDB	www.csdb.glycoscience.ru
GlyTouCan	www.glytoucan.org
GlycoEpitope	www.glycoepitope.jp
GlycoPedia	www.glycopedia.eu
Упутства	
Glyco ontology	www.bioportal.bioontology.org/ontologies/3169
GlycoRDF	www.glycoinfo.orf
MIRAGE	www.beilstein-institut.de/en/project/mirage
Аналитички алати	
UniCarb-DB	www.unicarb-db.expasy.org
GlycoMob	www.glycomob.org
GlycoBase and autoGU	www.glycobase.nibrt.ie
GlycoWorkBench	www.code.google.com/archive/p/glycoworkbench
Sweet-Heart	www.sweet-heart.glycoproteomics.proteome.bc.sinica.edu.tw
GRITS Tollbox	www.grits-toolbox.org
GlycoDigest	www.glycoproteome.expasy.org/glycodigest
GlycoMod	www.web.expasy.org/glycomod
RINGS	www.rings.t.soka.ac.jp
Glycomics@ExPASy	www.expasy.org/glycomics
Глико-ензими	
CAZy	www.cazy.org
BRENDA	www.brenda-enzymes.org
Везивање гликана	
RINGS	www.rings.t.soka.ac.jp
GlycoPattern	www.glycopattern.emory.edu
SugarBind	www.sugarbind.expasy.org
MatrixDB	www.matrixdb.univ-lyon1.fr
3Д/Моделинг/НМР	
GlyCAM	www.glycam.org
Sweet-II	www.glycosciences.de/modeling/sweet2/doc/index.php
Glyco3D	www.glyco3d.cermav.cnrs.fr
PDB-Care	www.glycosciences.de/tools/pdb-care
GlyVicinity	www.glycosciences.de/tools/glyvicinity
CASPER	www.casper.organ.su.se/casper
Цртање гликана	
Glycotool	https://glycotoolkit.com/glycoglyph

Поред набројаних линкова сваке године се појављују нове и унапређене верзије различитих алата, и свакодневно се откривају нови подаци и постојеће базе допуњују новим открићима.

Поглавље 8 Анализа и синтеза гликана/гликоконјугата

АНАЛИЗА ГЛИКАНА/ГЛИКОКОНЈУГАТА

Да би се могла испитивати структура и функција гликоконјугата, али и самих гликана, било је неопходно пронаћи начине изолације, пречишћавања, и синтезе како слободних гликана тако и гликана везаних у гликоконјугатима.

Постоји више праваца анализе ових молекула. Најпознатије технике које се могу користити су НМР спектроскопија и масена спектрометрија (слика 55.). И једна и друга метода имају предности и мане.



Слика 55. НМР спектрометар (лево), масени спектрометар (десно)

Анализа оба типа спектра је веома комплексна, посебно ако су конјугати који имају велики агликон типа протеина.

НМР спектроскопија захтева већу количину узорка (реда mg), изискује пречишћена једињења и подразумева дуго време

снимања спектра, али даје увид у много више детаља од масене спектрометрије. НМР анализом добија се тачна структура (конективност атома), али и стереохемија која је код гликана веома разноврсна и додатно компликује тумачење резултата самог снимања.

С друге стране, масена спектроскопија даје добре резултате и с мањом количином узорка (и испод pg) и лако се куплује са методама раздвајања, те је погодна и за смесе, али даје ограничене концептуалне информације и нарочито занемарује стереохемију. Посебан тип анализе је „*site analysis*“ код које се прво одваја гликан од пептидног ланца, а потом масена спектроскопија.

Из наведених разлога је потребно за сваки молекул користити више метода да би се расветлила структура гликанске компоненте као и место гликозилације.

Анализа гликоконјугата је комплексна јер и агликон често може да ремети анализу самих гликанских делова. Додатно и изолација конјугата може бити врло захтевна и често немогућа. Иако анализа гликана даје резултате лакше за тумачење, лако може довести и до грешака услед нежељене и неочекиване промене структуре гликана или агликона приликом изоловања и раздвајања ова два дела молекула.

За одвајање гликана од агликона постоје бројне методе о којима ће бити више речи у поглављу о одређивању биолошке активности гликана/гликоконјугата. Најчешће се користе различити ензими који раскидају тачно одређену везу, али постоје и други приступи.

Одређивање структуре гликана/гликоконјугата може бити и индиректно, анализирањем њихових интеракција са другим молекулима. У овом начину анализе велику улогу имају лектини (биљни, животињски, микробиолошки) који остварују изразито специфичне реакције са одређеним гликанима и непосредно се даје увид у структуре одређених делова гликана/гликоконјугата.

СИНТЕЗА ГЛИКАНА/ГЛИКОКОНЈУГАТА

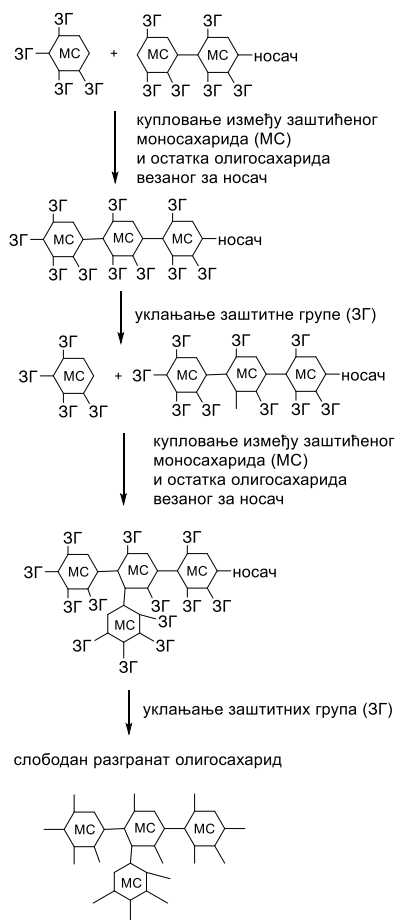
У почетку су постојали предлози да се постојеће синтезе пептида и нуклеинских киселина прилагоде синтези гликана, али су се појавили бројни проблеми. Моносахариди имају неколико хидроксилних група чија је реактивност слична и тешко је предвидети али и испланирати синтезу тако да настаје само један изомер и да се гликозидна веза гради између две тачно одређене хидроксилне групе. Такође, у синтези олигосахарида често је потребно да се добије разграната структура, а код пептида и нуклеинских киселина синтетишу се искључиво линеарне структуре. За разлику од нпр. Мерифилдове синтезе пептида (*енг. SPPS – solid phase peptide synthesis*) где се заштићују све функционалне групе сем жељене амино- и карбоксилне групе које треба да награде пептидну везу. Код изградње олигосахарида и на једном и на другом моносахариду се налази између три и пет хидроксилних група спремних за грађење гликозидне везе са ограниченом могућношћу да се одређене ОН групе заштите неким функционалним групама, а да само жељене остану слободне (слика 56.). Слична ситуација је и код синтезе нуклеинских киселина, где се синтеза може и диктирати и планирати, док је код олигосахарида опет присутан исти проблем хемоселективности и региоселективности.

Мерифилдова синтеза пептида
SPPS (Solid-Phase Peptide Synthesis)



Легенда:
АК - аминокиселина
ЗГ - заштитна група
МС - моносахарид

Модификована синтеза пептида за потребе синтезе гликана односно олигосахарида



Слика 56. Шематски приказ упоређивања синтезе пептида и олигосахарида

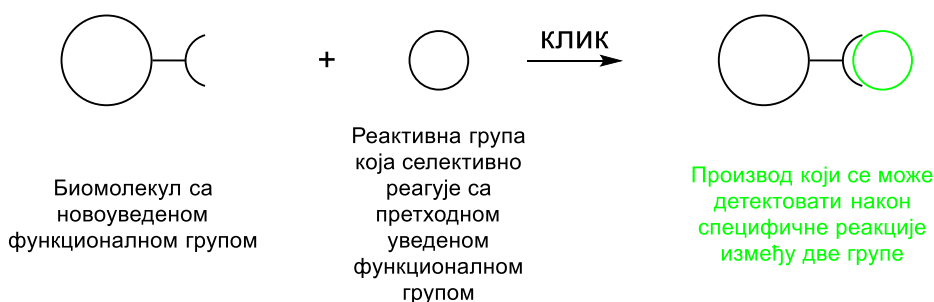
Класична хемијска синтеза олигосахарида, односно гликана је зато веома ретка и ради се само за гликане кратког низа. Не само да је ова синтеза изузетно изазовна, већ се и жељени производ углавном добија у веома ниском приносу.

Метод као приступ који превазилази проблеме ове класичне хемијске синтезе је синтеза која укључује употребу ензима, и то углавном клонираних гликозилтрансфераза. Једино ограничење је потреба за нуклеотидним донорима моносахарида. Да би метод био јефтинији и једноставнији, у комплекс се додају и ензими који регенеришу нуклеотидне доноре шећера користећи лако доступне и мање скупе полазне молекуле. Наведене методе описују синтезу искључиво гликанског дела гликоконјугата. Гликани, а ни агликони, немају биолошку активност уочену код конјугата. Зато постоји потреба за синтезом целокупног молекула гликоконјугата, посебно ако се испитује не само његова структура него и функција. Гликолипиди су до сада успешно синтетисани због чињенице да је њихов агликон мањих молекулских маса. За сада нема података о синтези глико-РНК, будући да се ради о недавно откривеним гликоконјугатним врстама, код којих се, између осталог, не зна тачно место везивања агликона и гликана. Највећи изазов за синтезу свакако представљају гликопротеини. До сада су синтетисани гликани одређеног броја гликопротеина, али успостављање везе између агликона и гликана није било успешно. Постигнуто је везивање гликана за R остатак лизина или цистеина из протеинског ланца, али не и за аспарагинску киселину код *N*-везаних гликана. Овакви конјугати са гликаном везаним за остатак лизина или цистеина се називају **неогликопротеини**.

Поглавље 9 Биоортогонална хемија

Појам биоортогонална хемија је прва увела Каролин Бертози (енг. *Carolyn Bertozzi*) 2003. године. Идејом да је много важније испитивати структуру и функцију гликоконјугата и темељно биомолекула у самом организму него ван њега, дошла је до невероватних открића која су и крунисана Нобеловом наградом за хемију 2022. **Биоортогонална хемија** подразумева брзе и селективне, хемијске реакције високог приноса, које се одигравају у природном окружењу (у ћелији/организму), без споредних реакција и безбедне за посматрано природно окружење. То су дакле, хемијске реакције унутар живог бића које се одвијају у реалном времену и које не ремете природне процесе у том бићу.

Биоортогонална реакција (слика 57.) подразумева два корака. Први који обухвата увођење одговарајуће функционалне групе (енг. *chemical reporter*) на жељени биомолекул, а други корак подразумева увођење групе (енг. *probe*) која селективно реагује са првобитно уведеном групом и доводи до изузетно специфичне реакције која се може детектовати (нпр. визуелизација означеног биомолекула флуоресценцијом).



Слика 57. Шематски приказ биоортогоналне реакције

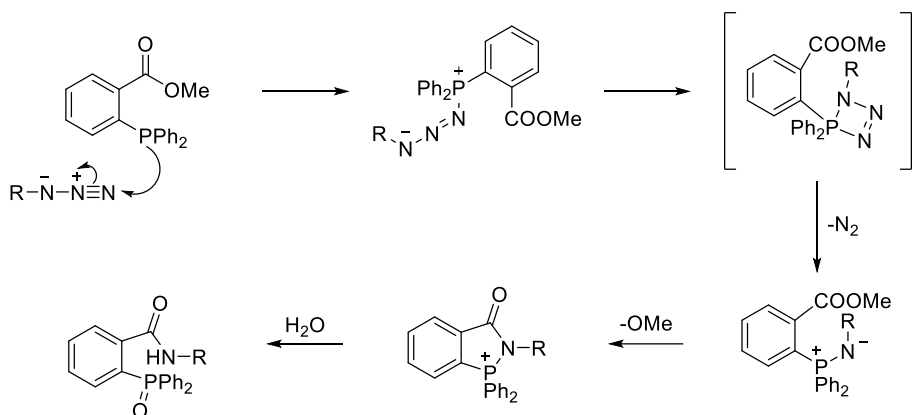
За први корак биоортогоналне реакције потребно је пажљиво одабрати одговарајућу функционалну групу која ће се користити за модификацију биомолекула (ћелијских

супстрата). Та функционална група (*енг. chemical reporter*) мора да испуњава следеће услове:

- Селективност - не сме да интереагује ни са једном другом функционалном групом у посматраном живом систему, мора да реагује само са другом функционалном групом која се накнадно уводи у другом кораку биоортогоналне реакције;
- Биолошку и хемијску инертност - биолошка инертност подразумева да уведена група не утиче на нормалан метаболизам ни биомолекула који је обележен, као ни осталих метаболита, док хемијска инертност подразумева остваривање јаке ковалентне везе са жељеним биомолекулом која се неће раскинути услед других реакција у посматраном систему;
- Кинетику – „клик” реакција између те две функционалне групе мора бити брза, те се мора десити пре метаболисања и излучивања обе компоненте, односно функционална група мора бити довољно дуго стабилна да се деси биоортогонална реакција;
- Биокompatibilност - функционална група мора бити стабилна на физиолошком pH, одговарајућој телесној температури и у воденој средини, као и потпуно нетоксична за посматрани систем;
- Доступност - функционална група мора бити лако доступна искључиво за уградњу у жељени биомолекул; такође, својим присуством та функционална група не сме нарушити структуру и функцију биомолекула.

Најстарије и прве функционалне групе које су се користиле у ове сврхе су биле азидне групе. Азид испуњава потребне услове и представља групу која се не може пронаћи у нормалним биолошким системима. Познато је да је азидна функционална група слаб електрофил те реагује са славим нуклеофилом као што је фосфин, градећи релативно стабилан продукт (илид) у воденој средини (слика 58.). Фосфини такође нису присутни у биолошким системима. Ова реакција је позната и као Штаудингерава лигација (*енг. Staudinger*), иако

је реакција прво осмишљена као биоортогонална, имала је своје мане и убрзо је замењена. Главни недостатак је био у спорој кинетици, где нема довољно времена да се детектује награђени производ, а исти већ подлегне разградњи (фосфински реагенси подлежу метаболисању од стране цитохрома P450).

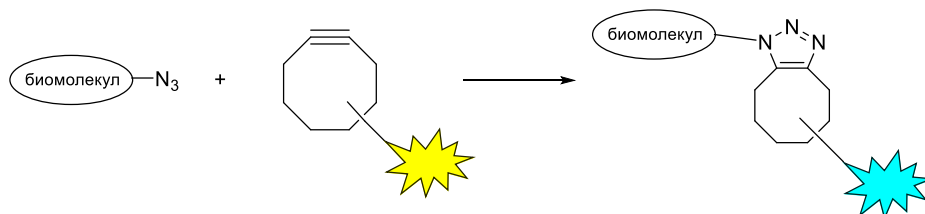


Слика 58. Шематски приказ Штаудингерове лигације као почетног примера биоортогоналне реакције

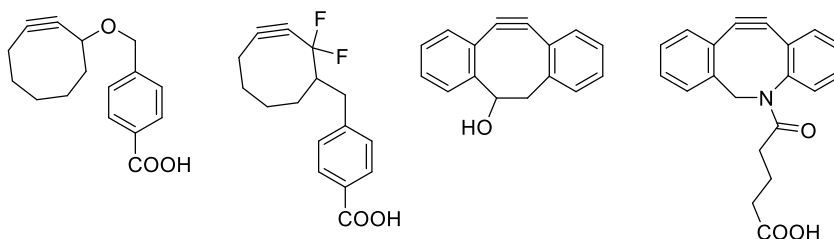
Други пример, који је превазишао проблеме претходно предложене реакције, јесте активирана варијанта циклоадиције азида и алкина тј. Хуисгенова циклоадиција (енг. *Huisgen*). Овде је примењена „клик” реакција без присуства токсичног бакра (енг. *copper-free click chemistry*). Ово је знатно бржа реакција и примењена је и на ћелијским културама, зебрицама, али и мишевима. Као функционална група која се уводи поново је коришћен азид, али су фосфини замењени алкинима који, такође, нису заступљени у биолошким системима (осим појединих биљних врста). У основној реакцији циклоадиције, да би дошло до реакције између азида и алкина, неопходно је или обезбедити високу температуру и повишен притисак или катализатор односно јоне бакра. Због токсичности за биолошке системе бакар је

морао бити замењен, па је као решење узет активирани алкин – циклооктин (слика 59.).

А - активирана Хуисгенова циклоадиција азида и алкина



Б - примери циклооктина (*probe*)



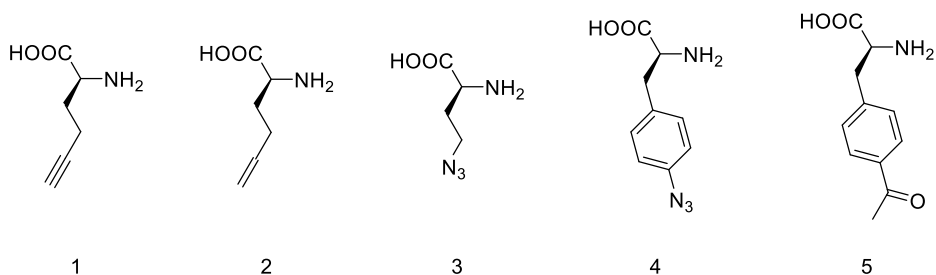
Слика 59. А) Шематски приказ активиране Хуисгенове циклоадиције азида и алкина; Б) неки од примера циклооктина који се могу користити у биоортогоналним реакцијама

Како се ова област убрзано развија, сваке године се појављују нове идеје и функционалне групе које се могу користити у биоортогоналним реакцијама. Поред наведених метода, предано се ради на реакцијама са алкенима, поготово модификованим Дилс-Алдеровим реакцијама (енг. *Diels-Alder*). У ову групу спадају бројне модификације као што су тетразинске лигације, тетразолске лигације, укрштена метатеза катализована одговарајућим катализатором, али и други типови реакција као што су оксимске лигације, изоцијанидне „клик“ реакције и бројне друге.

Примена биоортогоналних реакција је у интензивном развоју као и примери реакција и функционалних група.

Биоортогонална хемија је за сада пронашла примену у научним истраживањима и дијагностици, али се убрзано ради и на терапеутској примени. Биомолекули који се могу обележити одговарајућом функционалном групом су протеини, гликани гликоконјугата, липиди, као и нуклеинске киселине. У зависности од плана и идеје шта жели да се постигне биоортогоналним обележавањем зависиће и одабир методе, функционалне групе и осталих параметара.

Обележавање **протеина** се одвија обележавањем одређене функционалне групе аминокиселина. Таква аминокиселина се потом уграђује у протеин и појављује у посматраном организму. Постоје два начина увођења неприродних аминокиселина (односно биоортогонално обележених аминокиселина): инкорпорација специфичних резидуа (*енг. residue-specific incorporation*) и инкорпорација на специфичном месту (*енг. site-specific incorporation*). Први метод подразумева увођење нове обележене аминокиселине и одсуство нормалне аминокиселине која се њом замењује. На тај начин нова обележена аминокиселина се уграђује у протеин на свим местима где је била физиолошка аминокиселина. Други приступ подразумева замену, односно увођење обележене аминокиселине само на одређеној локацији на протеину, док остале позиције те аминокиселине остају непромењене. Инкорпорација специфичних резидуа подразумева да се аминокиселине уграђују нормалним транслационим метаболизмом. Измене на аминокиселинама су такве да не ремете њихово усвајање, не подлежу метаболизму, нормално се транспортују са тРНК, и обележени протеини и даље имају нормалну функцију и уграђују се на одговарајућа физиолошка места. Најчешће се обележавају метионин, леуцин, триптофан и фенилаланин. Примери обележених аминокиселина се могу видети на слици 60.



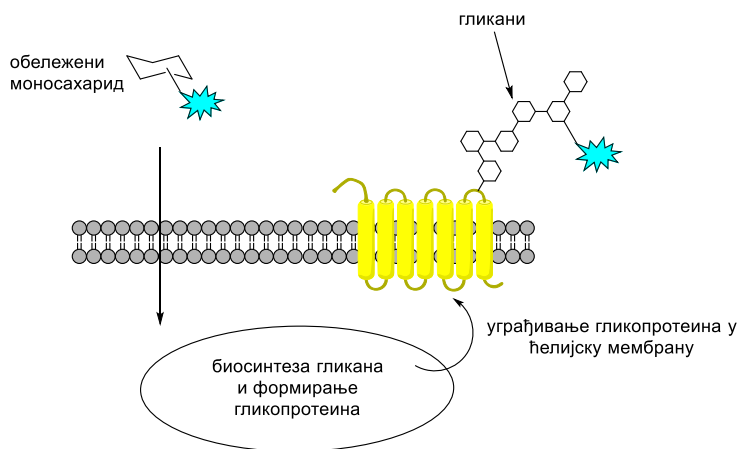
Слика 60. Обележене аминокиселине: хомопропаргилглицин (1), хомоалилглицин (2), азидохомоаланин (3), *p*-азидофенилаланин (4), *p*-ацетилфенилаланин (5)

Инкорпорација на специфичном месту се изводи на другачији начин. Метода се заснива на употреби стоп кодона UAG, који нормално зауставља синтезу протеина, као преносиоца информације о уградњи нефизиолошке, односно обележене аминокиселине. Обележену аминокиселину доноси одговарајућа тРНК, рибозом не примећује замену и уграђује обележену аминокиселину у растући ланац протеина. Овај приступ се много више користи *in vitro*, зато што захтева и генетске модификације. Ген за жељени протеин се модификује, и то тако да се стоп кодон угради на место где се жели уградити обележена аминокиселина, а сви остали стоп кодони се уклањају да се она не би више пута уградила. Неопходна је и синтеза одговарајуће тРНК са комплементарним антикодоном. Главна мана овог метода је у малом приносу и генетским изменама, али је ипак омогућила откривање важних информација о протеинима. Предано се ради на примени ове методе у *in vivo* системима.

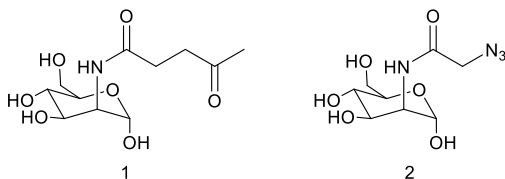
Обележавање аминокиселина, односно протеина је могуће и у посттранслационом поступку. Често се овај приступ користи за обележавање ензима преко коензима, попут биотина.

Поред протеина и други биомолекули се могу обележавати. Посебно је интересно обележавање **гликана гликоконјугата**. Ови молекули су углавном испољени на површини различитих мембрана и имају важне улоге у

комуникацији и препознавању. Пошто биосинтеза гликана није директно генетски кодирана, обележава се као код прве методе код протеина. Ћелијама се понуди обележени моносахарид и оне га уграђују у структуру гликана уместо физиолошког моносахарида. Након уградње у гликоконјугат тај молекул бива испољен на ћелијској мембрани и може се повезати са другом функционалном групом и визуелизовати - детектовати (слика 61). Типични примери су *N*-левулиноилманозамин и *N*-азидоацетилманозамин (аналози *N*-ацетилманозамина). Постоје и други моносахариди који су обележени различитим функционалним групама. Обележавање и детекција гликана могући су не само у ћелијским културама него и на живим бићима (нпр. зебрицама).

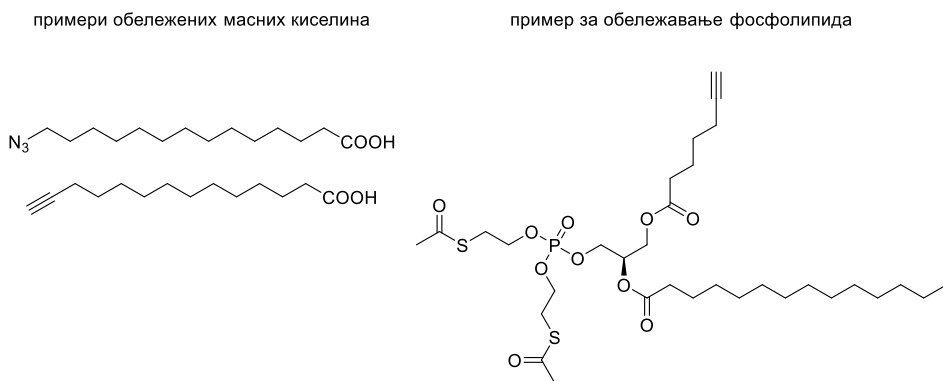


примери обележених моносахарида



Слика 61. Шематски приказ биоортогоналног обележавања гликана гликоконјугата, као и примери модификованих (обележених) моносахарида *N*-левулиноилманозамина (1) и *N*-азидоацетилманозамина (2)

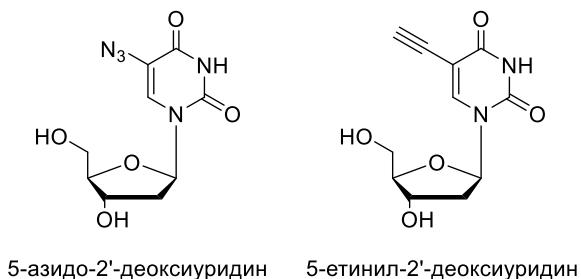
Обележавање **липида** представља веома сложен процес због разноликости у структури. Уколико се користе обележене масне киселине, оне се могу уградити у било који липид. Њихово истраживање има значај у праћењу метаболизма масти. До сада је посматрано више различитих прекурсора и аналога који изграђују липиде, као што су масне киселине, стероли, сфинголипиди и фосфолипиди. Успешно обележавање двослоја фосфолипида ћелијске мембране омогућило је изучавање структуре и функције саме мембране. Примери биоортогонално обележених липида су приказани на слици 62.



Слика 62. Примери биоортогонално обележених масних киселина и фосфатидинске киселине који се уграђују у липиде

Обележавање **нуклеинских киселина** се може изводити или обележавањем азотне базе или већ формираног нуклеозида. Ови обележени биомолекули се потом преводе у одговарајуће нуклеотиде и уграђују у жељену нуклеинску киселину (слика 63). Пример биоортогоналног обележавања је примена 5-етинил-2'-деоксиуридина који се уграђује у молекул ДНК приликом репликације и може се детектовати применом азидо-флуорофоре. Алкини се могу лако детектовати у живим ћелијама применом одговарајуће флуорофоре. Могу се обележавати и антисенсни олигонуклеотиди. Биоортогонално обележавање нуклеинских киселина се ради и на ћелијским

културама али и на различитим микроорганизмима као што су вируси и бактерије.



Слика 63. Примери обележених нуклеозида

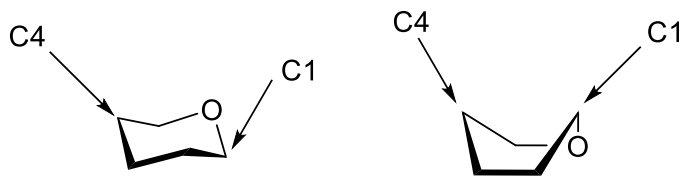
Примене биоортогоналних реакција су бројне, па се као прва улога намеће истраживање структуре, локализације и функције различитих биомолекула. Посебно су значајна испитивања новооткривених биомолекула, као што су гликоконјугати, о којима се мало зна. Поред испитивања физиолошких стања, значајна су открића у патолошким стањима, поготово код болести које су неразјашњене, новооткривене, али и све више заступљене, као што су аутоимуне болести и туморска обољења. Најновији правци у биоортогоналној хемији су усмерени на рану детекцију болести али и на циљано и селективно допремање биолошки активних супстанци на жељено место (*енг. drug delivery*). Биоортогонална хемија представља веома користан алат и за хемичаре и за биологе и у будућности ће омогућити откривање и третмане болести за које човечанство нема решење.

Поглавље 10 Стереохемија гликана

Када се изучава стереохемија одређених биомолекула, у овом случају гликана, као и евентуалне измене стереохемије приликом грађења гликоконјугата, важно је на почетку дефинисати појмове конфигурација и конформација. Конфигурација је просторни распоред функционалних група око једног стереоцентра, док је конформација просторни распоред свих функционалних група у једном молекулу. Пошто моносахариди углавном имају више стереоцентра онда је појам конформације много чешће заступљен у објашњавању стереохемије гликана.

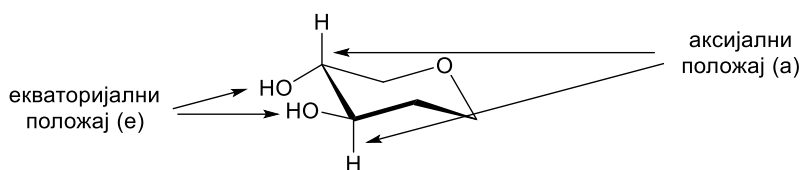
Конформација гликана гликоконјугата ће бити одговорна за њихову биолошку улогу као што је 3Д структура протеина одговорна за њихову биолошку активност.

Пошто су у већини гликана заступљене углавном хексозе, у овом поглављу највише ће бити речи о конформацији хексоза. То су углавном крути молекули са ограниченом флексибилношћу, који заузимају неколико различитих конформација. Два најчешће помињана облика конформација су чамац, лађа или када (*енг. boat*) и столица (*енг. chair*), који су приказани на слици 64.



Слика 64. Конформације столица (лево) и чамац (десно)

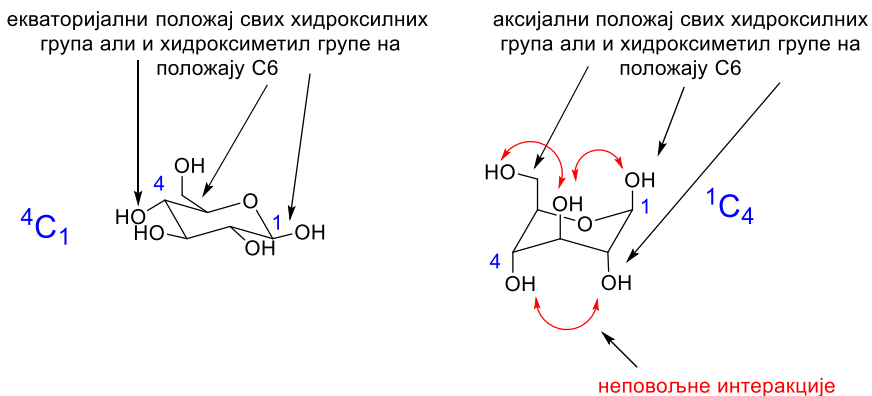
Функционална група на сваком угљениковом атому може бити оријентисана приближно нормално на раван прстена и тада се каже да заузима аксијални положај (а), или оријентисана скоро у равни прстена и тада се каже да заузима екваторијални положај (е) (слика 65).



Слика 65. Приказ екваторијално и аксијално оријентисаних функционалних група

Аксијално оријентисане функционалне групе чешће ступају у стерне интеракције па долази до стерних и електронских сметњи. Из тог разлога је фаворизовано да веће функционалне групе (нпр. OH) буду оријентисане у екваторијалном положају, док су мање групе (нпр. H) у аксијалном положају.

Зато се у биолошким системима и генерално у природи хексозе и њихови деривати углавном налазе у облику столице и то 4C_1 . Управо ова конформација омогућава да се веће функционалне групе оријентишу екваторијално, спречавајући тако могућност доласка до стерних и електронских сметњи. Други облик столице, 1C_4 , је знатно ређе заступљен зато што је у том случају код D-моносахарида хидроксиметилна функционална група присутна на C-6 оријентисана аксијално, што је веома лоше и дестабилизује молекуле. На слици 66. приказане су две конформације столице истог моносахарида β -D-глюкопиранозе у стабилном 4C_1 облику и нестабилном 1C_4 облику где се могу видети које су то неповољне интеракције које дестабилизују молекул хексозе.



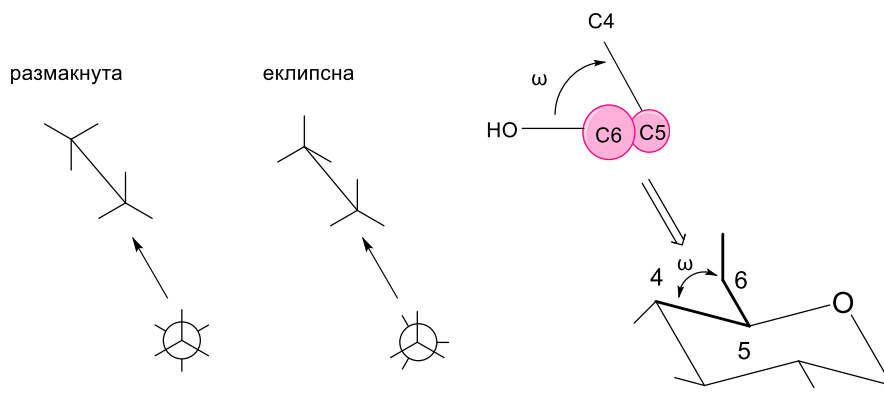
Слика 66. β -D-глюкопираноза у 4C_1 и 1C_4 облику

Значајни параметар у стереохемијским односима унутар једног али и између два суседна моносахарида у олигосахаридима је торзиони угао. То је угао који настаје између замишљених равни одређених веза које се посматрају (слика 67.). Постоје две, физички реалне, крајње конформације, и то су: а) еклипсна- где се посматра тако што су атом, веза и суседни атом у равни, а остале тетраедарске везе се поклапају са везама на наредном атому, и б) размакнута- где се посматра тако што су атом, веза и суседни атом у равни, док су остале тетраедарске везе размакнуте за 60° у односу на везе на суседном атому. Размакнута-конформација је вероватнија због већег размака између суседних атома и функционалних група. Торзиони угао се користи као величина која описује конформације гликана. Торзиони углови се обележавају грчким словима, и за конформације гликана значајни су углови ϕ (фи), ψ (пси) и ω (омега) (слика 68), где су:

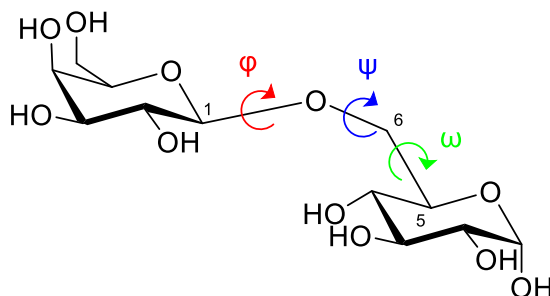
ϕ – торзиони угао између C1 и O гликозидне везе суседних моносахарида;

ψ – торзиони угао између O гликозидне везе и C с којим се гради гликозидна веза (C4 или C6 или било који други C атом суседног моносахарида);

ω – торзиони угао између C5 и C6 унутар једног моносахарида.



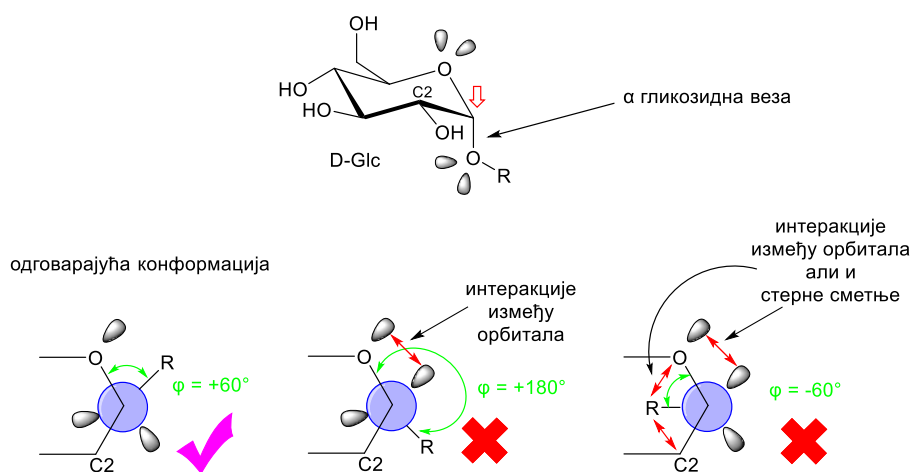
Слика 67. Замишљене равни које заклапају торзионе углове



Слика 68. Три најзначајнија торзиона угла за конформацију гликана

Торзиони угао ϕ који се односи на везу између C-1 моносахарида наредујућег краја и кисеоника гликозидне везе - (представља угао који заклапају равни дефинисане везама *Опрстена-Саномерни-Огликозидни-Сх*), има неколико фаворизованих вредности које су карактеристичне за стабилну конформацију, и то су: -60° , $+60^\circ$ и $+180^\circ$. Вредност торзионог угла ће зависити и од тога која два моносахарида граде гликозидну везу, као и од величине супституената на појединим атомима који ће локално директно утицати на

стерне и електронске ефекте. Посебно значајан електронски ефекат је егзо-аномерни ефекат (*енг. exo-anomeric effect*), феномен који важи само за торзиони угао φ зато што се посматра атом угљеника (C1 – аномерни центар) који се налази између два атома кисеоника и сваки има две sp^3 хибридизоване орбитале које садрже по неспарен пар електрона што доводи до одбијајућих интеракција између електронских парова (слика 69). Фаворизоване вредности торзионих углова као последица егзо-аномерног ефекта су: $+60^\circ$ за D-моносахариде ако граде α -гликозидну везу, и -60° ако граде β -гликозидну везу. Ово омогућава много прецизније предвиђање стереохемијских односа у гликанима.

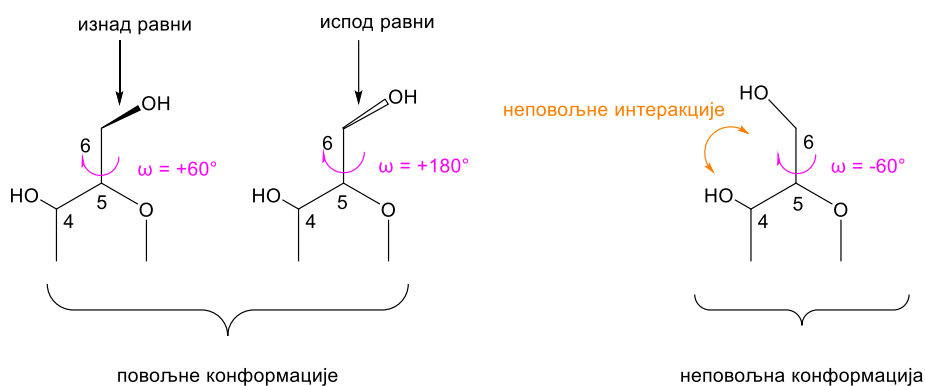


Слика 69. Приказ егзо-аномерног ефекта код D-моносахарида који граде α -гликозидну везу

Торзиони угао φ настаје између замишљених равни атома O гликозидне везе и атома C суседног моносахарида, с којим се гради гликозидна веза. За овај угао не постоји егзо-аномерни ефекат зато што се гликозидна веза гради између аномерног центра једног моносахарида и неког другог угљениковог атома другог моносахарида, тако да се C атом суседног моносахарида не налази између два атома кисеоника. Вредности торзионног угла φ нису строго дефинисане. Колика ће бити његова вредност зависи од више фактора: која два моносахарида граде гликозидну везу, њиховог распореда и

типа функционалних група, између којих C атома се гради гликозидна веза (да ли је то C1→C4 или C1→C6 или нека друга комбинација). Ако се гликозидна веза гради између C1→C6, као што је приказано на слици 68, онда ће и торзиони угао ω имати утицај на вредност торзионог угла ψ .

Торзиони угао ω је угао између замишљених равни које су дефинисане са четири тачке C5 – C6 и C6 – OH унутар једног моносахарида. Овај угао се јавља и код појединачних моносахарида, али утиче и на конформацију суседних моносахарида ако се посматра олигосахарид. Најчешће вредности за овај угао износе -60° , $+60^\circ$ и $+180^\circ$. Ипак, две вредности омогућавају конформације које су стабилније и то су $+60^\circ$ и $+180^\circ$. Вредност -60° много чешће доводи до стерних сметњи, (слика 70.).

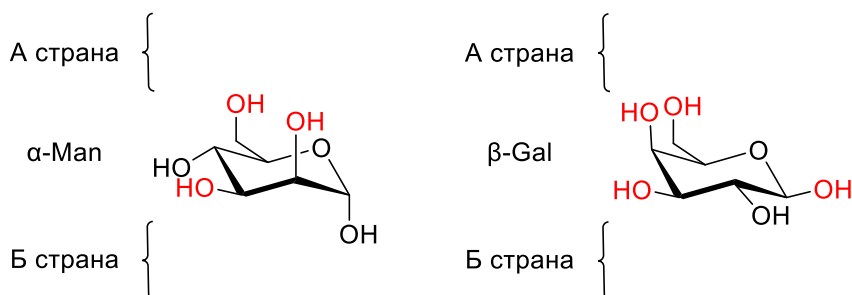


Слика 70. Могуће конформације у зависности од вредности торзионог угла ω

Може се закључити да одређивање конформације сахарида није једноставно и да захтева посматрање великог броја фактора. Чак и када се зна да су могуће две вредности за један торзиони угао. У зависности коју конформацију молекул заузме односно која је вредност тог торзионог угла утицаће и на остале торзионе углове и на саму конформацију целокупног гликана. Често се користе енергетски графици на којима су претпостављене вредности различитих торзионих углова за различите комбинације сахарида. Напредак

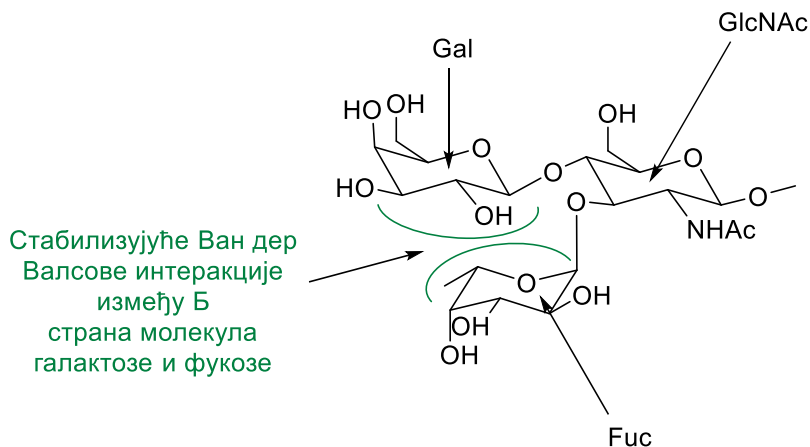
технологије омогућио је да примена рачунара може да предвиди и израчуна могуће вредности торзионих углова па и саму конформацију гликана.

Треба истаћи и значајну стереохемијску особину моносахарида, а то је А и Б страна моносахарида. А и Б страна моносахарида се бирају на основу присуства или одсуства липофилних/хидрофилних група. Сваки моносахарид, када се посматра планарно (као равна плоча), може се замислити да има горњу и доњу страну, а да су функционалне групе окренуте према горе или према доле. Ако је већина хидроксилних група окренута на једну страну закључак је да је та страна хидрофилна, односно представља А страну, док је друга страна где нема поларних група хидрофобна, односно Б страна моносахарида (слика 71).



Слика 71. А (поларна – хидрофилна) и Б (неполарна – хидрофобна) страна моносахарида

Иако постоје бројне неповољне интеракције које дестабилизују конформације гликана, нековалентне везе су изузетно значајне и за стабилизацију структуре, односно конформације гликана. Посебно треба истаћи водоничне везе и Ван дер Валсове интеракције (*Van der Waals*). На слици 72. види се стабилизација структуре Луис^x трисахарида (*Lewis*^x; уобичајени трисахарид заступљен на површини ћелијских мембрана) Ван дер Валсовим интеракцијама.



Слика 72. Ван дер Валсове интеракције у паковању Луис^x трисахарида

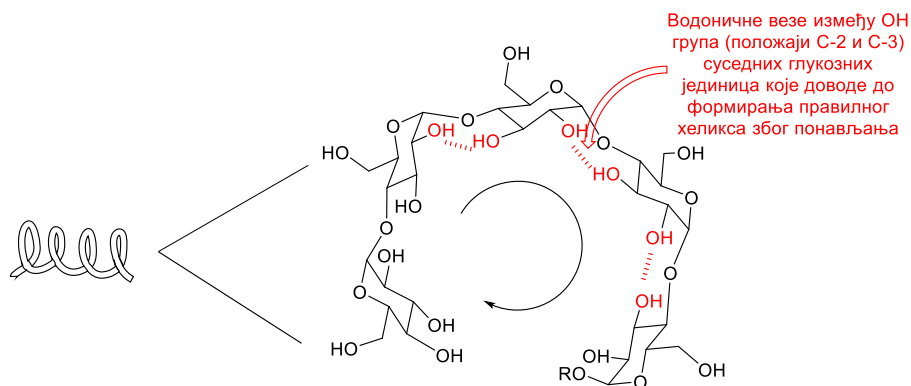
Значајне интеракције су и водоничне везе, које су веома заступљене у сахарицима управо због великог броја функционалних група које су и протон-донори и протон-акцептори (-OH, -NH₂, -NHAc и сл.). Водоничне везе се могу формирати и унутар једног молекула (када се говори о интрамолекулским водоничним везама), али и између два молекула (када се говори о интермолекулским водоничним интеракцијама).

Конформацију гликоконјугата треба посматрати као једну веома динамичну матрицу која подлеже и стабилизујућим и дестабилизујућим локалним интеракцијама, али и интеракцијама целокупног молекула. Велики утицај има сахарид који се посматра, али и агликон који својим функционалним групама може утицати на конформацију гликана. Конформација ће зависити од укупног збира свих интеракција (и привлачних и одбојних). За разлику од других биомолекула исти олигосахарици (најчешћи облик гликана) могу имати различите конформације. Стога, конформација гликана није строго одређена ковалентном структуром, тј. секвенцом, за разлику од протеина и нуклеинских киселина.

Динамика конформације једног гликана се може потврдити и израчунати методама молекулског моделовања које

обухватају све интеракције које доприносе стабилизацији или дестабилизацији посматраног молекула/дела молекула. Експериментални доказ овог динамичног облика конформације је присуство једног гликана у две конформације у појединим гликоконјугатима, док се поједини гликани могу пронаћи у само једној конформацији, оној која је енергетски много више стабилна.

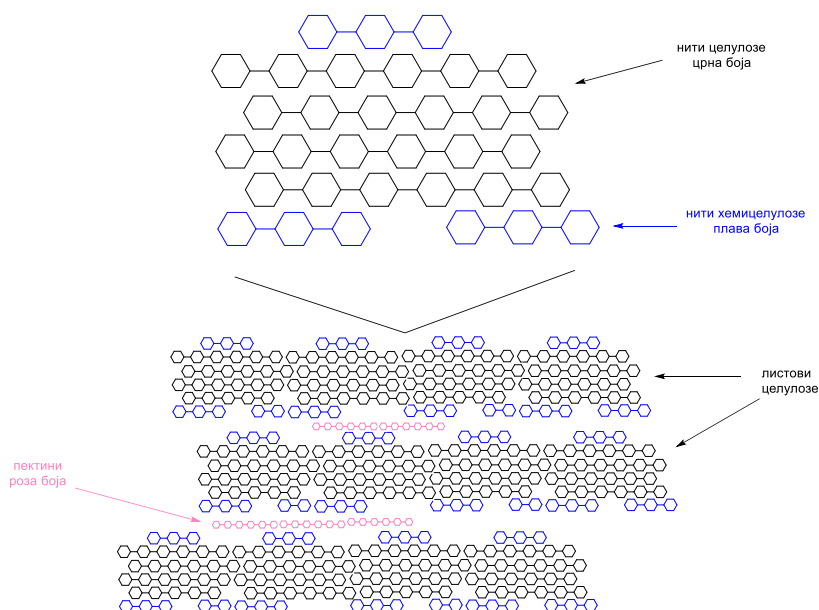
Поред свих аспеката, поједини делови гликана могу имати стандардне круте конформације. Какви су линеарни хомополисахариди код којих као последица присуства понављајућих истих делова, долази до формирања бројних интеракција које стабилизују тачно одређену конформацију. Пример је амилоза, линеарни α -1 $\rightarrow$ 4 глукан, на слици 73.



Слика 73. Структура сегмента амилозе код којег се због присуства водоничних веза формира хеликс

Ови понављајући сегменти хомополисахарида и њихова конформација су веома значајни у живом свету. Најраспрострањенији сахарид је целулоза која изграђује ћелијски зид биљака. То је хомополисахарид изграђен од глукозе повезане β -1 $\rightarrow$ 4 гликозидном везом. За разлику од α -гликозидне везе, код β -гликозидне везе не настаје хеликс него издужена нит (слика 74). Овакве конструкције се повезују у комплекс где се формирају водоничне везе између блиских хидроксилних група суседних ланаца, па тако у свакој нити глукозне резидуе бивају окренуте једна у односу на другу за

180°. Ово структуру чини крутом, јако чврстом и отпорном на кидање. Ове нити се повезују затим у листове који се слажу један на други, што се додатно стабилизује Ван дер Валсовим интеракцијама између листова (листови су окренути један према другом Б страном глукозе те су те стране неполарне и долази до привлачних интеракција). Поред целулозних нити, у структури ћелијског зида могу се пронаћи и делови хемицелулозе, где је глукоза замењена ксилозом. Ксилоза својим присуством нарушава структуру и тиме доприноси бољим физичким особинама овог материјала (постају отпорнији на ударе). Поред хемицелулозе у структури ћелијског зида се може пронаћи и пектин (у својој структури има доста негативно наелектрисаних група, претежно остатака галактуронске киселине, које за себе везују воду) који доприноси повећаном везивању воде, тј. повећава хидрираност површине биљне ћелије.



Слика 74. Поједностављени приказ грађе ћелијског зида биљке – сегмент целулозе

Обзиром на комплексној конформацији гликана/гликоконјугата за његово одређивање (расветљавање) најбоље је користити

рендгенокристалографску анализу и НМР спектроскопију. Значајне податке НМР спектроскопијом добијамо из NOE интеракција (енг. *nuclear Overhauser effect* – NOE). Овај ефекат даје увид у просторну блискост протона. Треба још истаћи да су спектри гликана/гликоконјугата изузетно комплексни и тешки за тумачење што представља главну ману ове анализе.

Најтачнији подаци о стереохемији и конформацији се добијају из рендгенокристалографске анализе гликана/гликоконјугата. Мана ове методе је што се велики број узорака не може добити у адекватном кристалном облику, као и што постоји могућност нарушавања структуре приликом изолације. Апарат за рендгенокристалографску анализу се може видети на слици 75.



Слика 75. Део апарата за рендгенокристалографску анализу монокристала

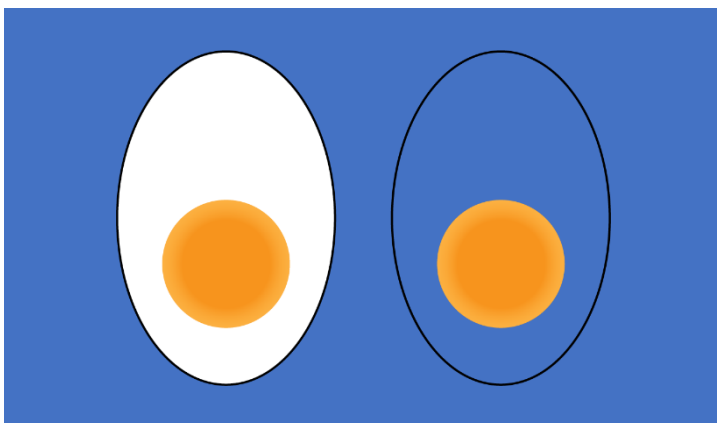
Комбинација ове две анализе омогућава откривање значајних стереохемијских односа гликана/гликоконјугата. С напредком технологије и применом бројних рачунарских програма знање о структури и стереохемији гликана и гликоконјугата постаје свеобухватније.

Поглавље 11 Биолошке функције гликана

У претходним поглављима уџбеника су обрађене структуре, биосинтезе и места испољавања гликоконјугата. Сада ће бити наведене и објашњене све до сада познате улоге, функције и примене гликоконјугата, пре свега у људском организму. Биће и неких улога других гликоконјугата, који нису хуманог порекла, али имају повезаност са људским имунитетом или могу да изазову болест или неко друго стање код човека.

Да би се открила улога гликана у биолошкој функцији гликоконјугата, неопходно је да се раскине веза између гликана и агликона, не би ли се установило да ли та улога припада агликону или гликану или гликоконјугату као целини, односно да су оба дела неопходна за пун биолошки одговор. Овим процесом може доћи до нарушавања структуре и гликана али и агликона, што значајно отежава одређивање улоге оба дела ових конјугата. Највише података и истраживања је повезано са гликопротеинима. Ефекти гликозилације на структуру и функцију протеина су бројни. Занимљиво је да је у јајету пингвина присутан протеин који је веома гликозилован (пеналалбумин). Овај гликопротеин је заступљен у већем проценту од уобичајеног овоалбумина, моногликозилованог протеина, који је присутан у јајету већине птица (даје белу боју беланцета кокошјем јајету када се скува, слика 76.). Сматра се да је одговоран за отпорност пингвинских јаја на екстремно ниске температуре.

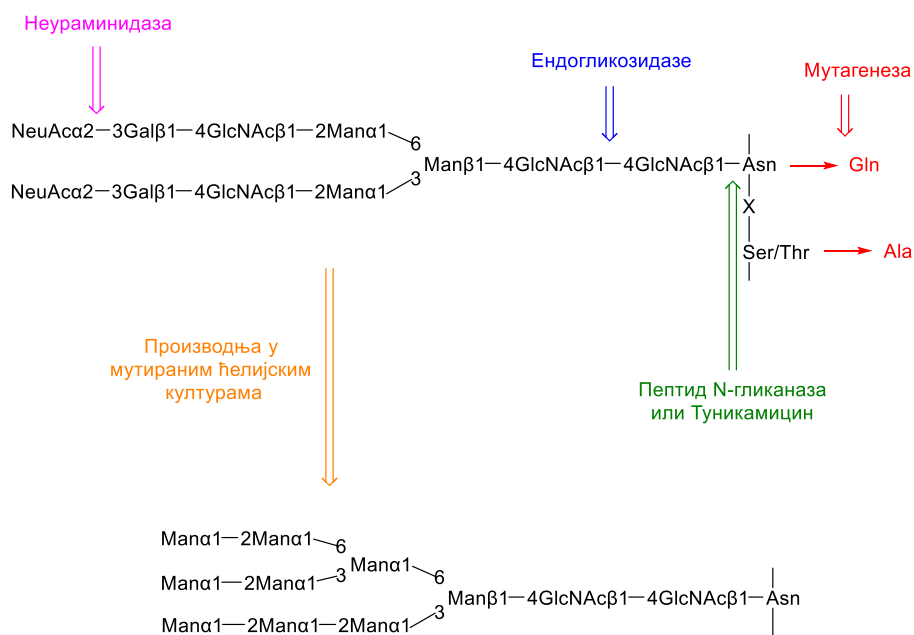
Занимљивост – очигледно је да када се скувају јаја од кокошке и пингвина, беланце код кокошјег јајета буде обојено бело, док код пингвинског јајета буде прозирно (слика 76).



Слика 76. Разлика у обојености беланцета код скуваног јајета кокошке (лево) и пингвина (десно)

Раскидањем везе између гликана и протеина може се установити које функције је изгубио гликопротеин уклањањем гликана и установити које функције има гликан у том конјугату. На слици 77. приказани су неки од начина раскидања везе између гликана и протеина (код *N*-везаних гликана). Најчешће методе за раскидање везе између гликана и агликона су ензимске. Коришћењем ендогликозидаза или пептид *N*-гликаназе може се одвојити цео гликан или део гликана и посматрати улога агликона, а коришћењем специфичних ензима који уклањају само терминалне резидуе (егзогликозидазе) могу се пратити улоге гликоконјугата без присуства неког одређеног моносахарида (нпр. неураминидаза уклања остатак сијалинске киселине). Поред ензимских постоје и друге методе за раскидање везе агликона и гликана. Примена различитих хемијских средстава као што су трифлуорометансулфонска киселина или флуороводоник доводе до раскидања, али и до веома озбиљних оштећења протеина пошто спадају у изузетно агресивне методе. Поред директних метода, могу се користити и методе које код ћелијских култура директно формирају дегликозиловани протеин. Једна је примена мутираних ћелијских култура, где се генетском модификацијом уклања неки од ензима одговорних за гликозилацију и на тај начин се добијају

протеини без или са малим уделом гликана. Може се користити и *in situ* диригована мутагенеза која подразумева измене протеинског ланца тако да редослед аминокиселина више не одговара услову за правилну гликозилацију, чиме се добија протеин без гликана; мада се овде промене у биолошкој функцији могу десити и због промене у секвенци протеина, не само због одсуства гликана. Метода која се може користити у узгајаним ћелијским културама јесте примена хемијских једињења која доводе до спречавања гликозилације. Такав је туникамицин, нуклеозидни антибиотик који спречава грађење долихол-олигосахарида те спречава први корак у настајању *N*-везаних гликана.



Слика 77. Шематски приказ раскидања гликана и агликона код *N*-везаних гликана

Коришћењем до сада наведених метода откривене су поједине функције *N*-гликозилованих протеина. Те функције се углавном приписују целокупном гликопротеину, а не само једном његовом делу.

Неке од откривених улога гликана у биолошкој функцији гликоконјугата следеће су:

- **Стабилизација протеина.** Пример су имунолошки молекули CD2 одговорни за адхезију. Испољени су на површини Т лимфоцита, и уклањањем гликана губе функцију. Места за гликозилацију су удаљена од места која остварују адхезију тако да улога гликана није у самом остваривању интеракције него у стабилизацији целог гликопротеина. Уклањањем гликана молекула се дестабилизује и због тога губи биолошку улогу.
- Позитивно утичу на **динамику протеина**, пример је RMP-C протеазни инхибитор, протеин од 36 аминокиселина који има само једну моносахаридну јединицу фукозе на положају 9 везану за остатак треонина. Овај протеин постоји у две форме: потпуно формирана структура у облику β -набране плоче (активан облик), и облик са делимично формираном β -набраном плочом (неактиван облик). Присуство фукозе помера равнотежу у страну активног облика, јер фукоза фаворизује Н-везе и олакшава формирање β -набране плоче.
- **Заштитна улога.** Присуство гликана на гликопротеинима спречава деловање ензима (поготово протеаза). Због великог удела гликана на површини протеина спречава се прилазак ензима самом протеину, па присуство гликана чини гликопротеине отпорнијим на протеолизу. Када се многим гликопротеинима уклони гликан, брже подлежу дејству протеолитичких ензима. Гликани својим присуством на површини протеина такође доприносе бољој стабилости гликопротеина у воденим срединама, где практично служе као штит од воде.
- Доприносе **комуникацији**. Гликани на површини протеина имају утицај на комуникацију са суседним молекулима, омогућују интеракције са лектинима, али такође могу да спрече да протеину приђу други типови молекула. Пример су хормони хипофизе и материце који су гликопротеинске структуре (лутеинизирајући

хормон (LH), фоликулостимулирајући хормон (FSH) и хумани хорионски гонадотропин (β -HCG)), чији се рецептори налазе у ћелијама полних жлезда. Ови гликопротеини се везују за рецептор и испољавају функцију. До везивања за рецептор ће доћи и без гликана на овим гликопротеинима, али ће биолошки одговор изостати.

- Поред утицаја на комуникацију унутар организма, гликани гликоконјугата имају утицај и на **интеракцију** хуманог организма **са страним ћелијама**. Пример су имуноглобулини (антитела) који имају везане гликане у одређеним деловима своје структуре што се може видети на слици 34. Основна улога им је да неутралишу патогене, тј. да их обележе да би могли бити уништени од стране макрофага. Уколико на имуноглобулину недостају гликани, настаје конформација протеина која не може да реагује са одговарајућим компонентама имуног система и на тај начин изостаје њихова функција. Гликан нема директан контакт са компонентама које стварају интеракцију и везивање, али такво одсуство доводи до изостанка биолошке активности и као последица нема одговарајућег имуног одговора организма.
- Гликани на страним ћелијама могу створити **избегавања имуног одговора домаћина**. Пример је гликопротеин испољен на површини паразита који изазива болест спавања (трипанозоме). Изменама гликана на површини гликопротеина ћелијске мембране овај узрочник болести може да завара имунолошке ћелије и да уђе у ћелије домаћина. Иако ово није хумано, овакве измене омогућују преживљавање паразита.

Према примерима, гликани већином не учествују директно у биолошкој активности и најчешће нису на самом месту везивања и активном месту, али њихово одсуство доводи до изостанка биолошке функције или смањења интензитета биолошког одговора. Гликани доприносе стабилизацији

протеина, њиховом лакшем везивању за активна места и испољавању биолошких функција.

Генетским мутацијама је такође установљено да код неких примера гликопротеина није било неопходно да буде присутан целокупан гликан него само његов део или поједина, тачно дефинисана, гликанска резидуа. Значај гликана и њихове биолошке функције ће тек бити расветљене, јер ће се развојем нових техника и гликобиологија све више развијати, чиме ће се гликани обимније и детаљније испитивати.

Поглавље 12 Угљенохидратно препознавање

Протеински молекули који специфично реагују само са одређеном угљенохидратном секвенцом се називају лектини. Као што је наведено у почетном делу овог уџбеника, лектини су протеини или гликопротеини, макромолекули који испољавају специфичне интеракције са угљеним хидратима или угљенохидратним делом гликоконјугата (значајни за препознавање и интеракцију). Могу се поделити на лектине који реагују са ендогеним, односно угљеним хидратима домаћина и одговорни су за међућелијску комуникацију и адхезију, као и на лектине који интерреагују специфично са егзогеним угљеним хидратима, односно угљеним хидратима страним за хумани организам и одговорни су за имуни одговор, тј. заштиту организма од различитих спољашњих фактора (бактерије, паразити и сл.). Поред лектина треба навести и сулфоноване гликозаминогликан-везујуће протеине (енг. *GAG-binding proteins*). Обе групе једињења чине молекули одговорни за све видове угљенохидратних интеракција, важни за бројне процесе у организму и природи, и једним термином називају се протеини који везују гликане (енг. *glycan-binding proteins- GBPs*).

Анимални лектини (у које спадају и хумани) се деле на основу домена одговорног за интеракцију са угљенохидратном компонентом, **CRDs** (енг. *carbohydrate-recognition domains*) тј. домен за угљенохидратно препознавање.

Поред анималних постоје и бројни други лектини, пошто су ова једињења веома распрострањена у различитим организмима (проکاریоти, вируси, биљке, гљиве и други).

Сваки CR домен је специфичан и остварује реакцију само са тачно одређеном угљенохидратном секвенцом. Некад је то само једна угљенохидратна резидуа, а некад низ од неколико моносахаридних јединица (олигосахарид). На основу тога који угљени хидрат треба да се веже зависиће и облик и изглед

шупљине на самом CR домену лектина. У CR домену је могуће и присуство дисулфидних мостова, као и места за везивање двовалентних катјона.

На основу CR домена лектини се деле у осам класа, као што је приказано у табели 4. Ове класе нису једини лектини који постоје, али су најзначајнији и највише испитани и воде порекло из људског организма. Постоје и друге класе лектина, од којих су неке заступљене само у одређеним организмима, док су поједине присутне код више различитих организама. Код људи се јављају и друге класе као нпр. интелектини, фиколини, малектини и др, који неће бити предмет изучавања у овом уџбенику.

Табела 4. Подела лектина на основу CR домена на осам класа најзначајнијих за функционисање људског организма

Тип лектина	Најчешћи лиганд	Неке од биолошких функција
C–тип	Више различитих моносахаридних терминалних резидуа	Бројне улоге (у адхезији, у имунолошком одговору и др.)
Галектини	β-галактоза	Бројне улоге (у развоју и регулацији имунолошког одговора, контрола ћелијског преживљавања и др.)
I–тип	Сијалинска киселина	Ћелијска адхезија
R–тип	Више различитих моносахаридних терминалних резидуа	Контрола ензимског деловања, контрола гликопротеинских хормона
Калнексин	Глукоза	Регулација правилног формирања терцијарне структуре гликопротеина
M–тип	Маноза	Регулација разградње неправилних гликопротеина у ЕР
L–тип	Маноза	Транспорт гликопротеина између ЕР и ГА
P–тип	маноза-6-фосфат	Транспорт гликопротеина након ГА

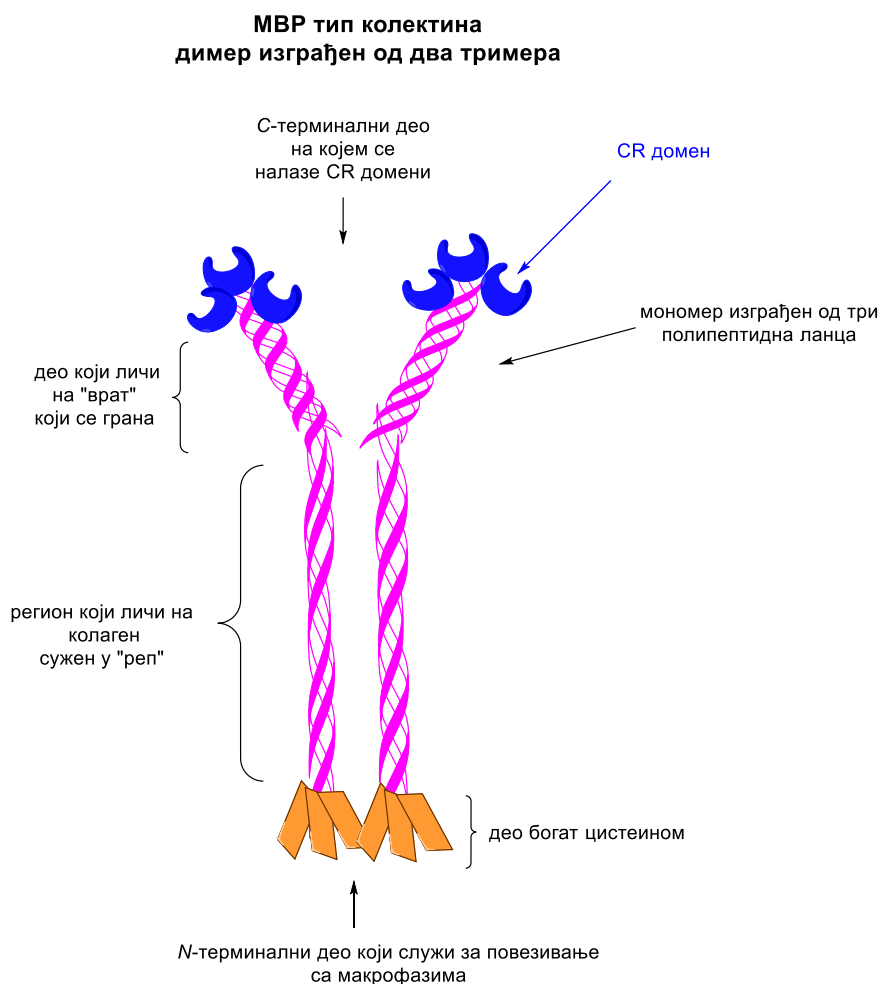
C–тип лектина

Ова група лектина је највећа и најразноврснија. Ту спадају протеини који везују гликане и то су протеини који зависе од присуства калцијумових јона. Ова зависност је узрокована специфичним редоследом аминокиселина у везивном месту протеина које одлично координирају јон калцијума и везују хидроксилне групе моносахаридних јединица. Постоји неколико поткласа овог типа лектина, то су асијалогликопротеински рецептори, лектини који везују манозу (колектини), селектини и др.

C–тип лектина је значајан за уклањање патогена из циркулације организма, па ће прво бити објашњене две поткласе овог типа лектина које су укључене у овај процес. То су серумски протеини који везују манозу (енг. *mannose-binding protein- MBP*), познати и као лектини који везују манозу (енг. *mannose-binding lectin- MBL*), а друга поткласа је асијалогликопротеински рецептор (енг. *asialoglycoprotein receptor- ASGPR*) који се још назива и хепатични Gal/GalNAc рецептор или Ашвел-Морелов рецептор (енг. *Ashwell–Morell receptor- AMR*). Улога ове две поткласе јесте да неутралишу патогене који доспеју у циркулацију и на тај начин поспеше имуни одговор организма.

Серумски **протеини који везују манозу** су одбрамбени молекули домаћина који се везују за шећере на површини микроорганизама што је основ механизма идентификације и неутрализације патогена. Ови молекули циркулишу кроз крвоток хватајући патогене који на својој површини имају одговарајуће моносахаридне резидуе, везују се за њих и активирају макрофаге који фагоцитозом уништавају патогене. Ова поткласа C–типа лектина је одговорна за урођени имунитет. Већ по рођењу у хуманом крвотоку се могу детектовати серумски протеини који везују манозу, а који штите новорођенче од могућих инфекција. Најзначајнија група ових протеина су колектини. Ови молекули имају структуру која подсећа на грађу колагена, одакле и потиче назив (**колаген + лектин → колектин**).

Колектини су олигомери изграђени од три полипептидна ланца који се удружују у тример. Тример се потом са још једним тримером удружује у димерну структуру која је на два места стабилизована хеликсом. Формира се неколико региона. *N*-терминални део (регион богат цистеином), следи регион сличан колагену, са два трострука хеликса; који су у почетном делу повезани у „реп“, а даље се шире (гранају). Након тога следи кратак домен „врата“, на кога се надовезује домен за препознавање угљеног хидрата, односно *C*-терминални део (слика 78).



Слика 78. Шематски приказ колектина

На С-крају се налази домен за препознавање гликана, а на N-крају се налази део који личи на колаген (који се завршава са делом богатим цистеином) и везује се за колектински рецептор на макрофазима доводећи до фагоцитозе. Целокупна структура личи на букет цвећа. Структурна особина полипептидног ланца колектина је да свака трећа аминокиселина мора бити глицин, што доприноси правилном формирању и функцији колектина. Поред интеракције са макрофазима, N-крај колектина може да се повеже и са ензимском каскадом која се назива MBP-удружене серинске протеазе (енг. *MASPs-MBP-associated serine proteases*). Активирање ове каскаде уништава патогене, као у случају везивања за макрофаге, осим што се у овој реакцији активирају протеолитички ензими који разарају патоген.

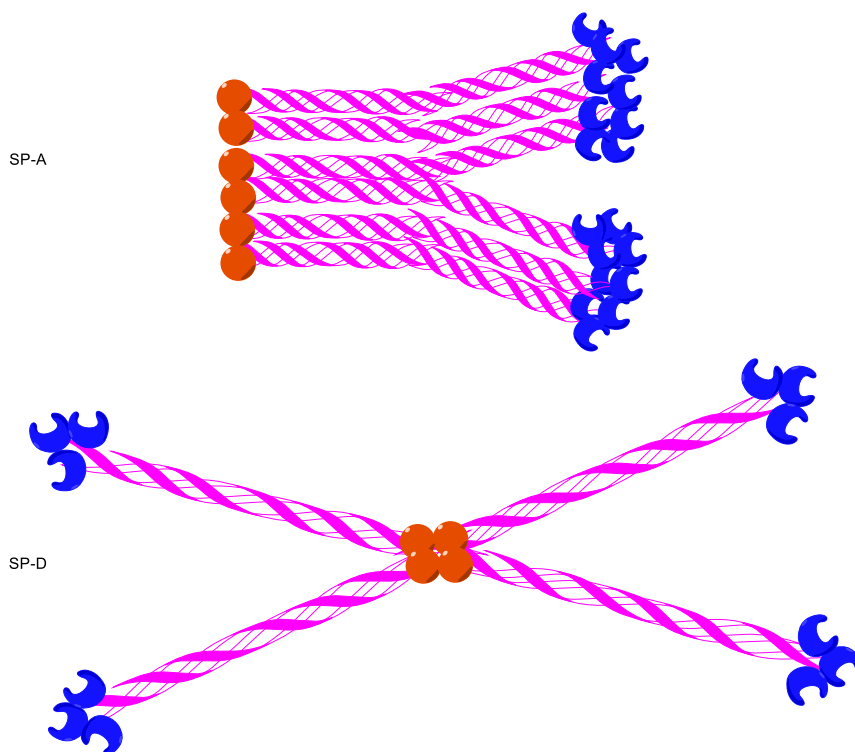
Значај колектина и серумских протеина који везују манозу је тај да деца са урођеном маном у изградњи ових молекула имају далеко слабији имунитет, склонији су инфекцијама и теже се опорављају од болести. Што је изражено до друге године живота, када се формира стечени имунитет и урођени постаје мање значајан за одбрану организма. Утврђено је и да особе оболеле од ХИВ инфекције које имају мане у изградњи поменутих молекула имају краћи животни век. Најчешће грешке које се код њих јављају су управо у изградњи полипептидног ланца, односно неопходан глицин је замењен неком другом аминокиселином што нарушава структуру и тако и функцију ових молекула.

Поред колектина присутних у крвотоку, важни колектини у имунолошком одговору су они присутни у плућним алвеолама, а који врше улогу плућних сурфактанта. То су слободни молекули одговорни за имунитет, тј. имају протективну улогу. Иако их најчешће повезујемо са плућима, веома су распрострањени по целом организму (танко црево, материца, плувачне жлезде, желудац, али и други органи и ткива).

Два најзначајнија плућна сурфактанта колектинске структуре су SP-A и SP-D. SP-A има изглед букета, док SP-D има изглед штапова које врте мажореткиње (слика 79.). Ова једињења

служе за заштиту алвеоларног простора и доприносе уклањању патогена. Својим С-крајем интереагују са одговарајућим гликанима на површини микроорганизама, а са својим N-крајем се повезују са рецепторима на алвеоларним макрофазима, доводећи тако до неутрализације патогена. Значај ових молекула се посебно види код превремено рођених беба, које се рађају са недовољно развијеним плућима и најчешће им недостаје довољна количина сурфактаната, што их чини подложнијим респираторним инфекцијама.

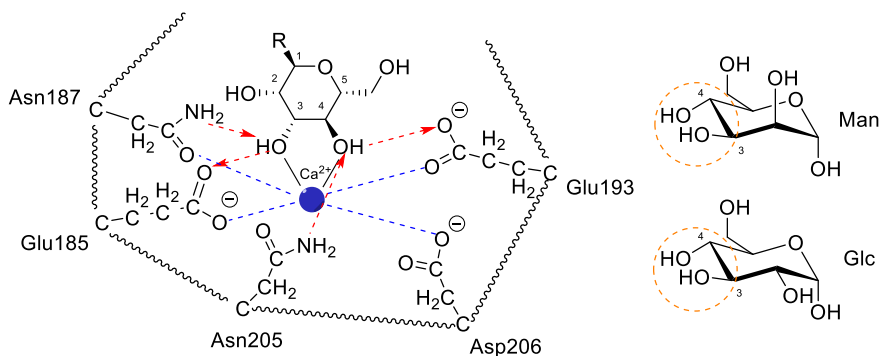
Поред споменутих SP-A и SP-D, треба описати и SP-B и SP-C. То су плућни сурфактанти који су мали хидрофобни протеини и имају улогу у имунолошком одговору, али немају колектинску структуру, па неће бити предмет изучавања ове књиге.



Слика 79. Изглед плућних сурфактаната SP-A (горе) и SP-D (доле)

Колектини, односно лектини који везују манозу се на тачно дефинисан начин повезују са гликанима патогена. Као што је напоменуто, за везивање је неопходан CR домен лектина, јон калцијума (Ca^{2+}) и одговарајући моносахарид што је најчешће резидуа манозе, али може бити и глюкозе или *N*-ацетилглюкозамина.

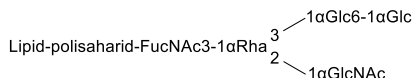
Везивање остатака манозе или глюкозе за лектине који везује манозу објашњено је рендгеноструктурним увидом у везивно место самог лектина. Познато је да се на месту везивања остварују водоничне везе између хидроксилних група на положајима 3 и 4 моносахарида са аминокиселинским остацима лектина, уз координацију јона калцијума (слика 80.). Као што се слике 80. види, било који моносахарид са истим конфигурацијама на положајима 3 и 4 може да се веже. Пошто је маноза C-2 епимер глюкозе јасно је да ће и глюкоза и деривати глюкозе моћи да остваре исте везивне интеракције са лектинима који везују манозу.



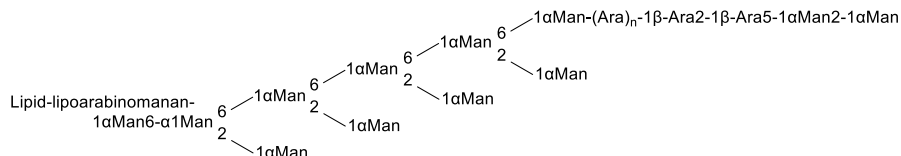
Слика 80. Место везивања моносахаридног остатка са лектином који везује манозу

Сада је сврсисходно објаснити и зашто нам је урођени имунитет заснован на интеракцијама лектина са остацима манозе и/или остацима глюкозе и њиховим дериватима. Остаци гликана на површини патогена углавном имају испољене управо ове моносахаридне резидеуе, па је и наш имуни систем тако и еволуирао да нас одбрани од ових узрочника болести (слика 81.). Присуство других

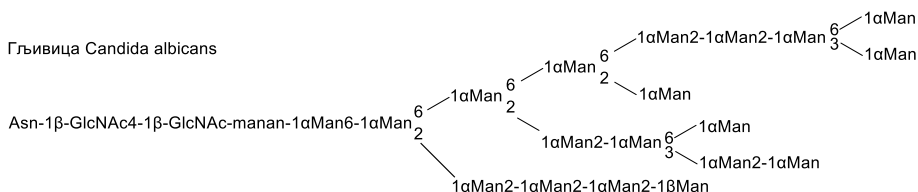
Бактерија *Escherichia coli*



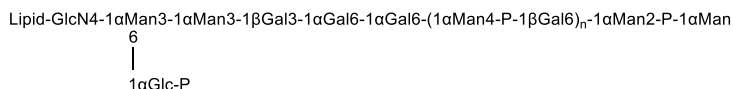
Бактерија *Mycobacterium tuberculosis*



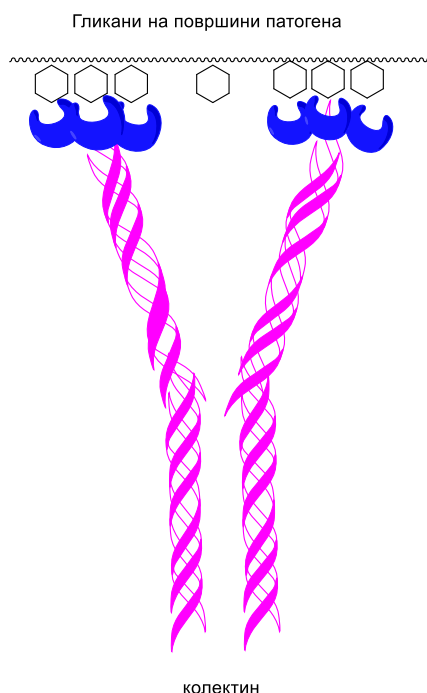
Гъивица *Candida albicans*



Паразитска протозооа *Leishmania donovani*



За висок афинитет лектина који везују манозу, поготово колектина, одговорне су вишеструке интеракције самог лектина и више остатака манозе који су испољени на површини патогена. Управо структура колектина омогућава да се везивна места налазе на удаљености од 5 nm што доводи до успостављања већег броја везивних интеракција које се сабирају и доприносе стабилизацији овог комплекса (слика 82.).

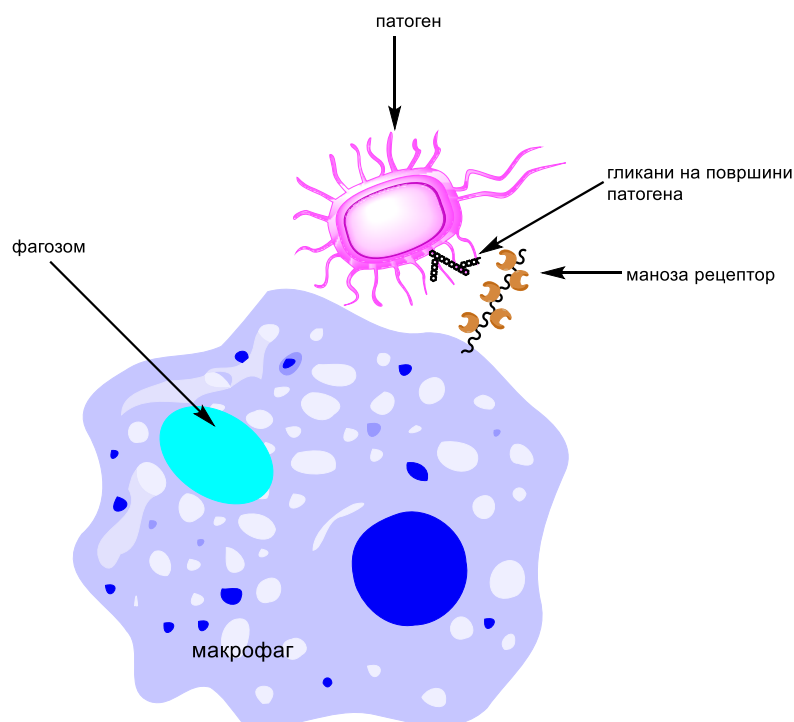


Слика 82. Везивање гликана са површине патогена са колектинима у циркулацији

Поред протеина који везују манозу, слободно циркулишућих, пронађени су и лектини који везују манозу али су повезани са мембраном ћелија.

Овакав вид молекула је присутан на имунолошким ћелијама као нпр. макрофазима, епителним ћелијама, Купферовим ћелијама јетре (*енг. Kupffer cells*, специјални облик макрофага заступљен само у јетри) итд. Овај тип **манозних рецептора** је најчешће повезан са другим рецепторима и омогућава чвршће везивање патогена за макрофаг. Када се макрофаг чврсто повеже са патогеном долази до фагоцитозе, а када се патоген нађе у унутрашњости макрофага, доводи до разградње патогена фузијом лизозома и фагозома. Овај тип манозног рецептора исто спада у С-лектине и његова улога је повезана са имунитетом, тј. активирањем имунолошког одговора ради уклањања потенцијалне опасности по организам. Манозни

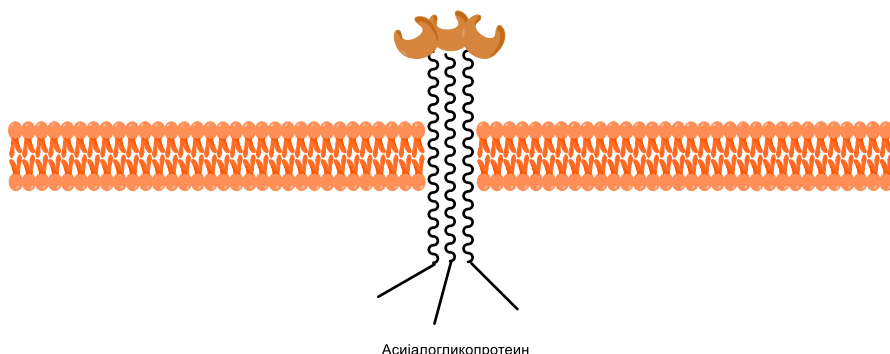
рецептори поред CRD-а С-типа лектина могу у структури да имају и неки други домен карактеристичан за неки други тип лектина, као на пример CRD R-типа лектина о чему ће бити више речи у неком од наредних делова уџбеника. На слици 83. се може видети шематски приказана интеракција између манозног рецептора на макрофазима и гликана гликоконјугата на површини патогена.



Слика 83. Шематски приказ интеракције између манозног рецептора макрофага и патогена

Поред лектина који везују манозу, и асијалогликопротеини уклањају гликопротеине патогена из циркулације. **Асијалогликопротеини** такође спадају у С-тип лектина, изграђени су као тримери и могу одједанпут да вежу три гликана за себе (слика 84.). Пример оваквог лектина је асијалогликопротеински рецептор (енг. *asialoglycoprotein receptor* - *ASGPR*) који се још назива и хепатични Gal/GalNAc рецептор или Ашвел-Морел рецептор (енг. *Ashwell–Morell*

receptor – AMR). За остваривање интеракције са асијалогликопротеинима неопходно је да последња моносахаридна јединица из гликана буде галактоза или GalNAc. Овакав вид гликопротеина којима је последња резидуа Gal или GalNAc настају у циркулацији након дејства сијалидаза које уклањају сијалинску киселину (као последњу резидуу гликана), због чега и носе префикс асијало- што означава без сијалинске киселине. Када се оствари везивање оваквог гликана са асијалогликопротеином, долази до преноса тог комплекса ендоцитозом у ћелије где се спаја са ендозомом у којем долази до раскидања везе између протеина и гликана, након чега се протеин спаја са фагозомом где се разграђује.



Слика 84. Изглед асијалогликопротеина

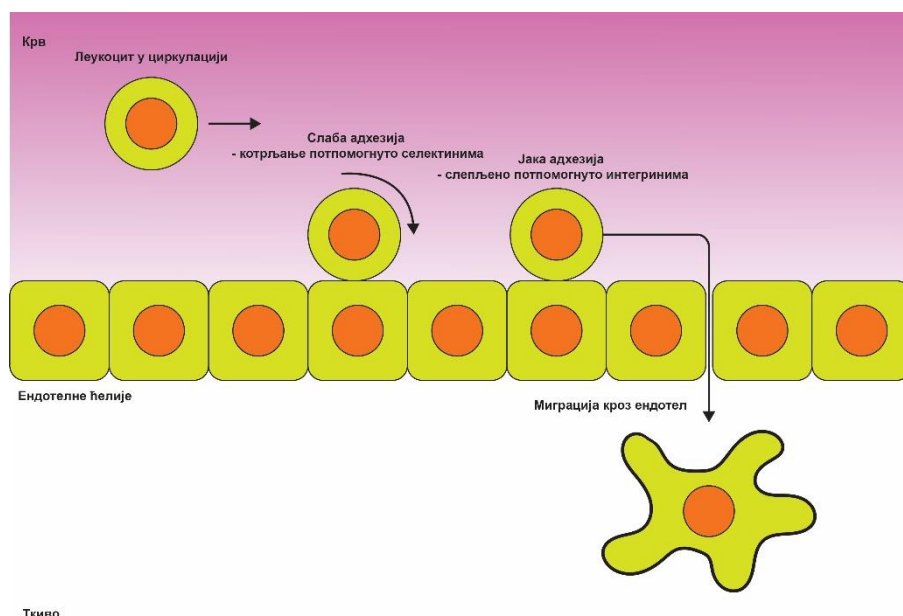
Место везивања на асијалогликопротеину је веома слично са местом везивања на лектину (протеину) који везује манозу. Једина разлика између циљних молекула ове две категорије С-типа лектина је оријентација хидроксилне групе на положају C-4.

- MBP - Man, Glc, GlcNAc,
- Асијалогликопротеински рецептор - Gal, GalNAc.

Треба напоменути да и протеини који везују манозу (MBP) као и асијалогликопротеини не уклањају само гликопротеине патогена, него и гликопротеине настале нормалним метаболизмом или неким патолошким стањем. Као пример се

може навести инфламација, где се током упалног процеса производи већа количина протеина који су богати манозом и могу бити уклоњени дејством поменутих манозних рецептора. Поред слободних молекула у циркулацији, ови молекули се могу наћи и повезани са ендотелним ћелијама, на ћелијама јетре и на површини макрофага. Улога им је да уклоне све непотребне и непожељне гликопротеине.

Наредна група лектина који спадају у С-тип лектина су **селектини**. Ови молекули су одговорни за ћелијску адхезију белих крвних зрнаца (леукоцита) за површину ендотела и омогућавају њихов пролазак кроз зидове крвних судова и долазак у остала ткива (дијапедеза). Леукоцити се нормално налазе у циркулацији и да би доспели у остала ткива неопходно је да прођу кроз слој ендотелних ћелија. Да би се то догодило потребно је да дође до интеракције између леукоцита и ендотелне ћелије, интеракције која је могућа захваљујући селекинима. Прво долази до клизања или котрљања по површини ендотела (за шта су одговорне интеракције између селектина и гликана), а затим до везивања (за шта су одговорне интеракције између интегрина и рецептора) и проласка кроз крвни зид у околна ткива. Процес кретања и проласка леукоцита кроз зид крвног суда приказан је шематски на слици 85.

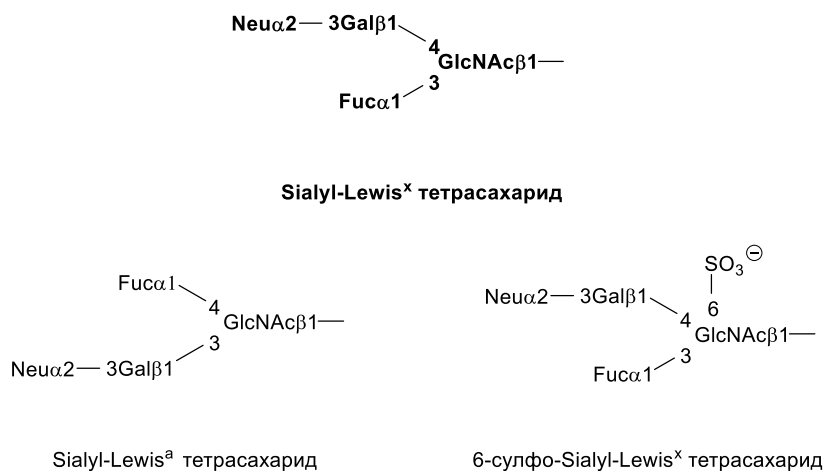


Слика 85. Шематски приказ проласка белих крвних зрнаца кроз зид крвног суда

До сада су откривене три врсте селектина одговорне за адхезију белих крвних зрнаца, и то су: L-селектини који се појављују по потреби на површини белих крвних зрнаца (L у називу означава леукоците), и P-селектини и E-селектини који се појављују на површини ендотелних ћелија по потреби, односно након неког физиолошког или патолошког стања које захтева излазак леукоцита из циркулације. Приликом инфламације познато је да се прво појављују P-селектини на површини ендотелних ћелија да би привукли циркулишуће неутрофиле. Након тога појављују се и E-селектини на површини ендотелних ћелија да би се привукли и прекурсори неутрофила и макрофага.

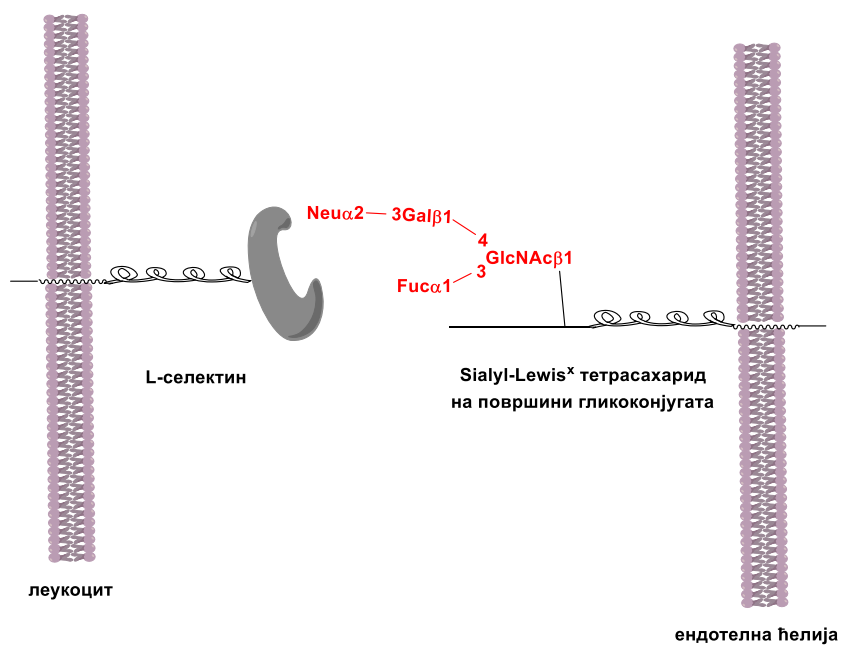
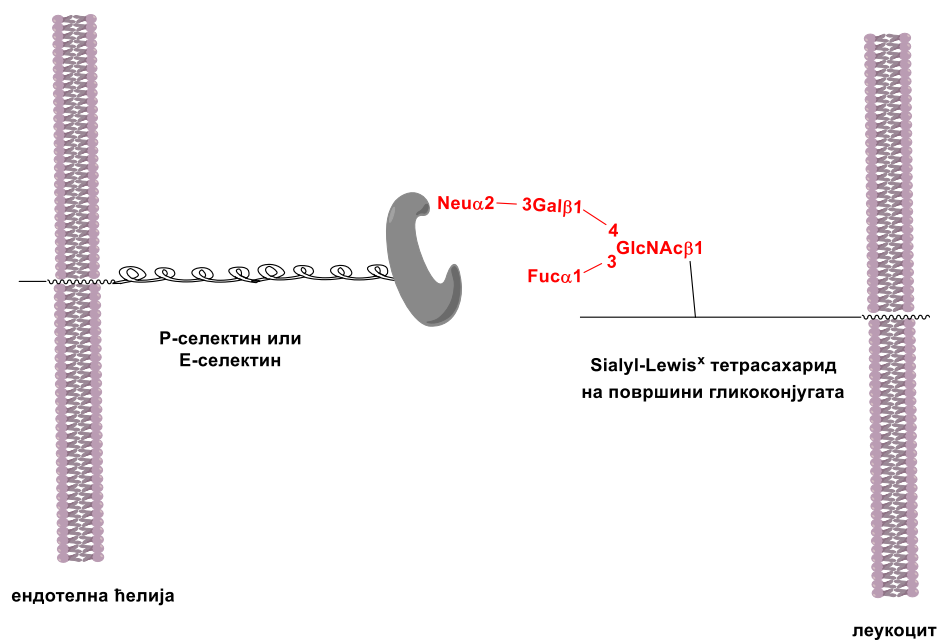
Сва три типа селектина имају сличну грађу и исти C-крај на којем се налази CRD лектина за који се везује тачно одређени гликан тетрасахарид по имену сијалил-Луис-X (енг. *sialyl-Lewis^x* (слика 86.)). Овај тетрасахарид се појављује на површини ендотелних ћелија и леукоцита у стањима где је потребно активирати дијапедезу. Поред поменутог

тетрасахарида, постоји могућност везивања и сличних тетрасахарида као што су сијалил-Луис-а (енг. *sialyl-Lewis^a*) и 6-сулфо-сијалил-Луис-Х (енг. *6-sulpho-sialyl-Lewis^x*) чије структуре су такође приказане на слици 86. Сви ови тетрасахариди у основи имају исте моносахариде који их изграђују и то су GlcNAc, Gal, Fuc и сијалинска киселина. Притом, остатак фукозе и сијалинске киселине морају бити на крајевима антена.



Слика 86. Структура *sialyl-Lewis^x* и сличних тетрасахарида

Sialyl-Lewis^x тетрасахарид, као и слични тетрасахариди који се испоље на ендотелним ћелијама, повезују се са L-селектином испољеним на леукоцитима, док се *Sialyl-Lewis^x* тетрасахарид и слични тетрасахариди који се појаве на површини леукоцита повезују са P-селектином и E-селектином који се појављују на површини ендотелних ћелија (слика 87.).



Слика 87. Шематски приказ повезивања селектина и sialyl-Lewis^x тетрасахарида

На овај начин селектини регулишу кретање леукоцита у нашем организму. Изузетно осетљив део овог процеса је фаза котрљања у којој интеракције које настају између селектина и гликана морају и да се успоставе, али и да се благовремено раскину да би се леукоцит котрљао тј. померао по површини крвног суда. Након фазе слепљености леукоцити ће напустити циркулацију и омогућити изазивање одговарајућег биолошког одговора који је најчешће повезан са имунитетом.

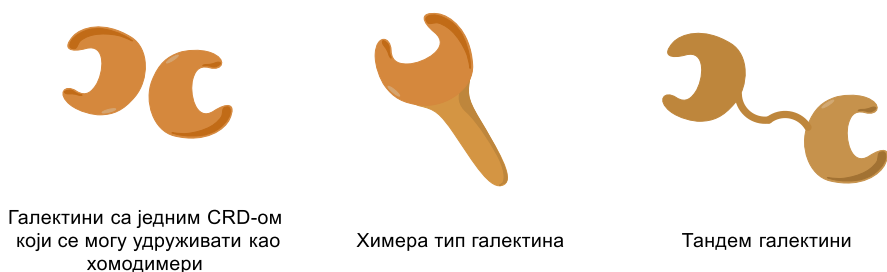
Галектини

Галектини су група лектина веома распрострањених у свим организмима, па и хуманом. Спадају у групу растворних протеина са CR доменом који за себе везује β -галактозу. Улоге галектина су бројне и обухватају учешће у развојном процесу, регулативне улоге, али и активирање имуног система.

Галектини се на основу свог CRD-а деле на три главне групе:

- Галектини са једним CRD-ом који се могу удруживати као хомодимери (галектини-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 и -15);
- Химера тип галектина који се описују као молекули са једним CRD-ом и *N*-терминалним полипептидним репом који у себи садржи највише остатке пролина, глицина и тирозина (галектини-3);
- Тандем галектини који обухватају молекул са два CRD-а повезаним са пептидним продужетком (*енг. linker*) који може поседовати и преко 50 аминокиселина (галектини-4, -6, -8, -9 и -12).

Упрошћени начин приказивања све три главне групе галектина дат је шематски на слици 88.



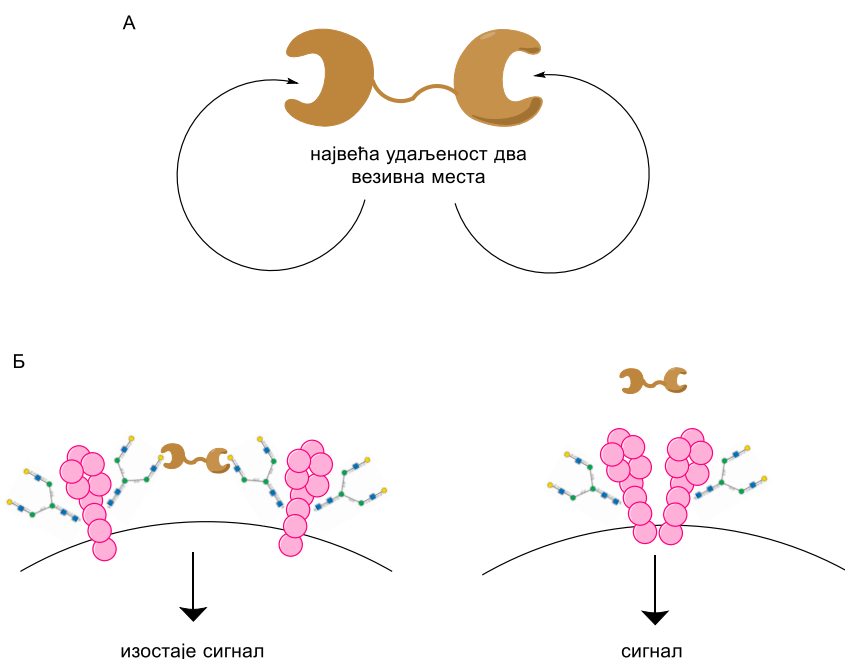
Слика 88. Три главне групе галектина

Галектини се могу пронаћи како везани за ћелијску мембрану или мембрану органела, тако и слободни у интрацелуларном и екстрацелуларном простору. Треба нагласити да су то једни од ретких лектина који се могу пронаћи и у једру ћелије.

Најзначајније улоге су им модификација интеракције ћелија-ћелија, адхезија ћелија-матрикс, трансмембранска сигнализација и контрола ћелијског преживљавања.

У везивно место галектина се веома добро уклапа лактоза ($\text{Gal}\beta 1\text{-4Glc}$), као и *N*-ацетиллактозамин ($\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}$), али оно што је најзначајје је да β -галактоза мора бити присутна као последња резидуа на нередукуюћем крају.

Везивна места на галектинима су на одређеним позицијама, постављеним тако да када дође до димеризације (код тандемских галектина) та везивна места ће бити на најудаљенијим деловима (слика 89А). Тиме се омогућава да приликом везивања обезбеђују растојање између два гликана који се везују за два галектинска CRD-а, што није био случај код до сада објашњених С-лектина. Приликом оваквог везивања они стварају структуру налик мосту, односно држе удаљенима рецепторе са галактозним остацима, и не дозвољавају димеризацију рецептора и активацију сигнала (слика 89Б). У одсуству тандемских галектина, суседни рецептори са галактозним остацима могу се приближити, што доводи до њиховог спаривања, грађења кластера и изазивања сигнала.



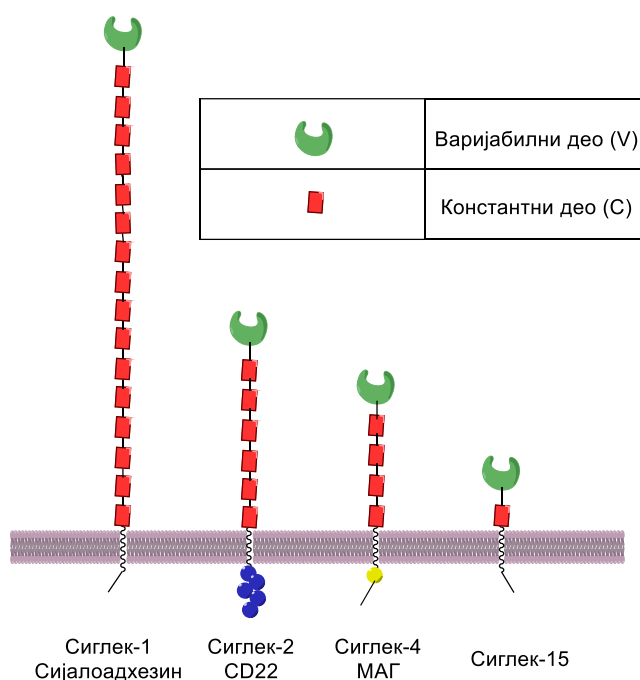
Слика 89. А) Везивна места на тандем галектину; Б) Везивање галектина и рецептора са β -галактозним остацима

Галектини -1, -9 и -3 су повезани са контролом ћелијског преживљавања, односно са активацијом или инхибицијом апоптозе као вида програмиране ћелијске смрти. За галектине -1 и -9 се зна да су присутни у тимусу (грудној жлезди) и да активирају апоптозу Т-ћелија уколико су неправилно развијене. За разлику од њих галектин -3 је пронађен у повећаној количини у туморским ћелија где се сматра да обавља инхибицију апоптозе и на тако омогућава преживљавање неправилних/измењених ћелија.

I–тип лектина

I–тип лектина су протеини са везујућим доменом који је сличан имуноглобулинској фамилији протеина. Највише изучена група лектина I–типа су **сиглектини (сиглеци)** који за свој CRD везују остатак сијалинске киселине. Назив сиглектин потиче од *енг. siglecs* – s-сијало, *ig*-имуноглобулини, *lecs*-лектини.

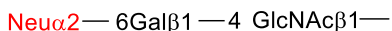
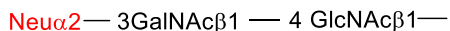
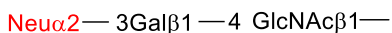
Сиглектини су изграђени из неколико типова домена, први тип јесте варијабилни (налик варијабилном региону имуноглобулина) и означава се словом V (енг. *variable-like domain*), други тип домена је константни (налик константном региону имуноглобулина) и означава се словом C1 или C2 (енг. *constant-like domain*). Сви сиглеци су мембрански протеини и садрже по један V део и више C делова. Присуство више C делова омогућава одмицање, тј. различиту удаљеност од површине ћелијске мембране (слика 90.).



Слика 90. Приказ одабраних сиглектина (I–тип лектина)

V део сиглека омогућава везивање гликана, за шта је неопходно присуство терминалне сијалинске киселине на гликану. Код најзаступљенијих сиглектина, сијалоадхезина, најјаче интеракције се остварују са терминалним остатком сијалинске киселине и то повезаних α 2-3 везом за остатак галактозе, док нешто слабије везивање може да се оствари и са NeuAc α 2-3GalNAc и NeuAc α 2-6Gal (слика 91.). Ово је објашњено везивним местом и интеракцијама које настају, где

се посебно истичу две водоничне везе између карбоксилне групе сијалинске киселине и остатка аргинина из везивног дела, али и хидрофобне интеракције између C7-C9 дела сијалинске киселине и остатка триптофана из везивног дела сијалоадхезина.



Слика 91. Гликани који остварују добро везивање за сијалоадхезин - сиглек-1

Биолошка улога сиглектина је у ћелијској адхезији и интерцелуларној комуникацији. Сијалоадхезин (сиглек-1) се повезује са Т-лимфоцитима, гранулоцитима и макрофазима, и на тај начин се активирају имунолошке ћелије. За CD22 (сиглек-2), који је присутан на Б-ћелијама имуног система, се зна да је негативни регулатор активације Б-ћелија. МАГ (*енг. myelin-associated glycoprotein*, сиглек-4) је сиглек заступљен у централном и периферном нервном систему и то у мембранама олигодендроцита и Шванових ћелија (*енг. Schwann cell*). Иако функције нису у потпуности разјашњене, МАГ доприноси процесу мијелинизације и опоравка нерава након повреде; што потврђују експерименти где је мишевима генетским изменама уклоњен МАГ што је прогресивно смањило моторне активности. Сиглек-15 је пронађен на остеокластима где је неизоставан у диференцијацији остеокласта, коштаних ћелија које имају улогу у деградацији костију.

Постоје и други лектини I-типа који се такође везују за терминалне остатке сијалинске киселине и учествују у ћелијској адхезији и комуникацији, али сиглектини су до сада и структурно и функционално највише истражена група ове класе лектина.

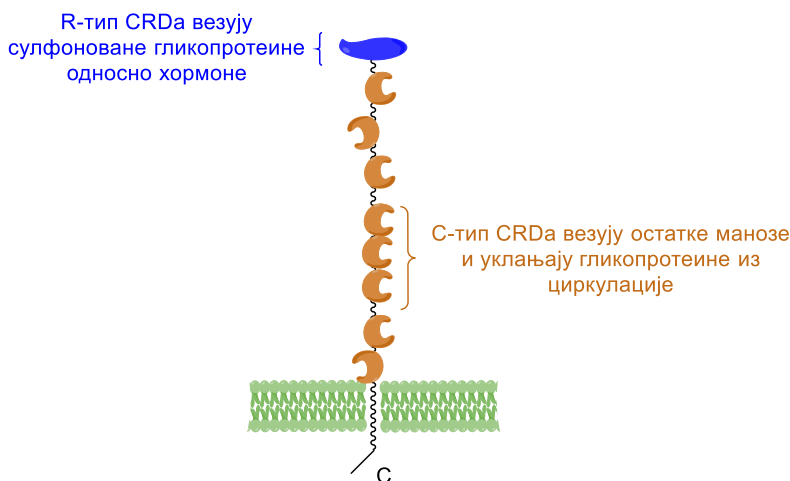
R–тип лектина

Ова група лектина има домен за везивање гликана који је најсличнији рицину (рицин се сматра првим откривеним лектином), те због наведене сличности ова група лектина носи ознаку R. Ови лектини су веома заступљени у биљкама, животињама и бактеријама. Ипак, највише речи у овом делу уџбеника ће бити о хуманим R-лектинима.

У хуманом организму улога R-типа лектина се повезује са контролисањем деловања ензима и омогућавањем деловања гликопротеинских хормона.

Деловање гликопротеинских хормона преко R-типа лектина има везе са рецепторима за манозу. Ту се поставља питање како то рецептори за манозу који су C-тип лектина могу имати везу са R-типом лектина, тј. са хормонима гликопротеинске структуре.

Наиме, прво су откривени рецептори за манозу као и њихова улога у имунитету, како урођеном тако и стеченом, што је обрађено у делу уџбеника лектини C–типа (*енг. CTLs – C-type lectins*). Иако је познато да рецептори за манозу имају више CRD-а C-типа лектина. Ови молекули на себи имају и део богат остацима цистеина који је CRD лектина R-типа, који за себе може да веже сулфоноване гликане као што су гликопротеини одређених жлезда (хормони), као и да их уклони из циркулације након извршене активности (слика 92.).



Слика 92. Структура рецептора за манозу који на себи има неколико CRD-а C-типа, али и CRD R-типа лектина

Хормони са гликопротеинском структуром су производи хипофизе или постељице (плаценте), и то су: лутеинизирајући хормон (ЛХ/LH или лутропин), фоликуло-стимулирајући хормон (ФСХ/FSH или фолитропин), тирео-стимулирајући хормон (ТСХ/TSH или тиреотропин) и хумани хорионски гонадотропин (hCG). Сви ови хормони су гликопротеинске структуре и у матрици имају минимум један остатак аспарагина који је гликозилован, то значи да спадају у гликопротеине са *N*-гликозидном везом (слика 93.).

$$\begin{array}{l}
 \text{O}_4\text{S-4GalNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-2Man}\alpha\text{1} \quad \diagdown \quad 6 \\
 \text{Man}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-Asn} \\
 \text{O}_4\text{S-4GalNAc}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-2Man}\alpha\text{1} \quad \diagup \quad 3
 \end{array}$$

$\text{NeuAc}\alpha 2\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}\alpha 1$ — 6 — $\text{Man}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-Asn}$
 $\text{NeuAc}\alpha 2\text{-3Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta 1\text{-2Man}\alpha 1$ — 3 —

NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1
 6
 Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn
 3
 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1

Сулфоновани хормони се много брже уклањају из циркулације у односу на хормоне који имају сијалинску киселину као терминалну резидуу на гликану. Оваквим структурама гликопротеинских хормона се објашњава зашто се на рецепторима за манозу налазе оба типа домена за угљенохидратно препознавање (и од С- и од R-типа лектина). Тако један молекул омогућава уклањање како сулфонованих тако и несулфонованих гликопротеина (ширег спектра гликопротеина) из циркулације.

142

гликозилтрансфераза. Примери су GalNAc-трансферазе које учествују у синтези гликопротеина са O-везаним гликанима, које у близини каталитичког места садрже CRD лектина R-типа. Овај домен препознаје остатак GalNAc везан за остатак серина или треонина и обележава где урадити наредну гликозилацију.

На крају, CRD лектина R-типа може да веже различите моносахаридне резидуе. Омогућава везивање и хормона којима је последња резидуа сулфонована галактоза, али и хормона са сијалинском киселином као последњим моносахаридом. Додатно, лектини R-типа могу и да регулишу различите енземе који врше гликозилују разноврсне моносахаридне резидуе, као што је био наведен пример са остатком GalNAc.

Наредне четири класе лектина (калнексин, и лектини M-, L- и P-типа) ће заједно бити објашњене у следећем делу под насловом улога лектина у кретању гликопротеина у ћелији и организму.

Улога лектина у кретању гликопротеина у ћелији и организму

У току биосинтезе N-везаних гликана долази до значајних промена у њиховој структури. Током миграције кроз органеле, од ендоплазматичног ретикулума до површине ћелијске мембране или до места где ће бити уграђени или имати своју биолошку улогу, долази до значајних промена које се дешавају под дејством четири преостале класе лектина. То су: калнексин, и лектини M-типа, L-типа, и P-типа. Тачно овим редоследом ови лектини и извршавају своје улоге и омогућавају кретање гликопротеина.

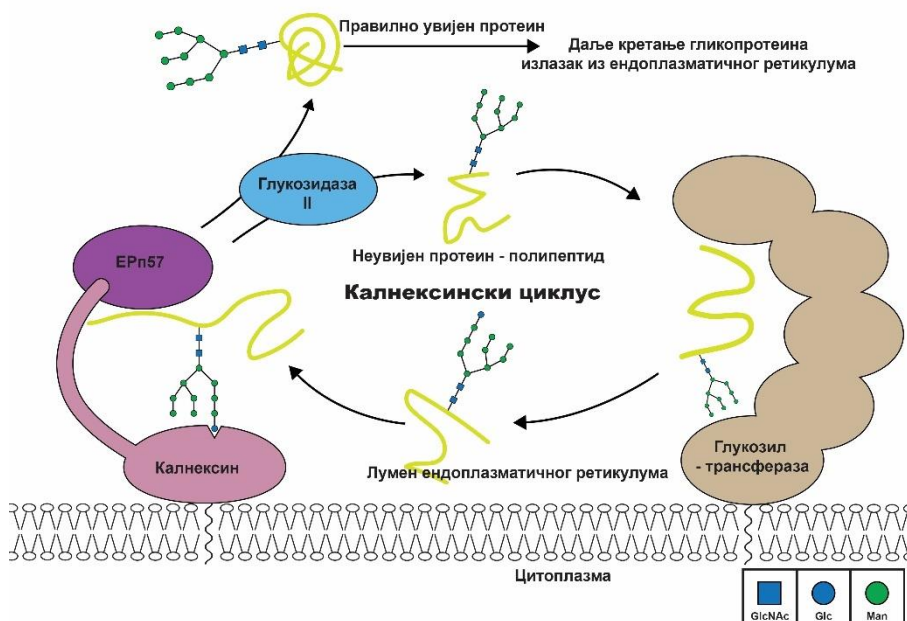
Калнексин/Калретикулин

Ова два протеина су почетни контролори квалитета новосинтетисаних гликопротеина у ендоплазматичном ретикулуму. После завршеног преноса олигосахарида на циљани полипептид, у лумену ендоплазматичног ретикулума, наредна измена у структури гликопротеина се односи на правилно увијање полипептидног ланца у протеин пре него што настави своје кретање кроз ћелијске органеле. Управо ово је задатак калнексина и/или калретикулина. Калнексин је мембрански протеин док је калретикулин слободан молекул у лумену ендоплазматичног ретикулума. Оба молекула могу да вежу гликополипептид који је богат манозом и има једну терминалну резидуу глукозе. Глукоза је једини моносахарид који може да се веже за калнексин и калретикулин. Калнексин и калретикулин ће омогућити правилно формирање тродимензионалне структуре и превести гликополипептид у гликопротеин. На тај начин ниједан неправилно увијени гликопротеин неће напустити ЕР.

Калнексин везује већину неформираних гликополипептида, док калретикулин везује само одабране. Ретки су гликополипептиди који се могу везати за оба ова лектина. Иако постоји, ова могућност се не дешава у истој фази биосинтетског процеса. Разлике у супстратима; врстама гликополипептида, такође могу диктирати за који лектин ће се везати. И место где се појављује сам супстрат јесте важно, да ли уз мембрану, те му је важнији калнексин (који је мембрански протеин) или унутар ЕР, па му више одговара калретикулин (који је слободан унутар лумена). Оно што им је заједничко је неопходно присуство јона калцијума за испуњавање улоге, односно правилно увијање протеинског дела, одакле и префикс „кал” у именима ових лектина.

Било који од ова два лектина ће увести гликополипептид у циклус (калнексински циклус или калретикулински циклус, у зависности од лектина), и то је обавезни део биосинтетског пута сваког новосинтетисаног гликопротеина (слика 94.). Први учесник у овим циклусима је ERp57/PDI (*енг. endoplasmic*

reticulum protein 57/protein disulphide isomerase, ERp57/PDI) који је у ствари припадник групе ензима изомераза. ERp57 гради комплекс са лектином (калнексин или калретикулин), након чега овај комплекс прихвата супстрат - неувиијени гликополипептид. Долази до правилног увијања полипептидног ланца и формирања гликопротеина. Продужава на следећег учесника у овом циклусу, ЕР-глюкозидазе II, која уклања терминални остатак глукозе преко којег је остварена веза између лектина и гликоконјугата. Правилни гликопротеин напушта овај циклус и креће се даље у биосинтетском путу. Уколико не дође до правилног увијања протеинског дела, и ако гликопротеин нема правилно формирану тродимензионалну структуру, остаје у поменутом циклусу где га преузима ензим UDP-глукоза: гликопротеин глюкозилтрансфераза (УГГТ) (енг. *UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase, UGGT*) која ће везати нове терминалне резидуе глукозе. Такав молекул ће поново бити повезан са комплексом калнексин-ERp57 и опет покушати да се правилно увије. Овај процес се може вишеструко понављати док не дође до правилног формирања тродимензионалне структуре гликопротеина. После неуспелих покушаја, гликополипептид може бити послат на деградацију због немогућности да се правилно увије (грешка у аминокиселинској секвенци или неки други недостатак у самој структури полипептидног ланца).



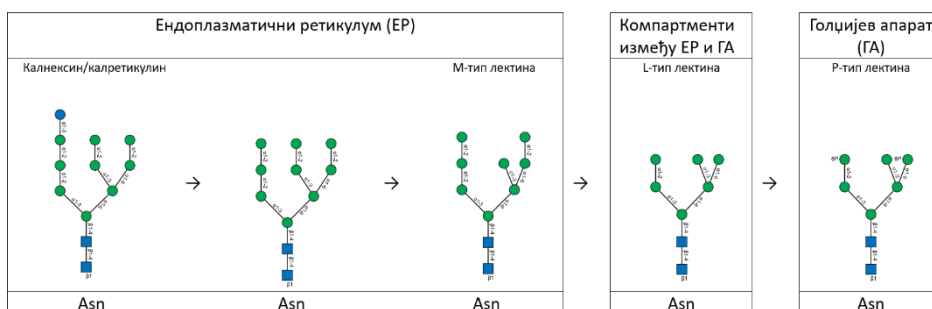
Слика 94. Калнексински циклус

Као и са калнексином, исти процес ће бити и са калретикулином, само цео комплекс неће бити повезан са мембраном ЕР, него ће бити слободан у лумену ендоплазматичног ретикулума. Тада се говори о калретикулинском циклусу.

Посебно је везивање гликополипептида за калнексин/калретикулин–ERp57 комплекс, односно како лектин зна да ли је протеинска структура правилно увијена или не? Везивање супстрата (гликополипептида) за комплекс ће се десити уколико је хидрофобни део полипептида слободан за интеракцију, а код правилно формираних гликопротеина тај део није слободан него је увијен у унутрашњости протеина. Овако, сви правилно увијени гликопротеини продужавају поред калнексин/калретикулин–ERp57 комплекса, а они који нису правилно увијени остварују интеракцију. Међутим, лектини имају специфичне интеракције са моносахаридима, тј. гликанским делом, те се намеће питање како хидрофобни део протеина може имати улогу у везивању. Везивање гликополипептида се дешава на два

места, и то гликанским делом (терминалним остатком глюкозе) за калнексин/калретикулин и хидрофобним делом протеинског агликона за ERp57. Како је омогућено структурним карактеристикама калнексина и калретикулина – ова два лектина имају продужени део на који се везује ERp57 и цео комплекс може да прихвати неувијени гликополипептид (слика 94.).

Након уклањања Glc остатка, наредни корак у синтези *N*-гликана је уклањање остатка манозе и то α 1-2 остатка са средње гране, Man-9 резидуе (слика 95.). Ово чини ендоплазматична ретикулум манозидаза I (енг. *ER-Man I*).



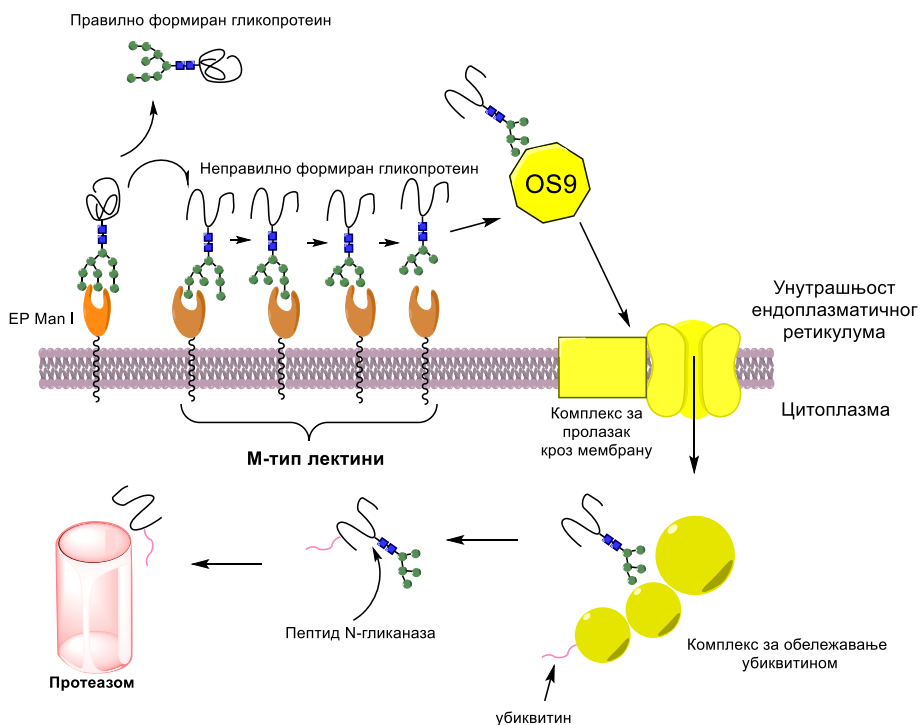
Слика 95. Кретање новосинтетизованих гликопротеина кроз ћелијске органеле и места учешћа четири типа лектина у модификацијама поменутих гликопротеина

Већина протеина без проблема прође фазу уклањања средишњег остатка манозе и продужава даље у Голџијев апарат где ће дејством одговарајућих манозидаза бити уклоњен остатак сувишних маноза и даље модификован гликански део. Одређен број гликопротеина доживи неку неправилност у структури и мора бити уклоњен. Процес деградације неправилних гликопротеина обухвата деловање система који се назива деградација протеина повезана са ендоплазматичним ретикулумом (енг. *endoplasmic reticulum – associated protein degradation - ERAD*). Овај процес укључује излазак неправилних гликопротеина из ендоплазматичног ретикулума у цитоплазму и разградњу протеинског дела

деловањем протеазома. Важну улогу у ERAD процесу играју лектини М-типа.

М-тип лектина

Главна улога лектина М-типа је припрема неправилно формираних гликопротеина за деградацију. Ови лектини омогућавају уклањање три резидуе манозе са гликана неправилних гликопротеина, који касније бивају препознати од осталих учесника ERAD-а и доводе до пребацивања ових гликопротеина у цитоплазму и њихове разградње. Грешке у синтези протеина су честе приликом болести, оксидативног стреса, температурног шока и сличних стања. ERAD чини неколико учесника: први је М-тип лектина, потом OS-9 (омогућава везивање гликопротеина након уклањања три остатка манозе), затим протеински комплекс у мембрани ендоплазматичног ретикулума који омогућава пролазак неправилног гликопротеина у цитоплазму, комплекс у цитоплазми који обележава неправилни гликопротеин убиквитином, пептид-*N*-гликаназа (гликопептидаза, ензим који раскида везу између *N*-гликана и протеинског агликона) и на крају - протеазом (разграђује протеин обележен убиквитином). На слици 96. приказани су редом сви учесници ERAD-а и како неправилно формиран гликопротеин пролази кроз фазе обележавања и деградације.



Слика 96. *ERAD* – систем за уклањање неправилно формираних гликопротеина

Након обележавања и деградације, од неправилно формираног гликопротеина остају моносахариди и аминокиселине које се поново могу искористити за синтезу новог молекула гликопротеина.

Наредни корак у биосинтетском путу правилно формираних гликопротеина подразумева пребацивање гликопротеина из ендоплазматичног ретикулума у Голџијев апарат. У овом процесу транспорта важну улогу имају лектини L-типа.

L-тип лектина

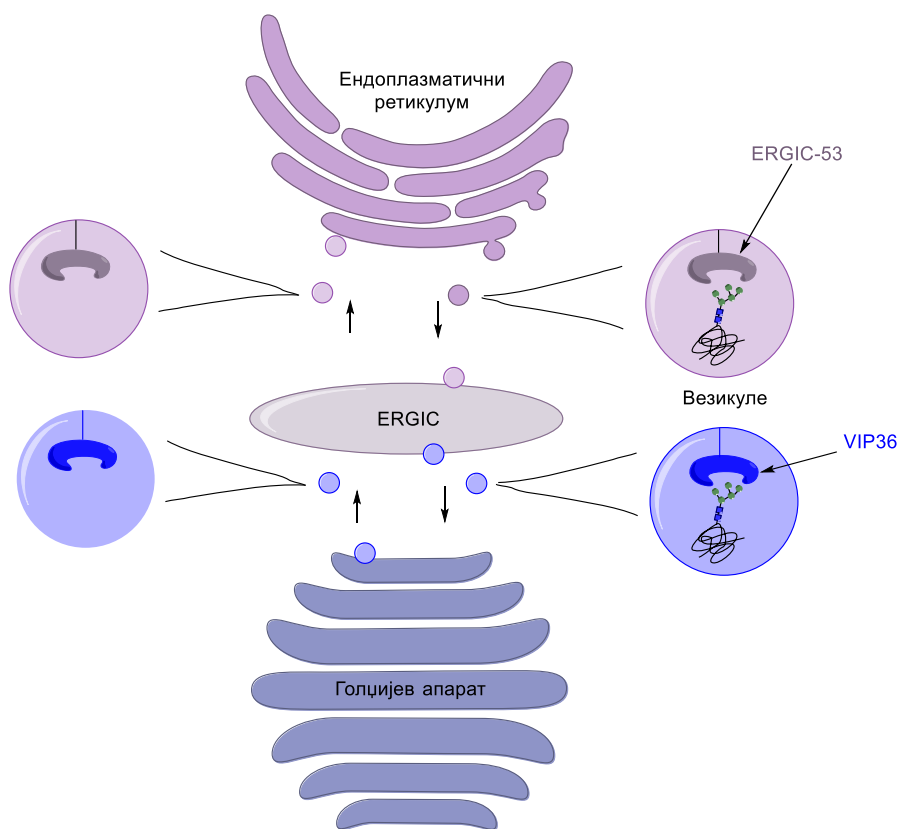
Транспорт новоформираних гликопротеина из ЕР у ГА омогућавају лектини који имају L-тип домена. Овај тип лектина везује гликане богате манозом, што је у складу са биосинтетским путем, пошто из ендоплазматичног ретикулума излазе управо овакви гликопротеини, а финална измена

гликанског дела и декорисање другим моносахаридима се дешава у Голџијевом апарату. Најзначајнији лектини за транспорт гликопротеина су ERGIC-53, VIP36 и VIPL. То су мембрански протеини који омогућавају везивање гликопротеина и формирање везикула које преносе гликопротеине прво из ендоплазматичног ретикулума у средишњи компартмент који се налази између ове две органеле (*енг. ER-Golgi intermediate compartment- ERGIC*), а потом из тог компартмента у Голџијев апарат (слика 97). Ови лектини за своје интеракције са гликанима захтевају калцијумове јоне.

ERGIC-53 или LMAN₁ (*енг. ER-Golgi intermediate compartment protein of 53 kDa* или *lectin mannose-binding 1*) преноси гликопротеине из ендоплазматичног ретикулума у средишњи компартмент (ERGIC).

VIP36 (*енг. vesicular integral membrane protein of 36 kDa*) преноси гликопротеине из средишњег компартмента (ERGIC) у Голџијев апарат.

VIPL (*енг. VIP36 like protein*) преноси гликопротеине из ендоплазматичног ретикулума, али само оне гликопротеине којима нису уклоњене одређене резидуе манозе, тј. преузима гликопротеин одмах након завршетка деловања калнексина/калретикулина.



Слика 97. Шематски приказ транспорта новосинтетизованих гликопротеина из ендоплазматичног ретикулума у Голџијев апарат лектинама L-типа

L-тип лектина омогућава непрестано кретање гликопротеина у току биосинтетског пута. Након додатка осталих моносахарида у ГА, биосинтеза гликопротеина са *N*-везаним гликанима је завршена и могу напустити ГА и наставити кретање до места где ће имати функцију (ћелијска мембрана, друге органеле, цитоплазма и др.).

P-тип лектина

Последњи тип лектина који има улогу у овом биосинтетском кретању су лектини *P*-типа. Ови лектини везују фосфорилловани остатак манозе и то манозу-6-фосфат; због чега се још називају и M6P рецептори (енг. *mannose-6-*

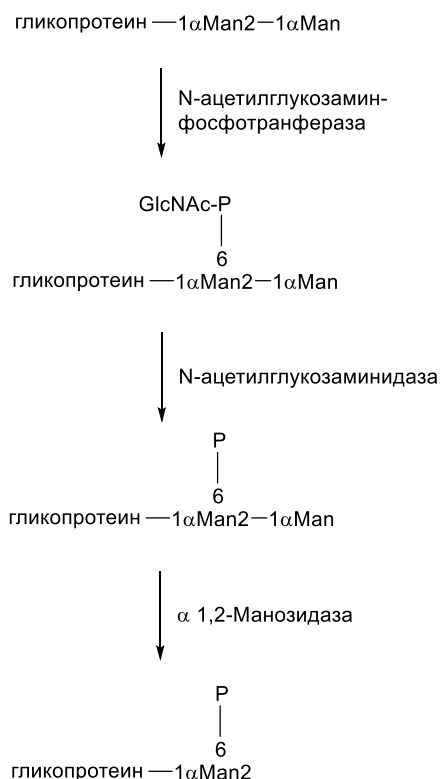
phosphate receptors). Прву групу чине лектини независни од катјона, или лектини за чије везивање није неопходно присуство јона, и означавају се CI-MPR (*енг. cation-independent mannose-6-phosphate receptor*). Друга група лектина Р-типа су ти којима је неопходно присуство катјона да би дошло до везивања одговарајућег гликана, и означавају се CD-MPR (*енг. cation-dependent mannose-6-phosphate receptor*). Оба типа рецептора се снажно везују за остатак манозе-6-фосфата, а далеко слабијим интензитетом и за GlcNAc-Man6P. Најчешће се као катјон за CD-MPR везује или јон калцијума или мангана. Оба типа лектина су мембрански протеини који лако доводе до формирања везикула за транспорт.

Да би се разумео значај ових лектина, неопходно је навести гликопротеине који се обележавају маноза-6-фосфатом.

Најзначајнија група таквих гликопротеина су ензими хидролазе, које је неопходно транспортовати у лизозоме. Биосинтеза хидролаза се одвија у рибозомима и ендоплазматичном ретикулуму, а потом у Голџијевом апарату, да би у завршном делу ГА била додата једна или више резидуа маноза-6-фосфата. Овакво обележавање изазива специфично везивање за рецепторе Р-типа лектина који се потом путем везикула преносе до ендозома, где се због киселе средине ослобађају хидролазе. Из ендозома ензими ће се преместити у лизозом и чувати до тренутка када је потребно да се разграде непотребне супстанце. Важно је да ензими типа хидролаза не доспеју на погрешно место где би разградили ћелијске компоненте, као што је битно и да други ензими и протеини не буду обележени маноза-6-фосфатом, пошто би били транспортовани до ендозома и лизозома где би дошло до њихове разградње.

Неопходна је изразита селективност код рецептора који треба да прихвате ове ензиме са маноза-6-фосфатом. Грешке доводе до одношења других ензима у лизозом где се одмах разграде, као и до одношења хидролаза на погрешно место где изазивају непотребну хидролизу протеина.

Процес фосфорилације остатка манозе је приказан на слици 98. Прво долази до везивања *N*-ацетилглюкозамин-фосфата на претпоследњи остатак манозе, затим ензим уклања остатак *N*-ацетилглюкозамина и потом и последњи остатак манозе. Као крајњи производ на крају гликана је присутна маноза-6-фосфат.



Слика 98. Фосфорилација остатка манозе

Изразито специфично везивање између остатка маноза-6-фосфата и CR домена Р-типа лектина се остварује формирањем водоничних веза где учествују хидроксилне групе манозе у положајевима 2, 3, и 4, што објашњава изузетно селективно везивно место само за остатак манозе, а не и за друге моносахаридне јединице.

Болест *I*-ћелија (енг. *I-cell disease*) настаје као последица недовољне активности првог ензима у каскади приказаној на

слици 98. Као последица није могуће да се маноза-6-фосфатом обележе одговарајуће хидролазе, због чега се накупљају супстанце које није могуће разградити, а све као последица недостатка хидролаза у лизозомима.

Поглавље 13 Гликобиологија других живих бића

Свако живо биће има одређене специфичне карактеристике које се приписују само тој врсти, тако се разликују и у структури и функцији гликома, односно гликоконјугата. Пошто је овај уџбеник пре свега намењен разумевању хуманог гликома, у овом поглављу ће бити наведене само неке од карактеристика гликома других живих бића које имају везе са хуманим гликомом, доводе до неких болести или се могу примењивати у истраживањима и за боље разумевање и откривање структуре и функције хуманих гликоконјугата.

Од значајних група живих бића биће споменуте основне карактеристике биљних, бактеријских, вирусних, паразитских и гљивичних гликоконјугата.

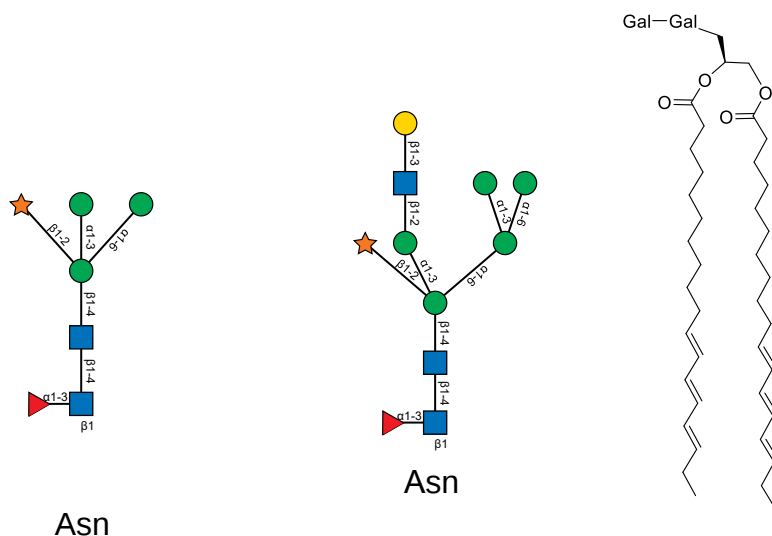
Гликобиологија биљака

Биљке су богате угљенохидратним структурама. Тиме су биљне врсте богате и различитим гликоконјугатима и лектинима. Поједине структуре су детаљно изучене и широко се примењују, али треба поменути значај угљених хидрата у изградњи биљака. Тако је целулоза најзаступљенији полисахарид на планети Земљи, а ћелијски зид биљака има комплексну структуру и његов изглед је описан у поглављу 10 (слика 74.). Треба навести и слободне олигосахариде који имају сигналну улогу и називају се **олигосахарини**. Пример олигосахарина који регулишу развој имунолошке одбране су олигогалактурониди (α 1-4 олигомери галактуронске киселине) који се ослобађају из полисахарида ћелијског зида биљке након повреде или инфекције. Олигосахарини се могу ослободити како у току механичке повреде, када долази до активирања ензима који их ослобађају из ћелијског зида, тако и услед инфекција, где може доћи до ослобађања ензима (полигалактуроназе) који омогућавају настајање ових сигналних молекула. Олигосахарине биљке користе и за комуникацију са осталим врстама. Позната је симбиоза између

појединих легуминоза и бактерија које везују азот (азофиксатора) која се одвија баш уз помоћ поменутих молекула.

Гликани гликоконјугата биљака имају своје специфичности које варирају у зависности од биљне врсте. Једна од уопштених структурних карактеристика, која није присутна код осталих живих бића, јесте заступљеност остатака ксилозе у гликанима која је у биљним врстама веома изражена у односу на друга жива бића.

На слици 99. приказане су структуре одабраних гликоконјугата присутних само код биљака.

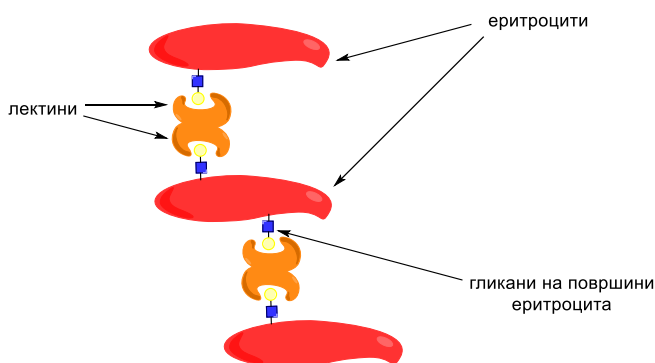


Слика 99. Често заступљени биљни гликоконјугати (лево и у средини структуре гликопротеина, десно структура гликолипида)

Поред приказаних структура присутне су и бројне друге модификоване структуре гликоконјугата у биљкама.

Изузетно значајне и истражене су структуре биљних лектина које се користе у научноистраживачке сврхе. Биљни лектини, као и други већ поменути лектини, имају специфичну карактеристику да се селективно везују за одређене угљенохидратне компоненте. За биљне лектине се зна дуже него за остале лектине и управо то је и разлог њихове толико распотраћене употребе и истражене структуре и функције.

Лектини се у биљкама могу пронаћи у скоро свим деловима биљке. Али су најинтересантнији лектини пронађени у семенкама и плодовима, за које се сматра да им је главна улога заштита биљака од предатора и штеточина. Најчешће се биљни лектини везују за остатке манозе или галактозе, где приликом везивања због мултивалентности могу да стварају кластере. И за њихову активност некада је неопходно присуство једног или више одређених металних јона (најчешће калцијума, магнезијума, мангана). Треба истаћи и да једна биљка може синтетисати више различитих лектина. За проверу ефикасности лектина често се користи тест хемаглутинације. Овај тест се заснива на умрежавању између више молекула лектина и структура са гликанима на површни, што резултује таложењем. Један од првих оваквих тестова је тест таложења еритроцита (слика 100.).



Слика 100. Тест хемаглутинације

Биљни лектини се данас у лабораторијама интензивно користе и стално се откривају неке нове могућности употребе. Неке од познатих и распотраћених употреба су у

афинитетној хроматографији за раздвајање угљених хидрата и гликоконјугата од осталих молекула, затим као дијагностички реагенси за детекцију одређених гликопротеина у ткиву, нпр. реагенс за одређивање крвне групе, поменута хемаглутинација се користи у тестовима за детекцију различитих патогена типа вируса и сл.

Биљни лектини могу бити и отровни за људе, као на пример лектини семена биљке рицинус (*Ricinus communis*). Овај токсин назива се ричин и састоји се из две подјединице, А и Б. Подјединица Б служи за повезивање са остацима гликана (најчешће галактозом на површини ентероцита) и процесом ендоцитозе бива увучена унутар ћелије, где се по доласку у ендоплазматични ретикулум раздваја од друге градивне подјединице. Подјединица А је та која изазива токсичност, тако што ензимском активношћу оштећује рибозоме и спречава биосинтезу протеина, што доводи до смрти ћелије. Сви делови биљке рицинус имају токсин у себи, али је његова концентрација највећа у семену.

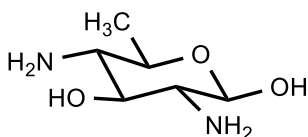
Гликобиологија бактерија

Бактерије у својој грађи имају присутне бројне угљенохидратне структуре. У зависности која врста бактерије се посматра, могу се наћи бројне сличности, али и велике разлике поготово у гликанима који у заступљени пре свега на површини бактерије али и на унутрашњим структурама. Гликозилација код прокариота је позната одавно, али се све више доводи у везу са гликозилацијом код еукариота за шта постоје јасни докази који указују на повезаност у биосинтетским путевима.

Најинтересантнији гликоконјугати су они на површини бактеријске ћелије који омогућавају инфекцију хуманих ћелија и омогућавају „варање” имуног система човека.

Што се тиче изгледа гликана на гликоконјугатима бактерија, могу бити врло разноврсни, али им је улога једина да заштите бактерију од неповољних утицаја и омогуће инфекцију ћелије неког другог организма.

Гликанске структуре бактерија имају мноштво познатих моносахарида који су присутни и код других царстава. Као пример се могу видети гликани на гликолипидима бактерија *Escherichia coli* и *Mycobacterium tuberculosis* дати на слици 81. У структурама гликана гликоконјугата бактерија могу се уочити и неке друге, не тако учестале, моносахаридне јединице као што су: *N*-ацетилмураминска киселина, арабиноза, *N*-ацетилманозамин и један моносахарид који је карактеристичан само за одабране бактерије бацилозамин, који може бити и ацетилован на једној или обе амино-групе (слика 101).



Бацилозамин
Bac

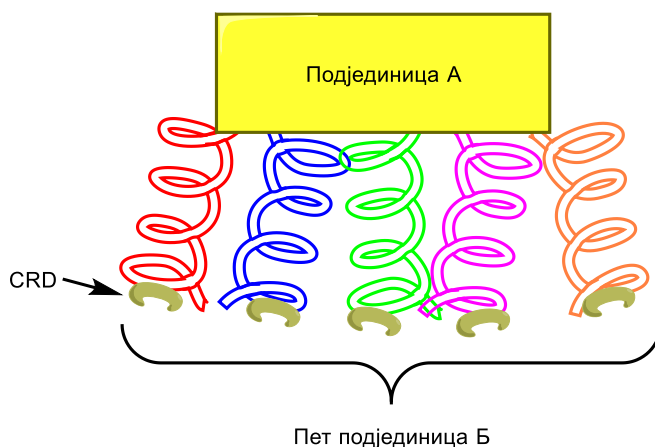
Слика 101. Структура бацилозамина (2,4-диамино-2,4,6-тридеокси-*D*-глукоза, *Bac*)

Посебни су и пептидогликани који изграђују ћелијски зид бактерије, и омогућавају бактеријској ћелији да преживи изразито неповољне спољне утицаје и одбрани се од имуних ћелија других организама. Интересанти су за фармацеутску индустрију зато што су мета деловања β -лактамских антибиотика (нпр. пеницилин).

Треба споменути и лектине бактерија који омогућавају специфичне интеракције са гликанима на површини ћелија сисара и након првог везивања доводе до инфекције циљне ћелије. Лектини бактеријама практично омогућавају лакши улазак у ћелију домаћина. Пример је *Escherichia coli* која на површини трепљи, које су присутне на ћелијској мембрани, има лектине који се везују за гликолипиде на површини ћелије. До инфекције не долази ако су то ћелије црева зато што је ова бактерија нормалан становник црева, али ако дође

до везивања за гликолипиде на ћелијама уринарног тракта онда ће доћи до инфекције.

Бактеријски лектини могу бити токсини и доводити до озбиљних тровања. Међу њима су познати отрови типа АБ₅. То су лектинске структуре изграђене из шест подјединица, где подјединица А изазива токсичност (начин деловања варира бактерије). Пет подјединица Б су одговорне за остваривање везивања за гликане гликоконјугата домаћинске ћелије (слика 102). Код АБ₅ токсина бактерија, као и код токсина биљака који имају сличну структуру, подјединица Б служи за повезивање са гликанима на површини ћелије. Комплекс ендоцитозом доспева у ћелију, где се подјединице раздвајају и подјединица А изазива токсични ефекат. Овакав, отрован, лектин производи бактерије *Vibrio cholerae*, одабране сојеve *Escherichia coli*, *Bordetella pertussis*, *Shigella dysenteriae* и друге.



Слика 102. Шематски приказ структуре отровних лектина бактерија типа АБ₅

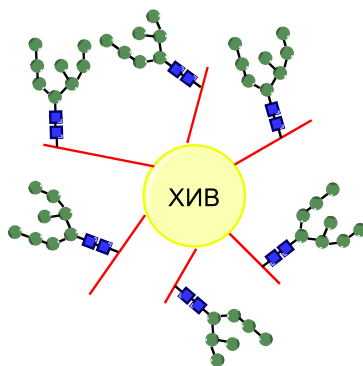
Токсини преко подјединице А изазивају различите ефекте. На пример отрови колере, дизентерије и ентеротоксин и веротоксин (*Escherichia coli*) активирају ензимску каскаду која повећава пермеабилност мембране ентероцита и доводи до губитка течности из ћелија црева што се манифестује појавом дијареје.

Гликобиологија вируса

Вируси, слично бактеријама, на површини имају различите гликане (гликоконјугате) или лектине који омогућавају везивање за циљне ћелије домаћина, да би омогућили себи улазак у ћелију и довели до инфекције.

За велики број вируса се тачно зна на који начин остварују интеракцију и како доводе до инфекције. Ипак поједини вируси, због изузетно брзог размножавања имају и велики број генетских мутација, па се настале промене могу огледати и у структури гликана, што утиче и на начин повезивања.

Што се тиче неке специјалне структурне карактеристике повезане искључиво са вирусима, зна се да одређен број вируса на својој површини има гликопротеине богате манозом. Као пример се може посматрати вирус ХИВ-а (енг. *human immunodeficiency virus*) који на својој површини има два типа гликопротеина, gp41 и gp120. Гликопротеин 120 (gp120) има мноштво остатака манозе у структури (слика 103.).



Слика 103. Шематски приказ gp120 на површини вируса ХИВ-а

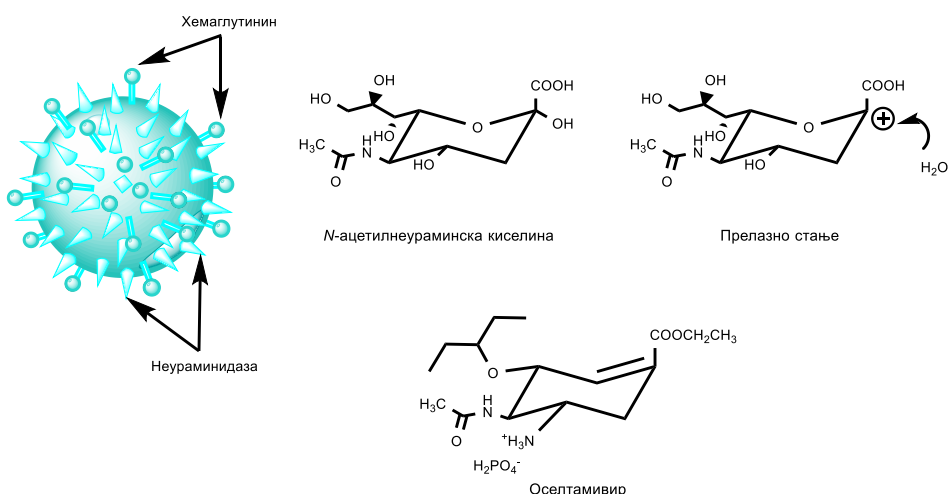
И најновији вирус SARS-CoV-2, узрочник ковид-19, на својој површини има гликопротеин познатији као S-протеин (енг. *spike protein*), одговоран за повезивање са ћелијама домаћина.

Поред ових вируса који изазивају инфекцију преко својих гликоконјугата, постоје и вируси који инфекцију, тј. повезивање са ћелијом домаћина врше преко својих површинских лектина, који интереагују са гликанима гликоконјугата на површини ћелија домаћина. Одличан пример је вирус грипа (*енг. influenza virus*), који на површини има два значајна молекула – хемаглутинин и ензим неураминидаза (субтипови вируса грипа означавају се према типу ова два молекула, нпр. H5N1) (слика 104). Хемаглутинин омогућава везивање за остатке сијалинске киселине који су често заступљени на површини ендотелних ћелија респираторног тракта, узрокујући инфекцију ћелије домаћина. Неураминидаза, служи за ослобађање нових вируса из инфициране ћелије.

Приликом инфекције, вирус грипа прилази ћелији домаћина и својим хемаглутинином остварује везу са ћелијом преко остатака сијалинске киселине. Цео вирус ендцитозом доспева унутар ћелије. Размножавају се вируси, након чега је потребно да нови вируси напусте заражену ћелију. Пошто на ћелији има доста остатака сијалинске киселине, постоји могућност да се новостворени вирус поново повеже са већ инфицираном ћелијом. Неураминидазе ће уклањати остатке сијалинске киселине и онемогућити поновно повезивање са већ зараженом ћелијом. Тако се омогућава удаљавање нових вируса од инфициране ћелије, као и довођење до инфекције и других ћелија, односно ширење инфекције.

Везивно место хемаглутиниона онемогућава да се вирус преноси између различитих врста. Хумани вирус грипа лакше се везује за гликане са NeuAcα2-6 на нередукуюћем крају, који се налазе на површини епителних ћелија горних дисајних путева код људи, док се птичји грип лакше везује за гликане са NeuAcα2-3 на нередукуюћем крају, који се налазе на површини ћелија дигестивног тракта код птица. Код свиња се у дисајним путевима могу наћи обе варијанте терминалног NeuAc, и α2-6 и α2-3, па је зато та животиња подложна инфекцијама обема субтиповима, и постоји могућност преноса и стварања новог комбинованог вируса.

Процес који укључује ензим неураминидазу је послужио медицинским хемичарима да осмисле структуру која ће се користити као лек за инфекцију вирусом грипа. За водећи молекул је одабрана сијалинска киселина, илито прелазно стање овог молекула приликом ензимске реакције неураминидазе која је циљни молекул. На овај начин је добијен лек оселтамивир (познатији под фармацеутским именом тамифлу) који се користи за третман оболелих од грипа (слика 104).



Слика 104. Шематски приказ површине вируса грипа (лево), структуре сијалинске киселине, прелазног стања сијалинске киселине, и лека оселтамивира (десно)

Гликобиологија паразита

Паразити су сви они организми који користе други организам за сопствене потребе. Паразитске инфекције се генерално деле на оне које су изазване протозоама (*Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma* и др.) и такве које су изазване црвима (*Schistosoma mansoni*, *Ascaris lumbricoides*, *Taenia solium* и др.). Велики број набројаних паразитских организама користи гликоконјугате и лектине за остваривање своје патогености. Гликани паразитских гликоконјугата имају велике сличности са гликанима гликоконјугата домаћина, а све са

Гликопротеини	Гликолипид
---------------	------------



Лектини паразита су, такође, испољени на површини ћелија паразита где омогућавају боље повезивање са ћелијом домаћина и утичу на патогеност паразитских организама. Неки од примера су протеини ЕВА-175, ЕВА-140 и ЕВА-180 протозое *Plasmodium falciparum*, Gal/GalNAc лектин амебе *Entamoeba histolytica*, галектин нематоде *Haemonchus contortus*, и бројни други.

Гљиве, као посебно царство, представљају структурно свет за себе. Тиме су и гликани њихових гликоконјугата веома

различити од осталих живих бића. Главна матрична карактеристика је присуство великог броја остатака манозе у гликоконјугатима. Пример је структура гликопротеина гљивице *Candida albicans* приказана на слици 81.

Гљиве су такође богате и лектинима, који имају улогу у расту и развоју гљива, остваривању симбиозе са другим организмима и одбрани гљива од токсичних ефеката. Код гљивица које могу довести до болести људи, животиња и биљака лектини могу имати улогу и у почетним фазама патогености.

Лектини гљива као и лектини биљака представљају интересно подручје за изучавање и доступан материјал за бројна биохемијска истраживања.

Поглавље 14 Гликобиологија у физиолошким и патолошким стањима

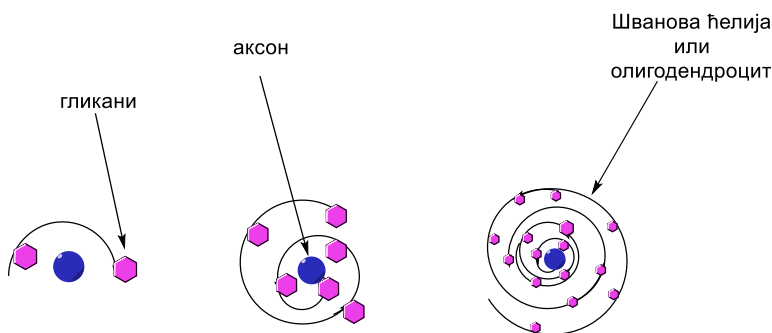
Гликани у гликоконјугатима су веома динамичне структуре. Њихова појава као и структура може се мењати у зависности од стања ћелије. Ове измене су могуће и при физиолошким односно нормалним стањима, а посебно су изражене при патолошким или стањима изазваним болестима.

Физиолошке промене гликана дешавају се и током развоја али и свакодневно, најчешће су на ендотелним ћелијама и омогућавају да наше ћелије и ткива нормално функционишу. Постоје и оне промене које се дешавају периодично или спорадично, попут измене гликана на површини ћелија репродуктивног тракта жене узроковане хормонским променама у току менструалног циклуса или у току трудноће.

Значај патолошких промена гликана је много интересантнији за истраживање зато што омогућава да се открију узроци болести, даје могућност брже и лакше детекције и лоцирања поремећаја, али може се утицати и на начине лечења.

У овом поглављу ће бити приказано само неколико примера промене гликана у физиолошким и патолошким стањима, будући да је то изузетно обиман део гликобиологије, али и област чији се развој и напредак тек очекују.

Пример значаја гликоконјугата у физиолошким стањима се може посматрати кроз **значај гликолипида у нервном ткиву**. Гликолипиди обухватају 25% липида који изграђују мијелин. Мијелин јесте ткиво које прекрива аксоне нервних ћелија и изграђен је од Шванових ћелија (*енг. Schwann cells*, у периферном нервном систему) и олигодендроцита (у централном нервном систему). Улоге гликолипида у мијелину су вишеструке, а једна се огледа у одржавању растојања, пошто се гликолипиди налазе између слојева мијелина (слика 106.) и, доводе до стабилизације структуре, али такође су и специфични маркери за препознавање.



Пресек мијелинизованог аксона

Слика 106. Увијање Шванове ћелије или олигодендроцита око аксона. Између слојева се налазе гликани гликолипида

Већина гликана гликолипида су богати остацима сијалинске киселине, што је главна структурна карактеристика ових гликоконјугата. Присуство ових гликолипида је изузетно значајно за развој нервног система, као што је доказано истраживањима на генетски модификованим мишевима. Притом је откривено да, већина поремећаја односно недостатака ензима неопходних за биосинтезу гликолипида доводи до смртог исхода већ у ембрионалном периоду развоја или до тешких неуролошких поремећаја тек рођених мишева.

Значај гликоконјугата у току физиолошких промена се може посматрати и кроз сазревање одређених крвних елемената. Гликоконјугати су неопходни за правилну **диференцијацију и сазревање Т-лимфоцита**. Сазревање се дешава у грудној жлезди (тимусу). Селекција бива када се на О-везане гликане који на свом крају имају дисахарид -GalNAc-Gal- додаје одговарајући моносахарид. Прва могућност је да се остатак GlcNAc веже на остатак GalNAc, што је знак да овај лимфоцит није сазрео и на гликан ће бити додат још један део да би покренуо апоптозу деловањем галектина. Али ако се као последњи остатак на гликан уместо GlcNAc дода сијалинска киселина, али на остатак Gal, а не на остатак GalNAc,

лимфоцит ће бити препознат као сазрео и послат на даље активности.

Овакви процеси се дешавају у нашем организму и током раста и развоја, али и кроз свакодневни живот у одраслом добу. Некада се процеси интензивирају или успоре у зависности од потреба и стања нашег организма.

Промене у гликанима код патолошких стања су ипак далеко интересантије за истраживање, а врло често и значајно различите у односу на промене у физиолошким стањима. Велик број болести настаје услед генетских мутација које се огледају у промени структуре па и функције гликоконјугата. Некада су измене у самом протеинском делу гликопротеина, али врло често и као последица мутације гена неке гликозилтрансферазе или гликозидазе, што се огледа у оријентацији гликана датог гликоконјугата.

Генетски поремећаји повезани са гликозилацијом могу се поделити у две категорије:

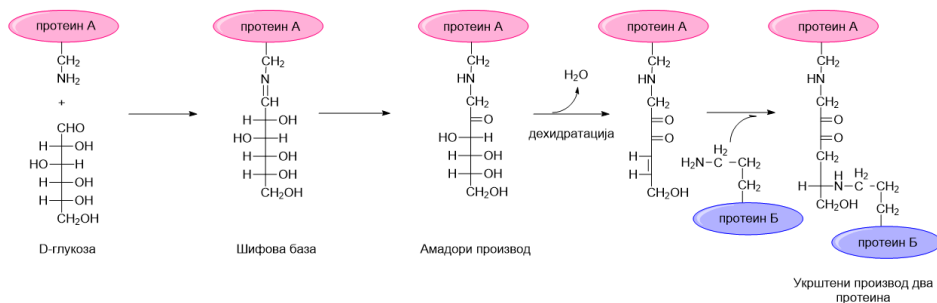
- Недовољна количина гликоконјугата, али је структура адекватна;
- Довољна количина гликоконјугата, али гликански део није правилно формиран (недовољно комплексан).

Први тип поремећаја углавном настаје као последица недовољне количине долихолских прекурсора, док се други тип поремећаја јавља услед недостатка једног или више ензима у каснијим фазама биосинтезе гликоконјугата.

Није само недостатак ензима узрок настајања болести. До болести некад доводи и прекомерна активност ензима. Пример је **смањена количина Вон Вилебрандовог фактора коагулације** (енг. *Von Willebrand factor*), неопходног за иницирање тромбоцитне каскаде. Низак ниво овог фактора продужава крварења. Код ове болести присутна је мутација на гену одговорном за GalNAc-трансферазу. Појављују се гликопротеини на површини ендотелних ћелија који у структури имају вишак резидуу GalNAc на крајевима. То

резултира уклањањем ових гликопротеина дејством асијалогликопротеина и на тај начин се у серуму оболелих особа јавља мала концентрација Вон Вилебрандовог фактора правилне структуре. Ова мутација ствара поремећаје у структурама других гликопротеина, али се главни патолошки утицај огледа у поремећају коагулације.

Хемијска гликација је процес везивања угљених хидрата за протеине без класичног биосинтетског пута, и терминологички се често меша са ензимском гликозилацијом тј. гликовањем. До гликације долази услед високе концентрације глукозе, као што је код неконтролисане шећерне болести - *diabetes mellitus*. У том случају се догађа реакција између протеина крвне плазме који имају дуг полуживот и ацикличног облика глукозе. Везивање се дешава између амино-групе остатка лизина и алдехидне групе глукозе, при чему настаје Шифова база (енг. *Schiff base*), потом Амадори производ (енг. *Amadori product*) који подлеже дехидратацији, а затим долази до унакрсне реакције где се повезују два протеина (слика 107.). Овакви производи оштећују бубрег, сочива ока, крвне судове.



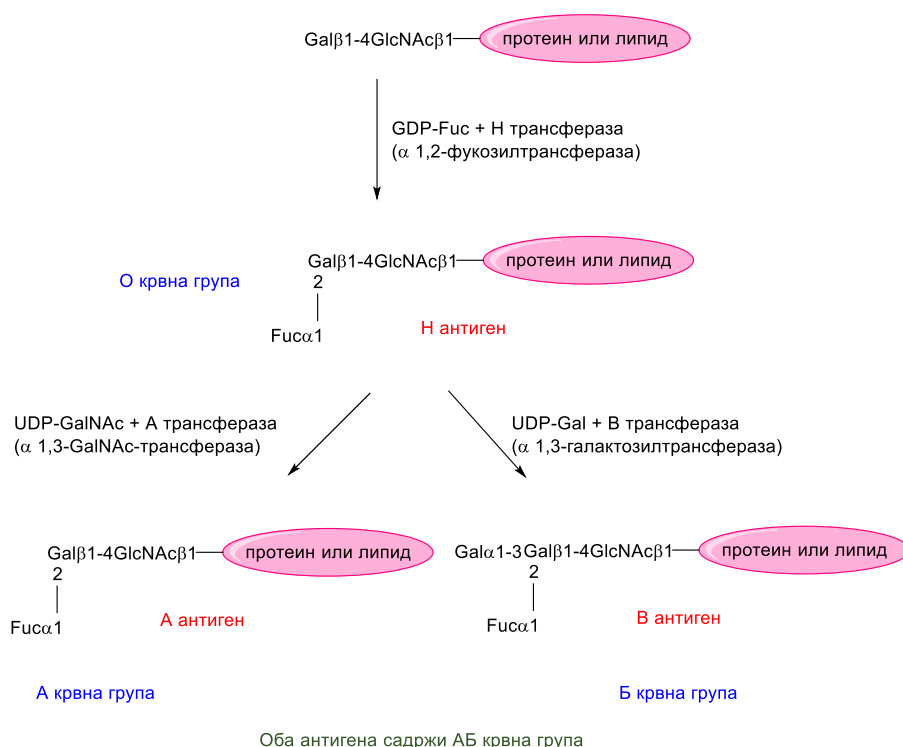
Слика 107. Хемијска гликација води до формирања унакрсних протеина који су штетни по организам

Као честе последице шећерне болести се наводе оштећења вида, много лоша периферна циркулација која доводи до слабог имунитета и честих инфекција које се могу завршити неопходном ампутацијом, оштећења бубрега и др. Већина ових последица је изазвана неконтролисаном концентрацијом

глюкозе у крви и хемијском гликацијом где настали производи оштећују ткива и воде ка овим симптомима.

Имуни систем људи има развијена антитела на угљене хидрате. Најпознатији систем који се заснива на основу антитела на угљене хидрате је **АБО систем крвних група**. Приликом интеракције хуманог организма са различитом крвном групом активира се имуно систем, односно повезују се антитела за гликане који су присутни на ћелијама друге крвне групе, што доводи до системске алергијске реакције где се организам бори да уништи еритроците погрешне крвне групе (посматра их као страна тела). Гликани на површини крвних елемената се понашају као антигени за које се везују антитела, а како је ово изузетно специфична реакција грешке нису могуће. Гликани најпознатијег система крвих група (АБО систем) су приказани на слици 108.

Антитела која су специфична за угљене хидрате су толико прецизно конструисана да праве јасну и непогрешиву разлику између гликана А и Б крвне групе иако је у питању структурно разлика само у једној функционалној групи. Код А крвне групе је резидуа GalNAc присутна на крају гликана, док је код Б крвне групе на крају гликана присутан остатак Gal. Ипак, уколико би крв особе једне од ових крвних група била дата особи са другом крвном групом дошло би до моменталне имунолошке реакције организма.



Слика 108. Гликани гликоконјугата АБО система крвих група

Овакав вид одбране организма се не дешава само приликом трансфузије погрешном крвном групом, него и контактом хуманог организма са било којим страним **угљенохидратним антигеном**. Угљени хидрати као антигени могу бити присутни и у храни (биљке, МО, гљиве и сл.) али због проласка кроз дигестивни тракт углавном бивају разграђени. Најизраженија имунолошка реакција је приликом мешања, убризгавања и удисања гликана страних организама (примери: трансплантација органа између људи или са животиње на човека, ујед инсекта и сл).

Гликозилација код туморских ћелија је нешто што захтева посебну пажњу са аспекта гликобиологије. Туморске ћелије настају од нормалних хуманих ћелија, али се приликом те трансформације сет гликана на површини ћелије драстично мења. Концептуално, не појављује се ниједан необичан моносахарид у структури гликана гликоконјугата туморских

ћелија. Ипак, постоје неке промене које се могу сматрати да су у вези са детекцијом тумора. Код туморских гликана често се, због повећане активности ензима GlcNAc-трансферазе V (која додаје нову грану на N-гликане), појављују гликани са великим бројем грана (антена). Њихова заступљеност је знатно мања код нормалних ћелија. Након бројних истраживања установљено је и да присуство већих количина остатака сијалинске киселине у гликанима туморских ћелија поспешује метастазирање. У процесу преношења туморских ћелија са једног на други орган (формирање метастаза), важну улогу играју и гликани и лектини пошто омогућавају специфичне интеракције и везивање тих првих туморских ћелија за здрава ткива где ће се наставити њихов раст (метастаза).

Истраживања гликоконјугата тумора и поређење са здравим ћелијама се ради из три основна разлога:

- Да се објасни процес настајања тумора и установе разлози настанка;
- Да се открију тачне разлике које ће омогућити ранију детекцију и тачније дијагностиковање;
- Да се открију специфичности које ће омогућити селективнију терапију.

С обзиром на број до сада откривених тумора и специфичности у структури и функцији гликана и гликоконјугата, ова област представља непресушан извор за истраживање и нова открића.

Поглавље 15 Гликобиологија у будућности

Будућност гликобиологије је данас веома перспективна јер постоје бројна отворена питања на које је потребно одговорити, али и бројна питања која ће се тек отворити и која ће се истраживати. Оно што дефинитивно треба нагласити јесте да је гликобиологија повезана са биохемијом, хемијом, биологијом ћелије, имунологијом, генетиком, технологијом, индустријом, компјутерским техникама, медицином, фармацијом, ветеринаром и бројним другим гранама и наукама.

Изгледи су велики да гликобиологија пронађе своје место и у основним али и у примењеним истраживањима како за потребе лечења људи, тако и за потребе проналажења и употребе нових материјала, али и других праваца.

Будући да је гликобиологија установљена пре четрдесетак година, а да се интензивније развија мање од две деценије, бенефити и достигнућа ће се тек откривати. Свакако се, бар са овог становишта, да закључити да је гликобиологија наука будућности.

Литература

Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. *Science*, **2001**, 291 (5512), 2357.

Bird, R. E.; Lemmel, S. A.; Yu, X.; Zhou, Q. A. *Bioconjug. Chem.* **2021**, 32 (12), 2457.

Feeney, R. E. *Int. j. pept. protein res.* **1982**, 19 (3), 215.

Flynn, R. A.; Pedram, K.; Malaker, S. A.; Batista, P. J.; Smith, B. A. H.; Johnson, A. G.; George, B. M.; Majzoub, K.; Villalta, P. W.; Carette, J. E.; Bertozzi, C. R. *Cell*, **2021**, 184 (12), 3109.

Hires, M.; Jane, E.; Mego, M.; Chovanec, M.; Kasak, P.; Tkac, J. *Diagnostics*, **2019**, 9 (4), 156.

<https://www.uniprot.org/help/carbohydr#>

Kiessling, L. L.; Splain, R. A. *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, 79, 619.

Kishore, U.; Greenhough, T. J.; Waters, P.; Shrive, A. K.; Ghai, R.; Kamran, M. F.; Bernal, A. L.; Reid, K. B. M.; Madan, T.; Chakraborty, T. *Mol. Immunol.* **2006**, 43 (9), 1293.

Mehta, A. Y.; Cummings, R. D. *Bioinformatics*, **2020**, 36 (11), 3613.

Molinari, M.; Eriksson, K. K.; Calanca, V.; Galli, C.; Cresswell, P.; Michalak, M.; Helenius, A. *Mol. Cell*, **2004**, 13 (1), 125.

Oliver, J. D.; Roderick, H. L.; Llewellyn, D. H.; High, S. *Mol. Biol. Cell.* **1999**, 10 (8), 2573.

Rademacher, T. W.; Parekh, R. B.; Dwek, R. A. *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 785.

Sharon, N. *Glycobiology*, **2007**, 17 (11), 1150.

Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48 (38), 6974.

Taylor, M. E.; Drickamer, K. *Introduction to Glycobiology*, 3rd Ed., Oxford University Press Inc.: New York, 2011.

Vankadari, N.; Wilce, J. A. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 601.

Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G. W.; Aebi, M.; Darvill, A. G.; Kinoshita, T.; Packer, N. H.; Prestegard, J. H.; Schnaar, R. L.; Seeberger, P. H. *Essentials of Glycobiology*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2017.

Varrot, A.; Basheer, S. M.; Imberty, A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23* (5), 678.

Xie, Y.; Chai, P.; Till, N. A.; Hemberger, H.; Lebedenko, C. G.; Porat, J.; Watkins, C. P.; Caldwell, R. M.; George, B. M.; Perr, J.; Bertozzi, C. R.; Garcia, B. A.; Flynn, R. A. *Cell*, **2024**, *187* (19), 5228.