

TØ 16 – Kulhydrater og glykosylering af proteiner

Table of contents

1 Opgave 1. ABO-blodtypesystemet	2
1.1 Beskriv biosyntese af O-bundne oligosaccharider	2
1.2 Beskriv genetik bag ABO-systemet	2
1.3 Forudsig N-glykosyleringer i EPO	3
1.4 Forudsig O-glykosyleringer i EPO	3
1.5 Vurdér forudsigelsesnøjagtighed	3
1.6 Identificér exogent EPO	3
2 Opgave 2. Serine carboxypeptidase Y	4
2.1 Find N-glykosylerede positioner i CPY	4
2.2 Foreslå oligosaccharidstrukturer	4
2.3 Analysér oligosaccharidstruktur eksperimentelt	4
2.4 Beskriv modning af CPY	4
3 Opgave 3. Mannosidase I	5
3.1 Beskriv stub efter mannosidase I	5
3.2 Find fucosyleringens placering	5
3.3 Forklar PNGase F-specificitet	5
3.4 Vurdér effekt af kifunensin	5
3.5 Klassificér kifunensin som inhibitor	5
3.6 Forklar α -glycosidbindingspecificitet	5
4 Opgave 4. Glykosyleringer i sortilin	7
4.1 Forklar rationalet for PNGase F-behandling	7
4.2 Vis sortilins glykosylerede asparaginer	7
4.3 Find N-glykosyleringssites i Uniprot	7
4.4 Forklar manglende glykosylering	7
4.5 Sammenlign behandlet og ubehandlet sortilin	7
4.6 Beskriv glycosylering på Asn549	7
4.7 Vis hydrogen-bindinger til glycosylering	7
4.8 Forklar manglende udtryk af mutant	8
5 Opgave 5. (Rhod-)opsin (PyMOL)	9
5.1 Hent og visualisér rhodopsin	9
5.2 Beskriv N-glykosyleringers kobling	9
5.3 Identificér PLM-ligander	10
5.4 Vis og beskriv retinal-binding	10
5.5 Sammenlign rhodopsin og opsin	10

1 Opgave 1. AB0-blodtypesystemet

Hos mennesket udgør en lille gruppe af O-bundne oligosaccharider, som vist på figuren, blodtypesystemet AB0, hvor man som individ kan være af typen (og dermed udtrykke antigenerne) 0, A, B eller AB.

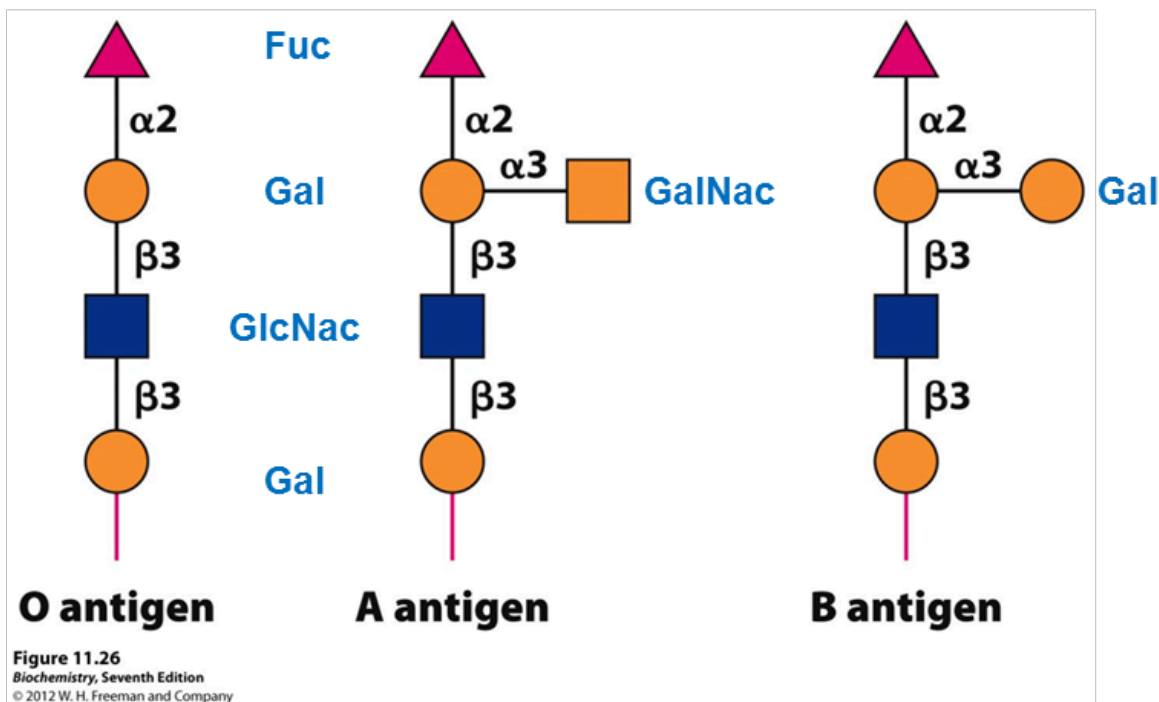
1.1 Beskriv biosyntese af O-bundne oligosaccharider

Beskriv hvordan modificerede proteiner af denne type syntetiseres. Sammenlign med biosyntesen af N-bundne oligosaccharider på glykoproteiner.

1.2 Beskriv genetik bag ABO-systemet

Beskriv det genetiske og biokemiske grundlag for at netop disse tre varianter dannes i det konkrete tilfælde med blodsystemet?

ABO-blodgruppe systemet



Erythropoietin (EPO) er et glycoprotein der stimulerer dannelse af røde blod legemer. EPO kan fremstilles recombinant i mammale celler hvorved man opnår et glykosyleret protein.

O- og N-glykosyleringer kan forudsiges ud fra aminosyresekvensen for et protein bl.a. via disse websites:

O-glykosyleringer: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetOGlyc-4.0/>

N-glykosyleringer: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>

Gå til Uniprot, søg efter "human erythropoietin" og kopier sekvensen (gå til "Sequence", klik knappen FASTA og kopier sekvensen).

Undersøg sekvensen for mulige O- og N-glykosyleringer på ovenstående websites.

1.3 Forudsig N-glykosyleringer i EPO

Hvor mange N-glykosyleringer bliver der forudsagt?

1.4 Forudsig O-glykosyleringer i EPO

Hvor mange O-glykosyleringer bliver der forudsagt?

Sammenlign resultatet med Stryer Figur 11.17 (bemærk at der er forskel i sekvensnummereringen pga. af et signalpeptid) eller Uniprot under overskriften "PTM/Processing".

1.5 Vurdér forudsigelsesnøjagtighed

Hvilken type af forudsigelse (O- eller N-glykosylering) er mest nøjagtig og hvorfor?

Sammensætningen af glykosyleringer er afhængig ikke kun af den organisme proteinet udtrykkes i men også af celletypen. Man vil derfor kunne undersøge en blodprøve for forekomst af udefrakommende (exogent) EPO.

1.6 Identificér exogent EPO

Foreslå to metoder til identificering af exogent EPO og forklar hvorfor de kan anvendes.

2 Opgave 2. Serine carboxypeptidase Y

En vakuolær protease fra gær, serine carboxypeptidase Y (CPY), er involveret i C-terminal forarbejdning af peptider og proteiner. Vakuoler er membranomsluttede vesikler i svampe og planter, der er vigtige for den intracellulære nedbrydning af affaldsprodukter, men CPYs præcise rolle i disse er uklar. CPY syntetiseres i en pre-pro form og bruges derfor som modelsystem for intracellulær proteinsortering i eukaryoter.

Aminosyresekvensen af pre-pro formen af CPY er vist nedenfor.

```
MKAFTSLLCG LGLSTTLAKA ISLQRPLGLD KDVLLQAAEK FGLDLDLHL LKELDSNVLD
60
AWAQIEHLYP NQVMSLETST KPKFPEAIKT KKDWFVVKV DAIENYQLRV NKIKDPKILG
120
IDPNVTQYTG YLDVEDEDKH FFFWTFESRN DPAKDPVILW LNGGPGCSSL TGLFFELGPS
180
SIGPDLKPIG NPYSWNSNAT VIFLDQPVNV GFSYSGSSGV SNTVAAGKDV YNFLELFFDQ
240
FPEYVNGQD FHIAGESYAG HYIPVFASEI LSHKDRNFNL TSVLIGNGLT DPLTQYNYE
300
PMACGEGGEP SVLPSEEC SA MEDSLERCLG LIESCYDSQS VWSCVPATIIY CNNAQLAPYQ
360
RTGRNVYDIR KDCEGNLCY PTLQDIDDYL NQDYVKEAVG AEVDHYESC N FDINRNFLFA
420
GDWMKPYHTA VTDLLNQDLP ILVYAGDKDF ICNWLGNKAW TDVLPWKYDE EFASQVVRNW
480
TASITDEVAG EVKSYKHFTY LRVFNGGHMV PFDVPENALS MVNEWIHGGF SL
532
```

2.1 Find N-glykosylerede positioner i CPY

CPY indeholder fire N-glykosylerede aminosyrerester. Angiv deres position og den lokale sekvens omkring dem.

2.2 Foreslå oligosaccharidstrukturer

Oligosacchariderne koblet til CPY er hovedsagelig på formen $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ og $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$. Foreslå strukturer for oligosacchariderne.

2.3 Analysér oligosaccharidstruktur eksperimentelt

Hvorledes kunne man eksperimentelt analysere strukturen af oligosacchariderne koblet til CPY?

Aminosyreresterne 1-20 udgør signalsekvensen i pre-pro CPY, hvorefter 21-111 er pro-peptidet og 112-532 udgør selve enzymet. I sekvensen finder man yderligere et konsensusignal for vakuolær sortering, **QRPL**.

2.4 Beskriv modning af CPY

Beskriv ud fra de givne oplysninger, hvordan modningen af CPY i cellen kunne foregå.

3 Opgave 3. Mannosidase I

Mannosidase I er et enzym der fjerner mannose enheder fra høj-mannose glycosyleringen der bliver tilføjet i ER. Den er således en forudsætning for at yderligere modificering af glycosyleringer senere kan foregå i Golgi. Mannosidase I er specific for α 1-2 glycosid bindinger.

3.1 Beskriv stub efter mannosidase I

Hvorledes vil den fælles N-glycosylerings stub se ud efter behandling med mannosidase I?

3.2 Find fucosyleringens placering

PNGase-F (peptide N-Glycosidase F) anvendes i laboratoriet ofte til at fjerne N-glycosyleringer fra proteiner idet den kløver N-glycosid bindingen mellem asparagine og N-acetylglucosamine. Denne kløvning sker imidlertid ikke hvis glykosyleringen indeholder en fucosylering.

Hvor er fucosyleringen sædvanligvis placeret i en N-glycosylering ?

3.3 Forklar PNGase F-specificitet

Hvorfor kan PNGase F ikke kløve en fucosyleret glycosylering ?

3.4 Vurdér effekt af kifunensin

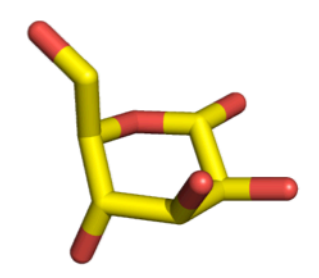
Kifunensin er en inhibitor af mannosidase I. I forbindelse med udtryk af proteiner i mammale cellekulturer tilsættes kifunensin ofte til mediet.

Vil det have en effekt på effektiviteten af efterfølgende PNGase-F behandling ?

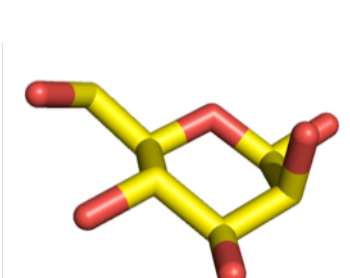
Nedenfor er vist strukturen af alpha-D-mannopyranose, beta-D-mannopyranose og kifunensin.

3.5 Klassificér kifunensin som inhibitor

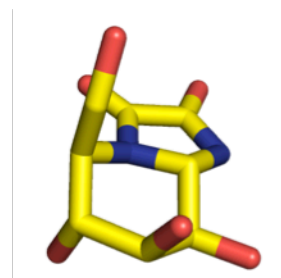
Vil du forvente at kifunensin er en kompetitiv, non-kompetitiv eller un-kompetitiv inhibitor ?



α -mannose



β -mannose

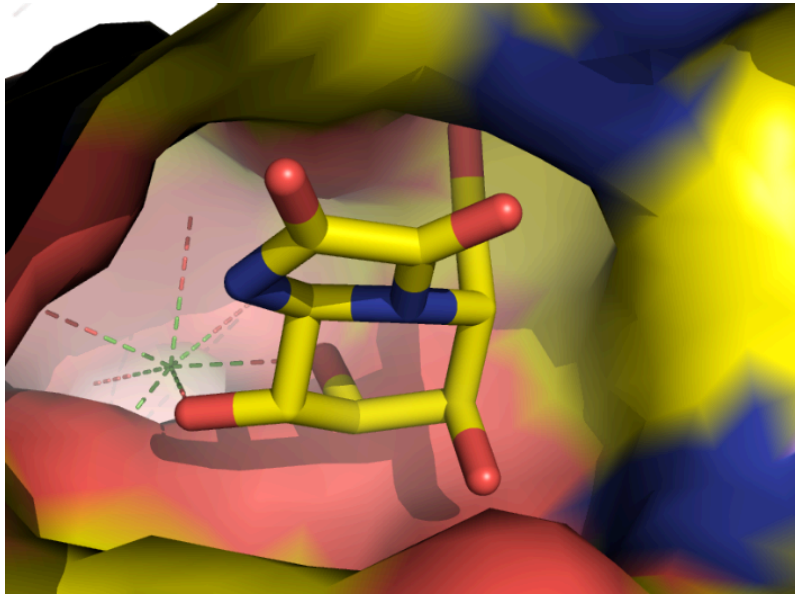


Kifunensin

I billedet nedenfor er vist kifunensin bundet i en lomme i mannosidase I. Kifunensin er vist som sticks og enzymet som en overflade. Det grønne kryds er en Ca^{2+} ion og de stiplede linier angiver interaktioner med oxygen atomer.

3.6 Forklar α -glycosidbindingspecificitet

Forklar hvorfor Mannosidase I er specifik for α -glycosid bindinger.



4 Opgave 4. Glykosyleringer i sortilin

I forbindelse med bestemmelse af krystalstrukturen af glycoproteiner behandler man ofte proteinet med enzymet PNGase F (peptide N-Glycosidase F) inden krystallisation.

4.1 Forklar rationalet for PNGase F-behandling

Hvad er rationalet bag denne behandling?

4.2 Vis sortilins glykosylerede asparaginer

Sortilin er en endocytose-receptor som er i stand til at binde et antal forskellige ekstracellulære proteiner og peptider og transportere dem til lysosomer. Ved bestemmelse af krystalstrukturen (PDB-ID: 4P07) blev sortilin ikke behandlet med PNGaseF.

Lav en scene, kaldet F1, som viser cartoon repræsentation og en scene, kaldet F2, der viser sortilins overflade. Hvilke asparaginer kan ses at være glycosyleret i Sortilin?

4.3 Find N-glykosyleringssites i Uniprot

 PyMOL info

Bemærk at surface-repræsentation kun ændrer proteinets repræsentation, men at solvent og glykosyleringer fortsat vises som sticks.

Find aminosyresekvensen for humant sortilin på Uniprot. Bemærk: der er forskel på nummereringen i UNIPROT og i PDB-ID: 4P07.

Hvor mange N-glykosyleringssites siger Uniprot der er i humant sortilin?

4.4 Forklar manglende glykosylering

Hvorfor er det ikke alle N-glykosyleringssites der ses at være glycosyleret i krystalstrukturen?

4.5 Sammenlign behandlet og ubehandlet sortilin

Ved bestemmelse af en anden krystalstruktur af sortilin (PDB-ID: 3F6K) blev sortilin behandlet med PNGaseF inden krystallisation.

Overlejr den behandlede sortilin med den ubehandlede sortilin og kald scenen F3. Lav så scener, kaldet F4, F5 og F6, som viser de 3 glykosylerede sites.

Hvorfor er det kun dele af glykosyleringerne, der fjernes?

4.6 Beskriv glykosylering på Asn549

Beskriv opbygningen af glykosyleringen på Asn549 på den ubehandlede sortilin og lav en scene kaldet, F7, som viser denne. Hint: definer Asn og glycolysering som et objekt. Dette inkluderer karakterisering af glycosid-bindingerne.

4.7 Vis hydrogen-bindinger til glykosylering

Vis nu sortilin som regnbuefarvet 'cartoon' og find polære kontakter mellem glykosyleringen på Asn549 og protein delen af sortilin.

Lav en scene, kaldet F8, der viser dette. Hvilke sidekæder danner hydrogen-bindinger med glykosyleringen?

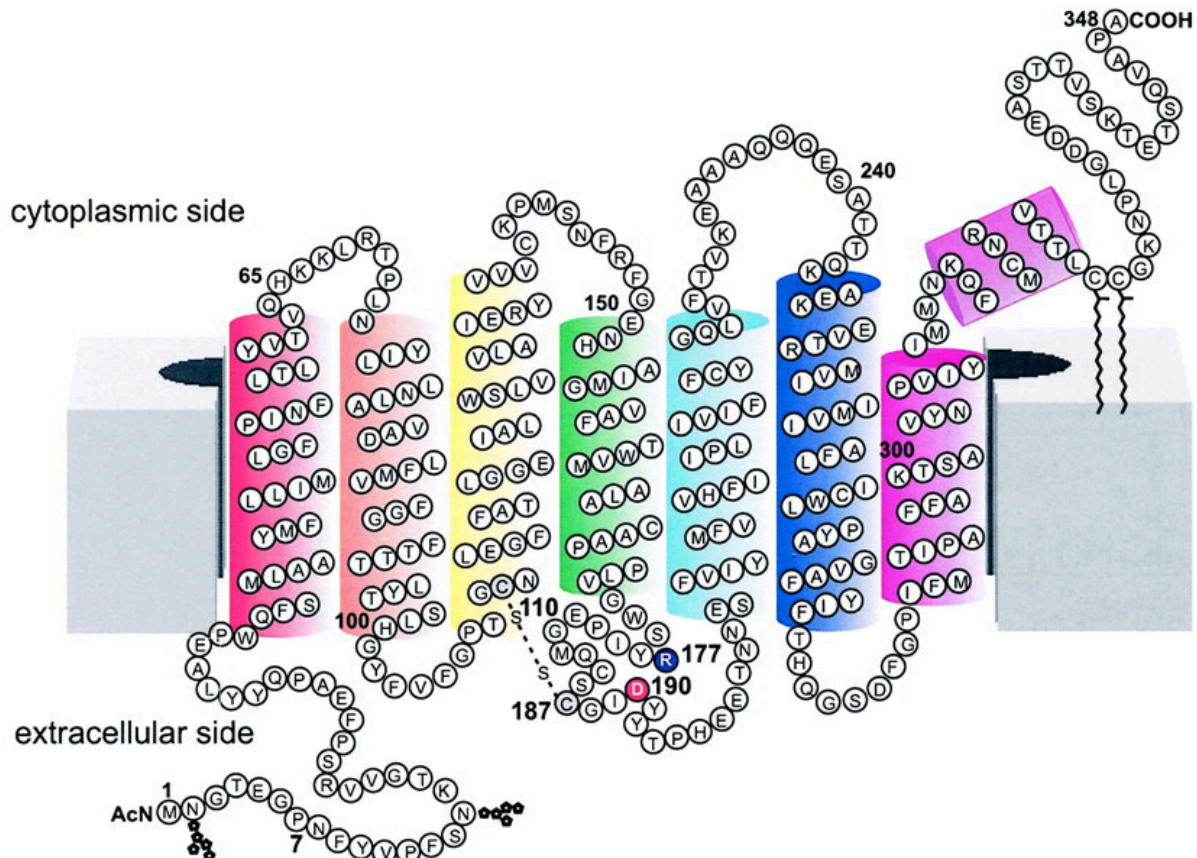
4.8 Forklar manglende udtryk af mutant

I et forsøg på at fjerne alle glykosyleringer blev alle asparaginer, der var forudsagt til at være glycosyleret i sortilin, muteret til alanin. Imidlertid viste det sig efterfølgende at det muterede sortilin ikke blev udtrykt.

Giv en mulig forklaring på denne observation.

5 Opgave 5. (Rhod-)opsin (PyMOL)

Proteinet rhodopsin er ansvarlig for omsætning af lys til et sansesignal i øjet. Strukturbestemmelse af rhodopsin har været ekstremt udfordrende, da proteinet ikke blot er et membranprotein, men heller ikke tåler lys. Derfor skal oprensningen ske i mørke.



5.1 Hent og visualisér rhodopsin

Lav et script, der henter krystalstrukturen af bovine rhodopsin bestemt til en opløsning af 2,2 Å (PDB-ID: 1U19) og opret et objekt, der kun indeholder kæderne A, C og D. Vis strukturen som cartoon i regnbuefarve (N=blå til C=rød), vis ioner som kugler og andre ligander med sticks. Gem dette som en scene kaldet F1.

Beskriv den overordnede foldningsklasse og struktur af rhodopsin.

Hint

Man kan med fordel bruge RCSB til at finde positioner for ligander / kigge på sekvensen i PyMol for residue numre/navne.

5.2 Beskriv N-glykosyleringers kobling

Kæderne C og D indeholder ikke protein, men er kovalent koblede til det. Hvordan er kæderne C og D koblet til rhodopsin og hvad indeholder de? Beskriv den modulære opbygning af kæderne.

5.3 Identificér PLM-ligander

Strukturen indeholder to molekyler med betegnelsen PLM. Hvilket stof er der tale om og hvorfor tror du det binder til rhodopsin?

5.4 Vis og beskriv retinal-binding

Identificér den prostetiske 11-*cis* retinal-gruppe og lav en scene kaldet F2, som tydeligt viser denne. Beskriv interaktionen mellem 11-*cis* retinal og rhodopsin. Hvordan fastholdes den prostetiske gruppe? Hvor er den optisk aktive del af 11-*cis* retinal?

5.5 Sammenlign rhodopsin og opsin

Hent strukturen af opsin (PDB-ID: 3CAP) og på samme måde som før; dan et objekt med kæderne A, C og D. Foretag dernæst en overlejring af opsin på rhodopsin. Gem dette som scene F3. Hvad er forskellen på opbygningen af opsin og rhodopsin? Giver denne forskel anledning til strukturelle ændringer? Hvilke?