



УДК 577.114.012.7

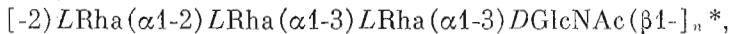
ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ  
 ТЕТРАСАХАРИДНЫХ ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ЗВЕНЬЕВ  
 О-АНТИГЕННОГО ПОЛИСАХАРИДА *SHIGELLA FLEXNERI*

Липкин Г. М., Кочетков Н. К.

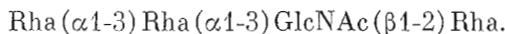
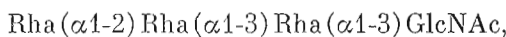
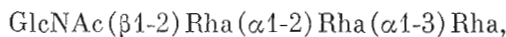
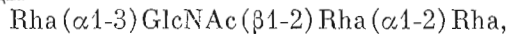
Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского  
 Академии наук СССР, Москва

Проведен теоретический конформационный анализ четырех тетрасахаридных повторяющихся звеньев полисахарида *Shigella flexneri* серотипа Y. Исследована взаимообусловленность конформационных состояний соседних дисахаридных звеньев в олигосахаридах. Дано распределение по конформациям тетрасахаридов в растворе, полученное на основе расчета свободных энергий оптимальных структур. Показано, что в олигосахаридных цепях учет энтропийного фактора приводит к существенной коррекции результатов.

Данная работа посвящена расчету свободных энергий оптимальных конформаций олигосахаридов в рамках механической модели молекулы. В качестве примера нами рассмотрены четыре химических тетрасахаридных повторяющихся звена полисахарида *Shigella flexneri* серотипа Y с первичной структурой [1]:



т. е. тетрасахариды



Расчет тетрасахаридов, в котором учитывается влияние конформационных состояний крайних дисахаридных звеньев на структуру центрального звена, естественно, дает большую информацию о стерических взаимоотношениях между остатками вдоль полисахаридной цепи и позволяет более обоснованно моделировать ее возможные пространственные структуры. Поскольку поверхностные бактериальные полисахариды функционируют в водном окружении, важно знать распределение по конформациям на относительно больших фрагментах цепи в растворе. Расчет, в котором учитываются только энергии невалентных взаимодействий между атомами остатков, явно недостаточен для таких заключений, так как вероятность состояний в существенной мере определяется также энтропийным фактором. Это обстоятельство учтено в данной работе.

Интерес к анализу пространственного строения четырех указанных тетрасахаридов в значительной степени также обусловлен тем, что они были синтезированы наряду со всевозможными ди- и трисахаридными фрагментами полисахарида *S. flexneri* [2-4] с целью исследовать иммунологическую специфичность этого полисахарида и выявить его антигенные олигосахаридные детерминанты [5]. Более того, для некоторых три- и тетрасахаридных фрагментов полисахарида *S. flexneri* серотипа Y в работе Бока с соавт. [6] по спектрам  $^1H$ - и  $^{13}C$ -ЯМР высокого разрешения определены те экспериментальные величины (по спин-решеточной релак-

\* Далее конфигурационные символы (*D* и *L*) при изображении моносахаридных остатков опускаются.

сации протонов, ядерным эффектам Оверхаузера, вициальным спин-спиновым константам  $^3J_{\text{HC-H}}$ ), которые определяются пространственным строением этих фрагментов и в конечном счете зависят от углов вращения  $\varphi$  и  $\psi^*$  вокруг гликозидных связей дисахаридных звеньев. Авторы указанной работы пришли к заключению, что олигосахаридные фрагменты и сам полисахарид *S. flexneri* являются конформационно-жесткими и экспериментальным величинам лучше всего соответствуют структуры, в которых на всех дисахаридных звеньях углы вращения  $\varphi$  и  $\psi$  равны  $\sim 50^\circ$  и  $0^\circ$  соответственно.

Однако проведенные нами теоретический конформационный анализ и расчет ядерных эффектов Оверхаузера, обусловленных насыщением резонанса аномерного протона H1 невосстанавливающего остатка на целом ряде протонов остатка агликона, а также расчет ядерных эффектов Оверхаузера между удаленными протонами остатков для дисахаридных звеньев, представленных в полисахариде *S. flexneri*, показали, что совокупность экспериментальных данных [7, 8] наиболее естественно воспроизводится при учете всего статистического распределения, задаваемого потенциальными поверхностями дисахаридов. Из расчета следует, что диапазон изменения углов вращения вокруг гликозидных связей данного полисахарида может быть весьма значителен ( $80-90^\circ$ ) и предложенная Боком и соавт. [6] конформация представляет собой только одну из его низкоэнергетических структур. Поэтому нами проведен анализ всех возможных оптимальных конформаций четырех повторяющихся звеньев полисахарида *S. flexneri*.

Так как нас интересуют конформационные состояния олигосахаридов в водной среде, при оценке потенциальной энергии конформеров была выбрана параметризация силового поля в расчете на эту среду. Как показано в работах [7-10], в этом случае атом-атомные потенциальные функции невалентных взаимодействий являются потенциалами средней силы. Остальные возможные составляющие энергии, такие, как электростатические взаимодействия, образование внутримолекулярных водородных связей, *экзо*-аномерный эффект, в водных растворах существенной роли не играют. Более того, учет возможности образования водородных связей в расчетах дисахаридов приводит к ухудшению согласия расчетных и опытных данных. Например, для мальтозы теоретическое среднее значение оптического связевого вращения без учета водородной связи составляет  $+16^\circ$ , с учетом  $-51^\circ$ , экспериментальная величина равна  $+39^\circ$  (см. [10]). Далее, расчет  $\beta$ -эффекта гликозилирования из спектров  $^{13}\text{C}$ -ЯМР в дисахариде Glc( $\beta$ 1-3)Gal дает  $-1,75$  и  $-3,95$  м. д. без учета и с учетом водородной связи; опытная величина составляет  $-2,0$  м.д. [9]. Для функций невалентных взаимодействий была использована параметризация, предложенная Китайгородским [11]. Функции Китайгородского наряду с функциями Скотта и Шераги [12] наиболее приемлемы для конформационных расчетов углеводных цепей [8, 10]. Учтен также торсионный вклад, связанный с наличием барьера вращения вокруг гликозидных связей (см. [10]).

При отборе пространственной структуры полисахарида *S. flexneri* Бок и соавт. [6] руководствовались концепцией *экзо*-аномерного эффекта, согласно которой дисахаридные звенья углеводных цепей в растворе принимают одну конформацию с углами вращения  $|\varphi| \sim 60^\circ$  и  $|\psi| \sim 10^\circ$  (см. [13, 14]). Однако, как было отмечено нами ранее [10], *экзо*-аномерный эффект не может быть решающим фактором в отборе структур, поскольку в воде он мал. Так, аномерный эффект, адекватный по своей природе *экзо*-аномерному эффекту (кстати, по расчетам Джеффри и соавт. [15], *экзо*-аномерный эффект близок аномерному), для водного раствора глюкозы определен только в  $0,55$  ккал/моль [16]. Поэтому мы считаем неприем-

\* Угол  $\varphi$  соответствует вращению вокруг аномерной связи C1-O и равен нулю при *цис*-ориентации связей C1-H1 и O-SA (SA - атом углерода агликона). Угол  $\psi$  определяет вращение вокруг связи O-SA и равен нулю при *цис*-ориентации связей C1-O1 и SA-HA. Положительное направление вращения соответствует движению по часовой стрелке, если смотреть от атома C1 к мостиговому кислороду и от последнего - к атому SA.

лемым расчетное приближение, предложенное Лемье и соавт. [14], где зависимость величины *экзо*-аномерного эффекта от растворителя не учитывается. В этом приближении электронная дестабилизация *транс*-ориентации агликона относительно связи C1—O5 невосстанавливающего остатка по сравнению с его *гош*-ориентацией составляет 3–5 ккал/моль (вместо ~0,5 ккал/моль). В данной работе небольшой энергетический вклад, который может быть обусловлен *экзо*-аномерным эффектом, учтен, но с помощью функции, параметры которой найдены по экспериментальным данным в воде (см. [8]).

Помимо расчета энергий конформеров тетрасахаридов нами проведена также оценка энтропии локальных состояний. В расчетах олигосахаридов об относительной стабильности конформеров, как правило, судят не по свободной энергии конформеров, а только по их энтальпии. Для многомерного случая, с которым мы сталкиваемся в олигосахаридах, процедура простого перебора по всем углам вращения  $\varphi$  и  $\psi$  для оценки конформационной статистической суммы громоздка и ее обычно не применяют.

Для расчета статистической суммы локального конформера (*i*) олигомера мы воспользовались предложенной Го и соавт. [17] методикой, по которой она может быть представлена в виде

$$Z_i = (2\pi RT)^{m/2} (\det F_i)^{-1/2} \exp(-\Delta U_i/RT), \quad (1)$$

где  $\Delta U_i$  — относительная энергия конформера,  $\det F_i$  — детерминанта матрицы вторых производных энергии по углам вращения в положении равновесия с размерностью, равной числу переменных (*m*). Таким образом, предэкспоненциальный множитель в выражении (1) характеризует форму потенциальной поверхности в окрестностях минимума и является аналогом энтропийного члена в обычном выражении статистической суммы. При наличии нескольких локальных минимумов статистическая сумма

системы равна  $Z = \sum_i Z_i$  и вероятность (статистический вес) конформера определяется из соотношения

$$W_i = Z_i/Z. \quad (2)$$

Структурные данные по самим моносахаридным остаткам  $\alpha$ -L-Rha,  $\beta$ -D-GlcNAc взяты из рентгеноструктурного анализа этих остатков [18, 19]. Длины связей C—H, которые в рентгеноструктурном анализе получают заниженными, трансформировались до их нормального значения 1,1 Å. Валентный угол у атома кислорода гликозидной связи принят равным 117° [20].

На первом этапе расчета рассматривались близкие взаимодействия в дисахаридных звеньях полисахарида *S. flexneri*. Найденные оптимальные значения углов вращения  $\varphi$  и  $\psi$  принимались в качестве нулевых приближений для варьируемых параметров при минимизации потенциальной энергии тетрасахаридов.

**Дисахаридные звенья.** На потенциальных поверхностях дисахаридных звеньев полисахарида *S. flexneri* выделяется ограниченное число локальных минимумов — 2 или 3 (табл. 1). Один из них обязательно соответствует *гош*-ориентации гликозидной связи O—CA агликона относительно связи C1—O5 невосстанавливающего остатка ( $\varphi \sim 50$ – $60^\circ$ ). Для этого минимума также характерно положительное значение угла  $\psi$ . В дальнейшем этот конформер будем обозначать символом *g* («гош»). В другом минимуме угол  $\varphi$ , как правило, принимает отрицательное значение, что соответствует приближительной *транс*-ориентации агликона вокруг аномерной связи C1—O по отношению к связи C1—O5, т. е. это конформер *t*. Только два указанных оптимальных конформера представлены в дисахаридных звеньях Rha( $\alpha$ 1-3)Rha и Rha( $\alpha$ 1-3)GlcNAc (табл. 1). В случае дисахаридов GlcNAc( $\beta$ 1-2)Rha и Rha( $\alpha$ 1-2)Rha на конформационной карте также выделяется минимум с положительным значением  $\varphi$ , близким к  $30^\circ$ , но с отрицательным значением  $\psi$ , его мы будем обозначать *g'*. У дисахаридов GlcNAc( $\beta$ 1-2)Rha представлены конформеры *g* и *g'*, а минимум,

Энергетические и геометрические параметры оптимальных конформаций дисахаридных звеньев полисахарида \*

Дисахариды	Конформеры	φ	ψ	U, ккал/моль	W, %
		град			
Rha (α1-3) GlcNAc	<i>g</i>	47,9	11,2	-1,2	83
	<i>t</i>	-12,0	28,8	-0,2	17
GlcNAc (β1-2) Rha	<i>g</i>	49,0	17,2	-0,3	70
	<i>g'</i>	27,4	-56,9	-0,2	30
Rha (α1-2) Rha	<i>g</i>	51,6	14,4	-0,4	50
	<i>g'</i>	37,2	-31,8	-0,4	35
	<i>t</i>	-25,9	-35,1	0,2	15
Rha (α1-3) Rha	<i>g</i>	54,7	22,0	-1,1	91
	<i>t</i>	-32,4	-27,5	0,2	9

\* U — общая энергия конформера, W — статистический вес конформера, рассчитанный по формуле (2).

Таблица 2

Энергетические параметры \* (ккал/моль) оптимальных конформаций четырех тетрасахаридных повторяющихся звеньев полисахарида *S. flexneri*

Rha (α1-3) GlcNAc (β1-2) Rha (α1-2) Rha					GlcNAc (β1-2) Rha (α1-2) Rha (α1-3) Rha				
Конформеры	U <sub>ср</sub>	U	ΔF	W	Конформеры	U <sub>ср</sub>	U	ΔF	W
<i>ggg</i>	-0,5	-2,5	0,0	22,5	<i>ggg</i>	-1,2	-3,0	0,21	20,0
<i>ggg'</i>	-0,4	-2,4	0,09	19,0	<i>gg'g</i>	-1,3	-3,1	0,0	28,4
<i>gg'g</i>	-0,9	-2,4	0,29	14,0	<i>g'gg</i>	-1,4	-2,8	0,60	10,3
<i>gg'g'</i>	-0,7	-2,2	0,42	11,5	<i>g'g'g</i>	-1,5	-2,8	0,61	10,3
<i>ggt</i>	-0,8	-2,1	0,35	12,5	<i>gtg</i>	-2,6	-3,5	1,2	4,2
<i>gg't</i>	-1,0	-2,0	0,66	7,0	<i>g'tg</i>	-2,5	-3,0	1,35	3,3
<i>tgg</i>	-0,5	-1,5	1,12	3,5	<i>ggt</i>	-2,0	-2,5	0,84	7,0
<i>tgg'</i>	-0,4	-1,4	1,25	2,8	<i>gg't</i>	-1,6	-2,2	0,95	5,9
<i>tg'g</i>	-0,9	-1,3	1,38	2,2	<i>g'gt</i>	-2,3	-2,4	1,0	5,0
<i>tg'g'</i>	-0,7	-1,1	1,50	2,0	<i>g'g't</i>	-2,3	-2,4	1,48	2,1
<i>tgt</i>	-0,8	-1,1	1,56	2,0	<i>gtt</i>	-3,2	-3,0	1,97	1,0
<i>tg't</i>	-1,1	-0,9	1,8	1,0	<i>g'tt</i>	-3,7	-3,0	1,75	1,5
					<i>itt</i>	-4,6	-2,7	1,97	1,0

Rha (α1-2) Rha (α1-3) Rha (α1-3) GlcNAc					Rha (α1-3) Rha (α1-3) GlcNAc (β1-2) Rha				
Конформеры	U <sub>ср</sub>	U	ΔF	W	Конформеры	U <sub>ср</sub>	U	ΔF	W
<i>ggg</i>	-1,7	-4,2	0,0	38,0	<i>ggg</i>	-1,1	-3,6	0,0	59,0
<i>g'gg</i>	-1,8	-4,3	0,19	27,5	<i>ggg'</i>	-1,1	-3,1	0,41	29,5
<i>tgg</i>	-1,4	-3,3	1,2	5,0	<i>tgg</i>	-0,5	-2,0	1,18	8,2
<i>gtg</i>	-4,4	-5,4	0,47	17,0	<i>tgg'</i>	-0,5	-1,4	1,90	2,5
<i>g'tg</i>	-2,8	-4,0	0,78	10,0	<i>gtg</i>	-1,2	-1,6	3,32	0,3
<i>ttg</i>	-1,3	-2,0	2,75	0,5	<i>gtg'</i>	-1,2	-1,1	3,22	0,3
<i>ggt</i>	-3,6	-3,6	2,34	1,0	<i>ttg</i>	-1,1	-1,0	3,6	0,1
<i>g'tt</i>	-3,4	-3,0	2,34	1,0	<i>ttg'</i>	-1,1	0,0	4,5	0,1

\* U<sub>ср</sub> — энергия средних (за вычетом ближних) взаимодействий между остатками; ΔF — относительная свободная энергия конформера.

соответствующий форме *t*, отсутствует, поскольку наличие ацетамидной группы в положении 2 невозстанавливающего остатка препятствует транс-ориентации агликона.

В целом вклад в конформационное равновесие дисахаридов *гош*-конформеров (*g* и *g'*) составляет в среднем 70–90%. Вклад конформеров *t* колеблется в пределах 10–15% (табл. 1). Описание распределения по конформациям в дисахариде, которое получено на основе расчета статистической суммы по приближенной формуле (1), близко к тому, которое

Углы вращения  $\varphi$  и  $\psi$  (град) в предпочтительных оптимальных конформациях (с вкладом  $>7\%$ ) тетрасахаридов

Тетрасахариды	Конформеры	Углы вращения $\varphi, \psi$ в звеньях			
		Rha ( $\alpha 1-2$ )GlcNAc	GlcNAc ( $\beta 1-2$ )Rha	Rha ( $\alpha 1-2$ )Rha	Rha ( $\alpha 1-3$ )Rha
Rha ( $\alpha 1-3$ )GlcNAc ( $\beta 1-2$ ) Rha ( $\alpha 1-2$ ) Rha	<i>ggg</i>	48, 11	51, 15	50, 17	
	<i>ggg'</i>	48, 11	50, 16	37, -32	
	<i>gg'g</i>	48, 11	29, -48	48, 20	
	<i>ggt</i>	48, 11	53, 13	-28, -34	
GlcNAc ( $\beta 1-2$ ) Rha ( $\alpha 1-2$ ) Rha ( $\alpha 1-3$ ) Rha	<i>ggg</i>		51, 15	54, 6	50, 25
	<i>gg'g</i>		51, 16	31, -29	52, 26
	<i>g'gg</i>		29, -48	54, 8	50, 25
	<i>g'g'g</i>		29, -48	40, -30	52, 26
	<i>ggt</i>		51, 15	58, 8	-35, -30
Rha ( $\alpha 1-2$ ) Rha ( $\alpha 1-3$ ) Rha ( $\alpha 1-3$ ) GlcNAc	<i>ggg</i>	41, 6		54, 5	55, 17
	<i>g'gg</i>	40, 5		41, -29	56, 18
	<i>gtg</i>	41, 6		62, 11	-34, -34
	<i>g'tg</i>	51, 16		47, -24	-34, -28
Rha ( $\alpha 1-3$ ) Rha ( $\alpha 1-3$ ) GlcNAc ( $\beta 1-2$ ) Rha	<i>ggg</i>	41, 6	48, 18		57, 15
	<i>ggg'</i>	41, 6	28, -47		57, 15
	<i>tgg</i>	46, 11	48, 18		-32, -29

Таблица 4

Распределение по конформациям (%) в дисахаридных звеньях тетрасахаридов

Тетрасахариды	Конформеры звеньев								
	Rha ( $\alpha 1-3$ )GlcNAc		GlcNAc ( $\beta 1-2$ )Rha		Rha ( $\alpha 1-2$ )Rha			Rha ( $\alpha 1-3$ )Rha	
	<i>g</i>	<i>t</i>	<i>g</i>	<i>g'</i>	<i>g</i>	<i>g'</i>	<i>t</i>	<i>g</i>	<i>t</i>
Rha ( $\alpha 1-3$ )GlcNAc ( $\beta 1-2$ ) Rha ( $\alpha 1-2$ ) Rha	86,5	13,5	61,3*	38,7	42,0	35,5	22,5		
GlcNAc ( $\beta 1-2$ ) Rha ( $\alpha 1-2$ ) Rha ( $\alpha 1-3$ ) Rha			67,7	32,5	42,5	47,0	10,5	76,5	23,5
Rha ( $\alpha 1-2$ ) Rha ( $\alpha 1-3$ ) Rha ( $\alpha 1-3$ ) GlcNAc	98,0	2,0			57,0	37,5	5,5	71,5	28,5
Rha ( $\alpha 1-3$ ) Rha ( $\alpha 1-3$ ) GlcNAc ( $\beta 1-2$ ) Rha	99,0	1,0	67,5	32,5				89,0	11,0

\* Жирным шрифтом выделены данные, относящиеся к центральным дисахаридным звеньям в соответствующих тетрасахаридах.

рассчитано путем суммирования бoльцмановских экспонент по всей конформационной карте при ее разбиении на равновеликие интервалы. Так, в случае дисахарида Rha ( $\alpha 1-3$ )GlcNAc вклады формы *t* в двух вариантах расчета равны 17 и 10% соответственно, т. е. различия в результатах по дисахаридам в двух расчетных приближениях не превышают 10%.

Следует подчеркнуть, что, несмотря на ограниченное число локальных минимумов на потенциальной поверхности, сами дисахаридами являются конформационно-лабильными системами. Так, контур с относительной энергией 1 ккал/моль на конформационной карте дисахарида Rha ( $\alpha 1-2$ ) Rha находится в границах углов  $\varphi$  от  $-20$  до  $70^\circ$  и  $\psi$  от  $-50$  до  $40^\circ$ , т. е. наи-

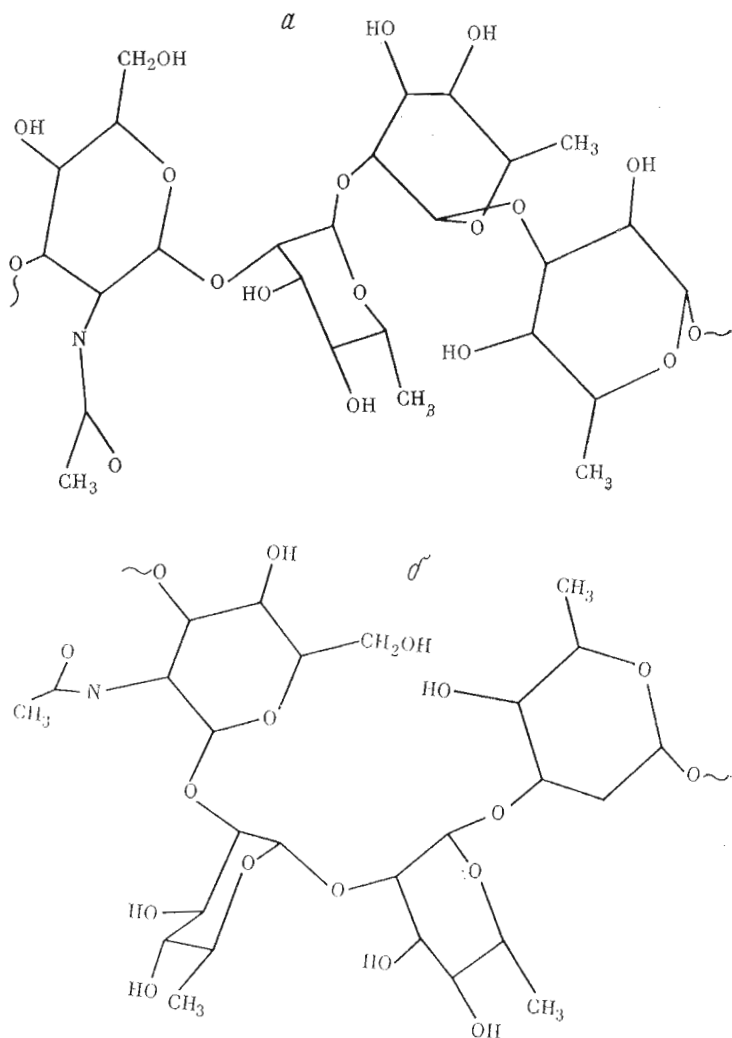


Рис. 1. Молекулярные модели тетрасахарида  $\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Rha}(\alpha 1-2)\text{Rha}(\alpha 1-3)\text{Rha}$  в конформациях  $gg'g$  (а) и  $gtg$  (б)

более вероятный диапазон изменения углов вращения  $\varphi$  и  $\psi$  составляет не менее  $90^\circ$ .

$\text{Rha}(\alpha 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Rha}(\alpha 1-2)\text{Rha}$ . В этом тетрасахариде какие-либо дополнительные невалентные взаимодействия между остатками, кроме ближних для дисахаридных звеньев, практически отсутствуют. Укажем только на небольшую относительную стабилизацию состояния  $t$  звена  $\text{Rha}(\alpha 1-2)\text{Rha}$  за счет дисперсионных взаимодействий между концевыми остатками трисахаридного фрагмента  $\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Rha}(\alpha 1-2)\text{Rha}$ .

Процентное содержание 12 оптимальных конформаций тетрасахарида  $\text{Rha}(\alpha 1-3)\text{GlcNAc}(\beta 1-2)\text{Rha}(\alpha 1-2)\text{Rha}$  в растворе дано в табл. 2. С наибольшим статистическим весом представлены четыре формы с *gauche*-конформациями дисахаридных звеньев:  $ggg$ ,  $ggg'$ ,  $gg'g$ ,  $gg'g'$ , их общий вклад в конформационное равновесие составляет 67%. Также существен вклад двух конформаций с состоянием  $t$  звена  $\text{Rha}(\alpha 1-2)\text{Rha}$  —  $ggt$  и  $gg't$  (20%). В этих структурах, несмотря на то что углы  $\varphi$  в большинстве случаев находятся в ограниченном интервале значений ( $25-50^\circ$ ), колебания по углам  $\psi$  могут быть весьма значительными (от  $30$  до  $-60^\circ$  — см. табл. 3, где приведены оптимальные значения углов вращения  $\varphi$  и  $\psi$  в предпочтительных структурах), что обуславливает конформационную лабильность этого тетрасахарида.

Согласно расчету Бока и соавт. [6], в котором определяющая роль отводится *экзо*-аномерному эффекту, этот тетрасахарид должен существовать только в конформации *ggg*. По нашим данным (табл. 2), эта конформация действительно является низкоэнергетической, тем не менее ее вклад в общее конформационное равновесие составляет только 22,5%. Отсюда очевидно, что нельзя пренебрегать другими пространственными формами олигосахарида.

На основе данных табл. 2 можно рассчитать содержание конформеров *g*, *g'* и *t* в каждом дисахаридном звене тетрасахарида, которое приведено в табл. 4. Например, для звена Rha( $\alpha$ 1-3)GlcNAc оно получено суммированием статистических весов всех конформеров тетрасахарида (табл. 2) с состоянием *g* на этом звене в одном случае и *t* — в другом.

*GlcNAc( $\beta$ 1-2)Rha( $\alpha$ 1-2)Rha( $\alpha$ 1-3)Rha*. В этом тетрасахариде средние невалентные взаимодействия также играют весьма существенную роль. Однако они возможны только тогда, когда одно из дисахаридных звеньев принимает конформацию *t*. Так, относительный выигрыш в энергии дисперсионных взаимодействий между концевыми остатками трисахаридных фрагментов GlcNAc( $\beta$ 1-2)Rha( $\alpha$ 1-2)Rha и Rha( $\alpha$ 1-2)Rha( $\alpha$ 1-3)Rha при состоянии *t* звена Rha( $\alpha$ 1-2)Rha в первом случае и состоянии *t* звена Rha( $\alpha$ 1-3)Rha во втором случае составляет  $\sim -1$  ккал/моль. Но важнее то, что, когда центральное звено Rha( $\alpha$ 1-2)Rha находится в конформации *t*, в олигосахаридной цепи образуется внутренний изгиб, при котором оказываются сближенными концевые остатки тетрасахарида — N-ацетилглюкозами и рамноза (рис. 1). Энергии невалентных взаимодействий между указанными остатками в оптимальных структурах *gtg*, *g'tg*, *g'tt* и *g'tt* равны  $-1,5$ ;  $-1,1$ ;  $-1,7$  и  $-2,0$  ккал/моль соответственно. В итоге эти конформеры становятся самыми низкоэнергетическими (табл. 2). В них средние взаимодействия между остатками ( $\sim -3$  ккал/моль) перекрывают проигрыши по ближним взаимодействиям. В конформации, изображенной на рис. 1б, вполне возможно сближение атомов кислорода концевых остатков N-ацетилглюкозамина и рамнозы до расстояния 3 Å и образование внутримолекулярной водородной связи с отрицательной энтальпией в менее полярных средах, чем вода. Особенно велико взаимодействие между концевыми остатками в структуре *ttt* ( $-2,8$  ккал/моль). Оно стабилизирует конформер *t* звена GlcNAc( $\beta$ 1-2)Rha, для которого минимум в свободном дисахариде отсутствует.

Однако, несмотря на то что указанные структуры с состоянием *t* центрального звена являются наиболее низкоэнергетическими, а конформер *gtg* оказывается по энтальпии даже глобальным, их вклад в общее конформационное равновесие невелик и составляет только 10% (вклад конформера *gtg* 4,2%, табл. 2). Этот факт обусловлен тем, что пространственное сближение концевых остатков существенно ограничивает конформационную подвижность в дисахаридных звеньях. Указанное свойство особенно характерно для звеньев со связью 1 $\rightarrow$ 2, образующих наиболее резкие изгибы в углеводной цепи, при которых удаленные остатки могут сближаться, не вступая в невалентные отталкивания друг с другом только в очень ограниченном диапазоне углов вращения  $\phi$  и  $\psi$ . Поэтому в расчете, учитывающем энтропию состояний, эти структуры оказываются маловероятными.

По-прежнему, как и для ранее рассмотренного тетрасахарида, в тетрасахариде GlcNAc( $\beta$ 1-2)Rha( $\alpha$ 1-2)Rha( $\alpha$ 1-3)Rha процентное содержание структур с *гош*-конформерами на всех звеньях (*ggg*, *gg'g*, *g'gg* и *g'g'g*) максимально (69%, табл. 2). Эти структуры, несмотря на наличие в цепи связи типа 1 $\rightarrow$ 2, развернуты, в них концевые остатки максимально удалены друг от друга. Их общая предпочтительность обусловлена только энтропийным фактором. Вместе с тем статистический вес конформации *ggg*, которая, по мнению авторов работы [6], характеризует пространственное строение этого повторяющегося звена, составляет только 20% (табл. 2). Напротив, по нашим данным, с максимальным статистическим весом в растворе должна быть представлена структура *gg'g* (28,4%), ее молекулярная модель дана на рис. 1а.

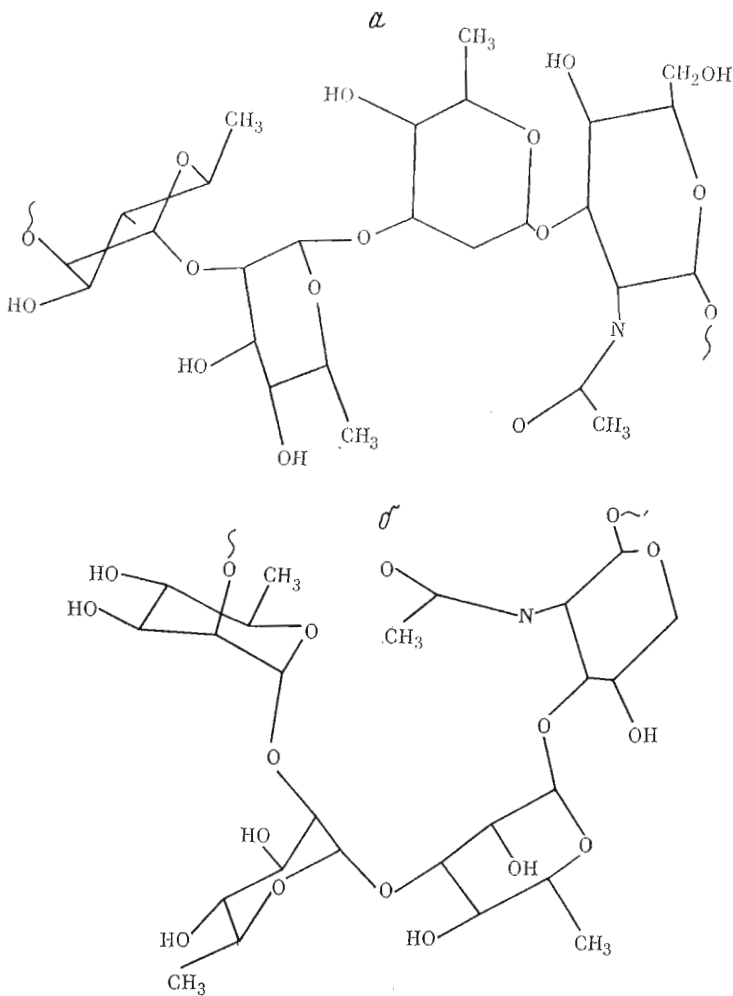


Рис. 2. Молекулярные модели тетрасахарида  $Rha(\alpha 1-2)Rha(\alpha 1-3)Rha(\alpha 1-3)GlcNAc$  в конформациях  $ggg$  (а) и  $gtg$  (б)

В итоге, несмотря на наличие дополнительных средних взаимодействий, распределение по конформациям на каждом дисахаридном звене тетрасахарида  $GlcNAc(\beta 1-2)Rha(\alpha 1-2)Rha(\alpha 1-3)Rha$  (табл. 4) оказывается близким к распределению в свободных дисахаридах (табл. 1); только в звене  $Rha(\alpha 1-3)Rha$  несколько увеличен вклад состояния  $t$  (23,5% вместо 9%). Что касается центрального звена  $Rha(\alpha 1-2)Rha$ , то для него равновероятны оба конформера —  $g$  и  $g'$ , т. е. и в тетрасахариде оно остается достаточно гибким.

$Rha(\alpha 1-2)Rha(\alpha 1-3)Rha(\alpha 1-3)GlcNAc$ . Как и в случае тетрасахарида с центральным звеном  $Rha(\alpha 1-2)Rha$ , в этой структуре с центральным звеном  $Rha(\alpha 1-3)Rha$  также возможны невалентные взаимодействия между концевыми остатками, но по-прежнему при состоянии  $t$  (табл. 2) этого звена. Энергии таких взаимодействий в конформациях  $gtg$ ,  $g'tg$ ,  $g'tt$  составляют  $-2,2$ ,  $-0,7$  и  $-1,4$  ккал/моль соответственно. Поскольку состояние  $t$  звена  $Rha(\alpha 1-3)Rha$  также стабилизируется дополнительными взаимодействиями на трисахаридном фрагменте  $Rha(\alpha 1-2)Rha(\alpha 1-3)Rha$ , в итоге конформер  $gtg$  становится самым низкоэнергетическим (табл. 2). Этот свернутый конформер (см. его молекулярную модель на рис. 2б) стабильнее на 1–2 ккал/моль по сравнению со следующим за ним по энергии развернутым конформером  $ggg$  (рис. 2а). Тем не менее вклад в конформационное равновесие тетрасахарида структуры  $gtg$ , оцененный на основе расчета статистической суммы по формуле (1), составляет только 17%, тогда как вклад структуры  $ggg$  — 38% (табл. 2). Мы снова видим,



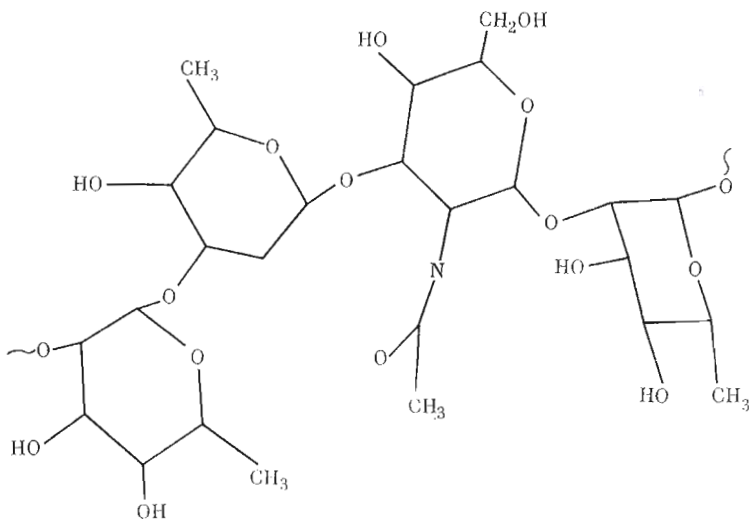


Рис. 3. Молекулярная модель тетрасахарида Rha( $\alpha$ 1-3)Rha( $\alpha$ 1-3)GlcNAc( $\beta$ 1-2)Rha в конформации *ggg*

что конформация, стабилизированная дополнительными межостаточными взаимодействиями, обладает меньшей конформационной гибкостью, поэтому без специального учета энтропийного фактора нельзя правильно предсказать ее статистический вес.

Вместе с тем в тетрасахариде Rha( $\alpha$ 1-2)Rha( $\alpha$ 1-3)Rha( $\alpha$ 1-3)GlcNAc в отличие от тетрасахарида с центральным звеном Rha( $\alpha$ 1-2)Rha вероятность состояния *t* в звене Rha( $\alpha$ 1-3)Rha весьма значительна — 30% (табл. 4). Так, вклад структур *gtg* и *g'tg* равен 27%. Вклад структур с *gosh*-конформациями всех дисахаридных звеньев, *ggg* и *g'gg*, составляет 65,5% (табл. 2). Таким образом, указанные четыре структуры практически полностью описывают конформационные состояния тетрасахарида.

*Rha*( $\alpha$ 1-3)*Rha*( $\alpha$ 1-3)*GlcNAc*( $\beta$ 1-2)*Rha*. Из конформационного анализа данного тетрасахарида следует важный вывод, который остается в силе и для всего полисахарида, что состояние *t* для центрального звена Rha( $\alpha$ 1-3)GlcNAc практически нереально из-за недопустимого сближения концевых остатков рамнозы. В случае *gosh*-конформации этого звена какие-либо взаимодействия между указанными остатками отсутствуют. Также нет дополнительной стабилизации какого-либо конформера трисахаридных звеньев. Поэтому распределение по конформациям на концевых звеньях тетрасахарида Rha( $\alpha$ 1-3)Rha и GlcNAc( $\beta$ 1-2)Rha (табл. 4) совпадает с таковым для свободных дисахаридов (табл. 1). Пространственное строение тетрасахарида практически можно описать только структурами *ggg* и *ggg'*, общий статистический вклад которых равен 88,5% (табл. 2). Молекулярная модель одной из них дана на рис. 3.

Таким образом, конформационный анализ тетрасахаридных повторяющихся звеньев полисахарида *S. flexneri*, где помимо ближних взаимодействий также учтены дополнительные взаимодействия между более удаленными остатками, несомненно, полнее отражает конформационную ситуацию для целого полисахарида. Прежде всего это относится к данным по конформационному распределению дисахаридных звеньев, когда они являются центральными в соответствующих тетрасахаридах (табл. 4).

В целом дисахаридное приближение для полисахаридной цепи в данном конкретном примере работает и является грубым приближением действительной картины. В самом деле, в звеньях GlcNAc( $\beta$ 1-2)Rha и Rha( $\alpha$ 1-2)Rha распределение по конформациям (табл. 4) почти такое же, как в свободных дисахаридных (табл. 1). Что касается звеньев Rha( $\alpha$ 1-3)GlcNAc и Rha( $\alpha$ 1-3)Rha, то расчет олигосахаридов внес заметный корректив: так, в звеньях Rha( $\alpha$ 1-3)GlcNAc становится запрещенным состояние *t*; напротив, в случае Rha( $\alpha$ 1-3)Rha статистический вес этого состояния увеличивается.

Преимуществом для дисахаридных звеньев рассматриваемого полисахарида является конформер  $g$ , содержание которого в зависимости от звена колеблется от  $\sim 45$  до  $100\%$  (табл. 4). Вклад конформера  $g'$  с отрицательным значением угла  $\psi$  также может быть значительным. Например, в дисахаридном звене  $Rha(\alpha 1-2)Rha$  он составляет  $\sim 50\%$ , что указывает на большую свободу вращения по углу  $\psi$  для этих звеньев. Что касается состояния  $t$  с неудовлетворительным по критерию экзо-аномерного эффекта значением угла  $\phi$  ( $< 0^\circ$ ), то только на звеньях  $Rha(\alpha 1-3)Rha$  его вклад может быть существен ( $\sim 30\%$ ). Таким образом, в полисахариде *S. flexneri* наиболее вероятны следующие конформационные состояния звеньев: для  $Rha(\alpha 1-3)GlcNAc$  только  $g$ , для  $GlcNAc(\alpha 1-2)Rha - g$  и  $g'$ , для  $Rha(\alpha 1-2)Rha - g$  и  $g'$ , для  $Rha(\alpha 1-3)Rha - g$  и  $t$ . Поэтому в пентасахаридных фрагментах углеводной цепи  $Rha(\alpha 1-3)GlcNAc(\beta 1-2)Rha(\alpha 1-2)-Rha(\alpha 1-3)Rha$  скорее всего реализуются следующие структуры:  $gggg$ ,  $gg'gg$ ,  $ggg'g$ ,  $gg'g'g$ ,  $gggt$ ,  $gg'gt$ ,  $ggg't$ ,  $gg'g't$ .

Результаты данной работы (см. также [10]) показывают, что пространственные структуры углеводных цепей в водной среде определяются только невалентными взаимодействиями. Меньшая вероятность на дисахаридных звеньях олигосахаридов конформационных состояний типа  $t$ , которую Лемье [13] связывает с влиянием экзо-аномерного эффекта, на самом деле определяется их меньшей энергетической или энтропийной предпочтительностью. Это наглядно продемонстрировано на примере расчета тетрасахаридов  $GlcNAc(\beta 1-2)Rha(\alpha 1-2)Rha(\alpha 1-3)Rha$  и  $Rha(\alpha 1-2)-Rha(\alpha 1-3)Rha(\alpha 1-3)GlcNAc$ , для которых учет энтропийного фактора привел к существенной коррекции конформационного распределения (табл. 2). Поэтому те выводы работы Тогерсена и соавт. [14], которые основываются на результатах расчета конформаций олигосахаридов, не учитывающего энтропию локальных состояний (см. табл. 1 в [14]), нельзя признать достоверным.

Все рассмотренные олигосахаридные фрагменты полисахарида *S. flexneri* являются конформационно-лабильными системами. В этой связи важно отметить, что недопустимость описания пространственной структуры дисахаридных звеньев олигосахаридных цепей только конформерами типа  $g_{0H}$  ( $\phi \sim 60^\circ$ ,  $\psi \sim 10^\circ$ ) убедительно продемонстрирована в недавно опубликованной работе Хоманса с соавт. [21]. В ней проведены измерения не только одномерного ядерного эффекта Оверхаузера в углеводных цепях гликопротеинов, но и двумерного ядерного эффекта Оверхаузера. Это позволило правильно отнести все сигналы в спектрах ЯМР. Так, для звена  $Man(\alpha 1-3)Man$  (очевидно, что конформации звеньев  $Rha(\alpha 1-3)Rha$ , представленных в полисахариде *S. flexneri*, должны быть сходными) среднее значение угла  $\phi$  оказалось близким к  $0^\circ$ , что указывает на существенный вклад конформеров типа  $t$ . Этот экспериментальный результат хорошо согласуется с нашим расчетом (табл. 4).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kenne L., Lindberg B., Petersson K., Romanowska E. Carbohydr. Res., 1977, v. 56, p. 363-370.
2. Josephson S., Bundle D. R. Can. J. Chem., 1979, v. 57, p. 3073-3079.
3. Bundle D. R., Josephson S. Carbohydr. Res., 1980, v. 80, p. 75-85.
4. Wessel H.-P., Bundle D. R. Carbohydr. Res., 1983, v. 124, p. 301-311.
5. Bundle D. R., Gidney M. A. J., Josephson S., Wessel H.-P. ACS Symposium Series. 1983, v. 231, p. 49-63.
6. Bock K., Josephson S., Bundle D. R. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1982, № 1, p. 59-70.
7. Липкин Г. М., Кочетков Н. К. Биооргани. химия, 1984, т. 9, № 9, с. 1229-1241.
8. Липкин Г. М., Кочетков Н. К. Биооргани. химия, 1984, т. 9, № 12, с. 1670-1679.
9. Липкин Г. М., Кочетков Н. К. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 3, с. 407-418.
10. Липкин Г. М., Веровский В. Е., Кочетков Н. К. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 9, с. 1269-1284.
11. Kitaigorodsky A. I. Tetrahedron, 1961, v. 14, № 3/4, p. 230-236.
12. Scott R. A., Scheraga H. A. J. Chem. Phys., 1966, v. 44, № 8, p. 3054-3068.
13. Lemieux R. U. Chem. Soc. Rev., 1978, v. 7, № 4, p. 423-452.
14. Thøgersen H., Lemieux R. U., Bock K., Meyer B. Can. J. Chem., 1982, v. 60, № 1, p. 44-57.

15. Jeffrey G. A., Yates J. H. Carbohydr. Res., 1981, v. 96, № 2, p. 205-213.
16. Стрэддарт Дж. Стереохимия углеводов. М.: Мир, 1975, с. 94.
17. Gō N., Gō M., Scheraga H. A. Macromolecules, 1974, v. 7, № 1, p. 137-139.
18. Killean R. C. G., Lawrence J. L., Sharma V. C. Acta crystall., 1971, v. B27, № 9, p. 1707-1710.
19. Mo F. Acta chem. scand., 1979, v. A33, № 3, p. 207-218.
20. Arnott S., Scott W. E. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1972, № 3, p. 324-335.
21. Homans S. W., Dwek R. A., Fernandes D. L., Rademacher T. W. FEBS Lett., 1983, v. 164, № 2, p. 231-235.

Поступила в редакцию  
29.VI.1984  
После доработки  
23.X.1984

## THEORETICAL CONFORMATIONAL ANALYSIS OF TETRASACCHARIDE REPEATING UNITS OF THE *SHIGELLA FLEXNERI* O-ANTIGENIC POLYSACCHARIDE

LIPKIND G. M., KOCHETKOV N. K.

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

Theoretical conformational analysis of four tetrasaccharide repeating units of the *Shigella flexneri* serogroup Y polysaccharide has been carried out. Interdependency of conformational states of neighbouring disaccharide units in the oligosaccharides has been investigated and conformational distribution of tetrasaccharides in solution calculated. Taking into account the entropy of oligosaccharide chains is shown to lead to significant correction of the results.