



УДК 547.458.022 : 543.422.25

КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ РАЗВЕТВЛЕННОГО О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА *SALMONELLA* *ARIZONAE* O63 (*ARIZONA* O8) ПО ДАННЫМ ¹³C-ЯМР

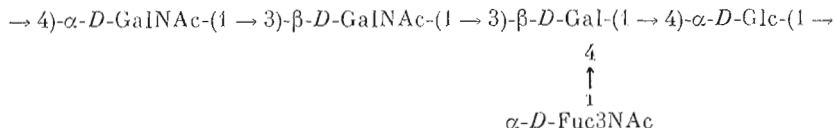
Липкин Г. М., Шашков А. С., Кочетков Н. К.

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

Метод компьютерного анализа структур регулярных полисахаридов на основе данных ¹³C-ЯМР распространен на случай разветвленных полисахаридов. Приняты во внимание отклонения от аддитивности величин эффектов гликозилирования для остатков, расположенных в узлах разветвления. Метод апробирован на примере структуры полисахарида *Salmonella arizonae* O63

Недавно для структурного анализа регулярных полисахаридов нами был разработан компьютерный метод определения структуры полисахаридов по данным спектров ¹³C-ЯМР [1]. С помощью этого метода были установлены структуры ряда бактериальных полисахаридов линейного строения без химической фрагментации и анализа получаемых фрагментов.

В данной работе рассматривается расширение этого метода на случай разветвленных полисахаридов и приводится первый пример установления строения О-специфического полисахарида *Salmonella arizonae* O63:



Строение этого полисахарида ранее было установлено путем предварительного отщепления боковой цепи в виде остатка $\alpha\text{-D-Fuc3NAc}$ безводным фтористым водородом с последующим анализом ¹³C-ЯМР-спектра [2].

Как известно [1], алгоритм решения структурной задачи для линейных полисахаридов этим методом включает три этапа: 1) генерация всех возможных структур полисахарида данного моносахаридного состава; 2) расчет ¹³C-ЯМР-спектра для каждой из этих структур исходя из химических сдвигов соответствующих моносахаридов и средних значений эффектов гликозилирования; 3) поиск структуры (структур), для которых рассчитанный спектр наиболее близок экспериментальному.

Однако для разветвленных полисахаридов расчет ¹³C-ЯМР-спектров по аддитивной схеме не может быть использован, так как в этом случае для моносахаридных остатков, расположенных в узле ветвления, наблюдаются значительные отклонения (иногда до 5 м.д. [3]) экспериментальных химических сдвигов ¹³C от рассчитанных по аддитивной схеме. В первую очередь это относится к моносахаридным остаткам, замещенным по соседним вицинальным гидроксильным группам.

Таким образом, для распространения компьютерного метода анализа на разветвленные полисахариды следует учитывать эти отклонения от аддитивности в величинах эффектов гликозилирования в узлах разветвления, которые могут быть получены, например, из ¹³C-ЯМР-спектров разветвленных трисахаридов с вицинальным замещением. В работе [3] отклонение от аддитивности *D* определено как разность экспериментальных и вычисленных химических сдвигов ¹³C рассматриваемого трисахарид.

Сдвиги рассчитывали по аддитивной схеме исходя из спектров соответствующих дисахаридов и моносахаридного остатка в узле разветвления.

Химические сдвиги остатков основной и боковой цепей, находящихся вне узла разветвления, рассчитывали по формуле, приведенной в работе [1]:

$$\delta(l) = \delta_0(l) + A(k, l) + B(k', l),$$

где l — номер атома углерода, $\delta_0(l)$ и $\delta(l)$ — химические сдвиги ^{13}C свободного моносахарида и соответствующего остатка в полисахариде; $A(k, l)$ и $B(k', l)$ — матрицы эффектов гликозилирования, вызванные гликозилированием данного остатка (индекс типа связи k) и образованием им гликозидной связи (индекс типа связи k') соответственно. Тогда формула для расчета химических сдвигов δ для центрального остатка узла разветвления принимает следующий вид:

$$\delta(l) = \delta_0(l) + A(k, l) + B(k', l) + A(k'', l) + D(k, k'', l),$$

где $A(k'', l)$ — эффекты гликозилирования данного остатка остатком боковой цепи (индекс типа связи k''), $D(k, k'', l)$ — отклонения от аддитивности эффектов гликозилирования, зависящие от двух индексов: k и k'' . Следует отметить, что химические сдвиги заместителей остатка в узле разветвления также претерпевают изменения (это касается главным образом атомов C1). Поэтому в этом случае

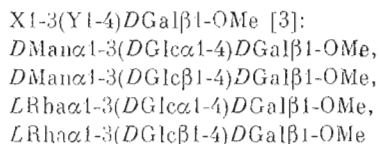
$$\delta(l) = \delta_0(l) + A(k, l) + B(k', l) + C(k, k'', l),$$

где $C(k, k'', l)$ — отклонения от аддитивности химических сдвигов гликозилирующих остатков.

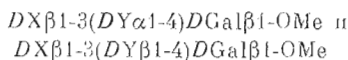
При компьютерном анализе полисахарида *S. arizonae* O63 при генерации его структур учитывали все возможные варианты последовательностей как основной, так и боковой цепей; последние могут включать от одного до четырех остатков. Вместе с тем во внимание принимали только те структуры, которые удовлетворяют данным метилирования [2] (в узле разветвления должен находиться остаток галактозы, замещенный в положениях 3 и 4, а остаток *D*-Fuc3NAc является терминальным сахаром боковой цепи). Это обстоятельство ограничивает число вариантов перестановок из 5 моносахаридных остатков в повторяющемся звене до 12. Кроме того, учитывали только те структуры, в которых три моносахаридных остатка имеют α -конфигурацию, а два — β -конфигурацию, что следует из данных по константам $^1J_{\text{C1,H1}}$ для пяти аномерных атомов углерода [2].

Необходимые для расчета спектров матрицы эффектов гликозилирования приведены в табл. 2 работы [1]. Что касается матрицы отклонений от аддитивности D для остатка галактозы в узле разветвления, то в случае замещения по положениям 3 и 4 этого остатка двумя *D*-сахарами могут быть четыре комбинации связей:

$\alpha 1 \rightarrow 3, \alpha 1 \rightarrow 4; \alpha 1 \rightarrow 3, \beta 1 \rightarrow 4; \beta 1 \rightarrow 3, \alpha 1 \rightarrow 4; \beta 1 \rightarrow 3, \beta 1 \rightarrow 4$. Таким образом, эта матрица содержит 4 строки и 6 столбцов (табл. 1). Используемые в этой таблице величины отклонений от аддитивности эффектов гликозилирования найдены из ^{13}C -ЯМР-спектров трисахаридов типа



соответственно. Использование данных по двум последним трисахаридам вполне допустимо в первом приближении, так как они стереохимически подобны (определение см. в работе [4]) соответствующим трисахаридам



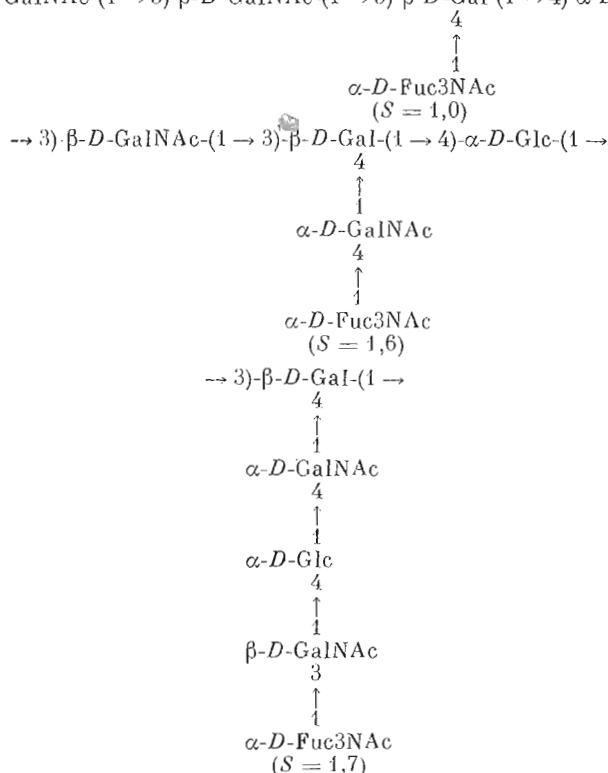
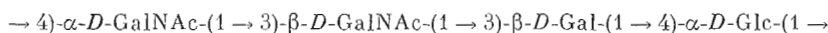
(X и Y — какие-либо моносахаридные остатки в пиранозной форме) с конфигурацией остатков β -*D*-*D* в звеньях с типом связи 1 $\rightarrow$ 3. Близость значений инкрементов D в стереохимически родственных трисахаридах нами

Величины отклонений от аддитивности эффектов гликозилирования,
в миллионных долях (матрицы D и C) в узле разветвления
X1-3 (Y1-4)DGalβ1-OMe [3]

Типы связей	Остаток Gal						Остаток X	Остаток Y
	D						C	
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C1	C1
α1-3, α1-4	0	-0,4	-0,5	-0,8	0	0	0,3	-0,1
α1-3, β1-4	0	-0,3	0,6	-1,3	0	0	1,0	-0,6
β1-3, α1-4	0	0,7	-2,5	0	0	0	-0,6	0
β1-3, β1-4	0	0,4	-2,4	-2,7	0	0	-0,7	-1,2

показана на ряде примеров [3]. В табл. 1 также приведены отклонения от аддитивности в химических сдвигах для атомов углерода C1 остатков X и Y в узле разветвления [3] (матрицы C).

Ниже приводятся результаты проведенного расчета с указанием для каждой предполагаемой структуры полисахарида *S. arizonae* O63 числа S — квадратичного отклонения рассчитанного спектра ^{13}C -ЯМР от экспериментального, нормированного на один остаток [1]. Ранее нами было показано, что кандидаты на реальную структуру полисахарида должны иметь величину $S \leq 1,5$, поэтому выделены структуры, которым соответствуют величины $S \sim 1,5$ (во всех остальных случаях величины $S > 2,5$).



Из приведенных данных следует, что из более чем 1000 принятых во внимание вариантов структуры полисахарида *S. arizonae* O63 (с учетом данных метилирования и количества α - и β -связей, см. выше) его экспериментальному спектру удовлетворяют только три структуры, при этом структура с наименьшим значением $S(1,0)$ точно соответствует реальной

Химические сдвиги (δ , м. д.) рассчитанного и экспериментального
(в скобках) ^{13}C -ЯМР-спектров полисахарида *S. arizonae* O63

Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6
-4GalNAc α 1-	94,6 (95,3)	51,0 51,0	68,5 68,8	79,2 79,2	72,4 72,4	61,7 61,5)
-3-GalNAc β 1-	103,8 (103,8)	52,0 51,8	76,5 76,0	65,4 65,5	76,4 76,0	62,2 62,3)
-3,4Gal β 1-	104,0 (104,1)	71,7 71,8	81,3 80,7	78,0 77,1	76,5 76,8	61,5 61,2)
-4Glc α 1-	101,3 (101,3)	72,7 72,8	72,6 72,8	79,9 79,8	71,9 72,3	61,1 61,2)
Fuc3NAc α 1-	101,2 (99,7)	67,4 67,7	52,1 52,1	71,8 72,2	68,1 68,1	16,8 16,6)

структуре полисахарида *S. arizonae* O63 [2]. В табл. 2 дано отнесение сигналов экспериментального спектра ^{13}C -ЯМР полисахарида [2] согласно проведенному расчету.

Таким образом, проведенный расчет показывает принципиальную возможность приложения компьютерного метода анализа и к разветвленным полисахаридам. Очевидно, что по мере накопления экспериментальных данных ^{13}C -ЯМР для трисахаридных узлов разветвления, включающих нужные стереохимические комбинации моносахаридов, предсказательная точность этого метода будет повышаться. Это обстоятельство открывает возможности бездеструктивного анализа полисахаридов самого различного строения.

Экспериментальная часть

^{13}C -ЯМР-спектр снят на приборе Bruker AM-300 в D_2O при 60°C с использованием в качестве внутреннего стандарта ацетона (δ , 31,45 м.д.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lipkind G. M., Shashkov A. S., Knirel Yu. A., Vinogradov E. V., Kochetkov N. K. // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. № 1. P. 59-75.
2. Виноградов Е. В., Книрель Ю. А., Липкинд Г. М., Шашков А. С., Кочетков Н. К., Станиславский Е. С., Холодкова Е. В. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 10. С. 1399-1404.
3. Липкинд Г. М., Шашков А. С., Нечасов О. А., Торгов В. И., Шибасов В. Н., Кочетков Н. К. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 10. С. 1366-1374.
4. Shashkov A. S., Lipkind G. M., Knirel Yu. A., Kochetkov N. K. // Magn. Reson. Chem. 1988. V. 26. № 9. P. 735-747.

Поступила в редакцию
29.III.1989

A COMPUTER-ASSISTED STRUCTURAL ANALYSIS OF THE BRANCHED O-SPECIFIC POLYSACCHARIDE OF *SALMONELLA ARIZONAE* 063 (ARIZONA 08) ON THE BASIS OF ^{13}C NMR DATA

LIPKIND G. M., SHASHKOV A. S., KOCHETKOV N. K.

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

A computerised approach to the structural analysis of branched regular polysaccharides on the basis of the ^{13}C NMR spectra is described. Deviations from additivity of the glycosidation effects for the monosaccharides arranged in branch points are taken into account. The approach has been verified by using data on bacterial polysaccharide of *S. arizonae* O63.