



УДК 547.458.02:577.114.012.7

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ КОНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ СПЕЦИФИЧЕСКИХ О-АНТИГЕННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

ПОЛИСАХАРИД *SHIGELLA DYSENTERIAE* СЕРОТИПА 2

ДипкинѢ Г. М., Кочетков Н. К.

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

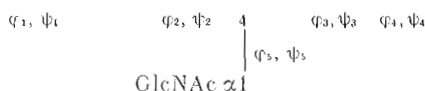
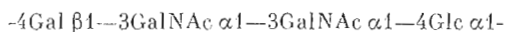
Проведен теоретический конформационный анализ полисахарида *Shigella dysenteriae* серотипа 2 с повторяющимися единицами следующего строения:



Показано, что пространственные формы полимера определяются в первую очередь конформационными состояниями звеньев  $\text{Glc } \alpha 1-4\text{Gal}$ , образующих внутренние изгибы цепи. Низкоэнергетические структуры полисахарида представляют собой левые спирали с числом повторяющихся единиц в витке, равным  $\sim 3$ , и с трансляцией единицы на ось спирали  $\sim 12$  А. Максимально доступными для межмолекулярных взаимодействий оказываются ацетамидные группировки боковых остатков N-ацетилглюкозаминов. Поэтому данные группы могут определять иммунологическую специфичность полисахарида.

О-Специфические полисахаридные цепи входят в состав липополисахаридов внешних мембран грамотрицательных бактерий. Они экспонированы на клеточной поверхности и являются носителями О-антигенных детерминант грамотрицательного микроорганизма [1]. Определение первичной и пространственной структур О-специфических полисахаридов представляет собой основу для понимания молекулярной природы иммунологической специфичности бактериальной клетки.

В данном сообщении излагаются результаты теоретического конформационного анализа О-специфического полисахарида *Shigella dysenteriae* серотипа 2. Химическое строение полисахаридов всех 10 серотипов группы *Sh. dysenteriae*, в том числе и серотипа 2, установлено Дмитриевым и соавт. [2, 3]. Исследуемый полисахарид имеет регулярное строение и содержит пентасахаридные повторяющиеся единицы следующей структуры:



Характерная особенность ряда антигенных полисахаридов состоит в том, что в условиях, близких к условиям существования клетки (в водном растворе), они могут обладать вполне определенной вторичной структурой [4]. Существование упорядоченных конформаций может быть важным фактором для функционирования О-специфических полисахаридов на поверхности клетки.

Какие-либо данные о пространственной структуре полисахаридов *Sh. dysenteriae* отсутствуют. Поэтому расчет возможных конформаций одного из соединений данной группы представляет существенный интерес. Ранее нами было проведено подобное исследование для полисахаридов бактерий рода *Salmonella* [5-7].

Конформации углеводных цепей определяются углами вращения вокруг гликозидных связей C1-O( $\varphi$ ) и O-C( $\psi$ ). Регулярные конформации

Геометрические ( $\varphi$ ,  $\psi$ , град) и энергетические ( $U$ , ккал/моль) параметры дисахаридных звеньев полисахарида *Sh. dysenteriae* серотипа 2

Номер конформера	$\varphi$	$\psi$ *	$U$	Номер конформера	$\varphi$	$\psi$	$U$	Водородные связи
GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc				Glc $\alpha$ 1-4Gal				
1	-50	-30	0,3	1	-40	-20	0,4	
2	10	20	2,3	2	-10	30	1,7	
GalNAc $\alpha$ 1-4Glc				Gal $\beta$ 1-3GalNAc				05...03.
1	-40	-20	0,8		(-15	35)	(-2,1) **	
2	10	30	2,2	1	60	-10	1,4	
GlcNAc $\alpha$ 1-4GalNAc				2	30	-50	1,6	
1	-40	-20	-0,3		(30	-60)	(-2,0)	05...04
2	-20	30	1,6	3	180	-10	4,0	

\* Угол  $\varphi$  равен нулю, когда связи C1—H и O—C4 (или O—C3) находятся в плоскости гликозидных связей и занимают *cis*-ориентацию по отношению друг к другу. Угол  $\psi=0$  при *cis*-расположении связей C1—O и C4—H (или C3—H). Положительное направление вращения соответствует движению по часовой стрелке, если смотреть от атома C1 к мостиковому атому кислорода и от последнего — к атому углерода (см. также работу [5]).

\*\* Величины в скобках отвечают конформациям с водородной связью и найдены при условии равенства энергии оптимальной водородной связи —4,5 ккал/моль.

рассматриваемого полисахарида задаются 10 углами вращения  $\varphi_1 \dots \varphi_5$  (они отмечены на приведенной химической структуре молекулы).

Для конформационных расчетов необходимо знание пространственной структуры моносахаридных остатков. Структуры остатков  $\alpha$ -D-GalNAc,  $\alpha$ -D-GlcNAc,  $\alpha$ -D-Glc и  $\beta$ -D-Gal взяты из соответствующих рентгенографических и нейтронографических исследований [8—11]. Валентный угол у мостикового кислорода, включенного в гликозидные связи, принят равным  $117^\circ$  [12].

При определении энергии конформеров нами учитывались невалентные взаимодействия атомов и внутримолекулярные водородные связи, а также торсионный вклад. Электростатические взаимодействия не учитывались, так как в углеводных цепях они не играют заметной роли [5]. Для функций невалентных взаимодействий использована параметризация, предложенная Журкиным и соавт. [13], полученная при использовании современных данных по ван-дер-ваальсовым радиусам атомов. Эти функции для алифатических атомов близки к функциям Момани и соавт. [14]. Их использование приводит к удовлетворительному описанию экспериментальных данных по конформациям олиго- и полисахаридных цепей [15]. Образование внутримолекулярных водородных связей учитывалось с помощью потенциала типа Морзе [16], в котором в зависимости от среды используются различные величины оптимальной энергии водородной связи O...H—O.

Нас интересуют конформации полисахарида *Sh. dysenteriae* серотипа 2 в водном растворе, представляющем функциональную среду клетки, и в кристаллическом состоянии. Ранее нами было показано, что в воде энthalпия образования водородных связей OH...O в углеводных цепях должна быть близка к нулю [15], поэтому ее можно не учитывать. Энергия оптимальной водородной связи O—H...O в кристаллических условиях принята равной —4,5 ккал/моль [17].

В работе специально не учитывался энергетический компонент, соответствующий экзоаномерному эффекту, которому в некоторых расчетах конформаций углеводов уделяется значительное внимание [18]. Однако при критическом отборе функций невалентных взаимодействий, по-видимому, в этом нет необходимости. Как будет показано в конечных результатах данного расчета, самые низкоэнергетические по невалентным взаимодействиям структуры оптимальны и по критерию экзоаномерного эффекта, т. е. на дисахаридных звеньях агликон ориентируется в *gosh*-положении по отношению к связи C1—O5 псевдосоединяющего остатка.

Конформации дисахаридных звеньев (табл. 1). При минимизации потенциальной энергии полимера в качестве нулевых приближений для параметров  $\varphi_1 \dots \varphi_5$  принимались углы вращения в локальных минимумах

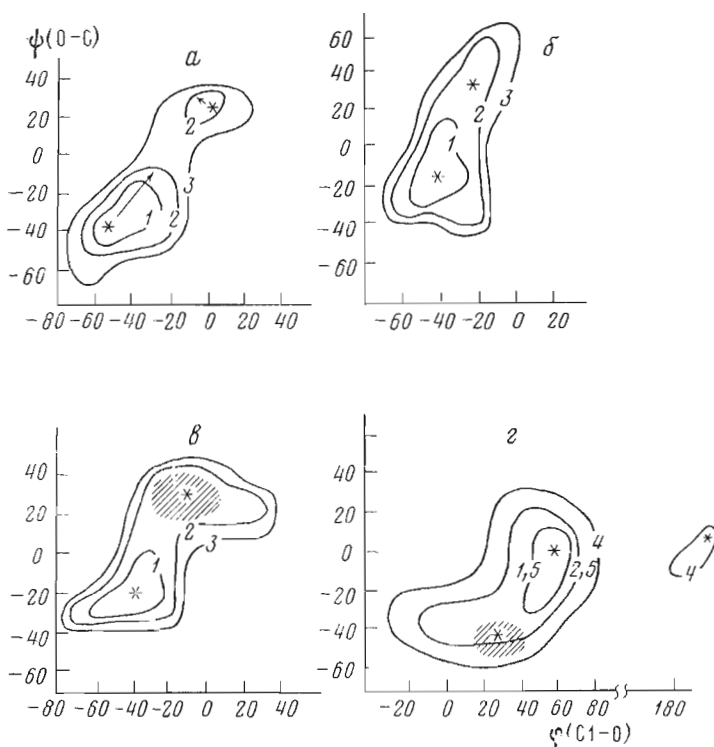


Рис. 1. Конформационные карты  $\varphi(C1-O) - \psi(O-C3)$  и  $\varphi(C1-O) - \psi(O-C4)$  невалентных взаимодействий дисахаридов GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc (а), GlcNAc $\alpha$ 1-4GalNAc (б), Glc $\alpha$ 1-4Gal (в) и Gal $\beta$ 1-3GalNAc (г). Углы даны в градусах. Звездочкой помечены положения локальных минимумов. Штрихованные области соответствуют конформациям с внутримолекулярной водородной связью O—H...O. На рис. а стрелками указаны изменения оптимальных углов вращения звена GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc при включении его в полисахаридную цепь

потенциальной поверхности каждого дисахаридного звена, т. е. рассматривались структуры, оптимальные по ближним взаимодействиям.

В рассматриваемом полисахариде имеется три дисахаридных звена, невозстанавливающим остатком которых является N-ацетилгликозамин: GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc, GalNAc $\alpha$ 1-4Glc, GlcNAc $\alpha$ 1-4GalNAc. Присутствие у атомов C2 N-ацетилгликозамина ацетамидной группы приводит к серьезному ограничению свободы вращения вокруг гликозидных связей дисахаридов (ср. рис. 1а, б, с 1в, г), прежде всего по углу  $\varphi$ ; так, запрещенными становятся значения угла  $\varphi > 0^\circ$ .

Несмотря на химические и структурные различия, для всех трех дисахаридов выделяется практически одна и та же низкоэнергетическая конформация с углами вращения  $\varphi -40^\circ \div -50^\circ$  и  $\psi -20^\circ \div -30^\circ$ . В случае звена GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc ацетамидные группы остатков имеют характерную направленность в противоположные стороны относительно гликозидной связи. Эта конформация оптимальна и по экзаномерному эффекту, так как агликон располагается в *gosh*-ориентации по отношению к связи C1—O5 остатка N-ацетилгликозамина. Вторая разрешенная конформация дисахаридов (табл. 1), неудовлетворительная по этому критерию ( $\varphi \sim 0^\circ$ ), является также более высокоэнергетической и по энергии невалентных взаимодействий (относительный проигрыш составляет  $\sim 2$  ккал/моль), поэтому в свободном состоянии дисахаридов статистический вес данной конформации незначителен. Ни в одном из рассмотренных звеньев внутримолекулярные водородные связи не образуются.

Несмотря на различия в химическом строении двух других дисахаридных звеньев — Glc $\alpha$ 1-4Gal и Gal $\beta$ 1-3GalNAc, их конформационные возможности близки. Прежде всего для них самой низкоэнергетической по невалентным взаимодействиям является конформация, в которой абсолютное значение угла  $\varphi$  находится в границах  $40-60^\circ$ . Вес такой конформации в

растворе должен быть подавляющим, так как при указанных значениях угла  $\varphi$  свобода вращения по углу  $\psi$  максимальна (от  $-40$  до  $+10$ ), что обуславливает ее энтропийную преимущественность. Это хорошо видно на рис. 1 в и з, где низкоэнергетические эквиваленты максимально вытянуты по углу  $\psi$  как раз при равенстве  $\varphi$   $60^\circ$  в случае  $\text{Gal}\beta 1\text{-3GalNAc}$  и при  $\varphi -40^\circ$  в случае  $\text{Glc}\alpha 1\text{-4Gal}$ . Таким образом, в водной среде равновесие должно быть смещено в сторону конформаций с  $|\varphi| \sim 40\text{--}60^\circ$ . Это обусловлено прежде всего характером конформационного распределения дисахаридов, определяемого формой потенциальной поверхности, приведенной на рис. 1, а не дополнительными электронными взаимодействиями, с которыми связывают природу экзаномерного эффекта [18].

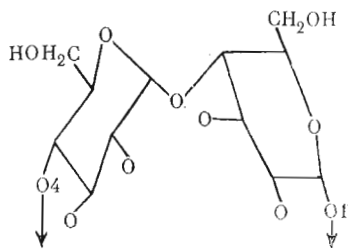


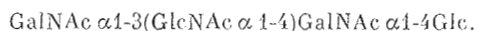
Рис. 2. Молекулярная модель дисахарида  $\text{Glc}\alpha 1\text{-4Gal}$

На конформационных картах дисахаридов  $\text{Glc}\alpha 1\text{-4Gal}$  и  $\text{Gal}\beta 1\text{-3GalNAc}$  выделяется второй, более высокоэнергетический по невалентным взаимодействиям минимум. Такое состояние мало вероятно в воде. Однако это именно те конформации, в которых возможно образование внутримолекулярных водородных связей. В случае структуры  $\text{Glc}\alpha 1\text{-4Gal}$  это водородная связь  $\text{Glc}(O5\cdots H-O3)\text{Gal}$ , в случае  $\text{Gal}\beta 1\text{-3GalNAc}$  — связь  $\text{Gal}(O5\cdots H-O4)\text{GalNAc}$ . В малополярной среде или в кристаллическом состоянии конформеры 2 становятся самыми низкоэнергетическими (табл. 1). Отметим, что углы вращения, полученные при оптимизации энергии конформеров 2 при учете только невалентных взаимодействий и при учете помимо этой составляющей потенциала водородной связи, почти совпадают. Отсюда следует, что оптимальная по невалентным взаимодействиям конформация 2 дисахаридов уже приспособлена для образования внутримолекулярной водородной связи и изменение полярности среды влияет только на ее относительную энталпию.

Своеобразие допустимых конформаций дисахарида  $\text{Glc}\alpha 1\text{-4Gal}$  (как в варианте 1, так и варианте 2, табл. 1) состоит в том, что агликоновой атом кислорода  $O4$  остатка глюкозы и гликозидный атом  $O1$  остатка галактозы, через которые указанное звено включается в полисахаридную цепь, располагаются по одну сторону от пиранозидных колец дисахарида и на близком расстоянии друг от друга (рис. 2), вследствие чего полисахаридная цепь на этом звене обязательно изменяет свое направление, или, иначе говоря, это звено образует изгиб цепи.

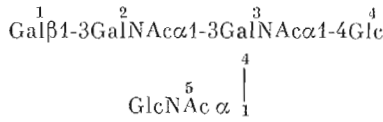
*Пентасахаридное звено  $\text{Gal}\beta 1\text{-3GalNAc}\alpha 1\text{-3(GlcNAc}\alpha 1\text{-4GalNAc}\alpha 1\text{-4Glc}$ .* На следующем этапе расчета выяснялось, в какой мере более дальние взаимодействия, например между концевыми остатками в пределах трисахаридных, тетрасахаридных звеньев и т. д., именуемые обычно средними взаимодействиями, могут влиять на энергетическую дифференциацию пространственных форм полисахарида.

Такой анализ мы начали с фрагмента цепи, включающего остаток с боковой цепью и по одному остатку справа и слева от него, т. е. с тетрасахарида



Этот тетрасахарид является конформационно-жестким узлом молекулы, так как включает в себя сразу три остатка с объемными N-ацетилидными группировками. Его расчет позволяет уточнить ориентацию боковых цепей в полисахариде. Оказалось, что между остатком глюкозы на восстанавливающем конце и боковой цепью какие-либо невалентные взаимодействия отсутствуют. Напротив, они весьма существенны между боковой цепью и остатком N-ацетилгалактозамина с невосстанавливающего конца тетрасахарида. Более того, при углах вращения, оптимальных для дисахаридных звеньев  $\text{GalNAc}\alpha 1\text{-3GalNAc}$  и  $\text{GlcNAc}\alpha 1\text{-4GalNAc}$ , между указанными остатками возникают недопустимые ван-дер-ваальсовы контакты, след-

Углы вращения (град), общие энергии ( $U$ , ккал/моль), а также энергии взаимодействия боковой цепи с остатками галактозы и N-ацетилгалактозамина ( $U_{5-1}$  и  $U_{5-2}$ ) в оптимальных конформациях пентасахарида



Идентификаторы конформаций*	$U^{**}$	$U_{5-1}$	$U_{5-2}$	$\varphi_1$	$\psi_1$	$\varphi_2$	$\psi_2$	$\varphi_3$	$\psi_3$	$\varphi_5$	$\psi_5$
111 <sup>2*</sup>	5,0	-1,4	-2,2	58,5	-15,7	-30,6	-8,0	-39,2	-19,8	-15,2	-38,0
211	6,1 (2,1)	-0,8	-2,4	37,1	-54,2	-30,0	-6,1	-39,2	-19,8	-16,7	-37,0
311	$\infty$	$\infty$	-1,0	180,0	-10,0	-30,0	-0,0	-39,2	-19,8	-25,0	-23,0
121	7,5	-1,2	-0,2	46,0	-34,1	-11,8	27,0	-39,2	-19,8	0,0	34,2
221	8,0 (4,3)	-1,0	0,2	29,6	-50,5	-15,5	27,9	-39,2	-19,8	-0,8	32,0
321	$\infty$	$\infty$	0,0	180,0	-10,0	-17,0	31,0	-39,2	-19,8	1,5	33,6

\* Конформации пентасахарида 112 ( $U$  6,5 ккал/моль), 212 ( $U$  7,5), 312 ( $U$   $\infty$ ) 122 ( $U$  8,9), 222 ( $U$  9,4), 322 ( $U$   $\infty$ ) отличаются от соответствующих конформеров этого столбца только значениями углов  $\varphi_3$ ,  $\psi_3$ , которые в этом случае равны 10,2 и 19,5°.

\*\* Первой цифрой идентификатора закодированы значения  $\varphi_1$ ,  $\psi_1$ , второй —  $\varphi_2$ ,  $\psi_2$  и т. д., согласно номеру дисахаридного конформера в табл. 1.

\*\* Величины энергии в скобках получены при учете образования водородной связи звеном Gal $\beta$ -1-3GalNAc.

ствие чего при оптимизации потенциальной энергии тетрасахарида получены значения углов вращения, существенно отличные от указанных в табл. 1. Из проведенного расчета следует, что боковой остаток N-ацетилглюкозамина имеет характерную направленность в сторону невозстанавливающего конца цепи тетрасахарида и вступает в контакты с соседними моносахаридными остатками с указанной стороны.

Анализ более длинных олигосахаридных фрагментов (пента-, гекса-, гепта-) показывает, что другим остатком, с которым может эффективно взаимодействовать боковая цепь, является остаток галактозы в пентасахариде Gal $\beta$ -1-3GalNAc $\alpha$ -1-3(GlcNAc $\alpha$ -1-4)GalNAc $\alpha$ -1-4Glc. Поэтому нами проведена оптимизация энергии конформеров пентасахарида, результаты которой даны в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что состояния дисахаридных звеньев GalNAc $\alpha$ -1-3GalNAc и GlcNAc $\alpha$ -1-4GalNAc в пентасахариде являются несколько напряженными по невалентным взаимодействиям, так как допустимые углы вращения  $\varphi$  и  $\psi$  не менее чем на 20° отличаются от оптимальных значений, приведенных в табл. 1. Например, в низкоэнергетической конформации дисахарида GalNAc $\alpha$ -1-3GalNAc углы  $\varphi$ ,  $\psi$  равны -50°, -30°, тогда как в пентасахариде оптимальными для углов  $\varphi_2$ ,  $\psi_2$  становятся значения  $\sim$ -30°, -10°. Изменение углов в звене GalNAc $\alpha$ -1-3GalNAc при включении его в цепь показано на рис. 1а стрелками. При состоянии 1 этого звена для боковой цепи реальные углы вращения  $\varphi_5 \sim$ -20°,  $\psi_5 \sim$ -40° (табл. 2), соответствующие конформеру 1 дисахарида GlcNAc $\alpha$ -1-4GalNAc в табл. 1. Напротив, при другой конформации звена остова GalNAc $\alpha$ -1-3GalNAc, определяемой углами  $\varphi_2$ ,  $\psi_2 \sim$ -10°, 30° (табл. 2), более вероятна другая, более высокоэнергетическая ориентация 2 ( $\varphi_3$ ,  $\psi_3 \sim$ 0°, 30°) боковой цепи (табл. 2).

В результате оптимизации энергии конформаций пентасахарида найдены структуры, в которых остатки N-ацетилглюкозамина, галактозы и N-ацетилгалактозамина оказываются расположенными компактно на расстояниях ван-дер-ваальсовых контактов и между ними действуют существенные силы дисперсионного притяжения: в оптимальных вариантах соответствующая энергия близка к -3 ккал/моль (см. данные столбцов 3 и 4 табл. 2).

На звене GalNAc $\alpha$ -1-3GalNAc по-прежнему преобладает конформер 1, который дополнительно стабилизируется эффективными невалентными взаимодействиями с боковой цепью. При другом состоянии этого звена 2

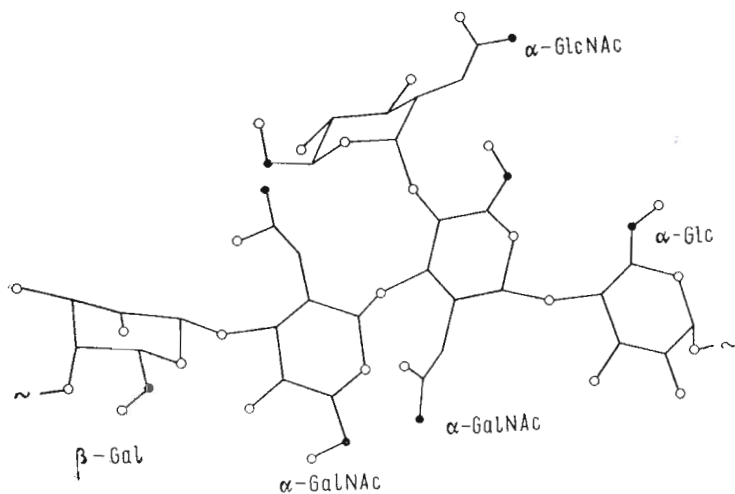


Рис. 3. Модель конформации 111 (табл. 2) пентасахаридного звена Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-3(GlcNAc $\alpha$ 1-4)GalNAc $\alpha$ 1-4Glc

(табл. 1) проигрыш в такой энергии составляет 2–3 ккал/моль (ср., например, данные столбцов 3 и 4 табл. 2 для конформеров 111 и 121). Энергия дисперсионных взаимодействий бокового остатка с остатком галактозы основной цепи равна  $\sim -1$  ккал/моль (табл. 2). Но это имеет место только в том случае, когда звенья Gal $\beta$ 1-3GalNAc представлены состояниями 1 или 2. Конформер 3 этого дисахарида ( $\varphi$  180°,  $\psi$  -10°) в пентасахариде становится запрещенным из-за недопустимого сближения галактозы с N-ацетилглюкозаминном, поэтому мы исключаем его из дальнейшего рассмотрения. Отметим, что какие-либо водородные связи боковой остаток N-ацетилглюкозамина с основной цепью не образует.

Из восьми допустимых конформаций преимущественными являются две — 111 и 121 (табл. 2). Первая конформация, самая низкоэнергетическая по невалентным взаимодействиям, более вероятна в водной среде, вторая — в кристаллическом состоянии; последней при учете образования водородной связи на звене Gal $\beta$ 1-3GalNAc соответствует минимум внутримолекулярной энергии (табл. 2). В целом рассматриваемый пентасахарид представляет собой конформационно-жесткую структуру, так как реализуется при избранных значениях углов вращения дисахаридных звеньев.

Модель оптимальной структуры 111 пентасахарида (рис. 3) свидетельствует, что основная цепь олигосахарида имеет довольно развернутую форму. Все остатки проектируются на одну прямую, на которую также попадают гликозидный атом кислорода глюкозы и агликоновый атом O4 остатка галактозы, посредством которых пентасахарид включается в цепь. Расстояние между указанными концевыми атомами кислорода также характеризует форму олигосахаридной цепочки. В конформации 111 оно равно 16 Å. Интересно, что во всех остальных семи оптимальных конформациях пентасахарида оно также составляет  $16 \pm 0,2$  Å. Из этого следует, что длина его цепи мало чувствительна к углам вращения в дисахаридных звеньях. Более того, пространственные формы всего полисахарида *Sh. dysenteriae* серотипа 2 также должны не очень сильно зависеть от конформационного состояния пентасахаридных фрагментов.

*Полисахаридная цепь Sh. dysenteriae serotuna 2.* Рассмотренный в предыдущем разделе статьи пентасахарид образует фрагменты цепи полимера, разделенные гликозидными связями звеньев Glc $\alpha$ 1-4Gal. Дисахарид Glc $\alpha$ 1-4Gal, как было показано, принимает такие конформации (рис. 2), которые обуславливают изгибы углеводной цепи. Таким образом, из структурного анализа фрагментов полисахарида *Sh. dysenteriae* следует, что его пространственные формы можно представить в виде че-



Параметры спиралей  $n$ ,  $h$  и  $d^*$  оптимальных структур полисахарида *Sh. dysenteriae* серотипа 2

Идентификаторы конформаций	$n^{**}$	$h$	$d$	Идентификаторы конформаций	$n$	$h$	$d$
1111	-3,3	11,0	5,5	1112	-3,4	0,3	8,3
2111	-2,6	12,5	3,5	2112	-3,0	4,5	7,3
1211	-3,3	9,3	6,4	1212	-3,0	3,0	7,1
2211	-2,7	10,3	5,2	2212	-2,9	1,0	7,3
1121	5,4	3,2	13,1	1122	3,0	9,5	5,9
2121	-4,5	5,2	10,9	2122	3,6	7,7	8,3
1221	3,9	4,8	9,5	1222	2,5	10,0	4,9
2221	3,8	1,1	9,8	2222	2,7	9,7	5,7

\*  $n$  — число остатков в витке,  $h$  — трансляция (в Å) повторяющейся единицы вдоль оси спирали,  $d$  — диаметр (в Å) спирали, определенный по атомам O1 остатков галактозы. Параметры спиралей вычислены по алгоритму [19].

\*\* Знак «минус» перед значением  $n$  соответствует левым спиральям, «плюс» — правым.

редования конформационно-жестких развернутых сегментов (стержней) — пентасахаров Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-3(GlcNAc $\alpha$ 1-4)GalNAc $\alpha$ 1-4Glc и изгибов (в звеньях Glc $\alpha$ 1-4Gal). В общем случае полисахарид *Sh. dysenteriae* серотипа 2 может образовывать более или менее компактные спирали. Развернутые структуры, наблюдаемые, например, в целлюлозе, для него просто нереальны.

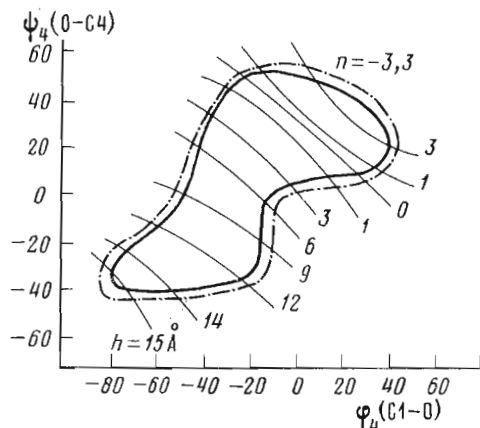
Чтобы получить более достоверные данные об углах вращения в оптимальных конформациях полисахарида и о средних взаимодействиях между остатками вдоль цепи, нами проведен конформационный анализ декасахарида, в котором центральным является звено изгиба Glc $\alpha$ 1-4Gal: Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-3(GlcNAc $\alpha$ 1-4)GalNAc $\alpha$ 1-4Glc $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-3(GlcNAc $\alpha$ 1-4)GalNAc $\alpha$ 1-4Glc. Во внимание принимались восемь конформаций концевых пентасахаридов (табл. 2) и две конформации звена Glc $\alpha$ 1-4Gal (табл. 1).

Расчеты показали, что в оптимальных конформациях столь длинного олигосахариды, несмотря на наличие центрального изгиба, в основной цепи реализуются только ближние взаимодействия в пределах дисахаридных звеньев, какие-либо дополнительные взаимодействия между более удаленными остатками отсутствуют. Что касается боковых цепей, то они вступают только во взаимодействия, обсуждаемые в предыдущем разделе при расчете пентасахариды (табл. 2). Таким образом, энергии конформеров декасахарида являются аддитивной суммой энергий соответствующих конформеров концевых пентасахаридов (табл. 2) и дисахариды Glc $\alpha$ 1-4Gal. Оптимизированные параметры  $\phi_1$ ,  $\phi_2$  этого звена в декасахарида составляют в одном случае  $-39,4$  и  $-21,4^\circ$  (вариант 1) и в другом  $-10,7$  и  $32,9^\circ$  (вариант 2), т. е. очень близки к значениям (это относится и к энергиям), приведенным в табл. 1.

Так как средние взаимодействия вдоль основной цепи отсутствуют, найденные оптимизированные значения углов вращения  $\phi_1 \dots \phi_4$  позволяют рассчитать параметры спиралей оптимальных конформаций полисахарида *Sh. dysenteriae* серотипа 2. Параметры спиралей  $n$ ,  $h$  и  $d$  приведены в табл. 3.

Поскольку размеры пентасахаридов, разделенных гликозидными связями звеньев Glc $\alpha$ 1-4Gal, не сильно зависят от углов вращения, можно допустить, что пространственные формы рассматриваемой полисахаридной цепи в первую очередь определяются углами вращения в дисахаридных фрагментах Glc $\alpha$ 1-4Gal. Данные табл. 3 в целом подтверждают это предположение. Так, конформации 1111, 2111, 1211 и 2211, которые различаются состояниями звеньев Gal $\beta$ 1-3GalNAc и GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc, тем не менее имеют близкие параметры спиралей ( $n \sim -3$  (знак «минус» соответствует левым спиральям) и  $h \sim 10-12$  Å). Итак, пространственные структуры полисахарида *Sh. dysenteriae* серотипа 2 прежде всего определяются конформационными состояниями звеньев Glc $\alpha$ 1-4Gal.

Рис. 4. Контуры одинаковых значений трансляции повторяющейся единицы на ось спирали  $h$  (Å) полисахарида *Sh. dysenteriae* серотипа 2 в зависимости от углов вращения  $\varphi_1, \psi_1$  (град) в звеньях Glc $\alpha$ 1-4Gal (остальные звенья представлены конформерами 1 табл. 1). Жирной линией выделена эквипотенциаль 3 ккал/моль на энергетической поверхности этого дисахарида (рис. 1). Во всех конформациях в пределах этой эквипотенциала число единиц в витке  $n = -3,3$  (штрихпунктир).



Зависимость параметров спиралей  $n$  и  $h$  полисахарида от углов вращения  $\varphi_1$  и  $\psi_1$  во фрагментах Glc $\alpha$ 1-4Gal (при условии, что остальные звенья представлены состояниями 1) дана на рис. 4. Мы ограничились низкоэнергетической областью на конформационной карте  $\varphi$ - $\psi$  указанного дисахарида (рис. 1а) в пределах 3 ккал/моль. На рис. 4 эта эквипотенциаль выделена жирной линией. Мы видим, что все низкоэнергетические конформации полисахарида *Sh. dysenteriae* представляют собой левые спирали с числом повторяющихся единиц в витке, равным фактически 3. Таким образом, мы имеем пример, когда величина  $n$  не очень чувствительна к углам вращения в цепи. Напротив, величина трансляции повторяющейся единицы на ось спирали может изменяться в широких пределах, от 0 до 15 Å (рис. 4).

При значениях углов вращения  $\varphi_1$  и  $\psi_1$  дисахаридов Glc $\alpha$ 1-4Gal, соответствующих образованию внутримолекулярной водородной связи O5...H-O3 ( $\varphi_1 -10 \div -30^\circ$ ,  $\psi_1 20 \div 40^\circ$ ), величины  $h$  малы и равны 0-1 Å (рис. 4). В оптимизированной конформации 1112  $h = 0,3$  Å (табл. 3). Такие величины  $h$  означают, что цепь закручивается сама на себя и между остатками первой и третьей, а также первой и четвертой повторяющихся единиц неминуемы невалентные отталкивания, вследствие чего соответствующие спирали просто невозможны. Таким образом, ясно, что в полисахаридной цепи *Sh. dysenteriae* серотипа 2 образование внутримолекулярных водородных связей и существование конформеров типа 2 в звеньях Glc $\alpha$ 1-4Gal нереально. Даже те структуры, в которых величины  $h$  больше, в границах 3-4 Å (2112 или 1212 табл. 3), в кристаллическом состоянии не реализуются вследствие значительных диаметров спиралей. Вместе с тем при углах вращения конформации 1112 может возникнуть замкнутая структура из трех повторяющихся единиц.

Спирали с приемлемой трансляцией повторяющейся единицы вдоль оси образуются при углах вращения звеньев Glc $\alpha$ 1-4Gal, соответствующих области минимума 1 конформационной карты ( $\psi < 0^\circ$ , рис. 1 и 4). В оптимальных конформациях 1111 величина  $h$  равна 11 Å, а в конформации 2111 составляет 12,5 Å (табл. 3). Однако спирали могут быть и более растянутыми. Как видно из рис. 4, достаточно небольшого изменения угла  $\varphi_1$ , например с  $-40$  до  $-60^\circ$ , что сопровождается небольшим (в пределах 1 ккал/моль) увеличением энергии ближних невалентных взаимодействий, чтобы величина  $h$  стала равной 13,5-14 Å при сохранении симметрии спирали ( $n \sim -3$ ). Таким образом, в кристаллическом состоянии, в котором реализуются наиболее вытянутые формы полисахаридных цепей, для рассматриваемой структуры значения углов вращения  $\varphi, \psi$  звеньев Glc $\alpha$ 1-4Gal должны соответствовать области минимума 1 конформационной карты (рис. 1, табл. 1). В водном растворе это конформационное состояние ( $\varphi_1, \psi_1 \sim -40, -20^\circ$ ) указанных звеньев также должно быть представлено с подавляющим статистическим весом, что следует из анализа ближних невалентных взаимодействий (см. соответствующий раздел).



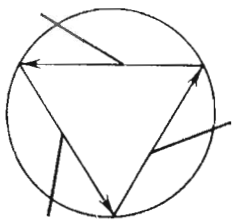


Рис. 5. Схематическая проекция спирали с осью симметрии третьего порядка. Прямые линии соответствуют жестким пентасахаридным фрагментам (см. текст). Углы между прямыми линиями образуют звенья  $\text{Glc}\alpha\text{-4Gal}$ . Жирными линиями выделены боковые цепи

Если принять во внимание, что в дисахаридах с невозстанавливающим остатком  $\text{N}$ -ацетилгалактозамина —  $\text{GalNAc}\alpha\text{1-3GalNAc}$  и  $\text{GalNAc}\alpha\text{1-4Glc}$  преимущественными являются конформеры 1 (это следует из данных табл. 1 и из данных по расчету пентасахарида, табл. 2), а в звеньях  $\text{Glc}\alpha\text{1-4Gal}$  реально также только состояние 1 (табл. 1), то можно утверждать, что самыми вероятными пространственными формами полисахарида *Sh. dysenteriae* серотипа 2 являются конформации 1111 и 2111, которые имеют близкие параметры спиралей (табл. 3). Отметим, что относительные энергии, которые приходятся на одну повторяющуюся единицу в конформациях полисахарида, также характеризуются данными табл. 2, поскольку нас интересуют структуры с одним и тем же состоянием 1 звеньев  $\text{Glc}\alpha\text{1-4Gal}$ .

Первая конформация 1111, в которой отсутствуют какие-либо внутримолекулярные водородные связи, с углами вращения  $\varphi_1$  58,5,  $\psi_1$  -15,7,  $\varphi_2$  -30,6,  $\psi_2$  -8,0,  $\varphi_3$  -39,2,  $\psi_3$  -19,8,  $\varphi_4$  -39,4,  $\psi_4$  -21,4,  $\varphi_5$  -15,2,  $\psi_5$  -38,0, более вероятна в водном растворе полисахарида, так как ей соответствует минимальная энергия невалентных взаимодействий (табл. 2). Несомненно, в растворе могут быть существенны конформационные флуктуации на дисахаридных звеньях. Поэтому, когда мы говорим о предпочтительности структуры 1111, то имеем в виду «среднюю» конформацию, представленную в растворе с наибольшим статистическим весом.

В кристаллическом состоянии более вероятна реализация структуры 2111 ( $\varphi_1$  37,7,  $\psi_1$  -57,2,  $\varphi_2$  -30,0,  $\psi_2$  -6,1,  $\varphi_3$  -39,2,  $\psi_3$  -19,8,  $\varphi_4$  -39,4,  $\psi_4$  -21,4,  $\varphi_5$  -16,7,  $\psi_5$  -37,0) благодаря энергетической стабилизации за счет образования внутримолекулярных водородных связей звеньями  $\text{Gal}\beta\text{1-3GalNAc}$ . Более того, в этой конформации по сравнению со структурой 1111 больше величина трансляции повторяющейся единицы ( $h=12,5$  Å) и меньше диаметр спирали (табл. 3), что также свидетельствует в ее пользу в кристаллических условиях. В оптимальной конформации 2111 число остатков в витке спирали  $n$  равно -2,6. Но этот результат получен для изолированной модели. В кристаллах полисахаридов, как правило, наблюдаются спирали с целым (и небольшим) числом остатков в витке [20]. Однако при небольших отклонениях углов вращения от оптимальных значений возможно образование структур типа 2111 с целым числом остатков в витке спирали. Например, при углах  $\varphi_1$  и  $\psi_1$  на звеньях  $\text{Gal}\beta\text{1-3GalNAc}$  40, -40° величина  $n$  равна -3,0.

Проведенный теоретический конформационный анализ позволяет заключить, что основным структурным мотивом полисахаридной цепи *Sh. dysenteriae* серотипа 2 является чередование фрагментов в развернутой конформации — пентасахаридов  $\text{Gal}\beta\text{1-3GalNAc}\alpha\text{1-3(GlcNAc}\alpha\text{1-4)-GalNAc}\alpha\text{1-4Glc}$  (рис. 3) и изгибов цепи, создаваемых дисахаридными звеньями  $\text{Glc}\alpha\text{1-4Gal}$  (рис. 2), в результате чего образуются не сильно растянутые спирали. На это указывает то, что трансляция на ось повторяющейся единицы ( $h$  10–13 Å) значительно меньше длины самой единицы (16 Å). Это левые спирали с осью симметрии третьего порядка, поскольку каждый виток включает три изгиба цепи (рис. 5). Спирали рассматриваемого полисахарида *Sh. dysenteriae* следует отнести к шейпу *eef* (о шейпах полисахаридов см. работу [5]).

Боковые остатки N-ацетилглюкозамина располагаются во внешней сфере спиралей полисахарида и имеют характерную направленность к невосстанавливающему концу цепи. Максимально удаленными от оси спирали оказываются ацетамидные группировки этих остатков, прежде всего карбонильные группы (см. рис. 3). Легкая доступность ацетамидных группировок остатков N-ацетилглюкозамина для межмолекулярных взаимодействий, например с молекулой антитела, позволяет предположить, что они могут быть важны в иммунологической специфичности полисахарида *Sh. dysenteriae* серотипа 2 и определяют один из его O-факторов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Lüderitz O. Eur. J. Biochem., 1973, v. 38, № 3, p. 453—488.
2. Дмитриев В. А., Кочетков Н. К. Докл. АН СССР, 1979, т. 245, № 3, с. 765—768.
3. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., Hofman I. L. Eur. J. Biochem., 1977, v. 76, № 3, p. 433—440.
4. Wolf Ch., Elsässer-Beile U., Stirm S., Dutton G. G. S., Burchard W. Biopolymers, 1978, v. 17, № 3, p. 731—748.
5. Липкинд Г. М., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 12, с. 1817—1829.
6. Липкинд Г. М., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 3, с. 391—400.
7. Липкинд Г. М., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1379—1383.
8. Gilardi R. D., Flippen J. L. Acta crystallogr., 1974, v. B30, № 12, p. 2931—2933.
9. Mo F., Jensen L. H. Acta crystallogr., 1975, v. B31, № 12, p. 2867—2873.
10. Jeffrey G. A., McMullan R. K., Takagi Sh. Acta crystallogr., 1977, v. B33, № 3, p. 728—737.
11. Sheldrick B. Acta crystallogr., 1976, v. B32, № 4, p. 1016—1020.
12. Arnott S., Scott W. E. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1972, № 3, p. 324—355.
13. Журкин В. Б., Полтев В. И., Флоренцьева В. А. Молекулярн. биология, 1980, т. 14, № 5, с. 1116—1130.
14. Motany F. A., Carruthers L. M., McGuire R. F., Scheraga H. A. J. Phys. Chem., 1974, v. 78, № 16, p. 1595—1620.
15. Липкинд Г. М., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 3, с. 407—418.
16. Липкинд Г. М., Архипова С. Ф., Попов Е. М. Ж. структурн. химии, 1970, т. 11, № 1, с. 121—126.
17. Пилментел Дж., Мак-Келлан О. Водородная связь. М.: Мир, 1964.
18. Lemieux R. M., Bock K., Delbaere L. T. J., Koto S., Rao V. S. Can. J. Chem., 1980, v. 58, № 6, p. 631—653.
19. Shimanouchi T., Mizushima S. J. Chem. Phys., 1955, v. 23, № 4, p. 701—711.
20. Atkins E. D. T. Pure and Appl. Chem., 1977, v. 49, № 8, p. 1135—1149.

Поступила в редакцию

5.I.1983

После доработки

23.III.1983

### THEORETICAL CONFORMATIONAL ANALYSIS OF SPECIFIC O-ANTIGENIC POLYSACCHARIDES. POLYSACCHARIDE OF *SHIGELLA DYSENTERIAE* SEROTYPE 2

LIPKIND G. M., KOCHETKOV N. K.

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

Theoretical conformational analysis of *Shigella dysenteriae* serotype 2 polysaccharide containing repeating unit:  $-4\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1-3(\text{GlcNAc}\alpha 1-4)\text{GalNAc}\alpha 1-4\text{Glc}\alpha 1-$  has been carried out. It is shown that spatial forms of the polymer are determined by conformational states of  $\text{Glc}\alpha 1-4\text{Gal}$  links which form the internal bends of the chain. The structures of low energy are shown to be left three-fold helices with an axially projected repeat of  $\sim 12 \text{ \AA}$ . N-Acetamide groups of side residues  $\alpha\text{-D-GlcNAc}$  are the most accessible for intermolecular interactions and may determine immunological specificity of the polysaccharide.