



УДК 577.114.012.7:543.422.25

КОНФОРМАЦИИ РАЗВЕТВЛЕННЫХ ТРИСАХАРИДОВ
С ВИЦИНАЛЬНЫМ ЗАМЕЩЕНИЕМ ПО ДАННЫМ ЯДЕРНЫХ
ЭФФЕКТОВ ОВЕРХАУЗЕРА И ТЕОРЕТИЧЕСКИХ РАСЧЕТОВ
I. ТРИСАХАРИДЫ С ЗАМЕЩЕНИЕМ ПО ПОЛОЖЕНИЯМ
3 И 4 ОСТАТКОВ ГАЛАКТОЗЫ

Динкинд Г. М., Исаилов А. С., Нечаев О. А.,
Торгов В. П., Шибанов В. Н., Кочетков Н. К.

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

Измерены ядерные эффекты Оверхаузера при облучении аномерных протонов и КССВ $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ и между атомами, разделенными межзвеньевой гликозидной связью, в ряде β -метилгликозидов трисахаридов с вицинальным замещением по положениям 3 и 4 остатков галактозы. На основании экспериментальных данных и теоретических конформационных расчетов показано, что в каждом из рассмотренных трисахаридов имеется один преимущественный конформер, относительный вклад которого в конформационное равновесие составляет не менее 90%.

Разветвленные олиго- и полисахариды широко распространены в природе. Пространственное строение таких структур тесно связано с конформационными особенностями узлов разветвления. В связи с этим нами проведен конформационный анализ трисахаридов с вицинальным расположением заместителей. Очевидно, что в этом случае несвязанные моносахаридные остатки могут находиться в непосредственной пространственной близости друг от друга, что должно приводить к ограниченно возможным конформациям такого рода соединений. Кроме того, в спектрах ^{13}C -ЯМР разветвленных олиго- и полисахаридов наблюдаются аномалии в величинах химических сдвигов, которые, возможно, также определяются особенностями конформации таких соединений.

Настоящая работа посвящена конформационному анализу β -метилгликозидов разветвленных трисахаридов с вицинальным замещением по положениям 3 и 4 остатка *D*-галактозы. Были рассмотрены соединения (I)–(IV) общей формулы * $\text{A1-4(B1-3)Gal}\beta\text{1-OMe}$:

- (I): $\text{A} = \text{Glc}\beta$, $\text{B} = \text{Man}\beta$;
(II): $\text{A} = \text{Glc}\beta$, $\text{B} = \text{Rha}\alpha$;
(III): $\text{A} = \text{Glc}\alpha$, $\text{B} = \text{Rha}\alpha$;
(IV): $\text{A} = \text{Glc}\alpha$, $\text{B} = \text{Man}\alpha$.

Трисахариды (I)–(IV) различаются как абсолютной конфигурацией заместителей, так и аномерными конфигурациями межзвеньевых связей; один из вицинальных заместителей в остатке галактозы занимает аксиальное, а другой — экваториальное положение. Конформационный анализ дисахаридных звеньев, входящих в состав трисахаридов (I)–(IV), был описан нами ранее [1].

Конформационными параметрами в углеводных цепях являются углы вращения вокруг межзвеньевых гликозидных связей (рис. 1). В звеньях $\text{Glc}\alpha\text{1-4Gal}$ трисахаридов (I)–(IV) углы вращения вокруг связей $\text{C1}'\text{-O}$ и O-C4 мы обозначили φ_1 и ψ_1 соответственно; номера атомов со штрихом относятся к остатку Glc. Для звеньев $\text{Rha}\alpha\text{1-3Gal}$ (или $\text{Man}\alpha\text{1-3Gal}$) углы вращения вокруг связей $\text{C1}''\text{-O}$ и O-C3 во фрагментах $\text{H1}''\text{-C}''\text{-O-C3}$

* Остатки Rha — *L*-ряда, остальные моносахариды — *D*-ряда.

и $C1''-O-C3-N3$ были обозначены как φ_2 и ψ_2 . Здесь номера атомов Rha или Man обозначаются двумя штрихами. Углы вращения φ_1 , ψ_1 , φ_2 и ψ_2 принимали равными нулю при *cis*-ориентации соответствующих связей C—H и C—O.

Как известно, наиболее существенными для конформационного анализа экспериментальными величинами, которые могут быть получены из спектров ЯМР, являются величины ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) в спектрах ^1H -ЯМР, отражающие пространственную сближенность несвязанных водородных атомов, а также величины КССВ $^3J_{C,H}$ для фрагментов H—C—O—C, включающих в себя атомы водорода соседних моносахаридных остатков. В связи с этим в настоящей работе проведено детальное исследование спектров ^1H -ЯМР трисахаридов (I)–(IV) (см. «Экспериментальная часть») и повторное изучение опубликованных ранее [2] спектров ^{13}C -ЯМР этих соединений.

Важно отметить, что данные по ЯЭО для соединений (I)–(IV) или родственных соединений в литературе отсутствуют. Поскольку спектры ^1H -ЯМР были сняты в D_2O , то параметры ЯЭО отражают конформационные состояния трисахаридов (I)–(IV) в водной среде. Из данных табл. 1 следует, что удастся наблюдать ЯЭО не только на протонах, относящихся к облучаемому моносахаридному остатку или остатку, связанному с ним гликозидной связью, но и на протонах не связанного с ним моносахаридного остатка (например, остатка В при облучении протона $\text{H}1'$ остатка А).

Экспериментальные данные по вицинальным КССВ $^3J_{C,H}$ во фрагментах $\text{H}1'-\text{C}1'-\text{O}-\text{C}4(J^{\text{H}1})$, $\text{C}1'-\text{O}-\text{C}4-\text{H}4(J^{\text{H}4})$, $\text{H}1''-\text{C}1''-\text{O}-\text{C}3(J^{\text{H}2})$ и $\text{C}1''-\text{O}-\text{C}3-\text{H}3(J^{\text{H}3})$ сведены в табл. 2.

Расчет оптимальных конформаций трисахаридов (I)–(IV) проводили, минимизируя потенциальную энергию молекул при изменении углов вращения φ_1 , ψ_1 , φ_2 и ψ_2 . При выборе начальных точек для минимизации энергии использовали данные по оптимальным конформациям дисахаридных звеньев [1], входящих в состав трисахаридов.

После определения самого низкоэнергетического конформера трисахаридов строили сечения поверхности его потенциальной энергии (конформационные карты) $\varphi_1-\psi_1$ (при фиксации углов φ_2 и ψ_2 в их оптимальных значениях) и $\varphi_2-\psi_2$ (при фиксации уже углов φ_1 и ψ_1). Такие конформационные карты дают представление о диапазоне допустимых значений углов вращения в рассматриваемом трисахариде.

Параметризация силового поля для расчетов трисахаридов требует специального комментария. В конформационном анализе 1–3- и 1–4-связанных гликозилгалактозидов было показано [1], что наилучшее согласие с экспериментальными данными дает использование атом-атомных потенциальных функций Скотта и Шераги [3]. Поэтому эти функции были первоначально использованы и при конформационном анализе разветвленных трисахаридов.

Однако в таком расчете воспроизвести количественно ЯЭО в трисахаридов (I)–(IV) не удалось. Рассчитанные величины ЯЭО между протонами не связанных между собой остатков (Glc и Man или Rha) оказываются явно завышенными. Это связано с тем, что в функциях Скотта и Шераги использовано наименьшее из принятых значений ван-дер-ваальсова радиуса атома водорода (1,2 Å). Возможно, что «удачные» атом-атомные потенциалы для расчета невалентных взаимодействий углеводных остатков, связанных межзвеньевой гликозидной связью, могут не соответствовать функциям, которые следует учитывать при определении энергии взаимодействий не связанных между собой остатков. Поэтому для расчета энергии взаимодействия не связанных между собой остатков были апробированы более «жесткие» потенциальные функции, предложенные Момани с соавт. [4] и Журкиным с соавт. [5]. В обоих случаях были получены одинаковые результаты, хорошо удовлетворяющие экспериментальным данным ЯЭО. Таким образом, в итоге в дисахаридных звеньях трисахаридов энергии рассчитывали по потенциалу Скотта и Шераги, а взаимодействия не связанных между собой остатков — по потенциалам Момани или Журкина.

ЯЭО (%), наблюдаемые при облучении аномерных протонов Н1' и Н1''
трисахаридов А1-4(В1-3)Galβ1-ОМе (I)–(IV) *

Трисахариды	Облучение Н1'		Облучение Н1''	
	наблюдаемые протоны	ЯЭО	наблюдаемые протоны	ЯЭО
(A) Glcβ1-4Galβ1-ОМе 3	H2'	2,8(0,5)	H2''	6,0(1,1)
	H3'+H5'	16,4(2,8)	H3	5,5(1)
	H4	5,9(1)	H4	5,9(1,1)
(B) Manα1 (I)	H1''	3,0(0,5)	H1'	3,2(0,6)
Glcβ1-4Galβ1-ОМе 3	H2''	3,4(0,6)		
	H2'	1,9(0,4)	H2''	5,6(1,1)
	H3'+H5'	10,2(2,1)	H3	5,0(1)
	H4	4,7(1)		
Rhaα1 (II)	H3''	3,0(0,6)		
	H5''	3,0(0,6)		
Glcα1-4Galβ1-ОМе 3	H2'	7,6(1)	H2''	9,8(1,3)
	H4	7,6(1)	H3	7,7(1)
	H6,H6	1,6(0,2)		
Rhaα1 (III)	H5''	1,7(0,2)		
Glcα1-4Galβ1-ОМе 3	H2'	9,0(1,6)	H2''	4,0(1,2)
	H4	5,5(1)	H3	3,4(1)
	H6,H6	6,3(1,1)	H4	3,4(1,0)
Manα1 (IV)			H1'	~0,5(0,15)
			H5'	1,0(0,3)

* В скобках даны отношения величины ЯЭО к ЯЭО для протона, связанного с углеродом, который образует гликозидную связь; номера атомов со штрихом относятся к остатку А-с двумя штрихами — к В.

Таблица 2

Экспериментальные значения КССВ
 $^3J_{C,H}$ (Гц) в трисахаридах
(I)–(IV)

Трисаха- риды	$J\psi_1$	$J\psi_1$	$J\psi_2$	$J\psi_2$
(I)	4,1	5,1		3,4
(II)	4,1	5,3	3,7	5,0
(III)		4,8		4,8
(IV)	3,9	5,0	3,1	3,5

Таблица 3

Оптимальные двугранные углы вращения
(град) в преимущественных конформерах
трисахаридов (I)–(IV)

Три- сахара- риды	$\varphi_1(C1'-O)$	$\psi_1(O-C4)$	$\varphi_2(C1''-O)$	$\psi_2(O-C3)$
(I)	57,2	8,3	-58,4	-38,8
(II)	55,6	14,0	58,1	12,1
(III)	-23,2	13,9	58,0	21,1
(IV)	-35,8	-24,3	-69,5	-43,8

О параметризации других составляющих энергии олигосахаридов в водной среде см. [6, 7]. Необходимые для конформационных расчетов данные по пространственным структурам соответствующих аномеров остатков Glc, Gal, Man и Rha взяты из нейтронографических исследований [8–11]. Валентный угол у атома кислорода межзвеньевой гликозидной связи принят равным его среднему значению (116,7°) [12].

Проведенный конформационный анализ трисахаридов (I)–(IV) позволил далее выполнить теоретический расчет ЯЭО и сопоставить их с экспериментально найденными значениями. Теоретически ожидаемую величину изменения интенсивности сигнала протона d при насыщении протона s (f_s^d) рассчитывали по формуле Ширмера и соавт. [13]. Для сравнения с экспериментальными данными были вычислены средние величины ЯЭО $\langle f_s^d \rangle$ ($s=H1'$ и $H1''$), при определении которых учитывали бoльцмановские вероятности всех возможных конформаций данного трисахарида. В расчете статистических сумм трисахаридов для экономии машинного времени учитывали только те значения углов вращения, которым на сечениях поверхности потенциальной энергии соответствуют конформации с

Рис. 1. Модель разветвленного трисахарида A1-4(B1-3)Gal β 1-OMe

Рис. 2. Модель преимущественного конформера трисахарида (I) Glc β 1-4(Man α 1-3)Gal β -OMe (оптимальные углы вращения приведены в табл. 3). Стрелками показаны протоны, для которых зафиксированы ЯЭО

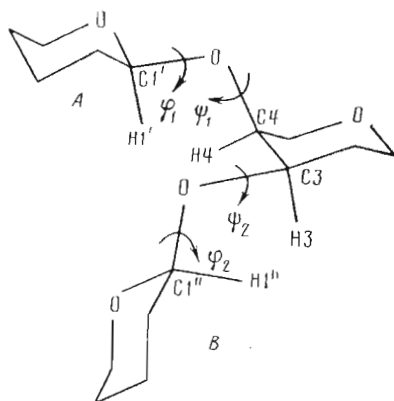


Рис. 1

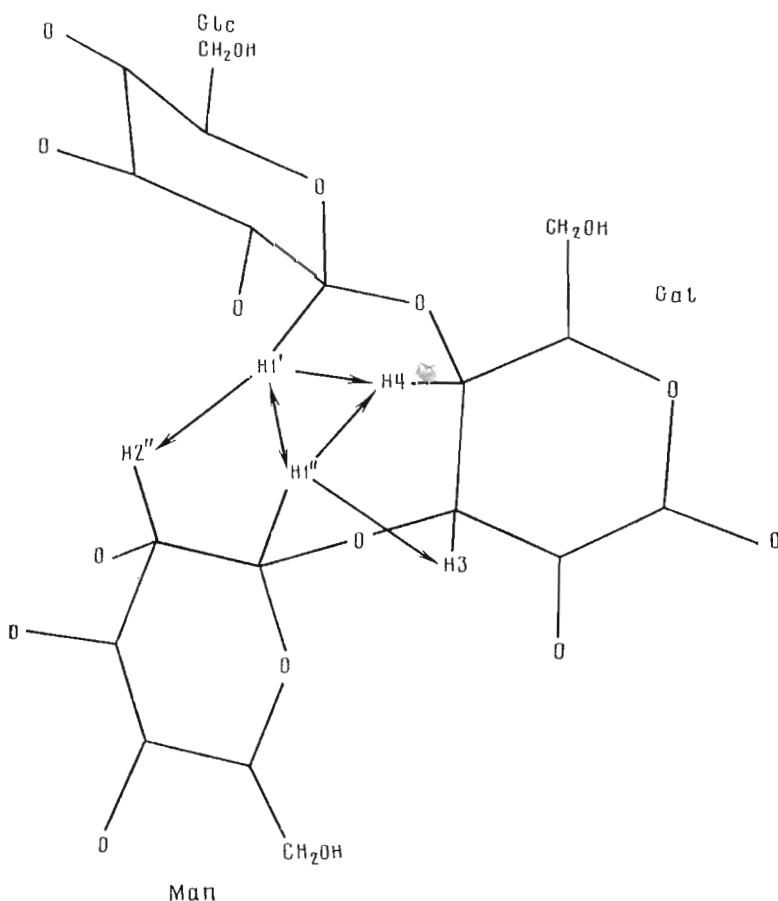


Рис. 2

относительной энергией, меньшей или равной 3 ккал/моль. Угол вращения меняли через 10° .

Сравнение экспериментальных и теоретически ожидаемых ЯЭО показало, что конформационное поведение четырех изученных трисахаридов удовлетворительно описывается одним конформером (см. табл. 3) (статистический вес $>90\%$). В табл. 4 представлены рассчитанные ЯЭО f_s^d в оптимальных конформерах, а также средние значения ЯЭО $\langle f_s^d \rangle$ и их относительные величины, используемые для сопоставления с соответствующими относительными величинами экспериментально наблюдаемых ЯЭО.

Рассчитанные средние значения ЯЭО ($\langle f_s^d \rangle$) (%), а также ЯЭО (f_s^d) в относительных конформациях трисахаридов (I)–(IV) *

Трисахариды	Облучение протона H1'			Облучение протона H1''		
	наблю- даемые протоны	f_s^d	$\langle f_s^d \rangle^*$	наблю- даемые протоны	f_s^d	$\langle f_s^d \rangle^*$
Glc β 1-4Gal β 1-OMe 3 Man α 1 (I)	H2'	5,1	5,8(0,5)	H2''	13,2	10,1(1,3)
	H3'	15,1	15,1(1,2)	H3	3,5	7,5(1)
	H5'	16,2	16,1(1,3)	H4	12,5	8,5(1,1)
	H4	8,1	12,1(1)	H1'	9,1	4,0(0,5)
	H1''	10,0	5,8(0,5)			
	H2''	7,5	6,8(0,6)			
Glc β 1-4Gal β 1-OMe 3 Rha α 1 (II)	H2'	6,0	6,0(0,5)	H2''	17,0	15,2(1,2)
	H3'	14,7	15,2(1,2)	H3	12,5	12,1(1)
	H5'	15,6	16,4(1,3)			
	H4	8,2	12,1(1)			
	H3''	14,0	7,1(0,6)			
	H5''	6,4	7,1(0,6)			
Glc α 1-4Gal β 1-OMe 3 Rha α 1 (III)	H2'	21,8	22,0(1)	H2''	17,2	15,1(1,3)
	H4	21,8	21,8(1)	H3	9,1	11,4(1)
	H6,H6	0	4,1(0,2)			
	H5''	3,8	5,1(0,25)			
Glc α 1-4Gal β 1-OMe 3 Man α 1 (IV)	H2'	22,1	21,8(1,8)	H2''	11,2	10,9(1,4)
	H4	11,2	12,1(1)	H3	2,1	8,0(1)
	H6,H6	15,1	12,9(1,1)	H4	11,0	9,1(1,1)
				H1'	0	0,5(0,08)
				H5'	5,1	3,2(0,4)

* См. примечание к табл. 1.

Обсуждение соответствия рассчитанных и экспериментальных данных проведено далее отдельно для каждого из трисахаридов.

Glc β 1-4(Man α 1-3)Gal β 1-OMe(I). В этом трисахариде при облучении аномерного протона H1' остатка Glc ЯЭО наблюдаются помимо атомов облучаемого остатка на протоне H4 остатка Gal, а также на двух атомах H1'' и H2'' остатка Man (табл. 1), что указывает на пространственную близость не связанных между собой остатков Glc и Man. При облучении аномерного протона H1'' остатка Man, как и в дисахариде Man α 1-3Gal β 1-OMe [1], наблюдаются ЯЭО на протонах H3 и H4 остатка Gal (табл. 1), а также, как и следовало ожидать, на протоне H1' (данные по облучению H1' см. в табл. 1).

При конформационном анализе трисахарид (I) выделяется один оптимальный конформер (рис. 2) с углами вращения ϕ_1 , ψ_1 , ϕ_2 и ψ_2 , приведенными в табл. 3. В этой конформации помимо протонов H1' и H4 в звене Glc β 1-4Gal ($r_{H1'-H4}$ =2,3 Å) и протонов H1'', H4 и H3 в звене Man α 1-3Gal ($r_{H1''-H4}$ =2,3, $r_{H1''-H3}$ =3 Å) также пространственно близки протоны остатков Glc (H1' и H2'') и Man (H1'' и H2''). Расстояния между указанными протонами $r_{H1'-H1''}$ и $r_{H1''-H2''}$ равны 2,35 и 2,7 Å соответственно.

Действительно, ЯЭО на протонах H1'' и H2'' при облучении протона H1' наблюдаются (табл. 1), при этом указанные эффекты только в 2 раза меньше ЯЭО на протоне H4, что указывает на значительный статистический вес предложенной конформации трисахарид (I).

В оптимальной конформации расчетные величины $f_{H1'}^{H4}$ и $f_{H1''}^{H1'}$ (или $f_{H1''}^{H2''}$) примерно равны, однако в расчете средних значений $\langle f_{H1'}^{H4} \rangle$, $\langle f_{H1''}^{H1'} \rangle$ и $\langle f_{H1''}^{H2''} \rangle$ (по методике, описанной во введении) воспроизводится экспериментальное отношение ЯЭО на протонах H1'' (или H2'') и H4, 1 : 2 (см. табл. 1 и 4). Также, в соответствии с экспериментальными данными, средние величины ЯЭО на протонах H3 и H4 при облучении прото-

на $H1''$ остатка Ман почти равны между собой и в 2 раза больше величины $\langle J_{H1''}^{H1''} \rangle$ (табл. 4).

Обратимся к сечениям поверхности потенциальной энергии трисахаридов (I) (рис. 3). На сечении для звена $Glc\beta 1-4Gal$ (рис. 3а) можно отметить небольшое сужение контура относительно энергии 1 ккал/моль по сравнению с величиной такого контура в свободном дисахариде $Glc\beta 1-4Gal\beta 1-OMe$ [4] (он показан пунктиром). Напротив, свобода вращения в звене $Man\alpha 1-3Gal$ претерпевает значительные изменения. Так, в трисахариде становятся запрещенными значительные по абсолютной величине отрицательные значения угла ψ_2 : $-40 \div -80^\circ$ (рис. 3б), которым соответствуют наиболее низкие энергии в свободном дисахариде $Man\alpha 1-3Gal\beta 1-OMe$ [4]. В трисахариде (I) в указанном интервале значений ψ_2 остаток Ман сближается до расстояний недопустимых контактов с остатком Glc.

Разная степень конформационной свободы в звене $Man\alpha 1-3Gal$ трисахаридов (I) и свободном дисахариде следует из данных ЯЭО. В дисахариде ЯЭО на протоне $H4$ при облучении протона $H1''$ остатка Ман в 2,2 раза больше, чем на протоне $H3$ [4], тогда как в трисахариде оба эти эффекта равны как по экспериментальным (табл. 1), так и по расчетным данным (табл. 4). На более высокие значения угла ψ_2 в трисахариде (I) указывает также сопоставление соответствующих констант J^{ψ} в трисахариде (3,4 Гц) и дисахариде $Man\alpha 1-3Gal\beta 1-OMe$ (2,7 Гц [4]).

Напротив, в звене $Glc\beta 1-4Gal$ трисахаридов (I) и в дисахариде $Glc\beta 1-4Gal\beta 1-OMe$ константы J^{ψ} равны ~ 5 Гц (табл. 2 и табл. 2 в работе [4]). В обоих случаях отношение ЯЭО на протонах $H2'$ остатка Glc и $H4$ остатка Gal равно 1 : 2 (табл. 1 и в табл. 1 в работе [4]). Это указывает на близость конформационных состояний звена $Glc\beta 1-4Gal$ в сопоставляемых молекулах.

Исходя из размеров контуров 1 ккал/моль на сечениях рис. 3 можно утверждать, что возможные колебания углов вращения вокруг межзвеньевых гликозидных связей невелики. Например, значения угла ψ_1 могут быть равны $0 \pm 10^\circ$, а угла ψ_2 — $-30 \pm 10^\circ$.

Таким образом, совокупность данных ЯЭО и расчетных результатов показывает, что в трисахариде (I) имеется единственный преимущественный конформер (рис. 2).

Glc\beta 1-4(Rha \alpha 1-3)Gal\beta 1-OMe (II). В этом трисахариде при облучении аномерного протона $H1'$ остатка Glc зафиксированы отклики на протоне $H4$ остатка Gal и протонах $H3''$ и $H5''$ остатка Rha (табл. 1). Таким образом, в трисахариде (II) по сравнению с трисахаридом (I) углеводный остаток в разветвлении развернут к остатку Glc другой своей стороной (относительно средней плоскости остатка). Облучение аномерного протона остатка Rha вызывает помимо ЯЭО на протоне $H2''$ только ЯЭО на протоне $H3$ остатка Gal (табл. 1).

В рассчитанной преимущественной конформации трисахаридов (II) (табл. 3, рис. 4) облучаемый протон $H1'$ остатка Glc пространственно сближен как с протоном $H4$ Gal, так и с протонами $H3''$ и $H5''$ остатка Rha (расстояния $r_{H1'-H4}$, $r_{H1'-H3''}$ и $r_{H1'-H5''}$ равны 2,4; 2,3 и 2,6 Å соответственно). Действительно, значительные ЯЭО на протонах $H3''$ и $H5''$ экспериментально наблюдаются (ЯЭО на протоне $H4$ только в 1,5 раза больше, чем на протонах $H3''$ и $H5''$, табл. 1), что полностью соответствует предложенной конформации трисахаридов (II). В расчете средних значений ЯЭО на указанных протонах удалось воспроизвести экспериментальные отношения ЯЭО. Так, $\langle J_{H1'}^{H3''} \rangle / \langle J_{H1'}^{H4} \rangle$ и $\langle J_{H1'}^{H5''} \rangle / \langle J_{H1'}^{H4} \rangle$ равны 0,6 (табл. 4).

Если сравнить конформационные карты $\varphi-\psi$ свободных дисахаридов [4], адекватных звеньям трисахаридов (II) (см. пунктирные контуры на рис. 5), с соответствующими сечениями на рис. 5, то прежде всего следует отметить значительное ограничение свободы вращения по углу ψ_2 в звене $Rha\alpha 1-3Gal$. К примеру, запрещенными становятся значения угла $\psi_2 < 0^\circ$, при которых остаток Rha «патаккивается» на остаток Glc. Поэтому

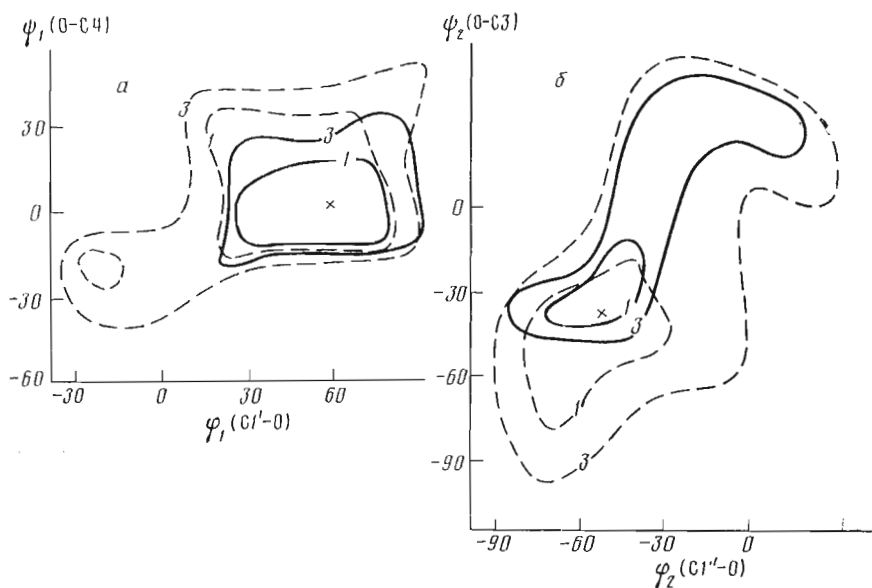


Рис. 3. Сечения поверхности потенциальной энергии трисахарида (I): $\varphi_1 - \psi_1$ ($\varphi_2 = -58,4^\circ$, $\psi_2 = -38,8^\circ$) (а) и $\varphi_2 - \psi_2$ ($\varphi_1 = 57,2^\circ$, $\psi_1 = 8,3^\circ$) (б). Указаны эквипотенциалы относительной энергии 1 и 3 ккал/моль. Крестиком даны положения локальных минимумов. Пунктиром показаны энергетические контуры в соответствующих свободных дисахаридах

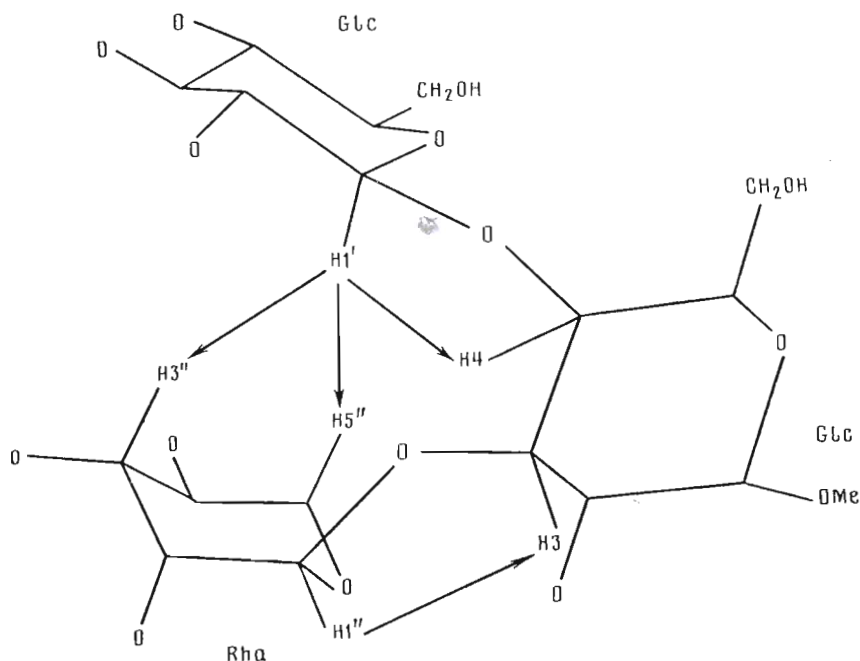


Рис. 4. Модель преимущественного конформера трисахарида (II) (Glc β 1-4 (Rha α 1-3)-Gal β 1-OMe (см. подпись к рис. 1)

преимущественный конформер дисахарида Rha α 1-3Gal β 1-OMe (φ , ψ 40, -50° , табл. 3 в работе [1]) в рассматриваемом трисахариде не реализуется вовсе. Таким образом, взаимодействия ковалентно не связанных остатков обуславливают более высокую структурную жесткость разветвленных олигосахаридов.

На ограничение свободы вращения в звене Rha α 1-3Gal трисахарида (II) указывает целый ряд данных. Так, в трисахариде ЯЭО на протоне H4 остатка Gal отсутствует, а в дисахариде Rha α 1-3Gal β 1-OMe, в котором

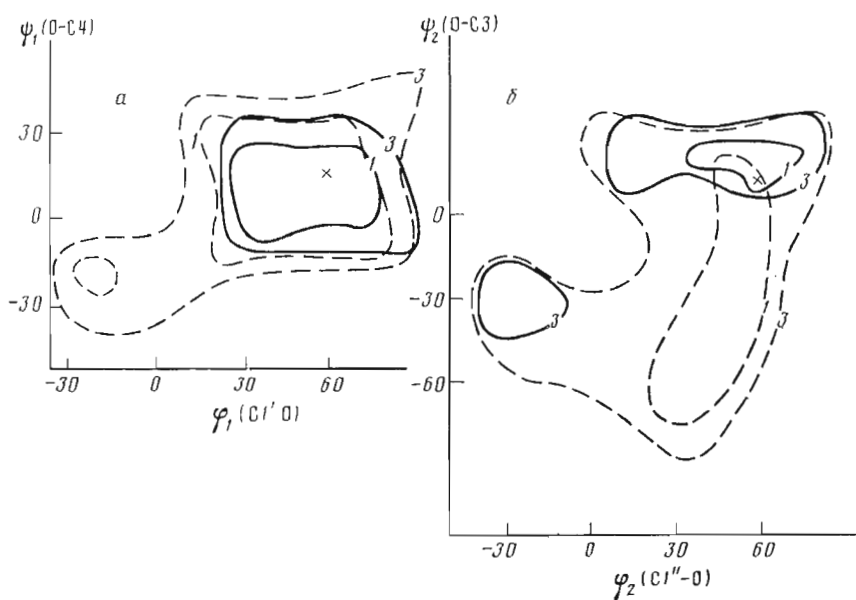


Рис. 5. Сечения поверхности потенциальной энергии трисахарида (II): $\varphi_1 - \psi_1$ ($\varphi_2 = 58,0^\circ$, $\psi_2 = 12,1^\circ$) (а) и $\varphi_2 - \psi_2$ ($\varphi_1 = 55,6^\circ$, $\psi_1 = 14,0^\circ$) (б). См. подпись к рис. 3

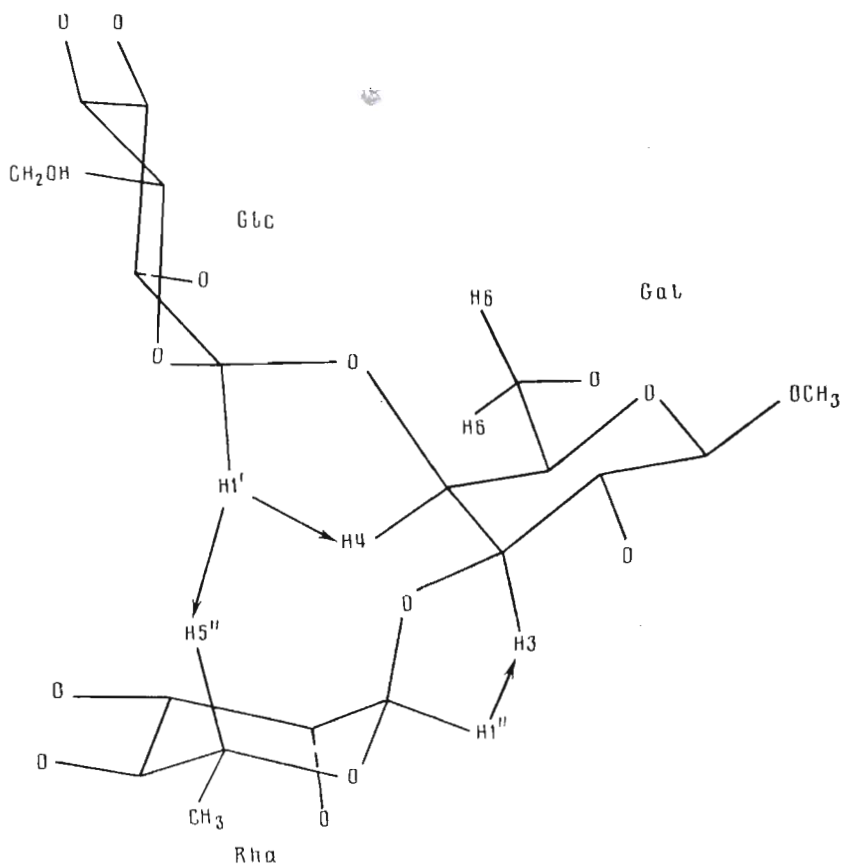


Рис. 6. Модель преимущественного конформера трисахарида (III) Glc α 1-4(Rha α 1-3)-Gal β 1-OMe

возможны отрицательные значения угла ψ , наблюдается ЯЭО, хотя и небольшой по величине [1]. На большее сближение протонов Н1" и Н3 в дисахариде указывает тот факт, что в нем отношение ЯЭО на протонах Н2" остатка Rha и Н3 остатка Gal < 1 (табл. 1 [1]), тогда как в трисахариде (II) это отношение > 1 (табл. 1). Далее, в дисахариде Rha α 1-3Gal β 1-ОМе КССВ J^* равна 4,1 Гц [1], в трисахариде соответствующая константа больше (5,4 Гц — табл. 2) и близка к своему предельному значению (см. [14]). Такая величина константы показывает, что значения угла ψ_2 должны быть близки 0°. Согласно сечению на рис. 4б, возможные значения угла ψ_2 равны $15 \pm 10^\circ$.

Таким образом, и в случае трисахарида (II) имеется один преимущественный конформер с ограниченной свободой вращения вокруг межзвеньевых гликозидных связей. В оптимальной конформации (рис. 4) несвязанные остатки Glc и Rha располагаются друг от друга на расстояниях сумм ван-дер-ваальсовых радиусов. Поэтому энергия взаимодействия этих остатков имеет отрицательную величину ($\sim -2,5$ ккал/моль). Таким образом, взаимное удаление несвязанных остатков приводило бы к проигрышу энергии их притяжения. В центре молекулы отметим гидрофобный кластер из атомов водорода (Н1', Н4, Н3", Н5", а также Н1" и Н3, рис. 3).

Glc α 1-4(Rha α 1-3)Gal β 1-ОМе (III). В трисахариде (III) обратим внимание на наличие ЯЭО между несвязанными остатками: при облучении протона Н1' остатка Glc наблюдается ЯЭО на протоне Н5" остатка Rha (табл. 1). В рассчитанной преимущественной конформации этого трисахарида (табл. 3) (ее молекулярная модель приведена на рис. 6) только указанные протоны остатков Glc и Rha сближены между собой. Они располагаются на расстоянии 2,8 Å (рис. 6).

В свободном дисахариде Glc α 1-4Gal β 1-ОМе возможны две конформации с углами вращения φ , $\psi - 40, -20^\circ$ и $-20, +30^\circ$ [1], из которых преимущественной является первая конформация (А) с отрицательными значениями угла ψ . Однако в трисахариде (III) отрицательные значения угла ψ_1 становятся мало вероятными из-за недопустимого сближения гидроксиметильной группы остатка Glc с остатком Rha. Поэтому в трисахариде низкоэнергетическим становится второй конформер В звена Glc α 1-4Gal со значением угла $\psi_1 \sim +15^\circ$ (табл. 3). Этот вывод подтверждается формой сечения $\varphi_1 - \psi_1$ потенциальной поверхности трисахарида на рис. 7.

Существенное различие конформационного состояния звена Glc α 1-4Gal в трисахариде (III) и дисахариде вытекает из значительной разницы в отношениях ЯЭО на протонах Н6, Н6 и Н4 остатка Gal при облучении протона Н1'. Если в дисахариде Glc α 1-4Gal β 1-ОМе ЯЭО на протонах Н6, Н6 в 2 раза слабее, чем на протоне Н4 (табл. 1 в работе [1]), то в трисахариде этот эффект слабее в 5 раз (табл. 1). Таким образом, конформер В с углами вращения φ , $\psi \sim -20, +15^\circ$ представлен в этом звене трисахарида (III) с подавляющим статистическим весом, тогда как доля конформера А, обуславливающего ЯЭО на протонах Н6, Н6, невелика ($\sim 10\%$, согласно статистическому расчету).

Что касается звена Rha α 1-3Gal, то вместо обширной области допустимых значений углов φ , ψ в свободном дисахариде Rha α 1-3Gal β 1-ОМе [1], в трисахариде допустимые значения угла ψ_2 находятся в границах $20 \pm 10^\circ$, а угла $\varphi_2 - 60 \pm 10^\circ$ (рис. 7б). Таким образом, в дисахаридных звеньях трисахарида (III) колебания по углам φ_1 , ψ_1 , φ_2 , ψ_2 от оптимальных значений не превышают 10° , что подтверждает конформационную жесткость этой структуры.

В расчете средних значений ЯЭО удается воспроизвести все наблюдаемые закономерности в спектре ЯЭО трисахарида (III). Например, в случае облучения протона Н1' ЯЭО на протонах Н4 и Н2' равны как по экспериментальным, так и по расчетным данным (табл. 1 и 4). Далее, отношение наблюдаемых ЯЭО на протонах Н5" остатка Rha и Н4 остатка Gal равно 0,2 (табл. 1). Расчетное отношение равно 0,25 (табл. 4). В случае облучения протона Н1" остатка Rha отношение средних величин

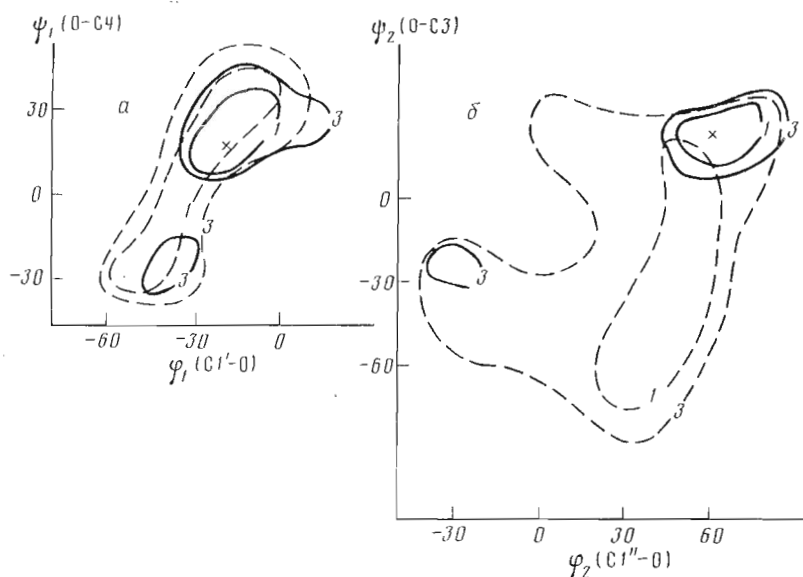


Рис. 7. Сечения поверхности потенциальной энергии трисахарида (III): $\varphi_1 - \psi_1$ ($\varphi_2 = 58,1^\circ$, $\psi_2 = 21,1^\circ$) (а) и $\varphi_2 - \psi_2$ ($\varphi_1 = -23,2^\circ$, $\psi_1 = 13,9^\circ$) (б)

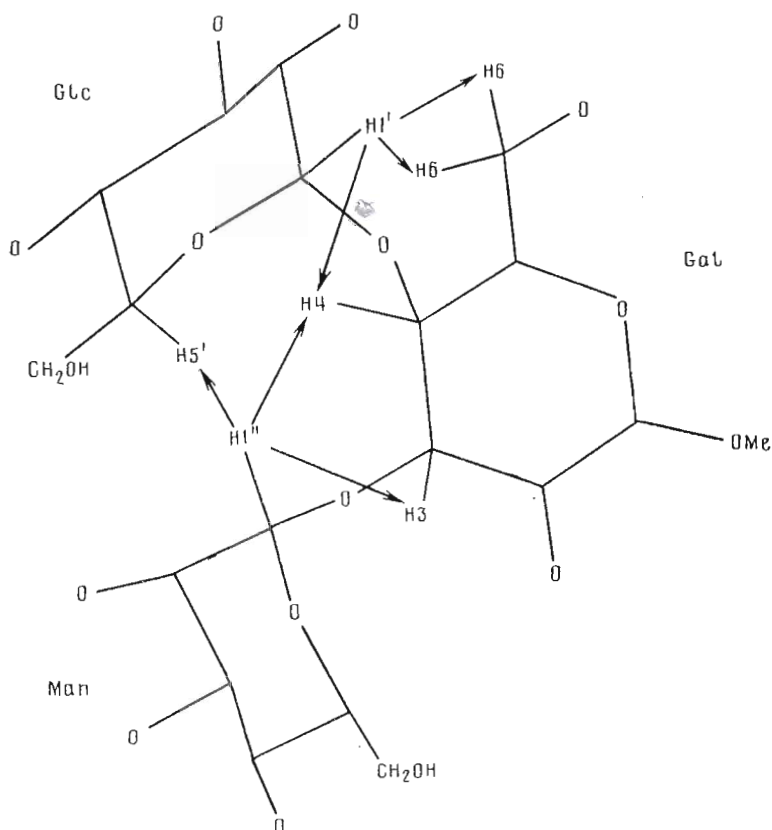


Рис. 8. Модель преимущественного конформера трисахарида (IV) $\text{Glc}\alpha 1-4(\text{Man}\alpha 1-3)\text{-Gal}\beta 1\text{-OMe}$

$\langle f_{\text{H1}''}^{\text{H2}''} \rangle$ и $\langle f_{\text{H1}''}^{\text{H3}} \rangle$ равно 1,3 (табл. 4). Экспериментальное отношение также составляет 1,3 (табл. 1).

Таким образом, трисахарид (III) представляет собой конформационно-детерминированную структуру. Отметим, что в этом трисахариде из двух возможных оптимальных конформеров в каждом дисахаридном звене

не [1], как в звене $\text{Glc}\alpha 1\text{-4Gal}$, так и в звене $\text{Rha}\alpha 1\text{-3Gal}$, реализуется более высокоэнергетический конформер.

$\text{Glc}\alpha 1\text{-4}(\text{Man}\alpha 1\text{-3})\text{Gal}\beta 1\text{-OMe}$ (IV). В этом трисахариде при облучении протона $\text{H1}'$ наблюдаются ЯЭО только в пределах дисахаридного звена $\text{Glc}\alpha 1\text{-4Gal}$, при облучении же протона $\text{H1}''$ остатка Rha ЯЭО зафиксированы как на протонах остатка Gal , так и на протонах $\text{H5}'$ и $\text{H1}'$ остатка Glc (табл. 1). Величина ЯЭО на протоне $\text{H5}'$ в 2 раза больше, чем на протоне $\text{H1}'$.

Преимущественная конформация трисахарида (IV) (соответствующие углы вращения см. в табл. 3) показана на рис. 8. В приведенной молекулярной модели протон $\text{H1}'$ остатка Glc сближен до расстояний ван-дер-ваальсова касания с протонами $\text{H6}, \text{H6}$ гидроксиметильной группы и протоном H4 остатка Gal ($r_{\text{H1}'-\text{H6a}}=2,3$, $r_{\text{H1}'-\text{H6b}}=2,3$, $r_{\text{H1}'-\text{H4}}=2,4$ Å). Отметим, что на рис. 8 учтена *gt*-ориентация указанной гидроксиметильной группы. Аномерный протон остатка Man сближен как с протоном H4 остатка Gal ($r_{\text{H1}''-\text{H4}}=2,3$ Å), так и с протоном $\text{H5}'$ остатка Glc ($r_{\text{H1}''-\text{H5}'}=2,7$ Å). Наличие ЯЭО между протонами $\text{H1}''$ и $\text{H5}'$ не связанных между собой остатков Man и Glc (табл. 1) подтверждает предложенную конформацию трисахарида (IV).

Сечения поверхности потенциальной энергии $\phi_1-\psi_1$ и $\phi_2-\psi_2$ трисахарида (IV) приведены на рис. 9. В работе [1] было отмечено, что в дисахариде $\text{Glc}\alpha 1\text{-4Gal}\beta 1\text{-OMe}$ свобода вращения по углам ϕ и ψ является наименьшей среди дисахаридов, включающих обычные моносахаридные остатки. Наличие в разветвлении у остатка Gal остатка Man приводит к еще большему ограничению допустимых значений углов ϕ_1 и ψ_1 (рис. 9а). Так, из двух конформеров *A* ($\phi, \psi -40, -20^\circ$) и *B* ($-20, +30^\circ$) дисахарида $\text{Glc}\alpha 1\text{-4Gal}\beta 1\text{-OMe}$ [1] в трисахариде (IV) реализуется практически только один конформер *A*.

Следует также отметить, что низкоэнергетические контуры на сечении $\phi_1-\psi_1$ трисахарида (IV) (рис. 9а) смещены в сторону больших значений угла ϕ_1 . Отрицательные значения угла ϕ в диапазоне $-50\div-60^\circ$, разрешенные в свободном дисахариде $\text{Glc}\alpha 1\text{-4Gal}\beta 1\text{-OMe}$ [1], здесь запрещены из-за недопустимого сближения гидроксиметильной группы остатка Glc с остатком Man . Исходя из положения контура относительной энергии 1 ккал/моль на рис. 9а можно заключить, что разрешенные значения углов вращения находятся в очень узких интервалах: $-30\div-40^\circ$ в случае угла ϕ_1 и $-10\div-30^\circ$ в случае угла ψ_1 . Это находит свое отражение и в измеренных величинах J^ϕ и J^ψ , которые равны 3,9 и 5,0 Гц (табл. 2).

Также существенные изменения претерпела конформационная свобода звена $\text{Man}\alpha 1\text{-3Gal}$ в трисахариде (IV) по сравнению с таковой в свободном дисахариде $\text{Man}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-OMe}$ (рис. 9б). Так, запрещенными становятся значения угла $\psi_2 -60\div-90^\circ$, этим объясняется большая величина константы J^ψ для звена $\text{Man}\alpha 1\text{-3Gal}$ трисахарида (IV) по сравнению с ее величиной для дисахарида — 3,5 и 2,7 Гц соответственно (табл. 2 и табл. 2 в работе [1]). Таким образом, и в звене $\text{Man}\alpha 1\text{-3Gal}$ свобода вращения по углам ϕ_2, ψ_2 невелика, наиболее вероятные значения угла ϕ_2 равны $-60\div-70^\circ$, а угла $\psi_2 -30\div-50^\circ$. Тем не менее следует иметь в виду, что в статистическую сумму трисахарида могут вносить определенный вклад все конформеры в пределах контура 3 ккал/моль на сечении $\phi_2-\psi_2$ рис. 9б.

Например, в оптимальной конформации трисахарида (IV) величина $f_{\text{H1}''}^{\text{H4}}$ значительно больше $f_{\text{H1}''}^{\text{H3}}$ (табл. 4), однако в расчете средних значений $\langle f_{\text{H1}''}^{\text{H4}} \rangle$ и $\langle f_{\text{H1}''}^{\text{H3}} \rangle$ получены одинаковые величины, что соответствует экспериментальным данным (см. табл. 1 и 4). В самом дисахариде $\text{Man}\alpha 1\text{-3Gal}\beta 1\text{-OMe}$ ЯЭО на протоне H4 более чем в 2 раза больше ЯЭО на протоне H3 [1], что сопряжено с наличием в равновесии конформеров со значениями угла $\psi -50\div-90^\circ$, которые нереальны в трисахариде (IV). Подобная ситуация имеет место и в трисахариде (I) (см. рис. 9б), в котором ЯЭО на протонах H3 и H4 при облучении протона $\text{H1}''$ также равны между собой (табл. 1).

Другой важный эффект, наблюдаемый в трисахариде (IV) при облу-

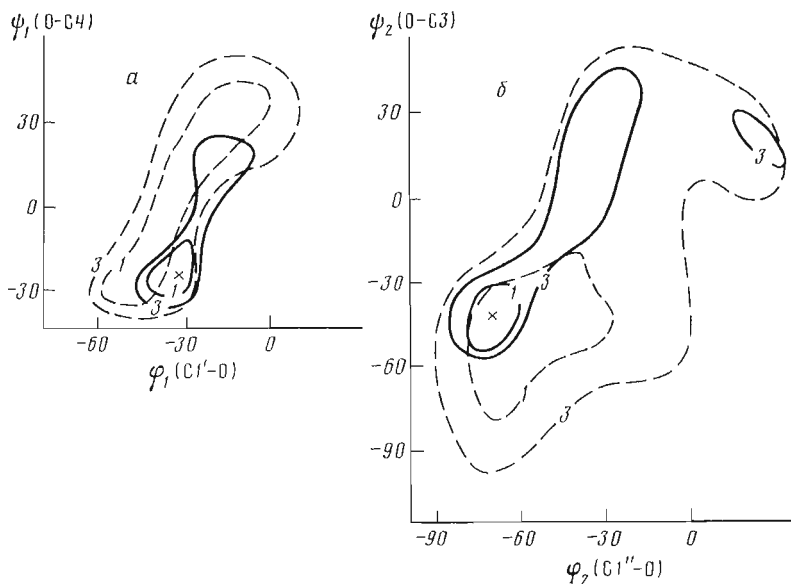


Рис. 9. Сечения поверхности потенциальной энергии трисахарида (IV): $\varphi_1 - \psi_1$ ($\varphi_2 = -69,5^\circ$, $\psi_2 = -43,8^\circ$) (а) и $\varphi_2 - \psi_2$ ($\varphi_1 = -35,8^\circ$, $\psi_1 = -24,3^\circ$) (б)

чении протона Н1'', — ЯЭО на протоне Н5' остатка Glc — также воспроизводится в расчете средних значений. Так, соотношение величин $\langle f_{\text{H1}''}^{\text{H5}'} \rangle$ и $\langle f_{\text{H1}''}^{\text{H4}} \rangle$ составляет 1 : 3 (табл. 4), экспериментальное отношение указанных ЯЭО — 1 : 3 (табл. 1).

Обсудим величины ЯЭО в условиях облучения протона Н1' остатка Glc. В этом случае наблюдаются ЯЭО на протоне Н4 и протонах гидроксиметильной группы в положении 5 остатка Gal (табл. 1), притом второй эффект большего первого. В трисахариде (IV) имеет место разительное отличие величин ЯЭО от величины ЯЭО в свободном дисахариде Glc α 1-4Gal β 1-ОМе, в котором эффект на протонах Н6,Н6 в 2 раза слабее эффекта на протоне Н4 [1].

Этот факт показывает, что если в дисахариде в равновесии участвуют конформеры, в которых протоны Н1' и Н6,Н6 могут быть как сближены, так и удалены друг от друга, то в трисахариде звено Glc α 1-4Gal существует только в конформации, в которой протоны Н1' и Н6,Н6 находятся в ван-дер-ваальсовом касании. Именно такая ситуация представлена в найденной оптимальной конформации трисахарида (IV) (рис. 8). В этой конформации расчетные величины $f_{\text{H1}'}^{\text{H6}, \text{H6}}$ равны 15% (при *gt*-ориентации гидроксиметильной группы остатка Gal) и 9% (при *tg*-ориентации этой группы). Учитывая, что *gt*- и *tg*-конформеры в остатке Gal приблизительно равновероятны [1], средние величины $\langle f_{\text{H1}'}^{\text{H6}, \text{H6}} \rangle$ и $\langle f_{\text{H1}'}^{\text{H4}} \rangle$ были оценены в 12,9 и 12% (табл. 4). Таким образом, отношение указанных средних величин оказалось равным отношению наблюдаемых ЯЭО на протонах Н6,Н6 и Н4 (1,1 — табл. 1).

Отметим, что в трисахариде (III) ЯЭО на протонах Н6,Н6, напротив, слабее (почти в 5 раз) ЯЭО на протоне Н4 остатка Gal (табл. 1), что определенно указывает на различия в конформационном состоянии звена Glc α 1-4Gal в двух трисахаридах. Действительно, в трисахариде (IV) низкоэнергетическим является конформер А звена Glc α 1-4Gal, тогда как в трисахариде (III) — конформер В (табл. 3).

Подтверждением того, что в звене Glc α 1-4Gal трисахарида (IV) преимущественным является конформер А ($\varphi, \psi -40, -20^\circ$ [1]), следует также из соотношения ЯЭО на протоне Н2' облучаемого остатка Glc и на протоне Н4 остатка Gal. Если в трисахариде оно равно 1,6 (табл. 1), то в дисахариде Glc α 1-4Gal β 1-ОМе, в котором конформеры А и В находятся в равновесии, указанное соотношение <1 [1].

Однако не следует слишком абсолютизировать конформационную жесткость этого звена в трисахариде (IV). Так, при облучении протона H1'' остатка Man наблюдается небольшой эффект на протоне H1' остатка Glc (табл. 1), величина которого на порядок меньше ЯЭО на протоне H4 остатка Gal. Он может быть обусловлен только конформациями со значениями угла ψ_1 10–20° (рис. 9a), в которых протоны H1'' и H1' находятся друг от друга на расстоянии ~3 Å. Таким образом, несмотря на то что вся совокупность данных указывает на подавляющий статистический вес одного конформера (табл. 3) в трисахариде (IV), колебания по углам вращения φ_1 и ψ_1 в звене Glc α -4Gal могут происходить в пределах всей низкоэнергетической области конформационной карты (рис. 8a).

В итоге из конформационного анализа трисахарид (IV) следует, что он существует в одной преимущественной конформации с очень ограниченной свободой вращения вокруг межзвеньевых гликозидных связей. Энергия взаимодействия несвязанных остатков составляет ~–2 ккал/моль. Внутри молекулы трисахарид (IV) имеется внутреннее неполярное ядро, включающее атомы водорода H1', H5' (Glc), H3, H4, H6, H6 (Gal) и H1'' (Man) (рис. 8).

В заключение отметим, что конформационные возможности свободных дисахаридов существенно больше, чем соответствующих дисахаридных

Таблица 5

Химические сдвиги * и мультиплетность в спектрах ¹H-ЯМР трисахаридов (I)–(IV)

Трисахарид	Мономер	Химический сдвиг, м. д.						
		H1	H2	H3	H4	H5	H6a	H6b
(I)	Gal β	4,43д	3,76дд	3,90дд	4,45д	3,81м	–	–
	Glc β	4,54д	3,33дд	3,55т	3,43м	3,51м	3,96дд	–
	Man α	5,11д	4,07дд	3,93дд	3,75т	–	–	–
(II)	Gal β	4,42д	3,82дд	3,88дд	4,29д	3,78м	–	–
	Glc β	4,75д	3,38дд	3,56т	3,44м	3,53м	3,95дд	–
	Rha α	5,15д	4,11дд	3,86дд	3,54т	3,80дк	1,35д	–
(III)	Gal β	4,42д	3,71дд	3,79дд	4,10д	3,79ддд	3,93дд	3,85дд
	Glc α	5,02д	3,53дд	3,79дд	3,53т	3,84м	–	–
	Rha α	5,15д	4,07дд	3,83дд	3,48т	3,79дк	1,31д	–
(IV)	Gal β	4,45д	3,68дд	3,82дд	4,33д	3,80ддд	3,79дд	3,88дд
	Glc α	4,99д	3,54дд	3,80дд	3,55дд	3,87м	–	–
	Man α	5,11д	3,97дд	3,91дд	3,77т	–	–	–

* Химические сдвиги групп OMe составляют 3,57–3,63 м. д.
д – дублет, т – триплет, к – кватер, м – мультиплет.

Таблица 6

Константы спин-спинового взаимодействия в спектрах ¹H-ЯМР трисахаридов (I)–(IV)

Трисахарид	Мономер	KCCB, Гц						
		J _{1,2}	J _{2,3}	J _{3,4}	J _{4,5}	J _{5,6a}	J _{5,6b}	J _{6,7}
(I)	Gal β	7,4	9,7	2,6	1	–	–	–
	Glc β	7,6	9,1	9,1	–	2,0	–	12,0
	Man α	1,8	3,4	9,5	9,5	–	–	–
(II)	Gal β	7,1	9,8	2,5	1	–	–	–
	Glc β	7,5	9,0	9,0	–	2,1	–	11,8
	Rha α	1,9	3,2	9,4	9,4	6,1	–	–
(III)	Gal β	7,0	9,9	2,4	1	7,0	5,4	11,0
	Glc α	3,5	9,6	9,4	9,4	–	–	–
	Rha α	1,9	3,2	9,1	9,1	6,0	–	–
(IV)	Gal β	7,7	10,1	2,5	1	7,5	4,6	11,4
	Glc α	3,6	10,0	9,2	9,8	–	–	–
	Man α	1,7	3,1	9,2	9,2	–	–	–

звеньев в разветвленных олигосахаридах. Пространственную структуру дисахаридов пельзы удовлетворительно описать какой-либо одной жесткой конформацией. Однако в разветвленных олигосахаридах с замещением по положениям 3 и 4 остатков галактозы реализуется ситуация, когда возможен единственный преимущественный конформер.

Экспериментальная часть

Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР сняты на приборе АМ-300 (Bruker) с рабочей частотой по протонам 300 МГц, по углероду — 75 МГц. В протонных спектрах химические сдвиги даны относительно 4,4-диметил-4-силалаптан-1-сульфоната натрия (табл. 5, 6). Отнесение ключевых сигналов в спектрах ^1H -ЯМР выполнено при помощи селективного гомаядерного резонанса в обычном и разностном вариантах. Результаты приведены в табл. 5, 6. Величины ЯЭО измерены по методике ТОЕ [15] при следующих временных константах: $D1$ 0,5 с (время преоблучения) и $D2$ 0,8 с (время релаксационной задержки). Величины ЯЭО (%) были выражены в виде отношения интегральных интенсивностей наблюдаемого и предоблучаемого протонов в разностном спектре. Вицинальные константы J^α и J^β определялись с помощью двумерной спектроскопии по методикам, описанным в работах [16, 17].

Синтез трисахаридов (I) — (IV) описан в работе [2].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Липкинд Г. М., Мамли С. С., Шашков А. С., Нечаев О. А., Торгов В. И., Шибеев В. Н., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 340—351.
2. Нечаев О. А., Торгов В. И., Шибеев В. Н., Мамли С. С. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 3. С. 359—370.
3. Scott R. A., Scheraga H. A. // J. Chem. Phys. 1966. V. 44. № 8. P. 3052—3068.
4. Motanu F. A., Carruthers L. M., McGuire R. F., Scheraga H. A. // J. Phys. Chem. 1974. V. 78. № 16. P. 1595—1620.
5. Журкин В. Б., Полтев В. И., Флорентьев В. А. // Молекулярн. биология. 1980. Т. 14. № 5. С. 1116—1130.
6. Липкинд Г. М., Веровский В. Е., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 9. С. 1269—1284.
7. Липкинд Г. М., Шашков А. С., Книрель Ю. А., Кочетков Н. К. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 6. С. 771—779.
8. Jeffrey G. A., McMullan R. K., Takagi S. // Acta crystallogr. 1977. V. B33. № 3. P. 728—733.
9. Jeffrey G. A., Takagi S. // Acta crystallogr. 1977. V. B33. № 3. P. 738—742.
10. Takagi S., Jeffrey G. A. // Acta crystallogr. 1979. V. B35. № 3. P. 902—906.
11. Takagi S., Jeffrey G. A. // Acta crystallogr. 1978. V. B34. № 6. P. 2551—2555.
12. Arnott S., Scott W. E. // J. Chem. Soc. Perkin Trans II. 1972. № 3. P. 324—335.
13. Shirmer R. E., Noggle J. H., Davis J. P., Hart P. A. // J. Amer. Chem. Soc. 1970. V. 92. № 11. P. 3266—3273.
14. Hamer G. K., Balza P., Cyr N., Perlin A. S. // Can. J. Chem. 1978. V. 56. № 24. P. 3109—3116.
15. Wagner G., Wütrich K. // J. Magn. Resonance. 1979. V. 33. № 3. P. 675—680.
16. Cidley M. J., Bociek S. M. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1985. № 4. P. 220—222.
17. Bax A., Freeman R. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. № 4. P. 1099—1100.

Поступила в редакцию
3.X.1988

CONFORMATIONS OF BRANCHED TRISACCHARIDES WITH VICINAL SUBSTITUTION ACCORDING TO NUCLEAR OVERHAUSER EFFECT DATA AND THEORETICAL CALCULATIONS. I. TRISACCHARIDES WITH 3 AND 4 SUBSTITUTED GALACTOSE RESIDUES

LIPKIND G. M., SHASHKOV A. S., NECHAEV O. A., TORGOV V. I., SHIBAEV V. N., KOCHETKOV N. K.

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

Nuclear Overhauser effects during irradiation of anomeric protons as well as spin-spin coupling constants $^3J_{\text{C,H}}$ for atoms separated by a glycosidic bond in several β -methylglycosides of trisaccharides with 3,4-disubstituted galactose residues have been determined. Experimental data and theoretical calculations showed that one predominant conformer corresponds to each trisaccharide; its fraction in the conformational equilibrium is not less than 90%.