

NMR a szénhidrátkémiában

Szilágyi László, a kémiai tudomány doktora

Debreceni Egyetem, TTK, Szerves Kémiai tanszék

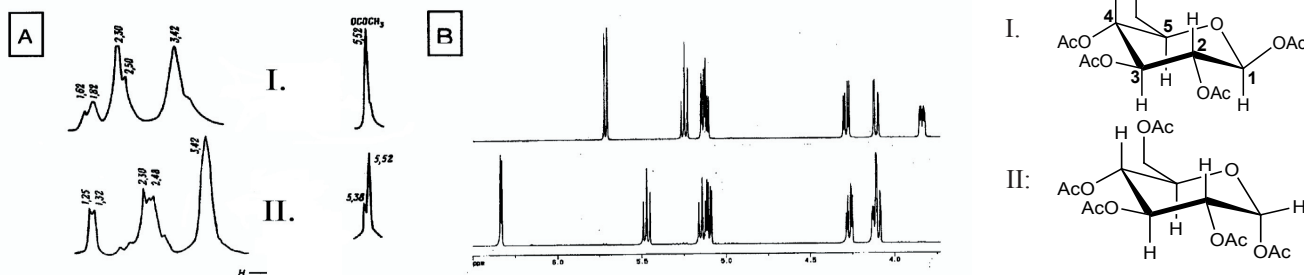
lszilagyi@tigris.klte.hu

Ha egy (reprezentatív mintán végzett) közvélemény kutatás során kémikusokat megkérdeznénk, hogy az NMR spektroszkópia területéről kinek a neve jut először eszükbe, akkor a *Karplus* név minden bizonnyal „utcahosszal” nyerne. A három-kötéses proton-proton csatolási állandó és a megfelelő torziós szög közötti összefüggést leíró, 1959-ban megalkotott egyenlet ¹ hihetetlen népszerűsége tett szert a folyadékfázisú molekulaszervezeti kutatásokban. Kevésbé közismert, hogy az elméleti általánosítás kísérleti megalapozását Lemieux és mtsai. ² egyszerű szénhidrátokon végzett mérései képezték. Az NMR alkalmazása szénhidrátok szerkezetvizsgálatára tehát a „hőskorra” nyúlik vissza. Nem túlzás ezt állítani, hisz olyan alapvető jelenségek, mint a kémiai eltolódás és a magspin-magspin csatolás az idő tájt még meglehetősen újdonságnak számítottak kémikus berkekben. E felfedezések a múlt század 50-es éveinek elején történtek, fizikai laboratóriumokban, mai szemmel nézve igen kezdetleges, általában házi építésű spektrométerek alkalmazásával, és az eredményeket fizikai folyóiratokban publikálták.

Az NMR spektroszkópia kuriózumnak számított ebben az időben, amely kevés kémikus fantáziáját mozgatta meg, és még kevesebben voltak olyan szerencsések, hogy mérőberendezés közelébe is juthattak. „Nagy felbontású” ¹H NMR spektrumot elkészíteni egy – mondjuk – az etanolnál bonyolultabb molekuláról az instabil és roppant kis érzékenységu spektrométereken önmagában nagy eredménynek számított. Pl. a stabilitást ugrásszerűen megnövelő forradalmi újítást, a „tér-frekvencia visszacsatolást” („field-frequency lock”) az 1961-ben forgalomba kerülő Varian A-60-as készüléken alkalmazták először ³, azaz jó pár évvel Lemieux idézett munkájának megjelenése után. Elég egy pillantást vetni az első szénhidrát NMR spektrumokra amelyek egy nem-stabilizált spektrométeren, 40 MHz (!) mérési frekvencián készültek (I. ábra), hogy megállapíthassuk: nem kis merészség szükségeltetett az – azóta sok ezer példával alátámasztott – összefüggés (általános) megfogalmazásához, miszerint ${}^3J_{\text{HaxHax}} > {}^3J_{\text{HaxHekv}}$. Tegyük hozzá: jó adag szerencse is,

hogy olyan vegyületekkel kísérleteztek, amelyek bonyolult spektrumában *egyetlen* (az anomer-) proton rezonanciajele annyira elkülönül, hogy a (csupán néhány Hz-es) spin-spin csatolás észlelhető az említett mostoha körülmények ellenére is. A hályogkovács esete juthat eszünkbe: ha a kutatók sejtették volna, hogy a természetes vegyületek körében a szénhidrátok NMR-sajátságai a legkedvezőtlenebbek (ami azóta kiderült: I. alább), akkor feltehetően más anyagokkal kísérleteztek. De: *sors bona, nihil aliud*. A mondás igazságát támasztja alá, negatív példával (!), a polipeptid/protein NMR spektroszkópia korai története. Saunders és mtsai gyakorlatilag a fentiekkel egyidőben publikálták az RNáz-A enzim első proton NMR spektrumát ⁴. Ez azonban nemhogy serkentette volna a terület további kutatását, hanem ellenkezőleg: legalább egy évtizedre kedvét szegte a kutatóknak és elriasztotta őket a további vizsgálódásoktól ⁵. Az azután már a sors fintora, hogy – míg a proteinek NMR vizsgálata napjainkra lélegzetelállító eredményeket produkált ^{6,7}, hasonló sikerekről a szénhidrátok (oligo- és poliszacharidok) területén nem tudunk beszámolni, és – meglehet – ez a helyzet tartósan fennmarad. Bár jósolni mindig kockázatos: „The hope ...for a complete determination of the structure of proteins...in solution...did not materialize and will not in the foreseeable future...” – írták jónévű szerzők, egyébként kitűnő könyvükben, 1981-ben Jardetzky & Roberts, ⁸. Wüthrich (kémiai Nobel-díj, 2002) és mtsai a következő évben publikálták általános módszerüket ⁹ fehérjék szerkezetmeghatározására oldatban...

Mi tehát az oka, hogy oligo- és poliszacharidok területén a modern, többdimenziós NMR-technika elképesztően hatékony módszereivel is csak viszonylag szerény eredményeket sikerült elérni ezidáig – legalább is a fehérjékhez viszonyítva? A legfőbb ok a kétfajta oligo- / polimer kémiai szerkezetének különbözőségében rejlik. A polipeptidok (fehérjék) egyszerű aminosavakból felépült *lineáris* láncmolekulák. Szerkezeti szkémájuk igen egyszerű: a főláncot alkotó *monoton* ismétlődő (NH-CH-CO) motívumok középső szénéhez pár szénatomos *oldalláncok* kapcsolódnak. Ennek megfelelően az NMR jelhozzárendelés



1. Ábra. A β - (I) és α - (II) pentaacetyl-D-glükóz ¹H-NMR spektrumai. (A): Egy tértabilizálás nélküli, 40 MHz-es spektrométeren 1956-ban ² készült, és (B): egy modern 500 MHz-es berendezésen napjainkban készített felvételek

(amely minden szerkezetmeghatározás alapja) stratégiájának két, jól elkülöníthető lépését a főlánc-, illetve az oldalláncok rezonanciajeleinek azonosítása képezi. Különösen igaz ez a modern, többdimenziós, tripla-rezonancia módszerekre ¹⁰. A szerkezet linearitása miatt az eljárás jól *algoritmizálható*: a korábbi „manuális”, időrabló módszereket mára nagyrészt felváltották az automatizált programok.

A szénhidrát oligo- / polimerek molekulaszervezete jóval változatosabb, bonyolultabb. A monoszacharid-alegységeket összekapcsoló glikozidos kötés *konfigurációja* (α - vagy β), valamint a kapcsolódás (glikozilezés) *helye* is változó a különböző oligoszacharidokban. A monoszacharidok gyűrűs vegyületek: a (gyakoribb) 6-os (piranóz) gyűrűk mellett 5-ös (furanóz) szerkezetek is előfordulnak. Lineáris oligomerek mellett igen gyakran találkozunk *elágazó*, sok esetben többszörösen elágazó (ilyen pl. a legtöbb glikoprotein oligoszacharid-komponense) láncszerkezetekkel. Az aminosavak lényegében *bifunkciós* vegyületek (néhány esetben *egy* további funkciós csoporttal az oldalláncban), *egyetlen kiralitási* centrummal, a monoszacharidok ezzel szemben *multifunkciósak* és *multikiralisak*. További bonyodalom forrása, hogy a *redukáló* oligoszacharidok minden esetben legalább *két-komponensű* egyensúlyi *elegyet* alkotnak (α/β -anomerek; a komponensek száma elvileg akár *nyolc (!)* is lehet). És akkor még nem beszéltünk a gyűrűkonformáció változásának (elvi) lehetőségéről (piranóz gyűrűknél: ⁴C₁ vagy ¹C₄).

Mindezen szerkezeti különbségek eredményeképpen az oligoszacharidok *sokfélesége* (diverzitása) messze felülmúlja az azonos számú monomer egységből felépíthető oligopeptidekét. Pl.: míg 5 aminosavból (A,B,C,D,E) összesen 5! = 120 különböző pentapeptid képződhet (a sokféleség forrása csupán a *szekvencia*), addig az 5 hexózból konstruálható különböző pentaszacharidok száma 2 144 640 (!). Másképp érzékeltetve a kétfajta biopolimer-típus szerkezeti különbözőségét: míg az összes polipeptid (fehérje) kémiai szerkezetét leírja az (NH-CHR-CO)_n általános képlet, addig poliszacharidokra nem adható meg semmiféle általános szkéma. Ezek a különbségek „visszaköszönnek” a kétfajta biopolimer kutatásának minden aspektusában - legyen szó izolálásról, szintézisről avagy szerkezetmeghatározásról - nagyjából a *sokféleségnél* említett arányban!

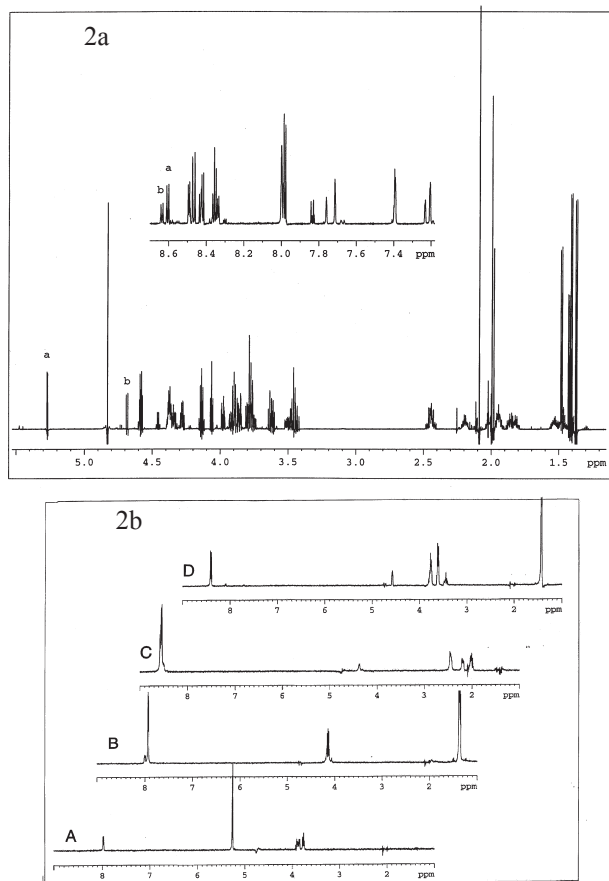
Bár jelen összefoglalóban azt kívánjuk áttekinteni, hogy az NMR spektroszkópia mennyiben képes hozzájárulni szénhidrátok (első sorban oligoszacharidok) bonyolult szerkezeti problémáinak megoldásához, szükséges röviden felvázolni azt a környezetet, amely az effajta vizsgálódások szükségzerű hátterét képezi. Az oligo- / poliszacharidok nagy része a természetben más biomolekulákhoz, -polimerekhez kapcsolódik, ún. *glikokonjugátumok* formájában. Ilyenek a viszonylag kisméretű *glikolipidek*, az óriás extracelluláris *proteoglikánok*, illetve a *glikoproteinek* és *peptidoglikánok*. Az NMR alkalmazások bemutatásához főleg az utóbbi két csoportból választottunk példákat. Az oligoszacharid-komponenst a vizsgálathoz először el kell különíteni (enzimatis vagy kémiai hasítással) a konjugátum egyéb komponense(i)től, és általában egy tisztítási-elválasztási lépést (különböző kromatográfiai módszerek, kapilláris elektroforézis, stb.) követően kerül sor a szerkezetvizsgálatra ¹¹.

Az NMR jelhozzárendelés

Az NMR módszer alkalmazása során első lépésként minden esetben meg kell állapítanunk, hogy a spektrumban megjelenő rezonanciajelek a vizsgált molekula mely atomjaitól (pontosabban: atommagjaitól) származnak. Ez a *jelhozzárendelés* (asszignáció) oligomerek esetében két szakaszra bontható: először azonosítjuk az egyes monomer-egységekre rezonanciajeleit (alegység-specifikus hozzárendelés), majd megállapítjuk, hogy a teljes spektrumban egy adott alegységhez rendelt jelek részhalma a kémiai kötésekkel kapcsolódó alegységek *sorrendjében* (*szekvencia*) *hányadik* taghoz tartozik (szekvencia-specifikus hozzárendelés). Utóbbi feladat megoldásához szükséges a szekvencia független módszerekkel (pl. kémiai-, vagy enzimatis lebontás, tömegspektrometria, stb.) meghatározott, előzetes ismerete! Az NMR spektroszkópus feladata „mindössze” annyi, hogy spektrális bizonyítékot találjon a szomszédos egységek kapcsolódására (*konnektivitás*). A szekvencia-specifikus jelhozzárendelés módszerét polipeptidekre dolgozták ki ⁷; a megközelítés elvben oligo-/poliszacharidokra is átvihető. A szénhidrátokra jellemző specifikus nehézségek (l. fent) miatt azonban *teljes* NMR-jelhozzárendelés 10-12-tagú oligoszacharidnál nagyobb molekulákra alig ismert az irodalomban. Az eddig elért egyik legnagyobb teljesítmény egy 29-tagú oligoszacharid (RG-II) csaknem teljes jelhozzárendelése volt ¹²; ez főleg az alkotó monoszacharidok változatosságának volt köszönhető. Ezen viszonylagos „lemaradás” (a fehérjékhez képest) oka a már említettek kivül még legalább két további tényezőben keresendő. Egyrészt a szénhidrátok proton-NMR spektruma jóval összetettebbek (bonyolultabb spinrendszerek), és zsúfoltabbak (kisebb spektrális diszperzió), mint a peptidké, másrészt a protein NMR-spektroszkópiában az utóbbi egymásfél évtizedben oly sikeresnek bizonyult biotechnológiai expresszási és izotópjelölési módszerek ¹⁰ gyakran nem alkalmazhatók oligo/poliszacharidokra (pl. az említett RG-II oligoszacharid bioszintézisében igen sok gén működik közre), de ha igen, legtöbbször specifikus eljárások szükségesek.

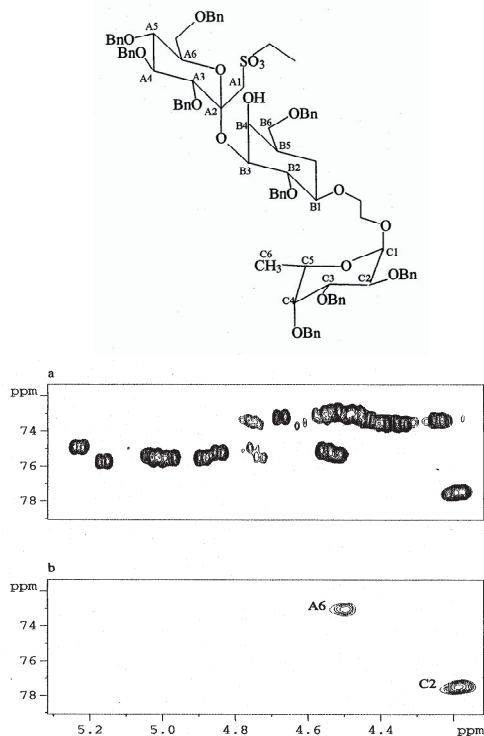
Kis tagszámú oligoszacharidok, oligopeptidek

A monomer-egységek ¹H-jelhozzárendelésének kiinduló pontját az anomer-protonok képezik, amelyek rezonanciajelei általában jól elkülönülnek kb. 4.4-5.5 ppm között. A 2D COSY és TOCSY módszerek elvben lehetővé teszik az egyes monoszacharid alegységek összes ¹H-rezonanciajelenek azonosítását (legalább is pentózok és hexózok esetében), azonban a kis csatolási állandók (pl. manno- vagy galakto konfigurációk esetében) és / vagy a spektrális zsúfoltság miatt itt is adódhatnak nehézségek. A 2D módszerek 1D szelektív variánsai vagy speciális, 2D szelektív mérési szekvenciák gyakran segítséget jelentenek az effajta problémák megoldásában. Pl. a 2a. ábrán látható spektrum egy glikopeptidről származik, amelynek szénhidrát része csupán két monoszacharidból áll, ám az egyik anomer proton jele a peptid α -protonok tartományába „csúszik”. 1D szelektív TOCSY kísérletekkel azonban az átfedések kiküszöbölhetők ¹² (2b. ábra): Oligoszacharid szintézisek során gyakran az alkalmazott védőcsoportok okoznak zavaró jelátfedést. A 3. ábra egy



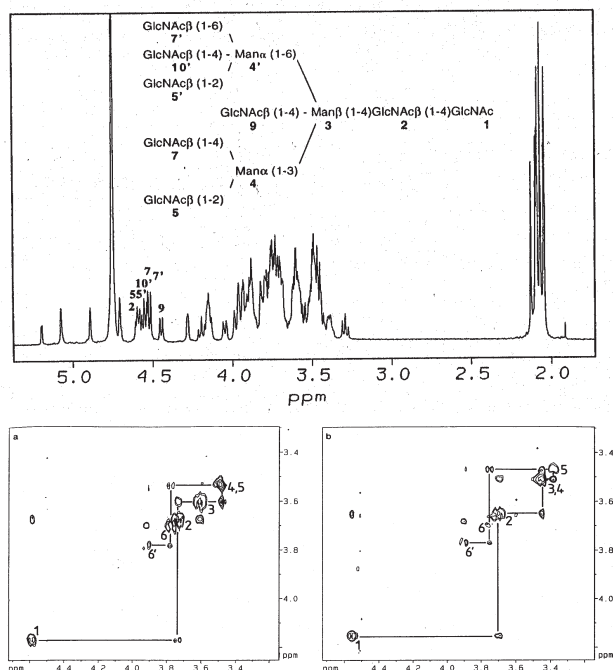
2. Ábra. A *Brevibacterium divaricatum* baktérium sejtfalából izolált peptidoglikán-monomer (PGM: D-GlcNAc- β (1 \rightarrow 4)-D-MurNAc-L-Ala-D-isoGln-mesoDap(ϵ NH₂)-D-Ala-D-Ala) 750 MHz-es ¹H-NMR spektruma (fent) és a szelektív 1D TOCSY technikával készült 500 MHz-es „alspektrumok” (lent). A diszaccharid-rész MurNAc „redukáló” végén α/β anomer-keverék, ezért minden rezonanciajel megkettőződik az anomer arányának megfelelő intenzitásokkal. Ez a jelenség legjobban a MurNAc anomer-protonok jelein észlelhető: α (a) – 5.27 ppm, β (b) – 4.68 ppm. A GlcNAc β -H1 rezonanciajele (4.58 ppm) átfed az aminosav-részek α -H-jeleivel (fent). Utóbbi rezonanciajel tisztán azonosítható a GlcNAc-egység „alspektrumában” (D, lent). A másik három alspektrum az α -MurNAc-tól (A), a D-Ala5 (B) és a D-isoGln (C) egységektől származik¹³

triszaccharid-származék ¹H-¹³C korrelációs spektrumát (HSQC) mutatja, amelyben a benzil-CH₂ rezonanciajelek az egyik váz-CH jelét *mindkét dimenzióban* elfedik. A zavaró jelek a spektrumból egy speciális sávselektív jelelnyomási szekvenciával eltávolíthatók (3b. ábra)¹⁴: Az ¹H-, és a ¹³C-spektrumok „anomer tartománya” (~ 4.4-5.5 ill. ~ 90-110 ppm) általában lehetőséget nyújt az oligoszaccharidot alkotó alegységek „leszámlálására”; a manapság rutinszerűen használt HSQC mérés az ¹H-, és a ¹³C előnyeit (érzékenység ill. kedvező spektrális diszperzió) egyesíti. Az anomer (esetenként egyéb-) protonok eltolódásai ezen kvantitatív adaton túlmenően az oligoszaccharid szerkezetére vonatkozó kvalitatív információt is tartalmaznak. Vliegthart és mtsai glikoproteinekből izolált nagyszámú oligoszaccharidon végzett empirikus összehasonlítás eredményeképpen a „szerkezetre utaló csoport” fogalmát vezették be e jelenség leírására¹⁵. A spektrális jelátfedések nagyobb tagszámú oligoszaccharidok esetén már nem, vagy csak részlegesen



3. Ábra. Egy perbenzilezett (Bn = C₆H₅CH₂-) triszaccharid (fent) ¹H,¹³C-HSQC-spektrumának a benzil-CH₂ rezonanciajeleket tartalmazó részlete: (a) közös HSQC-szekvenciával, és (b) sávselektív jel-elynyomással kombinált HSQC-szekvenciával¹⁴ mérve.

kezelhetők szelektív módszerek alkalmazásával. A probléma általános és leghatékonyabb megoldása a három- (esetleg négy-) dimenziós (3D, 4D) spektroszkópia. Ezek, a polipeptid/protein területen oly sikeres módszerek olig/poliszaccharidok szerkezetvizsgálatában eddig kevésbé terjedtek el, főleg a megfelelő izotópjelzési technikák nehézségei miatt, ahogy arra fentebb utaltunk. Korábban ezért 3D homonukleáris módszerekkel kísérleteztek, esetenként részleges sikerrel. Egy sikeres példa a 4. ábrán látható többszörösen elágazó, „ótfarkú” glikán, amelyben az NMR jelhozzárendelést roppant megnehezíti a nagyszámú azonos (esetenként azonos glikozidos kötében lévő) monoszaccharid-egység: 11-ből 8 GlcNAc, és ebből 6 láncvégi pozícióban kötött, β -anomer-konfigurációban! Emiatt az ¹H-spektrum anomer tartománya is igen zsúfolt (4a. ábra). Egy speciális (ún. konstans t₂-idejű) 3D HOHAHA-COSY (más néven: TOCSY-COSY) méréssel az átfedések tökéletesen feloldhatók, és hét GlcNAc-egység ¹H-spektruma elkülönítve hozzárendelhetők (4b. ábra)¹⁶. Az *anomer konfiguráció* meghatározására Lemieux úttörő munkája (ibid.) nyomán a J_{H1,H2} csatolási állandó szolgál. Ez a paraméter, amelyet bonyolultabb spektrumokból 2D- vagy 1D-TOCSY-méréssel határozhatunk meg, nem ad minden esetben egyértelmű eredményt (pl. ha H-2 ekvatoriális térállású). Ilyen esetekben az egykötéses proton-szám-13 csatolási állandó alkalmazható: $^1J_{C,H_{ekv}} \sim ^1J_{C,H_{ax}} + 10$ Hz^{17,18}. Korábban kimutattuk, hogy a fenti kvalitatív szabály érvényes *non-anomer* protonokra is, másrészt viszont, bizonyos esetekben, a két csatolás különbsége elenyésző lehet anomer C-H-kra is, ami óvatosságra int az anomer konfiguráció

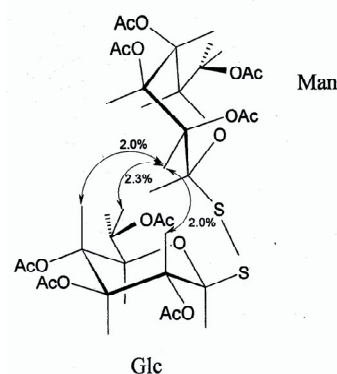


4. Ábra. Egy N-glikán típusú, többszörösen elágazó lánccal rendelkező undekaszaccharid 500 MHz-es ^1H NMR spektruma (fent): az anomer protonok rezonanciajelei erősen átfednek a 4.4 – 4.6 ppm tartományban. Lent: a szövegben jelzett 3D adatmátrix megfelelő (F1/F3) 2D metszeteiből az egyes alegységek ^1H -jelhozzárendelése „COSY-stílusban” egyértelműen elvégezhető, még „patologikus” jelátfedés esetén is, ahogyan ezt az 5-ös (balra) és az 5' (jobbra) β -GlcNAc-egységek példája szemlélteti ¹⁶.

meghatározásánál $^1J_{\text{C,H}}$ alapján ¹⁹. Kérdéses esetekben segítséget jelenthet a proton-proton távolságok ^1H NMR relaxációs módszerekkel történő mérése ²⁰.

Az alegységek közötti kapcsolat, azaz a *glikozilezés helyének vizsgálata* általában a glikozidos híd [$\text{C}(1')\text{H}(1')\text{-O-C}(n)\text{H}(n)$] pillératomjai közötti skaláris- (J -csatolás) vagy dipoláris (NOE, ROE) kölcsönhatás kimutatásával történik. Általánosan használt módszer a háromkötéses proton-szén-13 csatolás ($^3J_{\text{C,H}}$) észlelése az interglikozidos kötésen át. Erre a célra legalkalmasabb a 2D HMBC mérés, amelynek hatékonyságát a gradiens-módszerek bevezetése ugrásszerűen megnövelte. A módszer akkor is alkalmazható, ha az interglikozidos hidat alkotó egyik szénatom kvaterner (pl. ketószén esetében). A $^3J_{\text{C,H}}$ csatolás nagysága ugyanakkor fontos adat a glikozidos kötés konformációjának vizsgálatához (l. alább). Oligoszaccharidokban a glikozidos kötés helyének és a gyűrűtagyszám egyidejű meghatározására alkalmas módszert javasolt Jones és Bendiak ²¹, amelynek a lényege a következő. A szabad OH-csoportokat ^{13}C -mal kétszeresen jelzett acetyl-származékká ($-\text{O}-^{13}\text{CO}^{13}\text{CH}_3$) alakítják, majd a meghatározzák a 3-kötéses ^{13}C - ^1H -csatolásokat a gyűrűprotonokkal. A glikozid-kötés pillératomjaihoz, valamint a gyűrű-oxigén nem-anomer szénéhez kapcsolódó protonok ilyen korrelációt nem adnak. A ^{13}C - ^1H -korrelációkat különböző 3D heteronukleáris szekvenciák segítségével jelenítik meg, így módon kiaknázható a 3D technika legfőbb előnye: a kémiai eltolódások szerinti „szétválogatás” különböző dimenziókban. A módszer – amely mintegy a metilezési analízis NMR analógiájának tekinthető – általánosíthatónak ígérkezik; alkalmazását a szerzők egy tetraszaccharid példáján mutatták be ²¹.

A glikozilező egység anomer protonja az aglikon-egység több protonjával is létesíthet interannuláris NOE/ROE kölcsönhatást, nemcsak az interglikozidos kötésen keresztül. Interannuláris NOE/ROE észlelése ezért kis tagszámú oligoszaccharidokban az egységek kapcsolódásának tényét nagyobb biztonsággal rögzíti, mint a kapcsolat pontos helyét. Ez az NOE-módszer jelentőségét nem csökkenti, ellenkezőleg: akkor is jelzi az alegységek kapcsolódását, amikor nincs mérhető J -csatolás az interglikozidos kötésen át. Ilyen eset az eléggé gyakori 1-6 glikozidos kötés (pl. az amilopektinben) vagy a NeuNAc2-6 kötés pl. glikoprotein N-glikánokban. E származékokban az alegységek *három kötésen* át [$\text{C}(1')\text{-O-C}(6)\text{-C}(5)$] kapcsolódnak egymáshoz, szemben a fentebb jelzett *kétkötéses* kapcsolattal. Némileg egzotikusabb példát szolgáltatnak a háromkötéses interglikozidos hidra a nemrég szintetizált diszulfid-diszaccharidok, amelyekben az egységek kapcsolatát NMR módszerrel kizárólag az interannuláris NOE-k igazolták ²² (5. ábra).



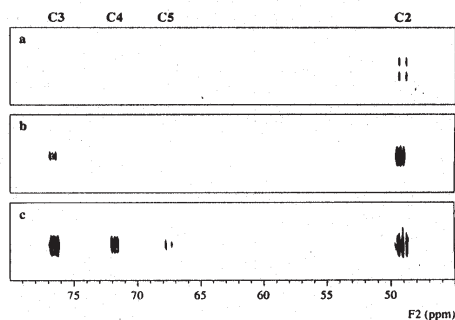
5. Ábra. Interannuláris NOE-kölcsönhatások egy háromkötéses interglikozidos hidat tartalmazó diszulfid-diszaccharid származékban ²².

Poliszaccharidok

Az oligoszaccharidok vizsgálatára kidolgozott módszerek elvileg poliszaccharidokra is alkalmazhatók. A fentiekben jelzett nehézségek poliszaccharidok esetében értelemszerűen halmozottan jelentkeznek. A kémiai szerkezetből fakadó problémákkal kapcsolatban érdemes ismét visszautalni a fehérjékre. A poliszaccharidok szerkezete az utóbbiakénál egyszerűbb is, meg bonyolultabb is egyszerre. A *monoton* (felépítésű) poliszaccharidok (pl. amilóz, vagy kitin) primer szerkezete roppant egyszerű (A_n), az NMR jelhozzárendelési probléma ezért elvben nem jelent bonyolultabb feladatot, mint egy monoszaccharid esetében. Ez az egyszerűség ugyanakkor drasztikusan leszűkíti a térszerkezet, konformáció vizsgálatára alkalmazható NMR paraméterek körét: hiányoznak u.i. a szekvenciafüggő kémiai eltolódások, amelyek a konformációfüggő paraméterek (pl. NOE-k) meghatározásához szükségesek. A legtöbb, élettanilag fontos poliszaccharid ismétlődő egységekből épül fel, vagyis az $(A-B-C-D\dots)_n$ általános formulával jellemezhető. Az ismétlődő szekvencia (amely tartalmazhat elágazásokat is) hossza általában nem nagy, pl. az igen fontos élettani szerepet betöltő glikozaminoglikánokban (hialuronsav, kondroitin-szulfát, keratán-szulfát, heparin) diszaccharid-egységek ismétlődnek, de a nagyobb ismétlődő szekvenciák hossza is ritkán haladja meg a 10-12 monoszaccharid egységet. Így a

poliszaccharidok NMR jelhozzárendelési stratégiája – első közelítésben – visszavezethető az oligoszaccharidoknál alkalmazott eljárásokra.

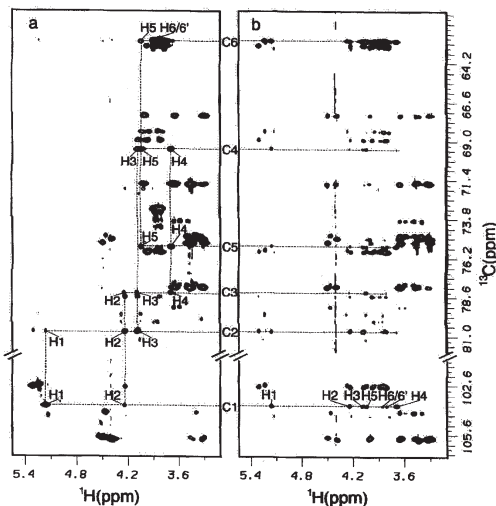
Részben érzékenységi okokból, részben azért, hogy a fehérjék szerkezetvizsgálatára kifejlesztett NMR-arsenál közvetlenül átvihető legyen erre a biopolimer-csoportra, egyre gyakrabban támaszkodnak az izotópjelzés (ami sok esetben sajnos, nem alkalmazható, l. fentebb) nyújtotta előnyökre. Így pl. hasznosíthatók a ^{13}C -jelzett proteineknel sikerrel alkalmazott ^{13}C - ^{13}C -koherencia-transzferen alapuló eljárások, amelyek a kicsi és változó 3-kötéses proton-proton csatolások helyett a sokkal nagyobb, és kevésbé változó egy-kötéses szén-szén csatolásokat hasznosítják. Egyik kézenfekvő lehetőség a 2D ^{13}C - ^{13}C -TOCSY kísérlet: itt közvetlenül a szén-szén konnektivitások jelennek meg az $^1J_{\text{CC}}$ -csatolásokon keresztül, ugyanúgy, mint a „közönséges” (^1H - ^1H -) TOCSY-ban. A ^{13}C - ^{13}C -TOCSY különösen hasznos *manno-* (*ramno-*), vagy *galakto-*konfigurációk esetén, ahol a megfelelő proton-proton-transzfer láncolat az ^1H - ^1H -TOCSY-ban „megszakad” a 2-es illetve 4-es proton helyén a kicsi (gyakran ~ 0) J_{HH} -csatolás miatt. Erre szolgált példát egy *E.coli* lipopoliszaccharid, amelynek pentaszaccharid ismétlődő szekvenciájában két galakto- és egy ramno-konfigurációjú egység található ²³(6. ábra).



6. Ábra. Az *E. coli* O25 jelű, ^{13}C -jelzett poliszaccharid 2D ^{13}C - ^{13}C -korrelációs spektrumrészletei. Az egyes „csíkok” az α -L-FucpNAc egység anomer szénének ^{13}C -korrelációs „keresztcsúcsait” mutatják három különböző ^{13}C - ^{13}C -TOCSY kísérletben, amelyekben az ún. izotróp keverési időt az a)-c) sorrendben növelték. A c) esetben egyértelműen megjelennek a C1-C2-C3-C4-C5 korrelációk ²³.

Egy másik példa egy hexaszaccharid ismétlődő egységet tartalmazó glükurono-xilomannán, amelynek összes C-atomját 99%-ban dúsított ^{13}C -ra cserélve, elvégezték az alegységek teljes ^1H - és ^{13}C -jelhozzárendelését ²⁴. Erre a célra az ún. „konstans idejű” HCCH-COSY és HCCH-TOCSY 2D szekvenciákat használták, amelyek szintén a nagy, egykötéses csatolások közvetítette koherencia-transzfert hasznosítják, és korábban már sikerrel alkalmazták őket ugyancsak ^{13}C -jelzett oligoszaccharidokra. A 7. ábrán látható, hogy a csatolási korrelációkat lépésről-lépésre követve a 2D-térképeken kijelölhető egy adott monoszaccharid-egység teljes spinrendszere: az eljárás emlékeztet a polipeptideknél alkalmazott „klasszikus” szekvenciaspecifikus jelhozzárendelési protokoll ²⁵ első lépésére.

A monoszaccharid-spinrendszerek szekvenciában elfoglalt helyének azonosítása az interglikozidos kötések át ható $^3J_{\text{CH}}$ csatolásokon keresztül, a szokásos HMBC módszerrel



7. Ábra. A ^{13}C -jelzett GXM 9759-Mu-I jelű poliszaccharid 2D konstans idejű HCCH-COSY- (balra) ill. HCCH-TOCSY (jobbra) spektruma 600 MHz-en ²⁴.

történt. Megjegyzendő, hogy ehhez a gyengébb ^{13}C -dúsítás (20%) előnyös, ez esetben u.i. a zavaró, és a 99%-os dúsítás esetén megjelenő egy-kötéses ^{13}C - ^{13}C -csatolások valószínűségi okokból elhanyagolhatók.

A HMBC módszernél hatékonyabb, különösen nagy móltömeg esetén az ún. dipólus-dipólus *keresztkorrelált relaxáció* jelenségén alapuló spektroszkópia. Nemrég sikerült ezzel a módszerrel azonosítani egy pentaszaccharid ismétlődő egységekből álló, igen nagy (>2 millió Da!) poliszaccharidban a négy lehetséges interglikozidos ^1H - ^{13}C -korrelációt természetes ^{13}C -izotópjárványban ²⁶!

Az NMR *kémiai eltolódás* és a molekulaszervezet közötti összefüggések a kezdetekben tapasztalati szabályokban fogalmazódtak meg; a szénhidrátok területén legismertebb szabályt az axiális/ekvatoriális proton eltolódások ill. az anomer konfiguráció kapcsán Lemieux és mtsai tették közzé idézett cikkükben, csaknem fél évszázada. A ^{13}C -eltolódások lényegesen nagyobb tartománya (szénhidrátok váz-szeneire ~ 100 ppm) további, karakterisztikus összefüggések felismeréséhez vezetett, amelyek közül a „glikozilezési eltolódás” jelenségét ²⁷ érdemes kiemelni. A kísérleti adatbázis növekedésével párhuzamosan nőtt az empirikus eltolódás – szerkezet összefüggések megbízhatósága, prediktív hatékonysága. A fejlődéshez két tényező járult hozzá lényeges mértékben: egyik az *abszolút* (vagy önkonzisztens, empirikus megfontolásokat mellőző, kizárólag spektroszkópiailag összefüggésekre támaszkodó) jelhozzárendelés, amelyet a többdimenziós NMR technika tett lehetővé, a másik pedig a kémiai eltolódások elméleti *számítása* felett (esetenként *ab initio*-) kvantummechanikai módszerekkel (utóbbi viszont a számítástechnika viharos fejlődésének köszönhető). Mindezek következményeként ma már több, kémiai eltolódási adatbázisra alapozott programcsomag segíti oligo- és poliszaccharidok primer szerkezetének meghatározását NMR adatokból ²⁸. Ígéretesnek tűnik a mesterséges *neuronhálózatok* alkalmazása szénhidrátok kémiai eltolódás-analízisére ²⁹. Elképzelhető, hogy a kémiai eltolódás-analízis szénhidrátok szerkezet-meghatározásában hasonló jelentőségre tesz

szert, mint ahogy ez a fehérjék esetében történik³⁰. Egy nemrég megjelent közlemény pl. cellulóz polimorf kristályszerkezetek finomításáról számol be szilárd fázisban mért ¹³C kémiai eltolódások felhasználásával³¹.

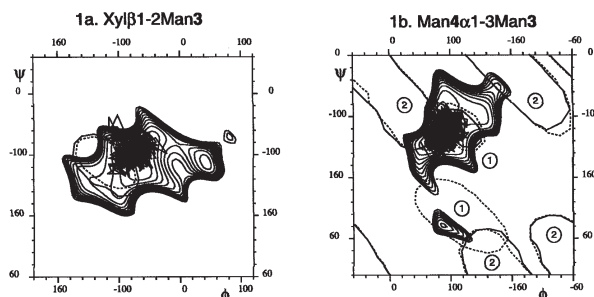
Konformáció

Az élettani funkciókat meghatározó molekuláris kölcsönhatásokban a molekulák téralkatának (konformációjának) kitüntetett szerepe van. Oligo- és poliszaccharidok konformációja a glikozidos kötés körüli rotamer-eloszlástól függ. A konformációs analízis célja tehát az eloszlásra jellemző ϕ ($O5'-C1'-O-C_n$) és ψ ($C1'-O-C_n-C_{n-1}$) torziós szögek meghatározása [háromkötéses interglikozidos kapcsolat, pl. 1→6 glikozidok, esetén egy harmadik torziós szöget (ω) is meg kell adni. Az interglikozidos kötés folyadékfázisban általában flexibilis, ill. legtöbb esetben fiziológiai körülmények között is (kivételet képeznek a szilárd állapotú váz-poliszaccharidok, mint pl. a cellulóz, vagy a kitin), a monoszaccharid-egységek két (ill. három) kötés körül elforoghatnak. Az eloszlás nem egyenletes, vannak energetikailag kitüntetett konformációk ill. konformer-családok. Ezek megkeresése és jellemzése kísérleti (első sorban NMR) adatok és elméleti számítások együttes alkalmazásával történik. Előbbiek az utóbbiak számára kényszerfeltételként (azaz a számítási eljárásokban felhasznált adatként), vagy a számított eredmény ellenőrzésének eszközeként („visszaszámolható” paraméterként) jelennek meg. A molekulamodellezési, számítási eljárásokra itt nincs mód kitérni még vázlatosan sem; a megközelítés szintje az *ab initio*-tól a különböző molekulamechanikai erőterek alkalmazásáig igen változatos. E vonatkozásokról a részletek iránt érdeklődő olvasó bőveges tájékoztatást talál a téma legfrissebb irodalmában^{32,33}.

Az NMR kísérleti adatok lényegében két csoportba sorolhatók: a skaláris spin-spin csatolási állandók a kémiai kötések átműködő, az NOE/ROE kontaktusok pedig a közvetlen, *téren át* ható kölcsönhatásokat közvetítik. Ez az eszköztár az utóbbi időkben kibővült a gyengén orientált (pl. folyadékkristályos) rendszerekben mérhető *maradék dipoláris csatolásokkal*³⁴, amelyek szintén az utóbbi kategóriába tartoznak. A skaláris spin-spin csatolások a megfelelő Karplus egyenletek segítségével a *torziós szögekről*, a *téren át* működő kölcsönhatások révén a *magnag távolságokról* kapunk információt.

Nagy irodalom foglalkozik az interglikozidos kötés pillératomjai (pontosabban: magjai) között mért háromkötéses proton-szén csatolási állandók alkalmazásával: általában két ilyen adat mérhető: $^3J_{H1,Cn}$ és $^3J_{C1,Hn}$. Előbbi a ϕ , utóbbi a ψ torziós szögről tudósít³⁵. Vizsgálták 3-kötéses ¹³C-¹³C-csatolások felhasználását is erre a célra³⁶. A glikozidos kötéssel összekapcsolt C-H csoportok protonjai ($C1'H1'-O-C_nH_n$) között általában mindig mérhető NOE (vagy ROE) kölcsönhatás, függetlenül az anomer-konfigurációtól³⁷. A megfelelő protonok közötti távolság, és így az NOE (ROE) nagysága is, természetesen változik a C-O-kötések körüli elfordulással, azaz függ a konformációtól, azonban az így behatárolt konformációs tér meglehetősen nagy, önmagában nem elegendő a rotamer-eloszlás meghatározásához. A konformációs tér szűkítéséhez több NOE-kölcsönhatásra lenne szükség a szomszédos egységek protonjai között, azonban az NOE meredek távolságfüggése (r^{-6}) ilyen

kontaktusok csak ritkán észlelhetők. A glikozidos kötésen át ható NOE/ROE adatokat e korlátok ellenére is széles körben alkalmazzák, molekulamodellezési számításokkal összekapcsolva, oligoszaccharidok konformációjának vizsgálatára. Ennek illusztrálására a 8. ábrán bemutatjuk egy hexaszaccharid teljes konformációs analízisének³⁸ egy részeredményét.



8. Ábra. Az α -D-Manp(1→3)- β -D-Manp(1→4)[α -D-Manp(1→6), β -D-Xylp(1→2)]- β -D-GlcNAcp(1→4)- β -D-GlcNAc (1→OMe) hexaszaccharid jelzett interglikozidos kötéseire számolt ϕ/ψ -energiafelületek (szintvonalak: HSEA-közelítés), ill. a ϕ/ψ torziós szögek változása (cikk-cakk vonalak) rövid (50 ps) molekuláris dinamikai (MD) szimulációk során³⁸

A ¹³C kémiai eltolódások érzékenyek a glikozidos ϕ/ψ torziós szögek változására⁴⁰. Ezt a megfigyelést újabban sikerrel alkalmazták ciklodextrinek és zárványkomplexeik konformációs analízisében³⁹.

Fentiekben néhány (szubjektíven válogatott) példa kapcsán kíséreltünk meg képet adni az NMR spektroszkópia alkalmazásairól a szénhidrátok területén. A kép mintegy madártávlati: szükségszerűen vázlatos, és hiányos. A témában elmélyülni szándékozó olvasónak a már idézett összefoglalókon kívül K. Bock és mtsai. kitűnő áttekintő cikkét²⁸, vagy egy nemrég megjelent könyvet⁴¹ tudunk figyelmébe ajánlani.

Irodalom

1. Karplus, M. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11.
2. Lemieux, RU.; Kullnig, RK.; Bernstein, HJ.; Schneider, WG. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1005.
3. Shoolery, JN. *Prog. NMR Spectr.* **1995**, *28*, 37.
4. Saunders, M.; Wishnia, A.; Kirkwood, JG. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3289.
5. Cohen, JS.; Jaroszewski, JW.; Kaplan, O.; Ruiz-Cabello, J.; Collier, SW. *Prog. NMR Spectr.* **1995**, *28*, 53.
6. Szilágyi, L. *Steric Aspects of Biomolecular Interactions*, CRC Press: Boca Raton, **1987**, 45
7. Wüthrich, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3340.
8. Jardetzky, O.; Roberts, GCK. *NMR in Molecular Biology*, Acad. Press: New York, **1981**, 9.
9. Wüthrich, K.; Wider, G.; Wagner, G.; Braun, W. *J. Mol. Biol.* **1982**, *155*, 311.
10. Sattler, M.; Schleucher, J.; Griesinger, C. *Prog. NMR Spectr.* **1999**, *34*, 93.
11. Mechref, Y.; Novotny, M. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 321.
12. du Penhoat, CH.; Gey, C.; Pellerin, P.; Perez, S. *J. Biomol. NMR* **1999**, *14*, 253.
13. Matter, H.; Szilágyi, L.; Forgó, P.; Marinic, Z.; Klaić, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2212.
14. Kövér, KE.; Fehér, K.; Szilágyi, L.; Borbás, A.; Herczegh, P.; Lipták, A. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 393.

15. Vliegthart, JFG.; Dorland, L.; van Halbeek, H. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1983**, *41*, 209.
16. Rutherford, TJ.; Homans, SW. *J. Magn. Reson.* **1995**, *106*, 10.
17. Perlin, AS.; Casu, B. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 2921.
18. Bock, K.; Pedersen, C. *J. Chem. Soc. Perkin 2* **1974**, 293.
19. Szilágyi, L.; Györgydeák, Z. *Carbohydr. Res.* **1985**, *143*, 21.
20. Szilágyi, L.; Forgó, P. *Carbohydr. Res.* **1993**, *247*, 129.
21. Jones, DNM.; Bendiak, B. *J. Biomol. NMR* **1999**, *15*, 157.
22. Szilágyi L.; Illyés TZ.; Herczegh P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3901.
23. Kjellberg, A.; Nishida, T.; Weintraub, A.; Widmalm, G. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 128.
24. Sheng, S.; Cherniak, R. *Carbohydr. Res.* **1997**, *301*, 33.
25. Wüthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley-Interscience: New York, 1986.
26. Vincent, SJF.; Zwahlen, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8307.
27. Lipkind, GM.; Shashkov, AS.; Knirel, YA.; Vinogradov, EV.; Kochetkov, NK. *Carbohydr. Res.* **1988**, *175*, 59.
28. Duus, JO.; Gotfredsen, CH.; Bock, K. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4589.
29. Radomski, JP.; van Halbeek, H.; Meyer, B. (1994): *Nature Struct. Biol.*, *1*, 217.
30. Szilágyi, L. *Progr. NMR Spectr.* **1995**, *27*, 325.
31. Sternberg U.; Koch FT.; Priess W.; Witter R. *Cellulose* **2003**, *10*, 189.
32. Imberty, A.; Pérez, S. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4567.
33. Imberty, A.; Engelsens, SB.; Tvaroska, I.; Defaye, J. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 905-1020.
34. Azurmendi, HF.; Bush, CA. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 905.
35. Wormald, MR.; Petrescu, AJ.; Pao, Y-L.; Glithero, A.; Elliott, T.; Dwek, RA. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 371.
36. Xu, Q.; Bush, AC. *Carbohydr. Res.* **1998**, *306*, 335.
37. Homans, SW. *Progr. NMR Spectr.* **1990**, *22*, 55.
38. Lommerse, JPM.; van Rooijen, JM.; Kroon-Batenburg, LMJ.; Kammerling, JP.; Vliegthart, JFG. *Carbohydr. Res.* **2002**, *337*, 2279.
39. O'Brien, EP.; Moyna, G. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 87.
40. Jarvis, MC. *Carbohydr. Res.* **1994**, *259*, 311.
41. Jiménez-Barbero, J. *NMR Spectroscopy of Glycoconjugates*, Wiley-VCH: Weinheim, 2003.