

Данные ^{13}C -ЯМР-спектров (δ , м. д.)* ДПС и ПС *Pseudoalteromonas* sp. КММ 639

Моносахаридный остаток	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
ДПС						
$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-1}$	102.8 (102.9)	67.9 (68.3)	76.8 (76.8)	72.0 (71.8)	70.3 (70.4)	18.0 (18.0)
$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-D-Galp-1}$	96.8 (96.9)	68.8 (68.9)	78.3 (78.5)	70.5 (70.2)	71.7 (72.2)	62.0 (62.4)
ПС						
$\rightarrow 3\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-1}$	102.7	67.9*	76.8	71.6	70.3	18.0
$\rightarrow 3, 6\text{-}\alpha\text{-D-Galp-1}$	96.8	68.8	78.3	70.3	71.6	65.5
Gro	62.0**	74.4	62.0**			

* В скобках приведены расчетные данные.

** Уширенный дублет.

лотами, идентифицирована 3- β -гидроксимиристиновая кислота – обычный компонент ЛПС грамотрицательных бактерий, а в водном растворе (с помощью БХ и ГЖХ) – D-глюкозамин, элемент основной цепи липида А.

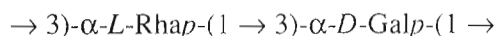
По данным элементного анализа, содержание фосфора в ПС составляло $\approx 3.6\%$. Кроме того, в ^{31}P -ЯМР-спектре ПС наблюдался сигнал при +1.6 м.д., что свидетельствует о наличии в цепи дизамещенного монофосфата [10].

В гидролизате ПС БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов идентифицированы D-галактоза, L-рамноза, абсолютная конфигурация которых определена на основании величин их удельного оптического вращения, а также глицерин. Кроме того, с помощью высоковольтного бумажного электрофореза показано наличие кислого компонента с M_{GalA} 0.7, дающего положительную реакцию с молибденовым реагентом Хейнса-Ишервуда на фосфор и являющийся, таким образом, неорганическим фосфатом.

Порядок замещения моносахаридных остатков в ПС определен методом метилирования [11]. При этом ГЖХ-МС идентифицированы 2,4-ди-O-метилрамноза и 2,4-ди-O-метилгалактоза, что указывает на разветвленный характер полисахарида и замещение остатка рамнозы в положение 3, а остатка галактозы – в положения 3 и 6.

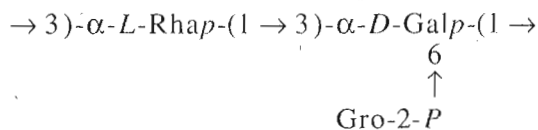
В результате дефосфорилирования полисахарида с последующей гель-хроматографией продуктов реакции на геле TSK HW-40(F) получен дефосфорилированный полисахарид (ДПС), в составе которого БХ и ГЖХ в виде ацетатов полиолов обнаружены галактоза и рамноза. В ^{13}C -ЯМР-спектре ДПС присутствовали сигналы аномерных атомов углерода при 102.8 и 96.8 м.д. (таблица), а также сигналы метильной (18.0 м.д.) и гидроксиметильной (62.4 м.д.) групп, относящиеся к C-6 моносахаридных остатков. Из этих данных следует, что молекула ДПС построена из повторяющихся дисахаридных звеньев, содержащих один остаток гексозы и один – 6-дезоксигексозы. Константы спин-спинового взаимодействия ($K_{\text{ССВ}}$) $J_{\text{С,Н}}$, определенные из ^{13}C -ЯМР-спектра, снятого

без подавления углерод-протонных взаимодействий, составляли 170 Гц для обоих аномерных атомов, что указывает на α -конфигурацию всех гликозидных связей в ДПС [12]. Анализ химических сдвигов углеродных атомов и эффектов гликозилирования позволил надежно отнести сигналы остатков рамнозы и галактозы [13]. Сигнал при 96.8 м.д. может принадлежать только аномерному атому остатка с D-конфигурацией, гликозилирующему в положение 3 остаток с L-конфигурацией, имеющий аксиальную ОН-группу в положении 2 или 4 [13]. При обработке периодатом ПС не окислялся (^{13}C -ЯМР-спектры нативного и окисленного ПС были идентичны). Этот факт подтверждает данные метилирования, а также указывает на то, что остаток фосфорной кислоты замещает остаток глицерина в положение 2. Таким образом, анализ спектров подтвердил строение ДПС:



Для подтверждения приведенной структуры проведен компьютерный расчет ^{13}C -ЯМР-спектра ДПС по методу [14] (таблица). При этом величины расчетных химических сдвигов оказались близкими к экспериментальным (сумма квадратичных отклонений химических сдвигов атомов углерода составила 0.7).

При сопоставлении ^{13}C -ЯМР-спектров нативного ПС и ДПС видно, что в спектре исходного ПС имеются дополнительные сигналы при 62.0 (двойной интегральной интенсивности), 65.5 и 74.4 м.д. Форма двух последних сигналов углеродных атомов (уширенные дублеты) указывает на то, что они связаны с остатком фосфата [15], а величины их химических сдвигов позволяют отнести первый к C-2 атому глицерина, а второй – к C-6 остатка галактозы [13]. Таким образом, O-специфический полисахарид *Pseudoalteromonas* sp. КММ 639 имеет следующую структуру:



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование микроорганизма *Pseudoalteromonas* sp. КММ 639, выделение ЛПС, аналитическую и препаративную БХ, ГЖХ и ГЖХ-МС, жидкостную хроматографию, электрофорез, измерение оптического вращения, полный кислотный гидролиз ЛПС, ПС и липида А, метилирование выполняли как описано ранее [3]. ^{13}C -ЯМР-спектры снимали на приборе Bruker WM-250 в D_2O при 60°C : внутренний стандарт – метанол (δ_{C} 50.15 м.д.). ^{31}P -ЯМР-спектр записан на том же приборе при 20°C относительно H_3PO_4 . Содержание фосфора определяли по методу [16].

ЛПС, выделенный по методу Вестфала [9] (2.4 г), подвергали анионообменной хроматографии на геле DEAE TSK 650(M). При этом резервный *D*-глюкан (1.63 г) элюировался 50 мМ Трис-НСI-буфером (рН 7.0), а ЛПС – 0.5 М NaCl в том же буфере (480 мг). ЛПС (400 мг) гидролизовали 1% уксусной кислотой (40 мл, 100°C , 2 ч), осадок липида А отделяли центрифугированием (20 мг), водорастворимую фракцию осаждали этанолом, осадок хроматографировали на геле TSK-65(F), получая при этом ПС (300 мг). Водно-этанольный раствор упаривали досуха. Выход остатка 15 мг.

Дефосфорилирование ПС (100 мг) проводили 40% водной HF (10 мл, 4°C , 48 ч), кислоту удаляли над щелочью в вакуум-эксикаторе, полученный продукт хроматографировали на геле TSK HW 40(F). Выход ДПС – 58 мг.

Работа финансирована РФФИ (грант № 96-04-49028).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

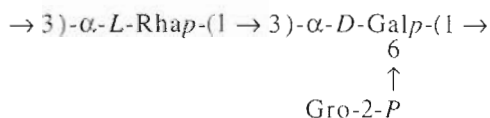
1. *Baumann L., Baumann P., Mandel M., Allen R.D.* // J. Bacteriol. 1972. V. 110. P. 402–429.
2. *Gauthier G., Gauthier M., Christen R.* // Intern. J. Syst. Bacteriol. 1995. V. 45. P. 755–761.
3. *Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л., Zubkov В.А., Иванова Е.П., Оводов Ю.С., Шапков А.С., Книрель Ю.А.* // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 327–336.
4. *Назаренко Е.Л., Zubkov В.А., Шапков А.С., Книрель Ю.А., Горшкова Р.П., Иванова Е.П., Оводов Ю.С.* // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 740–751.
5. *Назаренко Е.Л., Горшкова Р.П., Zubkov В.А., Шапков А.С., Иванова Е.П., Оводов Ю.С.* // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 733–739.
6. *Zubkov V.A., Nazarenko E.L., Gorshkova R.P., Ivanova E.P., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Paramonov N.A., Ovodov Y.S.* // Carbohydr. Res. 1995. V. 275. P. 147–154.
7. *Gorshkova R.P., Nazarenko E.L., Zubkov V.A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Paramonov N.A., Meshkov S.V., Ivanova E.P.* // Carbohydr. Res. 1997. V. 299. P. 69–76.
8. *Westphal O., Luderitz O., Bister F.* // Z. Naturforsch. 1952. B. 7B. P. 148–155.
9. *Dutton G.G.S., Folkman T.E.* // Carbohydr. Res. 1980. V. 80. P. 147–161.
10. *Egan W., Schneerson R., Werner K.E., Zon G.* // J. Am. Chem. Soc. 1982. V. 104. P. 2898–2910.
11. *Hakomori S.* // J. Biochem. (Tokyo). 1964. V. 55. P. 205–208.
12. *Bock K., Pedersen C.* // J. Chem. Soc. Perkin Trans II. 1974. № 3. P. 293–297.
13. *Lipkind G.M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Vinogradov E.V., Kochetkov N.K.* // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. P. 59–75.
14. *Кочетков Н.К., Виноградов Е.В., Книрель Ю.А., Шапков А.С., Липкинд Г.М.* // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 116–125.
15. *Jennings H.J., Lugowski C., Young N.M.* // Biochemistry. 1980. V. 19. P. 4712–4719.
16. *Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H.* // Anal. Chem. 1956. V. 28. P. 1756–1758.

Structure of the Glycerophosphate-containing O-Specific Polysaccharide of *Pseudoalteromonas* sp. KMM 639

R. P. Gorshkova[#], E. L. Nazarenko, V. V. Isakov, V. A. Zubkov,
N. M. Gorshkova, L. A. Romanenko, and E. P. Ivanova

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division, Russian Academy of Sciences,
prosp. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia*

On the basis of acid hydrolysis, dephosphorylation, methylation, and ^{13}C NMR spectroscopy data, the O-specific polysaccharide of *Pseudoalteromonas* sp. KMM 639 was shown to be a glycerophosphate-containing polymer built of repeating disaccharide units of the following structure:



Key words: Pseudoalteromonas, glycerophosphate-containing polysaccharide, NMR spectroscopy, methylation

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (4232) 314050; e-mail: elnaz@piboc.marine.su.