



УДК 577.114.5.088:579.841.11

ИДЕНТИФИКАЦИЯ 3-АЦЕТАМИДИНО-2-АЦЕТАМИДО-2,3-ДИДЕЗОКСИ-*L*-ГУЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ В СОСТАВЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, ИММУНОТИП 7

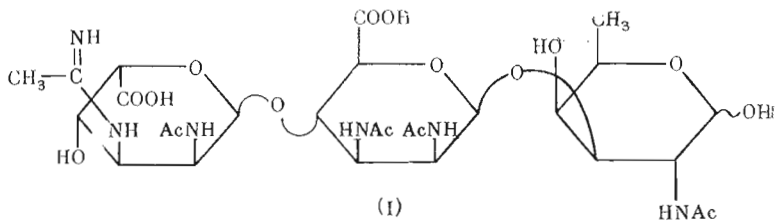
Книрель Ю. А., Парамонов Н. А., Виноградов Е. В.,  
Шапков А. С., Кочетков Н. К.

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

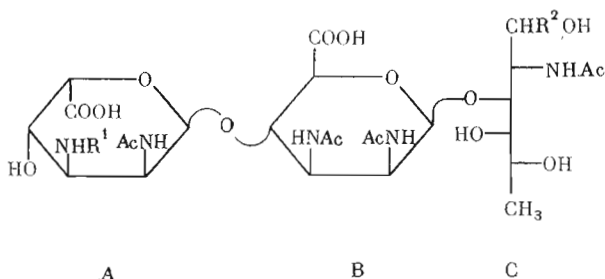
Производные диаминоуроновых кислот были идентифицированы нами ранее [1—3] в липополисахаридах *Pseudomonas aeruginosa* O3 и O6. В этой работе мы сообщаем об идентификации нового моносахарида этого класса — 3-ацетамидино-2-ацетамидо-2,3-дидезокси-*L*-гулуруновой кислоты в *O*-специфическом полисахариде *P. aeruginosa*, иммунотип 7, а также об установлении строения этого полисахарида.

Липополисахарид был выделен из бактериальных клеток по методу [4] и расщеплен 1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ( $100^\circ\text{C}$ , 3 ч) с образованием кислого полисахарида. Из продуктов кислотного гидролиза полисахарида (4 М  $\text{HCl}$ ,  $100^\circ\text{C}$ , 4 ч) был идентифицирован только *D*-фукозамин. В  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектре полисахарида присутствовали сигналы трех аномерных атомов углерода при 95,2, 100,0 и 100,9 м.д., пяти углеродных атомов, связанных с азотом, в области 46—54 м.д., семи атомов углерода, связанных с кислородом, в области 68—80 м.д., метильной группы 6-дезоксисахара при 16,5 м.д., четырех ацетамидных групп при 23,1—23,2 ( $\text{CH}_3$ ) и 173—176 м.д. ( $\text{CO}$ ), двух карбоксильных групп в области 173—176 м.д., а также ацетамидиновой группы при 20,9 ( $\text{CH}_3$ ) и 168,2 м.д. ( $\text{N}=\text{C}-\text{N}$ ) (ср. с данными [5] для этой группы в полисахариде *P. aeruginosa* O13). Таким образом, полисахарид построен из повторяющихся трисахаридных звеньев, одним из компонентов которых является *D*-фукозамин, а два другие, по-видимому, производные диаминоуроновых кислот. Четыре аминогруппы аminosахаров ацетилированы, а пятая входит в ацетамидиновую функцию.

При сольволизе полисахарида ( $\text{HF}$ ,  $20^\circ\text{C}$ , 4 ч) расщеплялась избирательно гликозидная связь фукозамина, и в качестве единственного продукта образовался трисахарид (I), содержащий остаток фукозамина на восстанавливаемом конце ( $\delta_{\text{C}}$  92,3,  $\text{C}1\alpha$ , 96,0,  $\text{C}1\beta$ ). Восстановление трисахарид (I) действием  $\text{NaBH}_4$  в насыщенном водном растворе  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ( $20^\circ\text{C}$ , 20 ч) привело к олигосахариду (II), имеющему в качестве агликона остаток фукозаминитола ( $\delta_{\text{C}}$  61,9,  $\text{C}1$ , 19,3,  $\text{C}6$ ) и сохраняющему ацетамидиновую группу ( $\delta_{\text{H}}$  2,42, с;  $\delta_{\text{C}}$  20,6,  $\text{CH}_3$ , 167,8,  $\text{N}=\text{C}-\text{N}$ ). Эта же реакция в воде привела к олигосахариду (III) в результате одновременного восстановительного дезаминирования ацетамидиновой функции в этиламиногруппу ( $\delta_{\text{H}}$  1,37, т,  $J$  7,1 Гц,  $\text{CH}_3$ , 3,25—3,42, м,  $\text{CH}_2$ ;  $\delta_{\text{C}}$  10,9,  $\text{CH}_3$ , 45,1,  $\text{CH}_2$ ). При использовании  $\text{NaBD}_4$  в воде был получен олигосахарид (IV), содержащий  $\text{CH}_3\text{CD}_2$ -группу ( $\delta_{\text{H}}$  1,35, с,  $\text{CH}_3$ ). При обработке соединения (II) 5% водным  $\text{Et}_3\text{N}$  ( $60^\circ\text{C}$ , 4 ч) происходило превращение ацетамидиновой группы в ацетамидную, и был получен олигосахарид (V), несущий пять *N*-ацетильных групп. Строение олигосахаридов (I)—(III) было подтверждено масс-спектрами, полученными при ионизации бомбардировкой быстрыми атомами, в которых присутствовали интенсивные пики нонов  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , отвечающие молекулярным массам этих олигосахаридов — 720, 722 и 709 соответственно.



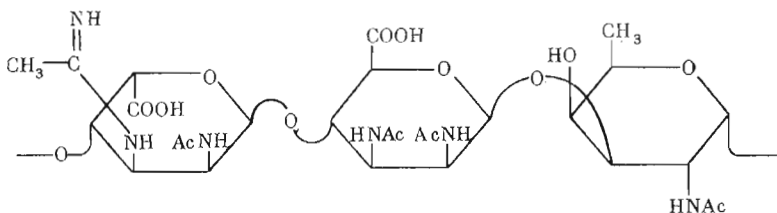
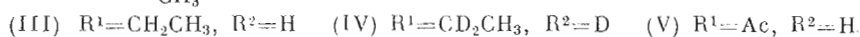
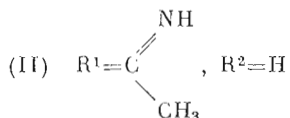
(I)



A

B

C



(VI)

$^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры (III) были полностью расшифрованы с помощью селективного гомоядерного и гетероядерного  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  двойного резонанса. На основании КССВ вицинальных протонов [6, 7] был сделан вывод, что одна из диаминоуроновых кислот (звено А) имеет  $\alpha$ -гуло-конфигурацию ( $J_{1,2}$  3,2,  $J_{2,3}$  4,5,  $J_{3,4}$  3,0,  $J_{4,5}$  3,0 Гц), а вторая (звено В) —  $\beta$ -манно-конфигурацию ( $J_{1,2}$  1,4,  $J_{2,3}$  4,0,  $J_{3,4}$  10,1,  $J_{4,5}$  10,1 Гц). Химические сдвиги сигналов С2 и С3 звеньев А (47,3 и 58,0 м. д.) и В (52,2 и 54,2 м. д.) показывали, что эти углеродные атомы связаны с азотом, и, следовательно, оба моносахарида являются производными 2,3-диамино-2,3-дидезоксиуроновых кислот.

Эксперименты на соединении (III) по ядерным эффектам Оверхаузера показали пространственное взаимодействие протонов Н1 звена А и Н4 звена В, а также Н1 звена В и Н3 агликона (звена С), что позволяет установить последовательность моносахаридов и типы замещения звеньев В и С. Пространственное взаимодействие протонов  $\text{CH}_3$  этиламиногруппы и Н3 звена А доказывало ее положение при С3 этого моносахарида. Вывод об этом подтверждался значительным смещением сигнала С3 звена А к 58,0 и 51,6 м. д. в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах олигомеров (III) и (V) соответственно по сравнению с его положением при 54,6 м. д. в спектре ацетиамидино-производного (II). Таким образом, в состав полисахарида входит 3-ацетиамидино-2-ацетиамидо-2,3-дидезоксиуглуруоновая кислота.

Для определения абсолютных конфигураций производных диаминоуроновых кислот были использованы известные закономерности эффектов гликозилирования в  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектрах [8]. Эти эффекты были определены при сравнении данных  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров трисахарида (I) и соответствующих незамещенных моносахаридов [2, 9]. Небольшой по модулю  $\beta$ -эффект ( $-0,9$  м. д.) на С4 D-фукозамина, вызванный его замещением 2,3-диацета-

мидо-2,3-дидезокси-β-маннуриновой кислоты в положение 3, доказывал *D*-конфигурацию гликозилирующего моносахарида [8]. Отрицательный β-эффект (−0,9 м. д.) на C3 производного *D*-маннуриновой кислоты, вызванный ее гликозилрованием в положение 4 производным α-гулуриновой кислоты, показывал, что последний моносахарид имеет *L*-конфигурацию [8].

Сравнение <sup>13</sup>C-ЯМР-спектров трисахарида (I) и полисахарида показало, что фукозамин имеет α-конфигурацию (δ<sub>C</sub> 95,2, C1, <sup>1</sup>J<sub>CL, H1</sub> 169,2 Гц [10]) и присоединен к звену А в положение 4 (ср. δ<sub>C</sub> 70,5 и 67,4 для C4 звена А в спектрах полисахарида и олигосахарида (I) соответственно). Таким образом, полисахарид является линейным, и его повторяющееся звено имеет структуру (VI).

Авторы благодарят Ю. Н. Елькина за съемку масс-спектров.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Dmitriev B. A., Kocharova N. A., Knirel Y. A., Shashkov A. S., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1982, v. 125, № 1, p. 229—237.
2. Knirel Y. A., Vinogradov E. V., Shashkov A. S., Dmitriev B. A., Kochetkov N. K., Stanislavsky E. S., Mashilova G. M. Eur. J. Biochem., 1983, v. 134, № 2, p. 289—297.
3. Книрель Ю. А., Парамонов Н. А., Виноградов Е. В., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. Биоорг. химия, 1986, т. 12, № 7, с. 995—997.
4. Вестфаль О., Яни К. В кн.: Методы химии углеводов/Ред. Кочетков Н. К. М.: Мир, 1967, с. 325—332.
5. Книрель Ю. А., Виноградов Е. В., Шашков А. С., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. Биоорг. химия, 1986, т. 12, № 6, с. 848—850.
6. Altona C., Haasnoot C. A. G. Org. Magn. Reson., 1980, v. 13, № 6, p. 417—429.
7. Шашков А. С., Изв. АН СССР. Сер. хим., 1983, № 6, с. 1328—1336.
8. Kochetkov N. K., Chizhov O. S., Shashkov A. S. Carbohydr. Res., 1984, v. 133, № 2, p. 173—185.
9. Kenne L., Lindberg B., Madden J. K., Lindberg A. A., Gemski P., Jr. Carbohydr. Res., 1983, v. 122, № 2, p. 249—256.
10. Bock K., Pedersen C. J. Chem. Soc. Perkin Trans. II, 1974, № 3, p. 293—297.

Поступило в редакцию  
13.II.1986

#### IDENTIFICATION OF 3-ACETAMIDINO-2-ACETAMIDO-2,3-DIDEOXY-*L*-GULURONIC ACID IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IMMUNOTYPE 7 LIPOPOLYSACCHARIDE

KNIREL Y. A., PARAMONOV N. A., VINOGRADOV E. V.,  
SHASHKOV A. S., KOCHETKOV N. K.

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

O-Specific polysaccharide chain of *Pseudomonas aeruginosa* immunotype 7 lipopolysaccharide is composed of 3-acetamidino-2-acetamido-2,3-dideoxy-*L*-guluronic acid (GulNAcAmA), 2,3-diacetamido-2,3-dideoxy-*D*-mannuronic acid (ManN<sub>2</sub>Ac<sub>2</sub>A), and N-acetyl-*D*-fucosamine (FucNAc). On solvolysis with anhydrous hydrogen fluoride, the polysaccharide afforded a trisaccharide containing all its components. Borohydride reduction of the trisaccharide in boric acid solution resulted in conversion of reducing fucosamine into fucosaminitol, whereas in water the reduction was accompanied by reductive deamination of acetamidino function into ethylamino group. On hydrolysis with aqueous triethylamine, acetamidino group gave acetamido group. Analysis of the trisaccharides thus obtained by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy (including nuclear Overhauser effect), <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, and fast-atom bombardment mass spectrometry allowed the determination of the structure of the unusual uronic acid derivative and the following structure of the polysaccharide repeating unit: -4)-α-*L*-GulNAcAmA-(1-4)-β-*D*-ManN<sub>2</sub>Ac<sub>2</sub>A-(1-3)-α-*D*-FucNAc(1-