



УДК 547.426.2'18'455.6.02:579.873

ПОЛИ(ГАЛАКТОЗИЛГЛИЦЕРОФОСФАТ) С БОКОВЫМИ  
ГЛИЦЕРОФОСФАТНЫМИ ЕДИНИЦАМИ В КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ  
*ACTINOMADURA CREMEA* ИНА 292Шотехина Н. В., Наумова И. Б., Шапков А. С. \*,  
Терехова Л. П. \*\**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет;*\* *Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва;*\*\* *Институт новых антибиотиков Академии медицинских наук СССР, Москва*

Тейхоевая кислота клеточной стенки *Actinomadura cremea* ИНА 292 имеет необычное строение и представляет собой поли(галактозилглицерофосфатную) цепь с боковыми глицерофосфатными единицами. Мономерные единицы полимера — монофосфаты 1-О-β-D-галактопиранозилглицерина — объединяются фосфодиэфирными связями при участии С3 глицерина и С6 галактозы. Примерно каждый второй галактозилный заместитель имеет при С3 глицерофосфатный остаток.

В последнее время накапливаются и расширяются данные по структуре тейхоевых кислот представителей различных групп микроорганизмов. Изучение каждого нового таксона бактерий приводит к открытию неизвестных ранее деталей в структуре этих полимеров. Тейхоевые кислоты, физиологически важные компоненты клеточных стенок, найдены и исследованы у бацилл, пневмококков, стафилококков, стрептомицетов, артробактерий и других родов бактерий. Показано, что они регулируют ряд важных биохимических процессов в клетке грамположительных бактерий и что их функционирование тесно связано с особенностями строения полимерной цепи [1].

Исследованные ранее 30 штаммов представителей рода *Actinomadura* показали большое разнообразие в строении их тейхоевых кислот [2], что позволило выделить для детального изучения наиболее интересные. В работе [3] приведены новые данные о структуре стеночной тейхоевой кислоты актиномадуры, содержащей 3-О-метилгалактозу.

В задачу настоящего исследования входило изучение структуры тейхоевой кислоты клеточной стенки *A. cremea* ИНА 292, которая, по предварительным данным, имела необычное строение.

Полученный из клеточной стенки полимер при кислотной деградации образовывал монофосфат глицерина, галактозу, глицерин и небольшие количества монофосфата галактозы и неорганического фосфата.

Для изучения структуры полимера необходимо было иметь значительное его количество, в связи с чем тейхоевая кислота была выделена из целых клеток и очищена ионообменной хроматографией на DEAE-Тоуорепарл 650 М в градиенте концентрации NaCl. Полимер элюируется в районе 0,2 М NaCl, и его идентичность тейхоевой кислоте, выделенной из клеточной стенки, была доказана сравнением продуктов кислотной деградации обоих препаратов.

Исследование проводили по схеме, принятой для изучения аналогичных полимеров [4].

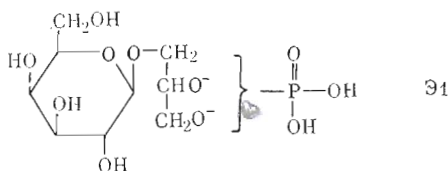
Известно, что установление строения фосфорных эфиров, продуктов щелочной деградации тейхоевой кислоты, — важный и основной этап при конструировании исходной молекулы [5]. Щелочной гидролиз тейхоевой кислоты привел к образованию трех фосфорных эфиров.

Фосфорный эфир I (Э1) имел электрофоретическую подвижность в буфере В  $E_{\text{ГРОР}}$  — 0,62, при хроматографировании в системе А идентифи-

Соединение	C1	C2	C3	C1'
-6'Gal $\beta$ 1'-4Gro3P-	71,8 *	70,6	67,8	104,5 **
-6'(Gro3''P-3')Gal $\beta$ 1'-4Gro3P-	71,7 *	70,6	67,8	104,15 **
Glc $\beta$ 1-4Gro3P [9]	70,9	69,5	67,5	
Gal $\beta$ 1-OMe [7]				104,9

\*, \*\* Отнесение может быть обратным.

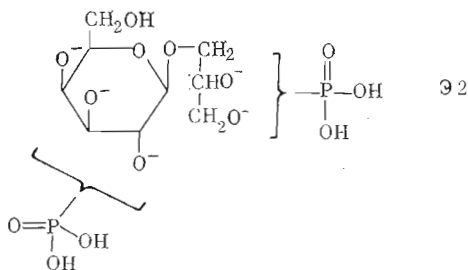
цированы два изомера ( $R_{\text{Gro}2\text{P}} = 0,62$ , и  $0,78$ ), которые при кислотном гидролизе образуют идентичные продукты — галактозу и монофосфат глицерина в соотношении 1 : 1. При гидролизе фосфомоноэстеразой образуются гликозид и неорганический фосфат. Гликозид в системе Б имеет подвижность  $R_{\text{Glc}} 0,8$ , окрашивается  $\text{AgNO}_3$ , не дает реакции с анилинфталатом и при кислотном гидролизе расщепляется до глицерина и галактозы в соотношении 1 : 1. Периодатное окисление гликозида привело к образованию формальдегида в количестве, эквивальном исходному гликозиду. Эти данные вместе с данными о пиранозной форме *D*-галактозы и о  $\beta$ -конфигурации гликозидного центра, полученными при анализе спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР тейхоевой кислоты (см. ниже), свидетельствуют о том, что галактозидная связь образована с первичным гидроксилом глицерина, а фосфорный эфир (Э1) является монофосфатом 1-*O*- $\beta$ -*D*-галактопиранозилглицерина:



Фосфорный эфир 2 (Э2) имел электрофоретическую подвижность  $E_{\text{GroP}} 1,03$ , при хроматографировании в системе А идентифицированы его изомеры с подвижностью  $R_{\text{Gro}2\text{P}} 0,12$  и  $0,19$ . При кислотном гидролизе изомеры образуют одинаковые соединения — галактозу, глицерин, монофосфат глицерина, неорганический фосфат и эфир (Э2а). При ферментативном гидролизе фосфомоноэстеразой эфир (Э2) дает гликозид, идентичный гликозиду, полученному из (Э1), и неорганический фосфат. Определено молярное соотношение компонентов эфира:  $\text{P}_i - \text{Gal} - \text{Gro} 2,05 : 1,2 : 1,0$  (2 : 1 : 1).

Эфир (Э2а) полностью расщепляется фосфомоноэстеразой до галактозы и неорганического фосфата. Это свидетельствует о том, что он является фосфорным эфиром галактозы.

Исходя из соображений, основанных на механизме щелочного гидролиза тейхоевых кислот и обсужденных ниже, структуру изомеров эфира (Э2) можно представить следующим образом:



Очевидно, что эфир (Э2) может иметь более двух изомерных соединений.

Фосфорный эфир 3 (Э3) — монофосфат глицерина, что установлено сравнением со стандартным образцом при электрофоретическом изучении в буфере В и ВХ в системе А.

C2'	C3'	C4'	C5'	C6'	C1''	C2''	C3''
72,1	74,65	69,4	74,4	65,2			
71,1	78,6	68,65	73,85	65,2	63,5	72,1	65,5
71,8	73,9	69,8	76,2	62,1			

Полученный состав фосфорных эфиров не соответствовал продуктам щелочной и кислотной деградации тейхоевых кислот, изученных в предыдущих исследованиях различных авторов. С одной стороны, анализ эфира (Э1) и гликозида свидетельствовал о том, что галактозилный заместитель присоединен к первичному гидроксилу глицерина. Такой эфир мог образоваться в двух случаях: если полимер имеет поли(глицерофосфатную) цепь 2,3-типа, что было исключено, так как при гидролизе кислотой в продуктах реакции не обнаружен дифосфат глицерина, или если присутствует поли(галактозилглицерофосфатная) цепь, в которой мономерные единицы объединяются фосфодиэфирной связью с участием глицериновой и галактозной единиц [4].

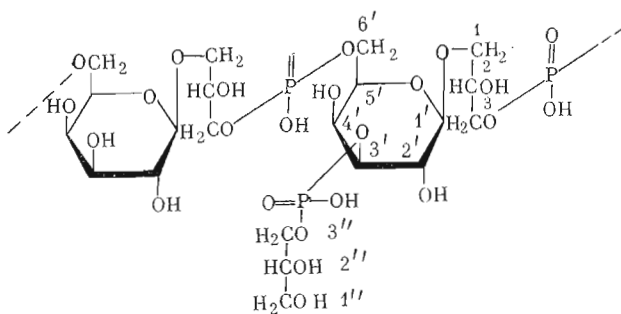
С другой стороны, наличие в продуктах гидролиза свободных глицерофосфатных остатков не укладывалось ни в одну из схем щелочной деградации подобных полимеров и указывало на структурные особенности исследуемой тейхоевой кислоты.

Полимер был очищен с помощью электрофореза, и в нем определено молярное соотношение компонентов. Вычислено:  $\text{Gto} - \text{P}_i - \text{Gal}$ , 3 : 3 : 2. Эти данные могли указывать на то, что около половины глицерофосфатных единиц не замещено галактозой. Наличие таких единиц в структуре основной цепи в виде отдельных глицерофосфатных последовательностей исключалось, так как в таком случае при кислотном гидролизе неизбежно образовался бы дифосфат глицерина. Оставалось только предположить, что отдельные глицерофосфатные момеры образуют боковые ответвления поли(галактозилглицерофосфатной) цепи.

В продуктах кислотного гидролиза тейхоевой кислоты и эфира (Э2) обнаружен монофосфат галактозы. Учитывая механизм щелочного гидролиза тейхоевой кислоты через образование циклического фосфата [6], мы полагали, что сохранение фосфатного остатка на галактозе указывает на участие в образовании фосфодиэфирной связи углеродного атома галактозы. Однако с равной долей вероятности гидроксильные группы при C2, C3 или C4 галактозы могли участвовать в образовании как основной фосфодиэфирной связи кора, так и в присоединении боковых глицерофосфатных единиц. В обоих случаях продукты химической деградации были бы одинаковыми. Вопрос мог быть решен с помощью спектроскопии на ядрах  $^{13}\text{C}$ .

В спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, типичном для биополимера со скрытой регулярностью структуры, содержались сигналы различной интегральной интенсивности. Часть пиков находилась в характеристических областях спектра, так что их отнесение не вызывало затруднений. Так, в области резонанса атомов углерода, связанных с двумя атомами кислорода, имелись два близких по положению и почти равных по интенсивности сигнала (при 104,5 и 104,15 м.д.), принадлежащих аномерным атомам углерода  $\beta$ -D-галактопиранозных остатков с O-алкильным (но не O-фосфатным) заместителем при C1-атоме [4, 7]. АРТ\*-спектр [8], позволяющий различить пики атомов углерода, связанных с одним или двумя протонами, выявил сигналы оксиметильных групп трех типов: незамещенных (63,5 м.д.), O-фосфорилированных (67,8; 65,5 и 65,2 м.д.), O-алкилированных (71,7 и 71,8 м.д.). Сигналы при 63,5; 65,5; 71,7 и 71,8 м.д. имели примерно одинаковую интегральную интенсивность, вдвое меньшую, чем у сигналов

\* АРТ — attached proton test.



Фрагмент структуры тейхоевой кислоты из клеточной стенки *Actinomadura cremea* ИНА 292

при 65,2 и 67,8 м.д. Эти данные подтверждали наличие в тейхоевой кислоте остатков 1-О-β-D-галактопиранозилглицерина и позволяли уточнить локализацию фосфатных группировок, за счет которых образовывалась полимерная цепь. Так, сигнал оксиметильной группы при 67,8 м.д. характерен для С3 глицерина в 1-О-гликозилглицерин-3-фосфатных остатках [9]; вместе с тем слабополюное положение сигналов С1 глицерина таких остатков в рассматриваемом спектре (71,7 и 71,8 м. д.) исключает их замещение по С2 [9] и, таким образом, 2,3-поли(глицерофосфатную) цепь. Поскольку в спектре имелся сигнал оксиметильной группы с химическим сдвигом 65,2 м. д., типичным для 6-фосфатов пираноз [7], естественно было предположить, что вторым атомом, участвующим в образовании основной цепи полимера, является С6 галактопиранозы. Отсутствие сигнала свободной оксиметильной группы β-D-галактопиранозы (62,2 м.д. [7]) и сильнополюный химический сдвиг сигнала С5 этого остатка в спектре тейхоевой кислоты (74,4 м.д. вместо обычного для не замещенных по С6 остатков 76,2 м.д. [7], таблица) однозначно свидетельствовали о правильности предположения.

Спектр <sup>13</sup>С-ЯМР подтверждает также замещение части (примерно половины) остатков 1-О-β-D-галактопиранозилглицерина остатками глицерин-3-фосфата. Наличием боковых цепей в части остатков естественным образом объясняется «расщепление» сигналов аномерного атома углерода галактопиранозы и С1 остатка глицерина в основной цепи. Вместе с тем незначительная разница химических сдвигов (0,35 м.д. в первом случае и 0,1 м.д. во втором) исключало замещение по С2 галактопиранозы или С2 глицерина, так как β-эффекты фосфорилирования значительно больше по амплитуде [10]. Таким образом, речь может идти только о замещении по С3 или С4 галактопиранозного остатка. Однозначный выбор в пользу замещения по С3 следует из наличия в спектре сигнала с химическим сдвигом 78,6 м.д. С учетом обычного α-эффекта фосфорилирования (3—4 м.д. [10]) этот сигнал может принадлежать только С3, но не С4 (таблица). Замещение по С3 подтверждается также наличием сигналов С2 и С4, смещенных в более сильное поле по сравнению с соответствующими сигналами в незамещенных остатках на ~1 м.д. (обычный β-эффект фосфорилирования [10]).

Отметим, что примерно равная интенсивность сигналов не замещенных и замещенных по С3 остатков практически исключает наличие 4-замещенных остатков, сигналы которых могли бы быть замаскированы более интенсивными основными пиками спектра.

В спектре <sup>31</sup>Р-ЯМР имеется один широкий сигнал с химическим сдвигом 1 м.д. и шириной на середине высоты 1,5 м.д.

Таким образом, тейхоевая кислота клеточной стенки *A. cremea* ИНА 292 является поли(галактозилглицерофосфатом) (рисунок). Мономерные единицы — монофосфаты 1-О-β-D-галактопиранозилглицерина — объединяются фосфодиэфирными связями при участии С3 глицерина и С6 галактозы. Около половины галактозилных заместителей имеют при С3 монофосфат глицерина в виде боковых ответвлений от основного коря полимера (рисунок). Тейхоевая кислота описанной структуры впервые найдена в бактериальной клеточной стенке.

## Экспериментальная часть

Изучали культуру актиномицета *Actinomadura cretea* ИНА 292 (АТСС 33577) из коллекции культур Института по изысканию новых антибиотиков АМН СССР (ИНА) [11, 12]. Штамм поддерживали в пробирках на скошенной агаровой среде — овсяной и органической № 2 Гаузе [13] при комнатной температуре.

Агаровыми блоками с выросшей культурой заседали колбы Эрленмейера объемом 500 мл, содержащие 150 мл органической среды № 2 Гаузе. Колбы инкубировали на качалке (200 об/мин) при 28° С. 48-часовую культуру использовали для инокуляции свежих колб, содержащих 150 мл той же среды. В каждую колбу вносили по 5 мл посевной культуры. Колбы инкубировали в идентичных условиях в течение 2 сут. Мицелий отделяли центрифугированием и промывали дистиллированной водой. Одну часть промывали этанолом, ацетоном и эфиром и использовали для выделения тейхоевой кислоты. Из второй части мицелия получали клеточные стенки путем разрушения его в ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1 (СССР) при 22 кГц 2—3 раза по 2 мин при 4° С. Все последующие операции проводили как описано в работе [14].

Фосфор определяли как описано в работе [14], глицерин и формальдегид — по методу Ханахана [15], сахара — с антроном.

Электрофорез и хроматографию проводили на бумаге Filtrak FN-13 (ГДР), промытой для препаративных целей 2 М уксусной кислотой и дистиллированной водой. Для нисходящей хроматографии использовали следующие системы растворителей: пропиловый спирт —  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $d$  0,88) —  $\text{H}_2\text{O}$ , 6 : 3 : 1 (А) — для разделения фосфорных эфиров и их изомеров; измеряли подвижность относительно глицерин-2-фосфата ( $R_{\text{ГТО2P}}$ ); пиридин — бензол — бутиловый спирт —  $\text{H}_2\text{O}$ , 3 : 1 : 5 : 3 (Б) — для разделения нейтральных компонентов.

Электрофорез тейхоевых кислот, продуктов их кислотного и щелочного гидролизом проводили в пиридин-ацетатном буфере (рН 5,5—5,6) (В), 4 ч, 20 В/см; измеряли подвижность относительно глицеринмонофосфата ( $R_{\text{ГТОР}}$ ). Тейхоевую кислоту и фосфорные эфиры проявляли реактивом Ишервуда, гликозид и моносахариды — 5%  $\text{AgNO}_3$  в аммиаке, моносахариды — анилинфталатом.

Спектры  $^{13}\text{C}$ - и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР раствора тейхоевой кислоты в  $\text{D}_2\text{O}$  снимали при 40° С на приборе Bruker AM-300 (ФРГ) с рабочей частотой по углероду 75 МГц и по фосфору 121,5 МГц. Химические сдвиги  $^{13}\text{C}$  измерены относительно  $\text{CH}_3\text{OH}$  (внутренний стандарт, 50,15 м.д. от внешнего  $\text{Me}_4\text{Si}$ ) и пересчитаны относительно  $\text{Me}_4\text{Si}$ ; химические сдвиги  $^{31}\text{P}$  измерены относительно 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (0 м.д., внешний стандарт).

*Выделение тейхоевой кислоты.* Сухой мицелий и препараты клеточной стенки экстрагировали 10% ТХУ (1 : 10 вес/объем) при 4° С. Через 24 ч смесь центрифугировали, а мицелий экстрагировали еще раз при тех же условиях. Супернатанты объединяли и тейхоевую кислоту осаждали смесью этанола и ацетона (1 : 1, 4 объема) в течение 24 ч. Осадок собирали центрифугированием, растворяли в ледяной воде, диализовали против дистиллированной воды при 4° С и лиофильно высушивали.

*Очистка тейхоевой кислоты.* Раствор 100 мг препарата тейхоевой кислоты растворяли в 1 мл 0,01 М трис- $\text{HCl}$ -буфера, рН 7, 5, помещали на колонку с DEAE-Тоуорепл 650 М ( $0,94 \times 54$  см). Колонку промывали тем же буфером (400 мл) и материал хроматографировали в том же буфере в линейном градиенте концентрации  $\text{NaCl}$  (0 — 0,5 М, общий объем 700 мл) со скоростью 2 мл/мин, отбирая фракции по 6 мл. Во фракциях определяли фосфор, общий сахар и поглощение при 270 нм. Фракции, содержащие фосфор и сахар, объединяли, диализовали против дистиллированной воды и лиофильно высушивали.

Дополнительную очистку препарата проводили с помощью электрофореза на бумаге в буфере В. Тейхоевую кислоту элюировали водой и лиофилизировали.

*Кислотный и щелочной гидролиз.* Тейхоевую кислоту, фосфорные эфиры, гликозид гидролизовали 3 ч 2 М  $\text{HCl}$  в запаянных капиллярах при 100° С. Кислоту удаляли под вакуумом. Тейхоевую кислоту гидролизовали 1 М  $\text{NaOH}$  при тех же условиях. Ионы  $\text{Na}^+$  удаляли с помощью смолы  $\text{K}_2\text{U}-2$  ( $\text{NH}_4^+$ -форма). Аммиак выпаривали в вакууме.

Продукты гидролизом разделяли с помощью ВХ и электрофореза, соответствующие зоны элюировали водой.

*Ферментативный гидролиз* проводили с помощью щелочной фосфатазы (КФ3.1.3.1, Sigma, США) в аммоний-ацетатном буфере, рН 10,4, в течение 1 ч при 37° С. Раствор упаривали в вакууме, а продукты гидролиза исследовали с помощью электрофореза в буфере В и ВХ в системе Б.

*Изучение гликозида.* Гликозид, образовавшийся при ферментативном гидролизе щелочного гидролизата тейхоевой кислоты, элюировали водой с хроматограммы и раствор упаривали досуха. Около 0,5 мг гликозида гидролизовали кислотой и определяли качественный состав с помощью ВХ в системе Б. Для определения мольных соотношений компонентов, входящих в состав гликозида, его гидролизовали, как описано выше, гидролизат упаривали, остаток растворяли в 2—3 мл воды и в аликвотах определяли галактозу и глицерин. Гликозид подвергали периодатному окислению [15] и в продуктах реакции определяли формальдегид.

*Исследование фосфорных эфиров.* Сухой остаток эфира гидролизовали кислотой и продукты реакции исследовали с помощью ВХ в системе В. Для определения мольного соотношения фосфор — галактоза — глицерин после удаления кислоты упариванием остаток обрабатывали щелочной фосфатазой, как описано выше, и в аликвотах проводили определение компонентов эфира.



ЛИТЕРАТУРА

1. Наумова И. Б. // Биохимия. 1978. Т. 43. С. 195—207.
2. Потехина Н. В., Терехова Л. П., Преображенская Т. П., Наумова И. Б. // Микробиология. 1985. Т. 54. № 4. С. 545—548.
3. Наумова И. Б., Дигимбай К., Потехина Н. В., Шашков А. С., Терехова Л. П., Преображенская Т. П. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 670—678.
4. Наумова И. Б., Шашков А. С., Строганова М. П. // Биоорган. химия. 1978. Т. 4. № 11. С. 1529—1537.
5. Keleman M. V., Vaddiley J. // Biochem. J. 1961. V. 80. № 2. P. 246—254.
6. Шабарова З. А., Богданов А. А. Химия. М.: Наука, 1978. С. 582.
7. Bock K., Pedersen C. // Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 1983. V. 41. P. 27—66.
8. LeCoq C., Lallemand J. // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1981. № 4. P. 150—152.
9. De Boer W. R., Kruyssen F. N., Wouters J. T. M., Kruk C. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 62. № 1. P. 1—6.
10. Bundle D. R., Smith I. C. P., Jennings H. J. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 7. P. 2275—2281.
11. Преображенская Т. П., Лаврова Н. А., Ухолина Р. С., Нечаева Н. П. // Антибиотики. 1975. № 5. С. 404—409.
12. Skerman V. B. D., McGowan V., Sneath P. H. A. (Eds). International I. Syst. Bacteriol. 1980. V. 30. № 1. P. 225—420.
13. Гаузе Г. Ф., Преображенская Т. П., Свейникова М. А., Терехова Л. П., Максимова Т. С. Определитель актиномицетов. М.: Наука, 1983.
14. Наумова И. В., Шашков А. С., Скоблилова Н. К., Агре Н. С., Романов В. В. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 6. С. 848—856.
15. Hanahan D. J., Olley J. N. // J. Biol. Chem. 1958. V. 231. № 2. P. 813—828.

Поступила в редакцию  
19.IV.1988

POLY(GALACTOSYLGlycerol PHOSPHATE) TEICHOIC ACID  
WITH MONOPHOSPHATE GLYCEROL SIDE UNITS  
FROM THE CELL WALL OF *ACTINOMADURA CREMEA* INA 292

ПОТЕХИНА Н. В., НАУМОВА И. Б., ШАШКОВ А. С. \*, ТЕРЕХОВА Л. П. \*\*

Department of Biology, Moscow State University; \* N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR;

\*\* Institute for New Antibiotics Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

The cell wall of *Actinomadura cremea* INA 292 contains a poly(galactosylglycerol phosphate) polymer; its repeating units, 1-O- $\beta$ -D-galactopyranosylglycerol monophosphates, are joined together by phosphodiester bonds involving the C3 atom of glycerol and the C6 atom of galactose. A specific feature of this teichoic acid is the presence of C3-located lateral glycerol phosphate units in a half of the galactosyl residues. This structure is the first of the kind ever found in a teichoic acid. The structure of the polymer was identified by chemical analysis and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy.