

УДК 577.124

## ДВА ГЛИКОЗИЛ-1-ФОСФАТНЫХ ПОЛИМЕРА И ТЕЙХУЛОЗОНОВАЯ КИСЛОТА ИЗ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *Glutamicibacter protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>†</sup>

© 2020 А.С. Шашков<sup>1</sup>, Е.М. Тульская<sup>2</sup>, Л.В. Дорофеева<sup>3</sup>,  
Л.И. Евтушенко<sup>3</sup>, Н.В. Потехина<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН, 119991 Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: potekhina56@mail.ru

<sup>3</sup> Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
имени Г.К. Скрыбина РАН, 142290 Пущино Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 20.03.2020

После доработки 03.04.2020

Принята к публикации 03.04.2020

В клеточной стенке *Glutamicibacter protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>†</sup> (ранее *Arthrobacter protophormiae*) обнаружены два гликозил-1-фосфатных полимера: с моногликозил-1-фосфатом, -6)- $\alpha$ -D-Glcp-(1-P-, и дигликозил-1-фосфатом, -6)- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1-P-, в повторяющемся звене. Структуры полимеров описаны впервые для прокариот. Тейхулозоновая кислота, третий найденный полимер, с остатками 3-дезоксид-Д-глицеро-Д-галакто-нон-2-улопиранозоновой кислоты (Kdp) и  $\beta$ -D-глюкопиранозы в основной цепи,  $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Kdp-(2 $\rightarrow$ ), ранее была обнаружена у ряда актинобактерий. Структуры гликополимеров установлены на основании результатов химического исследования и анализа одномерных спектров ЯМР на ядрах <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C и <sup>31</sup>P с использованием двумерных гомоядерных <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC, <sup>1</sup>H,<sup>31</sup>P HMBC методик.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** *Glutamicibacter*, клеточная стенка, гликозил-1-фосфатный полимер, Kdp-тейхулозоновая кислота.

DOI: 10.31857/S0320972520050127

### ВВЕДЕНИЕ

Новые данные о составе и химических структурах полимеров клеточных стенок у ранее не исследованных групп бактерий расширяют представления о многообразии органического мира и биосинтетическом потенциале микроорганизмов. Сведения о составе и структуре гликополимеров клеточной стенки представляют интерес для ряда областей фундаментальной и прикладной науки, в том числе систематики

микроорганизмов. Для ряда изученных групп актинобактерий показано, что гликополимеры и их структурные компоненты могут служить химическими маркерами видов (групп видов) или таксонов более высокого ранга [1–5].

*Glutamicibacter protophormiae* (семейство Microsoccaceae) является типовым видом недавно описанного рода *Glutamicibacter*, который включает ряд видов, входивших ранее в род *Arthrobacter* (группа «*Arthrobacter protophormiae*»), а также видов, описанных позднее [6–8]. Род предложен на основе филогенетической обособленности видов группы «*Arthrobacter protophormiae*» и их отличий от *Arthrobacter sensu stricto* по хемотаксономическим признакам, в первую очередь по типу пептидогликана клеточной стенки и составу изопреноидных хинонов дыхательной цепи [6]. Виды *Glutamicibacter* содержат пептидогликан A4 $\alpha$ -типа (лизин в тетрапептидной цепи и дипептид Ala–Glu в межпептидном мостике) [6, 9]. Другие гликополимеры клеточной стенки у представителей *Glutamicibacter*, за исключением *G. nicotianae* ATCC 15236 [10] и *G. uraxydans* ВКМ Ас-1979<sup>†</sup> [11], ранее не изучали.

Принятые сокращения: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов; COSY – корреляционная спектроскопия; HMBC – гетероядерная корреляция <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C через несколько связей; HSQC – протон-детектированная гетероядерная одноквантовая корреляция; J (KCCB) – константа спин-спинового взаимодействия; Kdp – 3-дезоксид-Д-глицеро-Д-галакто-нон-2-улопиранозоновая кислота; ROESY – двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; TOCSY – тотальная корреляционная спектроскопия; TSP – натриевая соль 3-(триметилсилил)-2,2,3,3-тетрадейтеропропионовой кислоты;  $\delta_C$ ,  $\delta_H$ ,  $\delta_P$  – значения химических сдвигов атомов <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H и <sup>31</sup>P соответственно.

\* Адресат для корреспонденции.

В настоящей работе представлены результаты исследования структур гликополимеров клеточной стенки у *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>Т</sup> – типового штамма типового вида рода *Glutamicibacter*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штамм *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>Т</sup> из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина РАН ([www.vkm.ru](http://www.vkm.ru)). Для получения биомассы штамм выращивали аэробно на пептонно-дрожжевой среде при температуре 28 °С до середины логарифмической фазы роста. Клетки отделяли центрифугированием и промывали 0,95% NaCl [2].

Клеточную стенку получали из разрушенных на ультразвуковом дезинтеграторе UP100H («Hielscher», Германия, 30 kHz, 3–5 × 10 мин в ледяной воде) клеток методом дифференциального центрифугирования [2].

Углеводсодержащие полимеры экстрагировали из клеточной стенки 10%-ной ТХУ [2] при 4 °С, 0,1 М цитратным буфером pH 4,0 [12] или 0,05 М Na-глициновым буфером, pH 8,8 [13] с получением трех различных препаратов, обозначенных для дальнейших исследований как препарат 1, 2 и 3 соответственно.

Кислотный гидролиз клеточной стенки и выделенных из нее препаратов (2 М HCl, 100 °С, 3 ч), нисходящая хроматография и электрофорез на бумаге, реактивы для проявления сахаров и фосфатсодержащих соединений и продуктов их кислотной деградации описаны ранее [2].

Абсолютная D-конфигурация моносахаридов была установлена методом ГЖХ ацетилированных гликозидов с (+)-октан-2-олом согласно опубликованным процедурам [2].

ЯМР-спектры снимали на спектрометре Avance 600 («Bruker», Германия) для растворов препаратов в дейтерированной воде при температуре 308 К. Для отсчета химических сдвигов использовали внутренние стандарты натриевой соли 3-(триметилсилил)-2,2,3,3-тетрадейтеро-пропионовой кислоты (TSP) ( $\delta_H$  0,0 и  $\delta_C$  –1,6) и внешний стандарт – 80% фосфорная кислота ( $\delta_P$  0,0). Двумерные ЯМР-эксперименты выполняли с использованием стандартного математического обеспечения («Bruker Optik GmbH», Германия). Время смешивания 150 мс и время спин-лока 250 мс были выбраны для экспериментов по двумерной спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат (ROESY) и тотальной корреляционной

спектроскопии (TOCSY) соответственно. Двумерные  $^1H$ ,  $^{13}C$  и  $^1H$ ,  $^{31}P$  эксперименты по гетероядерной корреляции через несколько связей (НМВС) были оптимизированы для константы спин-спиновой взаимодействия (КССВ) 5 Гц.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В кислотном гидролизате клеточной стенки *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>Т</sup> были обнаружены галактоза, глюкоза, манноза, арабиноза, глюкозы и галактозамины, глицерин, а также незначительное количество моно- и бисфосфата глицерина.

Продукты кислотной деградации трех препаратов, выделенных из клеточной стенки разными методами экстракции, отличались по соотношению сахаров и не содержали фосфорных эфиров глицерина. Эти данные могли указывать на отсутствие тейхоевых кислот и наличие других углеводсодержащих полимеров.

Структуры полимеров устанавливали на основе анализа одномерных спектров ЯМР на ядрах  $^1H$ ,  $^{13}C$  и  $^{31}P$  с использованием двумерных гомоядерных  $^1H$ ,  $^1H$  методик корреляционной спектроскопии (COSY), TOCSY, ROESY и гетероядерных методик –  $^1H$ ,  $^{13}C$  HSQC, HSQC-TOCSY, НМВС и  $^1H$ ,  $^{31}P$  НМВС.

В спектре ЯМР  $^{13}C$  препарата 1, полученного экстракцией ТХУ, в области резонанса аномерных атомов углерода наблюдали сигналы различной интенсивности, часть из которых, судя по величине их химических сдвигов ( $\delta_C$  92,1; 93,5; 96,4 и 97,7 м.д.), принадлежала сахарным остаткам со свободной гидроксильной группой при C-1 (рис. 1; таблица). Три сигнала принадлежали аномерным атомам углерода при гликозидных связях  $\delta_C$  98,4; 98,2 и 102,9 м.д.  $^{13}C$  АРТ (тест на присоединенные протоны) спектр выявил также сигнал четвертичного аномерного атома углерода при  $\delta_C$  96,4 м.д.

В спектре ЯМР  $^1H$  в области резонанса протонов при аномерных атомах углерода (рис. 2, вверху; таблица) были видны дублеты с КССВ, характерные для пираноз с  $\alpha$ -глюко- и  $\alpha$ -галакто-конфигурацией ( $\delta_H$  5,22; 5,20; 4,95 м.д.;  $^3J_{H-1, H-2}$  3,5 Гц) и с  $\beta$ -глюко- и  $\beta$ -галакто-конфигурацией ( $\delta_H$  4,72; 4,64; 4,56 м.д.;  $^3J_{H-1, H-2}$  8 Гц).

В сильном поле (рис. 3, таблица) имелись сигналы, характерные для протонов при C-3 альдулозоновых кислот ( $\delta_H$  2,27, дд,  $J$  5 и 13 Гц и  $\delta_H$  1,83, т,  $J$  13 Гц).

Спектр ЯМР  $^{31}P$  препарата содержал два уширенный сигнал при  $\delta_P$  –1,0 и –1,4 м.д.

Сигналы в одномерных спектрах ЯМР были отнесены при использовании двумерных методик  $^1H$ ,  $^1H$  COSY, TOCSY, ROESY;  $^1H$ ,  $^{13}C$  HSQC,

Химические сдвиги в спектрах  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$  ЯМР гликополимеров и их фрагментов из клеточной стенки *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>†</sup>

Остаток	Химические сдвиги ЯМР $^{13}\text{C}$ ( $\delta_{\text{C}}$ TSP $-1,6$ ) и $^1\text{H}$ ( $\delta_{\text{H}}$ TSP $0,0$ )								
	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3 (H-3e,3a)	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6, H-6'	C-7 H-7	C-8 H-8	C-9 H-9
Полимер I									
$\rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ (GaN)	98,7 4,55	51,1 <sup>c</sup> 4,21	68,8 3,96	69,4 4,05	70,9 4,14	65,8 <sup>a</sup> 4,04, 4,00			
$\rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1-P- (GN)	95,1 <sup>a</sup> 5,47	55,0 <sup>c</sup> 3,96	72,0 3,79	70,6 3,93	73,2 3,99	66,7 4,08, 3,69			
Дисахариды из полимера I									
$\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ (GaN')	98,4 4,95	51,1 4,18	68,9 3,96	69,7 4,01	72,2 4,00	62,4 3,77, 3,75			
$\rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-GlcpNAc (GN $\alpha$ )	92,1 5,20	55,3 3,88	72,0 3,76	71,0 3,60	71,6 3,98	66,8 4,02, 3,67			
$\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ (GaN'')	98,2 4,95	51,0 4,21	69,0 3,96	69,7 4,01	72,2 4,00	62,4 3,77, 3,75			
$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -D-GlcpNAc (GN $\beta$ )	96,4 4,72	57,9 3,68	75,2 3,53	70,7 3,59	75,6 3,59	66,7 3,97, 3,74			
Полимер II									
$\rightarrow 6$ )- $\alpha$ -D-Glcp-(1-P- (GI)	96,6 <sup>b</sup> 5,53	72,6 3,60	73,6 3,77	70,0 3,58	73,0 3,94	65,5 <sup>b</sup> 4,20, 4,14			
Полимер III (Kdn-полимер)									
$\rightarrow 8$ )- $\alpha$ -Kdn-(2 $\rightarrow$ (K $\alpha$ )	174,2	101,3	40,2 2,63, 1,65	70,0 3,56	70,9 3,45	75,2 3,73	69,1 4,44	85,7 3,95	61,5 4,23, 3,75
$\rightarrow 6$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ (Glc)	103,9 4,64	74,0 3,36	75,9 3,51	69,5 3,58	74,7 3,54	63,1 3,96, 3,64			
Kdn-гликозид <sup>d</sup> из полимера III									
$\beta$ -Kdn 8) ↑	174,3	96,4	40,1 2,27, 1,83	70,1 3,97	71,6 3,55	72,8 4,04	67,9 4,06	79,5 3,97	62,6 3,87, 3,75
$\beta$ -D-Glcp-(1	102,9 4,56	74,3 3,32	77,0 3,42	71,3 3,36	77,1 3,48	62,1 3,94, 3,65			

<sup>31</sup>P при  $\delta_{\text{P}}$  <sup>a</sup>  $-1,4$ ; <sup>b</sup>  $-1,0$  м.д.; <sup>c</sup>  $\text{CH}_3\text{CON}$  при  $\delta_{\text{C}}$  23,3, 23,4 и 176,8, 175,9 и  $\delta_{\text{H}}$  2,07 м.д.

<sup>d</sup> Продукт полного автогидролиза Kdn-полимера с повторяющимся звеном  $\rightarrow 6$ )- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow 8$ )- $\alpha$ -Kdn-(2 $\rightarrow$ .

HSQC-TOCSY, НМВС и  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  НМВС. Анализ двумерных спектров выявил наличие в препарате 1 остатков  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкопиранозы-6-фосфата и дисахаридов-6-фосфата,  $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcpNAc и  $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-GlcpNAc со свободной гидроксильной группой. Было предположено, что низкомолекулярные фосфатсодержащие соединения являются продуктами гидролиза гликозил-1-фосфатных полимеров, неустойчивых в кислой среде (в условиях выделения 10% ТХУ, pH < 1). В связи с этим была проведена экстракция полимеров из клеточной стенки с использованием цитратного буфера при pH 4,0 (препарат 2), что привело к выделению довольно больших олигосахаридов с фосфодиэфирными связями и установлению структур двух гликозил-1-фосфатных полимеров: **-6)- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1-P-** (полимер I), **-6)-  $\alpha$ -D-Glcp-(1-P-** (полимер II).

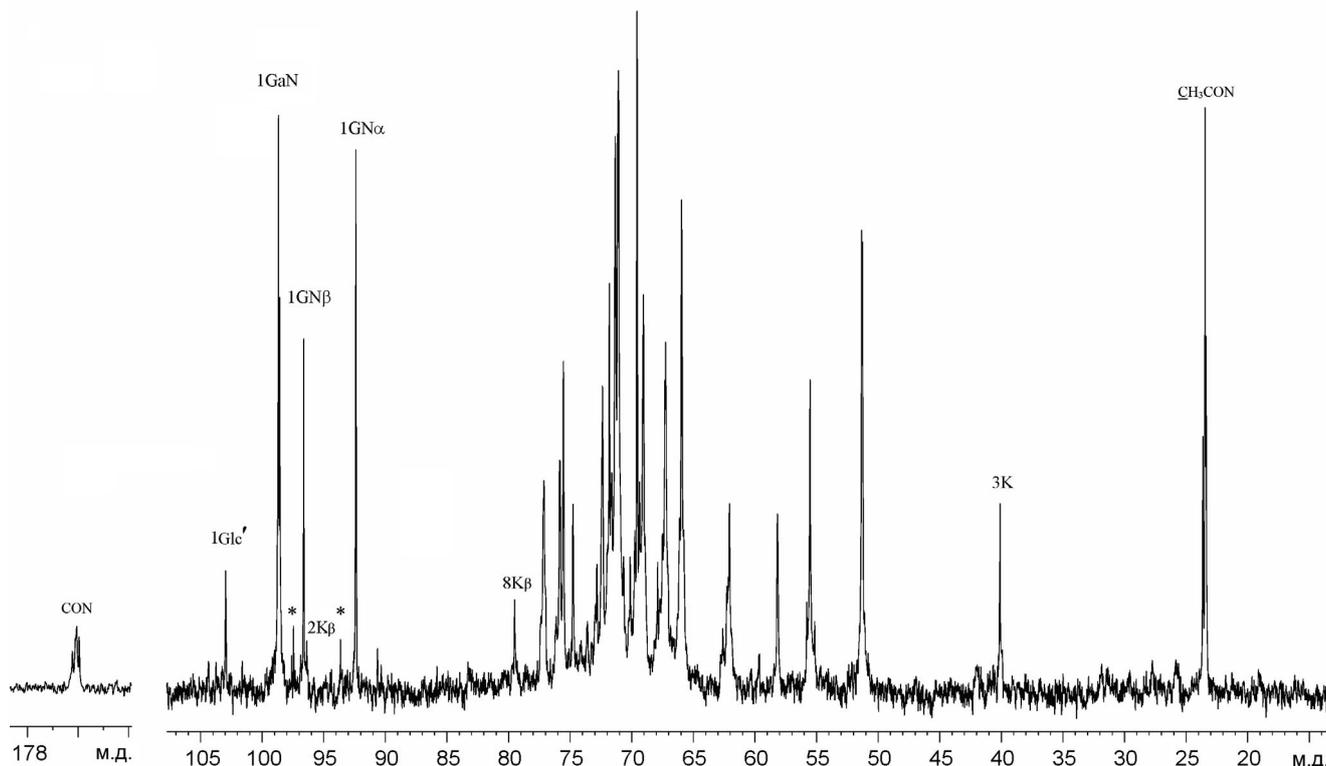
Абсолютная конфигурация моносахаридных остатков в полимерах была определена как D (см. раздел «Материалы и методы»).

Помимо фосфатсодержащих низкомолекулярных соединений в препарате 1 по одномерным и двумерным спектрам ЯМР был также идентифицирован дисахарид состава  $\beta$ -D-Glcp-

(1 $\rightarrow$ 8)- $\beta$ -Kdn (таблица), ошибочно принятый ранее за повторяющееся звено  $\beta$ -2,4-связанного полимера Kdn [14]. Последние наши исследования [13, 15] показали, что при выбранных нами условиях выделения (экстракция 10% ТХУ, pH < 1) нативный  $\alpha$ -Kdn-содержащий полимер подвергается автогидролизу и почти полностью деградирует. Следы полимера, где Kdn имеет  $\alpha$ -конфигурацию гликозидной связи, обнаруживаются в спектре  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC препарата 1 (рис. 3). Также ранее было показано, что изначальный Kdn-полимер, полученный в более мягких условиях выделения (экстракция Na-глициновым буфером, pH 8,8), сохраняет внутримономерные связи [13, 15]. Исследование препарата 3 выявило наличие в нем линейного Kdn-содержащего полимера, а его структура соответствовала таковой, описанной ранее в работе [15]:  **$\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Kdn-(2** (полимер III).

В клеточной стенке *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>T</sup> обнаружены моно-, дигликозил-1-фосфатные полимеры и Kdn-тейхулозоновая кислота.

Гликозил-1-фосфатные полимеры ранее были описаны у ряда актинобактерий [13, 16, 17]. Структура идентифицированного в настоящей работе дигликозил-1-фосфатного полимера с

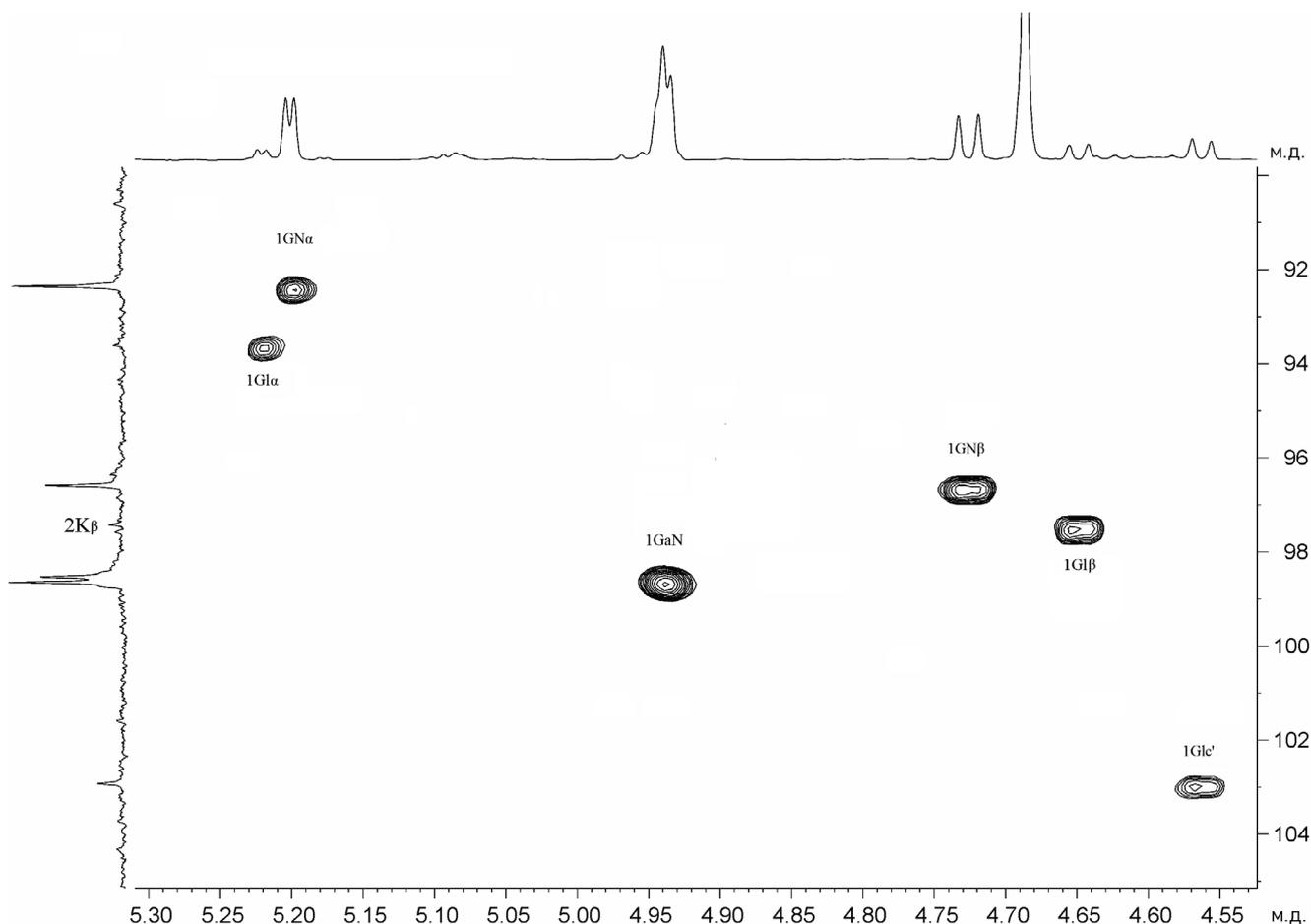


**Рис. 1.** Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$  гликополимеров и их фрагментов (препарат 1) из клеточной стенки *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>T</sup>. Обозначения приведены в соответствии с таблицей. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных как в таблице. Звездочками обозначены аномерные атомы углерода в остатках глюкозы (Gla и Glb) на восстанавливающем конце полимера II

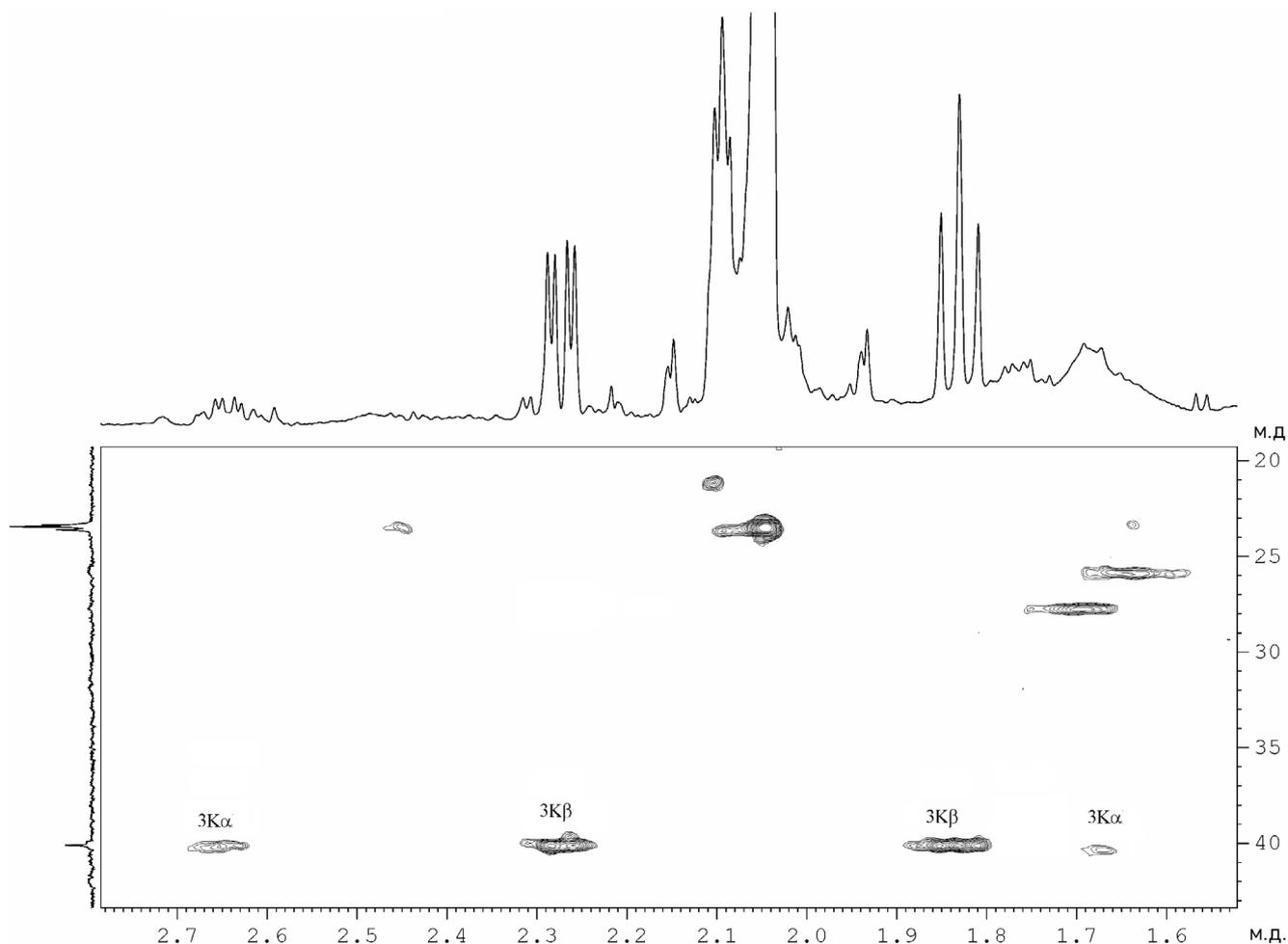
повторяющимся звеном  $-6)-\alpha-D-GalpNAc-(1\rightarrow6)-\alpha-D-GlcpNAc-(1-P-$  обнаружена впервые. Также впервые идентифицирован моногликозил-1-фосфатный полимер, состоящий из фосфодиэфирносвязанных остатков  $\alpha$ -глюкопиранозы,  $-6)-\alpha-D-Glcp-(1-P-$ . Исследованные ранее полимеры, содержащие один углеводный остаток в повторяющемся звене, были построены из остатков N-ацетилированных производных моносахаридов:  $-6)-ManpNAc-(1-P-$ ,  $-4)-GlcpNAc-(1-P-$  (*Bacillus pumilus*) [18, 19],  $-6)-GlcpNAc-(1-P-$  (*Micrococcus* spp.) [20] и  $-6)-\alpha-D-GalpNAc-(1-P-$  (*Arthrobacter* spp.) [13].

Тейхулозоновая кислота *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>T</sup> имела уже известную, описанную для ряда актинобактерий структуру,  $\rightarrow6)-\beta-D-Glcp-(1\rightarrow8)-\alpha-Kdn-(2\rightarrow$  [15, 21], однако для рода *Glutamicibacter* она так же, как и данный класс гликополимеров в целом, обнаружена впервые.

В клеточной стенке другого представителя рода – *G. uratoxydans* ВКМ Ас-1979<sup>T</sup>, изученного ранее, были выявлены гликополимеры иной структуры: две тейхоевые кислоты, относящиеся к разным типам, и гликозилфосфатный полимер с шестью моносахаридными остатками в повторяющемся звене [11]. Тейхоевые кислоты (структуры полностью не установлены) также были обнаружены у *G. nicotianae* ATCC 15236 [10]. Хотя три вышеупомянутых штамма различаются по составу и структуре стеночных гликополимеров, они имеют и общее свойство – в их клеточной стенке присутствуют фосфатсодержащие полимеры. Следует отметить, что представители другого рода, *Paenarthrobacter*, также относившиеся ранее к *Arthrobacter* [2], содержат в клеточной стенке только бесфосфатные полисахариды (неопубликованные данные авторов).



**Рис. 2.** Слабополярная часть  $^1H, ^{13}C$  HSQC-спектра гликополимеров и их фрагментов (препарат 1) из клеточной стенки *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>T</sup>. Соответствующие части  $^1H$  и  $^{13}C$  ЯМР-спектров приведены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Обозначения приведены в соответствии с таблицей. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных как в таблице



**Рис. 3.** Сильнопольная часть  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC-спектра гликополимеров и их фрагментов (препарат 1) из клеточной стенки *G. protophormiae* ВКМ Ас-2104<sup>Т</sup>. Соответствующие части  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектров приведены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Обозначения приведены в соответствии с таблицей. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных как в таблице

Полученные в настоящей работе и опубликованные ранее данные о наборе и структурах гликополимеров у трех представителей рода *Glutamicibacter*, а также сведения о сахарах и полиолах их клеточных стенок (галактоза, глюкоза, глюкозамин, галактозамин, глицерин) позволяют более полно охарактеризовать род и его виды и могут быть использованы в таксономической практике для дифференциации таксонов видового и родового рангов на фенотипическом уровне.

**Финансирование.** Работа выполнялась в рамках программы исследований № ЦИТИС: АА-АА-А16-116021660068-1, запланированных в МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедрой микробиологии на 2016-2022 гг.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takeuchi, M., and Yokota, A. (1989) Cell-wall polysaccharides in coryneform bacteria, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **35**, 233-252.
2. Potekhina, N. V., Streshinskaya, G. M., Tul'skaya, E. M., and Shashkov, A. S. (2011) *Methods in Microbiology*, vol. 38 (Rainey, F. A., and Oren, A., eds), chapter 6, Academic Press, Elsevier, pp. 131-164.
3. Evtushenko, L. I., and Ariskina, E. V. (2015) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Whitman, W. B., eds), 1-18.
4. Takeuchi, M., Yokota, A., and Misaki, A. (1990) Comparative structures of the cell-wall polysaccharides of four species of the genus *Microbacterium*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **36**, 255-271.

5. Shashkov, A. S., Tul'skaya, E. M., Streshinskaya, G. M., Dmitrenok, A. S., Potekhina, N. V., Senchenkova, S. N., Piskunkova, N. F., Dorofeeva, L. V., and Evtushenko, L. I. (2020) Rhamnomannans and teichuronic acid from cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603<sup>T</sup>, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 369-377.
6. Busse, H. J. (2016) Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter* sensu lato, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **66**, 9-378.
7. Feng, W. W., Wang, T. T., Bai, J. L., Ding, P., Xing, K., Jiang, J. H., Peng, X., and Qin, S. (2017) *Glutamicibacter halophytocola* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of a coastal halophyte, *Limonium sinense*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **67**, 1120-1125.
8. Busse, H. J., and Schumann, P. (2019) Reclassification of *Arthrobacter endophyticus* (Wang et al. 2015) as *Glutamicibacter endophyticus* comb. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **69**, 1057-1059.
9. Schleifer, K. H., and Kandler, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications, *Bacteriol. Rev.*, **36**, 407-477.
10. Fiedler, F., and Schäffler, M. J. (1987) Teichoic acids in cell wall of strains of "nicotianae" group of *Arthrobacter* a chemotaxonomic marker, *System. Appl. Microbiol.*, **9**, 16-21.
11. Potekhina, N. V., Shashkov, A. S., Senchenkova, S. N., Dorofeeva, L. V., and Evtushenko, L. I., (2012) Structure of hexasaccharide 1-phosphate polymer from *Arthrobacter uratoxydans* VKM Ac-1979<sup>T</sup> cell wall, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1294-1302.
12. Pavlik, J. G., and Rogers, H. J. (1973) Selective extraction of polymers from cell walls of gram-positive bacteria, *Biochem. J.*, **131**, 619-621.
13. Potekhina, N. V., Arbatsky, N. P., Shashkov, A. S., Dmitrenok, A. S., Senchenkova, S. N., Dorofeeva, L. V., and Evtushenko, L. I. (2017) Novel teichulosonic acid and glycosyl 1-phosphate polymers from the cell walls of *Arthrobacter* sp., strains VKM Ac-2549 and VKM Ac-2550, phylogenetically close to *Arthrobacter crystallopoietes*, *Carbohydr. Res.*, **451**, 36-41.
14. Shashkov, A. S., Kosmachevskaya, L. N., Streshinskaya, G. M., Evtushenko, L. I., Bueva, O. V., Denisenko, V. A., Naumova, I. B., and Stackebrandt, E. (2002) A polymer with a backbone of 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-non-2-ulopyranosonic acid, a teichuronic acid, and a  $\beta$ -glucosylated ribitol teichoic acid in the cell wall of plant pathogenic *Streptomyces* sp. VKM Ac-2124, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 6020-6025.
15. Shashkov, A. S., Potekhina, N. V., Senchenkova, S. N., and Evtushenko, L. I. (2016) Teichoic, teichulosonic and teichuronic acids in the cell wall of *Brevibacterium aurantiacum* VKM Ac-2111<sup>T</sup>, *Carbohydr. Res.*, **421**, 17-24.
16. Shashkov, A. S., Ostash, B. E., Fedorenko, V. A., Streshinskaya, G. M., Tul'skaya, E. M., Senchenkova, S. N., Baryshnikova, L. M., and Evtushenko, L. I. (2012) Novel teichulosonic acid from cell wall of *Streptomyces coelicolor* M145, *Carbohydr. Res.*, **359**, 70-75.
17. Potekhina, N. V., Shashkov, A. S., Streshinskaya, G. M., Senchenkova, S. N., and Evtushenko, L. I. (2005) Anionic polymers of the cell wall of *Brevibacterium linens* VKM Ac-2159, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 1046-1054.
18. Vann, W. F., Liu, T. Y., and Robbins, J. B. (1976) *Bacillus pumilus* polysaccharide cross-reactive with meningococcal group A polysaccharide, *Infect. Immunol.*, **13**, 1654-1662.
19. Kojima, N., Iida, J., Araki, Y., and Ito, E. (1985) Structural studies on the linkage unit between poly(N-acetylglucosamine 1-phosphate) and peptidoglycan in cell walls of *Bacillus pumilus* AHU 1650, *Eur. J. Biochem.*, **149**, 331-336.
20. Nikolaev, A. V., Botvinko, I. V., and Ross, A. J. (2007) Natural phosphoglycans containing glycosyl phosphate units: structural diversity and chemical synthesis, *Carbohydr. Res.*, **342**, 297-344.
21. Shashkov, A. S., Streshinskaya, G. M., Tul'skaya, E. M., Senchenkova, S. N., Baryshnikova, L. M., Dmitrenok, A. S., Ostash, B. E., and Fedorenko, V. A. (2016) Cell wall glycopolymers of *Streptomyces albus*, *Streptomyces albido-flavus* and *Streptomyces pathocidini*, *Antonie van Leeuwenhoek*, **109**, 923-936.

## TWO GLYCOSYL 1-PHOSPHATE POLYMERS AND TEICHULOSONIC ACID FROM *Glutamicibacter protophormiae* VKM Ac-2104<sup>T</sup> CELL WALL

A. S. Shashkov<sup>1</sup>, E. M. Tul'skaya<sup>2</sup>, L. V. Dorofeeva<sup>3</sup>, L. I. Evtushenko<sup>3</sup>, and N. V. Potekhina<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia; E-mail: potekhina56@mail.ru

<sup>3</sup> All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

Received March 20, 2020

Revised April 3, 2020

Accepted April 3, 2020

Two glycosyl 1-phosphate polymers containing monoglycosyl 1-phosphate,  $\beta$ -D-Glcp-(1-P-), and diglycosyl 1-phosphate,  $\beta$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-GlcpNAc-(1-P-), in the repeating unit were identified in the cell wall of *Glutamicibacter protophormiae* VKM Ac-2104<sup>T</sup> (formerly, *Arthrobacter protophormiae*). The structures of these polymers were described for the first time in prokaryotes. Teichulosonic acid, the third identified polymer, with 3-deoxy-D-glycero- $\alpha$ -D-galacto-non-2-ulopyranosonic acid (Kdn) and  $\beta$ -D-glucopyranose residues in the main chain,  $\beta$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 8)- $\alpha$ -Kdn-(2 $\rightarrow$ ), has been previously detected in a number of actinobacteria. The structures of these glycopolymers were established based on the results of chemical analysis and one-dimensional <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy using two-dimensional homonuclear (<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H COZY, TOCSY, ROESY) and heteronuclear (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC, and <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P HMBC) techniques.

**Keywords:** *Glutamicibacter*, cell wall, glycosyl 1-phosphate polymer, Kdn-containing teichulosonic acid