

УДК 577.124

РАМНОМАННАНЫ И ТЕЙХУРОНОВАЯ КИСЛОТА ИЗ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *Rathayibacter tritici* ВКМ Ас-1603^Т*

© 2020 А.С. Шашков¹, Е.М. Тульская^{2**}, Г.М. Стрешинская²,
А.С. Дмитриенко¹, Н.В. Потехина², С.Н. Сенченкова¹,
Н.Ф. Пискункова², Л.В. Дорофеева³, Л.И. Евтушенко³

¹ Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991 Москва, Россия

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: em_tulskaya@mail.ru

³ Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, 142290 Пущино Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 28.11.2019

После доработки 18.12.2019

Принята к публикации 18.12.2019

Химическими и ЯМР-спектроскопическими методами установлены структуры трех гликополимеров клеточной стенки фитопатогена *Rathayibacter tritici* ВКМ Ас-1603^Т (семейство Microbacteriaceae, порядок Micrococcales, класс Actinobacteria). Полимер 1 – разветвленный рамноманнан с повторяющейся единицей $\rightarrow 3$ - α -[β -D-Xylp-(1 \rightarrow 2)]-D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow ; полимер 2 – линейный рамноманнан $\rightarrow 2$ - α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow ; полимер 3 – тейхуроновая кислота с боковыми заместителями, содержащая остатки моносахаридов GlcA, Gal, Man и Glc в соотношении 1/1/1/5. Структуры полимеров описаны впервые для прокариотных микроорганизмов. Обсуждается индивидуальный набор бесфосфатных гликополимеров в клеточных стенках представителей 4-х видов рода *Rathayibacter* (*R. tritici* ВКМ Ас-1603^Т, *R. iranicus* ВКМ Ас-1602^Т, *R. toxicus* ВКМ Ас-1600 и «*Rathayibacter tanacetii*» ВКМ Ас-2596), изученных к настоящему времени. Штаммы характеризуются общим свойством – присутствием в клеточных стенках линейных или разветвленных рамноманнанов с D-рамнозой, с различной локализацией гликозидных связей в цепи и различными боковыми заместителями, что является важным хемотаксономическим признаком рода *Rathayibacter*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Rathayibacter*, клеточная стенка, рамноманнан, тейхуроновая кислота, D-рамноза, ЯМР-спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0320972520030124

Актинобактерии рода *Rathayibacter* (семейство Microbacteriaceae, класс Actinobacteria) – аэробные, грамположительные, неподвижные, неправильные палочки с пептидогликаном В2у

Принятые сокращения: ВКМ – Всероссийская коллекция микроорганизмов; НМВС – гетероядерная корреляция ¹H, ¹³C через несколько связей; HSQC – протон-детектированная НОНО-квантовая корреляция; J (KCCV) – константа спин-спинового взаимодействия; ROESY – двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; COSY – корреляционная спектроскопия; TOCSY – тотальная корреляционная спектроскопия; TSP – натриевая соль 3-(триметилсилил)-3,3,2,2-тетрадейтеропропионовой кислоты; δ_c , δ_H – значения химических сдвигов атомов ¹³C и соответственно, тейхуроновая кислота – (ТУК).

* Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 3, 2020.

** Адресат для корреспонденции.

типа и преобладающим менахиномом дыхательной цепи МК 10 [1]. Ряд видов рода, в их числе *R. tritici*, известны как фитопатогены, вызывающие гуммоз и задержку роста пшеницы и некоторых других злаковых растений [1, 2]. *R. toxicus*, кроме того, образует высокотоксичный гликолипид (коринетоксин), который является причиной гибели травоядных животных [1, 2]. Считается, что в природных условиях фитопатогены рода *Rathayibacter* переносятся на хозяйские растения галлообразующими нематодами рода *Anguina* [1, 2].

Наши предыдущие исследования показали, что клеточные стенки *R. toxicus* ВКМ Ас-1600, «*Rathayibacter tanacetii*» ВКМ Ас-2596 и *R. iranicus* ВКМ Ас-1602^Т содержат полимеры уникальной структуры [3, 4]. Другие представители рода ранее не исследованы в этом отношении.

Изучение состава и строения гликополимеров клеточных стенок ковалентно связанных с

пептидогликаном у ранее не исследованных видов (групп) бактерий представляет интерес для ряда областей фундаментальной и прикладной науки, в том числе микробиологии и экологии микроорганизмов. Сведения о строении гликополимеров клеточных стенок имеют также важное значение для развития системы классификации бактерий, в частности для обоснования описания новых видов (доказательство их отличий от известных видов на уровне фенотипа) [5, 6].

В настоящей работе приведены структуры углеводсодержащих полимеров клеточной стенки типового штамма *Rathayibacter tritici* в сравнении с таковыми, изученными ранее у других видов рода.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали штамм *Rathayibacter tritici* ВКМ Ас-1603^Т (= DSM 7486^Т = ICMP 2626^Т) из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (www.vkm.ru).

Культуру выращивали аэробно при 28 °С в колбах на качалке до середины логарифмической фазы роста на пептонно-дрожжевой среде [7].

Получение клеточных стенок и выделение из них гликополимеров проводили как описано в работе Shashkov et al. [3]. Выход препаратов гликополимеров, полученных при холодной и горячей ТХУ-экстракциях (10% ТХУ, 4 °С, 24 ч и последующая – 5% ТХУ, 90 °С, 20 мин), составил 1,3% и 4,6% соответственно. В дальнейшем препараты гликополимеров, полностью идентичные по предварительным химическим и ЯМР-спектроскопическим исследованиям, были объединены и обозначены как препарат Ас-1603.

Кислотный гидролиз клеточной стенки и препаратов гликополимеров проводили 2 М HCl, 3 ч, 100 °С, как описано в работе Potekhina et al. [7].

Нисходящую хроматографию (БХ) и электрофорез проводили на бумаге Filtrak FN-3 («Filtrak», Германия), используя различные системы растворителей [7]. Фосфат-содержащие соединения выявляли реактивом Ишервуда; полиолы и моносахариды – 5%-ным аммиачным раствором AgNO₃, восстанавливающие моносахариды – анилинфталатом [7].

Гликополимеры препарата Ас-1603 разделяли методом анионообменной хроматографии на колонке (80 × 1,5 см) с DEAE-целлюлозой («Тоуорепарл», Япония). Нейтральную фракцию элюировали 0,005 М, а кислую – 0,5 М фосфатным буфером (рН 6,3). Полученные фракции

обессоливали на колонке (90 × 1,5 см) с TSK HW-40S гелем («Тоуорепарл», Япония). Элюцию проводили 1%-ным АсОН, используя дифференциальный рефрактометр («Knauer», Германия). Фракции гликополимеров объединяли, диализовали против дистиллированной воды, замораживали и высушивали лиофильно.

Абсолютная D-конфигурация рамнозы и маннозы (полимеры 1 и 2) была установлена методом ГЖХ ацетилированных гликозидов с (+)-октан-2-олом согласно опубликованным процедурам [8]. Абсолютную конфигурацию моносахаридных остатков в полимере 3 определяли по эффектам гликозилирования в остатках моносахаридов в спектрах ЯМР ¹³С согласно закономерностям, изложенным в работе Shashkov et al. [9], предполагая, что глюкоза относится к D-ряду. D-Конфигурацию глюкозы подтверждали ферментативно, как описано ранее [4].

Спектры ЯМР снимали на приборе Bruker AV600 («Bruker», Германия) для растворов в 99,96% D₂O при температурах, обеспечивающих минимальное перекрытие остаточного сигнала дейтерированной воды с сигналами полимеров. В качестве внутреннего эталона использовали натриевую соль 3-(триметилсилил)-3,3,2,2-тетрадейтеропропионовой кислоты (TSP, δ_H 0,0 м.д., δ_C –1,6 м.д.). Двумерные спектры снимали и записывали при использовании стандартных методик фирмы Bruker. Время спин-лока в экспериментах тотальной корреляционной спектроскопии (TOCSY) составляло 100 мс. Время смешивания в эксперименте двумерной спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат (ROESY) составляло 150 мс. Эксперименты по гетероядерной корреляции ¹H, ¹³C (HMBC) были оптимизированы для констант спин-спиновой взаимодействия $J_{H,C}$ 8 Гц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В кислотных гидролизатах клеточной стенки и препарата Ас-1603 (2 М HCl, 100 °С, 3 ч) фосфат-содержащие соединения не выявлены (электрофорез), однако были обнаружены моносахариды – галактоза, глюкоза, манноза, рамноза и ксилоза (БХ), которые могли входить в состав гликополимеров клеточной стенки исследуемого штамма.

¹³С ЯМР-спектр препарата Ас-1603 (рис. 1) был типичным для нерегулярного полимера или смеси полимеров. Спектр содержал, по крайней мере, 12 сигналов различной интенсивности в аномерной области атомов углерода δ_C 97,5–105,1 м.д., а также один сигнал от 6-дезоксиса-

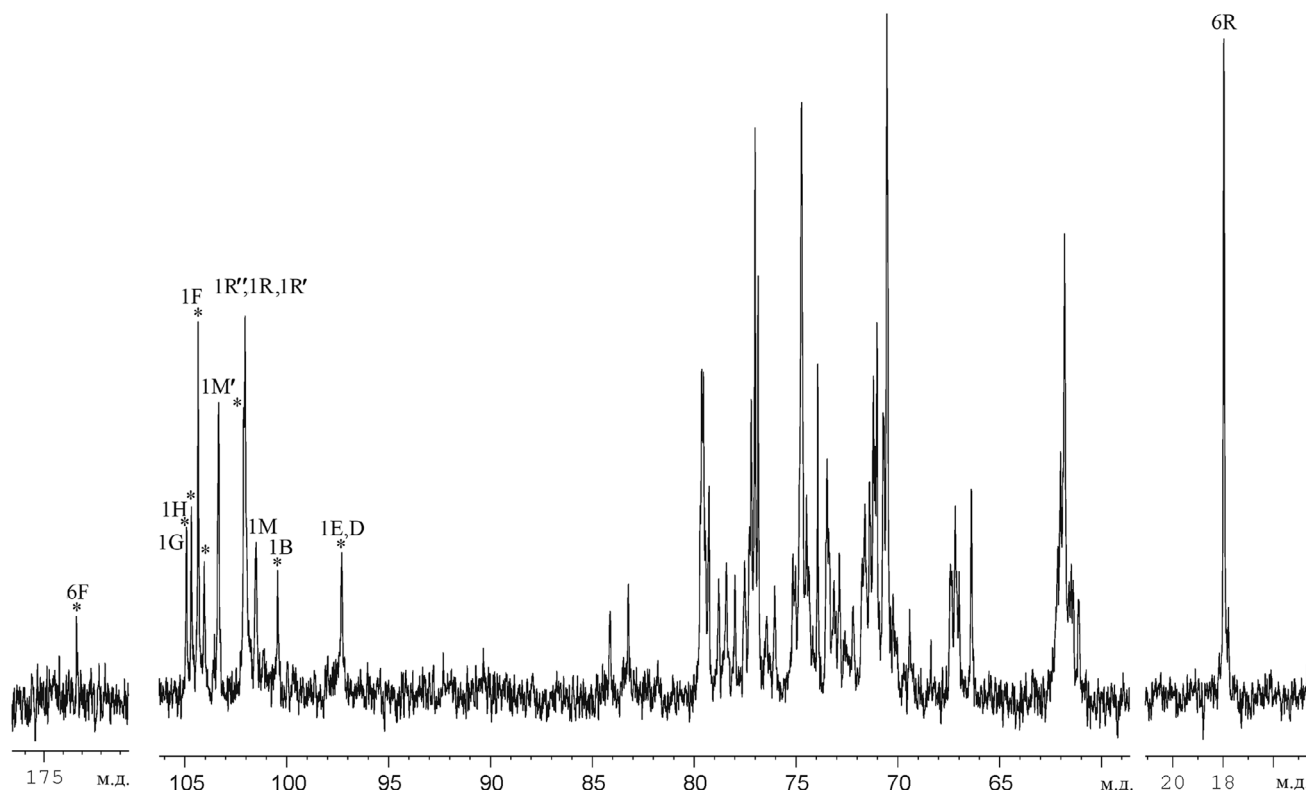


Рис. 1. Спектр ^{13}C ЯМР гликополимеров препарата Ас-1603 из клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^Т. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с табл. 1. Звездочками помечены сигналы, относящиеся к полимеру 3

хара при δ_{C} 18,0 м.д. Спектр также содержал сигнал в области резонанса карбонильных групп при δ_{C} 173,2 (рН 3,0) или 174,0 (рН 7,0), принадлежащий, судя по зависимости положения от рН, СООН-группе. Разделение препарата Ас-1603 на колонке с DEAE (см. раздел «Методы исследования») привело к получению нейтральной и кислой фракций.

^{13}C ЯМР-спектр нейтральной фракции (табл. 1, рис. 2) в аномерной области атомов углерода (δ_{C} 101,4–104,3 м.д.) содержал большое количество сигналов различной интенсивности, а в сильнополюной области спектра были сигналы при δ_{C} 17,9 и 18,0 м.д.

^1H ЯМР-спектр нейтральной фракции (табл. 1, рис. 3, вверху) содержал шесть хорошо разрешенных сигналов в аномерной области протонов. Два сигнала наблюдали в области сильного поля при δ_{H} 1,30 и 1,32 м.д.

Как ^1H , так и ^{13}C спектры полимеров нейтрального препарата были расшифрованы с помощью двумерных гомоядерных $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ спектров HSQC и HMBSC.

Двумерные $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, TOCSY и ROESY (рис. S1 в Приложении) спектры выявили остат-

ки α -маннопиранозы ($\alpha\text{-Manp}$), α -рамнопиранозы ($\alpha\text{-Rhap}$) и β -ксилопиранозы ($\beta\text{-Xylp}$). Анализ $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC-спектра (табл. 1, рис. 3) показал различное замещение остатков Manp: в положение 2 и 3 (химический сдвиг C-2 при 79,2 м.д. и химический сдвиг C-3 при 77,6 м.д., остаток M); только в положение 3 (химический сдвиг C-3 при 79,6 м.д., остаток M'); только в положение 2 (химический сдвиг C-2 при 79,8 м.д., остаток M''); замещение $\alpha\text{-Rhap}$ в положение 2 (химический сдвиг C-2 при 79,5 м.д., остаток R; при 79,6 м.д., остаток R' и при 79,7 м.д., остаток R''). Остатки $\beta\text{-Xylp}$ выявлены как концевые (Xs).

Последовательность остатков определена путем анализа $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY (табл. 1, рис. S1 в Приложении) и $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBSC (табл. 1, рис. S2 в Приложении) спектров. Корреляционные пики между остатками H-1(M)/H-2(R) (5,15/4,11); H-1(M'')/H-2(R'') (5,22/4,11); H-1(R, R'')/H-3(M') (5,25, 5,22/3,88); H-1(M')/H-2(R') (5,05/4,10); H-1(R')/H-3(M) (5,24/3,95); H-1(R')/H-2(M'') (5,24/4,07) и H-1(R')/H-3(M') (5,24/3,88) наблюдали в $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY-спектре (табл. 1, рис. S1 в Приложении). Они указывали на присутствие двух типов повторяющихся звеньев, что,

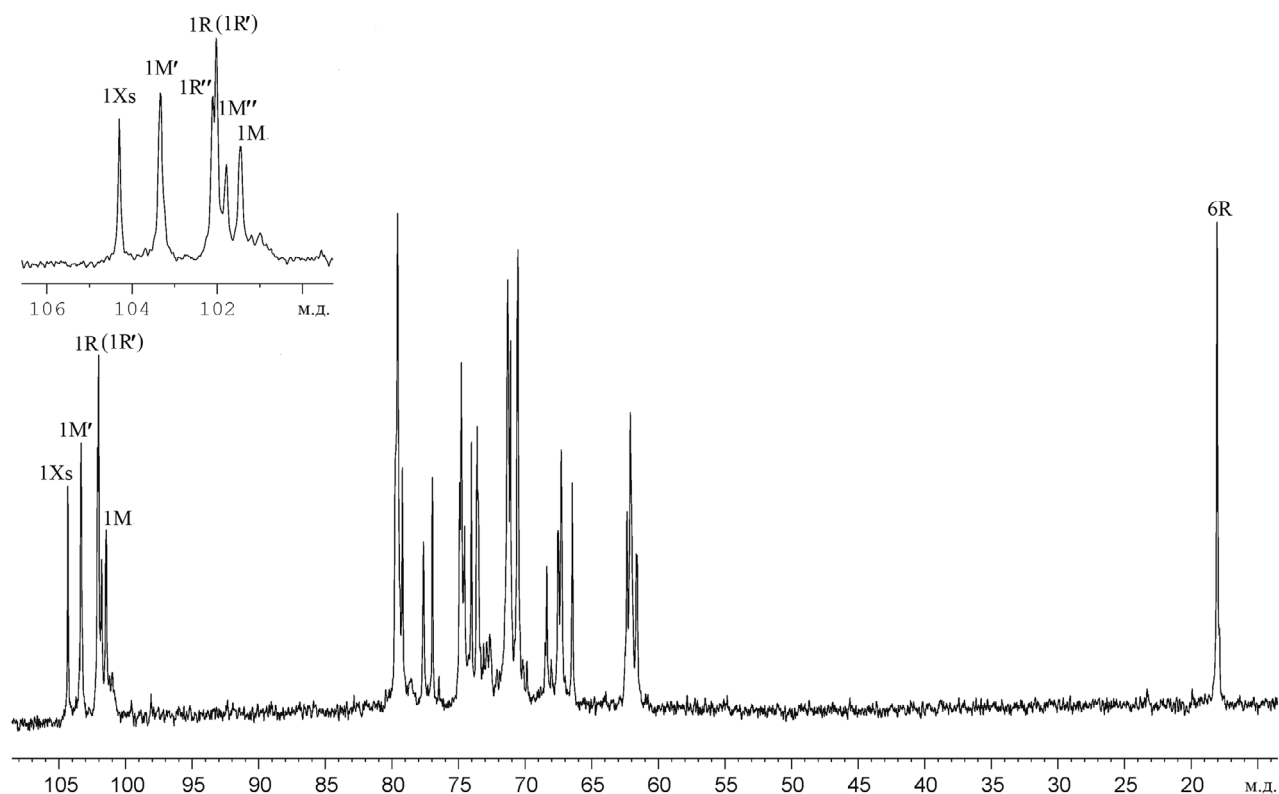


Рис. 2. Спектр ^{13}C ЯМР полимеров 1 и 2 нейтральной фракции из клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^T. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с табл. 1. Вверху слева приведена область аномерных атомов углерода, увеличенная в масштабе

скорее всего, связано с наличием в нейтральной фракции либо одного полимера с гетерогенной цепью, либо двух. Структуры были установлены при анализе дальних Н/С-корреляций в спектрах ^1H , ^{13}C НМВС (табл. 1, рис. S2 в Приложении), где обнаружены следующие корреляционные пики между остатками: Н-1(**M**)/С-2(**R**) (5,15/79,5); Н-1(**R**, **R''**)/С-3(**M'**) (5,25, 5,22/79,6); Н-1(**Xs**)/С-2(**M**) (4,43/79,2); Н-1(**M'**)/С-2(**R'**) (5,05/79,6); Н-1(**R'**)/С-2(**M''**) (5,24/76,8); Н-2(**M**)/С-1(**R**) (4,22/102,0); Н-3(**R'**)/С-1(**M**) (3,96/101,4); Н-3(**M**)/С-1(**Xs**) (3,95/104,3); Н-2(**M'**)/С-1(**R'**) (4,15/102,0) и Н-3(**R'**)/С-1(**M'**) (3,96/103,3).

Абсолютная D-конфигурация остатков α -Rhap и α -Manp определена согласно процедуре, описанной в работе Gerwig et al. [8], и подтверждена совпадением химических сдвигов С-1 – С-3 α -Rhap и α -Manp в спектрах ^{13}C -ЯМР с таковыми для полимера I из *R. toxicus* ВКМ Ас-1600, имеющего идентичную основную повторяющуюся единицу [3]. Присутствие в ^1H , ^1H ROESY-спектре (табл. 1, рис. S1 в Приложении) Н-1(**M**)/Н-1(**Xs**) (5,15/4,43) указывает на одинаковые D-конфигурации маннопиранозы и ксиллопиранозы.

Структуры повторяющихся звеньев рамноманнанов (полимеры 1 и 2) представлены на рис. 4.

^{13}C ЯМР-спектр полимера 3 из кислой фракции (табл. 1, рис. 5) был типичным для регулярного полимера. Аномерная область атомов углерода содержала шесть сигналов равной интенсивности и один сигнал двойной интегральной интенсивности. В области сильного поля сигналов не наблюдали, а сигнал при δ_{C} 173,5 (рН 5) был виден в резонансной области карбоксильных групп.

^1H ЯМР-спектр полимера 3 из кислой фракции (рис. 6, вверху) содержал шесть хорошо разрешенных сигналов и один сигнал двойной интенсивности в аномерной области протонов.

Как ^1H , так и ^{13}C спектры полимера 3 были расшифрованы с помощью двумерных спектров, упомянутых выше. Спектры 2D ^1H , ^1H COSY, TOCSY и ROESY (рис. S3 в Приложении) выявили остатки α -Galp, β -Manp, β -Glcsp, два остатка α -Glcsp, β -GlcspA и два терминальных остатка β -Glcsp. Анализ ^1H , ^{13}C HSQC-спектра (табл. 1, рис. 6, слева) показал слабопольный химический сдвиг атомов углерода при С-2 (78,2 м.д.) и С-3 (78,6 м.д.) (А); С-3 (83,4 м.д.)

Таблица 1. Химические сдвиги в спектрах ЯМР ^{13}C и ^1H для гликополимеров клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^Т (TSP δ_{C} – 1,6 м.д. и δ_{H} 0,00 м.д.)

Остаток		C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6 (H-6a, 6b)
Нейтральный полимер 1							
→3)- α -D-Манp-(1→ 2) ↑	M	101,4 5,15	79,2 4,22	77,6 3,95	67,5 3,84	74,9 3,69	62,3 ^b 3,88, 3,77
α -D-Хулp-(1	Xs	104,3 4,43	74,0 3,30	76,9 3,43	70,6 3,63	66,4 3,98, 3,27	
→2)- α -D-Rhap-(1→	R	102,0 5,25	79,5 4,11	71,3 3,92	73,5 3,51	70,6 ^a 3,95	18,0 1,32
→3)- α -D-Манp-(1→	M'	103,3 5,05	71,1 4,15	79,6 3,88	67,3 3,81	74,8 3,71	62,0 ^b 3,86, 3,76
→2)- α -D-Rhap-(1→	R'	102,0 5,24	79,6 4,10	71,3 3,96	73,5 3,52	70,6 ^a 3,95	17,9 1,28
Нейтральный полимер 2							
→2)- α -D-Манp-(1→	M''	101,8 5,22	79,8 4,07	71,3 3,91	68,4 3,68	74,5 3,73	61,6 3,82, 3,80
→2)- α -D-Rhap-(1→	R''	102,1 5,22	79,7 4,11	71,3 3,98	73,6 3,49	70,5 ^a 3,83	17,9 1,28
→3)- α -D-Манp-(1→	M'	103,3 5,05	71,1 4,15	79,6 3,88	67,3 3,81	74,8 3,71	62,3 ^b 3,84, 3,79
→2)- α -D-Rhap-(1→	R'	102,0 5,25	79,6 4,10	71,3 3,96	73,5 3,52	70,6 ^a 3,95	17,9 1,28
Кислый полимер 3							
β -D-Glcp-(1 ↓ 2) →6)- α -D-Galp-(1→ 3) ↑	G	105,1 4,69	74,6 3,31	77,1 3,49	71,0 3,41	77,1 3,48	62,0 3,91, 3,87
	A	102,2 5,43	78,2 4,11	78,6 4,25	70,7 4,23	71,8 4,32	71,5 3,98, 3,98
β -D-Glcp-(1	H	104,8 4,72	74,7 3,34	77,3 3,44	70,8 3,41	76,2 3,73	62,0 3,87, 3,77
→3)- β -D-Манp-(1→	B	100,7 4,74	71,5 4,34	83,4 3,75	67,1 3,79	77,6 3,47	62,3 3,94, 3,76
→4)- β -D-Glcp-(1→	C	104,2 4,72	74,9 3,44	76,2 3,72	79,1 3,72	77,5 3,79	61,4 3,78, 3,78
→3)- α -D-Glcp-(1→	D	97,5 5,21	71,8 3,81	84,3 3,98	69,5 3,56	73,0 4,00	61,8 3,94, 3,72
→2)- α -D-Glcp-(1→	E	97,5 5,72	76,6 3,69	72,3 3,78	70,3 3,52	73,1 3,61	62,0 3,84, 3,72
→4)- β -D-GlcpA-(1→	F	104,4 4,58	74,6 3,33	75,3 3,76	77,0 3,86	75,0 4,13	173,5

^{a,b} Предполагаемое отнесение в колонке.

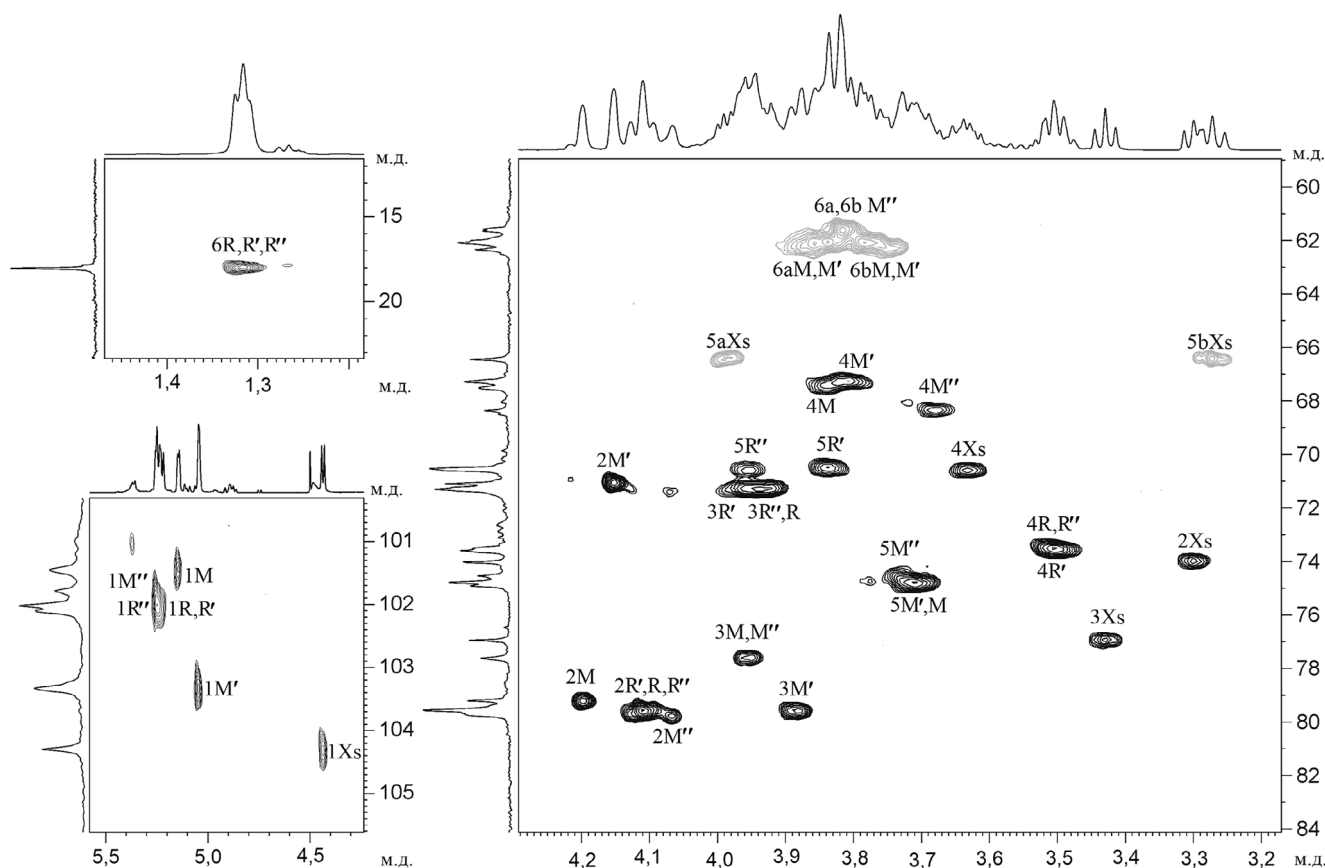


Рис. 3. Части двумерного ^1H , ^{13}C HSQC-спектра полимеров 1 и 2 нейтральной фракции из клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^T. Соответствующие части ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров приведены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с табл. 1

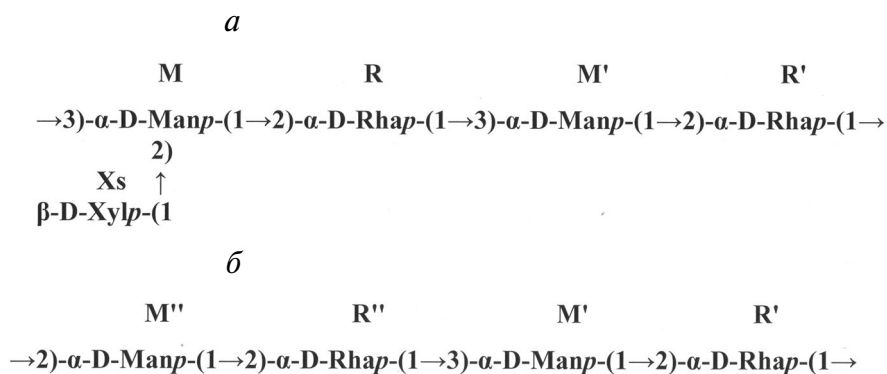


Рис. 4. Структуры повторяющихся звеньев нейтральных полимеров из клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^T: *a* – рамноманнан 1 (полимер 1); *б* – рамноманнан 2 (полимер 2). Заглавными латинскими буквами обозначены остатки в соответствии с табл. 1

(В); С-4 (79,1 м.д.) (С); С-3 (84,3 м.д.) (D); С-2 (76,6 м.д.) (Е) и С-4 (77,0 м.д.) (F) в сравнении с таковыми в спектрах соответствующих незамещенных остатков. Химические сдвиги ^{13}C в подспектрах остатков (G) и (H) были близки к тако-

вым в β-Glcp-OMe, что указывает на концевое положение остатков в повторяющемся звене.

Последовательность остатков в полимере 3 стала понятной после анализа 2D ^1H , ^1H ROESY спектра (табл. 1, рис. S3 в Приложении). Спектр

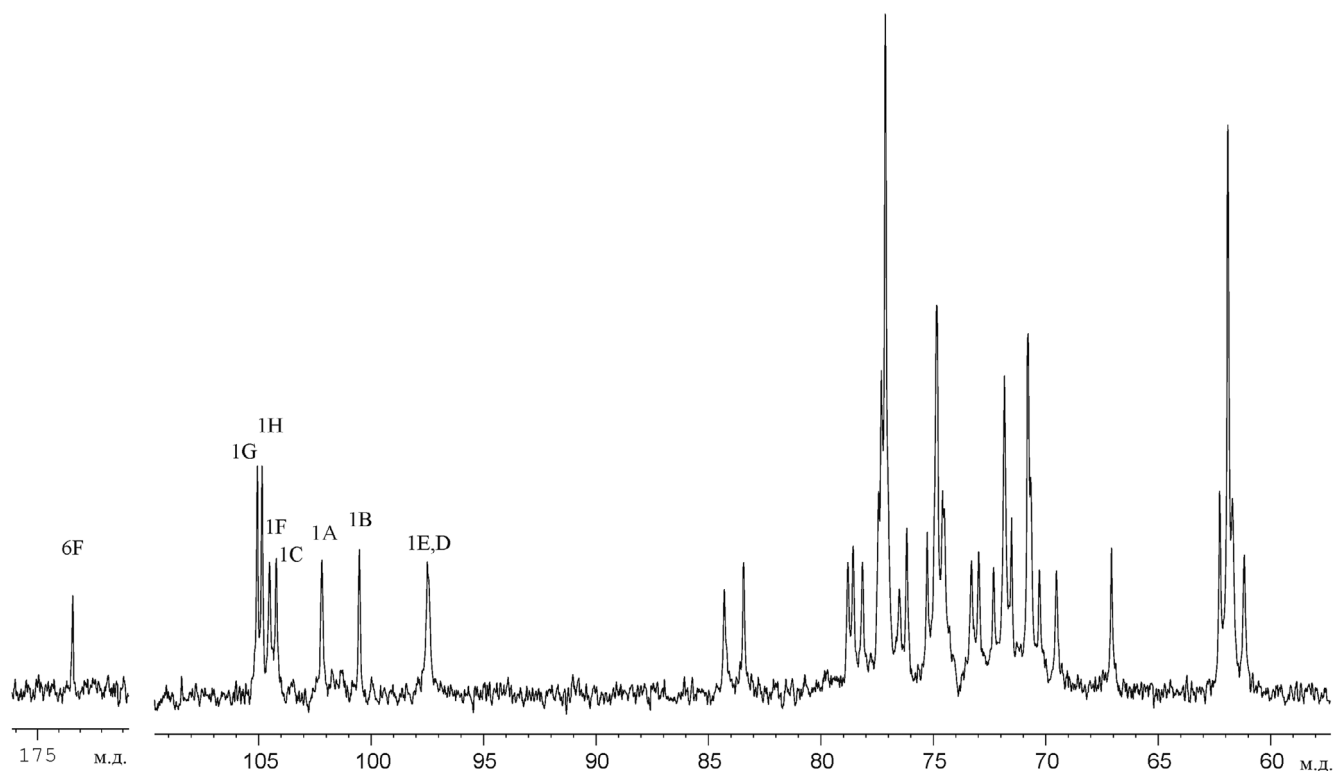


Рис. 5. Спектр ^{13}C ЯМР полимера 3 кислой фракции из клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^Т. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с табл. 1

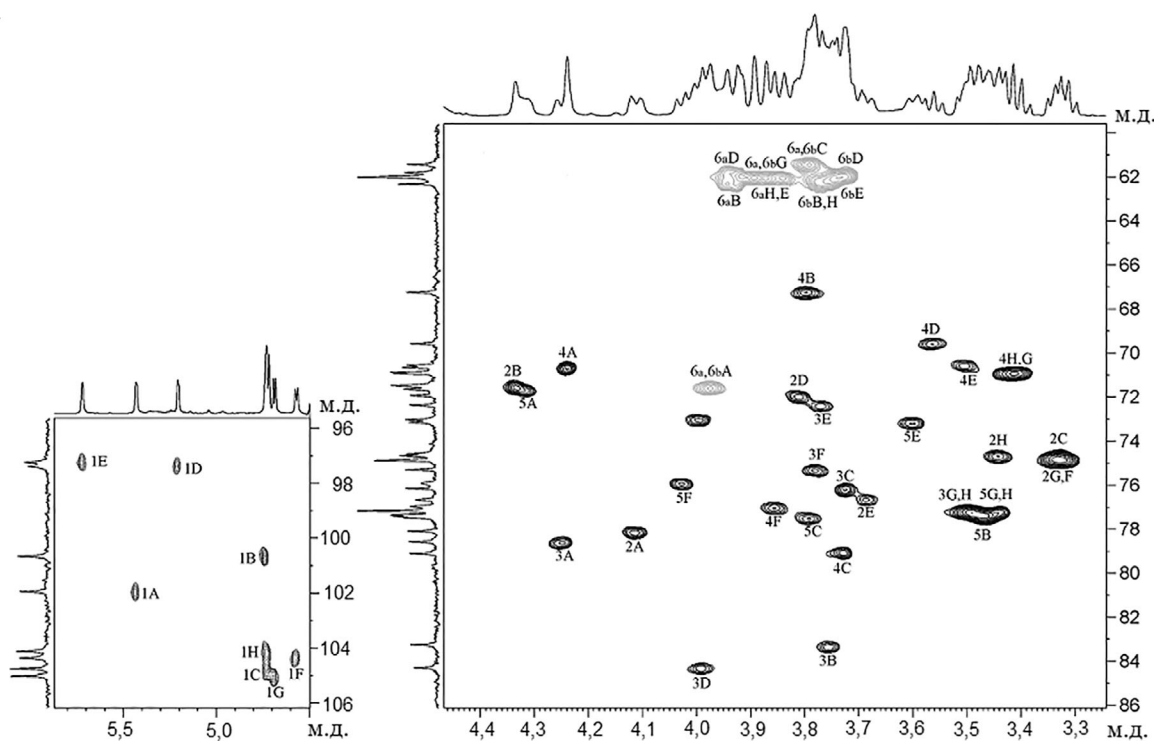


Рис. 6. Части двумерного ^1H , ^{13}C HSQC-спектра полимера 3 кислой фракции из клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^Т. Соответствующие части ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров приведены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с табл. 1

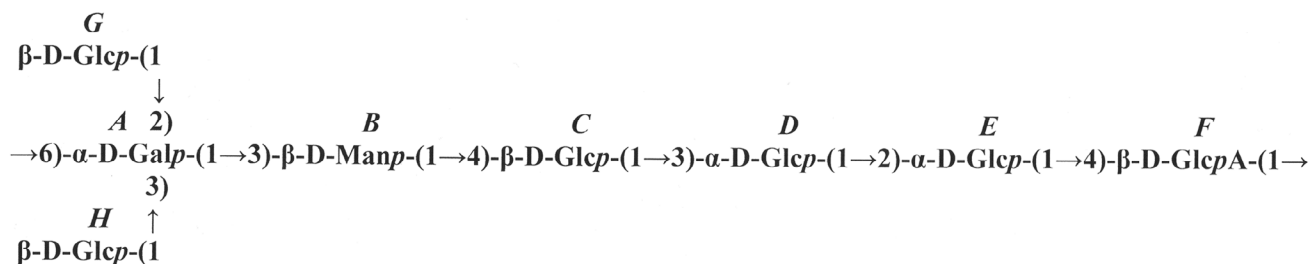


Рис. 7. Структура повторяющегося звена кислого полисахарида из клеточной стенки *R. tritici* ВКМ Ас-1603^T – тейхуроновой кислоты (полимер 3). Заглавными латинскими буквами обозначены остатки в соответствии с табл. 1

¹H, ¹H ROESY содержал следующие пики между остатками: Н-1(А)/Н-3(В) (5,43/3,75); Н-1(В)/Н-4(С) (4,74/3,72); Н-1(С)/Н-3(Д) (4,72/3,98); Н-1(Д)/Н-2(Е) (5,21/3,69); Н-1(Е)/Н-4(Ф) (5,72/3,86); Н-1(Ф)/Н-6(А) (4,58/3,98); Н-1(Г)/Н-2(А) (4,69/4,11) и Н-1(Н)/Н-3(А) (4,72/4,25). Такая последовательность была подтверждена при анализе ¹H, ¹³C НМВС-спектра кислого полимера 3 (табл. 1, рис. S4 в Приложении), где присутствовали следующие пики между остатками: Н-6(А)/С-1(Ф) (3,98/104,4); Н-3(В)/С-1(А) (3,75/102,2); Н-4(С)/С-1(В) (3,72/100,7); Н-3(Д)/С-1(С) (3,98/104,2); Н-2(Е)/С-1(Д) (3,69/97,5); Н-4(Ф)/С-1(Е) (3,86/97,5); Н-2(А)/С-1(Г) (4,11/105,1) и Н-3(А)/С-1(Н) (4,25/104,8).

Абсолютную конфигурацию моносахаридных остатков в полимере 3 определяли по гликозилирующим эффектам в ¹³C ЯМР-спектре согласно закономерностям, описанным ранее, принимая во внимание D-конфигурацию глюко-остатков (Glcр и GlcрА) [9]. Аналогичный подход был использован при определении абсолютных конфигураций моносахаридных остатков гликополимеров [3, 4]. Отрицательный (–0,7 м.д.) γ-эффект гликозилирования β-Glcp по С-6 (остаток С) характерен для D-абсолютной конфигурации гликозилирующей β-пиранозы, то есть β-Manp (остаток В). Гликозилирующие эффекты, как большой положительный (+9,1 м.д.) α-эффект Manp по С-3, так и малый по модулю отрицательный β-эффект (–0,1 м.д.) Manp по С-2 (остаток В), типичны для одинаковой абсолютной конфигурации остатков В и С. Таким образом, абсолютная D-конфигурация Galp (остаток А) следует из D-конфигурации β-Manp (остаток В).

Структура повторяющегося звена полимера 3, ТУК, представлена на рис. 7.

В результате проведенного исследования установлены структуры трех гликополимеров клеточной стенки типового штамма *R. tritici*. Структуры полимеров (рамноманнаны и тейхуроновая кислота) описаны впервые у прокариотных микроорганизмов.

Полимер 1 – разветвленный рамноманнан, в цепи которого остатки D-маннозы частично замещены остатками D-ксилопиранозы (Manp, Xylp, 2/1). Отметим, что рамноманнан (с D-маннозой) с другой локализацией гликозидных связей в цепи, а также с D-ксилофуранозой на остатках маннозы был выявлен в О-полисахариде грам-отрицательных бактерий рода *Citrobacter* [10].

Полимер 2 – линейный рамноманнан – не содержит ксилозы и с иной локализацией гликозидной связи между остатками маннозы и рамнозы в цепи. Возможно, что представленные повторяющиеся единицы (рис. 4) входят в состав одного полимера.

Полимер 3, ТУК, состоит из остатков моносахаридов – GlcА, Gal, Man и Glc в соотношении 1/1/1/5, при этом два остатка β-D-Glcp являются терминальными на остатке α-D-Galp. Представленная ТУК (рис. 7) содержит 8 остатков моносахаридов в повторяющемся звене. Большинство описанных ТУК состоит из дисахаридных звеньев, однако встречаются полимеры, содержащие 4 и более моносахаридных остатков в повторяющемся звене [11].

В табл. 2 представлены структуры гликополимеров клеточных стенок *R. tritici* в сравнении с изученными ранее у *R. toxicus*, «*Rathayibacter tanacetii*» и *R. iranicus* [3, 4]. Эти данные свидетельствуют, что каждый упомянутый вид имеет индивидуальный набор различных по структуре гликополимеров. Штаммы содержат линейные или разветвленные рамноманнаны с разной локализацией гликозидных связей и разным составом боковых гликозильных заместителей. Характерной особенностью описанных рамноманнанов является наличие рамнозы в D-конфигурации.

У представителей двух наиболее близких видов *R. iranicus* и *R. tritici* (уровень сходства 16S рРНК генов – 99,3%) помимо рамноманнанов в клеточных стенках присутствуют гликополимеры другой природы – тейхуроновые кислоты различной структуры. К особенностям пред-

Таблица 2. Гликополимеры клеточных стенок некоторых штаммов рода *Rathayibacter*

Гликополимеры клеточных стенок	Штаммы рода <i>Rathayibacter</i>			
	<i>R. tritici</i> ВКМ Ас-1603 ^T [настоящая работа]	<i>R. toxicus</i> ВКМ Ас-1600 [3]	« <i>Rathayibacter tanacetii</i> » ВКМ Ас-2596 [3]	<i>R. iranicus</i> ВКМ Ас-1602 ^T [4]
Рамноманнан 1 (PM1)	•			
Рамноманнан 2 (PM2)	•			
Рамноманнан 3 (PM3)		•		
Рамноманнан 4 (PM4)			•	
Рамноманнан 5 (PM5)				•
Полисахарид (ПС)		Δ		
Тейхуроновая кислота 1 (ТУК1)	◆			
Тейхуроновая кислота 2 (ТУК2)				◆

Примечание: (•) – рамноманнан; (Δ) – нейтральный полисахарид; (◆) – ТУК;
 (PM1) $\rightarrow 3$ - α -[β -D-Хylp-(1 \rightarrow 2)]-D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow);
 (PM2) $\rightarrow 2$ - α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow);
 (PM3) $\rightarrow 2$ - α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-(1 \rightarrow);
 (PM4) $\rightarrow 3$ - α -D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow);
 (PM5) $\rightarrow 2$ - α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -[α -D-Manp-(1 \rightarrow 6)]-D-Manp-(1 \rightarrow);
 (ПС) $\rightarrow 2$ - β -[α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)]- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow);
 (ТУК1) $\rightarrow 6$ -[β -D-Glcp-(1 \rightarrow 2) и β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)]- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow);
 (ТУК2) $\rightarrow 3$ - α -[α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)]-L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 2)- α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow).

ставленных ТУК можно отнести отсутствие в цепи N-ацетилированных производных моносахаридов, которые присутствуют в структурах большинства полимеров этого класса [11]. У генетически более удаленного от них вида *R. toxicus* (98,3 и 97,8% сходства 16S рРНК генов соответственно [12]) найден второй нейтральный полисахарид, в то время как ТУК отсутствует.

Штамм «*Rathayibacter tanacetii*» [13] отличается от трех, описанных выше, наличием в клеточной стенке только одного гликополимера – рамноманнана.

Таким образом, представители изученных к настоящему времени видов рода *Rathayibacter* содержат индивидуальные наборы уникальных гликополимеров, что дифференцирует их на уровне фенотипа. При этом все вышеупомянутые штаммы характеризуются общим свой-

ством – в их клеточной стенке присутствуют рамноманнаны с D-Rhap, что, возможно, является характерным признаком для актинобактерий данного рода.

Финансирование. Работа выполнялась в рамках программы исследований № ЦИТИС: АААА-А16-116021660068-1, запланированной в МГУ им. М.В. Ломоносова, кафедра микробиологии 2016–2022 гг.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Evtushenko, L.I., and Dorofeeva, L.V. (2012) Genus XXII. *Rathayibacter*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Whitman, W., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M., Ludwig, W., Suzuki, K., and Parte, A., eds), vol. 5, Springer New-York, NY, USA, pp. 953–964.
- Murray, T.D., Schroeder, B.K., Schneider, W.L., Luster, D.G., Sechler, A., Rogers, E.E., and Subbotin, S.A. (2017) *Rathayibacter toxicus*, other *Rathayibacter* species inducing bacterial head blight of grasses, and the potential for livestock poisonings, *Phytopathology*, **107**, 804–815.
- Shashkov, A.S., Tul'skaya, E.M., Dmitrenok, A.S., Streshinskaya, G.M., Potekhina, N.V., Senchenkova, S.N., Piskunkova, N.F., Dorofeeva, L.V., and Evtushenko, L.I. (2018) Rhamnose-containing cell wall glycopolymers from *Rathayibacter toxicus* VKM Ac-1600 and “*Rathayibacter tanacetii*” VKM Ac-2596, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 717–726.

4. Dmitrenok, A.S., Shashkov, A.S., Streshinskaya, G.M., Tul'skaya, E.M., Potekhina, N.V., Senchenkova, S.N., Dorofeeva, L.V., and Evtushenko, L.I. (2019) New rhamnose-containing glycopolymers from *Rathayibacter iranicus* VKM Ac-1602^T cell wall, *Carbohydr. Res.*, **482**, 107728.
5. Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C., and Whitman, W.B. (2002) Report of Ad Hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 1043–1047.
6. Schumann, P., Kämpfer, P., Busse, H.J., and Evtushenko, L.I. (2009) Proposed minimal standards for describing new genera and species of the suborder *Micrococineae*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, 1823–1829.
7. Potekhina, N.V., Streshinskaya, G.M., Tul'skaya, E.M., and Shashkov, A.S. (2011) Cell wall teichoic acids in the taxonomy and characterization of gram-positive bacteria, in *Methods in Microbiology* (F.A. Rainey, F.A., A. Oren, A., eds.), Vol. 38, Chapt. 6, Academic Press/Elsevier, Amsterdam, pp. 131–164.
8. Gerwig, G.J., Kamerling, I.P., and Viegant, J.F.G. (1979) Determination of the absolute configuration of monosaccharides in complex carbohydrates by capillary G.L.C., *Carbohydr. Res.*, **77**, 1–7.
9. Shashkov, A.S., Lipkind, G.M., Knirel, Y.A., and Kochetkov, N.K. (1988) Stereometrical factors determining the effects of glycosylation on the ¹³C chemical shifts in carbohydrates, *Magn. Reson. Chem.*, **26**, 735–747.
10. Knirel, Y.A. (2011) Structure of O-antigens, in *Bacterial lipopolysaccharides* (Knirel, Y.A., and Valvano, M.A., eds), Springer-Verlag/Wien, pp. 41–115, doi: 10.1007/978-3-7091-0733-1_3.
11. Tul'skaya, E.M., Shashkov, A.S., Streshinskaya, G.M., Senchenkova, S.N., Potekhina, N.V., Kozlova, Yu.I., and Evtushenko, L.I. (2011) Teichuronic and teichulosonic acids of actinomycetes, *Biochemistry* (Moscow), **76**, 904–913.
12. Стародумова И.П. (2018) Развитие системы классификации актинобактерий рода *Rathayibacter*, Дисс. канд. биол. наук, Москва, с. 77.
13. Vasilenko, O.V., Starodumova, I.P., Tarlachkov, S.V., Dorofeeva, L.V., Avtukh, A.N., and Evtushenko, L.I. (2016) Draft genome sequence of “*Rathayibacter tanacetii*” strain VKM Ac-2596 isolated from *Tanacetum vulgare* infested by a foliar nematode, *Genome Announc.*, **4**, e00512–e00516.

RHAMNOMANNANS AND TEICHURONIC ACID FROM THE CELL WALL OF *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603^T*

A. S. Shashkov¹, E. M. Tul'skaya^{2**}, G. M. Streshinskaya²,
A. S. Dmitrenok¹, N. V. Potekhina², S. N. Senchenkova¹,
N. F. Piskunova², L. V. Dorofeeva³, and L. I. Evtushenko³

¹ Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia; E-mail: em_tulskaya@mail.ru

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

Received November 28, 2019

Revised December 18, 2019

Accepted December 18, 2019

The structures of three cell wall glycopolymers of the phytopathogen *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603^T (family Microbacteriaceae, order Micrococcales, class Actinobacteria) were established by chemical methods and NMR spectroscopy. Polymer 1 is a branched rhamnmannan with the repeating unit $\rightarrow 3)-\alpha-[\beta-D-Xylp-(1\rightarrow 2)]-D-Manp-(1\rightarrow 2)-\alpha-D-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-Manp-(1\rightarrow 2)-\alpha-D-Rhap-(1\rightarrow$; polymer 2 is a linear rhamnmannan with the repeating unit $\rightarrow 2)-\alpha-D-Manp-(1\rightarrow 2)-\alpha-D-Rhap-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-Manp-(1\rightarrow 2)-\alpha-D-Rhap-(1\rightarrow$; polymer 3 is a branched teichuronic acid containing monosaccharides residues GlcA, Gal, Man, and Glc at the a 1 : 1 : 1 : 5 ratio (see the text for the structures). Glycopolymers with these structures were identified in prokaryotic microorganisms for the first time. Species-specific sets of cell wall phosphate-free glycopolymers of four species from the *Rathayibacter* genus (*R. tritici* VKM Ac-1603^T, *R. iranicus* VKM Ac-1602^T, *R. toxicus* VKM Ac-1600, and “*Rathayibacter tanacetii*” VKM Ac-2596) are discussed. All studied strains have a common property – the presence of linear or branched rhamnmannans with D-rhamnose, but the positions of glycosidic bonds and side substituents in their molecules are different and may serve as usefull chemotaxonomic marker of the genus *Rathayibacter*.

Keywords: *Rathayibacter*, cell wall, rhamnmannan, teichuronic acid, D-rhamnose, NMR-spectroscopy