

УДК 577.124

D-РАМНАН И ПИРУВАТСОДЕРЖАЩАЯ ТЕЙХУРОНОВАЯ КИСЛОТА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759

© 2021 А.С. Шашков¹, Е.М. Тульская^{2*}, Н.В. Потехина², А.С. Дмитренко¹,
С.Н. Сенченкова¹, В.А. Зайчиков², Л.В. Дорофеева³, Л.И. Евтушенко³

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

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: em_tulskaya@mail.ru

³ Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрябина, ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 18.01.2021

После доработки 16.02.2021

Принята к публикации 16.02.2021

Rathayibacter sp. ВКМ Ас-2759 (семейство Microbacteriaceae, класс Actinobacteria) содержит в клеточной стенке два гликополимера. Основная цепь рамнана, гликополимера 1, построена из повторяющихся тетрасахаридных звеньев, несущих на нередуцирующем конце терминальные остатки арабинофуранозы: $\rightarrow 3$)- α -[α -D-Araf-(1 \rightarrow 2)]-D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow). Подобно другим изученным видам рода *Rathayibacter*, в нейтральном гликополимере штамма ВКМ Ас-2759 рамноза присутствует в D-конфигурации. Ацетилированная пировиноградной кислотой тейхуроновая кислота, гликополимер 2, состоит из линейных тетрасахаридных звеньев: $\rightarrow 4$)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -[4,6-S-Pyг]-D-Manp-(1 \rightarrow). Структуры гликополимеров установлены химическими и ЯМР-спектроскопическими методами и описаны впервые для прокариотных микроорганизмов. Полученные данные могут быть востребованы в таксономических исследованиях и работах по выяснению механизмов колонизации и инфекции растений бактериями рода *Rathayibacter*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Rathayibacter*, клеточная стенка, гликополимеры, D-рамнан, тейхуроновая кислота, пируват.

DOI: 10.31857/S0320972521040114

ВВЕДЕНИЕ

Род *Rathayibacter* (семейство Microbacteriaceae, класс Actinobacteria) [1] включает 8 валидно описанных видов (LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: <https://lpsn.dsmz.de/genus/rathayibacter>), более половины из которых известны как фитопатогены [2–4]. Виды *Rathayibacter* имеют высокий уровень сходства между собой по генам 16S рРНК (до 99,52%) и традиционным фенотипическим характеристикам [2–5]. При изучении химическо-

го состава клеточных стенок у представителей пяти видов рода (*Rathayibacter tritici*, *Rathayibacter iranica*, *Rathayibacter toxicus*, *Rathayibacter caricis* и «*Rathayibacter tanacetii*») были обнаружены бесфосфатные полимеры различных типов и структур – рамноманнаны, тейхуроновые кислоты, рамнан (у *R. caricis*) и рамнозосодержащий нейтральный гликополимер с остатками D-Manp, D-Glcp и L-Rhap в повторяющемся звене (у *R. toxicus*) [6–9]. Штамм каждого вида имел индивидуальный профиль полисахаридов и содержал один или два гликополимера, при этом практически каждый из них имел структуру, впервые описанную у прокариотов [8, 9].

В настоящей работе представлены результаты изучения структур гликополимеров клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759, представителя пока не описанного нового вида, выделенного из некротического участка листа пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare*), инфицированной фитопатогенной нематодой *Aphelenchoides fragariae* [10].

Принятые сокращения: НМВС – гетероядерная корреляция ¹H, ¹³C через несколько связей; HSQC – протон-детектированная НОНО-квантовая корреляция; J – константа спин-спинового взаимодействия; ROESY – двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; COSY – корреляционная спектроскопия; TOCSY – тотальная корреляционная спектроскопия; δ_C , δ_H – значения химических сдвигов атомов ¹³C, ¹H соответственно.

* Адресат для корреспонденции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальный штамм *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759 был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) (www.vkm.ru).

Условия культивирования и получение биомассы для исследований, а также выделение и очистка клеточных стенок описаны ранее [11].

Выделение гликополимеров проводили методом холодной и горячей ТХУ-экстракций (10%-ная ТХУ, 4 °С, 24 ч и затем – 5%-ная ТХУ, 90 °С, 20 мин), как описано ранее [7]. Выход препаратов гликополимеров составил 4,8% и 14,2% соответственно. Полученные препараты (идентичные по химическим и ЯМР-спектроскопическим данным) были объединены и обозначены как суммарный препарат.

Методы кислотного гидролиза клеточной стенки и препаратов гликополимеров (2 М HCl, 3 ч, 100 °С), нисходящей хроматографии и электрофореза, а также реактивы для проявления сахаров и фосфатсодержащих соединений и продуктов их кислотной деградации описаны в работе Potekhina et al. [11].

Гликополимеры суммарного препарата разделяли методом анионообменной хроматографии на колонке (80 × 1,5 см) с DEAE-целлюлозой («Тоуорепарл», Япония). Фракции гликополимеров элюировали фосфатным буфером (рН 6,3) в разных концентрациях: нейтральную (*гликополимер 1*) – 0,005 М, а кислую (*гликополимер 2*) – 0,5 М. Полученные фракции обесоливали на колонке (90 × 1,5 см) с гелем TSK HW-40S («Тоуорепарл»). Элюцию проводили 1%-ным раствором АсОН, используя дифференциальный рефрактометр («Кнауер», Германия). Фракции *гликополимеров 1* и *2* диализовали против дистиллированной воды, высушивали лиофильно и исследовали методами ЯМР-спектроскопии.

Депирувирование гликополимера 2 проводили следующим образом: ~30 мг образца кислотной фракции обрабатывали 2%-ным раствором АсОН в течение 6 ч при 110 °С с последующей гель-хроматографией на колонке (90 × 1,5 см) с гелем TSK HW-40S в 1%-ном АсОН, осуществляя мониторинг элюции с помощью рефрактометра.

Состав моносахаридов в гликополимерах 1 и 2 исследовали модифицированным методом Leontein et al. [12] с помощью ГЖХ. Образцы гидролизовали 2 М CF₃COOH (120 °С, 2 ч), восстанавливали NaBH₄ (20 °С, 16 ч), ацетилювали уксусным ангидридом, и полученные ацетаты полиолов разделяли на хроматографе Маэстро ГХ 7820 («Интерлаб», Россия), оборудованном HP-5 колонкой (0,32 мм × 30 м) при темпе-

ратурном режиме 160–290 °С со скоростью 7 °С/мин.

Абсолютную конфигурацию нейтральных гексоз, входящих в структуры *гликополимеров 1* и *2*, устанавливали модифицированным методом Gerwig et al. [13]. К препарату *гликополимера* (0,5 мг) добавляли (+)-2-октанол и безводную трифторуксусную кислоту (15 мкл), нагревали в герметически закрытом контейнере 1 ч при 120 °С, избыток реагентов удаляли током воздуха. Полученные гликозиды ацетилювали и анализировали методом ГЖХ. Стандартные образцы готовили аналогичным способом из L- и D-моносахаридов.

Абсолютную конфигурацию арабинозы подтверждали на основании правил, опубликованных ранее [14], в соответствии с эффектами гликозилирования в спектре ЯМР ¹³C *гликополимера 1*.

Абсолютную конфигурацию остатков глюкуроновой кислоты в гликополимере 2 определяли по эффектам гликозилирования в остатках моносахаридов в спектрах ЯМР ¹³C на основании принадлежности глюкозы к D-ряду, согласно закономерностям, изложенным в работе Shashkov et al. [14].

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-тетрадегтеропропионовой кислоты (TSP, δ_H 0,0 м.д., δ_C – 1,6 м.д.). Двумерные ЯМР-эксперименты выполняли с использованием стандартного математического обеспечения («Bruker Optik GmbH», Германия). Время спин-лока в экспериментах TOCSY составляло 100 мс. Время смешивания в эксперименте ROESY составляло 150 мс. Эксперименты НМВС были оптимизированы для констант спин-спинового взаимодействия J_{н,с} 8 Гц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кислотные гидролизаты (2 М HCl, 100 °С, 3 ч) клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759 и выделенных из нее препаратов гликополимеров содержали набор сахаров (рамноза, глюкоза, галактоза, манноза и арабиноза) и не содержали характерных продуктов гидролиза тейхоевых кислот и гликозил-1-фосфатных полимеров (фосфорных эфиров полиолов и сахаров). Эти данные указывали на возможное присутствие в клеточной стенке исследуемого штам-

ма бесфосфатных гликополимеров, характерных для других штаммов рода *Rathayibacter* [6–9].

^{13}C ЯМР-спектр суммарного препарата (рис. 1, а) в аномерной области содержал восемь сигналов в диапазоне при δ_{C} 100,5–104,6 м.д. и сигнал при δ_{C} 110,0 м.д. В области высокого поля наблюдались четыре сигнала 6-дезоксипиранозы при δ_{C} 17,8–18,3 м.д. и интенсивный сигнал при δ_{C} 25,9 м.д., характерный для пируватной группы с шестичленным циклом и с экваториальной ориентацией метильной группы в этом цикле. В низкочастотной части спектра присутствовали сигналы при δ_{C} 173,1 и 173,9 м.д. Остальные сигналы находились в области δ_{C} 61–85 м.д. Спектры 2D-ЯМР, необходимые для расшифровки структуры, были сняты для суммарного препарата, но их анализ оказался сложным из-за многочисленных перекрытий протонных сигналов в области δ_{H} 3,4–4,2 м.д. Чтобы облегчить задачу, была сделана попытка разделить препарат на кислый и нейтральный компоненты с использованием хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой (см. «Материалы и методы»).

В результате разделения были получены две фракции. Первая, нейтральная фракция, содержала преимущественно гликополимер 1 (рис. 1, б) и небольшую примесь кислого полисахарида (гликополимер 2), а вторая, кислая фракция, со-

держала гликополимер 2 (рис. 1, в) с небольшой примесью гликополимера 1.

Нейтральная фракция (гликополимер 1). Спектр ЯМР ^{13}C нейтрального гликополимера 1 (рис. 1, б; таблица) содержал четыре интенсивных сигнала при δ_{C} 101,9–103,3 м.д. и сигнал при 110,0 м.д., характерный для фуранозида с *транс*-ориентацией заместителей при С-1 и С-2. Никаких интенсивных сигналов не наблюдалось в слабом поле при 165–185 м.д. В области сильного поля наблюдалось четыре сигнала 6-дезоксипиранозы (δ_{C} 17,8–18,3 м.д.). В спектре ЯМР ^1H (рис. 2, вверху) в аномерной области наблюдалось пять интенсивных протонных сигналов (δ_{H} 4,96–5,22 м.д.). Четыре дуплетных сигнала были видны в области сильного поля (δ_{H} 1,27–1,34 м.д.), что типично для 6-дезоксипираноз ($J_{5,6}$ 6 Гц).

Анализ моносахаридного состава гликополимера 1 выявил присутствие рамнозы и арабинозы в соотношении 4/1 как основных компонентов полисахарида.

Сигналы в спектрах ЯМР ^{13}C и ^1H были отнесены с помощью анализа двумерных гомоядерных $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC, HSQC-TOCSY и HMBC-экспериментов.

Анализ спектров $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, TOCSY и ROESY показал наличие в гликополимере 1 четы-

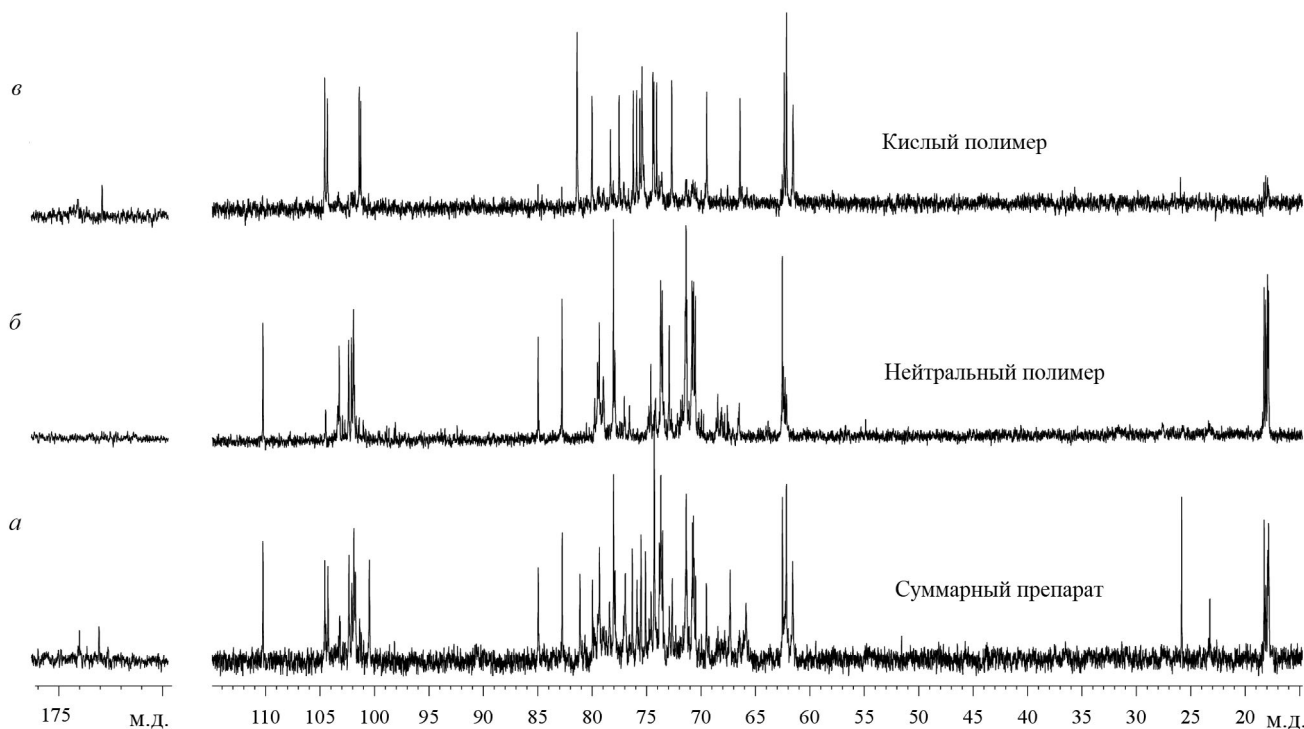


Рис. 1. Спектры ЯМР ^{13}C гликополимеров из клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759: суммарный препарат (а); нейтральная фракция (б); кислая фракция (в)

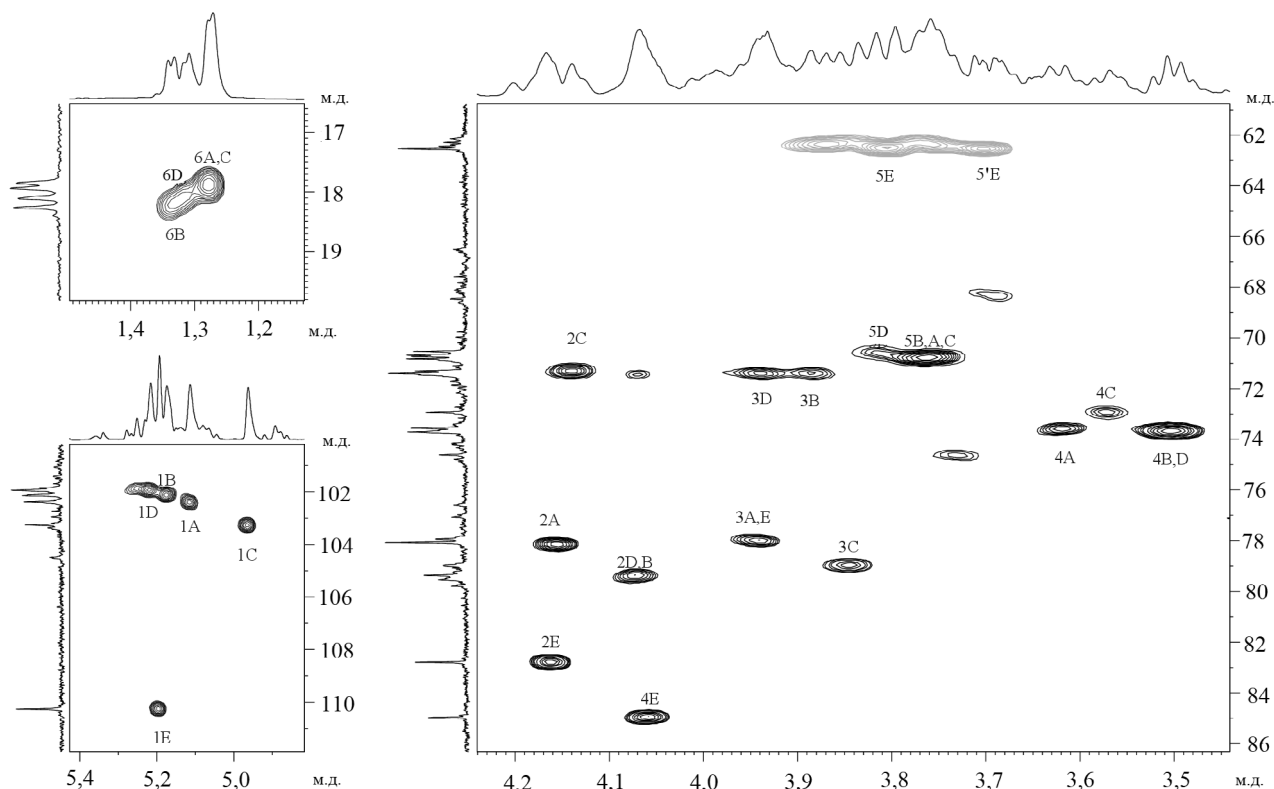


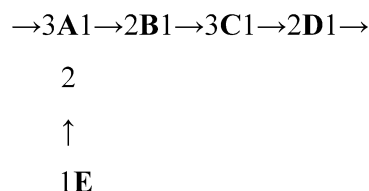
Рис. 2. Части двумерного ^1H , ^{13}C HSQC-спектра гликополимера *I* нейтральной фракции из клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759. Соответствующие части ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров приведены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с таблицей

рех остатков α -рамнопиранозы (α -Rhap) и одного остатка α -арабинофуранозы (α -Araf).

Смещение в спектре ^1H , ^{13}C HSQC (рис. 2; таблица) сигналов атомов углерода в сравнении с таковыми родоначальных пираноз свидетельствует о замещении двух остатков α -Rhap в положение 2 ($\delta_{\text{C-2}}$ 79,5 м.д. — остаток **B** и $\delta_{\text{C-2}}$ 79,3 м.д. — остаток **D**, таблица, гликополимер *I*), замещении остатка α -Rhap в положение 3 ($\delta_{\text{C-3}}$ 78,9 м.д. — остаток **C**) и замещении остатка α -Rhap в положения 2 и 3 ($\delta_{\text{C-2}}$ 78,1 м.д. и $\delta_{\text{C-3}}$ 78,0 м.д. — остаток **A**). Сравнение химических сдвигов остатка α -Araf (**E**) с таковыми, например, в метил- α -арабинофуранозиде, указывает на отсутствие замещения у C-2, C-3 и C-5 в остатке **E**.

Последовательность остатков в гликополимере *I* следовала из анализов спектров ^1H , ^1H ROESY и ^1H , ^{13}C HMBC. Гомоядерный 2D-спектр ^1H , ^1H ROESY (рис. 3, таблица) содержал следующие корреляционные пики между протонами: 1A/2B (5,11/4,08); 1B/3C (5,17/3,85); 1C/2D (4,96/4,06); 1D/3A (5,22/3,95) и 1E/2A (5,20/4,16). Очевидно, что корреляционные пики в спектре ^1H , ^1H ROESY соответствуют

следующей последовательности остатков в повторяющемся звене гликополимера *I*:



Анализ спектра ^1H , ^{13}C HMBC (рис. 4, таблица), содержащего корреляционные пики: H-1(**A**)/C-2(**B**) (5,11/79,5); H-1(**B**)/C-3(**C**) (5,17/78,9); H-1(**C**)/C-2(**D**) (4,96/79,3); H-1(**D**)/C-3(**A**) (5,22/78,0) и H-1(**E**)/C-2(**A**) (5,20/78,1), подтверждал последовательность остатков, представленную выше.

Газожидкостная хроматография обработанного оптически активным октанолом гидролизата гликополимера *I* выявила D-абсолютную конфигурацию рамнозы и арабинозы. Такая же D-абсолютная конфигурация сахаров была подтверждена на основе правил, касающихся эффектов гликозилирования в спектрах ЯМР ^{13}C полисахаридов [14]. Изучение спектра

Химические сдвиги в спектрах ЯМР ^{13}C и ^1H гликополимеров клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759 (TSP δ_{C} –1,6 м.д. и δ_{H} 0,00 м.д.)

Остаток		C-1 <i>H-1</i>	C-2 <i>H-2</i>	C-3 <i>H-3</i>	C-4 <i>H-4</i>	C-5 <i>H-5</i>	C-6 <i>H-6, H-6'</i>
Гликополимер 1							
$\alpha\text{-D-Araf-(1}$ ↓ 2)	E	110,0 5,20	82,6 4,16	78,0 3,95	85,0 4,06	62,5 3,80, 3,70	
→3)- $\alpha\text{-D-Rhap-(1}$ →	A	102,4 5,11	78,1 4,16	78,0 3,95	73,5 3,62	70,7 3,76	17,8 1,28
→2)- $\alpha\text{-D-Rhap-(1}$ →	B	102,1 5,17	79,5 4,08	71,3 3,88	72,7 3,51	70,6 3,75	18,3 1,34
→3)- $\alpha\text{-D-Rhap-(1}$ →	C	103,0 4,96	71,3 4,14	78,9 3,85	73,0 3,58	70,7 3,76	17,9 1,27
→2)- $\alpha\text{-D-Rhap-(1}$ →	D	101,9 5,22	79,3 4,06	71,4 3,94	73,7 3,50	70,5 3,81	18,1 1,31
Депирувилированный гликополимер 2 (dePur-гликополимер 2)							
→4)- $\beta\text{-D-GlcpA-(1}$ →	A	104,6 4,73	74,5 3,45	75,5 3,69	81,5 3,82	75,7 3,96	173,1
→4)- $\beta\text{-D-Galp-(1}$ →	B	104,4 4,47	72,7 3,62	74,4 3,76	78,4 4,15	76,0 3,74	62,2 3,77, 3,77
→4)- $\beta\text{-D-Glcp-(1}$ →	C	101,4 4,61	74,2 3,41	76,3 3,59	80,1 3,67	75,7 3,66	61,6 3,96, 3,80
→3)- $\beta\text{-D-Manp-(1}$ →	D	101,3 4,66	69,6 4,17	81,5 3,85	66,5 3,70	77,6 3,41	62,5 3,93, 3,75
Гликополимер 2							
→4)- $\beta\text{-D-GlcpA-(1}$ →	A	104,5 4,75	74,2 3,43	75,3 3,67	81,1 3,83	74,4 4,09	173,1
→4)- $\beta\text{-D-Galp-(1}$ →	B	104,2 4,47	72,8 3,62	74,3 3,77	78,5 4,16	75,9 3,75	62,2 3,77, 3,77
→4)- $\beta\text{-D-Glcp-(1}$ →	C	100,5 4,63	73,8 3,45	76,2 3,59	80,0 3,67	75,6 3,67	61,6 3,97, 3,81
→3)- $\beta\text{-D-Manp-(1}$ → 4) 6) ∖/ C / НООС CH ₃	D'	101,8 4,73	69,5 4,23	77,0 4,10	73,7 3,83	67,3 3,48	65,8 4,14, 3,76
			101,4				
		173,9		25,9 1,56			

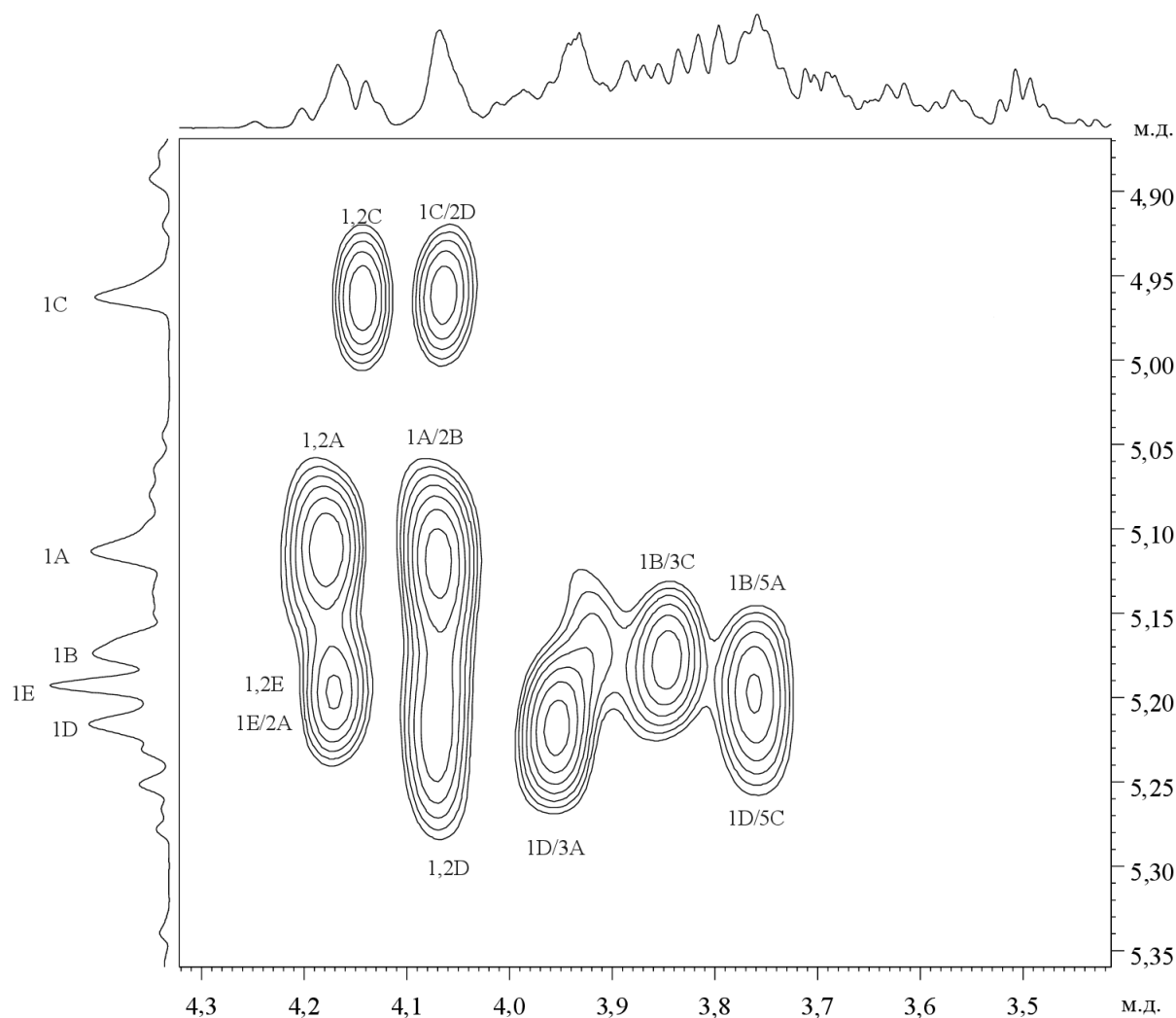


Рис. 3. Часть двумерного $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY-спектра гликополимера *I* нейтральной фракции из клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759. Соответствующие части ^1H ЯМР-спектра показаны вдоль осей. Арабские цифры относятся к номерам атомов протона в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с таблицей. Косая черта обозначает пики корреляции между остатками

ЯМР ^{13}C гликополимера *I* показало большой положительный эффект гликозилирования (+8,1 м.д.) для С-1 α -Araf в дисахаридном фрагменте α -Araf-(1 \rightarrow 2)- α -Rhap-(1 \rightarrow), что характерно для одинаковой (то есть D-) абсолютной конфигурации обоих сахаров. Намного меньший (+3,5 м.д.) эффект в том же фрагменте можно было ожидать, если бы в качестве гликозилирующего сахара присутствовала α -L-Araf.

Таким образом, структуру повторяющегося звена гликополимера *I* можно представить следующим образом: \rightarrow 3)- α -[α -D-Araf-(1 \rightarrow 2)]-D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow).

Кислая фракция (гликополимер 2). Спектр ЯМР ^{13}C гликополимера *2* (рис. 1, в) в области

резонанса аномерных атомов углерода содержал четыре интенсивных сигнала при δ_{C} 101,3; 101,4; 104,4 и 104,6 м.д. В высокопольной области спектра наблюдались только минорные сигналы метильных групп от 6-дезоксисахаридов, а также слабый сигнал при 25,9 м.д. по сравнению с таковым в спектре исходного суммарного препарата (рис. 1, а). В низкопольной области спектра был виден слабый сигнал при 173,9 м.д., характерный для карбоксильной группы пирувата, и более интенсивный — при 173,1 м.д., характерный для карбоксильной группы уроновой кислоты. В спектре ЯМР ^1H (рис. 5, вверху) в аномерной области наблюдались интенсивные сигналы четырех протонов (δ_{H} 4,47, дублет $J_{1,2}$ 8 Hz; δ_{H} 4,61, дублет $J_{1,2}$

8 Hz; δ_H 4,66, уширенный синглет $J_{1,2} < 2$ Hz и δ_H 4,73, дублет $J_{1,2}$ 8 Hz). Только минорные сигналы метильных групп от четырёх остатков рамнопиранозы из *гликополимера 1* и слабый синглет при 1,53 м.д. наблюдались в высокопольной области спектра. Почти полное исчезновение сигналов пируватных групп в *гликополимере 2* при сравнении его спектров со спектрами для исходного суммарного препарата (рис. 1, а) выявило нестабильность пирувата в кислом растворе (вследствие автогидролиза). Локализация пирувата в исходном кислом препарате была установлена после изучения структуры депирувилированного *гликополимера 2* (*dePyr-гликополимер 2*).

Анализ нейтральных моносахаридов в *dePyr-гликополимере 2* показал присутствие в качестве основных компонентов полисахарида галактозы, глюкозы и маннозы в соотношении 1/1/0,6.

Анализ спектров $^1H, ^1H$ COSY, TOCSY и ROESY *dePyr-гликополимера 2* из кислой фракции показал наличие остатков β -глюкуроновой кислоты (β -GlcA, остаток А, таблица), β -галактопиранозы (β -Galp, остаток В), β -глюкопира-

нозы (β -GlcP, остаток С) и β -маннопиранозы (β -Manp, остаток D).

Отнесение сигналов атомов углерода в спектрах $^1H, ^{13}C$ HSQC (рис. 5) и $^1H, ^{13}C$ HSQC-TOCSY *dePyr-гликополимера 2*, а также сравнение спектров ЯМР ^{13}C остатков со спектрами для соответствующих незамещённых пираноз выявило замещение остатков А (δ_{C-4} 81,5), В (δ_{C-4} 78,4) и С (δ_{C-4} 80,1) в положение 4 и замещение остатка D (δ_{C-3} 81,5) в положение 3.

Последовательность остатков в *dePyr-гликополимере 2* следовала из анализов спектров $^1H, ^1H$ ROESY и $^1H, ^{13}C$ HMBC. Гомоядерный 2D-спектр $^1H, ^1H$ ROESY (рис. 6, таблица) содержал следующие корреляционные пики между протонами: 1A/4B (4,73/4,15); 1B/4C (4,47/3,67); 1C/2,3D (4,61/4,17; 3,85) и 1D/4A (4,66/3,82), демонстрируя линейное повторяющееся звено *dePyr-гликополимера 2*: $\rightarrow 4A1 \rightarrow 4B1 \rightarrow 4C1 \rightarrow 3D1 \rightarrow$.

Анализ спектра $^1H, ^{13}C$ HMBC (рис. 7, таблица), содержащего корреляционные пики: H-1(A)/C-4(B) (4,73/78,4); H-1(B)/C-4(C) (4,47/80,1); H-1(C)/C-3(D) (4,61/81,5); H-1(D)/C-4(A)

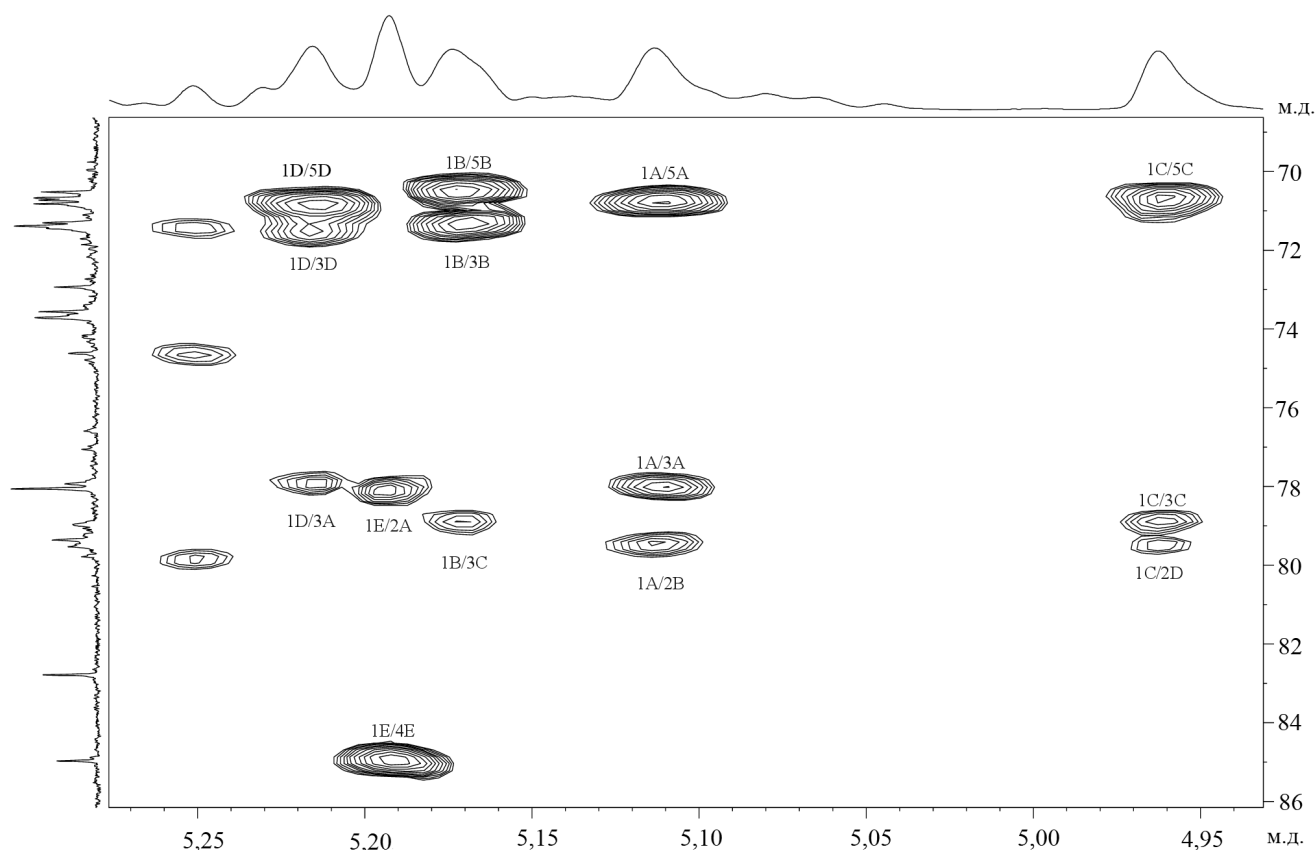


Рис. 4. Часть двумерного $^1H, ^{13}C$ HMBC-спектра *гликополимера 1* нейтральной фракции из клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759. Соответствующие части 1H и ^{13}C ЯМР-спектров приведены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры до косой черты относятся к атомам протона, а после – к атомам углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с таблицей

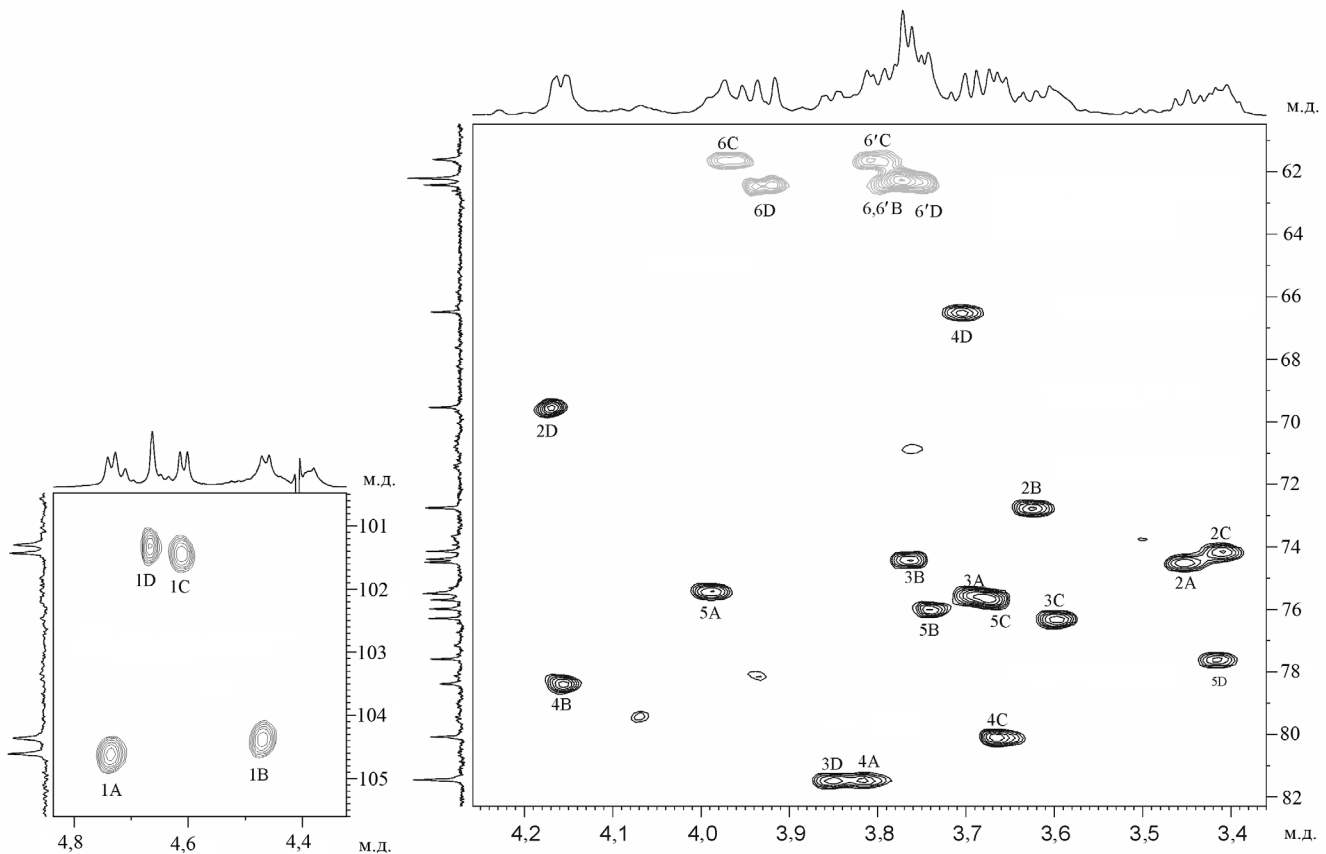


Рис. 5. Части двумерного ^1H , ^{13}C HSQC-спектра *dePyr*-гликополимера 2 кислой фракции из клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759. Соответствующие части ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров приведены вверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с таблицей

(4,66/81,5), так же как H-4(B)/C-1(A) (4,15/104,6); H-4(C)/C-1(B) (3,67/104,4); H-3(D)/C-1(C) (3,85/101,4) и H-4(A)/C-1(D) (3,82/101,3), показал согласование с последовательностью, представленной выше.

Газожидкостная хроматография обработанного оптически активным октанолом гидролизата *гликополимера 2* выявила D-абсолютную конфигурацию глюкозы, галактозы и маннозы. Как положительный эффект β -гликозилирования по C-3 (+1,4 м.д.) остатка A (Glc pA) в дисахаридном фрагменте $\rightarrow 3$ - β -Man p-(1 \rightarrow 4)- β -Glc pA-(1 \rightarrow , так и отсутствие γ -эффекта по C-6 остатка B (Galp) в фрагменте $\rightarrow 4$ - β -Glc pA-(1 \rightarrow 4)- β -Galp-(1 \rightarrow указывают на одну и ту же D-конфигурацию остатков D, A и A, B в соответствующих фрагментах [14].

Таким образом, *dePyr*-гликополимер 2 имеет следующую структуру повторяющегося звена: $\rightarrow 4$ - β -D-Glc pA-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc p-(1 \rightarrow 3)- β -D-Man p-(1 \rightarrow .

Принимая во внимание структуру *dePyr*-гликополимера 2, становится очевидной локализа-

ция пирувата с шестичленным циклом в интактном *гликополимере 2* у C-4,6-маннопиранозы (остаток D'), поскольку остатки B и C оказались гликозилированными в положение 4. Это утверждение можно было экспериментально подтвердить с помощью анализа двумерных спектров ЯМР исходного суммарного препарата, представляющего собой смесь *гликополимера 1* и интактного *гликополимера 2*, содержащего 4,6-пируват. Анализ спектров облегчался тем, что сигналы нейтрального гликополимера и сигналы остатков A, B и C кислого гликополимера в спектрах исходного препарата совпадали с таковыми в спектрах разделённых полимеров (рис. 2 и 5, таблица). Только в подспектре кислого гликополимера в спектре суммарного препарата существенно изменился сигнал остатка D' (с $\delta_{\text{C-4}}$ 73,7 – для остатка D' на $\delta_{\text{C-4}}$ 66,5 – для остатка D).

Низкопольный химический сдвиг сигналов C-4 и C-6 (эффекты α -замещения) и высокопольный химический сдвиг сигнала C-5 (два эффекта β -замещения) были типичными для

пирувата, расположенного в положениях 4 и 6 (таблица). Локализация пировиноградной кислоты на остатке D-маннопиранозы по положению О-4 и О-6, а также наличие интенсивного сигнала при δ_C 25,9 м.д., характерного для пируватной группы с шестичленным циклом и с экваториальной ориентацией метильной группы в этом цикле, свидетельствовали об S-конфигурации пирувата [15].

Таким образом, гликополимер 2 является тейхуроновой кислотой и имеет следующую структуру повторяющегося звена: $\rightarrow 4$)- β -D-GlcP-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcP-(1 \rightarrow 3)- β -[4,6-S-Pyr]-D-Manp-(1 \rightarrow).

В настоящей работе представлены результаты изучения состава и структур гликополимеров

клеточной стенки штамма ВКМ Ас-2759, являющегося претендентом на новый вид рода *Rathayibacter* [10]. Структуры полимеров описаны впервые у прокариотов. У штамма ВКМ Ас-2759 обнаружены D-рамнан и ацеталированная пировиноградной кислотой тейхуроновая кислота, отличные от гликополимеров представителей других видов рода [8, 9]. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными, свидетельствующими о видоспецифичности гликополимеров клеточных стенок для актинобактерий рода *Rathayibacter* [8].

Основная цепь выявленного рамнана построена из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, в которых остатки α -D-рамнопиранозы связаны чередующимися (1 \rightarrow 2) и (1 \rightarrow 3) гликозидными связями. Каждый остаток на нере-

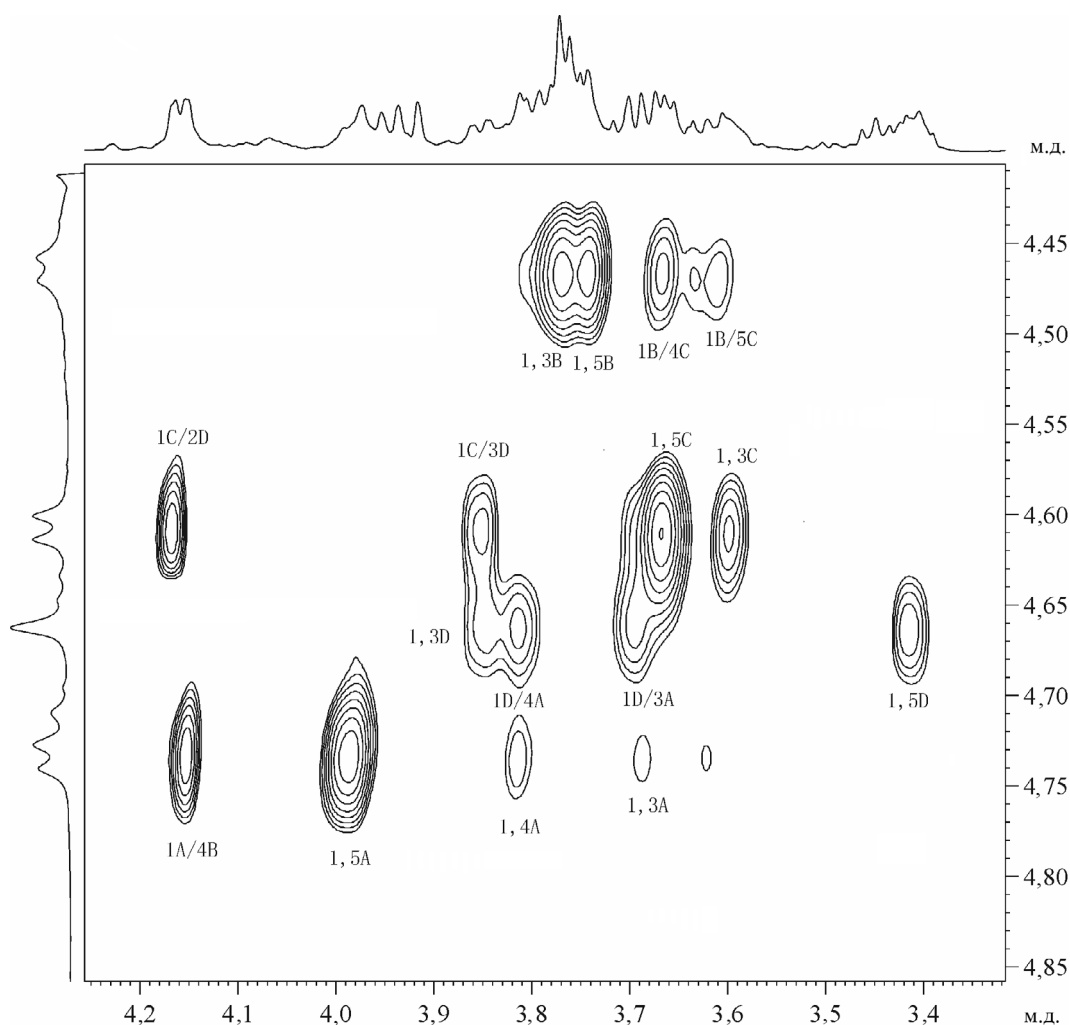


Рис. 6. Часть двумерного $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY-спектра *dePyr*-гликополимера 2 кислой фракции из клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759. Соответствующие части ^1H ЯМР-спектра показаны вдоль осей. Арабские цифры относятся к номерам атомов протона в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с таблицей. Косая черта обозначает пики корреляции между остатками

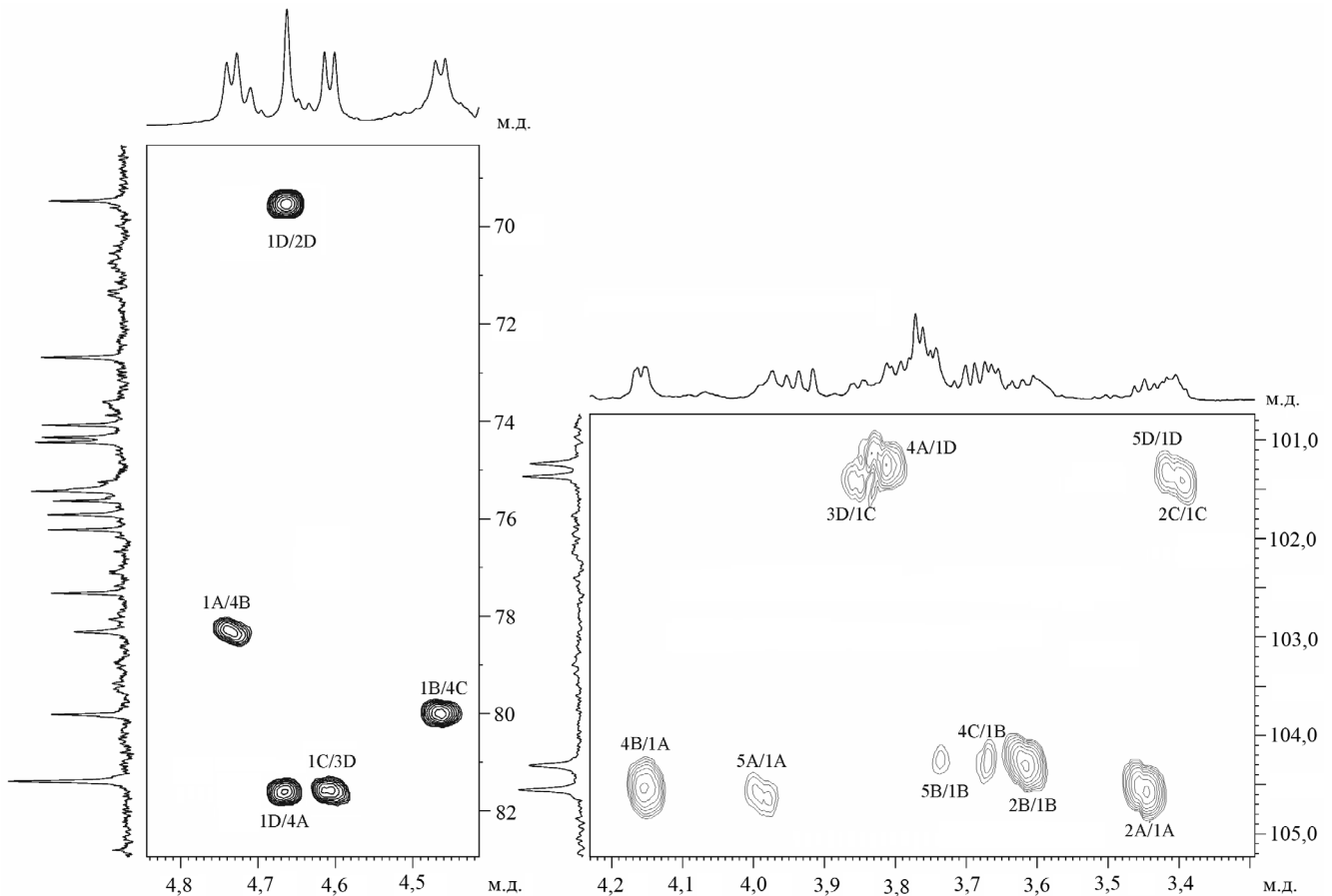


Рис. 7. Часть двумерного ^1H , ^{13}C НМВС-спектра *dePyr*-гликополимера 2 кислой фракции из клеточной стенки *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759. Соответствующие части ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров приведены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры до косой черты относятся к атомам протона, а после – к атомам углерода в остатках, обозначенных заглавными латинскими буквами в соответствии с таблицей

дуцирующем конце тетрасахарида гликозилирован по гидроксилу при С-2 боковыми остатками α -D-арабинофуранозы: $\rightarrow 3$)- α -[α -D-Araf-(1 \rightarrow 2)]-D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow). Ранее у грамположительных бактерий арабинофуранозу находили только в составе арабиногалактанов клеточной стенки представителей семейства *Mycobacteriaceae* (Bacterial Carbohydrate Structure Database: <http://csdb.glycoscience.ru>).

Среди актинобактерий рода *Rathayibacter* D-рамнан (отличающийся по структуре) был обнаружен нами у *R. caricis* ВКМ Ас-1799^T [9]. Изученные к настоящему времени штаммы четырех других видов *Rathayibacter* содержали в клеточной стенке рамноманнаны [8]. Следует отметить, что все идентифицированные у *Rathayibacter* рамноманнаны и рамнаны имеют общую особенность: наличие в их составе рамнозы в D-конфигурации [8, 9], которая значительно реже встречается в гликополимерах бактерий по сравнению с широко распространенной L-рамнозой [16, 17]

(Bacterial Carbohydrate Structure Database: <http://csdb.glycoscience.ru>). У представителей рода *Rathayibacter* L-изомер рамнозы присутствует в нейтральном полисахариде *R. toxicus* и тейхуроновых кислот *R. iranica* [7] и *R. caricis* [9].

Близкий по структуре к полисахариду штамма ВКМ Ас-2759 D-рамнан был описан в гликопротеине S-слоя *Aneurinibacillus thermoaerophilus* GS4-97, выделенном из сока сахарной свёклы [18]. Основная цепь полимера также состояла из тетрасахаридных повторяющихся звеньев с чередованием гликозидных связей (1 \rightarrow 2) и (1 \rightarrow 3), но в качестве боковых заместителей присутствовали остатки аминокислотного производного фукопиранозы: $\rightarrow 3$)- α -[α -D-Fucp3NAc-(1 \rightarrow 2)]-D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -[α -D-Fucp3NAc-(1 \rightarrow 2)]-D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow).

D-Рамнаны довольно часто встречаются в биополимерах грамотрицательных бактерий (Bacterial Carbohydrate Structure Database: <http://csdb.glycoscience.ru>). Среди них описаны поли-

сахариды, в том числе с тетрасахаридными повторяющимися звеньями, но с другим положением и чередованием гликозидных связей в структуре основной цепи. Например, у фитопатогенов *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* такой Д-рамнан присутствует в качестве экзополисахарида: $\rightarrow 4$)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- β -D-Rhap-(1 \rightarrow ; у *Pantoea agglomerans* – О-специфического полисахарида: $\rightarrow 2$)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- β -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow [19, 20]. Интересно отметить, что у представителей различных патогенов *Pseudomonas syringae* в составе О-полисахаридов были найдены линейные энантиомерные рамнаны [17].

Тейхуроновая кислота *Rathayibacter* sp. ВКМ Ас-2759, гликополимер 2, содержит в повторяющемся звене четыре моносахаридных остатка, один из которых, маннопираноза, несет ацеталь пировиноградной кислоты в S-конфигурации: $\rightarrow 4$)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -[4,6-S-Рур]-D-Manp-(1 \rightarrow . Это второй случай обнаружения пирувата в структуре тейхуроновых кислот у представителей рода *Rathayibacter*. Ранее тейхуроновая кислота, содержащая ацеталь пировиноградной кислоты с гептасахаридным повторяющимся звеном, была обнаружена у *R. caricis* ВКМ Ас-1799^T [9].

Таким образом, результаты настоящей работы и опубликованные ранее данные о наборе и

структурах гликополимеров, представителей рода *Rathayibacter*, а также сведения о моносахаридном составе их клеточных стенок (рамноза, манноза, глюкоза, галактоза, арабиноза) 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. Кроме того, полученные результаты расширяют представления о разнообразии гликополимеров микробного происхождения и могут быть востребованы в работах по выяснению механизмов колонизации и инфекции растений бактериями рода *Rathayibacter*.

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

Благодарности. Авторы благодарны Галине Матвеевне Стрешинской за помощь в исследованиях и обсуждении статьи.

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

- Zgurskaya, H. I., Evtushenko, L. I., Akimov, V. N., and Kalakoutskii, L. V. (1993) *Rathayibacter* gen. nov., including the species *Rathayibacter rathayi* comb. nov., *Rathayibacter tritici* comb. nov., *Rathayibacter iranicus* comb. nov., and six strains from annual grasses, *Int. J. Sys. Bacteriol.*, **43**, 143-149, doi: 10.1099/00207713-43-1-143.
- Evtushenko, L. I., and Dorofeeva, L. V. (2012) Genus XXII. *Rathayibacter* Zgurskaya, Evtushenko, Akimov and Kalakoutskii 1993, 147^{VP} in Bergey's manual of systematic bacteriology (Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Suzuki, K.-I., Ludwig, W., Whitman, W. B., eds.) 2nd Edn., Vol. 5, Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp. 953-964.
- Murray, T. D., Schroeder, B. K., Schneider, W. L., Luster, D. G., Sechler, A., et al. (2017) *Rathayibacter toxicus*, other *Rathayibacter* species inducing bacterial head blight of grasses, and the potential for livestock poisonings, *Phytopathology*, **107**, 804-815, doi: 10.1094/PHYTO-02-17-0047-RVW.
- Murray, T. D., Barrantes-Infante, B., and Schroeder, B. K. (2020) First report of bacterial head blight of *Pseudoroegneria spicata* subsp. *spicata* caused by *Rathayibacter agropyri* in Idaho, *Plant Disease*, **104**, 1534, doi: 10.1094/PDIS-06-19-1233-PDN.
- Starodumova, I. P. (2018) Development of the classification system for actinobacteria of the genus *Rathayibacter*, candidate dissertation (in Russian), Moscow.
- Shashkov, A. S., Tul'skaya, E. M., Dmitrenok, A. S., Streshinskaya, G. M., Potekhina, N. V., et al. (2018) Rhamnose-containing cell wall glycopolymers from *Rathayibacter toxicus* VKM Ac-1600 and "*Rathayibacter tanacetii*" VKM Ac-2596, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 717-726, doi: 10.1134/S0006297918060093.
- Dmitrenok, A. S., Shashkov, A. S., Streshinskaya, G. M., Tul'skaya, E. M., Potekhina, N. V., et al. (2019) New rhamnose-containing glycopolymers from *Rathayibacter iranicus* VKM Ac-1602^T cell wall, *Carbohydr. Res.*, **482**, 107728, doi: 10.1016/j.carres.2019.06.007.
- Shashkov, A. S., Tul'skaya, E. M., Streshinskaya, G. M., Dmitrenok, A. S., Potekhina, N. V., et al. (2020) Rhamnomannans and teichuronic acid from the cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603^T, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 369-377, doi: 10.1134/S0006297920030128.
- Shashkov, A. S., Potekhina, N. V., Dmitrenok, A. S., Tul'skaya, E. M., Senchenkova, S. N., et al. (2021) D-Rhamnan and teichuronic acid from the cell wall of *Rathayibacter caricis* VKM Ac-1799^T, *Carbohydr. Res.*, **499**, 108233.
- Tarlachkov, S. V., Starodumova, I. P., Dorofeeva, L. V., Prisyazhnaya, N. V., Leyn, S. A., et al. (2020) Complete and draft genome sequences of 12 plant-associated *Rathayibacter* strains of known and putative new species, *Microbiol. Resour. Announc.*, **9**, e00316-20, doi: 10.1128/MRA.00316-20.
- 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* (Rainey, F. A., and

- Oren, A., eds.) Vol. 38, Chap. 6, Academic Press, Elsevier, pp. 132-164, doi: 10.1016/B978-0-12-387730-7.00020-6.
12. Leontein, K., Lindberg, B., and Lönngren, J. (1978) Assignment of absolute configuration of sugars by glc of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols, *Carbohydr. Res.*, **62**, 359-362, doi: 10.1016/S0008-6215(00)80882-4.
 13. Gerwig, G. J., Kamerling, I. P., and Vliegthart, J. F. G. (1979) Determination of the absolute configuration of monosaccharides in complex carbohydrates by capillary GLC, *Carbohydr. Res.*, **77**, 1-7, doi: 10.1016/s0008-6215(00)83788-x.
 14. 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, doi: 10.1002/mrc.1260260904.
 15. Garegg, P. J., Jansson, P.-E., Lindberg, B., Lindh, F., Lönngren, J. (1980) Configuration of the acetal carbon atom of pyruvic acid acetals in some bacterial polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, **79**, 127-132, doi: 10.1016/S0008-6215(00)83666-6.
 16. Mistou, M.-Y., Sutcliffe, I. C., and van Sorge, N. M. (2016) Bacterial glycobiology: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, **40**, 464-479, doi: 10.1093/femsre/fuw006.
 17. Knirel, Y. A. (2010) O-Specific polysaccharides of Gram-negative bacteria, in *Microbial Glycobiology* (Holst, O., Brennan, P. J., von Itzstein, M., eds.) Vol. 4, Academic Press, pp. 57-73, doi: 10.1016/B978-0-12-374546-0.X0001-6.
 18. Schaffer, C., Muller, N., Christian, R., Graninger, M., Wugeditsch, T., et al. (1999) Complete glycan structure of the S-layer glycoprotein of *Aneurinibacillus thermoaerophilus* GS4-97, *Glycobiology*, **9**, 407-414, doi: 10.1093/glycob/9.4.407.
 19. Kaczynski, Z., Karapetyan, G., Evidente, A., Iacobellis, N. S., and Holst, O. (2006) The structure of a putative exopolysaccharide of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricola*, *Carbohydr. Res.*, **341**, 285-288, doi: 10.1016/j.carres.2005.10.020.
 20. Cimmino, A., Marchi, G., Hanuszkiewicz, A., Surico, G., Evidente, A., and Holst, O. (2008) The structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Pantoea agglomerans* strain FL1, *Carbohydr. Res.*, **343**, 392-396, doi: 10.1016/j.carres.2007.10.023.

D-RHAMNAN AND PYRUVAT-CONTAINING TEICHURONIC ACID FROM THE CELL WALL OF *Rathayibacter* sp. VKM Ac-2759

A. S. Shashkov¹, E. M. Tul'skaya^{2*}, N. V. Potekhina², A. S. Dmitrenok¹,
S. N. Senchenkova¹, V. A. Zaychikov², L. V. Dorofeeva³, and L. I. Evtushenko³

¹ Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 199334 Moscow, Russia

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; E-mail: em_tulskaya@mail.ru

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

Rathayibacter sp. VKM Ac-2759 (family of Microbacteriaceae, class Actinobacteria) contains two glycopolymers in the cell wall. The main chain of rhamnan, *glycopolymer 1*, is built from the repeating tetrasaccharide units carrying terminal arabinofuranose residues at the non-reducing end, $\rightarrow 3$ - α -[α -D-Araf-(1 \rightarrow 2)]-D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Rhap-(1 \rightarrow). Similar to other described *Rathayibacter* species, rhamnose in the neutral glycopolymer of the VKM Ac-2759 strain is present in D-configuration. Teichuronic acid with pyruvylated units, *glycopolymer 2*, is composed of tetrasaccharide repeating units, $\rightarrow 4$ - β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)- β -[4,6-*S*-Pyr]-D-Manp-(1 \rightarrow). The polymer structures were established using chemical analysis and NMR spectroscopy, and described for the first time in prokaryotic microorganisms. The data obtained can be used in taxonomic studies and in studies elucidating mechanisms of colonization and infection of plants by bacteria of the *Rathayibacter* genus.

Keywords: *Rathayibacter*, cell wall, glycopolymers, D-rhamnan, teichuronic acid, pyruvate