

## НОВЫЕ РАМНОЗОСОДЕРЖАЩИЕ ГЛИКОПОЛИМЕРЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *Rathayibacter festucae* ВКМ Ac-1390<sup>T</sup>

© 2024 **А.С. Шапков<sup>1</sup>, Н.В. Потехина<sup>2\*</sup>, Е.М. Тульская<sup>2</sup>, А.С. Дмитренок<sup>1</sup>,**  
**С.Н. Сенченкова<sup>1</sup>, Л.В. Дорофеева<sup>3</sup>, Л.И. Евтушенко<sup>3</sup>**

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

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
119234 Москва, Россия; электронная почта: potekhina56@mail.ru

<sup>3</sup> ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН,  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН,  
Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), 142290 Пущино, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 05.10.2024

После доработки 28.10.2024

Принята к публикации 30.10.2024

*Rathayibacter festucae* ВКМ Ac-1390<sup>T</sup> (семейство Microbacteriaceae, класс Actinomycetes) содержит в клеточной стенке три гликополимера. Структуры гликополимеров устанавливали химическими и ЯМР-спектроскопическими методами. Один из них, рамноманнан, построен из повторяющихся тетрасахаридных звеньев, несущих боковые остатки ксилопиранозы: →2)-α-[β-D-Xylp-(1→3)]-D-Rhap-(1→3)-α-D-Manp-(1→2)-α-D-Rhap-(1→3)-α-D-Manp-(1→). Второй полимер, обнаруженный у исследованного штамма в минорном количестве, представляет собой рамнан: →2)-α-D-Rhap-(1→3)-α-D-Rhap-(1→3)-α-D-Rhap-(1→). Третий полимер является тейхуроновой кислотой, ацетилированной остатками пировиноградной кислоты: →2)-α-[4,6-S-Pyr]-D-Manp-(1→4)-α-L-Rhap-(1→4)-β-D-GlcP-(1→4)-α-D-GlcP-(1→4)-β-D-GlcPA-(1→). Структуры рамноманнана и тейхуроновой кислоты являются новыми для представителей рода *Rathayibacter* и прокариот в целом. Результаты настоящего исследования расширяют представления о структурном разнообразии микробных гликополимеров и согласуются с ранее описанными данными о специфичности структур и состава гликополимеров для видов рода *Rathayibacter*.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** *Rathayibacter*, гликополимер клеточной стенки, полисахарид, рамноманнан, D-рамнан, тейхуроновая кислота, пируват.

DOI: 10.31857/S0320972524120051 EDN: IFNBHD

### ВВЕДЕНИЕ

Актинобактерии рода *Rathayibacter* известны с конца позапрошлого столетия – с момента обнаружения бактериального заболевания ежи сборной (*Dactylis glomerata* L.), вызванного бактерией «*Aplanobacter rathayi*» (ныне *Rathayibacter rathayi*) [1]. К началу нашей работы род *Rathayibacter* включал 11 зарегистрированных видов, из них 9 – с валидно опубликованными наименованиями (<https://lpsn.dsmz.de/genus/rathayibacter>).

Виды этого рода характеризуются наличием в клеточной стенке пептидогликана с 2,4-диамино-масляной кислотой (L-изомер), а также рамнозы и маннозы в качестве основных диагностических сахаров [2, 3]. Вышеуказанные сахара полностью или частично входят в состав гликополимеров клеточных стенок, ковалентно связанных с пептидогликаном [4].

Эти гликополимеры представляют собой нейтральные рамнозосодержащие полисахарида (рамнозилированный глюкоманнан и разные

Принятые сокращения: COSY – корелляционная спектроскопия; НМВС – гетероядерная корреляция <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C через несколько связей; HSQC – протон-детектированная НОНО-квантовая корреляция; J – константа спин-спинового взаимодействия; ROESY – двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во врачающейся системе координат; TOCSY – тотальная корреляционная спектроскопия; TSP – натриевая соль 3-(три-метилсилил)-3,3,2,2-тетрадейтеропропионовой кислоты; δ<sub>c</sub>, δ<sub>h</sub> – значения химических сдвигов атомов <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H соответственно.

\* Адресат для корреспонденции.

по структуре рамноманнаны и рамнанны), обычно присутствующие в сочетании с тейхуроновыми кислотами [4]. При этом каждый вид *Rathayibacter* характеризуется индивидуальным набором от одного до трех полимеров, в большинстве случаев включающим полимеры как нейтральной, так и кислой природы [4]. Химические структуры гликополимеров, выявленных у *Rathayibacter*, не были описаны ранее у других прокариот.

В данной работе мы сообщаем о новых структурах гликополимеров, идентифицированных в клеточной стенке штамма *Rathayibacter festucae* ВКМ Ac-1390<sup>T</sup>, выделенного из овсяницы красной (*Festuca rubra* L.) [3, 5].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Бактериальный штамм *Rathayibacter festucae*** ВКМ Ac-1390<sup>T</sup> был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) ([www.vkm.ru](http://www.vkm.ru)).

**Условия культивирования и получение биомассы** для исследований, а также выделение и очистка клеточных стенок описаны в работе Dmitrenok et al. [6].

**Выделение гликополимеров** проводили методом ТХУ-экстракций: 10% ТХУ, 4 °C, 24 ч и затем – 5% ТХУ, 90 °C, 20 мин, как описано ранее [6]; выход препаратов гликополимеров соответственно составил 12,3% и 19,7% от веса сухой клеточной стенки. Полученные препараты гликополимеров, проявившие полную идентичность при их предварительном исследовании химическими и ЯМР-спектроскопическими методами, были объединены и обозначены как суммарный препарат.

**Методы кислотного гидролиза** клеточной стенки и препаратов гликополимеров (2 M HCl, 3 ч, 100 °C), нисходящая хроматография, а также реагенты для проявления продуктов их кислотной деградации описаны ранее [6].

**Метод анионообменной гель-хроматографии** на колонке (80 × 1,5 см) с DEAE-целлюлозой («Toyopearl», Япония) использовали для разделения гликополимеров суммарного препарата, как описано ранее [7].

**Деградацию по Смиту** нейтральной фракции (нейтральных полисахаридов), приводящую к расщеплению основной цепи, проводили, как описано ранее [6].

**Абсолютную конфигурацию** моносахаридов и глюкуроновой кислоты определяли по эффектам гликозилирования в остатках моносахаридов в спектрах ЯМР <sup>13</sup>C, согласно закономерностям, изложенным в работе Shashkov et al. [8], и на основании принадлежности глюкозы к D-ряду.

**Спектры ЯМР** снимали на приборе Bruker AV600 («Bruker», Германия) для растворов

в 99,96% D<sub>2</sub>O при температурах, обеспечивающих минимальное перекрывание остаточного сигнала дейтерированной воды с сигналами полимеров. В качестве внутреннего эталона использовали натриевую соль 3-(триметилсилил)-3,3,2,2-тетрадейтериопропионовой кислоты (TSP; δ<sub>H</sub> 0,0 м.д.; δ<sub>C</sub> -1,6 м.д.). Двумерные ЯМР-эксперименты выполняли с использованием стандартного математического обеспечения («Bruker Optik GmbH», Германия). Время спин-лока в экспериментах <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H TOCSY (тотальная корреляционная спектроскопия) составляло 100 мс. Время смешивания в эксперименте <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H ROESY (двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат) составляло 150 мс. Эксперименты по гетероядерной корреляции <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C HMBC были оптимизированы для констант спин-спинового взаимодействия J<sub>H,C</sub>, 8 Гц.

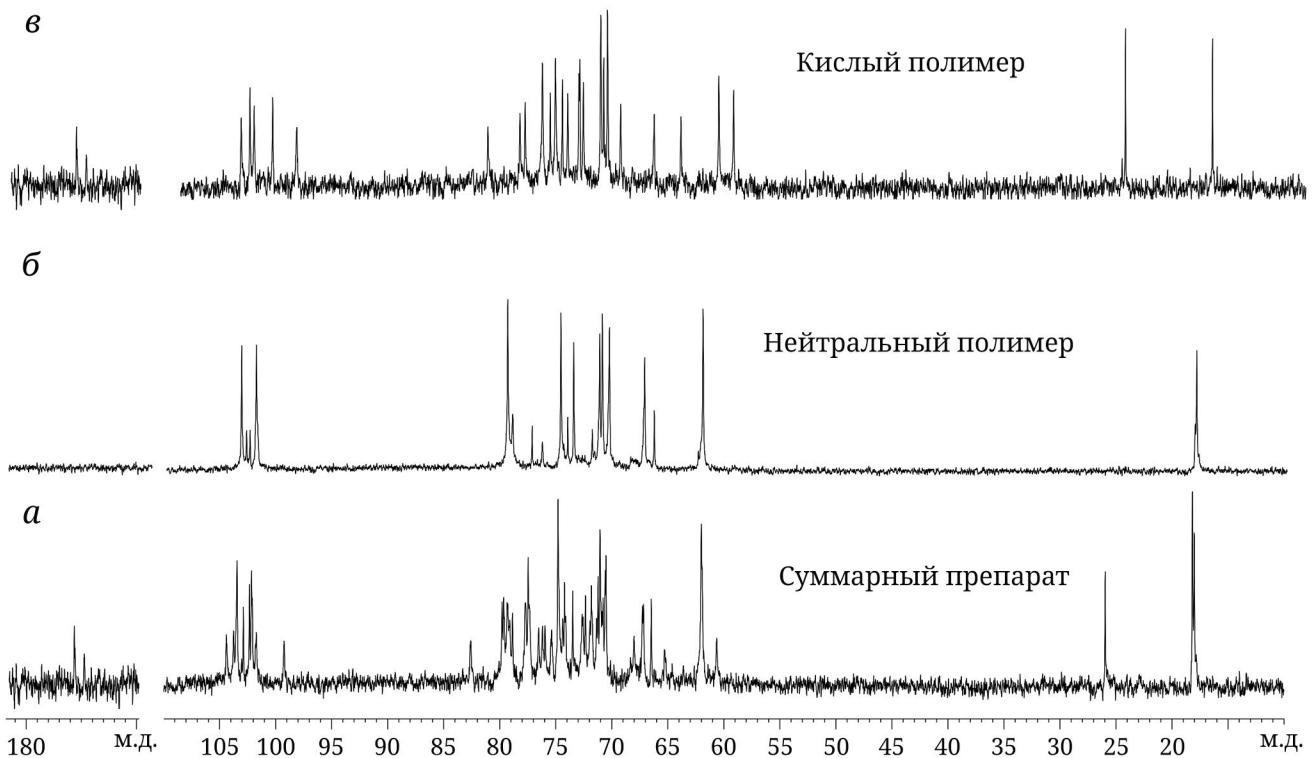
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С помощью нисходящей хроматографии на бумаге в кислотном гидролизате клеточной стенки были выявлены глюкоза, манноза, ксилоза и рамноза. Эти же моносахариды обнаружены в гидролизатах суммарного препарата гликополимеров.

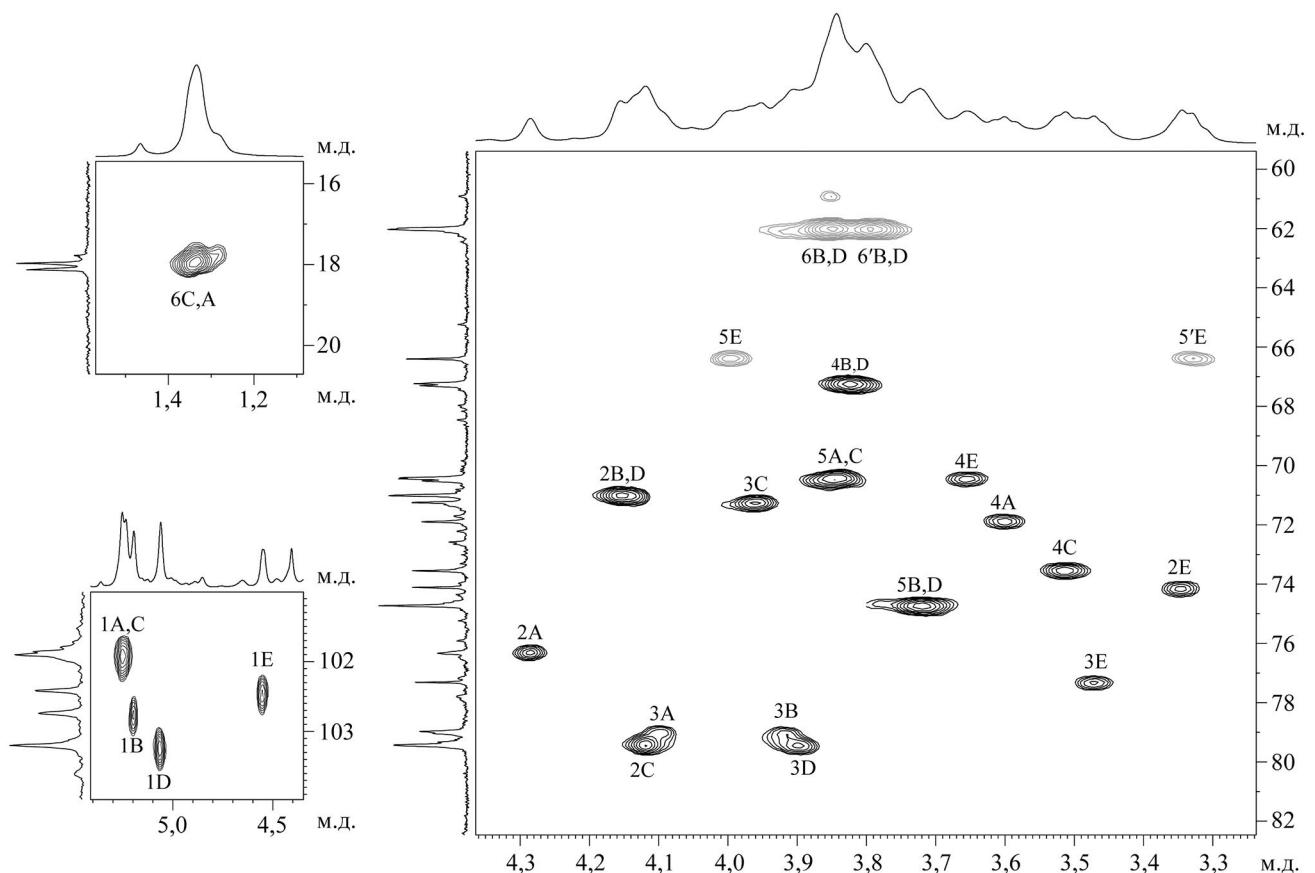
Спектр <sup>13</sup>C ЯМР суммарного препарата (рис. 1, а) был типичен для нерегулярного полимера и/или смеси полимеров. Спектр содержал, в частности, 8 сигналов различной интенсивности в области аномерного углеродного резонанса δ<sub>C</sub> 99,6–104,6 м.д., 4 сигнала 6-дезоксисахаров при δ<sub>C</sub> 17,9–18,3 м.д. и сигнал при δ<sub>C</sub> 26,0 м.д., характерный для пирувата в шестичленном цикле.

В спектре также наблюдались 2 сигнала в области резонанса карбонильных групп при δ<sub>C</sub> 175,5 и 174,9 м.д. Мы предположили, что последние сигналы принадлежат COOH-группе, и предприняли попытку разделить препарат с помощью анионной гель-хроматографии на DEAE-целлюлозе. В результате разделения были получены две фракции: нейтральная и кислая.

**Нейтральная фракция (нейтральные полисахариды).** Спектр ЯМР <sup>13</sup>C нейтральной фракции (рис. 1, б) снова показал признаки нерегулярности. Аномерная область углеродного спектра содержала 4 сигнала различной интенсивности, которые представляют собой 2 интенсивных пика при δ<sub>C</sub> 103,3 и 101,9 м.д. и второстепенные пики при δ<sub>C</sub> 102,8 и 102,5 м.д. Высокопольная область спектра содержала 2 сигнала при δ<sub>C</sub> 18,0 и 18,2 м.д. Спектр <sup>1</sup>H ЯМР нейтральной фракции (рис. 2, верхние проекции) также содержал сигналы различной интенсивности, что указывало на нерегулярность полисахарида.



**Рис. 1.** Спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  полисахаридов из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ac-1390<sup>T</sup>: суммарный препарат (а); нейтральная фракция (б); кислая фракция (в)



**Таблица 1.** Химические сдвиги в спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$  ( $\delta_{\text{C}}$  TSP -1,6) и  $^1\text{H}$  ( $\delta_{\text{H}}$  TSP 0,0) полисахаридов из клеточной стенки *R. festucae* BKM Ac-1390<sup>T</sup>

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-6a, 6b)</i>
Нейтральный полисахарид (полимер 1)							
$\rightarrow 2)\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow 3)$ ↑	(A)	101,9 5,24	76,3 4,28	79,0 4,10	71,9 3,60	70,4 3,84	18,2 1,34
$\beta\text{-D-Xylp-(1}$	(E)	102,5 4,55	74,1 3,35	77,3 3,48	70,5 3,65	66,4 4,00; 3,33	
$\rightarrow 3)\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow$	(B)	102,8 5,19	71,0 4,15	79,0 3,92	67,3 3,82	74,7 3,72	62,0 3,85; 3,79
$\rightarrow 2)\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow$	(C)	101,9 5,25	79,4 4,12	71,2 3,96	73,6 3,51	70,5 3,85	18,0 1,33
$\rightarrow 3)\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow$	(D)	103,2 5,06	71,0 4,15	79,4 3,90	67,2 3,83	74,7 3,72	62,0 3,85; 3,79
Продукт деградации по Смиту нейтральной фракции (минорный полимер 2)							
$\rightarrow 2)\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow$	(A')	102,2 5,19	79,3 4,07	71,2 3,95	73,5 3,51	70,6 3,83	18,0 1,32
$\rightarrow 3)\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow$	(B')	103,3 4,96	71,2 4,15	78,9 3,85	73,0 3,56	70,7 3,76	17,9 1,27
Кислый полисахарид (полимер 3)							
$\rightarrow 2)\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 4)$ / / S-Pyr	(A)	103,4 5,02	79,8 4,33	70,9 3,82	75,6 3,64	67,9 3,41	65,5 4,08; 3,72
$\rightarrow 4)\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow$	(B)	101,8 4,85	72,4 4,04	74,2 3,72	82,6 3,51	72,0 3,45	18,3 1,28
$\rightarrow 4)\beta\text{-D-GlcP-(1}\rightarrow$	(C)	103,8 4,48	74,5 3,33	76,7 3,64	77,8 3,64	76,1 3,53	62,2 3,92; 3,81
$\rightarrow 4)\alpha\text{-D-GlcP-(1}\rightarrow$	(D)	99,6 5,47	72,6 3,57	72,0 3,76	79,4 3,64	72,6 3,77	60,8 3,86; 3,82
$\rightarrow 4)\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow$	(E)	104,6 4,67	74,6 3,48	77,1 3,77	77,8 3,84	76,7 3,90	174,9

Сигналы как в  $^1\text{H}$ - , так и  $^{13}\text{C}$ -спектрах полимера были отнесены путем комбинированного использования методов 2D ЯМР, а именно гомоядерных  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  COSY (корреляционная спектроскопия), TOCSY, ROESY и гетероядерных  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HSQC и  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HMBC экспериментов (табл. 1).

Спектры 2D  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  COSY, TOCSY, ROESY выявили остатки  $\alpha$ -рамнопиранозы ( $\alpha\text{-Rhap}$ ),  $\alpha$ -маннопиранозы ( $\alpha\text{-Manp}$ ) и  $\beta$ -ксилопиранозы ( $\beta\text{-Xylp}$ ).

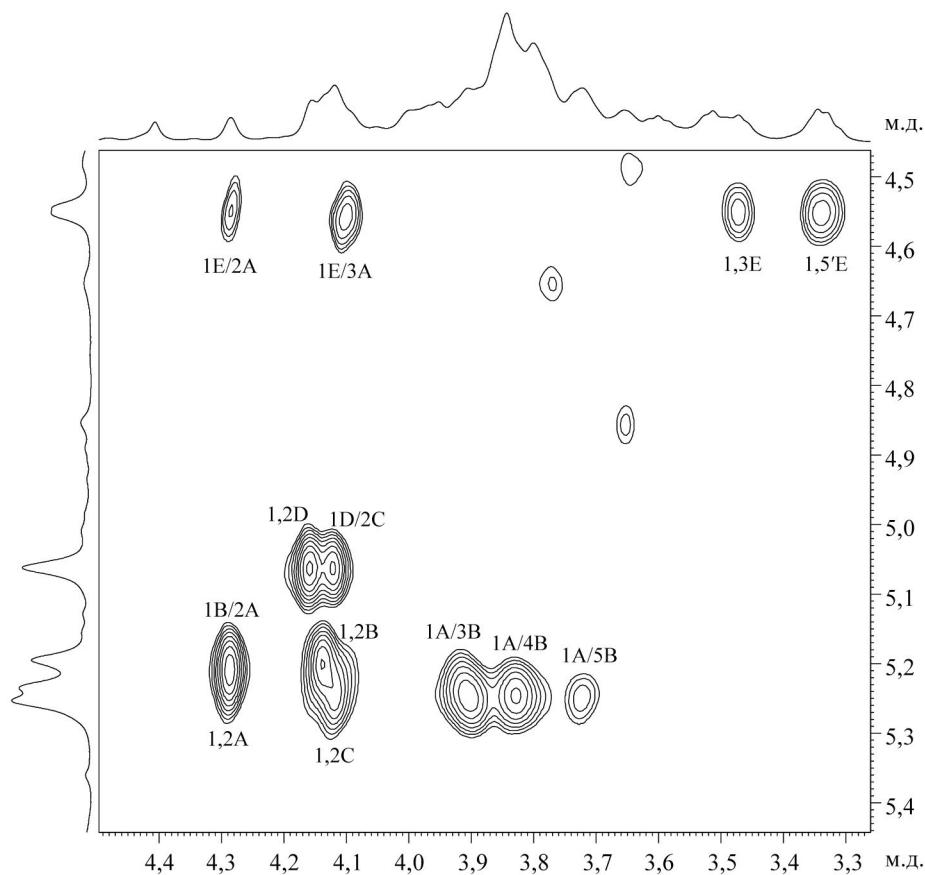
Анализ спектра протон-детектированной НОНО-квантовой корреляции  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HSQC (рис. 2) показал замещение  $\alpha\text{-Rhap}$  в позициях 2 и 3 ( $\delta_{\text{C-2}} 76,3$  м.д.;  $\delta_{\text{C-3}} 79,0$  м.д.) (остаток A, табл. 1) и только в позиции 2 ( $\delta_{\text{C-2}} 79,4$  м.д. остаток C); заме-

щение остатков  $\alpha\text{-Manp}$  в положение 3 ( $\delta_{\text{C-3}} 79,0$  м.д., остаток B и 79,4 м.д., остаток D). Остатки  $\beta\text{-Xylp}$  были определены терминальными (остаток E).

Выводы о составе сахаров, размере цикла и аномерной конфигурации (полимер 1, табл. 1) были сделаны на основе сравнения химических сдвигов  $^{13}\text{C}$  остатков сахаров и соответствующих родоначальных пираноз [9–11].

Последовательность остатков в повторяющемся звене была установлена путем анализа спектров  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY и  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HMBC.

В спектре  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY (рис. 3) наблюдались следующие корреляционные пики  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{H}}$  между остатками: 1(A)/H-3,4(B) (5,24/3,92, 3,82); H-1(C)/



**Рис. 3.** Часть спектра  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY нейтрального полисахарида(ов) из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ac-1390<sup>T</sup>. Арабские цифры относятся к протонам в остатках, как указано в табл. 1. Косая черта относится к пикам корреляции между остатками

H-3,4(D) (5,25/3,90, 3,83); H-1(B)/H-2(A) (5,19/4,28); H-1(C)/H-3,4(D) (5,25/3,83) и H-1(E)/H-3(A) (4,55/4,10), что указывает на присутствие в нейтральной фракции двух типов повторяющихся единиц в полимере или двух полимеров.

В конечном итоге структуры полимеров были подтверждены при анализе спектра  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  НМВС (рис. 4), где были обнаружены следующие корреляционные пики  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  между остатками: 1A/3B (5,24/79,0); 1B/2A (5,19/76,3); 1E/3A (4,55/79,0); 1C/3D (5,25/79,4); 1D/2C (5,06/79,4); 2A/1B (4,28/102,8); 3D/1A (3,90/101,9); 3A/1E (4,10/102,5); 2C/1D (4,12/103,2) и 3D/1C (3,90/101,9).

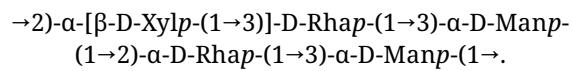
Абсолютные конфигурации остатков сахаров были определены на основе закономерностей, описанных ранее [8], и предположения о D-конфигурации остатков ксилозы. Большие по модулю и отрицательные  $\beta$ -эффекты замещения для C-2 (-3,1 м.д.) и C-4 (-1,7 м.д.) остатка A характерны для той же абсолютной конфигурации гликозилирующих ( $\beta$ -Xylp) и гликозилированных ( $\alpha$ -Rhap) пираноз.

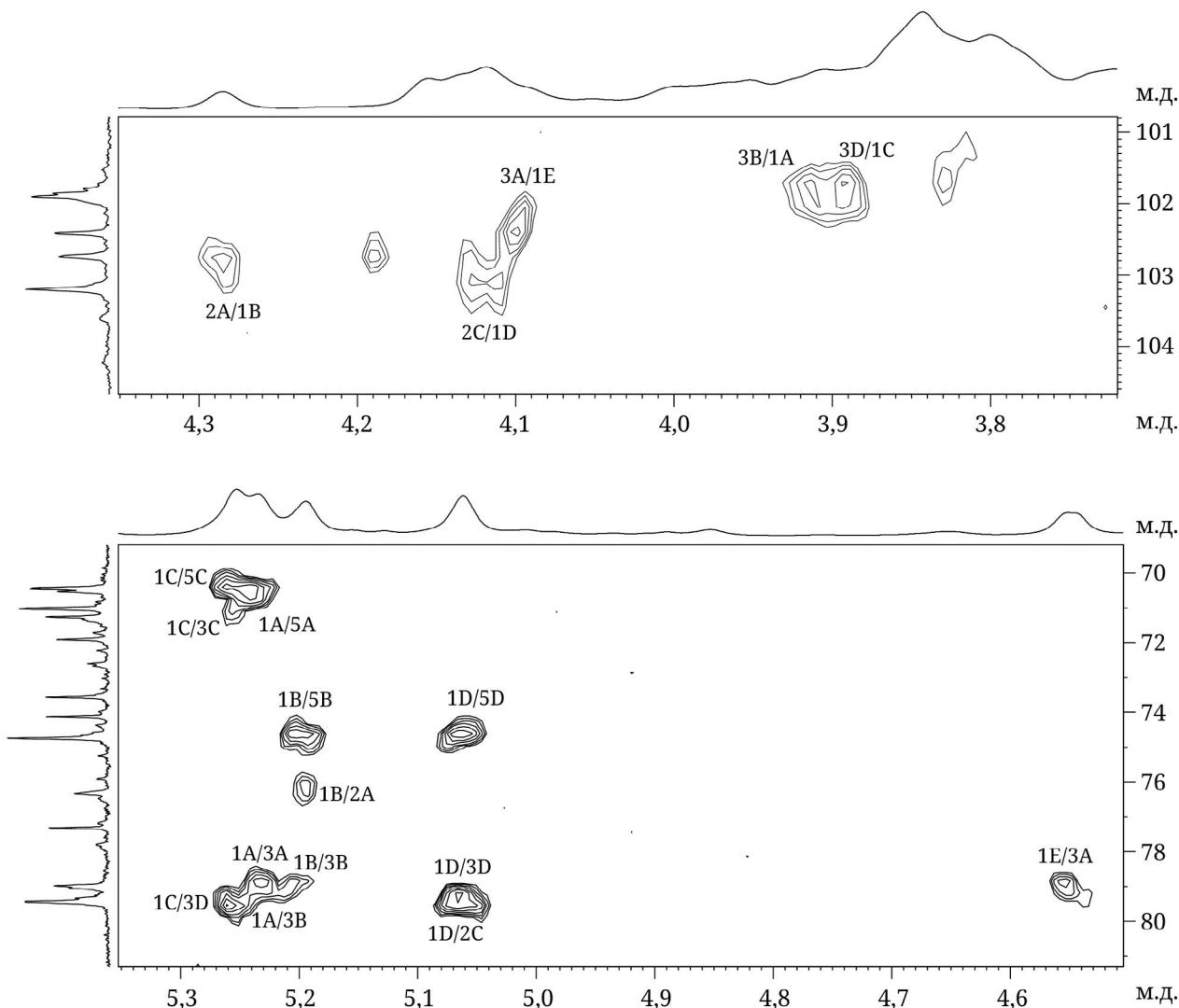
Сравнение химических сдвигов C-1, C-2 и C-3  $\alpha$ -Rhap и  $\alpha$ -Manp в спектрах  $^{13}\text{C}$  ЯМР полимеров 1 и 2 со спектрами полимеров из *Rathayibacter*

*tanaceti* ВКМАс-2596 [12] показало одинаковую абсолютную конфигурацию остатков.

Деградация по Смиту нейтральной фракции привела к получению смеси многочисленных низкомолекулярных продуктов и очень небольшому количеству полисахарида с повторяющимся звеном  $\rightarrow 2)$ -D-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)-D-Rhap-(1 $\rightarrow$  (полимер 2, табл. 1). Внимательное рассмотрение спектров ЯМР исходного суммарного препарата выявило минорные сигналы, которые могли бы принадлежать вышеупомянутому полимеру 2 с 3- и 2,3-замещенными остатками Rhap, но полное отнесение минорных сигналов не представляется возможным на фоне интенсивных сигналов основных полимеров.

В любом случае отсутствие дополнительного полимера в продуктах деградации по Смиту позволило предположить статистическое распределение точек разветвления в основном нейтральном полисахариде (полимер 1), и структура его повторяющегося звена должна быть следующей:





**Рис. 4.** Части спектра  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  НМВС нейтрального полисахарида(ов) из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ac-1390<sup>T</sup>. Заглавные латинские буквы относятся к остаткам, как обозначено в табл. 1. Арабские цифры перед косой чертой относятся к протонам, а после косой черты – к атомам углерода в соответствующих остатках

#### Кислая фракция (кислый полисахарид).

$^{13}\text{C}$  ЯМР-спектр кислой фракции (рис. 1, *в*) был типичен для регулярного полимера. Его аномерная область содержала 5 сигналов примерно равной интегральной интенсивности (99,6–104,6 м.д.) и небольшой сигнал, принадлежащий непротонированному атому углерода, связанному с двумя атомами кислорода (102,5 м.д.).

Два сигнала наблюдались в области сильного поля при  $\delta_c$  18,3 м.д. и 26,0 м.д., последний был характерен для пирувата в шестичленном кольце. Два сигнала при  $\delta_c$  174,9 м.д. и 175,5 м.д. наблюдались в области резонанса карбоксильных групп.

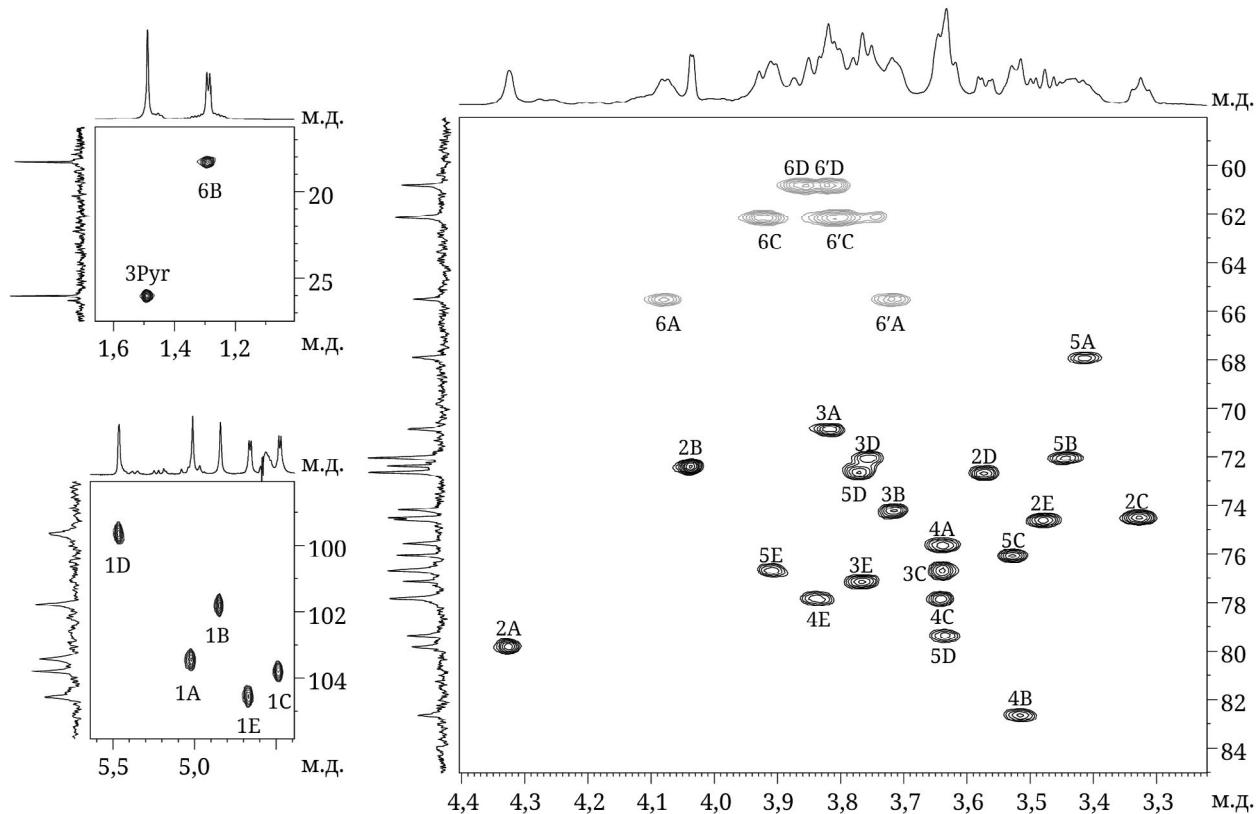
$^1\text{H}$  ЯМР-спектр кислой фракции (рис. 5, верхние проекции) содержал 5 хорошо разрешенных сигналов в аномерной области. Все сигналы имели одинаковую интегральную интенсивность, что указывает на регулярное строение полисахарида. В области сильного поля наблюдались 2 сигна-

ла при  $\delta_h$  1,49 м.д. (синглет, 3Н) и 1,28 м.д. (дублет, 6 Гц, 3Н).

Спектры  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  кислой фракции были отнесены с использованием 2D ЯМР-спектров, упомянутых выше. Спектры 2D  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  COSY, TOCSY и ROESY выявили остатки  $\beta$ -Manp (остаток А, табл. 1, полимер 3);  $\beta$ -Rhap (остаток В);  $\beta$ -GlcP (остаток С);  $\alpha$ -GlcP (остаток D) и  $\beta$ -GlcPA (остаток E).

Анализ спектров  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HSQC (рис. 5) выявил смещение атомов углерода C-2 ( $\delta_c$  79,8 м.д.), C-4 ( $\delta_c$  75,6 м.д.) и C-6 ( $\delta_c$  65,5 м.д.) (остаток А); C-4 ( $\delta_c$  82,6 м.д.; остаток В); C-4 ( $\delta_c$  77,8 м.д.; остаток С); C-4 ( $\delta_c$  79,4 м.д.; остаток D) и C-4 ( $\delta_c$  77,8 м.д.; остаток Е) в сторону слабого поля по сравнению с положением атомов в спектрах соответствующих незамещенных остатков.

Сильно сдвинутый в высокое поле сигнал C-5 остатка  $\beta$ -Manp ( $\delta_c$  67,9 м.д.) указывал на расположение остатка пировиноградной кислоты в полож-



**Рис. 5.** Части спектра  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HSQC кислого полисахарида из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ac-1390<sup>T</sup>. Части спектров ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  показаны вдоль горизонтальной и вертикальной осей соответственно. Арабские цифры относятся к атомам углерода в остатках, как обозначено в табл. 1

жении 4,6 остатка А. Химический сдвиг 26,0 м.д. от  $^{13}\text{C}$  был типичным для S-абсолютной конфигурации пирувата [13].

Последовательность и расположение остатков пировиноградной кислоты стали ясны после анализа спектра 2D  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY (рис. 6) и подтверждены спектром  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HMBC (рис. 7). Спектр  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  ROESY содержал следующие пики  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{H}}$  между остатками: 1A/4B (5,02/3,51); 1B/3,4C (4,85/3,64, 3,64); 1C/4D (4,48/3,64); 1D/3,4,5E (5,47/3,77, 3,84, 3,90) и 1E/2A (4,67/4,33), демонстрируя линейную структуру повторяющейся единицы: →A→B→C→D→E→.

Последовательность и тип замещения в остатках были подтверждены спектрами  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HMBC, в которых наблюдались корреляционные пики между остатками  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ : 1A/4B (5,02/82,6); 1B/4C (4,85/77,8); 1C/4D (4,48/79,4); 1D/4E (5,47/77,8) и 1E/2A (4,67/79,8).

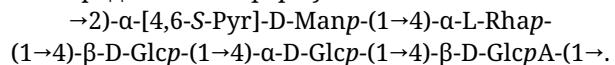
Абсолютные конфигурации остатков сахаров и глюкуроновой кислоты определяли по эффектам гликозилирования в остатках моносахаридов в спектрах  $^{13}\text{C}$  ЯМР, согласно закономерностям, изложенным в работе Shashkov et al. [8], и на основании принадлежности глюкозы к D-ряду.

Небольшие положительные  $\beta$ -эффекты гликозилирования (+0,1 м.д.) для C-3 замещения  $\beta\text{-GlcP}A$  характерны для той же (D) конфигурации

сахаров в дисахаридном фрагменте  $\alpha\text{-D-GlcP-(1→4)-}\beta\text{-D-GlcP}A$ .

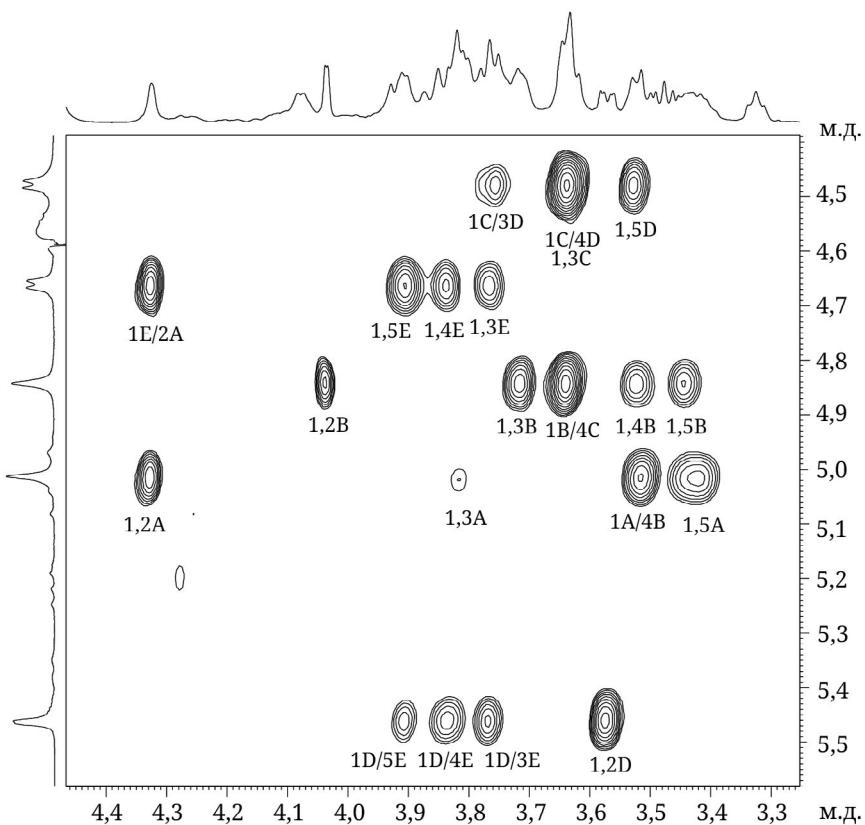
Относительно большие (+7,5 м.д.)  $\alpha$ -эффекты гликозилирования для замещения C-1  $\beta\text{-GlcP}A$  во фрагменте  $\beta\text{-GlcP-(1→2)-}\beta\text{-ManP}$  также характерны для той же (D) конфигурации сахаров. L-Абсолютная конфигурация  $\beta\text{-Rhap}$  (остаток В) во фрагменте  $\beta\text{-L-Rhap-(1→4)-}\beta\text{-D-GlcP}$  подтверждается отсутствием отрицательного эффекта  $\gamma$ -гликозилирования для C-6 остатка  $\beta\text{-D-GlcP}$  (остаток С). Для ситуации с  $\beta\text{-D-(1→4)-D}$  эффект  $\gamma$ -гликозилирования для C-6 D-GlcP имел бы небольшую отрицательную величину (около -1 м.д.), как это видно для фрагмента  $\beta\text{-D-GlcP-(1→4)-}\alpha\text{-D-GlcP}$ , где эффект  $\gamma$ -гликозилирования для гликозилированного остатка D-GlcP составлял -1,1 м.д.

В конечном итоге структура повторяющегося звена кислого полисахарида (полимер 3) может быть представлена формулой:

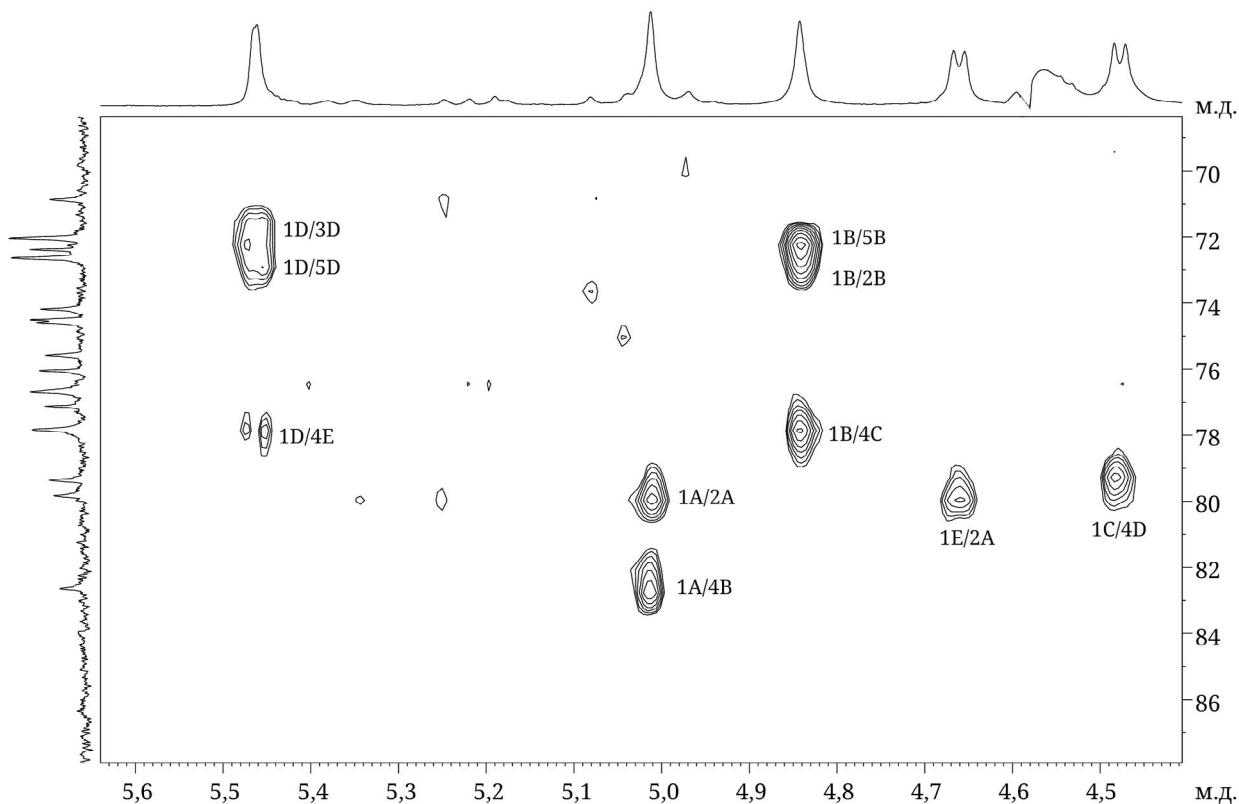


## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ac-1390<sup>T</sup> были выделены три гликополимера,



**Рис. 6.** Часть спектра  $^1\text{H},^1\text{H}$  ROESY кислого полисахарида из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ac-1390<sup>T</sup>. Арабские цифры относятся к протонам в остатках, как обозначено в табл. 1. Косая черта относится к пикам корреляции между остатками



**Рис. 7.** Часть спектра  $^1\text{H},^{13}\text{C}$  HMBC кислого полисахарида из клеточной стенки *R. festucae* ВКМ Ac-1390<sup>T</sup>. Заглавные латинские буквы относятся к остаткам, как обозначено в табл. 1. Арабские цифры перед косой чертой относятся к протонам, а после косой черты – к атомам углерода в соответствующих остатках

структуры которых установлены с использованием химических и ЯМР-спектроскопических методов. Первый полимер – разветвленный рамнomanнан с повторяющейся единицей: →2)- $\alpha$ -[ $\beta$ -D-Xylp-(1→3)]-D-Rhap-(1→3)- $\alpha$ -D-Manp-(1→2)- $\alpha$ -D-Rhap-(1→3)- $\alpha$ -D-Manp-(1→). Установленная структура рамнomanнана описана для прокариот впервые. При этом остатки ксилопиранозы ранее находили в полимерах других видов *Rathayibacter* – рамнomanнане *Rathayibacter tritici* BKM Ac-1603<sup>T</sup> и рамнане *Rathayibacter oskolensis* BKM Ac-2121<sup>T</sup> [14, 15].

Рамнан, второй нейтральный полимер, обнаружен у исследованного штамма в миорном количестве, что затрудняло его полную идентификацию. Однако выявленные миорные сигналы в спектрах <sup>13</sup>C ЯМР (на фоне интенсивных сигналов основных полимеров), а также результаты деградации по Смиту указывали на наличие в основной цепи рамнана бокового замещения по О-3, идентифицировать которое не представилось возможным.

Кроме того, в отличие от исследованных ранее представителей рамнан-содержащих штаммов (*Rathayibacter* sp. BKM Ac-2759 и *R. oskolensis* BKM Ac-2121<sup>T</sup>), изученный штамм BKM Ac-1390<sup>T</sup> имел одновременно с рамнаном и другой нейтральный полимер, рамнomanнан [4].

Рамноза в обоих нейтральных полимерах изученного нами штамма *R. festucae*, как и у ранее изученных представителей рода *Rathayibacter*, имела D-конфигурацию [4].

Третий гликополимер представлял собой тейхуроновую кислоту новой структуры. Она содержала 5 моносахаридных остатков в повторяющемся звене и остаток S-пировиноградной кислоты в положениях 4,6 остатка  $\alpha$ -D-Manp. Ранее S-пировиноградная кислота была обнаружена

в кислых гликополимерах клеточной стенки представителей трех других видов *Rathayibacter* [7, 15, 16].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящего исследования расширяют представления о структурном разнообразии микробных гликополимеров и согласуются с данными о специфичности структур и состава гликополимеров для видов рода *Rathayibacter*, описанных ранее.

**Вклад авторов.** А.С. Шашков – расшифровка спектров ЯМР-спектроскопии; Н.В. Потехина, Е.М. Тульская – выделение клеточной стенки и гликополимеров, их первичный химический анализ, написание текста статьи; А.С. Дмитренок – съемка ЯМР-спектров; С.Н. Сенченкова – химический анализ препаратов (ДЭАЕ-хроматография, пробоподготовка образцов к ЯМР-анализу); Л.В. Дорофеева – выращивание культуры *R. festucae*, получение биомассы; Л.И. Евтушенко – общее руководство, обсуждение результатов, редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках программы исследований 121032300094-7, запланированных в МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра микробиологии, 2021–2027 гг.

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

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Smith, E. F. (1913) A new type of bacterial disease, *Science*, **38**, 926, <https://doi.org/10.1126/science.38.991.926.a>.
- 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, <https://doi.org/10.1099/00207713-43-1-143>
- Evtushenko, L. I., and Doroфеева, L. V. (2012) Genus XXII. *Rathayibacter* Zgurskaya, Evtushenko, Akimov and Kalakoutskii 1993, 147<sup>Vb</sup> in Bergey's manual of systematic bacteriology (Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Suzuki, K.-I., Ludwig, W., and Whitman, W. B., eds) 2nd Edn., Vol. 5, Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp. 953-964.
- Potekhina, N. V., Tul'skaya, E. M., Ospennikov, and Y. V. Evtushenko, L. I. (2023) Cell wall glycopolymers as chemotaxonomic characteristics of the genus and species *Rathayibacter*, *Microbiology*, **92** (Suppl 1), S2-S6, <https://doi.org/10.1134/S0026261723603822>.
- Doroфеева, L. V., Evtushenko, L. I., Krausova, V. I., Karpov, A. V., Subbotin, S. A., and Tiedje, J. M. (2002) *Rathayibacter caricis* sp. nov. and *Rathayibacter festucae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of *Carex* sp. and the leaf gall induced by the nematode *Anguina graminis* on *Festuca rubra* L., respectively, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 1917-1923, <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-1917>.

6. 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<sup>T</sup> cell wall, *Carbohydr. Res.*, **482**, 107728, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2019.06.007>.
7. Шашков А. С., Тульская Е. М., Потехина Н. В., Дмитренок А. С., Сенченкова С. Н., Зайчиков В. А., Дорофеева Л. В., Евтушенко Л. И. (2021) Рамнан и пируватсодержащая тейхуроновая кислота клеточной стенки *Rathayibacter* sp. BKM Ac-2759, *Биохимия*, **86**, 595-606, <http://dx.doi.org/10.31857/S0320972521040114>.
8. Shashkov, A. S., Lipkind, G. M., Knirel, Y. A., and Kochetkov, N. K. (1988) Stereometrical factors determining the effects of glycosylation on the <sup>13</sup>C chemical shifts in carbohydrates, *Magn. Reson. Chem.*, **26**, 735-747, <https://doi.org/10.1002/mrc.1260260904>.
9. Jansson, P.-E., Kenne, L., and Widmalm, G. (1989) Computer-assisted structural analysis of polysaccharides with an extended version of CASPER using <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-n.m.r. data, *Carbohydr. Res.*, **188**, 169-191, [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(89\)84069-8](https://doi.org/10.1016/0008-6215(89)84069-8).
10. Altona, C., and Haasnoot, C. A. G. (1980) Prediction of anti and gauche vicinal proton-proton coupling constants in carbohydrates: a simple additivity rule for pyranose rings, *Org. Magn. Reson.*, **13**, 417-429, <https://doi.org/10.1002/mrc.1270130606>.
11. Bock, K., and Pedersen C. (1983) Carbon 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **41**, 27-66, [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60055-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60055-4).
12. Шашков А. С., Тульская Е. М., Дмитренок А. С., Стрешинская Г. М., Потехина Н. В., Сенченкова С. Н., Пискункова Н. Ф., Дорофеева Л. В., Евтушенко Л. И. (2018) Рамнозосодержащие гликополимеры клеточных стенок *Rathayibacter toxicus* BKM Ac-1600 и «*Rathayibacter tanaceti*» BKM Ac-2596, *Биохимия*, **83**, 915-925, <https://doi.org/10.1134/S0006297918060093>.
13. Garegg, P. J., Jansson, P.-E., Lindberg, B., Lindh, F., and Lönngrén, J. (1980) Configuration of the acetal carbon atom of pyruvic acid acetals in some bacterial polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, **79**, 127-132, [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)83666-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83666-6).
14. 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 the cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603<sup>T</sup>, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 369-377, <https://doi.org/10.1134/S0006297920030128>.
15. Shashkov, A. S., Potekhina, N. V., Tul'skaya, E. M., Dmitrenok, A. S., Senchenkova, S. N., Torgov, V. I., Dorofeeva, L. V., and Evtushenko, L. I. (2024) New lactate- and pyruvate-containing polysaccharide and rhamnomannan with xylose residues from the cell wall of *Rathayibacter oskolensis* VKM Ac-2121<sup>T</sup>, *Carbohydr. Res.*, **540**, 109145, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2024.109145>.
16. Shashkov, A. S., Potekhina, N. V., Dmitrenok, A. S., Tul'skaya, E. M., Senchenkova, S. N., Dorofeeva, L. V., Zaychikov, V. A. and Evtushenko, L. I. (2021) D-Rhamnan and teichuronic acid from the cell wall of *Rathayibacter caricis* VKM Ac-1799<sup>T</sup>, *Carbohydr. Res.*, **499**, 108233, <https://doi.org/10.1016/j.carres.2021>.

## NOVEL RHAMNOSE-CONTAINING GLYCOPOLYMERS FROM THE CELL WALL OF *Rathayibacter festucae* VKM Ac-1390<sup>T</sup>

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

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

<sup>2</sup> *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
119234 Moscow, Russia; e-mail: potekhina56@mail.ru*

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

*Rathayibacter festucae* VKM Ac-1390<sup>T</sup> (family Microbacteriaceae, class Actinomycetes) contains three glycopolymers in the cell wall. The structures of glycopolymers established by chemical and NMR spectroscopy methods. One of them, rhamnomannan, built from repeating tetrasaccharide units carrying side xylopyranose residues, →2)-α-[β-D-Xylp-(1→3)]-D-Rhap-(1→3)-α-D-Manp-(1→2)-α-D-Rhap-(1→3)-α-D-Manp-(1→. The second polymer, found in minor amounts in the strain studied, is rhamnan,

→2)- $\alpha$ -D-Rhap-(1→3)- $\alpha$ -D-Rhap-(1→. The third polymer is teichuronic acid, acetalated with pyruvic acid, →2)- $\alpha$ -[4,6-S-Pyr]-D-Manp-(1→4)- $\alpha$ -L-Rhap-(1→4)- $\beta$ -D-Glcp-(1→4)- $\alpha$ -D-Glcp-(1→4)- $\beta$ -D-GlcpA-(1→. The structures of rhamnomannan and teichuronic acid are new for *Ratayibacter* and prokaryotes in a whole. The results of the present study expand our understanding of the structural diversity of microbial glycopolymers and are consistent with the data on the specificity of the structures and composition of glycopolymers for species of the genus *Rathayibacter* described previously.

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