

УДК 577.114.083+579.252

СТРУКТУРНОЕ И ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РОДСТВО О-АНТИГЕНОВ ТИПОВЫХ ШТАММОВ *AZOSPIRILLUM AGRICOLA* CC-HIH038 И *AZOSPIRILLUM DOEBEREINERAE* GSF71

© 2024 г. Е. Н. Сигида^{а, *}, В. С. Гринев^{а, b}, М. С. Кокоулин^с,
С. А. Коннова^{а, b}, Ю. П. Федоненко^а

^аИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ СНЦ РАН, 410049, Саратов, Россия

^бСаратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
410012, Саратов, Россия

^сТихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022, Владивосток, Россия
*e-mail: sigida_e@ibppm.ru

Поступила в редакцию 06.06.2024 г.

После доработки 19.06.2024 г.

Принята к публикации 24.06.2024 г.

Из клеток типового штамма ризобактерий *Azospirillum agricola* CC-HIH038^T фенольной экстракцией выделен липополисахарид. Мягким кислотным гидролизом липополисахарида с последующим хроматографическим фракционированием получен О-специфический полисахарид. По данным моносхаридного анализа, включающего определение абсолютных конфигураций, одномерной и двумерной ¹H и ¹³C ЯМР спектроскопии установлена структура повторяющегося звена О-специфического полисахарида *A. agricola* CC-HIH038^T: →3)-α-L-Rhap2Ac-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-β-D-GlcpNAc6Ac-(1→, структурно родственного *A. doebereineriae* GSF71^T. На основании анализа данных полногеномного секвенирования штаммов *A. agricola* CC-HIH038^T и *A. doebereineriae* GSF71^T выявлены локусы биосинтеза О-специфических полисахаридов, характеризующиеся схожей организацией и высоким уровнем гомологии генов, подтверждающие общность структур О-антигенов этих штаммов.

Ключевые слова: *Azospirillum*, липополисахарид, структура О-специфического полисахарида, кластер генов биосинтеза О-антигена

DOI: 10.31857/S0026365624060116

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ДПС — дезацелированный полисахарид; ЛПС — липополисахарид; ОПС — О-специфический полисахарид; Ds-Na-ПААГ электрофорез — электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия; GT — гликозилтрансфераза; ЯМР — ядерный магнитный резонанс; HSQC — протон-детектированная гетероядерная одноквантовая корреляция; ROESY — двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; COSY — корреляционная спектроскопия; TOCSY — тотальная корреляционная спектроскопия; НМВС — гетероядерная корреляция через несколько связей; δ_C, δ_H — значения химических сдвигов атомов ¹³C и ¹H соответственно.

Азотфиксирующие свободноживущие грамотрицательные бактерии р. *Azospirillum* широко известны

как типичные представители группы бактерий, стимулирующих рост растений, в английской аббревиатуре PGPR (plant growth promoting rhizobacteria). Отсутствие строгой специфичности азоспирилл в отношении растения-хозяина, очевидно, определяется универсальностью многих бактериальных эффектов к широкому кругу потенциальных растений-партнеров. Механизм стимулирующего воздействия бактерий на растения активно исследуется, и азоспириллы являются признанными модельными объектами ассоциативных растительно-бактериальных взаимодействий (Fukami et al., 2018; Pedraza et al., 2020). Род *Azospirillum* включает 25 валидированных видов, изолированных преимущественно из сельскохозяйственных почв, ризосферы и корней растений, а также из таких разнообразных мест обитания, как загрязненные почвы, продукты ферментации, сульфидные и горячие источники, болота

и озера, карстовые пещеры и микробные топливные элементы (Nievas et al., 2023). Спектр физиологической активности азоспирилл, посредством которого они оказывают стимулирующее действие на рост и развитие растений, включает продукцию фитогормонов, фиксацию атмосферного азота, сольюбилизацию фосфатов, оптимизацию минерального питания растений, секрецию вторичных метаболитов, являющихся сигнальными молекулами, увеличивающих пролиферацию корневой системы, индуцирующих системную устойчивость растений и т.д. (Cassán et al., 2020).

С истоков изучения биохимии взаимодействия растений и свободноживущих диазотрофных бактерий многие научные изыскания были направлены на выявление молекул, выполняющих ведущую роль в выборе партнера ассоциативного симбиоза, и/или метаболитов, играющих ключевую роль на различных этапах взаимодействия. Среди основных претендентов на эту роль в большинстве исследований оказались гликополимеры поверхности бактерий (Caroff, Novikov, 2020). Для многих эффективных штаммов азоспирилл, как показали структурные исследования полисахаридов последних десятилетий (Федоненко и соавт., 2015), источником высокомолекулярных внеклеточных полисахаридов (полисахаридов капсулы и экстраклеточных полисахаридов) являются мембранные липополисахариды (ЛПС) (Konnova et al., 1994). Это стимулирует интерес к изучению структуры ЛПС и локализации генов его биосинтеза.

Липополисахариды (ЛПС) азоспирилл — основные структурные компоненты внешней мембраны грамотрицательных бактерий, покрывающие значительную часть поверхности бактериальной клетки, — вовлечены в начальные стадии формирования ассоциаций с растениями-хозяевами (Caroff, Novikov, 2020). Амфифильная молекула ЛПС гидрофобным компонентом, липидом А, встроена во внешнюю мембрану бактерий, а гидрофильным фрагментом — О-специфическим полисахаридом (ОПС), связанным с липидом А через олигосахарид кора, — экспонируется в окружающую среду. Бактериальные ОПС, в том числе ОПС азоспирилл, характеризуются высоким структурным разнообразием (Федоненко и соавт., 2015). Генетика биосинтеза ОПС подробно изучена для энтеробактерий, тогда как для почвенных микроорганизмов сведения об организации генов, ответственных за сборку ОПС и его экспорт на внешнюю мембрану, фрагментарны. За последние годы нами были получены данные о структурах ОПС типовых штаммов двенадцати видов азоспирилл, а для трех видов — *A. zeae* N7^T, *A. melinis* TMCY 0552^T и *A. palustre* B2^T — был проведен анализ генов, вовлеченных в биосинтез их ОПС (Сигида и соавт., 2022).

Целью настоящей работы являлось изучение структуры и характеристика генов биосинтеза ОПС типового штамма бактерий *A. agricola* СС-НН038^T, выделенного из образцов культивируемой почвы, собранных на острове Тайвань, и сравнение с таковыми для ранее исследованных штаммов азоспирилл.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемый штамм, условия культивирования бактерий и выделение липополисахарида. Штамм *Azospirillum agricola* СС-НН038^T (IBPPM 625) предоставлен Коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>). Культивирование бактерий проводили в колбах Эрленмейера в жидкой малатно-солевой среде с витаминами (Konnova et al., 1994) до окончания экспоненциальной фазы роста с использованием шейкера-инкубатора ES-20/60 (“BioSan”, Латвия) при температуре 30°C и 120 об./мин. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 30 мин с применением центрифуги Allegra X-30R (“Beckman Coulter”, США), ресуспендировали в 0.15 М растворе NaCl; механическим перемешиванием удаляли с поверхности капсульный материал, как описано ранее (Konnova et al., 1994). Клетки высушивали ацетоном и тонко диспергировали.

ЛПС выделяли из высушенных ацетоном бескапсульных клеток горячим 45%-м водным раствором фенола без разделения слоев (Кульшин и соавт., 1987). Экстракты освобождали от остатков фенола диализом с помощью мембран MEMBRA-CEL® с пределом исключения 14 кДа (“Viscase”, Франция), концентрировали на роторном испарителе Laborota 4000 (“Heidolph”, Германия). Экстракт ЛПС титровали 40%-ой CCl_3COOH до конечного значения pH 2.7 и декантировали после осаждения белков центрифугированием, диализовали и лиофилизировали на сушке Bench Top 2K (“VirTis”, США).

Получение О-специфического полисахарида осуществляли мягким кислотным гидролизом ЛПС 2%-ой CH_3COOH при 100°C в течение 4 ч с последующим осаждением центрифугированием (12000 g, 30 мин) нерастворимого в воде липида А. Водорастворимую часть гидролизата разделяли гель-хроматографией на колонке с Toyopearl TSK HW-50 (S) (“Tosoh Bioscience”, Япония) в 1% AcOH . Элюцию контролировали с помощью дифференциального проточного рефрактометра (“Knauer”, Германия). Фракцию высокомолекулярного ОПС концентрировали и лиофилизировали.

Дезацелирование препарата ОПС проводили в 12.5% растворе NH_4OH при 37°C в течение 16 ч. Полученный препарат дезацелированного полисахарида (ДПС) выделяли на колонке с Toyopearl

TSK HW-50 (S) (“Tosoh Bioscience”, Япония) в 1% AcOH.

Ds-Na-ПААГ электрофорез препаратов ЛПС выполняли, как описано ранее (Hitchcock, Brown, 1983). Визуализацию компонентов осуществляли окрашиванием гелей красителем на основе азотнокислого серебра (Tsai, Frasch, 1982).

Газо-жидкостная хроматография. Анализ моносахаридного состава и абсолютных конфигураций сахаров после гидролиза ОПС 2М CF_3COOH (120°C , 2 ч) осуществляли методом ГЖХ ацетатов полиолов (Sawardeker et al., 1965) и ацетилированных 2-(*S*)-октилглицеридов (Leontein et al., 1978) на хроматографе GC-2010 (“Shimadzu”, Япония) с капиллярной колонкой DB-5 (“Agilent”, США). Градиент температуры от 160°C (1 мин) до 290°C , скорость нагрева $7^\circ\text{C}/\text{мин}$.

Состав жирных кислот ЛПС определяли методом ГЖХ на хроматографе GC-2010 (“Shimadzu”, Япония), снабженном колонкой DB-5 (“Agilent”, США). Градиент температуры от 110°C (5 мин) до 290°C (30 мин), скорость нагрева $5^\circ\text{C}/\text{мин}$. Метилирование выполняли методом, описанным в работе (Mayer et al., 1985).

ЯМР-спектроскопия. Спектры ЯМР записывали на спектрометре Avance-700 II (“Bruker”, Германия) в растворе 99.96%-ой D_2O при 30°C , (внутренний стандарт — триметилсилилпропаноат- d_4 , $\delta_{\text{C}} -1.6$ и $\delta_{\text{H}} 0.0$). Образцы предварительно лиофилизировали дважды из 99.9%-ой D_2O . Двумерные спектры записывали с использованием стандартного математического обеспечения компании “Bruker” (Германия); для сбора и обработки данных использовали программу TOPSPIN 2.1. В экспериментах TOCSY и ROESY время смешивания составляло 150 и 200 мс соответственно.

Анализ генов биосинтеза О-антигенов. Гены биосинтеза *l*-Rha были извлечены из полногеномных сиквенсов *A. agricola* CC-HIN038^T (GCF_017876095.1) и *A. doebereineriae* GSF71^T (GCF_003989665.1). Предсказание функций идентифицированных последовательностей генов проводили путем выравнивания соответствующих и известных белковых последовательностей (полученных из GenBank), участвующих в биосинтезе О-антигенов других бактерий, с помощью инструмента BLAST (Altschul et al., 1997). Трехбуквенные (*wzm* и *wzt*) и четырехбуквенные обозначения (*rfbA*–*rfbD*, *galE*) присвоены генам в соответствии с их аннотациями, а также результатами попарных выравниваний их нуклеотидных последовательностей. Изображение генных кластеров изучаемых штаммов азоспирилл было получено с помощью визуализатора Easyfig версии 2.2.5 (Sullivan et al., 2011). Гомологию нуклеотидных последовательностей генов оценивали с помощью попарных выравниваний соответствующих последовательностей, выполненных с помощью сервиса BLASTn.

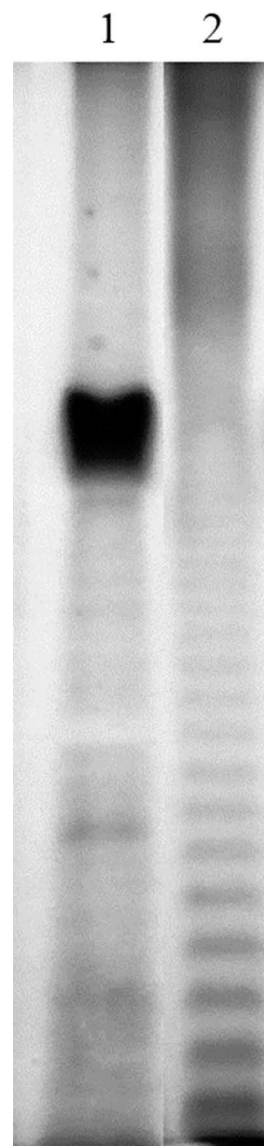


Рис. 1. Электрофореграмма препаратов липополисахаридов в 13.5% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия: *A. agricola* CC-HIN038^T (1), *Pseudomonas putida* TSh-18 B2 (2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика липополисахарида и анализ структуры О-специфического полисахарида *A. agricola* CC-HIN038^T. Методом водно-фенольной экстракции из высушенной биомассы бактерий *A. agricola* HIN038^T был выделен ЛПС. Ds-Na-электрофорез препарата ЛПС с окрашиванием серебром (рис. 1) демонстрировал типичную для ЛПС азоспирилл картину с преобладанием молекул ЛПС в верхней части геля, свидетельствующим о высокой

степени замещения корового олигосахарида цепями О-специфического полисахарида.

Анализ состава жирных кислот в ЛПС выявил присутствие характеристичных для бактерий рода *Azospirillum* (Сигида и соавт., 2022) 3-гидроксите-традекановой, 3-гидроксигексадеканой, гексадекановой и октадеценевой кислот, а также еще одного компонента, который по времени удерживания был предварительно идентифицирован нами как 3-гидроксиоктадекановая кислота. В результате анализа моносахаридов методами ГЖХ ацетатов полиолов и ацелированных (*S*)-октилгликозидов в составе ОПС *A. agricola* НН038^T были идентифицированы L-Rha и D-GlcNAc в соотношении 3 : 1.

ОПС был подвергнут комплексному анализу методом спектроскопии ЯМР. Спектр ¹³C ЯМР ОПС (рис. 2) содержал сигналы четырех аномерных углеродов при δ 100.1–103.4 м.д., трех CH₃-С групп (C-6 Rha) при δ 17.7, 17.8 и 17.9 м.д., одной OCH₂-С группы (C-6 GlcNAc) при δ 64.4 м.д., одного атома углерода, связанного с азотом, при δ 56.6 м.д., сигналы О-ацетильных групп при δ 21.5 (CH₃), 174.1 и 175.3 м.д. (CO), и шестнадцать

сигналов других атомов углерода моносахаридных остатков при δ 69.3–82.5 м.д.

В спектре отсутствовали сигналы в диапазоне при δ 83–88 м.д., характеристичные для фуранозидов (Bock, Pedersen, 1983), что свидетельствовало о том, что все моносахаридные остатки находятся в пиранозной форме. В сильнополюсной области ¹H ЯМР спектра присутствовало пять сигналов протонов в диапазоне δ 4.76–5.31 м.д., трех CH₃-С групп (H-6 Rha) при δ 1.24–1.32 м.д., сигналы О-ацетильных групп при δ_H 2.12 и 2.16 м.д. и других протонов моносахаридных остатков в диапазоне δ 3.57–4.14 м.д.

Спектры ¹³C и ¹H ЯМР ОПС были отнесены с помощью 2D экспериментов ¹H, ¹H COSY, TOCSY, ROESY и ¹H, ¹³C HSQC и HMBC (табл. 1).

Прослеживание корреляций в ¹H, ¹H COSY и TOCSY спектрах, в сочетании со значениями констант спин-спиновой взаимодействия ³J_{H,H} (Altona, Haasnoot, 1980) и химическими сдвигами атомов углерода в ¹³C ЯМР спектрах, позволило выявить спин-спиновые системы трех остатков Rha (A–C) и одного остатка GlcNAc (D).

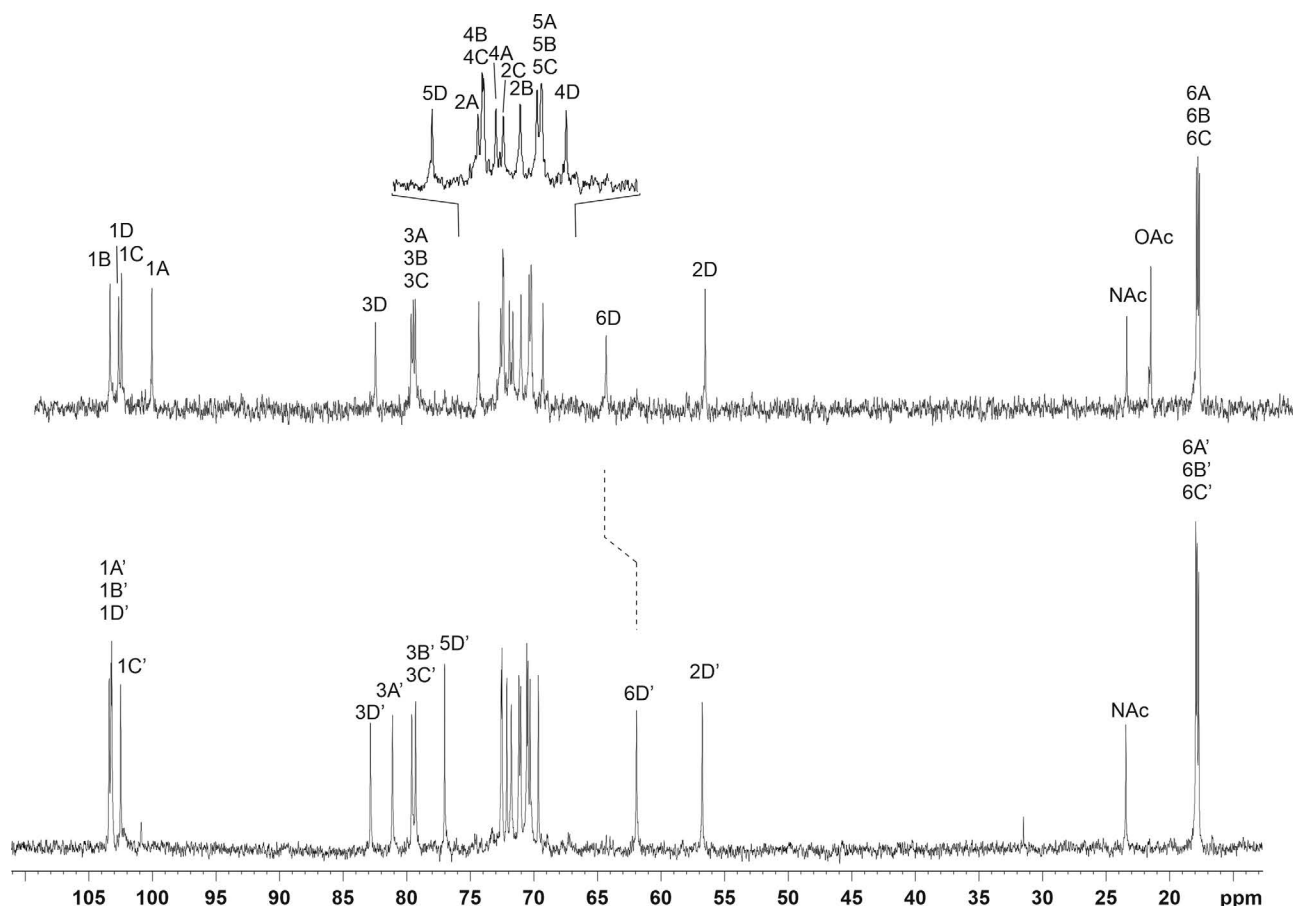


Рис. 2. ¹³C-ЯМР-спектр О-специфического полисахарида *A. agricola* CC-NN038^T. Арабские цифры относятся к атомам углерода в моносахаридных остатках, обозначенных, как указано в табл. 1.

Относительно сильнополюное положение сигналов С-5 остатков **A**, **B** и **C** при δ 70.2-70.4 м.д. и относительно слабополюное положение сигнала С-5 остатка **D** при δ 74.4 м.д. свидетельствовали об α -конфигурации остатков **A**, **B** и **C** и β -конфигурации остатка **D** (Bock, Pedersen, 1983). Наличие характеристичных для α -аномеров Н-1/Н-2 корреляций у остатков **A**, **B** и **C** и характеристичных для β -аномеров Н-1/Н-3, Н-1/Н-5 корреляций у остатка **D** в спектрах ^1H , ^1H ROESY подтверждало аномерные конфигурации моносахаридных остатков (рис. 3).

Значительное смещение сигналов С-3 всех моносахаридных остатков, по сравнению с незамещенными моносахаридами (Bock, Pedersen, 1983), указывало на позиции гликозирования. Последовательность моносахаридов в повторяющемся звене ОПС была определена на основании межзвеньевых корреляций между аномерными протонами и протонами при связываемых углеродах в спектре ^1H , ^1H ROESY (рис. 3): **A** Н-1/**B** Н-3 при δ 5.10/3.90 м.д.; **B** Н-1/**C** Н-3 при δ 5.00/3.78 м.д., **C** Н-1/**D** Н-3 при δ 4.84/3.62 м.д., **D** Н-1/**A** Н-3 при δ 4.76/4.06 м.д. В спектре ^1H , ^{13}C HMBC (рис. 4)

ОПС присутствовали соответствующие корреляции между аномерными протонами и трансгликозидными углеродами: **A** Н-1/**B** С-3 при δ 5.10/79.7 м.д.; **B** Н-1/**C** С-3 при δ 5.00/79.4 м.д., **C** Н-1/**D** С-3 при δ 4.84/82.5 м.д., **D** Н-1/**A** С-3 а при δ 4.76/79.5 м.д.

Таким образом, ОПС *A. agricola* CC-НН038^T имеет следующую структуру $\rightarrow 3$)- α -L-Rhap2Ac-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-GlcpNAc6Ac-(1 $\rightarrow$).

Для подтверждения данной структуры ОПС был дезацилирован в мягких щелочных условиях, и полученный препарат ДПС был исследован с применением ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, как описано выше для ОПС (табл. 1). Относительно слабополюное положение сигналов Н-2, С-2 остатка **A** и Н-6(а; b), С-6 остатка **D** в спектре ОПС, по сравнению с ДПС (рис. 2, табл. 1) в сочетании с кратностью интегральной интенсивности сигналов ^1H спектров ОПС свидетельствовали о полном О-ацетилировании остатка **A** в положении 2 и остатка **D** в положении 6.

Ранее нами была установлена структура ОПС *A. doebereineriae* GSF71^T, отличающегося от исследуемого в данной работе ОПС степенью

Таблица 1. Данные ^{13}C и ^1H -спектров ЯМР интактного и дезацилированного О-специфического полисахарида *A. agricola* CC-НН038^T (химические сдвиги, м.д.)

Моносахаридный остаток	Химические сдвиги							
	Моносахарид						ОАс	
	Н-1 С-1	Н-2 С-2	Н-3 С-3	Н-4 С-4	Н-5 С-5	Н-6 (а,б) С-6	CH ₃	CO
Интактный О-специфический полисахарид								
$\rightarrow 3$)- α -L-Rhap2Ac-(1 $\rightarrow$ A	5.10 100.1	5.31 72.6	4.06 79.5	3.57 72.0	3.90 70.2	1.31 17.8	2.12 21.5	174.1
$\rightarrow 3$)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ B	5.00 103.4	4.14 71.1	3.90 79.7	3.58 72.5	3.82 70.4	1.32 17.9		
$\rightarrow 3$)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ C	4.84 102.5	3.88 71.7	3.78 79.4	3.53 72.4	4.02 70.3	1.24 17.7		
$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc6Ac-(1 $\rightarrow$ D	4.76 102.7	3.86 56.6	3.62 82.5	3.61 69.3	3.65 74.4	4.27, 4.34 64.4	2.16 21.5	175.3
Дезацилированный полисахарид								
$\rightarrow 3$)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ A'	5.03 103.2	4.28 71.0	3.93 81.1	3.52 72.1	3.86 70.5	1.29 17.8		
$\rightarrow 3$)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ B'	5.00 103.4	4.14 71.2	3.89 79.6	3.56 72.5	3.82 70.6	1.32 17.9		
$\rightarrow 3$)- α -L-Rhap-(1 $\rightarrow$ C'	4.85 102.5	3.88 71.7	3.80 79.3	3.54 72.5	4.03 70.3	1.25 17.7		
$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc-(1 $\rightarrow$ D'	4.76 103.2	3.88 56.7	3.63 82.8	3.54 69.6	3.47 77.0	3.77, 3.93 61.9		

Примечание. Сигналы NAc-группы: δ 2.04. δ_{C} 23.4 (CH₃), δ_{C} 175.5 (CO) ОПС и δ_{H} 2.05. δ_{C} 23.4 (CH₃), δ_{C} 175.6 (CO) в ДПС.

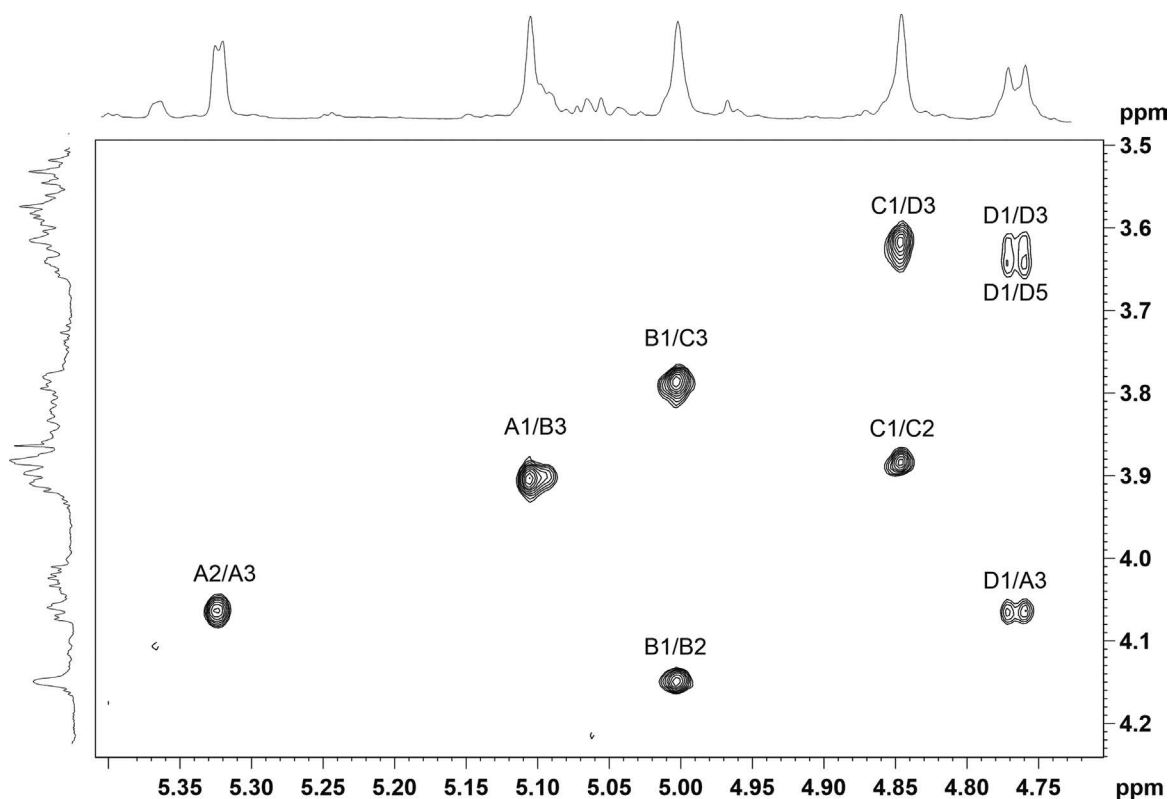


Рис. 3. Фрагмент ^1H , ^1H ROESY спектра О-специфического полисахарида *A. agricola* СС-НІН038^Т. Арабские цифры относятся к протонам в моносахаридных остатках, обозначенных, как указано в табл. 1.

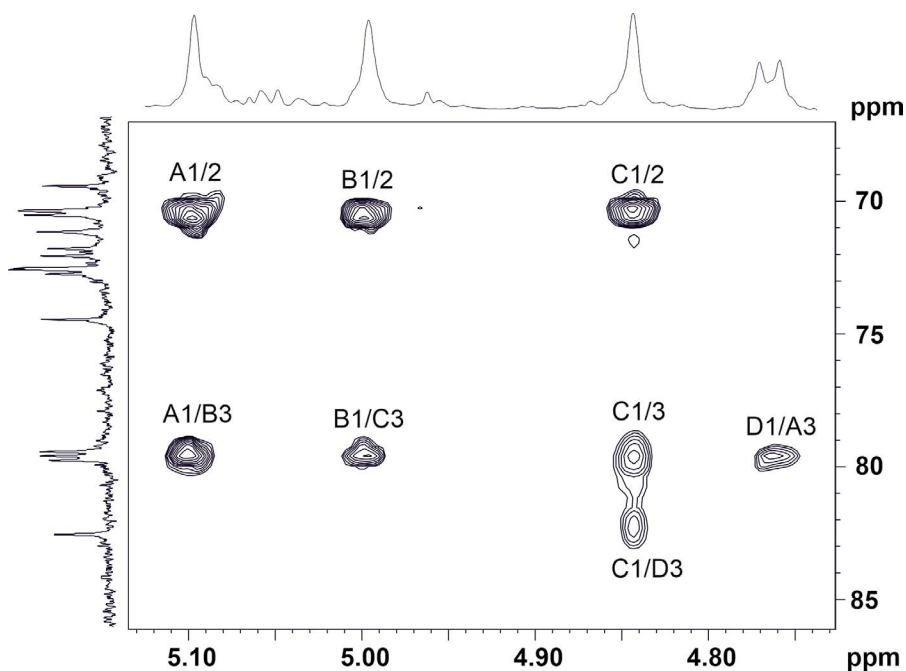


Рис. 4. Фрагмент ^1H , ^{13}C HMBSC спектра О-специфического полисахарида *A. agricola* СС-НІН038^Т. Соответствующие участки ^1H и ^{13}C ЯМР спектров расположены вдоль горизонтальной и вертикальной осей соответственно. Арабские цифры относятся к корреляциям С/Н в моносахаридных остатках, обозначенных, как указано в табл. 1.

О-ацетилирования остатка GlcNAc (~ 20%) (Sigida et al., 2019).

Сравнительный анализ генов, ответственных за биосинтез ОПС, у *A. agricola* CC-HIH038^T и *A. doebereinae* GSF71^T. Род *Azospirillum* включает 25 видов, и для большинства типовых штаммов установлены структуры О-антигенов, в составе которых отмечено преобладание L-рамнозы (Федоненко и соавт., 2015, Сигида и соавт., 2022). Известно, что структура О-антигенов грамотрицательных бактерий может быть использована в качестве хемотаксономического критерия, а анализ генов кластеров, ответственных за биосинтез О-антигенов, позволяет оценить их эволюционные взаимосвязи.

Рамноза для большого числа бактерий имеет очень важное значение, поскольку входит в состав полисахаридов клеточной стенки у грамположительных бактерий и липополисахаридов у многих грамотрицательных бактерий. Гены, кодирующие ферменты биосинтеза L-рамнозы, обозначаются в разных организмах как *rml*, *rfb* или *rff* A, B, C и D (Mistou et al., 2016).

Для выяснения генетической основы родства близких по структуре ОПС *A. agricola* CC-HIH038^T и *A. doebereinae* GSF71^T был выполнен анализ данных полногеномного секвенирования исследуемых штаммов. Было показано, что локусы биосинтеза ОПС двух исследуемых штаммов очень схожи по содержанию генов и организации (рис. 5).

Они содержали наборы генов, транскрибирующихся в одном направлении и кодирующих ферменты биосинтеза нуклеотиддифосфатного производного L-Rha (*rfbA*, *rfbB*, *rfbC*, *rfbD*), гликозилтрансферазы, а также ферменты процессинга, обеспечивающие трансмембранный перенос повторяющегося звена (*wzt*, *wzm*). Характеристики всех открытых рамок считывания и их гомологов, выявленных нами с помощью биоинформатического анализа, приведены в табл. 2. Следует отметить, что довольно часто кластер генов, участвующих в биосинтезе О-антигена, ограничен двумя консервативными генами, например, у *Escherichia coli* и родственных им бактерий он расположен на хромосоме между консервативными генами *galF* и *gnd* (Liu et al., 2020). Пока нам не удалось выявить аналогичной закономерности у азоспирилл, что, возможно, обусловлено ограниченностью сведений об организации их генных кластеров биосинтеза О-антигенов.

Инициация синтеза полимерной цепи ОПС, как правило, начинается с переноса N-ацетилглюкозамин-1-фосфата на ундекапренилфосфат и образования так называемого “праймера ОПС”. Эта реакция катализируется GlcNAc-1-фосфат-трансферазой (WecA), относящейся к семейству трансфераз (PNPT), участвующих в сборке гликанов бактериальной клеточной поверхности (Woodward, Naismith, 2016). В составе ОПС *A. agricola* CC-HIH038^T и *A. doebereinae* GSF71^T выявлен остаток GlcNAc, который, с высокой

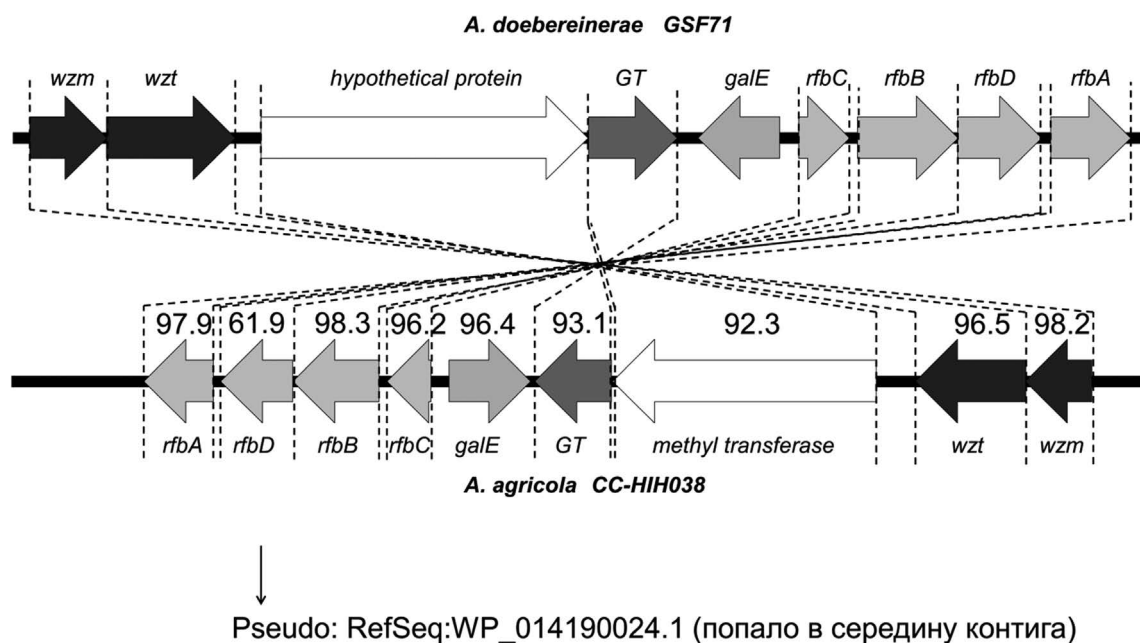


Рис. 5. Схематичное расположение кластеров генов биосинтеза О-антигенов *A. doebereinae* GSF71^T и *A. agricola* CC-HIH038^T. Светло-серыми стрелками обозначены гены биосинтеза моносахаридов, темно-серыми — гликозилтрансферазы, черными — гены процессинга *wzt* и *wzm*, белыми — гены с неизвестными функциями.

Таблица 2. Белки биосинтеза О-антигенов *A. agricola* CC-HIH038^T и *A. doebereinae* GSF71^T и их ближайшие гомологи

Ген	Кодируемый белок	Штамм (код доступа)			
		<i>A. agricola</i> CC-HIH038 ^T (GCF_017876095.1)		<i>A. doebereinae</i> GSF71 ^T (VTTN01000010.1)	
		CDS (ID белка)	Ближайший гомолог* покрытие/иден- тичность (длина совпадающего фрагмента)	CDS (ID белка)	Ближайший гомолог* Покрывте/идентич- ность (длина совпа- дающего фрагмента)
<i>wzm</i>	АВС-транспортная пермеаза	12456..13289** (WP_209782658.1)	<i>Nitrospira</i> sp. (MCA9458094.1) 97/60 (271)	44148..44981 (RUQ68956.1)	<i>Nitrospira</i> sp. (MCA9458094.1) 97/60 (271)
<i>wzt</i>	АВС-транспортный АТФ-связывающий белок	11084..12466 (WP_014190028.1)	<i>Negativicutes bacterium</i> (MDR3564473.1) 95/76 (440)	44971..46350 (RUQ68834.1)	<i>Negativicutes bacterium</i> (MDR3564473.1) 95/76 (440)
MT	SAM-зависимая метилтрансфераза класса 1	7295..10591 (WP_209782630.1)	<i>Rhodospirillaceae bacterium</i> (MBT4739842.1) 99/47 (1045)	46626..50132 (RUQ68835.1)	<i>Rhodospirillaceae bacterium</i> (MBT4739842.1) 94/47 (1045)
GT	Гликозилтрансфераза	6327..7286 (WP_209782629.1)	<i>Rhodospirillaceae bacterium</i> (MDX2225046.1) 91/57 (304)	50141..51085 (RUQ68836.1)	<i>Pseudomonadota bacterium</i> (MCA0201587.1) 90/58 (291)
<i>GalE</i>	UDP-глюкозо 4-эпимераза	5256..6278 (WP_209782628.1)	<i>Thalassospira</i> sp. TSL5-1 (WP_073954240.1) 94/65 (331)	51134..52156 (complement) (RUQ68837.1)	<i>Alphaproteobacteria bacterium</i> (GIK99467.1) 96/70 (332)
<i>rfbC</i>	dTDP-4-дегидро-маннозо 3,5-эпимераза	4475..5026 (complement) (WP_209782627.1)	<i>Methylobacterium</i> sp. B34 (WP_042673940.1) 100/79 (183)	52386..52937 (RUQ68838.1)	<i>Methylobacterium</i> sp. B34 (WP_042673940.1) 100/78 (183)
<i>rfbB</i>	dTDP-глюкозо-4,6-дегидратаза	3302..4378 (complement) (WP_209782626.1)	<i>Pararhodospirillum photometricum</i> (WP_051013520.1) 97/79 (353)	53018..54097 (RUQ68839.1)	<i>P. photometricum</i> DSM 122 (CCG06590.1) 96/79 (358)
<i>rfbD</i>	dTDP-4-дегидроманнозоредуктаза	2397..>3299 (complement) неполный RefSeq: WP_014190024.1	<i>P. photometricum</i> DSM 122 (CCG06589.1) 98/63 (300)	54094..54993 (RUQ68840.1)	<i>Pararhodospirillum photometricum</i> DSM 122 (CCG06589.1) 98/62 (300)
<i>rfbA</i>	Глюкозо-1-фосфат тимидил-трансфераза	1441..2304 (complement) (WP_209782624.1)	<i>P. photometricum</i> (WP_041795448.1) 100/79 (288)	55086..55949 (RUQ68841.1)	<i>P. photometricum</i> (WP_041795448.1) 98/80 (288)

*Бактерия (код GenBank ближайшего гомолога). **Нумерация в контиге Ga0451084_35.

долей вероятности, можно считать первым в биологическом повторяющемся звене. Однако нам не удалось идентифицировать в геномах обоих штаммов гены гомологичные *wesA*, охарактеризованным у других бактерий.

Гены биосинтеза нуклеотидного предшественника D-GlcNAc относятся к так называемым генам “домашнего хозяйства” и обычно не входят в специфическую область генного кластера ОПС. Три остальных моносахарида в повторяющемся

звене ОПС исследуемых штаммов представлены 3-замещенными остатками L-Rhap, синтез предшественника которых дезокситимидиндифосфат-L-рамнозы осуществляют четыре фермента: глюкозо-1-фосфаттимидилтрансфераза (RfbA), dTDP-D-глюкозо-4,6-дегидратаза (RfbB), dTDP-4-кето-6-дезоксид-D-глюкозо-3,5-эпимераза (RfbC) и dTDP-4-кето-L-Rha редуктаза (RfbD) (Li et al., 2022), кодируемые генами *rfbABCD*, располагающимися в кластере в консервативном порядке (Madduri et al., 2001).

В локусе выявлен ген гликозилтрансферазы (GT) (табл. 2), биоинформатический анализ которого не демонстрировал существенной гомологии с охарактеризованными генами рамнозилтрансфераз у ограниченного числа бета- и гамма-протеобактерий (*Pseudomonas* spp., *Burkholderia* spp., *Neisseria* spp., *Bordetella* spp., *Acinetobacter baumannii*), что может быть обусловлено вариабельностью структур данного фермента у представителей филогенетически удаленных групп. Следует отметить, что для классификации большого семейства гликозилтрансфераз используют три основных подхода, основанные на: а) анализе аномерной конфигурации реагентов и продуктов реакции, соответственно выделяющие инвертирующие или удерживающие (сохраняющие конфигурацию) GT; б) топологии GT, т.е. характеристике доменной структуры (укладки Россмана) и расположения доноров и акцепторов – GT-A, GT-B и GT-C; в) гомологии последовательностей – 135 различных семейств GT (по состоянию на 15 апреля 2024 г.) в базе данных Carbohydrate-Active enZymes (<http://www.cazy.org>). При широкой распространенности у бактерий рамнозосодержащих полимеров очевидно присутствие отнесенных по классификации CAZy к классу GT-2 рамнозилтрансфераз, сведения о структурных и биохимических особенностях которых остаются лимитированы (Kenyon et al., 2021a, 2021b).

Таким образом, генетические данные, в целом, согласуются с установленными структурами ОПС и могут быть использованы при разработке молекулярной основы для хемотипической классификации штаммов азоспирилл. Учитывая востребованность азоспирилл для биотехнологического использования, а также возникающие противоречия осуществляемого почти исключительно путем секвенирования 16S рРНК (Maronishe et al., 2017), в качестве альтернативных маркеров можно использовать хемотипирование на основании структур О-антигенов и сходство генов их биосинтеза.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Дальневосточного центра структурных

молекулярных исследований (ЯМР- и масс-спектрометрии) (ЦСМИ ТИБОХ ДВО РАН).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кульшин В.А., Яковлев А.П., Аваева С.Н., Дмитриев Б.А. Улучшенный метод выделения липополисахаридов из грамотрицательных бактерий // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 1987. № 5. С. 44–46.
- Kulshin V.A., Yakovlev A.P., Avaeva S.N., Dmitriev B.A. An improved method for the isolation of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria // Mol. genetics, microbiology and virology. 1987. № 5. P. 44–46.
- Сигида Е.Н., Гринев В.С., Здоровенко Э.Л., Дмитренко А.С., Бурьгин Г.Л., Кондюрина Н.К., Коннова С.А., Федоненко Ю.П. Характеристика структуры и генов биосинтеза О-антигенов *Azospirillum zeae* N7(T), *Azospirillum melinis* TMCY0552(T) и *Azospirillum palustre* B2(T) // Биоорг. химия. 2022. Т. 48. С. 302–312.
- Sigida E.N., Grinev V.S., Zdrovenko E.L., Dmitrenko A.S., Burygin G.L., Kondurina N.K., Konnova S.A., Fedonenko Y.P. O-Antigens of *Azospirillum zeae* N7 (T), *Azospirillum melinis* TMCY0552 (T), and *Azospirillum palustre* B2 (T): structure elucidation and analysis of biosynthesis genes // Rus. J. Bioorg. Chem. 2022. V. 48. P. 519–528.
- Федоненко Ю.П., Сигида Е.Н., Коннова С.А., Игнатов В.В. Структура и серология О-антигенов азотфиксирующих ризобактерий рода *Azospirillum* // Известия АН. Сер. химическая. 2015. Т. 64. С. 1024–1031.
- Fedonenko Y.P., Sigida E.N., Konnova S.A., Ignatov V.V. Structure and serology of O-antigens of nitrogen-fixing rhizobacteria of the genus *Azospirillum* // Rus. Chem. Bull. 2015. V. 64. P. 1024–1031.
- Altona C., Haasnoot C.A.G. Prediction of *anti* and *gauche* vicinal proton-proton coupling constants in carbohydrates: a simple additivity rule for pyranose rings // Org. Magn. Reson. 1980. V. 13. P. 417–429.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.

- Bock K., Pedersen C. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27–66.
- Caroff M., Novikov A. Lipopolysaccharides: structure, function and bacterial identification // OCL. 2020. V. 27. Art. 31.
- Cassán F., Coniglio A., López G., Molina R., Nievas S., Le Noir de Carlan C., Donadio F., Torres D., Rosas S., Pedrosa F.O., de Souza E., Zorita M.D., de-Bashan L., Mora V. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond // Biol. Fertil. Soils. 2020. V. 56. P. 461–479.
- Fukami J., Cerezini P., Hungria M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation // Amb. Express. 2018. V. 8. Art. 73.
- Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stain polyacrylamide gels // J. Bacteriol. 1983. V. 154. P. 269–277.
- Kenyon J.J., Arbatsky N.P., Sweeney E.L., Zhang Y., Senchenkova S.N., Popova A.V., Shneider M.M., Shashkov A.S., Liu B., Hall R.M., Knirel Y.A. Involvement of a multifunctional rhamnosyltransferase in the synthesis of three related *Acinetobacter baumannii* capsular polysaccharides K55, K74 and K85 // Int. J. Biol. Macromol. 2021a. V. 166. P. 1230–1237.
- Kenyon J.J., Kasimova A.A., Sviridova A.N., Shpirt A.M., Shneider M.M., Mikhaylova Y.V., Shelenkov A.A., Popova A.V., Perepelov A.V., Shashkov A.S., Dmitrenok A.S. Correlation of *Acinetobacter baumannii* K144 and K86 capsular polysaccharide structures with genes at the K locus reveals the involvement of a novel multifunctional rhamnosyltransferase for structural synthesis // Int. J. Biol. Macromol. 2021b. V. 193. P. 1294–1300.
- Konnova S.A., Makarov O.E., Skvortsov I.M., Ignatov V.V. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum* – wheat root interaction // FEMS Microbiol. Lett. 1994. V. 118. P. 93–99.
- Leontein K., Lindberg B., Lönngren J. Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols // Carbohydr. Res. 1978. V. 62. P. 359–362.
- Li S., Chen F., Li Y., Wang L., Li H., Gu G., Li E. Rhamnose-containing compounds: biosynthesis and applications // Molecules. 2022. V. 27. Art. 5315.
- Liu B., Furevi A., Perepelov A.V., Guo X., Cao H., Wang Q., Reeves P.R., Knirel Y.A., Wang L., Widmalm G. Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens // FEMS Microbiol. Rev. 2020. V. 44. P. 655–683.
- Madduri K., Waldron C., Merlo D.J. Rhamnose biosynthesis pathway supplies precursors for primary and secondary metabolism in *Saccharopolyspora spinosa* // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 5632–5638.
- Maroniche G.A., García J.E., Salcedo F., Creus C.M. Molecular identification of *Azospirillum* spp.: limitations of 16S rRNA and qualities of *rpoD* as genetic markers // Microbiol. Res. 2017. V. 195. P. 1–10.
- Mayer H., Tharanathan R., Weckesser J. Analysis of lipopolysaccharides of gram-negative bacteria // Meth Microbiol. 1985. V. 18. P. 157–207.
- Mistou M.Y., Sutcliffe I.C., van Sorge N.M. Bacterial glycobiology: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria // FEMS Microbiol. Rev. 2016. V. 40. P. 464–479.
- Nievas S., Coniglio A., Takahashi W.Y., López G.A., Larama G., Torres D., Rosas S., Etto R.M., Galvão C.W., Mora V., Cassán F. Unraveling *Azospirillum*'s colonization ability through microbiological and molecular evidence // J. App. Microbiol. 2023. V. 134. Art. lxad071.
- Pedraza R.O., Filippone M.P., Fontana C., Salazar S.M., Ramírez-Mata A., Sierra-Cacho D., Baca B.E. Chapter 6 – *Azospirillum* // Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi/ Eds. Amare-san N., Senthil Kumar M., Annapurna K., Kumar K., Sankaranarayanan A. Elsevier, Academic Press, 2020. P. 73–105.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00006-X>
- Sawardeker J.S., Sloneker J.H., Jeanes A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography // Anal. Chem. 1965. V. 37. P. 1602–1603.
- Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Knirel Y.A. Structure of the O-specific polysaccharide of *Azospirillum doebereineriae* type strain GSF71T // Carbohydr. Res. 2019. V. 478. P. 54–57.
- Sullivan M.J., Petty N.K., Beatson S.A. Easyfig: a genome comparison visualizer // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 1009–1010.
- Tsai C.M., Frasch C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels // Anal. Biochem. 1982. V. 119. P. 115–119.
- Woodward L., Naismith J.H. Bacterial polysaccharide synthesis and export // Curr. Opin. Struct. Biol. 2016. V. 40. P. 81–88.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Structural and Genetic Relationship of the O-Antigens of the Type Strains *Azospirillum agricola* CC-HIH038 and *Azospirillum doebereinae* GSF71

E. N. Sigida^{1, *}, V. S. Grinev^{1, 2}, M. S. Kokoulin³, S. A. Konnova^{1, 2}, Y. P. Fedonenko¹

¹*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, FRC Saratov Scientific Centre of Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia*

²*Chernyshevsky Saratov State University, 83, Ulitsa Astrakhanskaya, Saratov, 410012, Russia*

³*G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, 159/2, Prospekt 100 let Vladivostoku, Vladivostok, 690022, Russia*

**e-mail: sigida_e@ibppm.ru*

Lipopolysaccharide was isolated from cells of the type strain of rhizobacteria *Azospirillum agricola* CC-HIH038^T by phenol extraction. O-specific polysaccharide was obtained by mild acid hydrolysis of lipopolysaccharide followed by chromatographic fractionation. On the basis of monosaccharide analysis, including determination of absolute configurations, 1D and 2D ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, the following structure of the O-specific polysaccharide repeating unit of *A. agricola* CC-HIH038^T was elucidated: →3)-α-L-Rhap2Ac-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→3)-β-D-GlcpNAc6Ac-(1→, which is structurally related to *A. doebereinae* GSF71^T. Based on the analysis of full-genome sequencing data for strains *A. agricola* CC-HIH038^T and *A. doebereinae* GSF71^T the O-specific polysaccharide biosynthesis loci were identified, which were characterized by a similar organization and a high level of gene homology, confirming the common structure of the O-antigens of these strains.

Keywords: *Azospirillum*, lipopolysaccharide, O-specific polysaccharide, O-specific polysaccharide structure, O-antigen biosynthesis gene cluster