



Iwona Komaniecka

AUTOREFERAT

**„Wybrane elementy ściany komórkowej bakterii z rodzaju
Bradyrhizobium”**

Lublin, 2015

Spis treści:	Strona:
1. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	3
2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
3. Tytuł osiągnięcia naukowego	4
4. Publikacje wchodzące w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego	5
5. Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników	6
Wprowadzenie	6
Opis osiągnięcia naukowego	9
Podsumowanie najważniejszych osiągnięć	18
Bibliografia	20
6. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze	23
A\ Praca naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora	23
1) Studia i praca magisterska	23
2) Praca naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora	24
3) Praca doktorska	27
4) Bibliografia	29
B\ Praca naukowa po uzyskaniu stopnia doktora	30
1) Badania struktury lipopolisacharydu <i>Azospirillum lipoferum</i> SpBr17	30
2) Oznaczanie obecności antybiotyków z grupy cefalosporyn w mleku krowim techniką chromatograficzną połączoną z bioautografią	31
3) Ustalenie struktury lipidu A oraz polisacharydu O-swoistego <i>Azorhizobium caulinodans</i> – kontynuacja wcześniejszych badań	31
4) Badania strukturalne lipopolisacharydu <i>Aeromonas spp</i>	32
5) Badania struktury α -glukanów pochodzących z grzybów i owocników roślin oraz ich właściwości immunomodulacyjne	32
6) Egzopolisacharyd <i>Sinorhizobium meliloti</i> jako chelator jonów chromu (III)	33
7) Charakterystyka chemiczna grzybowej dehydrogenazy celobiozowej	33
8) Badania strukturalne polisacharydu O-swoistego izolowanego z LPS bakterii z rodzaju <i>Phyllobacterium</i> i <i>Ochrobactrum</i>	34
9) Badania wrażliwości błony zewnętrznej rizobiów na antybiotyki peptydowy - polimyksynę B	35
7. Podsumowanie aktywności naukowej	36

1. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

Tytuł magistra – Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie: Wydział Biologii
i Biotechnologii), **kierunek: biologia, specjalność: mikrobiologia,**
Lublin, **czerwiec 1999**

Tytuł pracy magisterskiej: „Charakterystyka chemiczna lipopolisacharydu *Mesorhizobium ciceri* HAMBI 1750”

promotor: Prof. dr hab. Ryszard Russa

Stopień doktora - Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie: Wydział Biologii
i Biotechnologii), **dziedzina: nauki biologiczne, dyscyplina: biologia**
Lublin, **czerwiec 2005**

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Lipopolisacharyd i peryplazmatyczny β -glukan *Azorhizobium caulinodans*”

promotor: Prof. dr hab. Ryszard Russa

2. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

Miejsce pracy: Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (od 2011 roku: Wydział Biologii i Biotechnologii).

10. 1999 – 09.2000	starszy referent inżynierjno-techniczny w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej;
10.2000 – 09.2005	asystent w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (od 10.2001 w wymiarze 1/3 etatu, a od 10.2003 r. 3/4 etatu);
10.2001 – 06.2005	doktorant: Studium Doktoranckie z zakresu biologii przy Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi;
10.2005 – obecnie	adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej (od roku 2007: Zakład Genetyki i Mikrobiologii).

3. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.(Dz. U. 2005 nr 164, poz. 1365, art. 251; Dz. U. 2011, nr 84, poz. 455)).

Osiągnięcie naukowe stanowi jednotematyczny cykl sześciu publikacji pod wspólnym tytułem:

„Wybrane elementy ściany komórkowej bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium*”

Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe stanowi cykl **5 oryginalnych publikacji naukowych** oraz **1 praca przeglądowa**, których sumaryczny *impact factor* (IF) podany zgodnie z rokiem ukazania się publikacji wynosi: **15.126** (sumaryczny pięcioletni **IF** w/w publikacji wynosi **15.778**).

Praca przeglądowa (**Publikacja nr 1**) opublikowana została w 2008 roku w Postęпах Mikrobiologii. Wówczas czasopismo to nie figurowało na liście JCR. Jest ono odnotowane na ww. liście od roku 2009 i obecnie posiada pięcioletni IF.

Suma punktów **MNiSW** podana zgodnie z aktualnym ujednoliconym wykazem czasopism punktowanych, z grudnia 2014 roku, wynosi **145 pkt**, zaś wg. wykazów obowiązujących w roku opublikowania wynosi **139 pkt**.

Prace badawcze wchodzące w skład osiągnięcia naukowego były w części finansowane ze środków przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach trzech grantów zespołowych, w których byłam głównym wykonawcą (2 granty: N303 109 32/3593 oraz N N303 822840) lub wykonawcą (grant N303 108 32/3585) oraz w ramach badań własnych i statutowych Zakładu Genetyki i Mikrobiologii UMCS.

Część badań wymagająca dostępu do specjalistycznej aparatury badawczej została przeprowadzona podczas pobytów stażowych w centrum badawczym – Research Center Borstel, Leibnitz Center for Medicine and Biosciences, w Niemczech, w latach: **2008, 2009, 2011 i 2013**; łączny czas pobytu w ww. ośrodku wyniósł **11 miesięcy**.

4. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ZGŁASZANEGO OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	IF _{5lat}	Punkty MNiSW	Punkty MNiSW ₂₀₁₄
1.	Komaniecka* I. , Choma A. (2008) Peryplazmatyczne β-glukany bakterii Gram-ujemnych. <i>Post. Mikrobiol.</i> 47, 35-42 (praca przeglądowa).	—	0.273	4 ₂₀₀₈	15
2.	Choma A., Komaniecka I. (2011) Characterisation of cyclic β-glucans of <i>Bradyrhizobium</i> by MALDI-TOF mass spectrometry. <i>Carbohydr. Res.</i> 346, 1945-1950.	2.332	2.133	25 ₂₀₁₁	25
3.	Komaniecka* I. , Zdzińska B., Kandefer-Szerszeń M., Choma A. (2010) Low endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Mesorhizobium</i> and <i>Azospirillum</i> strains. <i>Microbiol. Immunol.</i> 54, 717-725.	1.227	1.343	20 ₂₀₁₀	15
4.	Choma A., Komaniecka I. (2011) Straight and branched ω-1 hydroxylated very long chain fatty acids are components of <i>Bradyrhizobium</i> lipid A. <i>Acta Biochim. Pol.</i> 58, 51-57.	1.491	1.558	15 ₂₀₁₁	15
5.	Komaniecka* I. , Choma A., Lindner B., Holst O. (2010) The structure of a novel neutral lipid A from the lipopolysaccharide of <i>Bradyrhizobium elkanii</i> containing three mannose units in the backbone. <i>Chem. Eur. J.</i> 16, 2922 – 2929.	5.476	5.608	40 ₂₀₁₀	40
6.	Komaniecka* I. , Choma A., Mazur A., Duda K.A., Lindner B., Schwudke D., Holst O. (2014) Occurrence of an unusual hopanoid-containing lipid A among lipopolysaccharides from <i>Bradyrhizobium</i> species. <i>J. Biol. Chem.</i> 289 (51), 35644-35655.	4.600	4.863	35 ₂₀₁₄	35
Suma punktów:		15.126	15.778	139	145

* - Autor korespondencyjny

5. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW

WPROWADZENIE

Występujące w glebie Gram-ujemne bakterie, określane wspólnym mianem rizobia, posiadają unikalną zdolność do tworzenia brodawek na korzeniach, a czasem również na łodygach, roślin z rodziny bobowate (*Fabaceae*). Wymiernym efektem symbiozy jest uzyskanie przez gospodarza roślinnego przyswajalnych form azotu. Symbiotyczne interakcje pomiędzy rizobiami, a roślinami motylkowatymi, od wielu lat są przedmiotem intensywnych badań. W procesie nawiązywania wzajemnej interakcji biorą udział zarówno związki budujące ścianę komórkową rizobium jak i polimery luźno związane z komórką, a także związki wydzielane do środowiska zewnętrznego. Wśród związków kluczowych dla procesu symbiozy wymienia się: kwaśne egzopolisacharydy (EPS), kapsularne polisacharydy (CPS), lipopolisacharydy (LPS) i peryplazmatyczne β -glukany [Kannenberg i wsp., 1998]. Lipopolisacharydy budujące wraz z białkami zewnętrzną warstwę błony zewnętrznej (OM) bakterii Gram-ujemnych, mają szczególne znaczenie w tworzeniu układów symbiotycznych rizobium - roślina motylkowata. Makromolekuły te chronią komórki mikrosymbiontów przed działaniem mechanizmów obronnych rośliny gospodarza i wpływają na architekturę membrany zewnętrznej sprawiając, że powstające symbiosomy (pseudoorganelle, w których zachodzi proces wiązania azotu atmosferycznego) mają prawidłową morfologię i są w pełni funkcjonalne [Kannenberg i Carlson, 2001; Raetz i Whitfield, 2002; Wang i wsp., 2012; Haag i wsp., 2013].

Lipopolisacharyd - makrocząsteczkowy glikolipid jest integralnym składnikiem ściany komórkowej u niemal wszystkich bakterii Gram-ujemnych. Cząsteczki lipopolisacharydu mają strukturę trójdomenową. Domeny te połączone są ze sobą kowalencyjnie, ale są odmienne w odniesieniu do ich genetyki, biosyntezy, właściwości biologicznych i struktury chemicznej. Część glikolipidowa zwana lipidem A, dzięki oddziaływaniom hydrofobowym i elektrostatycznym, kotwiczy makrocząsteczkę LPS w błonie zewnętrznej bakterii. Część glikanowa, zwana polisacharydem O-swoistym lub O-antygenem, łączy się poprzez oligosacharyd rdzeniowy z częścią lipidową LPS. Region rdzeniowy zawiera przynajmniej jedną resztę kwasu 3-deoksy-D-manno-okt-2-ulozonowego (Kdo), który może być traktowany jako chemiczny marker obecności LPS [Raetz i Whitfield, 2002; Molinaro i wsp., 2015]. Lipopolisacharydy to efektywnie działająca bariera chroniąca bakterie Gram-ujemne przed czynnikami środowiskowymi, lekami oraz innymi szkodliwymi substancjami o charakterze hydrofobowym [Raetz i Whitfield, 2002]. Uważa się, że pełny, tzw. gładki LPS (LPS-S), chroni bakterie patogenne dla człowieka przed lizą nie dopuszczając do wbudowania się kompleksu litycznego MAC w błony bakteryjne. Udowodniono, że w przypadku rizobiów, tzw. LPS I (gładki, LPS-S) stabilizuje błonę zewnętrzną, czego nie jest w stanie dokonać LPS II (szorstki, LPS-R, pozbawiony łańcuchów O-swoistych) [Kannenberg i wsp., 1998]. Łańcuchy polisacharydowe przesłaniając struktury błonowe takie jak: integralne białka, region rdzeniowy i lipid A z LPS zapobiegają indukcji roślinnych mechanizmów obronnych tj.: reakcji nadwrażliwości (HR) czy reakcji uogólnionej nabytej odporności

(SAR) [Albus i wsp., 2000; Dow i wsp., 2000; Menezes i Jared, 2002; Silipo i wsp., 2010]. Kompletny lipopolisacharyd stabilizuje błonę zewnętrzną bakterii, co zapewnia bakteriom symbiotycznym bezpieczeństwo w trakcie przemieszczania się i proliferacji wewnątrz nici infekcyjnej. Szczególne znaczenie ma to w niciach o wąskim przekroju, występujących u roślin tworzących brodawki o ograniczonym wzroście. Stabilna błona zewnętrzna bakterii jest gwarantem, że tworzące i dzielące się symbiosomy będą miały prawidłową strukturę, a brodawki będą funkcjonalne.

LPS izolowany z komórek enterobakterii zazwyczaj jest toksyczny w stosunku do organizmów ssaków, co wynika z określonej struktury lipidu A. Toksyczny, enterobakteryjny lipid A posiada szkielet zbudowany z dwucukru glukozaminyowego [β -D-GlcpN-(1→6)-D-GlcpN], podstawionego dwiema grupami ortofosforanowymi w pozycjach: C-1 i C-4'. Sześć reszt kwasów tłuszczowych, które tworzą dwa ugrupowania acyloksyacylowe podstawia odpowiednio pozycje C-2, C-3, C-2' i C-3' szkieletu cukrowego [Raetz i Whitfield, 2002]. Aktywność biologiczna takiego lipidu A wynika z jego zdolności do wbudowywania się do kompleksu receptorowego TLR4-MD2, znajdującego się na powierzchni makrofagów i komórek endotelium, prowadząc do jego aktywacji [Park i wsp., 2009]. Aktywacja kompleksu TLR4-MD2 inicjuje kaskadę sygnałową, która wywołuje w makrofagach wzmożoną syntezę czynników prozapalnych, takich jak IL-1 β , IL-6 czy TNF. W przypadku masowej nadprodukcji tychże czynników może dojść do reakcji szoku septycznego i śmierci [Beutler i Rietschel, 2003]. Dowiedziono, że jedynie lipid A o ściśle określonej strukturze jest zdolny do aktywacji kompleksu receptorowego TLR4-MD-2. Decydujące znaczenie ma tu liczba kwasów tłuszczowych, ich długość, miejsce przyłączenia i konformacja przestrzenna, a także obecność ujemnie naładowanych reszt podstawiających szkielet cukrowy [Poltorak i wsp., 1998; Raetz i Whitfield, 2002]. Lipidy A, których struktura różni się od modelu enterobakteryjnego są zazwyczaj słabo lub w ogóle nietoksyczne dla organizmu człowieka [Urbanik-Sypniewska i wsp., 2000; Tsukushi i wsp., 2004]. Takie lipidy A opisano w grupie rizobiów. U tych bakterii szkielet cukrowy może być zbudowany podobnie do lipidu A enterobakterii, albo na bazie 2,3-diamino-2,3-dideoksyglukozy (GlcpN3N). U niektórych rizobiów redukująca reszta glukozaminy może być utleniona do 2-aminoglukonianu [Bhat i wsp., 1994]. Szkielet cukrowy lipidu A rizobium może być dekorowany resztą/ami fosforanowymi lub kwasem uronowym. Z kolei grupy aminowe diaminoglukozy i glukozaminy oraz pozycje C-3 i C-3' glukozaminy są podstawione 3-hydroksykwasami tłuszczowymi. Grupy hydroksylowe tych kwasów mogą być dodatkowo podstawione kwasami niepolarnymi lub długołańcuchowym kwasem tłuszczowym hydroksylowany w pozycji (ω -1), tworząc reszty acyloksyacylowe [Gil-Serrano i wsp., 1994; Russa i wsp., 1995; Que i wsp., 2000; Choma i Sowinski, 2004]. Zazwyczaj u rizobiów występuje kwas 27-hydroksyoktakozanowy, którego brak odnotowano jedynie w przypadku *Azorhizobium caulinodans* [Bhat i wsp. 1991a, 1991b, Choma i wsp., 2012].

W taksonomii rizobiów przyjmuje się podział na mikroorganizmy szybko rosnące (czas generacji poniżej 6-ciu godzin), do których należą m. in. bakterie z rodzajów *Rhizobium*, *Sinorhizobium* czy *Mesorhizobium* oraz rizobia wolno rosnące (czas generacji wydłużony do około 9-10 godzin

i powyżej), gdzie klasyfikuje się rodzaje *Bradyrhizobium* i *Azorhizobium* [Ormeño-Orrillo i wsp., 2015]. Grupy te różni szereg cech fizjologicznych i morfologicznych, włącznie ze strukturą składników powierzchniowych. Elementy struktur powierzchniowych rizobów szybko- i wolnorosnących zostały dość dobrze poznane i opisane, natomiast lipopolisacharydy bakterii wolnorosnących były badane sporadycznie, a główny nacisk kładziono na poznanie ich heterogenności metodą SDS-PAGE oraz ich funkcji, poprzez analizę mutantów LPS defektywnych w symbiozie. Badania analizujące strukturę tych makrocząsteczek to między innymi efekt prac prowadzonych w ciągu ostatnich kilku lat w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii UMCS.

Obszar moich zainteresowań badawczych, których część składa się na osiągnięcie habilitacyjne, koncentrował się wokół analizy struktury i właściwości peryplazmatycznych β -glukanów oraz lipopolisacharydu bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* ze szczególnym uwzględnieniem struktury i właściwości ich niezwykle lipidów A.

W momencie rozpoczęcia badań znana była budowa i sposób biosyntezy peryplazmatycznego glukanu syntetyzowanego przez komórki *Bradyrhizobium japonicum* [Bohin, 2000]. Brak było danych opisujących strukturę i sposoby podstawienia składnikami niecukrowymi β -glukanów innych przedstawicieli rodzaju *Bradyrhizobium*. Również skromne dane dotyczyły struktury lipopolisacharydu *Bradyrhizobium*. Wskazywano m.in. na obecność 2,3-diamino-2,3-dideoksyglukozy (Glc_pN_{3N}) zamiast glukozaminy (Glc_pN) w lipidzie A tych bakterii. Sugerowano również obniżoną aktywność endotoksyczną LPS tego typu bakterii [Loppnow i wsp., 1990].

Trzon osiągnięcia stanowi pięć prac doświadczalnych oraz jedna praca przeglądowa. W pracy przeglądowej opisano budowę, rolę i znaczenie peryplazmatycznych β -glukanów u bakterii Gram-ujemnych, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii symbiotycznych i roślinnych patogenów. Jako uzupełnienie wiedzy dotyczącej β -glukanów bakterii symbiotycznych, do osiągnięcia włączona została praca badawcza opisująca strukturę cyklicznych oligosacharydów wyizolowanych z kilku nieprzebadanych wcześniej gatunków *Bradyrhizobium*. Badania oparto głównie na analizach wykonanych techniką spektrometrii mas (MALDI-TOF). W dalszej części osiągnięcia zawiera pracę dotyczącą badań nad właściwościami biologicznymi LPS *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* i *Azospirillum*. Badania te były prowadzone jednocześnie z analizą długołańcuchowych hydroksykwasów tłuszczowych wchodzących w skład lipidu A *Bradyrhizobium* oraz próbami ustalenia kompleksowej struktury tego lipidu A w oparciu o nowoczesne techniki instrumentalne: wysokorozdzielczą spektrometrię mas (ESI FT-ICR MS/MS i MALDI TOF) oraz dwuwymiarową spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (2D NMR). Uzyskane wyniki – poznanie całkowicie odmiennego od dotychczas opisanych typów lipidu A - pozwoliły na wyjaśnienie przyczyn obserwowanych różnic we właściwościach biologicznych LPS *Bradyrhizobium*.

OPIS OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Wszystkie dotychczas przebadane rizobia produkują peryplazmatyczne β -glukany. Są to cykliczne oligosacharydy, o charakterze obojętnym lub anionowym. Najwcześniej zostały przebadane β -glukany produkowane przez przedstawicieli rodzajów *Rhizobium* i *Agrobacterium*. Wykazano, że są to cykliczne oligosacharydy, w których reszty glukozy są połączone wiązaniami β -(1 \rightarrow 2). Stopień polimeryzacji (DP) tych oligocukrów wynosi od 17 do 25, a w przypadku *Sinorhizobium meliloti* sięga aż 40 reszt. Glukany te mogą ulegać modyfikacjom polegającym na dołączeniu anionowych podstawników, takich jak *sn*-1-fosfoglicerol, bursztynian czy metylomalonian [Miller i wsp., 1987; Breedveld i Miller, 1998]. Linearna forma peryplazmatycznych β -(1 \rightarrow 2)-glukanów spotykana jest wyłącznie u enterobakterii i niektórych pasożytów roślin, takich jak *Erwinia chrysanthemi* czy *Pseudomonas syringae*. Mogą one zawierać od 5 do 13 reszt glukozy, która jest połączona głównie wiązaniami β -(1 \rightarrow 2), a liczne odgałęzienia tworzą reszty przyłączone wiązaniami typu β -(1 \rightarrow 6). Są one dodatkowo bogato dekorowane, np. resztami fosfoglicerolu, fosfoetanolaminy, kwasu octowego czy bursztynowego [Kennedy, 1996]. Z kolei *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* i *Rhodobacter sphaeroides* produkują peryplazmatyczne β -(1 \rightarrow 2)-glukany w formie cyklicznej, ale posiadające jedną resztę glukozy włączonej do pierścienia wiązaniem α -(1 \rightarrow 6). Obecność takiej reszty prawdopodobnie powoduje dodatkowe usztywnienie cząsteczki oligocukru [Lippens i wsp., 1998]. Rizobia wolnorosnące oraz *Azorhizobium* i *Azospirillum* produkują cykliczne oligocukry zbudowane z glukozy połączonej wiązaniami typu β -(1 \rightarrow 3);(1 \rightarrow 6). Rolin i współpracownicy [1992] opisali peryplazmatyczne glukany wyizolowane z *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. Są to cykliczne oligocukry zawierające od 10 do 12 reszt glukozy w pierścieniu, a dodatkowa reszta tworzy odgałęzienie boczne łączące się z pierścieniem poprzez grupę hydroksylową przy węglu C-6 jednej z reszt glukozy. Jedynym podstawnikiem, którego obecność stwierdzono, była fosfocholina. Jest to tzw. jon obojnaczy, który powoduje, że całkowity ładunek cząsteczki glukanu zależy od właściwości roztworu, w którym glukan jest rozpuszczony [Rolin i wsp., 1992]. Zebrane materiały, doświadczenie oraz literatura dotycząca tematu, pozwoliły na przygotowanie artykułu przeglądowego opisującego cykliczne glukany, w którym **przedstawiono klasyfikację tych oligocukrów, opisano ich biosyntezę oraz rolę i znaczenie tych związków dla bakterii symbiotycznych (Publikacja nr 1)**.

Celem uzupełnienia informacji dotyczących struktury peryplazmatycznych glukanów *Bradyrhizobium* poddano analizie oligosacharydy wyizolowane z trzech gatunków z tego rodzaju: *B. elkanii*, *B. liaoningense* oraz *B. yuanmingense*, u których nie prowadzono wcześniej tego typu analiz (**Publikacja nr 2**). Wyniki badań wykonanych techniką spektroskopii NMR oraz spektrometrii mas (MALDI-TOF) pozwoliły stwierdzić, że bradyrizobiowe glukany są, podobnie jak cykliczne oligocukry szybko rozpuszczalnych rizobiów, bogato dekorowane. U wszystkich przebadanych szczepów cykliczny β -(1 \rightarrow 3);(1 \rightarrow 6)-glukan o DP = 11-13, był podstawiony nie tylko fosfocholimą, ale również jedną, dwiema lub trzema resztami bursztynianu, a także acetylowany. U każdego z badanych szczepów cząsteczki

glukanu mogły być podstawione wyłącznie resztą acetylową, bursztynianową lub fosfocholimą lub zawierać dwa z w/w podstawników. W przypadku *B. elkanii* obserwowano cząsteczki glukanu podstawione jednocześnie wszystkimi trzema rodzajami podstawników, a także takie, które niosły wyłącznie dwie reszty fosfocholiny. U tych bakterii były też obecne oligocukry, zawierające dwie lub trzy reszty bursztynianu i dodatkowo grupę acetylową. **Wykazano, że stopień podstawienia i sposób dekoracji peryplazmatycznego glukanu ściśle zależy od gatunku i szczepu bradyrizobium.**

Kolejnym celem naukowym było poznanie właściwości biologicznych lipopolisacharydów szczepów rizobiowych. Badania były nowatorskie, gdyż LPS-y te posiadały lipidy A odmienne od modelu enterobakteryjnego. U progu badań wiadomym było, że pełną aktywność endotoksyczną przejawiają lipopolisacharydy zawierające lipid A zbudowany z dwóch cząsteczek glukozaminy, ufosforylowanych w pozycji C-1 i C-4' i podstawionych sześcioma resztami kwasów tłuszczowych, z których cztery tworzą ugrupowania acyloksyacylowe [Raetz i Whitfield, 2002]. Naturalnie występujące odmiany lipidów A o budowie wyraźnie odbiegającej od modelowej endotoksyny enterobakterii są zwykle nietoksyczne lub słabo toksyczne. Mała aktywność biologiczna wiąże się u nich z niskim powinowactwem LPS do odpowiednich receptorów komórek odpornościowych, a to z kolei może być spowodowane brakiem reszt fosforanowych w lipidzie A [Rietschel i wsp., 1994; Schromm i wsp., 1998]. Przypuszczano, że lipidy A *Mesorhizobium* i *Bradyrhizobium*, które zawierają 2,3-diamino-2,3-dideoksy-glukozę w miejsce glukozaminy mogą przejawiać obniżoną toksyczność [Mayer i wsp., 1989; Carlson i wsp., 1992]. Z kolei lipid A *Azospirillum* posiada szkielet cukrowy zbudowany z glukozaminy, jednak jest on podstawiony w pozycji C-1 resztą kwasu galakturonowego i jest całkowicie pozbawiony grup fosforanowych. Również wzór acylacji kwasami tłuszczowymi jest odmienny od enterobakterii. Lipid A *Azospirillum* posiada tylko jedno ugrupowanie acyloksyacylowe [Choma i Komaniecka, 2008].

Pewną wskazówką były badania przeprowadzone przez Loppnow'a i wsp. [1990] nad aktywnością biologiczną LPS *B. lupini* USDA 3045. Budowa lipidu A tego szczepu jeszcze nie była poznana, ale stwierdzono, że preparat LPS tego szczepu indukował syntezę IL-1 β i IL-6 w ludzkich monocytach na poziomie co najmniej równym LPS *Sinorhizobium meliloti*, jednakże był od niego dziesięciokrotnie mniej toksyczny dla uczulonych galaktozaminą myszy.

Toksyczność enterobakteryjnych lipidów A (lipopolisacharydów) jest wynikiem ich zdolności do przyłączania się do receptorów TLR4 (toll-like receptors), które są obecne na powierzchni ludzkich komórek odpornościowych. W makrofagach aktywacja receptorów TLR4 uruchamia biosyntezę różnych czynników prozapalnych (takich, jak: TNF i IL-1 β , IL-6). W przypadku nadmiernego nagromadzenia się tych cytokin może dojść do stanu szoku septycznego co niejednokrotnie prowadzi do zgonu [Raetz i Whitfield, 2002]. Do aktywacji receptorów TLR4, a tym samym do uruchomienia odpowiedzi immunologicznej w ludzkich komórkach odpornościowych wydaje się być niezbędna obecność grup fosforanowych i dwóch reszt acyloksyacylowych w lipidzie A [Aderem i Ulevitch, 2000; Poltorak i wsp., 1998; Raetz i Whitfield, 2002]. Stwierdzono, że cząsteczki lipidu A zawierającego

diaminoglukozę zamiast glukozaminy również są zdolne do wbudowania się w miejsca aktywne receptorów TLR4, ale nie prowadzi to do wystąpienia objawów szoku. Takie lipidy A blokują receptory i wyciszają reakcję obronną [Vandenplas i wsp., 2002]. Mogą one funkcjonować jako swego rodzaju remedium w zakażeniach enterobakteriami. Z tego powodu bardzo ważne jest prowadzenie prac nad poznaniem struktur lipidów A o składzie i budowie odmiennej od ich wysokotoksycznych odpowiedników enterobakteryjnych.

Właściwości endotoksyczne lipopolisacharydów wyizolowanych z pięciu szczepów *Bradyrhizobium*, oraz *Mesorhizobium huakuii* i *Azospirillum lipoferum* i oczyszczonych metodą elektrodializy [wg. Galanos i Lüderitz, 1975], badano, mierząc ilości wydzielanych cytokin (TNF, IL-1 β i IL-6) przez komórki THP-1. Mierzono również poziom uwalnianego tlenku azotu (NO) oraz zdolność do żelowania lizatu z amebocytów skrzypłocza (test LAL). Wyniki odnoszono do zachowania się standardowej endotoksyny *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. Badania biologicznej aktywności preparatów LPS prowadzono na komórkach ludzkiej białaczki monocytarnej (linia THP-1 z kolekcji ECACC) namnażanych na podłożu RPMI 1640 uzupełnionym antybiotykami i cielecą surowicą płodową, w atmosferze 5 % CO₂. W celu ustalenia optymalnych dawek LPS do testów indukcji cytokin, wstępnie zbadano ich toksyczność w stosunku do komórek THP-1 metodami kolorymetrycznymi: MTT i LDH. W przypadku LPS badanych szczepów *Bradyrhizobium* stwierdzono, że dawki 1 μ g/ml i poniżej są mało toksyczne – przeżywalność komórek wynosiła od 90 - 100 %. W przypadku endotoksyny *Salmonella* dawka 1 μ g/ml powodowała spadek żywotności komórek do 65 % i dwukrotny wzrost uwalniania LDH w stosunku do kontroli.

Do przeprowadzenia testów indukcji cytokin: TNF, IL-1 β i IL-6 wybrano dwie dawki LPS: 0,01 μ g/ml i 1 μ g/ml. W wyniku doświadczeń stwierdzono, że wydzielanie cytokin przez komórki indukowane niższą dawką rizobowego LPS (0,01 μ g/ml) było ekstremalnie niskie, a w przypadku interleukin (IL-1 β i IL-6) wręcz na poziomie spontanicznej produkcji cytokin przez komórki THP-1. Przy dawce LPS 1 μ g/ml odnotowano nieco wyższy poziom wydzielania cytokin, przy czym największe wartości (ale wciąż bardzo niskie w porównaniu z LPS *Salmonella*), zaobserwowano w przypadku LPS *M. huakuii*, *A. lipoferum* i *B. japonicum*. Z kolei podczas badania wydzielania tlenku azotu (NO) przez komórki linii THP-1 inkubowane z lipopolisacharydem *Bradyrhizobium* i *Salmonella* w dawce 1 μ g/ml, stwierdzono, że w przypadku dwóch szczepów: *B. liaoningense* i *B. yuanmingense* wydzielanie NO jest na poziomie kontroli, natomiast w przypadku LPS *Mesorhizobium*, *Azospirillum* i pozostałych szczepów *Bradyrhizobium*, ilość wydzielanego NO jest na poziomie około dwukrotnie niższym niż w przypadku LPS *Salmonella*. Aktywność biologiczną lipopolisacharydów badano przy pomocy testu żelowania lizatu z amebocytów skrzypłocza (test LAL). W przypadku LPS *B. japonicum* i *B. yuanmingense* żelowanie obserwowano przy stężeniu 0,1 μ g/ml, natomiast LPS *B. elkanii* i *B. liaoningense* dawał pozytywną reakcję przy stężeniu dziesięciokrotnie niższym - 0,01 μ g/ml. LPS *M. huakuii* i *A. lipoferum* wykazywał znacznie wyższą aktywność endotoksyczną. W ich przypadku, żelowanie obserwowano przy stężeniu 0,1 ng/ml. Standardowe endotoksyny pochodzące ze szczepów *Salmonella enterica* sv.

Typhimurium i *E. coli* O55:B5 żelowały amebocyty skrzypłocza już przy stężeniu 0,01 ng/ml (t.j. 0,00001 µg/ml). **Stwierdzono tym samym, że lipopolisacharydy (a właściwie lipidy A) *Bradyrhizobium* są 1 000 – 10 000 razy słabszymi endotoksynami niż LPS enterobakterii.** Wyniki powyższych badań opisano w **Publikacji nr 3**.

Różnice w biologicznej aktywności preparatów LPS *Bradyrhizobium* i standardowej endotoksyny odzwierciedlają różną strukturę lipidu A – centrum endotoksyczności cząsteczki LPS. Najważniejszymi czynnikami wpływającymi na immunologiczną aktywność LPS są: obecność w lipidzie A reszt fosforanowych oraz liczba, typ i dystrybucja kwasów tłuszczowych [Rietschel i wsp., 1994]. Do aktywności prozapalnej enterobakteryjnego lipidu A jest niezbędna obecność sześciu reszt kwasów tłuszczowych, z których dwa są niesymetrycznie zlokalizowane tworząc dwie reszty acyloksyacylowe. Brak jednej z nich powoduje około stukrotny spadek toksyczności, zaś lipid A niosący wyłącznie cztery pierwszorzędowe reszty kwasów tłuszczowych jest całkowicie nieaktywny biologicznie [Teghanemt i wsp., 2005; Park i wsp., 2009]. Na tym etapie badań można było stwierdzić, że zredukowana aktywność biologiczna bradyrizobiowych lipopolisacharydów mogła wynikać z różnego stopnia acylacji szkieletu cukrowego, jak również z obecności bardzo długich kwasów tłuszczowych, zawierających od 26 do 35 atomów węgla w łańcuchu. Obecność takich kwasów tłuszczowych prawdopodobnie upośledzała proces wbudowywania się cząsteczki LPS do miejsca aktywnego receptora MD-2. Co więcej, brak reszt fosforanowych w bradyrizobiowych lipidach A nie tylko wpływał na osłabienie powinowactwa glikolipidu do ligandu, lecz również mogło indukować strukturalną rearanżację adaptora multimerycznego receptora TLR4-MD-2, jak to stwierdzono w przypadku mutantów *Salmonella* Minnesota pozbawionych reszty fosforanowej w pozycji C-1 [Park i wsp., 2009]. W ten sposób zostaje zablokowane miejsce aktywne receptora TLR4 i nie dochodzi do powstania kompleksu TLR4-MD-2-LPS, który jest kluczowy w procesie aktywacji kaskady sygnałowej i biosyntezy czynników prozapalnych, takich jak: TNF, IL-1 β , czy IL-6 [Raetz i Whitfield, 2002].

Równoległe prowadzono badania nad **poznaniem struktury lipidu A u *Bradyrhizobium***. Prace te rozpoczęto od szczegółowej analizy kwasów tłuszczowych i innych składników lipidowych obecnych w preparatach LPS wszystkich szczepów *Bradyrhizobium*. Były one prowadzone w ramach dwóch grantów MNiSW realizowanych jednocześnie w grupie Prof. dr hab. Ryszarda Russy, w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii UMCS, w których byłam wykonawcą i głównym wykonawcą. U progu tych badań zidentyfikowano u *Bradyrhizobium* szereg kwasów tłuszczowych o niezwykle długich łańcuchach węglowodorowych i posiadających grupę hydroksylową umieszczoną w pozycji (ω -1). Dotychczas opisane lipidy A bakterii z grupy rizobiów zwykle posiadały jeden tego typu kwas tłuszczowy przyłączony estrowo i tworzący ugrupowanie acyloksyacylowe. Pierwsze doniesienia dotyczące izolacji i charakterystyki chemicznej kwasu 27-hydroksyoktakozanowego (27-OH-28:0) u *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ukazały się ponad 20 lat temu [Hollingsworth i Carlson, 1989]. W roku 1991 Bhat i współpracownicy dowiedli, że niemal wszystkie szczepy bakterii należących do *Rhizobiaceae* (z wyjątkiem rodzaju *Azorhizobium*) posiadają ten kwas w swoich lipopolisacharydach

[Bhat i wsp., 1991b]. Od tego czasu kwas 27-OH-28:0 funkcjonuje jako marker chemotaksonomiczny dla bakterii z grupy rizobiów. Później stwierdzono, że nie tylko rizobia, ale również inne mikroorganizmy z podgrupy α -2 Proteobacteria syntetyzują długołańcuchowe (ω -1)-hydroksylowane kwasy tłuszczowe. W szczepie *Rhodopseudomonas palustris* le5 występuje kwas 28-OH-29:0, prawdopodobnie o strukturze rozgałęzionej, co jednak nigdy nie zostało do końca dowiedzione [Bhat i wsp., 1991a]. U *Rhizobium tropici* zidentyfikowano kwas 29-OH-30:0, zaś w LPS *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* formę keto kwasu 27-OH-28:0 (kwas 27-keto-28:0) [Gil-Serrano i wsp., 1994; Izmailov i wsp., 1999]. Lista zidentyfikowanych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych u rizobiów została wydłużona po analizie LPS *Mesorhizobium huakuii*, gdzie oprócz kwasu 27-OH-28:0 i jego formy keto, zidentyfikowano również kwasy: 25-OH-26:0 i 29-OH-30:0 [Choma, 1999].

W toku prac, preparaty lipopolisacharydów wyizolowanych z czterech typowych szczepów *Bradyrhizobium* reprezentujących cztery gatunki: *B. japonicum* USDA 110, *B. elkanii* USDA 76, *B. liaoningense* USDA 3622 oraz *B. yuanmingense* CCBAU 10071 zostały poddane analizie jakościowej i ilościowej w celu określenia spektrum kwasów tłuszczowych oraz składników cukrowych. **Stwierdzono obecność dwóch polarnych kwasów posiadających grupę hydroksylową przyłączoną w pozycji β (tj. 3-OH-12:0 oraz 3-OH-14:0), a także szeregu długołańcuchowych kwasów tłuszczowych z łańcuchami alkilowymi zawierającymi od 26 aż do 35 atomów węgla w łańcuchu i z grupą hydroksylową w pozycji (ω -1).** Niektóre z tych kwasów występowały również w formie ketokwasów (27-keto-28:0 oraz 29-keto-30:0). Spośród kwasów niepolarnych obecne były: 24:0, 26:0 i 28:0, zidentyfikowane w LPS pochodzącym z fazy fenolowej *B. elkanii* i *B. liaoningense*. Stwierdzono, że 3-hydroksykwas są przyłączone do lipopolisacharydu (lipidu A) wiązaniem amidowym, natomiast pozostałe kwasy są związane estrowo.

Szczegółowa charakterystyka długołańcuchowych kwasów tłuszczowych izolowanych z LPS *Bradyrhizobium* dostarczyła kolejnych informacji. Stwierdzono, że w puli długołańcuchowych (ω -1)-hydroksykwasów są obecne zarówno kwasy z prostymi łańcuchami alifatycznymi jak również kwasy rozgałęzione (mono- i dimetylo). Ponadto, **kwasy rozgałęzione to prawie wyłącznie te o nieparzystej liczbie atomów węgla w łańcuchu.** Analiza pochodnych piroolidynowych oraz 4,4-dimetylooksazolinowych (DMOX) wykazała, że **miejszem rozgałęzienia łańcucha alkilowego jest pozycja C-(ω -10) i/lub C-(ω -11), co jest nietypowe dla tego rodzaju związków**, gdyż zazwyczaj w kwasach tłuszczowych bakterii miejscem rozgałęzienia jest pozycja C-(ω -1) lub C-(ω -2) i są to kwasy typu *iso*- i *anteiso*-, spotykane np. w grupie *Mesorhizobium* [Choma, 2002].

Wyniki badań nad kwasami tłuszczowymi *Bradyrhizobium* zostały zawarte w **Publikacji nr 4.**

Podsumowując wyniki powyższych analiz, należy zauważyć, że już wcześniej prowadzone analizy strukturalne rizobiowych lipidów A pozwoliły ustalić, że długołańcuchowy kwas tłuszczowy jest przyłączony do cząsteczki lipidu A jako kwas drugorzędowy, tworząc ugrupowanie acyloksyacylowe z 3-hydroksykwasem [Que i wsp., 2000; Jeyaretnam i wsp., 2002, Gudlavaletti

i Forsberg, 2003; Choma i Sowinski, 2004]. Badania przeprowadzone w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii UMCS pozwoliły na poznanie natury bradyrizobiowych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Dowiedziono, że bakterie te są w stanie wytwarzać znaczne ilości długołańcuchowych (ω -1)-hydroksykwasów tłuszczowych, zawierających od 26 do 35 atomów węgla, z łańcuchem prostym lub rozgałęzionym. W przeciwieństwie do innych rizobiów (szybkorosnących, np. z rodzaju *Mesorhizobium*) zawsze towarzyszą im tylko dwa kwasy typu 3-hydroksy (3-OH-12:0 i 3-OH-14:0), nie zaś całe ich spektrum. Ten unikalny zestaw kwasów tłuszczowych może być doskonałym markerem chemotaksonomicznym dla identyfikacji wolnorosnących rizobiów izolowanych z brodawek dzikorosnących roślin motylkowatych. Co więcej, ilość i stosunki molowe pomiędzy kwasami tłuszczowymi uwalnianymi z LPS bradyrizobiów wskazywały, że cząsteczka lipidu A może zawierać więcej niż jedną resztę długołańcuchowego kwasu tłuszczowego.

Dysponując powyższymi danymi przystąpiono do dalszego etapu prac, jakim było ustalenie struktury lipidu A *Bradyrhizobium*. Z uwagi na fakt, iż są to bakterie trudne do hodowli i wymagają długiego okresu inkubacji (hodowla właściwa trwa 10 dni) prace początkowo prowadzone na czterech szczepach ograniczono do tych, dla których uzyskano masę bakteryjną w wystarczającej ilości (tj. około 100 g mokrej masy bakteryjnej). Lipopolisacharyd z komórek *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76 podczas ekstrakcji gorącym 45 % fenolem/wodą niemal w całości przechodził do fazy organicznej. Lipid A otrzymany drogą łagodnej kwaśnej hydrolizy lipopolisacharydu poddano wyczerpującemu oczyszczaniu wodą wysyconą butanolem. W ten sposób usunięto wszelkie komponenty fosfolipidowe i lipidowe inne niż badany glikolipid [Azzouz i wsp. 2005]. Czysty preparat lipidu A poddano analizie jakościowej i ilościowej, ustalając, że jedynym obecnym aminocukrem jest 2,3-diamino-2,3-dideoksyglukoza. Dodatkowo wykryto heksozę, którą zidentyfikowano jako mannozę. Nie stwierdzono obecności fosforu w postaci reszt ortofosforanowych, które mogły by być przyłączone do szkieletu cukrowego lipidu A. O-deacylacja części materiału (przy użyciu bezwodnej hydrazyny) pozwoliła na uzyskanie preparatu lipidu A podstawionego wyłącznie kwasami związanymi amidowo [Haishima i wsp., 1992]. Materiał O-deacylowany i natywny poddano analizie strukturalnej, wykorzystując w tym celu wysokorozdzielczą spektrometrię mas (MALDI-TOF i ESI-FT-ICR MS/MS) oraz spektroskopię NMR. Analiza widma ESI FT-ICR MS natywnego lipidu A *B. elkanii* pozwoliła stwierdzić, że masa jego cząsteczki wynosi około 2600 Da. Trzy główne sygnały masowe różniły się między sobą o 28 i 14 jednostek masowych, co wskazywało na podstawienie kompletnej cząsteczki lipidu A kwasami tłuszczowymi o różnej długości łańcucha. Bazując na wynikach analizy chemicznej części cukrowej lipidu A oraz składu kwasów tłuszczowych, stwierdzono, że cząsteczka lipidu zawiera dwie reszty diaminoglukozy (Glc_pN₃N), trzy heksozy (mannozy), po dwie reszty kwasu 3-OH-12:0 i 3-OH-14:0 oraz dwie reszty długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, z których jedna jest dodatkowo zestyfikowana kwasem 3-hydroksymasłowym. Najbardziej intensywny jon widoczny na widmie ESI FT-ICR MS odpowiadający lipidowi A o masie 2600 Da poddano fragmentacji MS/MS (IRMPD), w celu ustalenia szczegółów jego budowy. Zidentyfikowano sygnał o m/z 761.4963 jako jon typu Y⁺

wg. nomenklatury zaproponowanej przez Domon i Costello, pochodzący z redukującego końca cząsteczki i odpowiadający fragmentowi lipidu A zbudowanemu z jednej diaminoglukozy, jednej mannozy i dwóch reszt kwasów tłuszczowych: 3-OH-12:0 i 3-OH-14:0. Z kolei drugi intensywny sygnał przy $m/z = 1499.3684$ to tzw. fragment B⁺, pochodzący z nieredukującego końca cząsteczki lipidu A, który w wyniku eliminacji utracił disacharyd mannozylo-mannozy. Tym samym, stwierdzono, że nieredukujący koniec cząsteczki lipidu A *B. elkanii* powinien być zbudowany z jednej reszty GlcN3N, dwóch reszt mannozy, dwóch amidowo związanych reszt 3-hydroksykwasów: 3-OH-12:0 i 3-OH-14:0 oraz dwóch reszt kwasu 27-OH-28:0, z których jedna jest dodatkowo zestryfikowana 3-hydroksymaślanem, przyłączonym do grupy hydroksylowej w pozycji (ω -1). Tym samym ustalono, że cząsteczka lipidu A wyizolowanego z LPS *B. elkanii* ma budowę asymetryczną: oba ugrupowania acyloksyacylowe są zlokalizowane przy nieredukującej reszcie GlcN3N. **Na uwagę zasługuje fakt, iż po raz pierwszy stwierdzono obecność aż dwóch reszt długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w cząsteczce lipidu A, co jest niezwykle wśród rizobiów**, gdzie dotychczas sądzono, że może być przyłączona tylko jedna taka reszta.

Analiza widma MS/MS *O*-deacylowanego lipidu A pozwoliła potwierdzić dystrybucję pierwszorzędowych kwasów tłuszczowych w cząsteczce. Sygnał dominujący o $m/z = 1670.0214$ odpowiadał cząsteczce lipidu A zbudowanej z dwóch reszt Glc_pN3N, trzech reszt mannozy i czterech reszt związanych amidowo 3-hydroksykwasów: dwóch 3-OH-12:0 i dwóch 3-OH-14:0. Fakt, iż zanotowano tylko jeden sygnał masowy potwierdzał, że heterogenność pełnego lipidu A pochodziła wyłącznie od heterogenności łańcucha estrowo związanych reszt. Zanotowano obecność jonu typu B⁺, przy $m/z = 909.5502$, pochodzącego z nieredukującego końca cząsteczki lipidu A. Ta fragmentacja potwierdziła, że do dystalnej reszty Glc_pN3N przyłączony jest disacharyd mannozylo-mannozylowy, zaś grupy aminowe diaminoglukozy są podstawione jedną resztą 3-OH-12:0 i jedną 3-OH-14:0.

Szczegóły budowy szkieletu cukrowego lipidu A *B. elkanii* (konfiguracja i pozycje wiązań) zostały ustalone na podstawie analizy widm 1D i 2D NMR. Na podstawie analizy heterokorelacyjnego widma HMQC natywnego preparatu lipidu A zidentyfikowano pięć układów spinowych odpowiadających pięciu resztom cukrowym szkieletu: A, α -D-Man_p, B, α -D-Glc_pN3N, C, β -D-Glc_pN3N, D, α -D-Man_p i E, α -D-Man_p. Wszystkie heksozy występowały w formie piranoz. Konfiguracja anomeryczna poszczególnych reszt została ustalona na podstawie odczytu stałych sprzężenia spinowo-spinowego pomiędzy węglem anomerycznym i związanym z nim protonem ($^1J_{C1,H1}$). Relatywnie wysokie wartości (powyżej 170 Hz) odpowiadają resztom cukrowym w konfiguracji α (reszta A, B, D i E), natomiast wartości około 160 Hz wskazują na konfigurację β (reszta C). Sposób połączenia poszczególnych reszt cukrowych w szkielecie lipidu A został ustalony na podstawie danych pochodzących z analizy widm: $^1H/^1H$ ROESY, $^1H/^1H$ NOESY i $^1H/^{13}C$ HMBC. Ustalono, że obie reszty diaminoglukozy są ze sobą połączone wiązaniem typu β -(1 \rightarrow 6) glikozydowym. Do tego disacharydu są dołączone trzy cząsteczki D-mannozy. Jedna cząsteczka mannozy dołączona

jest do proksymalnej reszty GlcpN3N wiązaniem α -(1→1), natomiast dwie pozostałe tworzą disacharyd mannozylo-(1→6)-mannozowy, dołączony do szkieletu lipidu A w pozycji 4'. Tym samym potwierdzono, że szkielet lipidu A *Bradyrhizobium elkanii* stanowi neutralny **pentasacharyd** o strukturze: α -D-Manp-(1→6)- α -D-Manp-(1→4)- β -D-GlcpN3N-(1→6)- α -D-GlcpN3N-(1→1)- α -D-Manp.

Była to pierwsza opublikowana tak rozbudowana struktura szkieletu lipidu A. Uzyskane wyniki zostały zamieszczone w **Publikacji nr 5**.

Wraz z zakończeniem prac związanych z dwoma granami MNiSW (lata 2007-2010) nie zaprzestano prac nad rozwiązaniem struktury LPS *Bradyrhizobium*. Preparaty lipidu A pozostałych szczepów były poddawane wnikliwym analizom spektrometrycznym. Otrzymane wyniki nie dawały się interpretować z wykorzystaniem znanych schematów. W przypadku lipidów A izolowanych z LPS *B. japonicum*, *B. yuanningense* czy *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus) na widmach MS obserwowano różnice mas, których nie dało się wytłumaczyć podstawieniem kolejnego długołańcuchowego kwasu tłuszczowego. Zarazem przeprowadzone analizy jakościowe oczyszczonych preparatów lipidowych wciąż wskazywały na obecność znacznej ilości tzw. lipidów hopanoidowych. Te pentacykliczne lipidy triterpenoidowe były już wcześniej opisywane nie tylko u bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium*, ale też u innych bakterii zarówno Gram-ujemnych jak i Gram-dodatnich, jak np.: u *Streptomyces* spp., *Zymomonas mobilis*, u purpurowej beziarkowej bakterii *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodocyclidium vanniellii*, *Methylococcus capsulatus*, czy wiążących azot *Azotobacter*, *Beijernickia* czy *Frankia* [Neunlist i wsp., 1985; Berry i wsp., 1993; Kannenberg i wsp., 1995; Bravo i wsp., 2001; Welander i wsp., 2009]. Sugerowano, że lipidy hopanoidowe stabilizują błony fosfolipidowe, pełniąc rolę podobną do steroli w komórkach eukariotycznych [Rohmer i wsp., 1979]. U *Frankia* hopanoidy są zaangażowane w ochronę kompleksu nitrogenazy przed oksydacją, tworząc barierę dyfuzyjną dla tlenu [Berry i wsp., 1993]. W przypadku *Rh. palustris* udowodniono, że bakteriohopanoidowe poliole m. in. determinują integralność membrany lipidowej [Welander i wsp., 2009].

Różnica mas widoczna na widmach MS wynosiła 512.42 Da. Odpowiadało to reszcie 34-karboksybakteriohopan-32,33-diolu zidentyfikowanego w badanych preparatach lipidu A *Bradyrhizobium*. Do określenia pozostał sposób i miejsce przyłączenia hopanoidu do cząsteczki lipidu A. Problem ten rozwiązano po dogłębnej analizie heterokorelacyjnych widm NMR (HSQC-DEPT i HMBC) uzyskanych dla lipidu A wyizolowanego z komórek *Bradyrhizobium japonicum* szczep USDA 110. Wykazano, że **grupa karboksylowa hopanoidu jest kowalencyjnie przyłączona do grupy hydroksylowej w pozycji (ω -1) długołańcuchowego hydroksykwasu tłuszczowego, związanego estrowo z kwasem 3-hydroksylowym, który z kolei łączy się z nieredukującą (dystalną) diaminoglukozą. Tak rozbudowany lipid A jest ewenementem wśród do tej pory opisanych tego typu molekuł.**

W toku analiz ustalono, że szkielet lipidu A *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 zbudowany jest z dwóch reszt 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukozy (D-GlcpN3N), dwóch cząsteczek D-mannozy

(D-Manp) tworzących α -(1→6)-związany disacharyd przyłączony w pozycji C-4' nieredukującej GlcpN3N oraz jednej reszty kwasu D-galakturonowego (D-GalpA) przyłączonej w pozycji C-1 redukującej D-GlcpN3N. Wszystkie grupy aminowe obu reszt diaminoglukozowych podstawione są 3-hydroksykwasami tłuszczowymi (3-OH-12:0 i 3-OH-14:0), które są rozmieszczone symetrycznie w cząsteczce lipidu A. Dwa z nich (te przy dystalnej reszcie D-GlcpN3N) niosą dodatkowo estrowo związane długołańcuchowe (ω -1)-hydroksykwasów tłuszczowe. Przynajmniej jeden z nich jest podstawiony resztą trzeciorzędową w postaci lipidu hopanoidowego lub jego metylowej pochodnej (34-karboksylo-2 β -metylo-bakteriohopan-32,33-diolu).

Otrzymanie widma masowego preparatu lipidu A *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, pozwoliło zaobserwować heterogenność materiału objawiającą się zróżnicowaniem stopnia acylacji szkieletu cukrowego. Sygnały o masie około 2100 Da odpowiadały lipidowi A posiadającemu 5 reszt kwasów tłuszczowych, a jedną z reszt acylowych był długołańcuchowy (ω -1)-hydroksykwas. Klaster jonów o niskiej intensywności w zakresie 2570-2680 Da odpowiadał heksa-acylowanemu lipidowi A z dwoma kwasami długołańcuchowymi. Natomiast bardzo intensywne piki w przedziale 3000-3200 Da to cząsteczki heksa-acylowanego lipidu A niosące dodatkowo przyłączoną kowalencyjnie cząsteczkę hopanoidu ($\Delta m = 512.42$ Da). Ostatnia grupa sygnałów w zakresie 3600-3700 Da to cząsteczki lipidu A *B. japonicum* USDA 110 niosące dwie reszty hopanoidowe.

Dodatkowe analizy oparte w głównej mierze o pomiary mas jonów lipidów A wyizolowanych z *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus) USDA 3045 i *B. yuanmingense* CCBAU 10071 wykazały, że pierwszy ze szczepów ma podobny wzór acylacji do opisanego dla *B. japonicum* (posiada dwa długołańcuchowe kwasy tłuszczowe tworzące ugrupowania acyloksyacylowe, a jedna z grup acyloksyacylowych jest dodatkowo podstawiona hopanoidem), natomiast **lipid A *Bradyrhizobium yuanmingense* jest podstawiony trzema resztami długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (jest hepta-acylowany) i dodatkowo niesie jedną resztę hopanoidową.**

Wydaje się, że tak niezwykle silnie rozbudowane lipidy A są powszechne wśród *Bradyrhizobiaceae*. Potwierdzeniem tej tezy jest praca opublikowana ostatnio przez zespół A. Molinaro z Uniwersytetu Fryderyka II w Neapolu (Włochy), w której opisano lipid A izolowany z fotosyntetyzującego szczepu bradyrhizobium (*Bradyrhizobium* sp. BTAi1) [Silipo i wsp., 2014].

Wyniki powyższych badań zostały przedstawione w **Publikacji nr 6.**

PODSUMOWANIE NAJWAŻNIEJSZYCH OSIĄGNIĘĆ:

- Zebrano, usystematyzowano i opracowano informacje dotyczące budowy, biosyntezy i roli peryplazmatycznych β -glukanów bakterii symbiotycznych i patogenów roślin.
- Określono budowę i sposób podstawienia resztami niecukrowymi peryplazmatycznych β -glukanów wyizolowanych z różnych gatunków *Bradyrhizobium*, tym samym uzupełniono informacje dotyczące cyklicznych oligosacharydów w tej grupie bakterii o nowe dane.
- Określono aktywność endotoksyczną nietypowych rizobiowych lipopolisacharydów (lipidów A) w stosunku do ludzkich komórek linii THP-1 i porównano je z aktywnością standardowej, enterobakteryjnej endotoksyny. Wyniki te uzyskano na podstawie testów indukcji cytokin (TNF, IL-1 β oraz IL-6), uwalniania tlenku azotu (NO) oraz testu żelowania lizatu z amebocytów skrzypłocza (test LAL).
- Ustalono skład kwasów tłuszczowych występujących w lipidach A *Bradyrhizobium* oraz wskazano, że unikalny zestaw tych kwasów tłuszczowych może być użyty jako marker chemotaksonomiczny dla tej grupy bakterii.
- Określono budowę długołańcuchowych (ω -1)-hydroksykwasów tłuszczowych *Bradyrhizobium* ze wskazaniem nietypowego miejsca przyłączenia grup metylowych w łańcuchach alifatycznych kwasów rozgałęzionych. Są to pozycje C-(ω -10) i/lub C-(ω -11).
- Ustalono pełną strukturę lipidu A wyizolowanego z LPS *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76, którego szkielet cukrowy stanowi neutralny pentasacharyd zbudowany z dwóch reszt 2,3-diamino-2,3-dideoksyglukozy i trzech mannoz. Było to pierwsze doniesienie literaturowe o lipidzie A z tak rozbudowanym szkieletem cukrowym.
- Dowiedziono, że w lipidzie A *Bradyrhizobium* 3-hydroksykwasu tłuszczowego są podstawione dwiema lub trzema resztami długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, podczas, gdy dotychczas u rizobiów (szybkorosnących) opisywano obecność tylko jednej reszty długołańcuchowego (ω -1)-hydroksykwasu tłuszczowego w lipidzie A.
- W lipidzie A *Bradyrhizobium* stwierdzono obecność nietypowego podstawnika – hopanoidu. Jest to 34-karboksy-bakteriohopan-32,33-diol i jego metylowa pochodna 34-karboksy-2-metylbakteriohopan-32,33-diol.
- Ustalono, że lipid A *Bradyrhizobium* zawiera cząsteczkę hopanoidu kowalencyjnie przyłączonego jako podstawnik trzeciorzędowy związany z grupą hydroksylową w pozycji (ω -1) długołańcuchowego kwasu tłuszczowego, który z kolei podstawia kwas 3-hydroksy przyłączony do dystalnej reszty diaminoglukozy.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w **pięciu oryginalnych pracach naukowych**. We wszystkich byłam głównym wykonawcą eksperymentów, wniosłam też znaczący wkład w koncepcję badań, analizę i opracowanie graficzne wyników oraz przygotowanie manuskryptów. **W trzech pracach byłam autorem korespondencyjnym**. W skład osiągnięcia włączyłam również **jeden artykuł przeglądowy**, w którego przygotowaniu miałam dominujący udział i **byłam jego autorem korespondencyjnym**.

Opisane powyżej publikacje wchodziły w jeden z głównych nurtów badań prowadzonych w Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii UMCS. Nasze osiągnięcia zostały dwukrotnie wyróżnione Nagrodą Zespołową I stopnia Rektora UMCS w roku 2010 i 2011.

Znaczna część przedstawionych badań, wchodzących w skład zgłaszanego osiągnięcia naukowego, została wykonana w ramach grantów:

1. „Charakterystyka strukturalna i toksyczność lipopolisacharydów (lipidów A) izolowanych z *Bradyrhizobium spp.*” Grant MNiSW nr N303 109 32/3593, przyznany na lata: 2007-2010; kierownik: dr hab. Adam Choma; **dr Iwona Komaniecka – główny wykonawca**.
2. „Taksonomia mikrosymbiontów traganka, janowca i żarnowca, dziko rosnących roślin motylkowatych, oparta na identyfikacji kwasów tłuszczowych i triterpenoidów.” Grant MNiSW nr N303 108 32/3585, przyznany na lata: 2007-2010; kierownik: prof. dr hab. Ryszard Russa; **dr Iwona Komaniecka – wykonawca**.
3. „Badanie mutantów *Bradyrhizobium* pozbawionych długołańcuchowych hydroksykwasów tłuszczowych – wpływ zmiany struktury lipidu A na zdolność do brodawkowania i przeżywalność wewnątrz komórek eukariotycznych.” Grant MNiSW / NCN nr N N303 822840, przyznany na lata 2011-2014 (przedłużony do maja 2015 r.); kierownik: dr hab. Adam Choma; **dr Iwona Komaniecka – główny wykonawca**.

BIBLIOGRAFIA

1. Aderem A., Ulevitch R.J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782-787.
2. Albus U., Baier R., Holst O., Pühler A., Niehaus K. (2001) Suppression of an elicitor-induced oxidative burst reaction in *Medicago sativa* cell cultures by *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides. *New Phytol.* 151, 597-606.
3. Azzouz N., Shams-Eldin H. Schwarz R.T. (2005) Removal of phospholipid contaminants through precipitation of glycosylphosphatidylinositols. *Analytical Biochem.* 343, 152-158.
4. Berry M., Harriott O.T., Moreau R.A., Osman S.F., Benson D.R., Jones A.D. (1993) Hopanoid lipids compose the *Frankia* vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6091-6094.
5. Beutler, B., Rietschel, E.T. (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nature Rev. Immunol.* 3, 169-176.
6. Bhat U.R., Carlson R.W., Busch M., Mayer H. (1991a) Distribution and phylogenetic significance of 27-hydroxyoctacosanoic acid in lipopolysaccharides from bacteria belonging to the alpha-2 subgroup of *Proteobacteria*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 41, 213-217.
7. Bhat U.R., Mayer H., Yokota A., Hollingsworth R.I., Carlson R.W. (1991b) Occurrence of lipid A variants with 27-hydroxyoctacosanoic acid in lipopolysaccharides from members of the family *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* 173, 2155-2159.
8. Bhat U.R., Forsberg L.S., Carlson R.W. (1994) Structure of lipid A component of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 269(20), 14402-14410.
9. Bohin J-P. (2000) Osmoregulated periplasmic glucans in *Proteobacteria*. *FEMS Microbiol Lett.* 186, 11-19.
10. Bravo J.-M., Perzl M., Härtner T., Kannenberg E.L., Rohmer M. (2001) Novel methylated triterpenoids of the gammacerane series from the nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Eur. J. Biochem.* 268, 1323-1331.
11. Breedveld M.W., Miller K.J. Cell-surface β -glucans. W: The *Rhizobiaceae*. H.P Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas (eds), Kluwer Acad. Publ. Dordrecht, Boston, London 1998, str. 81-96.
12. Carlson R.W., Bhat U.R., Reuhs B. *Rhizobium* lipopolysaccharides and evidence for their importance in the nitrogen-fixing symbiotic infection of their host legumes. W: Current topics in plant molecular biology. Plant biotechnology and development. P.M. Gresshoff (ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida. 1992, str. 33-44.
13. Choma A. (1999) Fatty acid composition of *Mesorhizobium huakuii* lipopolysaccharides. Identification of 27-oxooctacosanoic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 257-262.
14. Choma A. (2002) Lipopolysaccharides from *Mesorhizobium huakuii* and *Mesorhizobium ciceri*: chemical and immunological comparative data. *Acta Biochim. Pol.* 49, 1043-1052.
15. Choma A., Komaniecka I. (2008) Characterization of a novel lipid A structure isolated from *Azospirillum lipoferum* lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* 343, 799-804.
16. Choma A., Komaniecka I., Turska-Szewczuk A., Danikiewicz W., Spolnik G. (2012) Structure of lipid A from a stem-nodulating bacterium *Azorhizobium caulinodans*. *Carbohydr. Res.* 352, 126-136
17. Choma A., Sowinski P. (2004) Characterization of *Mesorhizobium huakuii* lipid A containing both D-galacturonic acid and phosphate residues. *Eur. J. Biochem.* 271, 1310-1322.
18. Dow J.M., Newman M.-A., von Roepenack E. (2000) The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38, 241-261.
19. Galanos C., Lüderitz O. (1975) Electrodialysis of lipopolysaccharides and their conversion to uniform salt forms. *Eur. J. Biochem.* 54, 603.
20. Gil-Serrano A.M., González-Jiménez I., Tejero-Mateo P., Megías M., Romero-Vázquez M.J. (1994) Analysis of the lipid moiety of lipopolysaccharide from *Rhizobium tropici* CIAT899: identification of 29-hydroxytriacontanoic acid. *J. Bacteriol.* 176, 2454-2457.

21. Gudlavalleti S.K., Forsberg L.S. (2003) Structural characterization of the lipid A component of *Sinorhizobium* sp. NGR234 rough and smooth form lipopolysaccharide *J. Biol. Chem.* 278, 3957-3968.
22. Haag A.F., Arnold M.F., Myka K.K., Kerscher B., Dall'Angelo S., Zanda M., Mergaert P., Ferguson G.P. (2013) Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. *FEMS Microbiol Rev.* 37(3), 364-83.
23. Haishima Y., Holst O., Brade H. (1992) Structural investigation on the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* rough mutant F653 representing the R3 core type. *Eur. J. Biochem.* 203, 127-134.
24. Hollingsworth R.I., Carlson R.W. (1989) 27-hydroxyoctacosanoic acid is a major structural fatty acyl component of the lipopolysaccharide of *Rhizobium trifolii* ANU843. *J. Biol. Chem.* 264, 9300-9303.
25. Izmailov S.F., Zhiznevskaya G.Y., Kosenko L., Troitskaya N., Kudryavtseva N.N., Borodenko L.I., Dubrovo P.N., Russa R., Pietras H., Lorkiewicz Z. (1999) Chemical characterization of effective strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Acta Biochim. Pol.* 46, 1001-1009.
26. Jeyaretnam B., Glushka J., Kolli V.S.K., Carlson R.W. (2002) Characterization of a novel lipid-A from *Rhizobium* species Sin-1. *J. Biol. Chem.* 277, 41802-41810.
27. Kannenberg E.L., Carlson R.W. (2001) Lipid A and O-chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development. *Mol. Microbiol.* 2001, 39, 379-391.
28. Kannenberg E.L., Perzl M., Härtner T. (1995) The occurrence of hopanoid lipids in *Bradyrhizobium* bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 127, 255-262.
29. Kannenberg E.L., Reuhs B.L., Forsberg L.S., Carlson R.W. Lipopolysaccharides, K-antigens: Their structures, biosynthesis, and function. W: *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 1998, str. 119-154.
30. Kennedy E.P. Membrane-derived oligosaccharides (periplasmic β -D-glucans) of *Escherichia coli*. W: *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology* F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Maganasik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger, (Eds.) wydanie II. American Society for Microbiology, Washington DC. 1996, str. 1064-1074.
31. Lippens G., Wieruszkeski J.M., Hotvath D., Talaga P., Bohin J.-P. (1998) Slow dynamics of the cyclic osmoregulated periplasmic glucan of *Ralstonia solanacearum* as revealed by heteronuclear relaxation studies. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 170-177.
32. Loppnow H., Libby P., Freudenberg M., Krauss J.H., Weckesser J., Mayer H. (1990) Cytokine induction by lipopolysaccharide (LPS) corresponds to lethal toxicity and is inhibited by nontoxic *Rhodobacter capsulatus* LPS. *Infect. Immun.* 58, 3743-3750.
33. Mayer H., Krauss J.H., Urbanik-Sypniewska T., Puvanesarajah V., Stacey G., Auling G. (1989) Lipid A with 2,3-diamino-2,3-dideoxy-glucose in lipopolysaccharides from slow-growing members of *Rhizobiaceae* and from „*Pseudomonas carboxydovorans*”. *Arch Microbiol.* 151, 111-116.
34. Menezes H., Jared C. (2002) Immunity in plants and animals: common ends through different means using similar tools. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 132, 1-7.
35. Miller K.J., Reinhold V.N., Weissborn A.C., Kennedy E.P. (1987) Cyclic glucans produced by *Agrobacterium tumefaciens* are substituted with *sn*-1-phosphoglycerol residues. *Biochim. Biophys. Acta* 901, 112-118.
36. Molinaro A., Holst O., Di Lorenzo F., Callaghan M., Nurisso A., D'Errico G., Zamyatina A., Peri F., Berisio R., Jerala R., Jiménez-Barbero J., Silipo A., Martin-Santamaria S. (2015) Chemistry of lipid A: at the heart of innate immunity. *Chem. Eur. J.* 21, 500-519.
37. Neunlist S., Holst O., Rohmer M. (1985) Prokaryotic triterpenoids. The hopanoids of the purple non-sulphur bacterium *Rhodomicrobium vannielii*: an aminotriol and its aminoacyl derivatives, *N*-tryptophanyl and *N*-ornithinyl aminotriol. *Eur. J. Biochem.* 15, 561-568.
38. Ormeño-Orrillo E., Servín-Garcidueñas L.E., Rogel M.A., González V., Peralta H., Mora J., Martínez-Romero J., Martínez-Romero E. (2015) Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the *Rhizobiaceae* family in light of genomics. *Syst. Appl. Microbiol.* 38(4), 287-291.

39. Park B.S., Song D.H., Kim H.M., Choi B.-S., Lee H., Lee J.-O. (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nature* 458, 1191-1196.
40. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Huffel C.V., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos Ch., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. (1998) Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in *Tlr4* Gene. *Science* 282, 2085–2088.
41. Que N.L.S., Ribeiro A.A., Raetz C.R.H. (2000b) Two-dimensional NMR spectroscopy and structures of six lipid A species from *Rhizobium etli* CE3. *J. Biol. Chem.* 275, 28017-28027.
42. Raetz C.R.H., Whitfield C. (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635-700.
43. Rietschel E.Th., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zähringer U., Seydel U., Di Padova F. (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 8, 217-225.
44. Rohmer M., Bouvier P., Ourisson G. (1979) Molecular evolution of biomembranes: structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 847–851.
45. Rolin D.B., Pfeffer P.E., Osman S.F., Szwergold R.B., Kappler F., Benesi A.J. (1992) Structural studies of a phosphocholine substituted β -(1,3);(1,6) macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Biochim. Biophys. Acta* 1116, 215-225.
46. Russa R., Urbanik-Sypniewska T., Lindström K., Mayer H. (1995) Chemical characterization of two lipopolysaccharide species isolated from *Rhizobium loti* NZP2213. *Arch. Microbiol.* 163, 345–351.
47. Schromm A.B., Brandenburg K., Loppnow H., Zähringer U., Rietschel E.T., Carroll S.F., Koch M.H., Kusumoto S., Seydel U. (1998) The charge of endotoxin molecules influences their conformation and IL-6-inducing capacity. *J. Immunol.* 161, 5464-5471.
48. Silipo A., Erbs G., Shinya T., Dow J.M., Parrilli M., Lanzetta R., Shibuya N., Newman M.-A., Molinaro A. (2010) Glycoconjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology* 20(4), 406-419.
49. Silipo A., Vitiello G., Gully D., Sturiale L., Chaintreuil C., Fardoux J., Gargani D., Lee H.I., Kulkarni G., Busset N., Marchetti R., Palmigiano A., Moll H., Engel R., Lanzetta R., Paduano L., Parrilli M., Chang W. S., Holst O., Newman D.K., Garozzo D., D’Errico G., Giraud E., Molinaro A. (2014) Covalently linked hopanoid-lipid A improves outer membrane resistance of a *Bradyrhizobium* symbiont of legumes. *Nat. Commun.* 5, 5106, 10.1038/ncomms6106.
50. Teghanemt A., Zhang D., Levis E.N., Weiss J.P., Gioannini T.L. (2005) Molecular basis of reduced potency of underacylated endotoxins. *J. Immunol.* 175, 4669-4676.
51. Tsukushi Y., Kodo N., Saeki K., Sugiyama T., Koide N., Mori I., Yoshida T., Yokochi T. (2004) Characteristic biological activities of lipopolysaccharides from *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium*. *J. Endotoxin Res.* 10, 25–31.
52. Urbanik-Sypniewska T., Choma A., Kutkowska J., Kaminska T., Kandefor-Szerszen M., Russa R., Dolecka J. (2000) Cytokine inducing activities of rhizobial and mesorhizobial lipopolysaccharides of different lethal toxicity. *Immunobiology* 202, 408–420.
53. Vandenplas M.L., Carlson R.W., Jeyaretnam B.S., McNeill B., Barton M.H., Norton N., Murray T.F., Moore J.N. (2002) *Rhizobium* Sin-1 lipopolysaccharide (LPS) prevents enteric LPS-induced cytokine production. *J. Biol. Chem.* 44, 41811-41816.
54. Wang D., Yang S., Tang F., Zhu H. (2012) Symbiosis specificity in the legume: rhizobial mutualism. *Cell Microbiol.* 14(3), 334-342.
55. Welander P.V., Hunter R.C., Zhang L., Sessions A.L., Summons R.E., Newman D.K. (2009) Hopanoids play a role in membrane integrity and pH homeostasis in *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1. *J. Bacteriol.* 191, 6145–6156.

6. POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE

A\ Praca naukowa przed uzyskaniem stopnia doktora

1. Studia i praca magisterska

Studia biologiczne na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi UMCS rozpoczęłam w roku 1994, a ukończyłam w roku 1999, z wynikiem bardzo dobrym, uzyskując tytuł magistra biologii, specjalność: mikrobiologia. Pracę magisterską zatytułowaną: "Charakterystyka chemiczna lipopolisacharydu *Mesorhizobium ciceri* HAMBI 1750" wykonaną w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej, obroniłam pod kierunkiem prof. dr hab. Ryszarda Russy i opieką dr Adama Chomy. W pracy tej opisano skład chemiczny lipopolisacharydu bakterii symbiotycznych z rodzaju *Mesorhizobium*, ze szczególnym uwzględnieniem lipidu A. Wyizolowany klasyczną metodą Westphal'a-Jann'a LPS pochodzący z fazy wodnej, charakteryzowano pod względem zawartości składników cukrowych i kwasów tłuszczowych. Preparaty analizowano metodą chromatografii gazowej-spektrometrii mas, po wyczerpującej hydrolizie materiału i po przeprowadzeniu monosacharydów w lotne pochodne: octany alditoli i aminoalditoli, a w przypadku kwasów tłuszczowych w ich estry metylowe (kwasy niepolarne) lub trimetylosililowe pochodne estrów metylowych hydroksykwasów. Wykazano, że badany preparat, spośród cukrów obojętnych, zawiera głównie 6-deoksyheksozę zidentyfikowaną jako ramnozę (30%) i jej 3-O-metylo-pochodną, trzy heksozy (mannozę, glukozę i galaktozę) oraz dwie heptozy. Spośród składników kwaśnych zidentyfikowano kwasy: glukuronowy i galakturonowy, oraz kwas 3-deoksy-D-manno-okt-2-ulozonowy (Kdo). Aminocukry reprezentowane były przez glukozaminę i 2,3-diamino-2,3-dideoksyglukozę (Glc_pN₃N), którym towarzyszyły niewielkie ilości aminoheksoz o konfiguracji *manno* i *galakto*. Wykazano dużą heterogenność kwasów tłuszczowych budujących lipid A – hydrofobową część LPS. Jest to charakterystyczne dla bakterii z rodzaju *Mesorhizobium* i zostało opisane w pracach: [Choma, 1999 i 2002]. Wśród kwasów związanych amidowo zidentyfikowano: 3-OH-10:0, 3-OH-12:0, 3-OH-*i*-13:0, 3-OH-18:0, 3-OH-20:0, 3-OH-*i*-21:0, 3-OH-21:0, 3-OH-22:0, 3-OH-22:1 oraz szereg ketokwasów: 4-keto-20:0, 4-keto-*i*-21:0, 4-keto-22:0, charakterystycznych dla mezorizobiów. Wśród estrowo związanych kwasów tłuszczowych stwierdzono obecność kwasów niepolarnych nasyconych i nienasyconych (12:0, 16:0, 18:0, 22:1, 22:0, 22:3) oraz kwasy (ω-1)-hydroksy: 27-OH-28:0 (dominujący), 25-OH-26:0 i śladowe ilości 29-OH-30:0. Obecny był również kwas 27-keto-28:0, wykryty po raz pierwszy w tej grupie bakterii, a opisywany wcześniej u *Legionella* [Sonesson i wsp., 1994]. Wyniki badań stanowiących przedmiot pracy magisterskiej zostały przedstawione w formie posteru.

1. Choma A., Dolecka J., **Komaniecka I.**, Grabek D. (1998) Wstępna chemiczna charakterystyka lipopolisacharydu *Mesorhizobium ciceri*. XXXIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok, wrzesień 1998, Abstrakty, N-28, str. 268.

2. Praca naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Po uzyskaniu tytułu magistra zostałam zatrudniona w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS. Początkowo na stanowisku starszego referenta inżynieryjno-technicznego, a po roku pracy zostałam mianowana na stanowisko asystenta naukowo-dydaktycznego. Jednocześnie, w 2001 roku rozpoczęłam Studia Doktoranckie z zakresu biologii przy Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, zaś etat asystenta, z przyczyn formalnych, został zredukowany do 1/3 etatu, a od października 2003 r. podniesiony do wymiaru 3/4 etatu.

Jako pracownik Zakładu Mikrobiologii Ogólnej, w grupie Prof. dr hab. Ryszarda Russy i we współpracy z dr Adamem Chomą, prowadziłam badania nad analizą fosfolipidów błonowych u bakterii z rodzaju *Mesorhizobium*. W wyniku tych badań stwierdzono obecność rzadko spotykanego w grupie rizobiów lipidu ornitynowego. U rizobiów, wśród lipidów błonowych stwierdza się obecność: kardiolipiny (CL), fosfatydyloglicerolu (PG), fosfatydyloetanolaminy (PE) oraz jej wszystkich metylowych pochodnych, łącznie z fosfatydylocholiną (PC), a także strukturalnych odpowiedników steroli, tj. lipidów hopanoidowych i lipidów aminokwasowych. W warunkach stresu tlenowego (obniżone pO_2) lub głodzenia fosforanowego pojawiają się też tzw. lipidy alternatywne, które zastępują fosfolipidy w błonach [Geiger 1998; Geiger i wsp., 1999; Komaniecka i Choma, 2001]. W trakcie prac analizowano lipidy błonowe wyekstrahowane z komórek *Mesorhizobium* namnażanych na podłożu bogatym, zawierającym znaczne ilości rozpuszczalnych fosforanów. Analizy prowadzono na ośmiu szczepach należących do czterech gatunków *Mesorhizobium*. Stwierdzono, że wszystkie badane preparaty mają bardzo zbliżone wzory lipidowe, a różnice ograniczały się głównie do składów ilościowych. Wykazano, że podstawowe fosfolipidy *Mesorhizobium* to: CL, PG, PE oraz PC. Ten ostatni okazał się być głównym składnikiem w siedmiu preparatach lipidowych. Zidentyfikowano dwie pochodne metylowe fosfatydyloetanolaminy. Ich obecność świadczy o tym, że przynajmniej część PC powstaje w wyniku procesu typowego dla bakterii, tj. trójkratnej metylacji substratu jakim jest PE. Do niedawna uważano, że bakteryjna fosfatydylocholina powstaje wyłącznie w wyniku przyłączenia trzech grup metylowych do fosfatydyloetanolaminy. Jednak przeprowadzone przez zespół Geiger'a badania dowiodły, że istnieje alternatywny szlak biosyntezy tego lipidu [Sohlenkamp i wsp. 2000]. Fosfatydylocholina powstaje w wyniku bezpośredniej kondensacji CDP-diacylglicerolu z choliną. Istnienie tego szlaku zostało udowodnione w przypadku *Sinorhizobium meliloti* [de Rudder i wsp. 2000]. Analiza sekwencji nukleotydowej genomu *M. loti* MAFF303099 (<http://www.kazusa.or.jp/rhizobase/>) pozwoliła wnosić, że odpowiednie geny *pcs* (dla syntazy fosfatydylocholiny) są obecne również u *Mesorhizobium*. Stwierdzono, że *M. ciceri* może pobierać cholinę z pożywki i włączać ją do puli związków fosfolipidowych. Rola jaką pełni fosfatydylocholina w membranach nie jest znana, jednak jej brak u *Sinorhizobium meliloti* (podwójny mutant w genach *pmt* oraz *pcs*) wyraźnie spowalnia wzrost bakterii [de Rudder i wsp. 2000], co więcej, mutant *Bradyrhizobium japonicum* syntezujący PC z 6%

wydajnością indukował powstawanie brodawek, które zawierały niewielką liczbę bakteroidów i miały obniżoną efektywność wiązania azotu [Mindner i wsp. 2001].

W toku badań wykazano, że bezfosforowy lipid ornitynowy powszechnie występuje w błonach lipidowych *Mesorhizobium*, a jego zawartość wynosi około 10 % całkowitej puli lipidowej. Biosynteza tego lipidu jest regulowana negatywnie stężeniem fosforanów, jednak nawet przy dużym stężeniu związków fosforu w podłożu nie dochodzi do całkowitej represji odpowiednich genów. Dowiedziono, że identyczny lipid jest syntetyzowany przez *Sinorhizobium meliloti* lecz tylko w warunkach głodzenia fosforanowego [Weissenmayer i wsp. 2002; Geiger i wsp. 1999]. Analiza kwasów tłuszczowych w poszczególnych klasach lipidów wykazała, że grupy polarne fosfolipidów są acylowane głównie przez kwas laktobacilowy (11,12-metylenooktadekanowy) należący do grupy kwasów cyklopropanowych. Kwasy cyklopropanowe są produktem końcowej modyfikacji lipidów już osadzonych w błonach [Gerson i wsp. 1975]. Proces ten przeprowadza metylotransferaza przenosząca grupy metylowe z S-adenozylometioniny w miejsce wiązań podwójnych. W przypadku *Mesorhizobium* akceptorem grup metylowych najczęściej był kwas wakcenyowy, dominujący w widmach lipidowych kwasów tłuszczowych otrzymanych z hodowli bakteryjnych będących w logarytmicznej fazie wzrostu [Orgambide i wsp., 1993]. Natomiast kwasy tłuszczowe typu 3-hydroksy obecne w preparatach lipidowych pochodziły wyłącznie z lipidu ornitynowego, w którym były związane amidowo poprzez grupę α -aminową ornityny. Same zaś łączyły się z kolejnym kwasem tłuszczowym tworząc resztę 3-acyloksyacylową. Rezultaty powyższych badań zostały opublikowane w formie **dwóch prac doświadczalnych**. Temu zagadnieniu została również poświęcona **praca przeglądowa**.

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	MNiSW ₂₀₁₄
1.	Choma A., Komaniecka I. Analysis of phospholipids and ornithine – containing lipids from <i>Mesorhizobium</i> spp. <i>System. Appl. Microbiol.</i> (2002) 25, 326-331.	2.643	35
2.	Choma A., Komaniecka I. The polar lipid composition of <i>Mesorhizobium ciceri</i> . <i>Biochim. Biophys. Acta</i> (2003) 1631, 188-196.	4.357	35
3.	Komaniecka I. , Choma A. Składniki lipidowe <i>Rhizobiaceae</i> . <i>Post. Mikrobiol.</i> (Advances in Microbiology) (2001) 40(1), 7-30	-	15

Wg. danych literaturowych, fosfolipidy są donorami grup polarnych modyfikujących przedostające się przez błonę cytoplazmatyczną do przestrzeni peryplazmatycznej tzw. cykliczne β -glukany [Geiger, 1998]. Aby sprawdzić, czy tak jest również w przypadku mezorizobiów, wyizolowano i przebadano syntetyzowane przez nie preparaty cyklicznych oligocukrów. Obecność cyklicznych β -glukanów stwierdza się w przestrzeni peryplazmatycznej wszystkich przebadanych bakterii Gram-ujemnych. Część tych oligosacharydów przedostaje się przez błonę zewnętrzną tworząc pulę glukanów zewnątrzkomórkowych. Dane literaturowe wskazują, że peryplazmatyczne β -glukany pełnią ważne funkcje w procesie symbiozy *Sinorhizobium* i *Bradyrhizobium*, i są czynnikami wirulencji

u *Agrobacterium*, *Pseudomonas* oraz *Erwinia*. Natomiast u bakterii wolnożyjących działają jako czynniki osmoprotekcyjne [Breedveld i Miller, 1998; Bohin, 2000].

W toku badań wykazano, że peryplazmatyczne glukany *Mesorhizobium* są zbudowane z nierozgałęzionych łańcuchów, w których cząsteczki glukozy połączone są wyłącznie wiązaniami typu β -(1 \rightarrow 2). Stopień polimeryzacji (DP) zawiera się w przedziale od 17 do 28, zaś rozkład mas cząsteczek glukanu ma kształt krzywej Gaussa z maksimum odpowiadającym 22 resztom glukozy w pierścieniu oligocukrowym. Nie stwierdzono modyfikacji tych oligosacharydów przez podstawniki niecukrowe. Należy więc wykluczyć udział fosfolipidów w biosyntezie β -glukanów u *Mesorhizobium huakuii*. Brak modyfikacji odróżnia je od części glukanów syntetyzowanych przez *Sinorhizobium* i *Agrobacterium*. Jednocześnie wykazano, że cykliczne β -glukany *Mesorhizobium* pełnią rolę osmoprotekcyjną, gdyż ich biosynteza jest regulowana przez ciśnienie osmotyczne pożywki.

Wyniki badań nad określeniem struktury peryplazmatycznych β -glukanów z komórek *Mesorhizobium huakuii* zostały opublikowane w artykule:

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	MNiSW ₂₀₁₄
1.	Choma A., Komaniecka I. Characterization of <i>Mesorhizobium huakuii</i> cyclic β -glucan. <i>Acta Biochim. Pol.</i> (2003) 50, 1273-1281.	1.262	15

Tuż po rozpoczęciu pracy w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej UMCS, we współpracy z dr Elżbietą Kimak z Akademii Medycznej w Lublinie wykonywałam analizy chromatograficzne (GC-MS) profili kwasów tłuszczowych wyizolowanych z błon erytrocytów pacjentów chorych na przewlekłą niewydolność nerek. Współpraca ta zaowocowała wydaniem wspólnej publikacji:

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	MNiSW ₂₀₁₄
1.	Kimak E., Komaniecka I. , Solski J. Kwasy tłuszczowe błon erytrocytarnych pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek (PNN). <i>Diagnostyka Laboratoryjna</i> (2001) 37, 153-159	-	3

Współpracowałam również z dr Ireną Chomą z Zakładu Metod Chromatograficznych na Wydziale Chemii UMCS. Współpraca ta była prowadzona w ramach międzywydziałowego grantu J.M. UMCS. Przeprowadzone badania obejmowały chromatograficzne oznaczanie antybiotyków w produktach spożywczych (mleku), na płytkach TLC, połączone z detekcją bioautograficzną. Ich wyniki zostały opublikowane w dwóch pracach. Kolejna publikacja będąca wynikiem powyższej współpracy ukazała się w roku 2008.

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	MNiSW ₂₀₁₄
1.	Choma I.M., Choma A., Komaniecka I. , Pilorz K., Staszczuk K. Semi-quantitative estimation of enrofloxacin and ciprofloxacin by thin-layer chromatography direct bioautography. <i>J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.</i> (2004) 27 (13), 2071-2085.	0.825	15
2.	Choma I.M., Komaniecka I. Matrix solid-phase dispersion combined with thin-layer chromatography – direct bioautography for determination of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in milk. <i>J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.</i> (2005) 28 (16), 2467-2478.	0.825	15

3. Praca doktorska

Od 2001 roku badałam struktury powierzchniowe bakterii należących gatunku *Azorhizobium caulinodans*, tworzących wiążące azot brodawki na korzeniach i łodygach tropikalnej rośliny *Sesbania rostrata*. Moja praca obejmowała izolację i charakterystykę strukturalną lipopolisacharydu oraz cyklicznych glukanów *Azorhizobium caulinodans*. Badania te były podstawą mojej pracy doktorskiej.

W toku badań wykazano, że *Azorhizobium caulinodans* wytwarza wysoce hydrofobowy lipopolisacharyd, który podczas ekstrakcji metodą fenol/woda niemal w całości przechodzi do fazy organicznej. Stosując elektroforezę w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) stwierdzono, że preparat LPS jest heterogeny i migruje w żelu poliakrylamidowym bardzo wolno. Należało więc wnosić, że LPS *A. caulinodans* stanowiły wyłącznie kompletne cząsteczki zawierające zarówno część rdzeniową jak i O-swoistą, a te ostatnie miały znaczną długość. Zaobserwowano istnienie przynajmniej kilku podfrakcji różniących się między sobą ciężarem cząsteczkowym.

Badając skład cukrowy lipopolisacharydu *A. caulinodans*, stwierdzono obecność głównie glukozy oraz dwóch 6-deoksyheksoz: fukozy i ramnozy. W preparacie były również obecne niewielkie ilości metylowych pochodnych fukozy: 2-*O*-Me- oraz 2,3-di-*O*-Me-fukoza. Ponadto, stwierdzono obecność grup acetylowych, które wraz z dużą ilością 6-deoksyheksoz i ich metylowych pochodnych były prawdopodobnie przyczyną wysokiej hydrofobowości materiału. Składniki te są bardzo charakterystyczne dla rizobiowych lipopolisacharydów [Carlson i wsp., 1992]. Wyizolowany preparat degradowanego polisacharydu frakcjonowano metodą chromatografii żelowej. Wykonano analizę składu cukrowego w poszczególnych frakcjach, ustalono absolutną konfigurację zidentyfikowanych monocukrów oraz wykonano analizę metylacyjną/etylacyjną w celu ustalenia pozycji wiązań w polisacharydzie. W toku badań nie udało się jednak ustalić finalnej struktury łańcucha O-swoistego. Było to możliwe w późniejszym czasie, po nawiązaniu współpracy z zespołem prof. Y. Knirela z Instytutu Chemii Organicznej im. N.D. Zielińskiego w Moskwie (Rosja). Grupa pracowników naukowych pod kierunkiem prof. Y. Knirela posiada ogromne doświadczenie w badaniach nad skomplikowanymi strukturami oligo- i polisacharydowymi. Współpraca ta zaowocowała wspólną publikacją dotyczącą struktury polisacharydu O-swoistego *A. caulinodans* [Zdorovenko i wsp., 2012].

Podczas badań nad lipidem A *Azorhizobium* wykazano, że ma on budowę odmienną od lipidów A spotykanych zwykle u bakterii. Posiada on szkielet cukrowy zbudowany z 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukozy (Glc_pN₃N). Stwierdzono brak reszt fosforowych. W lipidzie A *Azorhizobium* wykryto również obecność heksozy, którą zidentyfikowano jako glukozę. Jako miejsce jej przyłączenia wskazano proksymalną resztę diaminoglukozy. Spośród hydroksykwasów stwierdzono obecność kwasów: 3-OH-14:0, 3-OH-18:0 i 3-OH-20:1, natomiast wśród kwasów niepolarnych przeważał kwas 18:1, któremu towarzyszyły kwasy: 16:0 i 18:0. Wykazano, że 3-hydroksykwasy mogą być przyłączone do szkieletu lipidu A wiązaniami amidowymi, lub też tworzyć wiązania estrowe jako kwasy drugorzędowe w trzech możliwych resztach acyloksyacylowych. Kwas 3-metoksymasłowy był obecny

jako podstawnik trzeciorzędowy. Potwierdzono również brak u *Azorhizobium* kwasu 27-hydroksyoktakozanowego, chemotaksonomicznego markera bakterii z grupy rizobiów. Prace nad ustaleniem struktury lipidu A *Azorhizobium* zostały ukończone, a wyniki zostały opublikowane w roku 2012. Te badania były prowadzone nieco później, we współpracy z Prof. dr hab. Witoldem Danikiewiczem z Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie [Choma i wsp., 2012].

Podjęłam się również analizy peryplazmatycznych glukanów wyizolowanych z komórek *Azorhizobium caulinodans*. Jest to zbiór cyklicznych molekuł, posiadających od 10 do 13 reszt glukozy w pierścieniu. W preparacie przeważały cząsteczki złożone z jedenastu glukozy. Pierścienie oligocukrowe miały charakter obojętny i były pozbawione odgałęzień. Stwierdzono, że w cząsteczkach peryplazmatycznego glukanu *Azorhizobium* są obecne wyłącznie wiązania β -(1 \rightarrow 3) i β -(1 \rightarrow 6). Analiza widm MALDI-TOF preparatu glukanowego poddanego degradacji Smith'a wykazała, że reszty glukozy połączonej wiązaniami β -(1 \rightarrow 3) występują w sekwencjach złożonych z dwóch do siedmiu reszt cukrowych. Przy czym najczęściej można spotkać fragmenty trój- i czterocukrowe. Reasumując, wykazano, że glukan *A. caulinodans* ma budowę niejednorodną. Jest to grupa cząsteczek, w których sekwencje o różnej długości złożone z reszt glukozy połączonej wiązaniami β -(1 \rightarrow 3) są przedzielone sekwencjami także o różnej długości złożonymi z reszt glukozy połączonej wiązaniami β -(1 \rightarrow 6). W przypadku *Azorhizobium caulinodans* nie zaobserwowano zazwyczaj występującego zjawiska zahamowania syntezy peryplazmatycznych glukanów w odpowiedzi na wzrost ciśnienia osmotycznego pożywki. Podczas zwiększania osmolarności środowiska przy użyciu glukozy zaobserwowano silną stymulację syntezy tych oligocukrów, prowadzącą wręcz do podwojenia ich ilości w przestrzeni peryplazmatycznej. Prawdopodobnie *A. caulinodans* dysponuje innym mechanizmem chroniącym wewnątrz komórek przed stresem osmotycznym.

W dniu 15 czerwca 2005 r. obroniłam pracę doktorską zatytułowaną: „Lipopolisacharyd i peryplazmatyczny β -glukan *Azorhizobium caulinodans*”. Promotorem rozprawy był Prof. dr hab. Ryszard Russa. Recenzenci: Prof. dr hab. Czesław Ługowski oraz Prof. dr hab. Zygmunt Sidorczyk. Część wyników, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, a dotycząca budowy i mechanizmów regulacji syntezy cyklicznych β -glukanów *Azorhizobium caulinodans* została opublikowana w artykule:

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	MNiSW ₂₀₁₄
1.	Komaniecka I., Choma A. Isolation and characterization of periplasmic cyclic β -glucans of <i>Azorhizobium caulinodans</i> . <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> (2003) 227, 263-269.	2.199	20

W roku 2001 Zespół, w ramach którego prowadzone były powyższe prace otrzymał **nagrodę Rektora UMCS, II stopnia**.

4. Bibliografia

1. Bohin J-P. (2000) Osmoregulated periplasmic glucans in *Proteobacteria*. *FEMS Microbiol Lett.* 186, 11-9.
2. Breedveld MW, Miller KJ., Cell-surface β -glucans. W: *Rhizobiaceae*. H.P Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas (eds), Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Boston, London 1998, str. 81-96.
3. Carlson R.W., Bhat U.R., Reuhs B. *Rhizobium* lipopolysaccharides and evidence for their importance in the nitrogen-fixing symbiotic infection of their host legumes. W: Current topics in plant molecular biology. Plant biotechnology and development. Edytor: Gresshoff P.M. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1992, str. 33-44.
4. Choma A, Komaniecka I., Turska-Szewczuk A., Danikiewicz W., Spolnik G. (2012) Structure of lipid A from a stem-nodulating bacterium *Azorhizobium caulinodans*. *Carbohydr. Res.* 352, 126-136.
5. Choma A. (1999) Fatty acid composition of *Mesorhizobium huakuii* lipopolysaccharides. Identification of 27-oxooctacosanoic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 257-262.
6. Choma A. (2002) Lipopolysaccharides from *Mesorhizobium huakuii* and *Mesorhizobium ciceri*: chemical and immunological comparative data. *Acta Biochim. Pol.* 49, 1043-1052.
7. de Rudder, K.E.E., López-Lara, I.M., Geiger, O. (2000) Inactivation of the gene for phospholipid *N*-methyltransferase in *Sinorhizobium meliloti*: phosphatidylcholine is required for normal growth. *Mol. Microbiol.* 37, 763-772.
8. Geiger O. Phospholipids and alternative membrane lipids. W: The *Rhizobiaceae*. Molecular biology of model plant-associated bacteria. H.P.Spaink, A.Kondorosi, P.J.J.Hooykaas (eds.) Kluwer Academic Publishers 1998. str. 56-80.
9. Geiger O., Röhrs V., Weisenmayer B., Finan T.M., Thomas-Oates J.E. (1999) The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Mol. Microbiol.* 32, 63-73.
10. Gerson T., Patel J.J., Nixon L.N. (1975) Some unusual fatty acids of *Rhizobium*. *Lipids* 10, 134-139.
11. Komaniecka I., Choma A. (2001) Składniki lipidowe *Rhizobiaceae*. *Post. Mikrobiol.* 40(1), 7-30.
12. Mindner A.C., de Rudder K.E.E., Narberhaus F., Fischer H.M., Hennecke H., Geiger O. (2001) Phosphatidylcholine levels in *Bradyrhizobium japonicum* membranes are critical for an efficient symbiosis with the soybean host plant. *Mol. Microbiol.* 39, 1186-1198.
13. Orgambide G.G, Reusch R.N., Dazzo F.B. (1993) Methoxylated fatty acids reported in *Rhizobium* isolates arise from chemical alterations of common fatty acids upon acid-catalyzed transesterification procedures. *J. Bacteriol.* 175(15), 4922-4926.
14. Sohlenkamp, C., de Rudder, K.E.E, Röhrs V., López-Lara, I.M., Geiger, O., (2000) Cloning and characterization of the gene for phosphatidylcholine synthase. *J. Biol. Chem.* 275, 18919-18925.
15. Sonesson A., Jantzen E., Tangen T., Zähringer U. (1994) Chemical characterization of lipopolysaccharides from *Legionella feelei*, *Legionella hackeliae* and *Legionella jordanis*. *Microbiology*, 140, 2663-2671.
16. Weisenmayer B., Gao J.-L., Lopez-Lara M., Geiger O. (2002) Identification of a gene required for the biosynthesis of ornithine-derived lipids. *Mol. Microbiol.* 45, 721-733.
17. Zdrovenko E.L., Valueva O.A., Kachala V.V., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Komaniecka I., Choma A. (2012) Structure of the O-polysaccharide of *Azorhizobium caulinodans* HAMBI 216: identification of 3-C-methyl-D-rhamnose as a component of bacterial polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 358, 106-109.

B\ Praca naukowa po uzyskaniu stopnia doktora

1) Badania struktury lipopolisacharydu *Azospirillum lipoferum* SpBr17

Badano strukturę lipidu A oraz polisacharydu O-swoistego *Azospirillum lipoferum* szczepu SpBr17 - bakterii wchodzących w asocjację z systemem korzeniowym roślin jednoliściennych (tzw. plant-growth-promoting rhizobacterium). Wykazano, że lipid A tych bakterii jest odmienny od modelu enterobakteryjnego. Przy pomocy analiz chemicznych, techniki spektrometrii mas oraz dwuwymiarowej spektroskopii NMR wykazano, że szkielet lipidu A jest zbudowany z disacharydu glukozaminylowego, lecz nie jest ufosforylowany. Zamiast podstawników ortofosforanowych, w pozycji C-1 jest przyłączona wiązaniem α -(1 \rightarrow 1) reszta kwasu D-galakturonowego. W tym aspekcie lipid A *Azospirillum lipoferum* jest podobny do lipidu A *Mesorhizobium*. Wykazano, że grupy aminowe obu reszt GlcP_N są podstawione kwasem 3-hydroksypalmitynowym, podczas gdy grupy hydroksylowe z pozycji C-3 i C-3' są zestryfikowane kwasem 3-hydroksymirystynowym. Ugrupowanie acyloksyacylowe jest utworzone przez przyłączenie niepolarnego kwasu tłuszczowego (C-16 lub C-18) do amidowo-związanego 3-hydroksykwasu z pozycji C-2'. Taka budowa chemiczna lipidu A determinuje jego słabą aktywność endotoksyczną w stosunku do ludzkich monocytów, co zostało wykazane w późniejszych badaniach [Komaniecka i wsp., 2010 - **Publikacja nr 3**, osiągnięcie naukowe].

Podczas prac nad lipidem A uzyskano sporą ilość tzw. degradowanego polisacharydu, z którego po frakcjonowaniu metodą chromatografii żelowej uzyskano frakcję wysokocząsteczkową – polisacharyd O-swoisty. Dysponując czystym materiałem zdecydowano się powtórzyć analizy strukturalne, zapoczątkowane ponad 20 lat wcześniej i opublikowane w formie materiałów zjazdowych. Wyniki analiz chemicznych wraz z analizą metylacyjną potwierdziły wcześniejsze dane, dotyczące struktury OPS A. *lipoferum*. Jednak analizy 2D NMR dostarczyły nowych informacji dotyczących budowy powtarzającej się podjednostki w łańcuchu O-swoistym. Potwierdzono, że jest to czterocukier, w którym linearnie ułożone trzy reszty α -L-ramnozy są dodatkowo podstawione resztą β -D-glukozy. Na nowo wyznaczono miejsce O-acetylacji - jest to pierwsza reszta ramnozy w trisacharydzie (pozycja C-2) oraz wykazano, że glukoza jest odgałęzieniem bocznym przyłączonym w pozycji C-3 do α -(1,2)-związanej, środkowej reszty ramnozy. Tym samym wykazano, że OPS A. *lipoferum* SpBr17 jest podobny do antygeny O *Azospirillum lipoferum* SR65 (jedyna różnica to brak reszt O-acetylowych w szczepie SR65) oraz do powierzchniowego polisacharydu A. *lipoferum* Sp59b, który jest O-acetylowany w 60%. Wyniki powyższych analiz opublikowano w formie dwóch prac:

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	MNiSW ₂₀₁₄
1.	Choma A., Komaniecka I. Characterization of a novel lipid A structure isolated from <i>Azospirillum lipoferum</i> lipopolysaccharide. <i>Carbohydr. Res.</i> (2008) 343, 799-804.	1.960	25
2.	Choma A., Komaniecka I. , Sowiński P. Revised structure of the repeating unit of the O-specific polysaccharide from <i>Azospirillum lipoferum</i> strain SpBr17. <i>Carbohydr. Res.</i> (2009) 344, 936-939.	2.025	25

2) Oznaczanie obecności antybiotyków z grupy cefalosporyn w mleku krowim techniką chromatograficzną połączoną z bioautografią

W ramach kontynuacji współpracy z dr I. Chomą z Zakładu Metod Chromatograficznych na Wydziale Chemii UMCS, prowadzono badania mające na celu dopracowanie techniki chromatografii cienkowsarstwowej połączonej bioautograficzną detekcją rozdzielanych substancji, do oznaczania obecności w mleku krowim antybiotyków z grupy cefalosporyn. Antybiotyki te są powszechnie używane w leczeniu zapalenia wymion u bydła mlecznego. Dowiedziono, że technika TLC-DB może być z powodzeniem stosowana do doraźnej biodetekcji tych antybiotyków w mleku i jest alternatywą dla drogiej i czasochłonnej techniki HPLC. Co więcej technika ta pozwala na jednoczesne oznaczanie stężenia antybiotyku w wielu próbach. Wyniki powyższych badań zamieszczono w pracy:

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	MNiSW ₂₀₁₄
1.	Choma I.M., Kowalski C., Lodkowski R., Burmaczuk A., Komaniecka I. TLC-DB as an alternative to the HPLC method in the determination of cefacetil residues in cow's milk. <i>J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.</i> (2008) 31, 1903 – 1912.	1.026	15

3) Ustalenie struktury lipidu A oraz polisacharydu O-swoistego *Azorhizobium caulinodans* – kontynuacja wcześniejszych badań

Prace nad określeniem struktury lipopolisacharydu *Azorhizobium caulinodans* były kontynuowane w kolejnych latach i zaowocowały ustaleniem struktury lipidu A oraz polisacharydu O-swoistego. Zaawansowane są również prace nad ustaleniem budowy oligosacharydu rdzeniowego *Azorhizobium*. Prowadzone są one na szorstkim mutancie pozbawionym łańcucha O-swoistego. Ta część badań została zaprezentowana podczas międzynarodowej konferencji: 6th Baltic Meeting on Microbial Carbohydrates w Gdańsku, w 2014 roku, w formie doniesienia ustnego.

Widma fragmentacyjne preparatu lipidu A poddanego O-deacylacji otrzymane techniką ESI-MS, pozwoliły na ustalenie jego budowy i sposobu podstawienia pierwszorzędowymi kwasami tłuszczowymi. Wykazano, że szkielet lipidu stanowi nieufosforylowany trisacharyd, zbudowany z dwóch reszt diaminoglukozy (GlcP_{N3N}) i jednej reszty kwasu glukuronowego (GlcP_A), przyłączonego wiązaniem α -glikozydowym w pozycji C-1 proksymalnej reszty aminocukru. Grupy aminowe obu reszt GlcP_{N3N} podstawione są kwasami tłuszczowymi: 3-OH-18:0, 3-OH-14:0, 3-OH-20:1, 3-OH-14:0, odpowiednio w pozycji: C-2, C-3, C-2' i C-3'. W części lipidu A kwas 3-OH-20:1 jest zastąpiony przez 3-OH-18:0. Stwierdzono, że oprócz kwasów niepolarnych, także kwas 3-OH-18:0 może być związany estrowo, i jako podstawnik drugorzędowy przyłączony do grupy 3-hydroksylowej kwasu pierwszorzędowego, tworzyć ugrupowanie acyloksyacylowe. W lipidzie A *Azorhizobium* mogą być obecne trzy takie ugrupowania, tak więc kompletny lipid A jest hepta-acylowany. Stwierdzono, że część cząsteczek lipidu A jest dodatkowo podstawiona kwasem 3-metoksymasłowym. Potwierdzono brak kwasu długłańcuchowego z grupą hydroksylową w pozycji (ω -1).

Badania nad strukturą polisacharydu O-swoistego *Azorhizobium caulinodans* były prowadzone we współpracy z zespołem prof. Y. Knirela z Instytutu N.D. Zielińskiego w Moskwie (Rosja). W toku

analiz wykazano obecność nietypowego i niezwykle rzadko spotykanego w naturze cukru. Jest nim 3-C-metylo-ramnoza, czyli ewaloza. Cukier ten wraz z ramnozą i 2-O-metylo-ramnożą buduje powtarzającą się podjednostkę OPS, która jest linearnym pentasacharydem. Wyniki tych analiz zostały zamieszczone we wspólnej publikacji:

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	MNiSW ₂₀₁₄
1.	Zdorovenko E.L., Valueva O.A., Kachala V.V., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Komaniecka I. , Choma A. Structure of the O-polysaccharide of <i>Azorhizobium caulinodans</i> HAMBI 216: identification of 3-C-methyl-D-rhamnose as a component of bacterial polysaccharides. <i>Carbohydr. Res.</i> (2012) 358, 106-109.	2.044	25
2.	Choma A, Komaniecka I. , Turska-Szewczuk A., Danikiewicz W., Spolnik G. Structure of lipid A from a stem-nodulating bacterium <i>Azorhizobium caulinodans</i> . <i>Carbohydr. Res.</i> (2012) 352, 126-136.	2.044	25

4) Badania struktury lipopolisacharydu *Aeromonas spp*

Jako współwykonawca grantu NCN (DEC-2011/03/B/NZ1/01203, kierownik grantu: dr hab. A. Turska-Szewczuk) brałam udział w pracach nad ustaleniem struktury lipopolisacharydu *Aeromonas bestiarum* szczep K296 (serotyp O18), bakterii patogennych dla ryb. Badania były prowadzone z użyciem klasycznych technik analitycznych oraz wysokorozdzielczej spektrometrii mas (ESI FT-ICR MS) i dwuwymiarowej spektroskopii NMR. W toku analiz ustalono budowę lipidu A, który stanowi heksabądź tetra-acylowany bifosforylowany disacharyd glukozaminylowy, niestechiometrycznie dekorowany 4-aminoarabinozą. Oligosacharyd rdzeniowy jest nonasacharydem zbudowanym z jednej reszty Kdo, sześciu reszt heptozy, jednej heksozy, jednej heksozaminy oraz reszty fosforanowej. Z kolei powtarzająca się podjednostka polisacharydu O-swoistego to rozgałęziony tetrasacharyd, zawierający dwie reszty 6-deoksytalozy, jedną mannozę i jedną N-acetylogalaktozaminę, podobnie do OPS *A. hydrophila* AH-3 (serotyp O34). Oba polimery różni stopień i wzór acylacji. 6-Deoksytalozyna w OPS *A. bestiarum* jest dodatkowo niestechiometrycznie O-acetylowana w pozycjach O-2, oraz O-4 (lub O-3). Prowadzi to do różnic w ich właściwościach immunochemicznych (słaba reakcja na przeciwciała anti-O34). Wyniki badań strukturalnych i immunochemicznych zostały zamieszczone w pracy:

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	MNiSW ₂₀₁₄
1.	Turska-Szewczuk A. Lindner B., Komaniecka I. , Kozińska A., Pękala A., Choma A., Holst O. Structural and immunochemical studies of the lipopolysaccharide from the fish pathogen, <i>Aeromonas bestiarum</i> strain K296, serotype O18. <i>Marine Drugs</i> (2013) 11, 1235-1255.	3.512	40

5) Badania struktury α -glukanów pochodzących z grzybów i owocników roślin oraz ich właściwości immunomodulacyjne

We współpracy z dr hab. A. Wiaterem z Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej UMCS prowadzono analizy nierozpuszczalnych w wodzie α -glukanów wyizolowanych z mycelium grzybów pleśniowych *Aspergillus wentii*. Wykazano, że grzyby te produkują wysokocząsteczkowy polimer zbudowany z D-glukozy połączonej prawie wyłącznie wiązaniami typu α -(1→3)-glikozydowymi. Polimer ten ma masę

około 850 kDa i jest podzielony na podjednostki zawierające ok. 200 reszt glukozy, oddzielone krótkimi fragmentami (1-2 reszt), w których cząsteczki glukozy są połączone wiązaniami α -(1 \rightarrow 4).

W ramach tej współpracy przeprowadzono również analizę glukanu wyizolowanego z owoców mango. Ten wysokocząsteczkowy, rozpuszczalny w wodzie polimer glukozy posiadał dwa typy wiązań: α -(1 \rightarrow 3) i α -(1 \rightarrow 4). Glukoz połączonych wiązaniami α -(1 \rightarrow 3) jest w preparacie 2,4 razy więcej, niż glukoz połączonych wiązaniami α -(1 \rightarrow 4) (proporcja 2,4:1). Wykazano, że glukan wyizolowany z mango jest wysoce efektywnym stymulatorem produkcji mutanazy, enzymu degradującego mutan, prowadząc do degradacji kariogenicznego biofilmu tworzonego przez *Streptococcus mutans*.

Wyniki powyższych analiz zostały opublikowane w dwóch pracach:

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	MNiSW ₂₀₁₄
1.	Choma A., Wiater A., Komaniecka I. , Paduch R., Szczodrak J. Chemical characterization of water insoluble α -(1 \rightarrow 3)-D-glucan from alkaline extract of <i>Aspergillus wentii</i> . <i>Carbohydr. Polym.</i> (2013) 91, 603-608.	3.916	40
2.	Wiater A, Janczarek M., Choma A., Próchniak K., Komaniecka I. , Szczodrak J. Water-soluble (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- α -D-glucan from mango as a novel inducer of cariogenic biofilm-degrading enzyme. <i>Int. J. Biol. Macromol.</i> (2013) 58, 199-205.	3.096	25

6) Egzopolisacharyd *Sinorhizobium meliloti* jako chelator jonów chromu(III)

Produkcja kwaśnych egzopoligosacharydów przez rizobia jest dobrze poznana i udokumentowana. W przypadku EPS *Sinorhizobium meliloti* 1021, znane są szczegóły struktury chemicznej i drogi biosyntezy tego zewnątrzkomórkowego polisacharydu. Celem badań prowadzonych w Zakładzie Radiochemii i Chemii Koloidów na Wydziale Chemii UMCS, było zastosowanie kwaśnego egzopolisacharydu o znanej strukturze chemicznej jako czynnika wytrącającego związki chromu(III) w glebie i w wodzie zanieczyszczonej metalami ciężkimi. Stwierdzono, że EPS produkowany przez *S. meliloti* istotnie wspomaga wydajność usuwania tlenków chromu(III) z zanieczyszczonego środowiska. Wyniki badań zostały opisane w publikacji:

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	MNiSW ₂₀₁₄
1.	Szewczuk-Karpisz K., Wiśniewska M., Pac M., Choma A., Komaniecka I. <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 exopolysaccharide as a flocculant improving chromium(III) oxide removal from aqueous solutions. <i>Water, Air & Soil Pollution</i> (2014), 225, 2052 (1-13).	1.554	25

7) Charakterystyka chemiczna grzybowej dehydrogenazy celobiozowej

Dehydrogenaza celobiozowa (CDH) to enzym celulolityczny o charakterze flawocytochromu, produkowany przez liczne degradujące drewno grzyby. W ramach współpracy z dr. Grzegorzem Januszem z Zakładu Biochemii UMCS przeprowadzono charakterystykę części oligocukrowej tej glikoproteiny. Białko CDH zostało wyizolowane i oczyszczone, metodą wielostopniowej ekstrakcji i rozdzielania chromatograficznego. Wykonane oznaczenia pozwoliły stwierdzić, że enzym wyizolowany z *Pycnoporus sanguineus* zawiera 9.2 % węglowodanów, wśród których zidentyfikowano

D-mannozę i D-glukozę, w proporcji 2:1. Stopień glikozylacji tego białka jest typowy dla grzybowych enzymów zewnątrzkomórkowych.

Podobnym analizom poddano dehydrogenazę celobiozową wyizolowaną z innego grzyba degradującego drewno, *Cerrena unicolor*. Jest to mikroorganizm ważny biotechnologicznie, jako jeden z najbardziej wydajnych producentów lakazy oraz szeregu innych enzymów. Wyizolowana dehydrogenaza celobiozowa została oczyszczona i poddana wielostronnej charakterystyce, obejmującej kinetykę enzymatyczną, optimum temperaturowe i pH, właściwości przeciwutleniające oraz strukturalną analizę części glikozydowej i peptydowej. Stopień glikozylacji tej glikoproteiny oszacowano na 8.2 %. Wykazano ponadto, że część cukrowa jest zbudowana z mannozy (74.1 %) glukozy (6.2 %) i glukozaminy (17.2 %) oraz niewielkich ilości galaktozy (2.5 %).

Przeprowadzone badania stały się częścią dwóch publikacji:

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	MNiSW ₂₀₁₄
1.	Sulej J., Janusz G., Osińska-Jaroszuk M., Małek P., Mazur A., Komaniecka I., Choma A., Rogalski J. Characterization of cellobiose dehydrogenase and its FAD-domain from the ligninolytic basidiomycete <i>Pycnoporus sanguineus</i> . <i>Enzyme Microb. Technol.</i> (2013) 53, 427 – 437.	2.966	30
2.	Sulej J., Janusz G., Osińska-Jaroszuk M., Rachubik P., Mazur A., Komaniecka I., Choma A., Rogalski J. Characterization of cellobiose dehydrogenase from a biotechnologically important <i>Cerrena unicolor</i> strain. <i>Appl. Biochem Biotechnol.</i> (2015) 176 (6), 1638-1658.	1.735	20

8) Badania strukturalne polisacharydu O-swoistego izolowanego z LPS bakterii z rodzaju *Phyllobacterium* i *Ochrobactrum*

W zespole prof. dr hab. A. Chomy, do którego należę, dwie osoby przygotowują rozprawy doktorskie. Jestem promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim pani mgr Katarzyny Zamłyńskiej. Tematem wiodącym obu rozpraw jest chemiczna charakterystyka lipopolisacharydów izolowanych z *Phyllobacterium trifolii* i *Ochrobactrum cytisi*, bakterii zdolnych do nawiązania efektywnej symbiozy z roślinami motylkowatymi ale nie należących do rodziny *Rhizobiaceae*.

W toku badań ustalono strukturę polisacharydów budujących łańcuch O-swoisty *Phyllobacterium trifolii*, endosymbionta koniczyny i łubinu. Wykazano obecność dwóch oddzielnych polimerów; jeden z nich jest zbudowany z powtarzających się podjednostek sześciocukrowych i drugi, złożony z podjednostek dwucukrowych. Oba polimery budują takie same składniki: α -D-ramnoza oraz β -3-C-metylo-D-ramnoza (ewaloza), połączone wiązaniami odpowiednio: (1→3) i (1→2)-glikozydowymi. Wykazano, że w puli LPS wyizolowanego z *P. trifolii* przeważa forma heksameryczna. Jest jej około sześciokrotnie więcej niż polimeru zbudowanego z podjednostek disacharydowych.

Dowodzono, że polisacharyd O-swoisty wyizolowany z *Ochrobactrum cytisi*, endosymbionta żarnowca miotlastego (*Cytisus scoparius*), był zbudowany z powtarzających się dwucukrowych podjednostek złożonych z α -D-fukozy i β -N-acetylo-D-galaktozaminy, połączonych wiązaniami (1→3)-glikozydowymi. Polimer ten był niestechiometrycznie podstawiony grupami 4-O-metylowymi (~10%)

oraz resztami 4,6-*O*-(1-karboksy)-etylidenu (grupa pirogronianowa) (również w około 10 %). Reszta pirogronianowa jest rzadko spotykana jako podstawnik łańcucha O-swoistego bakterii, ale dość powszechny w przypadku rizobiowych kwaśnych egzopolisacharydów.

Uzyskane wyniki zostały opublikowane w dwóch pracach:

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	MNiSW ₂₀₁₄
1.	Zamlynska K., Komaniecka I. , Turska-Szewczuk A., Pac M., Choma A. The O-specific polysaccharides from <i>Phyllobacterium trifolii</i> PETP02 ^T LPS contain 3-C-methyl-D-rhamnose. <i>Carbohydr. Res.</i> (2015), 409, 25-29	1.929	25
2.	Pac M., Komaniecka I. , Zamlynska K., Turska-Szewczuk A., Choma A. The structure of O-specific polysaccharide from the legume endosymbiotic bacterium <i>Ochrobactrum cytisi</i> . <i>Carbohydr. Res.</i> (2015), 413, 37-40	1.929	25

9) Badania wrażliwości błony zewnętrznej rizobków na antybiotyki peptydowe - polimiksynę B.

W ramach grantu NCN przyznanego na lata 2010-2014 (grant N N303 822840), którego byłam głównym wykonawcą, prowadzono m.in. badania właściwości błony zewnętrznej bakterii należących do różnych gatunków rizobium, a posiadających odmienną strukturę lipidu A. Porównywano między sobą sześć szczepów rizobium (*Rhizobium leguminosarum* bv. Trifolii, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium huakuii*, *Ochrobactrum lupini*, *Bradyrhizobium japonicum* i *B. elkanii*) oraz dwa szczepy *E. coli* (HB101 i ATCC 25922, produkujące odmienny typ LPS-u), ze względu na oporność tych bakterii na antybiotyki lipocyklopeptydowe (polimiksynę B). Metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) sprawdzano zachowanie się błony zewnętrznej bakterii po inkubacji komórek z polimiksyną B. Badano również zmiany przepuszczalności membrany zewnętrznej pod wpływem czynnika chelatującego (EDTA) oraz ww. antybiotyku wykorzystując właściwości fluorescencyjne *N*-fenylnaftyloaminy (NPN). Po inkubacji z polimiksyną B, jedynie u obu szczepów *E. coli* zaobserwowano dramatyczne zmiany struktury membrany zewnętrznej (OM). Obserwowano wyraźną dezintegrację OM, połączoną z tworzeniem dużej ilości pęcherzyków błonowych. Żaden z badanych szczepów rizobium nie wykazywał podobnych zmian strukturalnych. W doświadczeniu z wykorzystaniem *N*-fenylnaftyloaminy (NPN) wykazano, że *E. coli* HB 101 (o szorstkim typie LPS), *B. elkanii*, *M. huakuii* oraz *S. meliloti* inkorporują barwnik fluorescencyjny niezależnie od obecności antybiotyku i EDTA. Podobnie zachowywał się szczep *R. leguminosarum* bv Trifolii. Różnica polegała jedynie na szybkości absorpcji barwnika. Z kolei komórki *E. coli* ATCC 25922 (szczep gładki), *B. japonicum* oraz *O. lupini* absorbowwały NPN w sposób zależny od obecności czynników dezorganizujących błonę. Wyniki powyższych doświadczeń opisano w artykule znajdującym się aktualnie w recenzji:

Lp.	Publikacja, dane bibliograficzne	IF	MNiSW ₂₀₁₄
1.	Komaniecka I. , Zamlynska K., Zan R., Staszczak M., Pawelec J., Seta I., Choma A. Rhizobium strains differ significantly in outer membrane permeability and polymyxin B resistance. <i>J. Basic Microbiol.</i> (2015) (w druku)	1.823	20

7. PODSUMOWANIE AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ

Dane bibliometryczne	IF ^a	IF _{5lat}	Punkty MNiSW ^b	Punkty MNiSW ₂₀₁₄
Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe = 6 publikacji:	15.126	15.778	139	145
Autorstwo lub współautorstwo publikacji naukowych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) (z wyłączeniem prac wchodzących w skład osiągnięcia):				
A\ przed uzyskaniem stopnia doktora = 6 publikacji	12.111	13.252	100	135
B\ po uzyskaniu stopnia doktora = 14 publikacji	31.559	33.456	366	365
Autorstwo lub współautorstwo publikacji naukowych w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w bazach lub na liście JCR:				
A\ przed uzyskaniem stopnia doktora = 2 publikacje	-	-	4	18
B\ po uzyskaniu stopnia doktora = brak				
Liczba komunikatów zjazdowych prezentowanych na konferencjach krajowych i międzynarodowych				
A\ przed uzyskaniem stopnia doktora = 15				
B\ po uzyskaniu stopnia doktora = 32				
Łączna liczba publikacji				
	Razem = 28	58.796	609	663
Łączna liczba cytowań (wg. bazy Web of Science)	145			
Liczba cytowań (WoS) z wyłączeniem autocytowań	121			
Indeks Hirscha (h) (wg. bazy Web of Science)	8			
Liczba projektów badawczych				
(główny wykonawca - 2, wykonawca - 3)	5			

^a IF zgodny z rokiem ukazania się pracy

^b punkty MNiSW wg wykazu obowiązującego w roku opublikowania

Iwona Komaniecka