

Streszczenie

Symbioza bakterii glebowych określanych jako „rizobia” z roślinami z rodziny bobowate (*Fabaceae*) jest jednym z kluczowych procesów warunkujących obieg azotu w przyrodzie. Interakcje rizobiów z roślinnym gospodarzem prowadzą do wytworzenia brodawek korzeniowych lub łodygowych, wewnątrz których bakterie redukują azot atmosferyczny do amoniaku, który jest następnie zużywany przez rośliny. Dzięki symbiozie rośliny mogą rosnąć na glebach o ograniczonej dostępności tego pierwiastka. Wśród roślin bobowatych są liczne wykorzystywane do produkcji wysokobiałkowej żywności i pasz, np. groch, fasola, soja, łubin. W związku z powyższym ten naturalny system biotechnologiczny jest istotny dla rozwoju zrównoważonego, ekologicznego rolnictwa, pozwalając na ograniczenie sztucznego nawożenia azotowego.

Rozwój efektywnej symbiozy to proces złożony, zależny od wielu czynników roślinnych i bakteryjnych. Bardzo duże znaczenie w tworzeniu układów symbiotycznych odgrywają struktury powierzchniowe bakterii, do których zaliczane są: kwaśne egzopolisacharydy, kapsularne polisacharydy, lipopolisacharydy i peryplazmatyczne β -glukany. Szczególne znaczenie w tworzeniu układów symbiotycznych rizobium - roślina bobowata przypisuje się lipopolisacharydowi, który wraz z białkami tworzy zewnętrzną warstwę błony zewnętrznej (OM bakterii Gram-ujemnych) zapewniającą bakteriom symbiotycznym bezpieczeństwo w trakcie przemieszczania się i proliferacji wewnątrz nici infekcyjnych.

W ciągu ostatnich kilkunastu lat analizowano głównie relacje symbiotyczne oraz charakteryzowano lipopolisacharydy bakterii należących do rodzin *Rhizobiaceae* i *Bradyrhizobiaceae*. Nie ma doniesień naukowych dotyczących symbiozy oraz struktury LPS-ów bakterii sklasyfikowanych rodzaju *Phyllobacterium*, który należy do rodziny *Phyllobacteriaceae*.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było ustalenie struktury lipopolisacharydu wyizolowanego z *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T – mikrosymbionta koniczyny i łubinu.

Analizy strukturalne LPS *P. trifolii* PETP02^T opierały się o klasyczne metody chemiczne, chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas, spektrometrię mas oraz spektroskopię NMR.

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na przedstawienie kompletnej struktury polisacharydu O-swoistego i lipidu A oraz na wskazanie elementów mogących wchodzić w skład regionu rdzeniowego LPS *P. trifolii* PETP02^T.

Wykazano, że *P. trifolii* PETP02^T syntetyzuje dwa typy polisacharydu O-swoistego, co nie jest często spotykane wśród bakterii symbiotycznych. Obydwa rodzaje O-PS tych bakterii zbudowane są z α -D-ramnozy i β -3-C-metylo-D-ramnozy (ewalozy cukru, który rzadko występuje w przyrodzie). Główny O-PS zbudowany jest z powtarzających się sześciocukrowych podjednostek, zawierających cztery reszty D-Rha i dwie reszty D-Rha3CMe, połączone wiązaniami β -(1 \rightarrow 3), α -(1 \rightarrow 3) i α -(1 \rightarrow 2). Natomiast drugi typ O-PS *P. trifolii* PETP02^T składa się z podjednostek dwucukrowych, utworzonych z reszty D-Rha i D-Rha3CMe, pomiędzy którymi wstępują wiązania β -(1 \rightarrow 3) i α -(1 \rightarrow 2).

W toku badań nad LPS *P. trifolii* PETP02^T stwierdzono, że lipid A zbudowany jest z dwóch reszt 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukozy, połączonych wiązaniem β -(1 \rightarrow 6) glikozydowym. W pozycji C-4' dystalnej D-GlcpN3N przyłączona może być reszta fosforanowa, natomiast koniec redukujący drugiej D - GlcpN3N ozdobiony jest kwasem galakturonowym (D-GalpA). Obecność D-GalpA w szkielecie lipidu A nie jest zbyt często opisywana wśród bakterii Gram-ujemnych. Szkielet cukrowy lipidu A *P. trifolii* PETP02^T jest symetrycznie podstawiony przez cztery amidowo związane 3-hydroksykwas (2 x 3OH-14:0 i 2 x 3OH-16:0). 3 - hydroksykwas znajdujące się przy dystalnej D-GlcpN3N posiadają estrowo związaną tzw. drugorzędowe kwasy tłuszczowe: 19:0cyc i 27OH-28:0. Kwas 27OH - 28:0 może być dodatkowo podstawiony kwasem 3-metoksymasłowym. Obecność kwasu 19:0cyc nie była dotychczas opisywana w LPS/lipidzie A bakterii. Kwas ten jest jednak często obecny w fosfolipidach bakteryjnych.

Badania nad regionem rdzeniowym lipopolisacharydu *P. trifolii* PETP02^T rozpoczęto od prób otrzymania mutanta pozbawionego polisacharydu O-specyficznego. Pomimo zastosowania różnych strategii mutagenyzy: przypadkowej (wykorzystując transpozon Tn5) i ukierunkowanej (mutageneza integracyjna, delecyjna) nie udało się uzyskać mutanta szorstkiego w LPS *P. trifolii* PETP02^T. W związku z tym szczegółowo przeanalizowano niskocząsteczkową frakcję dgPS lipopolisacharydu,

wykazując w niej składniki (D-glukoza, terminalna glukozamina), które mogły sugerować obecność regionu rdzeniowego w tej frakcji. Na podstawie kolejnych analiz stwierdzono, że frakcja ta zawierała głównie muropeptydy worka mureinowego, których struktura została przedstawiona w niniejszej rozprawie. Prace nad regionem rdzeniowym LPS i konstrukcją szorstkiego mutantu *P. trifolii* PETP02^T będą kontynuowane.