

STRESZCZENIE

Lipopolisacharydy produkowane przez rizobia mają bardzo zróżnicowaną strukturę. Różnice obserwuje się zarówno w lipidzie A (uważanym za najbardziej konserwatywną część LPS), w obrębie regionu rdzeniowego oraz polisacharydu O-swoistego. Lipidy A różnią się między sobą szkieletem cukrowym oraz schematem acylacji. W skład regionu rdzeniowego rizobiów wchodzi głównie heksozy, kwasy uronowe, N-acetylochinoxamina i Kdo, a brakuje w nich typowych dla enterobakterii heptoz. Natomiast O-PSy mogą mieć odmienną strukturę nawet wśród szczepów tego samego gatunku. Zbudowane są z różnych monocukrów i często mają charakter hydrofobowy. Odpowiednia struktura każdej z domen LPS jest wymagana do nawiązania efektywnej symbiozy na poziomie bakteria-roślinny gospodarz. Skutkiem zmian w strukturze LPS (najczęściej powodowanych mutacjami) było zmniejszenie wydajności, bądź brak wiązania azotu atmosferycznego. Kompletny LPS chroni bakterie symbiotyczne wnikające do wnętrza komórek roślinnych oraz decyduje o właściwej organizacji i dojrzewaniu symbiosomów.


WPROWADZENIE

Symbioza bakterii glebowych określanych jako „rizobia” z roślinami z rodziny bobowate (*Fabaceae*) jest jednym z kluczowych procesów warunkujących obieg azotu w przyrodzie. Rizobia to heterotrofy, które sklasyfikowano do ośmiu rodzin: *Rhizobiaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Brucellaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Phyllobacteriaceae* oraz *Burkholderiaceae*. Stanowią około 100 gatunków w obrębie 11 rodzajów klasy α -proteobakterii: *Rhizobium* (*Rhizobium*/*Agrobacterium*), *Shinella*, *Ensifer* (wcześniej *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Microvirga* i *Bradyrhizobium* oraz dwóch rodzajów: *Burkholderia* i *Cupriavidus*, należących do klasy β -proteobakterii [1]. Ich charakterystyczną cechą jest zdolność do wchodzenia w układy symbiotyczne z roślinami bobowatymi i indukcji procesu brodawkowania. Nie dotyczy to jednak fitopatogennych *Agrobacterium*, obecnie sklasyfikowanych w obrębie rodzaju *Rhizobium*. Klasyfikacja agrobakterii wśród rizobiów budzi wiele kontrowersji i jest ciągle dyskutowana wśród naukowców zajmujących się taksonomią bakterii [2].

Rizobia odznaczają się dużą plastycznością metaboliczną, dzięki czemu mogą bytować w dwóch formach: saprofitycznej żyjącej w glebie oraz symbiotycznej żyjącej w brodawkach roślin bobowatych [3-6].

Do symbiozy z rizobiami zdolnych jest aż 90% gatunków roślin bobowatych należących do podrodziny mimozowatych (*Mimosoideae*) i motylkowatych właściwych (*Papilionoideae*), natomiast z podrodziny brezylikowatych (*Caesalpinioideae*) zaledwie 30% [7]. Interakcje symbiotyczne z rizobiami nawiązują także rośliny, które nie należą do bobowatych. Są to rośliny z rodzaju *Parasponia*, obejmującego szereg gatunków drzew tropikalnych, spośród których wszystkie są zdolne do symbiozy [8]. Wśród roślin bobowatych znajdują się liczne wykorzystywane do produkcji wysokobiałkowej żywności i pasz (np. groch, fasola, soja, konieczyna, lucerna, wyka) oraz cenione, jako wysokobiałkowy zielony nawóz (np. łubin, peluszka, seradela, wyka, konieczyna). Rośliny te wykształciły wydajny system pobierania azotanów z podłoża. Mimo to symbioza z rizobiami jest dla nich istotnym źródłem azotu, głównie w przypadku niedoboru tego pierwiastka w glebie [9]. Zatem symbioza jest wydajnym, naturalnym systemem, pozwalającym na znaczne ograniczenie nawożenia azotowego w uprawach, w idealnym układzie czyniąc je samowystarczalnymi [10].

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, lipopolisacha-

dr Katarzyna Zamłyńska 

Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, Polska

https://doi.org/10.18388/pb.2020_316

 autor korespondujący: k.zamlynska@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: symbioza, rośliny bobowate, rizobium, lipopolisacharyd, lipid A, region rdzeniowy, polisacharyd O-swoisty

Wykaz skrótów: C-OS, ang. core oligosaccharide – oligosacharyd rdzeniowy; Dha – kwas 3-deoksyheptulozarowy; GlcN3N – 2,3-diamino-2,3-dideoksyglukoza, diaminogluukoza; Kdo – kwas 3-deoksy-D-manno-okt-2-ulozonowy; LPS – lipopolisacharyd; LPS-R, ang. rough LPS – forma szorstka LPS; LPS-S, ang. smooth LPS – forma gładka LPS; LPS-SR, ang. semi-rough LPS – forma półszorstka LPS; O-PS, ang. O-polysaccharide – polisacharyd O-swoisty, łańcuch O-swoisty, O-antygen; VLCFA – (ang. very long chain fatty acids) długłańcuchowe (ω -1)-hydroksykwasz tłuszczowe

Podziękowanie: Niniejsza praca powstała na podstawie przeglądu literaturowego mojej pracy doktorskiej, której promotorem był Prof. Adam Choma oraz promotorem pomocniczym dr hab. Iwona Komaniecka.

rydy 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) zapewniającą bakteriom symbiotycznym bezpieczeństwo w trakcie przemieszczania się i proliferacji wewnątrz nici infekcyjnych.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA LIPOPOLISACHARYDÓW RIZOBIOWYCH

Wszystkie bakterie Gram-ujemne, z wyjątkiem *Fibrobacter succinogenes* S85 i bakterii z rodzaju *Sphingomonas*, syntetyzują lipopolisacharyd (LPS) [11]. LPS to niezbywalna część ściany komórkowej tych bakterii spełniająca funkcje o podstawowym znaczeniu dla procesów życiowych komórki. W cząsteczkach LPS wyróżnia się trzy domeny: lipid A, oligosacharyd rdzeniowy (C-OS) i polisacharyd O-swoisty (O-PS). Każdą z domen charakteryzuje odmienny szlak biosyntezy, struktura chemiczna oraz właściwości biologiczne.

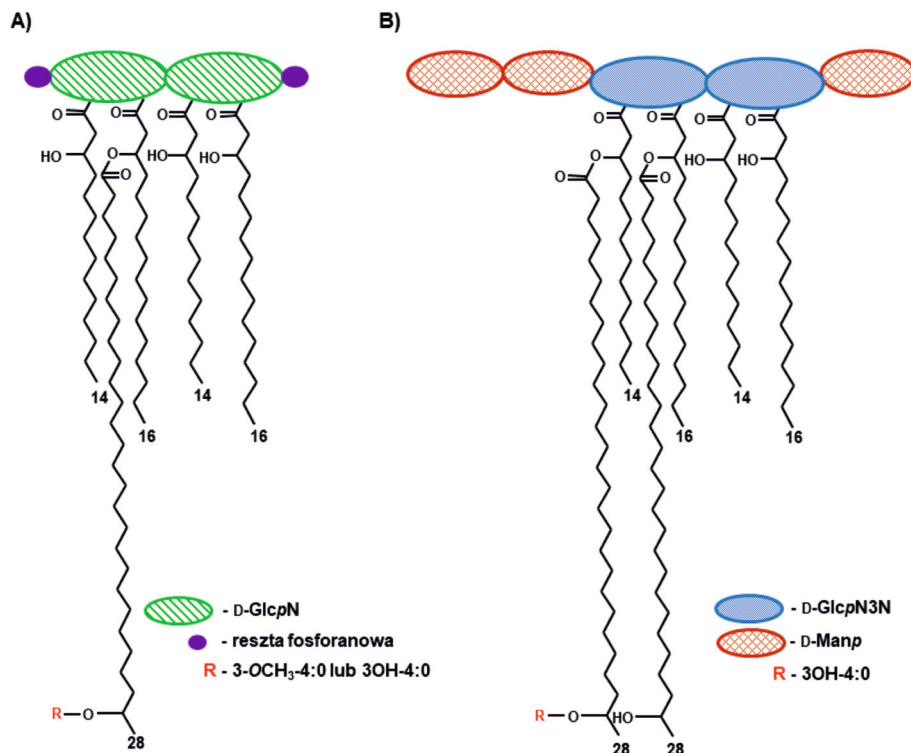
Kompletny lipopolisacharyd, zawierający wszystkie trzy wyżej wymienione części, to tak zwana forma gładka LPS (LPS-S). Lipopolisacharyd pozbawiony łańcucha O-swoistego to forma szorstka (LPS-R). Niektóre bakterie mogą także syntetyzować formę pośrednią LPS (LPS-SR), w której rdzeń jest podstawiony tylko jedną podjednostką O-PS. Heterogenność wśród występujących w błonie zewnętrznej frakcji LPS jest naturalną cechą bakterii [12].

STRUKTURA LIPIDU A BAKTERII SYMBIOTYCZNYCH

Lipidy A rizobiów posiadają zróżnicowaną strukturę. U bakterii tych szkielet cukrowy może być podobny do en-

terobakteryjnego, zbudowanego na bazie D-glukozy (D-GlcN) [13,14], bądź na bazie 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukozy (D-GlcN3N). Szkielet ten jest często modyfikowany przez podstawniki cukrowe, kwasy uronowe, reszty fosforanowe. Modyfikacjom chemicznym może podlegać sam rdzeń aminocukrowy (np. poprzez utlenianie). Grupy aminowe diaminoglukozy i glukozaminy oraz pozycje C-3 i C-3' glukozaminy są podstawione przez pierwszorzędowe 3-hydroksykwasy tłuszczowe, których długość wynosi od 12 do 20 atomów węgla. Grupy hydroksylowe części z tych kwasów są podstawione tak zwanymi drugorzędowymi kwasami tłuszczowymi, w tym długołańcuchowymi (ω -1)-hydroksykwasami (VLCFA, ang. Very Long Chain Fatty Acids), tworząc ugrupowania acylooksyacylowe. VLCFA mogą zawierać od 26 do 34 atomów węgla w cząsteczce i mogą występować także w formie utlenionej (ω -1)-ketokwasu). Skład kwasów tłuszczowych jest charakterystyczny dla poszczególnych rodzajów, a nawet gatunków rizobiów [15-18,12,19]. Jak do tej pory jedynym udokumentowanym wyjątkiem od powyższej reguły są bakterie z gatunku *Azorhizobium caulinodans*, które nie syntetyzują VLCFA pomimo obecności w ich genomie *loci* kodujący odpowiedni zestaw enzymów. Spośród VLCFA, kwas 27-hydroksyoktakozanowy (27OH-28:0) był tak często identyfikowany, że w pewnym momencie został on uznany za marker chemotaksonomiczny tej grupy bakterii [20,21]. Lipidy A bakterii należących do rodzajów *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Mezorhizobium* posiadają tylko jedną resztę kwasu 27OH-28:0, podczas gdy lipidy A *Bradyrhizobium* są podstawione przez dwie, a nawet trzy reszty kwasów z grupy VLCFA (Ryc. 1) [22-25].

Analiza cukrów wchodzących w skład lipidu A rizobiów pozwoliła na wyróżnienie trzech typów szkieletu cukrowe-



Rycina 1. Schemat przedstawiający budowę lipidów A: A) *Ensifer meliloti* Rm1021 [26,27] B) *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76 [22].

Tabela 1. Stopień ufosforylowania i rodzaj podstawienia szkieletu lipidu A rizobiów.

Lp.	Szczep bakteryjny	Typ rdzenia cukrowego	Rodzaj podstawnika disacharydu w pozycjach		Piśmiennictwo
			C4'	C1	
1.	<i>Ensifer meliloti</i> Rm1021 <i>Ensifer fredii</i> NGR 234 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	D-GlcpN-β-(1→6)-D-GlcpN	P	P	[26-29]
2.	<i>Rhizobium etli</i> CE3 (dawniej <i>R. phaseoli</i> , <i>R. leguminosarum</i> bv. Phaseoli) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bvs. Trifolii, Viciae 3841	D-GlcpN-β-(1→6)-D-GlcpAN	D-GalpA	brak	[17,18,31,32]
3.	<i>Rhizobium sp. Sin-1</i> <i>Rhizobium galegae</i>	D-GlcpN-β-(1→6)-D-GlcpAN	brak	brak	[33,34]
4.	<i>Mesorhizobium huakuii</i> IFO 15243T <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF 303099	D-GlcpN3N-β-(1→6)-D-GlcpN3N	P	D-GalpA	[19,36]
5.	<i>Phyllobacterium trifolii</i> PETP02T	D-GlcpN3N-β-(1→6)-D-GlcpN3N	P	D-GalpA	[37]
6.	<i>Azorhizobium caulinodans</i> HAMB1 216	D-GlcpN3N-β-(1→6)-D-GlcpN3N	brak	D-GlcpA	[38]
7.	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76	D-GlcpN3N-β-(1→6)-D-GlcpN3N	D-Manp-β-(1→6)-D-Manp	D-Manp	[22]
8.	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (diazoficiens) USDA 110 <i>Bradyrhizobium</i> sp. (Lupinus) USDA 3045 <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071 <i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1 <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	D-GlcpN3N-β-(1→6)-D-GlcpN3N	D-Manp-β-(1→6)-D-Manp	D-GalpA	[23,24]

Szczepy opisane pogrubioną czcionką były „referencyjne” w prowadzonych badaniach.

go. Pierwszy z nich reprezentuje *Ensifer meliloti* Rm1021, *Ensifer fredii* NGR234 oraz *Agrobacterium tumefaciens* C58 (*A. fabrum* C58 lub *R. radiobacter* C58). Syntetyzują one klasyczny rdzeń lipidu A zbudowany z dwóch cząsteczek D-glukozaminy, difosforylowany w pozycjach C-1 i C-4' (Tabela 1, poz. 1) [26-29]. Do szkieletu cukrowego lipidu A *E. meliloti* Rm1021, *E. fredii* NGR 234 i *A. tumefaciens* wiązaniem amidowym i estrowym przyłączone są symetrycznie po dwie reszty kwasu 3OH-14:0 oraz dwie reszty kwasu 3OH-16:0 (Tabela 2, poz.1). U bakterii tych kwas 3OH-16:0 znajdujący się przy dystalnej D-GlcpN jest dodatkowo podstawiony kwasem 27OH-28:0. Kwas 27OH-28:0 u *E. meliloti* Rm1021 może posiadać przyłączoną resztę kwasu 3-metoksymasłowego (3-OCH₃-4:0) (Tabela 2, poz. 1), natomiast u *E. fredii* NGR234 i *A. tumefaciens* resztę kwasu 3-hydroksymasłowego (3OH-4:0) [26-29].

U niektórych rizobiów redukująca reszta D-GlcpN może być utleniona do kwasu 2-amino-2-deoksy-D-glukonowego (D-GlcpAN) [30]. Takie lipidy A opisano dla *R. etli* CE3 i *R. leguminosarum* bvs. Trifolii i Viciae (Tabela 1, poz. 2). W obydwu przypadkach reszta fosforanowa w pozycji C-4' dystalnej D-GlcpN została zastąpiona przez D-GalA [17,18,31,32]. Dwucukier β-D-GlcpN-(16)-D-GlcpAN występuje także w szkielecie lipidu A *Rhizobium* sp. Sin-1 oraz *R. galegae*, jednak nie zwierają one podstawników w pozycji C-4' (Tabela 1, poz. 3) [33,34]. Schemat acylacji lipidów A tych bakterii jest podobny do wzoru acylacji lipidów A *E. meliloti* Rm1021, *E. fredii* NGR234 i *A. tumefaciens* (Tabela 2, poz. 1-3).

Bakterie z rodzajów *Meso*-, *Azo*- i *Bradyrhizobium* oraz szczep *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T syntetyzują lipidy A, których szkielet cukrowy jest dwucukrem zbudowanym z D-GlcpN3N (Tabela 1, poz. 4-8). Wyjątek stanowi lipid A *Mesorhizobium loti* Ayac1BII, którego struktura oparta jest o dwucukier glukozaminyloglukozaminowy (D-GlcpN-β-(1→6)-D-GlcpN). Jego budowa została ustalona na podstawie danych otrzymanych z GC-MS oraz UV-MALDI TOF MS [35]. W dotychczas opisanych szkieletach lipidów A mezorizobiów [19,36] i *P. trifolii* PETP02^T (bakterii należących do tej samej rodziny - *Phyllobacteriaceae*) w szkielecie zawsze występowała D-GlcpN3N. Zatem opisana struktura szkieletu lipidu A *M. loti* Ayac1BII może budzić wątpliwości wśród niektórych badaczy. Lipidy A *M. huakuii* IFO 15243T, *M. loti* MAFF 303099 oraz *P. trifolii* PETP02^T posiadają resztę kwasu D-GalpA przyłączoną do proksymalnej reszty D-GlcpN3N wiązaniem α-(1→1) (Tabela 1, poz. 4, 5) [19,36,37]. Podczas gdy *A. caulinodans* HAMB1216 jest podstawiony w pozycji C-1 resztą kwasu glukuronowego (D-GlcpA) (Tabela 1, poz. 6) [38]. Lipidy A mezorizobiów jak i *P. trifolii* PETP02^T mogą być częściowo ufosforylowane w pozycji C-4' dystalnej reszty D-GlcpN3N (Tabela 1, poz.4, 5) [19,36]. Do obydwu reszt D-GlcpN3N wiązaniem amidowym przyłączone są cztery reszty 3-hydroksykwasów tłuszczowych. U *A. caulinodans* HAMB1 216 są to dwie reszty kwasu 3OH-14:0 oraz po jednej reszcie kwasu 3OH-20:1 i kwasu 3OH-18:0. Znajdujące się przy dystalnej diaminoglukozie kwasy 3OH-14:0 i 3OH-20:1 oraz przy proksymalnej kwas 3OH-14:0 mogą tworzyć ugrupowania

Tabela 2. Rodzaj reszt acylowych oraz sposób ich rozmieszczenia w szkielecie cukrowym lipidu A rizobiów.

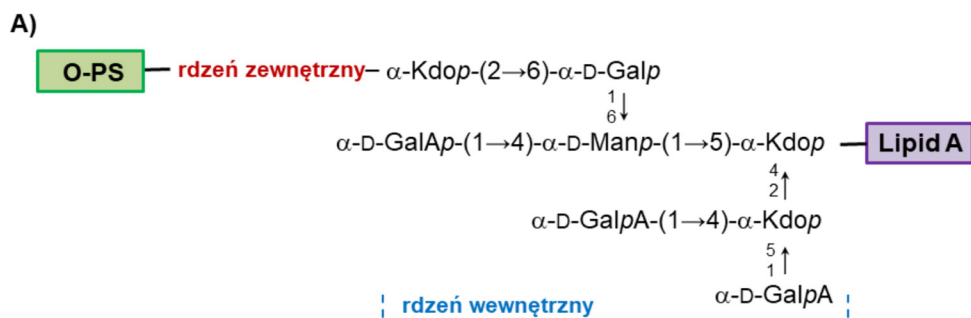
Lp.	Szczep bakteryjny	Rodzaj rdzenia cukrowego				Pismienictwo
		D-GlcpN II		D-GlcpN I		
		3'	2'	3	2	
1.	<i>Ensifer meliloti</i> Rm1021 <i>Ensifer fredii</i> NGR 234 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	3OH-14:0	3OH-16:0 27OH-28:0 3-OCH ₃ -4:0 lub 3-OH-4:0	3OH-14:0	3OH-16:0	[26-29]
		D-GlcpN		D-GlcpAN		
		3'	2'	3	2	
2.	<i>Rhizobium etli</i> CE3 (dawniej <i>R. phaseoli</i> , <i>R. leguminosarum</i> bv. Phaseoli) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bvs. Trifolii, Viciae 3841	3OH-14:0	3OH-16:0 27OH-28:0 3-OH-4:0	3OH-14:0	3OH-16:0	[17,18,31,32]
3.	<i>Rhizobium</i> sp. Sin-1 <i>Rhizobium galegae</i>	3OH-14:0	3OH-16:0 27OH-28:0	3OH-14:0	3OH-16:0	[33,34]
		D-GlcpN3N		D-GlcpN3N		
		3'	2'	3	2	
4.	<i>Mesorhizobium huakuii</i> IFO 15243 ^T <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF 303099	3OH- <i>i</i> 13:0 3OH-20:1	3OH-20:0 27OH-28:0	3OH- <i>i</i> 13:0	3OH-20:0	[19,36]
5.	<i>Phyllobacterium trifolii</i> PETP02 ^T	3OH-14:0 19:0cyc	3OH-16:0 27OH-28:0 lub 27oxo-28:0	3OH-14:0	3OH-16:0	[37]
6.	<i>Azorhizobium caulinodans</i> HAMBI 216	3OH-14:0	3OH-20:1 27OH-28:0 3OH-18:0, 18:0 18:1 lub 16:0	3OH-14:0	3OH-18:0	[38]
7.	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76	3OH-12:0 VLCFA (26-34) 3-OH-4:0	3OH-14:0 VLCFA (26-34)	3OH-12:0	3OH-14:0	[22]
8.	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (<i>diazoefficiens</i>) USDA 110 <i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Lupinus</i>) USDA 3045 <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071 <i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1 <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	3OH-12:0 VLCFA (26-34) hopanoid	3OH-14:0 VLCFA (26-34)	3OH-12:0	3OH-14:0	[23,24]

Szczepy opisane pogrubioną czcionką były „referencyjne” w prowadzonych badaniach.

acylooksyacylowe z kwasami 3OH-18:0, 18:1, 18:0 oraz 16:0 (Tabela 2, poz. 6) [38]. Ciekawy wzór acylacji posiadają lipidy A syntetyzowane przez *M. huakuii* IFO 15243^T i *M. loti* MAFF 303099, u których wśród pierwszorzędowych kwasów tłuszczowych zidentyfikowano kwas 3OH-20:0 oraz nietypowy rozgałęziony kwas 3OH-*i*-13:0 przyłączone odpowiednio w pozycjach C-2 i C-3 dystalnej i proksymalnej reszty D-GlcpN3N. Kwasy te mogą być estryfikowane odpowiednio przez kwasy 3OH-20:1 i 27OH-28:0 (Tabela 2, poz. 4) [19,36]. W lipidzie A *P. trifolii* PETP02^T pozycje C-2 i C-3 obydwu GlcpN3N są symetrycznie podstawione odpowiednio przez 3OH-14:0 i 3OH-16:0. 3-hydroksykwas znajdujący się przy C-2' dystalnej GlcpN3N są estryfikowane przez długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, głównie przez 27oxo-28:0 i 27OH-28:0. Drugi z nich może być dodatkowo acylowany

przez kwas 3-OCH₃-4:0. Resztę acylooksyacylową w pozycji C-3' lipidu A stanowi kwas 3OH-14:0 niosący kwas laktobacilowy (19:0cyc) jako podstawnik drugorzędowy (Tabela 2, poz. 5) [37]. Opisany powyżej lipid A jest jedynym, do tej pory, przykładem występowania kwasu laktobacilowego w rizobiowych lipopolisacharydach. Kwas ten powszechnie występuje w bakteryjnych fosfolipidach. Pojawia się głównie w stacjonarnej fazie wzrostu bakterii.

Lipidy A bakterii sklasyfikowanych do rodzaju *Bradyrhizobium* posiadają najbardziej rozbudowaną strukturę. Szkielet lipidu A *B. elkanii* USDA 76 składa się z dwóch cząsteczek D-GlcpN3N oraz trzech cząsteczek D-mannozy (D-Manp). Jedna cząsteczka mannozy dołączona jest do proksymalnej reszty D-GlcpN3N wiązaniem α-(1→1), nato-



B)

Rdzeń zewnętrzny:

***R. etli* CE3**

β -D-Fucp-(1→3)- β -D-Manp-(1→3)- β -D-QuipNAc-(1→

***R. leguminosarum* bv. *Trifolii* 24**

α -L-Rhap-2-OAc*(1→3)- α -L-Rhap-(1→3)- β -D-QuipNAc-(1→

*~50%

Rycina 2. Schemat przedstawiający strukturę: A) rdzenia wewnętrznego i B) rdzenia zewnętrznego *Rhizobium etli* CE3 oraz *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* 24 [46,49].

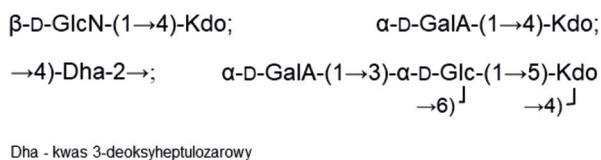
miast dwie pozostałe tworzą disacharyd α -D-mannozylo-(1→6)- α -D-mannozowy, dołączony do szkieletu lipidu A w pozycji C-4' (Tabela 1, poz. 7) [22]. Szkielety lipidów A *B. japonicum* (obecnie *B. diazoefficiens*) USDA 110, *B. yuanmingense* CCBAU 10071, *Bradyrhizobium* sp. Lupinus USDA 3045 oraz *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 zamiast mannozy w pozycji C-1 redukującej D-GlcP_{N3N} posiadają reszty kwasu D-galakturonowego (Tabela 1, poz. 8) [23,24]. U bradyrhizobii grupy aminowe obu reszt diaminoglukozowych podstawione są symetrycznie kwasami 3OH-12:0 i 3OH-14:0 (Tabela 2, poz. 7, 8). Dotychczas, tylko w lipidach A zdolnych do fotosyntezy *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 i sp. ORS278 obok 3OH-12:0 zidentyfikowano również 3OH-12:1 [24,39]. 3-hydroksykwasy związane z dystalną D-GlcP_{N3N} noszą związane do grup hydroksylowych dwa długołańcuchowe (ω -1)-hydroksykwasy tłuszczowe tworząc w ten sposób niezwykle reszty acyloksyacylowe. U *B. elkanii* USDA 76 jedna z grup acyloksyacylowych jest dodatkowo estryfikowana kwasem 3-hydroksymasłowym (Tabela 2, poz. 7) [22]. Natomiast u *B. diazoefficiens* USDA 110, *B. sp.* Lupinus USDA 3045 oraz *B. sp.* BTAi1 grupa ta podstawiona jest hopanoidem lub jego metylową pochodną (Tabela 2, poz. 8) [23,24]. Lipid A *B. yuanmingense* CCBAU 10071 może być hepta-acylowany i posiadać aż trzy reszty długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, z których jeden dodatkowo niesie resztę hopanoidu [23].

Hopanoidy są klasą pentacyklicznych lipidów triterpenowych, które występują zarówno u bakterii Gram-ujemnych jak i Gram-dodatnich. Skwaleń i pochodne hopanu zostały opisane u *Streptomyces* spp., *Zymomonas mobilis* (α -proteobakterii bakterii tolerujących wysokie stężenie etanolu), purpurowych bakterii bezsiarkowych – *Rhodopseudomonas palustris* i *Rhodomicrobium vannielii*; *Methylococcus capsulatus*; wiążących azot atmosferyczny – *Azotobacter* i *Beijerinckia* oraz symbiotycznych *Frankia* i *Bradyrhizobium* [40-

44]. Hopanoidy uważane są za odpowiedniki steroli obecnych w błonach komórek eukariotycznych. Pełnią rolę błonowych stabilizatorów odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie bakteryjnej błony komórkowej, nadając jej sztywność i wytrzymałość mechaniczną [45]. Uważa się, że u bakterii wiążących azot atmosferyczny hopanoidy mogą pełnić także inne funkcje. Wykazano, że u *Frankia* hopanoidy tworzą barierę dyfuzyjną dla tlenu, chroniąc w ten sposób kompleks nitrogenazy [41]. Dla przykładu, u mutantów *Bradyrhizobium* BTAi1 brak hopanoidów spowodował ich większą wrażliwość na czynniki stresogenne oraz mniejszą przeżywalność w komórkach roślinnego gospodarza w stosunku do szczepu dzikiego [24].

BUDOWA REGIONU RDZENIOWEGO U RIZOBIÓW

Kompletne struktury regionu rdzeniowego (C-OS, ang. *core-oligosaccharide*) opisano dla lipopolisacharydów *R. leguminosarum* bvs. *Viciae*, *Trifolii* oraz *R. etli* CE3 (Ryc. 2) [46,47]. U tych bakterii komponentami rdzenia wewnętrznego są: trisacharyd α -D-GalpA-(1→4)-[α -D-GalpA-(1→5)]-Kdop oraz tetrasacharyd α -D-Galp-(1→6)-[α -D-Galp-(1→4)]- α -D-Manp-(1→5)]-Kdop, uwalniane z LPSu w trakcie łagodnej kwaśnej hydrolizy. Oba oligosacharydy rdzeniowe łączą się ze sobą poprzez ketozydowe wiązanie pomiędzy dwiema cząsteczkami Kdo (α -Kdo(2-4)Kdo). W odróżnieniu od rdzenia enterobakterii [48] rdzeń bakterii z rodzaju *Rhizobium* nie zawiera regionu heptozowego i reszt fosforanowych. Trzecia reszta Kdo znajduje się w miejscu oddalonym o dwie heksozy od wyżej opisanych, łącząc ze sobą część wewnętrzną z zewnętrzną rdzenia [46,47,49]. W lipopolisacharydzie *R. etli* CE3 rdzeń zewnętrzny zawiera mannozę (Man), fukozę (Fuc), N-acetylochinosaminę (QuipNAc) i Kdo [50]. Natomiast w rdzeniu zewnętrznym *R. leguminosarum* bv. *Trifolii* 24 zidentyfikowano tylko ramnozę (Rha) i QuipNAc [49].



Rycina 3. Elementy strukturalne zidentyfikowane w regionie rdzeniowym LPS *E. meliloti* 102F51 [54].

W obrębie rodzaju *Agrobacterium* obserwuje się duże zróżnicowanie strukturalne regionu rdzeniowego. Podobnie jak u *R. leguminosarum* i *R. etli* oligosacharyd rdzeniowy różnych szczepów *Agrobacterium* nie zawiera regionu heptozowego ani podstawników fosfoestrowych. U *A. tumefaciens* A1, DSM 30150, TT111, DSM 30204 oraz *A. radiobacter* Rv3, DSM 30207 występuje wewnętrzny motyw Man₁Kdo₂, charakterystyczny dla *R. etli* i *R. leguminosarum* [51,52]. W LPS *A. larrymoorey* zamiast Man do Kdo przyłączona jest reszta galaktozy (Gal), podczas gdy w LPS izolowanym z *A. rubi* – reszta glukozy (Glc) [53,52]. Wśród szczepów *Agrobacterium* tylko *A. rubi* DSM 6772, oprócz Kdo, zawiera dodatkowo kwaśne cukry: dwie reszty kwasu glukuronowego oraz jedną kwasu galakturonowego [52]. Natomiast w C-OS *A. larrymoorey* zidentyfikowano kwas aminogalakturonowy [53].

W przypadku LPS *Ensifer* dotychczas ustalono tylko skład regionu rdzeniowego niektórych szczepów oraz opisano częściową strukturę C-OS z LPS *E. melilotii* 102F51 (Ryc. 3) [54]. Bakterie z tego rodzaju syntetyzują głównie LPS typu szorstkiego (LPS-R). Wszystkie formy LPS-R *Ensifer* zawierają kwas galakturonowy i Kdo oraz są pozbawione regionu heptozowego. Regiony rdzeniowe *E. meliloti* Rm1021, *E. fredii* USDA 205 i USDA 257 oraz *E. fredii* NGR 234 zawierają te same składniki tj. glukozę, galaktozę, mannozę, kwas galakturonowy oraz Kdo, jednak w różnych proporcjach. Przeprowadzone badania immunochemiczne potwierdziły obecność kilku grup strukturalnych w regionie rdzeniowym lipopolisacharydów tych bakterii [47,55]. Wykazano, że przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko *E. fredii* USDA 205 reagowały z formą LPS-R wyizolowaną ze szczepów *E. fredii* USDA 191, USDA 205, USDA 208 oraz NGR 234. Nie stwierdzono oddziaływania z szesnastoma innymi szczepami *E. melilotii* i *E. fredii*. Zaobserwowano jednak reakcję przeciwciał poliklonalnych skierowanych przeciwko LPS *E. meliloti* Rm41 z LPS-R z *E. meliloti* AK 631, Rm 1021, NRG 133, NRG 247, NRG 286, NRG 23, NRG 53 oraz z *E. fredii* USDA 192, USDA 196, USDA 197, USDA 257, USDA 201 i HH 103 [55]. Wyniki tych badań sugerują, że region rdzeniowy różnych szczepów *Ensifer* zawiera podobne, ale nie identyczne struktury, które można zgrupować w 3 lub 4 powiązane typy strukturalne [47,55]. Podobne wyniki uży-

skano stosując serię przeciwciał monoklonalnych przygotowanych przeciwko różnym szczepom *E. meliloti* [56].

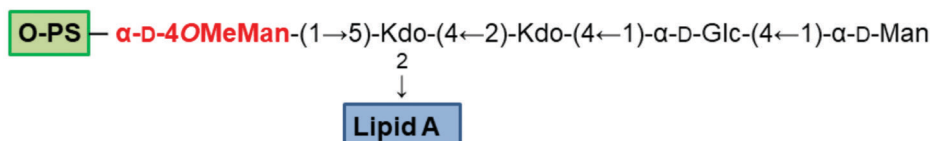
Skład oraz częściową strukturę regionu rdzeniowego u *B. japonicum* opisano, dzięki analizie LPSów wyizolowanych ze szczepów 61A101c i 61A123, niezupełnie pozbawionych O-PS oraz szorstkiego mutantu *B. japonicum* I110 (HS123) całkowicie pozbawionego O-PS. U wszystkich tych szczepów w regionie rdzeniowym zidentyfikowano Man, Glc oraz Kdo. Dodatkowo w LPSach szczepów 61A101c i 61A123 zidentyfikowano 4-O-metylomannozę (4-OMeMan), czego nie zauważono w mutancie I110. Sugeruje to, że 4-OMeMan stanowi łącznik pomiędzy O-PS i C-OS (Ryc. 4) [57]. Autorzy opisali strukturę di- i trisacharydu oraz zaproponowali budowę rdzenia *Bradyrhizobium* jak zaprezentowano na Ryc. 4.

Ostatnie badania pozwoliły na ustalenie kompletnej struktury regionu rdzeniowego u *Bradyrhizobium* sp. ORS278 [58]. Strukturę C-OS tej bakterii opisano dzięki analizie LPSów wyizolowanych ze szczepu dzikiego oraz jego mutantu w genie *rfaL* (*waaL*), który odpowiada za przyłączanie polisacharydu O-swoistego do kompleksu C-OS-lipid A. Opierając się na danych NMR i MS wykazano, że C-OS tej bakterii składa się z mieszaniny heptai i oktasacharydów zawierających trisacharyd o strukturze $\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glc-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-Kdo}$ oraz tetrasacharyd zbudowany z $\alpha\text{-D-GlcN-(1}\rightarrow\text{7)-}\alpha\text{-D-Hep-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-4OMeMan-(1}\rightarrow\text{5)-}\alpha\text{-Kdo}$, przy czym reszta $\alpha\text{-D-GlcN}$ występuje w ilości niestechiometrycznej. Analizy MS wykazały także obecność dodatkowej reszty $\alpha\text{-D-GlcN}$ przyłączonej do $\alpha\text{-D-Hep}$. Autorzy sugerują, że C-OS *Bradyrhizobium* sp. ORS278 ma strukturę liniową. Do lipidu A przyłączony jest trisacharyd, a tetrasacharyd resztą Kdo łączy się z terminalną $\alpha\text{-D-Man}$. Końcowa reszta $\alpha\text{-D-GlcN}$ jest linkerem, do którego w trakcie syntezy LPS dołączany jest łańcuch O-swoisty [58].

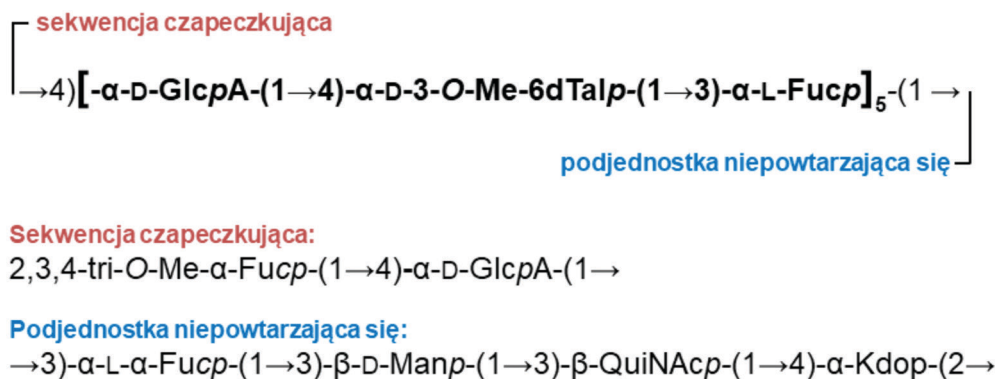
RIZOBIOWE POLISACHARYDY O- SWOISTE

Polisacharydy O-swoiste rizoobiów są bardzo zróżnicowane pod względem budowy nawet wśród szczepów tego samego gatunku.

Porównując skład O-PSów bakterii z rodzajów *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*) i *Agrobacterium* stwierdzono, że są zbudowane głównie z deoksyheksoz, w szczególności z ramnozy (Rha), fukozy (Fuc) i 6-deoksytalozy (6dTal) oraz ich metylowych pochodnych. W preparatach polisacharydowych tych bakterii zidentyfikowano także heksozy (Man, Gal), O-metyloheksozy, heptozę i jej metylową pochodną, aminocukry, kwasy uronowe oraz podstawniki niecukrowe np. grupy acetylowe [59,60,46,61-65].



Rycina 4. Struktura regionu rdzeniowego zaproponowana dla *B. japonicum* 61A101c przez Carlson i Krishnaiah [57].



Rycina 5. Schemat przedstawiający strukturę polisacharydu O-swoistego *Rhizobium etli* CE3 [66].

Rizobiowe polisacharydy O-swoiste mogą zawierać naładowane reszty monosacharydowe. Do takich reszt należą kwas 3-deoksy-2-heptulozarowy (Dha), obecny w O-PS *R. leguminosarum* bv. Trifolii 24, kwas glukuronowy u *R. etli* CE3, czy kwas 3-acetimidoamino-3-deoksy-D-glukoheksuronowy (Glc3NAmA) u *R. leguminosarum* bv. Viciae [60,66,61]. Reszty te są często zobojętniane (np. GalA w O-PS *R. etli* CE3 jest estryfikowany resztą metylową) bądź występują w postaci amfijonu (np. Glc3NAmA w O-PS *R. leguminosarum* bv. Viciae), przez co powierzchnia komórki wykazuje względnie hydrofobowy charakter [66, 61].

Typowym przykładem rizobiowego O-PS jest polisacharyd O-swoisty wyizolowany z LPS *R. etli* CE3 (Ryc. 5). Jest to krótki polimer zbudowany z trójsacharydowych powtarzających się podjednostek, w skład których wchodzi α -D-GlcpA, 6-deoksy-3-O-metylo- α -taloza (α -3-O-Me-6dTalp) i α -L-Fucp. Jego stopień polimeryzacji wynosi 5. Do końca nieredukującego powtarzającej się podjednostki przyłączona jest tzw. sekwencja czapeczkująca (cap), zbudowana z trimetylowej pochodnej fukozy (2,3,4-tri-O-Me- α -Fucp) i α -D-GlAp. Natomiast koniec redukujący podstawiony jest trójczukrem zbudowanym z α -L-Fucp, β -D-Manp i β -QuiNAc [66].

Ciekawą strukturę posiada O-PS w izolowany z LPS *R. leguminosarum* 3841 (mikrosymbiont groszku zwyczajnego), w którym oprócz α -L-Fuc zidentyfikowano nietypowe reszty glikozydowe: α -D-3-O-Me-6dTalp (synonim α -D-3Me-6dTalp), α -L-QuiNAc oraz kwas β -D-Glc3NAmA. O-PS ten składa się z trzech do czterech powtarzających się tetrasacharydowych podjednostek o następującej sekwencji: \rightarrow 4)-[β -D-Glcp3NAmA-(1 \rightarrow 4)-2-O-Ac-3-O-Me- α -D-6dTalp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fucp-(1 \rightarrow 3)- α -L-QuiNAc-(1 \rightarrow 4)]_n- β -D-Glcp3NAmA-(1 \rightarrow [61].

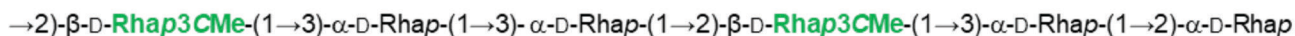
Przykładem polisacharydów O-swoistych bakterii z rodzaju *Mesorhizobium* są O-PSy wyizolowane z lipopolisacharydów *M. huakuii* IFO15243T, *M. loti* NZP2213 i *M. lotii* MAFF 3030999. O-PS *M. huakuii* IFO15243T stanowi liniowy polimer, który tworzą trójczukrowe powtarzające się podjednostki o następującej sekwencji: \rightarrow 2)- α -L-6dTalp(1 \rightarrow 3)- α -L-6dTalp(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap(1 \rightarrow [67]. *M. loti* NZP2213 posiada

O-PS zbudowany z 2-O-acetylo-6-deoksy-L-talozy z niewielką ilością 2-O-metylo-6-deoksy-L-talozy. W polisacharydzie O-swoistym mutantu Tn5 (*M. loti* NZP2213.1), który nie nawiązywał efektywnej symbiozy z roślinnym gospodarzem, zidentyfikowano znacznie więcej 2-O-Ac-3-Me-6dTal w porównaniu do O-PS szczepu dzikiego [62]. Natomiast ostatnie badania nad polisacharydem O-swoistym *M. lotii* MAFF3030999 wykazały, że jest on zbudowany z α -L-6dTalp i α -L-Rhap, podobnie jak O-PS *M. huakuii* IFO15243T [68, 67]. O-PS *M. lotii* MAFF 3030999 stanowi polimer sześciocukrowych podjednostek o następującej sekwencji: \rightarrow 2)- α -L-6dTalp-(1 \rightarrow 3)- α -L-6dTalp-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -L-6dTalp-(1 \rightarrow 3)- α -L-6dTalp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow [68].

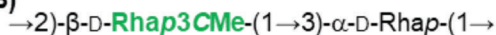
Przez długi okres czasu twierdzono, że struktura polisacharydu O-swoistego *E. fredii* NGR 234 oraz innych szczepów *E. fredii* znacznie odbiega od pozostałych rizobiowych O-PS. Analiza składu wskazywała na to, że są to homopolimery glukozy [69]. W toku kolejnych badań wykazano, że O-PS *E. fredii* NGR 234 podobnie jak inne polisacharydy O-swoiste rizobiów składa się głównie z L-Rha, a *E. fredii* SMH12 z D-GalA, L-Rha oraz D-Man [63, 65]. Wśród tej grupy bakterii opisano nietypową zdolność do wytwarzania warunkowo zależnych struktur O-PS. Wiele szczepów *Ensifer* hodowanych w warunkach laboratoryjnych posiada LPS pozbawiony łańcucha O-swoistego, bądź wytwarza go w małych ilościach. Zaobserwowano, że gdy do hodowli szczepu *E. fredii* NGR234 dodano apigeniny (flawonoid), która aktywuje ekspresję genów *nod*, szczep ten syntetyzował znaczne ilości O-PS [63]. W przypadku *E. fredii* USDA205 w normalnych warunkach hodowli O-PS wydaje się być zbudowany wyłącznie z glukozy, jednakże, gdy do hodowli dodano apigeniny lub ekstraktu z korzenia roślinnego gospodarza, zaobserwowano znaczny wzrost ilości lipopolisacharydu, który zawierał w łańcuchu O-swoistym Glc, Xyl i Man [69].

Opisano sześć polisacharydów O-swoistych dla rodzaju *Agrobacterium* (rodzina *Rhizobiaceae*): cztery dla *A. tumefaciens* i dwa dla *A. radiobacter* [32]. Trzy z nich są homopolimerami: O-PSy *A. tumefaciens* C58, *A. radiobacter* M2/1 oraz jeden z polisacharydów O-swoistych *A. radiobacter*. *A. tumefaciens* C58 syntetyzuje O-PS podobny do O-PS *M. lotii* NZP2213. Zbudowany jest także z α -L-6dTalp, jednak różni się wzorcem O-acetylacji. O-PS *A. radiobacter* to polimer

A)



B)



Rycina 6. Schemat przedstawiający strukturę A) sześćcio- i B) dwucukrowych podjednostek polisacharydów O-swoistych *P. trifolii* PETP02^T [70].

α -L-ramnozy, podczas gdy O-PS *A. radiobacter* M2/1 to nietypowy L-glicero-D-manno-heptan. We wszystkich tych polimerach występują wiązania (1 \rightarrow 3). Do heteropolimerów zalicza się: O-PS *A. tumefaciens* B6, O-PS *A. tumefaciens* F/1 oraz O-PS *A. tumefaciens* TT9. W skład O-PS *A. tumefaciens* B6 wchodzi D-arabinoza (D-Araf) i L-Fucp, połączone wiązaniami α -(1 \rightarrow 3). Szczepy *A. tumefaciens* F/1, *A. tumefaciens* TT9 i *A. radiobacter* posiadają więcej niż jeden rodzaj O-PS, co nie jest często spotykane wśród bakterii [32]. Obydwa O-PSy *A. tumefaciens* F/1 zbudowane są z α -L-Rhap i β -D-GlcpNAc, różnią się jednak sposobem połączenia cukrów. W jednym O-PS występują wyłącznie wiązania (1 \rightarrow 3), w drugim wiązania (1 \rightarrow 3) i (1 \rightarrow 4). *A. tumefaciens* szczep TT9 syntetyzuje dwa polisacharydy O-swoiste. Pierwszy z nich jest polimerem podjednostek zawierających α -L-Rhap i α -D-Fucp połączonych wiązaniami odpowiednio (1 \rightarrow 3) i (1 \rightarrow 4), natomiast proponowana struktura drugiego, która nie została dotychczas dokładnie udokumentowana, zawiera wyłącznie 4-amino-4-deoksyfukozę podstawioną w pozycji C-4 δ -laktamem kwasu 2-N-metylo-3,4-dihydroksyglutaminowego [32].

Jak wspomniano wyżej jeden z O-PSów *A. radiobacter* to homopolimer heptozowy, podczas gdy drugi to polimer utworzony z α -D-Fucp połączonych wiązaniami (1 \rightarrow 3), przy czym co druga α -D-Fucp podstawiona jest przez α -D-Manp w pozycji C-2. Synteza więcej niż jednego typu O-PS u tych bakterii zachodzi jednocześnie podczas hodowli w odpowiednim dla szczepu podłożu hodowlanym [32]. Podobnie jest u *P. trifolii* PETP02^T, który również syntetyzuje dwa typy polisacharydu O-swoistego. Obydwa rodzaje O-PS tych bakterii zbudowane są z α -D-ramnozy i β -3-C-metylo-D-ramnozy (ewalozoy). 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 α -D-Rha i β -D-Rha3CMe, pomiędzy którymi wstępują na przemian wiązania β -(1 \rightarrow 3) i α -(1 \rightarrow 2) (Ryc. 6) [70].

Podobne komponenty cukrowe do wyżej opisanych zidentyfikowano w polisacharydach O-swoistych *Bradyrhizobium*. W O-PS *B. japonicum* 61A123 oprócz Fuc zidentyfikowano N-acetylofukozaminę (FucNAc), D-Man oraz niewielkie ilości 4-O-metylomannozy (4-O-Me-D-Man) [71]. Natomiast O-PS *B. japonicum* I110 zawiera dodatkowo reszty ksylozy i arabinozy. Głównymi składnikami O-PS *B. japonicum* 61A101c są 2,3-di-O-Me-Man, Man, FucNAc i Qu-iNAc [72]. Bradyrizobiowe łańcuchy O - swoiste często są acetylowane [71].

Na uwagę zasługuje struktura O-PS *Ochrobactrum cytisi* ESC1(T), bakterii należącej do rodziny *Brucellaceae* i będących endosymbiontami żarowca miotlastego (*Cytisus scoparius*). Polisacharyd O-swoisty tych bakterii zbudowany jest z powtarzających się dwucukrowych podjednostek, w skład których wchodzi α -D-Fuc oraz β -N-acetylo-D-galaktozamina (β -D-GalpNAc). Cukry te łączą wiązanie (1 \rightarrow 3) glikozydowe [73]. W O-PS *O. cytisi* ESC1(T) β -D-GalpNAc jest niestechiometrycznie podstawiona (w około 10%) grupami metylowymi oraz resztami 4,6-O-(1-karboksy)-etylidenu (grupami pirogronianowymi). Reszta pirogronianowa jest rzadko spotykana jako podstawnik łańcucha O-swoistego bakterii. Dotychczas została opisana w O-PS wywołującej biegunki *Providencia alcalifaciens* serotyp O19 oraz niektórych enterobakteriach np. *P. mirabilis*, *P. vulgaris* i *P. penneri* [74,75]. Reszta pirogronianowa jednak dość często występuje w rizobiowych kwaśnych egzopolisacharydach [76,77].

Odminną strukturę posiada łańcuch O-swoisty szczep *O. cytisi* IPA7.2. O-PS tych bakterii stanowi liniowy polimer, składający się z trójcukrowych powtarzających podjednostek o następującej sekwencji:



Dodatkowo β -D-3OAc-GlcpNAc może być podstawiona (w ok. 50%) resztą acetylową [78].

ROLA LIPOPOLISACHARYDU W PROCESIE SYMBIOZY

Kompletny lipopolisacharyd jest niezbędny do rozwoju prawidłowo funkcjonującej brodawki. Odpowiednia struktura LPS odgrywa istotną rolę już na etapie kolonizacji włóśników korzeniowych. Wykazano, że obecność pewnych reszt cukrowych w LPS bakterii (np. N-acetylochinosamininy u *R. etli*), wiązanych przez lektyny roślinne, warunkuje adhezję komórek bakteryjnych do włóśników korzeniowych [79].

Podczas procesu kształtowania się i dojrzewania układu symbiotycznego LPS ulega licznym modyfikacjom. U *R. leguminosarum* bv. Viciae 3841 zauważono zwiększenie ilości formy gładkiej LPS oraz wzrost stopnia metylacji i acetylacji O-PS. W rezultacie tego powierzchnia komórki staje się bardziej hydrofobowa [31]. Zmiany te wydają się być niezbędne podczas infekcji brodawek oraz tworzenia się funkcjonalnych bakteroidów. Oba te procesy wymagają wzajemnego oddziaływania błony komórkowej roślinnego gospodarza z powierzchnią bakteryjną.

Zmniejszenie ilości formy hydrofobowej LPS zauważono u *M. loti* NZP2213.1 mutantu w obrębie genu kodującego glikozylotransferazę (*oatB*). Mutacja ta spowodowała, że O-PS będący w szczepie macierzystym homopolimerem zbudowanym z 2-O-acetylo-6-deoksy-L-talozy przekształcił się w polimer 6-deoksy-L-talozy częściowo podstawiony grupami metylowymi i acetylowymi w pozycji C-2. Równocześnie znacznie zmniejszył się stopień podstawienia oligosacharydu rdzeniowego tak zmodyfikowanym O-PS, co pociągnęło za sobą zmiany hydrofobowości komórek bakteryjnych. Konsekwencją tych zmian był nieprawidłowy rozwój nici infekcyjnych, przedwczesne starzenie się i degradacja symbiosomów w brodawkach indukowanych przez mutantu *M. loti* NZP2213.1 na komonicy zwyczajnej (*Lotus corniculatus*) [80,81].

Badania szorstkich mutantów (pozbawionych O-PS) wykazały, że są one defektywne w procesie infekcji brodawek. Bakterie, którym udało się dotrzeć do komórek brodawki makrosymbionta tworzyły bakteroidy o nieprawidłowym kształcie, które wielokrotnie dzieliły się wewnątrz symbiosomu co wskazuje na brak synchronizacji pomiędzy podziałami rizobium/bakteroidami a membraną symbiosomu [82]. Istnienie fizycznej interakcji pomiędzy powierzchnią bakterii, a błonami komórek makrosymbionta potwierdza fakt, że wyizolowane z brodawek korzeniowych bakteroidy *R. leguminosarum* bv. Viciae 3841 zawierały związaną z powierzchnią lektynę PsNLEC-1 oraz roślinne glikolipidy. Zaś szorstkie mutanty tego szczepu nie były w stanie wiązać składników pochodzenia roślinnego [83].

Do prawidłowego przebiegu symbiozy u *R. etli* CE3 wymagane jest podstawienie grupą metylową fukozy w pozycji C-2. Za proces ten odpowiedzialna jest metylaza kodowana przez gen *wreM*. Mutacja w tym genie powodowała, że bakterie syntetyzowały niezmienną ilość O-PS, ale pozbawione grup metylowych. Widocznym efektem tej mutacji było opóźnienie procesów nodulacji oraz zmniejszenie aktywności kompleksu nitrogenazy [84,85].

U rizobiów gładka forma LPS wraz z białkami OM stabilizuje błonę zewnętrzną, czego nie jest w stanie dokonać lipopolisacharyd typu R. Odpowiednia architektura OM zapewnia bakteriom symbiotycznym bezpieczeństwo w trakcie przemieszczania się i proliferacji wewnątrz nici infekcyjnej. Ma to szczególne znaczenie w niciach infekcyjnych o wąskim przekroju, występujących u roślin tworzących brodawki typu zdeterminowanego, np. soi [46]. Mutacja w genie *waal* u *B. japonicum*, mikrosymbionta soi, spowodowała, że bakterie te syntetyzowały LPS całkowicie pozbawiony łańcuchów O-swoistych. Brak O-PS skutkowało zwiększeniem hydrofobowego charakteru powierzchni komórki, zwiększeniem wrażliwości na tlen i zmiany ciśnienia osmotycznego oraz spadkiem ruchliwości mutantów w stosunku do szczepu dzikiego. Przeprowadzone doświadczenia dodatkowo wykazały, że soja zakażona mutantem *B. japonicum* zupełnie nie tworzyła brodawek korzeniowych. Rezultaty tych badań pokazują, że O-PS ma kluczowe znaczenie w inicjacji i podtrzymywaniu relacji symbiotycznych pomiędzy bakteriami, a roślinnym gospodarzem [86].

Polisacharyd O-swoisty chroni także bakterie symbiotyczne przed roślinnymi mechanizmami obronnymi. Wykazano, że ekspozycja LPS-R podczas procesu infekcji zwiększa odpowiedź układu odpornościowego ze strony rośliny, a bakterie pozbawione O-PS są bardziej wrażliwe na działania obronne roślin. Łańcuchy polisacharydowe przesłaniają strukturę błonową takie jak: integralne białka błonowe oraz region rdzeniowy i lipid A lipopolisacharydu zapobiegając w ten sposób reakcji nadwrażliwości (HR), czy reakcji uogólnionej odporności nabytej (SAR) ze strony rośliny [87-90]. Dodatkowo u *R. leguminosarum* bv. Viciae 3841 stwierdzono obecność nietypowych reszt cukrowych w O-PS, które mają znaczenie w zwiększeniu odporności tych bakterii na kationowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe, będące składnikami układu obronnego rośliny [61].

W nawiązaniu efektywnej symbiozy niezbędna jest również właściwa struktura regionu rdzeniowego. Mutanty *E. melilotii* Rm1021 posiadające zmieniony gen *lpsB*, który koduje mannozylotransferazę syntetyzowały zmieniony i skrócony rdzeń LPS, przy czym równocześnie syntetyzowały kompletny łańcuch O-swoisty. Zmiany te znacząco wpływały na proces brodawkowania oraz powodowały obumieranie bakteroidów [91].

Do niedawna uważano, że rola lipidu A w układzie rizobium-makrosymbiont jest nieznaczna. Obecność, w lipidach A *Rhizobium* i *Bradyrhizobium*, długołańcuchowych (ω -1)-hydroksykwasów zawierających od 26 do 34 atomów węgla w łańcuchu węglowodorowym warunkuje odpowiednie właściwości błony zewnętrznej, niezbędne w nawiązaniu efektywnej symbiozy [92]. Za przyłączanie tych kwasów do lipidu A odpowiedzialny jest specyficzny nośnik reszt acylowych AcpXL oraz acylotransferaza LpxXL. Wykazano, że mutacje w genach kodujących te białka u *R. leguminosarum* bv. Viciae 3841 i *E. meliloti* 1021 skutkowały syntezą LPS pozbawionego długołańcuchowego kwasu tłuszczowego [93,94,26]. Mutanty indukowały tworzenie brodawek korzeniowych na roślinnych gospodarzach, jednak brodawki powstawały z opóźnieniem, a wiązanie azotu odbywało się z mniejszą wydajnością. Analiza mikroskopowa brodawek zasiedlonych przez mutantu *R. leguminosarum* bv. Viciae 3841, wykazała że bakteroidy były znacznie powiększone, zdeformowane, a synchroniczny podział komórki bakteryjnej i symbiosomu został zakłócony [94]. Stwierdzono także, że rizobia szybko rosnące pozbawione kwasu 27-OH-28:0 są bardziej wrażliwe na zmiany pH, osmolarności środowiska i obecność detergentów oraz wolniej się namnażają [93,94,26,95]. Znaczenie odpowiedniej struktury lipidu A w symbiozie potwierdzają także ostatnie badania nad mutantem *Bradyrhizobium* sp. ORS 278 pozbawionym kwasu 25OH-26:0 w lipidzie A (mutacja w genie *lpxXL*) [39]. Wykazano, że mutanty te charakteryzowały się zwiększoną wrażliwością na czynniki stresogenne (H_2O_2 , SDS, polimyksyna B, ciśnienie osmotyczne), a rośliny nimi zainfekowane (*Aeschynomene indica*, *Aeschynomene evenia*) wykazywały typowe objawy „głodu” azotowego, w tym chlorozę i spadek masy zielonej. U *A. evenia* zaobserwowano także puste brodawki, podczas gdy u *A. indica* stwierdzono nagromadzenie się związków polifenolowych, co jest związane z reakcjami obronnymi roślinnego gospodarza. Analiza cytologiczna brodawek wy-

kazała obecność zarówno niezróżnicowanych bakterii, jak i bakteroidów, które nie były idealnie sferyczne i miały nieprawidłową wielkość, w porównaniu do bakterii szczepu dzikiego. Badania te sugerują istotny wpływ kwasu 25OH-26:0 w lipidzie A *Bradyrhizobium* sp. ORS 278 na stabilność membrany zewnętrznej, co jest ważne zarówno w zdolności tego szczepu do radzenia sobie w warunkach stresowych oraz w nawiązywaniu efektywnej symbiozy [39]. Podobne rezultaty uzyskano w badaniach nad mutantem *Bradyrhizobium* sp. BTAi1, całkowicie pozbawionym hopanoidów, strukturalnych komponentów lipidu A oraz nad mutantami *B. diazoefficiens* (*B. japonicum*) USDA110, pozbawionymi wolnych bądź związanych z lipidem A hopanoidów. Mutacje w genie cykazy skwalenowej (*shc*) u *B. BTAi1* oraz genach *hpnP* i *hpnH* u *B. diazoefficiens* spowodowały znaczny spadek przeżywalności tych bakterii w warunkach stresowych, jak również podczas infekcji roślinnego gospodarza – *Aeschynomene* [24,25].

PODSUMOWANIE

Lipopolisacharydy rizobiowe odznaczają się dużą różnorodnością strukturalną. Ich odpowiednia budowa jest niezbędna do właściwego funkcjonowania bakterii i nawiązania efektywnej symbiozy. LPS, jako najbardziej zewnętrzna część osłony bakteryjnej jest ekspozycyjny na zmieniające się warunki otoczenia. LPS chroni bakterie przed działaniem czynników środowiskowych (np. antybiotyków) jak również przed mechanizmami obronnymi gospodarza. U rizobiów LPS odgrywa istotną rolę w tworzeniu układów symbiotycznych z roślinami bobowatymi. LPS pełni funkcję cząsteczki sygnałnej w procesie zakażenia komórek rośliny gospodarza. Powoduje supresję reakcji obronnych rośliny. Zapewnia bakteriom symbiotycznym bezpieczeństwo w trakcie przemieszczania się i proliferacji wewnątrz nici infekcyjnej. Prawidłowa struktura LPS jest wymagana do wydajnego wiązania azotu atmosferycznego. Z powyższych powodów jego budowa i funkcje są wciąż intensywnie badane.

PIŚMIENNICTWO

1. www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia
2. Mousavi SA, Österman J, Wahlberg N, Nesme X, Lavire C, Vial L, Paulin L, De Lajudie P, Lindström K (2014) Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* 37: 208-215. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202014000204?via%3Dihub>
3. Velázquez E, García-Fraile P, Ramírez-Bahena M-H, Rivas R, Martínez-Molina E (2010) Bacteria involved in nitrogen-fixing legume symbiosis: current taxonomic perspective, W: Khan MS, Musarrat J, Zaidi A (red) *Microbes for Legume Improvement*. Springer-Verlag, Vienna, str. 1-25. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-211-99753-6_1
4. Chen WM, Moulin L, Bontemps C, Vandamme P, Béna G, Boivin-Masson C (2003) Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol* 185: 7266-7272. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC296247/>
5. Gyaneshwar P, James EK, Moulin L, Chen WM, Elliott GN, Bontemps C, de los Santos PE, Gross E, dos Reis FB Jr, Sprent JL, Young JPW, James EK (2011) Legume-nodulating betaproteo - bacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol Plant Microbe Interact* 24 (11): 1276-1288. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI-06-11-0172>
6. Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C (2001) Nodulation of legumes by members of the β -subclass of *Proteobacteria*. *Nature* 411: 948-950. <https://www.nature.com/articles/35082070>
7. Hirsch AM, Lum MR, Downie JA (2001) What makes the rhizobia-legume symbiosis so special. *Plant Physiol* 127: 1484-1492. <http://www.plantphysiol.org/content/127/4/1484.long>
8. Behm JE, Geurts R, Kiers ET (2014) Parasponia: a novel system for studying mutualism stability. *Trends in Plants Sci* 19 (12): 757-763. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138514002246?via%3Dihub>
9. Shantharam S, Mattoo AK (1997) Enhancing biological nitrogen fixation: An appraisal of current and alternative technologies for N input into plants. *Plant and Soil* 194: 205-2016. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1004234315999>
10. Hatano R, Lipiec J (2004) Effects of land use and cultural practices on greenhouse gas fluxes in soil. *Acta Agrophys* 111: 5-51. http://www.old.acta-agrophysica.org/artkuly/acta_agrophysica/Acta-Agr_109_2004_0_0_0.pdf
11. Alexander C, Zähringer U (2002) Chemical structure of lipid A - the primary immunomodulatory center of bacterial lipopolysaccharides. *Trends Glycosci Glyc* 14: 69-86. https://www.jstage.jst.go.jp/article/tigg1989/14/76/14_76_69/_article/-char/en
12. Raetz CRH, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Ann Rev Biochem* 71: 635-700. https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed
13. Seydel U, Lindner B, Wollenweber HW, Rietschel ET (1984) Structural studies on the lipid A component of enterobacterial lipopolysaccharides by laser desorption mass spectrometry. Location of acyl groups at the lipid A backbone. *Eur J Biochem* 145: 505-509. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08585.x?sid=nlm%3Apubmed>
14. Rietschel ET, Kirikaie T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, di Padova F, Schreier M, Brade H (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 8: 217-225. <https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.8.2.8119492>
15. Gil-Serrano AM, González-Jiménez I, Tejero-Mateo P, Megías M, Romero-Vázquez MJ (1994) Analysis of the lipid moiety of lipopolysaccharide from *Rhizobium tropici* CIAT899: identification of 29-hydroxytriacetate acid. *J Bacteriol* 176: 2454-2457. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC205373/>
16. 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. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00404207>
17. Que NLS., Lin SH, Cotte R Jr, Raetz CRH. (2000) Purification and mass spectrometry of six lipid A species from the bacterial endosymbiont *Rhizobium etli*: Demonstration of a conserved distal unit and a variable proximal portion. *J Biol Chem* 275: 28006-28016. <https://www.jbc.org/content/early/2000/06/15/jbc.M004008200.long>
18. Que NLS, Ribeiro AA, Raetz CRH (2000b) Two-dimensional NMR spectroscopy and structures of six lipid A species from *Rhizobium etli* CE3: Detection of an acyloxyacyl residue in each component and origin of the aminogluconate moiety. *J Biol Chem*. 275: 28017-28027. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2570648/>
19. 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. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-1033.2004.04038.x>
20. Bhat UR, Carlson RW, Busch M, Mayer H (1991) Distribution and phylogenetic significance of 27-hydroxy-octacosanoic acid in lipopolysaccharides from bacteria belonging to the alpha-2 subgroup of *Proteobacteria*. *Int J Syst Bacteriol* 41: 213-217. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-41-2-213>
21. Bhat UR, Mayer H, Yokota A, Hollingsworth RI, Carlson RW (1991) Occurrence of lipid A variants with 27-hydroxyoctacosanoic acid in lipopolysaccharides from members of the family *Rhizobiaceae*. *J Syst Bacteriol* 173: 2155-2159. https://www.researchgate.net/publication/21147554_Occurrence_of_lipid_A_variants_with_27hydroxyoc

- tacosanoic acid in lipopolysaccharides from members of the family Rhizobiaceae
22. Komaniecka I, Choma A, Lindner B, Holst O (2010) The structure of a novel neutral lipid A from the lipopolysaccharide of *Bradyrhizobium elkanii* containing three mannose units in the backbone. *Chem Eur J* 16: 2922-2929. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/chem.200902390>
 23. Komaniecka I, Choma A, Mazur A, Duda KA, Lindner B, Schwudke D, Holst O (2014) Occurrence of an unusual hopanoid-containing lipid A among lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium* species. *J Biol Chem* 289 (51): 35644-35655. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4271246/>
 24. Silipo A, Vitiello G, Gully D, Sturiale L, Chaintreuil C, Fardoux J, Gargani D, Lee HL, Kulkarni G, Busset N, Marchetti R, Palmigiano A, Moll H, Engel R, Lanzetta R, Paduano L, Parrilli M, Chang WS, Holst O, Newman DK, 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. <https://www.nature.com/articles/ncomms6106>
 25. Kulkarni G, Busset N, Molinaro A, Gargani D, Chaintreuil C, Silipo A, i inni (2015) Specific hopanoid classes differentially affect free-living and symbiotic states of *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *mBio* 6: e01251-15. doi: 10.1128/mBio.0125115. <https://mbio.asm.org/content/6/5/e01251-15>
 26. Ferguson GP, Datta A, Carlson RW, Walker GC (2005) Importance of unusually modified lipid A in *Sinorhizobium* stress resistance and legume symbiosis. *Mol Microbiol* 56: 68-80. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2958.2005.04536.x>
 27. Ferguson GP, Jansen A, Marlow VL, Walker GC (2006) BacA-mediated bleomycin sensitivity in *Sinorhizobium meliloti* is independent of the unusual lipid A modification. *J Bacteriol* 188: 3143-3148. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1447001/>
 28. Gudlavalleti SK, Forsberg LS (2003) Structural characterization of the lipid A component of *Sinorhizobium* sp. NGR234 rough and smooth form lipopolysaccharide *J Biol Chem* 278: 3957-3968. <https://www.jbc.org/content/278/6/3957.long>
 29. Silipo A, De Castro C, Lanzetta R, Molinaro A, Parrilli M (2004) Full structural characterization of the lipid A components from the *Agrobacterium tumefaciens* strain C58 lipopolysaccharide fraction. *Glycobiol* 14: 805-815. <https://academic.oup.com/glycob/article/14/9/805/582398>
 30. Bhat UR, Forsberg LS, Carlson RW (1994) The structure of the lipid A component of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli lipopolysaccharide. A unique non-phosphorylated lipid A containing 2-amino-2-deoxy-gluconate, galacturonate, and glucosamine. *J Biol Chem* 269: 14402-14410. <https://www.jbc.org/content/269/20/14402.long>
 31. Kannenberg EL, Carlson RW (2001) Lipid A, O-chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development. *Mol Microbiol* 39: 379-392. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2958.2001.02225.x?sid=nlm%3Apubmed>
 32. De Castro C, Molinaro A, Lanzetta R, Silipo A, Parrilli M (2008) Lipopolysaccharide structures from *Agrobacterium* and *Rhizobiaceae* species. *Carbohydr Res* 343: 1924-1933. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621508000554?via%3Dihub>
 33. Jeyaretnam B, Glushka J, Kolli VSK, Carlson RW (2002) Characterization of a novel lipid-A from *Rhizobium species* Sin-1. A unique lipid-A structure that is devoid of phosphate and has a glycosyl backbone consisting of glucosamine and 2-aminogluconic acid. *J Biol Chem* 277: 41802-41810
 34. Carlson RW, Forsberg S, Kannenberg EL (2010) Lipopolysaccharides in Rhizobium-Legume Symbioses, W: Wang X, Quinn PJ (red) *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*. Springer Science & Business Media, Berlin/Heidelberg, str. 339-385. https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-90-481-9078-2_16
 35. Casabuono AC, D'Antuono A, Sato Y, Nonami H, Ugalde R, Lepek V, Erra-Balsells R, Couto AS (2006) A matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry approach to the lipid A from *Mesorhizobium loti* Rapid Commun. Mass Spectrom 20: 2175-2182. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/rcm.2575>
 36. Brown DB, Muszyński A, Carlson RW (2013) Elucidation of a novel lipid A α -(1,1)-GalA transferase gene (rgtF) from *Mesorhizobium loti*: Heterologous expression of rgtF causes *Rhizobium etli* to synthesize lipid A with α -(1,1)-GalA. *Glycobiol* 23 (5): 546-558. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3608353/>
 37. Zamlynska K, Komaniecka I, Zebracki K, Mazur A, Sroka-Bartnicka A, Choma A (2017) Studies on lipid A isolated from *Phyllobacterium trifolii* PETP02¹ lipopolysaccharide. *Ant van Leeuwen* 110 (11): 1413-1433. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5644692/>
 38. 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. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621512001115?via%3Dihub>
 39. Busset N, Di Lorenzo F, Palmigiano A, Sturiale L, Gressent F, Fardoux J, Gully D, Chaintreuil C, Molinaro A, Silipo A, Giraud E (2017) The very long chain fatty acid (C26:25OH) linked to the lipid A is important for the fitness of the photosynthetic *Bradyrhizobium* strain ORS278 and the establishment of a successful symbiosis with *Aeschynomene* Legumes. *Front Microbiol* doi: 10.3389/fmicb.2017.01821. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5613085/>
 40. Neunlist S, Holst O, Rohmer M (1985) Prokaryotic triterpenoids. The hopanoids of the purple non-sulphur bacterium *Rhodospirillum rubrum*: an aminotriol and its aminoacyl derivatives, N-tryptophanyl and N-ornithinyl aminotriol. *Eur J Biochem* 15: 561-568. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.0014-2956.1985.00561.x?sid=nlm%3Apubmed>
 41. Berry AM, Harriott OT, Moreau RA, Osman SF, Benson DR, Jones AD (1993) Hopanoid lipids compose the Frankia vesicle envelope, presumptive barrier of oxygen diffusion to nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6091-6094. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC46873/>
 42. Kannenberg EL, Perzl M, Härtner T (1995) The occurrence of hopanoid lipids in *Bradyrhizobium* bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 127: 255-262. <https://academic.oup.com/femsle/article/127/3/255/601102>
 43. Bravo J-M, Perzl M, Härtner T, Kannenberg EL, 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. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1432-1327.2001.01998.x?sid=nlm%3Apubmed>
 44. Welander PV, Hunter RC, Zhang L, Sessions AL, Summons RE, Newman DK (2009) Hopanoids play a role in membrane integrity and pH homeostasis in *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1. *J Bacteriol* 191: 6145-6156. <https://jb.asm.org/content/191/19/6145>
 45. 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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC383070/>
 46. Forsberg LS, Carlson RW (1998) The structures of the lipopolysaccharides from *Rhizobium etli* strains CE358 and CE359. The complete structure of the core region of *R. etli* lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 273: 2747-2757. <https://www.jbc.org/content/273/5/2747.long>
 47. Kannenberg EL, Reuhs BL, Forsberg LS, Carlson RW, Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (1998) Lipopolysaccharides and K-antigens: their structures, biosynthesis, and function, W: Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (red) *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, str. 119-154. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-011-5060-6>
 48. Lodowska J, Zięba A, Wolny D, Węglarz L, Dzierżewicz Z (2006) Metody derywacji komponentów lipopolisacharydów w ocenie ich struktury chemicznej technikami chromatografii czynnymi. *Post Hig Med Dosw* 60: 113-128. <http://www.phmd.pl/api/files/view/1971.pdf>
 49. Turska-Szewczuk A, Russa R, Karaś M, Danikiewicz W (2015) Structural elucidation of the outer core tetrasaccharide isolated from the LPS of *Rhizobium leguminosarum* bv. Trifolii strain 24. *Carbohydr*


- Res 409: 1-8. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621515000889?via%3Dihub>
50. Forsberg LS, Noel KD, Box J, Carlson RW (2003) Genetic locus and structural characterization of the biochemical defect in the O-antigenic polysaccharide of the symbiotically deficient *Rhizobium etli* mutant, CE166: Replacement of N-acetylquinovosamine with its hexosyl-4-ucose precursor. *J Biol Chem* 278: 51347-51359. <https://www.jbc.org/content/278/51/51347.long>
 51. De Castro C, Carannante A, Lanzetta R, Liparoti V, Molinaro A, Parrilli M (2006) Core oligosaccharide structure from the highly phytopathogenic *Agrobacterium tumefaciens* TT111 and conformational analysis of the putative rhamnan epitope. *Glycobiol* 16: 1272-1280. <https://academic.oup.com/glycob/article/16/12/1272/2900195>
 52. Gargiulo V, Garozzo D, Lanzetta R, Molinaro A, Sturiale L, Castro CD, Parrilli M (2008) *Rhizobium rubi*: A gram-negative phytopathogenic bacterium expressing the Lewis B epitope on the outer core of its lipooligosaccharide fraction. *Chem Bio Chem* 9: 1830-1835. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cbic.200800191>
 53. Molinaro A, De Castro C, Lanzetta R, Parrilli M, Raio A, Zoina A (2003) Structural elucidation of a novel core oligosaccharide backbone of the lipopolysaccharide from the new bacterial species *Agrobacterium larrymoorei*. *Carbohydr Res* 338: 2721-2730. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670730>
 54. Russa R, Bruneteau M, Shashkov AS, Urbanik-Sypniewska T, Mayer H (1996) Characterization of the lipopolysaccharides from *Rhizobium meliloti* strain 102F51 and its nonnodulating mutant WL113. *Arch Microbiol* 165: 26-33. <https://link.springer.com/article/10.1007/s002030050292>
 55. Reuhs BL, Geller DP, Kim JS, Fox JE, Kolli VSK, Pueppke SG (1998) *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. *Appl Environ Microbiol* 64: 4930-4938. <https://aem.asm.org/content/64/12/4930.long>
 56. Reuhs BL, Stephens SB, Geller DP, Kim JS, Glenn J, Przytycki J, Ojanen-Reuhs T (1999) Epitope identification for a panel of anti-*Sinorhizobium meliloti* monoclonal antibodies and application to the analysis of K antigens and lipopolysaccharides from bacteroids. *Appl Environ Microbiol* 65: 5186-5191. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91702/>
 57. Carlson RW, Krishnaiah BS (1992) Structures of the oligosaccharides obtained from the core regions of the lipopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* 61A101c and its symbiotically defective lipopolysaccharide mutant, JS314. *Carbohydr Res* 231: 205-219. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0008621592840205?via%3Dihub>
 58. Di Lorenzo F, Palmigiano A, Duda KA, Pallach M, Busset N, Sturiale L, Giraud E, Garozzo D, Molinaro A, Silipo A (2017) Structure of the lipopolysaccharide from the *Bradyrhizobium* sp. ORS285 rfaL mutant strain. *Open Chem* 6: 541-553. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/open.201700074>
 59. Wang Y, Hollingsworth RI (1994) The structure of the O-antigenic chain of the lipopolysaccharide of *Rhizobium trifolii* 4s. *Carbohydr Res* 260: 305-317. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0008621594840482?via%3Dihub>
 60. Russa R, Urbanik-Sypniewska T, Shaskov AS, Banaszek A, Zamojski A, Mayer H (1996) Partial structure of lipopolysaccharide isolated from *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii 24 and its GalA-negative Exo- mutant. *System Appl Microbiol* 19: 1-8. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202096800026>
 61. Forsberg LS, Carlson RW (2008) Structural characterization of the primary O-antigenic polysaccharide of the *Rhizobium leguminosarum* 3841 lipopolysaccharide and Identification of a new 3-acetimido-3-deoxyhexuronic acid glycosyl component: A unique O-methylated glycan of uniform size containing 6-deoxy-3-O-methyl-D-talose, N-acetylquinovosamine, and rhozaminuronic acid (3-acetimido-3-deoxy-D-gluco-hexuronic acid). *J Biol Chem* 283: 16037-16050. <https://www.jbc.org/content/283/23/16037.long>
 62. Turska-Szewczuk A, Pietras H, Borucki W, Russa R (2008) Alteration of O-specific polysaccharide structure of symbiotically defective *Mesorhizobium loti* mutant 2213.1 derived from strain NZP2213. *Acta Biochim Pol* 55: 191-199. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18217107>
 63. Reuhs BL, Relic B, Forsberg LS, Marie C, Ojanen-Reuhs T, Stephens SB, Wong C-H, Jabbouri S, Broughton WJ (2005) Structural characterization of a flavonoid-inducible *Pseudomonas aeruginosa* A-band-like O-antigen of *Rhizobium* sp. Strain NGR234, required for the formation of nitrogen-fixing nodules. *J Bacteriol* 187: 6479-6487. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1236632/>
 64. De Castro C, Sturiale L, Parrilli M (2004) Characterisation of the alpha-(1→3) homopolymer of L-glycero-D-manno-heptose units isolated from the O-chain polysaccharide of *Agrobacterium radiobacter*. *Eur J Org Chem* 2: 2436-2440. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ejoc.200400002>
 65. Fernandez de Cordoba FJ, Rodriguez-Carvajal MA, Tejero-Mateo P, Corzo J, Gil-Serrano AM (2008) Structure of the O-antigen of the main lipopolysaccharide isolated from *Sinorhizobium fredii* SMH12. *Biomacromolecules* 9: 678-685. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm701011d>
 66. Forsberg LS, Bhat UR, Carlson RW (2000) Structural characterization of the O antigenic polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Rhizobium etli* strain CE3. A unique O-acetylated glycan of discrete size, containing 3-O-methyl-6-deoxy-L-talose and 2,3,4-tri-O-methyl-L-fucose. *J Biol Chem* 275: 18851-18863. <https://www.jbc.org/content/275/25/18851.long>
 67. Choma A, Sowinski P, Mayer H (2000) Structure of the O-specific polysaccharide of *Mesorhizobium huakuii* IFO15243T. *Carbohydr Res* 329: 459-464. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000862150001804?via%3Dihub>
 68. Hashimoto M, Mizukami M, Osuki K, Fujiwara N, Suda Y, Uchiumi T (2017) Characterization of O-antigen polysaccharide backbone derived from nitric oxide-inducing *Mesorhizobium loti* MAFF 303099 lipopolysaccharide. *Carbohydr Res* 445: 44-50. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621517301507?via%3Dihub>
 69. Reuhs BL, Kim JS, Badgett A, Carlson RW (1994) Production of the cell-associated polysaccharides of *Rhizobium fredii* USDA 205 is modulated by apigenin and host root extract. *Mol Plant Microbe Interact* 7: 240-247. <https://www.apsnet.org/publications/mpmi/backissues/Documents/1994Abstracts/Microbe07-240.htm>
 70. Zamlynska K, Komaniecka I, Turska-Szewczuk A, Pac M, Choma A (2015) The O-specific polysaccharides from *Phyllobacterium trifolii* PETP02^T LPS contain 3-C-methyl-D-rhamnose. *Carbohydr Res* 409: 25-29. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621515000750>
 71. Carrion M, Bhat UR, Reuhs B, Carlson RW (1990) Isolation and characterization of the lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 172: 1725-1731. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC208662/>
 72. Stacey G, So JS, Roth LE, Bhagya Lakshmi SK, Carlson RW (1991) A lipopolysaccharide mutant from *Bradyrhizobium japonicum* that uncouples plant from bacterial differentiation. *Mol Plant Microb Interact* 4: 332-340. <https://www.apsnet.org/publications/mpmi/backissues/Documents/1991Abstracts/Microbe04-332.htm>
 73. Pac M, Komaniecka I, Zamlynska K, Turska-Szewczuk A, Choma A (2015) The structure of O-specific polysaccharide from the legume endosymbiotic bacterium *Ochrobactrum cytisi*. *Carbohydr Res* 413: 37-40. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621515001597?via%3Dihub>
 74. Kocharova NA, Vinogradov E, Kondakova AN, Shashkov AS, Rozalski A, Knirel YA (2008) The full structure of the carbohydrate chain of the lipopolysaccharide of *Providencia alcalifaciens* O19. *Carbohydr Chem* 27: 320-331. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07328300802196091>
 75. Shashkov AS, Senchenkova SN, Vinogradov EV, Zatonksy GV, Knirel YA, LITERACKA E, KACA W (2000) Full structure of the O-specific polysaccharide of *Proteus mirabilis* O24 containing 3,4-O-[(S)-1-carboxyethylidene]-D-galactose. *Carbohydr Res* 329: 453-457. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000862150000207X?via%3Dihub>
 76. Skorupska A, Janczarek M, Marczak M, Mazur A, Król J (2006) Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Mi-*

- cro Cell Fact 16: 5-17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1403797/>
77. Janczarek M (2011) Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *Int J Mol Sci* 12: 7898-7933. <https://www.mdpi.com/1422-0067/12/11/7898metrics>
 78. Sigida EN, Kargapolova KY, Shashkov AS, Zdorovenko EL, Ponomaryova TS, Meshcheryakova AA, Tkachenko OV, Burygin GL, Knirel Y (2019) Structure, gene cluster of the O antigen and biological activity of the lipopolysaccharide from the rhizospheric bacterium *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.017. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019330636?via%3Dihub>
 79. Noel KD, Duelli DM (2000) Rhizobium lipopolysaccharide and its role in symbiosis, W: Triplett EW (red) Prokaryotic nitrogen fixation: a model system of analysis of a biological process. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, str. 415-431. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20001907328>
 80. Turska-Szewczuk A, Łotocka B, Kutkowska J, Król J, Urbanik-Sypniewska T, Russa R (2009) The incomplete substitution of lipopolysaccharide with O-chain prevents the establishment of effective symbiosis between *Mesorhizobium loti* NZP2213.1 and *Lotus corniculatus*. *Microbiol Res* 164: 163-173. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501307000134?via%3Dihub>
 81. Karaś MA, Turska-Szewczuk A, Marczak M, Jaszek M, Janczarek M, Dworaczek K, Stefaniuk D, Wydrych J (2018) A mutation in the *Mesorhizobium loti* *oatB* gene alters the physicochemical properties of the bacterial cell wall and reduces survival inside *Acanthamoeba castellanii*. *Int J Mol Sci* 19(11): pii: E3510. doi: 10.3390/ijms19113510. <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/11/3510>
 82. Perotto S, Brewin NJ, Kannenberg EL (1994) Cytological evidence for a host defense response that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharide - defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841. *Mol. Plant Microbe Interact* 7: 99-112. <https://www.apsnet.org/publications/mpmi/BackIssues/Documents/1994Abstracts/Microbe07-99.htm>
 83. Bolanos L, Redondo-Nieto M, Rivilla R, Brewin NJ, Bonilla I (2003) Cell surface interactions of *Rhizobium* bacteroids and other bacterial strains with symbiosomal and peribacteroid membrane components from pea nodules. *Mol Plant-Microbe Interact* 17: 216-223. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/MPMI.2004.17.2.216>
 84. Noel KD, Box JM, Bonne VJ (2004) 2-O-Methylation of fucosyl residues of a rhizobial lipopolysaccharide is increased in response to host exudate and is eliminated in a symbiotically defective mutant. *Appl Environ Microbiol* 70: 1537-1544. <https://aem.asm.org/content/70/3/1537.long>
 85. Ojeda KJ, Box JM, Noel KD (2010) Genetic basis for *Rhizobium etli* CE3 O-antigen O-methylated residues that vary according to growth conditions. *J Bacteriol* 192 (3): 679-690. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2812443/>
 86. Noh JG, Jeon HE, So JS, Chang WS (2015) Effects of the *Bradyrhizobium japonicum* *waaL* (*rfaL*) gene on hydrophobicity, motility, stress tolerance, and symbiotic relationship with soybeans. *Int J Mol Sci* 16 (8): 16778-16791. <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/8/16778>
 87. 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. <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/ful/10.1046/j.0028-646x.2001.00214.x>
 88. Dow JM, Newman M-A, von Roepenack E (2000) The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Phytopathol* 38: 241-261. <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.phyto.38.1.241>
 89. 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. 90. Silipo A, Erbs G, Shinya T, Dow JM, Parrilli M, Lanzetta R, Shibuya N, Newman MA, Molinaro A (2010) Glycoconjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiol* 20(4): 406-419. <https://academic.oup.com/glycob/article/20/4/406/1988107>
 91. Campbell GRO, Sharypova LA, Scheidle H, Jones KM, Niehaus K, Becker A, Walker GC (2003) Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. *J Bacteriol* 185: 3853-3862. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12813079>
 92. Choma A, Komaniecka I (2011) Straight and branched (ω -1)-hydroxylated very long chain fatty acids are components of *Bradyrhizobium* lipid A. *Acta Bioch Pol* 58: 51-57. http://www.actabp.pl/pdf/1_2011/51.pdf
 93. Sharypova LA, Niehaus K, Scheidle H, Holst O, Becker A (2003) *Sinorhizobium meliloti* *acpXL* mutant lacks the C28 hydroxylated fatty acid moiety of lipid A and does not express a slow migrating form of lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 278: 12946-12954. <https://www.jbc.org/content/278/15/12946.long>
 94. Vedam V, Haynes JG, Kannenberg EL, Carlson RW, Sherrier DJ (2004) A *Rhizobium leguminosarum* lipopolysaccharide lipid A mutant induces nitrogen-fixing nodules with delayed and defective bacteroid formation. *Mo. Plant - Microbe Interact* 17: 283-291. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI.2004.17.3.283>
 95. Haag AF, Wehmeier S, Beck S, Marlow VL, Fletcher V, James EK, Ferguson G (2009) The *Sinorhizobium meliloti* Lpx and AcpXL proteins play important roles in bacteroid development within alfalfa. *J Bacteriol* 191: 4681-4686. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2704725/>

Structures of rhizobial lipopolysaccharides and their role in symbiosis process

Katarzyna Zamłyńska 

Department of Genetics and Microbiology, Institute of Biological Sciences, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19, 20-033 Lublin, Poland

 corresponding author: k.zamlynska@poczta.umcs.lublin.pl

Key words: symbiosis, legume plants, rhizobium, lipopolysaccharide, lipid A, core region, O-specific polysaccharide

SUMMARY

Lipopolysaccharides synthesized by rhizobia have a various structure. Differences are observed in lipid A (considered as the most conservative part of LPS), in the core region, and in the O-specific polysaccharide. Lipids A may have different compositions of the sugar backbone and the acylation pattern. The core region of rhizobia mainly consists of hexoses, uronic acids, N-acetylquinohozamine, and Kdo, but has no heptose region typical for enterobacteria. The O-PSs may have a different structure even among strains of the same species. They are built of various monosaccharides and are often hydrophobic. An appropriate structure of LPS domains is required for establishment of an effective symbiosis between bacteria and their plant host. Changes in the structure of LPS (most often caused by mutations) resulted in a decrease in efficiency or failure of atmospheric nitrogen fixation. Complete LPS protects symbiotic bacteria penetrating plant cells and determines the proper organization and maturation of symbiosomes.