Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

mgr Agnieszka Kowalczyk

STRUKTURY CHEMICZNE O-POLISACHARYDÓW WYBRANYCH SZCZEPÓW BAKTERII Z RODZAJÓW *DICKEYA* I *PECTOBACTERIUM*

Promotor:
dr hab. Zbigniew Kaczyński, prof. UG

Rozprawa doktorska wykonana w Pracowni Biochemii Strukturalnej w Katedrze Chemii Biomedycznej

Gdańsk 2023

Kończąc kolejny ważny etap w mojej edukacji, chciałabym podziękować wszystkim tym, którzy przyczynili się do powstania niniejszej rozprawy doktorskiej.

Dziękuję mojemu promotorowi dr hab. Zbigniewowi Kaczyńskiemu, prof. UG za poświęcony mi czas, liczne wskazówki, cenne uwagi, wyrozumiałość i cierpliwość, zwłaszcza podczas pisania tej pracy.

Serdecznie dziękuję, za możliwość współpracy, zespołowi prof. Łojkowskiej z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed.

Dziękuję z całego serca moim rodzicom, rodzeństwu i najbliższym za nieocenione wsparcie, wiarę w moje możliwości i za to, że zawsze mogę na Was liczyć.

Grazie mille

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów 5

1. Wstęp literaturowy 7

1.1. Rola bakterii w środowisku roślin 7

1.2. Taksonomia bakterii pektynolitycznych 8

1.3. Czynniki wirulencji bakterii pektynolitycznych 10

1.4. Budowa i rola LPS-u 12

2. Cel pracy 16

3. Część eksperymentalna 17

3.1. Schemat analizy strukturalnej polisacharydów 17

3.2. Hodowla komórek bakteryjnych 18

3.3. Ekstrakcja LPS-u 18

3.3.1. Ekstrakcja PCP – fenol, chloroform, eter naftowy 19

3.3.2. Ekstrakcja fenolowo-wodna 20

3.4. Oczyszczanie LPS-u – trawienie enzymatyczne 20

3.5. Hydroliza LPS-u 20

3.6. Wyodrębnianie OPS-u – chromatografia wykluczania 21

3.7. Analiza strukturalna OPS-u 21

3.7.1. Spektroskopia NMR 22

3.7.2. Analizy chemiczne 23

3.7.2.1. Analiza cukrowa 23

3.7.2.2. Analiza metylacyjna 26

3.7.2.3. Przyporządkowanie monosacharydów do szeregu konfiguracyjnego D lub L 27

4. Część wynikowa 30

4.1. Wyizolowanie O-antygenu 30

4.2. Analizy chemiczne 33

4.2.1. Analiza cukrowa 33

4.2.2. Analiza metylacyjna 34

4.2.3. Reakcja z optycznie czynnym butan-2-olem 35

4.3. Interpretacja widm NMR 36

4.4. Struktury chemiczne badanych OPS-ów 45

4.4.1. *P. versatile* IFB5636 46

4.4.2. *P. aquaticum* IFB5637 46

4.4.3. *D. aquatica* (IFB0154, IFB0694) oraz *D. lacustris* IFB8647 47

5. Dyskusja 50

Streszczenie rozprawy doktorskiej 56

Abstract 58

Bibliografia 60

Artykuły stanowiące integralną część pracy doktorskiej 66

Załącznik D1 66

Załącznik D2 71

Załącznik D3 77

Oświadczenia 84

Wykaz dorobku naukowego 92

Wykaz stosowanych skrótów

^{1}H NMR - 1D widmo protonowe NMR

^{13}C NMR - 1D widmo węglowe NMR

COSY - (*ang. COrrelation SpectroscopY*); homokorelacyjne widmo 2D [^{1}H^{1}H] NMR przedstawiające sprzężenia między protonami przez 2-3 wiązania

CPS - (*ang. Capsular PolySaccharide*); polisacharyd kapsularny

DMSO - dimetylosulfotlenek

EPS - (*ang. ExoPolySaccharide*); polisacharyd zewnątrzkomórkowy

GC - (*ang. gas chromatography*); chromatografia gazowa

GC-MS - (*ang. gas chromatography – mass spectrometry*); chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas

HMBC - (*ang. Heteronuclear Multiple Bond Coherence*); heterokorelacyjne widmo 2D [^{1}H^{13}C] NMR obrazujące korelacje przez 2 lub więcej wiązań

HSQC - (*ang. Heteronuclear Single Quantum Correlation*); heterokorelacyjne widmo 2D [^{1}H^{13}C] NMR przedstawiające korelacje przez jedno wiązanie; zarejestrowane bez tzw. rozprzęgania dostarcza informacji o wartości stałych sprzężenia ^{1}H^{13}C przez jedno wiązanie

HSQC-TOCSY- (*ang. Heteronuclear Single Quantum Coherence – Total Correaltion Spectroscopy*); heterokorelacyjne widmo 2D [^{1}H^{13}C] NMR; przedstawiające korelacje pomiędzy protonami i atomami węgla w układzie spinowym

Kdo - kwas 2-keto-3-deoksy-D-manno-oktulozonowy

LOS - lipooligosacharyd

LPS - lipopolisacharyd

m/z - stosunek wartości masy do liczby ładunków w spektrometrii mas

NMR - (*ang. Nuclear Magnetic Resonance)*; magnetyczny rezonans jądrowy

OPS - polisacharyd O-swoisty (O-antygen)

PCP - (*ang. Phenol – Chloroform – Petroleum ether*); mieszanina ekstrakcyjna fenol - chloroform - eter naftowy

PCWDEs - (*ang. Plant Cell Wall-Degrading Enzymes*); enzymy degradujące ścianę komórkową roślin

R-LPS - (*ang. rough*); forma szorstka LPS

ROESY - (*ang. Rotating frame Overhause Effect SpectroscopY*); homokorelacyjne widmo 2D [$^{1}H^{1}H$] NMR przedstawiające sygnały pochodzące od protonów sprzęgających się przez przestrzeń

S-LPS - (*ang. smooth*); forma gładka LPS

SNFG - (ang. *Symbol Nomenclature For Glycans*); nomenklatura symboli dla glikanów

SR-LPS - (*ang. semi-rough*); forma półszorstka LPS

SRP - (*ang. Soft Rot Pectobacteraceae*); bakterie z rodziny *Pectobacteraceae* powodujące choroby roślin, tj. czarna nóżkę lub mokrą zgniliznę

SEC - (*ang. Size-Exclusion Chromatography*); chromatografia wykluczania

TFA - kwas trifluorooctowy

TFB - (*ang. Tryptic Soy Broth*); płynna pożywka do hodowli bakterii

TSA - (*ang. Trypticase Soy Agar*); stała pożywka do hodowli bakterii

TOCSY - (*ang. TOtal Correlation SpectroscopY*); homokorelacyjne widmo 2D [$^{1}H^{1}H$] NMR przedstawiające sprzężenia w obrębie układu spinowego

1. Wstęp literaturowy

1.1. Rola bakterii w środowisku roślin

W środowisku roślin dominują bakterie nie mające zauważalnego wpływu na wzrost i fizjologię roślin. Kolejną, liczną grupę stanowią bakterie pełniące pozytywną rolę w rozwoju roślin, co może przejawiać się m.in.: dostarczaniem składników odżywczych, stymulowaniem wzrostu, kontrolowaniem lub hamowaniem aktywności patogenów, poprawą struktury gleby, czy bioakumulacją substancji nieorganicznych [1]. W tej grupie niezwykle ważne są bakterie wiążące azot atmosferyczny, np. gatunki z rodzaju *Rhizobium*, które tworzą związki symbiotyczne z roślinami strączkowymi [2]. Niestety obok bakterii pozytywnie wpływających na rośliny, wyróżnia się też bakterie patogenne, wywołujące zakażenia, choroby, a nawet przyczyniające się do śmierci zainfekowanych organizmów. Poznano już ponad 10 000 hodowalnych gatunków bakterii, z których ponad 150 powoduje choroby roślin [3].

Na szczególną uwagę zasługuje duża i zróżnicowana grupa Gram-ujemnych, fakultatywnie beztlenowych bakterii tworzących rząd *Enterobacteriales* [4]. Jej przedstawiciele zamieszkują wiele różnych nisz ekologicznych. Żyją w glebie, wodzie oraz w połączeniu z żywymi organizmami, w tym roślinami, owadami, zwierzętami i ludźmi [5]. Wiele gatunków bakterii z rzędu *Enterobacteriales* jest patogenami ludzi i zwierząt (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* i *Yersinia pestis*), a także roślin (*Dickeya*, *Erwinia* i *Pectobacterium*) [6–10]. Ich chorobotwórczość, a przy tym zdolność do szybkiego wzrostu, łatwość rozprzestrzeniania się i przystosowania się do różnych warunków uczyniły z nich przedmiot intensywnych badań laboratoryjnych [5].

Do najważniejszych patogenów roślin z rzędu *Enterobacteriales* należą bakterie pektynolityczne z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya* (*ang.* Soft Rot *Pectobacteraceae*; SRP) powodujące czarną nóżkę oraz mokrą zgniliznę ziemniaka, a także mokrą zgniliznę wielu innych roślin uprawnych i ozdobnych na całym świecie [11–13]. Bakterie te uznawane są przez fitopatologów za jedne z 10 najważniejszych gospodarczo patogenów bakteryjnych roślin [10]. Przedstawiciele tych rodzajów atakują szeroką gamę roślin na całym świecie. Do najważniejszych żywicieli zalicza się: ziemniaki, pomidory, cykorię, karczochy, kukurydzę, ananasy, banany, tytoń, ryż wśród roślin uprawnych oraz chryzantemy, goździki, pelargonie, fiołki wśród roślin ozdobnych [12,14,15]. Bakterie z rodzaju *Dickeya*

początkowo były izolowane głównie w ciepłych regionach tropikalnych, jednak na przestrzeni ostatnich 20 lat zaczęły się także rozprzestrzeniać w Europie m.in. ze względu na zmiany klimatyczne i rozwój handlu międzynarodowego. Powodują one rozległe szkody przede wszystkim w uprawach ziemniaków, przyczyniając się do ogromnych strat gospodarczych i ekonomicznych [11]. Bakteryjne fitopatogeny są stałym zagrożeniem dla globalnego rolnictwa i to one stanowią temat mojej rozprawy doktorskiej.

1.2. Taksonomia bakterii pektynolitycznych

Niezmiennie od wielu lat, rozwojowi nauk mikrobiologicznych towarzyszy wciąż tworzący się i zmieniający system nazewnictwa drobnoustrojów. Od pierwszych odkryć mikroorganizmów wysiłki wielu badaczy skierowane były na usystematyzowanie wszystkich znanych organizmów żywych w spójną taksonomię. Wprowadzanie nowych metod badawczych dostarczało więcej danych doświadczalnych i informacji na temat poszczególnych gatunków. Próby klasyfikacji początkowo bazowały na morfologii i fizjologii komórek bakteryjnych. Jednym z przełomowych momentów, który przyczynił się do różnicowania bakterii, było odkrycie złożonej metody barwienia stworzonej przez Hansa Christiana Grama w 1884 r. Metoda ta umożliwia podział bakterii na Gram-dodatnie i Gram-ujemne, ze względu na różnice w budowie ściany komórkowej [16]. Przez lata systemy klasyfikacji opierały się głównie na analizie cech fenotypowych. Nowe odkrycia w dziedzinie biochemii i genetyki molekularnej znacząco wpłynęły na rozwój współczesnej taksonomii, która oparta jest na badaniach wielokierunkowych. Jednak pomimo wykorzystania wielu nowych technologii ciągle dochodzi do zmian i przeklasyfikowań.

W ciągu ostatniego stulecia taksonomia SRP ulegała wielu modyfikacjom. W roku 2016 przekształcono monotypowy rząd *Enterobacteriales*, zawierający jedną rodzinę *Enterobacteriaceae*, w politypowy rząd *Enterobacterales*, któremu przypisano siedem rodzin: *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* oraz *Budviciaceae* [4]. W wyniku tych zmian SRP przeklasyfikowano do *Pectobacteriaceae*.

Wraz z pojawieniem się i rozwojem technologii genomicznych, w ciągu kilku ostatnich lat wyodrębniono wiele nowych gatunków, a pojawienie się technik sekwencjonowania DNA umożliwiło badanie związków między gatunkami i podgatunkami. W 1998 r., stosując badania oparte o sekwencję genu kodującego 16S rRNA, opracowano nową systematykę

bakterii w obrębie rodzaju *Erwinia*. Z dawnego rodzaju *Erwinia* wyodrębniono cztery rodzaje: *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Brenneria*, *Pantoea* [9]. Do rodzaju *Pectobacterium* przypisano pektynolityczne enterobakterie wywołujące mokrą zgniliznę: *Erwinia carotovora*, *Erwinia cacticida*, *Erwinia chrysanthemi* i *Erwinia cypripedi*. W 2005 r. gatunek *Pectobacterium chrysanthemi*, wyizolowany po raz pierwszy z chryzantemy [14], został podniesiony do nowego rodzaju *Dickeya* [15] i nazwany na cześć słynnego amerykańskiego fitobakteriologa Roberta S. Dickeya.

Aktualny podział w obrębie rodzaju *Pectobacterium* obejmuje 21 gatunków, a w obrębie rodzaju *Dickeya* 12 gatunków (Tabela 1).

Tabela 1 Tabela przedstawiająca klasyfikację bakterii z rodzaju *Dickeya* i *Pectobacterium* z przypisaniem do odpowiedniego rzędu i rodziny (pogrubioną czcionką zostały wyróżnione badane przeze mnie szczepy).

Rząd	***Enterobacterales***	
Rodzina	***Pectobacteriaceae***	
Rodzaj	***Dickeya (12)***	***Pectobacterium (21)***
Gatunek	***D. aquatica*** *D. chrysanthemi* *D. dadantii (subsp. dadantii; subsp. dieffenbachiae)* *D. dianthicola,* *D. fangzhongdai* ***D. lacustris*** *D. oryzae* *D. parazeae* *D. poaceiphila* *D. solani* *D. undicola* *D. zeae*	*P. actinidiae* ***P. aquaticum*** *P. aroidearum* *P. atrosepticum* *P. betavasculorum* *P. brasiliense* *P. cacticidum* *P. carotovorum* *P. colocasium* *P. fontis* *P. oderiferum* *P. parmentieri* *P. parvum* *P. peruviense* *P. polaris* *P. polonicum* *P. punjabense* *P. quasiaquaticum* ***P. versatile*** *P. wasabiae* *P. zantedeschiae*

Większość z nich wyizolowano z zainfekowanych roślin, jednak stosunkowo dużą część stanowią również izolaty z gleby oraz wód gruntowych i powierzchniowych [17,18]. Pięć z nowo opisanych gatunków *Pectobacterium* wyizolowano z systemów wodnych: *P. fontis* z wodospadu w Malezji [19], *P. aquaticum* ze strumieni słodkiej wody we Francji [20] oraz jeziora Jeleń w Polsce [21], *P. polonicum* z wód podziemnych w obrębie pól warzywnych w północnej Polsce [22], *P. versatile* z wody i szerokiej gamy różnorodnych roślin [20, 21] oraz *P. quasiaquaticum* z wód rzecznych i sztucznych zbiorników we Francji [25]. Również w przypadku rodzaju *Dickeya* wyizolowano kilka szczepów bakterii z wody oraz ryzosfery roślin nadbrzeżnych, które zostały zaklasyfikowane do gatunków *D. aquatica, D. lacustris* i *D. undicola*. Szczepy *D. aquatica* wyizolowano z próbek wody pobranych z rzek w Finlandii [26] oraz Szkocji [27]. *D. aquatica* została też wyizolowana z gnijącej marchwi w Irlandii Północnej. Był to pierwszy stwierdzony przypadek izolacji tego gatunku z innego źródła niż woda [28]. Szczepy *D. lacustris* wyizolowano z małych jezior otoczonych mokradłami oraz z ryzosfery roślin żyjących w stawach wokół tych jezior we Francji [29], natomiast szczepy *D. undicola* z jeziora w Malezji i kanału Crillon we Francji [19].

Obecność szczepów SRP w zbiornikach wodnych niesie poważne ryzyko ich przenoszenia na uprawy, np. podczas nawadniania [30]. Dlatego niezmiernie istotne są dalsze badania nad rozprzestrzenianiem się tych bakterii w środowisku, jak i określeniem ich wirulentności.

1.3. Czynniki wirulencji bakterii pektynolitycznych

Ostatnie 50-lecie to czas, kiedy wielu naukowców dokonywało analizy różnych aspektów czarnej nóżki i mokrej zgnilizny oraz powodujących je patogenów. Uwaga skupiła się na taksonomii [9,15], patogenezie i regulacji zewnątrzkomórkowej syntezy enzymów [31–33], genomice porównawczej bakterii pektynolitycznych [34], a także na biochemicznych podstawach odporności na czarną nóżkę i mokrą zgniliznę [35]. Niestety do tej pory nie znaleziono kompleksowego sposobu zwalczania tych chorób. W tej sytuacji należałoby uważniej przyjrzeć się, w jaki sposób bakterie chorobotwórcze rozprzestrzeniają się i atakują gospodarza.

Poznanie czynników wirulencji bakterii chorobotwórczych jest kluczem do zrozumienia patogenezy i ich interakcji z gospodarzem. Wirulencja opisywana jest jako zdolność organizmu do zarażenia innego organizmu (gospodarza) i wywołania choroby, innymi słowy

jest ona miarą patogeniczności organizmu. Bakterie chorobotwórcze wytwarzają szerokie spektrum czynników wirulencji, które umożliwiają im zaatakować gospodarza, wywołać chorobę, ale też uniknąć systemu obronnego gospodarza [36]. Niektóre z nich powodują uszkodzenia lub prowadzą do obumierania komórek gospodarza, podczas gdy inne przyczyniają się do adhezji (przylegania komórek bakteryjnych do komórek gospodarza) lub inwazji (wnikania komórek bakteryjnych do komórek gospodarza i rozprzestrzeniania się w nim). Można wyróżnić również czynniki wirulencji, które umożliwiają bakteriom przystosowanie się i przetrwanie w organizmie gospodarza, chroniąc przed jego układem odpornościowym.

Bakterie z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* efektywnie wykorzystują różne czynniki wirulencji, do których należą m.in.: enzymy, ruchliwość, biofilm, siderofory, a także lipopolisacharydy (LPS), polisacharydy otoczkowe (CPS) i egzopolisacharydy (EPS) [37–41].

- Masowa produkcja i wydzielanie **enzymów** degradujących ścianę komórkową roślin (*ang. Plant Cell Wall-Degrading Enzymes*, PCWDEs) prowadzi do maceracji tkanek roślinnych w celu inwazji i pozyskania składników odżywczych. Do PCWDEs należą enzymy o właściwościach pektynolitycznych, celulolitycznych, proteolitycznych i lipolitycznych. Enzymy te, produkowane m.in. przez bakterie z rodzaju *Dickeya* i *Pectobacterium*, odpowiedzialne są za gnicie tkanek żywiciela [39,40,42].
- **Ruchliwością** nazywa się zdolność drobnoustrojów do przemieszczania się w tkankach gospodarza [43].
- **Tworzenie biofilmu** umożliwia komórkom bakteryjnym kolonizację różnych części roślin (liści, łodyg, naczyń, nasion i korzeni) [44,45]. Niektóre gatunki bakterii chorobotwórczych dla roślin (m.in. *Erwinia amylovora*) kolonizują i tworzą biofilmy w naczyniach ksylemu [46] wywołując objawy więdnięcia roślin [45].
- Wytwarzane przez bakterie **siderofory**, substancje posiadające umiejętność wiązania żelaza niezbędnego do wzrostu i prawidłowego metabolizmu bakterii, umożliwiają im konkurować z gospodarzem o ten pierwiastek [36,47,48]. Zdolność do pozyskiwania jonów żelaza jest ważnym wyznacznikiem wirulencji w przypadku

bakterii z rodzaju *Dickeya*, natomiast rola sideroforów w przypadku bakterii rodzaju *Pectobacterium* nie była badana [39,49].

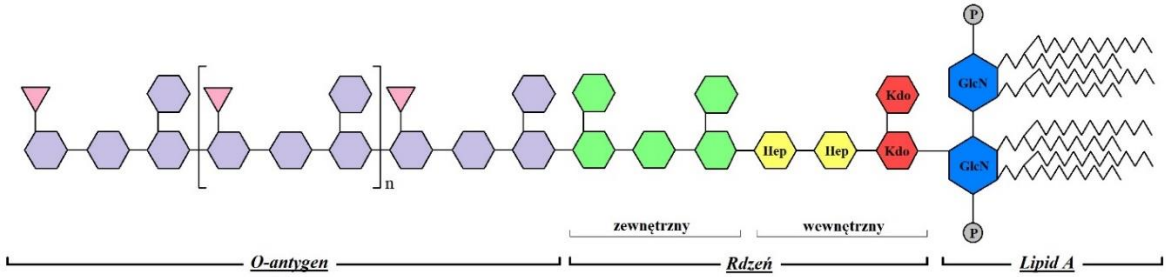
- Bakterie Gram-ujemne mogą produkować LPS, EPS i CPS. Są to polisacharydy powierzchniowe bakterii, które stale ewoluują, aby chronić je m.in. przed bakteriofagami [50,51]. **LPS-y** chronią komórki bakteryjne przed produkowanymi przez rośliny związkami o charakterze przeciwdrobnoustrojowym, indukują produkcję tlenku azotu, wykorzystywanego przez rośliny do obrony podczas infekcji, umożliwiają patogenom kolonizację tkanek roślinnych, a także są odpowiedzialne za oddziaływanie z systemami obronnymi gospodarza [52–54]. Produkcja EPS-u przez niektóre bakterie (np. *E. chryzantemi*) jest pomocna w inicjowaniu objawów maceracji, co sugeruje, że wytwarzanie EPS-u może wzmagać wirulencję [55]. CPS-y nie są niezbędne do życia i rozwoju bakterii, jednak mogą służyć jako bariera ochronna [56], m.in. warunkując odporność na fagocytozę [36,57].

Zidentyfikowanie czynników wirulencji, poznanie mechanizmów ich działania i zrozumienie sposobów ich regulowania może przyczynić się do rozwinięcia nowych narzędzi do zapobiegania infekcjom lub ich leczenia.

1.4. Budowa i rola LPS-u

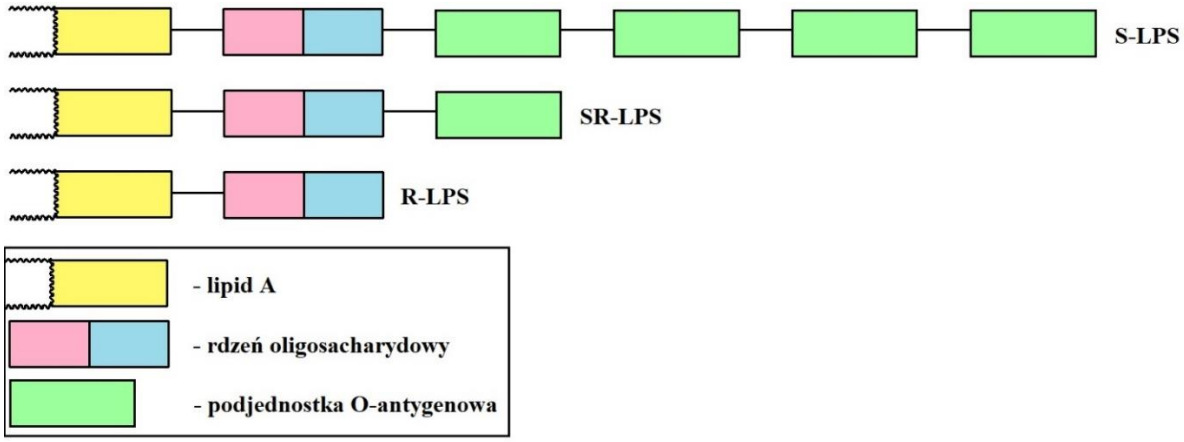
Jak wspomniano powyżej, do jednego z najważniejszych czynników wirulencji bakterii Gram-ujemnych zaliczany jest LPS. Stanowi on nieodłączny element struktury zewnętrznej ściany komórkowej większości bakterii Gram-ujemnych, zajmując około 70% powierzchni tego drobnoustroju [58,59]. LPS jest zróżnicowaną pod względem budowy cząsteczką. Składa się z trzech komponentów strukturalnych różniących się pod względem budowy chemicznej, właściwości biologicznych oraz zmienności strukturalnej: lipidu A, rdzenia oligosacharydowego i O-specyficznego łańcucha polisacharydowego (O-antygenu) [60]. Ogólną strukturę tych lipidowo-polisacharydowych heteropolimerów przedstawiono na schematycznym rysunku (Rysunek 1). Można na nim wyróżnić lipid A, fragment LPS-u zakotwiczony w zewnętrznej błonie komórkowej, połączony wiązaniem ketozydowym z rdzeniem oligosacharydowym. Rdzeń dzieli się na dwa regiony: wewnętrzny i zewnętrzny. Bezpośrednio z zewnętrznym regionem rdzenia łączy się polisacharydowy łańcuch

O-swoisty, który będąc najbardziej wyeksponowanym elementem ściany komórkowej „narażony” jest na oddziaływanie z otaczającym środowiskiem [61].



Rysunek 1 Rysunek przedstawiający schematyczną budowę LPS-u.

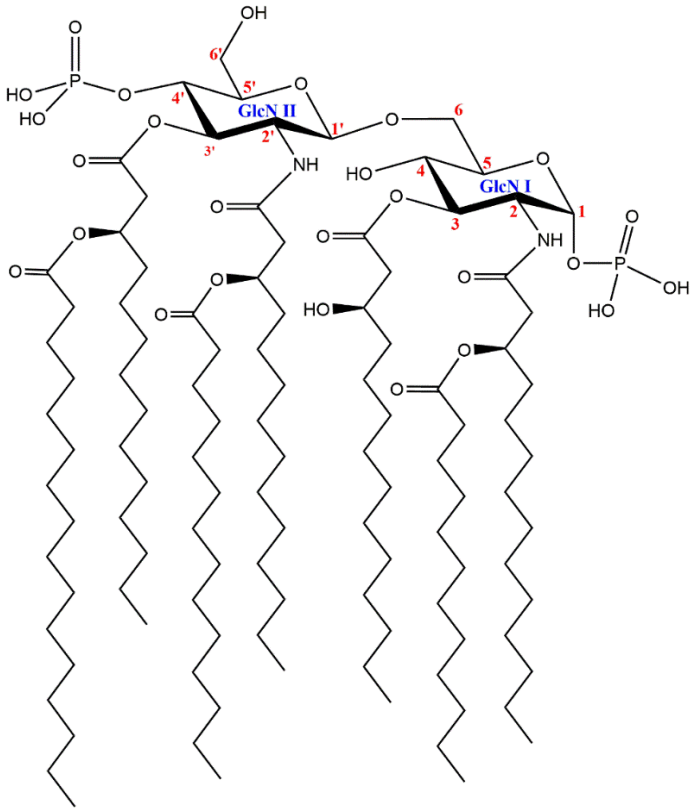
Wśród LPS-ów bakterii Gram-ujemnych można wyróżnić trzy typy różniące się długością łańcucha polisacharydowego (Rysunek 2). LPS gładki (S-LPS) jest to typowy LPS, zawierający w swojej budowie wszystkie omawiane elementy strukturalne. LPS szorstki (R-LPS) całkowicie pozbawiony jest podjednostek O-antygenowych. Te stosunkowo krótkie formy LPS-ów, określane też jako lipooligosacharydy (LOS), na ogół nie są wirulentne. Uważane są za mniej żywotne, zarówno na powierzchni rośliny żywicielskiej, jak i wewnątrz niej [62]. Formą pośrednią jest LPS półszorstki (SR-LPS), który posiada bardzo krótki łańcuch O-swoisty, składający się z jednej podjednostki O-antygenowej [52,59,63].



Rysunek 2 Rysunek przedstawiający schemat budowy trzech form LPS-u (S-LPS, SR-LPS, R-LPS).

Lipid A

Struktura chemiczna lipidu A większości bakterii Gram-ujemnych składa się z dwóch reszt glukozaminy (GlcN I, GlcN II) połączonych wiązaniem β(1→6) glikozydowym (Rysunek 3). Każda z nich przez grupy aminowe (przy C2, C2') oraz grupy hydroksylowe (przy C3, C3') może być podstawiona kwasami tłuszczowymi (zwykle 3-hydroksykwasy), z kolei poprzez grupę hydroksylową tych kwasów mogą być przyłączone inne kwasy tłuszczowe (np. nasycone i nierozgałęzione: laurynowy (C12:0), mirystynowy (C14:0), palmitynowy (C16:0) (Rysunek 3)). Disacharyd jest też zazwyczaj podstawiony w pozycji C1 i C4' resztami fosforanowymi (Rysunek 3), etanoloaminą, a rzadziej 4-aminoarabinozą, β-mannopiranozą, kwasem galaktouronowym czy glicyną [63,64]. Lipid A uważany jest za stosunkowo konserwatywną część LPS-u, zwłaszcza w porównaniu z rdzeniem i O-polisacharydem. Charakteryzuje się jednak sporą zmiennością zwłaszcza w zakresie liczby i rodzaju przyłączonych kwasów tłuszczowych. Zmiany w budowie chemicznej lipidu A wpływają na heterogenność międzygatunkową, a nawet międzyszczepową.



Rysunek 3 Przykładowa struktura chemiczna Lipidu A.

Rdzeń oligosacharydowy

Rdzeń oligosacharydowy łączy lipid A z polisacharydowym łańcuchem O-swoistym. W jego obrębie wyróżnia się dwa regiony: wewnętrzny i zewnętrzny, które wyraźnie różnią się budową chemiczną. Rdzeń wewnętrzny zawiera minimum jedną resztę kwasu 3-deoksy-D-mannooktulozonowego (Kdo) oraz reszty heptoz, które mogą być dodatkowo podstawiane grupami fosforanowymi, pirofosforanowymi lub fosfoetanoloaminą, natomiast w skład rdzenia wewnętrznego wchodzą heksozy. Rdzeń wewnętrzny połączony jest z lipidem A kwasolabilnym wiązaniem ketozydowym α(2→6'), a rdzeń zewnętrzny wiąże się glikozydowo z O-antygenem [65].

Łańcuch O-swoisty

Polisacharydowy łańcuch O-swoisty jest najbardziej wyeksponowanym komponentem LPS-u, mającym bezpośredni kontakt ze środowiskiem zewnętrznym. Charakteryzuje się on dużą heterogennością ze względu na skład chemiczny. OPS-y różnią się między sobą liczbą, rodzajem i sekwencją reszt cukrowych, wielkością pierścienia, rodzajem konfiguracji anomerycznej, miejscami podstawienia i przyporządkowaniem do szeregu konfiguracyjnego D lub L poszczególnych monosacharydów, a także obecnością niecukrowych podstawników [63,65,66]. Antygen O zbudowany jest z powtarzających się podjednostek, zawierających zwykle 1-8 reszt cukrowych, które mogą się łączyć liniowo lub w sposób rozgałęziony [58]. Do często występujących reszt w łańcuchach OPS należą heksozy (Glc, Man, Gal), aminoheksozy (GlcN, GalN), a także 6-deoksyheksozy (Fuc, Rha) [67].

OPS jest najbardziej zmiennym fragmentem LPS-u. Zmienność ta może przejawiać się odmiennym składem chemicznym, a także długością łańcucha polisacharydowego, która może wynikać z różnej liczby tworzących go podjednostek [59]. Jak już zostało wcześniej wspomniane, łańcuchy O-swoiste stanowią najbardziej zewnętrzny fragment LPS-u. Biorą one udział w procesach adhezji, chronią bakterie przed fagocytozą, a także umożliwiają im przetrwanie w tkankach gospodarza. OPS określa swoistość serologiczną, pełniąc istotną rolę powierzchniowego antygenu [52,65]. O-antygeny, ze względu na pełnione funkcje oraz zmienność pod względem strukturalnym, stanowią przedmiot badań mojej rozprawy doktorskiej.

2. Cel pracy

Bakterie pektynolityczne z rodziny *Pectobacteriaceae*, do której należą *Pectobacterium* i *Dickeya* powodują choroby czarnej nóżki oraz mokrej zgnilizny wśród wielu ważnych gospodarczo roślin uprawnych i ozdobnych na całym świecie. Uważane są za wysoce agresywne patogeny, wyrządzające rozległe szkody zwłaszcza na plantacjach ziemniaka, przyczyniając się do ogromnych strat ekonomicznych.

Większość dotychczas badanych izolatów szczepów SRP pochodziło z zainfekowanych roślin, jednak w ostatnich latach wyizolowano nowe fitopatogenne gatunki z wód powierzchniowych i gruntowych. Obecność bakterii w zbiornikach wodnych wiąże się z poważnym ryzykiem ich bezpośredniego przenoszenia na uprawy, np. podczas nawadniania pól. Problem związany z łatwością rozprzestrzeniania się tych bakterii i infekowania roślin okazał się na tyle ważny, że prowadzone są szerokie badania skupiające się na możliwościach ich przemieszczania się, jak i określeniu ich wirulentności.

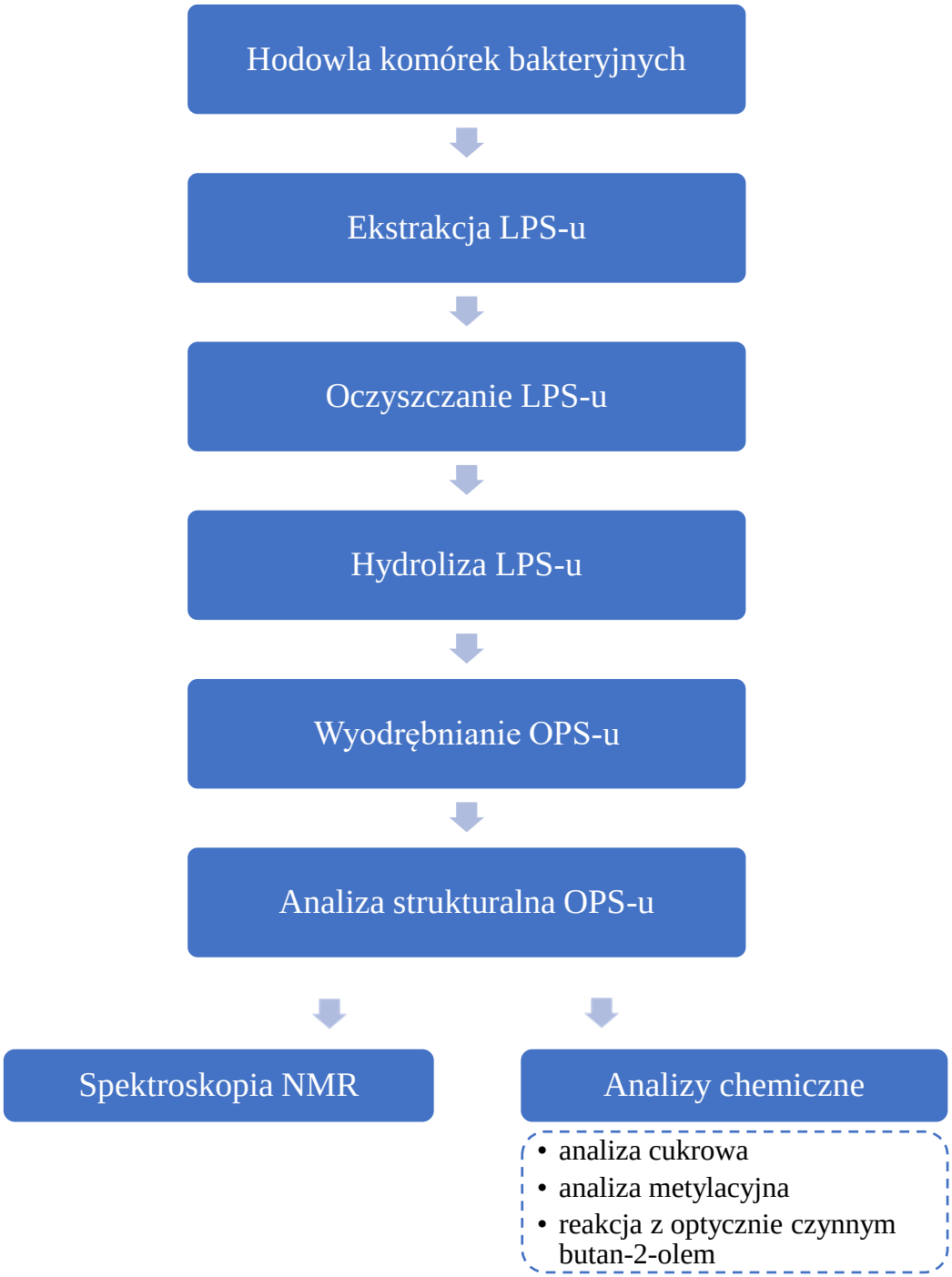
Głównym celem pracy doktorskiej było określenie struktury chemicznej O-polisacharydów bakterii z rodzajów *Dickeya* oraz *Pectobacterium*. Do badań wybrano wyizolowane ze środowisk wodnych szczepy bakterii: *D. aquatica* IFB0154 i IFB0694, *D. lacustris* IFB8647, *P. aquaticum* IFB5637 oraz *P. versatile* IFB5636.

Cele szczegółowe obejmowały:

- wyizolowanie LPS-ów ze ścian komórkowych bakterii, a następnie wyodrębnienie z nich OPS-ów,
- badania strukturalne, mające na celu:
  - ustalenie liczby i zidentyfikowanie rodzaju reszt cukrowych;
  - określenie miejsca podstawienia reszt cukrowych;
  - przyporządkowanie reszt cukrowych do szeregu konfiguracyjnego D lub L;
  - określenie wielkości pierścieni cukrowych;
  - wyznaczenie konfiguracji anomerycznych (α lub β) atomów węgla poszczególnych reszt cukrowych;
  - zidentyfikowanie podstawników niecukrowych;
  - ustalenie sekwencji reszt cukrowych w podjednostkach powtarzalnych analizowanych OPS-ów.

3. Część eksperymentalna

3.1. Schemat analizy strukturalnej polisacharydów



3.2. Hodowla komórek bakteryjnych

Wybrane do badań, wyizolowane ze środowiska wodnego, szczepy bakterii z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium* (z kolekcji Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed):

- szczep ***D. aquatica* IFB0154** (numery w innych kolekcjach IPO3496; Dw0440) z dróg wodnych w Finlandii, 2005 [26],
- szczep ***D. aquatica* IFB0694** (numery w innych kolekcjach NCPPB 4580, LMG27354) z dróg rzecznych Wielkiej Brytanii, 2008 [27]**,**
- szczep ***D. lacustris* IFB8647** (numery w innych kolekcjach CFBP8647, LMG30899) z jezior we Francji, 2017 [29]**,**
- szczep ***P. aquaticum* IFB5637** z polskiego jeziora Jeleń, położonego na Kaszubach [21],
- szczep ***P. versatile* IFB5636** (numery w innych kolekcjach CFBP6051, NCPPB 3387) z ziemniaka, we Francji [24]**.**

W celu uzyskania biomasy bakteryjnej przeznaczonej do izolacji LPS-ów, poszczególne szczepy inkubowano (28 °C, 24 h) na pożywce stałej Trypticase Soy Agar (TSA). Kolbę (200 mL) z pożywką płynną Tryptic Soy Broth (TSB) zaszczepiono pojedynczą kolonią bakteryjną pobraną z pożywki TSA i inkubowano (28 °C, z wytrząsaniem 130 rpm, 24 h). Uzyskaną płynną hodowlę bakteryjną wykorzystano do zaszczepienia 2000 mL pożywki TSB i ponownie inkubowano (28 °C, z wytrząsaniem 130 rpm, 48 h). Następnie komórki bakteryjne zebrano przez wirowanie (16.915,34 × g, 10 min) i przechowywano w temperaturze około -20 °C do czasu dalszych analiz. Hodowla została przeprowadzona w Zakładzie Ochrony i Biotechnologii Roślin Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed.

3.3. Ekstrakcja LPS-u

Dobrym rozwiązaniem jest przeprowadzenie minimum dwóch typów ekstrakcji w tandemie (Rysunek 4), np. za pomocą mieszaniny PCP (*ang. Phenol, Chloroform, Petroleum ether*) oraz mieszaniną gorącego fenolu i wody [68].

Rysunek 4 Schematyczne przedstawienie dwóch typów ekstrakcji LPS-u przeprowadzanych w tandemie.

Pierwszy typ ekstrakcji stosowany jest do wyodrębnienia formy szorstkiej R-LPS-u [69]. Zaletą tej metody jest stosunkowo mała ilość kwasów tłuszczowych oraz białek ekstrahowanych wraz z LPS-em. Za pomocą drugiego typu ekstrakcji – mieszaniną gorącego fenolu i wody można wyekstrahować LPS zawierający długi łańcuch polisacharydowy (S-LPS), który ma duże powinowactwo do fazy wodnej.

3.3.1. Ekstrakcja PCP – fenol, chloroform, eter naftowy

Do przeprowadzenia ekstrakcji przygotowałam mieszaninę ekstrakcyjną składającą się z 90% wodnego roztworu fenolu, chloroformu i eteru naftowego w proporcji 2:5:8 (v/v/v). W takim roztworze R-LPS jest rozpuszczalny, natomiast S-LPS, białka, kwasy nukleinowe i polisacharydy do niego nie przechodzą, zgodnie z zasadą „podobne rozpuszcza się w podobnym" [70]. Mieszaninę PCP przygotowałam pod wyciągiem, mieszając na mieszadle magnetycznym. Suchą masę bakteryjną zawiesiłam w otrzymanym roztworze (50 g biomasy/200 mL PCP). Przeprowadziłam 2-krotną bądź 3-krotną ekstrakcję w zależności od szczepu. Komórki bakteryjne odwirowałam (7012 × g; 30 min; 4 °C), a otrzymane supernatanty połączyłam w kolbie okrągłodennej. Przy pomocy wyparki obrotowej odparowałam chloroform i eter naftowy z ekstraktów (30 min, 40 °C). Do otrzymanej warstwy fenolowej dodałam ok. 300 µL wody dejonizowanej. Nie zaobserwowałam żadnych zmian (nie wytrącił się osad), co świadczyło o braku szorstkiej formy LPS-u we wszystkich analizowanych szczepach [69].

3.3.2. Ekstrakcja fenolowo-wodna

Kolejnym krokiem było przeprowadzenie ekstrakcji mieszaniną gorącego fenolu i wody (45:50, v/v). Do komórek bakteryjnych dodałam odpowiednią objętość fenolu i wody ogrzanych do temp. 65 °C, a następnie całość umieściłam na mieszadle magnetycznym (65 °C, 90 min). Po odwirowaniu osadu (7012 × g; 20 min; 4 °C) zaobserwowałam wyodrębnienie trzech faz: na dnie szczątki komórek bakteryjnych w fazie fenolowej, mleczna interfaza i warstwa wodna, którą zebrałam. Proces powtórzyłam 2-krotnie, przy skróconym do 60 min czasie mieszana. Otrzymane ekstrakty połączyłam i dializowałam w obecności wody, w ciągłym przepływie, do zaniku zapachu fenolu. Wykorzystałam worki dialityczne Spectrum (6-8 kD MWCO). Dializat zamroziłam i zliofilizowałam [71].

3.4. Oczyszczanie LPS-u – trawienie enzymatyczne

Pozostałości białek oraz kwasów nukleinowych w próbce po ekstrakcji pozbyłam się przeprowadzając trawienie enzymatyczne. W tym celu przygotowałam bufor do trawienia enzymatycznego (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, bufor o pH 7,5 z 1 M HCl), enzymy trawiące kwasy nukleinowe: DNazę i RNazę oraz enzymy trawiące białko – proteinazę K. Zliofilizowaną próbkę rozpuściłam w buforze (50 mg/9 mL buforu), dodałam szczyptę DNazy i RNazy, a następnie próbka była inkubowana przez noc w temperaturze 37 °C. Po tym czasie zwiększyłam temperaturę do 56 °C, dodałam szczyptę proteinazy K i pozostawiłam na kolejne 5 h. Następnie próbkę poddałam dializie z przepływem (2 dni), po czym zamroziłam i zliofilizowałam.

3.5. Hydroliza LPS-u

Do oddzielenia lipidu A od polisacharydu wykorzystałam łagodną hydrolizę przeprowadzoną za pomocą 1% wodnego roztworu kwasu octowego (10 mg LPS-u/1 mL kwasu). LPS wraz z roztworem kwasu octowego umieściłam w kolbce „sercówce” i ogrzewałam (100 °C; 1,5 h) w łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Próbkę pozostawiłam do ochłodzenia, do temperatury pokojowej, a następnie odwirowałam lipid A (7012 × g; 20 min.; 4 °C). Zebrany supernatant zawierający cukrowe fragmenty LPS-ów, po odszczepieniu i odwirowaniu lipidu A, odparowywałam w obecności metanolu na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem (40 °C), aż do zaniku zapachu kwasu

octowego. Osad rozpuściłam w wodzie dejonizowanej, po czym zamroziłam i zliofilizowałam.

3.6. Wyodrębnianie OPS-u – chromatografia wykluczania

Do wyodrębnienia i oczyszczenia wysokocząsteczkowej frakcji O-polisacharydowej wykorzystałam chromatografię wykluczania (*ang. Size Exclusion Chromatography* – SEC). Zliofilizowany materiał otrzymany po odszczepieniu lipidu A rozpuściłam w 2 mL wody, a następnie naniosłam na kolumnę wypełnioną żelami: Bio-Gel P-30 lub Superdex 75. Poszczególne frakcje zbierane były do probówek za pomocą kolektora.

Warunki analizy:

- szklana kolumna chromatograficzna: wys. 120 cm; śr. 1 cm,
- faza stacjonarna: Superdex 75 lub Bio-Gel P-30,
- faza ruchoma: woda dejonizowana,
- detektor refraktometryczny: JASCO RI-2031 Plus,
- pompa: Gilson Minipuls 3 (MP3),
- czas kolekcji: 20 min/probówkę,
- czas trwania analizy: 1000 min,
- prędkość przepływu fazy ruchomej: 6-10,8 mL h (6 mL/h *D. aquatica* IFB0154 oraz *D. aquatica* IFB0694; 9,6 mL/h *P. aquaticum* IFB5637 oraz *P. versatile* IFB5636; 10,8 mL/h *D. lacustris* IFB8647).

3.7. Analiza strukturalna OPS-u

Określenie struktury chemicznej OPS-u wymaga ustalenia liczby i rodzaju reszt cukrowych, wyznaczenia miejsc podstawienia poszczególnych monosacharydów, oznaczenia typu konfiguracji anomerycznej, wielkości pierścieni cukrowych, a także przyporządkowania do szeregu konfiguracyjnego D lub L (tzw. konfiguracji absolutnej). W badaniach strukturalnych OPS-u wykorzystuje się m.in. analizy chemiczne. Polegają one na syntezie odpowiednich pochodnych, a następnie analizowaniu ich za pomocą technik chromatograficznych oraz technik chromatograficznych połączonych ze spektrometrią mas. Wyniki analiz chemicznych dostarczają informacji o poszczególnych komponentach, stanowiąc podstawę do kontynuowania dalszych badań z wykorzystaniem NMR.

3.7.1. Spektroskopia NMR

W chemii strukturalnej, w tym m.in. do ustalania struktur OPS-ów bakteryjnych, niezwykle ważną rolę odgrywają badania oparte na spektroskopii NMR. Technika ta jest wykorzystywana w celu identyfikacji monosacharydów, oznaczenia ich konfiguracji anomerycznej, określenia wielkości pierścieni cukrowych, miejsc podstawienia, a także w pewnym zakresie do przyporządkowania do szeregu konfiguracyjnego D lub L oraz ich sekwencji w jednostce powtarzalnej. Interpretację rozpoczyna się od widm jednowymiarowych, na których można wyróżnić charakterystyczne obszary, m.in. zakres anomeryczny zawierający zwykle dobrze rozdzielone sygnały. Na podstawie widma protonowego – ^{1}H NMR można otrzymać informację o liczbie reszt cukrowych wchodzących w skład OPS-u, o czym świadczy liczba sygnałów w zakresie anomerycznym. Kolejnym krokiem jest analiza i interpretacja widm dwuwymiarowych, które dostarczają m.in. informacji o sposobie połączenia i miejscach podstawienia reszt cukrowych w łańcuchu polisacharydowym.

Próbki OPS-ów (3-10 mg) przed analizą za pomocą spektroskopii NMR rozpuściłam w ~1 mL $^{2}H_2O$ (99,9%), a następnie zamroziłam i zliofilizowałam. Wymianę z „ciężką wodą" przeprowadziłam w celu wymiany labilnych protonów z grup hydroksylowych i aminowych na atomy deuteru. Badany materiał rozpuściłam ponownie w 0,6 mL $^{2}H_2O$ (99,95%) i przeniosłam do szklanych probówek NMR. Dla przyrządzonych próbek zostały zarejestrowane widma 1D i zestaw widm 2D ($^{1}H^{1}H$ COSY, TOCSY, ROESY oraz $^{1}H^{13}C$ HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC) NMR.

Warunki analizy:

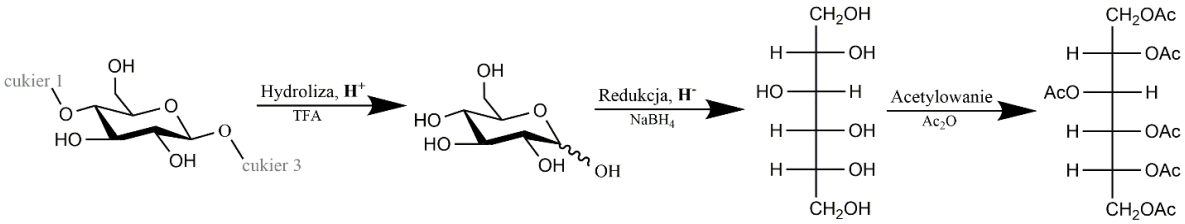
- aparatura - spektrometr NMR: Bruker AVANCE III 500 MHz oraz Bruker Avance III 700 MHz,
- oprogramowanie: Bruker TopSpin 3.6.2,
- rozpuszczalnik: $^{2}H_2O$ 99.5% lub $^{2}H_2O$ 99.95%,
- temperatura rejestracji widm: 30-40 °C (w zależności od próbki),
- wzorzec wewnętrzny do kalibracji przesunięć chemicznych: aceton (δ_H 2,225 ppm; δ_C 31,45 ppm).

3.7.2. Analizy chemiczne

Węglowodany posiadają liczne grupy hydroksylowe, co powoduje, że są one stosunkowo mało lotne, żeby analizować je bezpośrednio za pomocą chromatografii gazowej (GC), czy chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). W związku z tym niezbędna jest ich derywatyzacja, czyli przekształcenie w odpowiednie, lotne pochodne [61].

3.7.2.1. Analiza cukrowa

Analiza cukrowa przeprowadzana jest w celu identyfikacji oraz określenia liczby monosacharydów w jednostce powtarzalnej OPS na podstawie wyników analizy GC i GC-MS otrzymanych lotnych acetylowych pochodnych octanów alditoli. Składa się z trzech etapów: hydrolizy, redukcji i acetylowania (Rysunek 5).



Rysunek 5 Schemat przedstawiający etapy analizy cukrowej.

<u>Hydroliza</u> polega na hydrolitycznym rozszczepieniu wiązań glikozydowych przy wykorzystaniu (klasycznie) 2M wodnego roztworu kwasu trifluorooctowego (TFA). Do próbki (0,5-1,0 mg) dodałam 300 µL 2M TFA, a następnie ogrzewałam w bloczku grzejnym (2 h, 120 °C). Pozostawiłam próbkę w celu ochłodzenia do temperatury pokojowej, po czym 3-krotnie dodawałam metanolu i odparowywałam próbkę w strumieniu azotu. W ten sposób otrzymałam mieszaninę monosacharydów wchodzących w skład OPS-u.

<u>Redukcja</u> umożliwia przekształcenie grup karbonylowych (aldehydowych lub ketonowych) w grupy hydroksylowe (alkoholowe), co w konsekwencji prowadzi do otrzymania alditoli. W tym celu zastosowałam tetrahydroboran sodu jako czynnik redukujący. Próbkę, po dodaniu 250 µL wody dejonizowanej i szczypty $NaBH_4$, pozostawiłam na noc w temperaturze pokojowej. Po tym czasie dodałam kolejną szczyptę $NaBH_4$ i odczekałam 1 h. Wykonałam próbę potwierdzającą całkowite przereagowanie

próbki. W tym celu na szkiełku zegarkowym do ok. 0,5 µL roztworu próbki dodałam taką samą objętość kwasu octowego. Wydzielanie się gazu (wodoru) świadczyło o obecności $NaBH_4$. Mając pewność, że próbka w pełni przereagowała dodawałam kroplami 50% roztwór kwasu octowego, do zaniku wydzielania się pęcherzyków wodoru. W strumieniu azotu odparowałam roztwór kwasu octowego, a następnie powtórzyłam kilkukrotnie proces, dodając za każdym razem ok. 200 µL metanolu, aby pozbyć się resztek kwasu octowego z próbki. Otrzymane alditole poddałam acetylowaniu.

Acetylowanie prowadzi do przekształcenia wszystkich ugrupowań hydroksylowych w ugrupowania acetylowe (-OAc). Reakcję przeprowadziłam wykorzystując bezwodnik kwasu octowego (200 µL) w obecności szczypty octanu sodu, jako katalizatora. Próbkę ogrzewałam w bloczku grzejnym (2 h, 120 °C). Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, kilkukrotnie dodawałam toluenu (~300 µL) i odparowywałam do sucha w strumieniu azotu. Otrzymane produkty rozpuściłam w dichlorometanie (CH_2Cl_2) w celu oddzielenia od innych substancji. Roztwór przeniosłam do nowej buteleczki, a następnie odparowałam rozpuszczalnik.

Acetylowe pochodne octanów alditoli rozpuściłam w 100 µL chlorku metylenu i przeniosłam do buteleczki chromatograficznej z tzw. insertem. Przygotowaną próbkę analizowałam techniką GC oraz GC-MS.

Warunki analizy GC:

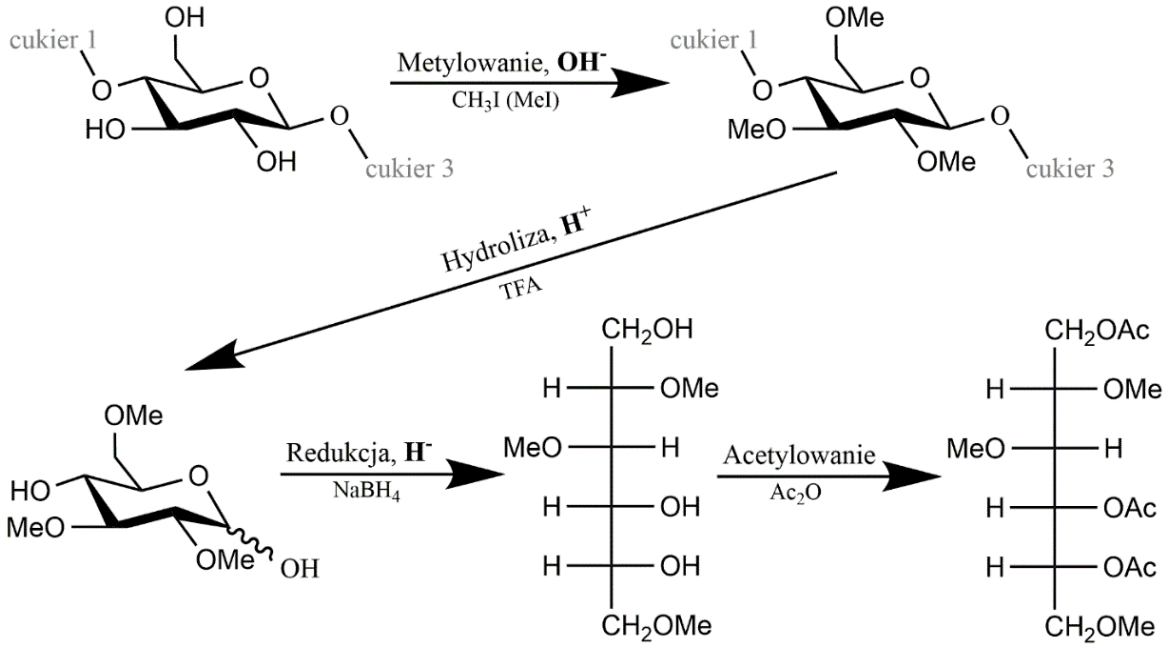
- aparatura - chromatograf gazowy: GC 8000 (Fisons Instruments) lub GC-2010 Pro (Shimadzu) z detektorem płomieniowo – jonizacyjnym (FID),
- kolumna: Rtx-5 (dł. 30 m, śr. 0,25 mm, grubość filmu: 0,25 µm),
- gaz nośny: argon,
- program temperaturowy: 120-265 °C, narost 4 °C/min, 265 °C izoterma (10 min).

Warunki analizy GC-MS:

- aparatura - chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas: GC MS-QP2010 SE (Shimadzu),
- gaz nośny: hel,
- jonizacja strumieniem elektronów EI: 70 eV,
- kolumna: Rtx-5 (dł. 30 m, śr. 0,25 mm, grubość filmu 0,25 µm),
- program temperaturowy: 120-265 °C, narost 4 °C/min, 265 °C izoterma (10 min).

3.7.2.2. Analiza metylacyjna

Analiza metylacyjna wykorzystywana jest w celu ustalenia miejsc podstawienia reszt cukrowych w łańcuchu oligosacharydowym/polisacharydowym na podstawie analizy GC-MS otrzymanych częściowo zmetylowanych acetylowych pochodnych octanów alditoli. Składa się z trzech etapów identycznych jak przy analizie cukrowej poprzedzonych metylowaniem (Rysunek 6).



Rysunek 6 Schemat przedstawiający etapy analizy metylacyjnej.

Pierwszym etapem analizy jest metylowanie. Proces polega na syntezie eterów (-OMe) w wyniku metylowania wolnych grup hydroksylowych reszt cukrowych w łańcuchu polisacharydowym.

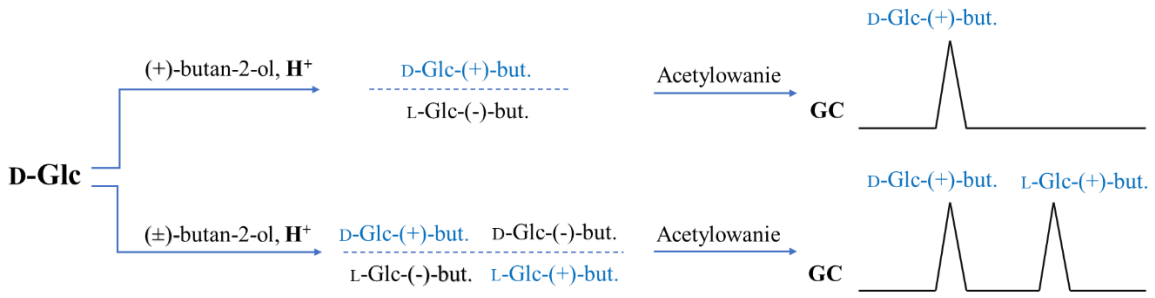
Do przeprowadzenia procesu metylowania zastosowałam procedurę opracowaną przez Ciucanu i Kerek'a [72]. Przygotowałam dwie buteleczki z ciemnego szkła. W pierwszej umieściłam frakcję cukrową (~1 mg), a w drugiej rozdrobniony wodorotlenek potasu (40 mg). Próbki umieściłam w eksykatorze nad pięciotlenkiem potasu (P_2O_5) na 2-3 dni, gdyż zachowanie bezwodnego środowiska reakcji jest warunkiem koniecznym do prawidłowego jej przebiegu. Po wyjęciu z eksykatora buteleczki szczelnie zamknęłam zakrętkami z silikonowymi membranami. Do próbki, przebijając się przez membranę, dodałam 300 µL dimetylosulfotlenku (DMSO) i wytrząsałam do jej rozpuszczenia. Klarowny roztwór przeniosłam do buteleczki z KOH i wytrząsałam za pomocą wytrząsarki

przez 1 h. Następnie, cały czas wytrząsając, dodałam trzy porcje po 50 µL roztworu jodku metylu (CH_3I) w odstępie 30 min. Po dodaniu ostatniej porcji pozostawiłam próbkę na wytrząsarce przez 1,5 h. Roztwór przeniosłam do większej buteleczki, odparowałam do sucha w obecności azotu i przeprowadziłam ekstrakcję rozpuszczalnikową chloroform/woda. Po trzykrotnej ekstrakcji zebrałam warstwę chloroformową i odparowałam do sucha w strumieniu azotu. Otrzymaną próbkę poddałam kolejno hydrolizie, redukcji i acetylowaniu wg procedury opisanej w podrozdziale 3.7.2.1. Po hydrolitycznym rozszczepieniu wiązań glikozydowych otrzymałam częściowo zmetylowane monosacharydy. Związki te zredukowałam do eterów metylowych alditoli, a następnie w wyniku ich acetylowania uzyskałam acetylowo-metylowe pochodne octanów alditoli. Przygotowaną próbkę poddałam analizie za pomocą GC-MS (warunki analizy GC-MS zostały opisane w podrozdziale 3.7.2.1.). Interpretując wyniki analizy metylacyjnej, ustaliłam miejsca glikozylowania poszczególnych reszt cukrowych wchodzących w skład badanego OPS-u.

3.7.2.3. Przyporządkowanie monosacharydów do szeregu konfiguracyjnego D lub L

Przyporządkowanie monosacharydów do szeregu konfiguracyjnego D lub L (potocznie nazywane określeniem konfiguracji absolutnej) odbywa się na podstawie porównania parametrów retencji odpowiednich pochodnych monosacharydów wchodzących w skład analizowanego polisacharydu z parametrami retencji odpowiednich standardów. Standardy przygotowywane są w reakcji danego monosacharydu z mieszaniną racemiczną chiralnego alkoholu, np. (±)-butan-2-olu oraz z jednym z jej enancjomerów, które następnie zostają przeprowadzone w lotne pochodne, np. w wyniku acetylowania.

Chcąc przypisać „nieznaną” glukozę do odpowiedniego szeregu konfiguracyjnego wystarczy wykorzystać jeden z jej enancjomerów do przygotowania wzorców, np. łatwo dostępną D-Glc i przeprowadzić dwie reakcje: jedną z mieszaniną racemiczną (±)-butan-2-olu, a drugą z jednym z jej enancjomerów, np. (+)-butan-2-olem (Rysunek *7*).



Rysunek 7 Schemat przedstawiający tworzenie wzorców umożliwiających przyporządkowanie reszt cukrowych do szeregu D lub L.

W reakcji D-Glc z (+)-butan-2-olem otrzymywany jest D-Glc-(+)-2-butylu, który jest enancjomerem L-Glc-(-)-2-butylu (takie same parametry retencji w GC). Natomiast w reakcji D-Glc z (±)-butan-2-olem otrzymuje się dwa diastereoizomery: D-Glc-(+)-2-butylu i D-Glc-(-)-2-butylu, które mają takie same parametry retencji jak ich enancjomery, czyli odpowiednio L-Glc-(-)-2-butylu i L-Glc-(+)-2-butylu. „Nieznaną" próbkę glukozy należy poddać reakcji z (+)-butan-2-olem lub (-)-butan-2-olem. Po zacetylowaniu próbek (wzorców i badanej), uzyskane lotne pochodne glikozydów butylu należy zanalizować za pomocą techniki GC. Porównanie czasów retencji analizowanej próbki i wzorców pozwoli na przyporządkowanie „nieznanej" glukozy do odpowiedniego szeregu konfiguracyjnego.

Proces otrzymania odpowiednich pochodnych monosacharydów, wchodzących w skład analizowanego polisacharydu, składa się z trzech etapów: hydrolizy, reakcji z optycznie czynnym butan-2-olem i acetylowania.

Hydroliza:

Do ~1 mg OPS-u umieszczonego w buteleczce o poj. 1,5 mL dodałam 200 µL 2M wodnego roztworu kwasu trifluorooctowego (TFA). Tak przygotowaną próbkę poddałam ogrzewaniu (2 h, 120 °C). Po schłodzeniu próbki do temperatury pokojowej wodny roztwór TFA usunęłam w strumieniu azotu.

Reakcja z optycznie czynnym butan-2-olem:

Do próbki dodałam 400 µL (+)-butan-2-olu oraz 10 µL mieszaniny kwasu trifluorooctowego z jego bezwodnikiem (50:1, v/v), a następnie ogrzewałam (6 h, 105 ºC). Ochłodziłam próbkę i odparowałam w strumieniu azotu.

Acetylowanie:

Etap acetylowania został przeprowadzony w sposób opisany w podrozdziale 3.7.2.1.

Warunki analizy GC:

- aparatura - chromatograf gazowy: GC 8000 (Fisons Instruments) lub GC-2010 Pro (Shimadzu) z detektorem płomieniowo – jonizacyjnym (FID),
- gaz nośny: argon,
- kolumna: Rtx-2330 (dł.: 60 m, śr. wew.: 0,25 mm, grubość filmu: 0,2 μm),
- program temperaturowy: 120-260 °C, narost 2 °C/min, 260 °C izoterma (30 min).

4. Część wynikowa

W ramach pracy doktorskiej określiłam struktury chemiczne O-polisacharydów wyizolowanych z pięciu wybranych szczepów fitopatogenów bakteryjnych z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium*. Część uzyskanych wyników została opublikowana w trzech artykułach, które stanowią zasadniczą część mojej pracy doktorskiej (załączniki D1-D3):

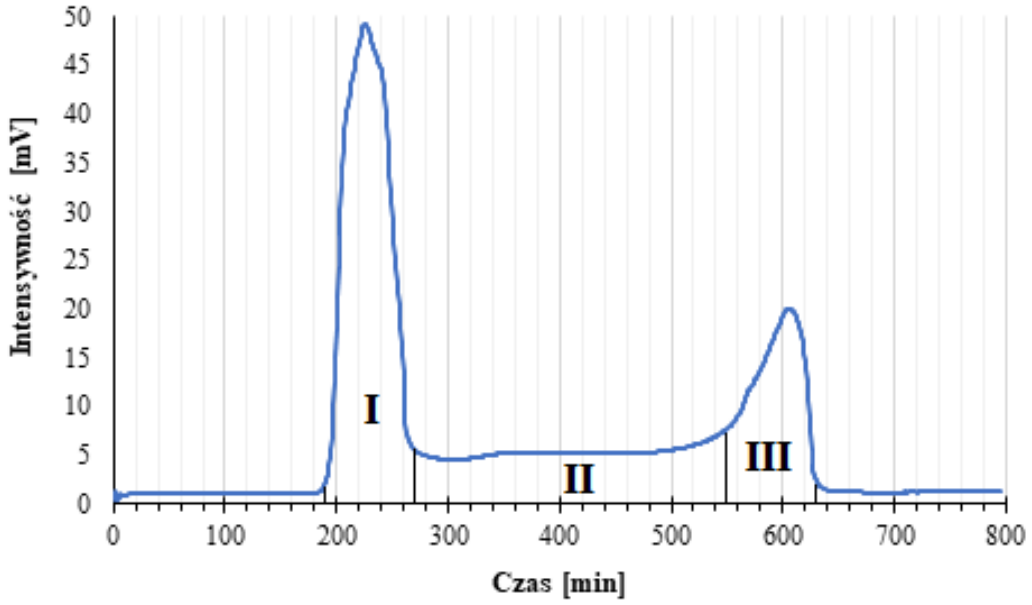
1. Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Śledź, W., Motyka-Pomagruk, A., Ossowska, K., Łojkowska, E., Kaczyński, Z. (2020). The structure of the O-polysaccharide isolated from pectinolytic gram-negative bacterium *Dickeya aquatica* IFB0154 is different from the O-polysaccharides of other *Dickeya* species. *Carbohydrate Research*, *497*, 108135. https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108135 [D1]
2. Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Babińska, W., Motyka-Pomagruk, A., Śledź, W., Łojkowska, E., Kaczyński, Z. (2022). The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. *Carbohydrate Research*, *522*, 108696. https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108696 [D2]
3. Kowalczyk, A., Babińska-Wensierska, W., Łojkowska, E., Kaczyński, Z. (2023). The structure of O-polysaccharide isolated from the type strain of *Pectobacterium versatile* CFBP6051T containing an erwiniose - higher branched monosaccharide. *Carbohydrate Research*, *524*, 108743. https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108743 [D3]

W tym rozdziale skupię się na szczegółowym przedstawieniu wyników analiz chemicznych i spektroskopowych, które doprowadziły do ustalenia struktury chemicznej OPS-u bakterii *P. versatile* IFB5636. Wyboru tego OPS-u dokonałam ze względu na obecność w jego strukturze bardzo rzadkiego w świecie bakterii monosacharydu, jakim jest erwinioza.

4.1. Wyizolowanie O-antygenu

Otrzymane z Zakładu Ochrony i Biotechnologii Roślin komórki bakteryjne szczepu *P. versatile* IFB5636 poddałam liofilizacji uzyskując 12,4 g suchej masy bakteryjnej. Do izolacji LPS-u wykorzystałam ekstrakcję mieszaniną gorącego fenolu i wody. Próbkę oczyściłam za pomocą trawienia enzymatycznego i dializy, otrzymując 574 mg LPS-u.

W celu odszczepienia lipidu A zastosowałam hydrolizę 1% kwasem octowym. Lipid A odwirowałam, a pozostały supernatant zawierający cukrowe fragmenty LPS-ów zamroziłam i zliofilizowałam, uzyskując 475 mg próbki. Na kolumnę SEC naniosłam porcję 52 mg rozpuszczoną w 1 mL wody dejonizowanej. Na podstawie uzyskanego chromatogramu (Rysunek 8), wyselekcjonowałam 3 frakcje.



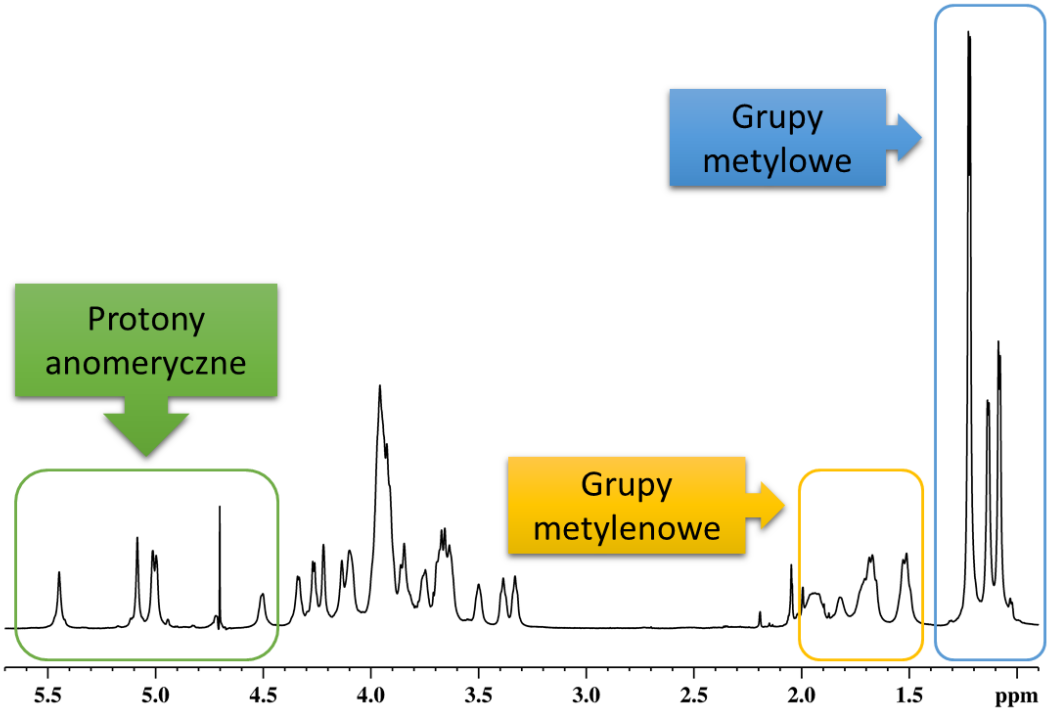
Rysunek 8 Chromatogram otrzymany w wyniku analizy za pomocą SEC próbki zawierającej cukrowe fragmenty LPS-u, uzyskanej po odszczepieniu lipidu A z LPS-u bakterii *P. versatile* IFB5636

Masy poszczególnych frakcji zostały zebrane w tabeli (Tabela 2).

Tabela 2 Tabela przedstawiająca masy poszczególnych frakcji zebranych w wyniku analizy próbki zawierającej cukrowe fragmenty LPS-ów, uzyskanej po odszczepieniu lipidu A z LPS-u bakterii *P. versatile* IFB5636

Numer frakcji	**Czas [min]**	**Masa [mg]**
I	190-270	10,7
II	270-530	Śladowe ilości
III	530-630	6

Dla każdej frakcji zarejestrowano widma protonowe (^{1}H NMR), jednak tylko dla pierwszej z nich widmo miało charakterystyczny profil cukrowy (Rysunek 9).



Rysunek 9 Widmo ^{1}H NMR OPS-u wyizolowanego z *P. versatile* IFB5636, na którym oznaczono obszary charakterystycznych przesunięć chemicznych.

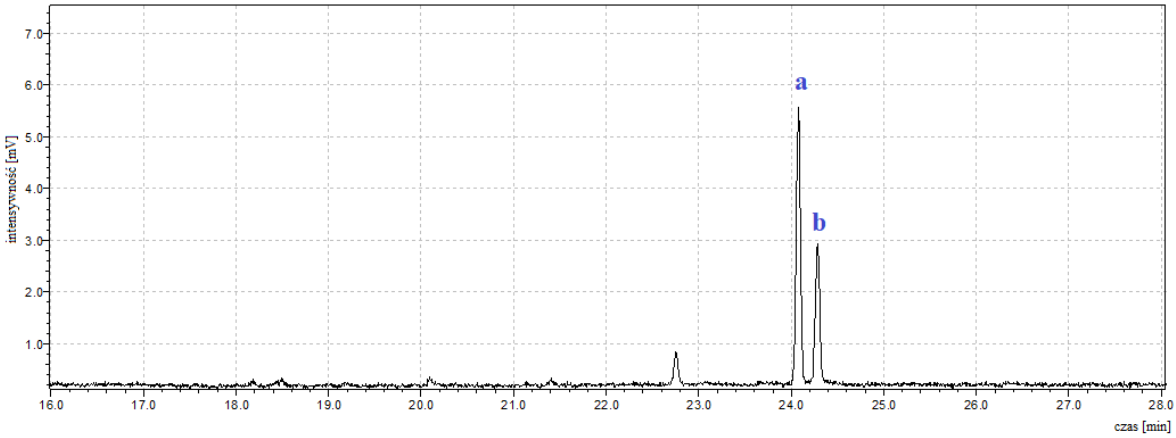
Podczas wstępnej analizy zarejestrowanego widma protonowego skupiłam się na ogólnej identyfikacji sygnałów występujących w obszarach charakterystycznych przesunięć chemicznych. Na widmie ^{1}H NMR zakres 5,6-4,4 ppm przedstawia obszar protonów anomerycznych. Ponadto wyróżniłam dwa obszary, które nie są typowe dla heksoz. W zakresie ~2,0-1,5 ppm wstępnie zidentyfikowałam protony pochodzące od grup metylenowych, natomiast przy przesunięciach ~1,3-1,0 ppm protony z grup metylowych, typowych dla deoksymonosacharydów.

Biorąc pod uwagę wynik rozdzielenia za pomocą SEC (Rysunek 8) oraz wstępną interpretację widma protonowego NMR (Rysunek 9) stwierdziłam, że frakcja pierwsza zawierała czysty OPS (10,7 mg, ~21% LPS-u), który wykorzystałam do dalszych badań strukturalnych.

4.2. Analizy chemiczne

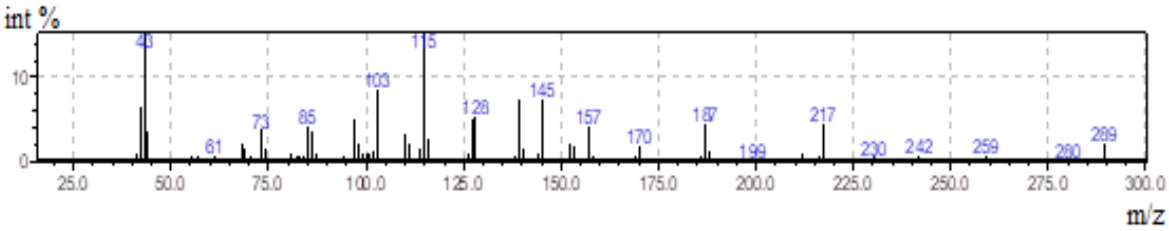
4.2.1. Analiza cukrowa

Analizę cukrową przeprowadziłam w celu identyfikacji oraz ustalenia liczby reszt cukrowych wchodzących w skład jednostki powtarzalnej OPS-u. W wyniku reakcji opisanych w podrozdziale 3.7.2.1. otrzymałam lotne pochodne (octany alditoli), które analizowałam za pomocą GC-MS (warunki analizy opisane zostały w podrozdziale 3.7.2.1.). Wyniki analizy cukrowej przedstawione zostały na chromatogramie (Rysunek 10).



Rysunek 10 Chromatogram przedstawiający wynik analizy cukrowej OPS-u bakterii *P. versatile* IFB5636 (warunki analizy GC-MS opisane w podrozdziale 3.7.2.1.). Sygnały: a - 1,2,3,4,5,6-heksa-*O*-acetylo-heksitol, b - 1,2,3,4,5,6-heksa-*O*-acetylo-heksitol.

Chromatogram przedstawia dwa intensywne sygnały o czasach retencji 24,09 min (**a**) i 24,29 min (**b**) w stosunku ilościowym 2: 1, co sugeruje obecność dwóch różnych reszt cukrowych. Zarejestrowane widma mas (Rysunek 11) dla obu sygnałów okazały się identyczne. Na ich podstawie zidentyfikowałam obecność dwóch różnych 1,2,3,4,5,6-heksa-*O*-acetylo-heksitoli.

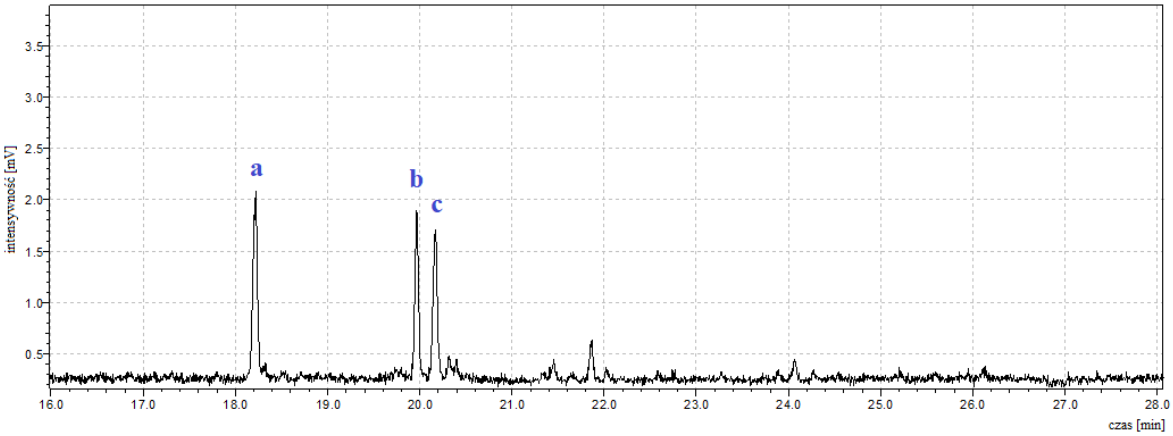


Rysunek 11 Widmo mas 1,2,3,4,5,6-heksa-*O*-acetylo-heksitolu.

Analizując otrzymane widma mas oraz parametry retencji poszczególnych sygnałów i porównując je z czasami retencji odpowiednich wzorców, ustaliłam, że sygnał **a** pochodzi od odpowiedniej pochodnej mannozy, natomiast sygnał **b** od pochodnej glukozy.

4.2.2. Analiza metylacyjna

Celem analizy metylacyjnej było określenie miejsc glikozylowania poszczególnych monosacharydów w łańcuchu polisacharydowym. Zastosowanie klasycznej metody opracowanej przez Ciucanu i Kerek'a, opisanej w podrozdziale 0. umożliwiło otrzymanie częściowo zmetylowanych octanów alditoli, które analizowałam za pomocą GC-MS (warunki analizy opisane zostały w podrozdziale 3.7.2.1.). Wyniki analizy metylacyjnej zaprezentowałam na chromatogramie (Rysunek 12).

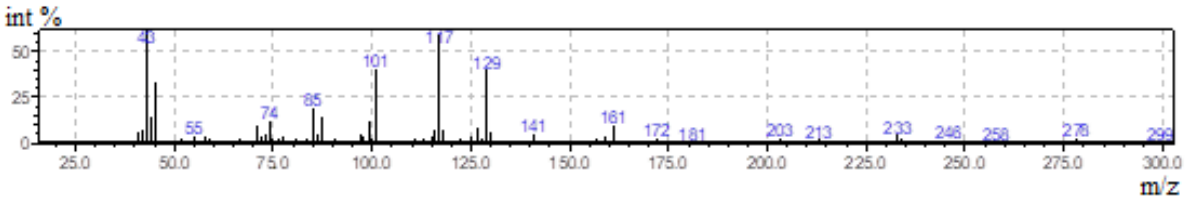


Rysunek 12 Chromatogram przedstawiający wynik analizy metylacyjnej OPS-u bakterii *P. versatile* IFB5636 (warunki analizy GC-MS opisane w podrozdziale 3.7.2.1). Sygnały: a - 1,3,5-tri-*O*-acetylo-2,4,6-tri-*O*-metyloheksitol, b - 1,3,4,5-tetra-*O*-acetylo-2,6-di-*O*-metyloheksitol, c - 1,2,3,5-tetra-*O*-acetylo-4,6-di-*O*-metyloheksitol.

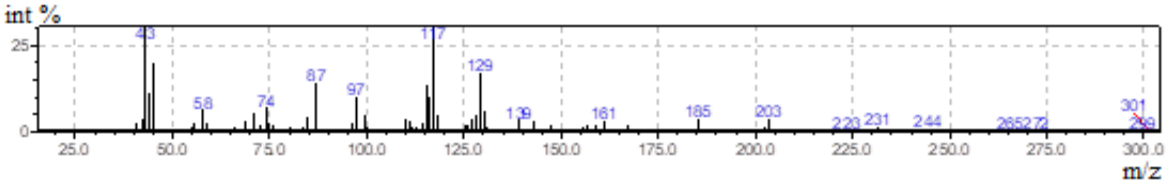
Chromatogram przedstawia 3 różne sygnały (**a**, **b**, **c**) różniące się czasami retencji. Stosunek intensywności tych sygnałów wynosi ~1:1:1, co potwierdzałoby obecność dwóch różnych reszt cukrowych (Man i Glc o stosunku ilościowym ~2:1) zidentyfikowanych na podstawie analizy cukrowej.

Wykorzystując widma mas zidentyfikowałam 3 częściowo zmetylowane acetylowe pochodne octanów alditoli, na podstawie których określiłam miejsca podstawienia poszczególnych monosacharydów.

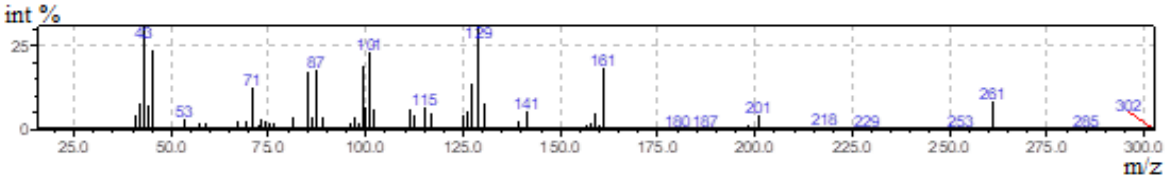
- **a** - 1,3,5-tri-*O*-acetylo-2,4,6-tri-*O*-metyloheksitol (Rysunek 13)
- **b** - 1,3,4,5-tetra-*O*-acetylo-2,6-di-*O*-metyloheksitol (Rysunek 14)
- **c** - 1,2,3,5-tetra-*O*-acetylo-4,6-di-*O*-metyloheksitol (Rysunek 15)



Rysunek 13 Widmo mas 1,3,5-tri-*O*-acetylo-2,4,6-tri-*O*-metyloheksitolu.



Rysunek 14 Widmo mas 1,3,4,5-tetra-*O*-acetylo-2,6-di-*O*-metyloheksitolu.



Rysunek 15 Widmo mas 1,2,3,5-tetra-*O*-acetylo-4,6-di-*O*-metyloheksitolu.

Sygnał **a** odpowiada heksozie podstawionej w pozycji 3, sygnał **b** odpowiada heksozie podstawionej w pozycjach 3 i 4 oraz sygnał **c** odpowiada heksozie podstawionej w pozycjach 2 i 3. Obecność dwupodstawionych reszt cukrowych wskazuje na rozgałęzienie łańcucha polisacharydowego. Niestety w wyniku analizy metylacyjnej nie został zidentyfikowany żaden końcowy monosacharyd.

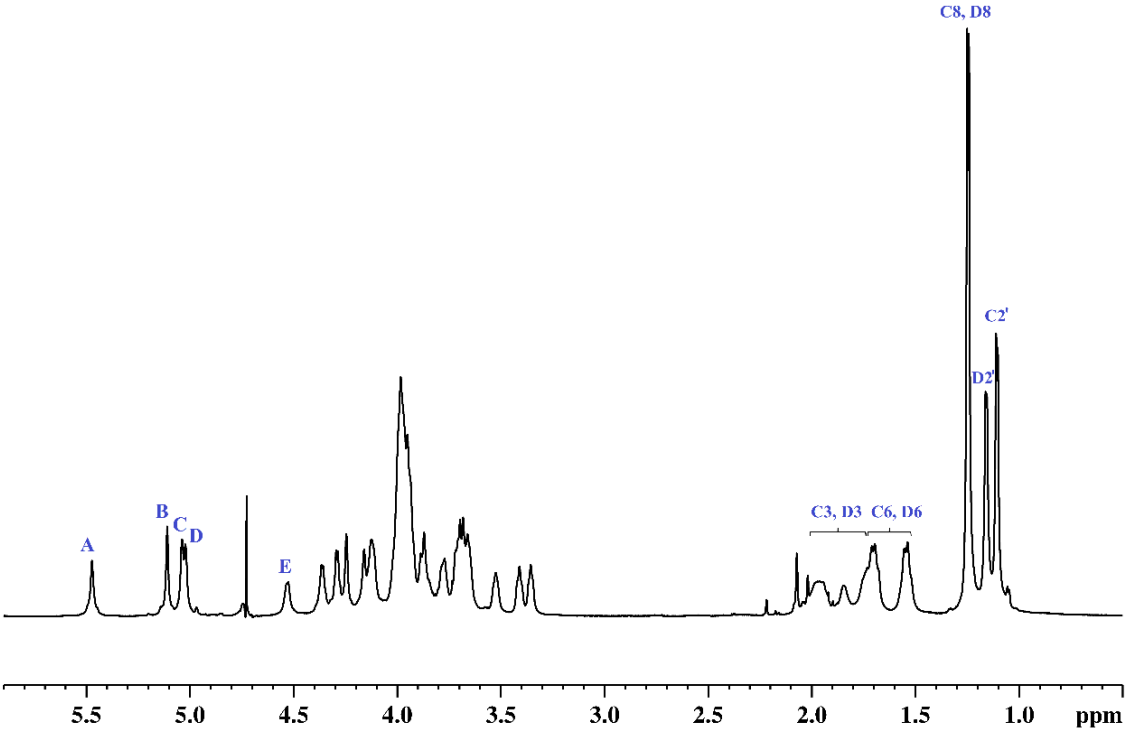
4.2.3. Reakcja z optycznie czynnym butan-2-olem

W reakcji z optycznie czynnym butan-2-olem otrzymałam pochodne, które analizowałam za pomocą GC, a następnie wraz z użyciem odpowiednich wzorców przyporządkowałam do szeregu konfiguracyjnego D lub L (procedura opisana w podrozdziale 3.7.2.3.).

Zarówno glukoza, jak i mannoza zostały przyporządkowane do szeregu konfiguracyjnego D.

4.3. Interpretacja widm NMR

Interpretację kompletu widm jedno- i dwuwymiarowych zarejestrowanych dla OPS-u bakterii *P. versatile* IFB5636 rozpoczęłam od widma protonowego ^{1}H NMR (Rysunek 16).



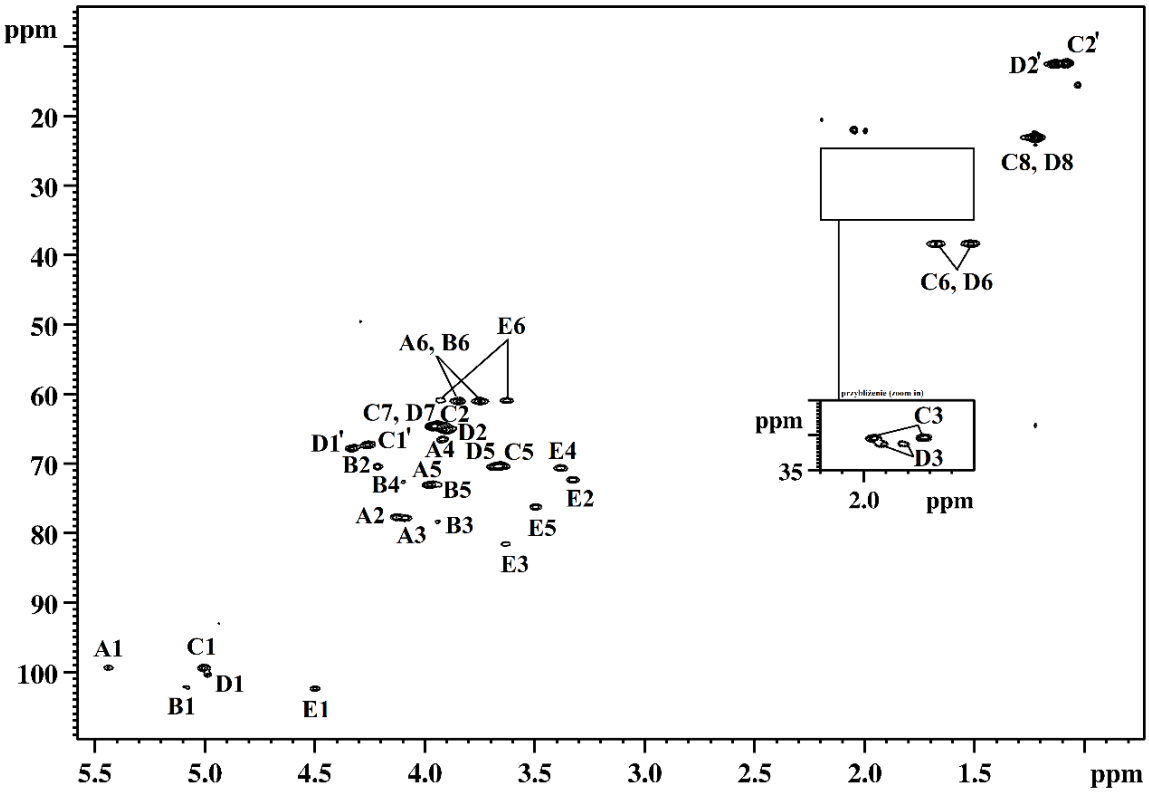
Rysunek 16 Widmo ^{1}H NMR (700 MHz) OPS-u wyizolowanego z bakterii *P. versatile* IFB5636. Litery odnoszą się do reszt monosacharydów zdefiniowanych w Tabeli 3.

Na widmie ^{1}H NMR (Rysunek 16), w charakterystycznym obszarze protonów anomerycznych, wyróżniłam 5 sygnałów przy przesunięciach chemicznych δ 5,471 (**A**), δ 5,113 (**B**), δ 5,037 (**C**), δ 5,017 (**D**) i δ 4,527 (**E**). Oznaczyłam je kolejno literami **A**-**E**, zgodnie z kierunkiem malejących wartości ppm. Posiłkując się krzywymi całkowania ustaliłam, że sygnały te występują w przybliżonym stosunku molowym 1:1:1:1:1, odpowiadając pięciu protonom anomerycznym, czyli pięciu resztom cukrowym. Odkrycie to nie było zgodne z wynikami analiz chemicznych, które wykazały obecność tylko 3 reszt cukrowych: 2 x Man i 1 x Glc. Obecność 2 dodatkowych sygnałów w zakresie anomerycznym na widmie protonowym oraz sygnałów w zakresie 2-1 ppm (4 sygnały pochodzące od grup metylenowych i 4 sygnały od grup metylowych) świadczyło o tym, że OPS zawiera 2 reszty cukrowe, które nie zostały wykryte za pomocą analiz

chromatograficznych. Prawdopodobnie były to monosacharydy, które uległy degradacji w warunkach prowadzonych reakcji chemicznych.

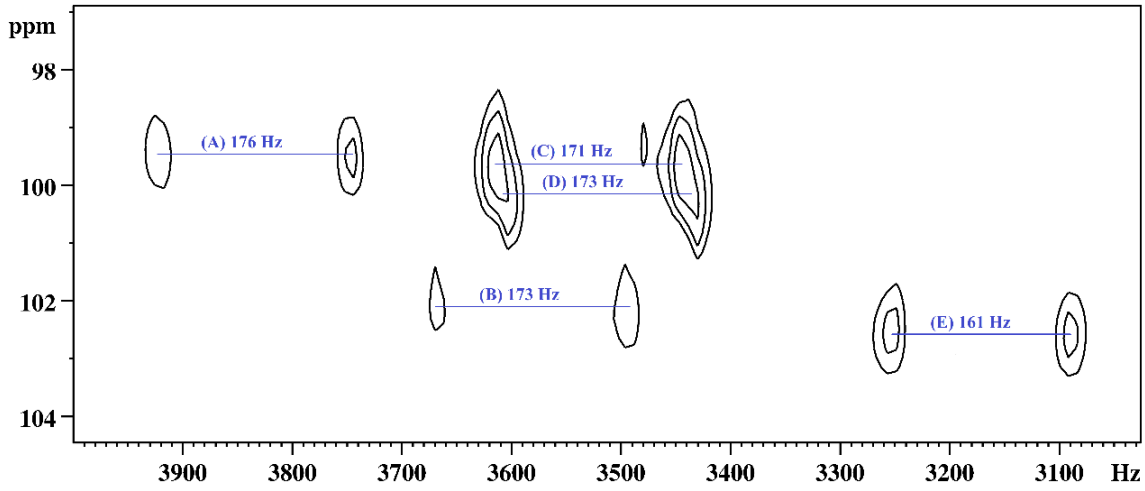
Do określenia struktury chemicznej OPS-u konieczna była interpretacja widm dwuwymiarowych NMR.

Obecność pięciu anomerycznych protonów i atomów węgla potwierdziłam na podstawie widma HSQC (Rysunek 17), na którym zidentyfikowałam pięć pików krzyżowych: δ 5,471/99,72 (**A**), δ 5,113/102,49 (**B**), δ 5,037/99,75 (**C**), δ 5,017/100,69 (**D**) i δ 4,527/102,75 (**E**).



Rysunek 17 Widmo $^{1}H^{13}C$ HSQC NMR (700 MHz) OPS-u wyizolowanego z bakterii *P. versatile* IFB5636. Litery odnoszą się do reszt monosacharydów zdefiniowanych w Tabeli 3, natomiast cyfry do numerów atomów w poszczególnych monosacharydach.

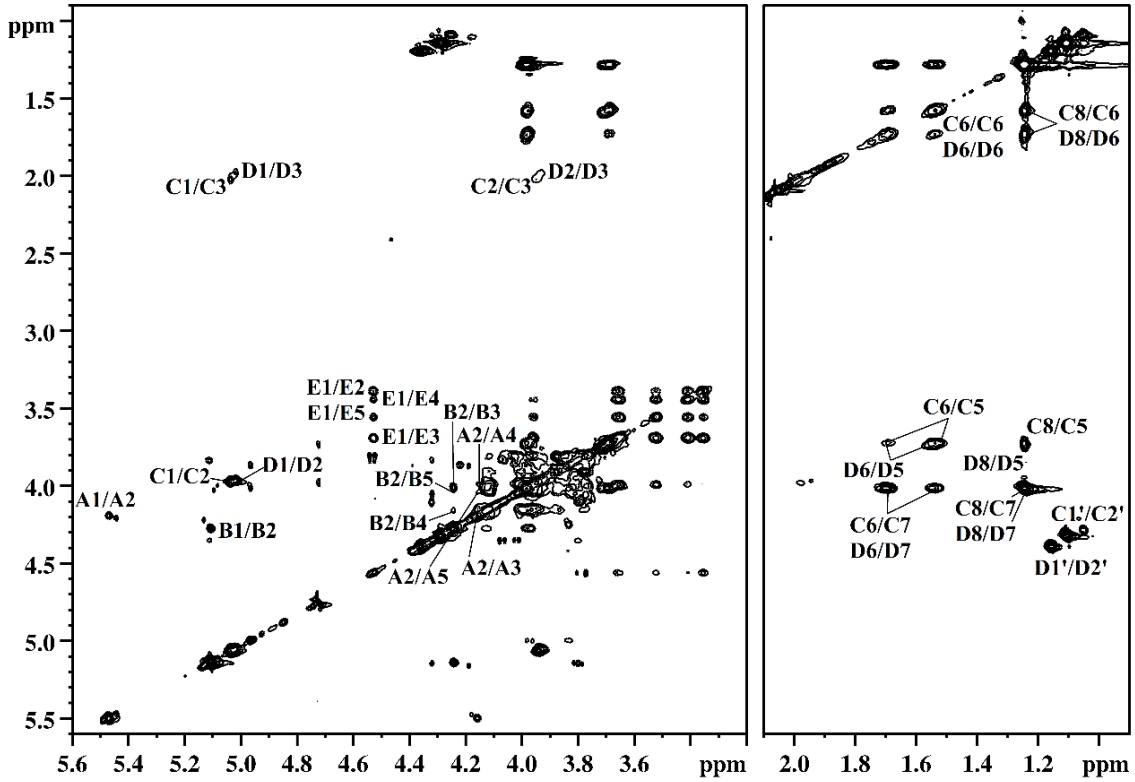
Do określenia konfiguracji anomerycznych wszystkich monosacharydów wykorzystałam eksperyment HSQC NMR zarejestrowany bez rozprzęgania (Rysunek 18). Stałe sprzężenia $^{1}J_{H\text{-}1,C\text{-}1}$ powyżej 170 Hz (reszty **A**, **B**, **C** i **D**) świadczyły o konfiguracji anomerycznej α, natomiast wartość 161 Hz dla reszty **E** wskazały na β konfigurację.



Rysunek 18 Fragment anomeryczny widma $^{1}H^{13}C$ HSQC NMR (700 MHz) zarejestrowanego bez rozprzęgania dla OPS-u bakterii *P. versatile* IFB5636.

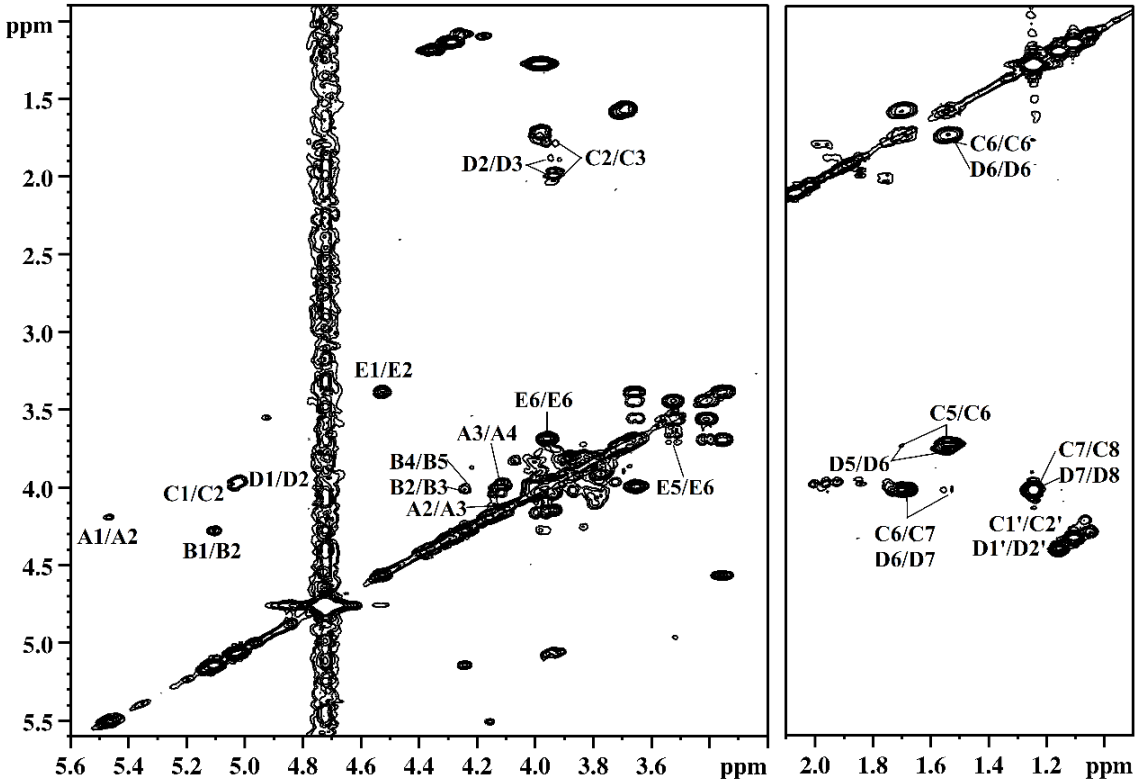
Kolejnym eksperymentem potwierdzającym obecność pięciu reszt cukrowych było widmo TOCSY (Rysunek 19), które przedstawia pięć systemów spinowych w regionie anomerycznym. Na podstawie wyników analiz chemicznych i informacji odczytanych z widm NMR zidentyfikowałam trzy reszty cukrowe: **A**, **B** i **E**. Charakterystyczny układ sprzężeń między protonami oraz niska wartość $^{3}J_{H\text{-}1,H\text{-}2} < 2$ Hz, wskazuje na konfigurację *manno* dla reszt A i B. Natomiast reszta cukrowa E wykazuje konfigurację *gluko*, z uwagi na tzw. duże wartości stałych sprzężenia, co przekłada się na możliwość zaobserwowania sygnałów praktycznie wszystkich protonów w układzie spinowym na widmie TOCSY. W związku z powyższym dwie pozostałe reszty (**C** i **D**) musiały w warunkach analizy cukrowej i metylacyjnej ulec degradacji. Układy spinowe reszt **C** i **D** były dość podobne. Na widmie TOCSY zaobserwowałam po dwa sygnały odpowiadające protonom anomerycznym **C** i **D**, w tym sygnały pochodzące od sprzężeń z protonami z grup metylenowych (C2/C3 oraz D2/D3). Przy pomocy widma HSQC przypisałam tym protonom odpowiadające im atomy węgla: δ 5,037/99,75 (C1), δ 3,960/65,39 (C2), δ 1,987 i 1,746/30,88 (C3) oraz δ 5,017/100,69 (D1), δ 3,932/65,59 (D2), δ 1,950 i 1,854/31,63 (D3). Ponadto przy użyciu widm dwuwymiarowych TOCSY i HSQC zidentyfikowałam cztery układy spinowe rozpoczynające się od grup metylowych. Dwa układy, zawierające tylko po jednym piku krzyżowym, wyraźnie różniące się przesunięciami chemicznymi (δ 1,108/12,69 (C2') i δ 4,294/67,61 (C1') oraz δ 1,159/12,83 (D2') i δ 4,364/68,17 (D1')) i dwa układy spinowe składające się z protonów o praktycznie takich samych przesunięciach

chemicznych, w tym grup CH_2 oraz różniących się tylko nieznacznie przesunięciami chemicznymi „ostatnich protonów” (δ 1,246/23,41 (C8), δ 3,985/64,85 (C7) δ 1,700 i 1,540 /38,56 (C6), δ 3,695/70,74 (C5) oraz δ 1,246/23,41 (D8), δ 3,985/64,85 (D7), δ 1,700 i 1,540/38,56 (D6), δ 3,716/70,74 (D5)).



Rysunek 19 Widmo $^1H^1H$ TOCSY (700 MHz) zarejestrowane dla OPS-u wyizolowanego z bakterii *P. versatile* IFB5636. Litery odnoszą się do reszt monosacharydów zdefiniowanych w Tabeli 3, natomiast cyfry do numerów protonów w poszczególnych monosacharydach.

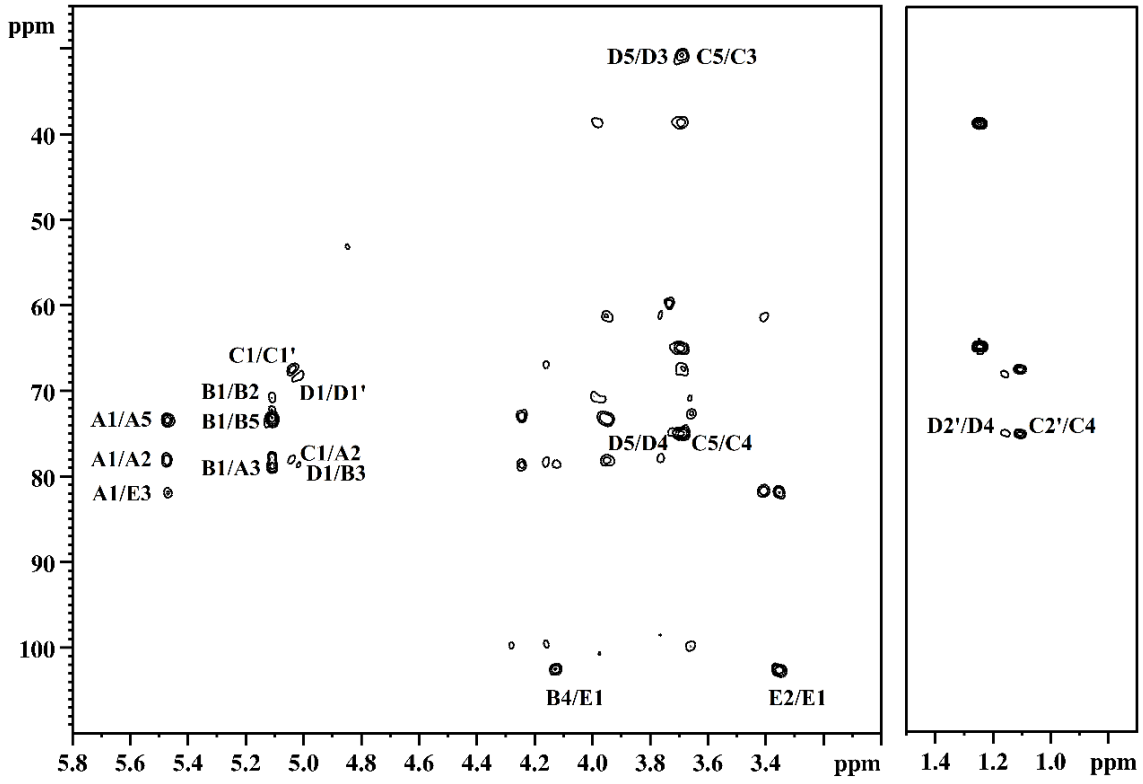
Równolegle analizowałam widmo homokorelacyjne COSY (Rysunek 20), które pokazuje sprzężenia H-H przez 2-3 wiązania w danej reszcie cukrowej. Dla reszt **A**, **B** i **E** większość sygnałów została zidentyfikowana. Problematyczny okazał się obszar 3,7-4,0 ppm, gdzie znajdowała się duża liczba nakładających się na siebie sygnałów. Dla jednostek **C** i **D** zaobserwowałam wyraźne po trzy układy spinowe. Pierwszy, rozpoczynając od H-1 dla obu reszt i kończąc na H-3, drugi zaczynając od protonu H-8, przez H-7, H-6 i H-5, gdzie sygnały w dużej mierze się pokrywają i trzeci zawierający sprzężenie tylko H-1’/H-2’.



Rysunek 20 Widmo $^{1}H^{1}H$ COSY (700 MHz) zarejestrowane dla OPS-u wyizolowanego z bakterii *P. versatile* IFB5636. Litery odnoszą się do reszt monosacharydów zdefiniowanych w Tabeli 3 natomiast cyfry do numerów protonów w poszczególnych monosacharydach.

Interpretacja widma HMBC (Rysunek 21) umożliwiła złożenie struktur reszt **C** i **D** z opisanych wcześniej 6 układów spinowych. Na widmie HMBC można zaobserwować sprzężenie (C1/C1'), jest to sprzężenie przez trzy wiązania protonu H-1 reszty **C** (δ 5,037) z atomem węgla jednego z „krótkich" układów spinowych przy δ 67,61 (C-1'). W ramach wyjaśnienia, w celu skrócenia oznaczania sygnałów na widmie HMBC przyjęłam zasadę, iż w poszczególnych pikach krzyżowych na pierwszym miejscu zawsze umieszony jest proton, zaś na drugim atom węgla. Protony grupy metylowej pochodzące z tego samego układu spinowego przy δ 1,108 (H-2') sprzęgają się przez trzy wiązania z czwartorzędowym atomem węgla przy δ 75,17 (C-4), sygnał oznaczony na widmie jako C2'/C4. Dodatkowo proton o przesunięciu δ 3,695 (H-5) z jednego z wyżej wymienionych „długich" układów spinowych sprzęga się przez dwa wiązania z czwartorzędowym atomem węgla C-4 (δ 75,17), a także przez trzy wiązania z atomem węgla C-3 (δ 30,88). Podobnie analiza pozostałych trzech układów spinowych umożliwiła złożenie reszty cukrowej **D**. Na widmie

HMBC widoczne są następujące sprzężenia: H-1 reszty **D** (δ 5,017) z atomem węgla z drugiego „krótkiego” układu spinowego przy δ 68,17 (C-1'), protonów grupy metylowej przy δ 1,159 (H-2') z czwartorzędowym atomem węgla przy δ 75,04 (C-4), protonu przy δ 3,716 (H-5) z drugiego „długiego” układu spinowego do czwartorzędowego atomu węgla C-4 (δ 75,04) oraz do atomu węgla C-3 (δ 31,63) reszty **D**. Jednostki **C** i **D** zostały zidentyfikowane jako reszty erwiniozy (3,6,8-trideoksy-4-C-(*R*-1-hydroksyetylo)-gulo-oktozy) na podstawie porównania danych NMR z danymi literaturowymi [73,74].



Rysunek 21 Widmo $^{1}H^{13}C$ HMBC NMR (700 MHz) OPS-u wyizolowanego z bakterii *P. versatile* IFB5636. Na widmie zaznaczono korelacje proton/atom węgla. Litery odnoszą się do reszt monosacharydów zdefiniowanych w Tabeli 3, natomiast cyfry do numerów atomów w poszczególnych monosacharydach.

Szczególnie przydatna okazała się publikacja Senchenkova i in., w której po raz pierwszy i jak dotychczas jedyny szczegółowo opisano strukturę erwiniozy [74]. Dane literaturowe i otrzymane przeze mnie, porównane pod względem wewnątrzcząsteczkowych sprzężeń ROESY i stałych sprzężenia H-H, okazały się bardzo podobne. Pewne różnice w przesunięciach chemicznych niektórych atomów węgla i odpowiadających im protonów z obu pierścieni cukrowych wynikały z różnej konfiguracji anomerycznej porównywanych

reszt erwiniozy (konfiguracja anomeryczna α badanych monosacharydów OPS-u *P. versatile* IFB5636 i konfiguracja anomeryczna β monosacharydu omawianego w publikacji Senchenkova i in.). W tym zakresie bardzo pomocne było porównanie z kariofilozą (α-izomerem piranozy) [73]. Kariofiloza jest monosacharydem bardzo podobnym do erwiniozy. Pierścienie cukrowe obu monosacharydów są takie same, a różnią się jedynie liczbą atomów węgla w cząsteczce (dziesięć w przypadku erwiniozy i dwanaście w przypadku kariofilozy). Przesunięcia chemiczne odpowiednich atomów węgla i protonów z porównywanych pierścieni cukrowych były praktycznie takie same [73]. Przesunięcia chemiczne wszystkich protonów i atomów węgla odczytanych na podstawie widm COSY, TOCSY, HSQC i HMBC NMR przedstawiłam w tabeli (Tabela 3).

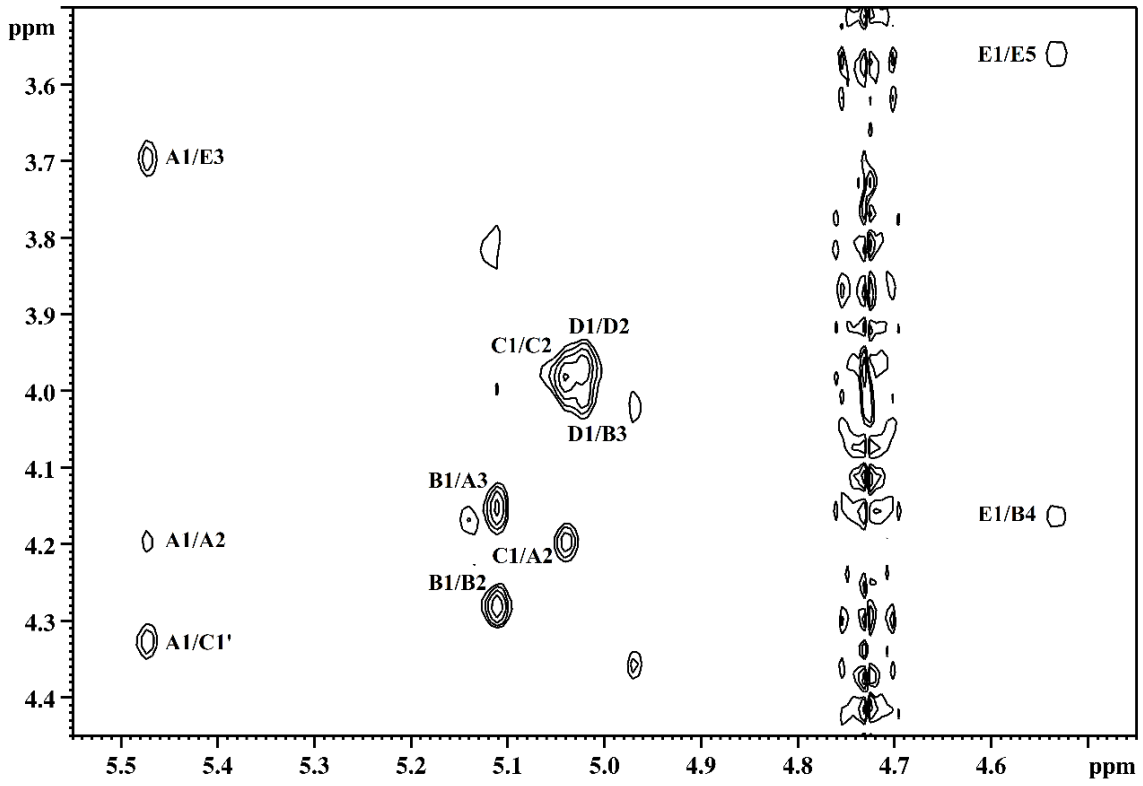
Przyporządkowanie reszt erwiniozy do szeregu konfiguracyjnego D lub L wydedukowałam przez porównanie obserwowanych efektów glikozylowania (δ) na ich anomeryczne atomy węgla z wartościami oczekiwanymi [73,75]. Zaobserwowany efekt δ +8,1 dla C-1 reszty **C** (oczekiwany δ +9,2 dla DD i δ +5,4 dla DL) wyraźnie wskazuje, że oba monosacharydy w disacharydzie α-Erw*p*-(1→2)-α-D-Man*p* tworzą parę DD. Podobnie obserwowany efekt δ +9,1 dla C-1 reszty **D** (oczekiwany δ +8,3 dla DD i δ +3,4 dla DL) wyraźnie wskazuje, że oba monosacharydy w disacharydzie α-Erw*p*-(1→3)-α-D-Man*p* tworzą parę DD. Zebrane dane ujawniły obecność D-erwinoz, czyli 3,6,8-trideoksy-4-C-(*R*-1-hydroksyetylo)-D-gulo-oktoz w badanym OPS-ie.

Tabela 3 Tabela przedstawiająca przesunięcia chemiczne ^{1}H i ^{13}C NMR OPS-u wyizolowanego z bakterii *P. versatile* IFB5636. Podstawione atomy węgla zostały podkreślone.

Reszta cukrowa	**Stała sprzężenia [Hz]**	**Przesunięcia chemiczne ^{1}H i ^{13}C (ppm)**									
	$^{1}J_{(H-1-C-1)}$	**H1** **C1**	**H2** **C2**	**H3** **C3**	**H4** **C4**	**H5** **C5**	**H6** **C6**	**H7** **C7**	**H8** **C8**	**H1'** **C1'**	**H2'** **C2'**
A **→2,3)-α-D-Man*p*-(1→**	176	5.471 99.72	4.159 78.13	4.116 78.19	3.948 66.83	4.005 73.35	3.874/3.766 61.38				
B **→3,4)-α-D-Man*p*-(1→**	173	5.113 102.49	4.248 70.75	3.977 78.74	4.128 72.96	3.971 73.35	3.874/3.766 61.38				
C **α-D-Erw*p*-(1→**	171	5.037 99.75	3.960 65.39	1.987/1.746 30.88	- 75.17	3.695 70.74	1.700/1.540 38.56	3.985 64.85	1.246 23.41	4.294 67.61	1.108 12.69
D **α-D-Erw*p*-(1→**	173	5.017 100.69	3.932 65.59	1.950/1.854 31.63	- 75.04	3.716 70.74	1.700/1.540 38.56	3.985 64.85	1.246 23.41	4.364 68.17	1.159 12.83
E **→3)-β-D-Glc*p*-(1→**	161	4.527 102.75	3.355 72.68	3.662 81.89	3.415 71.04	3.527 76.60	3.961/3.654 61.25				

Do ustalenia miejsc glikozylowania posłużyły dane literaturowe zawierające zestaw przesunięć chemicznych niepodstawionych reszt cukrowych [75]. Sygnały o wyraźnie wyższych wartościach przesunięć chemicznych atomów węgla zidentyfikowanych monosacharydów w porównaniu z niepodstawionymi odpowiednimi resztami wskazywały na miejsca glikozylowania. Sygnały A2 (δ 78,13), A3 (δ 78,19), B3 (δ 78,74), B4 (δ 72,96) i E3 (δ 81,89) mają wyższe wartości przesunięć chemicznych niż spodziewane dla reszt niepodstawionych, co wskazuje na miejsca glikozylowania: C-2 i C-3 reszty **A** oraz C-3 i C-4 reszty **B**, jak również C-3 reszty **E**. Brak znacznych zmian w przesunięciach chemicznych atomów węgla reszt **C** i **D** świadczy o braku miejsc glikozylowania w tych jednostkach, zatem okazały się one końcowymi monosacharydami w strukturze OPS-u.

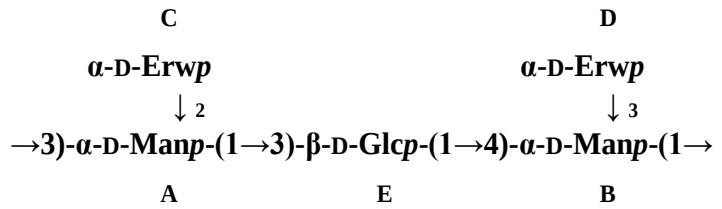
Eksperymenty HMBC (Rysunek 21) i ROESY (Rysunek 22) były niezbędne do określenia kolejności występowania reszt monosacharydowych w powtarzającej się podjednostce OPS-u.



Rysunek 22 Fragment widma $^{1}H^{1}H$ ROESY OPS-u wyizolowanego z bakterii *P. versatile* IFB5636. Litery odnoszą się do reszt monosacharydów zdefiniowanych w Tabeli 3, natomiast cyfry do numerów protonów w poszczególnych monosacharydach.

Na widmie ROESY zostały zidentyfikowane sprzężenia protonów między sąsiadującymi resztami: A1/E3 (δ 5,471/3,662), B1/A3 (δ 5,113/4,116), C1/A2 (δ 5,037/4,159), D1/B3 (δ 5,017/3,977) i E1/B4 (8 4,527/4,128). Ponadto na widmie HMBC zidentyfikowano następujące korelacje proton/atom węgla w obrębie wiązań glikozydowych: A1/E3 (δ 5,471/81,89), B1/A3 (δ 5,113/78,19), C1/A2 (δ 5,037/78,13), D1/B3 (δ 5,017/78,74) i B4/E1 (δ 4,128/102,75).

W wyniku przeprowadzonych analiz chemicznych i spektroskopowych ustaliłam strukturę chemiczną reszty powtarzalnej OPS-u wyizolowanego z bakterii *P. versatile* IFB5636:



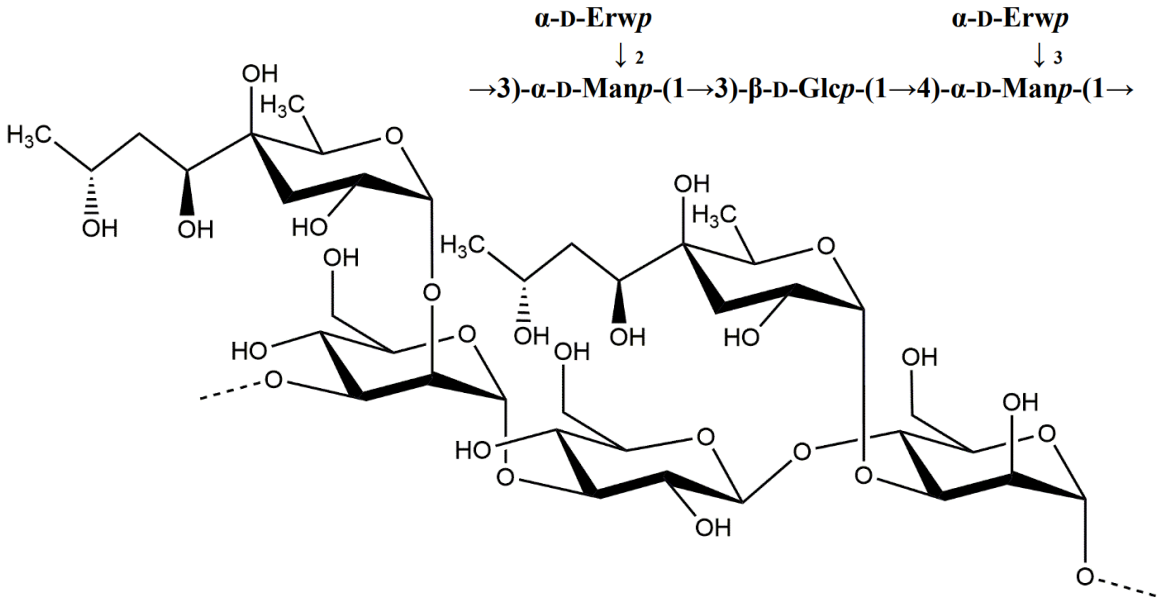
W bardzo podobny sposób analizowałam inne badane przeze mnie szczepy bakteryjne, tj.: *P. aquaticum* IFB5637, *D. aquatica* IFB0154 i IFB0694 oraz *D. lacustris* IFB8647. Ustalone struktury chemiczne OPS-ów przedstawię w kolejnej części pracy.

4.4. Struktury chemiczne badanych OPS-ów

Analiza i interpretacja chromatogramów otrzymanych w wyniku analiz chemicznych oraz kompletu widm 1D i 2D NMR umożliwiła ustalenie struktur chemicznych powtarzalnej jednostki O-antygenu badanych szczepów bakterii z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya*. Struktury przedstawiłam w formie przestrzennych wzorów chemicznych rysowanych w programie ChemDraw Professional 15.0 oraz za pomocą skrótowych nazw cukrów z uwzględnieniem wielkości pierścienia (*p* – pierścień piranozowy, *f* – pierścień furanozowy), typów wiązań i przynależności do szeregu konfiguracyjnego D lub L.

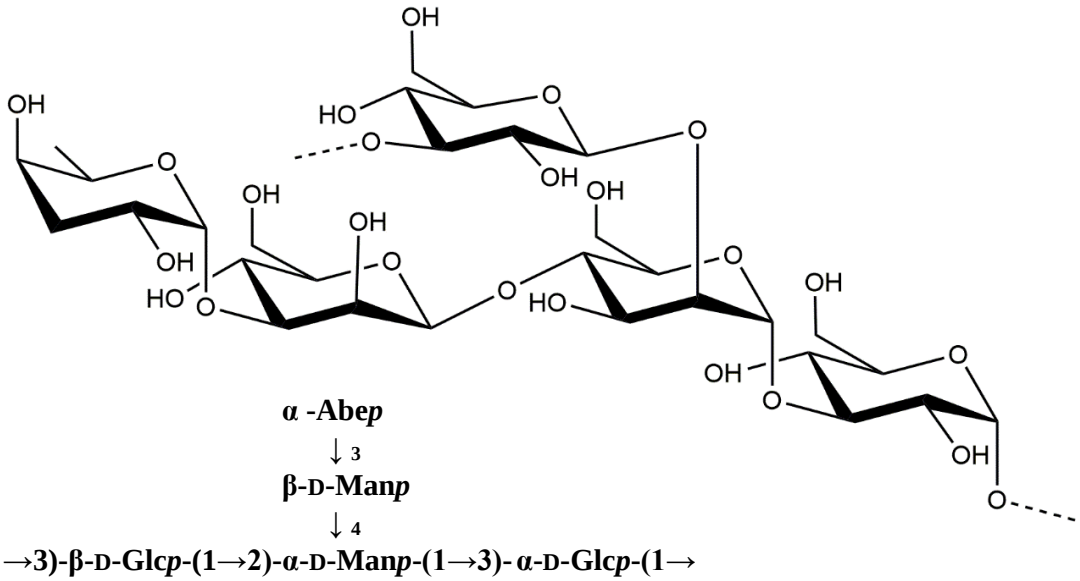
4.4.1. *P. versatile* IFB5636

Struktura *P. versatile* IFB5636 zawiera dwie heksozy (Man, Glc) oraz erwiniozę – monosacharyd niezwykle rzadko występujący w innych strukturach polisacharydowych.



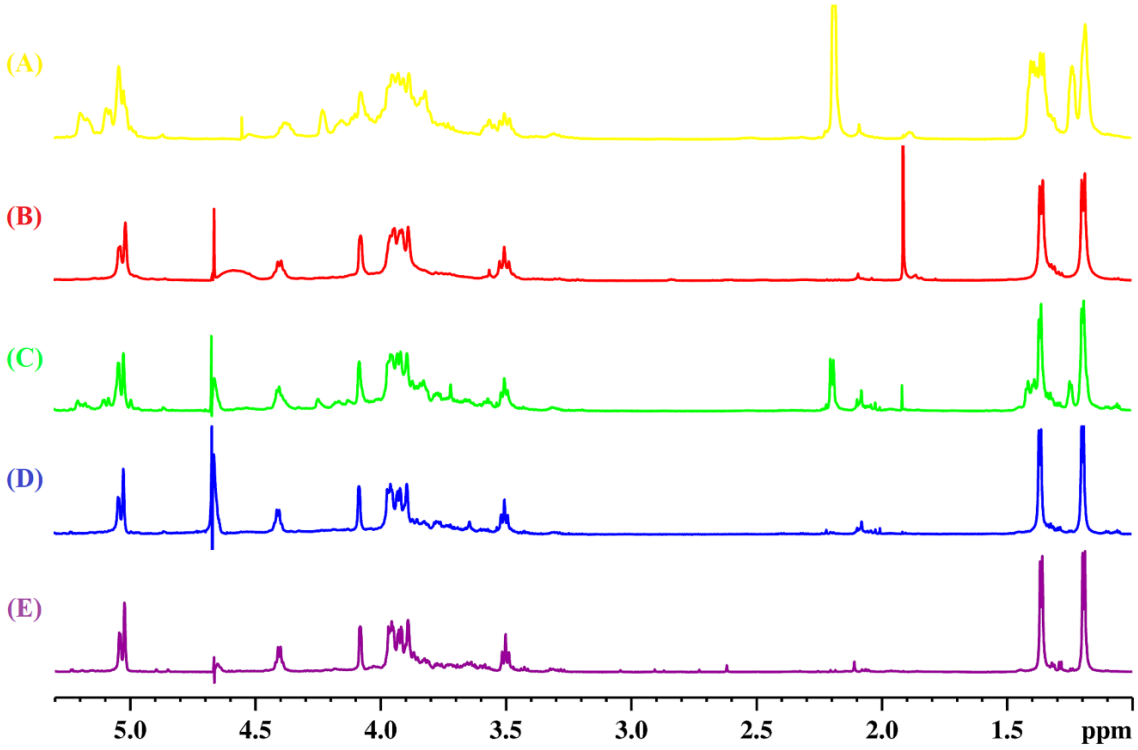
4.4.2. *P. aquaticum* IFB5637

Struktura powtarzającej się jednostki chemicznej OPS-u wyizolowanego z *P. aquaticum* IFB5637, składa się z dwóch różnych heksoz (Man, Glc), a także abekozy, po raz pierwszy zidentyfikowanej w OPS-ach bakterii *Pectobacteriaceae.*



4.4.3. *D. aquatica* (IFB0154, IFB0694) oraz *D. lacustris* IFB8647

OPS-y wyizolowane ze szczepów *D. lacustris* IFB8647 i *D. aquatica* IFB0694 mają struktury chemiczne bardzo podobne do struktury określonej dla szczepu *D. aquatica* IFB0154 [D1]. Niewielkie różnice wynikają z różnego stopnia *O*-acetylowania Rha. Podobieństwo struktur potwierdza zestawienie widm ^{1}H NMR, przedstawione na poniższym rysunku (Rysunek 23).

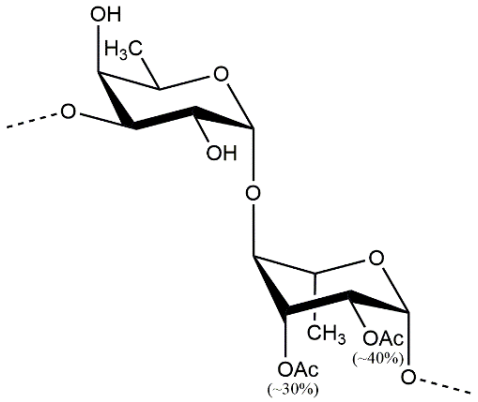


Rysunek 23 Widma ^{1}H NMR przedstawiające: OPS (A) i de-*O*-acetylowany OPS (B) wyizolowany ze szczepu *D. aquatica* IFB0154 (500 MHz), OPS (C) i de-*O*-acetylowany OPS (D) ze szczepu *D. aquatica* IFB0694, OPS (E) ze szczepu *D. lacustris* IFB8647 (700 MHz).

Przybliżony stopień *O*-acetylowania reszt ramnozy OPS-u wyizolowanego ze szczepu *D. aquatica* IFB0154 (**A**) oraz OPS-u wyizolowanego ze szczepu *D. aquatica* IFB0694 (**C**) został określony na podstawie integracji sygnałów w obszarze anomerycznym widma ^{1}H NMR.

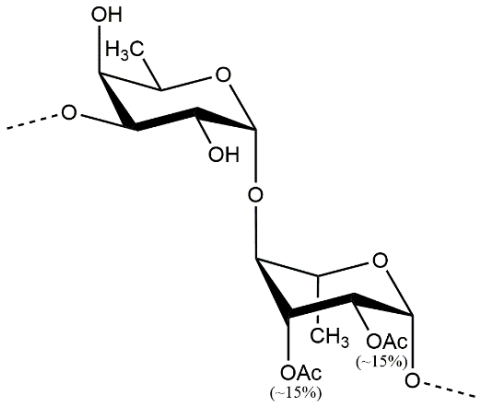
Stosunek powierzchni pików protonów anomerycznych względem protonów H-2 i H-3 Rha (wyższa wartość przesunięć w porównaniu z wartością niepodstawionej reszty Rha z powodu *O*-acetylowania w O-2 i O-3) wynosił ~2,0:0,7. W związku z tym stwierdziłam, że reszty ramnozy były *O*-acetylowane w ~70%. Na podstawie stosunku intensywności

pików H-2:H-3, który wynosił ~4:3, stopień *O*-acetylowania przy O-2 i O-3 Rha oszacowałam odpowiednio na 40% i 30%. Na podstawie danych NMR i wyników analiz składu chemicznego określiłam strukturę powtarzającej się jednostki OPS-u wyizolowanego ze szczepu *D. aquatica* IFB0154 składającej się z reszt Fuc i częściowo *O*-acetylowanej Rha:



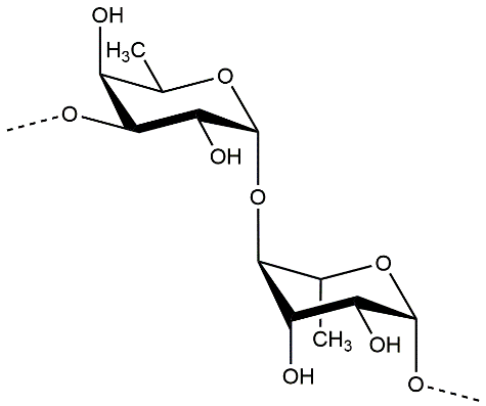
O-Ac (~ 40%)
↓2
→3)-α-D-Fuc*p*-(1→4)-α-L-Rha*p*-(1→
↑3
O-Ac (~ 30%)

W ten sam sposób wyznaczyłam stopień *O*-acetylowania reszty ramnozy wchodzącej w skład OPS-u (**C**) wyizolowanego ze szczepu *D. aquatica* IFB0694. Stosunek powierzchni pików protonów anomerycznych : sygnałów H-2 i H-3 : sygnałów grup -CH_3 Rha i Fuc wynosił ~2,0:0,3:6,0, co świadczyło o stopniu *O*-acetylowania wynoszącym ~30%. Stosunek sygnałów pochodzących od grup metylowych z grup *O*-acetylowych (~2 ppm), wynosił ~1:1, dlatego przyjęłam, że stopień *O*-acetylowania przy O-2 i O-3 Rha jest podobny i wynosi ~15%. Na podstawie porównania widm ^{1}H NMR (Rysunek 23) oraz widm 2D z widmami zarejestrowanymi dla OPS-u bakterii *D. aquatica* IFB0154 ustaliłam strukturę OPS-u bakterii *D. aquatica* IFB0694:



O-Ac (~ 15%)
↓2
→3)-α-D-Fuc*p*-(1→4)-α-L-Rha*p*-(1→
↑3
O-Ac (~ 15%)

Podobną strukturę OPS-u do wymienionych wyżej szczepów bakterii *D. aquatica* (IFB0154, IFB0694) posiada szczep *D. lacustris* IFB8647. Podobieństwo struktury ustaliłam na podstawie interpretacji widm: ^{1}H NMR (Rysunek 23) oraz kompletu widm dwuwymiarowych. Zidentyfikowałam dwie reszty cukrowe (Fuc i Rha) wchodzące w skład jednostki powtarzalnej OPS-u. Brak wyraźnych sygnałów przy przesunięciu ~2 ppm świadczył o braku *O*-acetylowania reszt cukrowych badanego O-polisacharydu. Struktura OPS-u wyizolowanego ze szczepu *D. lacustris* IFB8647:



→3)-α-D-Fuc*p*-(1→4)-α-L-Rha*p*-(1→

5. Dyskusja

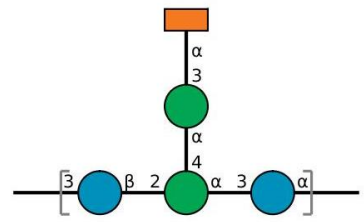
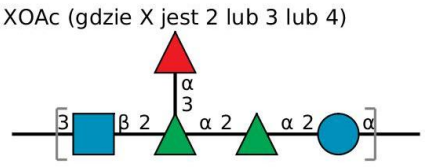
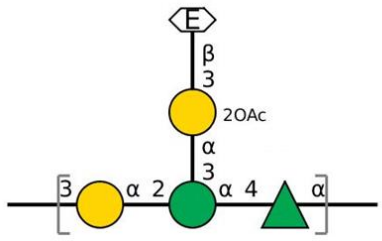
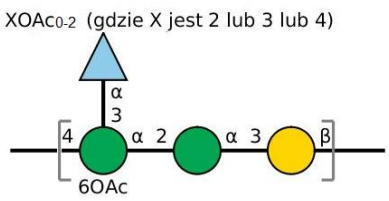
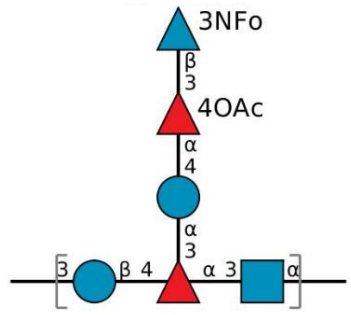
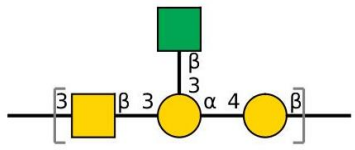
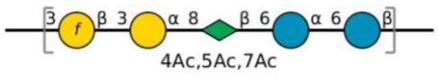
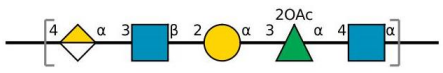
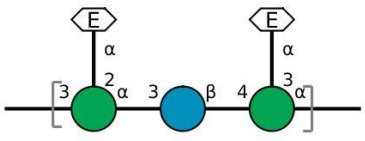
Dotychczas opublikowano 9 różnych struktur chemicznych OPS-ów wyizolowanych z komórek bakterii z rodzaju *Pectobacterium*:

- *P. aquaticum* IFB5637 [D2]
- *P. atrosepticum* SCRI1039 [76]
- *P. atrosepticum* SCRI1043 [77]
- *P. brasiliense* F152 [78]
- *P. brasiliense* IFB5527 [79]
- *P. parmentieri* IFB5408 i IFB5427 [80]
- *P. parmentieri* SCC3193 i IFB5432 [81]
- *P. versatile* F131 [82]
- *P. versatile* IFB5636 [D3]

Porównanie struktur chemicznych O-polisacharydów wykazało duże zróżnicowanie w obrębie tego rodzaju, jak również gatunków. Struktury wyżej wymienionych szczepów bakteryjnych zostały zebrane w tabeli (Tabela 4). W większości OPS-ów zidentyfikowano stosunkowo rzadko i bardzo rzadko występujące monosacharydy:

- **abekozę** (3,6-dideoksy-D-ksylo-heksoza) w *P. aquaticum* IFB5637 [D2],
- **6-deoksy-L-talozę** w *P. brasiliense* F152 [78],
- **chinowozaminę podstawioną grupą formylową** (3-acetamido-3,6-dideoxy-D-gluko-heksoza podstawiona formylem 3*N*Fo) w *P. brasiliense* IFB5527 [79],
- **mannozaminę** (2-(acetyloamino)-2-deoksy-D-mannopiranozę) w *P. parmentieri* IFB5408, IFB5427 [80],
- **kwas pseudoaminowy** (kwas 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeoksy-L-glicero-L-manno-non-2-ulosonowy) w *P. parmentieri* SCC3193, IFB5432 [81],
- **kwas galaktouronowy** w *P. versatile* F131 [82],
- **erwiniozę** (3,6,8-trideoksy-4-C-(R-1-hydroksyetylo)-gulo-oktoza) w *P. versatile* IFB5636 [D3].

Tabela 4 Tabela przedstawiająca zestawienie struktur chemicznych OPS-ów bakterii z rodzaju *Pectobacterium* wraz z nazwami szczepów i symbolami wg SNFG.

Pectobacterium		
Nazwa szczepu	Struktura chemiczna	Struktura chemiczna wg SNFG [83]
***P. aquaticum* IFB5637**	**α -Abe*p*** **↓ 3** **β-D-Man*p*** **↓ 4** **→3)-β-D-Glc*p*-(1→2)-α-D-Man*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*-(1→**	
***P. atrosepticum* SCRI1039**	**α-L-Fuc*p*X*O*Ac (gdzie X jest 2 lub 3 lub 4)** **↓3** **→3)-β-D-Glc*pN*Ac-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→2)- α-L-Rha*p*-(1→2)-α-D-Glc*p*-(1→**	
***P. atrosepticum* SCRI1043**	**β-D-Erw*p*-(1→3)-α-D-Gal*p*2*O*Ac** **↓3** **→3)-α-D-Gal*p*-(1→2)-α-D-Man*p*-(1→4)-α-L-Rha*p*-(1→**	
***P. brasiliense* F152**	**α-L-6dTal*p*X*O*Ac$_{0-2}$ (gdzie X jest 2 lub 3 lub 4)** **↓3** **→4)-α-D-Man*p*6*O*Ac-(1→2)-α-D-Man*p*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→**	
***P. brasiliense* IFB5527**	**β-D-Qui*p*3*N*Fo** **↓3** **α-L-Fuc*p*4*O*Ac** **↓4** **α-D-Glc*p*** **↓3** **→3)-β-D-Glc*p*-(1→4)-α-L-Fuc*p*-(1→3)-α-D-Glc*pN*Ac-(1→**	
***P. parmentieri* IFB5408 i IFB5427**	**β-D-Man*pN*Ac** **↓3** **→3)-β-D-Gal*pN*Ac-(1→3)-α-D-Gal*p*-(1→4)-β-D-Gal*p*-(1→**	
***P. parmentieri* SCC3193 i IFB5432**	**→3)-β-D-Gal*f*-(1→3)-α-D-Gal*p*-(1→8)-β-Pse*p*4Ac5Ac7Ac-(2→6)-α-D-Glc*p*-(1→6)-β-D-Glc*p*-(1→**	
***P. versatile* F131**	***O*Ac** **↓2** **→4)-α-D-Gal*p*A-(1→3)-β-D-Glc*pN*Ac-(1→2)-α-D-Gal*p*-(1→3)-α-L-Rha*p*-(1→4)- α-D-Glc*pN*Ac-(1→**	
***P. versatile* IFB5636**	**α-D-Erw*p*** **α-D-Erw*p*** **↓2** **↓3** **→3)-α-D-Man*p*-(1→3)-β-D-Glc*p*-(1→4)-α-D-Man*p*-(1→**	

W analizowanych przeze mnie OPS-ach zidentyfikowałam rzadko występującą abekozę i bardzo rzadko występującą erwiniozę.

Abekozę można znaleźć prawie wyłącznie w O-antygenach lipopolisacharydów [84]. Została wcześniej wykryta w O-antygenach różnych bakterii, m.in.: *Salmonella* serogrupy B [85], *Citrobacter freundii* O35 i O38 [86], *Citrobacter freundii* O22 szczep PCM1555 [87], *Edwardsiella tarda* PCM1153 [88], jak również w kompleksie *Yersinia pseudotuberculosis* [89]. W mojej pracy po raz pierwszy zidentyfikowałam Abe w OPS-ie SRP.

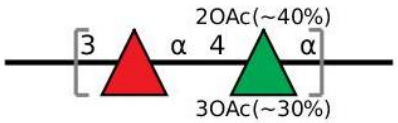
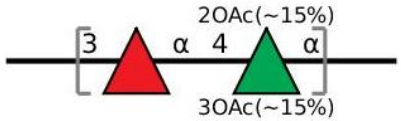
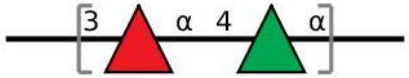
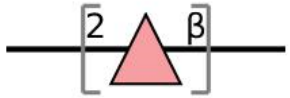
Według mojej wiedzy obecność erwiniozy w budowie chemicznej polisacharydów bakteryjnych została opisana tylko dwukrotnie: w strukturze chemicznej OPS-u *Erwinia carotovora* spp. *atroseptica* GSPB9205 [74] oraz w identycznej strukturze EPS-u wyizolowanego z *P. atrosepticum* SCRI1043 [77]. W obu przypadkach tylko jedna reszta β-Erw była obecna w powtarzającej się jednostce. W mojej pracy, po raz pierwszy, zidentyfikowałam dwie końcowe reszty α-Erw (w powtarzającej się jednostce OPS-u wyizolowanego z *P. versatile* IFB5636).

Struktury OPS-ów bakterii z rodzaju *Pectobacterium* są bardzo zróżnicowane, co można zaobserwować na podstawie sporządzonego zestawienia (Tabela 4). Różnice występują nawet w obrębie tego samego gatunku, co widać na przykładzie *P. atrosepticum* SCRI1039 i SCRI1043, *P. brasiliense* IFB5527 i F152, a także *P. versatile* IFB5636 i F131. W dwóch strukturach OPS-ów *P. atrosepticum* zidentyfikowano tylko jeden powtarzający się monosacharyd - Rha. Pozostałe reszty cukrowe znacząco różnią się w obu strukturach: *P. atrosepticum* SCRI1039 w łańcuchu głównym zawiera Glc, GlcNAc i „drugą" Rha podstawioną acetylowaną Fuc, natomiast OPS *P. atrosepticum* SCRI1043 tworzą dodatkowo, poza Rha, heksozy (Man i 2 x Gal) oraz Erw. Jednostki powtarzalne OPS-ów *P. brasiliense* IFB5527 i F152 zbudowane są z trzech różnych reszt cukrowych w łańcuchu głównym z jednym rozgałęzieniem. Łańcuch główny OPS-u *P. brasiliense* IFB5527 tworzą Glc, Fuc i GlcNAc, a do Fuc przyłączony jest łańcuch boczny zawierający trzy reszty: Glc, Fuc i Qui. W łańcuchu głównym *P. brasiliense* F152 znajdują się 3 heksozy (2 x Man i Gal), a jedna z mannoz podstawiona jest resztą 6dTal. Jednostkę powtarzalną OPS-ów *P. versatile* IFB5636 i F131 tworzy 5 monosacharydów. W przypadku *P. versatile* IFB5636 zbudowana jest ona z trzech heksoz (2 x Man i Glc) w łańcuchu głównym i dwóch

Erw w krótkich łańcuchach bocznych, natomiast *P. versatile* F131 posiada wszystkie pięć reszt cukrowych w łańcuchu głównym (GalA, 2 x GlcNAc, Gal, Rha). Ciekawym gatunkiem pod względem struktury OPS-ów okazał się *P. parmentieri,* u którego zaobserwowano zarówno podobieństwa, tzn. identyczną strukturę dla dwóch par szczepów, jak i różnice w strukturze pomiędzy tymi parami. Identyczne pod względem strukturalnym są pary OPS-ów: *P. parmentieri* IFB5408 i IFB5427 oraz *P. parmentieri* SCC3193 i IFB5432. Jednostka powtarzalna OPS *P. parmentieri* IFB5408 i IFB5427 zawiera cztery reszty cukrowe: trzy w łańcuchu głównym (2 x Gal i GalNAc) i jeden podstawnik (ManNAc), natomiast w przypadku *P. parmentieri* SCC3193 i IFB5432 powtarzająca się jednostka składa się z pięciu połączonych liniowo monosacharydów (2 x Gal, 2 x Glc oraz Pse). Najczęściej występującymi resztami cukrowymi obecnymi w opublikowanych strukturach O-antygenów bakterii z rodzaju *Pectobacterium* są heksozy (Glc, Man, Gal).

W strukturach OPS-ów bakterii z rodzaju *Dickeya* (Tabela 5) zaobserwowałam bardzo ciekawą prawidłowość, mianowicie wszystkie zawierają w swojej budowie tylko 6-deoksycukry (Rha, Fuc lub 6dAlt). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wyizolowane z wody szczepy *D. aquatica* (IFB0154, IFB0694) oraz *D. lacustris* IFB8647 mają praktycznie taką samą strukturę OPS-u (różnice wynikają z nieznacznie różnego stopnia *O*-acetylowania), ale co należy bardzo podkreślić, inną niż wszystkie dotychczas zbadane szczepy *Dickeya* wyizolowane z zakażonych roślin. W tym przypadku, pomimo różnych lokalizacji geograficznych, lat izolacji i pozycji taksonomicznej *D. dianthicola* IFB0485, *D. zeae* IPO946, *Dickeya solani* (IFB0099, IFB0158, IFB0223, IPO2222 i F0120) oraz *D. dadantii* 3937 [90,91] produkują OPS o takiej samej strukturze – homopolimer zbudowanych z resz 6dAlt*p*.

Tabela 5 Tabela przedstawiająca zestawienie struktur chemicznych OPS-ów bakterii z rodzaju *Dickeya* wraz z nazwami szczepów i symbolami wg SNFG.

Dickeya		
Nazwa szczepu	Struktura chemiczna	Struktura chemiczna wg SNFG [83]
***D. aquatica* IFB0154**	**OAc (~ 40%)** **↓2** **→3)-α-D-Fuc*p*-(1→4)-α-L-Rha*p*-(1→** **↑3** **OAc (~ 30%)**	
***D. aquatica* IFB0694**	**OAc (~ 15%)** **↓2** **→3)-α-D-Fuc*p*-(1→4)-α-L-Rha*p*-(1→** **↑3** **OAc (~ 15%)**	
***D. lacustris* IFB8647**	**→3)-α-D-Fuc*p*-(1→4)-α-L-Rha*p*-(1→**	
***D. dianthicola* IFB0485,** ***D. zeae* IPO946,** ***Dickeya solani* IFB0099, IFB0158, IFB0223, IPO2222 i F0120,** ***D. dadantii* 3937**	**→2)-β-D-6dAlt*p*-(1→**	

Zróżnicowanie struktur O-antygenów różnych gatunków *Dickeya* jest zgodne z wynikami analizy filogenetycznej opartej na proteomie [92]. W badaniach tych *D. aquatica* tworzy specyficzny klad, który jest oddzielony od kladu obejmującego *D. solani*, *D. dadantii*, *D. dianthicola* czy *D. zeae*. Analiza całego genomu, obejmująca również badania sekwencji genów związanych z wirulencją u różnych gatunków *Dickeya*, wykazała dużą jednorodność w całym rodzaju *Dickeya*.

Znajomość składu chemicznego OPS-ów różnych szczepów *Dickeya* oraz *Pectobacterium* może być podstawą do uporządkowania chemotaksonomii gatunków tych bakterii, może przyczynić się do zapobiegania infekcji bakteryjnych poprzez poznanie mechanizmów oddziaływań roślina-bakteria, może zostać wykorzystana do opracowania szybkich testów diagnostycznych, a w konsekwencji do ograniczenia strat ekonomicznych na plantacjach ziemniaków i innych roślin uprawnych.

Wyizolowane i strukturalnie scharakteryzowane polisacharydy mogą zostać wykorzystane w badaniach biologicznych.

Streszczenie rozprawy doktorskiej

STRUKTURY CHEMICZNE O-POLISACHARYDÓW WYBRANYCH SZCZEPÓW BAKTERII Z RODZAJÓW *DICKEYA* I *PECTOBACTERIUM*

mgr Agnieszka Kowalczyk

Bakterie otaczające rośliny zazwyczaj nie mają zauważalnego wpływu na ich wzrost i fizjologię. Liczną grupę stanowią gatunki przynoszące korzyści, np. dostarczając składników odżywczych, czy stymulując wzrost. Niestety występują również bakterie fitopatogenne powodujące poważne choroby, prowadzące nawet do obumierania roślin. Na szczególną uwagę zasługują fitopatogeny z rodziny *Pectobacteraceae* (*ang.* Soft Rot *Pectobacteraceae*; SRP), do których należą bakterie pektynolityczne z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya*. Drobnoustroje te powodują czarną nóżkę oraz mokrą zgniliznę ziemniaka, a także wielu innych roślin uprawnych (m.in. pomidorów, cykorii, ryżu, kukurydzy) i ozdobnych (m.in. chryzantem, goździków, fiołków) na całym świecie, przyczyniając się do znacznych strat. Fitopatogeny z rodzajów *Pectobacterium* i *Dickeya* są zdolne do penetracji tkanki żywiciela dzięki wydajnej produkcji enzymów degradujących ścianę komórkową roślin o właściwościach pektynolitycznych, celulolitycznych, proteolitycznych i lipolitycznych. Innym ważnym czynnikiem wirulencji jest lipopolisacharyd (LPS), ze względu na jego udział w adhezji bakterii do tkanki roślinnej oraz oddziaływanie z systemami obronnymi gospodarza. Chęć lepszego poznania interakcji bakteria-roślina, jak również scharakteryzowania czynników odpowiedzialnych za patogenność SRP, sprawiła, że podjęto badania struktur powierzchniowych tych fitopatogenów. Znajomość budowy polisacharydów może przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmów oddziaływania bakteria-roślina oraz uzupełnienia systemu klasyfikacji tych drobnoustrojów.

Celem rozprawy doktorskiej było określenie struktur chemicznych O-specyficznych polisacharydów (OPS-ów), stanowiących najbardziej wyeksponowane fragmenty LPS-ów, wybranych szczepów bakterii z rodzajów *Dickeya* i *Pectobacterium,* wyizolowanych ze środowiska wodnego.

LPS wyizolowano z suchej masy bakteryjnej, wykorzystując ekstrakcję mieszaniną fenolu-chloroformu-eteru naftowego lub klasyczną ekstrakcję fenolowo-wodną. DNA i RNA oraz białka zostały usunięte z próbki w wyniku trawienia enzymatycznego i dializy. Otrzymany LPS poddano łagodnej hydrolizie. Lipid A odwirowano a frakcję cukrową oczyszczono za pomocą chromatografii wykluczania. Do badań strukturalnych O-antygenów wykorzystano analizy chemiczne: analizę cukrową, analizę metylacyjna oraz reakcję z optycznie czynnym butan-2-olem, a także technikę spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Pochodne uzyskane w wyniku modyfikacji chemicznych analizowane były techniką chromatografii gazowej oraz chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Zarejestrowane chromatogramy oraz widma mas dostarczyły wstępnych informacji o strukturze chemicznej OPS-u: liczbie i rodzaju reszt cukrowych, miejscu ich podstawienia oraz przyporządkowaniu monosacharydów do szeregu konfiguracyjnego D lub L. Na podstawie zarejestrowanych widm jedno- i dwuwymiarowych NMR określono konfigurację anomerycznych atomów węgla, α lub β, poszczególnych monosacharydów, ustalono ich sekwencję w jednostce powtarzalnej, a także zidentyfikowano elementy strukturalne polisacharydów, które nie zostały wcześniej wykryte metodami chromatograficznymi.

W oparciu o wyniki uzyskane z analiz chemicznych i spektroskopowych określono struktury chemiczne OPS-ów badanych szczepów bakteryjnych: *D. aquatica* IFB0154 i IFB0694, *D. lacustris* IFB8647, *P. aquaticum* IFB5637 i *P. versatile* IFB5636.

Znajomość struktury OPS-u może przyczynić się do poznania mechanizmów oddziaływań roślina-bakteria, co może prowadzić do opracowania nowych metod identyfikacji patogenu, specyficznych dla gatunku, np. szybkich testów diagnostycznych, a także skutecznych metod zwalczania i zapobiegania infekcji. Perspektywa szybkiej identyfikacji drobnoustroju może przyczynić się do ograniczenia strat ekonomicznych na plantacjach ziemniaków i innych roślin uprawnych.

Abstract

CHEMICAL STRUCTURES OF O-POLYSACCHARIDES OF SELECTED STRAINS OF BACTERIA *DICKEYA* AND *PECTOBACTERIUM* GENERA

Agnieszka Kowalczyk, MSc

Bacteria surrounding plants usually have no noticeable effect on their growth and physiology. A large group are species that bring benefits, e.g. by providing nutrients or stimulating growth. Unfortunately, there are also phytopathogenic bacteria that cause serious diseases, leading to the death of plants. Of particular note are plant pathogens from the *Pectobacteraceae* family (Soft Rot *Pectobacteraceae*; SRP), including pectinolytic bacteria from the genera *Pectobacterium* and *Dickeya.* These microorganisms cause diseases such as blackleg and soft rot on potatoes, as well as many other cultivated plants (e.g. tomatoes, chicory, rice, corn) and ornamental plants (e.g. chrysanthemums, carnations, violets) worldwide, contributing to significant crop losses. Phytopathogens from the genera *Pectobacterium* and *Dickeya* are able to penetrate the host tissue due to the efficient production of plant cell wall degrading enzymes with pectinolytic, cellulolytic, proteolytic and lipolytic properties. Another important virulence factor is lipopolysaccharide (LPS), due to its participation in bacterial adhesion to plant tissue and interaction with host defense systems. The needs of better understanding the bacterial-plant interaction, as well as to characterize the factors responsible for the pathogenicity of SRP, led to the study of the surface structures of these phytopathogens. Knowledge of the structure of polysaccharides may help to explain the mechanisms of the bacterium-plant interaction and complement the classification system of these microorganisms.

The aim of my doctoral thesis was to determine the chemical structure of O-specific polysaccharides (OPS), which are the most exposed fragments of LPS, of selected strains of bacteria of the genera *Dickeya* and *Pectobacterium*, isolated from the aquatic environment.

LPS was isolated from dry bacterial cells using extraction with a mixture of phenol-chloroform-petroleum ether or classical phenol-water extraction. DNA, RNA and proteins were removed from the sample by enzymatic digestion and dialysis. The obtained LPS was subjected to mild hydrolysis. Lipid A was centrifuged and the sugar fraction was purified using size-exclusion chromatography. Chemical analyses such as sugar analysis, methylation

analysis and reaction with optically active butan-2-ol, as well as nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) were used for structural studies of O-antigens. Derivatives obtained as a result of chemical modifications of OPS were analyzed by gas chromatography and gas chromatography coupled with mass spectrometry. The analysis of obtained chromatograms and MS spectra provided preliminary information about the chemical structure of the OPS repeating unit. The number and type of sugar residues, their substitution sites were determined and monosaccharides were assigned to a D or L configuration series. Based on the recorded one- and two-dimensional NMR spectra, the configuration of anomeric carbon atoms, α or β, of individual monosaccharides was determined, the sequence of sugar residues in the repeating unit was established, and structural elements of polysaccharides that had not previously been detected by chromatographic methods were also identified.

On the basis of the results obtained from chemical analyzes and spectroscopic methods, the chemical structures of the OPS of the tested bacterial strains were determined: *D. aquatica* IFB0154, *D. aquatica* IFB0694, *D. lacustris* IFB8647, *P. aquaticum* IFB5637 and *P. versatile* IFB5636.

Knowledge of the structure of the OPS may contribute to the understanding of the mechanisms of plant-bacteria interactions, which may lead to the development of new species-specific pathogen identification methods, e.g. rapid diagnostic tests, as well as effective methods of combating and preventing infection. The prospect of quick identification of the microorganism may contribute to reducing economic losses in potato and other crop plantations.

Bibliografia

[1] J. Davison, Plant Beneficial Bacteria, *Nature Biotechnology*. 6 (1988) 282–286. https://doi.org/10.1038/nbt0388-282.

[2] R. Hayat, S. Ali, U. Amara, R. Khalid, I. Ahmed, Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review, *Annals of Microbiology*. 60 (2010) 579–598. https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1.

[3] P. Sobiczewski, Bakterie w środowisku roślin - wrogowie i sprzymierzeńcy, *Kosmos*. 70 (2021) 685–696. https://doi.org/10.36921/kos.2022_2776.

[4] M. Adeolu, S. Alnajar, S. Naushad, R. Gupta, Genome based phylogeny and taxonomy of the "*Enterobacteriales*": proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66 (2016). https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485.

[5] D.J. Brenner, J.J. Farmer, *Enterobacteriaceae*, in: W.B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund, S. Dedysh (Eds.), Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 1st ed., Wiley, 2015: pp. 1–24. https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00222.

[6] M.A. Croxen, B.B. Finlay, Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity, *Nature Reviews Microbiology*. 8 (2010) 26–38. https://doi.org/10.1038/nrmicro2265.

[7] M.D. Dyer, C. Neff, M. Dufford, C.G. Rivera, D. Shattuck, J. Bassaganya-Riera, T.M. Murali, B.W. Sobral, The Human-Bacterial Pathogen Protein Interaction Networks of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, and *Yersinia pestis*, *PLOS ONE*. 5 (2010) 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012089.

[8] O. Gal-Mor, E.C. Boyle, G.A. Grassl, Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ, *Frontiers in Microbiology*. 5 (2014) 1–10. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00391.

[9] L. Hauben, E.R.B. Moore, L. Vauterin, M. Steenackers, J. Mergaert, L. Verdonck, J. Swings, Phylogenetic Position of Phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*, *Systematic and Applied Microbiology*. 21 (1998) 384–397. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(98)80048-9.

[10] J. Mansfield, S. Genin, S. Magori, V. Citovsky, M. Sriariyanum, P. Ronald, M. Dow, V. Verdier, S.V. Beer, M.A. Machado, I. Toth, G. Salmond, G.D. Foster, Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology, *Molecular Plant Pathology*. 13 (2012) 614–629. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.

[11] I.K. Toth, J.M. van der Wolf, G. Saddler, E. Lojkowska, V. Hélias, M. Pirhonen, L. Tsror (Lahkim), J.G. Elphinstone, Dickeya species: an emerging problem for potato production in Europe, *Plant Pathology*. 60 (2011) 385–399. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x.

[12] I.K. Toth, M. Barny, M.B. Brurberg, G. Condemine, R. Czajkowski, J.G. Elphinstone, V. Helias, S.B. Johnson, L.N. Moleleki, M. Pirhonen, S. Rossmann, L. Tsror, J.E. van der Waals, J.M. van der Wolf, F. Van Gijsegem, I. Yedidia, *Pectobacterium* and *Dickeya*: Environment to Disease Development, in: F. Van Gijsegem, J.M. van der Wolf, I.K. Toth (Eds.), Plant Diseases Caused by *Dickeya* and *Pectobacterium* Species, Springer International Publishing, Cham, 2021: pp. 39–84. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61459-1_3.

[13] A.O. Charkowski, The Changing Face of Bacterial Soft-Rot Diseases, *Annual Review of Phytopathology*. 56 (2018) 269–288. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045906.

[14] W.R. Burkholder, L.A. Mcfadden, E.W. Dimock, A bacterial blight of Chrysanthemums, *Phytopathology*. 43 (1953) 522–526.

[15] R. Samson, J.B. Legendre, R. Christen, M.F.-L. Saux, W. Achouak, L. Gardan, Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55 (2005) 1415–1427. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02791-0.

[16] M.J. Wilhelm, J.B. Sheffield, M. Sharifian Gh, Y. Wu, C. Spahr, G. Gonella, B. Xu, H.-L. Dai, Gram's Stain Does Not Cross the Bacterial Cytoplasmic Membrane, *ACS Chemical Biology*. 10 (2015) 1711–1717. https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00042.

[17] J.D. Glasner, M. Marquez-Villavicencio, H.-S. Kim, C.E. Jahn, B. Ma, B.S. Biehl, A.I. Rissman, B. Mole, X. Yi, C.-H. Yang, J.L. Dangl, S.R. Grant, N.T. Perna, A.O. Charkowski, Niche-specificity and the variable fraction of the *Pectobacterium* pan-genome, *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 21 (2008) 1549–1560. https://doi.org/10.1094/MPMI-21-12-1549.

[18] I.K. Toth, M. Barny, R. Czajkowski, J.G. Elphinstone, X. (Sean) Li, J. Pédron, M. Pirhonen, F. Van Gijsegem, *Pectobacterium* and *Dickeya*: Taxonomy and Evolution, in: F. Van Gijsegem, J.M. van der Wolf, I.K. Toth (Eds.), Plant Diseases Caused by *Dickeya* and *Pectobacterium* Species, Springer International Publishing, Cham, 2021: pp. 13–37. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61459-1_2.

[19] S. Oulghazi, J. Cigna, Y.Y. Lau, M. Moumni, K.G. Chan, D. Faure, Transfer of the waterfall source isolate *Pectobacterium carotovorum* M022 to *Pectobacterium fontis* sp. nov., a deep-branching species within the genus *Pectobacterium*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 69 (2019) 470–475. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003180.

[20] J. Pédron, C. Bertrand, G. Taghouti, P. Portier, M.-A. Barny, *Pectobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from waterways, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 69 (2019) 745–751. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003229.

[21] W. Babinska, A. Motyka-Pomagruk, W. Sledz, A. Kowalczyk, Z. Kaczynski, E. Lojkowska, The First Polish Isolate of a Novel Species *Pectobacterium aquaticum* Originates from a Pomeranian Lake, *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18 (2021) 5041. https://doi.org/10.3390/ijerph18095041.

[22] M. Waleron, A. Misztak, M. Waleron, J. Jonca, M. Furmaniak, K. Waleron, *Pectobacterium polonicum* sp. nov. isolated from vegetable fields, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 69 (2019) 1751–1759. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003387.

[23] P. Portier, J. Pédron, G. Taghouti, C. Dutrieux, M.-A. Barny, Updated Taxonomy of *Pectobacterium* Genus in the CIRM-CFBP Bacterial Collection: When Newly Described Species Reveal "Old" Endemic Population, *Microorganisms*. 8 (2020) 1441. https://doi.org/10.3390/microorganisms8091441.

[24] P. Portier, J. Pédron, G. Taghouti, M. Fischer-Le Saux, E. Caullireau, C. Bertrand, A. Laurent, K. Chawki, S. Oulgazi, M. Moumni, D. Andrivon, C. Dutrieux, D. Faure, V. Hélias, M.-A. Barny, Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants, I*nternational Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 69 (2019) 3207–3216. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003611.

[25] H. Ben Moussa, J. Pédron, C. Bertrand, A. Hecquet, M.-A. Barny, *Pectobacterium quasiaquaticum* sp. nov., isolated from waterways, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 71 (2021). https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005042.

[26] J. Laurila, V. Ahola, A. Lehtinen, T. Joutsjoki, A. Hannukkala, A. Rahkonen, M. Pirhonen, Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland, *European Journal of Plant Pathology*. 122 (2008) 213–225. https://doi.org/10.1007/s10658-008-9274-5.

[27] N. Parkinson, P. DeVos, M. Pirhonen, J. Elphinstone, *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64 (2014) 2264–2266. https://doi.org/10.1099/ijs.0.058693-0.

[28] M.A. Zaczek-Moczydłowska, C.C. Fleming, G.K. Young, K. Campbell, R. O'Hanlon, *Pectobacterium* and *Dickeya* species detected in vegetables in Northern Ireland, *European Journal of Plant Pathology*. 154 (2019) 635–647. https://doi.org/10.1007/s10658-019-01687-1.

[29] N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, C. Jacot-des-Combes, J. Briolay, *Dickeya lacustris* sp. nov., a water-living pectinolytic bacterium isolated from lakes in France, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 69 (2019) 721–726. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003208.

[30] M.D. Harrison, G.D. Franc, D.A. Maddox, J.E. Michaud, N.J. McCarter-Zorner, Presence of E*rwinia carotovora* in surface water in North America, *Journal of Applied Bacteriology*. 62 (1987) 565–570. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1987.tb02690.x.

[31] S.H. De Boer, Characterization of Pectolytic *Erwinias* as Highly Sophisticated Pathogens of plants, *European Journal of Plant Pathology*. 109 (2003) 893–899. https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000003967.34041.65.

[32] N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, G. Condemine, W. Nasser, S. Reverchon, Regulation of Pectinolysis in *Erwinia Chrysanthemi*, *Annual Review of Microbiology*. 50 (1996) 213–257. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.213.

[33] M.C.M. Pérombelon, Potato blackleg: Epidemiology, host-pathogen interaction and control, *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 98 (1992) 135–146. https://doi.org/10.1007/BF01974480.
[34] I.K. Toth, L. Pritchard, P.R.J. Birch, Comparative genomics reveals what makes an enterobacterial plant pathogen, *Annual Review of Phytopathology*. 44 (2006) 305–336. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143444.
[35] G.D. Lyon, The biochemical basis of resistance of potatoes to soft rot *Erwinia* spp.—a review, *Plant Pathology*. 38 (1989) 313–339. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1989.tb02152.x.
[36] J.W. Peterson, Bacterial Pathogenesis, in: S. Baron (Ed.), Medical Microbiology, 4th ed., University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX), 1996: Chapter 7.
[37] D.H. Lee, J.-A. Lim, J. Lee, E. Roh, K. Jung, M. Choi, C. Oh, S. Ryu, J. Yun, S. Heu, Characterization of genes required for the pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21 in Chinese cabbage, *Microbiology*. 159 (2013) 1487–1496. https://doi.org/10.1099/mic.0.067280-0.
[38] X. Li, Y. Ma, S. Liang, Y. Tian, S. Yin, S. Xie, H. Xie, Comparative genomics of 84 *Pectobacterium* genomes reveals the variations related to a pathogenic lifestyle, *BMC Genomics*. 19 (2018) 889. https://doi.org/10.1186/s12864-018-5269-6.
[39] J. Nykyri, O. Niemi, P. Koskinen, J. Nokso-Koivisto, M. Pasanen, M. Broberg, I. Plyusnin, P. Törönen, L. Holm, M. Pirhonen, E.T. Palva, Revised Phylogeny and Novel Horizontally Acquired Virulence Determinants of the Model Soft Rot Phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* SCC3193, *PLOS Pathogens*. 8 (2012) e1003013. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003013.
[40] T.J.M. van den Bosch, O. Niemi, C.U. Welte, Single gene enables plant pathogenic *Pectobacterium* to overcome host-specific chemical defence, *Molecular Plant Pathology*. 21 (2019) 349–359. https://doi.org/10.1111/mpp.12900.
[41] N. Tendiuk, T. Konnova, O. Petrova, E. Osipova, T. Mukhametzyanov, O. Makshakova, V. Gorshkov, Structure-Functional Characteristics of the Svx Protein—The Virulence Factor of the Phytopathogenic Bacterium *Pectobacterium atrosepticum*, *International Journal of Molecular Sciences*. 23 (2022) 6914. https://doi.org/10.3390/ijms23136914.
[42] A. Motyka-Pomagruk, S. Zoledowska, A.E. Misztak, W. Sledz, A. Mengoni, E. Lojkowska, Comparative genomics and pangenome-oriented studies reveal high homogeneity of the agronomically relevant enterobacterial plant pathogen *Dickeya solani*, *BMC Genomics*. 21 (2020) 449. https://doi.org/10.1186/s12864-020-06863-w.
[43] L.N. Moleleki, R.G. Pretorius, C.K. Tanui, G. Mosina, J. Theron, A quorum sensing-defective mutant of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *brasiliense* 1692 is attenuated in virulence and unable to occlude xylem tissue of susceptible potato plant stems, *Molecular Plant Pathology*. 18 (2017) 32–44. https://doi.org/10.1111/mpp.12372.
[44] C.E. Jahn, D.A. Selimi, J.D. Barak, A.O. Charkowski, The *Dickeya dadantii* biofilm matrix consists of cellulose nanofibres, and is an emergent property dependent upon the type III secretion system and the cellulose synthesis operon, *Microbiology*. 157 (2011) 2733–2744. https://doi.org/10.1099/mic.0.051003-0.
[45] L.F. Castiblanco, G.W. Sundin, New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria, *Journal of Integrative Plant Biology*. 58 (2016) 362–372. https://doi.org/10.1111/jipb.12428.
[46] J.M. Koczan, B.R. Lenneman, M.J. McGrath, G.W. Sundin, Cell Surface Attachment Structures Contribute to Biofilm Formation and Xylem Colonization by *Erwinia amylovora*, *Applied and Environmental Microbiology*. 77 (2011) 7031–7039. https://doi.org/10.1128/AEM.05138-11.
[47] B. Krawczyk, A. Rosińska, Siderofory bakteryjne – rola w patogenezie i potencjał wykorzystania w diagnostyce, w: Mikrobiologia i toksykologia – przegląd wybranych zagadnień, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o. o., 2021: pp. 28–38.
[48] S. Reverchon, W. Nasser, *Dickeya* ecology, environment sensing and regulation of virulence programme, *Environmental Microbiology Reports*. 5 (2013) 622–636. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12073.
[49] A. Boughammoura, T. Franza, A. Dellagi, C. Roux, B. Matzanke-Markstein, D. Expert, Ferritins, bacterial virulence and plant defence, *Biometals*. 20 (2007) 347–353. https://doi.org/10.1007/s10534-006-9069-0.
[50] N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, G. Condemine, E. Gueguen, V.E. Shevchik, *Dickeya* Plant Pathogens, in: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. (Ed.), 1st ed., 2020: pp. 1–10.

[51] M. Ranjan, D. Khokhani, S. Nayaka, S. Srivastava, Z.P. Keyser, A. Ranjan, Genomic diversity and organization of complex polysaccharide biosynthesis clusters in the genus *Dickeya*, *PLOS ONE*. 16 (2021) e0245727. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245727.
[52] S. Ranf, Immune Sensing of Lipopolysaccharide in Plants and Animals: Same but Different, *PLOS Pathogens*. 12 (2016) e1005596. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005596.
[53] C. Zipfel, G. Felix, Plants and animals: a different taste for microbes?, *Current Opinion in Plant Biology*. 8 (2005) 353–360. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.004.
[54] T.J. Evans, A. Ind, E. Komitopoulou, G.P.C. Salmond, Phage-selected lipopolysaccharide mutants of *Pectobacterium atrosepticum* exhibit different impacts on virulence, *Journal of Applied Microbiology*. 109 (2010) 505–514. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04669.x.
[55] G. Condemine, A. Castillo, F. Passeri, C. Enard, The PecT Repressor Coregulates Synthesis of Exopolysaccharides and Virulence Factors in *Erwinia chrysanthemi*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 12 (1999) 45–52. https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.1.45.
[56] X. Hu, Z. Chen, K. Xiong, J. Wang, X. Rao, Y. Cong, Vi capsular polysaccharide: Synthesis, virulence, and application, *Critical Reviews in Microbiology*. 43 (2017) 440–452. https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1249335.
[57] L.M. Willis, C. Whitfield, Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways, *Carbohydrate Research*. 378 (2013) 35–44. https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.05.007.
[58] E. Krzyżewska, J. Rybka, Biosynthesis of lipopolysaccharides with different length of the O-specific region as a virulence factor of Gram-negative bacteria, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 72 (2018) 573–586. https://doi.org/10.5604/01.3001.0012.1735.
[59] A. Silipo, G. Erbs, T. Shinya, J.M. Dow, M. Parrilli, R. Lanzetta, N. Shibuya, M.-A. Newman, A. Molinaro, Glyco-conjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity, *Glycobiology*. 20 (2010) 406–419. https://doi.org/10.1093/glycob/cwp201.
[60] E.T. Rietschel, T. Kirikae, F.U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A.J. Ulmer, U. Zähringer, U. Seydel, F. Di Padova, M. Schreier, H. Brade, Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function, *The FASEB Journal*. 8 (1994) 217–225. https://doi.org/10.1096/fasebj.8.2.8119492.
[61] J. Lodowska, A. Zieba, D. Wolny, L. Weglarz, Z. Dzierzewicz, Methods of lipopolysaccharide component derivation in evaluating their structures by chromatographic techniques, *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*. 60 (2006) 113–128.
[62] A. Kutschera, S. Ranf, The multifaceted functions of lipopolysaccharide in plant-bacteria interactions, *Biochimie*. 159 (2019) 93–98. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.028.
[63] J. Lodowska, D. Wolny, L. Węglarz, Z. Dzierżewicz, Heterogenność strukturalna lipidu A bakterii Gram-ujemnych, *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*. 61 (2007) 106–121.
[64] C.R.H. Raetz, Biochemistry of Endotoxins, *Annual Review of Biochemistry*. 59 (1990) 129–170. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.59.070190.001021.
[65] M. Kaszowska, Budowa chemiczna i biosynteza lipopolisacharydu – ważnego składnika osłony, *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*. 58 (2004) 333–342.
[66] G. Samuel, P. Reeves, Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly, *Carbohydrate Research*. 338 (2003) 2503–2519. https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.07.009.
[67] Y.A. Knirel, Structure of O-Antigens, in: Y.A. Knirel, M.A. Valvano (Eds.), Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells, Springer, Vienna, 2011: pp. 41–115. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0733-1_3.
[68] C. De Castro, M. Parrilli, O. Holst, A. Molinaro, Microbe-Associated Molecular Patterns in Innate Immunity: Extraction and Chemical Analysis of Gram-Negative Bacterial Lipopolysaccharides, in: M. Fukuda (Ed.), Methods in Enzymology, Academic Press, 2010: pp. 89–115. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)80005-9.
[69] C. Galanos, O. Lüderitz, O. Westphal, A New Method for the Extraction of R Lipopolysaccharides, *European Journal of Biochemistry*. 9 (1969) 245–249. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00601.x.
[70] X. Wang, C. Zhang, F. Shi, X. Hu, Purification and Characterization of Lipopolysaccharides, in: X. Wang, P.J. Quinn (Eds.), Endotoxins: Structure, Function and Recognition, Springer Netherlands, Dordrecht, 2010: pp. 27–51. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9078-2_2.

[71] O. Westphal, K. Jann, Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure, in: Methods in Carbohydrate Chemistry, Academic press, New York, 1965: pp. 83–91.
[72] I. Ciucanu, F. Kerek, A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates, *Carbohydrate Research*. 131 (1984) 209–217. https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85242-8.
[73] A. Molinaro, C. De Castro, R. Lanzetta, E. Manzo, M. Parrilli, Solvent Effect on the Isomeric Equilibrium of Carbohydrates: The Superior Ability of 2,2,2-Trifluoroethanol for Intramolecular Hydrogen Bond Stabilization, *Journal of the American Chemical Society*. 123 (2001) 12605–12610. https://doi.org/10.1021/ja016471i.
[74] S.N. Senchenkova, A.S. Shashkov, Yu.A. Knirel, M. Ahmed, A. Mavridis, K. Rudolph, Structure of the O-polysaccharide of *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* GSPB 9205 containing a new higher branched monosaccharide, *Russian Chemical Bulletin*. 54 (2005) 1276–1281. https://doi.org/10.1007/s11172-005-0394-1.
[75] G.M. Lipkind, A.S. Shashkov, Y.A. Knirel, E.V. Vinogradov, N.K. Kochetkov, A computer-assisted structural analysis of regular polysaccharides on the basis of 13C-n.m.r. data, *Carbohydrate Research*. 175 (1988) 59–75. https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80156-3.
[76] M. Czerwicka, K. Marszewska, A. Bychowska, H. Dziadziuszko, K. Brzozowski, E. Łojkowska, P. Stepnowski, Z. Kaczyński, Chemical structure of the O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium atrosepticum* SCRI 1039, *Carbohydrate Research*. 346 (2011) 2978–2981. https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.10.026.
[77] V. Gorshkov, B. Islamov, P. Mikshina, O. Petrova, G. Burygin, E. Sigida, A. Shashkov, A. Daminova, M. Ageeva, B. Idiyatullin, V. Salnikov, Y. Zuev, T. Gorshkova, Y. Gogolev, *Pectobacterium atrosepticum* exopolysaccharides: identification, molecular structure, formation under stress and in planta conditions, *Glycobiology*. 27 (2017) 1016–1026. https://doi.org/10.1093/glycob/cwx069.
[78] A.A. Lukianova, M.M. Shneider, P.V. Evseev, A.M. Shpirt, E.N. Bugaeva, A.P. Kabanova, E.A. Obraztsova, K.K. Miroshnikov, S.N. Senchenkova, A.S. Shashkov, S.V. Toschakov, Y.A. Knirel, A.N. Ignatov, K.A. Miroshnikov, Morphologically Different *Pectobacterium brasiliense* Bacteriophages PP99 and PP101: Deacetylation of O-Polysaccharide by the Tail Spike Protein of Phage PP99 Accompanies the Infection, *Frontiers in Microbiology*. 10 (2020). https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.03147.
[79] S. Szulta, A. Kowalczyk, M. Czerwicka-Pach, A. Motyka-Pomagruk, W. Śledź, N. Kaczyńska, E. Łojkowska, Z. Kaczyński, The chemical structure of the O-polysaccharide isolated from the lipopolysaccharide of *Pectobacterium brasiliense* IFB5527, a phytopathogenic bacterium of high economic importance, *Carbohydrate Research*. (2023) 108806. https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108806.
[80] K. Ossowska, M. Czerwicka, W. Sledz, S. Zoledowska, A. Motyka, S. Szulta, E. Lojkowska, Z. Kaczyński, The structure of O-polysaccharides isolated from plant pathogenic bacteria *Pectobacterium wasabiae* IFB5408 and IFB5427, *Carbohydrate Research*. 426 (2016) 46–49. https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.03.017.
[81] K. Ossowska, A. Motyka-Pomagruk, N. Kaczyńska, A. Kowalczyk, W. Sledz, E. Lojkowska, Z. Kaczyński, Heterogenicity within the LPS Structure in Relation to the Chosen Genomic and Physiological Features of the Plant Pathogen *Pectobacterium parmentieri*, *International Journal of Molecular Sciences*. 23 (2022) 2077. https://doi.org/10.3390/ijms23042077.
[82] A.A. Lukianova, P.V. Evseev, M.M. Shneider, E.A. Dvoryakova, A.D. Tokmakova, A.M. Shpirt, M.R. Kabilov, E.A. Obraztsova, A.S. Shashkov, A.N. Ignatov, Y.A. Knirel, F.S.-U. Dzhalilov, K.A. Miroshnikov, *Pectobacterium versatile* Bacteriophage Possum: A Complex Polysaccharide-Deacetylating Tail Fiber as a Tool for Host Recognition in Pectobacterial Schitoviridae, *International Journal of Molecular Sciences*. 23 (2022) 11043. https://doi.org/10.3390/ijms231911043.
[83] K. Cheng, Y. Zhou, S. Neelamegham, DrawGlycan-SNFG: a robust tool to render glycans and glycopeptides with fragmentation information, *Glycobiology*. 27 (2017) 200–205. https://doi.org/10.1093/glycob/cww115.
[84] Y.A. Knirel, N.K. Kochetkov, Structure of lipopolysaccharides from gram-negative bacteria. III. Structure of O-specific polysaccharides, *Biokhimiia* (Moscow, Russia). 59 (1994) 1784–1851.
[85] Z. Kaczyński, J. Gajdus, H. Dziadziuszko, P. Stepnowski, Chemical structure of the somatic antigen isolated from *Salmonella Abortusequi* (O4), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 50 (2009) 679–682. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.10.013.

[86] N.A. Kocharova, Y.A. Knirel, E.S. Stanislavsky, E.V. Kholodkova, C. Lugowski, W. Jachymek, E. Romanowska, Structural and serological studies of lipopolysaccharides of *Citrobacter* O35 and O38 antigenically related to *Salmonella*, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 13 (1996) 1–8. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1996.tb00209.x.

[87] E. Katzenellenbogen, N.A. Kocharova, P.V. Toukach, S. Górska, A. Korzeniowska-Kowal, M. Bogulska, A. Gamian, Y.A. Knirel, Structure of an abequose-containing O-polysaccharide from *Citrobacter freundii* O22 strain PCM 1555, *Carbohydrate Research*. 344 (2009) 1724–1728. https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.06.005.

[88] E. Katzenellenbogen, N.A. Kocharova, P.V. Toukach, S. Górska, M. Bogulska, A. Gamian, Y.A. Knirel, Structures of a unique O-polysaccharide of *Edwardsiella tarda* PCM 1153 containing an amide of galacturonic acid with 2-aminopropane-1,3-diol and an abequose-containing O-polysaccharide shared by E. tarda PCM 1145, PCM 1151 and PCM 1158, *Carbohydrate Research*. 355 (2012) 56–62. https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.04.004.

[89] Y.A. Knirel, A.P. Anisimov, A.A. Kislichkina, A.N. Kondakova, O.V. Bystrova, A.S. Vagaiskaya, K.Y. Shatalin, A.S. Shashkov, S.V. Dentovskaya, Lipopolysaccharide of the *Yersinia pseudotuberculosis* Complex, *Biomolecules*. 11 (2021) 1410. https://doi.org/10.3390/biom11101410.

[90] A.P. Kabanova, M.M. Shneider, A.A. Korzhenkov, E.N. Bugaeva, K.K. Miroshnikov, E.L. Zdorovenko, E.E. Kulikov, S.V. Toschakov, A.N. Ignatov, Y.A. Knirel, K.A. Miroshnikov, Host Specificity of the *Dickeya* Bacteriophage PP35 Is Directed by a Tail Spike Interaction With Bacterial O-Antigen, Enabling the Infection of Alternative Non-pathogenic Bacterial Host, *Frontiers in Microbiology*. 9 (2019). https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03288.

[91] K. Ossowska, The uniform structure of O-polysaccharides isolated from *Dickeya solani* strains of different origin, *Carbohydrate Research*. (2017) 4. https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.04.001.

[92] A. Duprey, N. Taib, S. Leonard, T. Garin, J.-P. Flandrois, W. Nasser, C. Brochier-Armanet, S. Reverchon, The phytopathogenic nature of *Dickeya aquatica* 174/2 and the dynamic early evolution of *Dickeya* pathogenicity, *Environmental Microbiology*. 21 (2019) 2809–2835. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14627.

Artykuły stanowiące integralną część pracy doktorskiej

Załącznik D1

Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Śledź, W., Motyka-Pomagruk, A., Ossowska, K., Łojkowska, E., Kaczyński, Z. (2020). The structure of the O-polysaccharide isolated from pectinolytic gram-negative bacterium *Dickeya aquatica* IFB0154 is different from the O-polysaccharides of other *Dickeya* species. *Carbohydrate Research*, *497*, 108135. https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108135

Carbohydrate Research 497 (2020) 108135

Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carres

The structure of the O-polysaccharide isolated from pectinolytic gram-negative bacterium *Dickeya aquatica* IFB0154 is different from the O-polysaccharides of other *Dickeya* species

Agnieszka Kowalczyk [a], Nikola Szpakowska [a], Wojciech Sledz [b], Agata Motyka-Pomagruk [b], Karolina Ossowska [a], Ewa Lojkowska [b], Zbigniew Kaczyński [a,*]

[a] *Faculty of Chemistry, University of Gdansk, Wita Stwosza 63, 80-308, Gdansk, Poland*
[b] *Department of Plant Protection and Biotechnology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology University of Gdansk & Medical University of Gdansk, Abrahama 58, 80-307, Gdansk, Poland*

ARTICLE INFO

Keywords:
Dickeya aquatica
Dickeya dianthicola
Dickeya zeae
O-Polysaccharide
Structure
NMR spectroscopy

ABSTRACT

The species *Dickeya aquatica* was established in 2014 after the genomic characterization of the pectinolytic bacteria isolated from water. It was demonstrated that *D. aquatica* was able to cause symptoms of soft rot on the fruit of tomato and cucumber. According to earlier works, lipopolysaccharides are regarded as an important virulence factor of *Pectobacteriaceae*. An O-specific polysaccharide containing D-Fuc and L-Rha was obtained by mild acid hydrolysis of the lipopolysaccharide of *D. aquatica* IFB0154 (strain Dw044 isolated in Finland). By means of compositional analyses and NMR spectroscopy, the chemical repeating unit of the polymer was identified as a linear disaccharide of the structure shown below. The rhamnose residue was partially acetylated at O-2 or O-3.

```
                        OAc (~40%)
                        ↓2
→3)-α-D-Fucp-(1 → 4)-α-L-Rhap-(1→
                        ↑3
                        OAc (~30%)
```

The O-polysaccharides isolated from *Dickeya dianthicola* IFB0485 and *Dickeya zeae* IPO946 have a different structure, identical to that previously described for several strains of *Dickeya solani* and *Dickeya dadantii* 3937.

1. Introduction

The *Dickeya* genus comprises plant pathogenic bacteria causing soft rot of a wide range of plants. They are classified to the recently established family of *Pectobacteriaceae*. Its members are capable of producing and secreting pectinolytic and cellulolytic enzymes [1]. Strains from the *Dickeya* genus have been previously isolated from waterways in Finland [2], the UK [3], and Poland [4]. Strains isolated in Finland and the UK were described as a separate species *Dickeya aquatica* by Parkinson et al. (2014) [3]. This difference was based on phenotypic characterization obtained using the GN2 Micro Plate system (Biolog, Inc USA), which tested the metabolic profiles of studied bacterial strains in relation to 94 test substrates. It has been indicated that only *D. aquatica* strains are capable of fermenting melibiose and raffinose, but not arabinose and mannitol [3]. Despite of being isolated from waterways, *D. aquatica* is capable to cause soft rot disease symptoms on tomato and cucumber fruit [5].

Phylogenetic analysis based on six *Dickeya* genes involved in basic metabolisms [2], the genes encoding plant cell degrading enzymes or the constituents of the proteome of the *Dickeya* genus [5], indicated that *D. aquatica* is the most closely related to the *Dickeya zeae* and Dickeya chrysanthemi taxons.

Interestingly, all *Dickeya* spp. strains that up till now have been isolated from waterways in Poland identified as either *D. chrysanthemi* or *D. zeae* [4].

* Corresponding author.
E-mail address: zbigniew.kaczynski@ug.edu.pl (Z. Kaczyński).

https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108135
Received 30 July 2020; Received in revised form 14 August 2020; Accepted 15 August 2020
Available online 18 August 2020
0008-6215/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2. Results and discussion

Lipopolysaccharide (LPS) was isolated from dry bacterial cells of *D. aquatica* IFB0154 using two types of extraction methods: phenol-chloroform-petroleum ether (PCP) and hot phenol-water extraction. The PCP extraction indicated the absence of a lipooligosaccharide, while the hot phenol-water extraction enabled the isolation of the LPS. The obtained sample was purified by enzymatic digestion and dialysis. Lipid A was cleaved off using mild acid hydrolysis and removed from the solution by centrifugation. The mixture of carbohydrates was fractionated by size exclusion chromatography. The high molecular weight O-specific polysaccharide (OPS) obtained was analyzed by the use of NMR spectroscopy and chemical methods.

Sugar analysis demonstrated the presence of two different 6-deoxyhexoses in the molar ratio ~1:1, which were identified as fucose and rhamnose by comparison of the retention times with the authentic samples. The substitution positions of the monosaccharides were determined by methylation analysis. The GLC- MS of the partially methylated alditol acetates revealed the presence of two derivatives: 1,4,5-tri-*O*-acetyl-6-deoxy-2,3-di-*O*-methylhexitol and 1,3,5-tri-*O*-acetyl-6-deoxy-2,4-di-*O*-methylhexitol. The glycosylation sites were determined based on the position of the *O*-acetyl groups: →4)-6-deoxyhexose and →3)-6-deoxyhexose, respectively. The absolute configurations of the monosaccharides were determined by GLC of the acetylated glycosides obtained by reaction with (*S*)-(+)-2-butanol. The results obtained revealed the presence of L-Rha and D-Fuc.

The ^{1}H NMR spectrum (Fig. 1A) of the OPS isolated from *D. aquatica* IFB0154 showed several proton signals in the anomeric region of δ 4.5–5.5, signals of the other carbohydrate protons in the region of δ 3.5–4.3, a number of characteristic signals of methyl groups derived from 6-deoxy sugars at δ 1.0–1.5, and a signal for *O*-acetyl groups at δ 2.19. Analysis of the ^{1}H,^{13}C HSQC spectrum revealed the presence of non-anomeric proton signals (δ 5.192/74.36 and 5.169/74.24) in the anomeric region. Moreover, unequal intensities of anomeric proton signals indicated that the OPS is probably partially *O*-acetylated.

The OPS was de-*O*-acetylated by using 200 mM NaOH [6]. The 1H NMR spectrum of the resultant polysaccharide (Fig. 1B) showed only two signals of similar intensities at δ 5.035 (A) and δ 5.017 (B) in the anomeric region and two signals for methyl groups of 6-deoxy hexoses at δ 1.187 and δ 1.357. The residues A and B were recognized by the NMR spectra as fucose and rhamnose, respectively. The α anomeric configuration of both sugar residues was assigned by the $^{1}J_{H\text{-}1,C\text{-}1}$ coupling constants values of ~171 Hz. The α anomeric configuration of both residues was confirmed by strong intra-residual A1/A2 and B1/B2 proton contacts in the ROESY spectrum (Fig. 2).

The COSY, TOCSY (Fig. S1), and HSQC (Fig. S2) NMR spectra were helpful in the assignment of all ^{1}H and ^{13}C chemical shifts (Table 1). The lack of carbon signals in the region of δ ~83–88 in the ^{13}C NMR spectrum showed that both monosaccharides occurred in the pyranose form. Relatively higher values of chemical shifts of carbon atoms for the residues A (C-3 δ 78.90) and B (C-4 δ 81.93) compared with the ^{13}C chemical shifts of the corresponding unsubstituted residues confirmed the positions of glycosylation. The ROESY spectrum (Fig. 2) showed the inter-residual A-1/B-4 and B-1/A-3 proton contacts.

In summary, the results of the compositional analyses and NMR data allowed identification of the following structure of the de-*O*-acetylated OPS:

→3)-α-D-Fuc*p*-(1 → 4)-α-L-Rha*p*-(1→

A B

The ^{1}H NMR spectrum of the OPS showed several overlapping signals in the anomeric region (Fig. 1A), which were allocated to various spin systems using the TOCSY spectra (Fig. S3). In the anomeric region of the HSQC spectrum, two characteristic cross-peaks for the O-acetylated carbon atoms (δ 5.192/74.36 and 5.169/74.24) were observed. The COSY, TOCSY, ROESY, HSQC (Figs. S3-S6), and HMBC experiments were helpful to identify six spin systems starting from the anomeric protons (Table 2). Two cross-peaks: a (δ 5.041/100.94) and b (δ 5.014/103.11) were similar to those of the residues A and B in de-*O*-acetylated OPS (Table 1). The remaining four spin systems possessed quite similar anomeric H-1/C-1 cross-peaks a1 (δ 5.093/100.55), b1 (δ 5.027/103.20), a2 (δ 5.046/100.94), and b2 (δ 5.049/102.80) but distinctly different other cross-peaks due to partial *O*-acetylation. The data obtained revealed the presence of three different Rha residues (without *O*Ac substitution, and with *O*Ac groups at position C-2 or C-3) and the corresponding three slightly different Fuc residues.

The degree of *O*-acetylation of the rhamnose residue was determined by integration of the signals in the anomeric region of the 1H NMR spectrum. The ratio of the peak areas of the anomeric protons to H-2 and

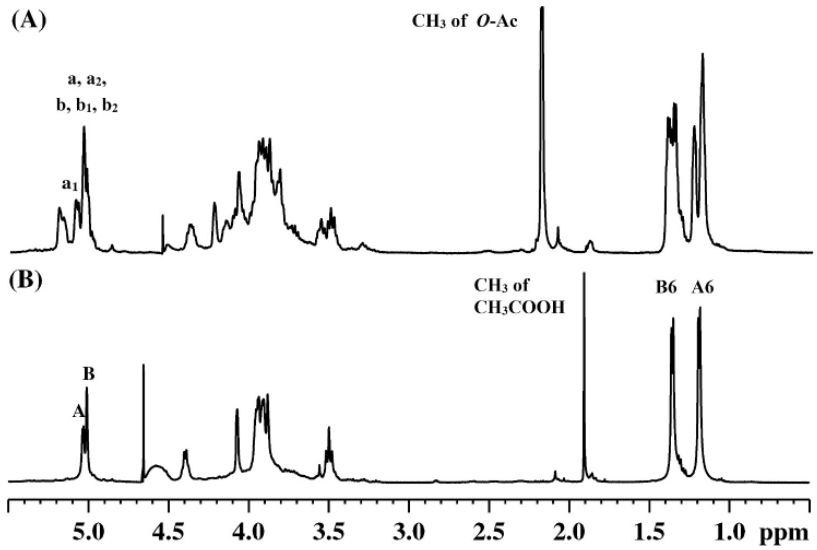


Fig. 1. ^{1}H NMR spectra of the OPS (A) and de-O-acetylated OPS (B) from *Dickeya aquatica* IFB0154.

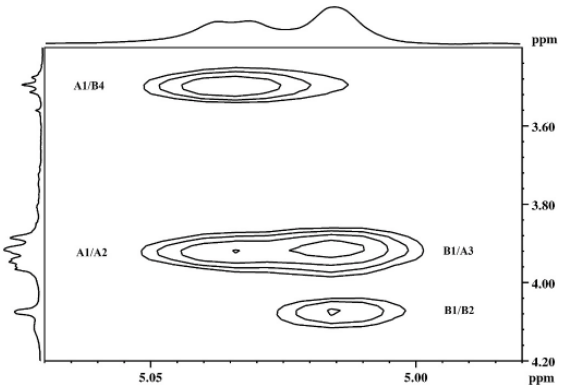


Fig. 2. Section of a ROESY spectrum of the de-*O*-acetylated OPS from *Dickeya aquatica* IFB0154.

H-3 of Rha (shifted downfield due to *O*-acetylation at O-2 and O-3) was ~2.0 : 0.7. Therefore, it was concluded that ~70% of the rhamnose residues was *O*-acetylated. Based on the ratio of the peak intensities H-2: H-3–4 : 3, the degree of *O*-acetylation at O-2 and O-3 of Rha was estimated to be 40% and 30%, respectively.

The NMR data and compositional analyses results allowed determination of the structure of the repeating unit of the OPS from *D. aquatica* IFB0154 consisting of the Fuc and partially *O*-acetylated Rha residues:

*O*Ac (~40%)

↓2

→3)-α-D-Fuc*p*-(1 → 4)-α-L-Rha*p*-(1→

a b ↑3

*O*Ac (~30%)

The same methods were applied for characterization of the OPS of *D. dianthicola* IFB0485 and *D. zeae* IPO946 isolated in Poland and the Netherlands, respectively. Both these strains have a different O-polysaccharide structure as compared to that of *D. aquatica* IFB0154.

Despite diverse geographical locations, years of isolation and taxonomic position *D. dianthicola* IFB0485, *D. zeae* IPO946, *Dickeya solani* (IFB0099, IFB0158, IFB0223, IPO2222 and F0120) and *D. dadantii* strain 3937 [7,8] possess the same structure of the O-polysaccharides consisting of a →2)-β-D-6dAlt*p*-(1→ homopolymer. *D. aquatica* strain IFB0154 isolated from water has a different OPS structure than that of the other investigated *Dickeya* spp. strains isolated from infected plants. This division is in accordance with the outcomes of phylogenetic analysis based on the proteome of diverse *Dickeya* species [5].

In that studies, *D. aquatica* forms a specific clade that is separated from those enclosing *D. solani*, *D. dadantii*, *D. dianthicola* or *D. zeae*. However, the genome-wide analyses involving also studies of the sequences of virulence-associated genes in different *Dickeya* species pointed to significant conservation in the whole *Dickeya* genus [9].

Table 1
^{1}H and ^{13}C NMR chemical shifts of the de-*O*-acetylated OPS from *Dickeya aquatica* IFB0154. Chemical shifts of the glycosylated carbon atoms are shown in bold.

Chemical shifts ^{1}H and ^{13}C (ppm)						
Residue	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
$^{1}J_{H-1,C-1}$	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
→3)-α-D-Fuc*p*-(1→	5.035	3.921	3.913	3.882	4.394	1.187
A	100.88	68.65	**78.90**	73.09	68.23	16.42
171 Hz						
→4)-α-L-Rha*p*-(1→	5.017	4.073	3.949	3.502	3.949	1.357
B	103.20	71.81	69.81	**81.93**	69.81	18.01
171 Hz						

3. Experimental

3.1. Bacteria isolation and cultivation

The *D. aquatica* strain IFB0154 (Dw0440) was isolated from waterways in Finland [2] and *D. zeae* strain IFB0031 (IPO946) from potato in the Netherlands. The samples were received from Prof. M. Pirhonen (University of Helsinki, Finland) and Dr. J. M. van der Wolf (Plant Research International, Wageningen, The Netherlands) respectively.

D. dianthicola IFB0485 (LMG28834) was isolated from symptomatic potato tuber in Poland at the Intercollegiate Faculty of Biotechnology University of Gdansk & Medical University of Gdansk (IFB UG & MUG) in 2013 [4]. All strains were kept at −80 °C.

To acquire approx. 50 g of the frozen bacterial biomass per strain, bacterial cells were grown on Trypticase Soy Agar plates (TSA) at 28 °C for 24 h. Then single bacterial colonies were utilized for inoculating 200 mL flasks with Trypticase Soy Broth (TSB) medium and subsequently incubated at 28 °C with 130 rpm shaking for 24 h. Each of these flasks was used for inoculation of 2000 mL TSB and subjected to 130 rpm shaking at 28 °C for 48 h. Finally, bacterial cells were collected with the use of Sorvall centrifuge (16,915.34×*g*, 10 min) and stored at −25 °C for further analyses.

3.2. LPS extraction and purification

Phenol, chloroform and petroleum ether extraction (PCP; v/v/v was 2:5:8 [10] and hot phenol extraction [11] were used for LPS isolation (107.1 mg) from dried bacterial cells (13.6 g) of *D. aquatica* IFB0154. The solution of PCP (80 mL) was added to the bacterial cells, mixed for 1 h and centrifuged (7012×*g*, 20 min, 4 °C) to remove the supernatant (the cells were re-extracted twice). The petroleum ether and chloroform were removed from the supernatant by rotary evaporation (40 °C, 30 min). Some drops of water were added to the remaining phenol solution, but it did not cause the lipooligosaccharide precipitation [12]. In the next step, the bacterial cells were suspended in the warm water (25 mL) and phenol (10 mL). The mixture was stirred at 65 °C for 90 min and centrifuged (7012×*g*, 20 min, 4 °C). The water phase obtained after three extractions was dialyzed (2 days), freeze-dried and dissolved in 10 mL of deionized water. 50 μL of DNAse and 50 μL of RNAse were added to the solution for RNA and DNA enzymatic digestion (12 h, 37 °C). Next 50 μL of Proteinase K solution were added and incubated at 55 °C for 5 h. Finally, the sample was dialyzed (2 days) and freeze-dried (107.1 mg).

Table 2
^{1}H and ^{13}C NMR chemical shifts of the OPS from *Dickeya aquatica* IFB0154. Chemical shifts of the glycosylated carbon atoms are shown in bold.

Chemical shifts ^{1}H and ^{13}C (ppm)						
Residue	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
→3)-α-D-Fuc*p*-(1→	5.041	3.933	3.914	3.880	4.379	1.185
a	100.94	68.57	**78.89**	72.97	68.31	16.42
→4)-α-L-Rha*p*-(1→	5.014	4.098	3.955	3.499	3.955	1.356
b	103.11	71.82	69.84	**81.97**	69.84	18.16
→3)-α-D-Fuc*p*-(1→	5.093	3.964	3.833	3.884	4.102	1.235
a_1	100.55	68.65	**78.84**	73.15	68.29	16.73
→4)-α-L-Rha*p*-(1→	5.027	4.217	5.169	3.820	4.056	1.400
b_1	103.20	69.56	74.24	**77.52**	70.12	18.52
→3)-α-D-Fuc*p*-(1→	5.046	3.933	3.914	3.880	4.379	1.185
a_2	100.94	68.57	**78.89**	72.97	68.31	16.42
→4)-α-L-Rha*p*-(1→	5.049	5.192	4.164	3.560	4.000	1.371
b_2	102.80	74.36	68.61	**81.87**	70.03	18.01
-*O*Ac	–	2.186				
	174.70	22.06				
-*O*Ac	–	2.193				
	174.70	22.06				

3.3. Isolation of OPS

The LPS (107.1 mg) was hydrolyzed with 1% acetic acid at 100 °C for 1 h. The lipid A precipitate was separated by centrifugation (7012×*g*, 20 min, 4 °C). The supernatant containing the sugar part was evaporated with methanol under vacuum to eliminate acetic acid, dissolved in water (5 mL) and freeze-dried. The obtained sugar fraction (62.8 mg) was dissolved in 1.5 mL of distilled water, purified and fractionated by gel permeation chromatography on Superdex 75 column (120 × 1 cm) with water as eluent. The process of separation was monitored using a Jasco RI-2031 differential refractometer detector. The collected fractions were freeze-dried and analyzed by ^{1}H NMR. The obtained high molecular weight OPS (12.3 mg) was analyzed by NMR spectroscopy and the chemical methods. The part of the OPS was de-*O*-acetylated (200 mM NaOH, 15 min).

3.4. Chemical analysis

Sugar analysis was performed to identify and determine the number of monosaccharide residues in OPS. The sample containing O-antigen (about 0.5 mg) was hydrolyzed with 300 μL of trifluoroacetic acid (2 M TFA) at 120 °C for 2 h, reduced with sodium borohydride ($NaBH_4$) and acetylated in 200 μL of acetic anhydride in the presence of a pinch of sodium acetate (120 °C, 2 h). The obtained alditol acetates derivatives were analyzed by GLC-MS.

The methylation analysis was used to determine the substitution position of the monosaccharides in the OPS. It was performed according to Ciukanu and Kerek method, using DMSO as a solvent in the presence of KOH and methyl iodide added in three portions (3 × 50 μL) [13]. The methylated OPS was hydrolyzed, reduced and acetylated, as described in the sugar analysis procedure. The obtained partially methylated alditol acetates were analyzed by GLC-MS.

Reaction with (*S*)-(+)-2-butanol was performed to assign an absolute configuration (D or L) of the monosaccharides. The obtained acetylated 2-butyl glycosides were analyzed by GLC [14].

3.5. GLC and GLC-MS techniques

GLC analyses were performed on GC 8000 (Fisons Instruments) gas chromatography system with FID detector, equipped with a capillary column Rtx-5 (30 m), for the sugar and methylation analyses products, and a capillary column Rtx-2330 (60 m) for the acetylated 2-butyl glycosides. The column temperature program from 120 °C to 265 °C was used at the rate of 4 °C min^{-1} followed by 10 min at 265 °C [15].

GLC-MS analyses were performed by using a GC MS-QP2010 SE (SHIMADZU) instrument equipped with a capillary column Rtx-5 (30 m). The used temperature programs were the same as described above. The ion source temperature was 200 °C, and the recorded mass range was 45–600 *m/z*.

3.6. NMR spectroscopy

The samples were dissolved in 1 mL of 99.9% D_2O, freeze-dried to exchange labile protons, and dissolved in 0.6 mL of 99.95% D_2O. 1D and 2D NMR spectra (^{1}H, ^{1}H-^{1}H COSY, TOCSY, ROESY and ^{1}H-^{13}C HSQC, HMBC) were recorded using a Bruker Avance III 500 MHz spectrometer at 45 °C for 5.6 mg of the OPS, and 35 °C for the OPS after de-*O*-acetylation. Bruker TopSpin 3.6 program was used to acquire and process the NMR data. A spin-lock time of 120 ms and mixing time of 200 ms were used in TOCSY and ROESY experiments, respectively. Chemical shifts were referenced to the internal standard of acetone (δ_H 2.225; δ_C 31.45).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Special thanks to Dr. Małgorzata Czerwicka-Pach for the help with GLC-MS analyses. We also want to acknowledge Prof. Minna Pirhonen for provision of the *D. aquatica* strain Dw0440 (IFB0154) isolated in Finland and Dr. Jan van der Wolf for provision of the *D. zeae* strain IPO946 (IFB0031) isolated in The Netherlands. The presented work was funded by National Science Centre in Poland (Narodowe Centrum Nauki) *via* projects: UMO-2014/14/M/NZ8/00501 attributed to EL.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108135.

References

[1] M. Adeolu, S. Alnajar, S.G.R. Naushad, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66 (2016) 5575–5599.
[2] J. Laurila, V. Ahola, A. Lehtinen, T. Joutsjoki, A. Hannukkala, A. Rahkonen, M. Pirhonen, Eur. J. Plant Pathol. 122 (2008) 213–225.
[3] N. Parkinson, P. DeVos, M. Pirhonen, J. Elphinstone, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64 (2014) 2264–2266.
[4] M. Potrykus, M. Golanowska, W. Sledz, S. Zoledowska, A. Motyka, A. Kolodziejska, J. Butrymowicz, E. Lojkowska, Plant Dis. 100 (2016) 408–417.
[5] A. Duprey, N. Taib, S. Leonard, T. Garin, J.P. Flandrois, W. Nasser, C. Brochier-Armanet, S. Reverchon, Environ. Microbiol. 8 (2019) 2809–2835.
[6] N. Ravenscroft, P. Cescutti, M. Gavini, G. Stefanetti, C.A. MacLennan, L.B. Martin, F. Micoli, Carbohydr. Res. 404 (2015) 108–116.
[7] K. Ossowska, M. Czerwicka, W. Sledz, S. Zoledowska, A. Motyka, M. Golanowska, G. Condemine, E. Lojkowska, Z. Kaczynski, Carbohydr. Res. 445 (2017) 40–43.
[8] A.P. Kabanova, M.M. Shneider, A.A. Korzhenkov, E.N. Bugaeva, K.K. Miroshnikov, E.L. Zdorovenko, E.E. Kulikov, S.V. Toschakov, A.N. Ignatov, Y.A. Knirel, K. A. Miroshnikov, Front. Microbiol. 9 (2019) e3288, https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03288.
[9] J. Pédron, F. Van Gijsegem, OBM Genet 3 (2019), https://doi.org/10.21926/obm.genet.1904098 e098.
[10] C. Galanos, O. Lüderitz, O. Westphal, Eur. J. Biochem. 9 (1969) 245–249.
[11] O. Westphal, K. Jann, Methods Carbohydr 5 (1965) 83–91.
[12] X. Wang, C. Zhang, F. Shi, X. Hu, Purification and characterization of lipopolysaccharides, in: Endotoxins: Structure, Function and Recognition, Springer, Dordrecht, 2010, pp. 27–51.
[13] I. Ciucanu, F. Kerek, Carbohydr. Res. 131 (1984) 209–217.
[14] K. Marszewska, M. Czerwicka, S.J. Forsythe, K. Ossowska, H. Dziadziuszko, Z. Kaczyński, Carbohydr. Res. 407 (2015) 55–58.
[15] S. Szulta, M. Czerwicka, S.J. Forsythe, K. Ossowska, K. Dziadziuszko, Z. Kaczyński, Carbohydr. Res. 431 (2016) 39–41.

Załącznik D2

Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Babińska, W., Motyka-Pomagruk, A., Śledź, W., Łojkowska, E., Kaczyński, Z. (2022). The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. *Carbohydrate Research*, *522*, 108696. https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108696

Carbohydrate Research 522 (2022) 108696

Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carres

The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637

Agnieszka Kowalczyk [a], Nikola Szpakowska [a], Weronika Babinska [b,c], Agata Motyka-Pomagruk [b,c], Wojciech Sledz [b,c], Ewa Lojkowska [b,c], Zbigniew Kaczyński [a,*]

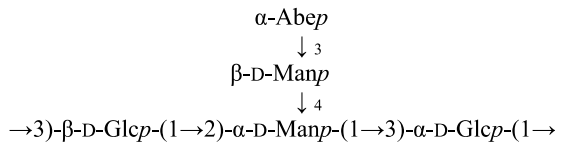
[a] *Laboratory of Structural Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Gdansk, 63 Wita Stwosza, 80-308, Gdansk, Poland*
[b] *Laboratory of Plant Protection and Biotechnology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdansk and Medical University of Gdansk, University of Gdansk, 58 Abrahama, 80-307, Gdansk, Poland*
[c] *Research and Development Laboratory, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdansk and Medical University of Gdansk, University of Gdansk, 20 Podwale Przedmiejskie, 80-824, Gdansk, Poland*

ARTICLE INFO

Keywords:
O-specific polysaccharide
Abequose
3,6-dideoxy-D-*xylo*-hexose
Pectinolytic bacteria
Plant pathogens

ABSTRACT

Soft rot and blackleg diseases, caused by pectinolytic bacteria from the numerous species of *Dickeya* and *Pectobacterium*, pose a serious threat to the world potato production. Besides, infections triggered by these pectinolytic bacteria lead to huge economic losses in the cultivation of other crops, vegetables, and ornamentals. Strains belonging to the genus *Pectobacterium* tend to be isolated from various environments such as rotten or asymptomatic plants, weeds, soil or water. The main virulence factors of these phytopathogenic bacteria involve plant cell wall degrading enzymes (PCWDEs) *i.e.* pectinases, cellulases and proteases. Among accessory virulence factors, there is often lipopolysaccharide (LPS) listed. This constituent of the external part of bacterial cell wall contains lipid A, inner and outer core in addition to O-polysaccharide (OPS). LPS plays an important role in plant-microbe interactions, in particular during the first step of pathogen recognition. In this study we present the chemical structure of OPS of the first *Pectobacterium aquaticum* strain (IFB5637) isolated from water in Poland. The OPS consists of two common hexoses, such as mannose and glucose, as well as an abequose (3,6-dideoxy-D-*xylo*-hexose), the first 3,6-dideoxyhexose identified among the *Pectobacteriaceae* family:



According to our best knowledge this is the first determined structure of the OPS of *P. aquaticum*.

1. Introduction

Pectinolytic bacteria from the genera *Pectobacterium* and *Dickeya* belonging to the *Pectobacteriaceae* family cause blackleg and soft rot diseases on potato and soft rot on a wide range of plants, including important crops, vegetables and ornamentals [1]. The strains from the genus *Pectobacterium* tend to be isolated not only from infected, symptomatic or asymptomatic plants, but also from soil or water. The species *Pectobacterium aquaticum* was established by Pedron at al. after isolation and characterisation of the strains originating from different waterways of South-Eastern France [2]. *P. aquaticum* IFB5637 is the first strain belonging to this species that has been isolated from a lake in Poland [3]. Previous studies [2,3] indicated that *P. aquaticum* was able to produce a broad spectrum of virulence factors including plant cell wall degrading enzymes (PCWDEs), such as pectinases, cellulases and proteases. Despite the fact that *P. aquaticum* strains have been collected from aquatic

* Corresponding author.
E-mail address: zbigniew.kaczynski@ug.edu.pl (Z. Kaczyński).

https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108696
Received 26 August 2022; Received in revised form 25 September 2022; Accepted 27 September 2022
Available online 4 October 2022
0008-6215/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

environments, these bacteria are capable of macerating potato and chicory tissues under laboratory conditions [2,3].

Among the accessory virulence factors of soft rot *Pectobacteriaceae* (SRP), an external constituent of the bacterial cell wall, namely lipopolysaccharide (LPS), is often listed. This molecule consists of lipid A, inner and outer core in addition to O-polysaccharide (OPS) and plays a role in plant-microbe interactions, in particular during the first step of infection involving recognition of the pathogen. In the current research, we aimed at elucidating the chemical structure of OPS of *P. aquaticum* IFB5637 and conducting a comparative study with the earlier identified OPS molecules of the other members of the *Pectobacterium* genus.

2. Results

In order to determine the chemical structure of O-polysaccharide of *P. aquaticum* IFB5637 [3], the LPS was isolated from bacterial cells using two types of extractions: PCP (Phenol-Chloroform-Petroleum ether) [4] and hot phenol-water extraction [5], then purified by enzymatic digestion. The extracted LPS was hydrolyzed to separate the lipid A from the sugar part. Lipid A was centrifuged, and the sugar portion was separated by size-exclusion chromatography (SEC). Proton nuclear magnetic resonance (^{1}H NMR) spectra were recorded for the obtained fractions. Based on them, a fraction containing pure polysaccharide was selected and used for further structural studies.

The obtained OPS was characterized by chemical methods. The sugar analysis was used to identify monosaccharides and to determine their number in the repeating unit of the OPS. The gas-liquid chromatography-mass spectrometry (GLC-MS) analysis of the obtained derivatives showed the presence of two different hexoses in the molar ratio ~1:1. The hexoses were identified as mannose and glucose by gas-liquid chromatography (GLC) analysis of the alditol acetates derivatives with the corresponding standards. The absolute configuration of the monosaccharides was established by GLC analysis of the synthesized (*R*,*S*)- and (*S*)-2-butyl-glycosides of sugar residues of the OPS and the respective standards. The absolute configuration D was determined for both Glc and Man. The results of methylation analyses revealed the presence of three partially methylated alditol acetate derivatives: two different 1,3,5-tri-*O*-acetyl-2,4,6-tri-*O*-methylhexitol and 1,2,4,5-tetra-*O*-acetyl-3,6-di-*O*-methylhexitol in the approximate molar ratio 2 : 1: 1. Taking into account the results of the sugar analysis, the presence of 2x →3)-Glc, →3)-Man and →2,4)-Man residues or 2x →3)-Man, →3)-Glc and →2,4)-Glc residues can be assumed. Wondering at this stage of the analysis was the presence of a branching sugar residue and the absence of a terminal sugar residue.

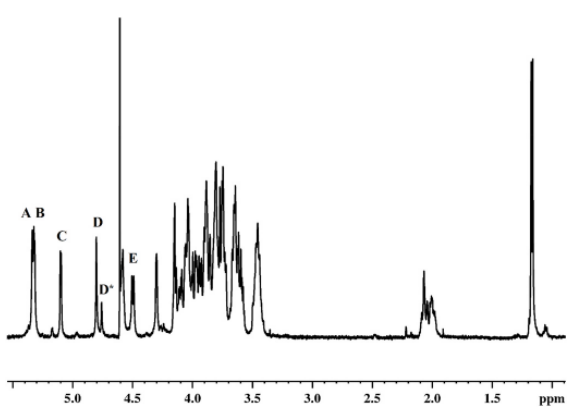


Fig. 1. ^{1}H NMR spectrum of the OPS isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. The letters refer to the monosaccharides residues as defined in Table 1.

The next step in the structural analysis was the interpretation of the recorded NMR spectra to identify the spin systems and to determine the number, the ring size, the α or β anomeric configuration, the position of the substitutions and the sequence of the sugar residues in the repeating unit of the OPS [6]. The analysis of the ^{1}H NMR spectrum (Fig. 1) and HSQC (heteronuclear single quantum coherence) spectrum (Fig. 1S) in the characteristic range of the anomeric proton spectrum clearly showed that the O-antigen of the bacterium *P. aquaticum* IFB5637 is composed of five sugar units. This observation was inconsistent with the results of chemical analysis, which revealed the presence of only four sugar residues. The inaccuracy was clarified during the subsequent steps of NMR spectra analysis. The signals labeled **A-E** represent five anomeric protons at δ: 5.333 (**A**), 5.319 (**B**), 5.097 (**C**), 4.797 (**D**) and 4.493 (**E**) in the estimated molar ratio 1:1:1:1:1. The proton spectrum contains also a characteristic signal of methyl group of 6-deoxy monosaccharide at δ ~1.2, a signal of –CH_2 group (probably) at δ ~2.0 and the remaining protons signals in the region of δ 3.4–4.3. The analysis of one-dimensional ^{1}H NMR spectrum together with two-dimensional NMR spectra [homonuclear COSY (correlation spectroscopy; Fig. 2S) and TOCSY (total correlation spectroscopy), as well as heteronuclear HSQC, HSQC-TOCSY (heteronuclear single quantum coherence - total correlation spectroscopy) and HMBC (heteronuclear multiple bound correlation)] allowed for the assignment of chemical shifts to all protons and carbon atoms (Table 1). The detailed analysis of chemical shifts of carbon atoms also enabled determination of the size of the sugar rings. The absence of carbon signals in the region of δ 83–88 (except for the glycosylated C-3 of the residue **E** at δ 83.52) indicated the pyranose rings for all the sugar residues. Based on the results of the sugar analysis and NMR data the **A** and **D** spin systems were found to have a *manno* configuration, while the **B** and **E** spin systems had a *gluco* configuration. The remaining spin system **C** possessed the *galacto* configuration and was identified as a 3,6-dideoxygalactose (3,6-dideoxy-*xylo*-hexose residue). This sugar residue was not identified in the sugar analysis because it was degraded under the classical analysis conditions.

The anomeric configuration of the individual sugar residues was determined by chemical shifts and coupling constants. The ^{1}H NMR spectrum of the anomeric region showed three signals with $\delta > 5$ and two signals with $\delta < 5$. These values indicate the α anomeric configuration of the residues **A**, **B** and **C** and the β anomeric configuration for residues **D** and **E**. This assumption was clearly confirmed by the corresponding values of the coupling constants obtained from HSQC NMR spectrum (recorded without decoupling) as well as ^{1}H NMR spectrum: **A** ($^1J_{(H\text{-}1,C\text{-}1)}$ = 174 Hz), **B** ($^1J_{(H\text{-}1,C\text{-}1)}$ = 173 Hz, $^3J_{(H\text{-}1,H\text{-}2)}$ = 3.3 Hz), **C** ($^1J_{(H\text{-}1,C\text{-}1)}$ = 171 Hz, $^3J_{(H\text{-}1,H\text{-}2)}$ = 3.4 Hz), **D** ($^1J_{(H\text{-}1,C\text{-}1)}$ = 160 Hz), and **E** ($^1J_{(H\text{-}1,C\text{-}1)}$ = 161 Hz, $^3J_{(H\text{-}1,H\text{-}2)}$ = 7.8 Hz). Low-field shifted signals of the carbon atoms (underlined in Table 1) **A**2 (δ 77.93), **A**4 (δ 77.38), **B**3 (δ 81.64), **D**3 (δ 82.05), and **E**3 (δ 83.52) compared with those of the unsubstituted sugars [7] proved glycosylation at C-2 and C-4 of residue **A**, at C-3 of residue **B**, at C-3 of residue **D**, and at C-3 of residue **E**. The remaining residue **C** was identified as a terminal monosaccharide.

The sequence of the monosaccharides in the OPS was assigned using ROESY (rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy) and HMBC NMR spectra. The following strong *inter*-residual NOE correlations were observed in the section of the ROESY spectrum (Fig. 2): **A1/B3**, **B1/E3**, **C1/D3**, **D1/A4** and **E1/A2**. Moreover, the section of the HMBC spectrum (Fig. 3) allowed for identification of the *inter*-residual carbon-proton correlations: C-1 of **A** and H-3 of **B** (δ 100.28/3.889), C-1 of **B** and H-3 of **E** (δ 100.44/3.644), C-1 of **C** and H-3 of **D** (δ 101.69/3.740), C-1 of **D** and H-4 of **A** (δ 101.13/3.980), as well as C-1 of **E** and H-2 of **A** (δ 102.76/4.293).

The absolute configuration of the 3,6-dideoxy-*xylo*-hexose residue was deduced by a comparison of the observed α-glycosylation effects (δ) on the substituted carbon atom C-3 and the neighboring carbon atom C-2 of Man residue with the expected values [7,8]. The observed effect δ +7.7 for C-3 (expected δ +7.5 for DD and δ +5.5 for DL) and δ −0.5 for C-2 (expected δ −0.2 for DD and δ −3.3 for DL) clearly indicates that both

Table 1
^{1}H and ^{13}C NMR data of the OPS isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. The substituted carbon atoms are underlined.

Residue	Coupling constants [Hz]	Chemical shifts ^{1}H and ^{13}C (ppm)					
	$^{1}J_{(H-1-C-1)}$ $^{3}J_{(H-1-H-2)}$	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6 C6
A	174	5.333	4.293	4.096	3.980	4.041	3.831/3.831
→2,4)-α-D-Man*p*-(1→	nd	100.28	77.93	69.46	77.38	72.50	61.16
B	173	5.319	3.624	3.889	3.594	4.037	3.804/3.851
→3)-α-D-Glc*p*-(1→	3.3	100.44	71.38	81.64	70.92	72.68	61.32
C	171	5.097	4.017	2.054/1.997	3.875	4.140	1.165
α-Abe*p*-(1→	3.4	101.69	64.71	34.11	69.52	68.07	16.52
D	160	4.797	4.147	3.740	3.756	3.472	3.955/3.754
→3)-β-D-Man*p*-(1→	nd	101.13	71.96	82.05	66.99	77.34	62.17
D*	160	4.753	4.064	3.660[a]	3.652[a]	3.416	3.955/3.754
β-D-Man*p*-(1→	nd	101.30	71.85	73.26	68.19	77.28	62.17
E	161	4.493	3.451	3.644	3.652	3.447	3.906/3.733
→3)-β-D-Glc*p*-(1→	7.8	102.76	72.68	83.52	71.15	76.86	61.69

[a] Approximate ^{1}H chemical shifts.

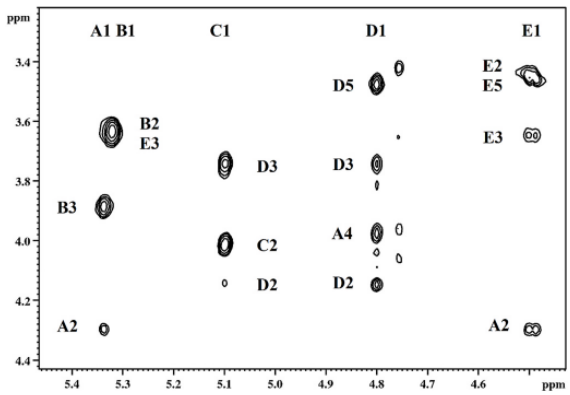


Fig. 2. The section of ROESY spectrum of the OPS isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. The letters refer to the monosaccharides residues as defined in Table 1, and the Arabic numerals refer to the protons in the respective residues.

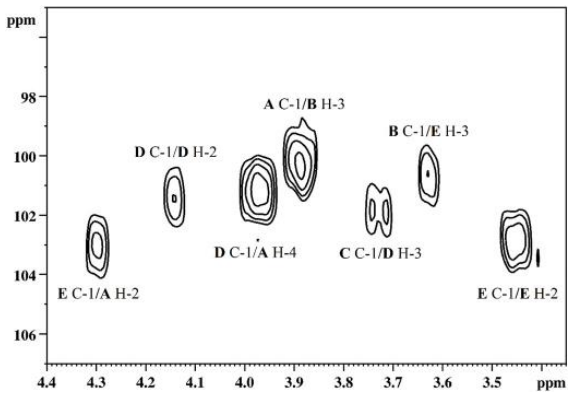


Fig. 3. The section of HMBC spectrum of the OPS isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. The letters refer to the monosaccharides residues as defined in Table 1, and the Arabic numerals refer to the carbon atoms or the protons in the respective residues.

sugar residues in the disaccharide α-3,6-dideoxy-*xylo*-hexopyranose-(1 → 3)-β-Man*p* form a pair with the same absolute configuration (DD). This data revealed the presence of 3,6-dideoxy-D-*xylo*-hexose (abequose, Abe) in the studied OPS.

Moreover, the origin of a small signal labeled as **D*** (δ 4.753) in the anomeric region of ^{1}H NMR spectrum was analyzed in detail. The **D*** spin system was found to be a terminal mannose residue. The integration of all signals in the anomeric region revealed that the molar ratio of **A** + **B** (not resolved signals):**C**:**D**:**D***:**E** is respectively 2:0.8:0.8:0.2:1. The reduced intensity of the signals **C** and **D** (~0.8 each) compared to **A**, **B** and **E** (~1.0 each) and the presence of a terminal mannose (~0.2) indicates that the residue **D** is non-stoichiometric substituted by Abe (~80%). Probably part of Abe was decomposed during isolation of the LPS and preparation of the OPS.

The results of the chemical analyses and NMR spectroscopy revealed that the OPS isolated from *P aquaticum* IFB5637 consisted of the pentasaccharidic repeating units:

α-Abe*p* **C**

↓ 3

β-D-Man*p* **D**

↓ 4

→3)-β-D-Glc*p*-(1→2)-α-D-Man*p*-(1→3)-α-D-Glc*p*-(1→

E **A** **B**

In conclusion, the structure of the chemical repeating unit of the OPS of the LPS from *P. aquaticum* IFB5637 was established, representing a novel structure not found before in any other OPS of the plant pathogenic bacteria studied so far. According to our best knowledge, this is the first assigned structure of the OPS isolated from *P. aquaticum*. The characterized OPS consists of two common hexoses (Man, Glc), as well as an abequose, first time identified among the *Pectobacteriaceae* family. Abequose is an unusual monosaccharide, which can be found almost exclusively in O-antigenic components of bacterial lipopolysaccharides [9]. Abequose has been found earlier in the O-antigens of different bacteria, including *Salmonella* serogroup B [10], *Citrobacter freundii* O35 and O38 [11], *Citrobacter freundii* O22 strain PCM 1555 [8], *Edwardsiella tarda* PCM 1153 [12], as well as in *Yersinia pseudotuberculosis* complex

[13]. Based on the proposed structure and the other data published so far (structures below), it is possible to conclude that there is a high structural diversity in the OPS isolated from different *Pectobacterium* spp. strains.

The published structures of O-polysaccharides of *Pectobacteriaceae*:

Pectobacterium atrosepticum SCRI1039 [14]:

α-L-Fuc*p*XAc (where X is 2 or 3 or 4)
↓3
→3)-β-D-Glc*pN*Ac-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→2)-α-D-Glc*p*-(1→

P. atrosepticum SCRI1043 [15]:

β-D-Erw*p*-(1→3)-α-D-Gal*p*2Ac
↓3
→3)-α-D-Gal*p*-(1→2)-α-D-Man*p*-(1→4)-α-L-Rha*p*(1→

Pectobacterium brasiliense F152 [16]:

α-L-6dTal*p*Ac$_{0\text{-}2}$
↓3
→4)-α-D-Man*p*6Ac-(1→2)-α-D-Man*p*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→

Pectobacterium parmentieri IFB5408 and IFB5427 [17]:

β-D-Man*pN*Ac
↓3
→3)-β-D-Gal*pN*Ac-(1→3)-α-D-Gal*p*-(1→4)-β-D-Gal*p*-(1→

P. parmentieri SCC3193 and IFB5432 [18]:

→3)-β-D-Gal*f*-(1→3)-α-D-Gal*p*-(1→8)-β-Pse*p*4Ac5Ac7Ac-(2→6)-α-D-Glc*p*-(1→6)-β-D-Glc*p*-(1→

Pse is 5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeoxy-L-*glycero*-L-manno-non-2-ulosonic acid.

3. Materials and methods

3.1. Isolation and cultivation of P. aquaticum IFB5637

P. aquaticum IFB5637 strain was isolated in October 2016 from the Jeleń Lake, located in the region of Kashubia (54° 12′04.4 ″ N 17° 31′31.5 ″ E), Poland [3]. This isolate was grown on Crystal Violet Pectate (CVP) medium and identified to the species level with the use of polymerase chain reactions (PCR) and sequencing of *recA* and *dnaX* housekeeping genes as described previously [3].

To obtain bacterial biomass for LPS isolation, *P. aquaticum* IFB5637 kept in a stock at −80 °C was plated on trypticase soy agar (TSA, Oxoid, Basingstoke, UK) medium. After 24 h incubation at 28 °C, 200 mL of trypticase soy broth (TSB, Oxoid, Basingstoke, UK) was inoculated with a single bacterial colony picked from the TSA plate and incubated at 28 °C with 130 rpm shaking for 24 h. This overnight culture was subsequently poured into 2000 mL of TSB medium. Incubation for 48 h at 28 °C with 130 rpm shaking followed. Then, bacterial cells were harvested using centrifugation at 16,915.34×*g* for 10 min with a 6-16 KS (Sigma, Kanagawa, Japan) device. The collected bacterial cells were stored afterwards at −20 °C for further analyses. The cultivation procedure was repeated until a sufficient amount of bacterial biomass of *P. aquaticum* IFB5637 was obtained.

3.2. Extraction and purification of the LPS

Two types of extraction were used to isolate the LPS: PCP and hot phenol-water extraction. The bacterial cells were extracted by stirring with 100 mL of PCP mixture (phenol, chloroform, and petroleum ether; v/v/v 2:5:8) for 90 min and centrifuged (7012×*g*, 20 min, 4 °C). Then, the bacterial cells were extracted two more times with 90 mL of PCP mixture for 30 min and centrifuged under the same conditions. Petroleum ether and chloroform were removed from the supernatant using a rotary evaporator (30 min, 40 °C). Deionized water (~300 μL), which was added to the obtained phenolic layer did not cause any precipitation. Therefore, it was assumed that the studied bacterial strain does not produce the rough LPS. The smooth LPS (355 mg) was isolated from dry bacterial cells (18.39 g) of *P. aquaticum* IFB5637 using hot phenol-water extraction. The bacterial cells were suspended in warm water (100 mL) and phenol (20 mL). The mixture was stirred for 90 min at 65 °C and centrifuged (7012×*g*, 20 min, 4 °C). The water phase was collected, then the step was repeated with 40 mL of warm water. The sample obtained after two extractions (~100 mL) was dialyzed for 2 days, freeze-dried, and subjected to enzymatic digestion to remove proteins and nucleic acids. For this purpose, 895 mg from 1334 mg of the lyophilized sample was dissolved in 50 mL of buffer (100 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, at pH 7.5 with 1 M HCl) and addition of the pinches of DNAse I and RNAse (6.5 h, 37 °C). Then, some Proteinase K was added, and the sample was incubated at 55 °C overnight, dialyzed (2 days) and freeze-dried.

3.3. Isolation and preparation of the OPS

The LPS was hydrolyzed with 1% acetic acid (1 mL of acid for every 10 mg of sample) at 100 °C for 1.5 h and the obtained precipitate of lipid A was separated by centrifugation (7012×*g*, 20 min, 4 °C). The supernatant was evaporated with methanol to remove acetic acid, dissolved in 10 mL of deionized water and freeze-dried (272.5 mg). Part of the obtained fraction (44.5 mg) was dissolved in 1.5 mL of deionized water and fractionated by gel-permeation chromatography (GPC) on a column (120 × 1 cm) of Bio-Gel P-30 with deionized water as an eluent using a differential refractometer detector Jasco RI-2031A for monitoring the separation process. The collected fractions were freeze-dried and the ^{1}H NMR spectrum was recorded. The yield of the isolated high-molecular-mass O-polysaccharide was ~15 mg (~33% of the LPS weight).

3.4. NMR spectroscopy

The sample of the OPS (3 mg) was exchanged twice with 1 mL of 99.5% D_2O, freeze-dried and finally dissolved in 0.6 mL of 99.95% D_2O. 1D and 2D NMR spectra (^{1}H–^{1}H COSY, TOCSY, ROESY and ^{1}H–^{13}C HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC) were recorded at 40 °C using a Bruker Avance III 500 MHz spectrometer. Bruker TopSpin 3.6.2 software was used to acquire and process the NMR data. The chemical shifts were referenced to the internal standard of acetone (δ_H 2.225; δ_C 31.45). The COSY, the TOCSY, and the ROESY experiments were recorded by using

data sets of 4096 × 256 points. The $^{1}H,^{13}C$ HSQC, the $^{1}H,^{13}C$ HSQC-TOCSY, and the $^{1}H,^{13}C$ HMBC experiments were recorded in ^{1}H-detection mode using data sets of 2048 × 256 points. The TOCSY experiment was performed with spinlock times of 100 ms.

3.5. Chemical analyzes

The sugar analysis was carried out to identify and determine the number of sugar residues in the repeating unit of the OPS. The OPS (0.8 mg) was hydrolyzed with 2 M trifluoroacetic acid (2 h, at 120 °C), the obtained monosaccharides were reduced with sodium borohydride overnight and the resulting alditols were acetylated with 200 μL of acetic anhydride in the presence of sodium acetate (2 h at 120 °C). The methylation analysis was performed to determine the substitution positions of sugar residues [19]. The OPS (1 mg) was methylated using DMSO (300 μL) as a solvent in the presence of KOH and methyl iodide (3 × 50 μL). The per-*O*-methylated polysaccharide was hydrolyzed, reduced, and acetylated as described above in the sugar analysis procedure.

Determination of the absolute configuration of the monosaccharides was carried out using GLC analysis of the obtained 2-butyl glycosides. The OPS was hydrolyzed. The obtained monosaccharides were reacted with (*S*)-(+)-butan-2-ol and then acetylated [20].

The derivatives of alditol acetates, partially methylated alditol acetates, and 2-butyl glycosides were analyzed using GLC and GLC-MS.

3.6. GLC and GLC-MS techniques

All GLC analyzes were performed using gas chromatograph GC-2010 Pro (Shimadzu) with a flame ionization detector (FID) detector equipped with a Rtx-2330 capillary column (length: 60 m, inner diameter: 0.25 mm, film thickness: 0.2 μm) for but-2-yl glycosides and with a capillary Rtx-5 column (length: 30 m, inner diameter: 0.25 mm, film thickness: 0.25 μm) for alditol acetates. In GLC analyzes the carrier gas was Ar. The temperature program from 120 °C to 260 °C, rate 2 °C min^{-1}, then 30 min isotherm at 260 °C was used. GLC-MS analyzes were performed on gas chromatograph coupled with mass spectrometry GC MS-QP2010 SE (Shimadzu) with a capillary column Rtx-5. In GLC-MS analyzes the carrier gas was He. The temperature program from 120 °C to 265 °C, rate 4 °C min^{-1}, 10 min isotherm at 265 °C was used. The mass spectra were recorded under the following conditions: EI ionization (70 eV), ion source temperature 220 °C and recorded mass range from 43 to 550 *m/z*.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

All the data are included in this article.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108696.

References

[1] I.K. Toth, J.M. van der Wolf, G. Saddler, E. Lojkowska, V. Hélias, M. Pirhonen, L. Tsror (Lahkim), J.G. Elphinstone, *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe, Plant Pathol. 60 (2011) 385–399, https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02427.x.

[2] J. Pédron, C. Bertrand, G. Taghouti, P. Portier, M.-A. Barny, *Pectobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from waterways, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 69 (2019) 745–751, https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003229.

[3] W. Babinska, A. Motyka-Pomagruk, W. Sledz, A. Kowalczyk, Z. Kaczynski, E. Lojkowska, The first polish isolate of a novel species *Pectobacterium aquaticum* originates from a Pomeranian lake, Int. J. Environ. Res. Publ. Health 18 (2021) 5041, https://doi.org/10.3390/ijerph18095041.

[4] C. Galanos, O. Lüderitz, O. Westphal, A new method for the extraction of R lipopolysaccharides, Eur. J. Biochem. 9 (1969) 245–249, https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00601.x.

[5] O. Westphal, K. Jann, Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure, Methods Carbohydr. Chem. 5 (1965) 83–91.

[6] C. De Castro, M. Parrilli, O. Holst, A. Molinaro, Chapter five - microbe-associated molecular patterns in innate immunity: extraction and chemical analysis of gram-negative bacterial lipopolysaccharides, in: M. Fukuda (Ed.), Methods in Enzymology, Academic Press, 2010, pp. 89–115, https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)80005-9.

[7] G.M. Lipkind, A.S. Shashkov, Y.A. Knirel, E.V. Vinogradov, N.K. Kochetkov, A computer-assisted structural analysis of regular polysaccharides on the basis of 13C-n.m.r. data, Carbohydr. Res. 175 (1988) 59–75, https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80156-3.

[8] E. Katzenellenbogen, N.A. Kocharova, P.V. Toukach, S. Górska, A. Korzeniowska-Kowal, M. Bogulska, A. Gamian, Y.A. Knirel, Structure of an abequose-containing O-polysaccharide from *Citrobacter freundii* O22 strain PCM 1555, Carbohydr. Res. 344 (2009) 1724–1728, https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.06.005.

[9] Y.A. Knirel, N.K. Kochetkov, Structure of lipopolysaccharides from gram-negative bacteria. III. Structure of O-specific polysaccharides, Biokhimiia (Moscow, Russia) 59 (1994) 1784–1851.

[10] Z. Kaczyński, J. Gajdus, H. Dziadziuszko, P. Stepnowski, Chemical structure of the somatic antigen isolated from *Salmonella* Abortusequi (O4), J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 50 (2009) 679–682, https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.10.013.

[11] N.A. Kocharova, Y.A. Knirel, E.S. Stanislavsky, E.V. Kholodkova, C. Lugowski, W. Jachymek, E. Romanowska, Structural and serological studies of lipopolysaccharides of *Citrobacter* O35 and O38 antigenically related to *Salmonella*, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 13 (1996) 1–8, https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1996.tb00209.x.

[12] E. Katzenellenbogen, N.A. Kocharova, P.V. Toukach, S. Górska, M. Bogulska, A. Gamian, Y.A. Knirel, Structures of a unique O-polysaccharide of *Edwardsiella tarda* PCM 1153 containing an amide of galacturonic acid with 2-aminopropane-1,3-diol and an abequose-containing O-polysaccharide shared by *E. tarda* PCM 1145, PCM 1151 and PCM 1158, Carbohydr. Res. 355 (2012) 56–62, https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.04.004.

[13] Y.A. Knirel, A.P. Anisimov, A.A. Kislichkina, A.N. Kondakova, O.V. Bystrova, A. S. Vagaiskaya, K.Y. Shatalin, A.S. Shashkov, S.V. Dentovskaya, Lipopolysaccharide of the *Yersinia pseudotuberculosis* complex, Biomolecules 11 (2021) 1410.

[14] M. Czerwicka, K. Marszewska, A. Bychowska, H. Dziadziuszko, K. Brzozowski, E. Łojkowska, P. Stepnowski, Z. Kaczyński, Chemical structure of the O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium atrosepticum* SCRI 1039, Carbohydr. Res. 346 (2011) 2978–2981, https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.10.026.

[15] V. Gorshkov, B. Islamov, P. Mikshina, O. Petrova, G. Burygin, E. Sigida, A. Shashkov, A. Daminova, M. Ageeva, B. Idiyatullin, V. Salnikov, Y. Zuev, T. Gorshkova, Y. Gogolev, *Pectobacterium atrosepticum* exopolysaccharides: identification, molecular structure, formation under stress and in planta conditions, Glycobiology 27 (2017) 1016–1026, https://doi.org/10.1093/glycob/cwx069.

[16] A.A. Lukianova, M.M. Shneider, P.V. Evseev, A.M. Shpirt, E.N. Bugaeva, A. P. Kabanova, E.A. Obraztsova, K.K. Miroshnikov, S.N. Senchenkova, A.S. Shashkov, S.V. Toschakov, Y.A. Knirel, A.N. Ignatov, K.A. Miroshnikov, Morphologically different *Pectobacterium brasiliense* bacteriophages PP99 and PP101: deacetylation of O-polysaccharide by the tail spike protein of phage PP99 accompanies the infection, Front. Microbiol. 10 (2020), 3147, https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03147.

[17] K. Ossowska, M. Czerwicka, W. Sledz, S. Zoledowska, A. Motyka, S. Szulta, E. Lojkowska, Z. Kaczyński, The structure of O-polysaccharides isolated from plant pathogenic bacteria *Pectobacterium wasabiae* IFB5408 and IFB5427, Carbohydr. Res. 426 (2016) 46–49, https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.03.017.

[18] K. Ossowska, A. Motyka-Pomagruk, N. Kaczyńska, A. Kowalczyk, W. Sledz, E. Lojkowska, Z. Kaczyński, Heterogenicity within the LPS structure in relation to the chosen genomic and physiological features of the plant pathogen *Pectobacterium parmentieri*, Int. J. Mol. Sci. 23 (2022), https://doi.org/10.3390/ijms23042077, 2077.

[19] I. Ciucanu, F. Kerek, A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates, Carbohydr. Res. 131 (1984) 209–217, https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85242-8.

[20] K. Marszewska, M. Czerwicka, S.J. Forsythe, K. Ossowska, H. Dziadziuszko, Z. Kaczyński, Structural studies of O-polysaccharide isolated from *Cronobacter sakazakii* Sequence Type 12 from a case of neonatal necrotizing enterocolitis, Carbohydr. Res. 407 (2015) 55–58, https://doi.org/10.1016/j.carres.2015.01.020.

Załącznik D3

Kowalczyk, A., Babińska-Wensierska, W., Łojkowska, E., Kaczyński, Z. (2023). The structure of O-polysaccharide isolated from the type strain of *Pectobacterium versatile* CFBP6051T containing an erwiniose - higher branched monosaccharide. *Carbohydrate Research*, *524*, 108743. https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108743

Carbohydrate Research 524 (2023) 108743

Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carres

The structure of O-polysaccharide isolated from the type strain of *Pectobacterium versatile* CFBP6051^{T} containing an erwiniose - higher branched monosaccharide

Agnieszka Kowalczyk [a], Weronika Babińska-Wensierska [b], Ewa Lojkowska [b], Zbigniew Kaczyński [a,*]

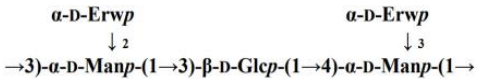
[a] *Laboratory of Structural Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Gdansk, 63 Wita Stwosza, 80-308, Gdansk, Poland*
[b] *Laboratory of Plant Protection and Biotechnology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdansk & Medical University of Gdansk, 58 Abrahama, 80-307, Gdansk, Poland*

ARTICLE INFO

Keywords:
O-specific polysaccharide
Higher branched monosaccharide
Erwiniose
3,6,8-Trideoxy-4-*C*-(*R*-1-hydroxyethyl)-D-gulo-octose
Pectobacterium versatile
Pectinolytic bacterium

ABSTRACT

Utilizing sugar, methylation, and absolute configurations analyses as well as NMR spectroscopy, the chemical repeating unit of the O-specific polysaccharide of *Pectobacterium versatile* CFBP6051^{T} was identified as:



The polymer contains residues of an unusual, higher-branched monosaccharide, named erwiniose (3,6,8-trideoxy-4-*C*-(*R*-1-hydroxyethyl)-D-gulo-octose). Comparison of the *P. versatile* CFBP6051^{T} O-polysaccharide with those isolated from strains of other *Pectobacterium* species indicated high differentiation in their structures within this genus.

1. Introduction

Numerous species of the *Pectobacterium* genera cause serious losses in the world production of potatoes, vegetables and ornamental plants [1]. The species *Pectobacterium versatile* was established in 2019 after genomic and physiological characterization of the set of *Pectobacterium* spp. strains formerly belonging to the genus *Pectobacterium carotovorum* [2]. The new species was named *P. versatile* in reference to the wide diversity of its habitats. Bacteria belonging to this species were isolated from diverse host symptomatic and non-symptomatic plants (*Solanum tuberosum, Allium cepa, Allium porrum, Allium sativum, Brasicca oleracea, Cichorium intybus, Cynara scolymus, Hyacinthus orientalis and Petroselinum crispum*), different water streams and other geographic origins [2–4]. It has been demonstrated that *P. versatile* produces virulence factors like plant cell wall degrading enzymes and extracellular lipopolysaccharides (LPSs) [2]. The LPS plays an important role in the adhesion of bacterial cells to the plant tissue and later disease symptoms development [5]. Recent studies indicated that LPS has the structural, protective, and immunosuppressive effects during *Pectobacterium*–plant interactions and thus should be considered as the virulence factors of these bacteria [6]. It has also been shown that the LPS-deficient mutants of bacteria from the genus *Pectobacterium* exhibit a lower ability to macerate the potato tissue than the wide types of bacteria [7,8].

In this study the structure of O-specific polysaccharide (OPS) from LPS produced by *P. versatile* CFBP6051^{T} (=NCPP3387 ^{T}, ICMP9168 ^{T}, IFB5636) is presented. It contains two residues of an unusual monosaccharide called erwiniose (3,6,8-trideoxy-4-*C*-(*R*-1-hydroxyethyl)-D-gulo-octose; Erw). So far, Erw has been identified only in the OPS of *P. atrosepticum* GSPB9205 [9] and in the exopolysaccharide (EPS) of *P. atrosepticum* SCRI1043 [10].

2. Results and discussion

The LPS was isolated from *P. versatile* CFBP6051^{T} dry cells by hot

* Corresponding author.
E-mail address: zbigniew.kaczynski@ug.edu.pl (Z. Kaczyński).

https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108743
Received 8 December 2022; Received in revised form 6 January 2023; Accepted 9 January 2023
Available online 12 January 2023
0008-6215/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

phenol-water extraction according to Westphal and Jann method and purified from proteins and nucleic acids by enzymatic digestion. Mild acid degradation of LPS cleaved off lipid A, which was separated by centrifugation. The remaining sugar part was fractionated by size-exclusion chromatography (SEC). For all obtained fractions proton nuclear magnetic resonance (^{1}H NMR) spectra were recorded. A fraction containing pure OPS was selected for further structural research.

The GLC and GLC-MS analyses of the alditol acetates obtained as a result of sugar analysis revealed the presence of mannose and glucose in a ratio of ~2:1. The GLC analysis of acetylated glycosides with an optically active butan-2-ol revealed D absolute configuration for mannose and glucose. Methylation analysis of the polysaccharide revealed a 3-substituted hexose residue (1,3,5-tri-*O*-acetyl-2,4,6-tri-*O*-methylhexitol), a 3,4-disubstituted hexose residue (1,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-methylhexitol) and a 2,3-disubstituted hexose residue (1,2,3,5-tera-*O*-acetyl-4,6-di-*O*-methylhexitol) in the approximate molar ratio 1:1:1. The substitutions of the obtained derivatives suggested a branched structure of the polysaccharide structure. Unfortunately, there were no detected terminal residues of the side chain in the methylation analysis results.

The next step in the determination of the chemical structure of the OPS was the interpretation of recorded 1D and 2D NMR spectra. The ^{1}H NMR spectrum of the OPS (Fig. 1) showed five signals in the anomeric region at δ 5.471 (**A**), δ 5.113 (**B**), δ 5.037 (**C**), δ 5.017 (**D**), and δ 4.527 (**E**) in the estimated ratio 1:1:1:1:1. The signals were labelled (**A-E**) according to the decreasing values of the chemical shifts. Furthermore, the ^{1}H NMR spectrum contained several signals of the ring protons of the constituent monosaccharides in the region of δ 3.3–4.4, as well as signals of methyl groups in the region of δ 1.1–1.3 and probably a few methylene groups in the region of δ 1.5–2.0. The presence of five anomeric protons and carbon atoms was confirmed by HSQC NMR spectrum (Fig. 2), which showed five anomeric cross-peaks: δ 5.471/99.72 (**A**), δ 5.113/102.49 (**B**), δ 5.037/99.75 (**C**), δ 5.017/100.69 (**D**), and δ 4.527/102.75 (**E**). The anomeric configurations of all monosaccharides were obtained from HSQC experiment recorded without decoupling. The coupling constants $^1J_{H\text{-}1,C\text{-}1}$ of 176 Hz for residue **A**, 173 Hz for residue **B**, 171 for residue **C**, 173 for residue **D** identified their α anomeric configuration, while the value of 161 Hz for residue **E** revealed its β anomeric configuration.

The TOCSY experiment also confirmed the presence of five spin systems in the anomeric region (data not shown). Three constituent residues were easily identified based on the chemical analysis results and NMR data. The $^3J_{H,H}$ coupling constants patterns were used to distinguish two mannose and one glucose. Residues **A** and **B** possessed *manno* configuration, while **E** had *gluco* configuration. Two remaining residues (**C** and **D**) must have originated from monosaccharides that, under the conditions of sugar and methylation analysis, were degraded. Residues **C** and **D** were quite similar and contained four proton signals, including CH_2 groups at the ends [respectively with the chemical shifts of the corresponding carbon atoms obtained from HSQC spectra: δ 5.037/99.75 (**C**1), δ 3.960/65.39 (**C**2), δ 1.987 and 1.746/30.88 (**C**3), as well as δ 5.017/100.69 (**D**1), δ 3.932/65.59 (**D**2), δ 1.950 and 1.854/31.63 (**D**3). In addition, four spin systems starting with methyl groups were identified using TOCSY and HSQC spectra. Two spin systems contained only two cross-peaks, clearly differing in chemical shifts [δ 1.108/12.69 (**C**2′) and δ 4.294/67.61 (**C**1′), as well as δ 1.159/12.83 (**D**2′) and δ 4.364/68.17 (**D**1′)], and two spin systems consisted of protons with practically the same chemical shifts, including CH_2 groups, and differing only slightly in the chemical shifts of the last protons [δ 1.246/23.41 (**C**8), δ 3.985/64.85 (**C**7) δ 1.700 and 1.540/38.56 (**C**6), δ 3.695/70.74 (**C**5) as well as δ 1.246/23.41 (**D**8), δ 3.985/64.85 (**D**7), δ 1.700 and 1.540/38.56 (**D**6), δ 3.716/70.74 (**D**5)]. The presence of the last two spin systems was also confirmed based on the doubled signal intensities. The HMBC spectrum (Fig. 3) was used to assemble the structures of **C** and **D** residues from the spin systems described above. The HMBC spectrum showed the coupling of H-1 of the residue **C** (δ 5.037) to the carbon atom of the one of short spin systems at δ 67.61 (C-1′) mentioned above. Moreover, the protons of the methyl group of this spin system at δ 1.108 (H-2′) were coupled to the quaternary carbon atom at δ 75.17 (C-4). In addition, the proton at δ 3.695 (H-5) from one of mentioned above long spin systems was coupled to the same quaternary carbon atom C-4 (δ 75.17) as well as to carbon atom C-3 (δ 30.88) of the residue **C**. Similarly, analysis of the remaining three spin systems allowed the assembly of the residue **D**. The following couplings were observed in the HMBC spectrum: the coupling of H-1 of the residue **D** (δ 5.017) to the carbon atom from the remaining short spin system at δ 68.17 (C-1′), the protons of the methyl group at δ 1.159 (H-2') to the quaternary carbon atom at δ 75.04 (C-4), and the proton at δ 3.716 (H-5) from the remaining long spin system to the quaternary carbon atom C-4 (δ 75.04) as well as to the carbon atom C-3 (δ 31.63) of the residue **D**. In

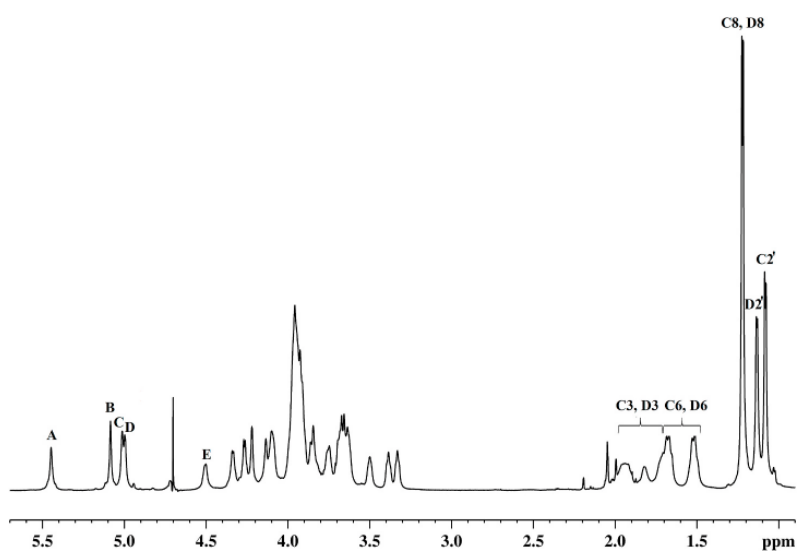


Fig. 1. ^{1}H NMR spectrum (700 MHz) of the OPS isolated from *P. versatile* CFBP6051^T. The letters refer to the monosaccharide residues as defined in Table 1.

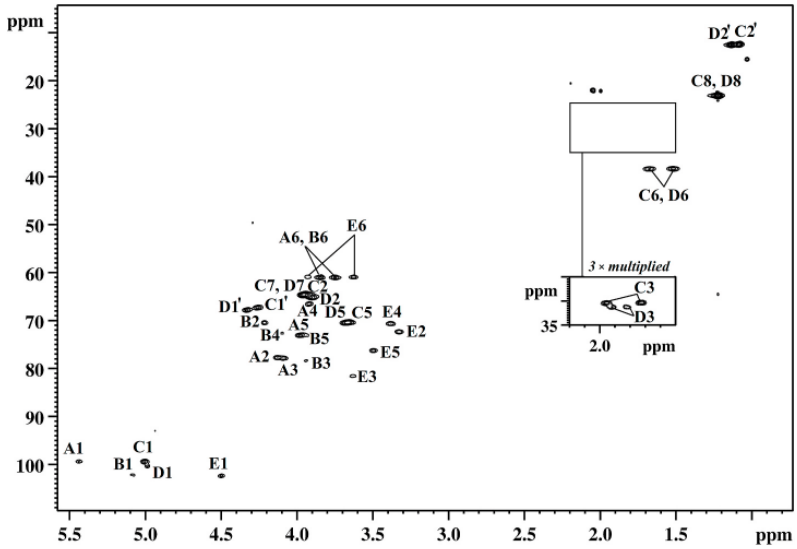


Fig. 2. The sections of HSQC NMR spectrum (700 MHz) of the OPS isolated from *P. versatile* CFBP6051^{T}. The proton/carbon atom correlations are labelled. The letters refer to the monosaccharide residues as defined in Table 1, and the Arabic numerals refer to the carbon atoms and the protons in the respective residues. Due to the relatively low intensity of C3 and D3 cross-peaks the marked region has been multiplied three times.

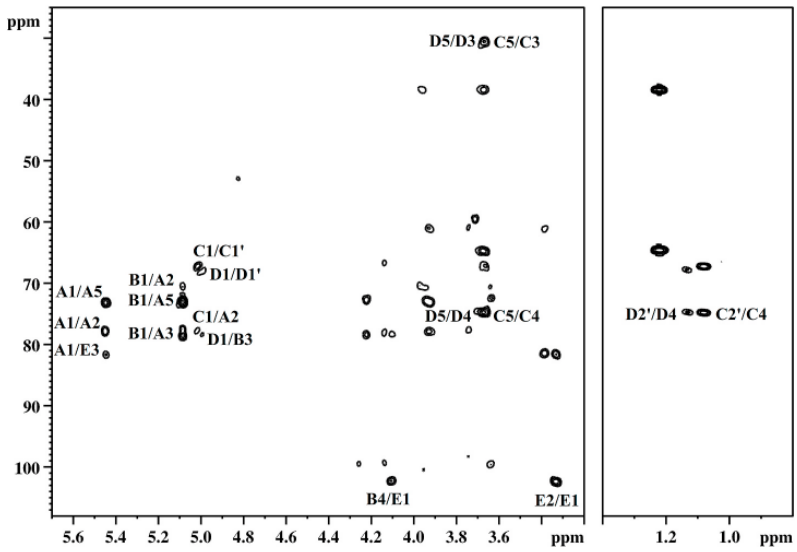
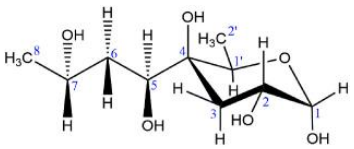


Fig. 3. The sections of HMBC NMR spectrum (700 MHz) of the OPS isolated from *P. versatile* CFBP6051^{T}. The *inter*-residual proton/carbon atom correlations are labelled. The letters refer to the monosaccharide residues as defined in Table 1, and the Arabic numerals refer to the carbon atoms or the protons in the respective residues.

this way, the residues **C** and **D** were assembled (Table 1). The identification of both compounds as erwiniose residues (3,6,8-trideoxy-4-*C*-(*R*-1-hydroxyethyl)-gulo-octose) was done by comparing the NMR data with the literature data [9,11].



Particularly useful was the data presented by Senchenkova et al. in which, for the first and only time, the identification of erwiniose was

Table 1
^{1}H and ^{13}C NMR data of the OPS isolated from *P. versatile* CFBP 6051^{T}. The substituted carbon atoms are underlined.

Residue	Coupling constants [Hz]	Chemical shifts ^{1}H and ^{13}C (ppm)									
	$^{1}J_{(H-1-C-1)}$	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H1′	H2′
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C1′	C2′
A	176	5.471	4.159	4.116	3.948	4.005	3.874/3.766				
→2,3)-α-D-Man*p*-(1→		99.72	78.13	78.19	66.83	73.35	61.38				
B	173	5.113	4.248	3.977	4.128	3.971	3.874/3.766				
→3,4)-α-D-Man*p*-(1→		102.49	70.75	78.74	72.96	73.35	61.38				
C	171	5.037	3.960	1.987/1.746	–	3.695	1.700/1.540	3.985	1.246	4.294	1.108
α-D-Erw*p*-(1→		99.75	65.39	30.88	75.17	70.74	38.56	64.85	23.41	67.61	12.69
D	173	5.017	3.932	1.950/1.854	–	3.716	1.700/1.540	3.985	1.246	4.364	1.159
α-D-Erw*p*-(1→		100.69	65.59	31.63	75.04	70.74	38.56	64.85	23.41	68.17	12.83
E	161	4.527	3.355	3.662	3.415	3.527	3.961/3.654				
→3)-β-D-Glc*p*-(1→		102.75	72.68	81.89	71.04	76.60	61.25				

described in detail [9]. The data compared in terms of *intra*-molecular ROESY couplings, and the pattern of H-H coupling constants was very similar. Some differences were observed in the chemical shifts of the corresponding carbon atoms and the protons from both sugar rings. The differences were due to the various anomeric configuration of the compared erwiniose residues (α anomeric configuration of the studied monosaccharides, and β anomeric configuration of the referred monosaccharide). In this case, comparison with the α-isomer of pyranose form of caryophyllose was very helpful [11]. Caryophyllose is a monosaccharide very similar to erwiniose. The sugar rings of both monosaccharides are the same and differ only in the number of carbon atoms (ten for erwiniose and twelve for caryophyllose). The chemical shifts of the corresponding carbon atoms and the protons from the compared sugar rings were practically the same [11]. ^{1}H and ^{13}C chemical shifts of all protons and carbon atoms of OPS constituents were obtained from COSY, TOCSY, HSQC and HMBC NMR spectra are collected in Table 1.

The absolute configurations of the erwiniose residues were deduced by a comparison of the observed glycosylation effects (δ) on their anomeric carbon atoms with the expected values [11,12]. The observed effect of δ +8.1 for C-1 of the residue **C** (expected δ +9.2 for DD and δ +5.4 for DL) indicates that both monosaccharides in the disaccharide α-Erw*p*-(1→2)-α-D-Man*p* form a pair with the same absolute configuration (DD). Similarly, the observed effect of δ +9.1 for C-1 of the residue **D** (expected δ +8.3 for DD and δ +3.4 for DL) indicates that both monosaccharides in the disaccharide α-Erw*p*-(1→3)-α-D-Man*p* form a pair with the same absolute configuration (DD). These data revealed the presence of 3,6,8-trideoxy-4-*C*-(*R*-1-hydroxyethyl)-D-gulo-octose (erwiniose) in the studied OPS.

Low-field shifted signals of the carbon atoms **A**2 (δ 78.13), **A**3 (δ 78.19), **B**3 (δ 78.74), **B**4 (δ 72.96), and **E**3 (δ 81.89) in a comparison with unsubstituted relevant residues [11,12] revealed glycosylation at C-2 and C-3 of the residue **A**, and C-3 and C-4 of the residue **B** as well as at C-3 of the residue **E**. The residues **C** and **D** were terminal monosaccharides.

The ROESY (Fig. 4) and the HMBC (Fig. 3) experiments were used to determine the order of the monosaccharide residues in the OPS repeating unit. The strong *inter*-residual NOE proton contacts were identified: **A**1/**E**3 (δ 5.471/3.662), **B**1/**A**3 (δ 5.113/4.116), **C**1/**A**2 (δ 5.037/4.159), **D**1/**B**3 (δ 5.017/3.977), and **E**1/**B**4 (δ 4.527/4.128). In addition, the following *inter*-residual proton/carbon atom correlations were identified on the HMBC spectrum: **A**1/**E**3 (δ 5.471/81.89), **B**1/**A**3 (δ 5.113/78.19), **C**1/**A**2 (δ 5.037/78.13), **D**1/**B**3 (δ 5.017/78.74), and **B**4/**E**1 (δ 4.128/102.75).

Employing compositional analyses and NMR spectroscopy, the chemical repeating unit of the *P. versatile* CFBP 6051^{T} O-polysaccharide was identified as a:

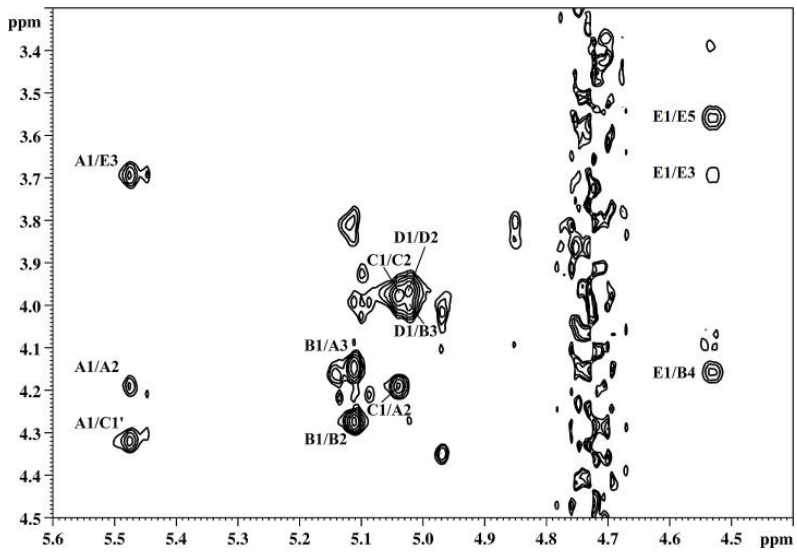
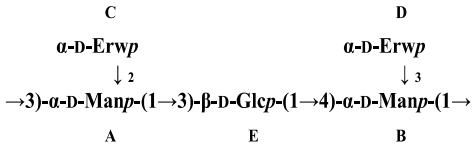


Fig. 4. The section of ROESY NMR spectrum (700 MHz) of the OPS isolated from *P. versatile* CFBP6051^{T}. The letters refer to the monosaccharide residues as defined in Table 1, and the Arabic numerals refer to the protons in the respective residues.



Erwiniose is an extremely rare monosaccharide present in polysaccharide structures. To the best of our knowledge, the presence of Erw in the chemical structures of bacterial polysaccharides has only been described twice: in the chemical structure of the OPS of *Erwinia carotovora* spp. *atroseptica* GSPB 9205 [9] and in the identical structure of the EPS isolated from *P. atrosepticum* SCRI1043 [10]. In both cases, only one β-Erw residue was present in a repeating unit. We identified for the first time two α-Erw residues in the structure of the repeating unit of the OPS isolated from *P. versatile* CFBP 6051^T and described in this paper.

Comparison of O-polysaccharides of *P. versatile* CFBP6051^T and other strains of *Pectobacterium* species indicated high structural differentiation within this genus [13–17]. Moreover, it should be mentioned that rare and very rare monosaccharide residues were identified in most of the studied polysaccharides: mannosamine (2-(acetylamino)-2-deoxy-D-mannopyranose) in *P. parmentieri* IFB5408, IFB5427 [15], 6-deoxy-L-talose in *P. brasiliense* F152 [17], pseudaminic acid (5,7-diamino-3,5,7,9-tetradeoxy-L-*glycero*-L-manno-non-2-ulosonic acid) in *P. parmentieri* SCC3193, IFB5432 [14], abequose (3,6-dideoxy-D-xylo-hexose) in *P. aquaticum* IFB5637 [16], and finally two erwiniose residues (3,6,8-trideoxy-4-*C*-(*R*-1-hydroxyethyl)-gulo-octose) in this studies.

3. Material and methods

3.1. Bacteria isolation and cultivation

The *P. versatile* CFBP6051^T strain was isolated from *Solanum tuberosum* in France [2] and was obtained from the CFBP collection. Bacterial cells have been grown on Trypticase Soy Agar plates (TSA; 28 °C, 24 h). Then single bacterial colonies were utilized for inoculating 200 mL flasks with Trypticase Soy Broth (TSB) medium that were incubated (28 °C, 24 h) with 130 rpm shaking. Each of these flasks was afterwards used for inoculation of 2000 mL TSB, which was subjected to 130 rpm shaking (28 °C, 48 h). Subsequently, bacterial cells were harvested with the use of a Sorvall centrifuge (16,915.34×*g* for 10 min) and stored at −25 °C for further analyses.

3.2. Isolation and purification of the OPS

Hot phenol-water extraction was used to isolate the LPS (574 mg) from dry bacterial cells (12.4 g). The cells were suspended in 322 mL of the hot phenol-water mixture (13:11, v:v), stirred (65 °C, 90 min) and centrifuged (7012×*g*, 4 °C, 20 min). The solution was divided into three parts: phenol layer with the cell debris (bottom), milky interphase, and water layer (top). The water phase was collected, and then the procedure was repeated twice with 100 mL of warm water. The combined aqueous fractions were dialyzed, freeze-dried and subjected to enzymatic digestion [16].

Standard procedures were used for the mild hydrolysis of LPS (1% acetic acid, 100 °C, 1.5 h). Lipid A was removed by centrifugation (7012×*g*, 4 °C, 20 min) and the supernatant was freeze-dried (475 mg). The part of the obtained sample (52 mg) was applied to the gel-filtration column (120 × 1 cm, Bio-Gel P-30) using deionized water as eluent [16]. A high-molecular mass polysaccharide (10.7 mg) was obtained in a yield of ~21% of the lipopolysaccharide weight.

3.3. Chemical analyses

The sugar analysis was done as described previously [16]. Briefly, the OPS (0.8 mg) was hydrolyzed (2 M CF_3COOH, 120 °C, 2 h). The obtained monosaccharides were reduced with $NaBH_4$ (12 h) and next acetylated (Ac_2O in presence of CH_3COONa; 120 °C, 2 h). The obtained alditol acetates were analyzed by GLC on a GC-2010 Pro (Shimadzu) gas chromatograph with the FID detector equipped with a capillary Rtx-5 column (length: 30 m, inner diameter: 0.25 mm, film thickness: 0.25 μm), using Ar as a carrier gas and the temperature program from 120 °C to 265 °C, rate 4 °C min^{-1}, then 10 min isotherm at 265 °C.

The methylation analysis of the OPS was done according to the Ciucanu and Kerek method [18,19]. The per-*O*-methylated polysaccharide was hydrolyzed, obtained partially methylated monosaccharides were reduced and acetylated as described above in the sugar analysis procedure. The partially methylated alditol acetates were analyzed using the GLC-MS system MS-QP2010 SE (Shimadzu) with a capillary column Rtx-5 and the carrier gas He. The temperature program from 120 °C to 265 °C, rate 4 °C min^{-1}, 10 min isotherm at 265 °C was used. The mass spectra were recorded under the following conditions: EI ionization (70 eV), the ion source temperature 220 °C and the recorded mass range 43–550 *m/z*.

Absolute configurations (D or L) of the constituent monosaccharides were determined by reaction with (*S*)-2-butanol [15,20]. The obtained acetylated but-2-yl glycosides were analyzed by GC-2010 Pro (Shimadzu) gas chromatograph with an FID detector equipped with a Rtx-2330 capillary column (length: 60 m, inner diameter: 0.25 mm, film thickness: 0.2 μm). The carrier gas was Ar and the temperature program from 120 °C to 260 °C, rate 2 °C min^{-1}, then 30 min isotherm at 260 °C was used.

3.4. NMR spectroscopy

The OPS (10 mg) was exchanged twice with 0.75 ml of 99.5% D_2O, freeze-dried, and finally dissolved in 0.6 mL of 99.95% D_2O. NMR spectra were recorded at 30 °C using a Bruker Avance III 700 MHz spectrometer. The NMR data was acquired and processed using Bruker TopSpin 3.6.2 software. Chemical shifts were referenced to the internal standard of acetone (δ_H 2.225; δ_C 31.45). The COSY (correlation spectroscopy), the TOCSY (total correlation spectroscopy), and the ROESY (rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy) experiments were recorded using data sets of 4096 × 512 points. The TOCSY experiment was performed with spinlock times of 100 ms. The $^1H,^{13}C$ HSQC (heteronuclear single quantum coherence), the $^1H,^{13}C$ HSQC-TOCSY (heteronuclear single quantum coherence - total correlation spectroscopy), and the $^1H,^{13}C$ HMBC (heteronuclear multiple bound correlation) experiments were recorded in ^1H-detection mode using data sets of 2048 × 256 points.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

References

[1] M. Adeolu, S. Alnajar, S. Naushad, R. Gupta, Genome based phylogeny and taxonomy of the "Enterobacteriales": proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae, Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66 (2016), https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485.

[2] P. Portier, J. Pédron, G. Taghouti, M. Fischer-Le Saux, E. Caullireau, C. Bertrand, A. Laurent, K. Chawki, S. Oulgazi, M. Moumni, D. Andrivon, C. Dutrieux, D. Faure, V. Hélias, M.-A. Barny, Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. odoriferum to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium*

brasiliense sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 69 (2019) 3207–3216, https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003611.

[3] H.B. Moussa, C. Bertrand, E. Rochelle-Newall, S. Fiorini, J. Pédron, M.-A. Barny, The diversity of soft rot *Pectobacteriaceae* along the Durance River stream in the south-east of France revealed by multiple seasonal surveys, Phytopathology (2022), https://doi.org/10.1094/phyto-12-21-0515-r.

[4] M. Smoktunowicz, J. Jonca, A. Stachowska, M. May, M.M. Waleron, M. Waleron, K. Waleron, The International trade of ware vegetables and Orna-mental plants—an underestimated risk of accelerated spreading of phytopathogenic bacteria in the Era of globalisation and ongoing climatic changes, Pathogens 11 (2022) 728, https://doi.org/10.3390/pathogens11070728.

[5] F. Di Lorenzo, K.A. Duda, R. Lanzetta, A. Silipo, C. De Castro, A. Molinaro, A journey from structure to function of bacterial lipopolysaccharides, Chem. Rev. 122 (2022) 15767–15821, https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01321.

[6] B. Islamov, O. Petrova, P. Mikshina, A. Kadyirov, V. Vorob'ev, Y. Gogolev, V. Gorshkov, The role of *Pectobacterium atrosepticum* exopolysaccharides in plant–pathogen interactions, Int. J. Mol. Sci. 22 (2021), 12781, https://doi.org/10.3390/ijms222312781.

[7] I.K. Toth, Y. Bertheau, L.J. Hyman, L. Laplaze, M.M. Lopez, J. McNicol, F. Niepold, P. Persson, G.P.C. Salmond, A. Sletten, J.M. van der Wolf, M.C.M. Pérombelon, Evaluation of phenotypic and molecular typing techniques for determining diversity in *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica, J. Appl. Microbiol. 87 (1999) 770–781, https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00929.x.

[8] N. Kaczynska, E. Lojkowska, M. Narajczyk, R. Czajkowski, Genome-wide analyses of the temperature-responsive genetic loci of the pectinolytic plant pathogenic *Pectobacterium atrosepticum*, Int. J. Mol. Sci. 22 (2021) 4839, https://doi.org/10.3390/ijms22094839.

[9] S.N. Senchenkova, A.S. Shashkov, YuA. Knirel, M. Ahmed, A. Mavridis, K. Rudolph, Structure of the O-polysaccharide of *Erwinia carotovora* ssp. atroseptica GSPB 9205 containing a new higher branched monosaccharide, Russ. Chem. Bull. 54 (2005) 1276–1281, https://doi.org/10.1007/s11172-005-0394-1.

[10] V. Gorshkov, B. Islamov, P. Mikshina, O. Petrova, G. Burygin, E. Sigida, A. Shashkov, A. Daminova, M. Ageeva, B. Idiyatullin, V. Salnikov, Y. Zuev, T. Gorshkova, Y. Gogolev, *Pectobacterium atrosepticum* exopolysaccharides: identification, molecular structure, formation under stress and in planta conditions, Glycobiology 27 (2017) 1016–1026, https://doi.org/10.1093/glycob/cwx069.

[11] A. Molinaro, C. De Castro, R. Lanzetta, E. Manzo, M. Parrilli, Solvent effect on the isomeric equilibrium of carbohydrates: the superior ability of 2,2,2-Trifluoroethanol for intramolecular hydrogen bond stabilization, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 12605–12610, https://doi.org/10.1021/ja016471i.

[12] G.M. Lipkind, A.S. Shashkov, Y.A. Knirel, E.V. Vinogradov, N.K. Kochetkov, A computer-assisted structural analysis of regular polysaccharides on the basis of 13C-n.m.r. data, Carbohydr. Res. 175 (1988) 59–75, https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80156-3.

[13] M. Czerwicka, K. Marszewska, A. Bychowska, H. Dziadziuszko, K. Brzozowski, E. Łojkowska, P. Stepnowski, Z. Kaczyński, Chemical structure of the O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium atrosepticum* SCRI 1039, Carbohydr. Res. 346 (2011) 2978–2981, https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.10.026.

[14] K. Ossowska, A. Motyka-Pomagruk, N. Kaczyńska, A. Kowalczyk, W. Sledz, E. Lojkowska, Z. Kaczyński, Heterogenicity within the LPS structure in relation to the chosen genomic and physiological features of the plant pathogen *Pectobacterium parmentieri*, Int. J. Mol. Sci. 23 (2022) 2077, https://doi.org/10.3390/ijms23042077.

[15] K. Ossowska, M. Czerwicka, W. Sledz, S. Zoledowska, A. Motyka, S. Szulta, E. Lojkowska, Z. Kaczyński, The structure of O-polysaccharides isolated from plant pathogenic bacteria *Pectobacterium wasabiae* IFB5408 and IFB5427, Carbohydr. Res. 426 (2016) 46–49, https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.03.017.

[16] A. Kowalczyk, N. Szpakowska, W. Babinska, A. Motyka-Pomagruk, W. Sledz, E. Lojkowska, Z. Kaczyński, The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637, Carbohydr. Res. 522 (2022), 108696, https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108696.

[17] A.A. Lukianova, M.M. Shneider, P.V. Evseev, A.M. Shpirt, E.N. Bugaeva, A. P. Kabanova, E.A. Obraztsova, K.K. Miroshnikov, S.N. Senchenkova, A.S. Shashkov, S.V. Toschakov, Y.A. Knirel, A.N. Ignatov, K.A. Miroshnikov, Morphologically different *Pectobacterium brasiliense* bacteriophages PP99 and PP101: deacetylation of O-polysaccharide by the tail spike protein of phage PP99 accompanies the infection, Front. Microbiol. 10 (2020), https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03147.

[18] I. Ciucanu, F. Kerek, A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates, Carbohydr. Res. 131 (1984) 209–217, https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85242-8.

[19] A. Kowalczyk, N. Szpakowska, W. Sledz, A. Motyka-Pomagruk, K. Ossowska, E. Lojkowska, Z. Kaczyński, The structure of the O-polysaccharide isolated from pectinolytic gram-negative bacterium *Dickeya aquatica* IFB0154 is different from the O-polysaccharides of other *Dickeya* species, Carbohydr. Res. 497 (2020), 108135, https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108135.

[20] G.J. Gerwig, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegenthart, Determination of the absolute configuration of monosaccharides in complex carbohydrates by capillary g, Carbohydr. Res. 77 (1979) 1–7, https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83788-X.

Oświadczenia

Agnieszka Kowalczyk

Gdańsk, dnia 15.03.2023 r.

Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

1. Kowalczyk, A., Babińska W., Lojkowska, E., Kaczyński, Z. The structure of O-polysaccharide isolated from the type strain of *Pectobacterium versatile* CFBP6051T containing an erwiniose - higher branched monosaccharide. *Carbohydr. Res.* 2023, 524, 108743. https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108743
2. Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Babińska W., Motyka-Pomagruk, A., Sledz, W., Lojkowska, E., Kaczyński, Z. The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. *Carbohydr. Res.* 2022, 522, 108696. https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108696
3. Kowalczyk A., Szpakowska N., Sledz W., Motyka-Pomagruk A., Ossowska K., Lojkowska E., Kaczyński Z. The structure of O-polysaccharide isolated from pectinolytic Gram-negative bacterium *Dickeya aqu*atica IFB0154 is different from O-polysaccharides of other Dickeya species. *Carbohydr. Res.* 2020, 497, 108135, https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108135

oświadczam, że mój wkład w ich powstanie był następujący:

- Wyizolowałam LPS-y z komórek bakteryjnych szczepów: *Dickeya aqu*atica IFB0154, *Pectobacterium aquaticum* IFB5637 i *Pectobacterium versatile* CFBP6051T.
- Przeprowadziłam trawienie enzymatyczne i dializę w celu usunięcia DNA, RNA i białek.
- Przeprowadziłam hydrolizę LPS-ów i oddzieliłam frakcje polisacharydowe od ich lipidów A.
- Wyodrębniłam frakcje O-polisacharydowe za pomocą sączenia molekularnego.
- Wykonałam analizy chemiczne dla OPS-ów.
- Przeprowadziłam analizę GC oraz GC-MS, a następnie na podstawie wyników otrzymanych pochodnych, identyfikowałam i określiłam liczbę monosacharydów w jednostce powtarzalnej OPS-ów badanych szczepów.
- Ustalałam miejsca podstawienia reszt cukrowych na podstawie analizy GC-MS otrzymanych metylowych pochodnych.
- Przyporządkowałam monosacharydy do szeregu konfiguracyjnego D lub L, na podstawie analizy GC otrzymanych pochodnych.
- Przeprowadziłam analizę 1D i 2D widm NMR zarejestrowanych dla OPS-ów.

Kowalczyk

Uniwersytet Gdański | GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Prof. dr hab. Ewa Łojkowska
Imię i nazwisko

Gdańsk, dnia 15.03.2023 r.

MWB UG i GUMed
ul. Abrahama 58
80-307 Gdańsk
Ewa.lojkowska@ug.edu.pl
Miejsce zatrudnienia/Adres korespondencyjny

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

1. Kowalczyk, A., Babińska W., Lojkowska, E., Kaczyński, Z. The structure of O-polysaccharide isolated from the type strain of *Pectobacterium versatile* CFBP6051T containing an erwiniose - higher branched monosaccharide. *Carbohydr. Res.* 2023, 524, 108743. https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108743
2. Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Babińska W., Motyka-Pomagruk, A., Sledz, W., Lojkowska, E., Kaczyński, Z. The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. *Carbohydr. Res.* 2022, 522, 108696. https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108696
3. Kowalczyk A., Szpakowska N., Sledz W., Motyka-Pomagruk A., Ossowska K., Lojkowska E., Kaczyński Z. The structure of O-polysaccharide isolated from pectinolytic Gram-negative bacterium *Dickeya aqua*tica IFB0154 is different from O-polysaccharides of other Dickeya species. *Carbohydr. Res.* 2020, 497, 108135, https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108135

oświadczam, że mój wkład w powstanie trzech wymienionych powyżej publikacji obejmował przygotowanie ostatecznego tekstu manuskryptu w części dotyczącej charakterystyki szczepów bakterii, z których komórek izolowano O-polisacharydy oraz opisu znaczenia liposacharydów zewnątrzkomórkowych w procesie patogenezy bakterii z rodzaju *Dickeya* i *Pectobacterium*.

Ewa Łojkowska

Międzyuczelniany
Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu
Medycznego

tel. +48 58 523 63 20
e-mail: dziekanat@biotech.ug.edu.pl

ul. Abrahama 58
80-307 Gdańsk
www.biotech.ug.edu.pl

MWB

Uniwersytet Gdański | Uczelnie Fahrenheita

Dr hab. Zbigniew Kaczyński
profesor Uniwersytetu Gdańskiego
Wydział Chemii UG

Gdańsk, 10 marca, 2023 r.

OŚWIADCZENIE

Jako współautor:

1. Kowalczyk, A., Babińska W., Lojkowska, E., Kaczyński, Z. The structure of O-polysaccharide isolated from the type strain of *Pectobacterium versatile* CFBP6051T containing an erwiniose - higher branched monosaccharide. *Carbohydr. Res.* 2023, 524, 108743,
2. Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Babińska W., Motyka-Pomagruk, A., Sledz, W., Lojkowska, E., Kaczyński, Z. The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. *Carbohydr. Res.* 2022, 522, 108696,
3. Kowalczyk A., Szpakowska N., Sledz W., Motyka-Pomagruk A., Ossowska K., Lojkowska E., Kaczyński Z. The structure of O-polysaccharide isolated from pectinolytic Gram-negative bacterium *Dickeya aqua*tica IFB0154 is different from O-polysaccharides of other Dickeya species. *Carbohydr. Res.* 2020, 497, 108135,

oświadczam, że mój wkład w powstanie trzech wymienionych powyżej publikacji obejmował koordynowanie badań, udział w dyskusji otrzymanych wyników, udział w przygotowaniu manuskryptu oraz pełnienie funkcji autora korespondencyjnego.

Z. Kaczyński

Wydział Chemii
Uniwersytetu Gdańskiego

tel. +48 58 523 50 10
fax. +48 58 523 50 12
e-mail: biurodziekana.chemia@ug.edu.pl

ul. Wita Stwosza 63
80-308 Gdańsk
www.chemia.ug.edu.pl

CHEMIA UG

Weronika Babińska-Wensierska
Imię i nazwisko

MWB UG&GUMed
ul. Abrahama 58
80-307 Gdańsk
weronika.babinska@phdstud.ug.edu.pl
Miejsce zatrudnienia/Adres korespondencyjny

Gdańsk, dnia 15.03.2023 r.

OŚWIADCZENIE

Jako współautor następujących publikacji:

1. Kowalczyk, A., Babińska W., Lojkowska, E., Kaczyński, Z. The structure of O-polysaccharide isolated from the type strain of *Pectobacterium versatile* CFBP6051T containing an erwiniose - higher branched monosaccharide. *Carbohydr. Res.* 2023, 524, 108743. https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108743
2. Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Babińska W., Motyka-Pomagruk, A., Sledz, W., Lojkowska, E., Kaczyński, Z. The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. *Carbohydr. Res.* 2022, 522, 108696. https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108696

oświadczam, że mój wkład w wymienionych powyżej publikacji obejmował udział w wykonywaniu analiz biologicznych. Dodatkowo brałam udział w przygotowaniu opisu wykonanych badań biologicznych we wstępnej wersji manuskryptu pt. „The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637".

Podpis
Weronika Babińska-Wensierska

.....Agata Motyka-Pomagruk..... Gdańsk, dnia 15.03.2023 r.
Imię i nazwisko

.....ul. Abrahama 58, 80-307 Gdańsk.....
Miejsce zatrudnienia/Adres korespondencyjny

OŚWIADCZENIE

Jako współautor następujących publikacji:

1. Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Babińska W., Motyka-Pomagruk, A., Sledz, W., Lojkowska, E., Kaczyński, Z. The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. *Carbohydr. Res.* 2022, 522, 108696. https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108696
2. Kowalczyk A., Szpakowska N., Sledz W., Motyka-Pomagruk A., Ossowska K., Lojkowska E., Kaczyński Z. The structure of O-polysaccharide isolated from pectinolytic Gram-negative bacterium *Dickeya aqu*atica IFB0154 is different from O-polysaccharides of other Dickeya species. *Carbohydr. Res.* 2020, 497, 108135, https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108135

oświadczam, że mój wkład w ich powstanie był następujący:

-udział w wykonywaniu analiz biologicznych

Agata Motyka-Pomagruk

Podpis

Nikola Szpakowska

Imię i nazwisko

Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

nikola.szpakowska@ug.edu.pl

Miejsce zatrudnienia/Adres korespondencyjny

Gdańsk, dnia 15.03.2023 r.

OŚWIADCZENIE

Jako współautor następujących publikacji:

1. Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Babińska W., Motyka-Pomagruk, A., Sledz, W., Lojkowska, E., Kaczyński, Z. The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. *Carbohydr. Res.* 2022, 522, 108696. https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108696
2. Kowalczyk A., Szpakowska N., Sledz W., Motyka-Pomagruk A., Ossowska K., Lojkowska E., Kaczyński Z. The structure of O-polysaccharide isolated from pectinolytic Gram-negative bacterium *Dickeya aqua*tica IFB0154 is different from O-polysaccharides of other Dickeya species. *Carbohydr. Res.* 2020, 497, 108135, https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108135

oświadczam, że mój wkład w ich powstanie był następujący:

- udział w izolacji OPSu.

Nikola Szpakowska

Wojciech Śledź
Imię i nazwisko

Gdańsk, dnia 15.03.2023 r.

Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin MWB UG i GUMed
ul. Abrahama 58, 80-307 Gdańsk, e-mail: wojciech.sledz@biotech.ug.edu.pl
Miejsce zatrudnienia/Adres korespondencyjny

OŚWIADCZENIE

Jako współautor następujących publikacji:

1. Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Babińska W., Motyka-Pomagruk, A., Sledz, W., Lojkowska, E., Kaczyński, Z. The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. *Carbohydr. Res.* 2022, 522, 108696. https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108696
2. Kowalczyk A., Szpakowska N., Sledz W., Motyka-Pomagruk A., Ossowska K., Lojkowska E., Kaczyński Z. The structure of O-polysaccharide isolated from pectinolytic Gram-negative bacterium *Dickeya aqu*atica IFB0154 is different from O-polysaccharides of other Dickeya species. *Carbohydr. Res.* 2020, 497, 108135, https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108135

oświadczam, że mój wkład w ich powstanie był następujący:

Udział w przygotowaniu eksperymentów biologicznych (poz. 1 i poz.2)

Podpis

Karolina Ossowska
Imię i nazwisko

ul. Zbiegniewskiej 15/32
87-800 Włocławek
Adres korespondencyjny

Miejskie Przedsiębiorstwo
Wodociągów i Kanalizacji Sp. z o.o.
ul. Toruńska 146
87-800 Włocławek
Miejsce zatrudnienia

Gdańsk, dnia 16.03.2023 r.

OŚWIADCZENIE

Jako współautor publikacji:

1. Kowalczyk A., Szpakowska N., Sledz W., Motyka-Pomagruk A., Ossowska K., Lojkowska E., Kaczyński Z. The structure of O-polysaccharide isolated from pectinolytic Gram-negative bacterium *Dickeya aqua*tica IFB0154 is different from O-polysaccharides of other Dickeya species. *Carbohydr. Res.* 2020;497;108135;https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108135

oświadczam, że mój wkład w jej powstanie polegał na określeniu struktury chemicznej OPS-ów wyizolowanych ze szczepów bakterii *D. dianthicola* IFB0485 i *D. zeae* IPO946.

Podpis

Wykaz dorobku naukowego

Artykuły w czasopismach z tzw. listy JCR:

1. Szulta S., Kowalczyk, A., Czerwicka-Pach M., Motyka-Pomagruk A., Śledź W., Kaczyńska N., Łojkowska, E., Kaczyński, Z. (2023). The chemical structure of the O-polysaccharide isolated from the lipopolysaccharide of *Pectobacterium Brasiliense* IFB5527, a phytopathogenic bacterium of high economic importance. *Carbohydrate Research*, 527, 108806, https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108806
2. Kowalczyk, A., Babińska-Wensierska, W., Łojkowska, E., Kaczyński, Z. (2023). The structure of O-polysaccharide isolated from the type strain of *Pectobacterium versatile* CFBP6051T containing an erwiniose - higher branched monosaccharide. *Carbohydrate Research, 524,* 108743. https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108743
3. Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Babińska, W., Motyka-Pomagruk, A., Śledź, W., Łojkowska, E., Kaczyński, Z. (2022). The structure of an abequose - containing O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium aquaticum* IFB5637. *Carbohydrate Research, 522,* 108696. https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108696
4. Ossowska, K., Motyka-Pomagruk, A., Kaczyńska, N., Kowalczyk, A., Śledź, W., Łojkowska, E., Kaczyński, Z. (2022). Heterogenicity within the LPS structure in relation to the chosen genomic and physiological features of the plant pathogen *Pectobacterium parmentieri*. *International Journal of Molecular Sciences, 23(4),* 2077. https://doi.org/10.3390/ijms23042077
5. Babińska, W., Motyka-Pomagruk, A., Śledź, W., Kowalczyk, A., Kaczyński, Z., Łojkowska, E. (2021). The first Polish isolate of a novel species *Pectobacterium aquaticum* originates from a Pomeranian Lake. *International Journal of Environmental Research and Public Health, 18(9),* 5041. https://doi.org/10.3390/ijerph18095041
6. Baranowska, K., Mońka, M., Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Kaczyński, Z., Bojarski, P., Józefowicz, M. (2020). Spectroscopic studies of the excited-state intramolecular proton and electron transfer processes of methyl benzoate derivatives in cucurbit[7]uril nanocage. *Journal of Molecular Liquids, 318,* 113921. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113921
7. Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Śledź, W., Motyka-Pomagruk, A., Ossowska, K., Łojkowska, E., Kaczyński, Z. (2020). The structure of the O-polysaccharide isolated from pectinolytic gram-negative bacterium *Dickeya aquatica* IFB0154 is different from the O-polysaccharides of other *Dickeya* species. *Carbohydrate Research, 497,* 108135. https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108135
8. Szpakowska, N., Kowalczyk, A., Jafra, S., Kaczyński, Z. (2020). The chemical structure of polysaccharides isolated from the *Ochrobactrum rhizosphaerae* PR17T. *Carbohydrate Research, 497,* 108136. https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108136

Artykuły w czasopismach spoza tzw. listy JCR:

1. Bylińska, I., Dzierżyńska, M., Giżyńska, M., Guzow, K., Jankowska, E., Jurczak, P., Kaczyński, Z., Karska, N., Kowalczyk, A., Kuncewicz, K., Orlikowska, M., Sawicka, J., Spodzieja, M., Szpakowska, N., Szymańska, A., Wieczerzak, E., Witkowska, J., Rodziewicz-Motowidło, S. (2022). Aminokwasy, glikany, peptydy i białka w ścieżkach diagnostycznych i terapeutycznych chorób cywilizacyjnych XXI wieku – projektowanie i charakterystyka fizykochemiczna oraz strukturalna. *Wiadomości Chemiczne, 76*. https://doi.org/10.53584/wiadchem.2022.5.8

Prezentacje konferencyjne:

1. Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Motyka-Pomagruk, A., Śledź, W., Kaczyńska, N., Babińska, W., Kaczyński, Z.: *Struktura chemiczna o-polisacharydów wyizolowanych z bakterii fitopatogennych*. 64. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 11-16.09.2022, Lublin (Polska).
2. Babińska, W., Motyka-Pomagruk, A., Kowalczyk, A., Kaczyński, Z., Śledź, W., Łojkowska, E.: *Are the waterways important paths of spreading plant pathogenic bacteria from the genera Dickeya and Pectobacterium?*, 14th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, 3-8.07.2022, Assisi (Italy).
3. Kaczyńska, N., Motyka-Pomagruk, A., Śledź, W., Ossowska, K., Kowalczyk, A., Kaczyński, Z., Łojkowska, E.: *Structural diversity of O-antigens in Pectobacterium parmentieri lipopolysaccharides*, 21st Triennial Conference of the European Association for Potato Research, 4-8.07.2022, Kraków (Polska).
4. Kaczyński, Z., Ossowska, K., Kowalczyk, A., Szulta, S., Motyka-Pomagruk, A., Śledź, W., Kaczyńska, N., Babińska, W., Łojkowska, E.: *The chemical structures of the O-specific polysaccharides of diverse soft rot Pectobacteriaceae*, 9th Biennial Meeting on Microbial Carbohydrates, 27-29.07.2022, Naples (Italy).
5. Kowalczyk, A., Szpakowska, N., Śledź, W., Motyka-Pomagruk, A., Ossowska, K., Łojkowska, E., Kaczyński, Z.: *The chemical structure of O-polysaccharide isolated from pectynolityc bacterium Dickeya aquatica IFB0154*, 15th Bratislava Symposium on Saccharides, 20-24.06.2022, Smolenice (Slovakia).
6. Szpakowska, N., Kowalczyk, A., Nowacka-Jechalke, N., Nowak, R., Lemieszek, M. K., Kaczyński, Z.: *The chemical structures of bioactive polysaccharides isolated from Sparassis crispa*, 15th Bratislava Symposium on Saccharides, 20-24.06.2022, Smolenice (Slovakia).
7. Szulta, S., Czerwicka-Pach, M., Kowalczyk, A., Motyka-Pomagruk, A., Śledź, W., Łojkowska, E., Kaczyński, Z., Kornicka, A.: *Structural characterization of the O-polysaccharide isolated from phytopathogenic bacteria Pectobacterium brasiliense IFB5527*, 30th International Carbohydrate Symposium, 10-15.07.2022, Florianopolis (Brazil).
8. Kaczyński, Z., Czerwicka, M., Ossowska, K., Szulta, S., Gacka, N., Kowalczyk, A.: *Chemical structures of OPS isolated from pectinolytic bacteria*, 20th European Carbohydrate Symposium, 30.06-4.07.2019, Leiden (Netherlands).

Staże zagraniczne:

- 05.10.2022 – 05.01.2023 (3 miesiące) **Research Center Borstel, Leibniz Lungcenter,** *Borstel, Niemcy.*
- 10.2018 – 01.2019 (3 miesiące) **Università degli Studi di Napoli Federico II**, **Wydział Chemii**, *Neapol, Włochy.*
- 04.2016 – 07.2016 (3 miesiące) **ULL – Universidad de La Laguna**, **Wydział Chemii**, *Teneryfa, Hiszpania.*
- 07.2015 (1 miesiąc) **BIT - Beijing Institute of Technology, Wydział Chemii,** *Pekin, Chiny.*

Projekty badawcze BMN:

- (**2020**) Kierownik projektu finansowanego w ramach Badań Naukowych Służących Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich na wydziale Chemii UG (Nr 539-T070-B472-20).
- (**2021**) Kierownik projektu finansowanego w ramach Badań Naukowych Służących Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich na wydziale Chemii UG (Nr 539-T070-B888-21).
- (**2022**) Kierownik projektu finansowanego w ramach Badań Naukowych Służących Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich na wydziale Chemii UG (Nr 539-T070-B016-22).
- (**2023**) Kierownik projektu finansowanego w ramach Badań Naukowych Służących Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich na wydziale Chemii UG (Nr 539-T070-B995-23).