

Iwona Komaniecka, Adam Choma

Zakład Mikrobiologii Ogólnej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej,
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, e-mail: ikoma@biotop.umcs.lublin.pl

Wpłynęło w marcu 2006 r.

1. Wprowadzenie. 2. Struktura peryplazmatycznych glukanów. 2.1. Liniowe β -(1,2)-glukany. 2.2. Cykliczne β -(1,2)-glukany (cyklosoforany). 2.3. Cykliczne β -(1,2)-glukany z jednym wiązaniem typu α -(1,6) w pierścieniu. 2.4. Cykliczne β -(1,3);(1,6)-glukany. 3. Synteza peryplazmatycznych glukanów. 3.1. Biosynteza szkieletu cukrowego. 3.2. Modyfikacja oligosacharydów. 3.3. Regulacja biosyntezy OPG. 4. Rola peryplazmatycznych glukanów. 5. Podsumowanie

Periplasmic β -glucans of Gram-negative bacteria

Abstract: Osmoregulated Periplasmic Glucans (OPGs) are intrinsic components of the bacterial envelope of many Proteobacteria. These oligosaccharides share several common structural characteristics: D-glucose is the sole component sugar, β -glycosidic bonds are the main type of linkages, glucans synthesis and accumulation are inversely proportional to the osmotic strength of the environment.

Four families of periplasmic β -glucans have been described so far: 1) linear oligosaccharides, which are branched and contain β -(1,2) and β -(1,6) linkages; 2) cyclic β -(1,2) glucans; 3) cyclic β -(1,2) glucans with one α -(1,6) linkage; 4) cyclic β -(1,3); β -(1,6) glucans. OPGs may be substituted by one or several residues such as: *sn*-1-phosphoglycerol, phosphoethanolamine or phosphocholine, which originate from the membrane phospholipids. Also some intermediary metabolites can serve as glucan substituents (i.e.: acetic, methylmalonic and succinic acid O-ester). Periplasmic β -glucans may be neutral or anionic in character. Except for the role in osmoprotection, OPGs are important in virulence, symbiosis, biofilm formation and resistance to antibiotics.

1. Introduction. 2. The structure of periplasmic glucans. 2.1. Linear β -(1,2)-glucans. 2.2. Cyclic β -(1,2)-glucans (cyclosoforans). 2.3. Cyclic β -(1,2)-glucans with one α -(1,6)-linkage in the ring. 2.4. Cyclic β -(1,3);(1,6)-glucans. 3. Synthesis of periplasmic glucans. 3.1. Biosynthesis of sugar backbone. 3.2. Modification of oligosaccharides. 3.3. Regulation of OPG biosynthesis. 4. The role of periplasmic glucans. 5. Summary

Słowa kluczowe: osmoregulacja, OPG, peryplazmatyczny β -glukan

Key words: osmoregulation, OPG, periplasmic β -glucan

1. Wprowadzenie

W roku 1942 McIntire i współpracownicy opisałi cykliczne oligomery glukozy wyizolowane z pożywki, w której hodowano bakterie z gatunku *Agrobacterium tumefaciens* (obecnie: *Rhizobium radiobacter*) [32]. Sądzone, że stanowią one nową podklasę egzopolisacharydów. Nieco później podczas badań nad metabolizmem fosfolipidów u *E. coli* wykazano obecność podobnych związków w peryplazmie tych bakterii. Wykazano wtedy, że przemiany fosfatydyloglicerolu są związane z transferem reszty *sn*-1-fosfoglicerolu na cząsteczkę peryplazmatycznego glukanu. W literaturze przyjął się skrót MDO (membrane derived oligosaccharides) dla określenia tych oligosacharydów. Okazało się, że zarówno glukany wyizolowane z komórek *A. tumefaciens*, jak i MDO z peryplazmy *E. coli* podlegają regulacji osmotycznej. Stąd wywodzi się ich wspólna nazwa: osmoregulowalne peryplazmatyczne glukany (osmoregulated periplasmic glucans – OPG) [27, 34].

Obecnie przyjmuje się, że OPG są powszechne u bakterii Gram-ujemnych i mieszczą się w przestrzeni

peryplazmatycznej. Przestrzeń ta jest wypełniona macierzą mającą postać żelu, w której oprócz glukanów i woreczka mureinowego obecne są liczne białka: między innymi enzymy, białka opiekuńcze, przenośniki substancji drobnocząsteczkowych, takich jak: aminokwasy, peptydy, cukry, witaminy, koenzymy, nukleotydy i jony związków nieorganicznych. W poszczególnych grupach bakterii glukany mają różną budowę, jednak można dopatrzeć się pewnych cech wspólnych. Są to polimery D-glukozy, która może być dodatkowo podstawiona składnikami niecukrowymi. Z reguły reszty glukozy są ze sobą połączone wiązaniami β -glikozydowymi, a wiązania α -glikozydowe spotyka się sporadycznie. Glukany mogą stanowić od 5 do 20% całkowitej suchej masy komórki. Ich ilość zależy od gatunku bakterii, warunków hodowli, a także od fazy wzrostu komórek. Najwięcej tych oligocukrów powstaje w logarytmicznej fazie wzrostu hodowli. W przestrzeni peryplazmatycznej mogą osiągać stężenie od 10 do 100 mM. Część glukanów jest wydzielana do podłoża. Tutaj ich ilość różni się znacznie i zależy od gatunku bakterii, a także jest silnie uwarunkowana przez fazę wzrostu oraz czynniki otoczenia. Wydzielanie

peryplazmatycznych glukanów na zewnątrz komórki wymaga wysoka temperatura oraz osmotycznie czynne składniki pożywek. Duże ich stężenie w podłożu stwierdza się w stacjonarnej fazie hodowli.

2. Struktura peryplazmatycznych glukanów

Na podstawie budowy cząsteczek można oligocukry te zaklasyfikować do czterech grup:

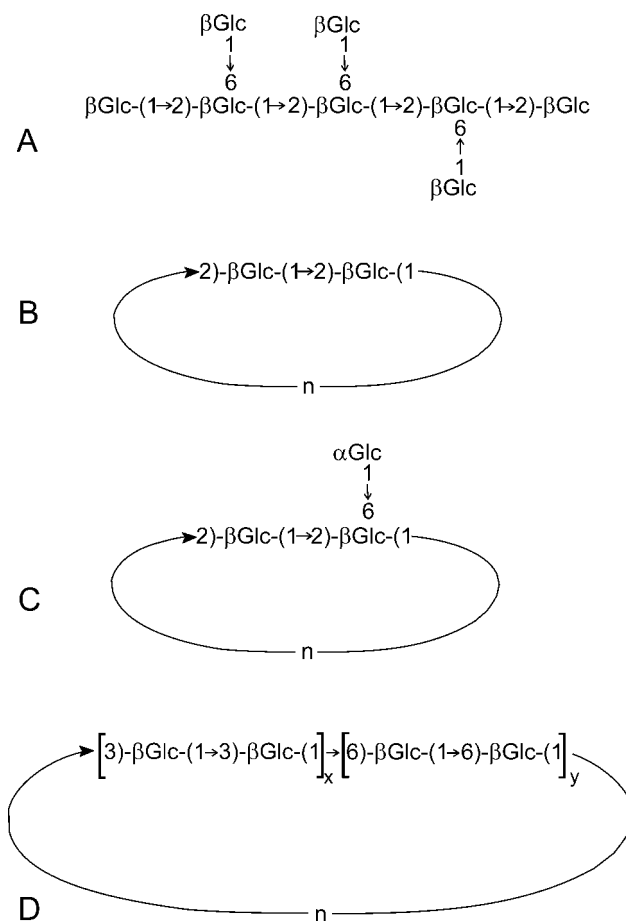
1. liniowe β -(1,2)-glukany;
2. cykliczne β -(1,2)-glukany;
3. cykliczne β -(1,2)-glukany z jednym wiązaniem typu α -(1,6);
4. cykliczne β -(1,3);(1,6)-glukany.

2.1. Liniowe β -(1,2)-glukany

Do tej grupy należą peryplazmatyczne oligocukry pochodzące z komórek *E. coli* oraz innych enterobakterii. Szkielet cząsteczki najczęściej jest utworzony z 8–9 reszt glukozy, choć spotyka się również cząsteczki zbudowane z 5 a nawet 12 reszt (rys. 1A). Cząsteczki glukozy w głównym łańcuchu są ze sobą połączone wiązaniami typu β -(1,2). Stwierdzono obecność licznych odgałęzień przyłączonych wiązaniami β -(1,6) glikozydowymi. Charakterystyczną cechą tej klasy peryplazmatycznych glukanów jest obecność podstawników niecukrowych. Najczęściej są to reszty fosfoglicerolu, fosfoetanolaminy, kwasu bursztynowego i octowego. W związku z tym większość cząsteczek glukanów znajdujących się w przestrzeni peryplazmatycznej komórek *E. coli* ma charakter anionowy [27]. Podobną budowę posiadają liniowe oligocukry izolowane z innych bakterii należących do γ -Proteobacteria, jak np. *Erwinia chrysanthemi* (u której występują glukany zbudowane z 5–12 reszt glukozy) [13] oraz *Pseudomonas syringae* (6–13 reszt glukozy w cząsteczce glukanu) [43].

2.2. Cykliczne β -(1,2)-glukany (cyklosoforany)

Są to oligosacharydy syntetyzowane przez bakterie należące do *Rhizobiales*, z rodzajów: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Agrobacterium* oraz *Brucella* [10, 12, 22, 23]. Cząsteczki tych oligosacharydów są cykliczne, a monomery glukozy łączą się wyłącznie wiązaniami β -(1,2). Stopień polimeryzacji reszt glukozy (DP) jest dość zróżnicowany [9]. U *Rhizobium leguminosarum* wynosi od 17 do 25, u *Mesorhizobium huakuii* DP = 17–28, natomiast u *Sinorhizobium meliloti* może sięgać nawet 40 reszt glukozy w pierścieniu. Nie udało się stwierdzić β -(1,2)-glukanów o liczbie podjednostek mniejszej niż 17. Prawdopodobnie mniejsze pierścienie przy tym typie wiązań



Rys. 1. Struktury wybranych peryplazmatycznych glukanów:

- A) *E. coli* [26];
- B) *Mesorhizobium huakuii* [12];
- C) *Ralstonia solanacearum* [29];
- D) *Azorhizobium caulinodans* [27].

n – liczba reszt glukozy w pierścieniu
x, y – liczba reszt glukozy połączonej odpowiednio
wiązaniami β -(1,3) i β -(1,6)

nie są energetycznie uprzywilejowane [46]. Strukturę cyklicznego β -(1,2)-glukanu przedstawiono na rys. 1B.

Początkowo sugerowano, że cykliczne β -(1,2)-glukany to oligocukry niemodyfikowane, a więc o charakterze obojętnym [33]. Okazało się jednak, że mogą one ulegać przemianom polegającym na dołączeniu anionowych podstawników takich, jak *sn*-1-fosfoglicerol, bursztynian, czy metylomalonian [9, 23, 35]. Dominującym podstawnikiem cyklicznych glukanów u *Sinorhizobium* i *Agrobacterium tumefaciens* jest *sn*-1-fosfoglicerol, pochodzący z części polarnej fosfatydyloglicerolu, będącego budulcem błon lipidowych. Podstawnik ten jest związany z cząsteczką glukozy w pozycji C-6 poprzez wiązanie fosfodiesterowe. Stwierdzono, że podczas logarytmicznej fazy wzrostu bakterii, liczne cząsteczki cyklicznych oligomerów są podstawiane jedną do czterech reszt *sn*-1-fosfoglicerolu, natomiast w fazie stacjonarnej obserwuje się głównie syntezę glukanów obojętnych [35].

2.3. Cykliczne β -(1,2)-glukany z jednym wiązaniem typu α -(1,6) w pierścieniu

Do tej grupy zaliczane są cykliczne oligosacharydy wyizolowane z komórek *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* i *Rhodobacter sphaeroides* [42, 45]. Częsteczki glukanu *Ralstonia* zawierają 13 reszt glukozy w pierścieniu, *Xanthomonas* wytwarza glukany zbudowane z 16 reszt, zaś *Rhodobacter* z 18. W pierścieniu oligocukrowym jedno wiązanie jest typu α -(1,6), a pozostałe reszty glukozy połączone są wiązaniami typu β -(1,2) (rys. 1C). Prawdopodobnie obecność wiązania α -(1,6) powoduje większe usztywnienie cząsteczki polimeru w porównaniu z bardziej elastycznymi strukturami cyklicznych glukanów posiadających w szkielecie wyłącznie wiązania typu β -(1,2) [30].

2.4. Cykliczne β -(1,3);(1,6)-glukany

Ta grupa obejmuje polimery, w których reszty glukozy są ze sobą połączone wiązaniami β -(1,3) i β -(1,6)-glikozydowymi. Obecność takich oligosacharydów stwierdzono u bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium*, u gatunków: *Azospirillum brasilense* oraz *Azorhizobium caulinodans* [1, 28, 41].

Bradyrhizobia syntetyzują cykliczne β -glukany zawierające od 10 do 13 reszt glukozy w pierścieniu. W cząsteczce zbudowanej z 13 reszt, dwanaście tworzy szkielet główny, natomiast trzynasta reszta jest rozgałęzieniem łączącym się z pierścieniem poprzez grupę OH przy węglu C-6 glukozy tworzącej wiązanie β -(1,3)-glikozydowe. W takim oligomerze reszty glukozy połączone wiązaniami β -(1,3) mogą być zgrupowane w układy tripletowe, które są oddzielone resztami glukozy połączonej wiązaniami β -(1,6). Sekwencje zawierające wiązania typu β -(1,6), mogą występować w grupach: po dwie, cztery lub pięć reszt glukozy. Częsteczki glukozy tworzące wiązanie β -(1,3) są podstawione fosfocholimą, przyłączoną do C-6 reszty glukozy. Fosfocholina będąc podwójnym jonem (zwitter ion) powoduje, że ładunek elektryczny glukanu zależy od własności roztworu, w którym są one rozpuszczone [9, 41].

Opisane niedawno peryplazmatyczne glukany *Azorhizobium caulinodans* mają budowę podobną do oligocukrów bradyrhizobiowych (rys. 1D). Stopień polimeryzacji tych cyklicznych molekuł wynosi od 10 do 13. Zdecydowaną większość (97%) stanowią cząsteczki jedenastomerowe. Stwierdzono, że w tych oligocukrach wiązania typu β -(1,3) mogą występować w grupach zawierających od dwóch do siedmiu reszt glukozy, z widoczną przewagą fragmentów złożonych z trzech i czterech monomerów. W przeciwieństwie do glukanów *Bradyrhizobium*, u *Azorhizobium* brak jest odgałęzień, a cząsteczki mają charakter obojętny, nie stwierdzono bowiem u nich jakichkolwiek podstawników [27].

Peryplazmatyczne glukany wyizolowane z komórek *Azospirillum brasilense* są mieszaniną trzech typów oligomerów. Podstawowy typ zbudowany jest z 12 reszt glukozy, połączonych trzema wiązaniami typu β -(1,3), ośmioma β -(1,6) i jednym wiązaniem typu β -(1,4). Drugi typ glukanu powstaje przez przyłączenie wiązaniem α -(1,3) jednej reszty glukozy do wspomnianej struktury podstawowej. Trzeci typ to modyfikacja glukanu typu drugiego. Polega ona na metylowaniu α -(1,3)-związanej reszty glukozy w pozycji C-2 [1].

3. Synteza peryplazmatycznych glukanów

3.1. Biosynteza szkieletu cukrowego

Na podstawie analizy fenotypów mutantów niezdolnych do syntezy glukanów wyodrębniono i scharakteryzowano szereg genów niezbędnych w biosyntezie OPG.

U *E. coli* wykryto dwa geny tworzące operon *opgGH* (lub *mdoGH*). Znajduje się on w bezpośrednim sąsiedztwie genu *pyrC*, którego produkt bierze udział w syntezie uracylu [8, 27]. Produktem genu *opgH* jest białko błonowe o masie cząst. 97 kDa. Osiem segmentów transmembranowych połączonych trzema długimi regionami cytoplazmatycznymi tworzy kanał, służący do translokacji OPG do przestrzeni peryplazmatycznej. Proces translokacji odbywa się równolegle z biosyntezą łańcucha cukrowego [14]. Białko OpgH (MdoH) jest niezbędne do wyrażenia aktywności glukozylotransferazy, katalizującej *in vitro* powstawanie liniowego łańcucha β -(1,2)-oligosacharydowego z UDP-glukozy jako prekursora [27]. Główna domena OpgH wykazuje pewne podobieństwa strukturalne z rodziną 2-glikozylotransferaz [7].

OpgG (MdoG) jest białkiem peryplazmatycznym o masie cząst. 56 kDa, zawiera ono dwie domeny o strukturze β . Miejsce aktywne tego białka enzymatycznego zbudowane jest z aminokwasów kwaśnych i aromatycznych, wykazując podobieństwo strukturalne do takich enzymów jak mutarotaza galaktozowa i glukodekstranaza. OpgG współpracuje z OpgH, katalizując proces tworzenia odgałęzień od głównego szkieletu glukanu. Ponieważ prekursor do tej reakcji (UDP-glukoza) znajduje się wyłącznie w cytoplazmie, to najbardziej prawdopodobne jest, że rozgałęzienia mogą powstawać poprzez rearanżację podjednostek glukozyowych pierwotnie przyłączonych do liniowego szkieletu wiązaniem β -(1,2)-glikozydowym. Przypuszcza się, że po peryplazmatycznej stronie błony cytoplazmatycznej OpgG wycina i przenosi reszty glukozy na tę samą lub inną cząsteczkę glukanu, tworząc rozgałęzienia przyłączone wiązaniem β -(1,6)-glikozydowym. Podobny proces zachodzi podczas powstawania

rozgałęzień w cząsteczkach glikogenu [21]. Udowodniono, że operon *opgGH* (*mdoGH*) podlega kontroli osmotycznej [7, 27].

Geny homologiczne do *opgGH* wyizolowano z komórek *Pseudomonas syringae* i *Erwinia chrysanthemi* [7, 27]. Obecność konserwatywnych sekwencji wykazujących podobieństwo do sekwencji *opgGH* stwierdzono również u innych bakterii należących do γ -Proteobacteria. U β -Proteobacteria takie sekwencje stwierdzono w genomie *Nitrosomonas europaea* [27].

Bakterie *Sinorhizobium meliloti* posiadają dwa sprzężone geny: *ndvB* i *ndvA* (**n**odule **d**evelopment) [9]. Gen *ndvB* koduje duże białko błonowe o masie cząst. około 319 kDa. Aktywność enzymatyczną NdvB badano *in vitro*. Wykazano, że jedynie 60 % cząsteczki tego białka, licząc od końca aminowego, jest niezbędne do syntezy glikanu. Produktem genu *ndvA* jest białko cytoplazmatyczne o masie cząst. 67 kDa. Sekwencja aminokwasowa tego białka wykazuje podobieństwo do składników systemu sekrecyjnego typu I (ABC-transporter), a zwłaszcza do białka HlyB. Prawdopodobnie białko NdvA bierze udział w translokacji glikanu do przestrzeni peryplazmatycznej oraz do środowiska zewnętrznego [44].

U *Agrobacterium tumefaciens* (*R. radiobacter*) zidentyfikowano podobne geny. Nazwano je *chvB* i *chvA* (**ch**romosomal **v**irulence). U *Sinorhizobium fredii* stwierdzono obecność genu *ndvB* zaś u *Brucella abortus* genu *cgs* [26]. Wykazano, że geny te mogą komplementować wadliwe szlaki biosyntezy OPG u mutantów *ndvB*⁻ *S. meliloti* [44]. Prawdopodobnie białka NdvB i ChvB uczestniczą we wszystkich etapach biosyntezy szkieletu rozpoczynając od UDP-glukozy jako substratu. Do ich aktywacji wymagana jest obecność jonów Mg²⁺ i Mn²⁺.

Dwa sprzężone geny *ndvB* i *ndvC* zidentyfikowano u *Bradyrhizobium japonicum*. Produktem genu *ndvB* jest białko o masie cząst. 102 kDa, zaś genu *ndvC* – białko o masie cząst. 62 kDa. Prawdopodobnie oba są białkami błonowymi. Inaktywacja genu *ndvB* prowadzi do zahamowania syntezy OPG, natomiast gdy inaktywacji ulega gen *ndvC*, produkowana jest normalna ilość OPG lecz w szkielecie reszty glukozy połączone są wyłącznie wiązaniami typu β -(1,3). Należy wnosić, że białko NdvB jest niezbędne do zainicjowania polimeryzacji β -(1,3) związanych reszt glukozy. Z kolei NdvC jest odpowiedzialne za powstawanie wiązań typu β -(1,6). Ostateczna forma glikanu może powstawać na drodze przyłączenia kolejnej podjednostki glukozowej wiązaniem β -(1,6), albo też poprzez rearanżację wiązań β -(1,3) pierwotnej molekuly [6]. Białko NdvB *B. japonicum* nie wykazuje znaczących podobieństw z sekwencją aminokwasową analogicznego białka *S. meliloti*. Należy ono do tej samej klasy glikozylotransferaz co OpgH. Natomiast gen *ndvC*

ma podobną sekwencję do niektórych genów drożdżowych, biorących udział w metabolizmie glikanów u tych mikroorganizmów [6].

3.2. Modyfikacja oligosacharydów

Szkielet OPG jest modyfikowany poprzez przyłączenie różnych podstawników. Podstawniki te mogą pochodzić od fosfolipidów błonowych, jak np.: fosfatydyloglicerol, fosfatydyloetanamina czy fosfatydylocholina. Mogą to być również metabolity pośrednie, np.: acetyl, bursztynian, metylomalonian, których donorem jest odpowiedni acylo-CoA.

Stwierdzono, że zarówno u *E. coli* jak i u *S. meliloti*, przenoszenie reszt fosfoglicerolu następuje w przestrzeni peryplazmatycznej [27, 33, 44]. I tak, u *E. coli*, wykryto gen *opgB* (*mdoB*), który koduje białko błonowe. Wykazano, że przenosi ono resztę fosfoglicerolu z zewnętrznej powierzchni błony komórkowej na sztuczny akceptor, jakim była arbutyna, ale nie katalizuje tego procesu w obecności rozpuszczalnych cząsteczek peryplazmatycznych glikanów. W związku z tym wydaje się, że reszty fosfoglicerolu mogą być przyłączane jedynie do cząsteczek glikanów pozostających jeszcze w błonie cytoplazmatycznej. U *S. meliloti* zidentyfikowano gen *cgmB*, którego produkt wykazuje pewne podobieństwo do OpgB [44]. Przypisuje się mu funkcję przenośnika reszt fosfoglicerolu.

Stwierdzono, że w komórkach *S. meliloti* proces przyłączania reszt bursztynianowych do OPG zachodzi w przestrzeni peryplazmatycznej. W przypadku *E. coli* nie zlokalizowano jak dotąd miejsca, w którym zachodzi bursztynylacja OPG. Wykazano jedynie, że niezbędny do tego procesu gen *opgC* (*mdoC*) koduje białko zawierające 10 transbłonowych segmentów. Wydaje się, że białko to katalizuje transfer reszt bursztynianu z warstwy cytoplazmatycznej błony komórkowej do szkieletu glikanowego znajdującego się po stronie peryplazmatycznej błony [29].

3.3. Regulacja biosyntezy OPG

Biosynteza peryplazmatycznych β -glikanów jest regulowana przez bakterie dwiema drogami. Pierwsza z nich to regulacja osmotyczna. OPG są syntetyzowane obficie gdy osmolarność środowiska jest bardzo niska (mniejsza niż 100 mOsm). Gdy wzrasta powyżej 600 mOsm, to ilość OPG zmniejsza się nawet 10-krotnie [29]. Taki mechanizm regulacji zaobserwowano u większości przebadanych dotąd gatunków bakterii, np. u *R. sphaeroides*, *R. solanacearum*, *E. chrysanthemi*, *E. coli*. Zarówno w komórkach *E. coli* jak i *S. meliloti* obserwowano opóźnienie pomiędzy zmianą warunków osmotycznych środowiska, a odpowiedzią komórki na stres osmotyczny, która objawia się

zmianą stężenia OPG w przestrzeni peryplazmatycznej [15]. Przy gwałtownym obniżeniu osmolarności środowiska obserwuje się stopniowy wzrost syntezy OPG, przy czym musi upłynąć czas potrzebny do powstania kolejnej generacji, aby to stężenie osiągnęło wielkość charakterystyczną dla gatunku. Przy gwałtownym wzroście osmolarności podłoża synteza OPG nagle ustaje, lecz nie obserwuje się degradacji istniejących oligosacharydów. Rozcieńczenie następuje wyłącznie poprzez rozdzielenie wyjściowej puli glukanów do komórek potomnych [29]. Wydaje się, że regulacja biosyntezy OPG, w zależności od gatunku bakterii, może mieć miejsce na poziomie transkrypcyjnym i/lub posttranskrypcyjnym – czyli albo poprzez regulację ekspresji genów albo aktywności białek. Stwierdzono, że w odpowiedzi na zmianę osmolarności środowiska w komórkach bakteryjnych zmienia się stężenie niektórych substancji. I tak w komórkach *E. coli* następuje akumulacja jonów K^+ i glutaminianu. Pozwala to na adaptację do środowiska o umiarkowanie wysokiej osmolarności. Natomiast przy wysokiej osmolarności, bakterie te zastępują jony potasu podwyższonym stężeniem innych związków. Mogą to być poliole, np. trehaloza, aminokwasy, np. prolina, lub też metyloaminy, np. betaina glicynowa [31]. Zjawisko nagromadzenia w cytoplazmie takich substancji jak jony potasu czy jony glutaminianowe obserwowano również u rizobiów oraz u *Agrobacterium* [36]. Rolą tych związków jest utrzymanie turgoru komórki. Dowiedziono, że u tych bakterii syntetaza β -(1,2)-glukanów jest wrażliwa na obecność jonów potasu i glutaminianu [24].

Stężenie OPG w przestrzeni peryplazmatycznej może być monitorowane przez jedno lub kilka białek sensorowych [17, 18]. Sugeruje się, że wchodzi one w skład systemu będącego wewnętrznym licznikiem liczby podziałów komórkowych i pośrednio kontrolerem gęstości populacji („quorum sensing”).

U bakterii należących do rodzaju *Brucella* i mutantu *S. meliloti* GR4 nie stwierdzono zależności ilości β -glukanów w peryplazmie od warunków środowiska zewnętrznego [10, 36, 47]. U tych mikroorganizmów syntetaza β -(1,2)-glukanów nie jest wrażliwa na obecność jonów K^+ i glutaminianu [24]. W warunkach podwyższonej osmolarności środowiska obserwowano u *S. meliloti* zahamowanie procesu podstawiania cząsteczek glukanu resztami anionowymi. Należy więc sądzić, że synteza OPG i modyfikowanie gotowych cząsteczek to procesy niezależne [24]. Prawdopodobnie odpowiedź komórek na stres osmotyczny przebiega tutaj poprzez nagromadzenie innych związków osmotycznie czynnych takich jak betaina glicynowa [10].

Drugim mechanizmem regulacji syntezy OPG, jak dotąd słabo zbadanym, jest kontrola metaboliczna, oparta na zjawisku sprzężenia zwrotnego (tzw. „feed-

back control”). Ten mechanizm został odkryty podczas badań nad szczepami *E. coli* niezdolnymi do syntezy OPG przy braku glukozy w pożywce. Po dodaniu glukozy do podłoża następowała szybka akumulacja glukanów w komórkach [27, 28]. Prawdopodobnie ten mechanizm regulacji występuje również w komórkach *Azorhizobium caulinodans*. U tych bakterii produkcja glukanu nie podlega regulacji osmotycznej. Zaobserwowano jednocześnie znaczny przyrost ilości peryplazmatycznych glukanów w komórkach podczas wzrostu w warunkach stresu osmotycznego spowodowanego dodatkiem glukozy do podłoża [28].

4. Rola peryplazmatycznych glukanów

Badania fenotypów mutantów bakteryjnych defektywnych w procesie syntezy glukanów dostarczyły informacji pozwalających na określenie ich znaczenia biologicznego. Mutanty *hrpM Pseudomonas syringae* oraz mutanty *chv Agrobacterium tumefaciens* (*R. radiobacter*) są niezdolne do wywołania reakcji nadwrażliwości (HR) u roślin [11], zaś mutanty *ndv S. meliloti* tworzą defektywne brodawki na korzeniach lucerny [19]. Mutacje w genie *ndvB* u *B. japonicum* powodują całkowity brak OPG, natomiast zmiany w genie *ndvC* objawiają się powstawaniem strukturalnie odmiennych glukanów zawierających jedynie wiązania typu β -(1,3), o czym wspomniano w rozdziale 3.1. Mutanty *ndvB* mają upośledzoną zdolność do ruchu i do wzrostu na podłożu hipoosmotycznym, a także tworzą nieefektywne, ale wyraźnie zróżnicowane brodawki na korzeniach soi, roślinnym gospodarzu *B. japonicum* [5]. Z kolei zaobserwowano, że mutanty w genie *ndvC* produkujące cykliczne glukany zawierające wyłącznie wiązania typu β -(1,3) (tzw. cyklodekakis-(1,3)- β -glukany), wykazują zdolność do ruchu i wzrostu w warunkach obniżonego ciśnienia osmotycznego na poziomie szczepu rodzicielskiego, ale nie są zdolne do nawiązania efektywnej symbiozy [4]. Proces brodawkowania jest wydatnie opóźniony, a pozbawione bakterii pseudobrodawki, zawierają komórki o pogrubionej ścianie, zagęszczonej cytoplazmie i licznych wakuolach [6]. Na podstawie tych obserwacji wysunięto wniosek, że odpowiednia struktura cyklicznego β -glukanu jest ważna dla prawidłowego przebiegu interakcji symbiotycznych oraz, że glukany bakterii symbiotycznych, oprócz swej roli osmoregulacyjnej, prawdopodobnie pełnią również inne, jeszcze bliżej nieokreślone funkcje.

Wykazano, że OPG wytwarzane przez bakterie *B. japonicum* zawierające w swej strukturze wiązania typu β -(1,3);(1,6) są podobne strukturalnie do frakcji niecyklicznych β -(1,3);(1,6)-heptaglukozydowych oligocukrów, pochodzących ze ściany komórkowej grzybowych

patogenów soi. Oligocukry te są potężnymi aktywatorami fitoaleksyn (głównie gliceoliny sojowej) [2]. W przeciwieństwie do glukanów grzybowych, cykliczne β -glukany bradyrizobiów są słabymi aktywatorami produkcji gliceoliny. Jednocześnie stwierdzono, że β -(1,3);(1,6)-glukany *B. japonicum* USDA 110 wstrzymują odpowiedź obronną indukowaną obecnością oligocukrów grzybowych [37]. Należy więc mniemać, że cząsteczki te funkcjonują również jako supresory odpowiedzi obronnej gospodarza podczas inwazji komórek korzenia soi przez bradyrizobia [6].

Podczas, gdy cykliczne β -(1,3);(1,6)-glukany *B. japonicum* wydają się być niezbędne do prawidłowego przebiegu procesu brodawkowania, takiej zależności nie obserwuje się w przypadku glukanów *S. fredii* [25]. Bakterie te produkują cykliczne β -(1,2)-glukany, które posiadają ładunek ujemny uwarunkowany obecnością reszt fosfoglicerolu. Mutanty w genie *ndvB* mimo, że nie były zdolne do wytwarzania glukanu, to jednak indukowały aktywne, wiążące azot brodawki na korzeniach dwóch różnych odmian soi.

Z kolei badania przeprowadzone przez Dylana i wsp. [16] na mutantach *S. meliloti*, defektywnych w syntezie β -(1,2)-glukanu, pozwoliły stwierdzić, że mutanty te nie są zdolne do tworzenia efektywnych brodawek. Powstające pseudobrodawki są małe, białe i niezasiedlone. Mutanty *ndvA* i *ndvB* *S. meliloti* charakteryzują się utratą ruchliwości, podwyższoną odpornością na bakteriofagi i wzrostem wrażliwości na niektóre antybiotyki. Mutanty *ndv* są defektywne zarówno w zdolności do przylegania do powierzchni komórek roślinnych jak również mają ograniczoną zdolność do inicjacji nici infekcyjnych na korzeniach lucerny. Pseudorewertanty tych mutantów, mimo braku zdolności do syntezy peryplazmatycznego glukanu, zdolne były do wzrostu w warunkach obniżonej osmolarności środowiska. Zaobserwowano również istotną poprawę zdolności do przylegania lecz jednocześnie niewielki wzrost zdolności do tworzenia nici infekcyjnych. Wysłunięto tezę, że cykliczne β -(1,2)-glukany wytwarzane przez sinorizobia mogą funkcjonować jako cząstki sygnałowe i osmoprotektanty wspierające nodulację, lecz nie są one kluczowe dla samego procesu brodawkowania [16].

Mutacje w genach *opgGH* *E. chrysanthemi* powodują plejotropowe zmiany w fenotypie bakterii, obejmujące: nadprodukcję egzopolisacharydów (co sprawia, że kolonie są śluzowe), osłabioną ruchliwość, wzmoczoną wrażliwość na sole żółciowe, obniżoną produkcję enzymów celulolitycznych, proteolitycznych oraz pektynolitycznych, co w konsekwencji prowadzi do utraty wirulencji [13, 38]. Pośród różnych efektów obserwowanych u mutantów *opg⁻* *E. chrysanthemi* najważniejsza wydaje się być redukcja wytwarzania i sekrecji liazy pektynowej, pełniącej kluczową

rolę w wirulencji. Wydaje się, że OPG obecne w przestrzeni peryplazmatycznej tych bakterii są niezbędne dla wzrostu na gospodarzu roślinnym, nie tylko podczas samej kolonizacji rośliny, lecz również podczas namnażania się bakterii w zmacerowanej tkance [38].

Oporność *E. coli* na detergenty typu SDS jest związana z obecnością OPG. Brak lub zahamowanie syntezy OPG w obecności SDS prowadzi do lizy komórek. Stwierdzono, że nadwrażliwość na SDS występuje zarówno u mutantów w genie *opgG* jak i *opgH*. Odnotowano również wzrost wrażliwości na szok wywołany obecnością SDS w komórkach szczepów rodzicielskich *E. coli* rosnących w warunkach indukujących obniżenie ilości OPG w przestrzeni peryplazmatycznej [40].

Mutanty niezdolne do syntezy OPG wykazują plejotropowe zmiany w fenotypie, wynikające z upośledzenia funkcji osłon komórkowych. Mutanty *A. tumefaciens* i *S. meliloti* o fenotypie *Opg⁻* wyraźnie słabiej rosną na podłożu hipoosmotycznym [9], podczas gdy wzrost podobnych mutantów *E. coli* czy *E. chrysanthemi* jest tylko lekko upośledzony [27]. Obserwuje się również zmiany w chemotaksji i ruchliwości, co może być konsekwencją zmniejszonego poziomu syntezy flagelliny. Mutanty *opg⁻* *E. coli* mają inny skład poryn, tzn. błona tych bakterii zawiera podwyższoną ilość OmpC. Ponadto te bakterie są odporne na lizujące białko faga MS2 i wytwarzają zwiększoną ilość kapsularnego polisacharydu (CPS), zwanego kwasem kolanowym [17, 27]. Wydaje się, że aktywacja genów odpowiedzialnych za proces biosyntezy CPS może polegać na wzajemnym oddziaływaniu pomiędzy OPG i białkiem RcsC (sensorem) oraz białkiem RcsB (pozytywnym regulatorem).

Peryplazmatyczne glukany są zaangażowane w mechanizmy osmoprotekcji, wirulencji oraz oporności na antybiotyki. Odgrywają one również rolę w regulacji syntezy EPS, który jest niezbędny w rozwoju architektury biofilmu [39]. Mikroorganizmy uorganizowane w postaci biofilmu są odporne na działania obronne gospodarza i terapię antybiotykową. Przykładem niech będą biofilmy uropatogennych szczepów *E. coli* tworzące się w drogach moczowych i na powierzchni cewników. W obrębie powstających ognisk infekcji obserwuje się wzrost oporności na rutynowo stosowane antybiotyki. Należy nadmienić, że zakażenia dróg moczowych stanowią najbardziej pospolite zakażenia bakteryjne występujące u ludzi [20].

Peryplazmatyczne glukany to ważny, integralny składnik osłon zewnętrznych bakterii Gram-ujemnych. Odgrywają one istotną rolę w przeżywalności bakterii w ekstremalnych warunkach środowiska oraz podczas interakcji bakterii z organizmami eukariotycznymi. Peryplazmatyczne glukany niosące ładunek ujemny biorą udział w utrzymaniu potencjału Donnana w porządek błony zewnętrznej bakterii [27]. Ponadto, wcho-

dząc w interakcję z innymi składnikami, takimi jak np. fosfolipidy, czy peptydoglikan, pełnią również rolę strukturalną w organizacji osłon komórkowych [3,7]. OPG mogą funkcjonować jako cząstki informacyjne, wrażliwe na obecność specyficznych białek w przestrzeni peryplazmatycznej [15]. Duże cząsteczki cyklicznych β -(1,2)-glukanów mogą tworzyć kompleksy inkluzyjne z substancjami hydrofobowymi. Ich konformacja przestrzenna umożliwia powstanie miejsc, w których mieszczą się cząsteczki hydrofobowe. Te cykliczne oligocukry nie są degradowane przez enzymy obecne w organizmach zwierzęcych [7, 9].

5. Podsumowanie

Osmoregulowane peryplazmatyczne glukany (OPG) są istotnym składnikiem osłon zewnętrznych bakterii Gram-ujemnych. Mimo swej różnorodności posiadają one pewne cechy wspólne: jedynym składnikiem cukrowym jest D-glukoza, połączona głównie wiązaniami typu β -glikozydowego, a ich synteza i nagromadzenie w peryplazmie jest odwrotnie proporcjonalne do siły osmotycznej środowiska. Dotychczas opisano cztery rodziny peryplazmatycznych glukanów.

Oprócz roli w osmoprotekcji, peryplazmatyczne glukany są istotne w wirulencji, w symbiozie, w trakcie tworzenia biofilmu oraz w oporności szczepów na antybiotyki.

Właściwości cyklicznych β -glukanów wskazują drogi do ich potencjalnego zastosowania w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym.

Piśmiennictwo

1. Altabe S.G., Talaga P., Wieruszkeski J.-M., Lippens G., Ugalde R., Bohin J.-P.: Periplasmic glucans of *Azospirillum brasilense* (w:) Biological nitrogen fixation for the 21st century, red. C. Elmerich, A. Kondorosi, W. E. Newton, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 1998, s. 390.
2. Ayers A.R., Ebel J., Finelli F., Berger N., Albersheim P.: Host-patogen interactions. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.* **57**, 751–759 (1976)
3. Banta L.M., Bohne J., Lovejoy S.D., Dostal K.: Stability of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB10 protein is modulated by growth temperature and periplasmic osmoadaptation. *J. Bacteriol.* **180**, 6597–6606 (1998)
4. Bhagwat A.A., Gross K.C., Tully R.E., Keister D.L.: β -glucan synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: characterization of a new locus (*ndvC*) influencing β -(1 \rightarrow 6)-likages. *J. Bacteriol.* **178**, 4635–4642 (1996)
5. Bhagwat A.A., Keister D.L.: Site-directed mutagenesis of the cyclic β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-glucan synthesis locus of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**, 366–370 (1995)
6. Bhagwat A.A., Mithöfer A., Pfeffer Ph.E., Kraus C., Spickers N., Hotchkiss A., Ebel J., Keister D.L.: Further studies of the role of cyclic β -glucans in symbiosis. An *ndvC* mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesises cyclodecakis-(1 \rightarrow 3)- β -glucosyl. *Plant Physiol.* **119**, 1057–1064 (1999)
7. Bohin J.-P.: Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**, 11–19 (2000)
8. Bohin J.-P., Kennedy E.P.: Mapping of a locus (*mdoA*) that affects the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **157**, 956–957 (1984)
9. Breedveld M.W., Miller K.J.: Cyclic β -glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.* **58**, 145–161 (1994)
10. Briones G., Inón de Iannino N., Steinberg M., Ugalde R.A.: Periplasmic cyclic 1,2- β -glucan in *Brucella* spp. is not osmoregulated. *Microbiology*, **143**, 1115–1124 (1997)
11. Cangelosi G.A., Martinetti G., Nester E.W.: Osmosensitivity phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* mutants that lack periplasmic β -1,2-glucan. *J. Bacteriol.* **172**, 2172–2174 (1990)
12. Choma A., Komanińska I.: Characterisation of *Mesorhizobium huakuii* cyclic β -glucan. *Acta Biochim. Polon.* **50**, 1273–1281 (2003)
13. Cogež V., Talaga P., Lemoine J., Bohin J.-P.: Osmoregulated periplasmic glucans of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **183**, 3127–3133 (2001)
14. Debarbieux L., Bohin A., Bohin J.-P.: Topological analysis of the membrane-bound glucosyltransferase, MdoH, required for osmoregulated periplasmic glucan synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 6692–6698 (1997)
15. Dylan T., Helinski D.R., Ditta G.S.: Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires β -(1 \rightarrow 2)-glucan. *J. Bacteriol.* **172**, 1400–1408 (1990)
16. Dylan T., Nagpal P., Helinski D.R., Ditta G.S.: Symbiotic pseudorevertants of *Rhizobium meliloti* *ndv* mutants. *J. Bacteriol.* **172**, 1409–1417 (1990)
17. Ebel W., Vaughn G.J., Peters III H.K., Trempy J.E.: Inactivation of *mdoH* leads to increased expression of colanic acid capsular polysaccharide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 6858–6861 (1997)
18. Fiedler W., Roterling H.: Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **263**, 14684–14689 (1988)
19. Geremia R.A., Cavaignac S., Zorreguieta A., Toro N., Olivares J., Ugalde R.A.: A *Rhizobium meliloti* mutant that forms ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharides but fails to form β (1–2) glucan. *J. Bacteriol.* **169**, 880–884 (1987)
20. Hanna A., Berg M., Stout V., Razatos A.: Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4474–4481 (2003)
21. Hanouille X., Rollet E., Clantin B., Landrieu I., Ödberg-Feragut C., Lippens G., Bohin J.-P., Villeret V.: Structural analysis of *Escherichia coli* OpgG, a protein required for the biosynthesis of osmoregulated periplasmic glucans. *J. Mol. Biol.* **342**, 195–205 (2004)
22. Hisamatsu M.: Cyclic (1 \rightarrow 2)- β -D-glucans (cyclophorans) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* **231**, 137–146 (1992)
23. Hisamatsu M., Yamada T., Higashiura T., Ikeda M.: The production of acidic, O-acetylated cyclophorans (cyclic β -(1,2)-D-glucans) by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. *Carbohydr. Res.* **163**, 115–122 (1987)
24. Inón de Iannino N., Briones G., Iannino F., Ugalde R.A.: Osmotic regulation of cyclic 1,2- β -glucan synthesis. *Microbiology*, **146**, 1735–1742 (2000)

25. Iñón de Iannino N., Briones G., Kreiman G., Ugalde R.: Characterization of the biosynthesis of $\beta(1\text{--}2)$ cyclic glucan in *R. fredii*. $\beta(1\text{--}2)$ glucan has no apparent role in nodule invasion of Mc Call and Peking soybean cultivars. *Cell. Mol. Biol.* **42**, 617–629 (1996)
26. Iñón de Iannino N., Briones G., Tolmasky M., Ugalde R.A.: Molecular cloning and characterisation of *cgs*, the *Brucella abortus* cyclic $\beta(1,2)$ glucan synthetase gene: genetic complementation of *Rhizobium meliloti ndvB* and *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutants. *J. Bacteriol.* **180**, 4392–4400 (1998)
27. Kennedy E.P., Membrane-derived oligosaccharides (periplasmic β -D-glucans) of *Escherichia coli* (*w*) *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, red. F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Maganasik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, H.E. Umbarger, Wyd. II. A.S.M., Washington DC. 1996, s. 1064–1074.
28. Komaniecka I., Choma A.: Isolation and characterization of periplasmic cyclic β -glucans of *Azorhizobium caulinodans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **227**, 263–269 (2003)
29. Lacroix J.-M., Lanfroy E., Cogez V., Lequette Y., Bohin A., Bohin J.-P.: The *mdoC* gene of *Escherichia coli* encodes a membrane protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. *J. Bacteriol.* **181**, 3626–3631 (1999)
30. Lippens G., Wieruszkeski J.M., Hotvath D., Talaga P., Bohin J.-P.: Slow dynamics of the cyclic osmoregulated periplasmic glucan of *Ralstonia solanacearum* as revealed by heteronuclear relaxation studies. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 170–177 (1998)
31. Lucht J., Bremer E.: Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system proU. *FEMS Microbiol. Rev.* **14**, 3–30 (1994)
32. McIntire F.C., Peterson W.H., Riker A.J.: A polysaccharide produced by the crown-gall organism. *J. Biol. Chem.* **143**, 491–496 (1942).
33. Miller K.J., Gore R.S., Benesi A.J.: Phosphoglycerol substituents present on the cyclic β -1,2-glucans of *Rhizobium meliloti* 1021 are derived from phosphatidylglycerol. *J. Bacteriol.* **170**, 4569–4575 (1988)
34. Miller K.J., Kennedy E.P., Reinhold V.N. Osmotic adaptation in Gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. *Science*, **231**, 48–51 (1986)
35. Miller K.J., Reinhold V.N., Weissborn A.C., Kennedy E.P.: Cyclic glucans produced by *Agrobacterium tumefaciens* are substituted with *sn*-1-phosphoglycerol residues. *Biochim. Biophys. Acta*, **901**, 112–118 (1987)
36. Miller K.J., Wood J.M.: Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 101–136 (1996)
37. Mithöfer A., Bhagwat A.A., Feger M., Ebel J.: Suppression of fungal β -glucan-induced plant defence in soybean (*Glycine max* L.) by cyclic 1,3-1,6- β -glucans from the symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. *Planta*, **199**, 270–275 (1996)
38. Page F., Altabe S., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Lacroix J.-M., Robert-Baudouy J., Bohin J.-P.: Osmoregulated periplasmic glucan synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. *J. Bacteriol.* **183**, 3134–3141 (2001)
39. Parsek M.R., Singh P.K.: Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 677–701 (2003)
40. Rajagopal S., Eis N., Bhattacharya M., Nickerson K.W.: Membrane-derived oligosaccharides (MDOs) are essential for sodium dodecyl sulfate resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **223**, 25–31 (2003)
41. Rolin D.B., Pfeffer P.E., Osman S.F., Szwergold R.B., Kappler F., Benesi A.J.: Structural studies of a phosphocholine substituted $\beta(1,3);(1,6)$ macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Biochim. Biophys. Acta*, **1116**, 215–225 (1992)
42. Talaga P., Cogez V., Wieruszkeski J.M., Stahl B., Lemoine J., Lippens G., Bohin J.-P.: Osmoregulated periplasmic glucans of the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2464–2472 (2002)
43. Talaga P., Fournet B., Bohin J.P.: Periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* **176**, 6538–6544 (1994)
44. Wang P., Ingram-Smith C., Hadley J.A., Miller K.J.: Cloning, sequencing, and characterization of the *cgmB* gene of *Sinorhizobium meliloti* involved in cyclic β -glucan biosynthesis. *J. Bacteriol.* **181**, 4576–4583 (1999)
45. York W.S.: A conformational model for cyclic $\beta(1\text{--}2)$ -linked glucans based on NMR analysis of the β -glucans produced by *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr. Res.* **278**, 205–225 (1995)
46. Zevenhuizen L.P.T.M., van Veldhuizen A. and Fokkens R.H.: Re-examination of cellular cyclic β -1,2-glucans of *Rhizobiaceae*: distribution of ring sizes and degrees of glycerol-phosphate substitution. *Antonie Leeuwenhoek*, **57**, 173–178 (1990)
47. Zorreguieta, A., Cavaignac S., Geremia R. A., Ugalde R.A.: Osmotic regulation of $\beta(1\text{--}2)$ -glucan synthesis in members of the family *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* **172**, 4701–4704 (1990)