

Analiza transkryptomu *Agrobacterium tumefaciens* C58 i jego mutantu defektywnego w syntezie fosfatydyloetanolaminy (C58ΔpssA) w warunkach stresu środowiskowego

Iwona Komaniecka, Kamil Żebracki, Piotr Koper, Andrzej Mazur, Anita Swatek, Adam Choma

Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

WSTĘP:

Agrobacterium tumefaciens C58 to ważny z gospodarczego punktu widzenia fitopatogen, infekujący głównie rośliny dwuliścienne (ponad 800 gatunków roślin, w tym rośliny uprawne i ozdobne), odpowiedzialny za wywoływanie choroby zwanej guzowatością. Choroba ta powstaje w wyniku transformacji genetycznej tkanek rośliny-gospodarza. Za transformację nowotworową tkanek odpowiadają geny *vir* zlokalizowane na plazmidzie pTi *Agrobacterium*. Indukcja ekspresji tych genów następuje pod wpływem czynników środowiskowych, takich jak niskie pH, cukry proste oraz specyficznego induktora – acetosyringonu. Kluczowe znaczenie w interakcji bakterii z rośliną mają lipidy błonowe *A. tumefaciens*. Przeprowadzono analizę transkryptomu *A. tumefaciens* C58 oraz jego mutantu pozbawionego zdolności do syntezy fosfatydyloetanolaminy (C58ΔpssA), w warunkach stresu środowiskowego (niskie pH, obecność glukozy oraz acetosyringonu).

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA:

Badania prowadzono na szczepie dzikim *A. tumefaciens* C58 (oznaczonym jako *Atu_Wt*) oraz na jego mutancie z delecją genu *pssA* (syntaza fosfatydyloserynowa w szlaku syntezy fosfatydyloetanolaminy (PE) - głównego lipidu błonowego) (szczep o nazwie C58ΔpssA). Hodowlę prowadzono w zmodyfikowanej pożywce 79CA wg Vincenta (1970), pozbawionej wyciągu drożdżowego (-YE), stosując glukozę jako źródło węgla. W celu wywołania stresu środowiskowego pH podłoża obniżono do wartości 5.5. Kontrolę stanowiły warunki standardowe: pH 6.7). W celu indukcji genów *vir* do hodowli o pH 5,5; dodano acetosyringon. Całkowite RNA wyizolowano z komórek szczepu dzikiego oraz mutantu, hodowanych przez 19 godzin (faza logarytmiczna), w temperaturze 28°C, z wytrząsaniem. Każdy wariant przygotowano w trzech powtórzeniach. Analizę statystyczną mającą na celu wytypowanie genów, których poziom ekspresji w badanych warunkach w mutancie uległ istotnej zmianie (DEG – differentially expressed genes) przeprowadzono z wykorzystaniem narzędzia DESeq2, a do wyłonienia DEG zastosowano następujące progi minimalne: wartość $p\text{-adj} \leq 0.05$, krotność indukcji/represji ($\log \text{fold change}$) $-1 \leq \log \text{FC} \geq 1$, CPM (Counts per Milion) ≥ 1 (ten ostatni parametr eliminuje z analizy różnicowej geny, których poziom ekspresji w badanych warunkach jest bardzo niski i może zaburzać analizę).

WYNIKI:

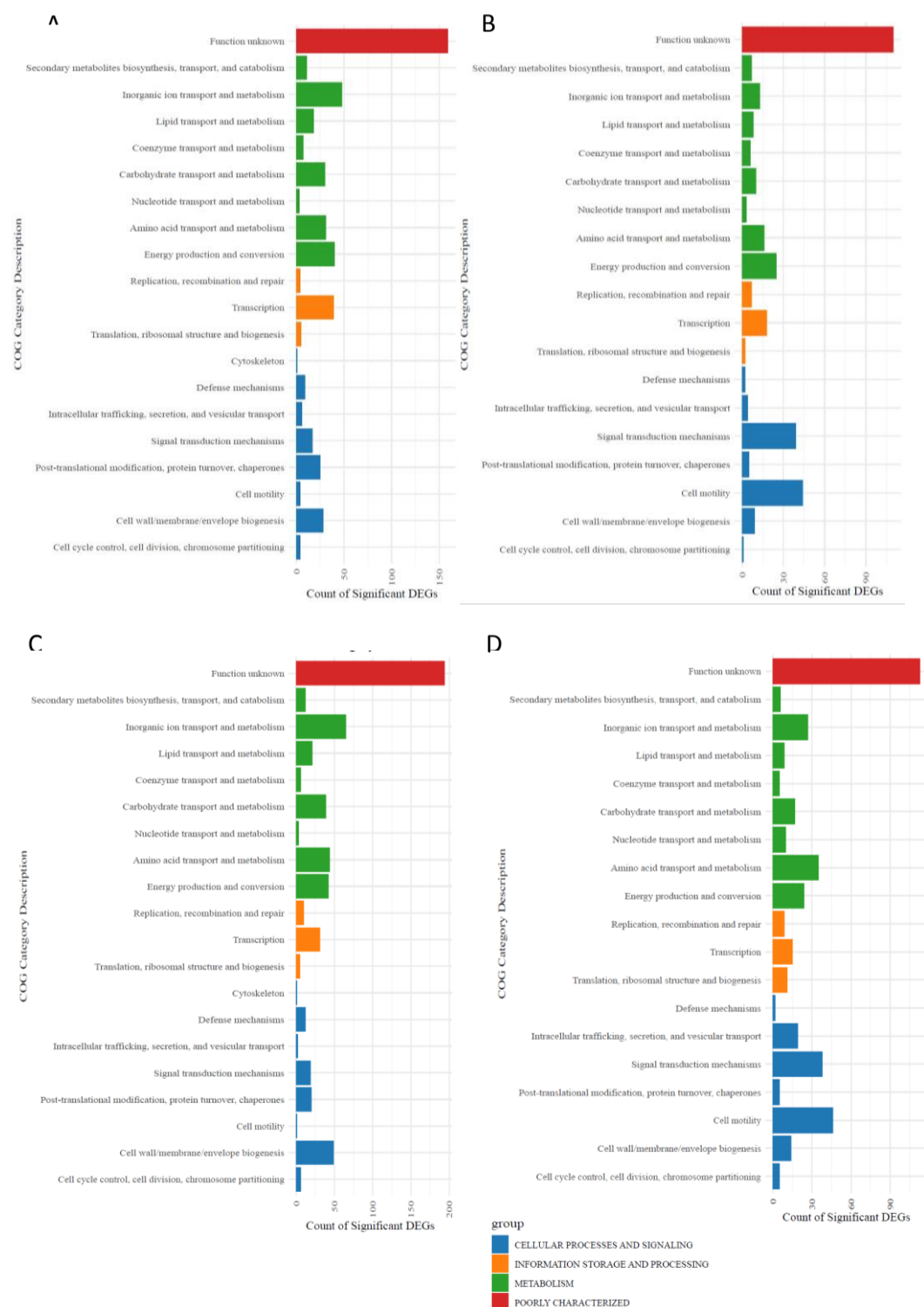
- Przeprowadzono analizę transkryptomu *A. tumefaciens* C58 (*Atu_Wt*) oraz jego mutantu pozbawionego zdolności do syntezy fosfatydyloetanolaminy (C58ΔpssA), w warunkach stresu środowiskowego indukującego ekspresję genów *vir* (niskie pH, obecność glukozy oraz acetosyringonu).
- Zróżnicowaną ekspresję genów porównywano w następujących wariantach: mutant C58ΔpssA vs. *Atu_Wt* (pH 6.7) oraz mutant C58ΔpssA vs. *Atu_WT* (pH 5.5).
- Wykazano, że każdy ze zbadanych warunków hodowli skutkuje istotną zmianą poziomu ekspresji dużej liczby genów, wśród których przeważają geny, które ulegały indukcji (Tabela 1).
- W celu identyfikacji szlaków/procesów metabolicznych modulowanych w komórkach mutantu C58ΔpssA w odpowiedzi na stres przeprowadzono adnotację funkcjonalną genów DEG do klastrów ortologicznych grup białek (COGs, narzędzie reCOGnizer).
- Nadrepzentowane kategorie COG, wśród których, w warunkach wzrostu komórek mutantu C58ΔpssA w pH 6.7, dominowały indukowane geny obejmowały (poza genami o nieznannej funkcji) procesy związane z metabolizmem i transportem związków nieorganicznych, produkcją i konwersją energii oraz transkrypcją, natomiast geny **wyciszone** istotnie przeważały w kategoriach COG obejmujących szlaki transmisji sygnałów oraz związane z ruchliwością komórki (Fig. 1A i B).
- Stres niskiego pH (5.5) **indukuje** w komórkach mutantu C58ΔpssA ekspresję licznych genów związanych z metabolizmem i transportem związków nieorganicznych oraz biogenezą osłony komórkowej, a w mniejszym stopniu genów odpowiedzialnych za transport i metabolizm węglowodanów i aminokwasów (Fig. 1C).
- W tych samych warunkach w komórkach mutantu silnie wyciszone są liczne geny odpowiedzialne za transmisję sygnałów i ruchliwość (podobnie, w jak w warunkach obojętnego pH 6.7), a dodatkowo geny przynależne do szlaków transportu i metabolizmu aminokwasów.
- Unikalną (spośród wszystkich analizowanych wariantów) grupą genów **wyciszanych** specyficznym w komórkach mutantu C58ΔpssA w kwaśnym pH są geny z kategorii COG U (**wydzielanie i transport wewnątrzkomórkowy**), która u bakterii obejmuje także różne systemy wydzielania (np. typu I-VI) wykorzystywane do transportu białek przez ich błony komórkowe (Fig. 1D).

Tabela 1. Liczba DEG w komórkach mutantu C58ΔpssA rosnącego w różnych warunkach

Wariant eksperymentalny w którym określono zróżnicowaną ekspresję genów	Całkowita liczba DEG	Liczba DEG, które uległy indukcji (upregulated)	Liczba DEG, które uległy represji (downregulated)
C58ΔpssA vs. <i>Atu_Wt</i> (pH 6.7)	761	464	297
C58ΔpssA vs. <i>Atu_WT</i> (pH 5.5)	929	554	375

WNIOSKI:

- Stres środowiskowy symulujący proces infekcji (niskie pH, obecność glukozy i acetosyringonu) u mutantu *A. tumefaciens* C58 pozbawionego zdolności do syntezy PE (C58ΔpssA), indukuje wzmożoną ekspresję genów związanych z metabolizmem i transportem związków nieorganicznych, a także z biogenezą osłony komórkowej.
- W tych warunkach, u mutantu geny odpowiedzialne za ruchliwość i transmisję sygnałów ulegają wyciszeniu, co wskazuje na słabsze możliwości infekcyjne szczepu mutantu w porównaniu ze szczepem dzikim.



Ryc. 1. Adnotacja funkcjonalna genów DEG do klastrów ortologicznych grup białek (COGs). Przedstawione panele odpowiadają wariantom opisanym w Tabeli 1 i obejmują odpowiednio geny indukowane i wyciszone w komórkach mutantu C58ΔpssA względem szczepu dzikiego *Atu_WT* w pH 6.7 (A i B) oraz w pH 5.5 (C i D). Wg legendy, poszczególne kolory oznaczają: **niebieski** – geny odpowiedzialne za procesy komórkowe i przekazywanie sygnałów; **pomarańczowy** – przechowywanie i przetwarzanie informacji; **zielony** – metabolizm; **czerwony** – geny słabo scharakteryzowane lub o nieznannej funkcji.