

Analiza funkcjonalna genów kodujących hipotetyczne kinazy i fosfatazy tyrozynowe *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*



UMCS 80 LAT UMCS

Kamila Rusek^{1,2*}, Marcelina Łukasik¹, Małgorzata Marczak¹

¹ Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie

² Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie

* kamila.rusek@mail.umcs.pl

VIII Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne „METAGENOMY RÓŻNYCH ŚRODOWISK” 2024

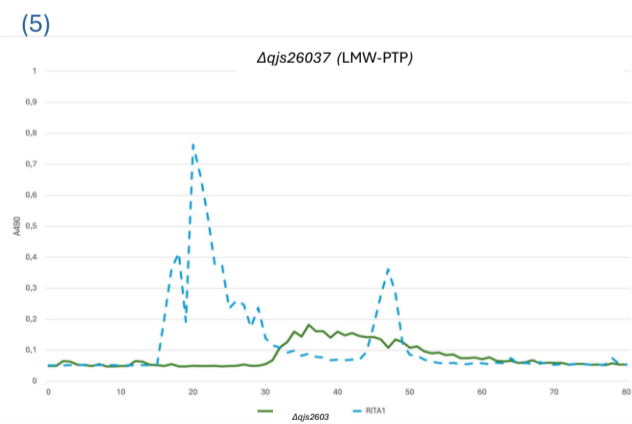
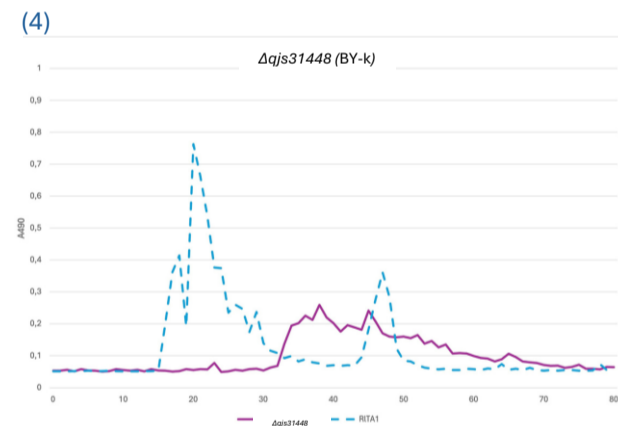
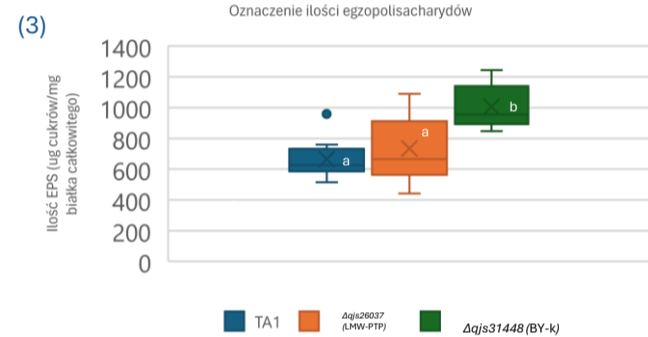
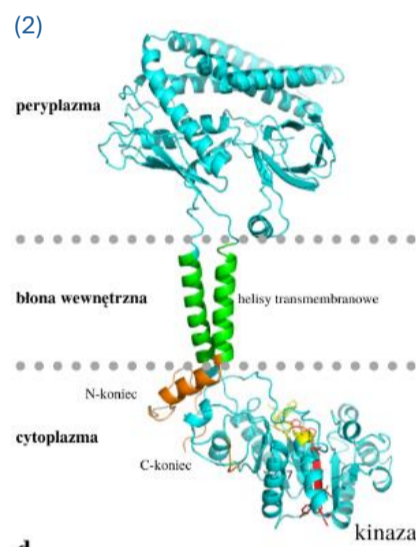
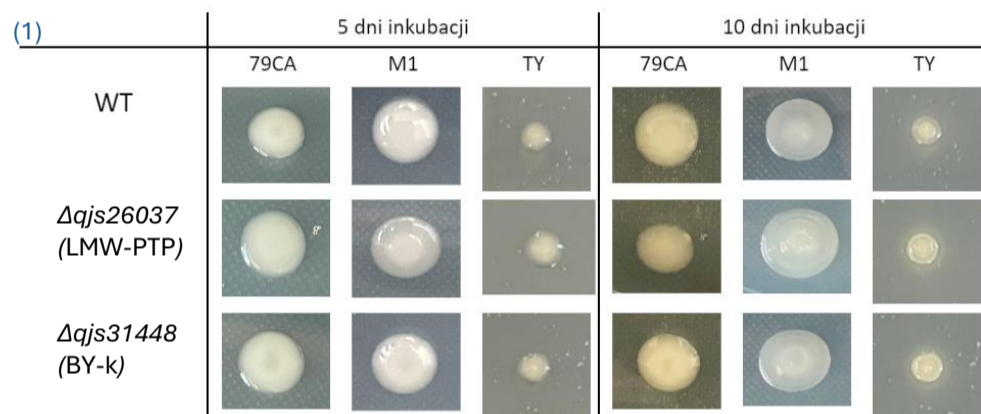
Wprowadzenie

Rizobia to bakterie glebowe zdolne do oddziaływań symbiotycznych z roślinami bobowatymi oraz redukcji azotu atmosferycznego do amoniaku wewnątrz brodawek indukowanych na korzeniach roślin. Taka drastyczna zmiana warunków życia z formy wolnożyjącej do symbiotycznej wymaga współdziałania złożonego układu czynników, do których należą **egzopolisacharydy** (EPS). EPS syntetyzowane są w szlaku Wzx/Wzy-zależnym, a jednym z kluczowych elementów tego procesu jest tzw. **kopolimeraza** (PCP). Białko to wykazuje aktywność **autokinazy tyrozynowej** i **m.in. reguluje długość łańcuchów polisacharydowych**. Analiza sekwencji genomu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 (*RITA1*) wykazała obecność dwóch genów kodujących białka o cechach autokinaz tyrozynowych: PssP i QJS31448, a także trzech genów kodujących niskocząsteczkowe fosfatazy tyrozynowe, które mogą komplementarnie uczestniczyć w procesie defosforylacji. Celem badań była analiza funkcjonalna genu kodującego kinazę QJS31448 oraz genu kodującego fosfatazę QJS26037.

Metody

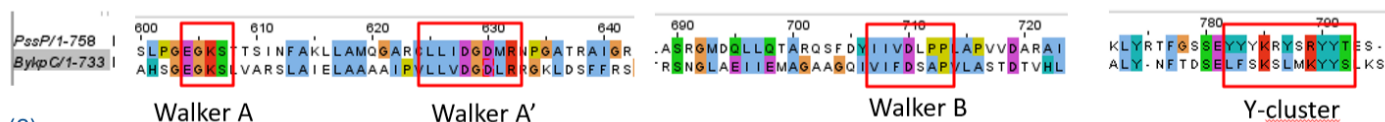
W celu przeprowadzenia analizy funkcjonalnej skonstruowano mutanty dla genów QJS31448 i QJS26037 poprzez przerwanie ich ciągłości za pomocą integracji wektora samobójczego. EPS wytrącano z płynu hodowlanego etanolem w stosunku 3:1 (v/v). Przeprowadzono analizę kinetyki wzrostu w różnych pożywkach (bogate/minimalne), z dodatkiem stresorów oraz różnej wartości pH. Do oceny jakościowej EPS zastosowano metodę chromatografii żelowo-permeacyjnej (SEC).

Wyniki



Analiza bioinformatyczna białka QJS31448, obejmująca modelowanie struktury (Phyre2) (2), adnotację sekwencji aminokwasowej (BYKdb) oraz przewidywanie topologii (DeepTMHMM), wskazuje na jego przynależność do **rodziny bakteryjnych kinaz tyrozynowych (BY-kinaz)**. W sekwencji białka zidentyfikowano konserwatywne motywy Walker A, Walker A' oraz Walker B (6), charakterystyczne dla białek wiążących ATP, a także C-koniec bogaty w reszty tyrozynowe. Analogiczną topologię wykazuje białko PssP *RITA1* zidentyfikowane jako BY-kinaza, której delecja skutkuje zahamowaniem produkcji EPS i zmianami fenotypowymi (Mazur et al., 2002).

Pomimo **braku obserwowalnych zmian fenotypowych** (1) w morfologii kolonii szczepów z uszkodzeniem genu *qjs31448* (kinazy) oraz *qjs26037* (fosfatazy), szczegółowe analizy ilościowe i jakościowe **EPS ujawniły istotne różnice**. Szczep z uszkodzeniem genu kinazy **wykazywał znaczącą nadprodukcję EPS** (3) w porównaniu do szczepu dzikiego oraz mutanta w genie kodującym fosfatazę. Analiza rozkładu mas cząsteczkowych EPS obu mutantów potwierdziła **zmiany w stopniu polimeryzacji** (4,5), szczególnie brak wyraźnego podziału na frakcje wysoko- (HMW) i nisko- (LMW) cząsteczkowe, charakterystycznego dla szczepu dzikiego. Zbliżone wzorce polimeryzacji EPS obu mutantów sugerują współdziałanie kinazy i fosfatazy w regulacji jego biosyntezy. Warto zaznaczyć, że analiza tempa wzrostu mutantów w pożywkach pełnych i minimalnych oraz ocena wrażliwości na wybrane stresory nie wykazały różnic w porównaniu do szczepu dzikiego (*dane nie przedstawione*).



Wnioski

- Uszkodzenie genu kinazy tyrozynowej *qjs31448* prowadzi do **znaczącej nadprodukcji EPS**, co wskazuje na zaangażowanie kodowanego białka w regulację biosyntezy egzopolisacharydów.
- Zbliżone wzorce polimeryzacji EPS dla obu mutantów sugerują **współdziałanie** kinazy QJS31448 i fosfatazy QJS26037 w tym procesie.
- Ocena wydajności oddziaływań symbiotycznych z kończyną czerwoną (*Trifolium pratense* L.) będzie istotna dla zrozumienia, czy zaburzenia stechiometrii frakcji EPS mają **wpływ na efektywność zakażenia roślin**, pomimo braku wyraźnych zmian fenotypowych mutantów.
- Rozszerzenie badań o analizę **fosfoproteomiczną** i **transkryptomoczną** umożliwi identyfikację potencjalnych substratów badanej kinazy i fosfatazy oraz ich powiązań z różnymi szlakami metabolicznymi w komórce.