

Analiza porównawcza genów odpowiedzialnych za biosyntezę lipopolisacharydów u bakterii z rodzaju *Brucella*, symbiontów roślin bobowatych

Katarzyna Zamłyńska, Kamil Żebracki, Iwona Komanińska, Adam Choma

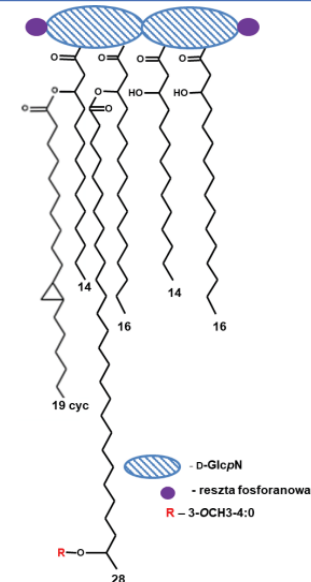
Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

WPROWADZENIE

Brucella lupini LUP21^T oraz *Brucella cytisi* ESC1^T (dawniej *Ochrobactrum*) to Gram-ujemne, szybko rosnące pałeczki należące do rodziny *Brucellaceae*. Te symbiotyczne bakterie zostały wyizolowane z brodawek korzeniowych odpowiednio *Lupinus honoratus* oraz *Cytisus scoparius*. *B. lupini* LUP21^T posiada zdolność wchodzenia w układy symbiotyczne także z innymi roślinami z rodzaju *Lupinus*, podczas gdy *B. cytisi* ESC1^T jest również mikrosymbiontem lucerny.

Badania strukturalne lipidów A *B. lupini* LUP21^T i *B. cytisi* ESC1^T wykazały, że obydwa lipidy A posiadają podobną strukturę, aczkolwiek różnią się od lipidów A opisanych w przypadku patogenów: *B. suis* i *B. abortus*.

Celem badań była analiza porównawcza genów odpowiedzialnych za biosyntezę lipidów A u *B. lupini* LUP21^T oraz *B. cytisi* ESC1^T. Badania te pozwoliły ustalić, czy zbliżona budowa lipidów A tych bakterii wynika z podobieństwa sekwencji genów zaangażowanych w ich biosyntezę.

Fig. 1. Proponowana struktura lipidów A *B. lupini* LUP21^T i *B. cytisi* ESC1^T

WYNIKI

MATERIAŁY I METODY

Genomowy DNA *B. cytisi* ESC1^T wyizolowano przy użyciu komercyjnego zestawu metodą kolumnkową. Oczyszczony gDNA poddano kontroli jakościowej i ilościowej poprzez analizę spektrofotometryczną, fluorymetryczną oraz elektroforezę agarozową. Następnie gDNA zsekwenjonowano w technologii Illumina NovaSeq PE150 (sparowane odczyty długości 150 pz, ponad 220-krotne pokrycie genomu). Uzyskane odczyty sekwencji adnotowano funkcjonalnie przy użyciu narzędzia NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline oraz wykorzystano do analizy porównawczej genów biosyntezy lipidów A *B. cytisi* ESC1^T i *B. lupini* LUP21^T (genom dostępny w bazie danych).

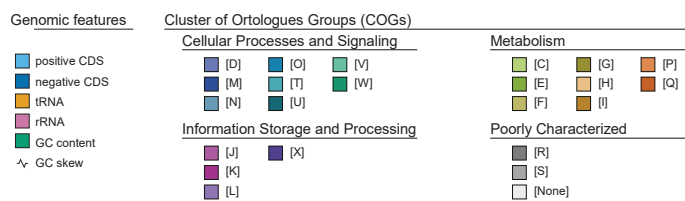
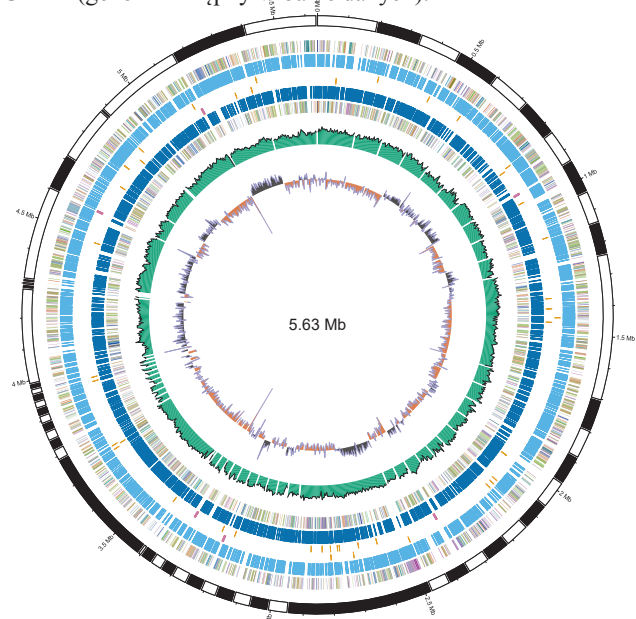


Fig. 2. Mapa genomu *B. cytisi* ESC1^T. Poszczególne okręgi reprezentują (od zewnątrz do wewnątrz): długości poszczególnych kontigów (kontigi oznaczone na przemian kolorami czarnym i białym), CDS na nici wiodącej (kolor jasnoniebieski) oraz na nici opóźnionej (kolor ciemnoniebieski) z przypisaniem genów do poszczególnych kategorii COG, wykres %GC (kolor zielony) i wykres GC-skew. Analizę wykonano przy użyciu narzędzia GenoVi.

Tabela 1. Podobieństwo sekwencji przewidywanych białek zaangażowanych w biosyntezę lipidów A *B. cytisi* ESC1^T i *B. lupini* LUP21^T

Przewidywany homolog genu	<i>gmnA</i>	<i>gmnB</i>	<i>lpxA</i>	<i>lpxC</i>	<i>lpxD</i>	<i>lpxH</i>	<i>lpxB</i>	<i>lpxK</i>
Przypuszczalna funkcja kodowanego białka	NAD-zależna oksydacja grupy hydroksylowej w pozycji C-3 prekursora UDP-GlcNAc	Transaminacja UDP-3-oxoGlcNAc z utworzeniem UDP-2-acetamido-3-amino-2,3-didekso-D-glukopiranozy (UDP-GlcNAc3N)	Acylotransferaza, przenosząca grupy 3OH-acylowe z acyl-ACP na UDP-GlcNAc3N	Deacetylaza UDP-3-N-acetyl-2-N-acetylglukozaminy	Acylotransferaza UDP-3-N-(3-hydroksymirystoilo)glukozaminy	Difosfataza UDP-2,3-N,N-diacetylo-diaminoglukozaminy	Syntaza disacharydu lipidu A	4'-kinaza tetraacylosacharydu
Szczep								
<i>Brucella cytisi</i> ESC1 ^T	AAES21_14990 (318) ^A	AAES21_14985 (374)	AAES21_02685 (278)	AAES21_11940 (312)	AAES21_02675 (351)	AAES21_03010 (287)	AAES21_02695 (394)	AAES21_18860 (341)
<i>Brucella lupini</i> LUP21 ^T	CES86_1021 (318) ^A 98.4% (98.7%) ^B	CES86_1020 (374) 99.7% (99.7%)	CES86_0484 (278) 99.6% (100%)	CES86_0810 (312) 99.7% (100%)	CES86_0486 (351) 100% (100%)	CES86_0412 (288) 98.6% (99.0%)	CES86_0482 (394) 98.0% (99.0%)	CES86_3458 (341) 92.1% (95.3%)
Przewidywany homolog genu	<i>kdtA</i> (<i>waaA</i>)	<i>acpXL</i>	<i>fabZXL</i>	<i>fabF2XL</i>	<i>fabF1XL</i>	<i>adhA2XL</i>	<i>lpxXL</i> (<i>msbB</i>)	???
Przypuszczalna funkcja kodowanego białka	Transferaza 3-deoksy-D-manno-octulozonowego kwasu (Kdo), do powstającej cząsteczki lipidu IVA (transferaza KdtA = WaaA) dołącza dwie cząsteczki Kdo wykorzystując cząsteczkę CMP-Kdo jako donor	ACP-nośnik białkowy, na którym odbywa się synteza kwasów tłuszczowych o bardzo długim łańcuchu węglowodorowym	Dehydrataza (3R)-hydroksyacylo-ACP	Syntaza II 3-oksoacylo-ACP	Syntaza I 3-oksoacylo-ACP	Dehydrogenaza	ACP-zależna acylotransferaza, odpowiedzialna za przyłączenie kwasu tłuszczowego o bardzo długim łańcuchu węglowodorowym (homolog acylotransferazy lauroilewej)	Acylotransferaza kwasu 19:0 cye
Szczep								
<i>Brucella cytisi</i> ESC1 ^T	AAES21_18865 (446)	AAES21_04395 (93)	AAES21_02680 (157)	AAES21_04400 (393)	AAES21_04405 (425)	AAES21_04410 (360)	AAES21_04415 (308)	???
<i>Brucella lupini</i> LUP21 ^T	CES86_3457 (446) 98.0% (99.1%)	CES86_3675 (93) 99.4% (100%)	CES86_0485 (157) 99.4% (100%)	CES86_3674 (393) 99.7% (99.7%)	CES86_3673 (425) 98.6% (99.5%)	CES86_3672 (360) 99.7% (100%)	CES86_3671 (308) 96.8% (98.1%)	???

^AORF (liczba kodowanych aminokwasów), odnosi się do całej Tabeli
^B% identyczności (% podobieństwa), odnosi się do całej Tabeli

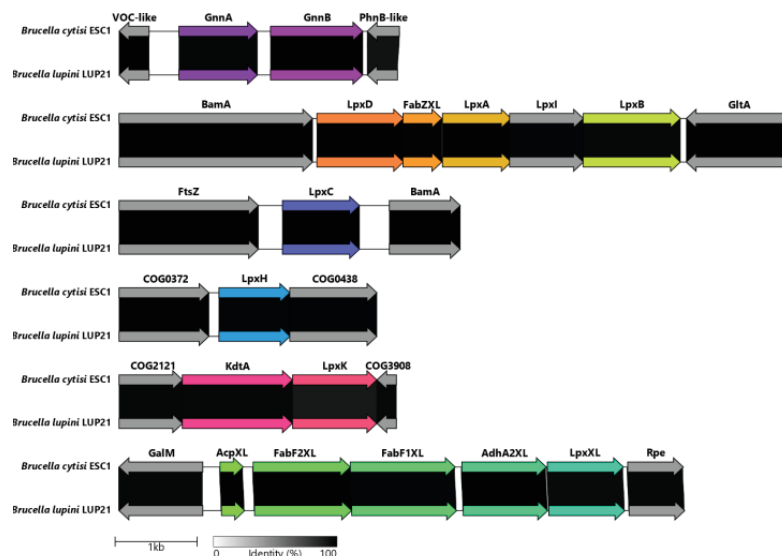


Fig. 3. Porównanie organizacji genetycznej genów biorących udział w biosyntezie lipidu A *B. cytisi* ESC1 i *B. lupini* LUP21. Poszczególne sekwencje kodujące oznaczono strzałkami zgodnie z ich orientacją. Kolorowymi strzałkami zaznaczono ORF zaangażowane w biosyntezę lipidu A, natomiast szarymi strzałkami – geny otaczające geny/klastry genów biosyntezy lipidu A. Powyżej strzałek podano przewidywane produkty białkowe poszczególnych ORF. Analizę wykonano przy użyciu narzędzia clinker.

WNIOSKI

Wykazano, że sekwencje przypuszczalnych genów kodujących enzymy wymagane do biosyntezy lipidu A (*lpxA*, *lpxC*, *lpxD*, *lpxH*, *lpxB*, *lpxK*, *kdtA*), a także genów kodujących specyficzne enzymy zaangażowane w modyfikacje strukturalne lipidu A, występujące w przypadku niektórych bakterii (*gmnAB*, klaster *acpXL-lpxXL*), występują w genomach obu analizowanych gatunków bakterii. Wysokie podobieństwo sekwencji tych białek odzwierciedla podobną strukturę lipidów A *B. cytisi* ESC1^T i *B. lupini* LUP21^T.