

# Indukcja genów *vir* *Agrobacterium tumefaciens* C58 – czynnik modyfikujący lipidom tych bakterii

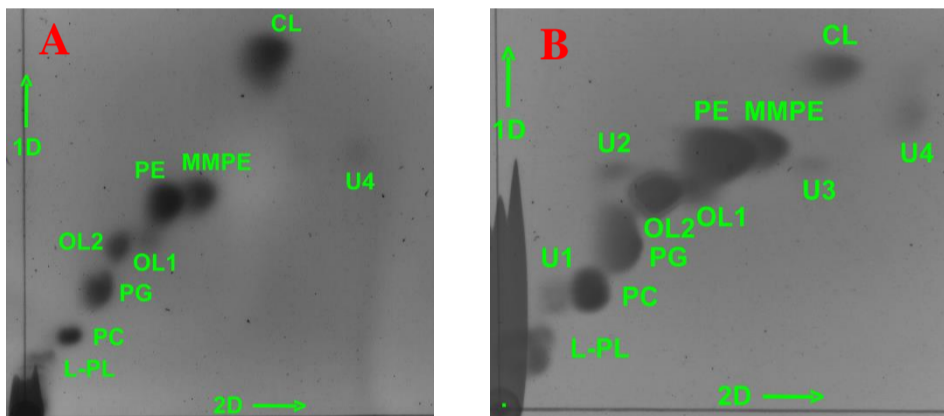
**Adam Choma, Kamil Żebracki, Piotr Koper, Andrzej Mazur, Anita Swatek, Iwona Komaniecka**

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

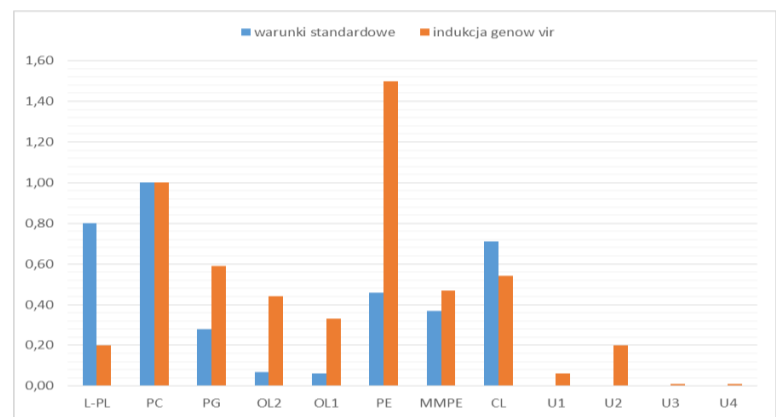
## WSTĘP:

*Agrobacterium tumefaciens* C58 to fitopatogen infekujący głównie rośliny dwuliścienne, 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. Ekspresja tych genów następuje pod wpływem czynników środowiskowych, takich jak niskie pH, cukry proste oraz związki z grupy fenoli (np. acetosyringon). Kluczowe znaczenie w bezpośredniej interakcji bakterii z rośliną mają lipidy błonowe *A. tumefaciens*. Przeprowadzono badania lipidomu *A. tumefaciens* C58 w warunkach standardowych oraz w warunkach stresu indukującego geny wirulencji (niskie pH, obecność glukozy i acetosyringonu). Analiza wyizolowanych frakcji lipidów komórkowych metodami chromatografii cienkowarstwowej i spektrometrii mas wskazuje na zmiany o charakterze ilościowym przy minimalnych modyfikacjach składu jakościowego. Obserwowane zmiany lipidomu korelowano ze zmianami ekspresji genów związanych z metabolizmem agrobakterii (analiza transkryptomyczna).

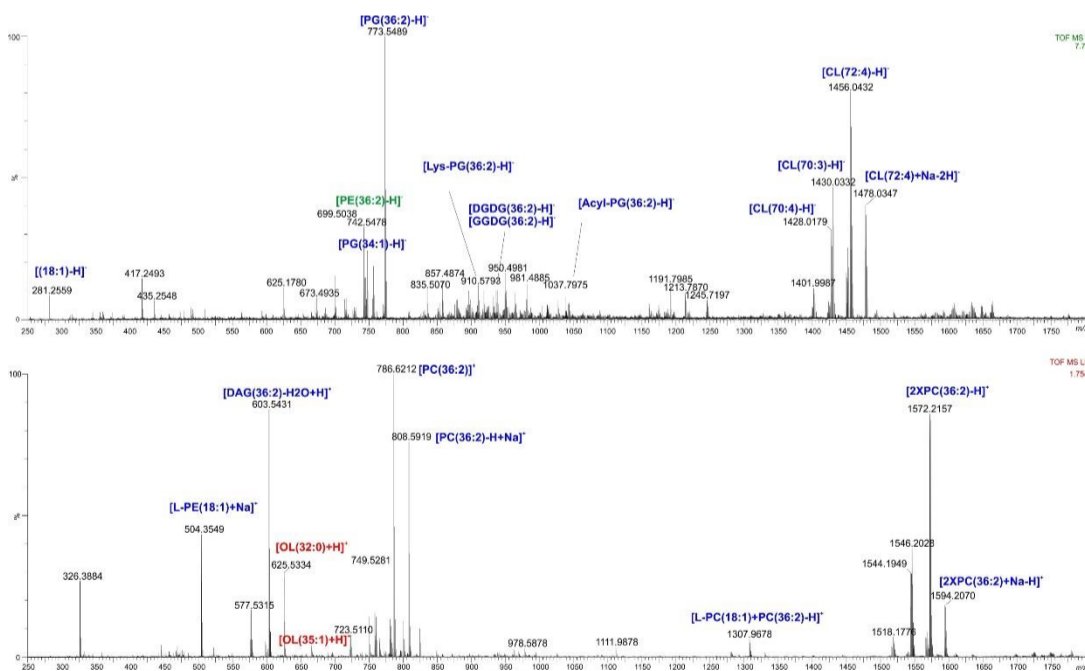
## CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA:



Ryc. 1. Analiza lipidów z bakterii *A. tumefaciens* C58 hodowanych w warunkach standardowych (A) i w warunkach indukcji genów *vir* (B).

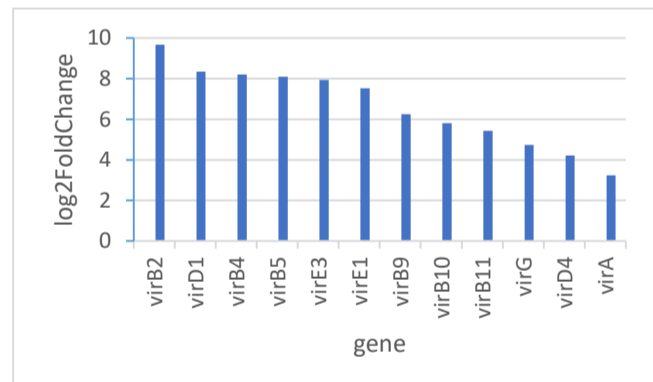


Ryc. 2. Względna zawartość lipidów w *A. tumefaciens* C58 hodowanych w warunkach standardowych (niebieski) i w warunkach indukcji genów *vir* (pomarańczowy). Normalizacja wyników względem fosfatydylocholiny.



Ryc. 3. Widma MS preparatu lipidów błonowych z bakterii *A. tumefaciens* C58 hodowanych w warunkach indukcji genów *vir*. Identyfikację lipidów wykonano w oparciu o analizy widm MALD-TOF. Analizowano zarówno jony ujemne (górne widmo) jak i jony dodatnie (dolne widmo).

Wykaz skrótów					
Lp.	skrót	objaśnienie	Lp.	skrót	objaśnienie
1	1D i 2D	Pierwszy i drugi kierunek rozwijania TLC	9	OL2	Hydroksylowany lipid ornitynowy
2	TLC	Chromatografia cienkowarstwowa	10	L-PL	Lizo-fosfolipidy
3	PC	Fosfatydylocholina	11	DGDG	digalaktyzylodiacylglicerol
4	PE	Fosfatydyoetanolamina	12	GGDG	glukozylogalaktyzylodiacylglicerol
5	MMPE	N-monometylofosfatydyloetanolamina	13	Acyl-PG	Acylovany fosfatydyloglicerol
6	PG	fosfatydyloglicerol	14	DAG(lubDG)	diacyloglicerol
7	CL	kardiolipina	15	Lys-PG	Lizyno-fosfatydyloglicerol
8	OL1	Lipid ornitynowy	16	U1-U4	Lipidy o niestandardowej budowie chemicznej



Ryc. 4. Indukcja ekspresji wybranych genów *vir* *A. tumefaciens* C58 w hodowli o niskim pH (5,5) i z acetosyringonem wyrażona jako wartość  $\log_2\text{FoldChange}$  względem warunków kontrolnych (pH 6,7). Indukcję ekspresji genów *vir* przedstawiono dla walidacji warunków eksperymentu.

Lp.	Nazwa enzymu	Skrót	locus_tag	log2FoldChange
1	Syntaza fosfatydylocholiny	Psc	ATU_RS08785	---
2	Fosfolipidowa N-metylotransferaza	Pmt	ATU_RS01435	1,0567
3	Syntaza fosfatydyloseryny	PssA	ATU_RS05260	---
4	Dekarboksylaza fosfatydyloseryny	Psd	ATU_RS05265	---
5	Syntaza CDP-DAG	CdsA	ATU_RS06805	---
6	Syntaza fosfatydyloglicerolu	PgsA	ATU_RS05570	---
7	Syntazy kardiolipin	ClS (dwa enzymy)	ATU_RS12151; ATU_RS08005	---
8	Wielopeptydowy czynnik oporności (syntaza Lys-PG)	MprF	ATU_RS12285	---
9	Syntaza Lys-PG	LpiA	ATU_RS12285	---
10	Syntaza LOL	OlsB	ATU_RS01650	---
11	acylotransferaza	OlsA	ATU_RS01705	---
12	Hydroksylaza OL1	OlsE	ATU_RS01525	---
13	glikozylotransferaza	Pgt	ATU_RS08850	---
14	glikozylotransferaza	Agt	ATU_RS11210	---
15	Fosfolipaza typu C	PlcP	ATU_RS08100	---
16	Enzym biosyntezy DGTS	BtaA	ATU_RS10345	---
17	Enzym biosyntezy DGTS	BtaB	ATU_RS10350	---
18	Hydrolaza Lys-PG	AcvB	ATU_RS12290	---

Ryc. 5. Indukcja ekspresji genów ( $\log_2\text{FoldChange}$ ) metabolizmu lipidów błonowych *A. tumefaciens* C58 w hodowli o niskim pH (5,5) i z acetosyringonem (--- brak zmian).

## WNIOSKI:

- Zmiana parametrów hodowli (pH 6,7 ver. pH 5,5 oraz acetosyringon (indukcja genów wirulencji)) *A. tumefaciens* C58 powoduje istotne przeobrażenia składu jakościowego i ilościowego lipidów błonowych.
- Zmiana parametrów hodowli na warunki wywołujące wirulencję *A. tumefaciens* C58 skutkuje znaczącą indukcją ekspresji genów operonu *vir* (od 8 do 1000-krotną), jednocześnie aktywność genów związanych z syntezą i metabolizmem lipidów błonowych ulega jedynie nieznacznej modyfikacji. Obserwowane zmiany aktywności genów metabolizmu lipidów nie mają bezpośredniego/prostego przełożenia na skład lipidowy błon *A. tumefaciens* C58.
- Należy sądzić, że regulacja biosyntezy lipidów błonowych odbywa się głównie na innych poziomach metabolizmu komórkowego (np. aktywności białek enzymatycznych).