

Analiza lipidomu mutantu *Agrobacterium fabrum* C58 defektywnego w syntezie fosfatydyloetanolaminy w warunkach indukujących ekspresję genów *vir*

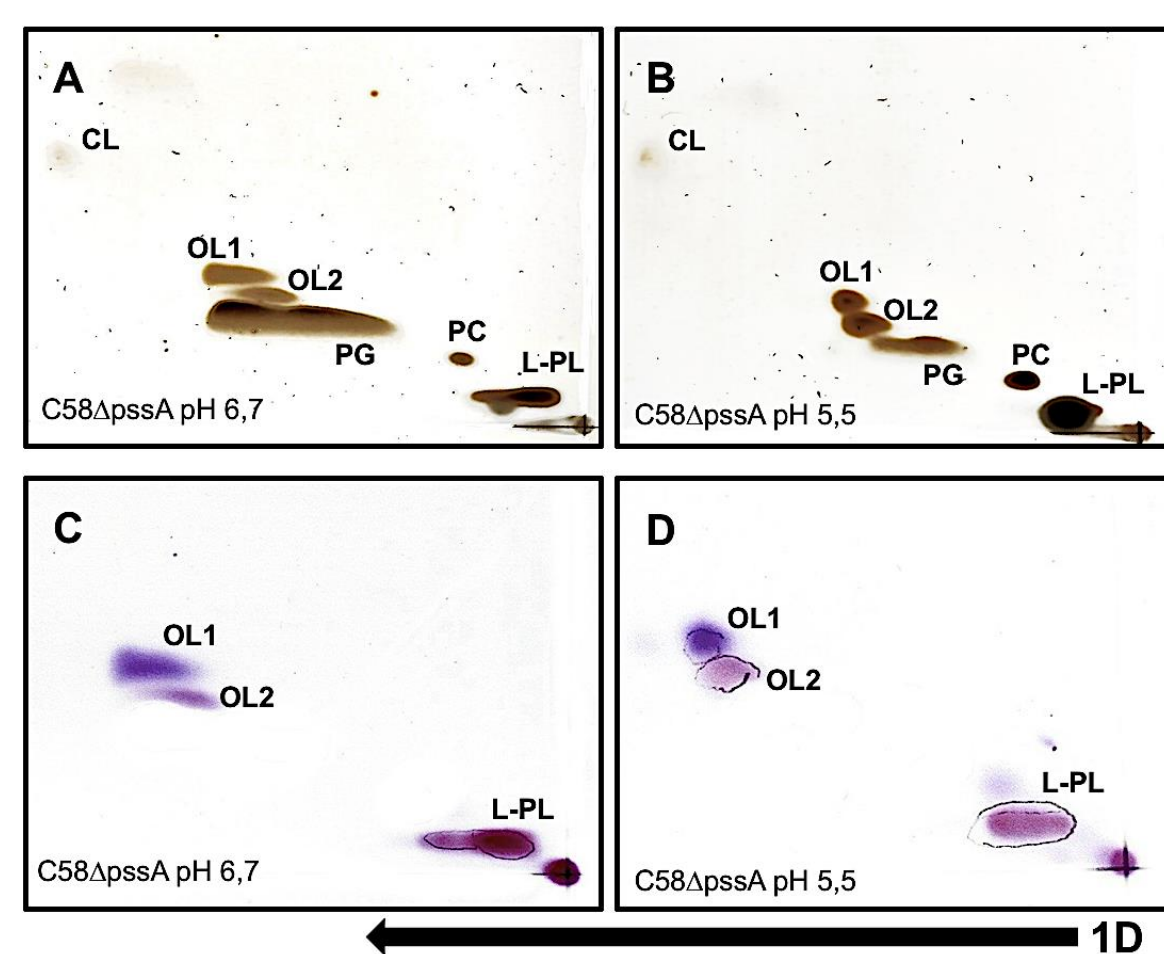
Yevheniia Smirnova, Kamil Żebracki, Andrzej Mazur, Anita Swatek, Adam Choma, Iwona Komaniecka

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

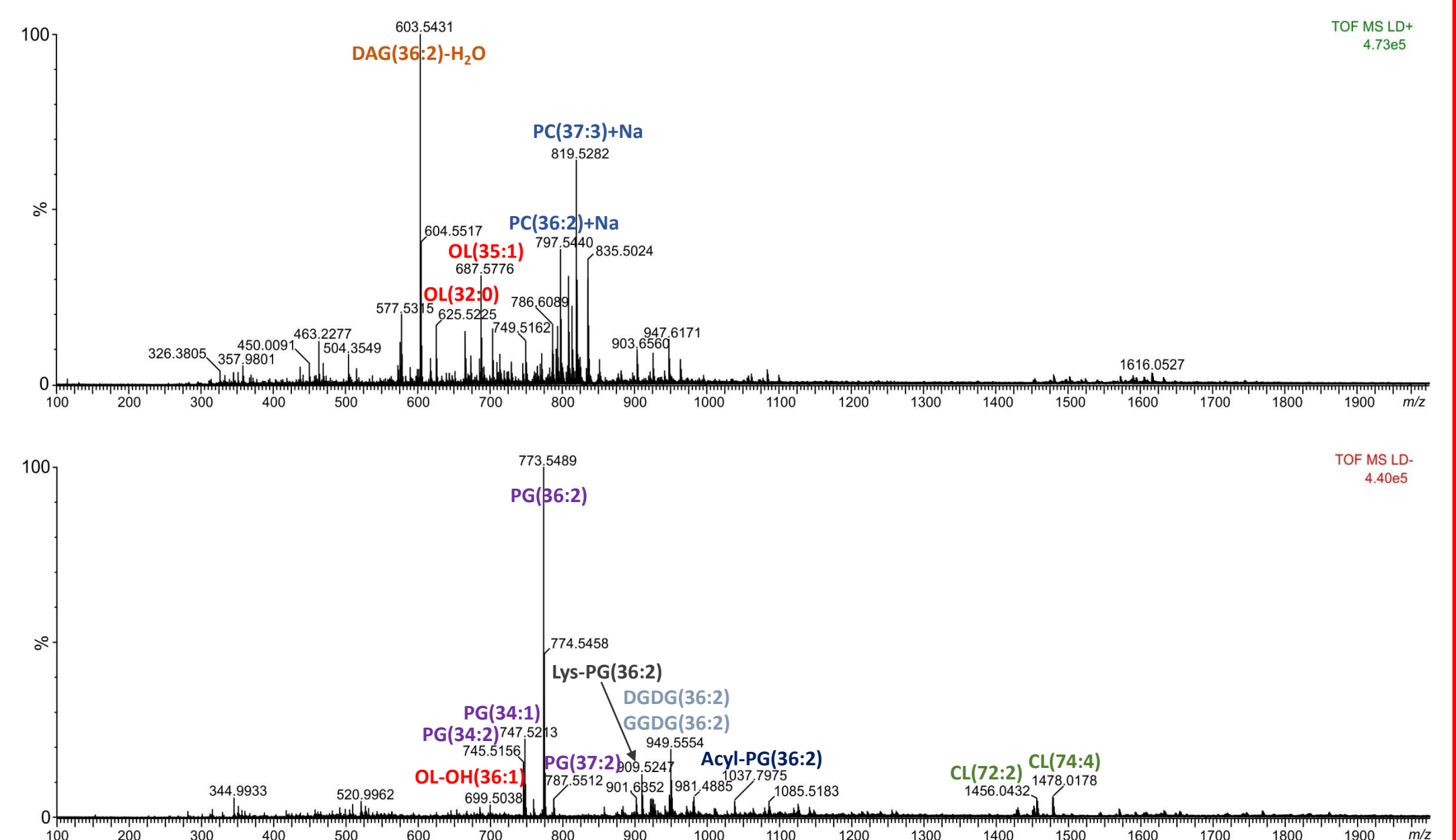
WSTĘP:

Agrobacterium fabrum C58 to Gram-ujemne, tlenowe, mezofilne pałeczki glebowe należące do rodziny *Rhizobiaceae*. Jest to fitopatogen infekujący głównie rośliny dwuliścienne, odpowiedzialny za wywołanie choroby zwanej guzowatością, powstającą w wyniku transformacji genetycznej tkanek rośliny-gospodarza. Geny *vir* zlokalizowane na plazmidzie *pTi* są odpowiedzialne za transformację nowotworową tkanek. Ekspresja tych genów podlega indukcji pod wpływem następujących czynników: niskie pH, obecność cukrów prostych oraz związków fenolowych (acetosyringonu). Kluczowe znaczenie w bezpośredniej interakcji bakterii z rośliną pełnią lipidy błonowe *Agrobacterium*. Przeprowadzono badania lipidomu mutantu *A. fabrum* C58, defektywnego w syntezie głównego lipidu błonowego – fosfatydyloetanolaminy, w warunkach standardowych oraz w warunkach stresu indukującego geny *vir*, na podłożu pozbawionym egzogennej choliny. Analiza lipidów komórkowych przeprowadzona technikami TLC oraz wysokorozdzielczej spektrometrii mas (MALDI-MS oraz MS-MS), pozwoliła na wykrycie zmian o charakterze ilościowym oraz jakościowym w analizowanych preparatach.

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA:

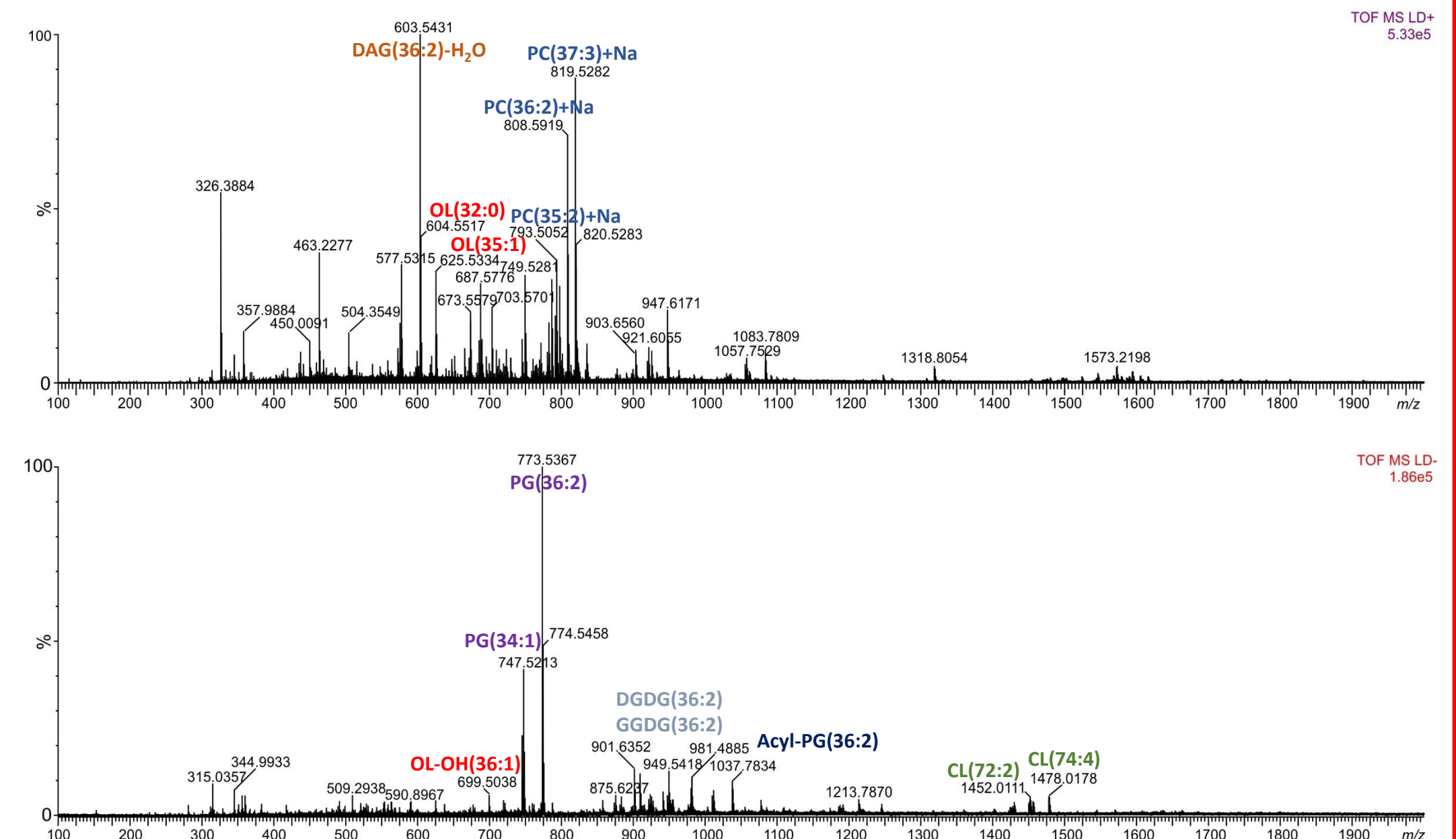


Ryc. 1 Analiza lipidowa z komórek *A. fabrum* C58ΔpssA hodowanych w warunkach standardowych – pH 6,7 (A, C) oraz w warunkach indukcji genów *vir* (pH 5,5, w obecności glukozy i acetosyringonu) (B, D). Panele A i B przedstawiają rozdzielanie lipidów metodą TLC z wizualizacją poprzez spalanie (spryskanie płytki 5% roztworem H₂SO₄ w etanolu, i ogrzewanie na płycie grzejnej). Panele C i D przedstawiają wizualizację przy użyciu ninhydryny – detekcja lipidów aminowych. Chromatogramy rozwijano solventami: 1D - chloroform:metanol:woda (14:6:1, v/v/v), 2D – chloroform:metanol: kwas octowy (13:5:2, v/v/v).

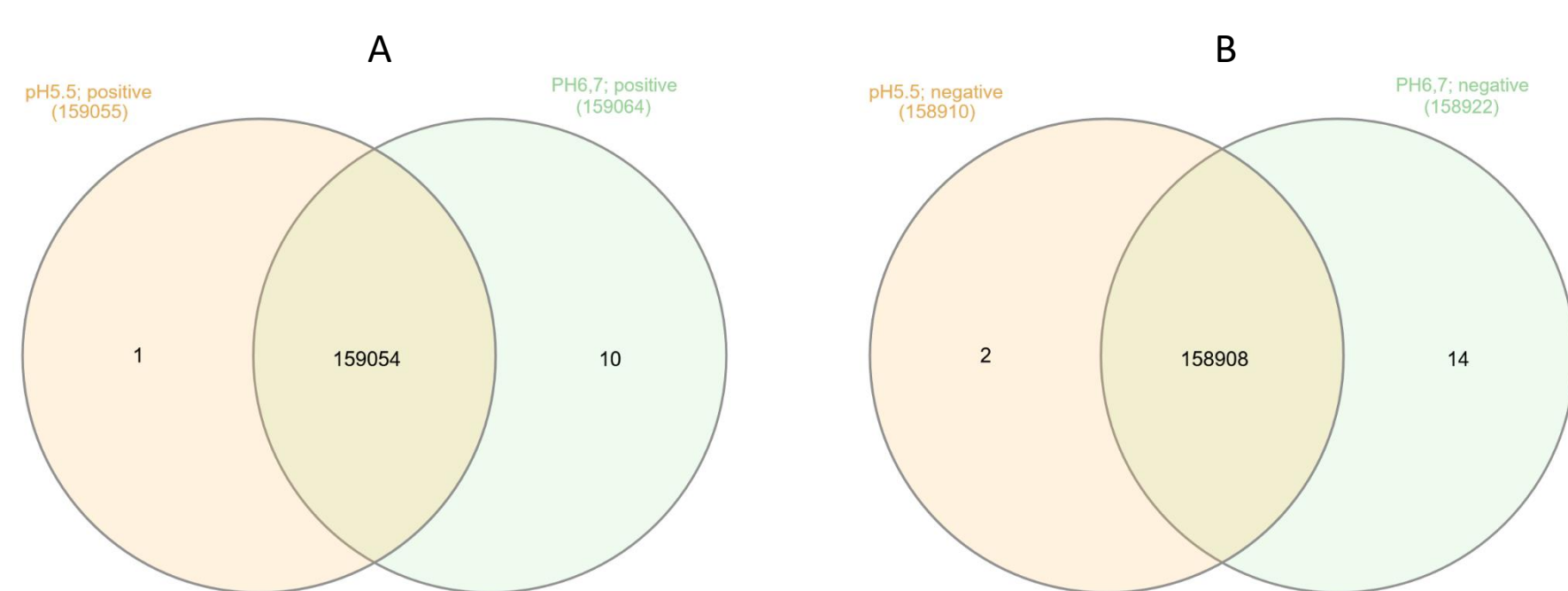


Ryc. 2. Widma masowe MALDI-MS lipidów wyizolowanych z komórek *A. fabrum* C58ΔpssA hodowanych w warunkach standardowych (pH 6,7), Panel górny przedstawia widmo jonów dodatnich, panel dolny – widmo jonów ujemnych.

Wykaz skrótów					
Lp.	skrót	objaśnienie	Lp.	skrót	objaśnienie
1	1D i 2D	pierwszy i drugi kierunek rozwijania TLC	9	Lys-PG	lizyno-fosfatydyloglicerol
2	TLC	chromatografia cienkowarstwowa	10	L-PL	lizo-fosfolipidy
3	PC	fosfatydylocholina	11	DGDG	digalaktozydylacylglicerol
4	PG	fosfatydyloglicerol	12	GGDG	glukozylgalkozydylacylglicerol
5	CL	kardiolipina (DPG)	13	Acyl-PG	acylowany fosfatydyloglicerol
6	OL1	lipid ornitynowy	14	DAG	diacyloglicerol
7	OL2	hydroksylowany lipid ornitynowy			



Ryc. 3. Widma masowe MALDI-MS lipidów wyizolowanych z komórek *A. fabrum* C58ΔpssA hodowanych w warunkach indukcji genów *vir* (pH 5,5, w obecności glukozy i acetosyringonu). Panel górny przedstawia widmo jonów dodatnich, panel dolny – widmo jonów ujemnych.



Ryc. 4 Wykresy Venna obrazujące podobieństwa i różnice w puli lipidów wyizolowanych z komórek *A. fabrum* C58ΔpssA hodowanych w warunkach standardowych (pH 6,7) oraz w warunkach indukcji genów *vir* (pH 5,5), na podstawie wyników analiz techniką spektrometrii mas MALDI-MS. Panel A przedstawia analizę porównawczą lipidów w trybie jonów dodatnich, panel B – jony ujemne.

WYNIKI:

Badania prowadzono na szczepie *A. fabrum* C58ΔpssA, mutancie defektywnym w syntezie PE. Hodowlę bakterii prowadzono na podłożu 79CA bez wyciągu drożdżowego: w warunkach normalnych (pH 6,7) oraz w warunkach imitujących proces zakażenia (pH 5,5, dodatek 1% glukozy oraz w obecności induktora genów *vir* – acetosyringonu). Wyizolowane preparaty lipidów błonowych poddano analizie techniką 2D TLC z detekcją przez spalanie oraz w obecności ninhydryny (wykrywanie lipidów z wolną grupą aminową) (Ryc.1). Analizę lipidomiczną przeprowadzono techniką wysokorozdzielczej spektrometrii mas z zastosowaniem instrumentu SYNAPT G2-Si HDMS (Waters), pracującym w opcji MALDI-MS oraz MS-MS. Widma rejestrowano w zakresie 100- 2000 Da, w trybie jonów dodatnich i ujemnych (Ryc. 2 i 3). Jako matrycę użyto kwas 2,5-dihydroksybenzoowy (DHB, 20 mg/ml, w 50% metanolu). Analizę porównawczą preparatów wykonano przy zastosowaniu oprogramowania InteractiVenn (Ryc.4) [<https://www.interactivenn.net/>; doi: 10.1186/s12859-015-0611-3].

WNIOSKI:

- Hodowla mutantu *A. fabrum* C58ΔpssA, w warunkach imitujących proces zakażenia powoduje głównie zmiany ilościowe w składzie lipidów błonowych.
- W warunkach indukcji genów *vir* komórki mutantu produkują mniejsze ilości i mniejszą różnorodność puli PG.
- Zwiększeniu ulega pula lipidów bezfosforowych (OL) oraz lizofosfolipidów (L-PL).
- Analiza podobieństwa puli lipidów na podstawie wykresów Venna dla poszczególnych warunków hodowli, wykazała niewielkie różnice jakościowe pomiędzy pulami lipidów – jedynie pojedyncze związki były unikalne dla warunków eksperymentu (warunki normalne *versus* indukujące geny *vir*).
- W warunkach braku egzogennej choliny nadal syntetyzowana jest niewielka pula PC, co sugeruje istnienie trzeciej, alternatywnej drogi syntezy tej klasy lipidów.