

Celem projektu jest określenie jaką rolę pełnią składniki błony zewnętrznej *Agrobacterium tumefaciens* w procesie tworzenia guzów (tumorów) na lodygach roślin uprawnych.

Głównymi składnikami błony zewnętrznej (OM) otaczającej komórki bakterii z gatunku *Agrobacterium tumefaciens* są: lipopolisacharyd, fosfolipidy i lipidy alternatywne (czyli te lipidy które bakterie syntetyzują żyjąc w warunkach braku dostępności rozpuszczalnych związków zawierających fosfor) oraz białka - zarówno peryferyjne jak i transbłonowe. Lipopolisacharyd tworzy warstwę zewnętrzną błony zajmując co najmniej 75-80% jej powierzchni. Pozostała część wypełniona jest przez białka, wśród których dominują białka porynowe. Na wolne lipidy (fosfolipidy) pozostaje skrajnie mało miejsca lub nie ma go wcale. Te związki dominują po stronie wewnętrznej błony zewnętrznej konstytuując ją. Agrobakterie, żyjąc w podłożu (środowisku) bogatym w składniki odżywcze i zawierającym rozpuszczalne związki fosforu, syntetyzują głównie fosfolipidy. Są wśród nich: PE (~30%), PG (~12%), CL (~15%), PC (~24%) oraz MMPE (~15%) i DMPE (~4%). Stwierdza się czasem niewielkie ilości PS i PI a także lipidów zawierających ornitynę lub lizynę. W warunkach stresu fosforowego fosfolipidy ulegają aktywnej degradacji, a na ich miejsce wprowadzana jest cała gama związków lipofilnych pozbawionych fosforu. W takich warunkach dominują lipidy ornitynowe, gliceroglikolipidy czy lipidy betainowe. *Rizobia*, w tym również *Agrobacterium*, a także wiele patogenów wewnątrzkomórkowych (np. *Brucella* czy *Legionella*) mają zdolność do syntezy i włączania do lipidu A (lipofilnej części LPSu) długołańcuchowych kwasów tłuszczowych typu (ω -1) (VLCFA). Obecność VLCFA sprawia, że OM jest bardziej zwarta, a bakterie nią otoczone są bardziej odporne na zmieniające się warunki otoczenia. *Agrobacterium tumefaciens* jest groźnym patogenem roślin dwuliściennych. Kolonizując genetycznie tkankę roślinną powoduje jej nadmierny rozrost i zmusza komórki tej tkanki (modyfikując je genetycznie) do syntezy i sekrecji opin. Stanowią one szczególnie dobre źródło węgla i azotu dla tego patogena. Rozrośnięta tkanka staje się bezpieczną niszą ekologiczną dla agrobakterii. Wchodząc w interakcje z komórkami roślin bakterie kontaktują się ze środowiskiem panującym w przestrzeniach międzykomórkowych. Bezpieczny kontakt z takim mikroświatem zapewnia im odpowiednia architektura ściany komórkowej, a przede wszystkim odpowiednia organizacja przestrzenna OM, która jest pierwszą i najbardziej zewnętrzną linią obrony. Dowiedziono, że poważne niedobory fosfatydylocholino uniemożliwiają *Agrobacterium tumefaciens* transformację komórek roślinnych. Równocześnie, takie bakterie stają się znacznie bardziej podatne na stresory (detergenty czy podwyższona temperatura). Z kolei brak możliwości syntezy lipidów ornitynowych zwiększa inwazyjność *A. tumefaciens*. Konstruując mutanty defektywne w syntezie PE, pragniemy sprawdzić jak zachowują się te szczepy, które w wyniku działań kompensacyjnych (syntezy dodatkowych porcji PG) mają zmodyfikowaną architekturę OM. Synteza zwiększonych ilości PG zmieni ładunek powierzchniowy OM, co może skutkować brakiem prawidłowego sfałdowania białek membranowych. Spodziewamy się także, że obniżone zostaną właściwości patogenezy mutantów *A. tumefaciens* defektywnych w syntezie i włączaniu do lipidu A długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Osłabiona w ten sposób, a więc bardziej przepuszczalna struktura OM, może sprawić, że mutanty będą słabiej (wolniej) rozwijały się wewnątrz tworzącej się tumorowatej tkanki. Przypuszczamy, że *Agrobacterium* zostanie najbardziej osłabione przez zmutowanie genu *msbB* kodującego specyficzną acylotransferazę. Brak tego enzymu uniemożliwi bakteriom przyłączanie do lipidu A jakiegokolwiek acylogowego podstawnika w zastępstwie VLCFA. Analogiczne mutacje u rizobiów powodowały znaczne upośledzenie tworzących się układów symbiotycznych.

Przewidujemy, że osłabione w wyniku planowanych mutacji agrobakterie będą inaczej zachowywały się w tkankach zakażonych roślin. Aby potwierdzić nasze przypuszczenia zamierzamy śledzić rozwój infekcji, rozrost tumoru i rozprzestrzenianie się bakterii w tkankach roślinnych używając do tego celu różnych technik obrazowania: mikroskopię konfokalną, mikroskopię FTIR, obrazowanie ramanowskie i obrazowanie z wykorzystaniem spektrometru mas (MSI MALDI-TOF). Technika MSI pozwoli także na precyzyjną lokalizację wydzielanych przez tkankę guza wtórnych metabolitów.