

CHARAKTRYZACJA PĘCHERZYKÓW BŁONY ZEWNĘTRZNEJ ZE SZCZEPU PECTOBACTERIUM PRODUKUJĄCEGO BIAŁKO GFP



Aleksandra Steć¹, Joanna Jońca², Agata Płoska³, Leszek Kalinowski³,
Bartosz Wielgomas¹, Małgorzata Waleron⁴, Krzysztof Waleron²,
Szymon Dziomba¹

¹Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny

²Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny

³Zakład Medycznej Diagnostyki Laboratoryjnej, Katedra Analizy Klinicznej Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny

⁴Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Instytut Biotechnologii, Uniwersytetu Gdańskiego, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed

www.gumed.edu.pl

Wprowadzenie

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. extracellular vesicles, EVs) to struktury biologiczne uwalniane przez komórki prokariotyczne i eukariotyczne. EVs bakteryjne charakteryzują się wielkością w przedziale od 20 do 300 nm i zbudowane są z lipopolisacharydu, fosfolipidów oraz białek błonowych. EVs posiadają zdolność przenoszenia między innymi kwasów nukleinowych, białek cytoplazmatycznych, periplazmatycznej i błonowych a także lipidów i metabolitów drobnocząsteczkowych. Gatunek oraz warunki hodowli determinują ich skład ilościowy i jakościowy, co z kolei przekłada się na pełnione przez nie funkcje, m.in. udział w odpowiedzi na czynniki stresogenne i transport biomolekuł poza obręb komórki, w tym także czynników wirulencji [1].

Cele i metody

Celem pracy była charakteryzacja EVs uwalnianych przez szczep patogenu roślinnego *P. zantedeschiae* 9M, transformowanego plazmidem pPROBE-AT-gfp, kodującym białko GFP. Badano także wpływ modyfikacji procedury izolacji EVs na odzysk i czystość uzyskiwanych izolatów.

Pęcherzyki z hodowli szczepu modyfikowanego i natywnego izolowano metodą wirowania różnicowego [2], a następnie poddawano dalszemu oczyszczaniu i wzbogacaniu na drodze ultrafiltracji (Vivaspin 2). Ultrawierowanie prowadzono z użyciem 65% jodoksanolu. Izolaty charakteryzowano pod względem zawartości białka całkowitego (test BCA), z wykorzystaniem analizy śledzenia nanocząstek (NTA) oraz techniki strefowej elektroforezy kapilarnej (CZE).

Podczas analiz CZE stosowano detekcję UV (200 nm) oraz LIF (488/520 nm). Pozostałe warunki jak w [2].

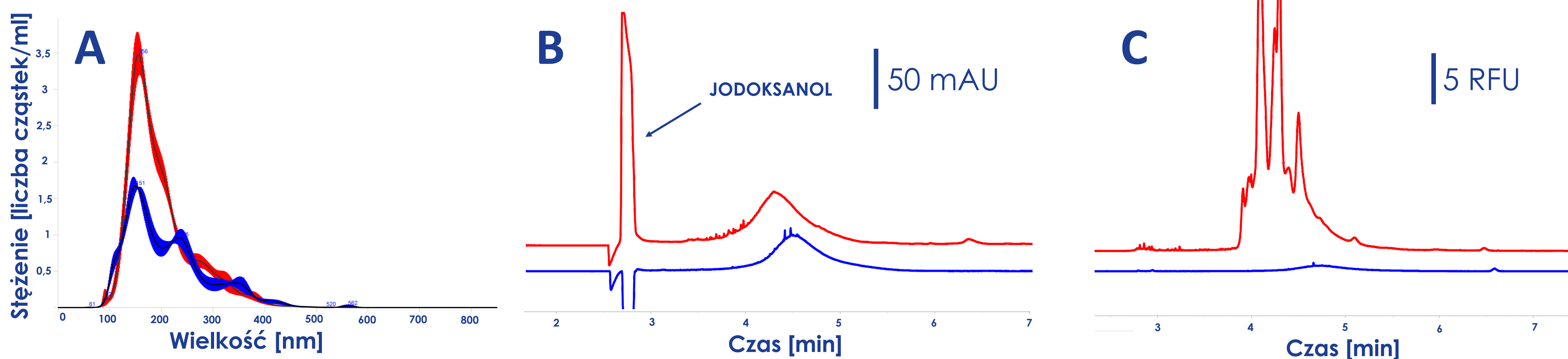
Wyniki

Zaobserwowano istotne różnice ilościowe w badanych izolatach (Rysunek 1). Różnice te były widoczne w zawartości białka całkowitego, stężeniu cząstek (Rysunek 1A) oraz wielkości skorygowanego pola powierzchni sygnału (Rysunek 1B i C). Pomimo braku istotnych różnic w rozkładzie wielkości EVs (Rysunek 1A), zaobserwowano różnicę w ruchliwości elektroforetycznej badanych struktur (Rysunek 1B i C). Analiza CZE-LIF wykazała także istotną różnicę w intensywności fluorescencji EVs otrzymywanych ze szczepów modyfikowanych (Rysunek 1C).

Badane izolaty były pozbawione licznych agregatów wielkocząsteczkowych, obserwowanych we wcześniejszych badaniach [2]. Analiza CZE-UV umożliwiła także monitorowanie pozostałości jodoksanolu w próbkach (Rysunek 1B).

Wnioski

- Ekspresja białka GFP w komórkach bakteryjnych prowadzi do wzmożonego wydzielania EVs.
- Wydzielane EVs przenoszą GFP.
- Zastosowanie jodoksanolu na etapie ultrawierowania pożywek pochodzących znacząco ogranicza destrukcyjny wpływ siły odśrodkowej na EVs.
- CZE jest techniką komplementarną do testów zawartości białka całkowitego oraz NTA.



Rys. 1. Analiza izolatów EVs otrzymywanych z hodowli szczepu natywnego (linia niebieska) i modyfikowanego (linia czerwona): (A) NTA; (B) CZE-UV; (C) CZE-LIF. Całkowita zawartość białka w analizowanych izolatach ze szczepu natywnego i modyfikowanego wynosiła odpowiednio: $2,94 \pm 0,05$ oraz $1,09 \pm 0,01$ mg/ml.

Literatura

[1] Klim J., Godlewska R. „Zastosowanie bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w konstrukcji szczepionek”. w: *Postępy Mikrobiologii*. 2017, 56(1):43-55.

[2] Piotrowska, M., Ciura, K., Zalewska, M., Dawid, M., Correia, B., Sawicka, P., Lewczuk, B., Kasprzyk, J., Sola, L., Piekoszewski, W., Wielgomas, B., Waleron, K., Dziomba, S. „Capillary zone electrophoresis of bacterial extracellular vesicles: A proof of concept”. w: *J. Chromatogr. A*. 2020, 1621, 461047.