

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ
ΕΚΚΡΙΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΤΥΠΟΥ III ΣΤΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΟ
ΒΑΚΤΗΡΙΟ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* pv. PHASEOLICOLA ΚΑΙ
ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
ΥΠΕΡΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ**

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ Π. ΤΑΜΠΑΚΑΚΗ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 1999

Επιβλέπων Καθηγητής: Νίκος Πανόπουλος

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- N. Πανόπουλος (Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Παν. Κρήτης)
- Π. Χατζόπουλος (Αναπλ. Καθηγητής, Γεωργικό Πανεπιστήμιο Αθηνών)
- Γ. Θηραΐος (Καθηγητής-Ερευνητής IMBB)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- N. Πανόπουλος (Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Παν. Κρήτης)
- Κ. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη ((Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Παν. Κρήτης)
- Ε. Στρατάκης (Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Παν. Κρήτης)
- Δ. Αλεξανδράκη (Αναπλ. Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Παν. Κρήτης)
- Μ. Κοκκινίδης (Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Βιολογίας, Παν. Κρήτης)
- Ε. Τσαγρή (Επικ. Καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογίας, Παν. Κρήτης)
- Α. Οικονόμου (Λέκτορας, Τμήμα Βιολογίας, Παν. Κρήτης)

στη μητέρα μου
Ευαγγελία

... ακόμα και ένα ταξίδι χιλίων βημάτων, αρχίζει μονάχα με ένα βήμα ...
“Κινέζικο ρητό”

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών, του Βιολογικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά το χρονικό διάστημα 1994-1998. Το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, του Ινστιτούτου Τεχνολογίας και Έρευνας, παρείχε τόσο υλικοτεχνική όσο και οικονομική υποστήριξη.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή Νίκο Πανόπουλο, όχι μόνο για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ στον τομέα της Βιοτεχνολογίας στο εργαστήριο του, αλλά και για την αδιάκοπη επιστημονική του παρουσία και βοήθεια, στην πορεία και χάραξη της παρούσας μελέτης. Επίσης, τον ευχαριστώ θερμά για την ηθική συμπαράσταση και κατανόηση, που έδειξε σε δύσκολες στιγμές της εκπόνησης της παρούσας διατριβής και για την αποτελεσματική και καθοριστική επιστημονική κατάρτιση, που μου προσέφερε και με οδήγησε σήμερα στο σημείο αυτό.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγησή τους σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους και την ενθαρρυντική κριτική τους.

Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια Ε. Τσαγρή και όλα τα μέλη του εργαστηρίου της, για τη συνεχή επιστημονική επικοινωνία, αλλά και την υλικοτεχνική βοήθεια που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια των τελευταίων 4 χρόνων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Κ. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη για την ηθική και επιστημονική συμπαράσταση, που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών σπουδών μου, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου της για τη συμπαράσταση και την έξοχη συνεργασία τους.

Ευχαριστώ θερμά τους Καθηγητές Ιωσήφ Παπαματθαίακη και Γιώργο Θηραίο για τη φιλοξενία στο εργαστήριό τους στις αρχές του ξεκινήματός μου και για τη συνεχή επιστημονική επικοινωνία. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη των ομάδων τους, τόσο για την άνετη και ευχάριστη ατμόσφαιρα κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο τους, όσο και για την επιστημονική συνεργασία τους.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη, που ήταν και είναι, στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών, όπου έγινε η εκπόνηση της παρούσας διατριβής, για την

άψογη συνεργασία τους και το φιλικό περιβάλλον. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Φίλιππο Βερβερίδη (Καθ. ΣΤΕΓ/ΤΕΙ Ηρακλείου) για τις εποικοδομητικές του συμβουλές και τη γόνιμη επιστημονική συνεργασία μας.

Θερμά ευχαριστώ τον κ. Στέλιο Μαυράκη για τη σημαντική και ουσιαστική βοήθεια, που παρείχε τόσο στην ανάπτυξη και διατήρηση των διαγονιδιακών φυτών στο θερμοκήπιο, όσο και στην έγκαιρη παροχή φυτικού υλικού.

Ιδιαίτερες και θερμότερες ευχαριστίες στις φίλες και συναδέλφισσες μου, Θεοδώρα Αγαλιώτη και Στάσα Παπαδάκη, για τη συνεχή παρουσία και συμπαράστασή τους τόσο στις ευχάριστες όσο και στις δύσκολες στιγμές, σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου, καθώς και για την άψογη επιστημονική συνεργασία μας .

Τέλος, θέλω να εκφράσω τη βαθειά μου ευγνωμοσύνη στην οικογένεια μου και ιδιαίτερα στη μητέρα μου για την κατανόηση, την αγάπη και την αδιάκοπη ηθική συμπαράσταση τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Φεβρουάριος 1999

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Γενικά	14
1.2 Μηχανισμοί άμυνας των φυτών	14
1.3 Γενετική και μοριακή βάση της φυλετικής εξειδίκευσης φυτών-παθογόνων	16
1.3.1 Γονίδια ανθεκτικότητας	18
1.3.2 Ταυτοποίηση και λειτουργία των γονιδίων <i>avr</i>	24
1.4 Παθογένεια των φυτοπαθογόνων βακτηρίων	27
1.4.1 Γονίδια <i>hrp</i>	30
1.4.2 Άλλοι παράγοντες παθογένειας : Τοξίνες και ένζυμα αποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος	32
1.4.3 <i>Pseudomonas syringae</i>	34
1.5. Εκκριση πρωτεϊνών στα Gram-αρνητικά βακτήρια	36
1.5.1 Δομή και λειτουργία του κυτταρικού φακέλλου των Gram-αρνητικών βακτηρίων	36
1.5.2 Τα μονοπάτια έκκρισης	38
1.5.2.1 Το μονοπάτι έκκρισης τύπου I	40
1.5.2.2 Το μονοπάτι έκκρισης τύπου II	40
1.5.2.3 Το μονοπάτι έκκρισης τύπου III	41
1.5.2.3.1 Το μονοπάτι Hrp	43
1.5.2.3.1.1 Οργάνωση και λειτουργία των γονιδίων <i>hrp</i> στην <i>P.syringae</i>	45
1.5.2.3.1.2 Πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το μονοπάτι Hrp	49
1.5.2.3.1.3 Αγωγός Hrp (Hrp pilus)	53
1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	57

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ	59
2.1.1 Προέλευση αντιδραστηρίων και υλικών	59
2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς-Στελέχη βακτηρίων και σακχαρομύκητα	59
2.1.3 Καλλιέργειες βακτηρίων και σακχαρομύκητα	60
2.1.4 Πλασμιδιακές κατασκευές	60
2.1.5 Φυτικό υλικό	67
2.1.6 Θρεπτικά μέσα φυτικών οργανοκαλλιεργειών	67
2.1.7 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας πρωτοπλαστών	67
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	68
2.2.1 Παρασκευή και ανάλυση νουκλεϊκών οξέων	68
2.2.1.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	68
2.2.1.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικά κύτταρα	68
2.2.1.3 Απομόνωση ολικού RNA από φυτικά κύτταρα	69
2.2.1.4 Πέννη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού	69
2.2.1.5 Ηλεκτροφορητική ανάλυση, απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης	69
2.2.1.6 Διαδικασίες υποκλωνοποίησης μορίων DNA	70
2.2.1.7 Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων βακτηριακών κλώνων	71
2.2.1.8 Ραδιοσήμανση μορίων DNA	71
2.2.1.9 Ραδιοσήμανση μορίων RNA	71
2.2.1.10 Ανάλυση Northern	71
2.2.1.11 Υβριδοποιήσεις νουκλεϊκών οξέων	71
2.2.1.12 Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA	72
2.2.1.13 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	72
2.2.2 Μετασχηματισμός προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων	73
2.2.2.1 Μετασχηματισμός βακτηρίων <i>E.coli</i> με πλασμιδιακό DNA	73
2.2.2.2 Μετασχηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα	73
2.2.2.3 Μεταφορά πλασμιδίων σε Αγροβακτήριο με τριγωνική βακτηριακή σύζευξη	74
2.2.3 Μέθοδοι έκφρασης γονιδίων σε φυτά	74
2.2.3.1 Μετασχηματισμός δίσκων φύλλου καπνού	74
2.2.3.1.1 Γενικά	74
2.2.3.1.2 Απολύμανση σπόρων καπνού	74
2.2.3.1.3 Απολύμανση φυτικών ιστών	74
2.2.3.1.4 Μετασχηματισμός δίσκων φύλλου καπνού με Αγροβακτήριο	74
2.2.3.1.5 Πρόσληψη τετρακυκλίνης από τα μετασχηματισμένα φυτά	75
2.2.3.2 Μόλυνση φυτών καπνού με τον ικό φορέα PVX202	76
2.2.4 Βιοδοκιμές	

2.2.4.1 Απομόνωση πρωτοπλαστών	76
2.2.4.2 Δοκιμή ποσοτικού προσδιορισμού H ₂ O ₂ σε απομονωμένους πρωτοπλάστες μετά από προσθήκη χαρπίνης	77
2.2.4.3 Δοκιμή ποσοτικού προσδιορισμού O ₂ ⁻ σε απομονωμένους πρωτοπλάστες μετά από προσθήκη χαρπίνης	77
2.2.4.4 Δοκιμή έγχυσης καθαρισμένης χαρπίνης και πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, από φυτά μολυσμένα με τον ανασυνδυασμένο ιό PVX202/HrpZ, σε φύλλα καπνού	77
2.2.4.5 Μέτρηση ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης σε μετασχηματισμένα κύτταρα σακχαρομύκητα	78
2.2.5 Παρασκευή και ανάλυση πρωτεϊνών	
2.2.5.1 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα <i>E. coli</i>	79
2.2.5.2 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα σακχαρομύκητα	79
2.2.5.3 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα ψευδομονάδας	79
2.2.5.4 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από φυτικά κύτταρα	80
2.2.5.5 Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού των πρωτεϊνών	80
2.2.5.6 Ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών	80
2.2.5.7 Ανίχνευση ολικών πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης	80
2.2.5.8 Ανάλυση western	81
2.2.5.9 Παρασκευή αντισωμάτων	82
2.2.5.10 <i>In vivo</i> σήμανση πρωτεϊνών με ³⁵ S-Met σε κύτταρα <i>E. coli</i>	82
2.2.5.11 <i>In vitro</i> μεταγραφή και μετάφραση	83
2.2.5.12 <i>In vitro</i> ανάλυση αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Far western	84
2.2.5.13 Εκφραση και καθαρισμός πρωτεϊνών από στήλη συγγενείας Ni-NTA αγαρόζης	84
2.2.5.14 Αμινοτελική αλληλούχιση των δύο μορφών της πρωτεΐνης HrpZ	85
2.2.5.15 Ανάλυση με τη βοήθεια των ηλεκτρονικών υπολογιστών	85

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού δράσης της χαρπίνης στην αντίδραση υπερευαισθησίας με νέες στρατηγικές προσεγγίσεις

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	87
3.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	89

ΕΝΟΤΗΤΑ Α: Εκφραση του γονιδίου <i>hrpZ</i> σε φυτά και σακχαρομύκητα	89
3.2.1. Ρυθμιζόμενη έκφραση του γονιδίου <i>hrpZ</i> _{P_{SP}} σε σταθερά	

μετασηματισμένα φυτά καπνού	89
3.2.1.1 Έλεγχος επαγωγής του γονιδίου <i>hsr203J</i>	94
3.2.1.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης HrpZ σε μετασηματισμένα φυτά	95
3.2.2. Έκφραση του γονιδίου <i>hrpZ_{P_{SP}}</i> σε φυτά καπνού με το ικό σύστημα έκφρασης PVX202	97
3.2.3. Μελέτη της οξειδωτικής έκρηξης σε πρωτοπλάστες καπνού παρουσία χαρπίνης	103
3.2.4. Έκφραση της εκκρινόμενης μορφής της HrpZ σε καπνό με το ικό σύστημα έκφρασης PVX202	106
3.2.5. Έκφραση των γονιδίων <i>avrPphB</i> και <i>avrPto</i> σε καπνό με το ικό σύστημα έκφρασης PVX202	109
3.2.6. Έλεγχος αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών HrpZ, AvrPphB και AvrPto με το σύστημα των δύο υβριδίων	111
3.2.7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	114
ΕΝΟΤΗΤΑ Β: Διερεύνηση της προέλευσης των δύο μορφών της χαρπίνης	118
3.2.8. Παρουσία και προέλευση δύο διαφορετικών ηλεκροφορητικά μορφών χαρπίνης <i>in vivo</i>	118
3.2.9. Αμινοτελική αλληλούχιση των δύο μορφών της χαρπίνης	121
3.2.10. Διερεύνηση της πρωτεόλυσης	122
3.2.11. Διερεύνηση <i>in vitro</i> αυτοπρωτεόλυσης	123
3.2.12. Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση του πρώτου εσωτερικού κωδικονίου ATG της χαρπίνης	125
3.2.13. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	127
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Λειτουργική αρχιτεκτονική του εκκριτικού συστήματος Hrp στο φυτοπαθογόνο βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	130
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	130
4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	134
4.2.1. Δομικές και λειτουργικές προβλέψεις των πρωτεϊνών που οργανώνουν το εκκριτικό σύστημα Hrp στο φυτοπαθογόνο βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	134
4.2.2. Έκφραση πρωτεϊνών Hrp σε <i>E. coli</i>	145
4.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	161
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Διερεύνηση του βιοχημικού ρόλου των πρωτεϊνών HrcQa και HrcQb της <i>P.s.phaseolicola</i>	165
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	165
5.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	168
5.2.1 Δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών HrcQa και HrcQb	168
5.2.2 <i>In vivo</i> αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών HrcQa και HrcQb με το σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης	170
5.2.3 Έκφραση και καθαρισμός των πρωτεϊνών HrcQa και HrcQb	174

5.2.4 <i>In vitro</i> μελέτη της δέσμευσης των πρωτεϊνών HrcQa και HrcQb	175
5.2.5 Προσδιορισμός της περιοχής του HrcQa που αλληλεπιδρά με HrcQb	177
5.2.6 Καθορισμός της μεμβρανικής τοπολογίας των πρωτεϊνών σε <i>P.syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	179
5.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	180
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	182
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	183
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	185
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	195

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ

ΟΡΟΣ	ΠΛΗΡΕΣ ΟΝΟΜΑ	ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ-ΕΡΜΗΝΕΙΑ
aa	<u>a</u> mino <u>a</u> cid	αμινοξύ
Annealing		μη ομοιοπολική σύνδεση
anti-	<u>a</u> ntibody	αντίσωμα
Antisense		αντικωδικός
Assay		βιοδοκιμή
avr genes	<u>a</u> virulence genes	γονίδια αμολυσματικότητας
Basic compatibility		βασική συμβατότητα
Binary expression vector		δυαδικός φορέας έκφρασης
Blunt ends		τυφλά άκρα
bp	<u>b</u> ase <u>p</u> air	ζεύγος βάσεων
Broad-host-range plasmid		πλασμίδιο ευρέου φάσματος
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin	Αλβουμίνη ορού βοός
cfu	<u>c</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nits	αποικίες
Chaperone		συνοδός πρωτεΐνη
Chemiluminescent		χημειοφωταύγεια
Compatible interaction		συμβατή αλληλεπίδραση
Conjugational helper plasmid		βοηθητικό πλασμίδιο βακτηριακής σύζευξης
Consensus		συντηρημένη αλληλουχία
Constitutive		συνεχής
cpm	<u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> in	κρούσεις ανά λεπτό
CsCl	Cesium chloride	χλωριούχο καίσιο
CSPD		υπόστρωμα αλκαλικής φωσφατάσης για χημειοφωταύγεια
CTAB	cetyl-trimethyl-ammonium bromide	κετύλ-τριμέθυλο βρωμιούχο αμμώνιο
DEPC	<u>d</u> iethylpyro <u>c</u> arbonate	διέθυλο-πυροκαρβονικό οξύ
dNTPs	deoxy-nucleotides triphosphates	τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια
DTT	<u>d</u> ithio <u>t</u> hreitol	διθειοθρεϊτόλη
EDTA	ethlen-diamine-tetra-acetic acid	εθυλέν-διάμινο-τέτρα-οξικό οξύ
Electroblotting		ηλεκτροαποτύπωση, ηλεκτρομεταφορά
Electroelution		ηλεκτροέκλουση
Elicitor		διεγέρτης, επαγωγέας
EtBr	<u>e</u> thidium <u>b</u> romide	βρωμιούχο αιθίδιο

Extract		εκχύλισμα
Fimbriae		ινίδια
Flagellar motor switch		διακόπτης του μαστιγιακού κινητήρα
Flagellum		μαστίγιο
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonic acid	
his-tag		αλληλουχία ιστιδινών, έκφυση ιστιδίνης
HR	<u>h</u> ypersensitive <u>r</u> eaction	αντίδραση υπερευαισθησίας
hrc genes	<u>h</u> rp and <u>c</u> oncerned genes	γονίδια hrc
hrp genes	<u>h</u> ypersensitive <u>r</u> eaction and <u>p</u> athogenicity	Γονίδια υπεύθυνα για την αντίδραση υπερευαισθησίας και την παθογένεια
In planta		στο φυτό
In situ		επί τόπου
In vitro		στο σωλήνα, εκτός οργανισμού
In vivo		εν ζωή, εντός οργανισμού
Incompatible interaction		ασύμβατη αλληλεπίδραση
Inducible		επαγόμενος
Injection		έγχυση (με ένεση)
Insert		ένθεμα
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside	
Labeling		σήμανση
Ligation		σύνδεση
M	molarity	μοριακότητα
μl (λ)	microliter	μικρόλιτρο
MS ring		δακτύλιος MS, δομικό στοιχείο του βακτηριακού μαστιγίου
MW	<u>m</u> olecular <u>w</u> eight	μοριακό βάρος
NBT/BCIP	nitro blue tetrazolium	χρωμοφόρα υποστρώματα αλκαλικής φωσφατάσης
Necrotic lesions		νεκρωτικές κηλίδες
ONPG	o-nitrophenyl-β-D-galactosidase	υπόστρωμα β-γαλακτοσιδάσης
Oxidative burst		οξειδωτική έκρηξη
Pathogenicity factors		παράγοντες παθογένειας
Pathovar		παθότυπος
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction	αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PEG	polyethyleneglycol	πολυαιθυλενική γλυκόλη
³²P	³² P-orthophosphate	ραδιοσημασμένος φώσφορος
Pellet		ίζημα
Pilus		αγωγός
Plasmid		πλασμίδιο, φορέας

PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride	αναστολέας πρωτεασών
Polylinker		πολυσυνδέτης
Pool		κλάσμα
Primer		εκκινητής
Probe		ανιχνευτής, ιχνηλάτης
Promoter		υποκινητής
PVP	polyvinylpyrrolidone	
Rabbit reticulocyte lysate		λύμα δικτυοερυθροκυττάρων κουνελιού
Race		φυλή
Race/cultivar specificity		φυλετική εξειδίκευση ενός παθογόνου
Random priming		ραδιοσήμανση με τυχαίους εκκινητές
Reporter		μάρτυρας
Repressor		καταστολέας
Resistance		ανθεκτικότητα
Restriction enzyme		ένζυμο περιορισμού
RNase	ribonuclease	ένζυμο που υδρολύει RNA
Rod		Ράβδος, δομικό στοιχείο του βακτηριακού μαστιγίου
ROS	Reactive Oxygen Species	Ενεργές μορφές οξυγόνου
³⁵S-Met	³⁵ S-Methionine	ραδιοσημασμένη μεθειονίνη
SA	salicylic acid	σαλικυλικό οξύ
SAR	systemic acquired resistance	διασυστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα
Scintillation vial		φιαλίδιο σπινθηρισμού
SDS	sodium dodecyl sulphate	δωδεκακυλοθειικό νάτριο
Sense		κωδικός
Sequencing		αλληλούχιση
Sticky ends		προεξέχοντα άκρα
Subcloning		υποκλωνοποίηση
Susceptible		ευπαθής
TEMED	N, N, N, N-tetramethylethylenediamine	
Template		μήτρα
Titration		τιτλοδότηση
TNT-coupled system		συζευγμένο σύστημα μεταγραφής-μετάφρασης
Transformation		μετασχηματισμός
Transgenic		διαγονιδιακός, μετασχηματισμένος
Triparental mating		τριγωνική σύζευξη
Truncated		ακρωτηριασμένος
Tumor		όγκος
Virulence factors		παράγοντες παθογόνου ισχύος
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-	υπόστρωμα β-γαλακτοσιδάσης

galactopyranoside

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γονίδια *hrp* (hypersensitive reaction and pathogenicity) των φυτοπαθογόνων βακτηρίων, τα οποία προσδιορίστηκαν αρχικά στο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, είναι υπεύθυνα τόσο για την ικανότητα τους να προκαλούν ασθένεια σε ευπαθή φυτά, όσο και για την ικανότητα να πυροδοτούν την αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive reaction, HR) σε ανθεκτικά φυτά. Η αντίδραση HR θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς άμυνας των φυτών και η φαινοτυπική της εκδήλωση εξαρτάται τόσο από γονίδια του παθογόνου, *hrp* και *avr* (avirulence genes), όσο και από γονίδια του φυτού (*R*, resistance genes). Ορισμένα γονίδια *hrp* κωδικοποιούν συστατικά ενός εξειδικευμένου συστήματος έκκρισης πρωτεϊνών, που ονομάζεται εκκριτικό σύστημα “τύπου III” και είναι παρόμοιο μ’ εκείνο που χρησιμοποιούν ζωικά παθογόνα βακτήρια, όπως *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, για να εκκρίνουν πρωτεΐνες παθογένειας. Στα φυτοπαθογόνα βακτήρια το εκκριτικό αυτό μονοπάτι ελέγχει την έκκριση μιας ομάδας πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων είναι οι χαρπίνες και οι πρωτεΐνες Avr. Οι χαρπίνες (HrpZ, HrpN και PopA1) είναι οι μόνες γνωστές βακτηριακές πρωτεΐνες, που επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας, μετά από έγχυσή τους σε καθαρή μορφή στους μεσοκυττάριους χώρους φύλλων. Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης HrpZ_{Psp}, του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, στην αντίδραση υπερευαισθησίας, εκφράστηκε το γονίδιο *hrpZ*_{Psp} σε φυτά καπνού. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο συστήματα φορέων έκφρασης: το ρυθμιζόμενο σύστημα έκφρασης, επαγόμενο από την τετρακυκλίνη, για τις ανάγκες του οποίου κατασκευάστηκαν σταθερά μετασχηματισμένα φυτά και το παροδικό ιικό σύστημα έκφρασης, που βασίζεται στον ιό PVX202. Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν κατασκευές, σχεδιασμένες έτσι ώστε η πρωτεΐνη να εκφράζεται είτε στην κανονική της μορφή είτε συντηγμένη με το εκκριτικό πεπτιδίο της πρωτεΐνης PR1a του καπνού, ώστε η παραγόμενη πρωτεΐνη να εκκρίνεται στους μεσοκυττάριους χώρους του φύλλου. Η παραγωγή της HrpZ στα διαγονιδιακά φυτά δεν οδήγησε σε νέκρωση, ανεξάρτητα της παρουσίας ή απουσίας του εκκριτικού πεπτιδίου, αποτέλεσμα που αποδόθηκε στο χαμηλό επίπεδο παραγωγής της.

Αντίθετα, με τον ικό φορέα έκφρασης PVX202 δείχτηκε ότι η παραγωγή της εκκρινόμενης μορφής της χαρπίνης επάγει τη εμφάνιση νεκρωτικών κηλίδων, χαρακτηριστικών της HR, σε φύλλα καπνού. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η θέση δράσης της χαρπίνης στα φυτικά κύτταρα είναι εξωκυττάρια. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι η χαρπίνη, σε φυτικά όπως και σε βακτηριακά κύτταρα, εμφανίζεται με δύο διαφορετικές ηλεκτροφορητικές μορφές. Διερεύνηση της προέλευσης των δύο αυτών μορφών κατέληξε στο συμπέρασμα, ότι η μορφή της χαρπίνης με τη μεγαλύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα είναι προϊόν εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης, από ένα εσωτερικό κωδικόνιο AUG₁₆, στο ευκαρυωτικό σύστημα μετάφρασης. Η αντίστοιχη μορφή, που παράγεται στην *E.coli*, είναι αμινοτελικά ακρωτηριασμένη, στο αμινοτελικό κατάλοιπο A₁₇. Το εκκριτικό μονοπάτι Hrp είναι επίσης υπεύθυνο για τη μεταφορά πρωτεϊνών Avr, που καθορίζουν τη φυλετική εξειδίκευση του παθογόνου, τις οποίες θεωρείται ότι εισάγει κατ' ευθείαν στα κύτταρα-ξενιστές. Βασιζόμενοι σε ενδείξεις, ότι οι χαρπίνες και οι πρωτεΐνες Avr πρέπει να εκφράζονται από το ίδιο βακτηριακό κύτταρο, προκειμένου να πυροδοτηθεί η αντίδραση υπερευαισθησίας, ελέγχθηκε αν οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Παράλληλα εξετάστηκε ποιές πρωτεΐνες Hrp αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, προκειμένου να αναπτυχθεί ένα μοντέλο λειτουργικής αρχιτεκτονικής της εκκριτικής συσκευής Hrp. Δύο πειραματικές προσεγγίσεις ακολουθήθηκαν: το σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης και η μέθοδος "Far western". Στην περίπτωση των πρωτεϊνών, AvrPphB και AvrPto, δεν διαπιστώθηκε αλληλεπίδραση με τη χαρπίνη, γεγονός που υποδηλώνει ότι η εξάρτηση της μεταφοράς τους μέσα στα φυτικά κύτταρα δεν απαιτεί φυσική επαφή με τη χαρπίνη. Ενδεχόμενα, η χαρπίνη να υπεισέρχεται σε άλλο στάδιο της εκκριτικής ή μετα-εκκριτικής διαδικασίας. Σε ότι αφορά τις πρωτεΐνες Hrp, διαπιστώθηκε μοριακή αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών HrcQa και HrcQb. Επιπλέον, δείχτηκε ότι η HrcQb αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό τμήμα της HrcQa, προσδιορίζοντας έτσι και την μεμβρανική τοπολογία της HrcQa.

ABSTRACT

The *hrp* genes of plant-pathogenic bacteria, originally defined in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, are responsible both for their ability to cause disease on susceptible plants and to elicit the hypersensitive reaction (HR) on resistant plants. The HR is one of the major defence mechanisms of plants to pathogen attack and its phenotypic manifestation depends both on bacterial genes (*hrp* and *avr*) and plant genes (*R*). Certain *hrp* genes encode components of a specialized protein secretion pathway, called “type III” secretion system, similar to the synonymous pathway used by animal pathogenic bacteria, such as *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella* to secrete proteinaceous pathogenic determinants. In phytopathogenic bacteria, this pathway controls the secretion of several proteins, among them are the harpins, which are able to elicit the hypersensitive reaction, upon injection, in purified form, into the leaves of resistant plants.

In order to study the role of harpin, HrpZ_{Psp}, of the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, in hypersensitive reaction, the *hrpZ_{Psp}* gene was expressed in tobacco plants. For this purpose, two expression systems were used: the tetracycline regulated system, where stable transformant plants were made and the transient viral expression system, which is based on the PVX202 virus. In both cases, constructs designed to express either the canonical form of harpin or a N-terminally extended version of the protein carrying the signal peptide portion of the tobacco pathogenesis related protein PR1a were used, so that the produced protein could be secreted into intercellular space of leaves. The production of HrpZ, in either form in transgenic plants, did not lead to necrosis, as expected, probably because of the low expression level. In contrast, the accumulation of secreted form of the harpin by the viral expression vector PVX202 induced the appearance of necrotic lesions, characteristic of HR, in tobacco leaves. These results indicate that the harpin acts at a site(s) external to the plant cell.

In the present work, it was observed that the expression of the harpin in plant and bacterial cells leads to the formation of two electrophoretically different forms. The N-terminal sequencing indicated that the faster-moving form is a N-terminally truncated version of the harpin. Site-directed mutagenesis and in vitro translation

further suggested that this form may originate from alternative initiation of translation, at an internal codon AUG₁₆.

The Hrp secretion pathway is also capable of delivering Avr proteins into the plant cells. Based on indications that both harpins and Avr proteins must be expressed by the same bacterial cell in order to trigger the hypersensitive reaction, we examined whether these proteins interact with each other. Similar experiments were carried out to identify possible interactions among Hrp/Hrc proteins to provide a basis for understanding the functional architecture of the Hrp secretion apparatus. Two experimental approaches were followed: the yeast two hybrid system and the Far western technique. In the case of the AvrPphB and AvrPto proteins, no interaction with harpin was detected, indicating that their translocation, through the type III apparatus, into the plant cells does not need physical contact between the Avr proteins and harpin. In respect to other Hrp proteins, interaction was detected between HrcQa and HrcQb. Moreover, it was showed that the HrcQb protein interacts with the carboxyl-terminal portion of HrcQa,. Based on these results and on other evidence, a model for the probable topology of HrcQa protein in the bacterial cell is proposed.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Τα φυτά είναι συνεχώς εκτεθειμένα σε ένα μεγάλο αριθμό παθογόνων, που περιλαμβάνουν βακτήρια, ιούς, μύκητες και νηματώδεις. Όμως, τα φυτά είναι κατά κανόνα ανθεκτικά στην πλειονότητα των παθογόνων και ένα πολύ μικρό ποσοστό αυτών είναι ικανό να αναπτύξει παθολογική σχέση μ' ένα δεδομένο φυτό-ξενιστή και να προκαλέσει ασθένεια. Ένας οργανισμός, για να προκαλέσει ασθένεια σ' ένα δεδομένο ξενιστή θα πρέπει, μεταξύ άλλων, να είναι ικανός, πρώτον να υπερνικήσει τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών, αποφεύγοντας για παράδειγμα την αναγνώριση του, ως “εισβολέα” και δεύτερον να καταστείλει βασικές κυτταρικές λειτουργίες του ή να διαταράξει το μεταβολικό/αναπτυξιακό του πρόγραμμα.

Γενικά, η εξελικτική πορεία των φυτικών ειδών περιλαμβάνει και μια διαδικασία προσαρμογής στην “πίεση” των παθογόνων οργανισμών, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μηχανισμών, που εμποδίζουν τις προσβολές από τα διάφορα παθογόνα. Παράλληλα, όταν ένα φυτικό είδος αποκτήσει, μέσω της εξέλιξης, ένα νέο μηχανισμό άμυνας, το παθογόνο θα πρέπει ξανά να αποκτήσει ένα εναλλακτικό μηχανισμό για να επανακτήσει την παθογένεια του. Αυτές οι δυναμικές συνεξελικτικές “μάχες” έχουν οδηγήσει στη χρήση πολύ εξειδικευμένων και εξαιρετικά έξυπνων στρατηγικών “αναμέτρησης”, τόσο από τη μεριά του παθογόνου όσο και από τη μεριά του φυτού.

1.2. Μηχανισμοί άμυνας των φυτών

Τα φυτά, κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς άμυνας, μέσω των οποίων αναγνωρίζουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς και εμποδίζουν την ανάπτυξη και την εποίκισή τους στους φυτικούς ιστούς. Οι κύριοι μηχανισμοί άμυνας των φυτών περιλαμβάνουν: 1) βιοσύνθεση φυτοαλεξινών (δευτερογενείς μεταβολίτες με αντιμικροβιακή δράση), 2) ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος, με εναπόθεση καλλόζης, λιγνίνης και γλυκοπρωτεϊνών πλούσιων σε υδροξυπρολίνη και 3) παραγωγή διαφόρων υδρολυτικών και οξειδωτικών ενζύμων, όπως λυσοζύμες, χιτινάσες, γλουκανάσες και περοξειδάσες (34, 183, 227, 240). Η επαγωγή μερικών ή όλων αυτών των μηχανισμών άμυνας παρατηρείται στις περισσότερες αλληλεπιδράσεις με ανθεκτικά φυτά, που συνήθως, αλλά όχι πάντα, συνοδεύουν την αντίδραση υπερευαισθησίας (hypersensitive response, HR).

Η αντίδραση αυτή πρωτοπαρατηρήθηκε στις αρχές του 20ου αιώνα από τον Gäumann, ο οποίος μελετούσε την ιστολογία της αντίδρασης ανθεκτικών και ευαίσθητων ποικιλιών σιτηρών, σε μολύνσεις από διαφορετικές φυλές του μύκητα *Puccinia graminis* (παθογόνο αίτιο της “σκωρίασης”) (2). Πολλές δεκαετίες αργότερα, ο Klement και οι συνεργάτες του περιέγραψαν το ίδιο φαινόμενο σε βακτηριακά παθογόνα των φυτών, όταν έγχυση συμπυκνωμένου αιωρήματος ($>10^6$ cfu/ml) από ένα μεγάλο αριθμό βακτηριακών παθογόνων στους μεσοκυττάριους χώρους των φύλλων ενός φυτού μη-ξενιστή, προκάλεσε, μετά από 24 ώρες, μια μακροσκοπικά ορατή νέκρωση περιορισμένη στην περιοχή, όπου ενέθηκαν τα βακτήρια (132-134). Σήμερα γνωρίζουμε ότι η αντίδραση υπερευαισθησίας είναι ένας γρήγορος κυτταρικός θάνατος, περιορισμένης έκτασης, κοινός σε όλα τα φυτά, που εκδηλώνουν ενεργή ανθεκτικότητα σε παθογόνους μύκητες, βακτήρια και ιούς (87, 107).

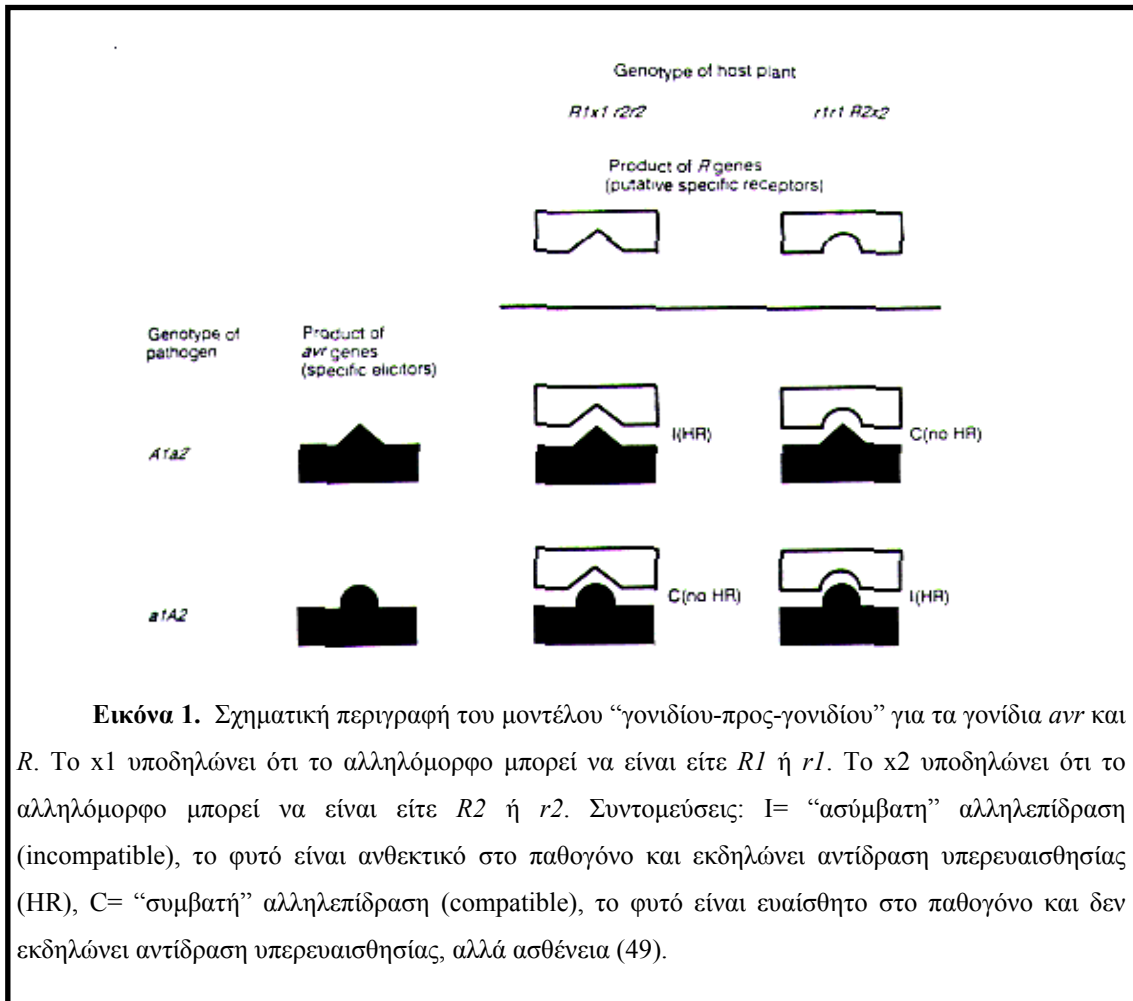
Διάφορα βιοχημικά γεγονότα προηγούνται χρονικά της εμφάνισης του κυτταρικού θανάτου, όπως διαρροή ηλεκτρολυτών από τα φυτικά κύτταρα, διακοπή της φυσιολογικής ανταλλαγής ιόντων K^+/H^+ (έξοδος H^+ , είσοδος K^+ , αντίδραση XR), εισροή ιόντων Ca^{+2} , παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου και συσσώρευση φυτοαλεξινών (11, 235, 270). Οι βιοχημικές αυτές διαταραχές οδηγούν σε νέκρωση του προσβλημένου ιστού, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται ο πολλαπλασιασμός και η διάδοση του παθογόνου στο φυτό και κατ' επέκταση, η εκδήλωση ασθένειας. Σε πολλές περιπτώσεις, αυτή η τοπικά επαγόμενη νεκρωτική αντίδραση συνοδεύεται από μια διασυστηματική αντίδραση άμυνας σε όλο το φυτό, η οποία ονομάζεται “διασυστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα” (Systemic acquired resistance, SAR) και έχει γενικευμένο χαρακτήρα, δηλαδή είναι μη εξειδικευμένη ως προς το παθογόνο (55, 214). Αν και οι μηχανισμοί, που είναι υπεύθυνοι για την αναστολή της ανάπτυξης του παθογόνου, δεν είναι πλήρως γνωστοί, εικάζεται ότι οι φυσικοί περιορισμοί, που επιβάλλονται από τον τοπικό κυτταρικό θάνατο, αναστέλλουν τη εξάπλωση του παθογόνου και την απόκτηση θρεπτικών συστατικών από το φυτό. Πρόσφατες μαρτυρίες υποδεικνύουν ότι η HR είναι μέρος ενός προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (programmed cell death), που ενεργοποιείται στα φυτά μετά την προσβολή του παθογόνου (92, 247).

1.3. Γενετική και μοριακή βάση της φυλετικής εξειδίκευσης φυτών-παθογόνων

Στην προσπάθεια να κατανοηθούν οι βασικοί μηχανισμοί, που ευθύνονται για την αναγνώριση του παθογόνου από το φυτό και την ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι συνδυασμοί φυτών-παθογόνων σαν μοντέλα μελέτης, σε γενετικό και μοριακό επίπεδο. Η εξειδίκευση που χαρακτηρίζει τις αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων μελετήθηκε συστηματικά, για πρώτη φορά από τον Flor (1955) σε γενετικό επίπεδο, χρησιμοποιώντας σαν σύστημα το φυτό λινάρι (*Linum usitatissimum*, flax) και το μύκητα *Melampsora lini*, παθογόνο αίτιο της ασθένειας “σκωρίαση” (flax rust) (71). Η μεθοδολογία που ακολούθησε ο Flor ήταν κλασσική γενετική ανάλυση με συστηματικές διασταυρώσεις, τόσο μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων ποικιλιών του ξενιστή, όσο και φυλών (races) του παθογόνου, ικανών ή μη να προσβάλλουν τις συγκεκριμένες ποικιλίες. Στη συνέχεια, τόσο οι γονικές ποικιλίες, όσο και οι απόγονοι της πρώτης (F1) και δεύτερης (F2) γενιάς, χρησιμοποιήθηκαν σε συστηματικά πειράματα μόλυνσης με τις γονικές φυλές του παθογόνου, όπως και τους απογόνους των γενιών F1 και F2 των αντιστοιχών διασταυρώσεων. Η επιλογή του συγκεκριμένου παθογόνου μύκητα είχε ως πλεονέκτημα τη δυνατότητα μόλυνσεων με απλοειδή και διπλοειδή σπόρια, γεγονός που επέτρεψε τον καθορισμό των υπό μελέτη γονιδίων στο παθογόνο ως κυρίαρχων ή υπολλειπόμενων. Τα συμπεράσματα του Flor διατυπώθηκαν υπό τη μορφή της υπόθεσης “γονιδίου-προς-γονιδίου” (gene-for-gene hypothesis) και ισχύουν για την πλειονότητα των περιπτώσεων ξενιστού-παθογόνου, που έχουν τύχει συστηματικής γενετικής ανάλυσης (70). Σημειώνεται ότι, η απλή γενετική ερμηνεία της υπόθεσης του Flor, λογικά προϋποθέτει την έννοια της “βασικής συμβατότητας” ξενιστού-παθογόνου (basic compatibility).

Η υπόθεση του Flor προβλέπει ότι η έκβαση της αλληλεπίδρασης μεταξύ φυτών και παθογόνων μικροοργανισμών καθορίζεται γενετικά τόσο από το παθογόνο όσο και από το φυτό. Ο Flor παρατήρησε ότι η ανθεκτικότητα των φυτών καθορίζεται, στις περισσότερες περιπτώσεις από μονά επικρατή γονίδια ανθεκτικότητας (Resistance genes, *R* genes) στο φυτό και λειτουργικά αντίστοιχα γονίδια *avr* (avirulence) στο παθογόνο. Αυτό σημαίνει ότι η ανθεκτικότητα εκδηλώνεται μόνο όταν το φυτό-ξενιστής φέρει ένα συγκεκριμένο γονίδιο ανθεκτικότητας και το παθογόνο ένα λειτουργικά αντίστοιχο γονίδιο *avr* (*R1-avr1*, *R2-avr2*, αλλά όχι *R1-*

avr2, *R2-avr1*). Αν το γονίδιο *avr* ή το γονίδιο ανθεκτικότητας *R* απουσιάζει, τότε το παθογόνο προκαλεί ασθένεια στο φυτό. Στην περίπτωση αυτή η σχέση φυτού-παθογόνου ονομάζεται “συμβατή” (compatible), ενώ όταν το φυτό εκδηλώνει ανθεκτικότητα ονομάζεται “ασύμβατη” (incompatible) (Εικ. 1).



Σε ένα μικρό αριθμό περιπτώσεων, η υπόθεση του Flor δεν ισχύει σε όλες τις πτυχές της. Για παράδειγμα, στην περίπτωση παθογόνων, που παράγουν

εξειδικευμένες “παθοτοξίνες”, οι κανόνες του γενετικά κυρίαρχου/υπολειπόμενου χαρακτήρα αντιστρέφονται, δηλαδή τα γονίδια ανθεκτικότητας του ξενιστή είναι γενετικά υπολειπόμενα και η έλλειψη παθογένειας, όπως και η ευαισθησία του ξενιστή, είναι γενετικά κυρίαρχοι χαρακτήρες. Ένα τέτοιο παράδειγμα συνιστά το παθοσύστημα *Cochliobolus carbonum*-αραβόσιτος, που αναφέρεται παρακάτω.

Ένα απλουστευμένο μοριακό μοντέλο, που προτάθηκε για την ερμηνεία και επιβεβαίωση της υπόθεσης του Flor, θεωρεί ότι τα γονίδια ανθεκτικότητας κωδικοποιούν υποδοχείς, που αντιλαμβάνονται τα μοριακά σήματα που παράγονται από τα γονίδια *avr*. Αποτέλεσμα αυτής της αναγνώρισης είναι η ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών του φυτού και η εκδήλωση ανθεκτικότητας. Το μοντέλο του Flor επιβεβαιώθηκε την τελευταία δεκαετία με την κλωνοποίηση των γονιδίων *avr* από βακτήρια και μύκητες και στη συνέχεια, με την κλωνοποίηση των γονιδίων ανθεκτικότητας, σε βακτήρια, μύκητες, ιούς, από διάφορα φυτά.

1.3.1. Γονίδια ανθεκτικότητας

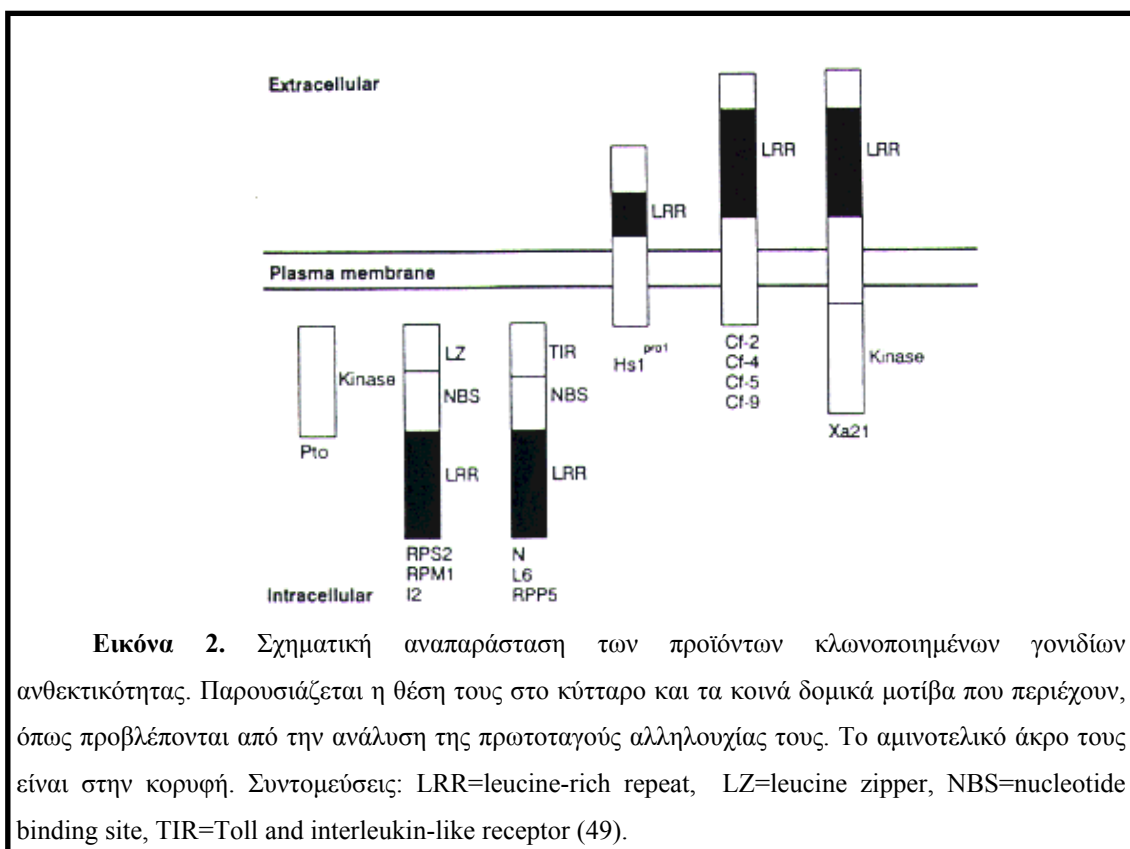
Το φυτικό βασίλειο περιέχει μια πλειάδα γονιδίων ανθεκτικότητας τα οποία εμφανίζουν εξειδίκευση ως προς το παθογόνο. Παρά τις διαφορές των μηχανισμών άμυνας, που επάγονται στη διάρκεια των διαφορετικών αλληλεπιδράσεων φυτών-παθογόνων, μερικά κοινά χαρακτηριστικά ήταν εμφανή από πολύ νωρίς. Το πιο εκπληκτικό είναι ότι η λειτουργία ενός γονιδίου *R* εξαρτάται από το γονότυπο του παθογόνου, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Έτσι, ένα φυτό θα ενεργοποιήσει τους αμυντικούς του μηχανισμούς μόνο όταν το παθογόνο φέρει ένα κατάλληλο γονίδιο *avr*. Η αναγνώριση αυτής της γονιδιακής εξάρτησης οδήγησε στην ανάπτυξη ενός υποθετικού μοντέλου, σύμφωνα με το οποίο τα γονίδια *avr* κωδικοποιούν ειδικούς διεγέρτες (specific elicitors), οι οποίοι αναγνωρίζονται από υποδοχείς που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *R*. Το μοντέλο αυτό δεν ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις και συνέβαλε ελάχιστα στην απομόνωση των γονιδίων *R* ή των γονιδιακών προϊόντων τους. Η απομόνωση των γονιδίων *R* επιτεύχθηκε μετά την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών για κλωνοποίηση φυτικών γονιδίων άγνωστης λειτουργίας, όπως η σήμανση με μεταθετά στοιχεία (transposon tagging) και η τοπολογική χαρτογράφηση (positional cloning) (18, 24, 266).

Το πρώτο γονίδιο *R* που απομονώθηκε (με transposon tagging) ήταν το γονίδιο *Hm1* από τον αραβόσιτο, το οποίο παρείχε ανθεκτικότητα σε φυλές του παθογόνου μύκητα *Cochliobolus carbonum* (124). Το γονίδιο κωδικοποιεί μια NADPH-εξαρτημένη αναγωγή, η οποία απενεργοποιεί μια τοξίνη, που παράγεται από το μύκητα. Η δράση αυτής της πρωτεΐνης σαφώς αποκλίνει από το προτεινόμενο μοντέλο, για τη λειτουργία των γονιδιακών προϊόντων *R* ως υποδοχείς σημάτων *avr*, αφού το γονίδιο αυτό δεν αντιστοιχεί με κάποιο γονίδιο *avr* στο μύκητα και ούτε επάγεται HR στο φυτό.

Η επιβεβαίωση του μοντέλου του Flor ήρθε μετά την κλωνοποίηση, με positional cloning και το χαρακτηρισμό του γονιδίου *Pto* από την τομάτα (165, 166). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια κινάση σερίνης-θρεονίνης (Ser/Thr protein kinase), πράγμα που υποδηλώνει την παρουσία ενός μονοπατιού μεταβίβασης σήματος μέσω φωσφορυλιώσεων πρωτεϊνών, που καταλήγει στην ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας του φυτού (268). Εκτοτε, έχουν απομονωθεί κι άλλα γονίδια από διάφορα φυτικά είδη, τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Αν και ο ακριβής ρόλος τους δεν έχει διελευκανθεί πλήρως, η παρουσία ορισμένων συντηρημένων δομικών μοτιβών, όπως υδρόφοβες περιοχές (TM, transmembrane regions), περιοχές για δέσμευση νουκλεοτιδίων (NBS, nucleotide binding sites), περιοχές κινασών πρωτεϊνών (PK, protein kinases) και περιοχές πλούσιες σε λευκίνες (Leucine-rich repeats, LRR), υποδηλώνει ότι λειτουργούν τουλάχιστον εν μέρει μέσω παρόμοιων διαδικασιών σηματοδότησης, αν και η προβλεπόμενη υποκυτταρική τους θέση διαφέρει. Μερικές απ' αυτές εντοπίζονται στη κυτταρική μεμβράνη, όπως προκύπτει από ανάλυση των πρωτεϊνικών τους αλληλουχιών, ενώ άλλες εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα (Εικ. 2).

Ενα εύλογο ερώτημα, που δημιουργείται λόγω της παρουσίας ορισμένων πρωτεϊνών *R* μέσα στο φυτικό κυτταρόπλασμα, είναι πώς από τη θέση αυτή μπορούν να δρουν ως υποδοχείς των πρωτεϊνών *Avr*, αφού τα βακτήρια αναπτύσσονται εξωκυττάρια. Υπάρχει πειστική μαρτυρία ότι τα βακτήρια, σε ορισμένες τουλάχιστον περιπτώσεις αναγνωρίζονται μέσα στα φυτικά κύτταρα από τα προϊόντα τους, τα οποία εκκρίνονται μέσα στο φυτικό κυτταρόπλασμα μέσω ενός ιδιόμορφου εκκριτικού συστήματος, το οποίο περιγράφεται παρακάτω. Πράγματι σε μία περίπτωση έχει καταδειχτεί φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ ενός γονιδιακού προϊόντος *R* με μία πρωτεΐνη *Avr*. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη *Pto*, η οποία είναι κυτταροπλασμική,

βρέθηκε με το σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης, ότι αλληλεπιδρά με την AnrPto (234). Στη συνέχεια, απομονώθηκαν κι άλλα γονίδια (Prf, Pti1-6) από βιβλιοθήκες τομάτας, τα προϊόντα μετάφρασης των οποίων αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη Pto, με αποτέλεσμα να αποκαλυφθεί όλο σχεδόν το μονοπάτι σηματοδότησης, που οδηγεί στην ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων, του μηχανισμού άμυνας των φυτών (Εικ. 3) (216, 268, 269).

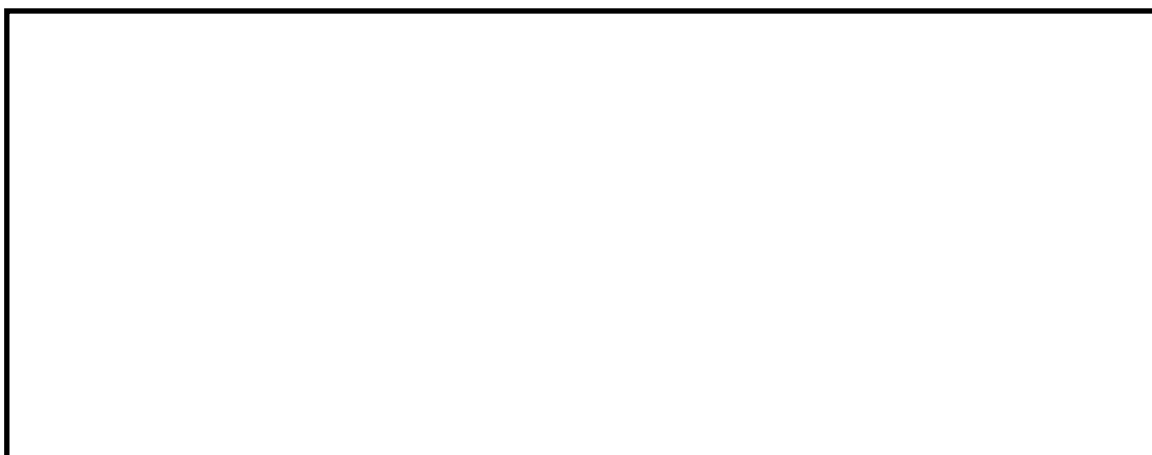


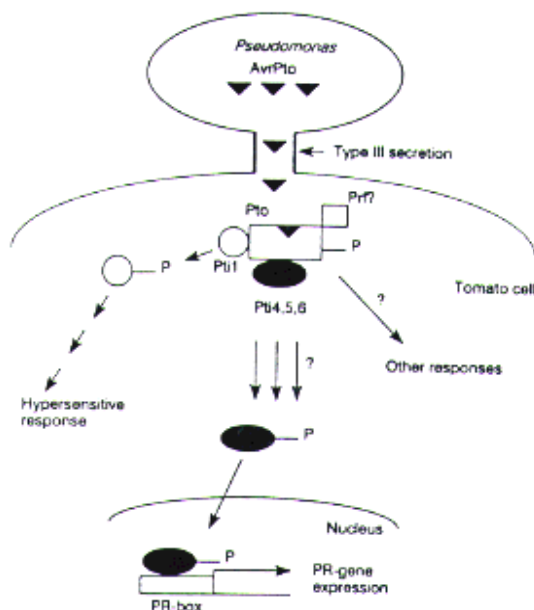
Παρόλο, που τα προϊόντα των γονιδίων *R* εμφανίζουν ορισμένα κοινά δομικά μοτίβα εμφανίζουν και μεγάλο βαθμό πολυμορφισμού (14). Έχει προταθεί ότι γενετικές ανακατατάξεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη αυτών των γονιδίων, επιτρέποντας έτσι στα φυτά να δημιουργούν νέα γονίδια ανθεκτικότητας για να ταιριάζουν με το μεταβαλλόμενο πρότυπο της παθογένειας (195, 196). Επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης προέκυψε με μελέτες στο γονιδιακό τόπο *rp1* στο καλαμπόκι, οι οποίες έδειξαν ότι ανασυνδυασμός γειτονικών δεικτών σχετιζόταν με τη δημιουργία νέων φαινοτύπων ανθεκτικότητας (205).

Πολλά γονίδια *R* απαντούν ως ομάδες ομολόγων γονιδίων, που επιπλέον με το λειτουργικό γονίδιο που ενεργοποιείται από το γενετικά αντίστοιχο γονίδιο *avr*, ίσως

κωδικοποιούν υποδοχείς αταυτοποίητων ακόμα πρωτεϊνών Αντ. Έχει προταθεί ότι διάφορες γονιδιακές ομάδες *R* έχουν εξελιχτεί με μια διαδικασία διπλασιασμού γονιδίων και άνισου διασκελισμού (212). Από τα ήδη κλωνοποιημένα γονίδια *R*, τα *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-9*, *N*, *Pto* και *Xa21* έχουν πολλά ομόλογα γονίδια ομαδοποιημένα, όπως συμβαίνει με τα γονίδια του κύριου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex) στα θηλαστικά (101, 127). Υπάρχουν, επίσης, γονιδιακοί τόποι *R*, οι οποίοι αποτελούνται από ένα μόνο γονίδιο με πολλά διακριτά αλληλόμορφα. Για παράδειγμα, ο γονιδιακός τόπος *L* στο λινάρι έχει 13 διαφορετικά αλληλόμορφα με διαφορετική εξειδίκευση το καθένα (121).

Η απομόνωση των γονιδίων ανθεκτικότητας *R* έχει συμβάλλει σημαντικά, όχι μόνο στην ανάλυση των αλληλεπιδράσεων φυτών-παθογόνων σε μοριακό επίπεδο, αλλά και στην κατανόηση των διαδικασιών με τις οποίες δημιουργούνται νέα γονίδια ανθεκτικότητας στη διάρκεια της συνεξέλιξης φυτών-παθογόνων. Τέλος, τα γονίδια *R* αποτελούν χρήσιμα μοριακά εργαλεία, για τη γενετική τροποποίηση των φυτών, με στόχο την αντιμετώπιση των φυτικών ασθενειών, με νέες ανθεκτικές ποικιλίες.





Εικόνα 3. Προτεινόμενο μοντέλο του μονοπατιού σηματοδότησης της HR μετά τη φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης AvrPto του βακτηρίου *P.s.tomato* και της πρωτεΐνης Pto της τομάτας. Οι προτεινόμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων πρωτεϊνών βασίζονται σε αποτελέσματα από μελέτες με το σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης, αλλά δεν έχουν ακόμα αποδειχτεί *in planta*. Η πρωτεΐνη AvrPto εισέρχεται μέσα στο φυτικό κύτταρο μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III, όπου αλληλεπιδρά με την Pto. Η πρωτεΐνη Pti1 αλληλεπιδρά με την Pto και φωσφορυλιώνεται, και πιθανόν να συμμετέχει στο μονοπάτι σηματοδότησης της HR. Επίσης οι μεταγραφικοί παράγοντες Pti4, Pti5 και Pti6 αλληλεπιδρούν με την Pto, καθώς και με υποκινητές (PR-box) επάγοντας την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν βασικές πρωτεΐνες PR (pathogenesis related proteins). Δεν είναι γνωστό αν αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες φωσφορυλιώνονται. Η πρωτεΐνη Prf απαιτείται, επιπλέον της Pto, για την εκδήλωση της HR, αλλά η λειτουργία της και η θέση της στο μονοπάτι δεν είναι γνωστή. Τα βέλη με τα ερωτηματικά υποδηλώνουν την πιθανότητα επαγωγής και άλλων μηχανισμών άμυνας (49).

Πίνακας 1. Κλωνοποιημένα φυτικά γονίδια ανθεκτικότητας [Parker, 1997 #26; de Wit, 1997 #36; Ellis, 1998 #249]

Γονίδια <i>R</i>	Φυτικό είδος	Παθογόνο	Γονίδιο <i>avr</i>	Δομή ¹	Αναφορά
<i>Hm1</i>	Maize	<i>Cochliobolus carbonum</i>	-	Toxin reductase	Johal and Briggs (124)
<i>Pto</i>	Tomato	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	<i>avrPto</i>	PK	Martin et al.(166)
<i>Xa21</i>	Rice	<i>Xantomonas campestris</i> pv. oryzae	<i>avrXa21</i>	LRR, TM, PK	Song et al (228)
<i>Xa1</i>	Rice	X.c pv. oryzae	<i>avrXa1</i>	NBS, LRR	Yoshimura et al. (264)
<i>RPS2</i>	Arabidopsis	P.s.tomato	<i>avrRpt2</i>	LRR, NBS, LZ	Bent et al. (25), Mindrinos et al (171)
<i>RPM1</i>	Arabidopsis	P.s.maculicola	<i>avrRpm1, avrB</i>	LRR, NBS, LZ	Grant et al (91)
<i>Prf</i>	Tomato	P.s.tomato	<i>avrPto</i>	LRR, NBS, LZ	Salmeron et al. (216)
<i>N</i>	Tobacco	Tobacco mosaic virus	TMV replicase?	TIR, LRR, NBS	Whitman et al. (256)
<i>L6</i>	Flax	<i>Melampsora lini</i>	<i>Unknown</i>	TIR, LRR, NBS	Lawrence et al. (140)
<i>Cf-2</i>	Tomato	<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Avr2</i>	LRR, TM	Dixon et al. (54)
<i>Cf-4</i>	Tomato	<i>C.fulvum</i>	<i>Avr4</i>	LRR, TM	Thomas et al. (unpublished)
<i>Cf-5</i>	Tomato	<i>C.fulvum</i>	<i>Avr5</i>	LRR, TM	Hammon-Kosack et al. (101)
<i>Cf-9</i>	Tomato	<i>C.fulvum</i>	<i>Avr9</i>	LRR, TM	Jones et al (125)
<i>Hs1^{pro1}</i>	Sugar beet	<i>Heterodera schachtii</i>	?	LRR	Cai et al. (36)
<i>RPP5</i>	Arabidopsis	<i>Peronospora parasitica</i>	?	TIR, NBS, LRR	Parker et al (184)
<i>I2C-1</i>	Tomato	<i>Fusarium oxysporum</i>	?	NBS, LRR	Ori et al. (182)

¹**Δομή:** Παρουσιάζονται τα δομικά μοτίβα των πρωτεϊνών, όπως προέκυψαν από ανάλυση των πρωτεϊνικών τους αλληλουχιών: LRR: leucine-rich repeat, NBS: nucleotide binding site, LZ: leucine zipper, PK: Protein kinase, TIR: αλληλουχίες παρόμοιες με κυτοπλασμικές περιοχές των πρωτεϊνών Toll και IL-1R, TM: transmembrane domain

1.3.2 Ταυτοποίηση και λειτουργία των γονιδίων *avr*

Καθοριστικό ρόλο στην κλωνοποίηση των γονιδίων *avr* ήταν η χρήση φυτοπαθογόνων βακτηρίων επιδεκτικών γενετικής ανάλυσης με μεθόδους μοριακής γενετικής. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αντίδραση υπερευαισθησίας αποτελεί την πιο συνήθη φαινοτυπική έκφραση άμυνας των φυτών και η εκδήλωση της εξαρτάται από τη λειτουργία των φυτικών γονιδίων *R*, που λειτουργούν με τους κανόνες της υπόθεσης του Flor. Η απομόνωση των γονιδίων *avr* βασίστηκε στην ικανότητά τους να μετατρέπουν μια παθογόνο φυλή (virulent race) σε μη-παθογόνο (avirulent), ως προς μια συγκεκριμένη ποικιλία φυτού, όταν μεταφερθούν σ' αυτήν με πλασμίδια ευρέους φάσματος (broad-host-range plasmids). Χρησιμοποιώντας αυτή την προσέγγιση, κλωνοποιήθηκε, το 1984, το πρώτο γονίδιο *avr* από ένα παθογόνο βακτήριο της σόγιας, την *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (229). Σήμερα περισσότερα από 30 γονίδια *avr* έχουν απομονωθεί από βακτήρια, κυρίως από στελέχη των *P.syringae* και *X. campestris* και μύκητες [Leach, 1996 #51; Dangl, 1994 #35]. Απ' αυτά μόνο ένα κωδικοποιεί πρωτεΐνη με καταδεδειγμένο ενζυμικό ρόλο. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη AvrD, προϊόν έκφρασης του γονιδίου *avrD* της *P.syringae* pv. *tomato*, είναι μια γλυκοσύλ-τρανσφεράση (glycosyl transferase), που συμμετέχει στο μονοπάτι βιοσύνθεσης δύο σχεδόν πανομοιότυπων ακυλογλυκοσιδίων, των syringolides 1 και 2. Τα μικρά αυτά μόρια εκκρίνονται και πιθανά αλληλεπιδρούν με το προϊόν (άγνωστο προς το παρόν) του γονιδίου ανθεκτικότητας *Rpg4* της σόγιας, είτε εξω- ή ενδοκυτταρικά (128, 135).

Ο βιολογικός και εξελικτικός ρόλος των γονιδίων *avr* στα μικροβιακά παθογόνα των φυτών παραμένει αινιγματικός. Ορισμένα γονίδια *avr* έχει βρεθεί ότι απαιτούνται για την παθογένεια, γιατί μεταλλάξεις ή ελλείψεις των γονιδίων αυτών μειώνει την ικανότητα των βακτηρίων να προκαλούν ασθένεια, καθώς και την προσαρμοστικότητά τους (fitness) (155, 206, 231, 232). Έτσι, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η πρωταρχική λειτουργία των γονιδίων *avr* δεν ήταν η αναγνώριση τους από τα ανθεκτικά φυτά και η ενεργοποίηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας. Αντίθετα θα πρέπει να πρόσφεραν κάποιο εξελικτικό πλεονέκτημα για το παθογόνο, ίσως πριν τα φυτικά είδη αποκτήσουν τα σημερινά συστήματα αναγνώρισης των μικροβιακών παθογόνων -γονίδια ανθεκτικότητας- (42, 143, 241). Στο παρελθόν οι φυτοπαθολόγοι ξεχώριζαν τα γονίδια *avr* από τα γονίδια *path* (pathogenicity).

Πίνακας 2. Βακτηριακά γονίδια avr [Leach, 1996 #52]

Παθογόνο	Γονίδιο avr	Γονίδιο R	Μέγεθος και χαρακτηριστικά
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola	<i>avrPph1</i>	Bean, R1	
	<i>avrPphB</i>	Bean (R3), pea	35 kDa, 28kDa (truncated form)
	<i>avrPphE</i>	Bean (R2), pea	41 kDa, υδροφιλική
	<i>avrPphD</i>	pea	
P.s. pv.tomato	<i>avrD</i>	Soybean (Rpg4), bean	34 kDa, υδροφιλική
	<i>avrE</i>	Soybean	
	<i>avrPto</i>	Tomato, Pto	18.3 kDa, υδροφιλική
	<i>avrRpt2</i>	Arabidopsis (RPS2), soybean, turnip, radish	28.2 kDa, υδροφιλική
P.s. pv. glycinea	<i>avrA</i>	Soybean (Rpg2)	101 kDa, υδροφιλική
	<i>avrB</i>	Soybean (Rpg1), Arabidopsis (RPM1/RPS3)	36 kDa, υδροφιλική
	<i>avrC</i>	Soybean (Rpg3),	39 kDa, υδροφιλική
P.s.pv. pisi	<i>avrPspi1</i>	Pea (R2), Arabidopsis (RPM1), Bean (RN+RN2) Soybean	
	<i>avrPspi3</i>	Pea, R3	
P.s. pv.syringae	<i>hrmA</i>		
<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>avrA</i>	Tobacco	
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. vesicatoria	<i>avrRxv</i>	Bean (Rxv), soybean, cowpea, alfalfa, cotton, corn	
	<i>avrBs1</i>	Pepper (Bs1)	49.8 kDa, υδροφιλική
	<i>avrBs2</i>	Pepper (Bs2)	60 kDa
	<i>avrBs3</i>	Pepper (Bs3)	122 kDa, 17.5 102-bp repeats, cytoplasmic
	<i>avrBsT</i>	Pepper (BsTi)	
	<i>avrBsP</i>	Tomato	122 kDa, 17.5 102-bp repeats
X. c. pv. malvacearum	<i>avrB4</i>	Cotton, AcB1, AcB4	19 102-bp repeats
	<i>avrB6</i>	Cotton, AcB1, Acb6	13.5 102-bp repeats
	<i>avrB7</i>	Cotton, Acb7	19 102-bp repeats
	<i>avrB101</i>	Cotton	23 102-bp repeats
	<i>avrBln</i>	Cotton, AcBln	
	<i>avrB102</i>	Cotton	
X. c. pv. citri	<i>pthA</i>	Bean, alfalfa	
X.c. pv. raphani	<i>avrXca</i>	Arabidopsis	
<i>X. oryzae</i> pv.oryzae	<i>avrXa7</i>	Rice, Xa-7	125 kDa, cytoplasmic 25.5 102-bp repeats

	<i>avrXa10</i>	Rice, Xa-10	119 kDa, cytoplasmic 15.5 102-bp repeats
--	----------------	-------------	---

Τα γονίδια *path* απαιτούνται από τα βακτήρια για να προκαλούν ασθένεια, ενώ τα *avr* ευθύνονται για την εκδήλωση της ανθεκτικότητας του ξενιστή καθώς και για τον καθορισμό του εύρους των ξενιστών ενός παθογόνου και είναι επιστατικά των γονιδίων *path*. Ομως, θεωρητικά, ένα γονίδιο *path* μπορεί να γίνει *avr* αν κάποια στιγμή αναγνωριστεί το προϊόν του από το σύστημα “ανίχνευσης” του φυτού. Η άποψη αυτή ενισχύθηκε μετά την ταυτοποίηση του πρώτου υποψήφιου γονιδίου *avr* από την *Erwinia amylovora*, του *dspA* (81). Απενεργοποίηση του γονιδίου αυτού, με ένθεση μεταθετών στοιχείων, καθιστά το βακτήριο μη παθογόνο σε ευαίσθητες ποικιλίες του ξενιστή (αχλαδιά), ενώ ένα μη παθογόνο στέλεχος μπορεί να γίνει παθογόνο στο προηγούμενα ανθεκτικό φυτό, με έκφραση του γονιδίου *dspA*. Πράγματι, παθογόνα που έχουν παρακάμψει την άμυνα του ξενιστή, έχουν αποκτήσει μεταλλαγές στα γονίδια *avr* και έτσι δεν αναγνωρίζονται από το φυτό [Leach, 1996 #52]. Ομως, επειδή αυτά τα βακτήρια έχουν διατηρήσει τους βασικούς παράγοντες παθογένειας, μπορούν να προκαλούν ασθένεια στο φυτό, που προηγουμένως εκδήλωνε ανθεκτικότητα.

Τα κύρια χαρακτηριστικά των γονιδίων *avr* είναι: 1) Οι αλληλουχίες τους δεν εμφανίζουν ομολογία σε νουκλεοτιδικό και πρωτεϊνικό επίπεδο, αλλά ούτε και με άλλες πρωτεΐνες, που έχουν καταχωρηθεί μέχρι σήμερα στις τράπεζες δεδομένων. Μια ενδιαφέρουσα εξαίρεση εμφανίζει η πρωτεΐνη, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *avrRxv* της *Xanthomonas campestris*, η οποία εμφανίζει ομοιότητα με την πρωτεΐνη AvrA της *Salmonella typhimurium* και την πρωτεΐνη YopJ της *Yersinia pseudotuberculosis*, τα οποία είναι ζωικά παθογόνα, καθώς και με το προϊόν του γονιδίου *y410* από το συμβιωτικό βακτήριο *Rhizobium* spp. (77). 2) Επάγονται *in planta*, δηλ. μετά από μόλυνση των βακτηρίων στο φυτό, καθώς και σε ελάχιστα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας. 3) κωδικοποιούν υδροφιλικές πρωτεΐνες και δεν έχουν πεπτίδια έκκρισης. 4) Παρόλο, που οι πρωτεΐνες Avr θεωρούνται υπεύθυνες για τη μοριακή αναγνώριση των παθογόνων από τα ανθεκτικά φυτά, εντούτοις δεν έχουν ανιχνευθεί έξω από τα βακτηριακά κύτταρα, και καμία από τις βακτηριακές πρωτεΐνες Avr δεν επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας, όταν εγχύνεται στο μεσοκυττάριο χώρο φύλλων φυτών, που φέρουν το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας. Η αντίδραση υπερευαισθησίας επάγεται μόνο όταν ζωντανά παθογόνα βακτήρια, που φέρουν τα γονίδια *avr* εγχύνονται στον αποπλάστη. Ο λόγος είναι ότι μια επιπλέον ομάδα γονιδίων, που ονομάζονται γονίδια *hrp* απαιτείται για να

επαχθεί η αντίδραση υπερευαισθησίας (191). Η εισαγωγή αυτής της γονιδιακής ομάδας σε ένα μη παθογόνο βακτήριο, όπως *E.coli* μαζί με ένα γονίδιο *avr* προσδίδει στο βακτήριο την ικανότητα να επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας σε κατάλληλη ποικιλία φυτού. Έτσι η λειτουργία των πρωτεϊνών *Avr* εξαρτάται από τη λειτουργία των γονιδίων *hrp*.

1.4. Παθογένεια των φυτοπαθογόνων βακτηρίων

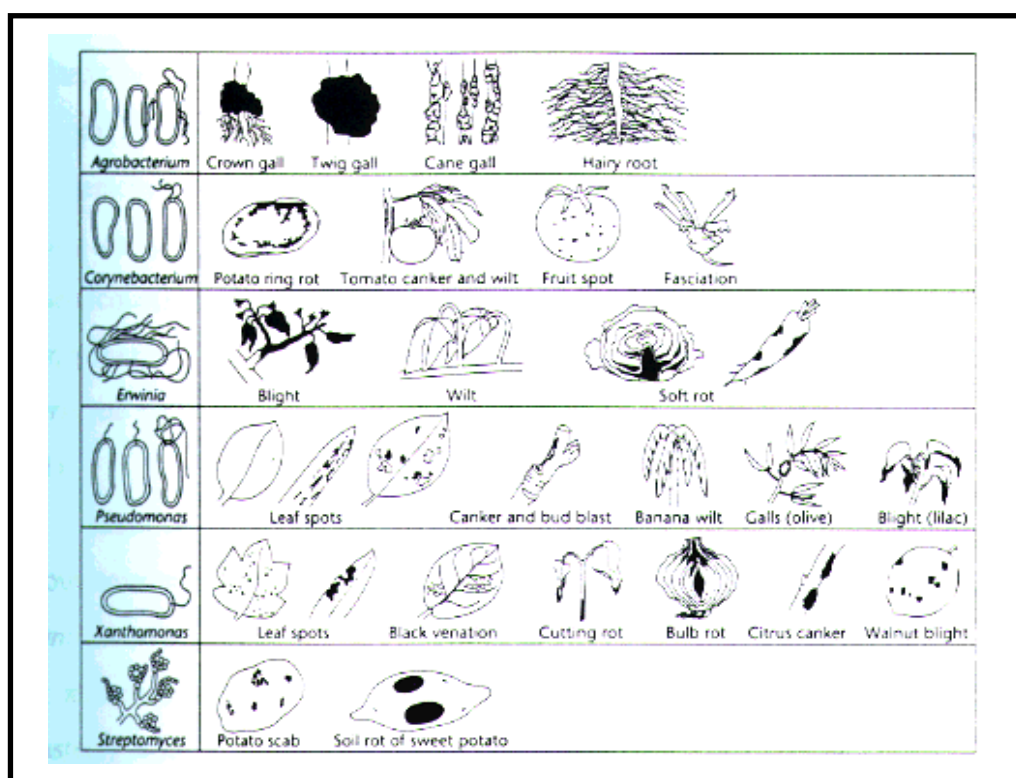
Τα βακτηριακά παθογόνα των φυτών αναπτύσσονται, κατά κανόνα, στον αποπλάστη-το χώρο μεταξύ των φυτικών κυττάρων- και από τη θέση αυτή προκαλούν μια ποικιλία ασθενειών στα περισσότερα καλλιεργούμενα φυτά (4). Οι συνήθεις ασθένειες που προκαλούν σε φυτά ξενιστές περιλαμβάνουν: κηλιδώσεις (leaf spots), κάψιμο (blight), μαρασμό (wilt), καρκινώματα (galls) και μαλακές σήψεις (soft rots). Η πλειονότητα αυτών των παθογόνων είναι Gram-αρνητικά βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* και *Ralstonia*. Τα κυριότερα είδη, που ανήκουν σ' αυτά τα γένη και προκαλούν ασθένειες με ιδιαίτερη οικονομική σημασία παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Σε κάθε είδος υπάρχουν οι παθότυποι και οι φυλές (pathovars, races), που διαφέρουν ως προς το είδος των φυτών που προσβάλλουν καθώς και στη συμπτωματολογία της ασθένειας που προκαλούν (Εικ. 4).

Τα περισσότερα είναι εξειδικευμένα ως προς το είδος και την ποικιλία του ξενιστή. Η παθογόνος φάση τους χαρακτηρίζεται από εκτεταμένο πολλαπλασιασμό στην περιοχή της μόλυνσης, για διάστημα 1-2 εβδομάδων και εξάπλωση στους παρακείμενους ιστούς ή/και διασυστηματική μεταφορά σε άλλα όργανα/ιστούς του ξενιστή, με τελικό αποτέλεσμα την εμφάνιση συμπτωμάτων χαρακτηριστικών της ασθένειας. Παρόλο, που αυτά τα βακτήρια ανήκουν σε διαφορετικές ταξινομικές ομάδες και προκαλούν εντελώς διαφορετικά συμπτώματα, όλα έχουν την ικανότητα να επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας σε μη-ξενιστές καθώς και σε ανθεκτικές ποικιλίες των ξενιστών τους. Σήμερα η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών, που διέπουν τις αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων, βασίστηκε σε τρεις κύριες ανακαλύψεις. Η πρώτη βασίστηκε στην παρατήρηση ότι, όταν ένας μεγάλος αριθμός βακτηριακών παθογόνων εγχύνεται στους μεσοκυττάρους χώρους φύλλου ενός φυτού μη-ξενιστή (incompatible interaction), εκδηλώνεται μια ορατή νέκρωση η

οποία περιορίζεται στην περιοχή όπου ενέθηκαν τα βακτήρια. Η αντίδραση αυτή ονομάστηκε αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Reaction, HR) (132, 134). Επειδή η ικανότητα να επάγουν την HR είναι ένα μοναδικό χαρακτηριστικό των νεκρογόνων παθογόνων (σε αντιδιαστολή με τα σαπρόφυτα) και αυτά τα βακτήρια μπορούν να διαφεύγουν ή να καταστέλλουν την ενεργοποίηση της στους ξενιστές τους, το φαινόμενο της HR έχει κεντρικό ρόλο στην βακτηριακή παθογένεια και στην εξειδίκευση, ως προς τον ξενιστή και έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον (47, 87, 102, 133). Η δεύτερη ανακάλυψη ήταν αποτέλεσμα της χρήσης κατάλληλων μεθόδων μοριακής γενετικής (όπως μεταλλαξιγένεση με μεταθετά στοιχεία, πλασμιδιακοί φορείς ευρέου φάσματος), που επέτρεψαν την ταυτοποίηση μιας ομάδας βακτηριακών γονιδίων, τα οποία όταν μεταλλαχθούν εμποδίζουν την εκδήλωση ασθένειας ή την επαγωγή της HR. Τα γονίδια αυτά, τα οποία απομονώθηκαν αρχικά από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *P.syringae* pv. *phaseolicola* (150), ονομάστηκαν γονίδια *hrp* (hypersensitive reaction and pathogenicity), γιατί εμφάνιζαν πλειοτροπικό μεταλλαγμένο φαινότυπο *in planta*: Μεταλλαγές ένθεσης μεταθετών στοιχείων στα γονίδια αυτά εμπόδιζαν την εκδήλωση της HR σε φυτά μη-ξενιστές και την εμφάνιση ασθένειας σε φυτά ξενιστές. Έτσι, οι προσεγγίσεις αυτές κατέγραψαν ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων που σχετίζονται με την HR, τα γονίδια *hrp*, αντ' καθώς και άλλα γονίδια που σχετίζονται με την παραγωγή πηκτινικών ενζύμων, τοξινών και εξωκυττάρων πολυσακχαριτών. Η τρίτη ανακάλυψη ήταν ότι τα περισσότερα από τα γονίδια *hrp* κωδικοποιούν ένα εκκριτικό σύστημα πρωτεϊνών, που είναι κοινό σε φυτικά και ζωικά παθογόνα και διαφέρει από το εκκριτικό σύστημα Sec, το οποίο είναι απαραίτητο για τη βιωσιμότητα των βακτηρίων. Το εκκριτικό αυτό μονοπάτι έχει τη δυνατότητα να μεταφέρει πρωτεΐνες παθογόνου ισχύος (virulence proteins) στα ευκαρυωτικά κύτταρα (4, 90, 238).

Πίνακας 3. Φυτοπαθογόνα βακτήρια και ασθένειες που προκαλούν (4)

Παθογόνο	Φυτό-Ξενιστής	Ασθένεια
<i>Pseudomonas syringae</i> pathovars	Tomato, Arabidopsis, legumes	Foliar spots and blights
<i>Xanthomonas campestris</i> pathovars	pepper, tomato, brassicas	Foliar spots and blights
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Solanaceae, tomato, tobacco	wilts
<i>Erwinia amylovora</i>	Rosaceae, apple and pear	Fire blight
<i>Erwinia stewartii</i>	Maize	Stewart's wilt
<i>Erwinia carotovora</i> and <i>E. chrysanthemi</i>	potato, tobacco, Saintpaulia	Soft rots

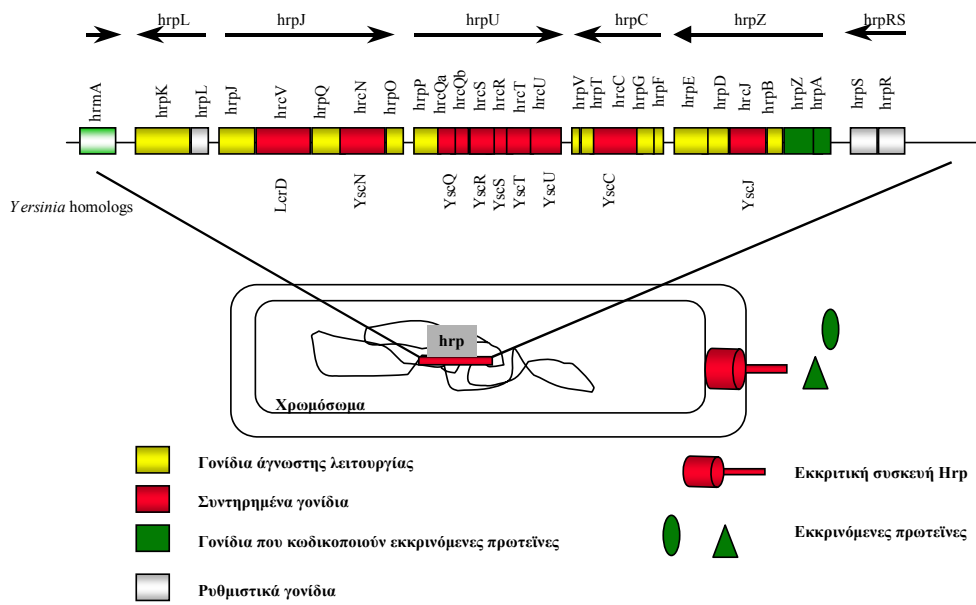


Εικόνα 4. Συμπτώματα και ασθένειες που προκαλούνται από έξι διαφορετικά βακτηριακά παθογόνα των φυτών (2).

1.4.1 Γονίδια *hrp*

Η ικανότητα των φυτοπαθογόνων Gram-αρνητικών βακτηρίων να επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας δεν εξαρτάται μόνο από τα γονίδια *avr*, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αλλά και από μια άλλη ομάδα γονιδίων, τα γονίδια *hrp*. Η πρώτη μαρτυρία ότι τα βακτήρια περιέχουν γενετικούς καθοριστές που ευθύνονται για την παθογένεια τους σε ευπαθείς ποικιλίες φυτών, καθώς και για την ικανότητα τους να επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας σε ανθεκτικές ποικιλίες του ξενιστή τους ή σε φυτά μη-ξενιστές προήλθε από πειράματα μεταλλαξιγένεσης με μεταθετά στοιχεία στο φυτοπαθογόνο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (150). Τα μεταλλαγμένα βακτήρια εμφάνιζαν πλειοτροπικό φαινότυπο, δηλαδή ήταν ανίκανα να προκαλέσουν ασθένεια σε ευπαθείς ποικιλίες του ξενιστή και επιπλέον αποτύγχαναν να επάγουν HR, μετά από έγχυση συμπυκνωμένων αιωρημάτων καλλιεργήματος τους στον αποπλάστη φύλλων καπνού, ενός φυτού μη-ξενιστή. Γι' αυτό το λόγο τα γονίδια αυτά ονομάστηκαν *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity). Μετέπειτα μελέτες οδήγησαν στη χαρτογράφηση των μεταλλαγών αυτών, σε μια περιοχή 25 kb, στο γονιδίωμα της *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Εικ. 5) (111, 150, 151, 202). Επίσης, το μέγεθος της περιοχής *hrp* καθώς και η γενική της οργάνωση ήταν συντηρημένη σε όλες τις φυλές του φυτοπαθογόνου *P. syringae* που εξετάστηκαν, ανεξάρτητα από το εύρος των ξενιστών, που μόλυναν (151).

Μετά την πρώτη δημοσίευση των γονιδίων *hrp*, παρόμοιες γονιδιακές ομάδες έχουν ταυτοποιηθεί σε όλα τα κύρια γένη των φυτοπαθογόνων βακτηρίων: *Erwinia*, *Xanthomonas* και *Ralstonia*, με εξαίρεση το *Agrobacterium tumefaciens*. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα γονίδια *hrp* είναι οργανωμένα σε γονιδιακές ομάδες (gene clusters), που το μέγεθός τους κυμαίνεται μεταξύ 23-40 kb DNA. Πολλά γονίδια *hrp* είναι συντηρημένα και στα τέσσερα βακτηριακά γένη και ενώ είχαν περιγραφεί με διαφορετικά ονόματα στα διάφορα βακτήρια, σήμερα έχει αναθεωρηθεί η ονοματολογία των γονιδίων *hrp*, έτσι ώστε τουλάχιστον 9 γονίδια *hrp* περιγράφονται με κοινά ονόματα (30). Παρά τις ομοιότητες τους, οι ομάδες των γονιδίων *hrp* (*hrp* clusters) έχουν υποδιαιρεθεί σε δύο ομάδες, βασιζόμενοι στις ομολογίες γονιδίων, την οργάνωση και τη ρύθμισή τους: Οι γονιδιακές ομάδες *hrp*



Εικόνα 5. Τα γονίδια *hrp* της *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 και οι πιθανές λειτουργίες τους. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της μεταγραφής για κάθε οπερόνιο και πάνω απ' αυτά σημειώνεται το όνομα της κάθε μεταγραφικής μονάδας. Τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην έκκριση είναι χρωματισμένα κίτρινα και κόκκινα. Τα κίτρινα δεν έχουν γνωστές βιοχημικές λειτουργίες, ενώ τα κόκκινα είναι συντηρημένα σε όλα τα εκκκριτικά συστήματα τύπου III. Τα γονίδια που κωδικοποιούν εκκρινόμενες πρωτεΐνες (π.χ. HrpZ και HrpA) είναι χρωματισμένα πράσινα, ενώ εκείνα που συμμετέχουν στη ρύθμιση είναι χρωματισμένα γκρι. Το *hrmA* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη τύπου Anv και στη θέση αυτή η *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* έχει το γονίδιο *anvPphE*.

από *Erwinia* και *Pseudomonas* αποτελούν την ομάδα I, ενώ οι γονιδιακές ομάδες *hrp* από *Ralstonia* και *Xanthomonas* συνιστούν την ομάδα II (6).

Στην *Pseudomonas syringae* τουλάχιστον 16 πρωτεΐνες Hrp συμμετέχουν άμεσα στο μηχανισμό έκκρισης. Μεταξύ των υπολοίπων γονιδίων *hrp*, τουλάχιστον 2 κωδικοποιούν εξωκυττάρειες πρωτεΐνες και 6 έχουν άγνωστη λειτουργία. 12 από τα 16 εκκριτικά γονίδια δείχνουν σημαντική ομοιότητα στην αλληλουχία με τα γονίδια *ycs* από *Yersinia*. Από αυτά τα 12, τα 9 εμφανίζουν ομοιότητα με τα γονίδια οργάνωσης του μαστιγίου των εντεροβακτηρίων. Τα γονίδια αυτά προσδιορίζουν ένα νέο βακτηριακό πρωτεϊνικό εκκριτικό σύστημα γνωστό ως εκκριτικό σύστημα τύπου III (type III secretion system). Επειδή τα γονίδια αυτά είναι συντηρημένα σε όλα τα βακτήρια που διαθέτουν εκκριτικό σύστημα τύπου III, έχουν ονομαστεί *hrc* (*hrp* gene conserved) (30). Η συντήρηση αυτών των 9 γονιδίων υποθέτει παρόμοιους κανόνες δόμησης και μηχανισμούς λειτουργίας στην έκκριση πρωτεϊνών μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III και οργάνωσης του μαστιγίου (flagellum assembly).

1.4.2. Άλλοι παράγοντες παθογένειας: Τοξίνες και ένζυμα αποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος

Η εμφάνιση συμπτωμάτων ασθένειας στα φυτά σχετίζεται με την παραγωγή τοξινών και διαφόρων ενζύμων αποδόμησης του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, από τα βακτήρια. Από εξελικτικής απόψεως φαίνεται ότι η συνεξέλιξη φυτών-παθογόνων βακτηρίων αποτέλεσε ένα ουσιαστικό παράγοντα φυσικής επιλογής υπέρ της δυνατότητας παραγωγής φυτοτοξινών στα βακτήρια. Μια παρατήρηση, που στοιχειοθετεί την ορθότητα της παραπάνω άποψης, είναι η χημική ποικιλομορφία των τοξινών, που παράγονται από βιολογικά στενά συγγενείς ομάδες οργανισμών, π.χ. η ποικιλομορφία των τοξινών στους διάφορους παθότυπους της *P. syringae*. Οι παθότυποι της *P. syringae* παράγουν διάφορες τοξίνες: coronatine, phaseolotoxin, syringomycin, syringopeptin, syringotoxin, tabtoxin και tagetitoxin (96). Κάθε τοξίνη παράγεται από ένα μόνο παθότυπο, π.χ. τα στελέχη της *P.s.phaseolicola* παράγουν τη φασεολοτοξίνη (188). Ο μηχανισμός δράσης της κάθε τοξίνης ποικίλλει. Για παράδειγμα, οι syringomycin και syringopeptin δρουν ως μέσα σχηματισμού καναλιών στην κυτταρική μεμβράνη (ion forming channels), ενώ η phaseolotoxin και η tabtoxin είναι αναστολείς ενζύμων (96, 117). Εκτός από τον

τρόπο δράσης τους, διαφέρουν και ως προς τη συμβολή τους στην παθογένεια. Έτσι, τοξίνες των οποίων η δράση είναι απαραίτητη για την πραγμάτωση της ασθένειας χαρακτηρίζονται ως παράγοντες παθογένειας (pathogenicity factors), ενώ αν η δράση τους απλά επαυξάνει την ένταση της ασθένειας χαρακτηρίζονται ως παρόγοντες παθογόνου ισχύος (virulence factors) (262). Κατά κανόνα οι τοξίνες της τελευταίας κατηγορίας είναι μη-ειδικές ως προς τον ξενιστή, ενώ εκείνες που είναι παράγοντες παθογένειας είναι κυρίως ειδικές για τον ξενιστή (173). Γενικά, οι βακτηριακές τοξίνες θεωρούνται ότι είναι παρόγοντες παθογόνου ισχύος. Βέβαια, θα πρέπει να επισημανθεί ότι η συμβολή της κάθε τοξίνης στην παθογένεια δεν είναι ξεκάθαρη, γιατί μη παθογόνα στελέχη της *P.syringae* παράγουν τοξίνες και πολλές επίσης τοξίνες εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση και έτσι είναι πιθανό να λειτουργούν με τρόπο, που ελαττώνουν τον ανταγωνισμό μεταξύ άλλων μελών της μικροχλωρίδας τους ξενιστή με αποτέλεσμα να εγκατασταθούν επιτυχώς στην επιφάνεια του ξενιστή (1, 96).

Μια άλλη κατηγορία “χημικών όπλων”, που διαθέτουν κυρίως τα νεκρότροφα βακτήρια (*Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi* και *P.viridiflava*), είναι η παραγωγή ενζύμων που αποδομούν δομικά συστατικά του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Τα ένζυμα αυτά, κυρίως πηκτινικές λυάσες, πολυγαλακτουρονάσες και πρωτεάσες, εκκρίνονται από τα βακτήρια μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου II (19, 43). Διάφορα ισοένζυμα πηκτινικών λυασών έχουν ταυτοποιηθεί, τα οποία διαφέρουν ως προς τη συμβολή τους στα συμπτώματα της ασθένειας (4). Παρόλο, που οι παθότυποι της *P.syringae* δεν είναι νεκρότροφα βακτήρια, μερικοί απ’ αυτούς παράγουν τέτοια ένζυμα, χωρίς όμως να έχει τεκμηριωθεί ο ρόλος τους στην παθογένεια (20, 22, 154, 164).

1.4.3. *Pseudomonas syringae*

Το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ανήκει στην ευρύτερη ταξινομική ομάδα των βακτηρίων *Pseudomonas syringae*. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει τόσο επιφυτικά, όσο και φυτοπαθογόνα βακτήρια, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως “παθότυποι” (pathovars) (265). Μέχρι σήμερα περισσότεροι από 50 διαφορετικοί παθότυποι είναι επίσημα αποδεκτοί και έχουν καταταχθεί στην ομάδα αυτή (223), λόγω των συγγενών φυσιολογικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών τους, που χρησιμοποιούνται σαν βάση του ισχύοντος ταξινομικού συστήματος. Οι παθότυποι αυτοί διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη παθολογική εξειδίκευση, την παθογονική ισχύ, την συμπτωματολογία της ασθένειας που προκαλούν, το είδος της φυτοτοξίνης που παράγουν και σε διάφορες άλλες ιδιότητες.

Η *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, όπως και τα περισσότερα μέλη της ομάδας, προκαλεί μία από τις εξής δύο αντιδράσεις σε φυτά: α) είτε ασθένεια με χαρακτηριστικά συμπτώματα κηλίδωσης, σε όσα φυτά αποτελούν ξενιστές της (π.χ. *Phaseolus vulgaris*, φασολιά) ή β) αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) σε όλα τα υπόλοιπα φυτά μη ξενιστές της, όπως π.χ. σε ανθεκτικές ποικιλίες φασολιάς, σε καπνό, ντομάτα κ.λ.π.

Στην περίπτωση της φασολιάς, τα συμπτώματα της ασθένειας (halo blight) εμφανίζονται στο φύλλωμα και στους λοβούς, υπό τη μορφή υδατωδών λιπαρών κηλίδων, διασυστηματικής χλώρωσης και νανισμού των φυτών. Η εκδήλωση των συμπτωμάτων κηλίδωσης, που θεωρούνται πρωτογενή συμπτώματα της ασθένειας, οφείλεται στον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων στους μεσοκυττάριους χώρους των φύλλων ή των λοβών, καθώς ο πληθυσμός των βακτηρίων αυξάνει κατά 10^5 - 10^7 φορές πάνω από το αρχικό επίπεδο του μολύσματος (172). Οι κηλίδες αυτές γίνονται τελικά νεκρωτικές. Η διασυστηματική χλώρωση θεωρείται δευτερογενές σύμπτωμα και εμφανίζεται με τη μορφή χλωρωτικών κηλίδων γύρω από τις υδατώδεις κηλίδες, ή με τη μορφή γενικευμένης χλώρωσης σε νεώτερα φύλλα του φυτού.

Η *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* επάγει την τοπική νεκρωτική αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά μη-ξενιστές (incompatible reaction), όπως καπνός και σε ανθεκτικές ποικιλίες φασολιάς. Η HR εκδηλώνεται μέσα σε 24 ώρες, στη διάρκεια της οποίας παρατηρείται περιορισμένος πολλαπλασιασμός των βακτηρίων και παρεμποδίζεται η εξάπλωση του παθογόνου στο φυτό.

Η εμφάνιση των πρωτογενών συμπτωμάτων της ασθένειας στη φασολιά, καθώς και η εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας στους μη ξενιστές ή σε ανθεκτικές

ποικιλίες φασολιάς εξαρτώνται γενετικά από το σύμπλοκο γονιδίων *hrp*, που εδράζεται στο χρωμόσωμα του βακτηρίου. Αντίθετα, τα δευτερογενή συμπτώματα της ασθένειας δεν ελέγχονται από το σύμπλοκο γονιδίων *hrp*, αλλά οφείλονται στη δράση μιας εξωτοξίνης, που παράγει το βακτήριο, της φασεολοτοξίνης. Η φασεολοτοξίνη έχει ταξινομηθεί ως παράγοντας παθογονικής ισχύος, γιατί η δράση της δεν είναι απαραίτητη για την πραγμάτωση της ασθένειας αλλά απλά επαυξάνει την έντασή της. Η δομή της φασεολοτοξίνης είναι γνωστή (N^{δ} -[N^{γ} -φωσφοσουλφαμύλ]-ορνιθυλαλανυλομοαργινίνη), καθώς και ο μηχανισμός δράσης της (παρεμπόδιση του βιοσυνθετικού ενζύμου τρανσκαρβαμυλάση της ορνιθίνης). Η βιοσύνθεση της τοξίνης εξαρτάται από μια άλλη ομάδα γονιδίων (*tox*), που έχουν επίσης εντοπισθεί στο βακτηριακό χρωμόσωμα και έχουν κλωνοποιηθεί στο σύνολο τους (188).

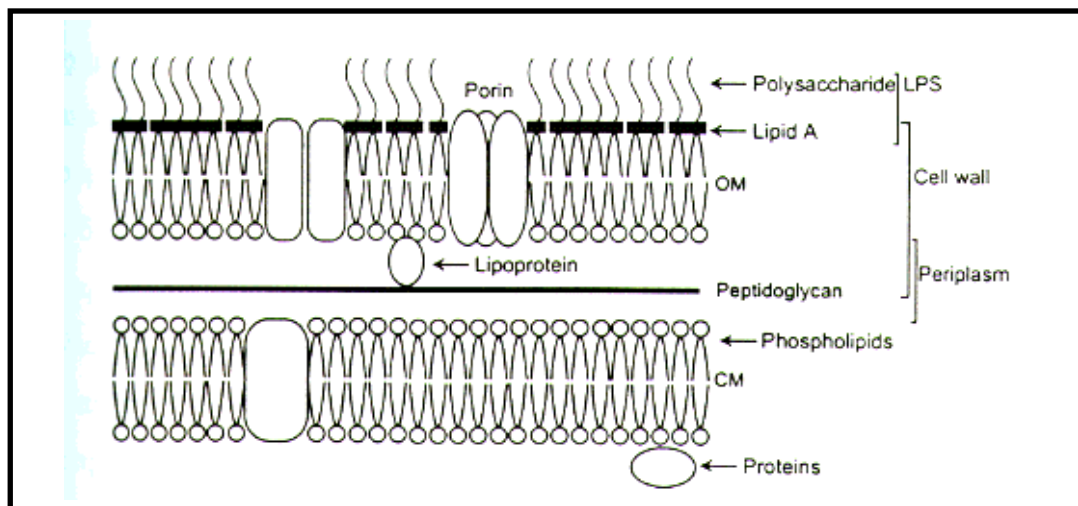
1.5. Εκκριση πρωτεϊνών στα Gram-αρνητικά βακτήρια

1.5.1. Δομή και λειτουργία του κυτταρικού φακέλλου των Gram-αρνητικών βακτηρίων

Ο κυτταρικός φάκελλος των Gram-αρνητικών βακτηρίων αποτελείται από δύο μεμβράνες, την κυτοπλασμική (CM), η οποία ονομάζεται επίσης και εσωτερική μεμβράνη (IM) και περιβάλλεται από ένα απλό επίπεδο έλασμα πεπτιδογλυκάνης, στο οποίο είναι στερεωμένο ένα σύμπλοκο στρώμα που ονομάζεται εξωτερική μεμβράνη (OM) (Εικ. 6). Η εξωτερική μεμβράνη είναι ένα φωσφολιπιδικό στρώμα, που ένα μεγάλο κλάσμα των φωσφολιπιδίων του εξωτερικού φύλλου αντικαθίσταται από μόρια λιποπολυσακχαριτών (LPS) (178). Οι λιποπολυσακχαρίτες αποτελούνται από ένα σύνθετο λιπιδίο, καλούμενο λιπίδιο A, στο οποίο συνδέεται πολυσακχαρίτης αποτελούμενος από πυρήνα και τελικές σειρές επαναλαμβανόμενων μονάδων, που κατευθύνονται προς το εξωκυττάριο μέσο. Ανάμεσα στην εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη είναι ο περιπλασμικός χώρος και το στρώμα πεπτιδογλυκανίου. Το τελευταίο παρέχει στο κύτταρο σχήμα και σταθερότητα και μαζί με την εξωτερική μεμβράνη σχηματίζει το κυτταρικό τοίχωμα. Η διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης ποικίλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων ειδών των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Η εξωτερική μεμβράνη εμποδίζει τη διάχυση μεγάλων μορίων εντός και εκτός του περιπλάσματος, επιτρέπει όμως τη διέλευση μικρών υδροφιλικών μορίων ($MB < 5000$) μέσω πρωτεϊνικών καναλιών, που σχηματίζονται από τις πορίνες, όπως OmpF και OmpC της *E.coli*. Οι πορίνες είναι συνήθως τριμερείς πρωτεΐνες που διεισδύουν και στις δύο όψεις της εξωτερικής μεμβράνης σχηματίζοντας μη ειδικούς πόρους που επιτρέπουν την ελεύθερη διακίνηση μικρών μορίων. Επιπλέον άλλες πορίνες σχηματίζουν εξειδικευμένα κανάλια για την πρόσληψη (uptake) θρεπτικών ουσιών όπως η σακχαρόζη, μαλτόζη, βιταμίνη B₁₂ και σίδηρος.

Παρόλο που η εξωτερική μεμβράνη είναι αρκετά διαφορετική από τις άλλες μεμβράνες, η εσωτερική μεμβράνη είναι παρόμοια με τις μεμβράνες των ευκαρυωτικών κυττάρων. Η εσωτερική μεμβράνη είναι πρωταρχικά υπεύθυνη για τη ρύθμιση της ροής των θρεπτικών και των προϊόντων του μεταβολισμού μέσα και έξω από το κύτταρο και συμμετέχει σε όλες σχεδόν τις διαδικασίες της ανάπτυξης και του μεταβολισμού των βακτηρίων. Έτσι, περιέχει ένα μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνών απ' ό,τι οι ευκαρυωτικές κυτταρικές μεμβράνες. Η εσωτερική μεμβράνη περιέχει περίπου

τον ίδιο αριθμό πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων τα οποία αποτελούν το 6-9% και 65-75%, αντίστοιχα των συνολικών πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων του κυττάρου (126). Οι ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες (integral membrane proteins) είναι ισχυρά συνδεδεμένες με τη μεμβράνη με μία ή περισσότερες διαμεμβρανικές περιοχές, ενώ οι περιφερειακές μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι χαλαρά συνδεδεμένες και άλλες δεσμεύονται μόνο παροδικά. Οι λειτουργίες, που πραγματοποιούνται στην κυτταρική μεμβράνη, π.χ. ρυθμιζόμενη μεταφορά θρεπτικών και προϊόντων μεταβολισμού, μεταφορά μακρομορίων του βακτηριακού φακέλλου, απαιτούν ενέργεια. Σε μια από τις διαδικασίες παραγωγής ενέργειας η ηλεκτροχημική διαβάθμιση (proton motive force), που δημιουργείται κατά μήκος της κυτοπλασματικής μεμβράνης, λειτουργεί ως η κινητήρια δύναμη, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετά από πολλές διαδικασίες μεταφοράς (104).



Εικόνα 6. Απλουστευμένη σχηματική αναπαράσταση του βακτηριακού φακέλλου των Gram-αρνητικών βακτηρίων (178).

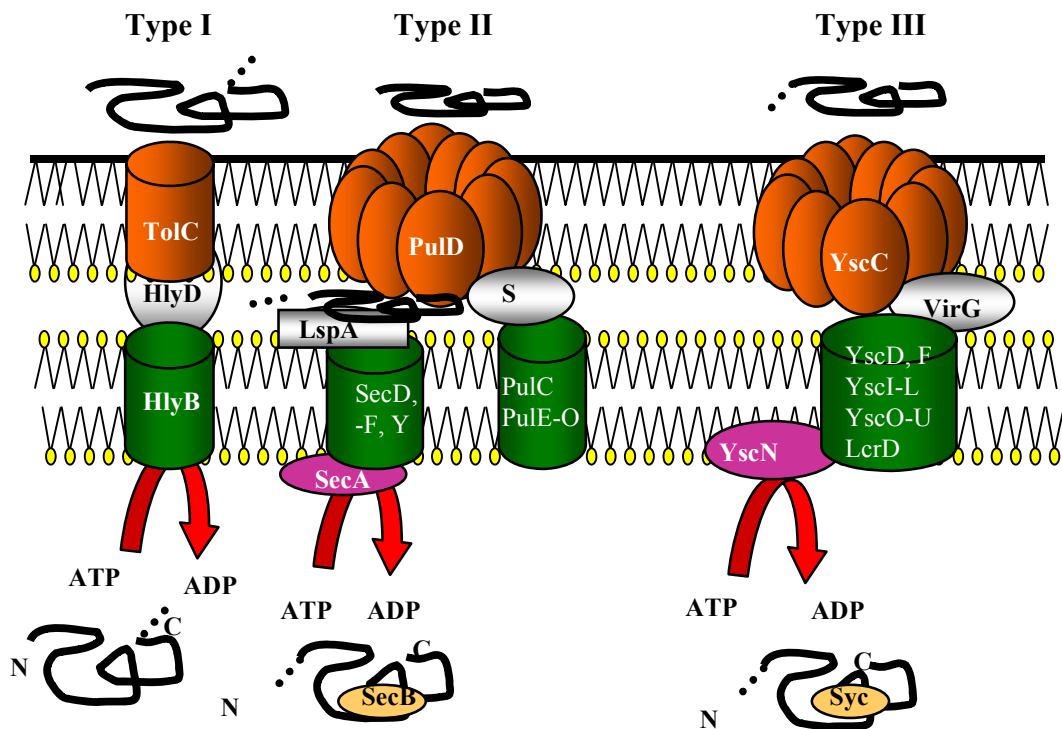
1.5.2. Τα μονοπάτια έκκρισης

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των παθογόνων μικροοργανισμών είναι η έκκριση ενζύμων κι άλλων παραγόντων παθογένειας, πρωτεϊνικής φύσης. Την τελευταία δεκαετία έχουν γίνει σημαντικές πρόοδοι στην έρευνα για τον καθορισμό του μηχανισμού έκκρισης και των πρωτεϊνών, που συμμετέχουν σ' αυτόν στα βακτηριακά κύτταρα. Συγκεκριμένα, μια εκπληκτικά ενδιαφέρουσα ανακάλυψη των μελετών που σχετίζονται με τους βασικούς μηχανισμούς εξωκυττάριας έκκρισης πρωτεϊνών ήταν ότι τα βακτήρια κατέχουν πολλαπλά μονοπάτια γι' αυτό το σκοπό (Εικ. 7). Στα Gram-αρνητικά παθογόνα βακτήρια έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερα εξειδικευμένα μονοπάτια έκκρισης πρωτεϊνών, πέραν του γενικού εκκριτικού μονοπατιού (GSP, general secretory pathway) (218, 219). Τα μονοπάτια αυτά είναι υπεύθυνα για την ελευθέρωση διαλυτών εξωκυττάρια υδρολυτικών ενζύμων στο περιβάλλον μέσο ή για τη μεταφορά και ειδική στόχευση των πρωτεϊνών στο κύτταρο-ξενιστή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα μονοπάτια πρωτεϊνικής έκκρισης είναι παρόμοια με εκείνα, που συμμετέχουν στην οργάνωση των βακτηριακών κυτταρικών εξαρτημάτων (μαστιγίων-flagella, αγωγών-pili). Συνδυασμένες γενετικές και βιοχημικές προσεγγίσεις έχουν πρόσφατα δείξει ότι τα μονοπάτια έκκρισης πρωτεϊνών και επιφανειακού εντοπισμού διαφόρων οργανιδίων είναι μηχανιστικά παρόμοια, κάτι που δεν είναι εμφανές συγκρίνοντας απλά τις αμινοξικές αλληλουχίες των δομικών και λειτουργικών τους πρωτεϊνών. Η επιλογή του μονοπατιού, το οποίο μια πρωτεΐνη θα χρησιμοποιήσει, δεν υπαγορεύεται μόνο από την ειδική ανάγκη της να διασχίσει τον μεμβρανικό φάκελλο στη λειτουργική της μορφή, αλλά επίσης από την ανάγκη να ελευθερωθεί στη σωστή θέση δράσης μετά την έξοδο της από το βακτηριακό κύτταρο (156).

Η ανάλυση συγγένειας των αλληλουχιών μεταξύ των διαφόρων μηχανών εξωκυττάριας έκκρισης και η λειτουργική αλληλοσυμπλήρωση μεμονωμένων εκκριτικών συστατικών επέτρεψε την ταξινόμηση των εκκριτικών συστημάτων σε μηχανιστικά συγγενείς κατηγορίες. Θεωρείται ότι ο βασικός μηχανισμός έκκρισης μέσα σε ένα ορισμένο σύστημα είναι πολύ πιθανό να είναι παρόμοιος ή πανομοιότυπος. Με βάση τα παραπάνω κριτήρια έχουν ταυτοποιηθεί τρία συντηρημένα μονοπάτια, που ονομάζονται εκκριτικά συστήματα τύπου I, II και III (218). Πιο πρόσφατα, ένα άλλο μονοπάτι μεταφοράς περιγράφηκε με βάση τη σύγκριση αλληλουχιών των συστατικών των εκκριτικών μονοπατιών και αυτό

αναφέρεται ως μονοπάτι τύπου IV (257). Επιπλέον, οι συστατικές πρωτεΐνες αυτών των εκκριτικών μηχανών, με εξαίρεση του τύπου I, έχουν ομοιότητα με εκείνες που κατευθύνουν το σχηματισμό επιφανειακών εξαρτημάτων, που ονομάζονται μαστίγια (flagella) και αγωγοί (pili). Η ενδιαφέρουσα αυτή σύνδεση υποδηλώνει ότι υπάρχουν περιορισμένοι δρόμοι για τη διάσχιση των δύο διαφορετικών μεμβρανών στα Gram-αρνητικά βακτήρια, οι οποίοι μπορούν να είναι προϊόν συγκλίνουσας ή αποκλίνουσας εξέλιξης.

Πέραν από τα παραπάνω εκκριτικά μονοπάτια, που απαιτούν βοηθητικούς παράγοντες, για τη διακίνηση των εκκριτικών υποστρωμάτων τους, ένας εκκριτικός μηχανισμός “αυτομεταφοράς”, περιγράφηκε αρχικά στο παθογόνο *Neisseria gonorrhoeae* (131). Το μονοπάτι αυτό, που λειτουργεί με αυτο-προωθούμενη ελευθέρωση πρωτεϊνών, όπως η πρωτεάση IgA, είναι πολύ πιθανό να λειτουργεί σε μια ποικιλία διαφορετικών Gram-αρνητικών παθογόνων και ίσως καθορίζει ένα άλλο συντηρημένο πρωτεϊνικό εκκριτικό μηχανισμό.



Εικόνα 7. Τα μονοπάτια έκκρισης των Gram-αρνητικών βακτηρίων (115).

1.5.2.1 Το μονοπάτι έκκρισης τύπου I

Το εκκριτικό μονοπάτι τύπου I είναι ανεξάρτητο από το γενικό εκκριτικό μονοπάτι (general secretory pathway, GSP), το οποίο σχηματίζεται από τα προϊόντα των γονιδίων *sec*. Το μονοπάτι τύπου I, εκκρίνει πρωτεΐνες που δεν έχουν τα κλασικά πεπτίδια έκκρισης και απαιτεί τρία ή τέσσερα βοηθητικά πολυπεπτίδια, τα οποία σχηματίζουν ένα διαμεμβρανικό κανάλι μέσω του οποίου μεταφέρεται το εκκρινόμενο μόριο. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα βοηθητικά πολυπεπτίδια είναι συνήθως ομαδοποιημένα μαζί με τα γονίδια που κωδικοποιούν τα εκκρινόμενα μόρια (67). Σε όλες τις περιπτώσεις που έχουν μελετηθεί το μονοπάτι τύπου I περιέχει ένα ομόλογο πολυπεπτίδιο μεταφορέα τύπου ABC (ABC transporter, ATP binding cassette), που πιστεύεται ότι παρέχει την ενέργεια που απαιτείται στη διάρκεια της μεταφοράς (27, 62). Το υπόλοιπο της εκκριτικής μηχανής περιλαμβάνει μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης που σχετίζεται με την πρωτεΐνη TolC της *E.coli* (246). Τέλος, στο σύστημα συμμετέχει και μια διμερής πρωτεΐνη που εκτείνεται μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης και ανήκει σε μια οικογένεια μορίων, που αναφέρονται ως πρωτεΐνες σύντηξης μεμβρανών (membrane fusion proteins) (52). Η πληροφορία για την έκκριση εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό τμήμα των πρωτεϊνών-υποστρωμάτων, οι οποίες εκκρίνονται στο εξωκυττάριο μέσο κατευθείαν από το κυτταρόπλασμα, παρακάμπτοντας πλήρως το περίπλασμα. Παραδείγματα πρωτεϊνών, από Gram-αρνητικά βακτήρια, που εκκρίνονται απ' αυτό το μονοπάτι, είναι η αιμολυσίνη (haemolysin) παθογόνων στελεχών της *E.coli* (246), και ορισμένες πρωτεάσες από την *Pseudomonas aeruginosa* και από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Erwinia chrysanthemi* (218).

1.5.2.2. Το μονοπάτι έκκρισης τύπου II

Το εκκριτικό μονοπάτι τύπου II αποτελεί επέκταση του γενικού μονοπατιού έκκρισης (GSP) και μερικές φορές αναφέρεται ως ο κύριος τελικός κλάδος του (main terminal branch of GSP) (197, 199). Το μονοπάτι αυτό εκκρίνει πολλούς διαφορετικούς τύπους πρωτεϊνών, όπως ένζυμα και τοξίνες. Η έκκριση πραγματοποιείται σε δύο διάκριτα στάδια. Στο πρώτο στάδιο οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στο περίπλασμα διασχίζοντας την εσωτερική μεμβράνη μέσω του μονοπατιού Sec. Η πληροφορία για την έκκριση εντοπίζεται σε ένα κλασσικό

αμινοτελικό πεπτίδιο έκκρισης, το οποίο αναγνωρίζεται και αποκόπτεται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο του μονοπατιού Sec. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το περίπλασμα στο εξωκυττάριο μέσο, από ένα εξειδικευμένο εκκριτικό σύστημα (197, 219). Ένα καλά μελετημένο εκκριτικό σύστημα τύπου II είναι το σύστημα έκκρισης του ενζύμου πουλουλανάσης (pullulanase) στην *Klebsiella oxytoca*. Στο σύστημα αυτό συμμετέχουν 14 διαφορετικά συστατικά (198), η πλειονότητα των οποίων είναι πρωτεΐνες της εσωτερικής βακτηριακής μεμβράνης. Μία από τις πρωτεΐνες αυτές περιέχει ένα συντηρημένο μοτίβο ABC, για δέσμευση ATP. Επίσης, μια πρωτεΐνη ενσωματωμένη στην εξωτερική μεμβράνη πιστεύεται ότι χρησιμεύει ως ένα κανάλι μεταξύ του περιπλάσματος και του εξωκυττάριου μέσου. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις πρωτεΐνες είναι συνήθως οργανωμένα σε μεταγραφικές ομάδες και μεταλλαγές σε οποιοδήποτε απ' αυτά είτε καταργούν την έκκριση ή οδηγούν σε συσσώρευση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών στο περίπλασμα.

1.5.2.3. Το μονοπάτι έκκρισης τύπου III

Το εκκριτικό μονοπάτι τύπου III είναι υπεύθυνο για την έκκριση πρωτεϊνών παθογένειας, τόσο από βακτηριακά παθογόνα ζώων (*Yersinia*-Yops, *Salmonella*-Sips, *Shigella*-Iras) όσο και φυτών (Harpins και πρωτεΐνες Avr) (6, 238, 239). Παρόλο που τα παθογόνα αυτά παράγουν διαφορετικούς πρωτεϊνικούς παράγοντες παθογένειας και προκαλούν συμπτωματολογικά διαφορετικές ασθένειες σε διαφορετικούς ξενιστές, χρησιμοποιούν ένα εξαιρετικά συντηρημένο μηχανισμό έκκρισης, ο οποίος θεωρείται αναγκαίος καθοριστής της παθογόνου ικανότητας. Η ιδιομορφία του μονοπατιού τύπου III σε σχέση με τα υπόλοιπα μονοπάτια έγκειται κυρίως στην ικανότητα του να μεταφέρει πρωτεΐνες κατευθείαν από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα μέσα στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα (45, 144).

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III οργανώνεται από τουλάχιστον 20 πολυπεπίδια, η πλειονότητα των οποίων εντοπίζονται κυρίως στην εσωτερική μεμβράνη, ενώ τουλάχιστον ένα εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη. Είναι ενδιαφέρον ότι ένα από τα συστατικά πολυπεπίδια της εξωτερικής μεμβράνης παρουσιάζει πρωτοταγή ομοιότητα, που υποδηλώνει παρόμοια λειτουργία, με μια πρωτεΐνη του μονοπατιού τύπου II (PulD), η οποία σχηματίζει μέρος του καναλιού της εξωτερικής μεμβράνης. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις πρωτεΐνες είναι

συνήθως οργανωμένα σε μεταγραφικές ομάδες, ενώ οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται ή μεταφέρονται μέσα στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα μπορεί να βρίσκονται είτε μέσα σ' αυτές τις ομάδες ή έξω απ' αυτές και δεν περιέχουν χαρακτηριστικά πεπτίδια έκκρισης τα οποία θα τις οδηγούσαν στο εκκριτικό σύστημα Sec. Φαίνεται ότι η όλη διαδικασία έκκρισης πραγματοποιείται σε ένα στάδιο, χωρίς περιπλασμικό ενδιάμεσο στάδιο. Μια άλλη ιδιαιτερότητα του μονοπατιού αυτού είναι ότι επάγεται μετά από επαφή των βακτηρίων με τα κύτταρα-ξενιστές και η μεταφορά των πρωτεϊνών μέσα στα ευκαρυωτικά κύτταρα πραγματοποιείται μέσω των θέσεων επαφής των βακτηρίων με τα κύτταρα ξενιστές. Για το λόγο αυτό το εκκριτικό σύστημα τύπου III έχει ονομαστεί “contact dependent secretion pathway” και η μεταφορά χαρακτηρίζεται ως πολική γιατί συμβαίνει μόνο στις θέσεις επαφής (45, 189, 213, 248). Σε εργαστηριακές συνθήκες, η έκκριση μέσω του μονοπατιού αυτού μπορεί να πραγματοποιηθεί με ανάπτυξη των βακτηρίων σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα και συνθήκες, που μιμούνται τις ρυθμιστικές συνθήκες, που συναντούν τα βακτήρια μετά την επαφή με την επιφάνεια του κυττάρου-στόχου.

Το πιο καλά μελετημένο και χαρακτηρισμένο σύστημα τύπου III, εκτός από τη βιογένεση του μαστιγίου, είναι το εκκριτικό σύστημα τύπου III της *Yersinia* spp., το οποίο εκκρίνει τους παράγοντες παθογένειας Yops (*Yersinia* outer proteins) (45). Σε *in vitro* συνθήκες, που επάγουν την παραγωγή των πρωτεϊνών Yops, τουλάχιστον 12 Yops εκκρίνονται στο εξωκυττάριο μέσο, ενώ μετά από επαφή με τα κύτταρα-ξενιστές, μόνο τέσσερις απ' αυτές (YopE, YopH, YopM, YopO) ελευθερώνονται μέσα στο κύτταρο ξενιστή μέσω των ζωνών επαφής που σχηματίζονται. Κάθε εκκρινόμενη πρωτεΐνη έχει μια ειδική κυτοπλασμική συνοδό πρωτεΐνη (Syc, *S*pecific *y*op *c*haperone), η οποία αναγνωρίζει συνήθως μια αμινοτελική περιοχή της εκκρινόμενης πρωτεΐνης, η οποία είναι σημαντική για την πραγματοποίηση της έκκρισης. Αν και οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες δεν έχουν χαρακτηριστικά πεπτίδια έκκρισης, η πληροφορία για έκκριση στο εξωκυττάριο μέσο καθώς και η πληροφορία για την ελευθέρωση/εσωτερίκευση τους μέσα στα ευκαρυωτικά κύτταρα εντοπίζεται στο αμινοτελικό τμήμα των πρωτεϊνών αυτών. Ομως, κανένα συντηρημένο μοτίβο δεν έχει βρεθεί (45). Μια πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε ότι η πληροφορία για έκκριση των YopE και YopN περιέχεται στο mRNA. Έχει προταθεί ότι επειδή η έκκριση είναι συζευγμένη με τη μετάφραση, το mRNA αποκτά μια διαμόρφωση κατάλληλη για μετάφραση μόνο μετά από επαφή με την εκκριτική συσκευή (8). Τέλος οι πρωτεΐνες

που οργανώνουν την εκκριτική μηχανή ονομάζονται Ysc και είναι αυτές που εμφανίζουν ομολογία με τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οργάνωση των άλλων εκκριτικών συστημάτων τύπου III (144).

1.5.2.3.1 Το μονοπάτι Hrp

Τα Gram-αρνητικά φυτοπαθογόνα βακτήρια, που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Ralstonia* και *Xanthomonas*, περιέχουν μία ομάδα γονιδίων, τα γονίδια *hrp*, τα οποία είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση των φυτοπαθογόνων βακτηρίων, τόσο με ευαίσθητες όσο και με ανθεκτικές ποικιλίες φυτών, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (1.4.1). Οι πρώτες ενδείξεις για το βιοχημικό ρόλο των πρωτεϊνών Hrp προήρθαν από την παρατήρηση ότι αρκετές απ' αυτές εμφανίζουν ομολογία με πρωτεΐνες των ζωικών βακτηριακών παθογόνων (*Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*), που μεσολαβούν στην έκκριση πρωτεϊνών παθογένειας, όπως Yops και Iras, μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III (29, 64, 78, 113, 239). Επίσης οι πρωτεΐνες αυτές εμφάνισαν ομολογία και με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οργάνωση του μαστιγίου στα ευβακτήρια (149, 225). Έτσι, η ομοιότητα 9 πρωτεϊνών Hrp, που σήμερα ονομάζονται Hrc, αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη ότι οι πρωτεΐνες αυτές ίσως λειτουργούν στην έκκριση κάποιων πρωτεϊνών. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε με τη δημιουργία μεταλλαγών στα γονίδια τους, οι οποίες εμπόδιζαν την έκκριση μερικών πρωτεϊνών, που δρουν ως διεγέρτες (elicitors) της αντίδρασης υπερευαισθησίας: harpins της *Pseudomonas syringae* (106) και *Erwinia* spp. (21, 253) και της πρωτεΐνης PopA της *Ralstonia* (9). Οι πρωτεΐνες αυτές είχαν ανιχνευθεί στο εξωκυττάριο μέσο ανάπτυξης των βακτηρίων και σε καθαρισμένη μορφή είχαν την ικανότητα να πυροδοτούν την αντίδραση υπερευαισθησίας, μετά από έγχυση στον αποπλάστη φύλλων καπνού ή άλλων φυτών που δεν είναι ξενιστές των βακτηρίων τα οποία τις παράγουν. Μετέπειτα μελέτες μεταλλαξιγένεσης προσδιόρισαν ποιές πρωτεΐνες Hrc βοηθούν στη μεταφορά των πρωτεϊνών κατά μήκος της εσωτερικής και της εξωτερικής βακτηριακής μεμβράνης.

Η μεταφορά βακτηριακών πρωτεϊνών παθογένειας, όπως Yops, κατευθείαν μέσα στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III, φαίνεται να χαρακτηρίζει και το εκκριτικό μονοπάτι Hrp. Το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες Anr δεν έχουν ανιχνευθεί εξωκυτάρια (στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των

βακτηρίων), απαιτούν ένα λειτουργικό εκκριτικό σύστημα Hrp για να εκδηλώσουν τη δράση τους και επιπλέον έκφραση τους μέσα στα φυτικά κύτταρα προκαλεί νέκρωση των φυτών, λόγω επαγωγής της αντίδρασης υπερευαισθησίας, οδηγεί στην υπόθεση ότι πιθανόν οι πρωτεΐνες Avr να μεταφέρονται μέσα στα φυτικά κύτταρα μέσω του εκκριτικού συστήματος Hrp (31, 88, 237).

Οι ομοιότητες του εκκριτικού μονοπατιού Hrp με τα υπόλοιπα εκκριτικά μονοπάτια τύπου III επεκτείνεται και στον τρόπο με τον οποίο ρυθμίζεται η έκφραση των γονιδίων *hrp*. Τα γονίδια *hrp* εκφράζονται μετά από επαφή του βακτηρίου με τους φυτικούς ιστούς, καθώς και σε θρεπτικά μέσα που μιμούνται τις συνθήκες του αποπλάστη των φύλλων, χαμηλό pH και χαμηλή συγκέντρωση οσμολυτών (203), όπως συμβαίνει και στη *Yersinia*.

Τέλος, το γεγονός ότι τα γονίδια *hrp*, όπως και τα γονίδια που κωδικοποιούν συστατικά άλλων εκκριτικών συστημάτων τύπου III, είναι ομαδοποιημένα και σε ορισμένες περιπτώσεις εντοπίζονται σε πλασμίδια έχει οδηγήσει στην άποψη ότι ίσως έχουν αποκτηθεί με οριζόντια μεταφορά από άλλα βακτήρια (95, 98, 141). Πράγματι στα φυτοπαθογόνα βακτήρια *Ralstonia solanacearum* και στην *Erwinia herbicola* τα γονίδια *hrp* βρίσκονται σε πλασμίδια, όπως και τα γονίδια *ysc* της *Yersinia* (4, 179).

Συμπερασματικά, είναι σήμερα αποδεκτό ότι τα εκκριτικά συστήματα τύπου III απαιτούνται για την οργάνωση των μαστιγίων στα ευβακτήρια, για την έκκριση πρωτεϊνών παθογένειας από τα ζωικά παθογόνα βακτήρια και από τα φυτοπαθογόνα βακτήρια που φέρουν ομάδες γονιδίων *hrp*.

1.5.2.3.1.1 Οργάνωση και λειτουργία των γονιδίων *hrp* στην *P.syringae*

Η αλληλούχιση της γονιδιακής ομάδας *hrp* (*hrp* gene cluster) της *P.syringae* pv. *syringae* 61 (Pss61) έχει ολοκληρωθεί (113, 194). Όταν ένα πλασμίδιο (pHIR11) που περιέχει τη γονιδιακή ομάδα *hrp* μεταφέρεται σε ένα μη-παθογόνο βακτήριο, όπως ορισμένα στελέχη της *E.coli* ή *P.fluorescens*, τότε αυτά τα βακτήρια μπορούν να επάγουν HR σε φύλλα καπνού (114). Η ομάδα αυτή καταλαμβάνει μια περιοχή 25 kb στο χρωμόσωμα της *P.syringae* και περιέχει 27 γονίδια *hrp* και ένα γονίδιο τύπου *avr*, το *hrmA*, τα οποία είναι οργανωμένα σε 7 οπερόνια (5, 113). Στην *P.syringae* pv. *phaseolicola* η γονιδιακή ομάδα *hrp* εμφανίζει μεγάλη ομολογία τόσο σε επίπεδο αλληλουχίας όσο και σε επίπεδο οργάνωσης και ρύθμισης, με την εξαίρεση ότι στη θέση του *hrmA* υπάρχει ένα άλλο γονίδιο *avr*, το *avrPphE*. Επειδή η αλληλουχία των γονιδίων *hrp* από την *P.syringae* pv. *phaseolicola* δεν έχει ολοκληρωθεί, η περιγραφή τους θα γίνει με βάση την ομάδα *hrp* της *P.syringae* pv. *syringae* 61.

Η ρύθμιση των γονιδίων *hrp* ελέγχεται από τα προϊόντα των γονιδίων *hrpRS*, τα οποία κωδικοποιούν ένα δυαδικό ρυθμιστικό σύστημα μεταγραφικών παραγόντων. Ένα άλλο γονίδιο, το *hrpL* κωδικοποιεί ένα εναλλακτικό μεταγραφικό παράγοντα σ (alternative sigma factor), που ανήκει στην οικογένεια των παραγόντων σίγμα ECF (extra cytoplasmic function), που ρυθμίζουν την έκκριση γονιδίων με εξωκυτταρική δράση (153, 251, 259, 260). Ένας άλλος μεταγραφικός παράγοντας, ο σ^{54} κωδικοποιείται από το γονίδιο *rpoN* και θεωρείται ότι απαιτείται για τη μεταγραφή του *hrpL* (259). Το γονίδιο *hrpM*, το οποίο είναι συντηρημένο σε πολλούς παθότυπους της *P.syringae*, αλλά δεν είναι μέρος της ομάδας *hrp*, δεν φαίνεται να είναι μέρος και αυτού του ρυθμιστικού συστήματος (152). Η πρωτεΐνη HrpL αναγνωρίζει ένα συντηρημένο μοτίβο 26 bp GGAACC-N16-CCAC, το οποίο ονομάζεται “harp box”. Το harp box έχει βρεθεί στην αρχή όλων των οπερονίων *hrp* που ρυθμίζονται από τους HrpRS/L, όπως επίσης σε όλα τα γνωστά γονίδια *avr* της *P.syringae* [Innes, 1993 #45; Salmeron, 1993 #46; Shen, 1993 #47; Xiao, 1994 #24]. Όταν ο HrpL εκφράζεται συνεχώς (constitutively) μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση των γονιδίων *hrp* ανεξάρτητα από τους HrpS και HrpR (191, 259). Στην *P.syringae* pv. *syringae* 61 οι πρωτεΐνες HrpS και HrpR πιθανόν να λειτουργούν ως διμερή (259), ενώ στην *P.syringae* pv. *phaseolicola* ο HrpR προτείνεται ότι ενεργοποιεί την

μεταγραφή του *hrpS* (93). Ένα παρόμοιο ρυθμιστικό σύστημα υπάρχει και στην *E.amylovora* ενώ το ρυθμιστικό σύστημα *hrp* των *X.campestris* και *R.solanacearum* είναι διαφορετικό. Μια σημαντική διαφορά στη ρύθμιση είναι ότι τα οπερόνια της ομάδας I (*P.syringae* and *E.amylovora*) ενεργοποιούνται από τον HrpL, ενώ τα περισσότερα οπερόνια της ομάδας II (*X.campestris* και *R.solanacearum*) ενεργοποιούνται από ένα μέλος της οικογένειας AraC, που είναι η πρωτεΐνη HrpB στη *Ralstonia* (83) και HrpX στη *Xanthomonas* (254, 255).

Παρόλ' αυτά, τα γονίδια *hrp* και στις δύο ομάδες καταστέλλονται σε σύνθετα θρεπτικά μέσα και εκφράζονται μόνο μετά από επαφή με φυτικό ιστό ή σε θρεπτικά μέσα που μιμούνται τις συνθήκες των μεσοκυττάρων χώρων των φυτών (π.χ. ελάχιστο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας με χαμηλή οσμωτική ισχύ, pH περίπου 5.5 και εφοδιασμένο με απλά σάκχαρα όπως φρουκτόζη ή σακχαρόζη ή με σακχαρικές αλκοόλες, όπως μαννιτόλη και χωρίς σύνθετες αζωτούχες ενώσεις) (203, 252). Ο τρόπος αυτός ρύθμισης των γονιδίων *hrp* υποδεικνύει ότι τα γονίδια *hrp* ίσως συμμετέχουν στην ελευθέρωση θρεπτικών συστατικών από τα φυτικά κύτταρα. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από την ομοιότητα των HrpS και HrpR με ρυθμιστικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την αφομοίωση πηγών αζώτου και άνθρακα σε διάφορα βακτήρια (201).

Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα το κύριο ερώτημα ήταν: πώς τα βακτήρια αντιλαμβάνονται το περιβάλλον του φυτικού αποπλάστη. Μια ενδιαφέρουσα ανακάλυψη προήρθε από την ταυτοποίηση του γονιδίου *prhA* στη *Ralstonia solanacearum* (162). Μεταλλαγές σ' αυτό το γονίδιο καταστέλλουν την ενεργοποίηση των γονιδίων *hrp* μόνον όταν τα βακτήρια συνκαλλιεργούνται με φυτικά κύτταρα, ενώ η έκφραση αυτών των γονιδίων σε επαγικό θρεπτικό μέσο δεν επηρεάζεται. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η πρωτεΐνη PrhA είναι ένας υποδοχέας εξειδικευμένος για σήματα επαγωγής, που προέρχονται από το φυτό. Αυτό είναι το πρώτο παράδειγμα ενός ειδικού φυτο-εξαρτώμενου μονοπατιού, που ελέγχει την επαγωγή των γονιδίων *hrp*.

Τα υπόλοιπα γονίδια της ομάδας *hrp* κωδικοποιούν πρωτεΐνες, που εκκρίνονται στο εξωκυττάριο μέσο των βακτηρίων (*hrpA* και *hrpZ*) και πρωτεΐνες που οργανώνουν το εκκριτικό μονοπάτι Hrp, το οποίο όπως αναφέρθηκε ανήκει στην κατηγορία των εκκριτικών μονοπατιών τύπου III. Εννέα πρωτεΐνες της τελευταίας κατηγορίας είναι συντηρημένες σε όλα τα φυτοπαθογόνα βακτήρια και στα ζωικά

παθογόνα, που διαθέτουν το εκκριτικό σύστημα τύπου III (6, 105). Έτσι τα γονίδια ονομάζονται σήμερα *hrc* (hypersensitive reaction and conserved) και το τελευταίο γράμμα προέρχεται από το ομόλογο γονίδιο *ysc* στη *Yersinia* (30). Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι πρωτεΐνες Hhr και Hhc και η πιθανή θέση τους στο κύτταρο καθώς και ο πιθανός βιοχημικός τους ρόλος με βάση τις ομολογίες, που εμφανίζουν με τα γονίδια των ζωικών παθογόνων. Με την εξαίρεση της πρωτεΐνης HhcC, ομόλογα όλων των συντηρημένων γονιδίων βρίσκονται και στο σύστημα οργάνωσης του μαστιγίου στα ευβακτήρια (6, 105). Η HhcC ανήκει στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης, που συναντώνται στο μονοπάτι τύπου II και σε άλλα μονοπάτια που συμμετέχουν στη μεταφορά μακρομορίων (112). Η θέση των πρωτεϊνών Hhc στο κύτταρο καθώς και πιθανή λειτουργία τους έχει καθοριστεί στην *P.syringae* pv. *syringae* με ανάλυση μη πολικών μεταλλαγών στα αντίστοιχα γονίδια. Έτσι η HhcJ προβλέπεται ότι είναι μια λιποπρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης (113). Η HhcN περιέχει μια περιοχή δέσμησης ATP και πιθανόν να παρέχει ενέργεια στη διαδικασία της έκκρισης (113, 149), ενώ οι υπόλοιπες συντηρημένες πρωτεΐνες θεωρείται ότι εντοπίζονται πιθανόν στην εσωτερική μεμβράνη (6, 38, 112).

Πίνακας 4. Οι πρωτεΐνες Hrp της *Pseudomonas syringae* και οι γνωστές ή προτεινόμενες λειτουργίες τους (6, 105, 113).

Πρωτεΐνες Hrp	Ομόλογα στη Yersinia	Ομόλογες πρωτεΐνες του μαστιγίου	Λειτουργίες ή χαρακτηριστικά
HrpK	-	-	Αγνωστη
HrpL	-	-	Μεταγραφικός παράγοντας (Alternative sigma factor)
HrpJ	YopN	-	Εκκριση
HrcV	LcrD	FlhA	Εκκριση, πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης
HrpQ	YscD	FliG	Εκκριση
HrcN	YscN	FliI	Εκκριση, ATPase
HrpO	YscO	FliJ	Εκκριση
HrpP	YscP	-	Εκκριση
HrcQa	-	-	Εκκριση
HrcQb	YscQ	FliM, FliN	Εκκριση
HrcR	YscR	FliP	Εκκριση, πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης
HrcS	YscS	FliQ	Εκκριση, πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης
HrcT	YscT	FliR	Εκκριση, πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης
HrcU	YscU	FlhB	Εκκριση, πρωτεΐνη της εσωτερικής μεμβράνης
HrpV	-	-	Εκκριση
HrpT	-	-	Εκκριση
HrcC	YscC	-	Εκκριση, πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης
HrpG	-	-	Εκκριση
HrpF	-	-	Εκκριση
HrpE	YscL	FliH	Εκκριση
HrpD	YscK	-	Εκκριση
HrcJ	YscJ	FliF	Εκκριση, πιθανά λιποπρωτεΐνη
HrpB	YscI	-	Εκκριση
HrpZ	-	-	Εκκρινόμενη πρωτεΐνη
HrpA	-	-	Δομική υπομονάδα του αγωγού Hrp
HrpS	-	-	Μεταγραφικός ενεργοποιητής (οικογένεια NtrC)
HrpR	-	-	Μεταγραφικός ενεργοποιητής (οικογένεια NtrC)

1.5.2.3.1.2 Πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το μονοπάτι Hrp

α) Χαρπίνες

Δύο κατηγορίες εξωκυττάρων πρωτεϊνών Hrp έχουν ταυτοποιηθεί: οι χαρπίνες (harpins) και οι πιλίνες (pilins). Οι χαρπίνες ήταν οι πρώτες πρωτεΐνες που δείχτηκε να εκκρίνονται στο μέσο καλλιέργειας της *E.coli*, που έφερε τη γονιδιακή ομάδα *hrp* της *Erwinia amylovora* (253). Επειδή μεταλλάξεις στο γονίδιο της χαρπίνης (*hrpN*) της *E. amylovora* καταργούσαν την ικανότητα της να επάγει την HR σε καπνό (μη-ξενιστής) και την εκδήλωση ασθένειας σε ευαίσθητες ποικιλίες του ξενιστή (αχλαδιά), θεωρήθηκε αρχικά ότι η χαρπίνη ήταν η πρωτογενής πρωτεΐνη παθογένειας, που διασχίζει το εκκριτικό μονοπάτι Hrp. Επιπλέον τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η χαρπίνη σε καθαρισμένη μορφή μπορούσε να επάγει HR, όταν ενυόταν στους μεσοκυττάρους χώρους φύλλων καπνού, οδήγησε στην άποψη, η οποία επικράτησε για μεγάλο χρονικό διάστημα, ότι η χαρπίνη ήταν απαραίτητη και αρκετή για την πυροδότηση της HR σε φυτά-μη ξενιστές καθώς και την εκδήλωση ασθένειας σε φυτά-ξενιστές.

Μετέπειτα μελέτες οδήγησαν στην ταυτοποίηση χαρπινών και σε άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια, όπως σε είδη των γενών *Pseudomonas* και *Ralstonia*, ενώ στη *Xanthomonas* δεν έχει απομονωθεί ανάλογη πρωτεΐνη, μέχρι σήμερα (9, 23, 106, 174, 194). Παρόλο που οι χαρπίνες από τα διαφορετικά είδη δεν εμφανίζουν σημαντική ομολογία σε αμινοξικό επίπεδο εμφανίζουν ορισμένα κοινά γενικά χαρακτηριστικά: είναι υδρόφιλες, είναι πλούσιες σε γλυκίνες, εμφανίζουν θερμοσταθερότητα, δεν έχουν κυστεΐνες (το οποίο δηλώνει ότι δεν έχουν δευτεροταγείς δομές, αλλά μάλλον μια ανοικτή δομή, η οποία ίσως να τις καθιστά ευάλωτες σε πρωτεόλυση), δεν έχουν αμινοτελικά πεπτίδια έκκρισης, αλλά εκκρίνονται στο βακτηριακό θρεπτικό μέσο. Η έκφραση και η έκκριση τους εξαρτάται από τα γονίδια *hrp* και όλες έχουν την ικανότητα να προκαλούν νέκρωση, όταν εγχύνονται στον αποπλάστη των φυτών. Ομως η φυσιολογική τους λειτουργία και η βάση της ικανότητας τους να επάγουν κυτταρικό θάνατο δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί.

Πρόσφατες μελέτες οδήγησαν στην ανακάλυψη μιας νέας τάξης πηκτινικών λυασών (class III pectate lyases) παρέχοντας νέες ιδέες για το βιολογικό ρόλο των χαρπινών. Τα γονίδια *hrpW*, που ταυτοποιήθηκαν σε *P.syringae* pv.tomato και

E.amylovora κωδικοποιούν πολυπεπίδια με αμινοτελικές περιοχές, που μοιάζουν με χαρπίνες (harpin-like domains) και καρβοξυτελικές περιοχές που μοιάζουν με πηκτινικές λυάσες (pectate lyase-like domains) (39, 129). Είναι ενδιαφέρον ότι αυτά τα πολυπεπίδια δεν δείχνουν ενζυμικές ενεργότητες πηκτινικών λυασών. Όμως και οι δύο πρωτεΐνες HrpW εκκρίνονται, και σε καθαρισμένη μορφή επάγουν HR, όταν εγχύνονται στον αποπλάστη των φυτών, υποδηλώνοντας ότι ίσως αλληλεπιδρούν με πηκτινικά κλάσματα του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Οι έντονες ομοιότητες μεταξύ των πηκτινικών λυασών τάξης III (class III pectate lyases) και των χαρπινών, σε συνδυασμό με προηγούμενες μελέτες που εντόπισαν harpin_{PSS} στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα (110), δημιουργεί πολλά ερωτηματικά όσον αφορά τη λειτουργία τους στην επαφή των βακτηρίων με το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα (bacterial-plant cell wall interface) και την εξέλιξη τους στα βακτήρια.

Οι χαρπίνες, παρά τις ομοιότητες τους, εμφανίζουν διαφορές στη θέση των γονιδίων τους μέσα στις γονιδιακές ομάδες *hrp*, καθώς και στη συνεισφορά τους στο φαινότυπο Hrp. Έτσι πιστεύεται ότι οι πρωτεΐνες HrpZ της *P.syringae*, PopA της *R.solanacearum* και HrpN των *Erwinia* spp. ίσως αντιπροσωπεύουν τρεις διάκριτες τάξεις διεγερτών (elicitors). Ειδικότερα η θέση των γονιδίων τους μέσα στη γονιδιακή ομάδα *hrp* ποικίλει και στα τρία γένη βακτηρίων.

1) Τα γονίδια *hrpN*, στα βακτήρια *E.amylovora* (*hrpN_{Ea}*) και *E.chrysanthemi* (*hrpN_{Ech}*) και *hrpZ* στους παθότυπους της *P.syringae* είναι δίπλα και μέσα στη γονιδιακή ομάδα *hrp* αντίστοιχα, ενώ το γονίδιο *popA* βρίσκεται εκτός (αλλά πλησίον) της γονιδιακής ομάδας *hrp* της *R.solanacearum*.

2) Δεν υπάρχουν γονίδια *hrp* μετά από το γονίδιο *hrpN* ούτε από το *popA*, το οποίο σημαίνει ότι μεταλλαγές σ' αυτά τα γονίδια δεν έχουν πολική επίδραση (polar effect) στη μεταγραφή άλλων γονιδίων αναγκαίων για την έκφραση του φαινότυπου Hrp⁺. Αντίθετα, το γονίδιο *hrpZ*, της *P.syringae* βρίσκεται μέσα σε οπερόνιο που περιέχει κι άλλα γονίδια *hrp* και έτσι μεταλλαγές σ' αυτό επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων που έπονται.

Η συνεισφορά των χαρπινών στο φαινότυπο Hrp φαίνεται να διαφέρει. Έτσι οι χαρπίνες των βακτηρίων *E.amylovora* και *E.chrysanthemi* έχει δειχτεί, με μεταλλαγές ένθεσης στα αντίστοιχα γονίδια, ότι είναι απαραίτητες και αρκετές για να επάγουν HR και επιπλέον, η πρωτεΐνη HrpN της *E.amylovora* απαιτείται για παθογένεια. Αντίθετα, η HrpN της *E.chrysanthemi* είναι σημαντική αλλά όχι αρκετή για την

παθογένεια (23). Παρόμοια, η πρωτεΐνη PopA1 της *R.solanacearum* δεν είναι απαραίτητη για παθογένεια στη τομάτα (9). Τέλος, παρόμοιες μελέτες αλλά με μη-πολικές μεταλλαγές στο γονίδιο *hrpZ* της *P.s.syringae* έδειξαν ότι χαρπίνη HrpZ είναι απαραίτητη αλλά όχι αρκετή για την επαγωγή της HR. Ειδικότερα μη-πολικές μεταλλαγές στο γονίδιο *hrpZ* από την *P.s.syringae* εμπόδιζε πλήρως της εκδήλωση HR στα συνήθη επίπεδα μολύσματος (2×10^7 cfu/ml), αλλά εκδηλωνόταν, με κάποια χρονική καθυστέρηση σε μεγαλύτερα επίπεδα μολύσματος (5×10^8 cfu/ml). Επιπλέον, μεταλλαγές σε ένα άλλο γονίδιο, το *hrmA*, το οποίο προτάθηκε τότε και αποδείχτηκε στη συνέχεια, ότι λειτουργεί ως γονίδιο *avr*, εμπόδιζε την εκδήλωση HR σε καπνό, παρόλο που τα επίπεδα της εκκρινόμενης χαρπίνης ήταν φυσιολογικά. Έτσι εξηγήθηκε ότι η χρονικά καθυστερημένη HR από στελέχη που είχαν μη-πολικές μεταλλαγές στο δομικό γονίδιο της χαρπίνης οφειλόταν στην έκφραση του *hrmA* (3). Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν σε μια αναθεώρηση της μέχρι τότε επικρατούσας άποψης, ότι η χαρπίνη ήταν απαραίτητη και αρκετή για την επαγωγή της HR. Η άποψη αυτή εξακολουθεί βέβαια να ισχύει για την *Erwinia amylovora* αλλά όχι για τη *P.syringae*, στην οποία η χαρπίνη είναι απαραίτητη αλλά όχι αρκετή.

Τα αποτελέσματα, σχετικά με το ρόλο της πρωτεΐνης HrpZ_{PSS}, επιβεβαιώθηκαν την ίδια περίοδο και από μια άλλη ομάδα ερευνητών, οι οποίοι επιπλέον έδειξαν ότι έκφραση στην *E.coli* της γονιδιακής ομάδας *hrp* (με λειτουργικά τα *hrmA* και *hrpZ*) από την *P.syringae* 61 δεν επάγει την HR στην *Arabidopsis thaliana* και τη σόγια (*Glycine max* L. cv. Merr.) (191). Ομως, το ίδιο στέλεχος επάγει την HR όταν επιπλέον φέρει το γονίδιο *avrB* από την *P.s.glycinea*. Άλλα γονίδια *avr* (*avrA* από την *P.s.glycinea*, *avrPto* και *avrRpt2* από την *P.s.tomato*, *avrRpm1* από την *P.s.maculicola* και *avrPphB* από την *P.s.phaseolicola*) δεν μπορούσαν να υποκαταστήσουν το ρόλο του *avrB*. Φαίνεται λοιπόν, ότι τα διάφορα γονίδια *avr* ίσως καθορίζουν κάποιο επίπεδο εξειδίκευσης στις αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων.

Περαιτέρω ανάλυση του ρόλου των πρωτεϊνών HrpZ και AvrB στην *Arabidopsis* και τη σόγια έδειξαν ότι, τόσο η χαρπίνη όσο και η AvrB, πρέπει να παράγονται από το ίδιο βακτηριακό κύτταρο προκειμένου να γίνει επαγωγή της HR (88). Στην προσπάθεια να εξηγήσουν πώς οι πρωτεΐνες Avr πυροδοτούν την HR, εφόσον σε αντίθεση με τις χαρπίνες, δεν εκκρίνονται στο μέσο καλλιέργειας των βακτηρίων, έλεγξαν αν η έκφραση τους μέσα στα φυτικά κύτταρα οδηγεί σε HR. Πράγματι διαπιστώθηκε ότι η AvrB δρα μέσα στα φυτικά κύτταρα και σε συνδυασμό

με τα προηγούμενα αποτελέσματα προτάθηκε ότι η ελευθέρωση της μέσα στα φυτικά κύτταρα απαιτεί την HrpZ καθώς και τα εκκριτικά συστατικά της ομάδας *hrp* (88). Μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι και άλλα γονίδια *avr* (*avrPto*, *avrBs3*, *avrRpt2*), όταν εκφράζονται μέσα στα φυτικά κύτταρα επάγουν την HR (31).

β) Πιλίνες (pilins)

Η δεύτερη κατηγορία εξωκυττάρων πρωτεϊνών Hrp αντιπροσωπεύεται από την πιλίνη HrpA της *Pseudomonas syringae*. Η HrpA, είναι μια μικρή υδροφιλική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *hrpA*, το οποίο βρίσκεται αμέσως πριν από το γονίδιο *hrpZ*, στο ίδιο οπερόνιο. Η πρωτοταγής αλληλουχία της HrpA δεν εμφανίζει ομολογία με άλλες πρωτεΐνες. Είναι ενδιαφέρον ότι η HrpA βρέθηκε να σχετίζεται με μία νέα σωληνοειδή δομή που ονομάστηκε Hrp pilus (210, 211). Η παραγωγή του αγωγού Hrp, ο οποίος έχει διάμετρο 6-8nm και μήκος >2μm εξαρτάται από τουλάχιστον δύο γονίδια *hrp/hrc* : *hrpS* που κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό ενεργοποιητή και το *hrcC* που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης που συμμετέχει στην έκκριση. Ανάλυση μη πολικών μεταλλαγών στο *hrpA* έδειξαν ότι η πρωτεΐνη HrpA είναι μια δομική πρωτεΐνη του αγωγού Hrp και επιπλέον ο σχηματισμός του είναι απαραίτητος για τις αλληλεπιδράσεις φυτών-βακτηρίων (HR και παθογένεια), που ελέγχονται από το σύστημα Hrp. Η ανακάλυψη αυτή υποδεικνύει ότι βακτηριακή προσκόλληση στα φυτικά κύτταρα ίσως απαιτείται για τη μεταφορά πρωτεϊνών (virulence και avirulence proteins) κατά μήκος του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Είναι ενδιαφέρον ότι μια παρόμοια δομή είναι απαραίτητη για τη μεταφορά του T-DNA από το *Agrobacterium tumefaciens* στο φυτό (75).

Μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί παρόμοιες δομές σε άλλα εκκριτικά συστήματα τύπου III. Ομως ινιδιακά εξαρτήματα (invasomes) διαμέτρου 60nm έχουν παρατηρηθεί στην επιφάνεια της *S.typhimurium*, μετά από επαφή με τα κύτταρα ξενιστές (84). Ο σχηματισμός αυτών των δομών είναι παροδικός και είναι κάτω από τον έλεγχο γονιδίων του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Αν και τα συστατικά αυτών των δομών δεν έχουν ταυτοποιηθεί, πιστεύεται ότι πιθανές υποψήφιες είναι οι πρωτεΐνες InuJ, SpaO και οι πρωτεΐνες Sip (78). Οι δύο πρώτες εμφανίζουν ομολογία με τις HrpP και HrcQ αντίστοιχα (115). Πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση του εκκριτικού συστήματος τύπου III στα είδη της *Shigella* οδηγεί

στην οργάνωση εκκρινόμενων προϊόντων σε φυλλοειδείς δομές (sheet-like) *in vitro* (186). Τουλάχιστον δύο πρωτεΐνες, οι IpaB και IpaC έχει δείχτει να αποτελούν συστατικά αυτών των δομών. Στο φως αυτών των ομοιοτήτων μεταξύ των γονιδίων της *Shigella* και της *Salmonella* (94), είναι πιθανό ότι οι δομές, που σχηματίζει *in vitro* η *Shigella* να σχετίζονται με τα ινιδιακά εξαρτήματα (invasomes) που σχηματίζει η *Salmonella in vivo*.

Μια άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι η εσωτερίκευση της *Shigella* στα κύτταρα-ξενιστές, που περιλαμβάνει την προσκόλληση αρχικά στα επιθηλιακά κύτταρα, ελαττώνεται με μεταλλαγές στα γονίδια *mxi-spa*, τα οποία συμμετέχουν στην έκκριση (169). Όμως δεν είναι γνωστό αν αυτά τα προϊόντα αυτών των γονιδίων οργανώνονται σε δομές που συμμετέχουν στην προσκόλληση των βακτηρίων στα κύτταρα-στόχους.

1.5.2.3.1.3 Αγωγός Hrp (Hrp pilus)

Οι αγωγοί (pili), τα ινίδια (fimbriae) και τα μαστίγια (flagella) είναι πρωτεϊνικά εξοκυτάρια ινιδιακά εξαρτήματα των βακτηριακών κυττάρων. Ο ρόλος των μαστιγίων είναι να προσδίδουν στα βακτηρία την ικανότητα να μετακινούνται, ενώ οι αγωγοί και τα ινίδια λειτουργούν κυρίως σαν εξαρτήματα στην προσκόλληση. Οι αγωγοί και τα ινίδια είναι συνήθως λεπτότερες δομές, με διάμετρο μικρότερη από 10 nm, απ' ό τι τα μαστίγια, τα οποία έχουν διάμετρο περίπου 15-20 nm. Η δόμηση των αγωγών, ινιδίων και μαστιγίων γίνεται με ελεγχόμενο πολυμερισμό πρωτεϊνικών υπομονάδων. Συνήθως υπάρχει μια κύρια δομική πρωτεϊνική υπομονάδα, πιλίνη, φιμπρίνη ή φλαγγελίνη (pilin, fimbrin, flagellin), που σχηματίζει τη δομή του ινιδίου. Επιπλέον υπάρχουν δευτερεύουσες υπομονάδες που εντοπίζονται σε διαφορετικά μέρη του ινιδίου και χρησιμεύουν σε διάφορες λειτουργίες, όπως προσκόλληση (adhesins proteins) μέχρι πρωτεΐνες που ελέγχουν την οργάνωση και τον καθορισμό του μήκους του ινιδίου. Σε μερικές περιπτώσεις το ινίδιο αποτελείται μόνο από την κύρια υπομονάδα, η οποία μπορεί να λειτουργεί ως μια προσφυτική πρωτεΐνη (adhesin protein). Το ινίδιο κατασκευάζεται από την προσθήκη υπομονάδων στη βάση του αναπτυσσόμενου/σχηματιζόμενου αγωγού ή των ινιδίων. Αντίθετα στα μαστίγια οι υπομονάδες, της δομικής πρωτεΐνης (flagellin), προστίθενται στην

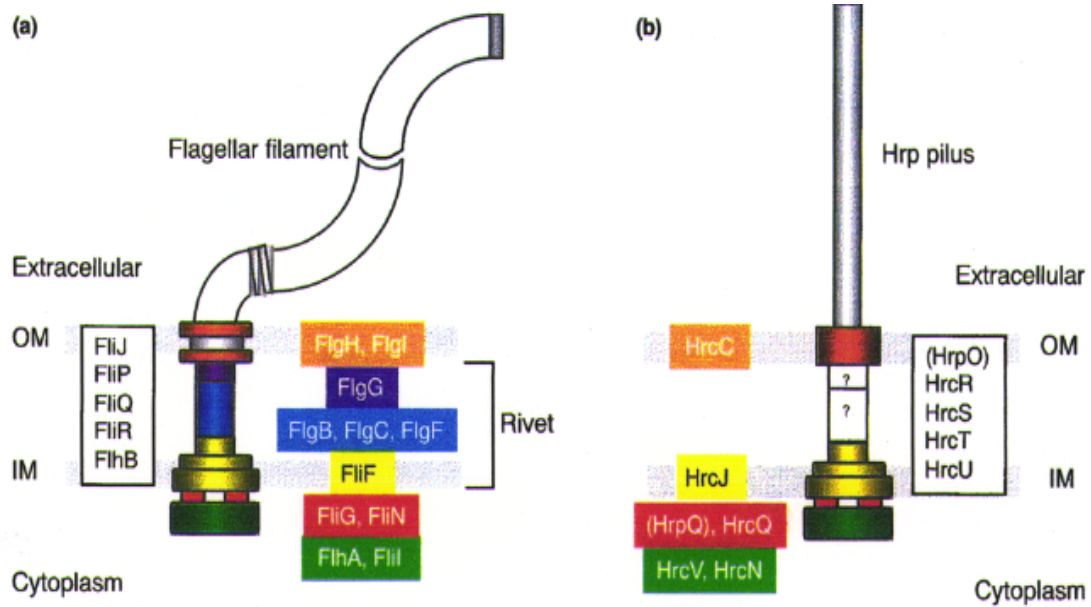
κορυφή του, αφού πρώτα μεταφερθούν μέσω ενός κοίλου καναλιού (hollow core) του σχηματιζόμενου μαστιγίου (99, 116, 157, 197).

Παρά τις διαφορές, που εμφανίζουν αυτά τα επιφανειακά εξαρτήματα, όσον αφορά τη μορφή τους, το σχήμα τους, τον τρόπο οργάνωσης τους και το ρόλο τους, ορισμένα εμφανίζουν ομολογίες σε αρκετά συστατικά τους που συμμετέχουν στη δομή και οργάνωση τους. Η ανακάλυψη ότι τα φυτοπαθογόνα βακτήρια σχηματίζουν αγωγούς (Hrp pilus) που απαιτούνται για την έκκριση και τη μεταφορά πρωτεϊνών παθογένειας στα φυτικά κύτταρα σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες που οργανώνουν το μαστίγιο στη *Salmonella* και στην *E.coli*, εμφανίζουν ομολογία με πρωτεΐνες Hrp παρέχει ιδέες για την πιθανή δομή και οργάνωση του αγωγού Hrp (113, [Lee, 1997 #1], 238). Στην Εικόνα 8 παρουσιάζονται οι δομικές ομοιότητες μεταξύ της δομής του μαστιγίου και μέρος της υποθετικής δομής που κωδικοποιείται από το εκκριτικό σύστημα Hrp της *P.syringae*. Στο μοντέλο αυτό, οι 8 πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη δόμηση του μαστιγίου και που δείχνουν ομοιότητα αλληλουχίας με πρωτεΐνες Hrc, συμμετέχουν στο να φτιάξουν μια δομή δακτυλίου που εδράζεται στο βακτηριακό φάκελλο (159). Η πρωτεΐνη FliF είναι ενσωματωμένη στην εσωτερική μεμβράνη, που αποτελεί το έδρανο του δακτυλίου: το μεμβρανικό δακτύλιο (MS ring, membrane and supra-membrane ring). Ομως η αντίστοιχη πρωτεΐνη HrcJ είναι μία λιποπρωτεΐνη (113) και ίσως γεφυρώνει τις δύο μεμβράνες, εσωτερική και εξωτερική. Οι HrcR, HrcS, HrcT και HrcU αντιστοιχούν στις FliP, FliQ, FliR και FlhB, οι οποίες είναι πρωτεΐνες ενσωματωμένες στην εσωτερική μεμβράνη με περιπλασματικές επεκτάσεις και προβλέπεται να είναι μέρος της δομής του δακτυλίου. Η HrpO έχει μικρή ομοιότητα στην αλληλουχία με τη FliJ, η οποία συμμετέχει στην οργάνωση του δακτυλίου του μαστιγίου. Η HrcQ εμφανίζει ομολογία με τις πρωτεΐνες FliN/FliY, που είναι περιφερειακές κυτοπλασμικές πρωτεΐνες. Η FliN/FliY είναι μέρος του μηχανισμού που ελέγχει την κατεύθυνση περιστροφής του μαστιγίου (flagellar motor switch apparatus), ο οποίος συνδέεται με το δακτύλιο MS. Ομως η πρωτεΐνη SpaO της *Salmonella*, η οποία εμφανίζει ομοιότητα με την HrcQ, έχει δείξει ότι είναι μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη (147). Η HrcN και η αντίστοιχη FliN είναι μία κυτοπλασμική πρωτεΐνη που έχει διάφορα μοτίβα χαρακτηριστικά των ΑΤΡασών και είναι υποψήφια να παρέχει ενέργεια στην οργάνωση του μαστιγίου και της εκκριτικής συσκευής τύπου III. Η HrcC είναι μία πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης και ίσως είναι το λειτουργικό ισοδύναμο των

δακτυλίων P και O του μαστιγίου, προμηθεύοντας ένα πρωτεϊνικό πόρο στην εξωτερική μεμβράνη για τη διέλευση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών. Τέλος η HrpJ της *E.amylovora* εμφανίζει ομοιότητα αλληλουχίας με τις πρωτεΐνες HrpJ της *P.syringae* και YopN της *Yersinia* spp. (29). Η YopN εντοπίζεται στην βακτηριακή επιφάνεια και πιστεύεται να χρησιμεύει ως μία βαλβίδα διακοπής για την εξ επαφής έναρξη της έκκρισης των πρωτεϊνών που δρουν, (contact-triggered secretion of effector proteins) στα κύτταρα των ξενιστών (46, 72, 213).

Το εξωκυττάριο μέρος του μαστιγίου αποτελείται από ένα άγκιστρο (hook) για την περιστροφή του μαστιγίου και ένα μακρύ ινίδιο, στο άκρο του οποίου υπάρχει μία πρωτεΐνη σφραγίσματος (cap protein). Το οργανωμένο μαστιγιακό ινίδιο λειτουργεί για να πλοηγεί τα βακτήρια στη διάρκεια του χημειοτακτισμού. Αν και ο αγωγός Hrp μπορεί να θεωρηθεί ως το δομικό ισοδύναμο του μαστιγιακού ινιδίου, η πραγματική λειτουργία του είναι άγνωστη. Ίσως λειτουργεί ως ένας αγωγός μεταφοράς των βακτηριακών χαρπινών και των πρωτεϊνών Avr στα φυτικά κύτταρα. Στην περίπτωση αυτή η μεταφορά των πρωτεϊνών αυτών μπορεί να θεωρηθεί ως μία επέκταση της διαδικασίας δόμησης του μαστιγίου. Μια πιο περίπλοκη υπόθεση είναι ότι ο αγωγός Hrp μπορεί να λειτουργεί ως ένας σωλήνας αγκυροβόλησης που προσάπτει τα βακτήρια στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα. Στη συνέχεια η επαφή αυτή πιθανότατα επάγει το σχηματισμό ενός άλλου συμπλόκου έκκρισης, που διεισδύει στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο χρησιμεύει ως ένας αγωγός για τη μεταφορά βακτηριακών πρωτεϊνών. Είναι επίσης πιθανό ότι το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα ίσως διασπάται με βακτηριακά κυτταροτοξωματικά ένζυμα αποικοδόμησης, έτσι που άμεση επαφή μεταξύ βακτηριακής και φυτικής μεμβράνης είναι εφικτή. Μέχρι τώρα δεν υπάρχει μαρτυρία για ένα τέτοιο μηχανισμό. Επιπλέον μερικά τουλάχιστον από τα βακτήρια που επάγουν την HR δεν παράγουν ανιχνεύσιμα ένζυμα αποικοδόμησης του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος. Επίσης μεταλλαγές σε ένζυμα αποικοδόμησης του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος στα βακτήρια δε φαίνεται να επηρεάζουν την πυροδότηση της HR (105).





Εικόνα 8. Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει **(α)** ένα βακτηριακό μαστίγιο και **(β)** μέρος του πιθανού εκκριτικού συμπλόκου Hrp. Τα ονόματα των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην οργάνωση μιας συγκεκριμένης δομής περικλείονται από ένα κουτί το οποίο είναι χρωματισμένο με το ίδιο χρώμα, όπως η αντίστοιχη δομή. **α)** Οι πρωτεΐνες FlhA και FliI συμμετέχουν στην οργάνωση μιας πιθανής εσωτερικής θύρας της συσκευής εξόδου. Οι FliG και FliN δομούν το “διακόπτη” του μαστιγιακού κινητήρα (flagellar motor switch). Η FliF τον δακτύλιο MS. Οι FlgB, FlgC, FlgF και FlgG συμμετέχουν στην κατασκευή του βασικού σώματος της ράβδου (rod) και δεν έχουν αντίστοιχα στο σύστημα Hrp. Οι FliJ, FliP, FliQ, FliR και FliH απαιτούνται για την οργάνωση του βασικού σώματος, το οποίο περιλαμβάνει: δακτύλιο MS, switch, εκκριτική συσκευή και ράβδο (στο σχήμα αναφέρεται ως rivet). Οι FlgI και FlgH φτιάχνουν τους δακτυλίους P και L, αντίστοιχα στην εξωτερική μεμβράνη. **β)** Μέρος της πιθανής εκκριτικής συσκευής Hrp, βάσει της ομολογίας των πρωτεϊνών Hrp με τις πρωτεΐνες του μαστιγίου και της ανακάλυψης του αγωγού Hrp. Βασικό σωματίδιο δεν έχει ακόμα βρεθεί στο σύστημα Hrp. Συντομεύσεις: IM=εσωτερική μεμβράνη, OM=εξωτερική μεμβράνη (105).

1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα φυτοπαθογόνα βακτήρια προκαλούν ασθένειες σε μια ποικιλία φυτικών ειδών, αλλά και ενεργοποίηση των μηχανισμών άμυνας των φυτών σε ανθεκτικές ποικιλίες των ξενιστών τους, έχει απασχολήσει τους ερευνητές για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η κατανόηση αυτών των μηχανισμών είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα, γιατί θα αποτελέσει τη βάση για το σχεδιασμό στρατηγικών ελέγχου των φυτικών ασθενειών με βιολογικά μέσα.

Ο μοριακός χαρακτηρισμός των γονιδίων (*hrp*, *avr*, *R*) που καθορίζουν την έκβαση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε ένα παθογόνο και ένα φυτό και η διαπίστωση ότι τα βακτήρια εκκρίνουν πρωτεΐνες (χαρπίνες) που έχουν την ικανότητα να πυροδοτούν την αντίδραση υπερευαισθησίας, μετά από έγχυση τους στο φυτό, σε καθαρή μορφή, διευκόλυνε τη μελέτη τόσο των μηχανισμών παθογένειας των βακτηρίων, αλλά και των μηχανισμών άμυνας των φυτών. Επιπλέον, τα περισσότερα από τα γονίδια *hrp* των φυτοπαθογόνων βακτηρίων κωδικοποιούν πρωτεΐνες ομόλογες μ' εκείνες ζωικών παθογόνων βακτηρίων, που συμμετέχουν στην οργάνωση ενός εξειδικευμένου εκκριτικού συστήματος τύπου III, το οποίο μεταφέρει βακτηριακές πρωτεΐνες όχι μόνο στο εξωκυττάριο μέσο των βακτηρίων, αλλά και μέσα στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα. Η ανακάλυψη τέτοιων ομολογιών, μεταξύ φυτικών και ζωικών παθογόνων, κάνει τη μελέτη αυτού του νέου εκκριτικού μηχανισμού να αποτελεί ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον.

Στόχοι της παρούσας διατριβής είναι: α) η διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού δράσης της πρωτεΐνης HrpZ (χαρπίνη), του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, στην αντίδραση υπερευαισθησίας των φυτών και ο καθορισμός της θέσης δράσης της στα φυτικά κύτταρα β) η δομική και λειτουργική οργάνωση των πρωτεϊνών Hrp στο εκκριτικό σύστημα τύπου III.

Η μεθοδολογική προσέγγιση στο πρώτο θέμα βασίστηκε στην έκφραση του γονιδίου *hrpZ_{Psp}* σε φυτά καπνού με και χωρίς οδηγό πεπτίδιο έκκρισης, ώστε να καθοριστεί αν η πρωτεΐνη δρά ενδο- ή εξωκυτταρικά. Οσον αφορά το δεύτερο στόχο, η υποκλωνοποίηση 18 γονιδίων *hrp/hrc* σε κατάλληλους φορείς έκφρασης διευκόλυνε τόσο τον καθαρισμό των πρωτεϊνών και την παρασκευή αντισωμάτων, όσο και τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών Hrp/Hrc, με τη μέθοδο του Far western και με το σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Προέλευση αντιδραστηρίων και υλικών

Τα υλικά, που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής προήλθαν από τις εταιρείες BOEHRINGER MANHEIM, PHARMACIA, PROMEGA, SIGMA CHEMICALS, United States Biochemicals (USB), STRATAGENE και MERK.

Τα περιοριστικά και τροποποιητικά ένζυμα των νουκλεϊκών οξέων προήλθαν από τις εταιρείες MINOTECH, New England Biolabs (NEB) και PROMEGA. Το αντίσωμα anti-His-AP-conjugate αγοράστηκε από την εταιρεία QIAGEN.

Τα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας των βακτηριακών στελεχών και στελεχών σακχαρομύκητα ήταν από την DIFCO και MERK, ενώ αυτά των φυτών ήταν από SIGMA CHEMICALS.

Τα ραδιοσημασμένα νουκλεοτίδια α [³²P]-dATP και α [³²P]-dCTP ήταν από την εταιρεία AMERSHAM, όπως και το ραδιενεργό αμινοξύ ³⁵S-Met.

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των μορίων DNA έγινε με τα υλικά που παρέχονται από την εταιρεία United States Biochemicals (Sequenase 2.0).

Οι νάυλον μεμβράνες για τη στύπωση των νουκλεϊκών οξέων αγοράστηκαν από την εταιρεία Du Pont/New England Nuclear (GeneScreen), ενώ για τη στύπωση πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες νιτροκυτταρίνης από τις εταιρείες SCHLEICHER & SHUELL και GELMAN και μεμβράνες PVDF από την GELMAN. Τα φιλμ αυτοραδιογραφίας ήταν από την KODAK, ενώ τα φιλμ χημειοφωταύγειας ήταν από τη BOEHRINGER MANHEIM. Τα ολιγονουκλεοτίδια συντέθηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας του IMBB (ITE) και από MWG-Biotech GmbH.

2.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς-Στελέχη βακτηρίων και σακχαρομύκητα

Για τη δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς: pBLUESCRIPT KS II (STRATAGENE), pUC18/19 (PHARMACIA), pT7-7 (233), pET16B και pET26B (NOVAGEN), pUC-A7-Tx, pBIN-Hyg-Tx και pTET1 (προσφορά από Dr. M.Gatz), PVX202 (προσφορά από Dr. Baulcombe), pAS2-1 και pACT2 (CLONTECH). Το πλασμίδιο pPL6 φέρει ένα ένθετο τμήμα περίπου 28 kb, που περιέχει σχεδόν όλη τη γονιδιακή ομάδα *hrp*, του στελέχους *P.s.phaseolicola* NPS3121, στον κοσμιδιακό φορέα pLAFR3 (202). Το πλασμίδιο pT7-7/HrpZ ήταν προσφορά του Δρ. Ε. Χατζηλουκά.

Τα βακτηριακά στελέχη *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν : DH5a, HB101 και BL21(DE3)plysS, οι γονότυποι των οποίων περιγράφονται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο των Sambrook et al. (220). Το στέλεχος HB101(pRK2013) χρησιμοποιήθηκε για την τρι-γονική σύζευξη (53).

Τα στελέχη του σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Y187 (CLONTECH), ο γονότυπος του οποίου περιγράφεται στο σχετικό εγχειρίδιο “The Matchmaker system” (CLONTECH) και PJ69-4A (123).

Το στέλεχος ψευδομονάδας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο άγριος τύπος *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121, Φυλή 1, με μία τυχαία μεταλλαγή για ανθεκτικότητα στη ριφαμπικίνη (Rif^R) (202).

Για το γενετικό μετασχηματισμό των φυτών χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Αγροβακτηρίου C58C1 (Rif^R), που περιέχει το βοηθητικό πλασμίδιο pGV2260 (Cb^R)(51).

2.1.3 Καλλιέργειες βακτηρίων και σακχαρομύκητα

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών *E.coli* και του Αγροβακτηρίου χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο LB (Luria and Bertani), τόσο σε υγρή όσο και σε στερεά μορφή. Τα θρεπτικά υλικά, στερεά και υγρά, καθώς και τα διαλύματα των αντιβιοτικών παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τους Sambrook et al. (220). Στην περίπτωση της *in vivo* σήμανσης των πρωτεϊνών σε *E.coli* χρησιμοποιήθηκε το ελάχιστο θρεπτικό μέσο M9 σύμφωνα με τους Sambrook et al. (220).

Για την καλλιέργεια των ψευδομονάδων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο King's B (KB), σε υγρή και στερεή μορφή, παρασκευασμένο σύμφωνα με τους King et al. (130), εκτός του ότι το MgSO₄ αποστειρώθηκε με διήθηση και προστέθηκε ασηπτικά εκ των υστέρων στο θρεπτικό μέσο, μετά την θερμική αποστείρωση του τελευταίου. Σε ορισμένα πειράματα η αποκαταστολή της έκφρασης των γονιδίων *hrp* πραγματοποιούνταν με ανάπτυξη των ψευδομονάδων σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο M9, που περιείχε 0.5% w/v φρουκτόζη, ρυθμισμένο σε pH 5.5 (118).

Οι καλλιέργειες των στελεχών σακχαρομύκητα έγιναν σε πλούσιο θρεπτικό μέσο YPD και ελάχιστο θρεπτικό μέσο SD, όπως περιγράφονται στο εγχειρίδιο "The Matchmaker system" (CLONTECH).

2.1.4. Πλασμιδιακές κατασκευές

Πλασμιδιακές κατασκευές πολλαπλασιαζόμενες στην *E.coli* (DH5a, HB101)

pUC-A7-TX/HrpZ: Προέκυψε με γραμμοποίηση του φορέα pUC-A7-TX με Sma I και υποκλωνοποίηση στη θέση αυτή της κωδικής περιοχής του HrpZ από το πλασμίδιο pT7-7/HrpZ μετά από πέψη του τελευταίου με Nde I (Klenow fill in)/EcoRV.

pUC-A7-TX/SP: Προέκυψε με γραμμοποίηση του φορέα pUC-A7-TX με Kpn I/BamH I και υποκλωνοποίηση στις θέσεις αυτές της κωδικής περιοχής του πεπτιδίου έκκρισης της πρωτεΐνης PR1a από τον καπνό (68, 190), απομονώθηκε με PCR από γενωμικό DNA καπνού (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi), χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

pUC-A7-TX/SP-HrpZ: Η κατασκευή pUC-A7-TX/SP γραμμοποιήθηκε κατάλληλα ώστε να είναι δυνατή η υποκλωνοποίηση της κωδικής περιοχής του γονιδίου HrpZ στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με την αλληλουχία του πεπτιδίου έκκρισης. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Αρχικά έγινε πέψη της κατασκευής pUC-A7-TX/SP με BamH I, τροποποίηση των άκρων με Mung bean nuclease, και πέψη στη συνέχεια με Pst I. Η κωδική περιοχή του γονιδίου *hrpZ* απομονώθηκε από την κατασκευή pT7-7/HrpZ μετά από πέψη με Dde I (Klenow fill in)/Pst I.

pUC/AvrPto: Προέκυψε από την ένθεση ενός τμήματος Nru I, που περιείχε την κωδική περιοχή του γονιδίου *avrPto* (*P.s. pv. tomato*), στη μοναδική θέση Sma I του πλασμιδίου pUC18. Το γονίδιο *avrPto* απομονώθηκε με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το πλασμίδιο pDSK519/AvrPto (προσφορά του Dr. B.J

Staskawicz. Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

PUC-A7-TX/SP-AvrPto: Προέκυψε από την ένθεση ενός τμήματος Nru I που περιείχε την κωδική περιοχή του γονιδίου *avrPto* (*P.s. pv. tomato*), στη μοναδική θέση BamH I του πλασμιδίου pUC-A7-TX, τα άκρα της οποίας είχαν τροποποιηθεί με Mung bean nuclease.

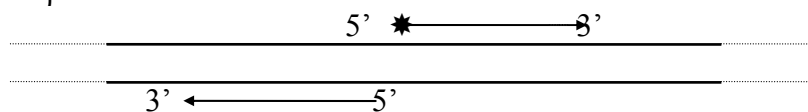
pBluescript KS II/AvrPphB: Προέκυψε από την ένθεση ενός τμήματος που περιείχε την κωδική περιοχή του γονιδίου *avrPphB* (*P.s. pv. phaseolicola*), στη μοναδική θέση Sma I του πλασμιδίου pBluescript KS II. Το γονίδιο *avrPphB* απομονώθηκε με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το πλασμίδιο pBR322/AvrPphB (προσφορά του Dr. J. Mansfield), και τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

pUC18/Hsr203J: Προέκυψε από την ένθεση ενός τμήματος BamH I που περιείχε την κωδική περιοχή του γονιδίου *hsr203J*, στη μοναδική περιοριστική θέση BamH I του πλασμιδίου pUC18. Το γονίδιο *hsr203J* απομονώθηκε με τη μέθοδο της PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα γενωμικό DNA καπνού (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi), με τους εκκινητές που αναφέρονται στον πίνακα 5.

pBluescript KS II/Hin 1: Προέκυψε από την ένθεση ενός τμήματος Xba I που περιείχε την κωδική περιοχή του γονιδίου *hin 1*, στη μοναδική περιοριστική θέση Xba I του πλασμιδίου pBluescript KS II. Το γονίδιο *hin 1* απομονώθηκε με τη μέθοδο της PCR χρησιμοποιώντας ως μήτρα γενωμικό DNA καπνού (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi), με τους εκκινητές που αναφέρονται στον πίνακα 5.

pT7-7/HrpZ_{Met}¹⁶: Στο πλασμίδιο αυτό το γονίδιο *hrpZ* έχει μεταλλαχτεί σε ένα νουκλεοτίδιο, έτσι ώστε το αμινοξύ στη θέση 16 της παραγόμενης πρωτεΐνης να είναι ισολευκίνη αντί για μεθειονίνη (M16I). Η μεταλλαξιγένεση του νουκλεοτιδίου έγινε με αντίδραση PCR, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Fisher et al. (69). Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής σε σχέση με τις υπόλοιπες είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί με οποιοδήποτε φορέα και απαιτούνται μόνο δύο εκκινητές, εκ των οποίων ο ένας φέρει την επιθυμητή μεταλλαγή, σε μία μόνο αντίδραση PCR και ο βαθμός επιτυχίας της μεταλλαξιγένεσης είναι της τάξης του 80%. Συνοπτικά η διαδικασία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να είναι γειτονικοί και εκατέρωθεν των δύο αλυσίδων του DNA. Ο ένας εκκινητής φέρει τη μεταλλαγή στο 5' άκρο του.



2. Πριν από την αντίδραση της PCR οι εκκινητές φωσφορυλιώνονται: 50pmol/μl κάθε εκκινητή διαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (50mM Tris-HCl pH 7.6, 10mM MgCl₂, 1mM ATP, 1mM DTT, 5% PEG-8000) όπου προστίθεται 1U/μl του ενζύμου κινάση πολυνουκλεοτιδίων του φάγου T4 (T4 polynucleotide kinase). Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 30 λεπτά.
3. Εκτέλεση της PCR: Το μίγμα της αντίδρασης, όγκου 50 μl περιέχει: 50ng DNA-μήτρα (pT7-7/HrpZ), 50pmol από κάθε φωσφορυλιωμένο εκκινητή, 350 μM dNTPs, 1x ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης της πολυμεράσης Pfu (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄,

2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 100 µg/ml BSA) και 1.25 units Pfu DNA polymerase.

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν: αρχική αποδιάταξη στους 94°C για 4 min, ακολουθούμενη από 20 κύκλους: 94°C/1 min, 50°C/1 min, 72°C/4 min και τελική επέκταση στους 72°C/7 min. Το προϊόν της αντίδρασης εκχυλίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρημνίζεται με αιθανόλη.

4. Το προϊόν της αντίδρασης κυκλοποιείται με 10 U T4 DNA λιγάσης σε 20 µl ρυθμιστικού διαλύματος λιγάσης και επωάζεται για τουλάχιστον 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια απενεργοποιείται το ένζυμο με θέρμανση στους 65°C για 20 min.
5. Ακολουθεί πέψη με το ένζυμο Dpn I για να γραμμοποιηθεί το μεθυλιωμένο πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα-DNA. Τα πλασμίδια που απομονώνονται από τα συνήθη εργαστηριακά βακτηριακά στελέχη είναι μεθυλιωμένα. Έτσι μπορούν να αναγνωριστούν και να κοπούν από το ένζυμο Dpn I, ενώ το μη μεθυλιωμένο προϊόν της PCR παραμένει ακέραιο.
6. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli*, οποιουδήποτε στελέχους.

Πλασμιδιακές κατασκευές για υπερέκφραση γονιδίων στην *E.coli* (BL21[DE3]plysS)

Για την έκφραση των κωδικών περιοχών των γονιδίων *hrp* της *P.syringae* pv. phaseolicola, σε κύτταρα *E.coli* χρησιμοποιήθηκαν δύο φορείς έκφρασης ο pT7-7 και ο pET16b. Οι φορείς αυτοί επιτρέπουν έκφραση των γονιδίων υπό τον έλεγχο του υποκινητή T7, του φάγου Φ10 και επιπλέον, οι πρωτεΐνες που παράγονται από τον φορέα pET16b φέρουν στο αμινοτελικό άκρο τους μια αλληλουχία 10 ιστιδινών, επιτρέποντας έτσι τον καθαρισμό τους με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη αгарόζης νικελίου (Ni-NTA agarose). Το στέλεχος BL21(DE3)plysS της *E.coli* επιλέχτηκε γιατί εκφράζει την T7 RNA πολυμεράση. Δεκαπέντε γονίδια *hrp* που υποκλωνοποιήθηκαν στους φορείς αυτούς απομονώθηκαν με τη μέθοδο της PCR από το κοσμίδιο pPL6, το οποίο φέρει σχεδόν όλη τη γονιδιακή ομάδα *hrp* της *P.s.pv phaseolicola*. Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται τα ολιγονουκλεοτίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση και σημειώνονται με υπογράμμιση οι θέσεις περιορισμού, που διευκόλυναν την υποκλωνοποίηση των προϊόντων της PCR. Όλα τα γονίδια υποκλωνοποιήθηκαν ως Nde I/BamH I τμήματα στις αντίστοιχες θέσεις των παραπάνω φορέων με εξαίρεση την κατασκευή pET16b/hrpJ, στην οποία το *hrpJ* υποκλωνοποιήθηκε ως Nde I/Hind III στην αντίστοιχη θέση του pET16b.

Τέλος οι ελλείψεις του γονιδίου *hrcQa* δημιουργήθηκαν με την επιλογή κατάλληλων περιοριστικών θέσεων. Συγκεκριμένα το τμήμα του γονιδίου, που κωδικοποιεί το αμινοτελικό ήμισυ της πρωτεΐνης HrcQa, λήφθηκε με πέψη της κατασκευής pT7-7/hrcQa με Nde I/EcoR V και το τμήμα αυτό υποκλωνοποιήθηκε στις θέσεις Nde I/Sma I των φορέων pT7-7 και pET16b. Το τμήμα του γονιδίου, που κωδικοποιεί το καρβοξυτελικό ήμισυ της πρωτεΐνης HrcQa, λήφθηκε με πέψη της κατασκευής pT7-7/hrcQa με EcoR V/BamH I και υποκλωνοποιήθηκε στις θέσεις EcoR I (Klenow fill in)/BamH I των φορέων pT7-7 και pET16b.

Πλασμιδιακές κατασκευές για έκφραση γονιδίων στο σακχαρομύκητα *S.cerevisiae*

Πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών Hrp, όπως και της χαρπίνης με άλλες πρωτεΐνες ελέγχθηκαν με το σύστημα των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα. Το σύστημα αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι πολλοί ευκαρυωτικοί μεταγραφικοί ενεργοποιητές αποτελούνται από δύο χωριστές, λειτουργικά ανεξάρτητες περιοχές. Για παράδειγμα ο μεταγραφικός ενεργοποιητής GAL4, του σακχαρομύκητα, περιέχει μια περιοχή για δέσμευση στο DNA (DNA-BD, DNA-binding domain), και μια περιοχή απαραίτητη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής (AD, activation domain). Η περιοχή DNA-BD αναγνωρίζει και δεσμεύεται σε μια αλληλουχία (UAS), που βρίσκεται στον υποκινητή γονιδίων που ενεργοποιούνται από τον GAL4, ενώ η περιοχή AD, αλληλεπιδρά με άλλα συστατικά της μεταγραφικής μηχανής που απαιτούνται για την έναρξη της μεταγραφής. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το σύστημα MATCHMAKER, το οποίο βασίζεται στον GAL4 και χρησιμοποιεί δύο διαφορετικούς φορείς κλωνοποίησης, τους pAS2-1 και pACT2. Ο φορέας pAS2-1 επιτρέπει τη δημιουργία χμαιρικών πρωτεϊνών με την περιοχή AD του GAL4 (αα 768-881), ενώ ο pACT2 επιτρέπει τη δημιουργία χμαιρικών πρωτεϊνών με την περιοχή DNA-BD του GAL4 (αα 1-147). Οι φορείς αυτοί έχουν την αλληλουχία που απαιτείται για έναρξη αντιγραφής του DNA στο σακχαρομύκητα (2μ *ori*) και διαφορετικούς δείκτες επιλογής (*TRP1* για pAS2-1 και *LEU2* για pACT2). Οι χμαιρικές πρωτεΐνες εκφράζονται συνεχώς, κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της αλκοολικής αφυδρογονάσης. Οι ανασυνδυασμένες κατασκευές εισήχθηκαν ταυτόχρονα σε κύτταρα ζύμης Y187 και PJ69-4A.

pACT2/HrpZ: Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Nde I (Klenow fill in)/EcoRV της κατασκευής pT7-7/HrpZ στην μοναδική θέση Sma I του φορέα pACT2.

pAS2-1/HrpZ: Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Nde I/Pst I της κατασκευής pT7-7/HrpZ στις θέσεις περιορισμού Nde I/Pst I του φορέα pAS2-1.

pAS2-1/AvrPto: Προέκυψε από την ένθεση ενός Nru I τμήματος που περιείχε την κωδική περιοχή του γονιδίου *avrPto* (*P.s. pv. tomato*), στη μοναδική θέση Sma I του πλασμιδίου pAS2-1.

pAS2-1/AvrPphB: Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Sma I/Sac I από την κατασκευή pBluescript KS II/AvrPphB, στη μοναδική θέση Sma I του φορέα pAS2-1.

pACT2/AvrPphB: Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Sma I από το πλασμίδιο pBluescript KS II/AvrPphB, στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pACT2.

pAS2-1/HrpA: Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Nde I/BamH I, από την κατασκευή pT7-7/HrpA, στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pAS2-1.

pAS2-1/HrpB: Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Nde I/BamH I, από την κατασκευή pT7-7/HrpB, στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pAS2-1.

pAS2-1/HrQa: Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Nde I/BamH I, από την κατασκευή pT7-7/HrcQa, στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pAS2-1.

pACT2/HrQb: Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Nde I/BamH I, μετά από επεξεργασία των 5' και 3' άκρων με Klenow, από την κατασκευή pT7-7/HrcQb, στη μοναδική θέση περιορισμού του φορέα pACT2.

Πλασμιδιακές κατασκευές για έκφραση γονιδίων σε φυτά

pBIN-Hyg-TX/HrpZ: Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής EcoRI/HindIII της κατασκευής pUC-A7-TX/HrpZ στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pBIN-Hyg-TX.

pBIN-Hyg-TX/SP-HrpZ: Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής EcoRI/Xba I της κατασκευής pUC-A7-TX/SP-HrpZ στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pBIN-Hyg-TX.

PVX202/HrpZ: Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Hpa I/Hind III (Klenow fill in) της κατασκευής pUC-A7-TX/HrpZ στην περιοριστική θέση Nru I του φορέα PVX202.

PVX202/SP-HrpZ: Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Hind III (Klenow fill in) της κατασκευής pUC-A7-TX/SP-HrpZ στην περιοριστική θέση Nru I του φορέα PVX202.

PVX202/AvrPto: Προέκυψε από την ένθεση ενός Nru I τμήματος που περιείχε την κωδική περιοχή του γονιδίου *avrPto* (*P.s. pv. tomato*), στη μοναδική θέση Nru I του φορέα PVX202.

PVX202/SP-AvrPto: Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Hind III (Klenow fill in) της κατασκευής pUC-A7-TX/SP-AvrPto στην περιοριστική θέση Nru I του φορέα PVX202.

PVX202/AvrPphB: Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Sma I από το πλασμίδιο pBluescript KS II/AvrPphB, στη μοναδική θέση Nru I του φορέα PVX202.

Πίνακας 5. Ολιγονουκλεοτίδια, που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.

Προϊόν PCR	Μήτρα-DNA	Ολιγονουκλεοτίδια
<i>SP_{PR1a}</i>	Γενωμικό καπνού	DNA 5'-CCGCGGGTACCAAGCTTTCCTATAGTCATGGG-3' 5'-TCTGAGGGATCCTTGTGAGAGTTTTGGGCACG-3'
<i>avrPto</i>	pDSK519/ <i>AvrPto</i>	5'-TGTA <u>CTCGCG</u> AGGGTATACGAATGGG-3' 5'-GCCT <u>CGCG</u> AGTCGACATTATGACGCC-3'
<i>avrPphB</i>	pBR322/ <i>AvrPphB</i>	5'-CGGGATCCATGAAAATAGGTACGCAGG-3' 5'-CGGGATCCGGCTGGGTTTTTTGCTTC-3'
<i>hsr203J</i>	Γενωμικό καπνού	DNA 5'-CGCGGATCCGGCTGGCTTAGAGTTTTTC-3' 5'-TCCGGGATCCCTCCGATAGGACCGCACG-3'
<i>hin 1</i>	Γενωμικό καπνού	DNA 5'-GAGCTCTAGATGGCCCTTCCATTCCGC-3' 5'-GCTCTAGACGCCGGAACAAAAGG-3'
<i>hrpA</i>	pPL6	5'-GGGTATCACCATATGAACATCATGAG-3' 5'-GAAGGGGGATCCAAGAAATCAGAAC-3'
<i>hrpB</i>	pPL6	5'-GGAGAACTCATATGACCGTTTCCCACC-3' 5'-CAGCAGCCCTGGGATCCAAAATTTTAC-3'
<i>hrcJ</i>	pPL6	5'-GTAGAGGTTCATATGAAATTTTTGAGCGCA-3' 5'-CACTCTGCAAGGATCCGCTGTGAC-3'
<i>hrpP</i>	pPL6	5'-GTTAAGTGCATATGACCGCACCGATC-3' 5'-GGAGCCAGCAGGGGATCCACCTT-3'
<i>hrcQa</i>	pPL6	5'-CATGAAGATCTTGCCATATGAGCGCG-3' 5'-CTCGACATCTTCCGGATCCAGATCTTC-3'
<i>hrQb</i>	pPL6	5'-GAGCACCGCCCATATGAGTACTGAAG-3' 5'-CAAGAAACAGCGCCAGGATCCTCGG-3'
<i>hrcR</i>	pPL6	5'-GGTGACCCGCATATGATCATGGAGGGC-3' 5'-GCAGGATCCCGACCAGAAACATGCCTT-3'
<i>hrcR-N_{ter}</i> (1-156)	pT7-7/HrcR	5'-GGTGACCCGCATATGATCATGGAGGGC-3' 5'-AGATCAGGGATCCGATCTAGAAACCGGCC-3'
<i>hrcR-I</i> (68-156)	pT7-7/HrcR	5'-CAACCATGTTCCATATGGCCCCGGTG-3' 5'-AGATCAGGGATCCGATCTAGAAACCGGCC-3'
<i>hrcR-C_{ter}</i> (68-217)	pT7-7/HrcR	5'-CAACCATGTTCCATATGGCCCCGGTG-3' 5'-GCAGGATCCCGACCAGAAACATGCCTT-3'
<i>hrcS</i>	pPL6	5'-GTGAGGCGCATATGGAAGCGTTGGCG-3' 5'-CGCGGGATCCCCAGACCCATGCC-3'
<i>hrcT</i>	pPL6	5'-GGGGTCAATCACCATATGCCCTTCGACGC-3'

		5'-GCGTCACGGATCCGTTTGGGGGTAGCC-3'
<i>hrcU</i>	pPL6	5'-CTGGTGCAAGT <u>CATATGAGT</u> GAAAAAACCGA-3' 5'-CCTGTTACGCCTGGATCCCAGCTCC-3'
<i>hrcU-N_{ter}</i> (1-133)	pT7-7/HrcU	5'-CTGGTGCAAGT <u>CATATGAGT</u> GAAAAAACCGA-3' 5'-CAGGTTGAGGATCCTCTACCCGGAAAAC-3'
<i>hrcU-C_{ter}</i> (199-END)	pT7-7/HrcU	5'-CTGGTCGTCCATATGGTTCGACTTCG-3' 5'-CCTGTTACGCCTGGATCCCAGCTCC-3'
<i>hrpJ</i>	pPL6	5'-GCTCAGAACCGT <u>CATATG</u> AAAATCG--3' 5'-CGACAGGGCAAGCTTGTTCAGAAAG-3'
<i>hrcV</i> (313-END)	pPL6	5'-GCCCACGGGAGTACATATGACCATCGCG-3' 5'-CCTTGGTGCGGATCCTTCAGTACGCG-3'
<i>hrpQ</i>	pPL6	5'-CGGAGACTTT <u>CATATG</u> TTTGAATTACGCG-3' 5'-GGCCACTGACGGGATCCGCGCTGTAGTC-3'
<i>hrcN</i>	pPL6	5'-TGAGGTGAACATATGAACGCTGCACTGAGC-3' 5'-GCGGATCGGATCCAGTGTGTCTTCC-3'
<i>hrpO</i>	pPL6	5'-CCGGAGTACATATGGAAGACACACTGGA-3' 5'-GGGTGTTGGATCCGTGCGGTCAT-3'
<i>hrpZ_{Met-16}</i>	pT7-7/HrpZ	5'-ACGGGCTTTTCGAGCGTGCTGCTG-3' 5'-CGATCGCGCTCGTTCTGATCCGTCC-3'

Στα ολιγονουκλεοτίδια σημειώνονται με υπογράμμιση οι θέσεις περιορισμού. Οι αριθμοί μέσα στην παρένθεση, κάτω από το όνομα του γονιδίου, αναφέρονται στα αμινοξικά κατάλοιπα που οριοθετούν την περιοχή του γονιδίου, που κωδικοποιεί η αλληλουχία αυτή.

2.1.5 Φυτικό υλικό

Φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi), αναπτυγμένα σε θερμοκήπιο χρησιμοποιήθηκαν ως δότες φύλλων για απομόνωση πρωτοπλαστών καθώς και σε πειράματα για τον έλεγχο της αντίδρασης υπερευαισθησίας. Για τη μόλυνση με τον ιό PVX202 χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Nicotiana benthamiana*, ανεπτυγμένα σε θερμοκήπιο, ενώ για το γενετικό μετασχηματισμό των φυτών χρησιμοποιήθηκαν φυτά *Nicotiana tabacum* cv. Winsconsin 38, που ήταν μετασχηματισμένα με το φορέα pTET1 (προσφορά της Dr. A. Gatz).

2.1.6 Θρεπτικά μέσα φυτικών οργανοκαλλιέργειών

Η ανάπτυξη των φυτών σε ιστοκαλλιέργεια έγινε σε θρεπτικό υλικό Murashige and Scoog-MS (175), στους 25°C με 16/8 h φωτοπερίοδο και ένταση φωτός 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών Conviron εφοδιασμένο με λαμπτήρες φθορισμού (φως ημέρας). Ειδικότερα, τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το γενετικό μετασχηματισμό των φυτών περιγράφονται στον πίνακα 6 και όλα προμηθεύτηκαν από τη SIGMA Chemicals Co.

Πίνακας 6. Θρεπτικά υλικά για το μετασχηματισμό φυτών καπνού.

Υγρό μέσο MS :	Υδατικό διάλυμα αλάτων (μακροστοιχεία και μικροστοιχεία MS), βιταμίνες MS και 3% σακχαρόζη.
Στερεό μέσο MS:	Υγρό μέσο MS και 0.8% άγαρ.
Υγρό MS επιλογής:	MS και σεφοταξίμη (500 $\mu\text{g/ml}$ τελική συγκέντρωση).
MS συν-καλλιέργειας:	Στερεό μέσο MS με 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ναφθαλινοξικού οξέος (NAA), 1 $\mu\text{g/ml}$ βενζυλαμινοπουρίνης (BAP).
MS - επιλογής:	Στερεό μέσο MS που περιείχε σε τελικές συγκεντρώσεις τα ακόλουθα: 0.1 $\mu\text{g/ml}$ NAA, 1 $\mu\text{g/ml}$ BAP, 500 $\mu\text{g/ml}$ σεφοταξίμη, 50 $\mu\text{g/ml}$ υγρομυκίνη.
MS - επιμήκυνσης:	Στερεό μέσο MS που περιείχε σε τελικές συγκεντρώσεις τα ακόλουθα: 2 $\mu\text{g/ml}$ BAP, 500 $\mu\text{g/ml}$ σεφοταξίμη, 50 $\mu\text{g/ml}$ υγρομυκίνη.
MS - ριζοβολίας:	Στερεό μέσο MS (0.6% άγαρ) που περιείχε σε τελικές συγκεντρώσεις τα ακόλουθα: 500 $\mu\text{g/ml}$ σεφοταξίμη, 50 $\mu\text{g/ml}$ υγρομυκίνη.

2.1.7 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας πρωτοπλαστών

Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των πρωτοπλαστών παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τους Koop και Schweiger (136).

Πίνακας 7. Διαλύματα απομόνωσης και καλλιέργειας πρωτοπλαστών από καπνό. Τα διαλύματα είναι μερικώς τροποποιημένα αυτών που έχουν ήδη αναφερθεί: Koop Schweiger (136).

<u>Διάλυμα απομόνωσης</u>	<u>Διάλυμα καλλιέργειας</u>
Μακρο- και μικροστοιχεία B5	όπως το διάλυμα απομόνωσης, εκτός από:
2mM CaCl ₂	
25mM MES	
200 mg/l μεσοϊνοσιτόλη	
0.02 mg/l βιοτίνη	
2 mg/l παντοθενικό οξύ	
1 mg/l θειαμίνη-HCl	
2 mg/l πυριδοξίνη-HCl	
0.4M σακχαρόζη	0.4 M γλυκόζη
pH 5.7	0.1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.2.1.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Για την παρασκευή σε μικρή κλίμακα υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες μέθοδοι:

α) Μέθοδος βρασμού.

β) Μέθοδος αλκαλικής λύσης.

Οι αναλυτικές μέθοδοι γι' αυτές τις διαδικασίες καθώς και η σύσταση των διαλυμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά στους Sambrook *et al.* (220). Σε περιπτώσεις που ήταν απαραίτητη η παρασκευή μεγαλύτερων ποσοτήτων DNA και υψηλότερης καθαρότητας χρησιμοποιήθηκε η αλκαλική μέθοδος της κυτταρικής λύσης με συνδυασμό διαδοχικών υπερφυγοκεντρήσεων κλίσης χλωριούχου καισίου (CsCl gradient) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Εναλλακτικά εφαρμόστηκε η μέθοδος της μοριακής διήθησης με στήλες διαχωρισμού QIAGEN. Το αναλυτικό πρωτόκολλο και οι συστάσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στο σχετικό εγχειρίδιο της εταιρείας.

2.2.1.2 Απομόνωση γενωμικού DNA από φυτικά κύτταρα

Ο φυτικός ιστός κονιορτοποιήθηκε σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια το DNA εκχυλίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο CTAB (cetyl-trimethyl-ammonium bromide), που περιγράφεται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο των Rogers *et al.* (209). Η διαδικασία έχει ως εξής: Ο κονιορτοποιημένος ιστός μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρησης και προστίθενται 1 ml/gr ιστού διαλύματος 2 x CTAB, προθερμασμένου στους 65°C. Το μίγμα αναμιγνύεται και επωάζεται στους 65°C για 15 λεπτά. Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και το μίγμα αναδεύεται ελαφρά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 xg για 5 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και προσδιορίζεται ο όγκος του. Προστίθεται 1/10 του όγκου προθερμασμένου διαλύματος 10% CTAB και το μίγμα αναδεύεται. Προστίθεται ξανά ίσος όγκος χλωροφορμίου:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και το μίγμα αναδεύεται ισχυρά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο σωλήνα όπου προστίθεται διάλυμα κατακρήμνισης CTAB 1%, σε αναλογία 1:1. Το δείγμα αναδεύεται και φυγοκεντρείται όπως παραπάνω. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και το ίζημα επαναιωρείται σε διάλυμα TE υψηλής αλατότητας (0.5 ml/gr). Το DNA κατακρημνίζεται με 2 όγκους απόλυτης αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και το ίζημα πλένεται με 80% αιθανόλη και ξαναφυγοκεντρείται. Τελικά το DNA επαναδιαλύεται σε αποστειρωμένο H₂O.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ DNA

2x CTAB: 2% CTAB (w/v), 100mM Tris (pH 8.0), 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 1% PVP (polyvinylpyrrolidone) M_r 40000.

10% CTAB: 10% CTAB, 0.7M NaCl.

Διάλυμα κατακρήμνισης CTAB: 1% CTAB, 50mM Tris (pH 8.0), 10mM EDTA.

Διάλυμα TE υψηλής αλατότητας: 10 mM Tris (pH 8.0), 1mM EDTA, 1M NaCl.

2.2.1.3 Απομόνωση ολικού RNA από φυτικά κύτταρα

Ο φυτικός ιστός κονιορτοποιήθηκε σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια το RNA εκχυλίστηκε με μία από τις παρακάτω δύο μεθόδους:

α) Στον κονιορτοποιημένο ιστό προστίθεται 2ml/gr ιστού, διαλύματος εκχύλισης (8M υδροχλωρική γουανιδίνη, 20 mM MES pH 7.0, 20 mM EDTA, 50 mM μερκαπτοαιθανόλη). Το μίγμα αναμιγνύεται και επωάζεται στους 4°C για 15 λεπτά με περιοδική ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 xg για 15 min στους 4°C. Το υπερκείμενο εκχυλίζεται με ίσο όγκο φαινόλης:χλωροφορμίο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα, όπου κατακρημνίζεται το RNA με 0.7 όγκους απόλυτης αιθανόλης και 0.2 όγκους οξικού οξέος 1M. Μετά από επώαση για 1 ώρα στους -80°C φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες. Το ίζημα πλύνεται με 80% αιθανόλη και επανααιωρείται σε 0.1M οξικό νάτριο pH 6.0. Προστίθεται αιθανόλη σε τελική συγκέντρωση 10% και το δείγμα επωάζεται στους 4°C για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα, όπου προστίθενται 2 όγκοι απόλυτης αιθανόλης για κατακρήμνιση του RNA. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται, το ίζημα πλένεται με 80% αιθανόλη και τελικά επαναδιαλύεται σε αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό.

β) με το αντιδραστήριο TRI-REAGENT (SIGMA). Το αντιδραστήριο αυτό επιτρέπει την ταυτόχρονη εκχύλιση από ένα δείγμα RNA, DNA και πρωτεϊνών. Σε 100 mg ιστού προστίθεται 1 ml αντιδραστηρίου. Ακολουθεί ανακίνηση με vortex και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται στις 12000 xg για 10 λεπτά στους 4°C. Συλλέγεται το υπερκείμενο και εκχυλίζεται δύο φορές με φαινόλη/χλωροφόρμιο (1:1). Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο φυγοκέντρησης (eppendorf) όπου κατακρημνίζεται με 2 όγκους 100% αιθανόλης και 1/10 του όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5.2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 xg για 20 λεπτά στους 4°C και το ίζημα (RNA) που προκύπτει πλύνεται με 70% αιθανόλη. Η επαναδιάλυση του ιζήματος γίνεται σε αποστειρωμένο ddH₂O.

2.2.1.4 Πέψη μορίων DNA με ένζυμα περιορισμού

Οι περιοριστικές πέψεις πραγματοποιήθηκαν με βάση τις άριστες συνθήκες στις οποίες λειτουργεί κάθε ένζυμο (θερμοκρασία, pH, μοριακότητα ρυθμιστικού διαλύματος σε άλατα) σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας και τα πρωτόκολλα που περιγράφονται στο σχετικό εργαστηριακό εγχειρίδιο (220).

2.2.1.5 Ηλεκτροφορητική ανάλυση, απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αгарόζης

Η ανάλυση κομματιών DNA έγινε με ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό τους σε πήκτωμα αгарόζης, κατάλληλης για την κάθε περίπτωση πυκνότητας (0.5-1.5%). Για την απομόνωση και τον καθαρισμό μορίων DNA που είχαν διαχωριστεί σε πήκτωμα αгарόζης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της εκλεκτικής δέσμευσης σε μικροσφαιρίδια πυριτίου QIAEX II (QIAGEN). Η αναλυτική διαδικασία περιγράφεται στο σχετικό εγχειρίδιο της εταιρείας.

2.2.1.6 Διαδικασίες υποκλωνοποίησης μορίων DNA

Οι συνήθεις διαδικασίες υποκλωνοποίησης σε πλασμιδιακούς φορείς περιλαμβάνουν τη συνένωση δύο τμημάτων DNA με συμβατά άκρα, με τη βοήθεια της T4 DNA Ligase. Στις περιπτώσεις που δεν ήταν δυνατή η επιλογή συμβατών άκρων, φορέων και ενθέματος, γινόταν τροποποίηση έτσι ώστε να μη διαθέτουν μονόκλωνο τμήμα. Έτσι η δημιουργία των “τυφλών άκρων” έγινε με δύο τρόπους:

α. Με χρήση του μεγάλου ενζυμικού κλάσματος Klenow της πολυμεράσης I του DNA της *E.coli*. Το ένζυμο είναι ικανό παρουσία δεσοξυριβονουκλεοτιδίων να «γεμίζει» 5' υπολειπόμενα άκρα που αφήνουν οι περιοριστικές πέψεις των περισσότερων ενζύμων. Η συνήθης αντίδραση περιλαμβάνει ένα ρυθμιστικό διάλυμα με pH: 8.0 και περιεκτικότητα σε MgCl₂ 10 mM, 5 μg/ml DNA, 0.1 mM, δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), και 150 u/ml ενζύμου. Η αντίδραση επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολουθεί θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου με επώαση στους 70°C. Το ίδιο ένζυμο είναι ικανό να υδρολύει τα 3' προεξέχοντα μονόκλιωνα άκρα που προκύπτουν από πέψεις περιοριστικών ενζύμων αρκεί στην παραπάνω τυπική αντίδραση να παραλειφθεί η προσθήκη δεσόξυ-νουκλεοτιδίων.

β. Με χρήση του ενζύμου Mung Bean Nuclease. Το ένζυμο αυτό έχει την ιδιότητα να περιορίζει τα μονόκλιωνα τμήματα του DNA και δεν εμφανίζει ειδικότητα στο αν τα μονόκλιωνα άκρα είναι 3' ή 5' προεξέχοντα. Το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις εκείνες όπου ήταν αναγκαία η αφαίρεση μονόκλωνου τμήματος από 5' υπολειπόμενο άκρο για λόγους διατήρησης, στις προκύπτουσες κατασκευές, του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου που μας ενδιέφερε. Η αντίδραση στην περίπτωση αυτή περιλαμβάνει 1 μg DNA, 1.0u ενζύμου, ρυθμιστικό διάλυμα (50mM sodium acetate pH 5.0, 30 mM NaCl, 1mM ZnCl₂). Η αντίδραση επωάζεται στους 30°C για 60 λεπτά και στην συνέχεια το ένζυμο απενεργοποιείται με προσθήκη 0.01% SDS ή με εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο (1:1).

γ. Αντίδραση σύνδεσης δύο μορίων DNA. Στις αντιδράσεις σύνδεσης (ligation) δύο μορίων DNA χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο λιγάση του βακτηριοφάγου T4. Στις περιπτώσεις όπου τα άκρα των δύο μορίων ήταν συμβατά, η συγκέντρωση του συνολικού DNA δεν ξεπερνούσε τα 50ng/μl αντίδρασης, για πλασμίδια μεσαίου μεγέθους (3-8kb), ενώ η ποσότητα της λιγάσης ήταν 5 Weiss units/μl. Η αντίδραση περιλαμβάνει 1 mM ATP. Στις αντιδράσεις συνένωσης ο υπολογισμός της ποσότητας φορέα/ενθέματος βασιζόταν στο να επιτευχθεί μοριακή αναλογία 1/5-1/10 (φορέας /ένθεμα) ανάλογα με το μέγεθός τους. Ο χρόνος επώασης της αντίδρασης ήταν 12-18 ώρες στους 16°C. Στις περιπτώσεις που τα άκρα ήταν τυφλά διατηρήθηκαν οι παραπάνω μοριακές αναλογίες αλλά η ποσότητα της λιγάσης διπλασιάστηκε. Οι παραπάνω διαδικασίες περιγράφονται αναλυτικά στους Sambrook et al. (220).

2.2.1.7 Ταυτοποίηση ανασυνδυνασμένων βακτηριακών κλώνων

Η ταυτοποίηση των βακτηριακών κλώνων γίνονταν με τρεις τρόπους:

- α) με χρωματική επιλογή που βασίζεται στην ενεργότητα της γαλακτοσιδάσης, αν αυτή παρέχονταν από το φορέα,
- β) ή με απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα και πέψη των ανασυνδυνασμένων πλασμιδίων με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα,
- γ) ή με *in situ* υβριδοποίηση των ανασυνδυνασμένων βακτηριακών κλώνων, μετά τη μεταφορά τους σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (GELMAN) και με ανιχνευτή το προς κλωνοποίηση ένθεμα (97).

2.2.1.8 Ραδιοσήμανση μορίων DNA

Για τη ραδιοσήμανση γραμμικών μορίων DNA ακολουθήθηκε η μέθοδος της σήμανσης με τυχαίους εκκινητές (random priming labelling). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη δημιουργία ραδιοσημασμένων τμημάτων DNA υψηλής ειδικής ενεργότητας (5×10^8 cpm/ μ g) και χρησιμοποιήθηκε σε ανάλυση κατά Northern. Η αναλυτική διαδικασία περιγράφεται από τους Sambrook et al. (220).

2.2.1.9 Ραδιοσήμανση μορίων RNA

Η ραδιοσήμανση μορίων RNA έγινε με *in vitro* μεταγραφή, χρησιμοποιώντας ως DNA-μήτρα γραμμοποιημένο, με κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο, πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο-ανιχνευτή. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη ραδιοσήμανση του γονιδίου της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού PVX202. Η αναλυτική διαδικασία περιγράφεται από τους Ausubel et al. (13).

2.2.1.10 Ανάλυση Northern

Η αρχή της μεθόδου περιλαμβάνει ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό του RNA σε αποδιατακτικό πήκτωμα αгарόζης (1.2%) παρουσία φορμαλδεΐδης (2.2M). Στα δείγματα RNA που ήταν διαλυμένα σε νερό προστίθονταν 2 όγκοι διαλύματος: 50% φορμαμίδη, 2.2 M φορμαλδεΐδη, 20 mM MOPS, 5 mM NaAc pH 7.0, 1 mM EDTA, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol και θερμαίνονταν για 5 min στους 65°C πριν την ηλεκτροφόρηση. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιείχε: 20 mM MOPS, 5 mM NaAc pH 7.0, 1 mM EDTA, 2.2 M φορμαλδεΐδη.

Στη συνέχεια τα RNA μεταφέρονταν σε νάυλον μεμβράνη GENESCREENTM/DU-PONT με τη χρήση περίσσειας διαλύματος μεταφοράς: 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.2.

Η ακινητοποίηση των αποδιαταγμένων μορίων RNA στη μεμβράνη γινόταν με έκθεση της σε ακτινοβολία UV (312 nm) και θέρμανση για 1 ώρα στους 80°C.

2.2.1.11 Υβριδοποιήσεις νουκλεϊκών οξέων

Οι υβριδοποιήσεις μεμβρανών με ακινητοποιημένα μόρια RNA έγιναν με βάση το πρωτόκολλο των Church και Gilbert (40). Σύμφωνα με τη μέθοδο οι μεμβράνες προϋβριδοποιούνται για τουλάχιστον δύο ώρες με διάλυμα που περιέχει 0.5 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.2, 7% SDS, 1% BSA, 1 mM EDTA. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης εξαρτάται από τη σύνθεση, το μέγεθος και την ομολογία των ανιχνευτών με την προς υβριδοποίηση αλληλουχία. Κατά κανόνα σε όλες σχεδόν τις

αναλύσεις η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή στους 65°C. Στη συνέχεια ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής (10⁶ cpm/ml διαλύματος υβριδοποίησης) αποδιατάσσεται για 5 min στους 100°C και ακολουθεί υβριδοποίηση στις ίδιες συνθήκες για 12-18 h. Τα πλύσιμο των μεμβρανών, για την αφαίρεση των μη ειδικά προσδεδεμένων ραδιοσημασμένων μορίων, γίνονταν σε διάλυμα 40 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.2, 5% SDS, 1 mM EDTA, στην ίδια θερμοκρασία υβριδοποίησης και στη συνέχεια ακολουθούσε αυτοραδιογραφία.

2.2.1.12 Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του DNA

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία δίκλωνων μορίων DNA προσδιορίζονταν με τη μέθοδο τερματισμού της επιμήκυνσης του DNA, λόγω ενσωμάτωσης τριφωσφορικών διδεοξυνουκλεοτιδίων (221). Σαν μήτρες χρησιμοποιήθηκαν υπερελικωμένες πλασμιδιακές κατασκευές, ενώ η σήμανση των μορίων έγινε με τη χρήση [³⁵S]-dATP. Στις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Sequenase version 2.0 από την USBC, η οποία είναι τροποποιημένη T7 DNA πολυμεράση. Η όλη διαδικασία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας οι οποίες περιέχονται στο σχετικό εγχειρίδιο (USB: Sequenase TM kit, Version 2.0).

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ορισμένων γονιδίων *hpr* έγινε από το εργαστήριο Μικροχημείας του IMBB.

2.2.1.13 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον πολλαπλασιασμό οποιασδήποτε αλληλουχίας DNA *in vitro*, με την χρήση μιας ελάχιστης ποσότητας DNA-μήτρας και δύο ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών που συνδέονται στις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες, εκατέρωθεν της αλληλουχίας DNA που ενδιαφέρει. Επίσης η μέθοδος αξιοποιεί την ικανότητα των DNA πολυμερασών από θερμοφίλους οργανισμούς να «αντέχουν» υψηλές θερμοκρασίες και έτσι να είναι λειτουργικές σε όλα τα στάδια της αντίδρασης, χωρίς να χάνουν την αποτελεσματικότητά τους να πολυμερίζουν το DNA.

Μία τυπική αντίδραση περιλαμβάνει 5 ng DNA μήτρας, 1X ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 100 μg/ml BSA), 0.2 mM δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), 0.5 Units Θερμο-σταθερής πολυμεράσης και 0.5 μM από κάθε ένα ολιγονουκλεοτίδιο-εκκινητή (primer). Η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αντιδράσεις ήταν η Deep Vent DNA πολυμεράση από την εταιρεία NEW ENGLAND BIOLABS. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιείται σε αυτόματο θερμοκυκλοποιητή και περιλαμβάνει τρία στάδια: Στο πρώτο στάδιο γίνεται αποδιάταξη των συστατικών με θέρμανση για 5 min στους 100°C. Το δεύτερο στάδιο το οποίο επαναλαμβάνεται 25-30 φορές περιλαμβάνει διαδοχικά στάδια αποδιάταξης, σύνδεσης των εκκινητών στις αλληλουχίες στόχους της μήτρας σε κατάλληλη θερμοκρασία, και επιμήκυνσης των νέων αλυσίδων στους 72°C. Σε ένα τρίτο στάδιο ακολουθεί η ολοκλήρωση των ήδη υπάρχοντων αλυσίδων στους 72°C για 5 min. Η θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών στις αλληλουχίες στόχους της μήτρας υπολογίζεται σύμφωνα με τον μαθηματικό τύπο :

$$Td = Tm - 13 \text{ και}$$

$Tm = 81.5 - 16.6(\log [Na^+]) + 41.5(\%G-C) - 600/N$ όπου N είναι ο αριθμός των βάσεων του εκκινητή. (Tm= Θερμοκρασία σημείου τήξης των εκκινητών).

2.2.2. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

2.2.2.1 Μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* με πλασμιδιακό DNA

Κύτταρα επιλεκτικά σε μετασχηματισμό παρασκευάστηκαν ως ακολούθως:

α. Προετοιμασία κυττάρων: Τα βακτήρια καλλιεργούνται σε καλλιέργεια των 100 ml σε κωνική φιάλη των 1000 ml, για επαρκή αερισμό, μέχρι οπτικής πυκνότητας 0.4 (595 nm). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2500 στροφές για 5 min στους 4°C, επανααιώρηση και επώαση για 20 min στους 4°C, σε 20 ml διαλύματος 100 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM CH₃COOK, 10 mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, pH 5.8. Στη συνέχεια τα βακτήρια ξαναφυγοκεντρώνονται και επανααιωρούνται σε 5 ml διαλύματος: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% γλυκερόλη, pH 7.0. Τα βακτήρια χρησιμοποιούνταν αμέσως ή αποθηκεύονταν στους -80°C σε κλάσματα των 200 μl.

β. Μετασχηματισμός κυττάρων: Τα βακτήρια που είχαν υποστεί την παραπάνω διαδικασία επωάζονταν για 20 min στους 4°C παρουσία του DNA με το οποίο θα μετασχηματιζόνταν, ακολουθούσε επώαση για 45 sec στους 42°C και αμέσως μετά μεταφέρονταν σε πάγο για 2 min. Τέλος επωάζονταν στους 37°C για 1h, μετά από προσθήκη θρεπτικού μέσου LB και επωάζονταν σε στερεό θρεπτικό μέσο LB που περιείχε τα κατάλληλα αντιβιοτικά.

2.2.2.2 Μετασχηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα

Για το μετασχηματισμό κυττάρων σακχαρομύκητα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος TRAF0, όπως περιγράφεται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο των Ausubel et al. (13).

Συνοπτικά μία αποικία εμβολιάζει 50 ml θρεπτικού διαλύματος YEP ή κατάλληλου διαλύματος SD συμπληρωμένου με τα κατάλληλα αμινοξέα και επωάζεται μέχρι τίτλου κυττάρων 2×10^7 /ml. Τα κύτταρα αραιώνονται σε καλλιέργειες των 50 ml και σε τίτλο 2×10^6 /ml. Η επώαση συνεχίζεται για 4-5 ώρες ακόμη στους 30°C με έντονη ανάδευση, μέχρι ο αριθμός των κυττάρων να φτάσει τα 2×10^7 . Στο σημείο αυτό τα κύτταρα συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται 5 λεπτά στις 3000 rpm και ξεπλένονται μία φορά με απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Στην συνέχεια τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος 0.1 M οξικού λιθίου (LiAc), ώστε ο τίτλος των κυττάρων να είναι 2×10^9 /ml. Τα κύτταρα μοιράζονται ανά 50 μl, φυγοκεντρώνονται και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται με την σειρά τα εξής:

240 μl 50% PEG 3.350

36 μl 1 M LiAc

50 μl 2 mg/ml Salmon Sperm DNA

10 μg DNA σε συνολικό όγκο 50 μl.

Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) μέχρι ομοιογενούς ανάμιξης και επώαση στους 30°C, για 30 λεπτά. Στην συνέχεια τα κύτταρα υφίστανται θερμικό shock στους 42°C για 25 λεπτά. Τέλος τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται, επαναδιαλύονται σε 150 μl αποστειρωμένου νερού και απλώνονται σε κατάλληλα τρυβλία επιλογής. Η επώαση διαρκεί 3 ημέρες για να εμφανισθούν τα κύτταρα, που έχουν υποστεί μετασχηματισμό.

2.2.2.3 Μεταφορά πλασμιδίων σε Αγροβακτήριο με τριγονική βακτηριακή σύζευξη

Η εισαγωγή πλασμιδίων στο αγροβακτηριακό στέλεχος C58C1 (pGV2260), για το γενετικό μετασχηματισμό των φυτών, έγινε με τριγονική σύζευξη (triparental mating) σύμφωνα με τους Rogers et al. (208). Ως βοηθητικό στέλεχος της σύζευξης (conjugational helper) χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος της *E.coli*, HB101 (pRK2013) (66). Η επιλογή των μετασχηματισμένων Αγροβακτηρίων έγινε σε στερεό θρεπτικό υλικό LB, παρουσία ριφαμυκίνης (50μg/ml), καναμυκίνης (50μg/ml) και καρμπενικιλίνης (50μg/ml).

2.2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ

2.2.3.1 Μετασχηματισμός δίσκων φύλλου καπνού

2.2.3.1.1 Γενικά

Τα διαλύματα, θρεπτικά μέσα και αντικείμενα που χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό των ασηπτικών ιστών, αποστειρώθηκαν είτε με κλιβανισμό ή διήθηση μέσω φίλτρου αποστείρωσης 0.22 μm, ή με εμβάπτιση σε 100% αιθανόλη ή έκθεση σε UV. Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν μέσα σε εστία νηματικής ροής.

2.2.3.1.2 Απολύμανση σπόρων καπνού

Για την ανάπτυξη φυτών σε ασηπτικές συνθήκες, οι σπόροι φυτών *Nicotiana tabacum* cv. Wincosin 38 απολυμάνθηκαν επιφανειακά με τον ακόλουθο τρόπο (109): εμβάπτιστηκαν για 10 sec σε 100% αιθανόλη, με συνεχή αλλά ήπια ανάδευση. Αμέσως μετά αναδεύτηκαν σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης 10% (w/w) για 15 min, και στη συνέχεια πλύθηκαν με τρεις διαδοχικές εμβάπτισεις των 5 λεπτών σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Αφού στεγνώθηκαν σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο MS-ριζοβολίας και σε αριθμό 10 σπόροι/τρυβλίο και επωάστηκαν στους 25°C με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι για να βλαστήσουν.

2.2.3.1.3 Απολύμανση φυτικών ιστών

Η απολύμανση φύλλων καπνού από μη-ασηπτικά ανεπτυγμένα φυτά, έγινε ως ακολούθως: τα φύλλα εμβάπτιστηκαν σε 70% αιθανόλη για 10 sec, με ταυτόχρονη ήπια ανάδευση. Αμέσως μεταφέρθηκαν σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης 10% και επωάστηκαν για 10 min. Στη συνέχεια πλύθηκαν 3 φορές επί 5 min με αποστειρωμένο-απιονισμένο νερό, τεμαχίστηκαν σε σχήμα δίσκων (1 cm διαμέτρου) και χρησιμοποιήθηκαν άμεσα για μετασχηματισμό.

2.2.3.1.4 Μετασχηματισμός δίσκων φύλλου καπνού με Αγροβακτήριο

Η μέθοδος αυτή μετασχηματισμού των φυτών περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Horsch et al. (109) και τροποποιήθηκε αργότερα από τους Deblaere et al. (50). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν ελαφρώς τροποποιημένη.

Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό ήταν ήδη μετασχηματισμένα με το γονίδιο *tetR* και στην παρούσα μελέτη μετασχηματίστηκαν με Αγροβακτήρια που έφεραν τρεις πλασμιδιακές κατασκευές: pBIN-Hyg-TX/HrpZ, pBIN-Hyg-TX/SP-HrpZ, και pBIN-Hyg-TX/ZprH (antisense).

Φύλλα από τα φυτά αυτά αφού απολυμάνθηκαν, με τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω, τεμαχίστηκαν σε δισκία και τοποθετήθηκαν προσωρινά σε υγρό θρεπτικό υλικό MS-συνκαλλιέργειας για 15 min. Παράλληλα η καλλιέργεια Αγροβακτηρίου, η οποία προηγουμένως είχε επωαστεί στους 28°C μέχρις οπτικής πυκνότητας 0.8 (600 nm), φυγοκεντρήθηκε, ξεπλύθηκε με υγρό θρεπτικό υλικό MS-συνκαλλιέργειας και τελικά τα κύτταρα επανααιωρήθηκαν στο ίδιο θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση 10⁹ κύτταρα/ml. Στο εναιώρημα αυτό εμβαπτίστηκαν οι δίσκοι φύλλων καπνού και επώαστηκαν υπό ήπια ανάδευση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια οι δίσκοι στεγνώθηκαν σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί και διαμοιράστηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό MS-συνκαλλιέργειας, με την πάνω επιφάνεια σε επαφή με το θρεπτικό μέσο. Τα τρυβλία επώαστηκαν στο σκοτάδι, για 48 ώρες, στους 25°C. Στη συνέχεια οι δίσκοι μεταφέρθηκαν σε τρυβλία με MS-επιλογής.

Οι δίσκοι μάρτυρες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, από τις οποίες η μία αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υλικό MS-συνκαλλιέργειας, παρουσία υγρομυκίνης (Hyg) και η άλλη αναπτύχθηκε στο ίδιο θρεπτικό υλικό, απουσία υγρομυκίνης. Όλα τα τρυβλία επώαστηκαν σε ειδικό θάλαμο, στους 25°C με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι επί 2 περίπου εβδομάδες. Σε όσους δίσκους εμφανίστηκαν όγκοι (tumors) έγινε τεμαχισμός τους έτσι ώστε οι διαφορετικοί όγκοι να διαχωριστούν μεταξύ τους πριν τη μεταφορά τους σε νέο θρεπτικό μέσο MS-επιλογής, όπου επώαστηκαν επί 2 περίπου εβδομάδες κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Όταν εμφανίστηκαν νεαροί βλαστοί στους όγκους πραγματοποιήθηκε μεταφορά τους σε τρυβλία με MS-επιμήκυνσης και νέα επώαση στις ίδιες συνθήκες για 2 περίπου εβδομάδες. Ακολούθησε αποκοπή των επιμηκυσμένων βλαστών (2 cm ύψους) από τους όγκους και μεταφορά τους σε διαφανή δοχεία με MS-επιμήκυνσης και νέα επώαση στις ίδιες συνθήκες για 2 περίπου εβδομάδες. Στη συνέχεια οι βλαστοί μεταφέρθηκαν σε διαφανή δοχεία με MS-ριζοβολίας και επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες μέχρι να εμφανιστούν ρίζες.

Στο στάδιο αυτό, αποκόπηκε από κάθε φυτάριο ένα φύλλο και επανεπιλέχτηκε σε MS-επιλογής για να επιβεβαιωθεί ο αναμενόμενος φαινότυπος Hyg^R για τα μετασχηματισμένα και Hyg^S για τα φυτά μάρτυρες. Το υπόλοιπο κάθε φυτού, αφού οι ρίζες του απαλλάχτηκαν προσεκτικά από το άγαρ, φυτεύθηκε σε γλάστρες. Αρχικά οι γλάστρες καλύφθηκαν με πλαστικές διαφανείς σακούλες, για τη διατήρηση περιβάλλοντος αυξημένης υγρασίας για 6 μέρες και σκληραγωγήθηκαν στις προαναφερθείσες συνθήκες σε επωαστικούς θαλάμους για 4-6 εβδομάδες, πριν μεταφερθούν στο θερμοκήπιο.

2.2.3.1.5 Πρόσληψη τετρακυκλίνης από τα μετασχηματισμένα φυτά

Η πρόσληψη τετρακυκλίνης από τα μετασχηματισμένα φυτά, ώστε να αποκατασταλεί η έκφραση του υπο μελέτη γονιδίου, έγινε με δύο τρόπους σύμφωνα με τους Gatz *et al.* (79, 80):

α) μέσω των ριζών: Μετασχηματισμένα φυτά 4 εβδομάδων τοποθετήθηκαν σε υδροπονική καλλιέργεια με θρεπτικό μέσο Hoagland παρουσία 10 mg/L

τετρακυκλίνη. Το θρεπτικό διάλυμα ανανεωνόταν κάθε δύο μέρες και η παροχή οξυγόνου στο υγρό γινόταν μέσω αντλίας.

β) μέσω των φύλλων: Φύλλα από μετασχηματισμένα φυτά βυθίστηκαν σε ένα δοχείο που περιείχε 10 mg/L τετρακυκλίνη σε 50 mM κιτρικό νάτριο pH 5.5 και τοποθετήθηκαν σε αντλία κενού για 3.5 min. Στη συνέχεια επώαστηκαν στο σκοτάδι για 6-18 ώρες, σε υγρό θρεπτικό μέσο MS, που περιείχε 10 mg/L τετρακυκλίνη.

2.2.3.2 Μόλυνση φυτών καπνού με τον ικό φορέα PVX202

Φυτά *Nicotiana benthamiana* 4 εβδομάδων, μολύνθηκαν με τον ιό PVX202 καθώς και με τις ανασυνδυασμένες κατασκευές, που δημιουργήθηκαν στην παρούσα μελέτη, σύμφωνα με τους Sablowski *et al.* (215). Η διαδικασία πραγματοποιείται με ήπιο τρίψιμο των φύλλων τα οποία έχουν σκονιστεί με carborundum και περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο τα φυτά μολύνονται με υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA και στο δεύτερο στάδιο με εκχύλισμα από τα ήδη μολυσμένα φυτά. Αρχικά λοιπόν, δύο φύλλα ανά φυτό μολύνονται το καθένα, με 5 μg υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA, σε 30μl διαλύματος 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7.0. Δύο εβδομάδες αργότερα, τα μολυσμένα φύλλα καθώς και τα ανώτερα φύλλα λειοτριβούνται χωριστά σε 0.5M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8.2. Το εκχύλισμα φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο χρησιμοποιείται είτε για ανάλυση πρωτεϊνών, είτε για νέα μόλυνση άλλων φυτών. Φαινοτυπικά η μόλυνση διαπιστώνεται με την εμφάνιση χλωρωτικών κηλίδων και βιοχημικά με ανίχνευση της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα ενάντια στην καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού.

2.2.4. ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ

2.2.4.1 Απομόνωση πρωτοπλαστών

Φύλλα από μη ασηπτικά ανεπτυγμένα φυτά *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση πρωτοπλαστών και απολυμάνθηκαν με τη διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω. Περίπου 2 gr φύλλων κόπηκαν σε λεπτές λωρίδες και επώαστηκαν σε 20 ml ενός διαλύματος απομόνωσης (πίνακας 7) που περιείχε ένζυμα για την αποδόμηση των κυτταρικών τοιχωμάτων (1% w/v cellulase “Onozuka” R-10 και 0.5% w/v Macerozyme R10). Η επώαση πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι στους 25°C για 8 ώρες. Μετά το τέλος του χρόνου επώασης, το ενζυμικό διάλυμα αντικαταστάθηκε με το ίδιο διάλυμα, αλλά χωρίς τα ένζυμα και ακολούθησε η απελευθέρωση των πρωτοπλαστών με ήπια ανάδευση (100 rpm). Στη συνέχεια οι πρωτοπλάστες διαχωρίστηκαν από τα μη αποδομημένα φύλλα με διήθηση μέσω γάζας. Το αιώρημα των πρωτοπλαστών τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένους σωλήνες φυγοκέντρησης και επάνω απ’ αυτό προστέθηκαν αργά 2 ml διαλύματος καλλιέργειας πρωτοπλαστών, ώστε να δημιουργηθεί διαβάθμιση δύο φάσεων (γλυκόζη-σακχαρόζη). Ακολούθησε φυγοκέντρηση σε κεφαλή φυγοκέντρου με κινητές θέσεις για 10 min στις 1100 rpm (Sorvall, DuPont, κεφαλή HB4). Μετά τη φυγοκέντρηση οι ακέραιοι πρωτοπλάστες επιπλέουν στη μεσόφαση (στρώμα μεταξύ γλυκόζης-σακχαρόζης), απ’ όπου συλλέγονται, μεταφέρονται σε νέους σωλήνες και επαναιωρούνται σε διάλυμα καλλιέργειας για την απομάκρυνση ιχνών ενζυμικών παρασκευασμάτων. Οι πρωτοπλάστες συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις ίδιες

συνθήκες και ο αριθμός τους υπολογίζεται με αιματοκυτταρόμετρο, χρησιμοποιώντας τη χρωστική Evan's blue.

2.2.4.2 Δοκιμή ποσοτικού προσδιορισμού H_2O_2 σε απομονωμένους πρωτοπλάστες μετά από προσθήκη χαρπίνης

Η παραγωγή H_2O_2 σε απομονωμένους πρωτοπλάστες καπνού, μετά από προσθήκη χαρπίνης, προσδιορίστηκε με βάση τη χημειοφωταύγεια της luminol, όπως περιγράφεται από τους Murphy και Huerta (176). Η δοκιμή έγινε σε συνολικό όγκο 2 ml που περιείχαν 0.2 ml διαλύματος 1 mM luminol, 0.1 μονάδες περοξειδάσης σε 20 mM φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος pH 7.4 και 10^4 /ml πρωτοπλάστες σε φιαλίδιο σπινθηρισμού (scintillation vial) (12). Το φιαλίδιο τοποθετήθηκε αμέσως σε φασματοφωτόμετρο σπινθηρισμού (LS 8000, Beckman) για ανίχνευση της χημειοφωταύγειας. Οι μετρήσεις καταγράφονται κάθε 15 sec για 1 min και οι τελευταίες δύο τιμές λήφθηκαν υπόψη στον υπολογισμό της χημειοφωταύγειας. Η συγκέντρωση του H_2O_2 υπολογίστηκε με βάση πρότυπη καμπύλη η οποία συσχετίζει τις τιμές χημειοφωταύγειας με γνωστές συγκεντρώσεις H_2O_2 .

2.2.4.3 Δοκιμή ποσοτικού προσδιορισμού O_2^- σε απομονωμένους πρωτοπλάστες μετά από προσθήκη χαρπίνης

Η παραγωγή του O_2^- προσδιορίστηκε από τη χημειοφωταύγεια της lucigenin, η οποία είναι ειδικός ανιχνευτής των O_2^- (44, 148). Η δοκιμή έγινε σε συνολικό όγκο 2 ml που περιείχαν 0.2 ml διαλύματος 1 mM lucigenin σε 0.1 M Gly-NaOH pH 9.0 με 1 mM EDTA και 10^4 /ml πρωτοπλάστες σε φιαλίδιο σπινθηρισμού (scintillation vial) (12). Το φιαλίδιο τοποθετήθηκε αμέσως σε φασματοφωτόμετρο σπινθηρισμού (LS 8000, Beckman) για ανίχνευση της χημειοφωταύγειας. Οι μετρήσεις καταγράφονται κάθε 6 sec για 1 min και οι τελευταίες δύο τιμές λήφθηκαν υπόψη στον υπολογισμό της χημειοφωταύγειας. Η συσσώρευση του O_2^- υπολογίστηκε με βάση πρότυπη καμπύλη η οποία έγινε με βάση το σύστημα xanthine/xanthine oxidase, όπως περιγράφεται από τους Murphy και Auh (177), προκειμένου να μετατραπούν οι τιμές χημειοφωταύγειας σε ρυθμούς παραγωγής. Σύμφωνα με την καμπύλη 10^6 cpm ισοδυναμούν με 38.21 ± 2.16 pmol O_2^- .

2.2.4.4 Δοκιμή έγχυσης καθαρισμένης χαρπίνης και πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, από φυτά μολυσμένα με τον ανασυνδυασμένο ιό PVX202/HrpZ, σε φύλλα καπνού

Η βιοδοκιμή αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της βιολογικής ενεργότητας της χαρπίνης που παράγεται από τα μολυσμένα φυτά με τον ανασυνδυασμένο ιό PVX202/HrpZ. Η διαδικασία πραγματοποιείται ως εξής: στην κάτω επιφάνεια του φύλλου γίνεται μια μικρή τρύπα με βελόνα σύριγγας ινσουλίνης και στη συνέχεια εγχύεται στο μεσοκυττάριο χώρο του φύλλου το περιεχόμενο της σύριγγας, στην οποία προηγουμένως έχει αφαιρεθεί η βελόνα. Κατά την έγχυση ο αέρας στο μεσοκυττάριο χώρο του μεσόφυλλου αντικαθίσταται από το περιεχόμενο της σύριγγας και η περιοχή έχει μια υδαρή εμφάνιση για 30-90 min και τελικά εξαφανίζεται. Ο έλεγχος εμφάνισης της HR γίνεται 24 ώρες αργότερα.

Με τη διαδικασία αυτή έγινε έγχυση καθαρισμένης χαρπίνης συγκέντρωσης 100μg/ml, πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από ιωμένα φυτά με PVX202, PVX202/HrpZ

και βακτηριακού εναιωρήματος ψευδομονάδων (*P.syringae* pv. *phaseolicola*). Στην περίπτωση έγχυσης ψευδομονάδων, τα βακτήρια καλλιεργούνται στους 30°C μέχρι τη λογαριθμική τους φάση ($OD_{600}=0.8$) στη συνέχεια φυγοκεντρώνται και επανααιωρούνται σε ρυθμιστικό 10 mM Tris-HCl pH 7.0. Πλύνονται από τα αντιβιοτικά και τα άλατα του θρεπτικού μέσου και καθορίζεται η συγκέντρωση τους φασματοφωτομετρικά στα 600 nm σε 10^8 cfu/ml και ακολουθεί αμέσως έγχυση τους με την παραπάνω διαδικασία.

Η βιοδοκιμή αυτή πραγματοποιήθηκε τόσο σε φυτά *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi όσο και σε *Nicotiana benthamiana*.

2.2.4.5 Μέτρηση ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης σε μετασχηματισμένα κύτταρα σακχαρομύκητα

Η δοκιμή της β-γαλακτοσιδάσης χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί φαινοτυπικά η αλληλεπίδραση πρωτεϊνών με το σύστημα των δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα. Όταν δύο χιμαιρικές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, ο μεταγραφικός ενεργοποιητής θα ανασυσταθεί λειτουργικά και θα ενεργοποιήσει τη μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς που διαθέτει, για το σκοπό αυτό, το στέλεχος του σακχαρομύκητα που χρησιμοποιείται. Τα γονίδια αναφοράς του στελέχους Y187 είναι *lacZ* και *HIS3*, ενώ το στέλεχος PJ69-4A διαθέτει ένα επιπλέον γονίδιο αναφοράς το *ADE2*. Τα γονίδια αυτά βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο υποκινητών, οι οποίοι έχουν αλληλουχίες που δεσμεύεται ο GAL4.

Η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης ανιχνεύτηκε με δύο τρόπους: α) με τη μέθοδο των φίλτρων, κατά την οποία οι αποικίες μεταφέρονται σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης, και στη συνέχεια εκτελείται η δοκιμή, χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα X-gal και β) με τη μέθοδο της υγρής καλλιέργειας, χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα ONPG.

Η πρώτη μέθοδος επιτρέπει μόνο ποιοτική ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης και επιπλέον το υπόστρωμα X-Gal είναι 10^6 φορές πιο ευαίσθητο απ' ό,τι το ONPG. Η δεύτερη μέθοδος έχει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει την ποσοτική εκτίμηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης και έτσι μπορεί να υπολογιστεί η ισχύς της αλληλεπίδρασης.

Οι αναλυτικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν καθώς και τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά στο σχετικό εγχειρίδιο της εταιρείας CLONTECH, "The Matchmaker system".

2.2.5 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

2.2.5.1 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα *E coli*

Κύτταρα από κορεσμένη βακτηριακή καλλιέργεια όγκου 2-5ml πλύνονται και επαναιωρούνται σε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 20% glycerol, 1 mM PMSF, 0.5 mM Leupeptin. Το εναιώρημα των βακτηρίων παγώνει σε υγρό άζωτο για 5 λεπτά και ξεπαγώνει στους 37°C για άλλα 5 λεπτά, τρεις φορές. Με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα λύνονται και οι πρωτεΐνες απελευθερώνονται στο διάλυμα. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στους 4°C στις 14000 rpm και συλλέγεται το υπερκείμενο. Τελικά τα ολικά πρωτεϊνικά κυτταρικά εκχυλίσματα διαμοιράζονται σε μικρές ποσότητες και φυλλάσσονται στους -20°C.

2.2.5.2 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα σακχαρομύκητα

Για την παραγωγή ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κύτταρα σακχαρομύκητα, μία καλλιέργεια επωάζεται σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο μέχρι η οπτική της πυκνότητα στα 600 nm να είναι μεγαλύτερη του 1. Στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 3000 rpm στους 25°C για 5 λεπτά. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 500-1000 μl διάλυμα λύσης 20 mM Tris-Cl pH:8, 400 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 10% glycerol, 7 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Antipain, 0.5 mM Leupeptin, 1 mM Aprotinin, 1 mM Pepstatin. και τους προσθέτονται 500-1000 μl υάλινα μικροσφαιρίδια (διαμέτρου 0.45 μm -0.55 mm) . Ακολουθεί έντονο ανακάτεμα για δύο τουλάχιστον λεπτά. Το υλικό φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στους 4°C, και στο υπερκείμενο προστίθεται κατάλληλος όγκος από κορεσμένο διάλυμα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3.9 M) ώστε η τελική συγκέντρωση του άλατος στο δείγμα να είναι 40%. Τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά, και στην συνέχεια φυγοκεντρώνονται στις 10⁴ rpm. Τα πρωτεϊνικά ιζήματα τα επαναδιαλύουμε σε 100-200 μl διαλύματος με σύσταση 10 mM HEPES-KOH pH:7.9, 5 mM EDTA, 7 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Antipain, 0.5 mM Leupeptin, 1 mM Aprotinin, 1 mM Pepstatin. Ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών στο διάλυμα.

2.2.5.3 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα ψευδομονάδας

Η απομόνωση ολικών πρωτεϊνών από το κυτταρικό κλάσμα καλλιεργειών ψευδομονάδας καθώς και από το υπερκείμενο έγινε σύμφωνα με τους Alfano et al (3), ως εξής: Κύτταρα ψευδομονάδας καλλιεργούνται σε 25 ml θρεπτικού μέσου King's B στους 30°C για 18 ώρες. Συλλέγονται με φυγοκέντρηση, πλύνονται και επαναιωρούνται σε 50 ml ελάχιστου θρεπτικού μέσου *hpr* (118)(για αποκαταστολή της έκφρασης των γονιδίων *hpr*) μέχρι οπτικής πυκνότητας 0.8 και συνεχίζεται η καλλιέργεια τους στις ίδιες συνθήκες, για διάφορα χρονικά διαστήματα (2-24 ώρες). Τα κύτταρα διαχωρίζονται σε κυτταρικό κλάσμα και υπερκείμενο με φυγοκέντρηση. Το υπερκείμενο διηθείται μέσω φίλτρων 0.2 μm για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα των κυττάρων και αμέσως προστίθεται 1 mM PMSF. Το υπερκείμενο συγκεντρώνεται με Centriprep-10 (Amicon) τουλάχιστον 10 φορές. Το κυτταρικό κλάσμα επαναιωρείται σε 1 mM MES pH 5.6, 1 mM PMSF και οι διαλυτές

πρωτεΐνες ελευθερώνονται με τρεις διαδοχικούς κύκλους ψύξης-απόψυξης ή με υπερήχους. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C στις 14000 rpm και συλλέγεται το υπερκείμενο (πρωτεϊνικό εκχύλισμα).

2.2.5.4 Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από φυτικά κύτταρα

Ο φυτικός ιστός κονιορτοποιείται παρουσία υγρού αζώτου σε γουδί λειοτρίβησης και μεταφέρεται σε προκατεψυγμένο σωλήνα φυγοκέντρησης. Για κάθε 1 gr ιστού προστίθεται διάλυμα εκχύλισης (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10 μM Leupeptin, 10% glycerol, 0.25% Triton X-100). Το δείγμα αναδεύεται με vortex και επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά, με περιοδική ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C στις 14000 rpm. Το υπερκείμενο συλλέγεται, διαμοιράζεται σε μικρές ποσότητες, και φυλλάσσονται στους -20°C.

2.2.5.5 Μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού των πρωτεϊνών

Η μέτρηση των πρωτεϊνών έγινε είτε με τη μέθοδο BRADFORD (32) ή με τη μέθοδο LOWRY(158) όπως περιγράφεται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο (13).

2.2.5.6 Ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε σε αποδιατακτικά πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (139). Το πήκτωμα ανάλυσης (resolving gel) περιείχε 12-17% πολυακρυλαμίδη (ανάλογα με το μέγεθος της αναλυόμενης πρωτεΐνης), 375 mM Tris pH 8.8, 0.1% SDS, ammonium persulfate και TEMED. Το πήκτωμα επιστοίβασης (stacking gel) περιείχε 4% πολυακρυλαμίδη, 125 mM Tris pH 6.8, 0.1% SDS, ammonium persulfate και TEMED. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιείχε 25 mM Tris, 192 mM Glycine pH 8.0 και 0.1% SDS. Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος: 100 mM Tris pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol, θερμαίνονται στους 100°C για 5 min και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι 20 mA ανά πήκτωμα, μέχρι το μέτωπο να φθάσει στο πήκτωμα ανάλυσης και 30 mA στη διάρκεια της ανάλυσης σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης οι ολικές πρωτεΐνες ανιχνεύονται χρωματικά είτε με χρώση Coomassie Brilliant blue R-250 ή με χρώση νιτρικού αργύρου, ενώ ειδικές πρωτεΐνες ανιχνεύονται μετά τη μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος.

2.2.5.7 Ανίχνευση ολικών πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Για την ανίχνευση ολικών πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης ακολουθήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι:

α) Χρώση Coomassie Brilliant blue R-250: Το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα 50% μεθανόλης, 10% οξικό οξύ, 0.002% Coomassie Brilliant blue R-250 για 1-2 ώρες με ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί αποχρωματισμός του πηκτώματος σε διάλυμα 50% μεθανόλης, 10% οξικού οξέος μέχρι οι πρωτεϊνικές ζώνες να γίνουν ορατές και στη συνέχεια διατηρείται σε 0.07% οξικό οξύ, 7% γλυκερόλη ή ξηραίνεται.

β) Χρώση νιτρικού αργύρου: Η ικανότητα ανίχνευσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο αυτή είναι μεγαλύτερη απ' ό,τι με τη μέθοδο Coomassie, και πλησιάζει το όριο

ανίχνευσης της ανάλυσης Western που είναι το 1ng πρωτεΐνης. Το πήκτωμα επωάζεται με ήπια ανάδευση για 2 ώρες σε διάλυμα 10% οξικού οξέος, 50% μεθανόλης. Ακολουθεί επώαση με ήπια ανάδευση για 10 λεπτά σε διάλυμα “οξειδωσης” (σε 1 lt διαλύματος αναμιγνύονται 1g $K_2Cr_2O_7$ και 400 ml HNO_3 65%), ενώ στην συνέχεια για τρία δεκάλεπτα ξεπλένεται με απιονισμένο νερό. Ακολούθως το πήκτωμα επωάζεται σε διάλυμα 2gr/lt $AgNO_3$, για 20-30 λεπτά. Ακολουθούν σύντομες πλύσεις με απιονισμένο νερό και προσθήκη του διαλύματος «εμφάνισης» 28 gr/lt Na_2CO_3 , 0.018% φορμαλδεΐδης. Η προσθήκη του διαλύματος αυτού γίνεται με έντονη ανάδευση και ανανεώνεται κάθε μισό λεπτό. Το πήκτωμα μετά τη χρώση επωάζεται σε διάλυμα 2% γλυκερόλης και 5% οξικού οξέος για 30 λεπτά και ξηραίνεται σε αντλία κενού. Οι χρόνοι επώασης είναι ανάλογοι του πάχους του πηκτώματος. Εδώ όπου αναφέρονται αφορούν πηκτώματα πάχους 1.5 mm.

2.2.5.8 Ανάλυση Western

Η ανάλυση Western περιλαμβάνει τη μεταφορά πρωτεϊνών από πηκτώματα ακρυλαμιδίου σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης και την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών με χρήση κατάλληλου αντισώματος.

Κατά τη διαδικασία αυτή 5-10 μg ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αναλύεται σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου, κατά το σύστημα Laemmli. Στην συνέχεια ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ηλεκτροαποτύπωση (electroblotting). Κατά τη διαδικασία αυτή τοποθετείται το πήκτωμα ακρυλαμιδίου και η μεμβράνη εν τω μέσω δύο ηλεκτροδίων γραφίτη εμποτισμένων με διάλυμα 25 mM Tris base, 192 mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη. Εφαρμόζεται τάση στα ηλεκτρόδια σύμφωνα με τον αριθμητικό τύπο $0.8 \text{ mA} \times \text{cm}^2$ για 90 λεπτά, και στην συνέχεια η μεμβράνη ξηραίνεται στον αέρα. Η μεμβράνη εμβαπτίζεται (προαιρετικά) σε διάλυμα 0.1% οξικού οξέος, 1% Ponceau S, για να διαπιστωθεί η πλήρης μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη νιτροκυτταρίνη. Ακολουθούν τρεις πλύσεις με αραιό διάλυμα οξικού οξέος, και η μεμβράνη μπορεί σε αυτό το στάδιο να φωτογραφηθεί. Η χρωστική Ponceau απομακρύνεται στην συνέχεια με διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα TBS: 100 mM Tris-Cl pH:7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης στο παραπάνω διάλυμα συμπληρωμένο με 3% BSA ή 5% σκόνη γάλακτος, για 30-60 λεπτά, ενώ στην συνέχεια προστίθεται το κατάλληλο κάθε φορά αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση. Η επώαση με το αντίσωμα γίνεται σε ένα χρονικό διάστημα 1-2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου ή 8-12 ώρες στους 4°C. Ακολουθούν τρεις πλύσεις των 10 λεπτών με περίσσεια διαλύματος TBS, και στην συνέχεια στο ίδιο διάλυμα προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα για ένα διάστημα 60 λεπτών. Μετά το τέλος της διαδικασίας αυτής ακολουθούν πλύσεις με TBS για δύο εικοσάλεπτα. Ακολουθεί η διαδικασία εμφάνισης ανάλογα με το ένζυμο που είναι προσδεμένο στο δεύτερο αντίσωμα. Σε όλες τις περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκε ως δεύτερο αντίσωμα anti-IgG-Alkaline phosphatase (PROMEGA). Η πρόσδεση του δεύτερου αντισώματος πιστοποιείται είτε χρωματικά ή με χημειοφωταύγεια ανάλογα με τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται:

α) Χρωματική ανίχνευση: Η αντίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης πραγματοποιείται σε διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης (100 mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 100 mM Tris pH 9.5) με την προσθήκη των υποστρωμάτων NBT (66μl/10ml) και BCIP (33 μl/10ml). Η αντίδραση ολοκληρώνεται συνήθως σε 30-60 λεπτά.

β) Μέθοδος χημειοφωταύγειας: Η μέθοδος αυτή ανιχνεύει το φως που προκαλείται από την αντίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης με τη χρήση

κατάλληλου αντιδραστηρίου. Στην παρούσα μελέτη το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το CSPD (BOEHRINGER). Το πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι το σήμα είναι 100 φορές πιο ενισχυμένο από τις συμβατικές μεθόδους χρώσης. Η ανίχνευση του σήματος γίνεται με αυτοραδιογραφία και με τη χρήση κατάλληλων φιλμ. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι σύμφωνο με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας.

2.2.5.9 Παρασκευή Αντισωμάτων

α) Παρασκευή αντισώματος anti-HrpZ_{Psp}: Πολυκλωνικό αντίσωμα εναντίον της καθαρισμένης πρωτεΐνης HrpZ παρασκευάστηκε σε κουνέλι Νέας Ζηλανδίας. Η πρωτεΐνη καθαρίστηκε από *E.coli*, από το εργαστήριο κρυσταλλογραφίας του IMBB (Μ.Κοκκινίδη). Αρχικά έγινε ένεση στο κουνέλι με καθαρισμένη χαρπίνη (HrpZ), περίπου 350 μg. Η δεύτερη ένεση (1η υπενθύμιση) έγινε 15 μέρες αργότερα, χρησιμοποιώντας την ίδια ποσότητα πρωτεΐνης, γαλακτοματοποιημένη με ανοσοενισχυτικό του Freund σε μια αναλογία 1:1. Ακολούθησαν άλλες δύο ενέσεις (2η και 3η υπενθύμιση). Τρεις εβδομάδες μετά από κάθε υπενθύμιση γίνονταν αφαιμάξη, ενώ μετά την 3η υπενθύμιση έγιναν τρεις αφαιμάξεις. Ο τίτλος του αντισώματος στον ορό προσδιοριζόταν με ELISA. Μη άνοσος ορός συλλέχθηκε από το κουνέλι πριν από την ανοσοποίηση.

β) Παρασκευή αντισωμάτων anti-HrcQa και anti-HrcQb: Ο καθαρισμός και η παρασκευή των αντισωμάτων έγινε από το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του IMBB του Τ.Οικονόμου.

2.2.5.10 *In vivo* σήμανση πρωτεϊνών με ³⁵S-Met σε κύτταρα *E.coli*

Η σήμανση των πρωτεϊνών με ραδιενεργή μεθειονίνη (³⁵S]-Methionine) σε *E.coli*, έγινε με το σύστημα που βασίζεται στην T7 RNA πολυμεράση, όπως περιγράφεται από τους Tabor και Richardson (233). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση πρωτεϊνών Hrp, τα γονίδια των οποίων είχαν υποκλωνοποιηθεί σε φορείς έκφρασης pT7-7 ή pET16b, στους οποίους η μεταγραφή των γονιδίων γίνεται από την T7 RNA πολυμεράση.

Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα: Κύτταρα *E.coli*, που περιέχουν πλασμιδιακές κατασκευές pT7-7/Hrp ή pET16b/Hrp, καλλιεργούνται σε LB παρουσία των απαραίτητων αντιβιοτικών, στους 30°C, μέχρι το μέσον της εκθετικής φάσης (OD₆₀₀=0.5). Στο σημείο αυτό 2 ml από την καλλιέργεια φυγοκεντρώνται στις 14000 rpm για 1 min και τα κύτταρα κατακρημνίζονται. Το ίζημα πλύνεται δύο φορές με θρεπτικό μέσο M9 και τελικά επαναιωρείται στον ίδιο όγκο σε θρεπτικό μέσο M9, εμπλουτισμένο με 20μg/ml θειαμίνη και 0.01% w/v μίγματος 19 αμινοξέων (εκτός από μεθειονίνη) και τα βακτήρια καλλιεργούνται στους 30°C για 1 ώρα. Προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM και η καλλιέργεια των βακτηρίων συνεχίζεται στις ίδιες συνθήκες για 30 min. Προστίθεται rifampicin σε τελική συγκέντρωση 200 μg/ml, για να ανασταλεί η λειτουργία των RNA πολυμερασών του βακτηρίου, ενώ η λειτουργία της T7 RNA πολυμεράσης δεν αναστέλλεται γιατί είναι ανθεκτική στο αντιβιοτικό. Μ' αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται εκλεκτική έκφραση και σήμανση της υπό μελέτη πρωτεΐνης, το γονίδιο της οποίας μεταγράφεται από την T7 RNA πολυμεράση. Για

την αποτελεσματική είσοδο της rifampicin στα κύτταρα, τα βακτήρια επωάζονται στους 42°C για 10 λεπτά και μετά μεταφέρονται στους 30°C για άλλα 20 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 2 µl ραδιενεργής μεθειονίνης (20µCi, Amersham) και τα κύτταρα επωάζονται για 5 λεπτά στους 30°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνών με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.5.1. Τα δείγματα αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, το οποίο στη συνέχεια ξηραίνεται και εκτίθεται σε φιλμ για αυτοραδιογραφία.

2.2.5.11 *In vitro* μεταγραφή και μετάφραση

In vitro μεταγραφή και μετάφραση cDNA μορίων από υπερελικωμένα πλασμίδια έγινε με το συζευγμένο σύστημα μεταγραφής/μετάφρασης (TNT, PROMEGA) σε λύμα δικτυοερυθροκυττάρων κουνελιού. Συνοπτικά, 1µg ανασυνδυασμένου πλασμιδίου, που πρόκειται να μεταγραφεί, προστίθεται στο μίγμα αντίδρασης (50 µl):

Μίγμα αντίδρασης:	Όγκος
TNT λύμα δικτυοερυθροκυττάρων κουνελιού	25 µl
TNT ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης	2 µl
T7 RNA πολυμεράση	1 µl
Rnasin, αναστολέας ριβονουκλεασών	1 µl
1mM μίγματος αμινοξέων (εκτός μεθειονίνη)	4 µl
³⁵ S-Μεθειονίνη (10mCi/ml)	4 µl
Πλασμίδιο	1 µg
Νερό	μέχρι 50 µl

Η αντίδραση επωάζεται στους 30°C για 60-90 λεπτά. Τα προϊόντα της μετάφρασης αναλύονται σε SDS-αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Το πήκτωμα ξηραίνεται και στη συνέχεια εκτίθεται σε φιλμ για αυτοραδιογραφία.

Σε ορισμένα πειράματα στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκαν οι πρωτεϊνικοί αναστολείς:

Πρωτεϊνικός αναστολέας	Τελική συγκέντρωση
Antipain dihydrocholate	74 µM
Bestatin	130 µM
Chymostatin	100 µM
E-64	10 µM
Leupeptin	4 µM
Pepstatin	1 µM
Phosphoramidon	0.1 mM
Petabloc	1 mM
EDTA-Na ₂	1 mM
Aprotinin	0.1 µM
PMSF	1 mM

2.2.5.12 *In vitro* ανάλυση αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Far western.

Η μέθοδος Far western επιτρέπει την ανίχνευση πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Η επιλογή του Far western, ως μεθόδου για τον έλεγχο των αλληλεπιδράσεων βασίστηκε σε τέσσερις λόγους: 1) Παρέχει άμεση απόδειξη της αλληλεπίδρασης, 2) επιτρέπει αξιόπιστη σύγκριση μεγάλων αριθμών δειγμάτων, 3) απαιτεί καθαρισμό μίας μόνο ή δύο πρωτεϊνών σε μια αλληλεπίδραση, οπότε αντιμετωπίζονται τα προβλήματα μη επαρκούς έκφρασης ή δυσκολίας καθαρισμού και 4) σε αντίθεση με το σύστημα των δύο υβριδίων, μπορούν να ελεγχθούν περισσότερες των δύο πρωτεϊνών σε μια αλληλεπίδραση. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Οι πρωτεΐνες αναλύονται σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, παρουσία SDS και στη συνέχεια μεταφέρονται σε μεμβράνες PVDF, με ηλεκτρομεταφορά σε διάλυμα 25 mM Tris base, 192 mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη. Στη συνέχεια, η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα FW (20 mM Tris pH 7.5, 60 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 0.02% NP-40, 5% glycerol), συμπληρωμένο με 5% σκόνη γάλακτος, για 60 min. Ακολουθούν τρεις πλύσεις των 5 min με περίσσεια διαλύματος FW και στη συνέχεια προστίθεται η ραδιενεργά σημασμένη πρωτεΐνη σε διάλυμα FW συμπληρωμένο με 2% BSA και επωάζεται στους 4°C για 12-16 h. Μετά το τέλος της επώασης η μεμβράνη πλύνεται τρεις φορές με περίσσεια διαλύματος FW και ακολουθεί αυτοραδιογραφία.

2.2.5.13 Έκφραση και καθαρισμός πρωτεϊνών από στήλη συγγενείας Ni-NTA αγαρόζης

Η έκφραση πρωτεϊνών Hpr, τα γονίδια των οποίων είχαν υποκλωνοποιηθεί στο φορέα έκφρασης pET16b, έγινε σε κύτταρα *E.coli* του στελέχους BL21(DE3)plyS.

Τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε θρεπτικό υλικό LB (100 ml), παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών, στους 37°C μέχρις οπτικής πυκνότητας OD₆₀₀=0.5-0.7. Στη συνέχεια επαγόταν η έκφραση του γονιδίου με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Η καλλιέργεια επωαζόταν στους 30°C για 1-3 h και ακολούθως τα κύτταρα κατακρημνίζονταν με φυγοκέντρωση στις 5000 στροφές για 20 min. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιούνταν σε αποδιατακτικές ή μη αποδιατακτικές συνθήκες, ανάλογα με την πρωτεΐνη, που παρήγαγαν. Έτσι, τα κύτταρα λύνονταν στο κατάλληλο διάλυμα με τρεις διαδοχικούς κύκλους ψύξης/απόψυξης. Επακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 12000 x g για 20 min, ώστε να απο το υπερκείμενο.

Στη συνέχεια, ακολουθούσε ο καθαρισμός της πρωτεΐνης από το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα με εφαρμογή του σε στήλη Ni-NTA αγαρόζης, σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας QIAGEN, οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά στο σχετικό εγχειρίδιο "The QIAexpressionist". Συνοπτικά η όλη διαδικασία είναι η ακόλουθη:

Σε κυτταρικό εκχύλισμα 2ml προστίθενται 500μl από 50% αιώρημα Ni-NTA αγαρόζης και το μίγμα αναδεύεται στους 4°C (μη-αποδιατακτικές συνθήκες) ή σε θερμοκρασία δωματίου (αποδιατακτικές συνθήκες), για 60 min. Πριν την προσθήκη του κυτταρικού εκχυλίσματος, η κολώνα εξισσοροπείται με κατάλληλο διάλυμα, ανάλογα με τις συνθήκες καθαρισμού. Στη συνέχεια, το μίγμα εφαρμόζεται σε στήλη μήκους 10 cm και διατομής 3 mm, με το κάτω άκρο κλειστό, μέχρι η αγαρόζη να πακεταριστεί. Τότε, απομακρύνεται το πόμα και συλλέγεται το πρώτο κλάσμα (FT, flow through). Η στήλη πλένεται δύο φορές με κατάλληλο διάλυμα και ακολουθεί η έκλυση της πρωτεΐνης με ιμιδαζόλιο, στην περίπτωση των μη αποδιατακτικών

συνθηκών ή σε όξινο pH, στις περιπτώσεις αποδιατακτικών συνθηκών. Τα κλάσματα αναλύονται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί χρώση με Coomassie Blue R250 και ανάλυση western με το αντίσωμα anti-His-AP-conjugate (QIAGEN), προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ταυτότητα της πρωτεϊνικής ζώνης.

2.2.5.14 Αμινοτελική αλληλούχιση των δύο μορφών της πρωτεΐνης HrpZ

Για την αμινοτελική αλληλούχιση των δύο μορφών της χαρπίνης, 2 μg καθαρισμένης πρωτεΐνης από *E.coli*, αναλύθηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και μεταφέρθηκαν με ηλεκτροαποτύπωση σε μεμβράνη PVDF. Η μεμβράνη εμβαπτίστηκε σε διάλυμα: 0.1% Coomassie blue, 50% μεθανόλης και επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε αποχρωματισμός της μεμβράνης σε διάλυμα 50% μεθανόλης, 10% οξικού οξέος μέχρις οι πρωτεϊνικές ζώνες να γίνουν ορατές και στη συνέχεια αφέθηκε να στεγνώσει. Η αμινοτελική αλληλούχιση έγινε στο τμήμα Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου NewCastle, (University of NewCastle, Molecular Biology, UNIT, England).

2.2.5.15 Ανάλυση με τη βοήθεια των ηλεκτρονικών υπολογιστών

Η ανάλυση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών έγινε με κατάλληλα προγράμματα που βρίσκονται στις διευθύνσεις του παγκόσμιου ιστού (world wide web):

<http://www.expasy.ch>,

<http://www.biochem.ucl.ac.uk>,

<http://www.toulouse.inra.fr>,

<http://www.cbs.dtu.dk>,

<http://www.blocks.fhrc.org>,

<http://www.pdb.bnl.gov>,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>,

<http://www.fmi.ch>,

<http://www.motif.genome.ad.jp>.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Διερεύνηση του μοριακού μηχανισμού δράσης της χαρπίνης στην αντίδραση υπερευαισθησίας με νέες στρατηγικές προσεγγίσεις

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πολλά φυτοπαθογόνα Gram-αρνητικά βακτήρια προκαλούν δύο τύπους νέκρωσης, όταν μολύνουν ένα φυτό. Σε ευπαθείς ποικιλίες των ξενιστών τους προκαλούν νέκρωση σε μια περίοδο μερικών ημερών, η οποία επεκτείνεται σε όλο το φυτό, καθώς τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται και τελικά το φυτό εκδηλώνει ασθένεια. Αντίθετα, σε ανθεκτικές ποικιλίες των ξενιστών τους ή σε φυτά, που δεν είναι ξενιστές τους, προκαλούν μια τοπική νέκρωση μέσα σε ένα διάστημα 24-48 h, ενώ ταυτόχρονα ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων αναστέλλεται και έτσι εμποδίζεται η διάδοση των βακτηρίων στο φυτό και η εκδήλωση ασθένειας. Η αντίδραση αυτή των ανθεκτικών φυτών έναντι στα φυτοπαθογόνα βακτήρια ονομάζεται αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) και αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μηχανισμούς άμυνας των φυτών. Η ικανότητα των βακτηρίων να πυροδοτούν την HR οφείλεται σε μια ομάδα γονιδίων που ονομάζεται *hrp*, τα οποία απαιτούνται για την παραγωγή και έκκριση πρωτεϊνών, οι οποίες πυροδοτούν την αντίδραση υπερευαισθησίας στο φυτό. Εκκρινόμενες πρωτεΐνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια τόσο των φυτοπαθογόνων βακτηρίων όσο και των ζωικών παθογόνων.

Η πρώτη πρωτεΐνη Hrp, που βρέθηκε να εκκρίνεται από τα φυτοπαθογόνα βακτήρια ήταν η χαρπίνη από την *E. amylovora*. Μεταλλαγές στο γονίδιο της (*hrpN*) καταργούσαν, τόσο την ικανότητα της *E. amylovora* να πυροδοτεί την HR σε φυτά-μη ξενιστές όσο και την εκδήλωση ασθένειας σε ευπαθείς ποικιλίες του ξενιστή της. Παρόμοιες πρωτεΐνες απομονώθηκαν αργότερα και από άλλα βακτήρια (*P.s. p.v. syringae* (HrpZ), *R. solanacearum* (PopA1)). Οι πρωτεΐνες αυτές, εκτός του ότι είχαν ορισμένα κοινά γενικά χαρακτηριστικά, είχαν την ικανότητα, σε καθαρισμένη μορφή, να προκαλούν τοπική νέκρωση (HR), όταν εγχύνονταν σε υψηλές συγκεντρώσεις, στους μεσοκυττάριους χώρους των φύλλων σε φυτά μη-ξενιστές. Έτσι, η αποκάλυψη ότι οι πρωτεΐνες αυτές εκδηλώνουν θνησιγόνο δράση, απουσία βακτηρίων, διευκόλυνε τη μελέτη των μοριακών και βιοχημικών γεγονότων που

συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης υπερευαισθησίας και έδωσε τη δυνατότητα να ξεκινήσει μια πιο συστηματική μελέτη του μηχανισμού δράσης των πρωτεϊνών αυτών.

Στόχος λοιπόν της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί ο ρόλος της χαρπίνης, από το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, κατά την αντίδραση υπερευαισθησίας, καθώς και ο μηχανισμός δράσης της. Η καταλληλότερη προσέγγιση για τη μελέτη των παραπάνω μηχανισμών ήταν η έκφραση της πρωτεΐνης στο φυτό, γιατί έτσι παρέχεται η δυνατότητα να διαλευκανθούν μερικά από τα ερωτήματα που αφορούν το ρόλο και το μηχανισμό δράσης της στην αντίδραση υπερευαισθησίας, όπως:

1) μπορεί η ενδογενής παραγωγή της χαρπίνης στα φυτά να υποκαταστήσει το ρόλο της ή όχι, δεδομένου ότι η χαρπίνη εκκρίνεται από τα βακτηριακά κύτταρα και σε καθαρισμένη μορφή μπορεί να ενεργοποιήσει την HR.

2) επειδή οι χαρπίνες επιδρούν στα φυτικά κύτταρα απέξω, τίθεται το ερώτημα αν η πρωτεΐνη εισέρχεται στο φυτικό κύτταρο πριν προκαλέσει HR ή αν αλληλεπιδρά με ένα μεμβρανικό υποδοχέα του φυτικού κυττάρου και

3) τι φαινότυπο εκφράζουν μετασχηματισμένα φυτά, που παράγουν ενδογενώς χαρπίνη σε ενεργή μορφή; Αν η ενδογενώς παραγόμενη χαρπίνη προκαλεί ένα ορατό νεκρωτικό φαινότυπο στο φυτό, τότε παρέχεται η δυνατότητα να δημιουργηθούν μεταλλαγμένα φυτά, που δεν νεκρώνονται. Η μελέτη των μεταλλαγών αυτών θα αποκάλυπτε τα συστατικά εκείνα του φυτού, που συμμετέχουν στο βιοχημικό μονοπάτι της HR. Τέλος, μια άλλη δυνατότητα είναι η χρησιμοποίηση του γονιδίου της χαρπίνης σε στρατηγικές επαγόμενου κυτταρικού θανάτου, οι οποίες στοχεύουν στη δημιουργία μετασχηματισμένων φυτών, που είναι ανθεκτικά σε ασθένειες.

3.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

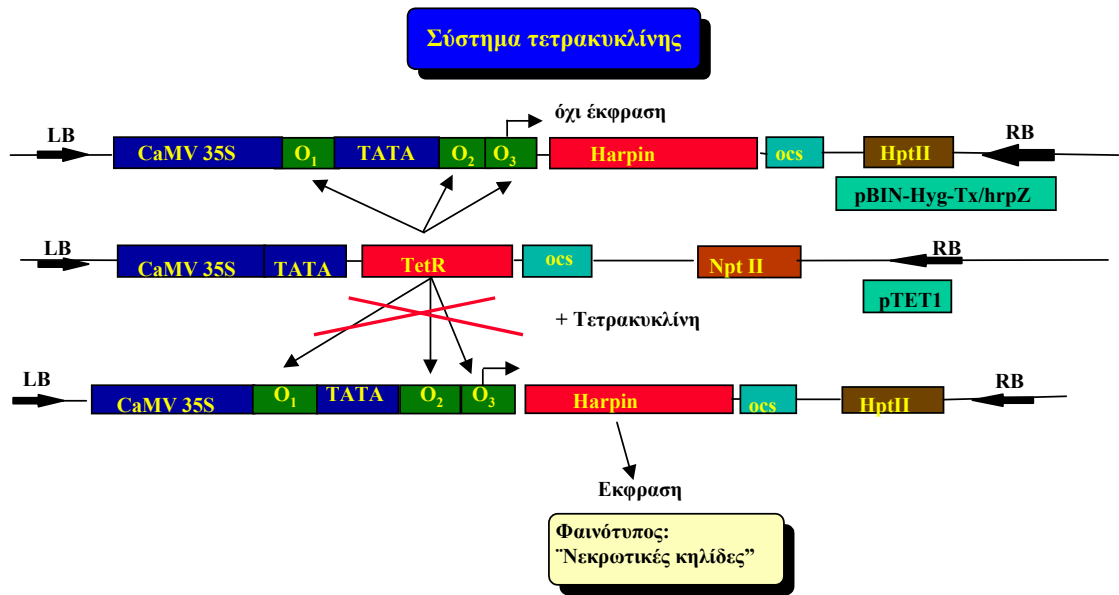
ΕΝΟΤΗΤΑ Α: Έκφραση του γονιδίου *hrpZ* σε φυτά και σακχαρομύκητα.

3.2.1. Ρυθμιζόμενη έκφραση του γονιδίου *hrpZ_{P_{sp}}* σε σταθερά μετασηματισμένα φυτά καπνού

Με βάση το γεγονός ότι καθαρισμένη χαρπίνη έχει την ικανότητα να πυροδοτεί την αντίδραση υπερευαισθησίας μετά από έγχυσή της στον αποπλάστη φύλλων καπνού, επιχειρήθηκε να ελεγχθεί αν η έκφραση της χαρπίνης στο φυτό μπορεί να προκαλέσει νέκρωση. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά φυτά καπνού, που έκφραζαν το γονίδιο *hrpZ_{P_{sp}}* της *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Επειδή καθαρισμένη πρωτεΐνη προκαλεί τοπική νέκρωση, όταν εγχύνεται στους μεσοκυττάριους χώρους φύλλων καπνού, κρίθηκε σκόπιμο η έκφραση του γονιδίου της να βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός ρυθμιζόμενου συστήματος, γιατί η συνεχής έκφραση του (constitutive expression) πιθανόν να ήταν θνησιγόνος, οπότε θα υπήρχε πρόβλημα αναγέννησης των φυτών. Ως ρυθμιζόμενο σύστημα έκφρασης χρησιμοποιήθηκε το χημικά ρυθμιζόμενο σύστημα τετρακυκλίνης (79, 80).

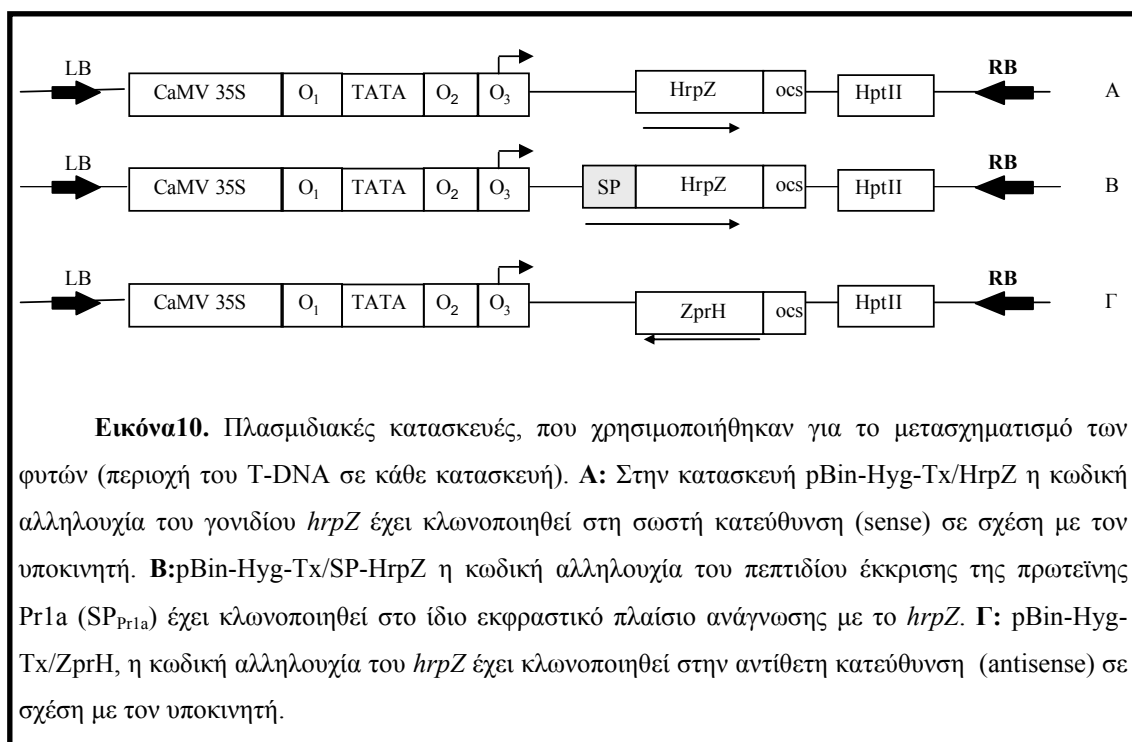
Το σύστημα αυτό απαιτεί την έκφραση δύο γονιδίων στο φυτό: το ένα γονίδιο κωδικοποιεί το βακτηριακό καταστολέα TetR, και εκφράζεται συνεχώς υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού συστατικού υποκινητή, 35S του ιού της μωσαϊκής του κουνουπιδιού (CaMV35S). Το υπό μελέτη γονίδιο εκφράζεται υπό τον έλεγχο ενός τροποποιημένου υποκινητή CaMV35S, που περιέχει 3 θέσεις του tet operator (Triple-Op promoter), στις οποίες δεσμεύεται ο καταστολέας TetR, απουσία τετρακυκλίνης και εμποδίζει την έκφραση του γονιδίου. Παρουσία τετρακυκλίνης ο καταστολέας απενεργοποιείται με δέσμευση του στην τετρακυκλίνη και έτσι αποκαταστέλλεται η έκφραση του γονιδίου (Εικ. 9).

Έτσι για τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών, το γονίδιο της χαρπίνης, *hrpZ_{P_{sp}}*, κλωνοποιήθηκε μεταξύ του τροποποιημένου υποκινητή CaMV35S και ενός πολυαδενυλικού σήματος (ocs), στο φορέα έκφρασης pBin-Hyg-Tx. Επίσης



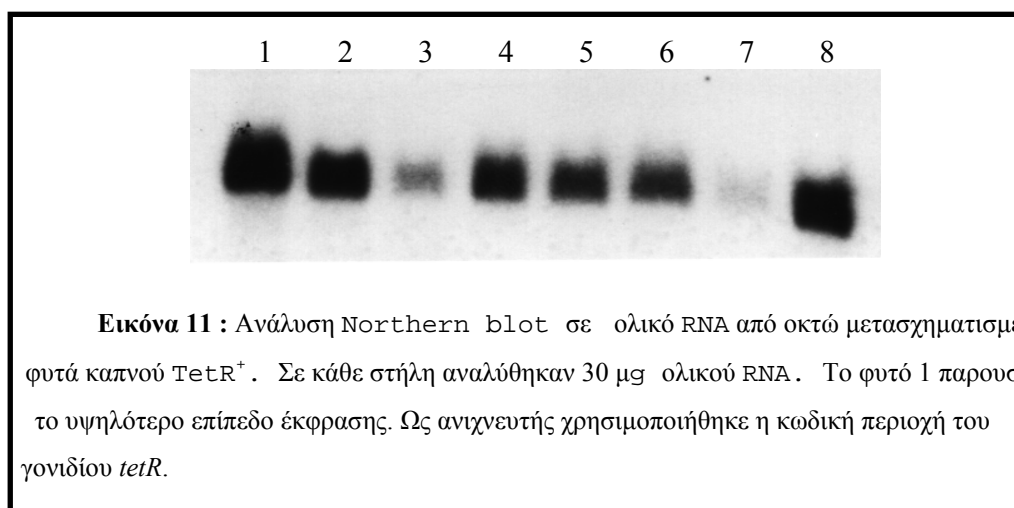
Εικόνα 9. Διαγραμματική παρουσίαση των γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στη δημιουργία των διαγονιδιακών φυτών. Το pTET1 περιέχει το γονίδιο του καταστολέα της τετρακυκλίνης (*tetR*), κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή CaMV 35S. Η κατασκευή pBIN-Hyg-Tx/hrpZ περιέχει το γονίδιο *hrpZ* από την *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, κάτω από τον έλεγχο του τροποποιημένου υποκινητή CaMV 35S, ο οποίος περιέχει τρεις tet operators (O1, O2, O3), όπου δεσμεύεται ο καταστολέας TetR και εμποδίζει την έκφραση του γονιδίου. Παρουσία τετρακυκλίνης ο καταστολέας δε δεσμεύεται στις θέσεις αυτές και το γονίδιο *hrpZ* εκφράζεται. NptII: neomycinphospho-transferase, ocs: octopine synthase terminator, HptII: hygromycinphosphotransferase, RB: Right border, LB: Left border. Τα βέλη δείχνουν την έναρξη της μεταγραφής.

δημιουργήθηκε άλλη μία κατασκευή, που περιείχε το γονίδιο *hrpZ* σε αντίθετη κατεύθυνση (antisense orientation) σε σχέση με τον υποκινητή, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως αρνητικός μάρτυρας. Επειδή δεν ήταν γνωστό αν η πρωτεΐνη HrpZ εισέρχεται ή όχι στο φυτικό κύτταρο, μετά την έκκριση της από τα βακτήρια ή μετά την έγχυση της στον αποπλάστη των φύλλων, κρίθηκε απαραίτητο να εξασφαλιστεί η παρουσία της έξω από τα φυτικά κύτταρα. Για να επιτευχθεί αυτό έπρεπε η χαρπίνη να φέρει ένα κατάλληλο πεπτίδιο έκκρισης. Έτσι, απομονώθηκε με PCR από γενωμικό DNA καπνού η αλληλουχία, που κωδικοποιεί το πεπτίδιο έκκρισης της πρωτεΐνης PR1a (Pathogenesis-related protein a). Η αλληλουχία αυτή συντήχθηκε στο αμινοτελικό άκρο του γονιδίου *hrpZ*, στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης, στο φορέα pBIN-Hyg-Tx/HrpZ (Εικόνα 10).



Οι παραπάνω κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό φυτών καπνού (*Nicotiana tabacum* cv. Wincosin, W38), που έκφραζαν τον καταστολέα TetR (προσφορά από Dr. Gatz). Προκειμένου να εξασφαλιστεί επαρκής καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *hrpZ*, επιλέχθηκαν μετασχηματισμένα φυτά TetR⁺ που είχαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του καταστολέα, όπως φαίνεται σε ανάλυση Northern blot (Εικ. 11).

Η επιλογή των μετασχηματισμένων φυτών έγινε παρουσία υδρομυκίνης. Κατά τη διάρκεια της αναγέννησης των φυτών, δεν παρατηρήθηκε κανένα πρόβλημα στο σχηματισμό βλαστών και ριζών, υποδεικνύοντας ότι η καταστολή της έκφρασης ήταν αποτελεσματική. Επιπλέον δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη μορφολογία και στα χαρακτηριστικά ανάπτυξης τους σε σχέση με τα μη μετασχηματισμένα φυτά.

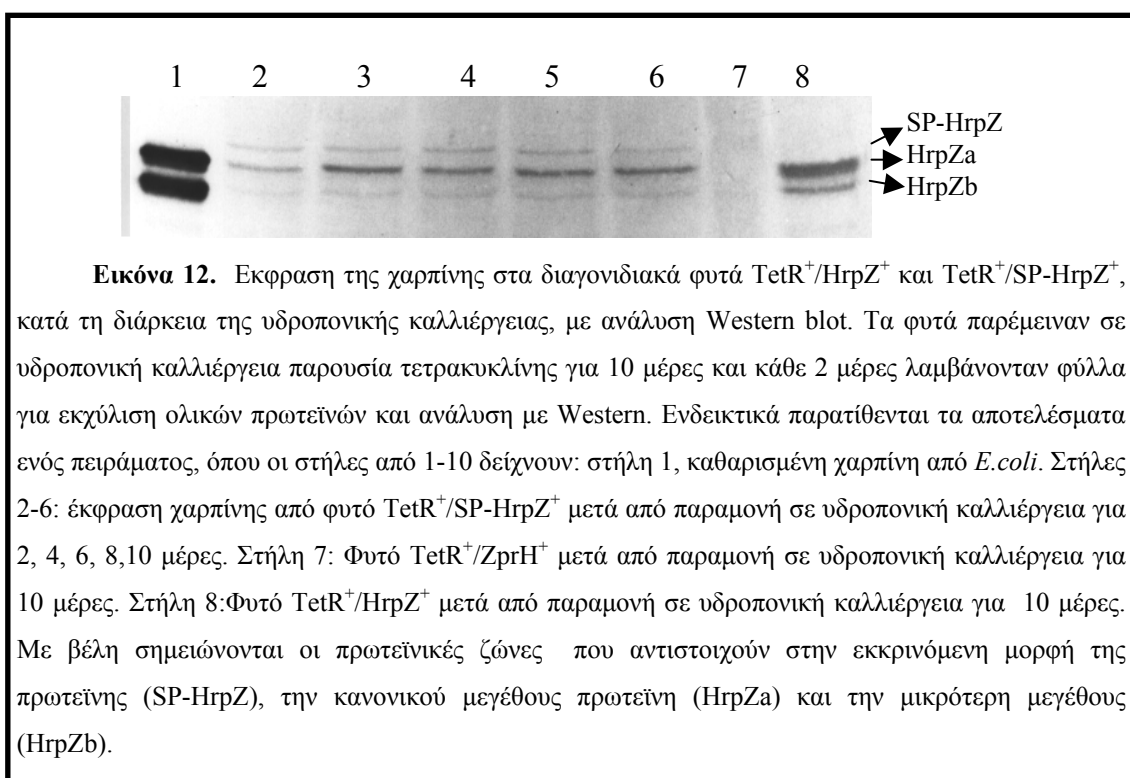


Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση του γονιδίου *hrpZ* στα αναγεννημένα φυτά, αφαιρέθηκαν φύλλα (ένα από κάθε φυτό) στα οποία έγινε παροχή τετρακυκλίνης, με εμποτισμό σε μη τοξική συγκέντρωση, 10mg/L, υπό κενό (vacuum infiltration). Μετά από επώαση 24 ωρών, σε υγρό θρεπτικό υλικό MS που περιείχε τετρακυκλίνη, εκχυλίστηκε ολικό RNA για ανάλυση Northern, χρησιμοποιώντας ως ιχνηλάτη το γονίδιο *hrpZ*. Διαπιστώθηκε ότι και στα 20 φυτά, που εξετάστηκαν από κάθε κατηγορία (συνολικά 40 φυτά), υπήρχε έκφραση του γονιδίου *hrpZ*, τουλάχιστον στο επίπεδο του mRNA. Όλα τα φυτά αυτογονιμοποιήθηκαν και οι απόγονοι τους (T-1) χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

Η παραγωγή της πρωτεΐνης HrpZ ελέγχθηκε με ανάλυση Western, χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού anti-HrpZ_{Psp}, το οποίο παρασκευάστηκε για το σκοπό αυτό ενάντια σε καθαρισμένη χαρπίνη από καλλιέργεια *E.coli* (BL21[DE3]), όπου το γονίδιο *hrpZ*_{Psp} είχε εκφραστεί κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή T7 (pT7-7/HrpZ).

Ο έλεγχος του φαινοτύπου των μετασχηματισμένων φυτών που έκφραζαν το γονίδιο *hrpZ*, έγινε με τοποθέτηση των φυτών σε υδροπονική καλλιέργεια παρουσία τετρακυκλίνης. Επειδή η τετρακυκλίνη ήταν γνωστό ότι απενεργοποιείται μετά τη

δεύτερη μέρα (80), το μέσο καλλιέργειας ανανεωνόταν κάθε μέρα, ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής αποκαταστολή του διαγονιδίου. Τα φυτά παρέμειναν σε υδροπονική καλλιέργεια για ένα διάστημα 10 ημερών, στη διάρκεια του οποίου πραγματοποιούνταν έλεγχος της παραγόμενης πρωτεΐνης με Western blots κάθε δύο μέρες, ενώ παράλληλα εξεταζόταν αν τα φυτά εμφάνιζαν χαρακτηριστικά νέκρωσης (Εικ. 12). Κανένα από τα φυτά ($TetR^+/SP-HrpZ^+$ και $TetR^+/HrpZ^+$), που ελέγχθησαν δεν εμφάνισαν καμία ορατή φαινοτυπική μεταβολή μολονότι όλα παρήγαγαν ανοσοανιχνεύσιμη χαρπίνη.

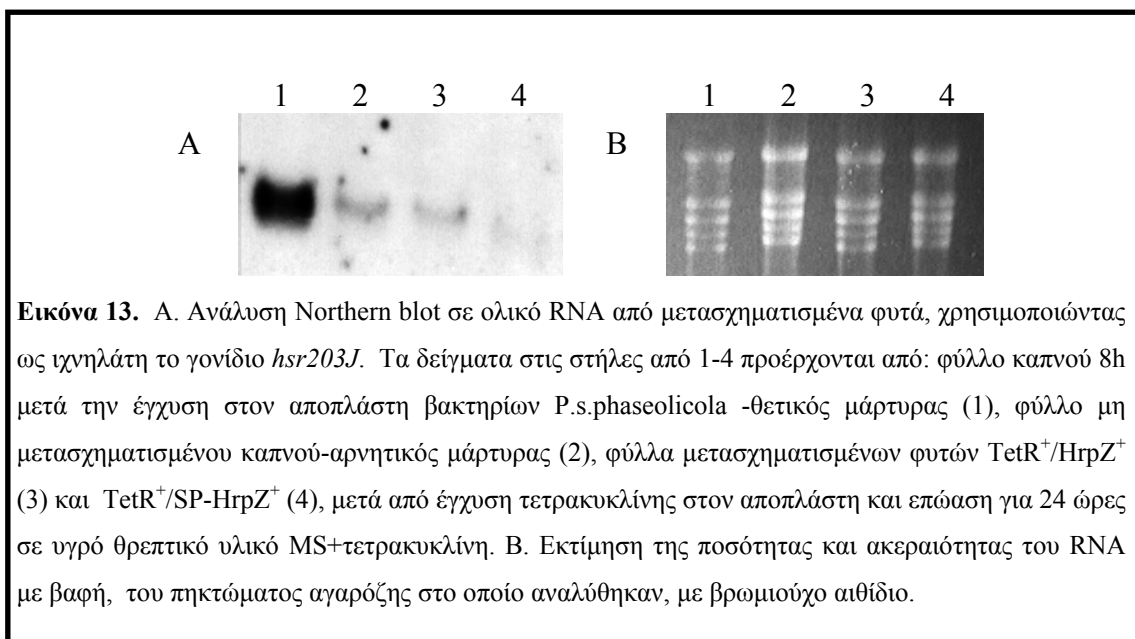


Η αδυναμία της ενδογενώς παραγόμενης χαρπίνης να προκαλέσει νέκρωση θα μπορούσε να αποδοθεί στις εξής τουλάχιστον αιτίες: α) Το επίπεδο έκφρασης της χαρπίνης δεν ήταν αρκετό για να προκαλέσει μακροσκοπική νέκρωση. β) Η ενδογενώς παραγόμενη χαρπίνη πιθανώς πυροδοτούσε ορισμένα, αλλά όχι όλα τα μοριακά και βιοχημικά γεγονότα, που οδηγούν στην εκδήλωση ορατής νέκρωσης στο φυτό. γ) Η παρεχόμενη τετρακυκλίνη πιθανώς να παρεμπόδιζε κάποιο(α) βήμα(τα) αναγκαίο για την εκδήλωση της κυτταρικής νέκρωσης. δ) Η χαρπίνη πιθανώς να μην παραγόταν σε βιολογικά ενεργή μορφή.

3.2.1.1. Έλεγχος επαγωγής του γονιδίου *hsr203J*

Η νέκρωση που παρατηρείται κατά την HR, εκδηλώνεται αρκετές ώρες μετά από έγχυση βακτηριακού αιωρήματος ή καθαρής χαρπίνης στον αποπλάστη των φύλλων, γεγονός που υποδηλώνει ότι προηγούνται ορισμένα βιοχημικά γεγονότα. Προηγούμενες μελέτες των πρώιμων αυτών γεγονότων αποκάλυψαν μια κατηγορία γονιδίων που ενεργοποιούνται πολύ πιο γρήγορα, πριν την εκδήλωση του νεκρωτικού φαινοτύπου. Τα γονίδια αυτά ονομάστηκαν *hsr* (hyperssensitivity-related), γιατί εκφράζονταν μόνο κατά τη διάρκεια της HR κι όχι σε απόκριση άλλων συνθηκών καταπόνησης (stress) (193). Ένα από τα γονίδια *hsr*, το *hsr203J*, επάγεται πολύ γρήγορα, πριν την εμφάνιση νεκρωτικών κηλίδων, όχι μόνο από βακτήρια που φέρουν γονίδια *hrp*, αλλά και από καθαρή χαρπίνη. Έτσι το γονίδιο *hsr203J* θεωρήθηκε κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός μάρτυρας της HR στα διαγονιδιακά φυτά. Για το σκοπό αυτό, το cDNA του γονιδίου αυτού απομονώθηκε με PCR από γενωμικό DNA καπνού και ελέγχθηκε η επαγωγή του στα μετασχηματισμένα φυτά. Όπως φαίνεται από την εικόνα 13 δεν παρατηρήθηκε επαγωγή σε καμία κατηγορία μετασχηματισμένων φυτών, ενώ επαγόταν μετά από μόλυνση φύλλων καπνού με *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η ενδογενώς παραγόμενη χαρπίνη στο φυτό, είτε ήταν στην εκκρινόμενη, είτε στη μη εκκρινόμενη μορφή της, εκτός από την αδυναμία της να επάγει μακροσκοπικά ορατή HR, δεν ήταν ικανή να την επάγει ούτε σε μοριακό επίπεδο.



Εικόνα 13. Α. Ανάλυση Northern blot σε ολικό RNA από μετασχηματισμένα φυτά, χρησιμοποιώντας ως ιχνηλάτη το γονίδιο *hsr203J*. Τα δείγματα στις στήλες από 1-4 προέρχονται από: φύλλο καπνού 8h μετά την έγχυση στον αποπλάστη βακτηρίων *P.s.phaseolicola* -θετικός μάρτυρας (1), φύλλο μη μετασχηματισμένου καπνού-αρνητικός μάρτυρας (2), φύλλα μετασχηματισμένων φυτών $TetR^+/HrpZ^+$ (3) και $TetR^+/SP-HrpZ^+$ (4), μετά από έγχυση τετρακυκλίνης στον αποπλάστη και επώαση για 24 ώρες σε υγρό θρεπτικό υλικό MS+τετρακυκλίνη. Β. Εκτίμηση της ποσότητας και ακεραιότητας του RNA με βαφή, του πηκτώματος αгарόζης στο οποίο αναλύθηκαν, με βρωμιούχο αιθίδιο.

3.2.1.2. Ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης HrpZ σε μετασχηματισμένα φυτά

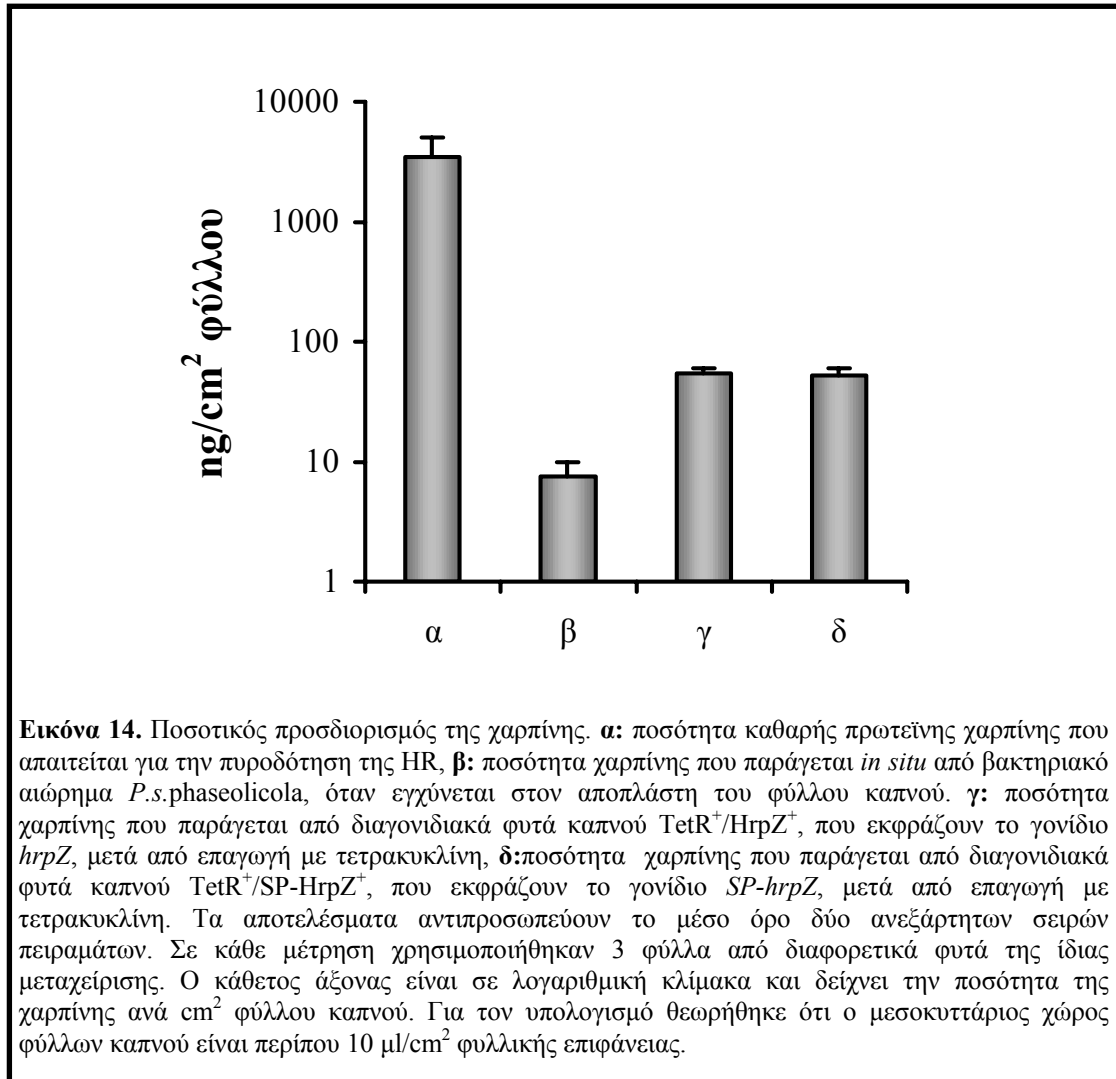
Η αδυναμία της χαρπίνης να επάγει την HR μπορεί να οφειλόταν στο χαμηλό επίπεδο έκφρασης της, δεδομένου ότι η καθαρισμένη χαρπίνη πυροδοτεί την αντίδραση υπερευαισθησίας σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (100 $\mu\text{g/ml}$). Θεωρήθηκε επομένως απαραίτητο να προσδιοριστεί η ποσότητα της χαρπίνης, που παραγόταν στα μετασχηματισμένα φυτά, ανά cm^2 φύλλου, ώστε να συγκριθεί τόσο με την ποσότητα της χαρπίνης, που παράγεται από τα βακτήρια όταν εγχύνονται σε φυλλική επιφάνεια του ίδιου μεγέθους, καθώς και με την ποσότητα της καθαρισμένης χαρπίνης, ικανής να προκαλέσει HR. Για το σκοπό αυτό ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: τεμάχια φύλλων συγκεκριμένης επιφάνειας από τα μετασχηματισμένα, φυτά, εμποτίστηκαν σε διάλυμα τετρακυκλίνης (10mg/l), υπό κενό και μετά από επώαση 24 h σε υγρό θρεπτικό υλικό MS, που περιείχε τετρακυκλίνη στην ίδια συγκέντρωση, εκχυλίστηκαν ολικές πρωτεΐνες. Με παρόμοιο τρόπο, σε τεμάχια φύλλων από μη μετασχηματισμένα, φυτά έγινε έγχυση αιωρήματος *P.s.phaseolicola* και 8 ώρες μετά έγινε εκχύλιση ολικών πρωτεϊνών. Επίσης, προσδιορίστηκε η ποσότητα της καθαρισμένης χαρπίνης που, όταν εγχύνεται ανά cm^2 φύλλου, επάγει HR.

Στη συνέχεια τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με western blot χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-HrpZ_{Psp}. Η σχετική ποσότητα της χαρπίνης σε κάθε δείγμα συγκρίθηκε με καθαρισμένη χαρπίνη γνωστής συγκέντρωσης, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα NIH-Image για Macintosh.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής παρουσιάζονται στην Εικόνα 14, απ' όπου διαπιστώνεται ότι η ποσότητα της χαρπίνης, που παραγόταν από τα διαγονιδιακά φυτά ανά cm^2 φύλλου καπνού ήταν σημαντικά περισσότερη (5-10 φορές), από την ποσότητα που παράγεται από τα βακτήρια *in situ*, κατά τη μόλυνση φύλλων καπνού και πολύ λιγότερη από την ποσότητα της καθαρισμένης χαρπίνης, που απαιτείται για να πυροδοτήσει την HR.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα θεωρείται, ότι η αδυναμία της ενδογενούς χαρπίνης να επάγει την HR, σε μακροσκοπικό και μοριακό επίπεδο, οφειλόταν πιθανώς στο χαμηλό επίπεδο παραγωγής της και στις δύο κατηγορίες μετασχηματισμένων φυτών. Η ικανότητα των βακτηρίων να επάγουν HR με πολύ μικρότερες ποσότητες χαρπίνης, πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία και άλλων

παραγόντων στα βακτήρια, που λειτουργούν συνεργιστικά και επιτυγχάνεται έτσι η επαγωγή της HR, ή/και στην ικανότητα των βακτηρίων να την αποθέτουν σε κατάλληλη θέση.



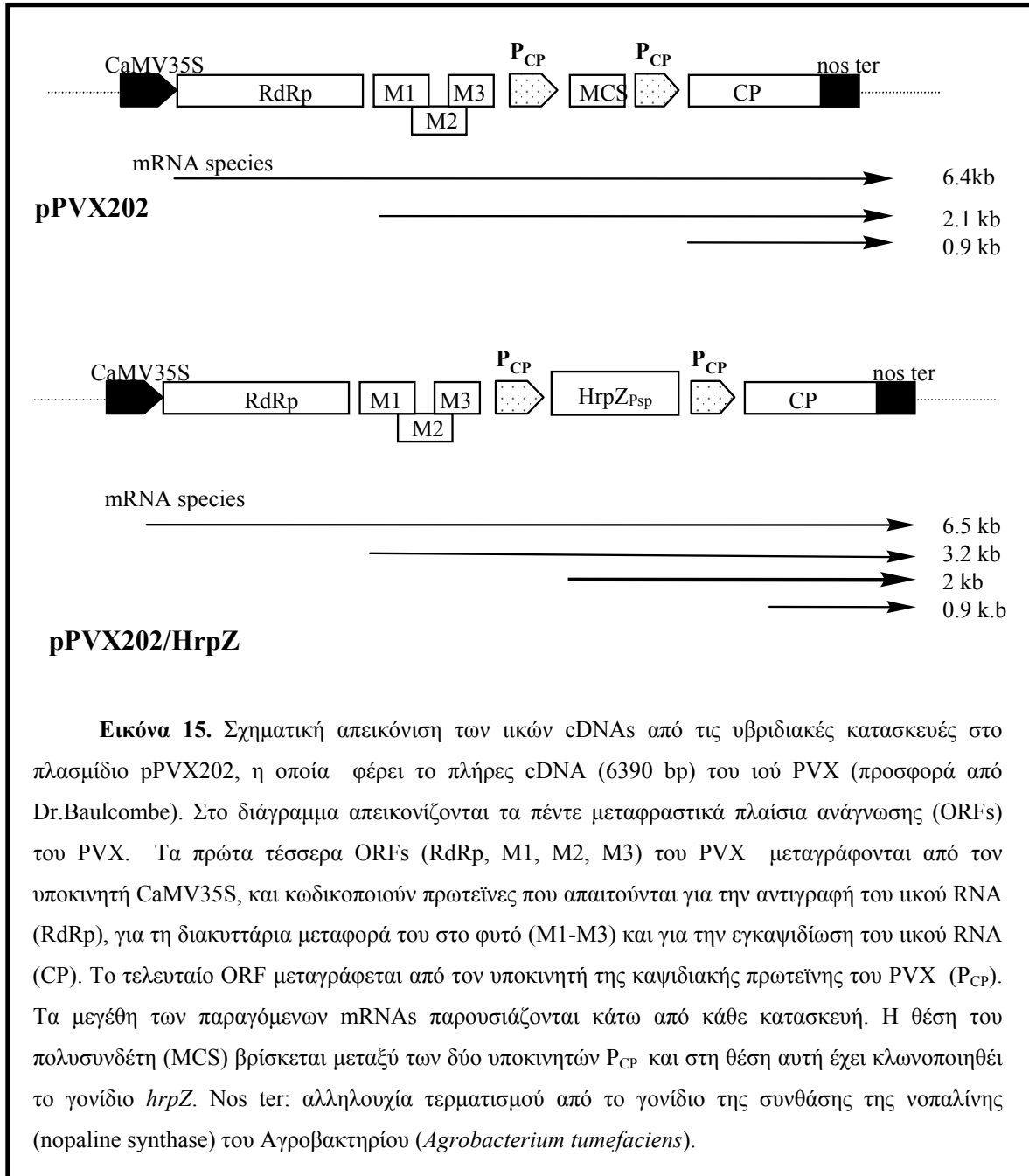
3.2.2. Έκφραση του γονιδίου *hrpZ_{Psp}* σε φυτά καπνού με το ιικό σύστημα έκφρασης PVX202

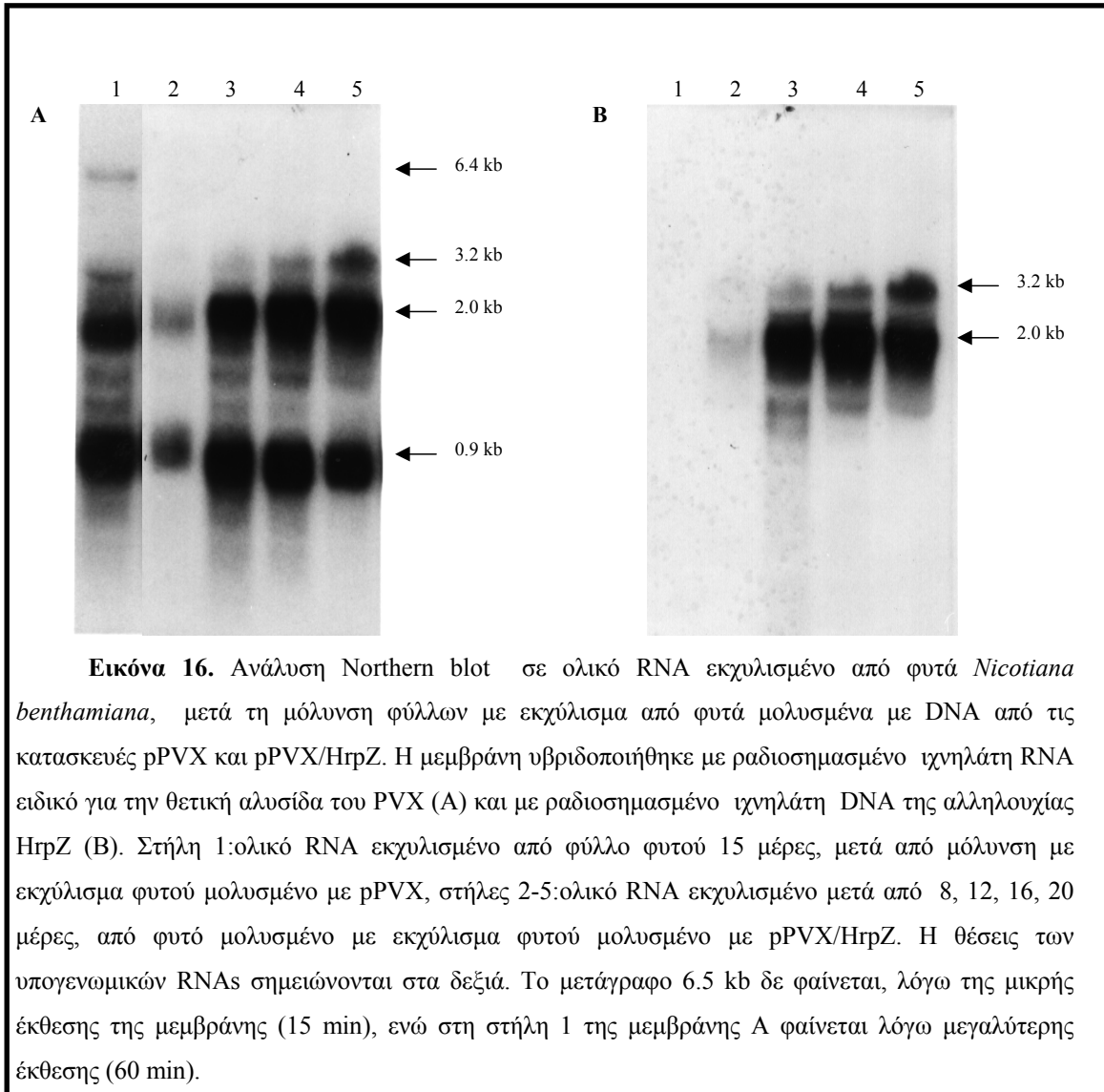
Προκειμένου να διαπιστωθεί αν το επίπεδο έκφρασης της χαρπίνης στα διαγονιδιακά φυτά ήταν υπεύθυνο για την αδυναμία της να επάγει την HR, κλωνοποιήθηκε το γονίδιο *hrpZ_{Psp}* στον ιικό φορέα έκφρασης pPVX202. Το πλασμίδιο αυτό εκφράζει το γονιδίωμα του ιού X του μωσαϊκού της πατάτας (Potato Virus X). Η χρήση του PVX για έκφραση γονιδίων στα φυτά έχει το πλεονέκτημα ότι πολλαπλασιάζεται σε πολλά αντίγραφα ανά κύτταρο και έτσι επιτρέπει την παραγωγή πρωτεϊνών σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις απ' ό τι είναι δυνατό με φορείς Αγροβακτηρίου και λόγω της διασυστηματικής μόλυνσης που προκαλεί, το γονίδιο εκφράζεται σε όλο το φυτό. Επιπλέον η έκφραση της πρωτεΐνης μπορεί να ανιχνευθεί μετά από ένα διάστημα μόνο 7-15 ημερών, σε σύγκριση με τους 4-6 μήνες που απαιτεί ο μόνιμος γενετικός μετασχηματισμός. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο PVX είναι ένα παροδικό σύστημα συνεχούς έκφρασης και μετά την παρέλευση 30 ημερών δεν ανιχνεύεται πλέον έκφραση του γονιδίου.

Ο ιικός φορέας έκφρασης pPVX-202 (προσφορά του Dr. Baulcombe) φέρει την αλληλουχία (cDNA) του ιού PVX (6.4 kb), η οποία έχει τροποποιηθεί έτσι ώστε το υπό μελέτη γονίδιο να μπορεί να κλωνοποιηθεί στο ιικό γονιδίωμα μεταξύ δύο τεχνητά διπλασιασμένων αντιγράφων του ιικού υποκινητή της καψιδιακής πρωτεΐνης (P_{CP}). Στην Εικόνα 15 παρουσιάζεται η γενετική οργάνωση του γονιδιώματος του ιού PVX, καθώς και η ένθεση του γονιδίου *hrpZ* στον PVX.

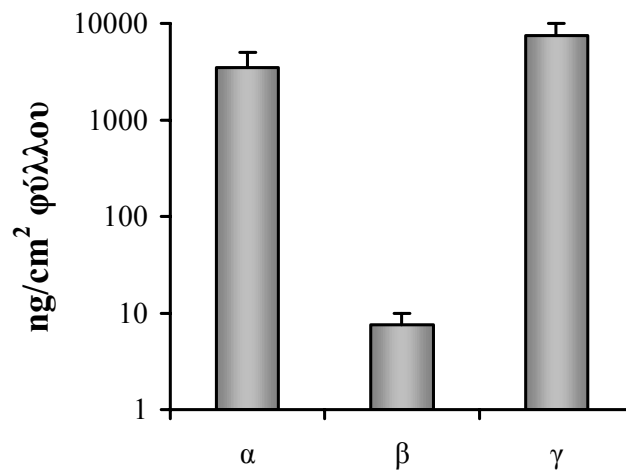
Οι κατασκευές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τη μόλυνση φυτών *Nicotiana benthamiana*. Η μόλυνση των φυτών γινόταν σε δύο στάδια: στο πρώτο στάδιο τα φύλλα μολύνονταν με πλασμιδιακό DNA και 10 μέρες αργότερα μετά την εμφάνιση των χαρακτηριστικών χλωρωτικών κηλίδων του ιού εκχυλίζονταν τα ιοσωμάτια. Επειδή η μολυσματικότητα του ιού με τη μορφή πλασμιδιακού DNA είναι γενικά μικρή ήταν απαραίτητο να πραγματοποιείται και δεύτερη μόλυνση χρησιμοποιώντας το εκχύλισμα των ιοσωματίων, έτσι ώστε να υπάρξει ένας στατιστικά ικανός αριθμός μολυσμένων φυτών για την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Η μόλυνση των φυτών ελεγχόταν με ανάλυση Northern, ώστε να εξακριβώνεται η ακεραιότητα του ανασυνδυασμένου ιού καθώς και η παραγωγή των υπογενωμικών του RNA (Εικόνα 16). Επίσης, με Western blots ελεγχόταν κάθε τρεις μέρες, η έκφραση της χαρπίνης

και της καμινδιακής πρωτεΐνης του ιού, χρησιμοποιώντας αντισώματα anti-HrpZ_{Psp} και anti-Coat_{PVX} αντίστοιχα.

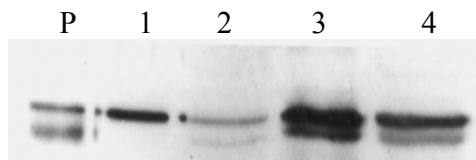




Παρά το γεγονός ότι η χαρπίνη παραγόταν σε ικανοποιητικά επίπεδα δεν εμφανίστηκαν νεκρωτικές κηλίδες χαρακτηριστικές της HR. Έτσι, έγινε ποσοτικοποίηση της παραγόμενης χαρπίνης, με τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω, σε διασυστηματικώς μολυσμένα φύλλα δύο εβδομάδες μετά τη δεύτερη μόλυνση. Όπως φαίνεται από την Εικόνα 17, τα φυτά παράγαγαν χαρπίνη (ανά cm^2 φύλλου) σε ποσότητα σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη, που ελευθερώνεται από τα βακτήρια στους μεσοκυττάριους χώρους του φύλλου, στη διάρκεια της HR ή της καθαρισμένης χαρπίνης, που απαιτείται για HR.



Εικόνα 17. Ποσοτικός προσδιορισμός της χαρπίνης. **α:** ποσότητα καθαρής πρωτεΐνης χαρπίνης που απαιτείται για την πυροδότηση της HR, **β:** ποσότητα χαρπίνης που παράγεται *in situ* από βακτηριακό αιώρημα *P.s.phaseolicola*, όταν εγχύνεται στον αποπλάστη του φύλλου καπνού. **γ:** ποσότητα χαρπίνης που παράγεται από διασυστηματικώς μολυσμένα φύλλα καπνού με τον ανασυνδυασμένο ιό PVX/HrpZ. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο δύο ανεξάρτητων σειρών πειραμάτων. Σε κάθε μέτρηση χρησιμοποιήθηκαν 3 φύλλα από διαφορετικά φυτά της ίδιας μεταχείρισης. Ο κάθετος άξονας είναι σε λογαριθμική κλίμακα και δείχνει την ποσότητα της χαρπίνης ανά cm² φύλλου καπνού.

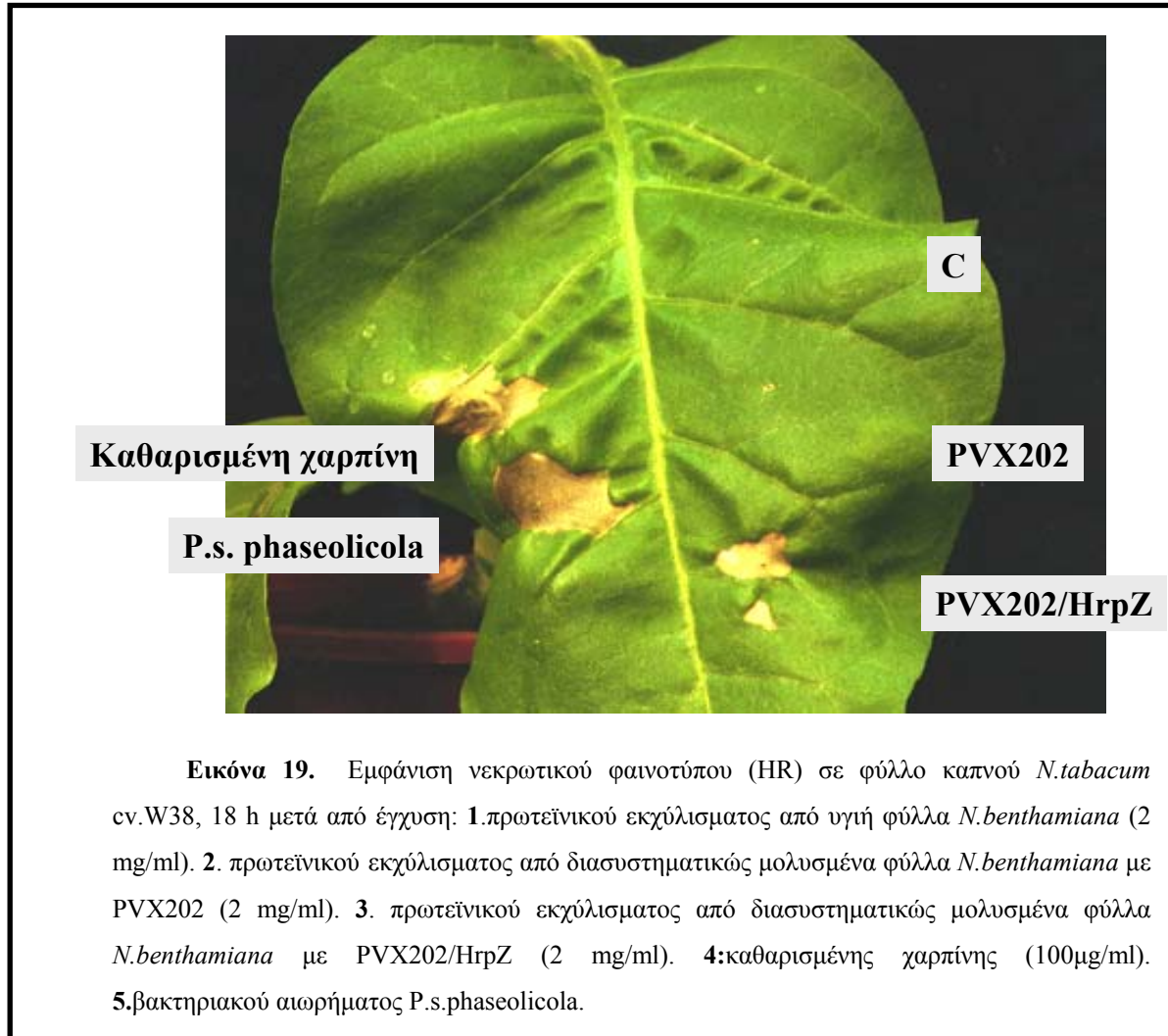


Εικόνα 18. Ανάλυση Western blot της χαρπίνης που παράγεται από: 1. Μετασηματισμένα φυτά (TetR⁺/HrpZ⁺), που εκφράζουν χαρπίνη μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη. Η ποσότητα αντιστοιχεί σε 0,2 cm² φύλλου. 2. Φύλλα *Nicotiana benthamiana*, μετά από μόλυνση της, με τον ιό PVX/HrpZ. Η ποσότητα αντιστοιχεί σε 0,076 mm² φύλλου. 3. *P.s.phaseolicola* μετά από έγχυση βακτηριακού αιωρήματος στους μεσοκυττάριους χώρους φύλλου καπνού, έκτασης 0,2 cm². 4. *P.s.phaseolicola* που αναπτύχθηκε σε ελάχιστο μέσο επαγωγής (Hrp-inducing medium) για 12 ώρες. P: Καθαρή πρωτεΐνη χαρπίνης (10ng).

Παρά το γεγονός ότι η ποσότητα της χαρπίνης, που παραγόταν από τα φυτά αυτά, ήταν στα ίδια επίπεδα με αυτά της καθαρικής πρωτεΐνης που προκαλεί HR, η απουσία εμφάνισης συμπτωμάτων νέκρωσης, μας οδήγησε στη υπόθεση ότι η ενδογενώς παραγόμενη πρωτεΐνη στα φυτά ενδεχομένως δεν είναι βιολογικά ενεργή.

Προκειμένου να ελεγχθεί η ενεργότητα της πρωτεΐνης που παράγεται υπό αυτές τις συνθήκες, παρασκευάστηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από φύλλα καπνού *N. benthamiana* που είχαν μολυνθεί με PVX202-HrpZ_{Psp} καθώς και με τον PVX202. Μετά από κατακρήμνιση με θειϊκό αμμώνιο και παρατεταμένη διαπίδυση, τα εκχυλίσματα ενέθηκαν στους μεσοκυττάριους χώρους φύλλων καπνού *N. tabacum* και *N. benthamiana*. Όπως φαίνεται από την εικόνα 19, μετά από 18 ώρες, παρατηρήθηκε νέκρωση μόνο στα φύλλα που ενέθηκαν με εκχυλίσματα φύλλων, μολυσμένα με PVX202-HrpZ_{Psp}. Εκχυλίσματα από φύλλα υγιών φυτών, όπως και από φύλλα μολυσμένα με τον ιικό φορέα PVX202 δεν προκάλεσαν νέκρωση.

Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η χαρπίνη, που παράγεται ενδογενώς στα φυτά μετά από μόλυνση με τον ιικό φορέα PVX202, είναι βιολογικά ενεργή, στη συμβατική βιοδοκιμή υπερευαισθησίας σε φύλλα καπνού. Η έλλειψη νεκρωτικού φαινοτύπου *in planta* μπορεί να ερμηνευθεί εάν υποθέσουμε ότι δεν εκδηλώνει τη δράση της μέσα στα φυτικά κύτταρα αλλά απέξω (π.χ. αλληλεπίδραση με τον κυτταρικό στόχο της).



Εικόνα 19. Εμφάνιση νεκρωτικού φαινοτύπου (HR) σε φύλλο καπνού *N.tabacum* cv.W38, 18 h μετά από έγχυση: **1.**πρωτεϊνικού εκχύλισματος από υγιή φύλλα *N.benthamiana* (2 mg/ml). **2.** πρωτεϊνικού εκχύλισματος από διασυστηματικώς μολυσμένα φύλλα *N.benthamiana* με PVX202 (2 mg/ml). **3.** πρωτεϊνικού εκχύλισματος από διασυστηματικώς μολυσμένα φύλλα *N.benthamiana* με PVX202/HrpZ (2 mg/ml). **4:**καθαρισμένης χαρπίνης (100μg/ml). **5.**βακτηριακού αιωρήματος *P.s.phaseolicola*.

3.2.3. Μελέτη της οξειδωτικής έκρηξης σε πρωτοπλάστες καπνού παρουσία χαρπίνης

Πριν από την εμφάνιση του νεκρωτικού φαινοτύπου της HR, προηγούνται διάφορες βιοχημικές αλλαγές, μεταξύ αυτών η αντίδραση XR (K^+ efflux/ H^+ influx exchange response) και η αντίδραση AO (active oxygen response)(10, 15). Η αντίδραση XR περιγράφει μία ανταλλαγή ιόντων, κατά την οποία ιόντα H^+ εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων ενώ ιόντα K^+ εξέρχονται. Η αντίδραση θεωρείται σημαντική σε “συμβατές” αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων, επειδή η αλκαλοποίηση του αποπλάστη έχει δείχτει ότι οδηγεί σε έξοδο σακχαρόζης από τα φυτικά κύτταρα και παρέχει πρόσθετη, ή απαραίτητη, πηγή άνθρακα για τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων.

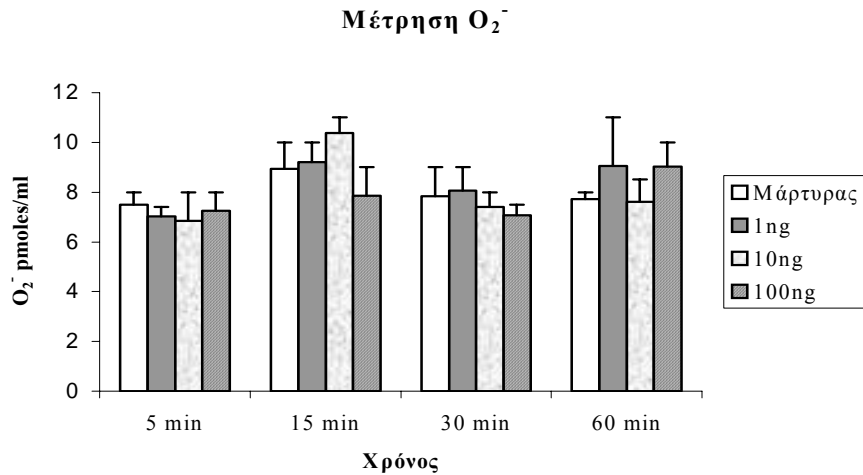
Η αντίδραση AO χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), όπως υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), ανιόντα υπεροξειδίου (superoxide anions O_2^-) και ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου (hydroxyl free radical, OH^\cdot) είναι γνωστή ως “οξειδωτική έκρηξη” (146, 230). Πιστεύεται ότι τα ROS παίζουν κύριο ρόλο στην ενίσχυση της άμυνας των φυτικών ιστών, συμμετέχοντας σε αντιδράσεις ενίσχυσης του κυτταρικού τοιχώματος, σηματοδοτώντας την ενεργοποίηση βιοχημικών μηχανισμών άμυνας, όπως σύνθεση φυτοαλεξινών, ενεργοποίηση της έκφρασης άλλων γονιδίων άμυνας, προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, και μηχανισμών βιοχημικής προστασίας στους υγιείς ιστούς για να αποφευχθεί καταστροφή τους από τα ROS (33, 168). Επιπλέον τα ROS, αυτά καθ’ αυτά, είναι τοξικά για τα βακτήρια. Διάφορες μελέτες παρέχουν ενδείξεις ότι ο σχηματισμός των ROS στα φυτά καταλύεται από μια NAD(P)H εξαρτώμενη οξειδάση, ενδεχομένως ομόλογη με αυτήν των ζωικών κυττάρων, η οποία εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη (102).

Η αντίδραση AO χαρακτηρίζεται από δύο φάσεις: Η φάση I AO συμβαίνει αμέσως μετά την επαφή των βακτηρίων με φυτικούς ιστούς και είναι “μη ειδική”, με την έννοια ότι παρατηρείται τόσο στις συμβατές όσο και στις μη συμβατές αλληλεπιδράσεις φυτού-παθογόνου και επάγεται επίσης και από μη φυτοπαθογόνα βακτήρια. Η φάση II AO συμβαίνει ταυτόχρονα με την XR, διεγείρεται σε μη συμβατές αλληλεπιδράσεις φυτού-παθογόνου, που οδηγούν στην αντίδραση υπερευαισθησίας, και εκδηλώνεται 1.5-3 h μετά τη μόλυνση.

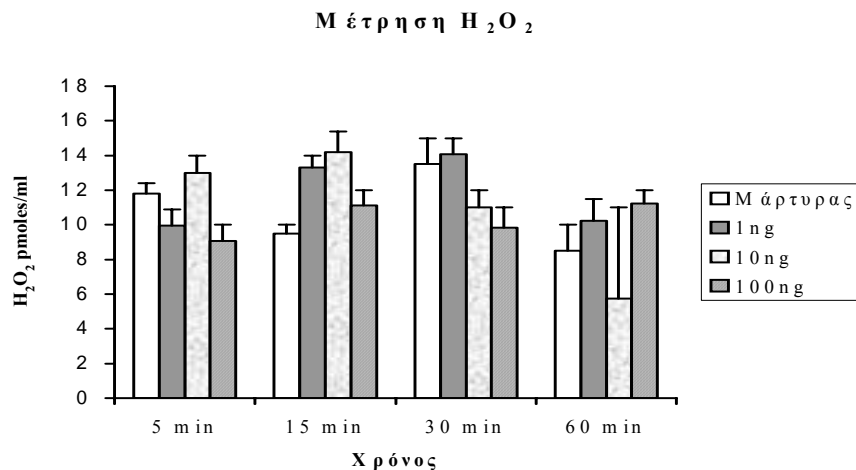
Το σύμπλοκο των γονιδίων *hrp* της *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* έχει δειχτεί ότι ευθύνεται για την επαγωγή τόσο της αντίδρασης XR όσο και της παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου στη φάση II (86). Αργότερα βρέθηκε ότι η χαρπίνη της *Erwinia amylovora* επάγει το σχηματισμό ROS σε αιωρούμενες καλλιέργειες κυττάρων καπνού (16).

Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τη δική μας διαπίστωση ότι η χαρπίνη δεν δρά μέσα στο φυτικό κυτταρόπλασμα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι ο κυτταρικός στόχος της χαρπίνης είναι η κυτταρική μεμβράνη ή το κυτταρικό τοίχωμα. Προκειμένου να ελεγχθεί αν η χαρπίνη στοχεύει στην κυτταρική μεμβράνη, ελέγχθηκε αν επάγεται ο σχηματισμός ROS μετά την προσθήκη χαρπίνης σε απομονωμένους πρωτοπλάστες καπνού (κύτταρα χωρίς κυτταρικό τοίχωμα).

Μετά την απομόνωση τους οι πρωτοπλάστες (10^5 /ml) επώαστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις χαρπίνης (1, 10 και 100ng/ml) και η μέτρηση των O_2^- και H_2O_2 πραγματοποιήθηκε μετά από 5-60 min από την προσθήκη της πρωτεΐνης, χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια lucigenin και luminol, αντίστοιχα. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί ότι στις αιωρούμενες κυτταροκαλλιέργειες καπνού η μέγιστη παραγωγή ROS παρατηρείται 15 min μετά την προσθήκη χαρπίνης (100ng/ml). Ομως, στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα του H_2O_2 και O_2^- , σε απομονωμένους πρωτοπλάστες, παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες συγκεντρώσεις χαρπίνης (Εικόνες 20, 21). Το αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι η χαρπίνη πιθανόν να μην αλληλεπιδρά με την κυτταρική μεμβράνη, αλλά με το κυτταρικό τοίχωμα. Ενδέχεται όμως, η αδυναμία της χαρπίνης να επάγει την παραγωγή ROS να οφείλεται στην καταστροφή των θέσεων δέσμευσης της χαρπίνης στη διάρκεια της ενζυμικής απομόνωσης των πρωτοπλαστών ή στη δράση των πηκτινολυτικών ενζύμων, που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση τους, τα οποία είναι γνωστό ότι αναστέλλουν την HR (17). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι ένα μεταλλαγμένο στέλεχος της *Erwinia chrysanthemi* ανίκανο να παράγει ισοένζυμα πηκτινικών λυασών, PelABC, μπορούσε να επάγει HR, ενώ ο άγριος τύπος (PelABC⁺) δεν επάγει HR (21).



Εικόνα 20. Παραγωγή O_2^- στο μέσο καλλιέργειας πρωτοπλαστών καπνού μετά από επώαση με καθαρισμένη χαρπίνη. Οι πρωτοπλάστες αμέσως μετά την απομόνωση τους επώαστηκαν (10^5 κύτταρα/ml) παρουσία χαρπίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων, για χρονικό διάστημα 60 min. Στα χρονικά διαστήματα που σημειώνονται στο ιστόγραμμα, λαμβάνονταν δείγματα για μέτρηση O_2^- , η παραγωγή των οποίων μετρήθηκε από τη χημειοφωταύγεια της lucigenin η οποία ανιχνεύει ειδικά τα O_2^- . Οι τιμές της χημειοφωταύγειας (cpm) κανονικοποιήθηκαν βάσει πρότυπης καμπύλης, η οποία συσχετίζει τη χημειοφωταύγεια με τη συγκέντρωση του O_2^- .



Εικόνα 21. Παραγωγή H_2O_2 στο μέσο καλλιέργειας πρωτοπλαστών καπνού μετά από επώαση με καθαρισμένη χαρπίνη. Οι πρωτοπλάστες αμέσως μετά την απομόνωση τους επώαστηκαν (10^5 κύτταρα/ml) παρουσία χαρπίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων, για χρονικό διάστημα 60 min. Στα χρονικά διαστήματα που σημειώνονται στο ιστόγραμμα λαμβάνονταν δείγματα για μέτρηση H_2O_2 , η παραγωγή του οποίου μετρήθηκε από τη χημειοφωταύγεια της luminol η οποία ανιχνεύει ειδικά το υπεροξείδιο. Οι τιμές της χημειοφωταύγειας (cpm) κανονικοποιήθηκαν βάσει πρότυπης καμπύλης.

~~3.2.4. Έκφραση της εκκρινόμενης μορφής της HspZ σε καπνό με~~

το υικό σύστημα έκφρασης PVX202

Τα παραπάνω αποτελέσματα απέκλεισαν την πιθανότητα η χαρπίνη να στοχεύει μέσα στα φυτικά κύτταρα ή στην κυτταρική μεμβράνη, με τις επιφυλάξεις βέβαια που αναφέρθηκαν. Δεδομένου ότι η ποσότητα της χαρπίνης που παράγεται από φυτά μολυσμένα με τον ιό PVX202/HrpZ, είναι αρκετή να πυροδοτήσει την αντίδραση υπερευαισθησίας κρίθηκε απαραίτητο να ελεγχθεί αν η χαρπίνη εκδηλώνει τη δράση της έξω από τα φυτικά κύτταρα, στον αποπλάστη. Για το σκοπό αυτό κλωνοποιήθηκε το γονίδιο της μαζί με το πεπτίδιο έκκρισης της PR1a στον PVX202 (PVX202/SP_{PR1a}-HrpZ_{sp}), ώστε η χαρπίνη να εκκρίνεται στο μεσοκυττάριο χώρο των φύλλων. Η διαδικασία ανάλυσης των φυτών ήταν ίδια με αυτήν, που αναφέρθηκε παραπάνω.

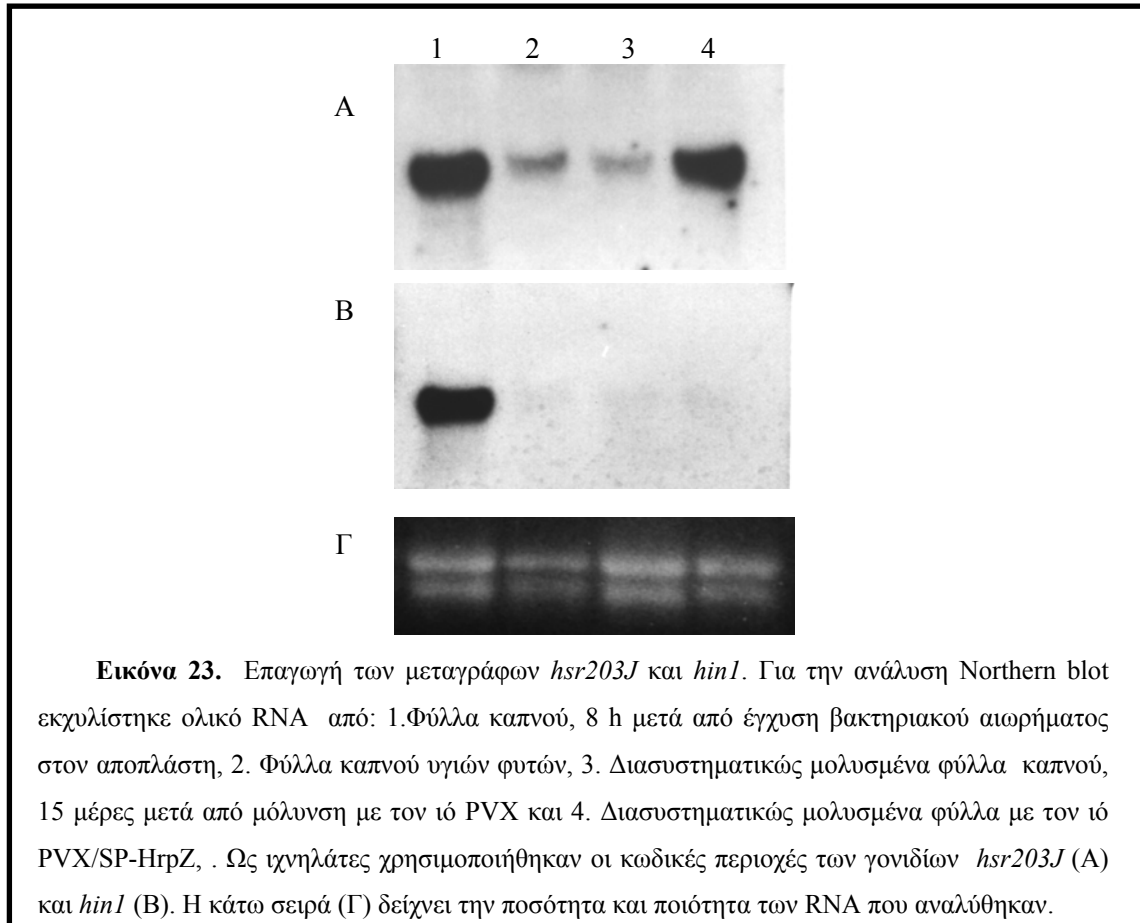
Φυτά καπνού (*N. benthamiana*) μολυσμένα με τον ανασυνδυασμένο ιό, που κωδικοποιεί την εκκρινόμενη μορφή της πρωτεΐνης, εμφάνισαν νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα, οι οποίες διέφεραν από τις χλωρωτικές κηλίδες που προκαλεί ο ιός (Εικ. 22).



Εικόνα 22. Εμφάνιση νεκρωτικών κηλίδων σε φυτό καπνού *N.benthamiana*, 15 μέρες μετά από μόλυνση με τον ιό PVX/SP-HrpZ.

Προκειμένου να διευκρινιστεί αν αυτές οι νεκρωτικές κηλίδες είναι αντιπροσωπευτικές της HR, ελέγχθηκε με Northern blot η επαγωγή των γονιδίων *hsr203J* και *hin1*, τα οποία απομονώθηκαν με PCR από γενωμικό DNA καπνού. Τα

γονίδια αυτά είναι γνωστό ότι επάγονται κατά τη διάρκεια της HR (89, 193). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 23, ανιχνεύεται επαγωγή έκφρασης του γονιδίου *hsr203J* αλλά όχι του *hin1*, σε φυτά μολυσμένα με τον ανασυνδυασμένο ιό PVX/SP-hrpZ_{psp}.



Εικόνα 23. Επαγωγή των μεταγράφων *hsr203J* και *hin1*. Για την ανάλυση Northern blot εκχυλίστηκε ολικό RNA από: 1. Φύλλα καπνού, 8 h μετά από έγχυση βακτηριακού αιωρήματος στον αποπλάστη, 2. Φύλλα καπνού υγιών φυτών, 3. Διασυστηματικώς μολυσμένα φύλλα καπνού, 15 μέρες μετά από μόλυνση με τον ιό PVX και 4. Διασυστηματικώς μολυσμένα φύλλα με τον ιό PVX/SP-HrpZ. Ως ιχνηλάτες χρησιμοποιήθηκαν οι κωδικές περιοχές των γονιδίων *hsr203J* (A) και *hin1* (B). Η κάτω σειρά (Γ) δείχνει την ποσότητα και ποιότητα των RNA που αναλύθηκαν.

Παρόλο, που η έκφραση του *hin1* επάγεται από καθαρισμένη χαρπίνη όταν εγχύνεται στους μεσοκυττάριους χώρους, δεν επάγεται στα φυτά που εκφράζουν τη χαρπίνη. Η διαφορά αυτή πιθανόν να οφείλεται σε τεχνικούς καθαρά λόγους, γιατί στην πρώτη περίπτωση ο χρόνος επαγωγής του γονιδίου μπορεί να ελεγχθεί ενώ στη δεύτερη όχι. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν και τα δύο γονίδια επάγονται κατά την HR, το γονίδιο *hsr203J* επάγεται από σαλικυλικό οξύ (SA) ενώ το *hin1* δεν επάγεται. Πιστεύεται ότι η επαγωγή του *hsr203J* πραγματοποιείται μέσω του SA στη διάρκεια της εκδήλωσης της διασυστηματικής επίκτητης ανθεκτικότητας (SAR), ενώ η επαγωγή του *hin1* συμβαίνει είτε πριν την παραγωγή του SA ή ανεξάρτητα απ' αυτό, κατά τη διάρκεια εκδήλωσής της HR (89).

Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η χαρπίνη επάγει την παραγωγή SA και την εκδήλωση της SAR, μπορούν να ερμηνεύσουν την αδυναμία

ανίχνευσης του *hinI* στα φυτά, που εκφράζουν χαρπίνη μετά από μόλυνση με τον ανασυνδυασμένο ιό. Έτσι είναι πιθανό το γονίδιο *hinI* να επάγεται σ' ένα πρώιμο στάδιο της έκφρασης της χαρπίνης, το οποίο επειδή δεν μπορεί να καθοριστεί τεχνικά, δεν είναι δυνατή και η ανίχνευση της επαγωγής του *hinI*. Αντίθετα, η επαγωγή του *hsr203J* είναι ανιχνεύσιμη γιατί, σε αντίθεση με το *hinI*, επάγεται από SA και έτσι η αρχική επαγωγή του μπορεί να οφείλεται στην έκφραση της χαρπίνης, αλλά η μετέπειτα διατήρηση των υψηλών επιπέδων έκφρασης του *hsr203J* να οφείλεται στο SA το οποίο επάγεται από τη χαρπίνη. Συνοψίζοντας λοιπόν, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η θέση δράσης της χαρπίνης είναι στο κυτταρικό τοίχωμα. Έτσι τίθεται το ερώτημα, ποιός είναι ο ρόλος της χαρπίνης στο κυτταρικό τοίχωμα.

Μελέτες από άλλες ερευνητικές ομάδες την ίδια περίοδο, έδειξαν ότι η χαρπίνη έχει ένα βοηθητικό ρόλο στην εκδήλωση της αντίδραση υπερευαισθησίας, γιατί βακτήρια *P.s.syringae* με μη πολικές μεταλλάξεις στο γονίδιο της δεν καταργούσαν πλήρως την ικανότητα τους να επάγουν την HR, ενώ μεταλλάξεις σε ένα γονίδιο *avr* (*hrmA*) την καταργούσαν πλήρως. Επιπλέον μεταλλάξεις και σε άλλα γονίδια *hrp* εμπόδιζαν την εκδήλωση της HR, υποδεικνύοντας έτσι ότι η λειτουργία των βακτηριακών πρωτεϊνών Avr εξαρτάται από τα γονίδια *hrp* (3). Όμως, η βιοχημική βάση αυτής της εξάρτησης δεν ήταν γνωστή. Τα δεδομένα αυτά άρχισαν να αποκτούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον όταν οι Gopalan et al (1996) έδειξαν ότι έκφραση μιας πρωτεΐνης Avr (AvrB από *P.s.glycinea*) στο φυτό προκαλεί νέκρωση, γεγονός που οδήγησε στην άποψη ότι οι πρωτεΐνες Avr είναι οι πρωτογενείς διεγέρτες της HR, ενώ οι χαρπίνες έχουν δευτερεύοντα ρόλο (88). Το γεγονός όμως, ότι η πρωτεΐνη AvrB δεν εκκρίνεται στο μέσο καλλιέργειας των βακτηρίων αλλά έκφραση της στο φυτό προκαλεί νέκρωση, προέτρεψε τους ερευνητές να ελέγξουν αν η ελευθέρωση της πρωτεΐνης AvrB στα φυτικά κύτταρα απαιτεί χαρπίνη. Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι η πρωτεΐνη AvrB εκδηλώνει τη δράση της μόνον όταν παράγεται μαζί με χαρπίνη από το ίδιο βακτηριακό κύτταρο (88). Έτσι προτάθηκε ότι οι πρωτεΐνες Avr και οι χαρπίνες ενδεχομένως αλληλεπιδρούν.

3.2.5. Έκφραση των γονιδίων *avrPphB* και *avrPto* σε καπνό με το υικό σύστημα έκφρασης PVX202

Στην προσπάθεια να κατανοηθεί ο ρόλος της χαρπίνης στην αντίδραση υπερευαισθησίας και ειδικότερα η σχέση της με τις πρωτεΐνες Avr, έπρεπε αρχικά να

ελεγχθεί αν πρωτεΐνες Avr, από το ίδιο στέλεχος βακτηρίου (δηλ. της *Ps.phaseolicola*) με την υπό μελέτη χαρπίνη ($HrpZ_{P_{sp}}$), έχουν την ικανότητα να επάγουν HR μετά την έκφραση τους στο φυτό και στη συνέχεια να ελεγχθεί αν αλληλεπιδρούν.

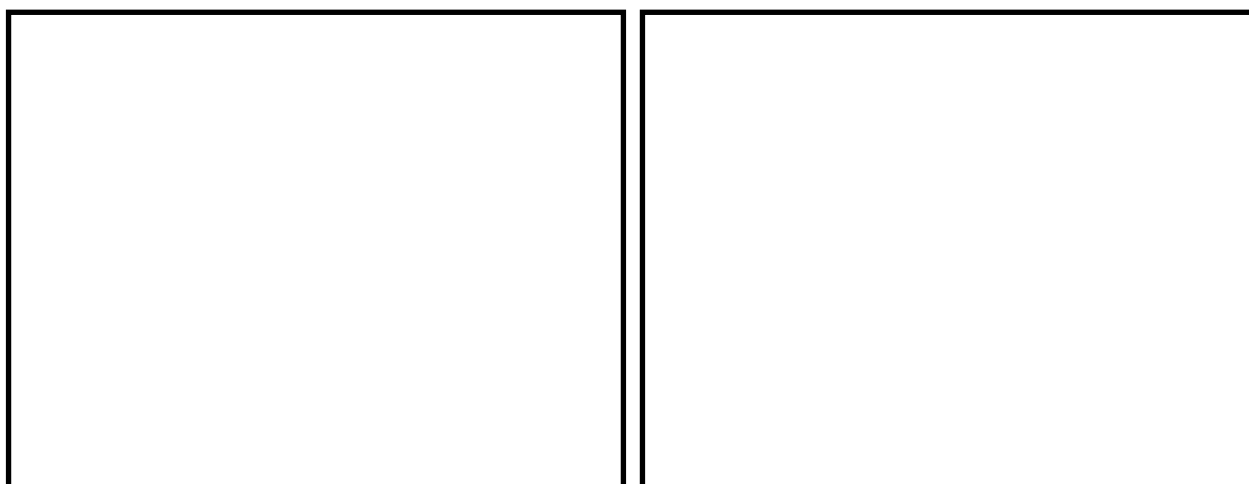
Για το σκοπό αυτό το γονίδιο *avrPphB* (από την *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) απομονώθηκε με PCR και κλωνοποιήθηκε στον ικό φορέα έκφρασης PVX-202. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *avrPto* από *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, το οποίο επίσης απομονώθηκε με PCR και κλωνοποιήθηκε στον ικό φορέα PVX-202.

Μόλυνση φυτών καπνού *N. benthamiana* με τις παραπάνω κατασκευές, οδήγησε σε ολοκληρωτική νέκρωση των φυτών (Εικ. 24). Αντίθετα, στις τομάτες νέκρωση παρατηρήθηκε μόνο στην ποικιλία 76R για το *avrPto*, το οποίο αναμενόταν γιατί η ποικιλία αυτή φέρει το γονίδιο ανθεκτικότητας *Pto*, το οποίο αντιστοιχεί γενετικά με το *avrPto*. Επιπλέον, έχει βρεθεί με το σύστημα των δύο υβριδίων ότι οι πρωτεΐνες AvrPto και Pto αλληλεπιδρούν. Ο ανασυνδυασμένος ιός, που έκφραζε το γονίδιο *avrPphB*, προκάλεσε νέκρωση και στις δύο ποικιλίες τομάτας, 76R και 76S. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι: 1) η πρωτεΐνη AvrPphB, όπως και άλλες πρωτεΐνες Avr, έχει θνησιγόνο δράση 2) δρα μέσα στο φυτικό κυτταρόπλασμα. Αν και πολλές πρωτεΐνες Avr δρουν στο φυτικό κυτταρόπλασμα (31), έχει βρεθεί ότι μέλη της οικογένειας *avrBs3* της *Xanthomonas* δρουν στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου (76) 3) η πρωτεΐνη που αναγνωρίζει την AvrPphB υπάρχει στον καπνό (*N. benthamiana*) και στις τομάτες 76R και 76S.

Πίνακας 8. Συμπτώματα νέκρωσης σε φυτά μετά από έκφραση βακτηριακών γονιδίων.

	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i> 76R	<i>Lycopersicum esculentum</i> 76S
PVX/hrpZ	-	-	-
PVX/SP-hrpZ	++	?	?
PVX/avrPto	++++	++++	-
PVX/avrPphB	++++	++++	++++

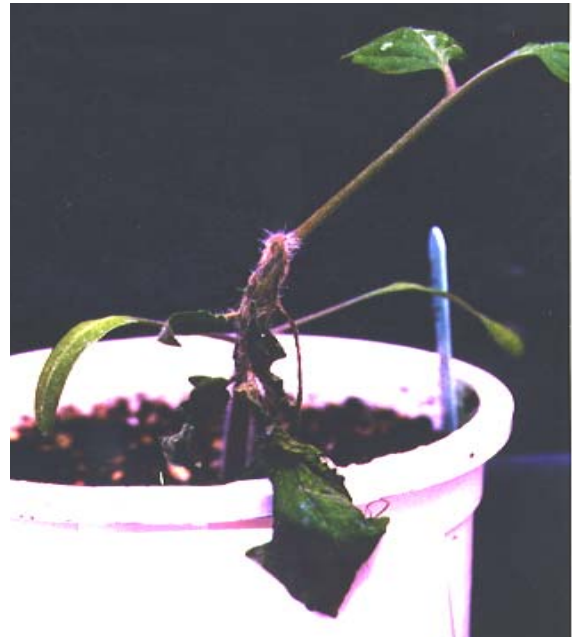
Σημειώσεις: -: έλλειψη μακροσκοπικής νέκρωσης, ++:νεκρωτικές κηλίδες διάσπαρτες στα φύλλα, ++++:έντονη τυπική νέκρωση του φύλλου. ?: δεν ελέγχθηκε.



A.



B.

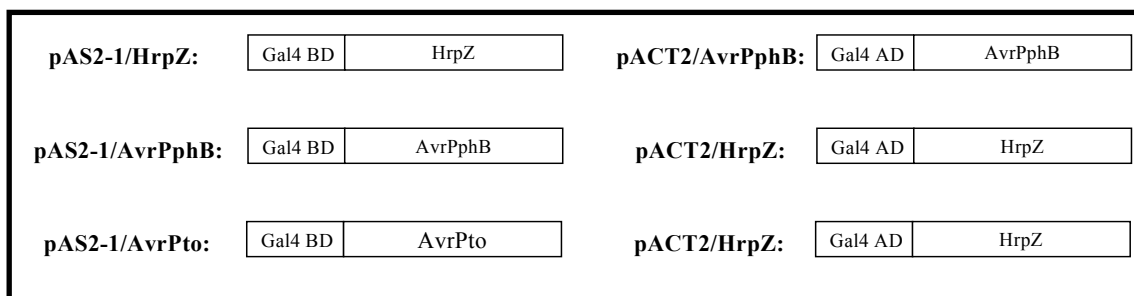


Εικόνα 24. Συμπτώματα νέκρωσης σε φυτά μετά από έκφραση πρωτεϊνών Avr με το ιικό σύστημα έκφρασης PVX202. **A.** Φυτό καπνού *Nicotiana benthamiana* 10 μέρες μετά από μόλυνση με τον ιό PVX202/AvrPphB. **B.** Φυτό τομάτας *Lycopersicon esculentum* 76S, 10 μέρες μετά από μόλυνση με τον ιό PVX202/AvrPphB. **Γ.** Φυτό καπνού *Nicotiana benthamiana* 10 μέρες μετά από μόλυνση με τον ιό PVX202/AvrPto.

3.2.6. Έλεγχος αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών HrpZ, AvrPphB και AvrPto με το σύστημα των δύο υβριδίων

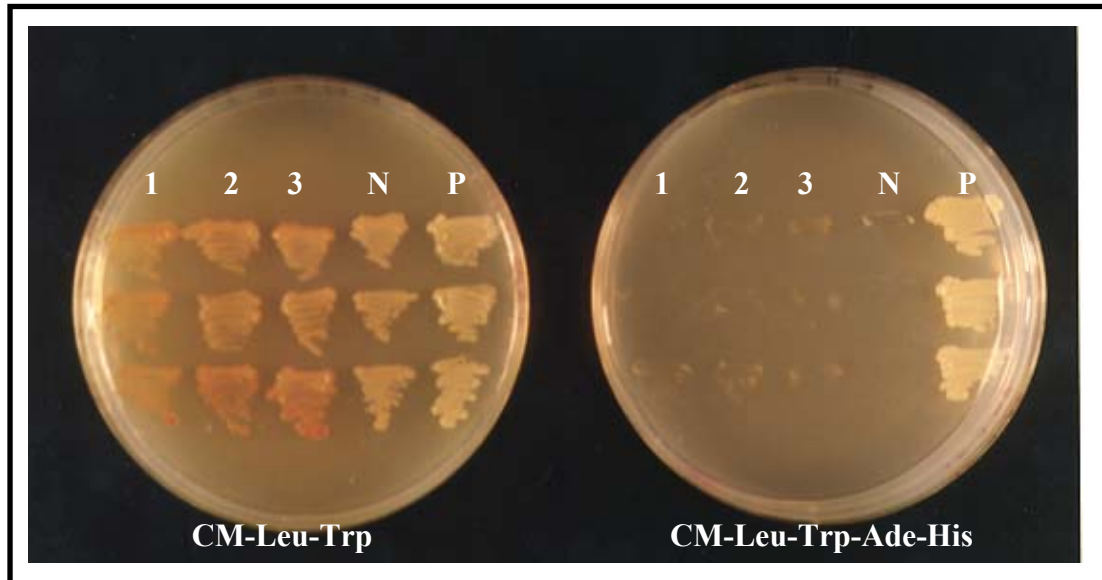
Η ελευθέρωση των πρωτεϊνών Avr στο φυτό δεν απαιτεί μόνο ένα λειτουργικό εκκριτικό σύστημα Hrp, όπως δείχτηκε με μεταλλαγές σε γονίδια *hrp*, αλλά επιπλέον εξαρτάται και από την παρουσία χαρπίνης στα βακτήρια. Είναι ενδιαφέρον ότι, τόσο οι πρωτεΐνες Avr όσο και οι χαρπίνες, πρέπει να εκφράζονται από το ίδιο βακτηριακό κύτταρο, υποδηλώνοντας ότι ενδεχομένως αλληλεπιδρούν προκειμένου να ελευθερωθούν οι Avr στα φυτικά κύτταρα (88). Η απαίτηση για συνέκφραση των Avr και χαρπινών από το ίδιο βακτηριακό κύτταρο είχε οδηγήσει στην υπόθεση ότι οι χαρπίνες βοηθούν τη μεταφορά των Avr, και έτσι είναι πιθανό να λειτουργούν, όπως η πρωτεΐνη YopD στη *Yersinia*. Η YopD εκκρίνεται στο βακτηριακό μέσο καλλιέργειας, εκδηλώνει ανεξάρτητα κυτοτοξικότητα και είναι απαραίτητη για την πυροδότηση της μεταφοράς άλλων πρωτεϊνών Yops στα κύτταρα-ξενιστές, μέσω των ζωνών επαφής, που δημιουργούνται (213). Αν λοιπόν η χαρπίνη έχει ένα ανάλογο ρόλο με τη YopD, τότε θα περίμενε κανείς ότι οι χαρπίνες και οι πρωτεΐνες Avr αλληλεπιδρούν.

Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης ενισχύουν μια τέτοια υπόθεση. Το γεγονός ότι η χαρπίνη δρά στο κυτταρικό τοίχωμα και η έκφρασή της AvrPphB στο φυτό προκαλεί νέκρωση, μας προέτρεψε να ελέγξουμε αν οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν. Για να ελεγχθεί αυτό το ενδεχόμενο χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης. Το γονίδιο της χαρπίνης και δύο γονίδια *avr*, τα *avrPphB* και *avrPto*, υποκλωνοποιήθηκαν σε φορείς έκφρασης της ζύμης, όπως φαίνεται από την Εικόνα 25.



Εικόνα 25. Πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στο σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης. Gal4 BD: Gal4 DNA binding domain, Gal4 AD: Gal4 activation domain.

Οι κατασκευές αυτές εισήχθηκαν στο στέλεχος της ζύμης PJ69-4A, το οποίο περιέχει τρία διαφορετικά γονίδια αναφοράς (*ade*, *his*, *lacZ*), κάθε ένα από τα οποία εκφράζεται από διαφορετικό υποκινητή, ελαττώνοντας έτσι την πιθανότητα ανίχνευσης ψευδοθετικής αλληλεπίδρασης στα μετασχηματισμένα κύτταρα ζύμης. Ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης έγινε τόσο με μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης, όσο και με ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο, που δεν περιείχε αδερίνη και ιστιδίνη (Εικ. 26). Η αδυναμία των κυττάρων να αναπτυχθούν απουσία αδερίνης και ιστιδίνης, καθώς και η έλλειψη ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης σημαίνει ότι η χαρπίνη δεν αλληλεπιδρά άμεσα ούτε με την ΑνιΡto, ούτε με την ΑνιΡhB. Ομως, το αρνητικό αυτό αποτέλεσμα μπορεί να αποδοθεί είτε σε αδυναμία του συστήματος, να ανιχνεύσει μια ενδεχόμενη αλληλεπίδραση, επειδή οι χιμαιρικές πρωτεΐνες αποκτούν τέτοια διαμόρφωση που δεν επιτρέπει την αλληλεπίδραση μεταξύ τους, είτε στο γεγονός, ότι δεν υπάρχει φυσική επαφή μεταξύ τους, γιατί ενδεχομένως απαιτείται και ένας τρίτος παράγοντας, ο οποίος λειτουργεί ως σύνδεσμος μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Έτσι, για να ελεγχθεί η πρώτη υπόθεση, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του Farwestern, η οποία σε αντίθεση με το σύστημα των δύο υβριδίων παρέχει 1) άμεση απόδειξη της αλληλεπίδρασης και 2) οι πρωτεΐνες δεν απαιτείται να εκφραστούν ως χίμαιρες. Παρά τις επαναλαμβανόμενες προσπάθειες δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ της χαρπίνης και των πρωτεϊνών Ανι, που ελέγχθηκαν. Έτσι συμπεραίνεται ότι η εξάρτηση της μεταφοράς των πρωτεϊνών Ανι μέσα στα φυτικά κύτταρα από τη χαρπίνη, ενδεχομένως δεν απαιτεί φυσική επαφή με την τελευταία.



Εικόνα 26. Κύτταρα ζύμης PJ69-4A, που περιείχαν τις πλασμιδιακές κατασκευές 1) pAS2-1/HrpZ και pACT2/AvrPphB, 2) pAS2-1/AvrPphB και pACT2/HrpZ 3) pAS2-1/AvrPphB και pACT2/HrpZ αναπτύχθηκαν σε πλήρες ελάχιστο θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε λευκίνη, τρυπτοφάνη, αδενίνη και ιστιδίνη (CM-Ade-His-Leu-Trp), για να ελεγχθεί η ύπαρξη θετικής αλληλεπίδρασης. Τα τρυβλία επώστηκαν στους 30°C για 3 μέρες. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του ίδιου στελέχους που περιείχαν τα πλασμίδια pVA3-1 και pTD1-1 (P), ενώ ως αρνητικός μάρτυρας κύτταρα με τα πλασμίδια pAS2-1 και pACT2 (N).

3.2.7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όλα τα παθογόνα βακτήρια των φυτών πολλαπλασιάζονται εξωκυττάρια, στον αποπλάστη των φύλλων ή σε αγγεία του ξυλώματος και απ' αυτή τη θέση πυροδοτούν μια σειρά μορφολογικών και βιοχημικών αλλαγών στα φυτικά κύτταρα, οι οποίες καταλήγουν είτε σε εκδήλωση ασθένειας ή σε ανθεκτικότητα, ανάλογα με το στέλεχος του βακτηρίου και την ποικιλία του φυτού. Η ανακάλυψη ότι και οι δύο τύποι αλληλεπιδράσεων (ασθένεια και ανθεκτικότητα) μεταξύ φυτών και παθογόνων καθορίζονται από μια ομάδα βακτηριακών γονιδίων, που ονομάστηκαν για το λόγο αυτό *hrp*, ενώ η έκβαση της αλληλεπίδρασης καθορίζεται από τα βακτηριακά γονίδια *avr*, άνοιξε το δρόμο για τη μελέτη των μοριακών και βιοχημικών μηχανισμών που διέπουν τις αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων.

Αρχικά η έρευνα προσανατολίστηκε στην ταυτοποίηση των πρωτεϊνών, που εκκρίνονται από τα βακτήρια που φέρουν γονίδια *hrp* και *avr*, επειδή τα βακτήρια δρουν έξω από τα φυτικά κύτταρα. Έτσι, βρέθηκε ότι πρωτεΐνες, που κωδικοποιούνται από γονίδια *hrp*, οι χαρπίνες, είχαν την ικανότητα να επάγουν έναν από τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών, την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR), γεγονός που οδήγησε στην άποψη ότι ήταν οι πρωτογενείς διεγέρτες της HR (106, 253). Όμως το γεγονός ότι εκκρίνονται δεν καθορίζει κατ' ανάγκη και τη θέση δράσης τους στο φυτικό κύτταρο, δηλαδή αν η δράση τους σχετίζεται με το κυτταρικό τοίχωμα ή με την κυτταρική μεμβράνη ή τέλος αν εισέρχονται με κάποιο μηχανισμό μέσα στα φυτικά κύτταρα. Έτσι με την παρούσα μελέτη δείχτηκε ότι η χαρπίνη HrpZ από την *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, εκδηλώνει τη δράση της έξω από τα φυτικά κύτταρα, γιατί έκφραση της μαζί με κατάλληλο πεπτίδιο έκκρισης, ώστε η πρωτεΐνη να εντοπίζεται στον αποπλάστη των φύλλων, προκάλεσε την εμφάνιση νεκρωτικών κηλίδων στα φύλλα φυτών καπνού που είχαν μολυνθεί με τον ανασυνδυασμένο ιό PVX202/SP-HrpZ. Η εμφάνιση των νεκρωτικών κηλίδων ήταν αντιπροσωπευτική της HR, όπως δείχτηκε με την επαγωγή του γονιδίου *hsr203J*. Η αδυναμία των διαγονιδιακών φυτών που έκφραζαν την εκκρινόμενη μορφή της χαρπίνης οφείλεται στο ότι η παραγόμενη πρωτεΐνη ήταν 50-100 φορές λιγότερη από την ποσότητα που απαιτείται για την καθαρή πρωτεΐνη να προκαλέσει HR. Το γεγονός ότι τόσο η καθαρισμένη χαρπίνη, από το βακτηριακό σύστημα *E.coli*/pT7-7, όσο και η παραγόμενη από το φυτό πρέπει να είναι σε πολύ υψηλή

συγκέντρωση προκειμένου να πυροδοτήσει την HR, ενώ τα βακτήρια παράγουν πολύ λιγότερη πρωτεΐνη, κατά την επαγωγή της HR in planta, ίσως να μην αντανακλά την πραγματική της βιολογική λειτουργία. Πράγματι μη πολικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *hrpZ_{P_{SS}}* δεν καταργούν πλήρως την ικανότητα των βακτηρίων να επάγουν HR, ενώ μεταλλαγή ενός γονιδίου *avr (hrmA)* την καταργούν πλήρως (3). Επιπλέον μεταλλάξεις και σε άλλα γονίδια *hrp*, που δεν επηρεάζουν το γονίδιο *hrmA*, εμποδίζουν την εκδήλωση της HR. Η εξάρτηση του φαινοτύπου των γονιδίων *avr* από τα γονίδια *hrp* περιορίζεται μόνο όταν τα ζωντανά παθογόνα βακτήρια εγχύνονται στον μεσοκυττάριο χώρο των φύλλων, γιατί όπως προέκυψε από την παρούσα μελέτη αλλά και από μελέτες άλλων ερευνητών η έκφραση των πρωτεϊνών Avr στο φυτό είναι αρκετή να επάγει την HR (31, 88).

Έτσι τα γονίδια *hrp* δεν συμμετέχουν άμεσα στην παραγωγή μοριακών σημάτων, που παρεμβάλλονται στη δράση των πρωτεϊνών Avr, αλλά θεωρείται ότι παίζουν ρόλο στη μεταφορά των πρωτεϊνών Avr μέσα στο φυτικό κύτταρο (6). Πράγματι, ορισμένες πρωτεΐνες Hrp είναι ομόλογες με πρωτεΐνες από ζωικά παθογόνα που είναι δομικά συστατικά του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Καθώς οι πρωτεΐνες Avr δεν έχουν ανιχνευθεί στο υπερκείμενο βακτηριακών καλλιεργειών και έκφραση τους μέσα στο φυτό προκαλεί νέκρωση, πιστεύεται ότι αυτές οι πρωτεΐνες μεταφέρονται μόνο μετά από επαφή με το κύτταρο-ξενιστή, όπως συμβαίνει με τις πρωτεΐνες Yops της *Yersinia* (31). Η μεταφορά των Yops πιστεύεται ότι ξεκινά μετά την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης YopN, η οποία λειτουργεί ως αισθητήρας, με ένα υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια του ξενιστή (72). Ένα ανάλογο σύστημα θα μπορούσε να συμμετέχει στη μεταφορά των πρωτεϊνών Avr μέσα στο φυτικό κύτταρο. Ομως αντίθετα με τα ζωικά κύτταρα, τα φυτικά κύτταρα περιβάλλονται από το κυτταρικό τοίχωμα, δημιουργώντας το ερώτημα αν και κατά πόσο οι πρωτεΐνες Avr διασχίζουν το πλέγμα του κυτταρικού τοιχώματος ελεύθερες ή σε κάποια άλλη μορφή. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει μαρτυρία ότι τα κύτταρα του παθογόνου κάνουν άμεση επαφή με την κυτταρική μεμβράνη των φυτικών κυττάρων. Το εύρημα ότι στην επιφάνεια του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* επάγεται ο σχηματισμός εξαρτημάτων, δομικό στοιχείο των οποίων είναι η πρωτεΐνη HrpA, υποδηλώνει ότι το εκκριτικό σύστημα τύπου III συμμετέχει στο σχηματισμό μιας δομής που ίσως διασχίζει το κυτταρικό τοίχωμα και έτσι μεσολαβεί στη μεταφορά πρωτεϊνών Avr μέσα στο κύτταρο (210). Είναι ενδιαφέρον ότι ο αγωγός

Hpr, ο οποίος έχει μια διάμετρο 6-8 nm, είναι αρκετά λεπτός για να διασχίσει τα φυσικά ανοίγματα του κυτταρικού τοιχώματος, χωρίς τοπική υδρόλυση των επαλλήλων στρωμάτων των δομικών πολυσακχαριτών που το συνθέτουν. Αν αυτές οι δομές είναι κοίλες και λειτουργούν πράγματι ως κανάλια δεν έχει εξακριβωθεί.

Εκτός από ένα λειτουργικό εκκριτικό σύστημα Hpr οι πρωτεΐνες Avt απαιτούν και χαρπίνη, σε κάποιο παρεμβαλλόμενο στάδιο παραγωγής, μεταφοράς ή δράσης τους, αν και οι απόψεις στο σημείο αυτό από δύο ερευνητικές ομάδες δίστανται (88, 191). Πιστεύεται ότι η ασυμφωνία αυτή οφείλεται πιθανόν σε διαφορές στον πειραματικό σχεδιασμό. Η επικρατούσα άποψη είναι ότι η χαρπίνη απαιτείται για την ελευθέρωση της πρωτεΐνης Avt μέσα στα φυτικά κύτταρα και ο ρόλος αυτός της χαρπίνης μπορεί να εκδηλωθεί μόνο όταν οι δύο πρωτεΐνες παράγονται από το ίδιο βακτηριακό κύτταρο (88). Ετσι προτάθηκε ότι η χαρπίνη ίσως είναι ένας εξωκυττάριος βοηθός στην ελευθέρωση των πρωτεϊνών Avt, όπως στη *Yersinia* η YopD βοηθά την ελευθέρωση της YopE (213). Στη βάση αυτών των δεδομένων εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη αν η χαρπίνη αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες Avt. Όμως δεν διαπιστώθηκε ότι υπάρχει άμεση επαφή μεταξύ τους. Ένα ενδεχόμενο είναι ότι απαιτείται και τρίτη πρωτεΐνη που λειτουργεί ως συνδέτης (μεσολαβητής της αλληλεπίδρασης) μεταξύ των δύο. Μια άλλη ερμηνεία είναι ότι η χαρπίνη συμμετέχει στη διαδικασία μεταφοράς των πρωτεϊνών Avt, όχι όμως μέσω αλληλεπίδρασης μ' αυτές αλλά διευκολύνοντας ένα άλλο στάδιο της διαδικασίας.

Στην παρούσα μελέτη δείχτηκε ότι η χαρπίνη δε φαίνεται να έχει ως στόχο την κυτταρική μεμβράνη, γιατί δεν παρατηρήθηκε επαγωγή ROS σε απομονωμένους πρωτοπλάστες, φαινόμενο το οποίο συμβαίνει σε αιωρούμενες κυτταροκαλλιέργειες καπνού (16). Ετσι συνάγεται ότι η χαρπίνη πιθανότατα έχει ως στόχο της το κυτταρικό τοίχωμα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα δεδομένα άλλων ερευνητών οι οποίοι δεν παρατήρησαν αλκαλοποίηση του μέσου καλλιέργειας των πρωτοπλαστών, μετά από προσθήκη χαρπίνης, ενώ σε αιωρούμενες κυτταροκαλλιέργειες παρατηρήθηκε (110). Επιπλέον δεν κατάφεραν να εντοπίσουν χαρπίνη, με φθορίζοντα αντισώματα, μέσα στο φυτικό κυτταρόπλασμα ή στη μεμβράνη των απομονωμένων πρωτοπλαστών, ενώ ανιχνευόταν σε κύτταρα με κυτταρικό τοίχωμα.

Ένα λοιπόν πιθανό σενάριο είναι ότι οι χαρπίνες συμμετέχουν σε μια διαδικασία που ευαισθητοποιούν το φυτικό κύτταρο στα πρώτα στάδια της αλληλεπίδρασης

κυττάρου-βακτηρίου. Ένα τέτοιο στάδιο ευαισθητοποίησης ίσως να απαιτείται για το φυτικό κύτταρο να γίνει πιο αποκρίσιμο στις πρωτεΐνες Ανγ και/ή στην είσοδο τους μέσα στο φυτικό κυτταρόπλασμα. Η άποψη αυτή φαίνεται να κερδίζει έδαφος μετά την πολύ πρόσφατη ανακάλυψη μιας νέας πρωτεΐνης της HrpW. Η πρωτεΐνη αυτή βρέθηκε σε *Erwinia amylovora* και *Pseudomonas syringae* ταυτόχρονα από δύο ερευνητικές ομάδες και εμφανίζει μια ιδιόμορφη δομή (39, 129). Το αμινοτελικό τμήμα της είναι ομόλογο με τις χαρπίνες και το καρβοξυτελικό τμήμα της είναι ομόλογο με πηκτινικές λυάσες. Η HrpW εκτός του ότι εμφανίζει τα δομικά χαρακτηριστικά των χαρπινών έχει την ικανότητα να επάγει την HR σε καθαρή μορφή, αλλά μεταλλαγές στο γονίδιο της δεν επηρεάζουν το φαινότυπο Hrp. Μια υπόθεση είναι ότι το *hrpW* ίσως είναι ένα γονίδιο “υπό εξαφάνιση” του οποίου ο ρόλος στην παθογένεια έχει αντικατασταθεί από το *hrpN/hrpZ* στη διάρκεια της εξέλιξης. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η HrpN/Z είναι η κύρια εκκρινόμενη πρωτεΐνη Hrp, ενώ η HrpW δεν είναι.

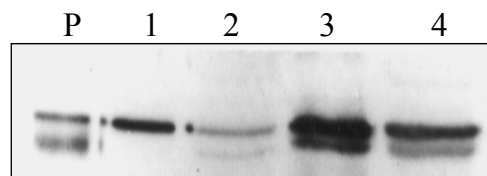
Από την άλλη πλευρά η HrpW δεν εμφανίζει ενεργότητα λυάσης, γεγονός που αποδόθηκε στην έλλειψη των συντηρημένων κυστεϊνών που υπάρχουν στις ομόλογες πηκτινικές λυάσες. Ομως η ικανότητα της HrpW να δεσμεύει πηκτίνες είναι σύμφωνη με το μοντέλο το οποίο θεωρεί ότι η θέση δράσης της χαρπίνης είναι στο κυτταρικό τοίχωμα. Ορισμένες Ανγ, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μεταφέρονται κατευθείαν μέσα στο φυτικό κύτταρο μέσω του συστήματος Hrp. Ομως για να ελευθερωθούν μέσα στο φυτικό κύτταρο θα πρέπει να διασχίσουν το κυτταρικό τοίχωμα. Οι χαρπίνες ίσως λειτουργούν σε αυτό το στάδιο, πιθανόν με χαλάρωση του κυτταρικού τοιχώματος. Η γενική έλλειψη κυστεϊνών στις χαρπίνες πιστεύεται ότι πιθανόν να συμβάλλει στη διατήρηση της πρωτεΐνης σε ξεδιπλωμένη μορφή έτσι ώστε να διευκολύνεται η διάτρηση του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος ή η διάβαση του αγωγού Hrp μέσα από το δομικό πλέγμα του κυτταρικού τοιχώματος.

Παρά τις έντονες προσπάθειες που έχουν γίνει από πολλές ερευνητικές ομάδες και τα δεδομένα που έχουν προκύψει, ο ρόλος των χαρπινών εξακολουθεί μέχρι σήμερα να είναι αινιγματικός. Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι οι χαρπίνες παραμένουν οι μόνες γνωστές βακτηριακές πρωτεΐνες που είναι ικανές να επάγουν ένα εμφανή κυτταρικό θάνατο όταν παρέχονται εξωγενώς σε φυτικά κύτταρα.

ΕΝΟΤΗΤΑ Β: Διερεύνηση της προέλευσης των δύο μορφών της χαρπίνης

3.2.8. Παρουσία και προέλευση δύο διαφορετικών ηλεκτροφορητικά μορφών χαρπίνης *in vivo*

Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης, όπως αναφέρεται λεπτομερέστερα στη συνέχεια, παρατηρήθηκε ότι όταν εκφράζεται *in vivo* τόσο σε ευκαρυωτικά κύτταρα (φύλλα καπνού από διαγονιδιακά φυτά και φύλλα καπνού μολυσμένα με τον ιό PVX202-HrpZ), όσο και σε προκαρυωτικά, η χαρπίνη εμφανίζεται με τη μορφή δύο ζωνών, οι οποίες αναγνωρίζονται από το αντίσωμα anti-HrpZ_{Psp}. Η μεγαλύτερη ζώνη αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της χαρπίνης 35.26 kDa, ενώ η μικρότερη εκτιμήθηκε, με βάση τους πρωτεϊνικούς μάρτυρες ηλεκτροφόρησης, ότι είναι περίπου 2 kDa μικρότερη. Το ίδιο πρότυπο εμφάνιζε και η καθαρισμένη πρωτεΐνη από *E.coli*, όπως και σε πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από φύλλα καπνού, τα οποία είχαν μολυνθεί με *P.syringae* pv. *phaseolicola* (Εικ. 27). Σε όλες τις περιπτώσεις, η μικρού μοριακού βάρους μορφή δεν είχε διακριτή διαφορά μοριακού βάρους. Όμως η μικρότερη ζώνη δεν ανιχνευόταν σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων του βακτηρίου *P.syringae* pv. *phaseolicola*, κατά την ανάπτυξή τους σε θρεπτικό μέσο επαγωγής.



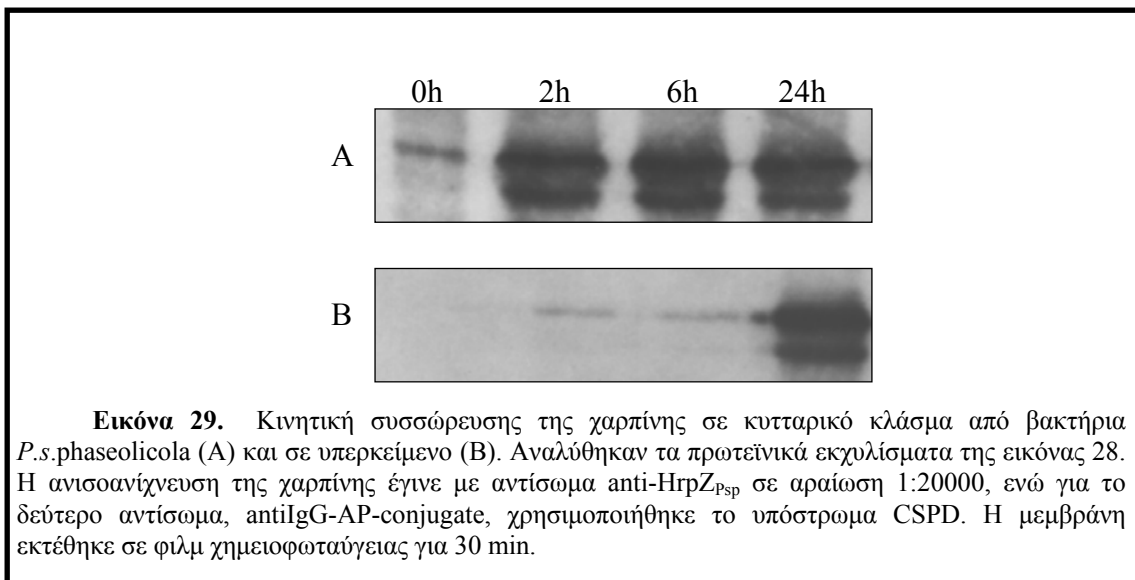
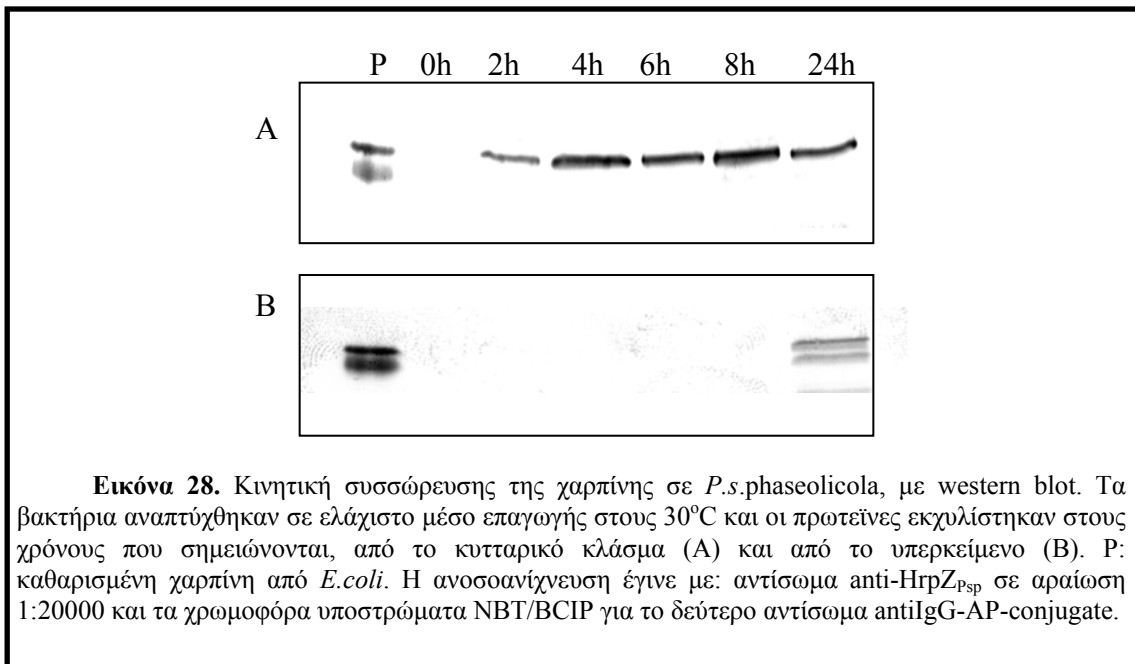
Εικόνα 27. Εκφραση του γονιδίου *hrpZ* οδηγεί στην παραγωγή δύο μορφών χαρπίνης. Τα δείγματα προέρχονται από: P: Καθαρισμένη χαρπίνη από *E.coli*, 1: κυτταρικό κλάσμα της *P.s.phaseolicola*, που αναπτύχθηκε σε ελάχιστο μέσο επαγωγής (Hrp-inducing medium) για 12 h, 2: Φύλλο καπνού μετά από έγχυση βακτηριακού αιωρήματος *P.s.phaseolicola* στον αποπλάστη, 3: Φύλλα *Nicotiana benthamiana*, μετά από μόλυνση της, με τον ιό PVX202/HrpZ, 4: Φύλλα μετασηματισμένων φυτών ($TetR^+/HrpZ^+$), που εκφράζουν χαρπίνη μετά από επαγωγή με τετρακυκλίνη.

Επειδή το παραπάνω φαινόμενο παρατηρείται και σε άλλες πρωτεΐνες, που εκκρίνονται εξωκυττάρια μέσω του συστήματος Hrp διαφόρων φυτοπαθογόνων βακτηρίων, όπως οι πρωτεΐνες PopA1, HrpA και DspA (βλ. 3.2.13), στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε πιο συστηματικά η προέλευση της μικρότερου μοριακού βάρους μορφής στα διάφορα κυτταρικά συστήματα έκφρασης του γονιδίου *hrpZ*, όπως και *in vitro*. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν τρία ενδεχόμενα: α) η μικρότερη μοριακού βάρους μορφή να είναι προϊόν ή ενδιάμεσο στάδιο της εκκριτικής διαδικασίας καθεαυτής, β) να προέρχεται από πρωτεόλυση ανεξάρτητη του εκκριτικού μηχανισμού και γ) να προέρχεται από μεταφραστική έναρξη σε ένα εσωτερικό κωδικόνιο του γονιδίου, δεδομένου ότι υπάρχει μια μεθειονίνη στη θέση 15 της πρωτεΐνης.

Κατ' αρχήν, εξετάστηκε αν η μικρότερη ζώνη αποτελεί την εκκρινόμενη μορφή της πρωτεΐνης στο βακτήριο *P.syringae* pv. *phaseolicola*. Για το σκοπό αυτό βακτήρια αναπτύχθηκαν αρχικά σε πλούσιο θρεπτικό μέσο (LB) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο για να γίνει επαγωγή των γονιδίων *hrp*. Στο μέσο αυτό παρέμειναν για ένα διάστημα 24 h στη διάρκεια του οποίου λαμβάνονταν δείγματα από το υπερκείμενο των βακτηρίων καθώς και από τα κύτταρα, μετά από κατακρήμνιση με φυγοκέντρηση. Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι η συσσώρευση της χαρπίνης, στο κυτταρικό ίζημα, αρχίζει 2 h μετά τη μεταφορά των βακτηρίων στο θρεπτικό μέσο επαγωγής, ενώ έκκρισή της στο υπερκείμενο παρατηρείται για πρώτη φορά στις 24 h (Εικ. 28). Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κατακρημνισμένων κυττάρων δεν ανιχνεύεται η μικρότερη ζώνη, η οποία όμως εμφανίζεται στο υπερκείμενο-δείγμα στις 24 h. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι η μικρότερου μοριακού βάρους μορφή δεν αποτελεί υποχρεωτικό ενδιάμεσο ή προϊόν έκκρισης της πρωτεΐνης και ότι η μορφή αυτή είναι προϊόν πρωτεόλυσης της μεγαλύτερης μοριακού βάρους μορφής, μετά την έκκριση της στο υπερκείμενο.

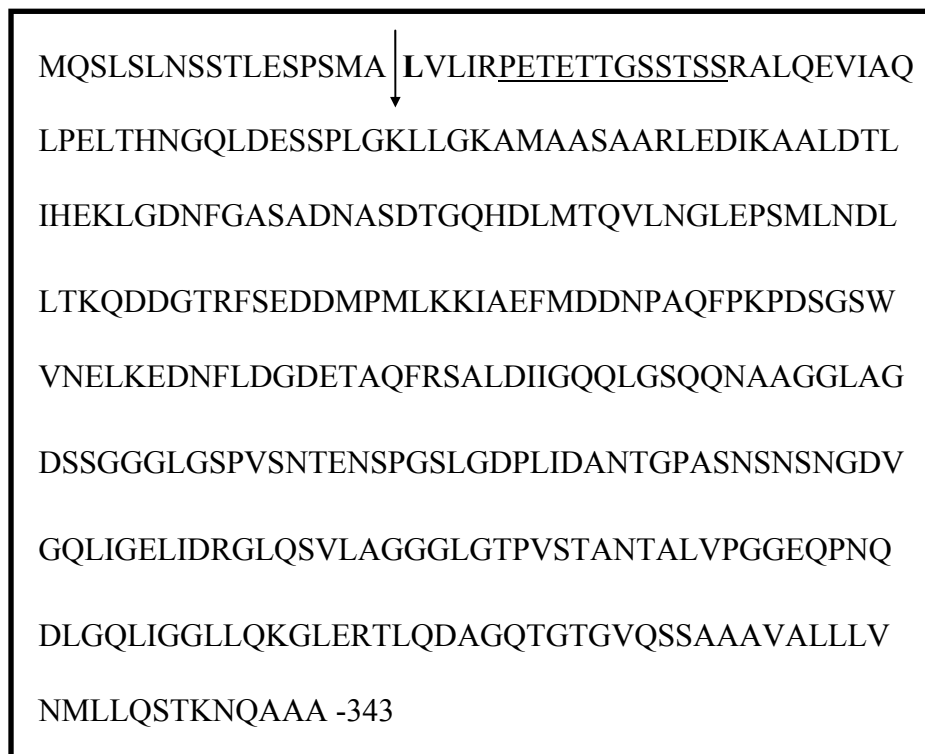
Μετέπειτα πειράματα όμως έδειξαν ότι η απουσία της μικρότερης ζώνης στο πρωτεϊνικό κλάσμα των βακτηριακών κυττάρων οφείλεται σε αδυναμία της μεθόδου να ανιχνεύσει μικρές ποσότητες της πρωτεΐνης. Στην αρχική ανάλυση western, χρησιμοποιήθηκαν τα συνήθη χρωμοφόρα υποστρώματα NBT/BCIP για το αντίσωμα antiIgG-AP-conjugate, το οποίο χρησιμοποιείται ως δεύτερο αντίσωμα. Η χρήση πιο ευαίσθητων υποστρωμάτων, όπως CSPD, που επιτρέπουν ανίχνευση

χημειοφωταύγειας (chemiluminescent detection) έδειξε ότι η δεύτερη ζώνη υπάρχει και στο βακτηριακό ίζημα (Εικ. 29).



3.2.9. Αμινοτελική αλληλούχιση των δύο μορφών της χαρπίνης

Προκειμένου να καθοριστεί αν η μικρότερη ζώνη είναι αποτέλεσμα πρωτεόλυσης ή εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης, δεδομένου ότι υπάρχει μια μεθειονίνη στη θέση 15 της πρωτεΐνης, έγινε αμινοτελική ανάλυση των αμινοξέων των δύο μορφών της πρωτεΐνης, που απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή από καλλιέργεια *E. coli* (pT7-7/HrpZ). Η μεγαλύτερη ζώνη αντιστοιχεί στην πλήρους μήκους πρωτεΐνη και ξεκινά με το αμινοξύ μεθειονίνη στην κωδική θέση 1, ενώ η μικρότερη ζώνη ξεκινά με το αμινοξύ λευκίνη στην κωδική θέση 18 (Leu¹⁸).



Εικόνα 30. Πρωτοταγής δομής της χαρπίνης από *P.s.phaseolicola*. Σημειώνονται: με υπογράμμιση η περιοχή PEST, με βέλος: η θέση πρωτεόλυσης και με έντονο γράμμα το πρώτο αμινοξύ της μικρότερης ζώνης της χαρπίνης, το οποίο ανιχνεύεται μετά από αμινοτελική αλληλούχιση καθαρισμένης χαρπίνης από *E.coli*.

Το αποτέλεσμα αυτό επιδέχεται δύο ερμηνείες: α) η μικρότερη ζώνη είναι προϊόν πρωτεολυτικής αφαίρεσης των 17 πρώτων αμινοξικών καταλοίπων στην *E.coli* και ενός αναλόγου, αλλά όχι κατ' ανάγκη του ίδιου τμήματος στην *P.syringae* pv. *phaseolicola* και το ευκαρυωτικό κυτταρικό περιβάλλον (φυτά), β) η μικρότερη ζώνη προέρχεται από έναρξη της μετάφρασης στο εσωτερικό κωδικόνιο της θέσης 16 (Met), με μετέπειτα αφαίρεση της φορμυλομεθειονίνης και της αλανίνης-17.

Το γεγονός ότι η μικρού μοριακού βάρους μορφή της χαρπίνης υπάρχει και στα φυτικά κύτταρα συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι η δημιουργία της μορφής αυτής δεν

εξαρτάται από το σύστημα Hsp, αλλά είναι αποτέλεσμα δράσης πρωτεασών που υπάρχουν και στις δύο κατηγορίες κυττάρων.

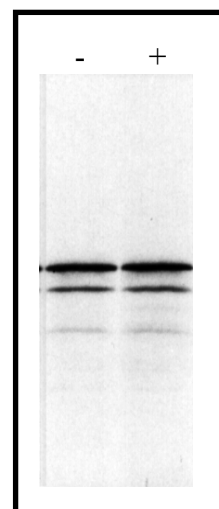
3.2.10. Διερεύνηση της πρωτεόλυσης

Παρατηρήθηκε ότι η σχετική αναλογία της μικρού μοριακού βάρους μορφής της χαρπίνης στα φυτικά κύτταρα είναι σαφώς πολύ μεγαλύτερη απ' ότι στα βακτηριακά κύτταρα (Εικ. 27). Η διαφοροποίηση αυτή, αν και δεν συνηγορεί υπέρ της μίας ή της άλλης από τις δύο παραπάνω ερμηνείες, μας οδήγησε στην ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της χαρπίνης με το πρόγραμμα PEST (<http://www.icnet.uk>), το οποίο έδειξε την παρουσία μιας αλληλουχίας τύπου PEST μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 23-34. Οι αλληλουχίες αυτές είναι πλούσιες σε προλίνες (P), γλουταμικά οξέα (E), σερίνες (S) και θρεονίνες (T). Τέτοιες αλληλουχίες συναντώνται συχνά σε πρωτεΐνες, που αποδομούνται γρήγορα μέσα στα ευκαρυωτικά κύτταρα (207). Είναι λοιπόν πιθανό ότι η παρουσία αυτής της περιοχής ευθύνεται για την υψηλή αναλογία της μικρότερης ζώνης της χαρπίνης μέσα στα φυτικά κύτταρα. Υποστηρίζεται ότι οι πρωτεΐνες, που έχουν αλληλουχίες τύπου PEST αποδομούνται στο κυτταρόπλασμα πιθανά από καλπαΐνες (calpains), ενώ εικάζεται επίσης ότι οι περιοχές αυτές αποτελούν θέσεις αναγνώρισης για την προσθήκη ουβικιτίνης (ubiquitination) και αποδόμηση από το πρωτεόσωμα 26S (204). Αν και μοτίβα PEST απαντώνται σε ένα μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, που ρυθμίζονται σε επίπεδο σταθερότητας, δεν είναι ακόμα γνωστό τι καθορίζει τη λειτουργικότητα μιας αλληλουχίας PEST και πώς διευκολύνει την αποδόμηση των πρωτεϊνών. Έχει βρεθεί ότι η αποδόμηση με μοτίβα PEST ενισχύεται από φωσφορυλίωσή τους σε κατάλοιπα Ser από την κινάση II της καζεΐνης (224). Ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της χαρπίνης εμφάνισε αρκετά μοτίβα για την κινάση αυτή. Αν αυτά είναι λειτουργικά ή όχι δεν είναι γνωστό.

Προκειμένου να διευκρινιστεί το ενδεχόμενο πρωτεολυτικής παραγωγής της μικρού μοριακού βάρους μορφής, εκφράστηκε η χαρπίνη απουσία και παρουσία 12 αναστολέων πρωτεασών, σε λύμα δικτυοερυθροκυττάρων κουνελιού, παρουσία ³⁵S-μεθειονίνης, χρησιμοποιώντας το συζευγμένο *in vitro* σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης. Όπως φαίνεται από την Εικόνα 31, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά

στο προφίλ ενσωμάτωσης της ^{35}S -Met, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρωτεόλυση δεν οφείλεται σε συνήθως απαντώμενες πρωτεάσες.

Εικόνα 31. *In vitro* μετάφραση της χαρπίνης, παρουσία και απουσία πρωτεϊνικών αναστολέων. Η μεταγραφή και μετάφραση έγινε από το πλασμίδιο T7-7/HrpZ (1μg) με το συζευγμένο σύστημα TNT σε λύμα δικτυοερυθροκυττάρων κουνελιού (Promega), παρουσία ^{35}S -Methionine, όπως περιγράφεται στα υλικά και μέθοδοι. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 30°C απουσία πρωτεϊνικών αναστολέων (-) και παρουσία τους (+) για χρονικό διάστημα 90 λεπτών και αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και αυτοραδιογραφία.

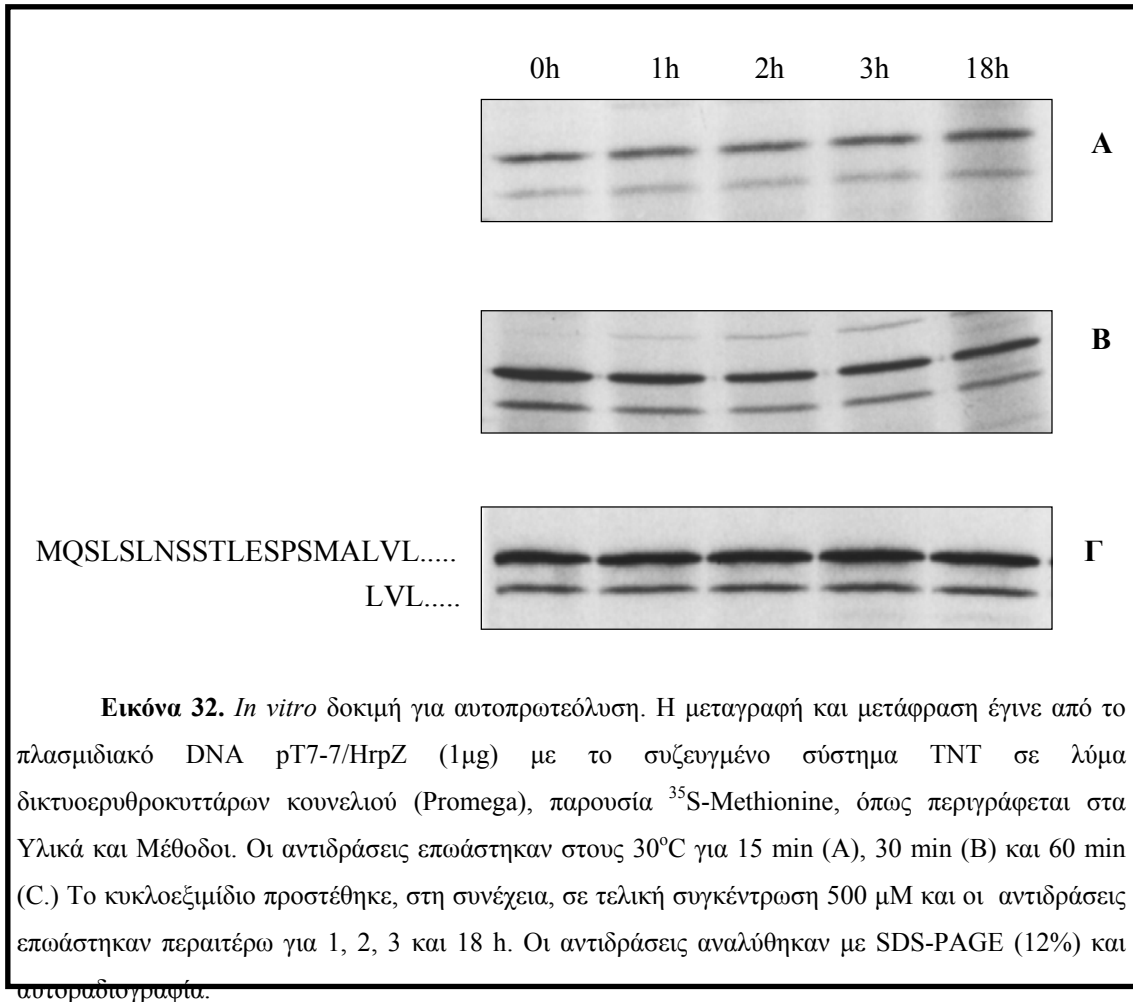


3.2.11. Διερεύνηση *in vitro* αυτοπρωτεόλυσης

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένα, πρωτεΐνες που διασχίζουν το μονοπάτι Hrp, όπως PopA1, HrpA και DspA, εμφανίζουν προϊόντα πρωτεόλυσης, όπως και η χαρπίνη μετά την έκκρισή τους από τα βακτήρια, τα οποία εξακολουθούν να διατηρούν τη βιολογική ενεργότητα των πλήρους μήκους πρωτεϊνών (9, 81, 211). Το κοινό αυτό χαρακτηριστικό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι δεν εμφανίζεται κάποιο συντηρημένο μοτίβο ή κάποια χαρακτηριστική θέση πρωτεόλυσης και η διαδικασία δεν αναστέλλεται από συνήθεις αναστολείς πρωτεασών, μας οδήγησε στην υπόθεση ότι πιθανόν οι πρωτεΐνες αυτές να δρουν ως αυτοπρωτεάσες.

Προκειμένου να διευκρινιστεί αν η μικρότερη ζώνη είναι αποτέλεσμα αυτοπρωτεόλυσης, η χαρπίνη-το πλήρες κωδικό πλαίσιο της οποίας ήταν κλωνοποιημένο στο φορέα έκφρασης pT7-7- εκφράστηκε σε λύμα δικτυοερυθροκυττάρων κουνελιού, παρουσία ^{35}S -μεθειονίνης, χρησιμοποιώντας το συζευγμένο *in vitro* σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης. Η χρήση του συστήματος αυτού δίνει τη δυνατότητα να διαπιστωθεί αν μία πρωτεΐνη αυτοπρωτεολύεται, όταν

αναστέλλοντας τη μετάφραση παρατηρείται προοδευτική συσσώρευση του πρωτεολυόμενου προϊόντος. Στην προκειμένη περίπτωση, η μετάφραση αναστάλθηκε με προσθήκη κυκλοεξιμιδίου σε τελική συγκέντρωση 500μM και λήφθηκαν δείγματα σε ένα χρονικό διάστημα 0-18 h, μετά την προσθήκη του αναστολέα.



Εικόνα 32. *In vitro* δοκιμή για αυτοπρωτεόλυση. Η μεταγραφή και μετάφραση έγινε από το πλασμιδιακό DNA pT7-7/HrpZ (1μg) με το συζευγμένο σύστημα TNT σε λύμα δικτυοερυθροκυττάρων κουνελιού (Promega), παρουσία ³⁵S-Methionine, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν στους 30°C για 15 min (A), 30 min (B) και 60 min (C.) Το κυκλοεξιμίδιο προστέθηκε, στη συνέχεια, σε τελική συγκέντρωση 500 μM και οι αντιδράσεις επώαστηκαν περαιτέρω για 1, 2, 3 και 18 h. Οι αντιδράσεις αναλύθηκαν με SDS-PAGE (12%) και αυτοραδιογραφία.

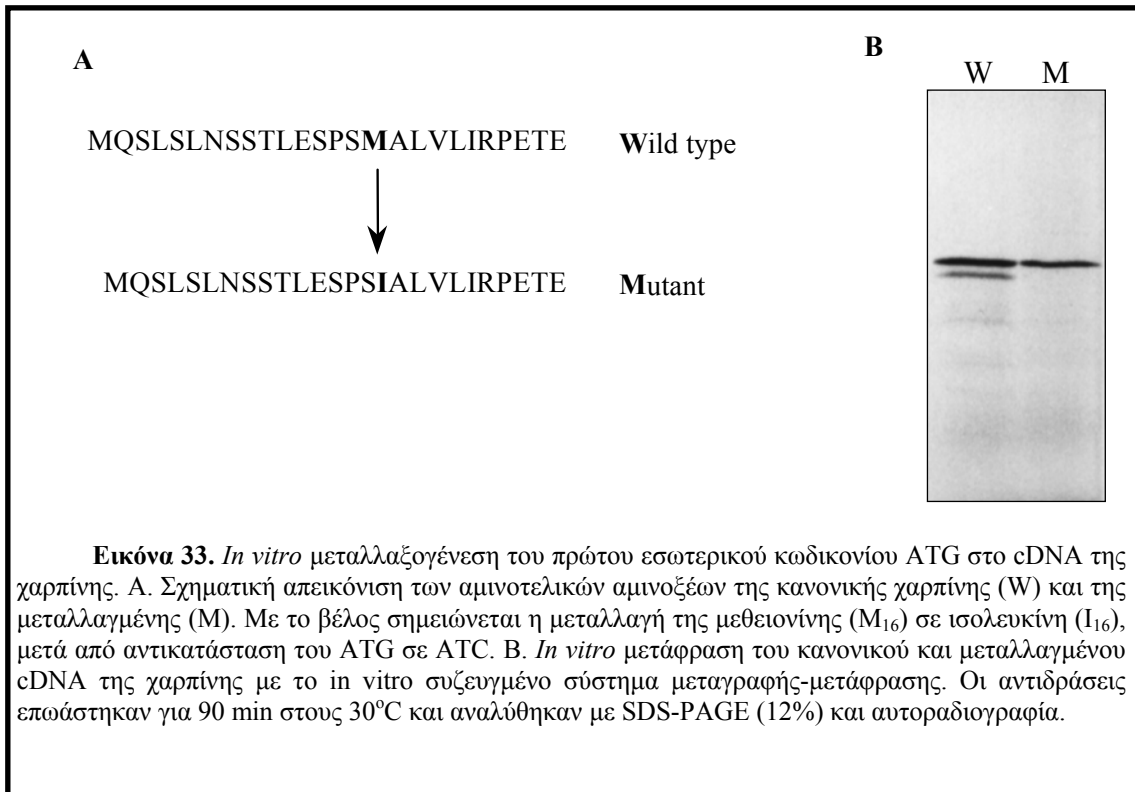
Ανάλυση των δειγμάτων με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) και αυτοραδιογραφία έδειξε ότι η χαρπίνη εξακολουθεί να εμφανίζεται με δύο ζώνες και στην ίδια στοιχειομετρική αναλογία σε όλα τα χρονικά διαστήματα (Εικ.32). Το αποτέλεσμα αυτό δε συνηγορεί υπέρ της υπόθεσης ότι η χαρπίνη αυτοπρωτεολύεται. Επειδή όμως η στοιχειομετρική αναλογία των δύο ζωνών ήταν σταθερή σε όλο το χρονικό διάστημα που εξετάστηκε, θεωρήθηκε σκόπιμο να εξεταστεί το ενδεχόμενο αν η πρωτεόλυση αναστέλλεται μετά τη συσσώρευση του πρωτεολυόμενου προϊόντος σε μια μέγιστη οριακή συγκέντρωση. Ετσι μειώθηκε ο χρόνος επώασης των *in vitro* αντιδράσεων μεταγραφής/μετάφρασης από 1 h σε 15 και 30 min, πριν την προσθήκη

του αναστολέα. Όμως τα αποτελέσματα δε διαφοροποιήθηκαν, από αυτά της Εικόνας 31, γεγονός που μας οδήγησε να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο της αυτοπρωτεόλυσης.

3.2.12 Κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση του πρώτου εσωτερικού κωδικονίου ATG της χαρπίνης

Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα κρίθηκε σκόπιμο να εξετάσουμε αν το κωδικόνιο της Μεθειονίνης¹⁶ χρησιμοποιείται ως εναλλακτικό κωδικόνιο έναρξης, παράγοντας έτσι τη μικρότερη μορφή χαρπίνης. Έτσι έγινε μεταλλαξιγένεση του κωδικονίου 16 της μεθειονίνης με PCR, χρησιμοποιώντας κατάλληλα ολιγονουκλεοτίδια, στα οποία το κωδικόνιο ATG μεταλλάχτηκε σε ATC, το οποίο κωδικοποιεί για ισολευκίνη. Αποτέλεσμα της μεταλλαξογένεσης ήταν η δημιουργία μιας περιοριστικής θέσης (Pvu I) στην περιοχή της μεταλλαγής, η οποία ήταν μοναδική στο πλασμιδιακό κατασκευάσμα, διευκολύνοντας έτσι την επιλογή των μεταλλαγμένων κλώνων. Στη συνέχεια η μεταλλαγή επιβεβαιώθηκε με αλληλούχιση ενός από τους κλώνους. Το μεταλλαγμένο γονίδιο της χαρπίνης χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια ως υπόστρωμα στο συζευγμένο *in vitro* σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης, όπου διαπιστώθηκε η παντελής απουσία της μικρότερης ζώνης (Εικ. 33). Το αποτέλεσμα αυτό συνηγορεί υπέρ της εκδοχής ότι η δεύτερη ζώνη είναι προϊόν εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης από το κωδικόνιο της μεθειονίνης στη θέση 16.

Όμως, το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με την αμινοτελική ανάλυση των δύο μορφών της χαρπίνης, η οποία έδειξε ότι η μικρότερη ζώνη ξεκινά με το αμινοξύ λευκίνη στη θέση 18 (Leu₁₈). Παρά τη φαινομενική αντίφαση, που παρουσιάζουν τα αποτελέσματα αυτά, θα μπορούσαν να εξηγηθούν με διάφορους τρόπους: 1) Η παραγωγή της μικρότερης ζώνης σε ευκαρυωτικό *in vitro* σύστημα είναι αποτέλεσμα εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης στη Met₁₆, ενώ στα βακτήρια (*E.coli* και *Pseudomonas*) είναι αποτέλεσμα πρωτεόλυσης. 2) Τόσο στο ευκαρυωτικό όσο και στο προκαρυωτικό σύστημα έκφρασης είναι αποτέλεσμα



εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης στη Met₁₆ και τα δύο αμινοξέα (μεθειονίνη και αλανίνη) τα οποία προηγούνται της λευκίνης, απομακρύνονται μετά τη μετάφραση. Είναι γνωστή η απομάκρυνση της αρχικής μεθειονίνης από τις πρωτεΐνες. Ένα ενδεχόμενο θα ήταν ότι, μετά την παραγωγή της μικρότερης μορφής της χαρπίνης, η Met₁₆ απομακρύνεται και η πρωτεΐνη ξεκινά με Ala₁₇, η οποία για καθαρά τεχνικούς λόγους να μην ήταν δυνατή η ανίχνευση της κατά την αμινοτελική ανάλυση. 3) Ένα τελευταίο ενδεχόμενο είναι ότι η Met₁₆ είναι απαραίτητη για πρωτεόλυση και μεταλλαγή της οδηγεί σε αναστολή της διαδικασίας. Το τελευταίο ενδεχόμενο φαίνεται πιο πιθανό, δεδομένου ότι και άλλες πρωτεΐνες των φυτοπαθογόνων βακτηρίων υπόκεινται σε πρωτεόλυση. Όμως σε καμία περίπτωση δεν έχει μελετηθεί ο μηχανισμός της πρωτεόλυσης και ο ρόλος της παραμένει άγνωστος.

3.2.13 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη δείχτηκε ότι η χαρπίνη όταν εκφράζεται τόσο σε βακτηριακά όσο και σε φυτικά κύτταρα εμφανίζει δύο μορφές. Διερεύνηση του μηχανισμού δημιουργίας των δύο αυτών μορφών, δεν κατέληξε σε πλήρη διελεύκανση του. Παρόλα αυτά το ενδεχόμενο της πρωτεόλυσης δεν μπορεί ακόμα να αποκλειστεί. Η εμφάνιση της πλήρους μήκους χαρπίνης στο υπερκείμενο των βακτηρίων αποκλείει την περίπτωση ότι τα 17 αμινοτελικά αμινοξέα απομακρύνονται κατά τη διάρκεια της έκκρισης της, όπως συμβαίνει με πρωτεΐνες που ακολουθούν το γενικό μονοπάτι έκκρισης (GSP) των βακτηρίων. Εξάλλου οι χαρπίνες, όπως και άλλες πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το μονοπάτι Hip, δεν εμφανίζουν τυπικά αμινοτελικά πεπτίδια έκκρισης και δεν υπόκεινται σε επεξεργασία/πρωτεόλυση (processing) κατά τη διάρκεια της έκκρισης τους, το οποίο μοιάζει με τα χαρακτηριστικά έκκρισης των πρωτεϊνών Yops και Ipas στα ζωικά παθογόνα *Yersinia* και *Shigella*. Το γεγονός ότι η μικρότερη μορφή της χαρπίνης ανιχνεύεται στο ίζημα των βακτηρίων μόνο με πολύ ευαίσθητες μεθόδους ανοσοεντοπισμού υποδηλώνει ότι πιθανόν μέσα στα βακτηριακά κύτταρα να μην είναι οι συνθήκες κατάλληλες για πρωτεόλυση, π.χ. να μην υπάρχουν οι κατάλληλες πρωτεάσες. Ένα άλλο ενδεχόμενο είναι ότι η πρωτεΐνη προστατεύεται με κάποιο τρόπο μέσα στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Αν ο μηχανισμός έκκρισης της χαρπίνης απαιτεί κάποια συνοδό πρωτεΐνη (chaperone) η οποία δεσμεύεται στο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης, όπως συμβαίνει με τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες Yops της *Yersinia*, τότε μια τέτοια δέσμευση θα εμπόδιζε την πρωτεόλυση της. Μια άλλη περίπτωση θα μπορούσε να ήταν η γλυκοσυλίωση της χαρπίνης μέσα στα βακτηριακά κύτταρα, δεδομένου ότι περιέχει θέσεις γλυκοσυλίωσης μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 7-10 και 101-104. Αν και η γλυκοσυλίωση είναι σχετικά σπάνια στα βακτήρια, έχουν αναφερθεί πολύ πρόσφατα, ότι ορισμένες βακτηριακές πρωτεΐνες γλυκοσυλιώνονται (όπως flagellins, S-layer proteins και pillins) (82). Επίσης έχει αναφερθεί ότι η γλυκοσυλίωση ενός ενζύμου (παγκρεατικής λιπάσης) πραγματοποιείται για να κρύψει την περιοχή PEST, προκειμένου να οδηγηθεί το ένζυμο σε μονοπάτι έκκρισης (35).

Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά πάσα πιθανότητα και οι δύο μορφές έχουν την ικανότητα να επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας, δεδομένου ότι διαφορετικά τμήματα της πρωτεΐνης μπορούν να δρουν ως διεγέρτες της (3). Το ενδεχόμενο της πρωτεόλυσης ενισχύεται επιπλέον από το γεγονός ότι τρεις άλλες πρωτεΐνες που

διασχίζουν το μονοπάτι Hrp, πρωτεολύονται. Η πρωτεΐνη AvrPphB από την *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola αν και δεν εκκρίνεται από τα βακτήρια φαίνεται ότι διασχίζει το μονοπάτι Hrp για να εισέρθει στα φυτικά κύτταρα και να εκδηλώσει τελικά τη δράση της, δεδομένου ότι έκφραση της στο φυτό, όπως προέκυψε από την παρούσα μελέτη, οδηγεί σε νέκρωση. Είναι ενδιαφέρον ότι αμέσως μετά την έκφραση της στα βακτήρια υπόκεινται σε πρωτεόλυση με απομάκρυνση 62 αμινοτελικών αμινοξέων, και 18 ώρες αργότερα ανιχνεύεται στα βακτήρια μόνο η μικρότερη ζώνη (200). Ο ρόλος αυτής της πρωτεόλυσης δεν είναι γνωστός.

Πρωτεόλυση φαίνεται να συμβαίνει και σε άλλες πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω του μονοπατιού Hrp από τα φυτοπαθογόνα βακτήρια. Για παράδειγμα η PopA1 από τη *Ralstonia solanacearum*, μετά την έκκριση της από τα βακτήρια, εμφανίζει τρεις ζώνες (9). Η μία αντιστοιχεί στην πλήρους μήκους πρωτεΐνη, η οποία ονομάζεται PopA1, ενώ οι άλλες δύο PopA2 και PopA3 είναι πρωτεολυτικά προϊόντα της PopA1, στις οποίες έχουν απομακρυνθεί τα 9 αμινοτελικά και 40 αμινοτελικά αμινοξέα αντίστοιχα. Παρόλο που και οι τρεις μορφές έχουν την ικανότητα να επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας, η βιολογική σημασία αυτής της πρωτεόλυσης δεν είναι γνωστή. Εικάζεται ότι πιθανόν η PopA3 που είναι περισσότερο υδρόφιλη απ' ό,τι η PopA1, να απαιτείται για τη διατήρηση της PopA1 σε διαλυτή μορφή στους φυτικούς ιστούς μετά την έκκριση.

Επίσης η HrpA η οποία εκκρίνεται από τα βακτήρια και αποτελεί το δομικό συστατικό του πύλου Hrp, κατά τη διάρκεια του καθαρισμού της ανιχνεύτηκαν τρεις επιπλέον ζώνες οι οποίες ήταν αποτέλεσμα πρωτεόλυσης που είχε συμβεί πριν από συγκεκριμένα κατάλοιπα ασπαραγίνης. Όλες οι μορφές της HrpA είχαν την ικανότητα να οργανώνονται και να σχηματίζουν πύλους (211). Όμως και σ' αυτήν την περίπτωση ο ρόλος της πρωτεόλυσης παραμένει άγνωστος.

Τέλος η πρωτεΐνη DspA από την *E.amylovora*, είναι ο πρώτος παράγοντας παθογένειας, που έχει δείχτεί ότι εκκρίνεται από το μονοπάτι Hrp. Μετά την έκκριση της εμφανίζεται με δύο μορφές. Η μία αντιστοιχεί στην πλήρους μήκους πρωτεΐνη και η άλλη θεωρείται ότι είναι ένα πρωτεολυτικό προϊόν της (81). Όμως κανένα στοιχείο δεν είναι γνωστό για τη μικρότερη μορφή της πρωτεΐνης.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, φαίνεται ότι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το μονοπάτι Hrp υπόκεινται σε πρωτεόλυση και αυτή η διαδικασία δε συμβαίνει μέσα στα βακτηριακά κύτταρα (με εξαίρεση την AvrPphB). Αν και η βιολογική σημασία

αυτού του φαινομένου δεν είναι γνωστή, αξίζει να επισημάνουμε ότι πρωτεΐνες Yops που εκκρίνονται από το εκκριτικό σύστημα τύπου III στη *Yersinia*, αλληλεπιδρούν στο αμινοτελικό τμήμα τους με ειδικές τσαπερόνες (Syc) για να εμποδίσουν πρόωρες αλληλεπιδράσεις με άλλες εκκρινόμενες πρωτεΐνες ή με άλλα συστατικά της εκκριτικής μηχανής. Για παράδειγμα μέσα στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα η SycE δεσμεύεται στην YopE και η SycB δεσμεύεται στην YopB, για να εμποδιστεί η αλληλεπίδραση των YopE και YopB, κάτι το οποίο πρέπει να συμβεί μόνο μετά την έκκριση τους (249, 250). Στη βάση αυτών των δεδομένων θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι παρόμοια και οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το μονοπάτι Hrp απαιτούν τσαπερόνες. Έτσι μια τέτοια δέσμευση θα εμπόδιζε πιθανόν να υποστούν πρωτεόλυση ή να δεσμεύονται με άλλες πρωτεΐνες μέσα στα βακτηριακά κύτταρα. Αντίθετα στον εξωκυττάριο χώρο των βακτηρίων, λόγω απουσίας των τσαπερονών οι χαρπίνες είναι πιθανόν να υπόκεινται σε μη ειδική πρωτεόλυση. Σ' αυτό θα μπορούσε να συμβάλει και η ανοικτή δομή που έχουν οι χαρπίνες, λόγω απουσίας κυστεϊνών και υψηλής παρουσίας γλυκίνης στην πρωτοταγή δομή τους. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι στην *Yersinia pestis*, οι πρωτεΐνες Yops αποικοδομούνται γρήγορα μετά την έκκριση τους, από μια επιφανειακή πρωτεάση την Pla, η οποία απαιτείται για την παθογένεια (115). Όμως αν και οι περισσότερες Yops υπόκεινται σε πρωτεόλυση από την Pla, υπάρχουν Yops, όπως η YopM και η YopN που δεν πρωτεολύονται.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα αυτά μαζί θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η πρωτεόλυση που συμβαίνει έξω από τα βακτήρια αποτελεί πιθανόν μέρος του μηχανισμού ρύθμισης της έκκρισης των πρωτεϊνών αυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Λειτουργική αρχιτεκτονική του εκκριτικού συστήματος Hrp στο φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μιά σημαντική τομή στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων ξενιστών-παθογόνων τα τελευταία χρόνια ήταν η ανακάλυψη ότι ζωικά και φυτικά παθογόνα περιέχουν μία ομάδα συντηρημένων γονιδίων παθογένειας. Τα γονίδια αυτά προσδιορίζουν ένα νέο βακτηριακό πρωτεϊνικό εκκριτικό σύστημα γνωστό ως εκκριτικό σύστημα τύπου III. Το εκκριτικό αυτό σύστημα διαφοροποιείται από τα άλλα δύο καλά χαρακτηρισμένα εκκριτικά συστήματα, όπως το σύστημα της αιμολυσίνης και το γενικό εκκριτικό μονοπάτι των Gram-αρνητικών βακτηρίων, επειδή είναι εξειδικευμένο στην έκκριση παραγόντων παθογόνου ισχύος από τα ζωικά και φυτικά παθογόνα βακτήρια. Επιπλέον καμία από τις πρωτεΐνες, που είναι γνωστό ότι εκκρίνονται απ' αυτό το μονοπάτι, δεν έχει τυπικά αμινοτελικά πεπτίδια έκκρισης.

Τα γονίδια, που κωδικοποιούν τα εκκριτικά συστήματα τύπου III και ιδιαίτερα εκείνα που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οργάνωση της εκκριτικής συσκευής είναι ομαδοποιημένα. Σε μερικούς οργανισμούς οι γονιδιακές αυτές ομάδες εντοπίζονται σε πλασμίδια, τα οποία υπάρχουν μόνο στα παθογόνα και δε συναντώνται σε μη παθογόνα στελέχη του είδους (*Yersinia* spp., *S. flexneri*, και *R. solanacearum*). Σε άλλα παθογόνα (*S. typhimurium*, Enteropathogenic *E.coli* [EPEC-Enteropathogenic *E.coli*]), *P. aeruginosa*, *P. syringae*, *E. amylovora*, *X. campestris* και *R. fredii*) οι γονιδιακές ομάδες εντοπίζονται στα χρωμοσώματά τους.

Στην Εικόνα 34, παρουσιάζεται η γενετική οργάνωση 12 γνωστών εκκριτικών συστημάτων τύπου III σε 11 διαφορετικά παθογόνα, όπως επίσης και η οργάνωση των γονιδίων, που κωδικοποιούν ομόλογες πρωτεΐνες στα συστήματα βιοσύνθεσης του μαστιγίου σε *B.subtilis* και *S.typhimurium*. Τα γονίδια, που κωδικοποιούν ομόλογες πρωτεΐνες απεικονίζονται με το ίδιο χρώμα.

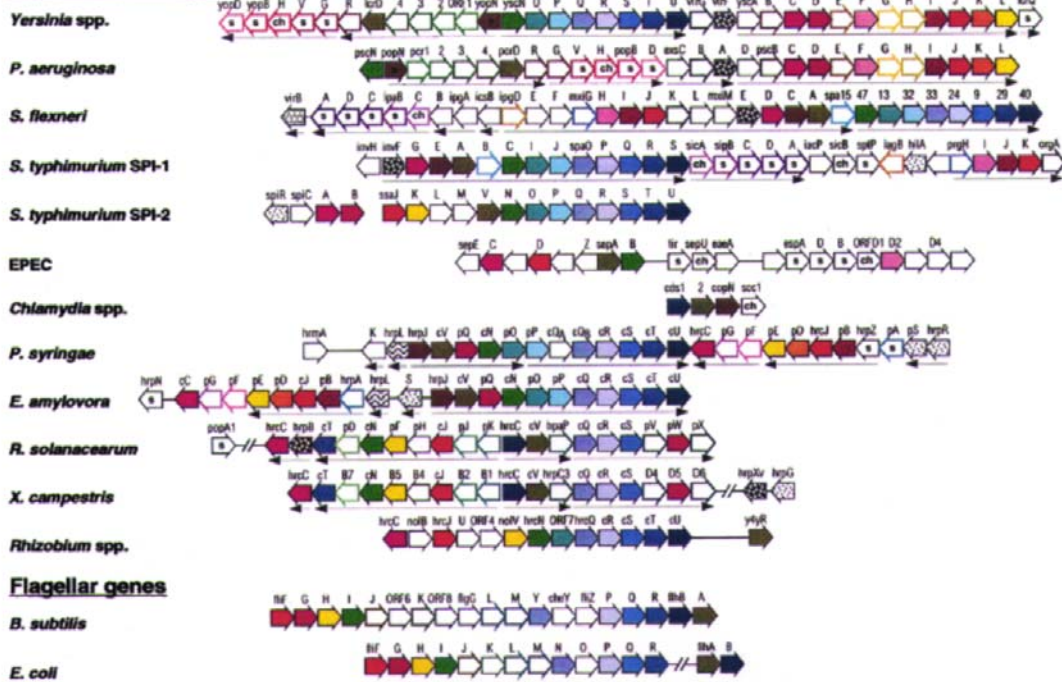
Η γενετική οργάνωση των διαφόρων εκκριτικών συστημάτων τύπου III εμφανίζει ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά: 1) τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτά τα συστήματα είναι ομαδοποιημένα, όπως ήδη αναφέρθηκε 2) η πλειονότητα των γονιδίων σε κάθε σύστημα κωδικοποιεί πρωτεΐνες που έχουν ομόλογα με άλλα εκκριτικά συστήματα, ενώ κάθε γονιδιακή ομάδα έχει επίσης γονίδια που είναι μοναδικά στο αντίστοιχο σύστημα 3) οι ομάδες των αντιστοιχών γονιδίων είναι

συντηρημένες στη γενετική σειρά οργάνωσης μεταξύ διαφορετικών συστημάτων και 4) η συνολική γενετική οργάνωση των γονιδιακών ομάδων τύπου III είναι συντηρημένη μέσα σε διάφορες υποομάδες οργανισμών.

Λόγω αυτής της οργάνωσης, τα εκκριτικά συστήματα τύπου III πιστεύεται ότι έχουν διαδοθεί ως ακέραιες γενετικές ομάδες με οριζόντια γονιδιακή μεταφορά, στη διάρκεια της εξέλιξης των προκαρυωτικών παθογόνων. Όμως, αν και τα γονίδια που κωδικοποιούν τις εκκριτικές συσκευές είναι ομαδοποιημένα, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες και μερικούς μεταγραφικούς ρυθμιστές εντοπίζονται συχνά σε θέσεις, εκτός των ομάδων αυτών, υποδεικνύοντας ότι αυτές οι πρωτεΐνες έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα από την κύρια εκκριτική συσκευή και ότι αυτά τα διαφορετικά συστατικά των εκκριτικών συστημάτων τύπου III έχουν προσαρμοσθεί για να σχηματίσουν λειτουργικές μονάδες.

Βασιζόμενοι λοιπόν στις ομολογίες μεταξύ των γονιδίων και στη γενετική τους οργάνωση μέσα στις γονιδιακές ομάδες, τα γονίδια που συνιστούν τις εκκριτικές συσκευές έχουν ομαδοποιηθεί σε τρεις κατηγορίες: 1) γονίδια που βρίσκονται σε όλα τα εκκριτικά συστήματα τύπου III, 2) γονίδια που παρουσιάζονται μόνο σε ζευγάρια συγγενικών εκκριτικών συστημάτων τύπου III και 3) γονίδια που είναι μοναδικά σε μεμονωμένα συστήματα. Οι πρωτεΐνες, που κωδικοποιούνται από την πρώτη ομάδα φαίνονται στον Πίνακα 9 και έχουν ταξινομηθεί κατά οικογένειες. Επειδή το εκκριτικό σύστημα τύπου III της *Yersinia* ήταν το πρώτο που περιγράφηκε και παραμένει το πιο καλά χαρακτηρισμένο, οι ονομασίες των πρωτεϊνικών οικογενειών παίρνουν το όνομα της ομόλογης πρωτεΐνης στη *Yersinia*.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η μελέτη της οργάνωσης και λειτουργίας της εκκριτικής συσκευής Hrp. Η πραγματοποίηση αυτού του στόχου απαιτεί αρχικά την υποκλωνοποίηση του κάθε γονιδίου *hrc/hrp*, την έκφραση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν, τον καθαρισμό τους για παραγωγή αντισωμάτων και στη συνέχεια τον καθορισμό των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των επιμέρους πρωτεϊνών, προκειμένου να οργανωθεί ένα δομικό και λειτουργικό μοντέλο της εκκριτικής συσκευής στα φυτοπαθογόνα βακτήρια.

Type III secretion genes

Εικόνα 34. Γενετική οργάνωση των εκκριτικών συστημάτων τύπου III και των γονιδίων βιοσύνθεσης του μαστιγίου από *B.subtilis* και *E.coli*. Τα ομόλογα γονίδια υποδεικνύονται με το ίδιο χρώμα. Τα εκκριτικά συστήματα τύπου III των ζωικών και φυτικών παθογόνων είναι ομαδοποιημένα σύμφωνα με τις γενετικές τους ομοιότητες. Τα γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες απεικονίζονται με ασπρόμαυρες κουκίδες. Ενα μικρό s μέσα στο σύμβολο του γονιδίου υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί εκκρίνεται, ενώ τα γονίδια που κωδικοποιούν τσαπερόνες είναι σημειωμένα με ch. Τα βέλη κάτω από τα γονίδια καθορίζουν τις μεταγραφικές μονάδες, όπου αυτές είναι γνωστές. Για τα εκκριτικά συστήματα τύπου III των φυτοπαθογόνων, τα ονόματα των γονιδίων *hrc* και *hrp* αντικαθίστανται ορισμένες φορές με *c* και *p* αντίστοιχα (115).

Πίνακας 9. Συντηρημένες πρωτεΐνες των εκκριτικών συστημάτων τύπου III και των πρωτεϊνών βιοσύνθεσης του μαστιγίου σε *B.subtilis* και *E.coli/S.typhimurium*(115).

<i>Yersinia</i> spp.	LcrD	YopN	YscN	YscO	YscP	YscQ	YscR	YscS	YscT	YscU	YscC	YscD	YscF	YscI	YscJ	YscK	YscL
<i>P.aeruginosa</i>	PcrD	PopN	PscN	PscO							PscC	PscD	PscF	PscI	PscJ	PscK	PscL
<i>S.flexneri</i>	MxiA	ORF15	SpaL	SpaM	SpaN	SpaO	SpaP	SpaQ	SpaR	SpaS	MxiD		MxiH	MxiI	MxiJ		
<i>S.typhimurium</i> SPI-1	InvA	InvE	InvC	InvI/ SpaM	InvJ/Spa N	SpaO	SpaP	SpaQ	SpaR	SpaS	InvG		PrgI	PrgJ	PrgK		
<i>S.typhimurium</i> SPI-2	SsaV		SsaN	SsaO	SsaP	SsaQ	SsaR	SsaS	SsaT	SsaU	SpiA	SpiB			SsaJ		SsaK
EPEC	SepA		SepB								SepC		ORFD2		SepD		
<i>Chlamydia</i> spp.	Cds2	CopN	homolog reported						homolog reported	Cds1	homolog reported						
<i>E.amylovora</i>	HrcV, HrpI	HrpJ	HrcN	HrpO	HrpP	HrcQ	HrcR	HrcS	HrcT	HrcU	HrcC	HrpQ		HrpB	HrcJ	HrpD	HrpE
<i>E. carotovora</i>						MopA	MopC	MopD	MopE								
<i>P.syringae</i>	HrcV	HrpJ	HrcN	HrpO	HrpP	HrcQb HrcQa	HrcR	HrcS	HrcT	HrcU	HrcC	HrpQ		HrpB	HrcJ	HrpD	HrpE
<i>R.solanacearum</i>	HrcV, HrpO		HrcN			HrcQ, HrpQ	HrcR, HrpT	HrcS, HrpU	HrcT, HrpC	HrcU, HrpN	HrcC, HrpA	HrpW			HrcJ, HrpI		HrpF
<i>X.campestris</i>	HrcV		HrcN			HrcQ,Hr pD1	HrcR, HrpD2	HrcS, HrpD3	HrcT, HrpB8	HrcC, HrpC1	HrcC, HrpA1	HrpD5			HrcJ		HrpB5
<i>Rhizobium</i> spp.	HrpC2		HrcN	ORF7		HrcQ	HrcR	HrcS	HrcT	HrcU	NolW				NolT		NolV
Flagellar proteins <i>B.subtilis</i>	FlhA		FliI			FliY	FliP	FliQ	FliR	FlhB		FliG			FliF		FliH
Flagellar proteins <i>E.coli,</i> <i>S.typhimurium</i>	FlhA		FliI			FliN FliM	FliP	FliQ	FliR	FlhB		FliG			FliF		FliH

4.2.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.2.1.Δομικές και λειτουργικές προβλέψεις των πρωτεϊνών που οργανώνουν το εκκριτικό σύστημα Hrp στο φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Οι μεταγραφικές μονάδες *hrpJ*, *hrpU*, *hrpZ*, κωδικοποιούν 18 πρωτεΐνες Hrp, τα δομικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 10. Ανάλυση υδροφοβικότητας έδειξε ότι οι περισσότερες απ' αυτές εμφανίζουν υδρόφοβες περιοχές (βλ. Παράρτημα I). Το χαρακτηριστικό αυτό, σε συνδυασμό με την ομολογία που εμφανίζουν ορισμένες απ' αυτές με πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης άλλων εκκριτικών συστημάτων τύπου III, υποδεικνύει ότι ενδεχομένως εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη. Εξάιρεση αποτελεί η πρωτεΐνη HrcJ η οποία χαρακτηρίζεται ως λιποπρωτεΐνη λόγω της παρουσίας ενός συντηρημένου μοτίβου, χαρακτηριστικό των λιποπρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες HrpJ, HrcN, HrpO, HrpA, HrpZ, HrpB είναι υδρόφιλες αλλά η υποκυτταρική τους θέση δεν είναι γνωστή με εξαίρεση τις HrpA και HrpZ οι οποίες είναι γνωστό ότι εκκρίνονται από τα βακτηριακά κύτταρα.

Ετσι λόγω έλλειψης βιοχημικών δεδομένων για τις πρωτεΐνες Hrp έγινε αρχικά μια εκτενή βιβλιογραφική έρευνα των ομολόγων πρωτεϊνών τους, ώστε να αποκτηθεί αφενός μια εικόνα για την λειτουργία αυτών των πρωτεϊνών και αφετέρου να σχεδιαστούν κατάλληλες πειραματικές προσεγγίσεις για τη μελέτη του εκκριτικού συστήματος Hrp.

HrpJ: Η πρωτεΐνη HrpJ εμφανίζει ομολογία με την HrpJ από *Erwinia amylovora*, αλλά μέχρι σήμερα, δεν έχει βρεθεί ομόλογη πρωτεΐνη σε *Xanthomonas campestris* και *Ralstonia solanacearum*. Για το λόγο αυτό δεν αναφέρεται ως πρωτεΐνη Hrc. Παρόλα αυτά οι δύο πρωτεΐνες HrpJ από *Pseudomonas syringae* και *Erwinia amylovora* εμφανίζουν μικρή ομοιότητα με τις πρωτεΐνες, που ανήκουν στην οικογένεια YopN (29, 149). Όλες οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια αυτή είναι υδρόφιλες. Με εξαίρεση την YopN (LcrE) της *Yersinia*, δεν υπάρχουν δομικά ή λειτουργικά στοιχεία γι' αυτές τις πρωτεΐνες. Η ομολογία της HrpJ με τη YopN είναι ενδιαφέρουσα γιατί η YopN, η οποία είναι μια εξωκυττάρια πρωτεΐνη στα είδη της *Yersinia*, παίζει ένα ρόλο κλειδί στην πυροδότηση της έκφρασης των γονιδίων *ycs* μετά από την επαφή του βακτηρίου με το κύτταρο-στόχο, καθώς και στην πολική

Πίνακας 10. Φυσικο-χημικές ιδιότητες και άλλα χαρακτηριστικά των 18 πρωτεϊνών Hrp που κωδικοποιούνται από τις μεταγραφικές μονάδες *hrpJ*, *hrpU* και *hrpZ*.

Πρωτεΐνη	Αμινοξέα	MB (kDa)	pI	Πιθανή λειτουργία και χαρακτηριστικά ³
HrpJ	340	37	10.48	Αγνωστη
HrcV ¹	693	76.2	5.05	Εκκριση, I.M, 7TMs
HrpQ	330	36.03	4.95	Εκκριση, I.M, 2TMs
HrcN ¹	449	48.86	8.97	Εκκριση, ATPase, M.A,
HrpO	113	13.23	6.81	Εκκριση
HrpP	191	20.54	5.94	Εκκριση, I.M, 1TMs
HrcQa	239	26.1	6.38	Εκκριση, I.M, 1TMs
HrcQb	134	14.18	3.69	Εκκριση
HrcR	217	24.15	5.37	Εκκριση, I.M, 4TMs
HrcS	88	9.4	7.6	Εκκριση, I.M, 2TMs
HrcT	264	28.3	4.41	Εκκριση, I.M, 6TMs
HrcU	359	39.96	9.26	Εκκριση, I.M, 3TMs
HrpA	108	11.19	7.13	Δομική υπομονάδα του αγωγού Hrp
HrpZ	343	37.7	3.89	Harpin
HrpB	125	12.97	6.08	Εκκριση
HrcJ ¹	269	29.3	8.28	Εκκριση, O.M, 2TMs λιποπρωτεΐνη
HrpD ²	133	15.18	5.57	Εκκριση
HrpE ²	193	21.52	4.61	Εκκριση

¹:η αλληλουχία των γονιδίων αυτών από τη *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola δεν είναι γνωστή σε όλη τους την έκταση ή μερικά σημεία απαιτούν διευκρίνηση.

²: η αλληλουχία των γονιδίων *hrpD* και *hrpE* από τη *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola δεν είναι γνωστή. Τα στοιχεία αναφέρονται στις ομόλογες πρωτεΐνες από *Pseudomonas syringae* pv. syringae.

³: Αναφέρεται η γνωστή/πιθανή λειτουργία, η θέση στο κύτταρο (I.M: εσωτερική μεμβράνη, O.M: εξωτερική μεμβράνη, M.A: περιφερειακά συνδεδεμένη με τη μεμβράνη) και ο αριθμός των πιθανών διαμεμβρανικών περιοχών (TMs).

μεταφορά της YopE (72). Η YopN θεωρείται ότι συμμετέχει στη διαδικασία αναγνώρισης του κυττάρου-στόχου και μεταβιβάζει το σήμα-επαφής σε ενδοκυττάριους ρυθμιστικούς παράγοντες. Έτσι η YopN φαίνεται να είναι ένας αισθητήρας (sensor), που εκτείνεται επιφανειακά και ελέγχει την έκκριση τύπου III, σε απόκριση ενός σήματος από τα ευκαρυωτικά κύτταρα, διευκολύνοντας ένα τοπικό άνοιγμα των εκκριτικών καναλιών στις θέσεις επαφής, ενώ τα εκκριτικά κανάλια που δεν είναι σε άμεση επαφή είναι κλειστά (72). Ο ρόλος αυτός της YopN θα μπορούσε να παρομοιαστεί με το ρόλο της πρωτεΐνης PrhA από τη *Ralstonia solanacearum*(163). Η πρωτεΐνη PrhA φαίνεται να λειτουργεί ως ένας υποδοχέας εξειδικευμένος για σήματα που προέρχονται από το φυτό, πυροδοτώντας στη συνέχεια την έκφραση των γονιδίων *hrp*. Δεδομένου ότι ομόλογα της PrhA δεν έχουν βρεθεί σε άλλα φυτοπαθογόνα και η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων *hrp* σε *Ralstonia* και *Xanthomonas* πραγματοποιείται από διαφορετικούς ρυθμιστικούς παράγοντες απ' ό,τι σε *Pseudomonas* και *Erwinia*, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η HrpJ ίσως έχει ένα τέτοιο ρόλο.

Επίσης μελέτες του μηχανισμού έκκρισης της YopN από τα βακτήρια αποκάλυψε ότι η πληροφορία για την έκκριση της δε φέρεται στην αμινοξική της αλληλουχία, αλλά στο RNA της και για την έκκριση της απαιτείται αλληλεπίδραση της με την YscB, η οποία φαίνεται να λειτουργεί ως τσαπερόνη (8, 122). Έχει βρεθεί ότι η YopN, μέσω της περιοχής που οριοθετείται από τα αμινοξέα 50-86, αλληλεπιδρά με την YscB. Στην ίδια περιοχή, η HrpJ περιέχει ένα μοτίβο “φερμουάρ λευκίνης” (leucine zipper), αλλά δεν είναι γνωστό αν αυτό συμμετέχει σε αλληλεπίδραση με κάποια πρωτεΐνη, όπως συμβαίνει με τη YopN. Επίσης η YopN περιέχει δύο δομές τύπου σπειρωμένου σπειράματος (coiled-coil) μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 62-108 και 248-272. Τέτοιες δομές είναι γνωστό ότι συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Βρέθηκε ότι το δεύτερο σπείραμα αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη TyeA, η οποία ρυθμίζει την έκκριση και μεταφορά ορισμένων Yops μέσα στα ευκαρυωτικά κύτταρα (120). Είναι ενδιαφέρον ότι ανάλογες δομές και στις ίδιες περιοχές εμφανίζει και η HrpJ (Παράρτημα, Εικ. 66), καθώς επίσης και ένα μοτίβο “φερμουάρ λευκίνης” μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 62 και 83 (Παράρτημα, Εικ. 65). Με βάση τη σύγκριση αυτή γίνεται αντιληπτό ότι η μελέτη της HrpJ αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

HrcV: Η HrcV είναι μία από τις πιο συντηρημένες πρωτεΐνες Hrp και ανήκει στην οικογένεια LcrD, όλα τα μέλη της οποίας εμφανίζουν το ίδιο δομικό πρότυπο. Όλες χαρακτηρίζονται από μία υδρόφοβη αμινοτελική περιοχή που προβλέπεται να σχηματίζει τουλάχιστον 6 διαμεμβρανικές έλικες και μια μεγάλη υδρόφιλη καρβοξυτελική περιοχή. Η τοπολογία των πρωτεϊνών αυτών στη μεμβράνη έχει καθοριστεί μόνο για την LcrD και την FlhA, στις οποίες το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (37, 103). Πιστεύεται ότι όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη και ενδεχομένως σχηματίζουν ένα κεντρικό πρωτεϊνικό κανάλι.

Η ομοιότητα των αλληλουχιών μεταξύ των μελών της οικογένειας LcrD κυμαίνεται μεταξύ 36% και 66%. Η αμινοτελική περιοχή που περιέχει τα μεμβρανικά τμήματα είναι πολύ συντηρημένη, ενώ η καρβοξυτελική περιοχή είναι πιο ποικιλόμορφη. Για παράδειγμα, το αμινοτελικό τμήμα της HrcV της *P. syringae* έχει 64% ταυτότητα (identity) με την LcrD της *Yersinia*, ενώ το καρβοξυτελικό τμήμα έχει μόνο 35% ταυτότητα με την LcrD και αυτή η περιοχή εμφανίζει πολύ μικρή ομοιότητα με το ομόλογο της πολυπεπτιδίου από την *Erwinia amylovora* (29, 112). Είναι ενδιαφέρον ότι μερικές πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής μπορούν να αντικαταστήσουν λειτουργικά η μία την άλλη σε ετερόλογο σύστημα και ειδικότερα η αμινοτελική περιοχή είναι λειτουργικά ανταλλάξιμη, υποδηλώνοντας ότι οι καρβοξυτελικές κυτοπλασμικές περιοχές αυτών των πρωτεϊνών ίσως καθορίζουν αλληλεπιδράσεις με άλλα συστατικά του εκκριτικού συστήματος τύπου III, τα οποία είναι διαφορετικά ανάλογα με το είδος των βακτηρίων (85, 115). Οσον αφορά το ρόλο της πρωτεΐνης, δύο λειτουργίες έχουν συσχετιστεί με την LcrD στα είδη της *Yersinia*: Η LcrD είναι απαραίτητο δομικό συστατικό του εκκριτικού συστήματος της *Yersinia* αλλά επιπλέον συμμετέχει, σε συνδυασμό με άλλες πρωτεΐνες, όπως η YopN, στη ρύθμιση της έκφρασης των οπερονίων *vir* σε χαμηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου (192). Παρόμοιο ρόλο φαίνεται να έχει και η HrcV, γιατί μη πολικές μεταλλαγές στο γονίδιο *hrcV* της *E. amylovora* δεν εκκρίνουν χαρπίνη (29).

HrpQ: Ομόλογα της HrpQ υπάρχουν και στις τέσσερις κύριες κατηγορίες φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Ειδικότερα το αμινοτελικό τμήμα της HrpQ από μέλη του είδους *Pseudomonas syringae* δείχνει ομολογία με την HrpW από τη *Ralstonia*

solanacearum (αμινοξέα 1-89 και 135-174). Οι δύο αυτές περιοχές χωρίζονται από μια αλληλουχία 51 αα, η οποία έχει ένα υψηλό περιεχόμενο σε προλίνες (239). Επίσης στο αμινοτελικό τμήμα των πρωτεϊνών αυτών προβλέπεται να υπάρχουν 2 πιθανές διαμεμβρανικές περιοχές, σύμφωνα με την ανάλυση υδροφοβικότητας (Παράρτημα, Εικ. 68). Όπως με την περίπτωση της HrcV, είναι πιθανό η καρβοξυτελική περιοχή να αλληλεπιδρά με συστατικά του εκκριτικού συστήματος, που δεν εμφανίζουν μεγάλη συντήρηση στην αλληλουχία τους στα διάφορα είδη βακτηρίων.

Αν και η HrpQ δεν εμφανίζει σημαντική ομολογία με πρωτεΐνες άλλων εκκριτικών συστημάτων τύπου III, γι' αυτό εξάλλου δε χαρακτηρίζεται ως Hrc, κατατάσσεται στην οικογένεια YscD, τα μέλη της οποίας χαρακτηρίζονται από μικρό ποσοστό ομολογίας (20-50%) και εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη. Η YscD, όπως και η HrpQ, προβλέπεται να περιέχει 2 διαμεμβρανικές περιοχές στο αμινοτελικό ήμισυ της πρωτεΐνης (81-101 αα και 122-142) και το αμινοτελικό άκρο της θα μπορούσε να εντοπίζεται στο περίπλασμα (100, 170). Όμως αυτή η μεμβρανική τοπολογία δεν προβλέπεται για τις πρωτεΐνες FliG των βακτηρίων *B. subtilis* και *S. typhimurium* (115).

Όσον αφορά το ρόλο της HrpQ στην έκκριση δεν είναι γνωστός. Αντίθετα ο ρόλος της ομόλογης πρωτεΐνης FliG από *Salmonella* και *E.coli*, που σχετίζεται με τη βιογένεση του μαστιγίου, είναι περισσότερο μελετημένος. Η FliG έχει εντοπιστεί στην κυτοπλασμική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, όπου αλληλεπιδρά με FliF και σχηματίζει το δακτύλιο M (M ring) του βασικού σωματίου του μαστιγίου (flagellar basal body). Επίσης η FliG μαζί με FliM και FliN (ομόλογη της HrcQ) υποστηρίζεται ότι σχηματίζει ένα διακόπτη (switch) που καθορίζει τη δεξιόστροφη ή αριστερόστροφη περιστροφή του μαστιγίου συμμετέχοντας στη χημειοτακτική απόκριση των βακτηρίων μέσω αλληλεπίδρασης με την CheY (236). Η FliG αλληλεπιδρά με την FliM, για την οποία δεν έχει βρεθεί ομόλογο, καθώς και με την FliF η οποία είναι μια λιποπρωτεΐνη με ομολογία με την HrcJ (138, 167, 236).

HrcN: Η αλληλουχία της κωδικής περιοχής του γονιδίου της HrcN από την *P. syringae* pv. *phaseolicola* δεν έχει καθοριστεί πλήρως. Όμως, έχει γίνει αλληλούχιση σε ένα κεντρικό τμήμα της και στην παρούσα μελέτη έγινε αλληλούχιση του αμινοτελικού και καρβοξυτελικού τμήμα της ώστε να είναι δυνατή η

υποκλωνοποίηση του γονιδίου και η ολοκλήρωση της αλληλουχίας του. Επειδή οι πρωτεΐνες Hrp των βακτηρίων *P.s.syringae* και *P.s.phaseolicola* εμφανίζουν πολύ μεγάλη ομολογία, της τάξης του 90%, η περιγραφή της πρωτεΐνης HrcN θα γίνει σύμφωνα με την αλληλουχία από την *P.s.syringae* (149). Η πρωτεΐνη HrcN αποτελεί ένα συστατικό-κλειδί του εκκριτικού συστήματος Hrp και στις τέσσερις κατηγορίες φυτοπαθογόνων βακτηρίων (29, 63, 149, 239). Ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της έδειξε ορισμένα σημαντικά μοτίβα, τα οποία δίνουν μια εικόνα για τη λειτουργία της πρωτεΐνης (Παράρτημα, Εικ. 71). Η HrcN εμφανίζει μοτίβα που χαρακτηρίζουν τις ATPάσες. Μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί σε κανένα φυτοπαθογόνο βακτήριο αν η πρωτεΐνη HrcN λειτουργεί ως ATPάση. Όμως, οι πρωτεΐνες HrcN των φυτοπαθογόνων βακτηρίων εμφανίζουν ομολογία με πρωτεΐνες από άλλα εκκριτικά συστήματα τύπου III και γι' αυτό κατατάσσονται στην οικογένεια YscN (26, 242, 258). Όλα τα μέλη της οικογένειας αυτής είναι σχεδόν πανομοιότυπα σε μέγεθος και η συντήρηση στην αμινοξική αλληλουχία δεν περιορίζεται μόνο σε ορισμένες περιοχές, αλλά εμφανίζεται σε όλο το μήκος τους, με ταυτότητα 40-60% (115). Επίσης όλες είναι περίπου 30% πανομοιότυπες με την β-υπομονάδα των ATPασών από μη παθογόνα βακτήρια (π.χ. *E.coli*) (245). Η μεγαλύτερη συντήρηση τους εντοπίζεται στα Box A και B (mononucleotide binding domains) και στο Box C (magnesium binding domain) τα οποία χαρακτηρίζουν τις ATPάσες (244, 263). Ενεργότητα ATPάσης έχει καταδειχτεί για τα ομόλογα InnC και FliH από τη *Salmonella* (56, 58). Επειδή η πρωτεΐνη αυτή είναι συντηρημένη σε όλα τα εκκριτικά συστήματα τύπου III και είναι το μόνο συστατικό που περιέχει περιοχές απαραίτητες για τροφοδότηση ενέργειας, είναι πολύ πιθανό να παρέχει ενέργεια είτε για τη μεταφορά πρωτεϊνών είτε για την οργάνωση της εκκριτικής συσκευής.

Οι ATPάσες, από άλλα εκκριτικά συστήματα, σχηματίζουν διμερή ή πολυμερή (108). Όμως αυτό δεν φαίνεται να ισχύει στην περίπτωση της YscN, βάσει κατάλληλων πειραμάτων (site-directed mutants στο *yscN*) (258). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για να προταθεί ένα γενικό μοντέλο για τον τρόπο λειτουργίας της. Όμως, η δυνατότητα να σχηματίζονται πολυμερή, θα μπορούσε να παρέχεται από άλλη πρωτεΐνη με την οποία η HrcN αλληλεπιδρά, σχηματίζοντας έτσι ένα λειτουργικό σύμπλοκο ATPάσης, όπως αναφέρεται παρακάτω.

Όσον αφορά τη θέση τους στο κύτταρο, τα μέλη της οικογένειας YscN δεν περιέχουν υδρόφοβες περιοχές και πιστεύεται ότι εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα

και πιθανά σχετίζονται περιφερειακά με τη μεμβράνη. Αυτό έχει καταδειχτεί μέχρι σήμερα μόνο για την FliI από *Salmonella* (60).

HrpO: Ομόλογα της πρωτεΐνης HrpO έχουν βρεθεί μόνο στην *Erwinia amylovora*, ενώ στη *Ralstonia* και *Xanthomonas* δεν έχει βρεθεί ομόλογο μέχρι σήμερα (29). Παρόλο που δεν έχουν βρεθεί ομόλογα στις γονιδιακές ομάδες *hrp* της ομάδας II, είναι ενδιαφέρον ότι η HrpO εμφανίζει μικρή ομολογία με πρωτεΐνες άλλων εκκριτικών συστημάτων τύπου III, που κατατάσσονται στην οικογένεια YscO. Τα μέλη της οικογένειας αυτής εμφανίζουν μικρή ομολογία μεταξύ τους και ανάλυση της πρωτεϊνικής τους αλληλουχίας έχει δείξει ότι πρόκειται για υδρόφιλες πρωτεΐνες. Η ομοιότητα στη μεταγραφική οργάνωση των *yscNOP* και *hrcNhrpOP* ενισχύει τη σημασία αυτής της ομολογίας (26, 29, 149). Το γεγονός ότι καταλαμβάνουν αντίστοιχες γενετικές θέσεις πιθανόν να δηλώνει, ότι τα προϊόντα των γονιδίων αυτών έχουν παρόμοιες λειτουργίες στα αντίστοιχα βακτήρια, και λόγω της εξελικτικής πίεσεως για προσαρμογή είτε στο ξενιστή είτε σε κάποιο μη συντηρημένο συστατικό της εκκριτικής συσκευής, να έχουν υποστεί σημαντικές αλλαγές. Λίγα είναι γνωστά για την υποκυτταρική θέση αυτών των πρωτεϊνών καθώς και για τη βιοχημική τους λειτουργία. Μια πολύ πρόσφατη δημοσίευση αναφέρει ότι η YscO εντοπίζεται σε όλα τα υποκυτταρικά κλάσματα (κυτταρόπλασμα, μεμβράνες και υπερκείμενο), ενώ η ομόλογη SpaM δεν εντοπίζεται στο υπερκείμενο (187). Εικάζεται ότι η YscO, είτε είναι μια περιφερειακή πρωτεΐνη που σχετίζεται με τη μεμβράνη ή ελευθερώνεται από τη μεμβράνη κατά τη διαδικασία μεταφοράς πρωτεϊνών Yops. Έτσι υποθέτουν, ότι πιθανόν ο εκκριτικός μηχανισμός τύπου III έχει ένα δυναμικά μετακινούμενο πυρήνα, μέρος του οποίου είναι η YscO. Τέλος η HrpO εμφανίζει ομοιότητα με την FliJ από *Salmonella*, η οποία αποτελεί συστατικό του βασικού σωματίου του μαστιγίου (149). Όμως η σημασία αυτής της ομοιότητας δεν είναι γνωστή.

HrpP: Παρόλο που ομόλογα γονίδια *hrpP* δεν έχουν βρεθεί στις γονιδιακές ομάδες *hrp* τύπου II, των *Ralstonia* και *Xanthomonas*, εντούτοις οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν εμφανίζουν μικρή ομοιότητα με πρωτεΐνες από άλλα εκκριτικά συστήματα τύπου III. Επιπλέον η γενετική θέση του γονιδίου *hrpP* αντιστοιχεί με τη θέση του γονιδίου *yscP* της *Yersinia* (26). Έτσι λόγω της μικρής ομολογίας, που εμφανίζουν οι πρωτεΐνες YscP και HrpP και η αντιστοιχία των γενετικών θέσεων των

γονιδίων τους, η HrpP έχει καταταχτεί στην οικογένεια YscP, για τα μέλη της οποίας δεν είναι τίποτα γνωστό όσον αφορά τη βιοχημική τους λειτουργία. Σχετικά με την υποκυτταρική τους θέση, έχει βρεθεί ότι οι ομόλογες πρωτεΐνες SraN από τη *Salmonella typhimurium* και Sra32 από τη *Shigella flexneri* εκκρίνονται από τα βακτήρια (41). Αυτό πιθανόν να μην ισχύει στην περίπτωση της HrpP η οποία προβλέπεται να έχει μια υδρόφοβη περιοχή μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 117-139. Αν η πρωτεΐνη εντοπίζεται στη μεμβράνη δεν είναι γνωστό. Πιστεύεται ότι οι πρωτεΐνες των οικογενειών YscO και YscP ανήκουν στην κατηγορία των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί σημαντικές αλλαγές στο μόριο τους κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, λόγω της απαίτησης για προσαρμογή είτε ως προς το βακτήριο είτε ως προς το ξενιστή (147).

HrcR: Τα γονίδια *hrcRSTU* αποτελούν μια συντηρημένη ομάδα γονιδίων που απαιτούνται σε όλα τα εκκριτικά συστήματα τύπου III των φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Στα περισσότερα εκκριτικά συστήματα τύπου III, αυτά τα γονίδια είναι τοποθετημένα με την ίδια σειρά με τα γονίδια *yscQRSTU* της *Yersinia* (26, 239). Παρόμοια γενετική οργάνωση εμφανίζουν και τα ομόλογα γονίδια *fliN*, *fliP*, *fliQ*, *fliR* και *fliB* από το σύστημα βιογένεσης του μαστιγίου (160). Η ταυτότητα των αλληλουχιών μεταξύ των μελών της κάθε οικογένειας πρωτεϊνών κυμαίνεται από 25%-50%. Παρόλο που οι βιοχημικές λειτουργίες των μελών της κάθε οικογένειας δεν είναι γνωστές, είναι ενδιαφέρον ότι τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών της κάθε οικογένειας συναντώνται και στις αντίστοιχες πρωτεΐνες Hrc. Με εξαίρεση την HrcQb από *P.s.syngiae*, η οποία περιγράφεται μαζί με την HrcQa στο επόμενο κεφάλαιο, όλες προβλέπεται να περιέχουν τουλάχιστον μία διαμεμβρανική περιοχή, υποδηλώνοντας ότι είναι πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης.

Η YscR εμφανίζει, όπως και η HrcR τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές (Παράρτημα, Εικ. 75). Είναι ενδιαφέρον ότι τα δύο ζεύγη των διαμεμβρανικών περιοχών χωρίζονται από ένα υδροφιλικό τμήμα (~85 αα) το οποίο εμφανίζει μεγάλο ποσοστό ομολογίας μεταξύ των μελών της οικογένειας. Επιπλέον περιέχει την πλειονότητα των φορτισμένων αμινοξέων της κάθε πρωτεΐνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η περιοχή αυτή εκτίθεται προς τον περιπλασμικό χώρο, αν και αυτό δεν είναι σε συμφωνία με την προτεινόμενη τοπολογία για την ομόλογη περιοχή στη

YscR (65, 239). Η τοπολογία της YscR στη μεμβράνη μελετήθηκε με τη χρήση χημικών πρωτεϊνών YscR-PhoA και βρέθηκε ότι η YscR έχει 4 διαμεμβρανικές περιοχές και ότι το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο, όπως επίσης και η μεγάλη κεντρική εσωτερική θηλιά (loop) εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα (65). Για την FlpP προτείνεται μια διαφορετική τοπολογία σε σχέση με τη YscR, η οποία βασίζεται στο γεγονός ότι μετά την απομάκρυνση των 21 αμινοτελικών της αμινοξέων, το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης καθώς και η μεγάλη υδρόφιλη περιοχή εντοπίζονται στο περίπλασμα (61, 180). Ομως δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα αρκετά πειραματικά δεδομένα που να επιβεβαιώνουν μια τέτοια τοπολογία.

Μια άλλη ενδιαφέρουσα ομοιότητα είναι ότι οι αλληλουχίες, που είναι σε γειτνίαση με τις πιθανές διαμεμβρανικές περιοχές, είναι πολύ συντηρημένες μεταξύ όλων των ομολόγων της οικογένειας YscR, όπως και στην περίπτωση των ομολόγων της οικογένειας LcrD. Αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχει συντήρηση στη λειτουργία εκτός από τη σταθερή ένθεση τους στη μεμβράνη. Τέτοιες περιοχές θα μπορούσαν να περιλαμβάνονται στο σχηματισμό του υποθετικού συμπλόκου μεταφοράς (translocase complex) ή στη διαδικασία μεταφοράς αυτής καθ' αυτής. Η λιγότερο συντηρημένη πιθανή κυτοπλασμική θηλιά (loop) στην YscR και στα ομόλογά της, η οποία επεκτείνεται σε όλη την τρίτη και τέταρτη διαμεμβρανική περιοχή, θα μπορούσε να έχει αποκλίσει στην αλληλουχία για να εξυπηρετήσει ειδικές λειτουργίες σε κάθε σύστημα (65).

HrcS: Η πρωτεΐνη HrcS προβλέπεται να έχει δύο διαμεμβρανικές περιοχές (Παράρτημα, Εικ.77), όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας YscS στην οποία ανήκει, χωρίς όμως να είναι γνωστή η τοπολογία των πρωτεϊνών αυτών στη μεμβράνη. Βάσει της ανάλυσης υδροφοβικότητας τους προβλέπεται να έχουν μια μικρή αμινοτελική περιοχή στο κυτταρόπλασμα, μια διαμεμβρανική έλικα, μια μικρή περιπλασμική περιοχή, μια δεύτερη διαμεμβρανική έλικα και μια μικρή καρβοξυτελική περιοχή στο κυτταρόπλασμα (180). Επίσης οι δύο διαμεμβρανικές περιοχές χωρίζονται από μια μικρή υδροφιλική loop (20 αα), υποδηλώνοντας ότι πιθανόν εισέρχονται ταυτόχρονα στη μεμβράνη. Ένα συντηρημένο μοτίβο (QA/TXTQI/LQET/SL/I) έχει ταυτοποιηθεί στην υδροφιλική θηλιά των πρωτεϊνών της οικογένειας αυτής (239). Επειδή η περιοχή αυτή εμφανίζει ομοιότητα μεταξύ όλων των πρωτεϊνών της

οικογένειας αυτής, ενδεχομένως να αλληλεπιδρά με κάποιο επίσης συντηρημένο συστατικό των εκκριτικών συστημάτων τύπου III. Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι δεν είναι γνωστός ο ρόλος καμίας πρωτεΐνης αυτής της οικογένειας.

HrcT: Η πρωτεΐνη HrcT ανήκει στην οικογένεια YscT, τα μέλη της οποίας έχουν παρόμοιο μήκος (~260 αμινοξέα) είναι πολύ υδρόφοβες και προβλέπεται να περιέχουν τουλάχιστον 6 διαμεμβρανικές περιοχές. Επειδή η απόσταση μεταξύ δύο συνεχόμενων υδρόφοβων περιοχών είναι πάντα μικρότερη από 40 αμινοξέα σε όλα τα ομόλογα, έχει προταθεί ότι οι πρωτεΐνες αυτές ίσως εισέρχονται στην μεμβράνη με ένα μηχανισμό ανεξάρτητο από το μονοπάτι Sec (Sec-independent assembly mechanism) και με το μη-θετικά φορτισμένο αμινοτελικό άκρο να εκτείνεται στο περίπλασμα (180). Μια περιοχή 21 αμινοξέων η οποία σχηματίζει loop μεταξύ των διαμεμβρανικών περιοχών 5 και 6 είναι πολύ συντηρημένη (239). Οσον αφορά τη λειτουργία αυτών των πρωτεϊνών είναι γνωστό ότι έχουν κάποιο ρόλο στην έκκριση γιατί μεταλλάξεις στα γονίδια τους εμποδίζουν την έκκριση, χωρίς να επηρεάζεται η παραγόμενη ποσότητα της εκκρινόμενης πρωτεΐνης στα κύτταρα. Όμως ο ακριβής βιοχημικός ρόλος τους δεν είναι γνωστός.

HrcU: Η πρωτεΐνη HrcU ανήκει στην οικογένεια YscU, τα μέλη της οποίας εμφανίζουν ομολογία καθόλο το μήκος της, αλλά ορισμένες περιοχές είναι πιο συντηρημένες από άλλες. Επιπλέον τα υδροφοβικά προφίλ τους είναι πολύ συντηρημένα και αυτό υποδηλώνει ότι όλες αυτές οι πρωτεΐνες εκτελούν παρόμοιες λειτουργίες. Οσον αφορά την τοπολογία τους στη μεμβράνη η συγκέντρωση θετικά φορτισμένων καταλοίπων στο αμινοτελικό άκρο και αμέσως μετά την τελευταία διαμεμβρανική περιοχή σε κάθε μια από αυτές τις πρωτεΐνες, υποδηλώνει μια τοπολογική ένθεση στη μεμβράνη και με τα δύο άκρα να εκτείνονται στο κυτταρόπλασμα σύμφωνα με τον κανόνα “τα θετικά φορτία είναι εσωτερικά” (“positive-inside”) (243). Αυτή η τοπολογική οργάνωση επιβεβαιώνεται για ένα από τα ομόλογα, την YscU, βάσει της ανάλυσης χημικών πρωτεϊνών YscU-PhoA (7). Επιπλέον όλα τα μέλη εμφανίζουν μια μεγάλη καρβοξυτελική περιοχή η οποία στην YscU έχει βρεθεί ότι εκτείνεται στο κυτταρόπλασμα. Επειδή η περιοχή αυτή είναι πολύ συντηρημένη πιστεύεται ότι καθορίζει τη λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών.

Πιστεύεται, χωρίς να υπάρχουν ενδείξεις για αυτό, ότι ένα τόσο συντηρημένο κομμάτι της εκκριτικής μηχανής, δεσμεύεται σε μια πρωτεΐνη η οποία είναι επίσης πολύ συντηρημένη μεταξύ των διαφόρων ομολόγων της οικογένειας. Αν η υπόθεση αυτή είναι σωστή τότε κάποιος θα μπορούσε να αποκλείσει την LcrD, επειδή τα ομόλογα της οικογένειας LcrD ποικίλλουν στην καρβοξυτελική κυτοπλασμική περιοχή τους. Αντίθετα, η YscU θα μπορούσε να είναι υποψήφια για δέσμευση με YscN: οι κυτοπλασμικές τους περιοχές είναι πολύ συντηρημένες, ενώ οι διαμεμβρανικές περιοχές και οι loops που εκτείνονται στο περίπλασμα διαφέρουν σημαντικά (7). Όσον αφορά τη λειτουργία τους, φαίνεται να έχουν διπλό ρόλο γιατί, εκτός του ότι μεταλλάξεις στα γονίδια, σε όσες έχουν μελετηθεί, εμποδίζουν την έκκριση, επιπλέον επηρεάζουν και τη σύνθεση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών.

Ανάλυση της αλληλουχίας της, με το πρόγραμμα PROSITE, εμφάνισε ορισμένα μοτίβα, από τα οποία περισσότερο ενδιαφέρον εμφανίζει μια περιοχή που έχει ομοιότητα με τους μεταφορείς ABC (Παράρτημα, Εικ. 80).

4.2.2 Εκφραση πρωτεϊνών Hrp σε *E. coli*

Τα γονίδια 15 πρωτεϊνών Hrp απομονώθηκαν με PCR από το κοσμίδιο pPL6, το οποίο φέρει όλη τη γονιδιακή ομάδα *hrp* της *P.syringae* pv.phaseolicola και υποκλωνοποιήθηκαν σε δύο φορείς έκφρασης, με και χωρίς His-tag, pET16b και pT7-7, αντίστοιχα. Με το φορέα έκφρασης pET16b οι πρωτεΐνες εκφράζονται επισημασμένες μαζί με μια μικρή αλληλουχία 10 ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο τους, διευκολύνοντας έτσι τον καθαρισμό τους με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη που περιέχει ακινητοποιημένα ιόντα νικελίου. Ο έλεγχος της έκφρασης και στους δύο φορείς γίνεται από την υποκινητή T7, επιτρέποντας έτσι την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων πρωτεΐνης από το στέλεχος της *E.coli* BL21(DE3)plysS, το οποίο εκφράζει την πολυμεράση T7, από χρωμοσωμική θέση, υπό τον έλεγχο του υποκινητή *lacUV5*. Έτσι οι κατασκευές εισήχθηκαν, χωριστά, στο στέλεχος αυτό και ελέγχθηκε η έκφραση της κάθε πρωτεΐνης μετά από επαγωγή με IPTG. Το επίπεδο έκφρασης της κάθε πρωτεΐνης ήταν διαφορετικό. Ορισμένες πρωτεΐνες εκφράζονταν σε πολύ υψηλά επίπεδα και ανιχνεύονταν με χρώση Coomassie blue, μετά από ανάλυσή τους σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, άλλες ανιχνεύονταν με ανάλυση western χρησιμοποιώντας κατάλληλο αντίσωμα, που αναγνωρίζει την αλληλουχία των ιστιδινών (anti-His-AP-conjugate) και τέλος άλλες πρωτεΐνες ανιχνεύονταν μόνο με ³⁵S-labelling. Στην τελευταία περίπτωση η σήμανση των πρωτεϊνών με ³⁵S-Met έγινε τόσο *in vivo* σε *E.coli* όσο και *in vitro* χρησιμοποιώντας το συζευγμένο *in vitro* σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης. Στον Πίνακα 11, παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα από τη μελέτη της έκφρασης 15 πρωτεϊνών Hrp.

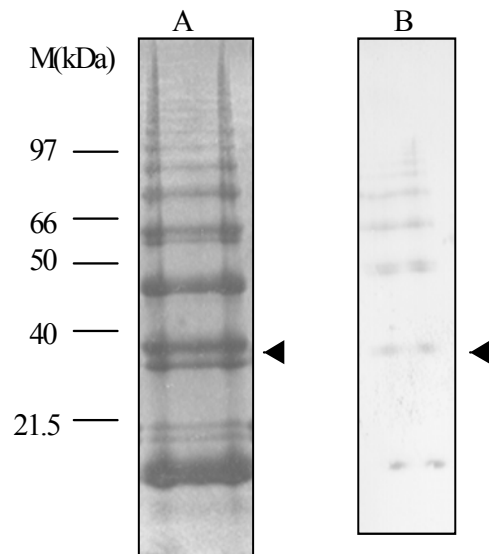
Ομως, εκτός από το διαφορετικό επίπεδο έκφρασης που είχαν οι πρωτεΐνες αυτές, ορισμένες εμφάνισαν ένα ιδιόμορφο πρότυπο κατά την ανάλυσή τους σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Επειδή το πρότυπο αυτό οφείλεται σε διαφορετικούς λόγους ανάλογα με την πρωτεΐνη, η περιγραφή της κάθε μίας θα γίνει χωριστά και θα αναφερθεί επίσης ο τρόπος αντιμετώπισης του προβλήματος σε κάθε περίπτωση.

Πίνακας 11. Εκφραση των πρωτεϊνών Hrp σε *E.coli*.

Πρωτεΐνη	Φορείς έκφρασης		Μέθοδος ανίχνευσης		
	pT7-7	pET16B	Coomasie blue	Western blotting	³⁵ S-labelling
HrpJ	-	+	+	+	+
HrcV ₃₁₂₋₆₉₃	-	+	+	+	+
HrpQ	-	+	-	-	+
HrcN	-	+	+	+	+
HrpO	+	+	+	+	+
HrpP	+	+	+	+	+
HrcQa	+	+	+	+	+
HrcQb	+	+	+	+	+
HrcR	+	+	-	-	+
HrcS	+	+	-	-	+
HrcT	+	+	-	-	-
HrcU	+	+	-	-	-
HrpA	+	+	+	+	+
HrpZ	+	+	+	+	+
HrpB	+	+	+	+	+
HrcJ	+	+	-	-	-

HrpJ: Το πρότυπο της πρωτεΐνης HrpJ σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μετά από καθαρισμό σε μικρή κλίμακα, από στήλη που περιείχε ιόντα νικελίου, και κάτω από ισχυρές αποδιατακτικές συνθήκες (8M Urea) φαίνεται στην Εικόνα 35A. Η εμφάνιση πολλών πρωτεϊνικών ζωνών, μετά από χρώση του πηκτώματος με Coomassie blue, δεν είναι αποτέλεσμα συνκαθαρισμού πρωτεϊνών της *E.coli*, δεδομένου ότι οι ίδιες πρωτεϊνικές ζώνες ανιχνεύονται σε Western blot με αντίσωμα anti-His-AP-conjugate, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία των ιστιδινών (Εικ. 35B).

Εικόνα 35. Καθαρισμένη πρωτεΐνη His₁₀-HrpJ από στήλη Ni-NTA agarose, κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (8M Urea). A: αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12%, χρωματισμένο με coomassie blue, B: ανάλυση western με το αντίσωμα anti-His-AP-conjugate (1:1000). Σημειώνονται οι δείκτες μοριακής μάζας, και με βέλος η ζώνη με μοριακή μάζα του μονομερούς της πρωτεΐνης HrpJ.

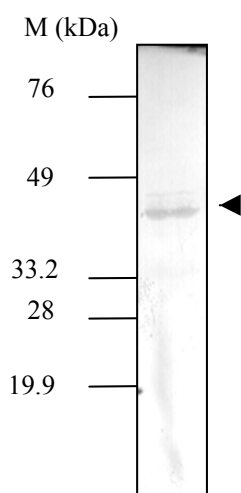


Δεδομένου ότι η HrpJ έχει αναμενόμενο μοριακό βάρος 37 kDa, η ζώνη που δείχνει το βέλος αντιπροσωπεύει τη μονομερή πρωτεΐνη. Η ζώνη, που εμφανίζεται κάτω από την κανονικού μεγέθους πρωτεΐνη πιθανόν να είναι προϊόν πρωτεόλυσης ή προϊόν εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης. Οι ζώνες, που εμφανίζονται πάνω από τη ζώνη των 37 kDa, δε φαίνεται να αποτελούν πολυμερή της, γιατί οι μάζες τους δεν είναι πολλαπλάσιες του 37. Επίσης η πρωτεΐνη HrpJ, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, δεν προβλέπεται να έχει υδρόφοβες περιοχές, ώστε το πολλαπλό αυτό πρότυπο ζωνών να αποδοθεί σε ανωμαλία της κινητικότητας της πρωτεΐνης για συνήθεις λόγους. Είναι ενδιαφέρον ότι ένα τέτοιο κλιμακωτό πρωτεϊνικό πρότυπο εμφανίζεται σε πρωτεΐνες που δεσμεύουν λιποπολυσακχαρίτες (LPS), οι οποίοι συναντώνται στην εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων. Λαμβάνοντας υπόψη την ομολογία της HrpJ με τη YopN, η οποία εντοπίζεται στην επιφάνεια των βακτηρίων της *Yersinia*, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι και η HrpJ έχει παρόμοια θέση. Το γεγονός επίσης

ότι τα LPS έχουν κάποιο ρόλο στην παθογένεια, καθιστά τη ικανότητα της HrcJ να συσχετίζεται με LPS ιδιαίτερα ενδιαφέροντα. Ένα άλλο ενδεχόμενο είναι ότι οι ζώνες αυτές αποτελούν πολυμερή της πρωτεΐνης, γεγονός που ενισχύεται από την παρουσία ενός μοτίβου “φερμουάρ λευκίνης” (leucine zipper) στο αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης. Επειδή ορισμένες ζώνες δεν αντιστοιχούν στο μέγεθος διμερών, τριμερών κ.λ.π. μορφών είναι πιθανό να σχηματίζονται από αλληλεπίδραση της μικρότερης ζώνης που αναλύεται στα 15 kDa περίπου και της ολόκληρης πρωτεΐνης (37 kDa) ή σε ένα συνδυασμό αυτών. Περαιτέρω πειράματα απαιτούνται για τη διελεύκανση της δημιουργίας αυτών των πολλαπλών ζωνών.

HrcV: Η έκφραση και ο καθαρισμός της HrcV από *E.coli* δεν θα ήταν εφικτός λόγω των πολλών διαμεμβρανικών περιοχών που προβλέπεται να έχει στο αμινοτελικό άκρο της. Έτσι κρίθηκε σκόπιμο να υποκλωνοποιηθεί το τμήμα του γονιδίου *hrcV*, που καθορίζει το υδροφιλικό καρβοξυτελικό τμήμα της HrcV. Ανάλογη προσέγγιση είχε γίνει για την έκφραση της ομόλογης πρωτεΐνης FlbA από *Helicobacter pylori* (222). Επειδή η πλήρης αλληλουχία του γονιδίου *hrcV* από *P.s. phaseolicola* δεν ήταν γνωστή, παρά μόνο ένα κεντρικό τμήμα του, έγινε αρχικά αλληλούχιση του καρβοξυτελικού άκρου του από το κοσμίδιο pPL6. Στη συνέχεια απομονώθηκε με PCR το τμήμα του γονιδίου *hrcV*, που καθορίζει τα αμινοξικά κατάλοιπα 312 μέχρι το τέλος της πρωτεΐνης (312-693 αα) και υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα έκφρασης pET16b. Η κατασκευή εισήχθη στο στέλεχος BL21(DE3)pLysS της *E.coli* και ελέγχθηκε η έκφραση της μετά από επαγωγή με IPTG. Δεν παρουσιάστηκαν προβλήματα κατά την έκφραση και τον καθαρισμό της. Στην Εικόνα 36 φαίνεται το καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης, μοριακού βάρους 42 kDa, σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μετά από καθαρισμό σε μικρή κλίμακα από στήλη Ni-NTA αγαρόζης.

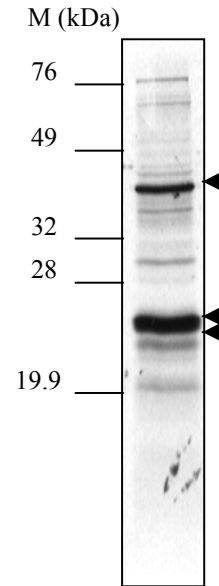
Εικόνα 36. Καθαρισμένη πρωτεΐνη His₁₀-HrcV₃₁₂₋₆₉₃ με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη Ni-NTA αγαρόζης, κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (8M Urea). Η πρωτεΐνη αναλύθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12% και ανιχνεύτηκε με το αντίσωμα anti-His-AP-conjugate (1:1000). Σημειώνονται οι δείκτες μοριακής μάζας.



HrpQ: Η αλληλουχία του γονιδίου *hrpQ* από *P.s.phaseolicola* δεν ήταν γνωστή, γι' αυτό έγινε αρχικά αλληλούχιση όλου του γονιδίου από το κοσμίδιο pPL6 και στη συνέχεια απομονώθηκε με PCR από το κοσμίδιο αυτό και υποκλωνοποιήθηκε στο φορέα έκφρασης pET16b.

Η πρωτεΐνη HrpQ προβλέπεται να έχει δύο υδρόφοβες περιοχές, γι' αυτό το λόγο η εκχύλιση της από τα κύτταρα της *E.coli*, καθώς και ο καθαρισμός της από στήλη με ιόντα νικελίου πραγματοποιήθηκε κάτω από ισχυρές αποδιατακτικές συνθήκες (8M Urea). Παρόλα αυτά, δεν ήταν δυνατή η ανίχνευσή της μετά από χρώση με Coomassie blue, αλλά ούτε και με το αντίσωμα anti-His-AP-conjugate. Η αδυναμία ανίχνευσής της μπορεί να οφείλεται είτε σε αστάθεια της πρωτεΐνης μέσα στα κύτταρα ή να εκφράζεται σε πολύ χαμηλό ποσοστό. Έτσι, προκειμένου να ελεγχθεί αν η πρωτεΐνη μπορεί να εκφράζεται σε *E.coli*, η έκφραση της έγινε παρουσία $^{35}\text{S-Met}$. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 37 η έκφραση της σε *E. coli* έδωσε μία ζώνη που αντιστοιχεί στην HrpQ, αλλά πιθανώς λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα της δε μεταναστεύει στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της (36 kDa). Επίσης εμφανίζονται και δύο μικρότερες ζώνες του ίδιου περίπου μοριακού βάρους (25 kDa), οι οποίες μπορεί να αντιπροσωπεύουν προϊόντα αποδόμησης ή να προέρχονται από εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης.

Εικόνα 37. Αυτοραδιογραφία της *in vivo* παραγόμενης πρωτεΐνης His10-HrpQ σε *E.coli*, παρουσία ^{35}S -Μεθειονίνης. Το βακτηριακό πρωτεϊνικό εκχύλισμα αναλύθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (12%) και μετά από ξήρανση εκτέθηκε για 24 h σε φιλμ. Με βέλη σημειώνονται η πλήρους μήκους πρωτεΐνη και δύο μικρότερου μεγέθους πολυπεπίδια, του ίδιου περίπου μοριακού βάρους.



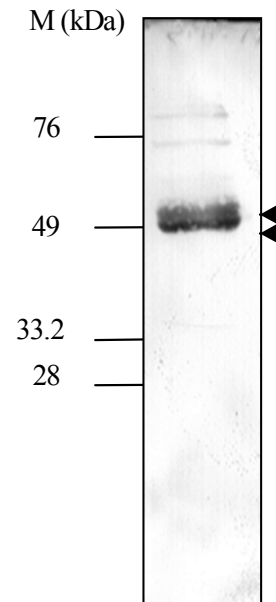
HrcN: Η αλληλουχία του γονιδίου *hrcN* από *P.s.phaseolicola* δεν ήταν γνωστή, γι' αυτό έγινε αρχικά αλληλούχιση του αμινοτελικού και καρβοξυτελικού άκρου του, από το κοσμίδιο pPL6, ώστε να είναι δυνατή η απομόνωση του με PCR και στη συνέχεια η υποκλωνοποίηση του στο φορέα έκφρασης pET16b.

Παρόλο που, η πρωτεΐνη δεν περιέχει υδρόφοβες περιοχές οπότε ο καθαρισμός της θα μπορούσε να γίνει από το κυτοπλασματικό κλάσμα των βακτηρίων, διαπιστώθηκε ότι ένα μεγάλο ποσοστό της πρωτεΐνης παρέμενε στο μεμβρανικό κλάσμα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι πιθανόν η πρωτεΐνη να σχετίζεται περιφερειακά με τη μεμβράνη και γι' αυτό εμφανίζεται και στα δύο κλάσματα. Έτσι η εκχύλιση της πρωτεΐνης από τα βακτήρια και ο καθαρισμός της σε μικρή κλίμακα έγινε κάτω από ισχυρές αποδιατακτικές συνθήκες (8M Urea). Μετά τον καθαρισμό της, με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη Ni-NTA αραρόζης, εμφάνισε δύο ζώνες με πολύ μικρή διαφορά μοριακού βάρους, σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου χρωματισμένο με Coomassie blue.

Προκειμένου να διευκρινιστεί ποιά από τις δύο ζώνες αντιστοιχεί στην HrcN, έγινε western blot χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-His-AP-conjugate. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 38 και οι δύο ζώνες αναγνωρίζονται από το αντίσωμα. Το αποτέλεσμα αυτό δηλώνει ότι και οι δύο ζώνες αποτελούν μορφές της HrcN, με τη μεγαλύτερη να αντιστοιχεί στην πλήρους μήκους πρωτεΐνη και τη μικρότερη να είναι

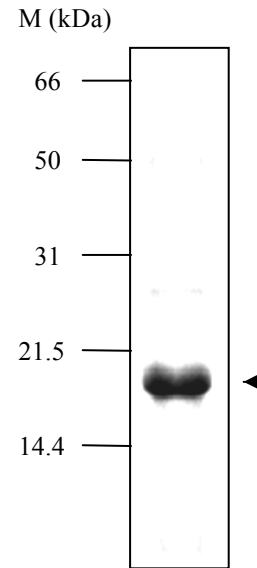
ενδεχομένως προϊόν πρωτεόλυσης. Το γεγονός ότι η μικρότερη ζώνη ανιχνεύεται με το αντίσωμα υποδηλώνει ότι η πρωτεόλυση συμβαίνει κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι και η YscN μετά την έκφραση της εμφανίζεται με δύο ζώνες, όμως δεν είναι γνωστό πώς προκύπτουν. Πιστεύεται ότι η μικρότερη ζώνη, είτε είναι αποτέλεσμα εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης είτε είναι προϊόν πρωτεόλυσης. Ένα άλλο ενδεχόμενο, το οποίο θα μπορούσε να εξηγήσει την εμφάνιση των δύο μορφών, λόγω της μικρής διαφοράς μοριακού βάρους που έχουν, είναι η φωσφορυλίωση. Σ' αυτήν την περίπτωση, η μικρότερη ζώνη θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει την πλήρους μήκους πρωτεΐνη και η μεγαλύτερη να είναι φωσφορυλιωμένη της μορφή.

Εικόνα 38. Καθαρισμένη πρωτεΐνη His₁₀-HrcN με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη Ni-NTA αγαρόζης, κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (8M Urea). Η πρωτεΐνη αναλύθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 14% και ανιχνεύτηκε με το αντίσωμα anti-His-AP-conjugate (1:1000). Σημειώνονται οι δείκτες μοριακής μάζας, στα αριστερά και δεξιά με βέλη σημειώνονται οι δύο μορφές της πρωτεΐνης HrcN.



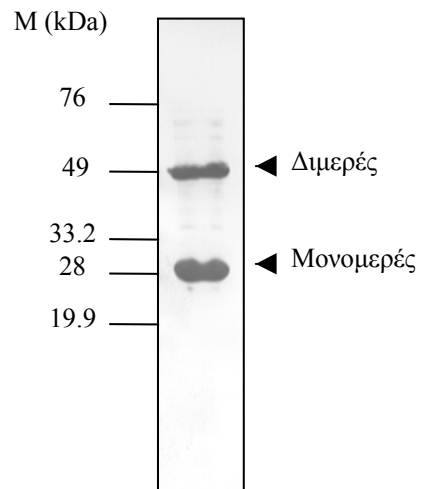
HrpO: Το επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης HrpO, τόσο από το φορέα έκφρασης pT7-7 όσο και από τον pET16B, ήταν πολύ υψηλό και η πρωτεΐνη εντοπίστηκε στο κυτταρικό κλάσμα των βακτηρίων. Ο καθαρισμός της σε μικρή κλίμακα έγινε κάτω από μη αποδιατακτικές συνθήκες με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη Ni-NTA αγαρόζης. Η ταυτότητα της καθαρισμένης πρωτεΐνης επιβεβαιώθηκε με ανάλυση western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-His-AP-conjugate (Εικ.39).

Εικόνα 39. Καθαρισμένη πρωτεΐνη His₁₀-HrpO με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη Ni-NTA αραρόζης. Η πρωτεΐνη αναλύθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (14%) και ανιχνεύθηκε μετά από χρώση με Coomassie blue.



HrpP: Το επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης HrpP, τόσο από το φορέα έκφρασης pT7-7 όσο και από τον pET16b, ήταν πολύ υψηλό και η πρωτεΐνη εντοπίστηκε στο μεμβρανικό κλάσμα των βακτηρίων. Έτσι, η εκχύλιση της πρωτεΐνης από τα βακτήρια *E. coli* και ο καθαρισμός της σε μικρή κλίμακα έγινε κάτω από ισχυρές αποδιατακτικές συνθήκες (8M Urea). Η καθαρισμένη πρωτεΐνη HrpP, μετά από ανάλυσή της σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, εμφάνισε δύο ζώνες. Με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα, η μικρότερη ζώνη μετανάστευε στα 28kDa, κοντά στο μοριακό βάρος της HrpP (20.5 kDa), ενώ η μεγαλύτερη είχε περίπου διπλάσιο μοριακό βάρος.

Εικόνα 40. Καθαρισμένη πρωτεΐνη His₁₀-HrpP με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη Ni-NTA αραρόζης. Η πρωτεΐνη αναλύθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (14%) και ανιχνεύθηκε με το αντίσωμα anti-His-AP-conjugate (1:1000).

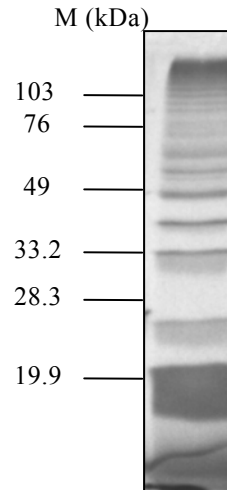


Ετσι, για να εξακριβωθεί η ταυτότητα των δύο ζωνών έγινε ανάλυση western, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-His-conjugate. Όπως φαίνεται στην Εικόνα και οι δύο ζώνες ανιχνεύονται από το αντίσωμα, που σημαίνει ότι είναι μορφές της HrpP. Η μικρότερη ζώνη φαίνεται να αντιστοιχεί στη μονομερή μορφή της πρωτεΐνης, παρόλο που μεταναστεύει πιο αργά. Η αργή αυτή κινητικότητα μπορεί να οφείλεται στον υδρόφοβο χαρακτήρα της πρωτεΐνης, αφού ανάλυση της πρωτοταγούς της αλληλουχίας έδειξε την παρουσία μιας υδρόφοβης περιοχής. Η μεγαλύτερη ζώνη πιθανόν να αποτελεί διμερές της HrpP, παρόλο που οι συνθήκες είναι αποδιατακτικές. Το γεγονός ότι το σύμπλοκο δεν αποδιατάσσεται σε υψηλή θερμοκρασία (100°C), παρουσία ισχυρών αποδιατακτικών μέσων, όπως Urea και SDS, υποδηλώνει ότι πιθανά ο σχηματισμός του σταθεροποιείται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων των μονομερών της πρωτεΐνης. Η δημιουργία συμπλόκων, που είναι σταθερά σε ισχυρά αποδιατακτικές συνθήκες, δεν είναι χωρίς προηγούμενο (137). Αν ο σχηματισμός διμερών δεν είναι αποτέλεσμα της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης μέσα στα κύτταρα της *E.coli*, αλλά πραγματοποιείται και στην *Pseudomonas*, τότε θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η HrpP πιθανόν να αποτελεί δομικό συστατικό ενός καναλιού που οργανώνεται στην εσωτερική μεμβράνη των βακτηρίων.

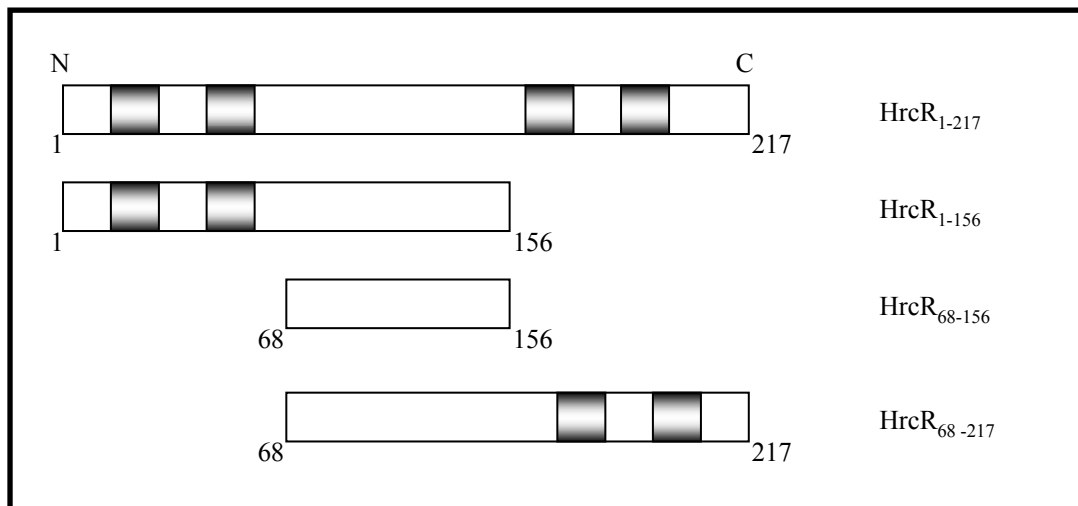
HrcR: Η πρωτεΐνη HrcR εκφράστηκε σε *E.coli* τόσο από το φορέα έκφρασης pT7-7 όσο και από τον pET16b, αλλά δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση της πρωτεΐνης με τις μεθόδους, που ανιχνεύτηκαν οι προηγούμενες πρωτεΐνες. Η αδυναμία ανίχνευσης της πρωτεΐνης πιθανόν να οφειλόταν σε χαμηλό επίπεδο έκφρασης. Χρησιμοποιώντας πιο ευαίσθητες μεθόδους, όπως σήμανση της πρωτεΐνης με ραδιενεργή μεθειονίνη (³⁵S-Met), κατά τη διάρκεια της έκφρασης της σε *E.coli* ή με έκφραση της πρωτεΐνης *in vitro*, με το συζευγμένο σύστημα μεταγραφής/μετάφρασης δεν παρατηρήθηκε μια ευδιάκριτη ζώνη.

Αντίθετα παρατηρήθηκε ένα πολλαπλό πρότυπο ζωνών, οι οποίες μπορεί να είναι μορφές της HrcR, αλλά λόγω του υψηλού βαθμού υδροφοβικότητας να μην έχουν ομαλή συμπεριφορά όταν αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Εικ. 41). Μια άλλη εκδοχή είναι ότι η πλήρους μήκους πρωτεΐνη είναι ασταθής οπότε δεν είναι δυνατή η ανίχνευση της.

Εικόνα 41. Αυτοραδιογραφία της *in vitro* παραγόμενης πρωτεΐνης HrcR με το συζευγμένο σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης (PROMEGA), σε λύμα δικτυοερυθροκυττάρων κουνελιού. Χρησιμοποιήθηκε 1μg του πλασμιδίου pT7-7/HrcR. Το προϊόν της αντίδρασης αναλύθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (12%).



Ανάλογα προβλήματα έκφρασης έχουν αναφερθεί και σε άλλες ομόλογες πρωτεΐνες της οικογένειας που μελετήθηκαν από άλλες ερευνητικές ομάδες. Ένας τρόπος αντιμετώπισης τέτοιων προβλημάτων είναι η έκφραση μικρότερων τμημάτων της πρωτεΐνης. Έτσι απομονώθηκαν με PCR τρεις περιοχές του γονιδίου που κωδικοποιούν : την αμινοτελική περιοχή 1-68, την κεντρική περιοχή 68-156 και τη καρβοξυτελική περιοχή 68-217 (Εικ. 42) και υποκλωνοποιήθηκαν στο φορέα έκφρασης pET16b.

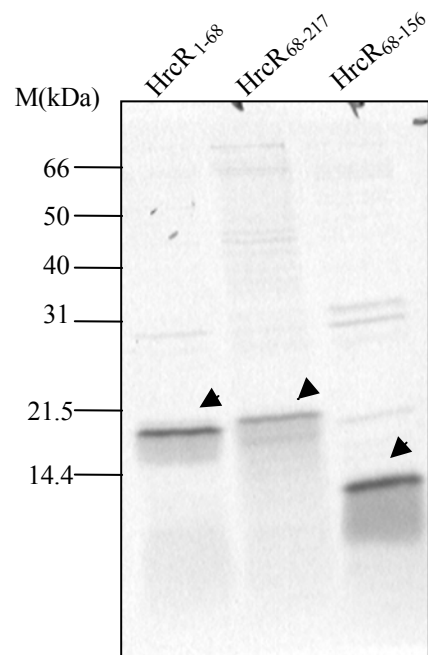


Εικόνα 42. Σχηματική απεικόνιση των περιοχών της HrcR, που υποκλωνοποιήθηκαν στο φορέα έκφρασης pET16b. Τα σκιασμένα κουτιά απεικονίζουν τις υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης. Οι αριθμοί που σημειώνονται κάτω από τα σχήματα αντιστοιχούν σε αμινοξικά κατάλοιπα της πλήρους μήκους πρωτεΐνης HrcR.

Εξαιτίας της παρουσίας δύο υδρόφοβων περιοχών στα τμήματα της πρωτεΐνης που περιείχαν το αμινοξυτελικό και καρβοξυτελικό τμήμα της, η εκχύλισή τους από τα κύτταρα της *E.coli*, καθώς και ο καθαρισμός της από στήλη Ni-NTA αγαρόζης πραγματοποιήθηκε κάτω από ισχυρές αποδιατακτικές συνθήκες (8M Urea). Παρόλα αυτά δεν ήταν δυνατή η ανίχνευσή της μετά από χρώση με Coomassie blue, αλλά ούτε και με το αντίσωμα anti-His-AP-conjugate.

Η αδυναμία ανίχνευσης τους μπορεί να οφειλόταν είτε σε αστάθεια των γονιδιακών προϊόντων μέσα στα κύτταρα ή να εκφράζονταν σε πολύ χαμηλό επίπεδο. Έτσι προκειμένου να ελεγχθεί αν μπορούν να εκφραστούν μέσα σε *E.coli*, η έκφραση τους έγινε παρουσία $^{35}\text{S-Met}$. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 43, το επίπεδο έκφρασης είναι χαμηλό. Αντίθετα το κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης, το οποίο δεν εμφανίζει υδρόφοβες περιοχές, δεν εμφάνισε προβλήματα έκφρασης και η ανίχνευση του ήταν δυνατή με όλες τις μεθόδους (Εικ. 43), παρά το γεγονός ότι ήταν το πολυπεπίδιο με το μικρότερο μέγεθος.

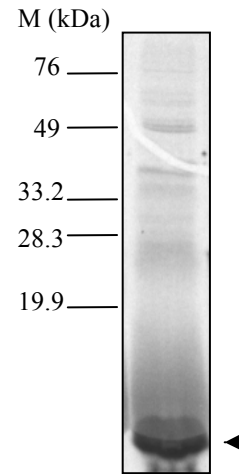
Εικόνα 43. Εκφραση τμημάτων της πρωτεΐνης HrcR σε *E.coli*. Αυτοραδιογραφία των ελλειμμάτων της HrcR, μετά από έκφραση τους σε *E.coli* παρουσία $^{35}\text{S-Met}$ και ανάλυση του σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης. Β.



HrcS: Η πρωτεΐνη HrcS εκφράστηκε σε *E.coli*, τόσο από το φορέα έκφρασης pT7-7 όσο και από τον pET16B, αλλά δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση της πρωτεΐνης με τις μεθόδους που ανιχνεύτηκαν οι προηγούμενες πρωτεΐνες. Έτσι έγινε σήμανση της πρωτεΐνης με ραδιενεργή μεθειονίνη ($^{35}\text{S-Met}$), είτε με *in vivo* έκφραση σε *E.coli* ή *in vitro* χρησιμοποιώντας το συζευγμένο σύστημα μεταγραφής και

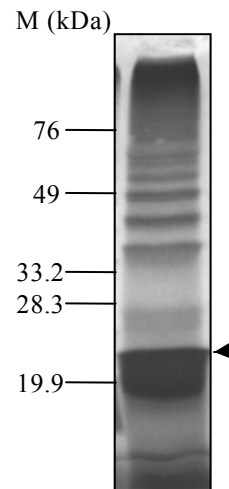
μετάφρασης. Έκφραση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε μόνο στην τελευταία περίπτωση (Εικ. 44).

Εικόνα 44. Αυτοραδιογραφία της παραγόμενης πρωτεΐνης HrcS, με το *in vitro* σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης, σε λύμα δικτυοερυθροκυττάρων κουνελιού. Χρησιμοποιήθηκε 1μg του πλασμιδίου pT7-7/HrcS. Το προϊόν της αντίδρασης αναλύθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (12%). Το μοριακό βάρος της HrcS είναι 9.4 kDa.



HrcT: Η πρωτεΐνη HrcT εκφράστηκε σε *E.coli*, τόσο από το φορέα έκφρασης pT7-7 όσο και από τον pET16b, αλλά δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση της πρωτεΐνης μετά από χρώση Coomassie blue ή με ανάλυση western. Έτσι έγινε σήμανση της πρωτεΐνης με ραδιενεργή μεθειονίνη (^{35}S -Met), είτε με *in vivo* έκφραση σε *E.coli* ή *in vitro* χρησιμοποιώντας το συζευγμένο σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης. Έκφραση της πρωτεΐνης παρατηρήθηκε μόνο στην τελευταία περίπτωση (Εικ 45).

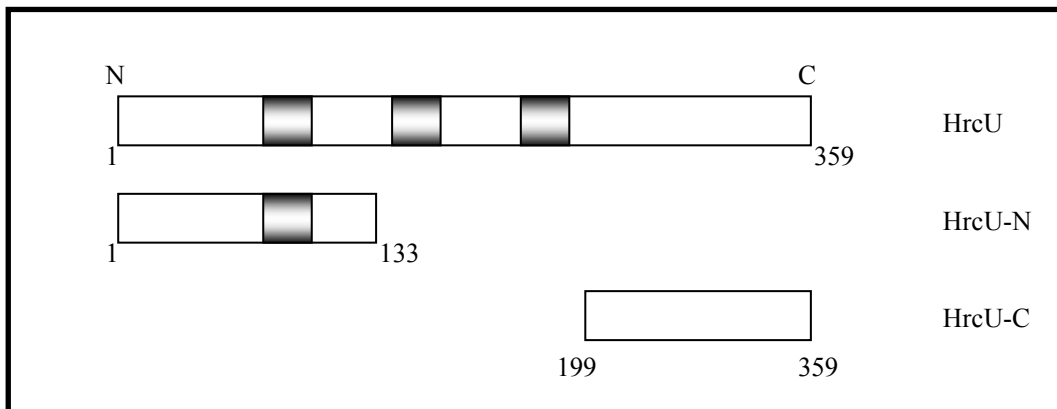
Εικόνα 45. Αυτοραδιογραφία της παραγόμενης πρωτεΐνης HrcT, με το *in vitro* σύστημα μεταγραφής και μετάφρασης, σε λύμα δικτυοερυθροκυττάρων κουνελιού. Χρησιμοποιήθηκε 1μg του πλασμιδίου pT7-7/HrcT. Το προϊόν της αντίδρασης αναλύθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (12%). Το μοριακό βάρος της HrcT είναι 28.3 kDa.



Όμως, όπως φαίνεται στην Εικόνα 45, δεν παρατηρείται μία ευδιάκριτη ζώνη αλλά ένα πολλαπλό πρότυπο ζωνών το οποίο, όπως έχει προαναφερθεί, οφείλεται πιθανόν στον υψηλό βαθμό υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης. Η HrcT περιέχει έξι ισχυρά υδρόφοβες περιοχές. Ανάλογη συμπεριφορά είχε παρατηρηθεί και κατά τη μελέτη της ομόλογης πρωτεΐνης FliR (61). Στην περίπτωση της HrcT, δεν υπήρχε η

δυνατότητα να κατασκευαστούν ελλείμματα, γιατί οι υδρόφοβες περιοχές της είναι πολύ κοντά.

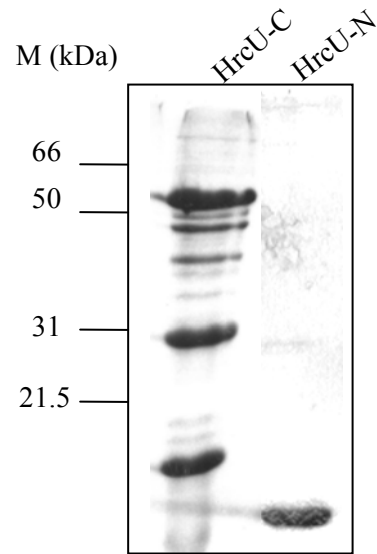
HrcU: Η ανίχνευση της πρωτεΐνης, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, δεν ήταν εφικτή λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα της. Έτσι ακολουθήθηκε η ίδια στρατηγική με την HrcR, δηλαδή εκφράστηκαν μικρότερα τμήματα της πρωτεΐνης. Ειδικότερα απομονώθηκαν με PCR δύο περιοχές του γονιδίου που κωδικοποιούν : την αμινοτελική περιοχή 1-133 (HrcU-N, 14.5 kDa) και τη καρβοξυτελική περιοχή 199-359 (HrcU-C, 17.4 kDa) (Εικ. 46). Οι αλληλουχίες αυτές υποκλωνοποιήθηκαν στο φορέα έκφρασης pET16b και οι κατασκευές εισήχθησαν στο στέλεχος BL21(DE3)pLysS της *E.coli*.



Εικόνα 46. Σχηματική απεικόνιση των περιοχών της HrcU, που υποκλωνοποιήθηκαν στο φορέα έκφρασης pET16b. Τα σκιασμένα κουτιά απεικονίζουν τις υδρόφοβες περιοχές της πρωτεΐνης. Οι αριθμοί που σημειώνονται κάτω από τα σχήματα αντιστοιχούν σε αμινοξικά κατάλοιπα της πλήρους μήκους πρωτεΐνης HrcU.

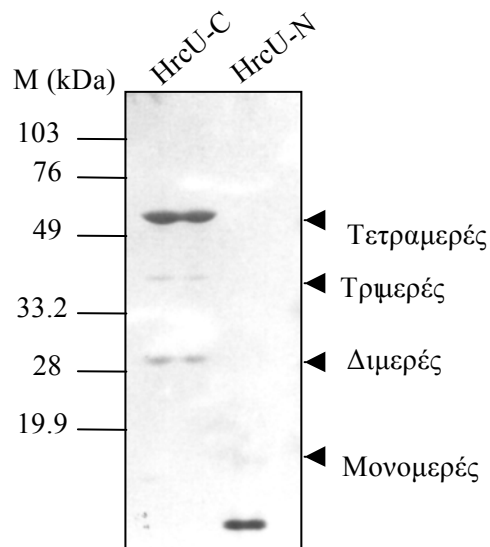
Η εκχύλιση των πρωτεϊνών από τα κύτταρα της *E.coli*, καθώς και ο καθαρισμός της από στήλη Ni-NTA αγαρόζης πραγματοποιήθηκε κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες (8M Urea). Στην Εικόνα 47 παρουσιάζεται το ηλεκτροφορητικό πρότυπο του αμινοτελικού και καρβοξυτελικού τμήματος της πρωτεΐνης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου μετά από χρώση με Coomassie Brilliant blue. Το τελευταίο εμφανίζει τέσσερις κύριες ζώνες. Η μικρότερη ζώνη μεταναστεύει στο αναμενόμενο μοριακό της μονομερούς πρωτεΐνης, ενώ οι μεγαλύτερες ζώνες μεταναστεύουν σε μοριακά βάρη που αντιστοιχούν σε διμερή, τριμερή και τετραμερή της πρωτεΐνης.

Εικόνα 47. Καθαρισμένη πρωτεΐνη His₁₀-HrcU-C με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη Ni-NTA αραρόζης, υπό αποδιατακτικές συνθήκες (8M Urea). Η πρωτεΐνη αναλύθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (12%) και ανιχνεύθηκε μετά από χρώση με Coomassie blue.



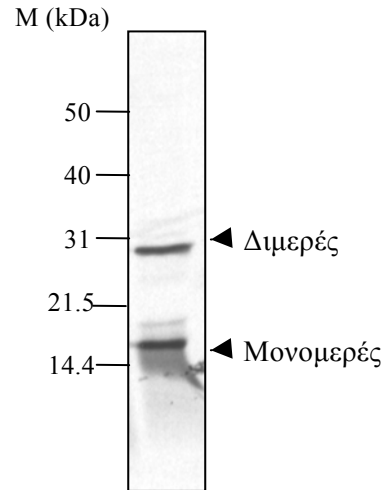
Προκειμένου να εξακριβωθεί η ταυτότητα των παραπάνω ζωνών έγινε ανάλυση Western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-His-AP-conjugate. Όπως φαίνεται από την εικόνα 48 και οι τέσσερις ζώνες αναγνωρίζονται από το αντίσωμα, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι και οι τρεις ζώνες αποτελούν πολυμερή της πρωτεΐνης.

Εικόνα 48. Ανάλυση western της καθαρισμένης πρωτεΐνης His₁₀-HrcU-C με το αντίσωμα anti-His-AP-conjugate (1:1000).



Ο σχηματισμός περισσότερων πολυμερών εξαρτάται από την ποσότητα της εκφραζόμενης πρωτεΐνης, γιατί όταν η διάρκεια έκφρασης της είναι μικρή (5 min), όπως κατά την *in vivo* σήμανση της σε *E.coli* παρουσία ³⁵S-Met, τότε εμφανίζονται μόνο η μονομερής και η διμερής μορφή της πρωτεΐνης (Εικ. 49).

Εικόνα 49. Αυτοραδιογραφία της *in vivo* παραγόμενης πρωτεΐνης His10-HrpU-C σε *E.coli*, παρουσία ^{35}S -Μεθειονίνης. Το βακτηριακό πρωτεϊνικό εκχύλισμα αναλύθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (12%).



Επειδή η έκφραση της πλήρους μήκους πρωτεΐνης δεν κατέστη δυνατή δεν μπορούμε να συμπεράνουμε αν ικανότητα πολυμερισμού έχει ολόκληρη η πρωτεΐνη. Αν όμως διαπιστωθεί ότι ικανότητα πολυμερισμού έχει και η πλήρους μήκους πρωτεΐνη, τότε το αποτέλεσμα αυτό αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε συνδυασμό με τα δομικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης (παρουσία ενός μοτίβου ABC και 3 πιθανών διαμεμβρανικών περιοχών) και της πιθανής αλληλεπίδρασης της με την πρωτεΐνη HrcN, η οποία φαίνεται να είναι η ATPάση του συστήματος. Η σημασία αυτού του πολυμερισμού έγκειται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες-μεταφορείς ABC περιέχουν 1 ή 2 διαμεμβρανικές περιοχές και οργανώνονται σε σύμπλοκα είτε μέσω πολυμερισμού ενός πολυπεπτιδίου είτε μέσω διαφορετικών πολυπεπτιδίων. Οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν δύο πολύ συντηρημένα μοτίβα τα Walker A και Walker B, τα οποία απαιτούνται για δέσμευση ATP, και το ABC signature SGG(Q). Ομως η πρωτεΐνη HrcU δεν περιέχει τα μοτίβα Walker A και B, αλλά μόνο το ABC signature. Είναι λοιπόν πιθανό η HrcU να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HrcN και να σχηματίζεται έτσι ένα λειτουργικό σύμπλοκο με ικανότητα υδρόλυσης ATP. Η ικανότητα πολυμερισμού του καρβοξυτελικού τμήματος της πρωτεΐνης μπορεί να σχετίζεται με τη δημιουργία ενός καναλιού στην εσωτερική μεμβράνη, όπως συμβαίνει με ορισμένες πρωτεΐνες ABC, οι οποίες λειτουργούν ως κανάλια παρά ως μεταφορείς. Ομως θα μπορούσε να σχετίζεται με το ρυθμιστικό ρόλο που φαίνεται να έχει η HrcU στην έκκριση των πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, αν η καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης, η οποία αναμένεται να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, αλληλεπιδρά με την HrcN, τότε είναι πιθανό ο πολυμερισμός να εμποδίζει τη δέσμευση της HrcN και έτσι να εμποδίζει την έκκριση. Προκαταρκτικά πειράματα με

τη μέθοδο Far western έχουν δείξει ότι η HrcN αλληλεπιδρά με τα ελλείμματα HrcU-N και HrcU-C. Όμως απαιτείται περαιτέρω ανάλυση για να εξακριβωθεί αν οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι ειδικές ή όχι.

4.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα πίστευαν ότι τα κύρια όπλα που χρησιμοποιούν τα φυτοπαθογόνα βακτήρια ήταν εξωκυτάρια ένζυμα, πολυσακχαρίτες και διάφορες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, όπως τοξίνες, που είτε δρουν κατευθείαν έξω από τα κύτταρο ξενιστή ή μετά από διάχυση μέσα στο κύτταρο. Σήμερα είναι γνωστό ότι η πλειονότητα των Gram-αρνητικών φυτοπαθογόνων βακτηρίων, που ανήκουν στα γένη *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* και *Ralstonia*, διαθέτουν ένα συντηρημένο εκκριτικό σύστημα τύπου III, το οποίο στέλνει πρωτεΐνες παθογόνου ισχύος κατευθείαν μέσα στο κύτταρο ξενιστή. Αυτό προέκυψε από τη παρατήρηση ότι βακτήρια με μεταλλάξεις στα γονίδια *hrp* που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος Hrp, δεν εκδηλώνουν παθογένεια, ενώ παρεμποδίζοντας την παραγωγή εξωενζύμων, πολυσακχαριτών και τοξινών ελαττώνεται μόνο η ένταση των συμπτωμάτων. Η μέχρι σήμερα έρευνα έχει δείξει ότι οι πρωτεΐνες, που μεταφέρονται κυρίως μέσα στα κύτταρα ξενιστές, είναι οι πρωτεΐνες Avr, οι οποίες θεωρούνται ως τα πρωτογενή όπλα των φυτοπαθογόνων βακτηρίων (105).

Ο χαρακτηρισμός των γονιδίων *hrp* και η αποκάλυψη ότι πολλές από τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούν εμφανίζουν ομοιολογία με πρωτεΐνες που οργανώνουν το εκκριτικό σύστημα τύπου III στα ζωικά παθογόνα, υποδηλώνει ότι το εκκριτικό σύστημα Hrp είναι ένα εκκριτικό σύστημα τύπου III. Επιπλέον, το εκκριτικό αυτό σύστημα εμφανίζει ομοιότητες και με το σύστημα βιογένεσης του βακτηριακού μαστιγίου. Η διαπίστωση αυτών των ομοιοτήτων έχει συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της βακτηριακής παθογένειας και παράλληλα παρέχεται η δυνατότητα να μελετηθεί το εκκριτικό σύστημα Hrp πιο συστηματικά.

Στην παρούσα μελέτη ξεκινήσαμε το βιοχημικό χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών Hrp, με στόχο να μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο οι πρωτεΐνες αυτές οργανώνονται προκειμένου να συγκροτήσουν την εκκριτική συσκευή Hrp. Αρχικά έγινε μια βιβλιογραφική έρευνα σχετικά με την μελέτη των ομολόγων πρωτεϊνών ώστε να αποκτηθεί μια πιο λεπτομερή εικόνα για το ρόλο των πρωτεϊνών αυτών αλλά και να σχεδιαστούν κατάλληλα πειράματα για τη μελέτη του εκκριτικού συστήματος Hrp. Παράλληλα έγινε λεπτομερής έρευνα, *in silico*, για να εντοπιστούν διάφορα χαρακτηριστικά δομής, που καθοδήγησαν τις προσπάθειες έκφρασης και καθαρισμού των επιμέρους πρωτεϊνών. Οι έρευνες αυτές έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες Hrp δεν

εμφανίζουν ομολογία μόνο στην αλληλουχία, αλλά εμφανίζουν και παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά, καθώς και παρόμοια λειτουργικά μοτίβα. Επιπλέον τα μήκη των πρωτεϊνών, που ανήκουν στην ίδια οικογένεια, είναι παρόμοια και τα γονίδια τους βρίσκονται σε παρόμοιες γενετικές θέσεις. Η ομοιότητα στη γενετική οργάνωση των εκκριτικών συστημάτων τύπου III έχει οδηγήσει στην άποψη ότι τα συστήματα αυτά έχουν αποκτηθεί ως ακέραιες γενετικές μονάδες με οριζόντια μεταφορά, στη διάρκεια της εξέλιξης. Παρόλο που ορισμένες πρωτεΐνες έχουν συντηρηθεί, άλλες έχουν υποστεί σημαντική αλλαγή. Γενικά, οι πιο πολύ συντηρημένες οικογένειες (LcrD, YscC, YscF, YscJ, YscN, YscR, YscS, YscT, YscU) δείχνουν ομοιότητα αλληλουχίας, που ποικίλει από 30-70%, ενώ οι λιγότερο συντηρημένες (YopN, YscD, YscF, YscI, YscK, YscL, YscQ) δείχνουν τιμές κάτω από 20% μέχρι 50%. Έτσι η σχετική θέση ενός γονιδίου μπορεί να έχει συντηρηθεί μεταξύ διαφορετικών εκκριτικών συστημάτων τύπου III, ενώ οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν, αν και προερχόμενες από ένα κοινό πρόγονο, ίσως έχουν αλλάξει σε ένα βαθμό, που δεν αναγνωρίζεται πλέον σαν ομολογία πρωτοταγούς δομής. Η διαφοροποίηση αυτή διευκόλυνε ίσως την προσαρμογή σε διαφορετικούς ξενιστές ή την έκκριση διαφορετικών παθογονικών παραγόντων.

Μια τέτοια περίπτωση γονιδίων, με συντηρημένη γενετική θέση αλλά σημαντική διαφορά στην αλληλουχία, είναι τα γονίδια των οικογενειών YscI, YscK και YscL, στις οποίες ανήκουν τα γονίδια *hrpB*, *hrpD* και *hrpE* αντίστοιχα, της *Pseudomonas syringae* (115). Ένα άλλο και ακόμα πιο δραστικό παράδειγμα διαφοράς στην αλληλουχία είναι τα γονίδια και οι πρωτεΐνες, που ανήκουν στις οικογένειες YscO και YscP, δηλαδή τα γονίδια *hrpO* και *hrpP*, αντίστοιχα, της *Pseudomonas syringae* (115). Είναι ενδιαφέρον ότι τα γονίδια αυτά συναντώνται μόνο στις ομάδες *hrp* των βακτηρίων *Pseudomonas* και *Erwinia* (ομάδα I). Ενδεχομένως οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν να έχουν λειτουργικά ανάλογα στα άλλα βακτήρια. Όμως μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστός ο ρόλος των πρωτεϊνών που ανήκουν στις παραπάνω οικογένειες.

Επίσης, οι πρωτεΐνες που ανήκουν στη YscQ οικογένεια, για τις οποίες γίνεται αναφορά στο επόμενο κεφάλαιο, εμφανίζουν ποικιλομορφία στην αλληλουχία τους. Όμως οι διαφορές περιορίζονται στα αμινοτελικά ήμισυ των πρωτεϊνών ενώ τα καρβοξυτελικά είναι συντηρημένα και επίσης παρουσιάζονται στις πρωτεΐνες FliN και FliY, που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση του μαστιγίου.

Τέλος στις λιγότερο συντηρημένες πρωτεΐνες ανήκει και η πρωτεΐνη HrpJ, η οποία όπως και οι πρωτεΐνες HrpO και HrpP, συναντώνται μόνο στις ομάδες *hrp* των βακτηρίων *Pseudomonas* και *Erwinia* (ομάδα I). Είναι ενδιαφέρον ότι η πρωτεΐνη HrpJ εμφανίζει μικρή ομοιότητα με την YopN από *Yersinia*, η οποία έχει βρεθεί ότι εντοπίζεται στη βακτηριακή επιφάνεια και συμμετέχει στην αναγνώριση των κυττάρων-στόχων (29, 149). Αν η πρωτεΐνη HrpJ έχει ένα ανάλογο ρόλο δεν είναι γνωστό.

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες που εμφανίζουν μεγαλύτερη ομολογία, όπως οι HrcV, HrcR, HrcS, HrcT και HrcU εκτός από την ομοιότητα στην αλληλουχία εμφανίζουν παρόμοιο πρότυπο υδροφοβικότητας υποδηλώνοντας ότι οι πρωτεΐνες αυτές έχουν και παρόμοια τοποθέτηση στη μεμβράνη. Για ορισμένες από τις ομόλογες πρωτεΐνες έχειδειχτεί η τοπολογία τους στη μεμβράνη, αλλά για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες Hrp τίποτα δεν είναι γνωστό. Επίσης η λειτουργία τους δεν είναι γνωστή, εκτός από ορισμένες περιπτώσεις όπως η ομόλογη της HrcV η LcrD η οποία συμμετέχει στο μονοπάτι ρύθμισης των γονιδίων *ycs* κάτω από χαμηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου. Πιστεύεται ότι η LcrD μεταβιβάζει εξωκυττάρια σήματα σε πρωτεΐνες στο εσωτερικό των βακτηρίων με τελική κατάληξη την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *ycs* (192).

Μια άλλη ενδιαφέρουσα περίπτωση συντηρημένης πρωτεΐνης είναι η HrcN, η οποία εμφανίζει μοτίβα χαρακτηριστικά των ATPασών, όπως και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας στην οποία ανήκει. Έτσι είναι η μοναδική υποψήφια πρωτεΐνη Hrp, που φαίνεται να τροφοδοτεί το εκκριτικό σύστημα με ενέργεια από ATP..

Το γεγονός ότι οι παραπάνω πρωτεΐνες εμφανίζουν ομολογία και με τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οργάνωση του μαστιγίου, έχει οδηγήσει στην άποψη ότι τα εκκριτικά συστήματα τύπου III σχηματίζουν μια παρόμοια δομή, που μεταφέρει τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες μέσω της εξωτερικής μεμβράνης, είτε στον εξωκυττάριο χώρο είτε κατευθείαν μέσα στα κύτταρα του ξενιστή. Όμως η μελλοντική έρευνα θα δείξει αν οι δύο διαδικασίες είναι λειτουργικά συντηρημένες. Για παράδειγμα, είναι σημαντικό να καθοριστεί αν η συναρμολόγηση του αγωγού Hrp πραγματοποιείται με εναπόθεση της πρωτεΐνης HrpA στην κορυφή του, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της οργάνωσης του μαστιγίου. Επίσης είναι ενδιαφέρον αν

στο εκκριτικό σύστημα Hgr υπάρχει μια ανάλογη δομή του βασικού σωματίου του μαστιγίου.

Συμπερασματικά, γίνεται αντιληπτό ότι η μελέτη του εκκριτικού συστήματος Hgr δεν θα οδηγήσει μόνο στην κατανόηση του ιδιόμορφου αυτού μηχανισμού έκκρισης, που διαθέτουν τόσο τα φυτοπαθογόνα βακτήρια όσο και τα ζωικά παθογόνα βακτήρια, αλλά θα δώσει τη δυνατότητα από πρακτικής πλευράς να αναπτυχθούν μεθοδολογίες, που θα παρεμποδίζουν τη δράση παραγόντων παθογόνου ισχύος και θα διευκολύνουν την ανάπτυξη νέων φαρμάκων με αυτοματοποιημένο έλεγχο συνθετικών ή φυσικών ουσιών *in vitro*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Διερεύνηση του βιοχημικού ρόλου των πρωτεϊνών HrcQa και HrcQb της *P. s. phaseolicola*

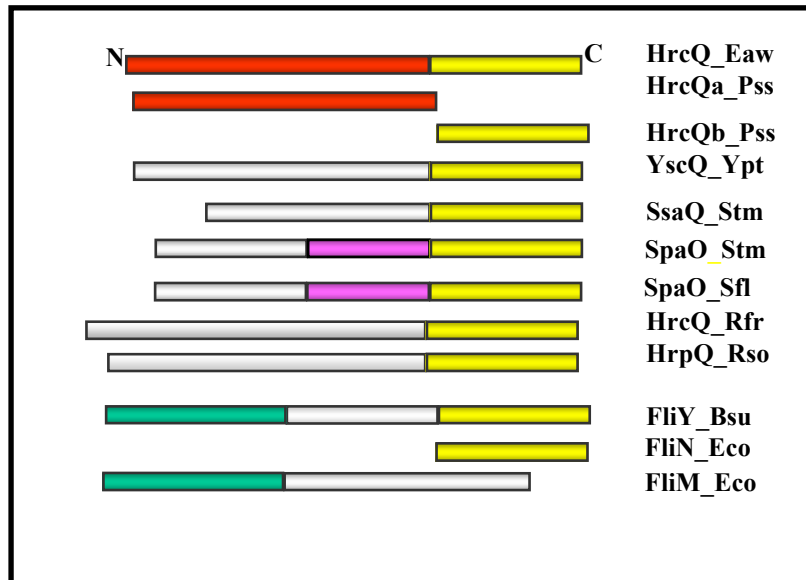
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το εκκριτικό σύστημα Hrp/Hrc, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έχει προσδιοριστεί μόνο γενετικά και στις τέσσερις κατηγορίες φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Είναι ενδιαφέρον ότι, οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από 9 γονίδια *hrp* εμφανίζουν ομολογία με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οργάνωση του εκκριτικού συστήματος τύπου III των ζωικών παθογόνων, καθώς και με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οργάνωση του μαστιγίου στα ευβακτήρια. Πρωτεΐνες, που δεν εμφανίζουν ομολογία, ενδεχομένως να έχουν ανάλογους ρόλους αλλά έχουν διαφοροποιηθεί στα διάφορα παθογόνα προκειμένου να εξυπηρετήσουν τις ειδικές απαιτήσεις που υπαγορεύονται από τον ξενιστή ή ακόμα και από διαφορετικές φυλές του παθογόνου.

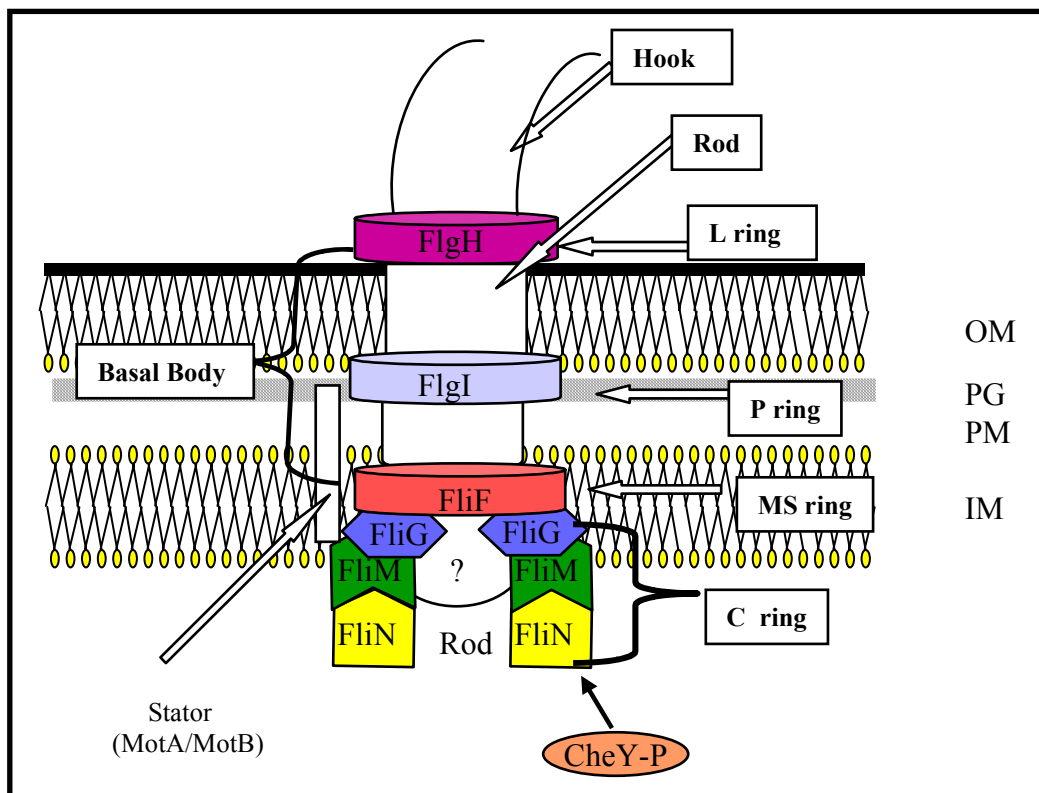
Παρόλο που το εκκριτικό σύστημα τύπου III στα ζωικά παθογόνα έχει μελετηθεί σε γενετικό και βιοχημικό επίπεδο λεπτομερώς, δεν έχει καθοριστεί πλήρως η αρχιτεκτονική οργάνωση της δομής του. Ομως, η βιοσύνθεση του μαστιγίου έχει μελετηθεί εκτενέστερα και έχουν καθοριστεί ποιές πρωτεΐνες συμμετέχουν στην οργάνωση του και με ποιό τρόπο οργανώνονται, για να σχηματίσουν την εκκριτική μηχανή, παρέχοντας έτσι σημαντικές πληροφορίες και ιδέες για το πώς ενδεχομένως οργανώνεται το εκκριτικό σύστημα τύπου III στα ζωικά παθογόνα και φυτικά παθογόνα. Ειδικότερα, ο βιοχημικός ρόλος των πρωτεϊνών Hrp, που συμμετέχουν στην οργάνωση του εκκριτικού συστήματος Hrp δεν είναι γνωστός, καθώς επίσης και ο τρόπος με τον οποίο οργανώνονται.

Στόχος λοιπόν της παρούσας μελέτης είναι να καθοριστούν αμοιβαίες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών Hrp/Hrc, προκειμένου να οργανωθεί η εκκριτική συσκευή στα φυτοπαθογόνα βακτήρια. Κρίθηκε σκόπιμο η μελέτη αυτή να ξεκινήσει έχοντας ως οδηγό το καλά μελετημένο σύστημα της οργάνωσης του μαστιγίου. Έτσι, από το σύνολο των πρωτεϊνών Hrp, των οποίων οι κωδικές περιοχές υποκλωνοποιήθηκαν και εκφράστηκαν επιτυχώς σε *E.coli*, επιλέχθηκαν αρχικά οι πρωτεΐνες HrcQa και HrcQb για δύο λόγους: 1) οι πρωτεΐνες αυτές κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, στα στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas syringae*, ενώ στα υπόλοιπα φυτοπαθογόνα τα δύο πολυπεπίδια κωδικοποιούνται ως μία ενιαία

πρωτεΐνη από ένα μόνο γονίδιο. Επομένως, θεωρείται πιθανότερη η ύπαρξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πολυπεπτιδίων, των οποίων τα ομόλογα τμήματα στα ενιαία πολυπεπτίδια είναι εξελικτικά συγγενή. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρωτεΐνη HrcQb εμφανίζει ομολογία με το καρβοξυτελικό τμήμα των ομολόγων πρωτεϊνών HrcQ από τα άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια, καθώς και με τις πρωτεΐνες, που ανήκουν στην οικογένεια YscQ (Εικ. 50). 2) Η HrcQb εμφανίζει ομολογία με την πρωτεΐνη FliN, που συμμετέχει στην οργάνωση του μαστιγίου και αποτελεί δομικό συστατικό του δακτυλίου C (267). Ο δακτύλιος αυτός είναι το πρώτο δομικό στοιχείο που σχηματίζεται κατά την οργάνωση του μαστιγίου, εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης των βακτηρίων και αποτελείται από τις πρωτεΐνες FliN, FliM και FliG (57). Αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών έχουν αναλυθεί εκτενώς με γενετικές, βιοχημικές μελέτες καθώς και με ηλεκτρονική μικροσκοπία (73, 74, 167, 181, 261). Η σειρά με την οποία αλληλεπιδρούν παρουσιάζεται στην Εικόνα 51. Αξίζει να σημειωθεί ότι η FliG, η οποία θεωρείται ότι λειτουργεί ως ένας σύνδεσμος μεταξύ του συμπλόκου, που σχηματίζεται από FliM και FliN, εμφανίζει μικρή ομοιότητα με την HrpQ από *P.syringae* (149), ενώ η FliM δεν έχει κάποιο γνωστό ομόλογο σε κανένα από τα γνωστά εκκριτικά συστήματα τύπου III. Στη βάση αυτών των ομοιοτήτων κρίθηκε σκόπιμο να ξεκινήσει η μελέτη της οργάνωσης του εκκριτικού συστήματος Hrp με τις πρωτεΐνες HrcQa και HrcQb.



Εικόνα 50. Σχηματική αναπαράσταση των ομολόγων περιοχών των πρωτεϊνών της οικογένειας YscQ και των δομικών πρωτεϊνών του μαστιγίου. Οι ομόλογες περιοχές παρουσιάζονται με το ίδιο χρώμα, ενώ οι γκρι περιοχές δεν έχουν ομολογία. Τα αμινοτελικά άκρα των πρωτεϊνών είναι στην αριστερή πλευρά (115).



Εικόνα 51. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του μαστιγίου και των δομικών πρωτεϊνών του (161). OM: Εξωτερική μεμβράνη, PG: στρώμα πεπτιδογλυκάνης, PM: περιπλασματικός χώρος, IM: εσωτερική μεμβράνη.

5.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.2.1 Δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών HrcQa και HrcQb

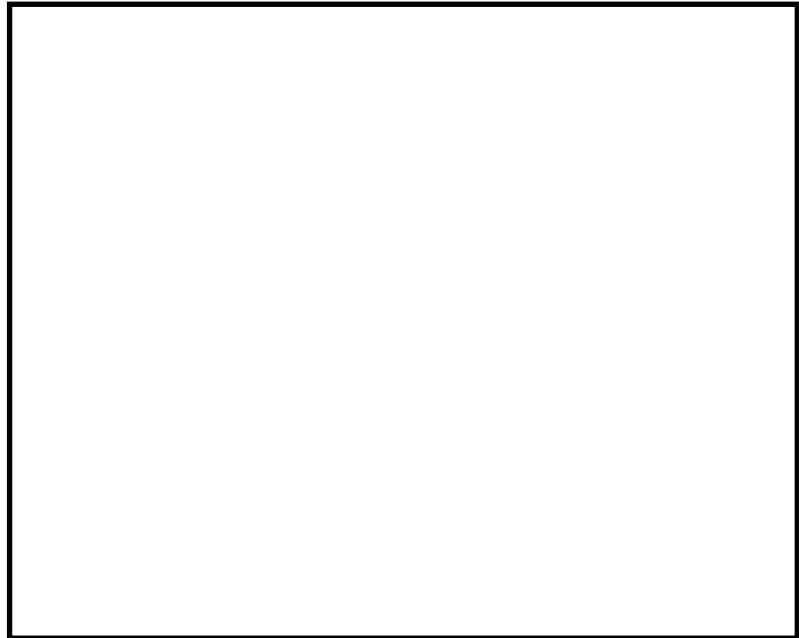
Οι πρωτεΐνες HrcQa και HrcQb, όπως αναφέρθηκε, κωδικοποιούνται από δύο γειτονικά γονίδια που βρίσκονται στο οπερόνιο *hrpU* της γονιδιακής ομάδας *hrp* της *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Στα φυτοπαθογόνα βακτήρια των γενών *Erwinia* και *Ralstonia*, οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν τμήματα μιας πρωτεΐνης, της HrcQ, που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο. Η πρωτεΐνη HrcQa είναι ομόλογη με το αμινοτελικό τμήμα των πρωτεϊνών HrcQ, ενώ η HrcQb αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό τμήμα τους. Οι πρωτεΐνες HrcQ εμφανίζουν ομολογία και με πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε εκκριτικά συστήματα τύπου III ζωικών βακτηριακών παθογόνων, καθώς και με τις πρωτεΐνες FliN (*E.coli*) και FliY (*B.subtilis*), οι οποίες συμμετέχουν στη δομή του μαστιγίου. Έτσι όλες αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ταξινομηθεί στην οικογένεια YscQ (115). Η ομολογία δεν είναι σε όλο το μήκος των πρωτεϊνών αλλά περιορίζεται στα 80 καρβοξυτελικά αμινοξέα τους, τα οποία στις φυλές του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* αποτελούν τμήμα της HrcQb. Αντίθετα η πρωτεΐνη HrcQa καθώς και το αμινοτελικό τμήμα των πρωτεϊνών HrcQ δεν εμφανίζει ομολογία με καμία πρωτεΐνη των ζωικών βακτηρίων που χρησιμοποιούν το εκκριτικό σύστημα τύπου III (Εικ. 50). Πιθανόν όμως να υπάρχει ένα λειτουργικό ανάλογο, το οποίο στη διάρκεια της εξέλιξης έχει διαφοροποιηθεί ώστε να καθορίζει μια λειτουργία ειδική στο κάθε είδος βακτηρίου (species-specific λειτουργία).

Όσον αφορά τη μεμβρανική τοπολογία των μελών της οικογένειας YscQ δεν είναι ξεκάθαρη. Παρόλο που η συνολική τους φύση είναι υδρόφιλη, τουλάχιστον μια υδρόφοβη περιοχή εντοπίζεται στο αμινοτελικό τμήμα τους (αμινοξέα 127-147). Μια παρόμοια διαμεμβρανική περιοχή προβλέπεται σε παρόμοια θέση στη SpaO από *Shigella* και *Salmonella*, στις πρωτεΐνες HrcQ και στην HrcQa από *P.syrinagae* spp. (Εικ. 53). Γι' αυτό το λόγο υιοθετείται, προς το παρόν, η εκδοχή ότι η HrcQa είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Επίσης, η υποκυτταρική θέση των πρωτεϊνών αυτών δεν είναι γνωστή σε όλες τις περιπτώσεις, αλλά τουλάχιστον σε μια περίπτωση, στη *Salmonella*, η SpaO έχει βρεθεί ότι εκκρίνεται (147). Η μεγάλη συντήρηση του καρβοξυτελικού τμήματος των μελών της οικογένειας YscQ, μαζί με την ποικιλομορφία των αμινοτελικών άκρων, δηλώνει ότι αυτές οι πρωτεΐνες συνιστούν ένα σύνδεσμο ανάμεσα στα συντηρημένα και τα εξειδικευμένα συστατικά των εκκριτικών συστημάτων τύπου III.

1	MSALRLRKVD	ALLAQATREL	GAGQSLGFSA	AGQDAELTLL
41	QRLSPTV <u>ARL</u>	<u>LAPVEPLHNK</u>	<u>PQAPTLGCRV</u>	QIRRGGEQLH
81	PLLADAGEPA	GAVWLSTAIG	PLLLSDAEAL	LSLLGDIPLT
121	LGGEQQAWYW	QLFNAHMHAT	PDTLLRLLRS	ASWQARTRTV
161	DESWSVASPL	IIGEMSLTRE	QIASLRPGDV	VLPAHCQFDS
201	AGQGFLSLAG	RQWAAQTDQH	AQRLFLRLSH	EEHRHHEY

Εικόνα 52. Πρωτοταγής δομής της πρωτεΐνης HrcQa. Η περιοχή η οποία προβλέπεται να είναι υδρόφοβη έχει υπογραμμιστεί.

Εικόνα 53. Διάγραμμα υδροφοβικότητας/υδροφιλικότητας της πρωτεΐνης HrcQa, όπως προέκυψε από ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας με το πρόγραμμα Tmpred.



1	MSTEDLYQED	VEMLDDYEDP	STEQHWSEED	GEPSGYATAE
41	PDDHAAQEEQ	DEPPAL <u>DSLA</u>	<u>LDLTLRCGEL</u>	<u>RLTLAELRRL</u>
81	DAGTILEVTG	ISPGHATLCH	GEQVVAEGEL	VDVEGRLGLQ
121	ITRLVTRS			

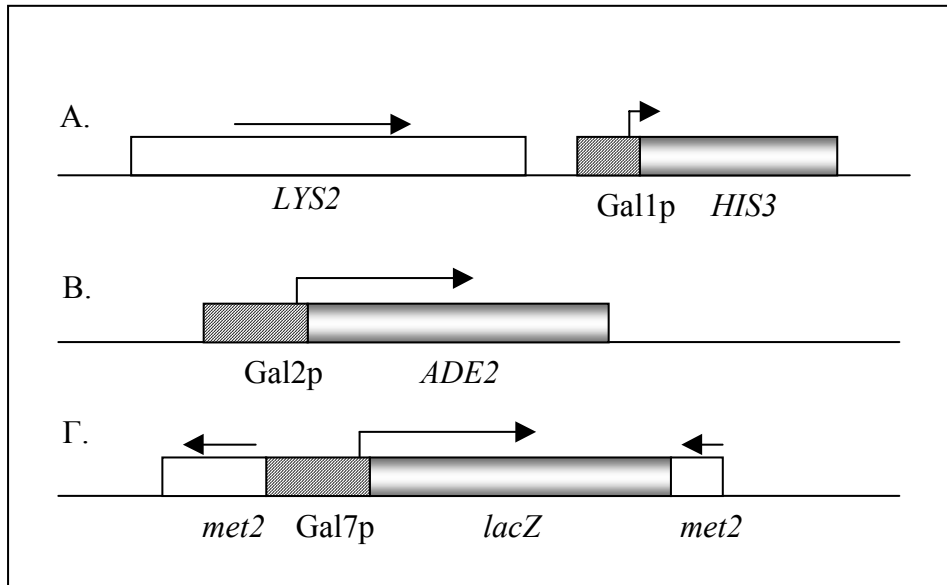
Εικόνα 54. Πρωτοταγής δομής της πρωτεΐνης HrcQb. Το μοτίβο “φερμουάρ λευκίνης” (leucine zipper) σημειώνεται με υπογράμμιση.




5.2.2 In vivo αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών HrcQa και HrcQb με το σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης

Προκειμένου να εξεταστεί αν οι πρωτεΐνες HrcQa και HrcQb αλληλεπιδρούν χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης. Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος ζύμης PJ69-4A, το οποίο περιέχει τρία διαφορετικά γονίδια επιλογής (*ade*, *his*, *lacZ*), κάθε ένα από τα οποία εκφράζεται από διαφορετικό υποκινητή (Εικ. 55), ελαττώνοντας έτσι την πιθανότητα των ψευδοθετικών μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης. Επιπλέον, το στέλεχος αυτό έχει το αγρίου-τύπου γονίδιο *ADE2*, η έκφραση του οποίου οδηγεί στην εμφάνιση αποικιών που έχουν άσπρο χρώμα, ενώ η μη έκφραση του δίνει στις αποικίες κόκκινο χρώμα. Το γονίδιο *ADE2* μεταγράφεται μόνο μετά από ανασύσταση της ενεργότητας του μεταγραφικού παράγοντα Gal4, λόγω αλληλεπίδρασης των συντηγμένων πρωτεϊνών, ο οποίος δεσμεύεται στον υποκινητή Gal2. Έτσι η ανάπτυξη των κυττάρων σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει αδενίνη δίνει τη δυνατότητα να διαπιστωθεί η ύπαρξη θετικής ή αρνητικής αλληλεπίδρασης από το χρώμα των αποικιών: άσπρο (θετική αλληλεπίδραση), κόκκινο (αρνητική αλληλεπίδραση).

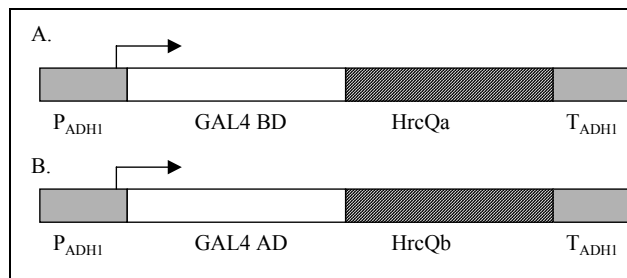
Επίσης η επιλογή των φορέων, στους οποίους υποκλωνοποιήθηκαν τα γονίδια *hrcQa* και *hrcQb*, δεν ήταν τυχαία. Δεδομένου ότι η HrcQb περιέχει ένα μοτίβο “φερμουάρ λευκίνης” (leucine zipper), κρίθηκε σκόπιμο να συντηχθεί με την περιοχή του Gal4 που ευθύνεται για τη μεταγραφική ενεργοποίηση (Gal4-activation domain), για να αποφευχθεί μια πιθανή αυτο-ενεργοποίηση. Έτσι το γονίδιο *hrcQa* συντήχθηκε στο ίδιο εκφραστικό πλαίσιο ανάγνωσης με την αμινοτελική περιοχή του Gal4 που περιέχει το τμήμα που δεσμεύεται στο DNA (DNA binding domain), στο φορέα έκφρασης pAS2-1. Το γονίδιο της HrcQb συντήχθηκε στο ίδιο εκφραστικό πλαίσιο ανάγνωσης με την αμινοτελική περιοχή του Gal4, που περιέχει το τμήμα που απαιτείται για ενεργοποίηση της μεταγραφής (Gal4-activation domain), στο φορέα έκφρασης pACT2 (Εικ. 56).

Οι κατασκευές εισήχθηκαν ταυτόχρονα, στο στέλεχος που προαναφέρθηκε, και η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης έγινε σε πλήρες ελάχιστο



Εικόνα 55. Γενετική δομή στα γονίδια αναφοράς του στελέχους της ζύμης PJ69-4A. Οι Gal4 επαγόμενοι υποκινητές υποδεικνύονται με , τα γονίδια αναφοράς με , και οι γειτονικές κωδικοποιούσες περιοχές με .

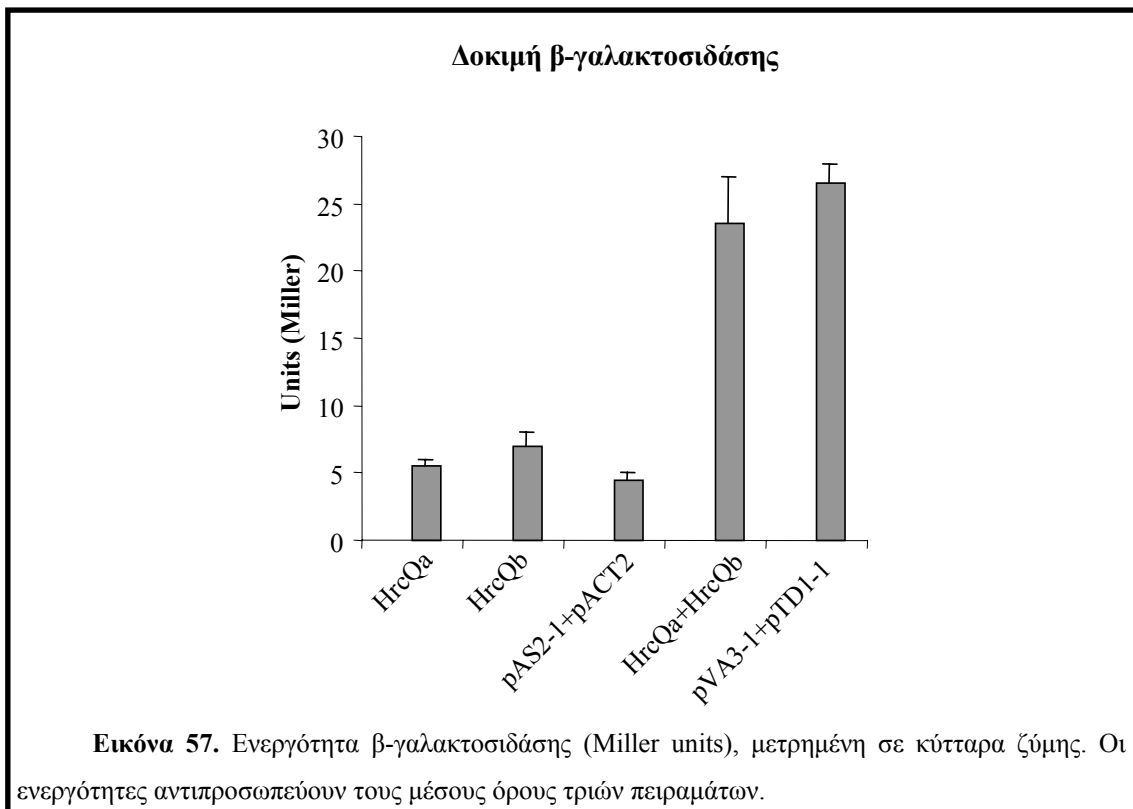
A) Η δομή του γονιδίου αναφοράς *LYS2::GAL1-HIS3*. B) Η δομή του γονιδίου αναφοράς *GAL2-ADE2*. Γ) Η δομή του γονιδίου αναφοράς *met2::GAL7-lacZ*.

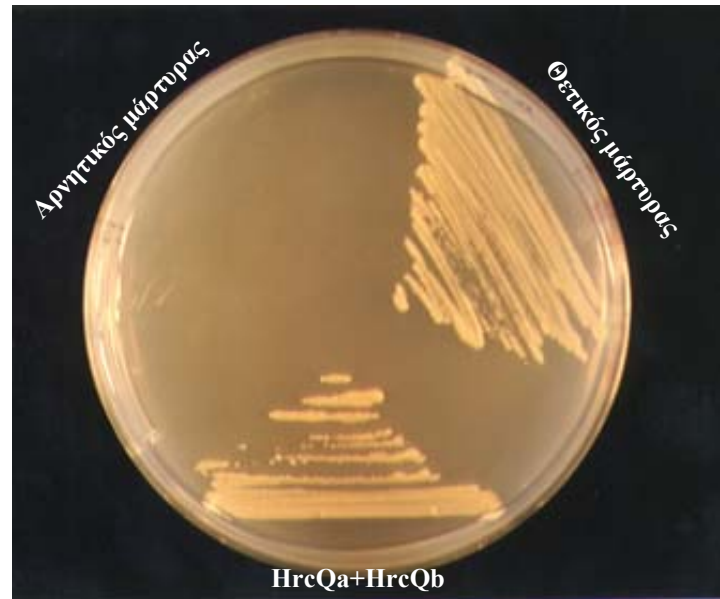


Εικόνα 56. Σχηματική παρουσίαση των πλασμιδιακών κατασκευών, που χρησιμοποιήθηκαν στο σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης. *GAL4 BD*: κωδική περιοχή του Gal4, που κωδικοποιεί το τμήμα του μεταγραφικού παράγοντα που απαιτείται για δέσμευση στο DNA. *GAL4 AD*: κωδική περιοχή του Gal4, που κωδικοποιεί το τμήμα του μεταγραφικού παράγοντα που απαιτείται για ενεργοποίηση της μεταγραφής. *P_{ADHI}*: Υποκινητής του γονιδίου της αλκοολικής αφυδρογονάσης. *T_{ADHI}*: Αλληλουχία τερματισμού από το γονίδιο της αλκοολικής αφυδρογονάσης.

θρεπτικό μέσο (CM: complete minimal medium) που δεν περιείχε τα αμινοξέα λευκίνη και τρυπτοφάνη. Αρχικά ελέγχθηκε αν η εισαγωγή μόνο της μιας ή της άλλης κατασκευής ενεργοποιούσε τα γονίδια αναφοράς, αλλά δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η ικανότητα των μετασχηματισμένων κυττάρων να αναπτύσσονται σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο, που δεν περιείχε λευκίνη, τρυπτοφάνη, αδενίνη και ιστιδίνη, για να διαπιστωθεί αν οι χμιαϊκές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν.

Όπως φαίνεται στην Εικ.58, τα μετασχηματισμένα κύτταρα ζύμης που εκφράζουν τις χμιαϊκές πρωτεΐνες GAL4-HrcQa και GAL4-HrcQb αναπτύσσονται απουσία αδενίνης και ιστιδίνης και έχουν λευκό χρώμα, όπως και ο θετικός μάρτυρας. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι οι χμιαϊκές πρωτεΐνες GAL4-HrcQa και GAL4-HrcQb αλληλεπιδρούν. Προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η ένταση της αλληλεπίδρασης πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης σ' αυτά τα κύτταρα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 57, το επίπεδο έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων ζύμης, που περιέχουν αυτές τις συντήξεις, είναι αρκετά υψηλό σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες. Έτσι από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι οι πρωτεΐνες HrcQa και HrcQb αλληλεπιδρούν *in vivo*.





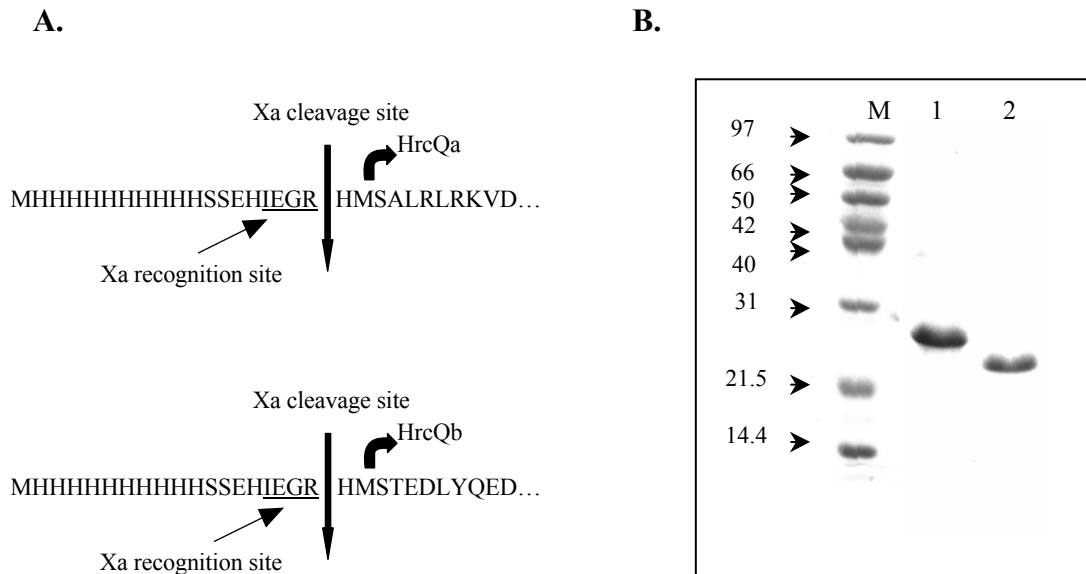
Εικόνα 58. Αλληλεπίδραση HrcQa και HrcQb. Κύτταρα ζύμης pJ69-4A, που περιείχαν τις πλασμιδιακές κατασκευές pAS2-1/HrcQa και pACT2/HrcQb αναπτύχθηκαν σε πλήρες ελάχιστο θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε λευκίνη, τρυπτοφάνη, αδερίνη και ιστιδίνη. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30°C για 3 μέρες. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του ίδιου στελέχους που περιείχαν τα πλασμίδια pVA3-1 και pTD1-1, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας κύτταρα, του ίδιου στελέχους, με τα πλασμίδια pAS2-1 και pACT2.

5.2.3 Έκφραση και καθαρισμός των πρωτεϊνών HrcQa και HrcQb

Αν και το σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης είναι μια καλή μέθοδος για τον έλεγχο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων, είναι σημαντικό να ελεγχθούν τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων με μια ανεξάρτητη μέθοδο. Επιπλέον είναι πιθανό, η παρατήρηση μιας θετικής αλληλεπίδρασης να προκύπτει από ανασύσταση της ενεργότητας του Gal4, λόγω έμμεσης αλληλεπίδρασης των HrcQa και HrcQb, μέσω γεφύρωσης ενός ή περισσότερων ενδογενών παραγόντων. Έτσι, εφαρμόστηκε μια *in vitro* τεχνική για να ελεγχθεί η άμεση αλληλεπίδραση HrcQa -HrcQb .

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν αυτές οι μελέτες, κλωνοποιήθηκαν τα γονίδια *hrcQa* και *hrcQb* στο φορέα έκφρασης της *E.coli* pET16b, ο οποίος παρέχει τη δυνατότητα σύντηξης μιας μικρής αλληλουχίας 6 ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο των υπό κλωνοποίηση πρωτεϊνών. Έτσι διευκολύνεται ο καθαρισμός των πρωτεϊνών με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη που περιέχει ιόντα νικελίου. Επιπλέον, ο έλεγχος της έκφρασης γίνεται από την υποκινητή T7, επιτρέποντας έτσι την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων πρωτεϊνών από το στέλεχος της *E.coli* BL21(DE3)pLysS, το οποίο εκφράζει την T7 πολυμεράση. Τέλος, παρέχεται η δυνατότητα απομάκρυνσης της αλληλουχίας των 6 ιστιδινών με πέψη της πρωτεΐνης με τον παράγοντα Xa, σε περίπτωση που η αλληλουχία αυτή επηρεάζει τη δράση ή τη διαμόρφωση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης. Στην Εικόνα 59A παρουσιάζονται οι κατασκευές, που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση αυτή.

Οι πρωτεΐνες HrcQa και HrcQb υπερπαραράχθηκαν στο στέλεχος *E.coli* BL21(DE3)pLysS μετά από επαγωγή με 1 mM IPTG, για 1h στους 30°C και καθαρίστηκαν από στήλη ιόντων νικελίου (Εικ. 59B). Ειδικότερα, η πρωτεΐνη HrcQa καθαρίστηκε κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Qiagen, και η έκλουση της έγινε με 300 mM ιμιδαζόλιο. Αντίθετα, η HrcQb καθαρίστηκε κάτω από μη-αποδιατακτικές συνθήκες και εκλούστηκε από τη στήλη με 150 mM ιμιδαζόλιο.



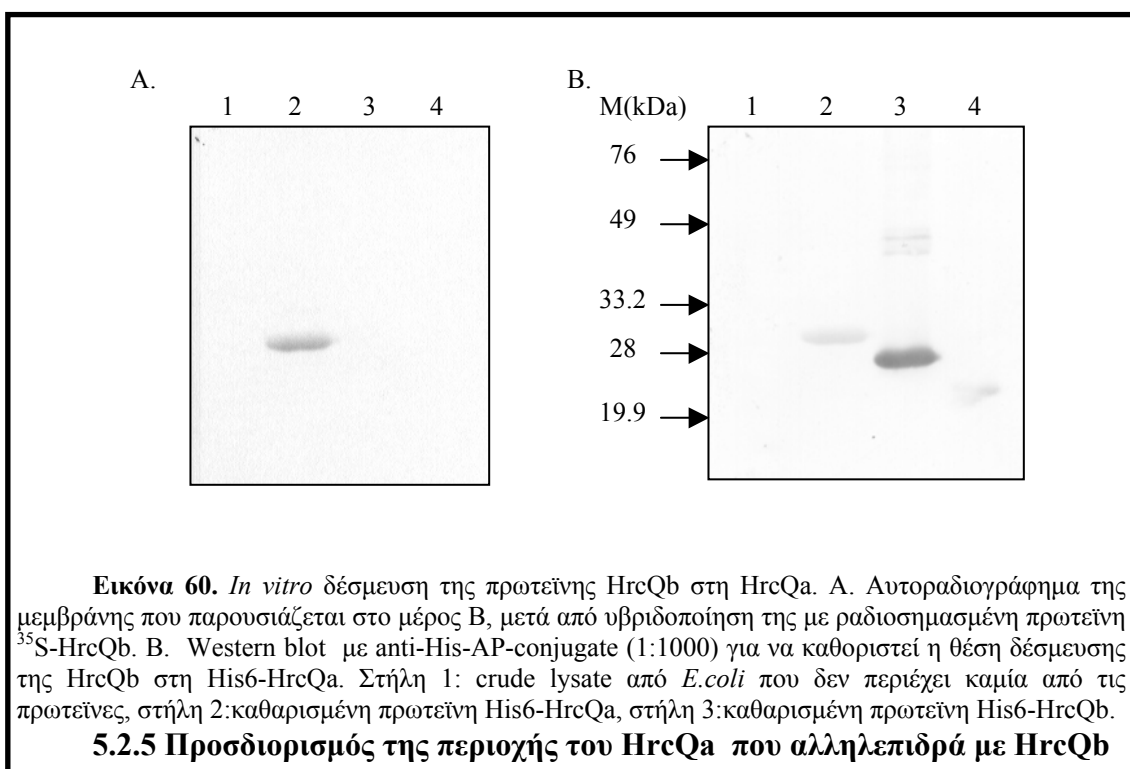
Εικόνα 59. Καθαρισμός των His6-HrcQa και His6-HrcQb πρωτεϊνών. Α. Πρωτοταγής δομή των αμινοτελικών καταλοίπων στις πρωτεΐνες His6-HrcQa και His6-HrcQb. Η αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το Παράγοντα Χα είναι υπογραμμισμένη και η θέση κοπής σημειώνεται με βέλος. Β. Ανάλυση των καθαρισμένων πρωτεϊνών His6-HrcQa και His6-HrcQb, μετά από χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη ιόντων νικελίου, σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (12%) βαμμένο με Coomassie Brilliant Blue. Στήλη 1: HrcQa, Στήλη 2: HrcQb. Στα αριστερά σημειώνονται οι δείκτες μοριακής μάζας σε kDa.

5.2.4 *In vitro* μελέτη της δέσμευσης των πρωτεϊνών HrcQa και HrcQb

Για να ελεγχθεί αν η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών HrcQa και HrcQb πραγματοποιείται μέσω φυσικής επαφής των μορίων τους, εφαρμόστηκε η τεχνική Far Western. Η επιλογή της τεχνικής αυτής ως μέθοδο για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων βασίστηκε σε τέσσερις λόγους: 1) παρέχει άμεση απόδειξη της αλληλεπίδρασης, γιατί η παρατήρηση ενός ειδικού, θετικού σήματος είναι αξιόπιστη απόδειξη μιας αλληλεπίδρασης, η απουσία όμως ενός σήματος δε δηλώνει απαραίτητα ότι οι δύο πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν. 2) Επιτρέπει αξιόπιστη σύγκριση μεγάλων αριθμών δειγμάτων. 3) Απαιτεί καθαρισμό μίας μόνο πρωτεΐνης, οπότε αντιμετωπίζονται περιπτώσεις στις οποίες η μία από τις δύο πρωτεΐνες δεν εκφράζεται επαρκώς ή δεν υπάρχει καθαρισμένη μορφή και 4) σε αντίθεση με το σύστημα των δύο υβριδίων μπορούν να ελεγχθούν περισσότερες των δύο πρωτεϊνών σε μια αλληλεπίδραση. Επιπλέον δεν υπεισέρχεται η πιθανότητα οι δύο πρωτεΐνες να

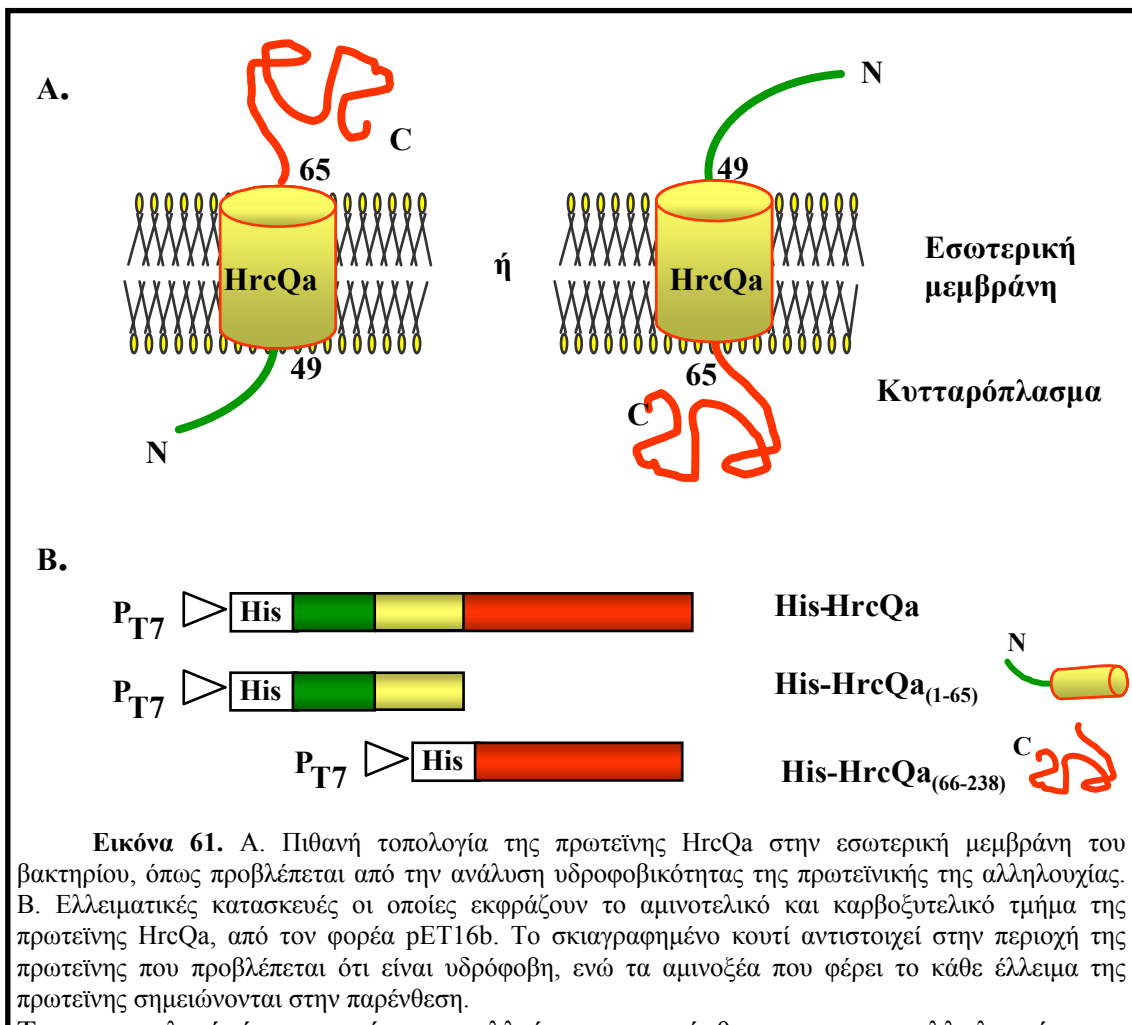
αλληλεπιδρούν λόγω ανασύστασης της ενεργότητας του μεταγραφικού παράγοντα από ενδογενείς παράγοντες στη ζύμη.

Η τεχνική Far Western απαιτεί την ανάλυση των πρωτεϊνών σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή PVDF και υβριδοποίηση της μεμβράνης με ραδιενεργά σημασμένη πρωτεΐνη (π.χ. ^{35}S -Met). Στη συνέχεια, η μεμβράνη εκτείνεται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας και μετά την εμφάνιση του φιλμ η μεμβράνη υπόκειται σε ανάλυση Western με κατάλληλο αντίσωμα, ώστε να επιβεβαιωθεί αν το σήμα, που ανιχνεύεται, αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Με αυτή λοιπόν τη διαδικασία, αναλύθηκαν οι πρωτεΐνες HrcQa, HrcQb και HrpP σε 14% αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF, η οποία υβριδοποιήθηκε με ραδιοσημασμένη πρωτεΐνη ^{35}S -HrcQb (Εικ. 60A). Η υβριδοποιημένη μεμβράνη, μετά την αυτοραδιογραφία, χρησιμοποιήθηκε για western με anti-His-AP-conjugate σε αραιώση 1:1000 για να καθοριστεί η θέση των ζωνών, που δεσμεύονται στην HrcQb. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 60B, η πρωτεΐνη HrcQb δεσμεύεται μόνο στην HrcQa και όχι στις HrpP ή στον εαυτό της, παρά το γεγονός ότι η HrcQb περιέχει ένα μοτίβο “φερμουάρ λευκίνης”, το οποίο όπως είναι γνωστό συμμετέχει στο σχηματισμό ομοδιμερών ή ετεροδιμερών.



Ανάλυση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των HrcQa και HrcQb με το πρόγραμμα TMpred (Transmembrane prediction), το οποίο παρέχει πληροφορία για την παρουσία υδρόφοβων περιοχών στο μόριο μιας πρωτεΐνης, έδειξε ότι η HrcQa εμφανίζει μια υδρόφοβη περιοχή μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων 49 και 65, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη HrcQa δεσμεύεται στη μεμβράνη. Όμως, δεν καθορίζεται η μεμβρανική τοπολογία της πρωτεΐνης στη μεμβράνη, δηλαδή αν το αμινοτελικό ή το καρβοξυτελικό άκρο της εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Αντίθετα, με την HrcQa, η HrcQb δεν παρουσιάζει καμιά υδρόφοβη περιοχή και έτσι αναμένεται να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα.

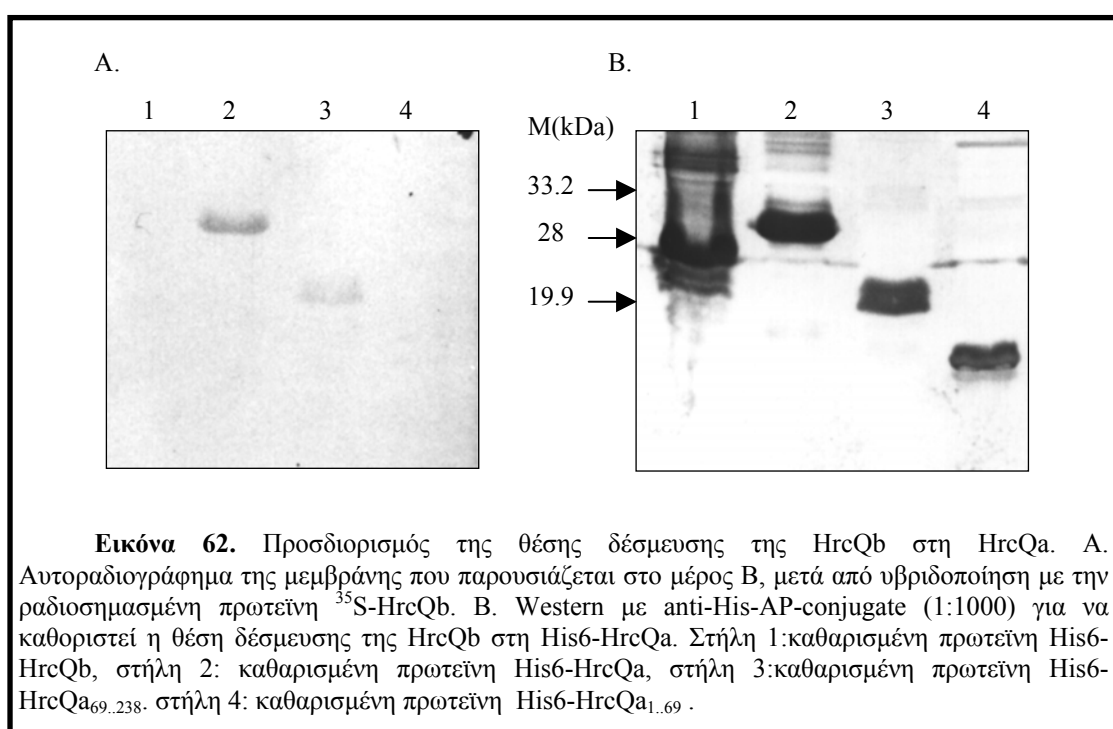
Προκειμένου να εξεταστεί ποιο μέρος της πρωτεΐνης HrcQa αλληλεπιδρά με την HrcQb, διευκρινίζοντας έτσι και την τοπολογία της HrcQa στη μεμβράνη, κατασκευάστηκαν δύο ελλείψεις. Η μία περιείχε το αμινοτελικό άκρο της HrcQa (1..65 αα) και η άλλη περιείχε το καρβοξυτελικό άκρο της (65-238 αα).



Εικόνα 61. Α. Πιθανή τοπολογία της πρωτεΐνης HrcQa στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηρίου, όπως προβλέπεται από την ανάλυση υδροφοβικότητας της πρωτεϊνικής της αλληλουχίας. Β. Ελλειμματικές κατασκευές οι οποίες εκφράζουν το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό τμήμα της πρωτεΐνης HrcQa, από τον φορέα pET16b. Το σκιαγραφημένο κουτί αντιστοιχεί στην περιοχή της πρωτεΐνης που προβλέπεται ότι είναι υδρόφοβη, ενώ τα αμινοξέα που φέρει το κάθε έλλειμμα της πρωτεΐνης σημειώνονται στην παρένθεση.

Τα αμινοτελικά άκρα αυτών των ελλείψεων συντήχθηκαν με την αλληλουχία των ιστοτιδινών (His tag) στο φορέα έκφρασης pET16b (Εικ. 61). Στη συνέχεια έγινε

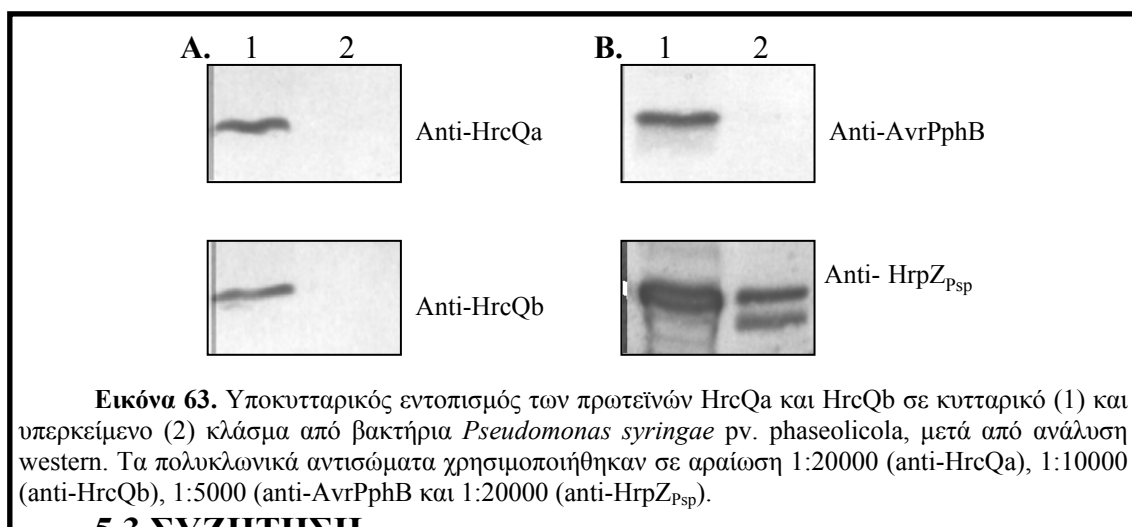
υπερέκφραση των ελλειμμάτων στο στέλεχος *E.coli* BL21(DE3)pLysS και καθαρίστηκαν με κολώνα νικελίου, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (17%) και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω στην τεχνική Far western. Στην Εικόνα 62A παρουσιάζεται το αυτοραδιογράφημα της μεμβράνης του μέρους B, μετά από υβριδοποίηση με ραδιοσημασμένη πρωτεΐνη ^{35}S -HrcQb, ενώ στην Εικόνα 62B παρουσιάζεται η μεμβράνη μετά από western με anti-His-AP-conjugate. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 62A, η πρωτεΐνη HrcQb δεσμεύεται μόνο στο καρβοξυτελικό τμήμα της HrcQa και όχι στο αμινοτελικό τμήμα της.



Ετσι τα αποτελέσματα αυτά δεν καθορίζουν μόνο την περιοχή της HrcQa, που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HrcQb, αλλά επιπλέον καθορίζεται και η τοπολογία της πρωτεΐνης HrcQa στη μεμβράνη. Επειδή η HrcQb είναι κυτοπλασμική πρωτεΐνη-βασισμένοι στο διάγραμμα υδροφοβικότητας/υδροφιλικότητας- και αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό μέρος της HrcQa, τότε η τελευταία θα πρέπει να είναι τοποθετημένη στη μεμβράνη με τέτοιο τρόπο ώστε το καρβοξυτελικό άκρο της να εκτείνεται στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα.

5.2.6 Καθορισμός της μεμβρανικής τοπολογίας των πρωτεϊνών HrcQa και HrcQb στην *P.syringae* pv. *phaseolicola*

Προκειμένου να προσδιοριστεί η *in vivo* υποκυτταρική θέση των πρωτεϊνών HrcQa και HrcQb της *P.syringae* pv. *phaseolicola*, παρασκευάστηκαν πολυκλωνικά αντισώματα ενάντια στις πρωτεΐνες αυτές. Οι πρωτεΐνες εκφράστηκαν σε *E.coli* και καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη ιόντων νικελίου. Για να εξεταστεί αν οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται στο κυτταρικό κλάσμα ή στο υπερκείμενο της καλλιέργειας, τα βακτήρια αναπτύχθηκαν αρχικά σε πλούσιο θρεπτικό μέσο LB, συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και επανααιωρήθηκαν σε $OD_{600}=0.8$ σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο Hrp, ώστε να γίνει, επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *hrp*. Μετά από 18 h επώαση στους 30°C η καλλιέργεια διαχωρίστηκε με φυγοκέντρηση σε δύο κλάσματα: υπερκείμενο (S) και κυτταρικό κλάσμα (C). Το υπερκείμενο διηθήθηκε μέσω φίλτρου 0.2μm και συμπυκνώθηκε 50 φορές με Centriprep (cut-off 10 kDa). Οι πρωτεΐνες και των δύο κλασμάτων αναλύθηκαν σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (14%) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη PVDF για ανάλυση western με τα κατάλληλα αντισώματα. Ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας για το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκαν τα πολυκλωνικά αντισώματα anti-HrpZ_{Psp} και anti-AvrPphB αντίστοιχα. Όπως φαίνεται από την Εικόνα 63, και οι δύο πρωτεΐνες εντοπίζονται στο κυτταρικό κλάσμα ενώ δεν ανιχνεύονται στο υπερκείμενο των βακτηρίων, γεγονός που επιβεβαιώνει τη θεώρηση ότι η HrcQb είναι κυτοπλασμική πρωτεΐνη και όχι εκκρινόμενη, όπως συμβαίνει με άλλα μέλη της οικογένειας YscQ στην οποία ανήκει.



5.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

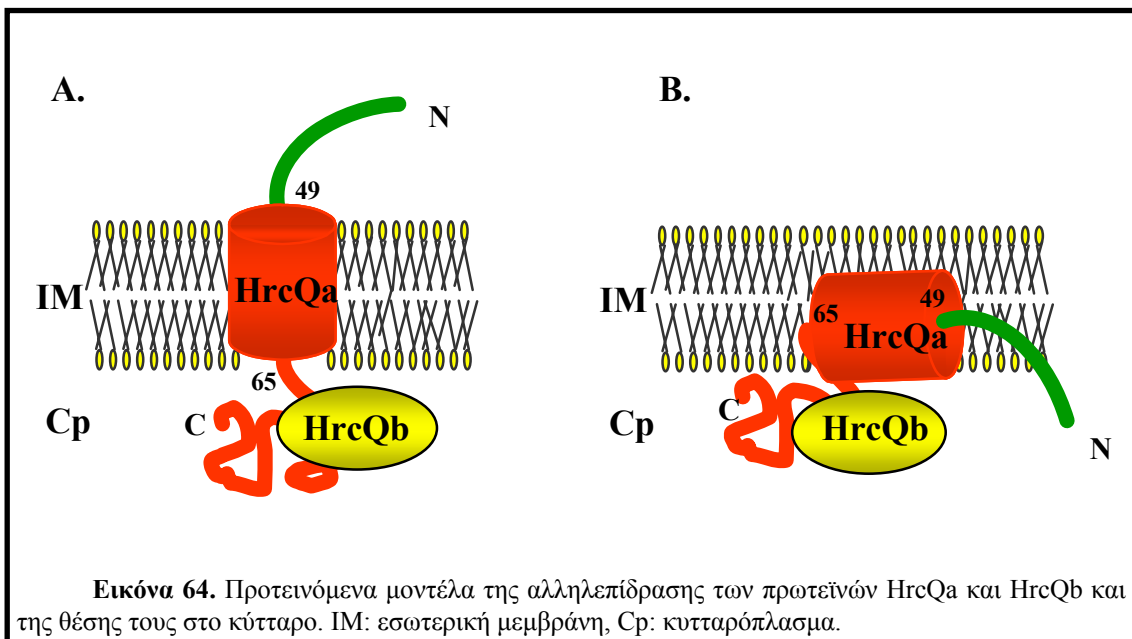
Στην παρούσα μελέτη δείχτηκε ότι η βακτηριακή πρωτεΐνη HrcQa αλληλεπιδρά *in vitro* και *in vivo* με τη βακτηριακή πρωτεΐνη HrcQb και επιπλέον η

αλληλεπίδραση πραγματοποιείται μέσω του καρβοξυτελικού τμήματος της HrcQa. Το αποτέλεσμα αυτό παρέχει επιπλέον πληροφορία για τη μεμβρανική τοπολογία της HrcQa. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η HrcQa τοποθετείται με τέτοιο τρόπο στην μεμβράνη ώστε το καρβοξυτελικό άκρο της να εκτείνεται στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα, ενώ η HrcQb φαίνεται να είναι εξ' ολοκλήρου κυτοπλασμική. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα προτείνουμε δύο πιθανά μοντέλα για την τοπολογία της πρωτεΐνης HrcQa στην εσωτερική μεμβράνη των βακτηρίων (Εικ. 64). Σύμφωνα με το ένα μοντέλο η πρωτεΐνη HrcQa διασχίζει την εσωτερική μεμβράνη έτσι ώστε το αμινοτελικό άκρο της να εκτίθεται στο περίπλασμα, ενώ το καρβοξυτελικό εκτίθεται στο κυτταρόπλασμα για να είναι εφικτή η αλληλεπίδραση της με την HrcQb. Στο δεύτερο μοντέλο η πρωτεΐνη HrcQa συνδέεται περιφερειακά με την εσωτερική μεμβράνη, οπότε τόσο το αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό άκρο της εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα θα μπορούσαν να παραλληλιστούν με τα δεδομένα που υπάρχουν για τις αντίστοιχες ομόλογες πρωτεΐνες του μαστιγίου: FliN (*E.coli*) και FliY (*B.subtilis*). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι γνωστό ότι συμμετέχουν στην οργάνωση μιας δομής, που ονομάζεται δακτύλιος C και ο οποίος εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική πλευρά της εσωτερικής μεμβράνης των βακτηρίων. Άλλες δύο πρωτεΐνες αποτελούν δομικά συστατικά του δακτυλίου C : η FliM και η FliG. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών έχουν αναλυθεί εκτενώς με γενετικές και βιοχημικές μελέτες καθώς και με ηλεκτρονική μικροσκοπία (73, 74, 167, 181, 261). Έχει καταδειχτεί ότι η FliN, τα 60 καρβοξυτελικά αμινοξέα της οποίας εμφανίζουν ομολογία με την HrcQb, αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο της FliM, ενώ μια κεντρική περιοχή της αλληλεπιδρά με την FliG (236). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η FliG, η οποία θεωρείται ότι λειτουργεί ως ένας σύνδεσμος μεταξύ του συμπλόκου, που σχηματίζεται από FliM και FliN, εμφανίζει μια μικρή ομοιότητα με την HcrQ από *P.syringae* (149), ενώ η FliM δεν έχει κάποιο εμφανές ομόλογο σε κανένα από τα γνωστά εκκριτικά συστήματα τύπου III .

Μια ιδιόμορφη περίπτωση είναι η πρωτεΐνη FliY από το βακτήριο *B.subtilis*, η οποία στο καρβοξυτελικό ένα τρίτο της εμφανίζει ομολογία με τη FliN, ενώ το αμινοτελικό ένα τρίτο της είναι ομόλογο με τη FliM (28). Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η πρωτεΐνη FliN είναι πολύ μικρότερη από τις πρωτεΐνες της οικογένειας YscQ, έχουν οδηγήσει στην άποψη ότι ο ρόλος που

κατέχει η FliM στην έξοδο πρωτεϊνών του μαστιγίου θα μπορούσε ίσως να αντικατασταθεί από τα αμινοτελικά τμήματα της YscQ και των ομολόγων της στα εκκριτικά συστήματα τύπου III. Με άλλα λόγια η HrcQa πιθανόν να αποτελεί το λειτουργικό ανάλογο της FliM και ενδέχεται να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη HrcQ, η οποία εμφανίζει μικρή ομολογία με την FliG. Ετσι, αν η ομολογία των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην δόμηση των εκκριτικών συστημάτων τύπου III και του μαστιγίου αντανακλά και παρόμοιο τρόπο οργάνωσης τότε η μελέτη του εκκριτικού συστήματος Hrp διευκολύνεται σημαντικά. Αυτό σημαίνει ότι ο έλεγχος των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μπορεί να εστιαστεί σε συγκεκριμένα ζευγάρια πρωτεϊνών, χωρίς βέβαια να παραβλέπεται η σημασία των μη συντηρημένων πρωτεϊνών, γιατί σ' αυτές οφείλεται η διαφοροποίηση του κάθε εκκριτικού συστήματος.



ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής κατέληξαν στα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Η πρωτεΐνη HrpZ (χαρπίνης), του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, είναι ικανή να επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας όταν εκφράζεται μόνο σε εκκρινόμενη μορφή στα φυτικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ο στόχος της πρωτεΐνης στο φυτικό κύτταρο είναι πιθανότατα εξωκυτταρικός. Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί με εκείνα άλλων ερευνητών οι οποίοι χρησιμοποίησαν άλλες πειραματικές προσεγγίσεις (16, 110).
2. Η πρωτεΐνη AvtPphB, όπως και άλλες πρωτεΐνες Avt, εκδηλώνει θνησιγόνο δράση, όταν εκφράζεται στα φυτικά κύτταρα. Ομως, σε αντίθεση με τη χαρπίνη η δράση της εκδηλώνεται μέσα στο φυτικό κυτταρόπλασμα. Επομένως ο υποθετικός υποδοχέας, με τον οποίο αλληλεπιδρά η πρωτεΐνη αυτή, είναι ενδοκυτταρικός.
3. Η μεταφορά πρωτεϊνών Avt από το βακτήριο μέσα στα φυτικά κύτταρα δεν φαίνεται να απαιτεί φυσική επαφή με τη χαρπίνη. Πιθανώς ένας τρίτος άγνωστος παράγοντας, να λειτουργεί ως σύνδεσμος μεταξύ των δύο πρωτεϊνών ή η χαρπίνη να διευκολύνει κάποιο άλλο στάδιο της διαδικασίας έκκρισης ή στόχευσης. Ένα ενδεχόμενο είναι ότι η χαρπίνη συμβάλλει στη χαλάρωση του κυτταρικού τοιχώματος, διευκολύνοντας τη διάτρηση του ή τη διάβαση του αγωγού Hrp μέσα από το δομικό πλέγμα του κυτταρικού τοιχώματος.
4. Η εμφάνιση μίας μικρότερου μοριακού βάρους μορφής της χαρπίνης διαπιστώθηκε σε βακτηριακά και φυτικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, όπως και σε ευκαρυωτικό *in vitro* σύστημα μετάφρασης. Σε εκχυλίσματα *E.coli*, η μορφή αυτή είναι αμινοτελικά ακρωτηριασμένη, με πρώτο αμινοξικό κατάλοιπο την L₁₈ και φαίνεται να είναι προϊόν μετα-μεταφραστικής πρωτεόλυσης. Στο ευκαρυωτικό *in vitro* σύστημα μετάφρασης είναι προϊόν εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης από ένα εσωτερικό εναρκτήριο κωδικόνιο AUG₁₆, του γονιδίου της. Το ενδεχόμενο η προέλευση της μικρότερης μορφής να είναι διαφορετική στα δύο συστήματα έκφρασης δεν μπορεί ακόμα να αποκλειστεί.

5. Οι δομικές πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III, HrcQa και HrcQb αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και η αλληλεπίδραση αυτή πραγματοποιείται μέσω του καρβοξυτελικού τμήματος της HrcQa.
6. Οι πρωτεΐνες HrcQa και HrcQb εντοπίζονται στο κυτταρικό κλάσμα των βακτηρίων και δεν συνιστούν εκκρινόμενα συστατικά. Το αποτέλεσμα αυτό, σε συνδυασμό τόσο με το προηγούμενο όσο και με την παρουσία μιας υδρόφοβης περιοχής στην αμινοτελική περιοχή της HrcQa, οδήγησε στην πρόταση δύο πιθανών μοντέλων για την τοπολογία της πρωτεΐνης HrcQa στην εσωτερική βακτηριακή μεμβράνη. Σύμφωνα με το ένα μοντέλο, η πρωτεΐνη HrcQa διασχίζει την εσωτερική μεμβράνη, έτσι ώστε το αμινοτελικό άκρο της να εκτίθεται στο περίπλασμα, ενώ το καρβοξυτελικό εκτίθεται στο κυτταρόπλασμα για να είναι εφικτή η αλληλεπίδραση της με την HrcQb. Στο δεύτερο μοντέλο, η πρωτεΐνη HrcQa συνδέεται περιφερειακά με την εσωτερική μεμβράνη, οπότε τόσο το αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό άκρο της εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η παρούσα διατριβή διευκολύνει την περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού δράσης της πρωτεΐνης HrpZ στην αντίδραση υπερευαισθησίας των φυτών, σε παθογόνα βακτήρια, εστιάζοντας την προσπάθεια για την ταυτοποίηση του υποδοχέα της στα εξωκυτάρια συστατικά των φυτικών κυττάρων.

Ο μηχανισμός προέλευσης της μικρότερου μοριακού βάρους μορφής της χαρπίνης καθώς και ο βιολογικός της ρόλος απαιτεί περαιτέρω διελεύκανση. Για το σκοπό αυτό θα πρέπει να γίνει μεταλλαξιγένεση τόσο της πρώτης μεθειονίνης της χαρπίνης, όσο και της αλανίνης στη θέση 17 του κωδικού πλαισίου και στη συνέχεια να ελεγχθεί αν οι μεταλλαγές αυτές ακυρώνουν ή όχι το σχηματισμό της μικρότερης μορφής, τόσο σε ευκαρυωτικό όσο και σε προκαρυωτικό σύστημα έκφρασης. Επίσης, αξίζει να μελετηθεί αν η μικρότερη μορφή σχετίζεται με το μηχανισμό έκκρισης της πρωτεΐνης ή με άλλες λειτουργίες του εκκριτικού συστήματος τύπου III.

Το γεγονός ότι η πρωτεΐνη AnrPphB εκδηλώνει θνησιγόνο δράση όταν εκφράζεται σε φυτά καπνού και τομάτας παρέχει τη δυνατότητα να κλωνοποιηθεί το

λειτουργικά αντίστοιχο γονίδιο *R* του φυτού, το προϊόν του οποίου αναγνωρίζει την πρωτεΐνη AnrPphB. Επιπλέον το γονίδιο *anrPphB* μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν στοιχείο επαγωγής σε στρατηγικές κυτταρικού θανάτου, που στοχεύουν π.χ. στην δημιουργία ανθεκτικών ποικιλιών φυτών σε συγκεκριμένα παθογόνα ή σε άλλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Σε ότι αφορά την οργάνωση του εκκριτικού συστήματος τύπου III στα φυτοπαθογόνα βακτήρια, η έκφραση ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών Hgr/Hgc σε *E.coli* θα βοηθήσει στη συστηματική μελέτη της οργάνωσης και λειτουργίας αυτού του συστήματος. Ειδικότερα η δυνατότητα απομόνωσης των πρωτεϊνών αυτών σε καθαρή μορφή θα συμβάλει: α) στη μελέτη της οργάνωσης της εκκριτικής συσκευής Hgr, καθορίζοντας τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιμέρους πρωτεϊνών, β) στην παρασκευή αντισωμάτων ενάντια σ' αυτές τις πρωτεΐνες, ώστε να προσδιοριστεί η θέση τους στα βακτηριακά κύτταρα και γ) στην κρυστάλλωση τους, η οποία θα δώσει σημαντικές πληροφορίες τόσο για τη δομή τους, όσο και για την τοπολογία ορισμένων πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη του βακτηρίου.

Τέλος, η περαιτέρω μελέτη του εκκριτικού συστήματος τύπου III θα συμβάλλει τόσο στην κατανόηση του ιδιόμορφου αυτού μηχανισμού έκκρισης, που διαθέτουν τα φυτικά και τα ζωικά παθογόνα βακτήρια, σε μοριακό λειτουργικό επίπεδο, όσο και στη δυνατότητα ανάπτυξης βιοτεχνολογικών μεθοδολογιών, που θα παρεμποδίζουν την εκδήλωση της παθογόνου δράσης των βακτηρίων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

HrpJ

1	MKIVAPPTLP	IRPVAPIRAI	TPAARAIPGS	GLPDEKGTSS
41	LQVSRFAAA	LVQHSRILRE	<u>RELIASRNAL</u>	<u>QSRVAVKLGEL</u>
81	<u>YQLLMSTSDT</u>	GLDNAARLLR	KKLLQDNDAD	LEQVLEFADG
121	AAKAHVVLQA	ARKQAEDDGA	EEEYAALTQT	LKHLRRRFGP
161	RARAGINTAR	AFGRQNIDRR	<u>TALRNLYGVA</u>	VSGQPNV <u>TGL</u>
201	<u>IEALIGEQQE</u>	PGEFDLNLRD	MRRAIADDLS	AITPSASHEQ
241	LRTL MHGLTT	ARHVTTLLRG	CEHLLGRMRK	KNPKLTVDP
281	AFLKHMLTLT	ANGMNTLQLT	<u>QHIGGNKLEH</u>	QLAFLNGLRA
321	DADATADPAL	AGPEKPPGRA	E	

Εικόνα 65. Η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης HrpJ. Η παρουσία των μοτίβων απεικονίζεται με έντονα υπογραμμισμένα γράμματα: Leucine zipper (62..83), cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site (180-183), N-glycosylation site (198..201, 299..302).



Εικόνα 66. Ανάλυση για σπειρωμένα σπειράματα (coiled-coil analysis) της πρωτεΐνης HrpJ της *P.s.phaseolicola*.

HrcV

1	MNRVINFLNM	VALSSAMRRS	ELVGAFFVIA	IVFMMITPLP
41	TGLIDVLI A V	NICISCLLIM	LAMHLPRPLA	FSTFPAVLLL
81	TTMFRLALS V	STTRLILLNQ	DAGHIVEAFG	QFVVGPNLAY
121	GLVIFLILTV	VNFLVITKGS	ERVAEVGARF	TLDAMPGKQM
161	SIDSDLRANL	ITVHEARKRR	AELNKESQLF	GAMDGAMK F V
201	NGDAIASLII	VAINMIGGIS	IGVLQHNMAA	GDALQLYTVT
241	IGDGLIAQIP	ALLISVTSGM	IITRVPNTEA	GVEANIGREI
281	AEQITSQPKA	WIIASVAMLG	FAALPGMPTG	VFITIAICG
321	AGGLLQLQRA	KPKADEQRTA	AVAPEMNGKE	DLRTFSPSRQ
361	FVLQFHPGQD	SAQIEALVSE	IPKRRNRLVV	QYGLTLPSFI
401	IEHVDDIAPD	EFRFTVYDVP	MLKATFTQSH	VAVEARQLEG
441	ENLPAAIPGN	TDRQEDQVWW	LPAEQSGELN	PVSSTTLERM
481	ERALQSCAPQ	FIGLQETKAI	LSWLESEQPE	LAQEMQRVLT
521	LTRFSAVLQR	LASECVPLRA	IRVIAETLIE	HCQHERDTNV
561	LTDYVRIALQ	SQIYHQYCGA	EGLQVWLVT P	ESEGLLRDGL
601	RQTQTETFFA	LSNETSQMLV	QQLIHAFPVR	APEQAVLLVA
641	QDLRSPLRTL	LREEFYHVPV	LCFAEISNAA	KVKVMGRFDL
681	EDDLEPLDNE	HAA		

Εικόνα 67. Πρωτοταγής αλληλουχία της πρωτεΐνης HrcV της *P.s.syringae*. Οι υδρόφοβες περιοχές σημειώνονται με υπογράμμιση και η πιθανή θέση γλυκοσυλίωσης με έντονα γράμματα.

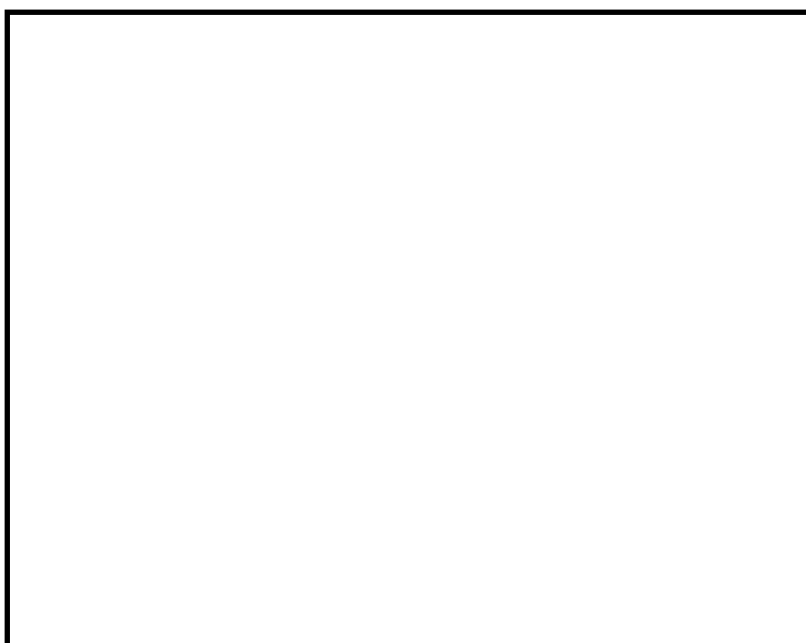


Εικόνα 68. Ανάλυση υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης HrcV.

HrpQ

1	MHGDFQMFEL	RVLNGQHQGA	ALPLIGEQWS	IGSAGQHDLA
41	LDDAGVESLH	CRLQRVDDNW	TLNAEQGAVC	DEQGNARPSI
81	<u>DLTLNNAFML</u>	<u>GSVWLCVSPA</u>	<u>GDEWPSVPAV</u>	LPKQPEAESG
121	PAHNDVPLEK	VKSRSQFL <u>NR</u>	<u>TTGIIAGLLV</u>	<u>GVIGSAWSLT</u>
161	RPPAIAMDQS	PAHLAAATTE	ALPDTPKAPA	RAANPVTDK R
201	IRLSNADAVR	HQLSTMLSDR	LLTDISVEET	PDGLILNGDL
241	KEESLLVYQR	MLQRFKALYD	SPVTVLDNVG	SNRNTLPFVV
281	VQIMTGPHAH	LVTADGRRVY	VGDEVDGLRL	TRIDNQRLQF
321	DGNRHIEVNW			

Εικόνα 69. Πρωτοταγής αλληλουχία της πρωτεΐνης HrpQ από *P.s.syringae*. Σημειώνονται: με έντονα γράμματα οι πιθανές θέσεις γλυκοσυλίσωσης, και με υπογράμμιση οι υδρόφοβες περιοχές.



Εικόνα 70. Ανάλυση υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης HrpQ.

HrcN

1	VNAALNLWKD	AHAKRLSQYC	AVRVIGRVSA	VRRILLECRI
41	PSAKVGDLCE	VSKADGSLLL	AEIVGFTQEC	TLLSALGPPD
81	GIQVGAPIRP	<u>LGVAHRIGVD</u>	<u>DSLLGCVLDG</u>	<u>FGRPLMGRLP</u>
121	RRVRRPRRPP	HDSAGDRRRP	AADPATAHHP	GLATGIRAID
161	SAILLGEGQR	VGLFAGAGCG	KTTLMAELAR	NMDCDVIVFG
201	LIGERGRELR	EFLDHELDET	LRRRSVLVCA	TSDRSSMERA
241	<u>RAAFTATAIA</u>	<u>EAFRARGQKV</u>	<u>LLLLDSLTRF</u>	<u>ARAQREIGIA</u>
281	<u>SGEPLGRGGL</u>	<u>PPSVYTLLPR</u>	<u>LVERAGMSEN</u>	GSITALYTVL
321	<u>IEQDSMNDPV</u>	<u>ADEVRSLLDG</u>	<u>HIVLSRKLAE</u>	<u>RGHYPADVS</u>
341	<u>ASISRILSNV</u>	<u>TGRKHQRANN</u>	RLRQLLAAYK	QVEMLLRLGE
361	<u>YQAGADPVTD</u>	CAVQLNEAIN	AFLRQDLREP	VPLQETLDRL
401	LQLTSQLPE			

Εικόνα 71. Πρωτοταγής αλληλουχία της HrcN της *P.s.syringae*. Ανάλυση της αλληλουχίας της εμφανίζει ορισμένα σημαντικά μοτίβα, τα οποία σημειώνονται με υπογράμμιση: ATP synthase alpha and beta subunits signature (91..116, 244..255, 263..307, 329..366, 355..364), με έντονα γράμματα: ATP/GTP binding site motif A (P-loop) (175..182), με πλαγιαστά γράμματα:cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site (14..17, 222..225), και με γκρι γράμματα:Amidation site (371..374).

HrpP

1	MTAPIKHPAK	APTAPPVVHA	TQPSAPAQRA	PDKADDKPPA
41	FGSTTRTDMP	KVRFAQN RS A	TETPESADGL	FFSQLLIPQV
81	GEEPDAQGFG	GSSIALPAHA	ENVPTQLIDE	LAQRLPEQ PA
121	<u>GPLAFTLLMP</u>	<u>SLGTVRVNAE</u>	KTEHRWSIQL	GFARRDVLKR
161	LQGHTGACRD	SLSRALGHDV	ELDLHEDLAA	

Εικόνα 72. Πρωτοταγής αλληλουχία της πρωτεΐνης HrpP από *P.s.phaseolicola*. Σημειώνονται: με έντονα γράμματα, μια πιθανή θέση γλυκοσυλίνωσης (57..60) και με υπογράμμιση μια πιθανή υδρόφοβη περιοχή (119..137).



Εικόνα 73. Διάγραμμα υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης HrpP.

HrcR

1	MIMEGVNPIM	<u>LALFLGSLSL</u>	<u>IPFLIVCTA</u>	FLKIAMTLII
41	TRNAIGVQQV	PPNM <u>ALY</u> GIA	<u>LAATMFV</u> MAP	<u>VAHEIQ</u> RVH
81	EHPLELGSAD	KLQSSLKTVI	EPLQRFMTRN	TDPDVVAHLL
121	ENTQRMWPKE	MADQANKNDL	LLAIPAFVLS	ELQAGFE <u>IGF</u>
161	<u>LIYIPFIV</u> ID	<u>LIVSNLLL</u> LAL	<u>GMQMVSP</u> MTL	<u>SLPLKLLL</u> LFV
201	<u>LVSGWSR</u> LLD	<u>SLFY</u> SYM		

Εικόνα 74. Πρωτοταγής αλληλουχία της πρωτεΐνης HrcR από *P.s.phaseolicola*. Σημειώνονται με έντονα γράμματα το μοτίβο Leucine zipper (11..32, 18..39), και με υπογράμμιση οι υδρόφοβες περιοχές.

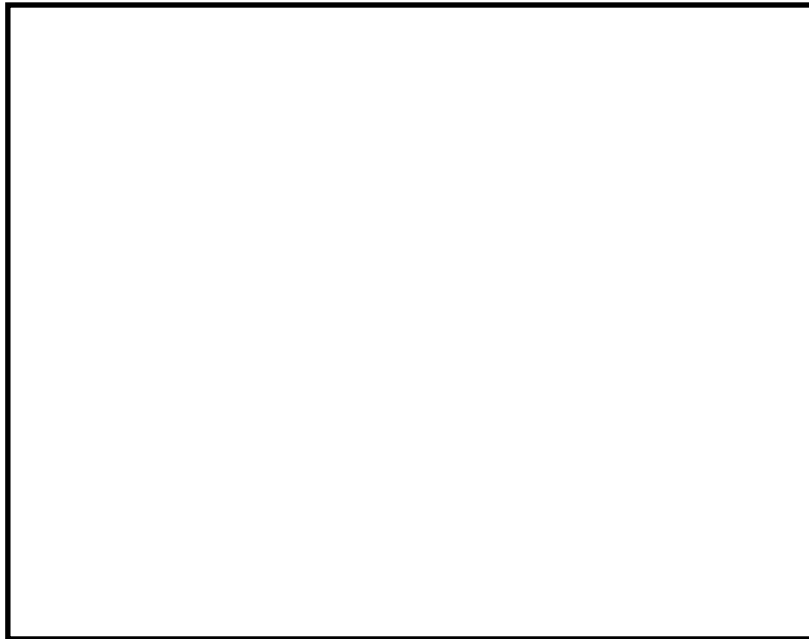


Εικόνα 75. Ανάλυση υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης HrcR της *P.s.phaseolicola*.

HrcS

1	MEALALFKQ	<u>MFLVVILTAP</u>	<u>PLGVAVLVGV</u>	LTSLQALMQ
	G			
41	<u>IQDQTL</u> PFGI	<u>KLGA</u> VGLTLA	<u>MTGR</u> WIGVEL	IQFINMAFDL
81	IARSGVNH			

Εικόνα 76. Πρωτοταγής αλληλουχία της πρωτεΐνης HrcS από *P.s.phaseolicola*. Σημειώνονται με υπογράμμιση οι προβλεπόμενες υδρόφοβες περιοχές.



Εικόνα 77. Ανάλυση υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης HrcS από *P.s.phaseolicola*.

HrcT

1	MPFDAHEAFQ	<u>FMLGMGLAMA</u>	<u>RLLPCMLLVP</u>	AFCFKYLKGP
41	LRYA <u>VAVLA</u>	<u>MVPAPAISRA</u>	<u>LGSLDDNWFA</u>	IGGLMIKEA <u>V</u>
81	<u>LGTLGLLLY</u>	<u>APFWMFASVG</u>	ALLDSQRGAL	SGGQLNPALG
121	PDATPLGELF	QETL <u>LIMLVIL</u>	<u>TGGLSLITQV</u>	<u>IWDSYSVWPP</u>
161	TAWLPGMTAG	GLDVFLEQLN	QTMQH <u>MLLYA</u>	<u>APFIALLLI</u>
201	<u>EAAFAIIGLY</u>	<u>AQQLNVSILA</u>	<u>MPAKSMAGLA</u>	<u>FLLIYLPTLL</u>
241	<u>ELGTGQLLTL</u>	VDLKSLLALL	VQVP	

Εικόνα 78. Πρωτοταγής αλληλουχία της πρωτεΐνης HrcT. Σημειώνονται με έντονα γράμματα οι πιθανές θέσεις γλυκοσυλίωσης (181..184, 216..219) και με υπογράμμιση οι προβλεπόμενες υδρόφοβες περιοχές.

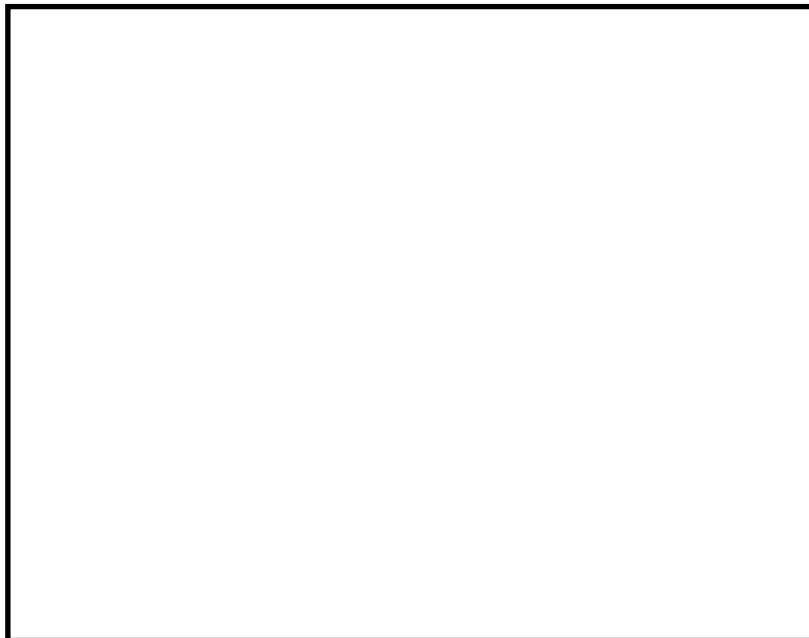


Εικόνα 79. Ανάλυση υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης HrcT από *P.s.phaseolicola*.

HrcU

1	VSEKTEKATP	KQIRDAREKG	QVGQSQDLGK	LLVLMVISEI
41	TLGLADDSVD	RLQALLALSF	KGIDRSFAAS	VELIASEGLS
81	<u>VLLSFTLCSV</u>	<u>GMAMLMRLVS</u>	<u>SWMQIGFLFA</u>	PKALKLDINK
121	INPFSHAKQM	FSGQNILN <u>LL</u>	<u>LSILKAVAIG</u>	<u>ATLYMQVKPA</u>
161	LGALILLANS	DLTTYWHALV	ELFRHILR <u>VI</u>	<u>LGLLLVVAMV</u>
201	<u>DFAMQKYFHA</u>	KKLRRMSHEDI	KKEYKQSEGD	PHVKGHRRQL
241	SHEILNQEPS	AAPNPKKLR	MLLVNPTHYA	VALYRPGET
281	PLPLIHCKGE	DEEGLALIAR	AKKAGIPVVQ	SIWLTRTLYR
321	AKVGKYIPRP	TLQAVGHIYK	VVRQLDEITD	EVIQVEVEL

Εικόνα 80. Πρωτοταγής αλληλουχία της πρωτεΐνης HrcU από *P.s.phaseolicola*. Σημειώνονται με έντονα γράμματα το ABC transporters family signature (88..102) και με υπογράμμιση οι προβλεπόμενες υδρόφοβες περιοχές.



Εικόνα 81. Ανάλυση υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης HrcU από *P.s.phaseolicola*.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Adetuyi, F. C., A. Isogai, D. Di Giorgio, A. Ballio, and J. Y. Takemoto.** 1995. Saprophytic *Pseudomonas syringae* strain M1 of wheat produces cyclic lipodepsipeptides. FEMS Microbiol. Lett. **131**:63-67.
2. **Agrios, G. N.** 1988. Plant Pathology, 4th ed. Academic Press, San Diego.
3. **Alfano, J. R., Bauer D.W, Milos T.M., and A. Collmer.** 1996. Analysis of the role of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HrpZ harpin in elicitation of the hypersensitive response in tobacco using functionally non-polar *hrpZ* deletion mutations, truncated HrpZ fragments, and *hrmA* mutations. Mol. Microbiol. **19**(4):715-728.
4. **Alfano, J. R., and A. Collmer.** 1996. Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. Plant Cell. **8**:1683-1698.
5. **Alfano, J. R., H.S. Kim, T.P. Delaney, and A. Collmer.** 1997. Evidence that the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrp*-linked *hrmA* gene encodes an Avr-like protein that acts in an *hrp*-dependent manner within tobacco cells. Mol. Plant Microbe Interact. **10**(5):580-588.
6. **Alfano, J. R. and A. Collmer.** 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. J. Bacteriol. **179**(18):5655-5662.
7. **Allaoui, A., S. Woestyn, C. Sluifers, and G.R. Cornelis.** 1994. YscU, a *Yersinia enterocolitica* inner membrane protein involved in Yop secretion. J. Bacteriol. **176**(15):4534-4542.
8. **Anderson, D. M., and O. Schneewind.** 1997. A mRNA signal for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. Science. **278**:1140-1143.
9. **Arlat, M., Gijsegem F.V., Huet J.C., Pernollet J.C., and C.A. Boucher.** 1994. PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. EMBO J. **13**(3):543-553.
10. **Atkinson, M. M.** 1993. Molecular mechanisms of pathogen recognition by plants, vol. 10. Academic Press, New York.
11. **Atkinson, M. M.** 1993. Molecular mechanisms of pathogen recognition by plants. Adv. Plant Pathol. **10**:35-64.
12. **Auh, C. K., and T.M. Murphy.** 1995. Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O₂⁻ and H₂O₂ by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. Plant Physiol. **107**:1241-1247.
13. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D.D Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl.** 1987. Current protocols in molecular biology. Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
14. **Baker, B., P. Zambryski, B. Staskawicz, and S.P. Dinesh-Kumar.** 1997. Signalling in plant-microbe interactions. Science. **276**:726-733.
15. **Baker, C. J., N.R. Neill, L.D. Keppler, and E.W. Orlandi.** 1991. Early responses during plant-bacterial interactions in tobacco cell suspensions. Phytopathology. **81**:1504-1507.
16. **Baker, C. J., Orlandi E.W., and N.M. Mock.** 1993. Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora*, elicits active oxygen production in suspension cells. Plant Physiol. **102**:1341-1344.

17. **Baker, C. J., N.M. Mock, M.M. Atkinson, and S.Hutcheson.** 1990. Inhibition of the hypersensitive response in tobacco by pectate lyase digests of cell wall and of polygalacturonic acid. *Physiol. mol. Plant Pathol.* **37**:155-167.
18. **Balcells, L. J. S., and G. Coupland.** 1991. Transposons as tools for the isolation of plant genes. *Trends Biotech.* **9**:31-37.
19. **Barras, F., F. Van Gijsegem, and A. K. Chatterjee.** 1994. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Ann. Rev. Phytopathol.* **32**:201-234.
20. **Bashan, Y., Y. Okon, and Y. Henis.** 1985. Detection of cutinases and pectic enzymes during infection of tomato by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Phytopathology.* **75**:940-945.
21. **Bauer, D. W., Wei Z.M., Beer S.V., and A. Collmer.** 1995. *Erwinia chrysanthemi* Harpin_{Ech}: An elicitor of the hypersensitive response that contributes to soft-rot pathogenesis. *Mol. Plant Microbe-Interact.* **8**(4):484-491.
22. **Bauer, D. W., and A. Collmer.** 1997. Molecular cloning, characterization, and mutagenesis of a *pel* gene from *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans encoding a member of the *Erwinia chrysanthemi* PelADE family of pectate lyases. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**:369-379.
23. **Bauerm, D. W., Wei Z.M., Beer S.V., and A. Collmer.** 1995. *Erwinia chrysanthemi* Harpin_{Ech}: An elicitor of the hypersensitive response that contributes to soft-rot pathogenesis. *MPMI.* **8**(4):484-491.
24. **Bennetzen, J. L., and J. D. G. Jones.** 1992. Approaches and progress in the molecular cloning of plant disease resistance genes, vol. 14. Plenum Press, New York.
25. **Bent, A. F., B.N. Kunkel, D. Dahlbeck, K.L. Brown, R. Schmidt, J. Giraudat, J. Leuhn, and B.J. Staskawicz.** 1994. *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science.* **265**:1856-1860.
26. **Bergman, T., K. Erickson, E. Galyov, C. Persson, and H. Wolf-Watz.** 1994. The *lcrB* (*yscN/U*) gene cluster of *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in Yop secretion and shows high homology to the *spa* gene clusters of *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**(9):2619-2626.
27. **Binet, N., S. Letoffe, J.M. Ghigo, P. Delepelaire, and C. Wandersman.** 1997. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters. *Folia Microbiol.* **42**:179-183.
28. **Bischoff, D. S., and G. W. Ordal.** 1992. Identification and characterization of FliY, a novel component of the *Bacillus subtilis* flagellar switch complex. *Mol. Microbiol.* **6**:4900-4908.
29. **Bogdanove, A. J., Wei Z-M., Zhao L., and S.V. Beer.** 1996. *Erwinia amylovora* secretes harpin via a type III pathway and contains a homolog of *yopN* of *Yersinia* spp. *J. Bacteriol.* **178**(6):1720-1730.
30. **Bogdanove, A. J., S.V. Beer, U. Bonas, C.A. Boucher, A. Collmer, D.L. Coplin, G.R. Cornelis, H.C. Huang, S.W. Hutcheson, N.J. Panopoulos, and F. VanGijsegem.** 1996. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopatogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **20**:681-683.
31. **Bonas, U., and G. V. Ackerveken.** 1997. Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial diseases? *Plant J.* **12**(1):1-7.

32. **Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
33. **Brisson, L., R. Tenhaken, and C. Lamb.** 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell.* **6**:1703-1712.
34. **Brisson, L. F., R. Tenhaken, and C. Lamb.** 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell.* **6**:1703-1712.
35. **Bruneau, N., A. Nganga, E.A. Fisher, and D. Lombardo.** 1997. O-glycosylation of C-terminal tandem-repeated sequences regulates the secretion of rat pancreatic bile salt-dependent lipase. *J.Biol. Chem.* **272**(43):27353-27361.
36. **Cai, D., et al.** 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science.* **275**:832-834.
37. **Carpenter, P. B., and G.W. Ordal.** 1993. *Bacillus subtilis* FlhA: a flagellar protein related to a new family of signal-transducing receptors. *Mol. Microbiol.* **7**(5):735-743.
38. **Charkowski, A. O., H.-C. Huang and A. Collmer.** 1997. Altered localization of HrpZ in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrp* mutants suggests that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membranes of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **179**:3866-3874.
39. **Charkowski, A. O., J.R. Alfano, G. Preston, J. Yuan, S.Y. He, and A. Collmer.** 1998. The *Pseudomonas syringae* pv. tomato HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. *J. Bacteriol.* **180**(19):5211-5217.
40. **Church, G. M., and W. Gilbert.** 1984. Genome sequencing. *PNAS.* **81**:1991-1995.
41. **Collazo, C. M., M. K. Zierler, and J. E. Galan.** 1995. Functional analysis of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invI* and *invJ* and identification of a target of the protein secretion apparatus encoded in the *inv* locus. *Mol. Microbiol.* **15**:25-38.
42. **Collmer, A.** 1996. Bacterial avirulence proteins: where's the action? *Trends in Plant Science.* **1**(7):209-210.
43. **Collmer, A., and N. T. Keen.** 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**:383-409.
44. **Corbisier, P., A. Houbion A., and J. Remacle.** 1987. A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiluminescence. *Anal. Biochem.* **164**:240-247.
45. **Cornelis, G. R.** 1997. Contact with eucaryotic cells: a new signal triggering bacterial gene expression. *Trends in Microbiol.* **5**(2):43-44.
46. **Cornelis, G. R., and H. Wolf-Watz.** 1997. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eucaryotic cells. *Mol. Microbiol.* **23**(5):861-867.
47. **Dangl, J. L., R.A. Dietrich R.A., and M.H. Richberg.** 1996. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell.* **8**:1793-1807.

48. **Dangl, J. L.** 1994. The enigmatic avirulence genes of phytopathogenic bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immun.* **192**:5934-5944.
49. **de Wit, P. J. G. M.** 1997. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends in Plant Science.* **2**(12):452-458.
50. **Deblaere, R., A. Reynaerts, H. Hefte, J-P. Hernalsteens, J. Leemans, and M. van Montagu.** 1987. Vectors for cloning in plant cells, p. 277-292. *In* I. W. a. Grossman (ed.), *Methods in Enzymol.*, vol. 153.
51. **Deblaere, R. B., B. De Greve, H. Debroeck, F. Schell, J. van Montagu, and J. Leemans.** 1985. Efficient octopine Ti plasmid derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acids Res.* **13**:4777-4788.
52. **Dinh, T., I.T. Paulsen, and M.H. Saier.** 1994. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of Gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* **176**:3825-3831.
53. **Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, and D. R. Helinski.** 1980. Broad host range DNA cloning system from Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**:7347-7351.
54. **Dixon, M. S., D.A. Jones, J.S. Keddie, C.M. Thomas, K. Harrison, and J.D.G. Jones.** 1996. The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell.* **84**:451-459.
55. **Draper, J.** 1997. Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends in Plant Science.* **2**(5):162-165.
56. **Dreyfus, G., A.W. Williams, I. Kawagishi, and R.M. Macnab.** 1993. Genetic and biochemical analysis of *Salmonella typhimurium* FliI, a flagellar protein related to the catalytic subunit of the F₀F₁ ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant pathogens. *J. Bacteriol.* **175**(10):3131-3138.
57. **Dricks, A., and D. J. DeRosier.** 1990. Additional structures associated with bacterial flagellar basal body. *J. Mol. Biol.* **211**:669-672.
58. **Eichelberg, K., C. Ginocchio, and J. E. Galan.** 1994. Molecular and functional characterization of the *Salmonella typhimurium* invasion genes *invB* and *invC*: homology of *InvC* to the F₀F₁ ATPase family of proteins. *J. Bacteriol.* **176**:4501-4510.
59. **Ellis, J., and D. Jones.** 1998. Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**:288-293.
60. **Fan, F., and R.M. Macnab.** 1996. Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **271**(50):31981-31988.
61. **Fan, F., K. Ohnishi, N.R. Francis, and R.M. Macnab.** 1997. The FliP and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*, putative components of the type III flagellar export apparatus, are located in the flagellar basal body. *Mol. Microbiol.* **26**(5):1035-1046.
62. **Fath, M. J., and R. Kolter.** 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**:995-1017.
63. **Fenselau, S., Balbo I., and U. Bonas.** 1992. Determinants of pathogenicity in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals. *MPMI.* **5**(5):390-396.
64. **Fenselau, S., and U. Bonas.** 1995. Sequence and expression analysis of *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which

- encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa and Fli secretion systems. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:845-859.
65. **Fields, K., G.V.Plano, and S.C. Straley.** 1994. A low-Ca⁺² response (LCR) secretion (*ysc*) locus lies within the *lcrB* region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis*. *J.Bacteriol.* **176**(3):569-579.
 66. **Figurski, D. H., and D.R. Helinski.** 1979. Replication of an Origin-containing derivative of plasmid RK-2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:1648-1625.
 67. **Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**(2):136-169.
 68. **Firek, S., J. Draper, R.L.O. Meran, A. Gandecha, B. Cockburn, and G.C. Whitelam.** 1993. Secretion of a functional single-chain Fv protein in transgenic tobacco plants and cell suspension cultures. *Plant Mol. Biol.* **23**:861-870.
 69. **Fisher, C. L., and G. Kui Pei.** 1997. Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method. *Biotechniques.* **23**:570-574.
 70. **Flor, H. H.** 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**:275-296.
 71. **Flor, H. H.** 1955. Host-parasite interaction in flax rust-its genetics and other implications. *Phytopathology.* **45**:680-685.
 72. **Forsberg, A., A.M. Viitanen, M. Skurnik, and H. Wolf-Watz.** 1991. The surface-localized YopN protein involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **5**:977-986.
 73. **Francis, N. R., G. E. Sosinsky, D. Thomas, and D. J. DeRosier.** 1994. Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex. *J. Mol. Biol.* **235**:1261-1270.
 74. **Francis, N. R., V. M. Irikura, S. Yamaguchi, D. J. DeRosier, and R. M. Macnab.** 1992. Localization of the *Salmonella typhimurium* flagellar switch protein FliG to the cytoplasmic M-ring face of the basal body. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:6304-6308.
 75. **Fullner, K. J., J.C. Lara and E.W. Nester.** 1996. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science.* **273**:1107-1109.
 76. **Gabriel, D. W.** 1997. Targeting of protein signals from *Xanthomonas* to the plant nucleus. *Trends in Plant Science.* **2**(6):204-206.
 77. **Galan, J. E.** 1998. Avirulence genes in animal pathogens. *Trends in Microbiol.* **6**(1):3-6.
 78. **Galan, J. E.** 1996. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* **20**(2):263-271.
 79. **Gatz, C., A. Kaiser, and R. Wendenburg.** 1991. Regulation of a modified CaMV 35S promoter by the Tn10-encoded Tet repressor in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **227**:229-237.
 80. **Gatz, C., C. Frohberg, and R. Wendenburg.** 1992. Stringent repression and homogenous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants. *Plant J.* **2**(3):397-404.
 81. **Gaudriault, S., Malandrin L., Paulin J.-P., and A. A. Barny.** 1997. DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. *Mol. Microbiol.* **26**(5):1057-1069.

82. **Ge, Y., C. Li, L. Corum, C.A. Slaughter, and N.W. Charon.** 1998. Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **180**(9):2418-2425.
83. **Genin, S., C.L. Gough, C. Zischek, and C.A. Boucher.** 1992. Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Microbiol.* **6**:3065-3076.
84. **Ginocchio, C. C., S.B. Olmsted, C.L. Wells, and J.E. Galan.** 1994. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell.* **76**:717-724.
85. **Ginocchio, C. C., and J.E. Galan.** 1995. Functional conservation among members of the *Salmonella typhimurium* InvA family of proteins. *Infect. Immun.* **63**:729-732.
86. **Glazener, J. A., H.C. Huang, and C.J. Baker.** 1991. Active oxygen induction in tobacco cell suspensions treated with *Pseudomonas fluorescens* containing the cosmid pHIR11 and with strains containing TnPhoA mutations in the *hrp* cluster. *Phytopathology.* **81**:1196.
87. **Goodman, R. N., and A.J. Novacky.** 1994. The hypersensitive Reaction of Plants: A Resistance Phenomenon. APS Press.
88. **Gopalan, S., D.W. Bauer, J.R. Alfano, A.O. Loniello, S.H. He, and A. Collmer.** 1996. Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plant cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. *Plant Cell.* **8**:1095-1105.
89. **Gopalan, S., W. Wei, and S.Y. He.** 1996. *hrp* gene-dependent induction of *hin-1*: a plant gene activated rapidly by both harpins and the *avrPto* gene-mediated signal. *Plant J.* **10**(4):591-600.
90. **Gough, C. L., S. Genin, C. Zischek, and C.A. Boucher.** 1992. *hrp* genes of *Pseudomonas solanacearum* are homologous to pathogenicity determinants of animal pathogenic bacteria and are conserved among plant pathogenic bacteria. *MPMI.* **5**(5):384-389.
91. **Grant, M. R., L. Godiard, E. Straube, T. Ashfield, J. Lewald, A. Sattler, R.W. Innes, and J.L. Dangl.** 1995. Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science.* **269**:843-846.
92. **Greenberg, J. T., A. Guo, D.F. Klessig, and F.M. Ausubel.** 1994. Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defence functions. *Cell.* **77**:551-563.
93. **Grimm, C., Aufsatz W., and N.J. Panopoulos.** 1995. The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* constitutes a complex regulatory unit. *Mol. Microbiol.* **15**(1):155-165.
94. **Groisman, E. A., and H. Ochman.** 1993. Cognate gene clusters govern invasion of host epithelial cells by *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri*. *EMBO J.* **12**:3779-3787.
95. **Groisman, E. A., and H. Ochman.** 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell.* **87**:791-794.
96. **Gross, D. C.** 1991. Molecular and genetic analysis of toxin production by pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Ann. Rev. Phytopathol.* **29**:247-278.
97. **Grunstein, M., and D. Hogness.** 1975. Colony hybridization: A method for isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**:3961-3964.

98. **Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, and H. Tschape.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**:1089-1097.
99. **Hacker, J.** 1992. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Can. J. Microbiol.* **38**:720-727.
100. **Haddix, P. L., and S.C. Straley.** 1992. Structure and regulation of the *Yersinia pestis yscBCDEF* operon. *J. Bacteriol.* **174**:4820-4828.
101. **Hammond-Kosack, K. E., and J. D. G. Jones.** 1997. Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **48**:575-607.
102. **Hammond-Kosack, K. E., and J.D.G. Jones.** 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell.* **8**:1773-1791.
103. **Hardham, J. M., J.G. Frye, N.R. Young, and L.V. Stamm.** 1997. Identification and sequences of the *Treponema pallidum flhA*, *flhF* and *orf304* genes. *DNA Seq.* **7**(2):107-116.
104. **Harold, F. M., and P.C. Maloney.** 1996. Energy transduction by ion currents, 2nd ed, vol. 1. ASM Press, Washington, DC.
105. **He, S. Y.** 1997. Hrp-controlled interkingdom protein transport: learning from flagellar assembly? *Trends Microbiol.* **5**:489-495.
106. **He, S. Y., Huang H.C., and A. Collmer.** 1993. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin_{SS}: a protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell.* **73**:1255-1266.
107. **Heath, M. C.** 1998. Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**:117-124.
108. **Higgins, C. F.** 1995. The ABC of channel regulation. *Cell.* **82**:693-696.
109. **Horsch, R. B., J. Fry, N.Hoffmann, J.Neidermayer, S.G. Rogers, and R.T. Fraley.** 1988. Leaf disc transformation. Sect A5:1-9. In Gelvin et al. .
110. **Hoyos, M. E., Stanley C.M., He S.Y., Pike S., Pu X-A., and A. Novacky.** 1996. The interaction of Harpin_{SS} with plant cell walls. *MPMI.* **9**(7):608-616.
111. **Huang, H.-C., S.W. Hutcheson, and A. Collmer.** 1991. Characterization of the hrp cluster from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 and TnphoA tagging of genes encoding exported or membrane-spanning Hrp proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**(5):469-476.
112. **Huang, H.-C., Y. Xiao, R-H. Lin, Y. Lu, S.W. Hutcheson, and A. Collmer.** 1993. Characterization of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrpJ* and *hrpI* genes: Homology of HrpI to a superfamily of proteins associated with protein translocation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**(4):515-520.
113. **Huang, H.-C., R-H. Lin, C-J. Chang, A. Collmer, and W-L. Deng.** 1995. The complete hrp gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of genes required for Harpin_{SS} secretion that are arranged colinearly with *Yersinia ysc* homologs. *Mol.Plant-Microbe Interact.* **8**(5):733-746.
114. **Huang, H.-C., R. Schuurink, T.P. Denny, M.M. Atkinson, C.J. Baker, I. Yucel, S.W. Hutcheson, and A. Collmer.** 1988. Molecular cloning of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* gene cluster that enables *Pseudomonas fluorescens* to elicit the hypersensitive response in tobacco plants. *J. Bacteriol.* **170**:4748-4756.
115. **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**(2):379-433.

116. **Hultgren, S. J., C.H. Jones, and S. Normark.** 1996. Bacterial adhesins and their assembly, p. 2730-2756. *In* F. C. Neidhart, R. Curtiss, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (ed.), *In Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed, vol. 2. ASM Press, Washington, DC.
117. **Hutchison, M. L., and D.C. Gross.** 1997. Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel forming activities of syringopeptin and syringomycin. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**:347-354.
118. **Huynh, T. V., D. Dahlbeck, and B. J. Staskawitz.** 1989. Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. *Science.* **245**:1374-1377.
119. **Innes, R. W., A.F. Bent, B.N. Kunkel, S.R. Bisgrove, and B.J. Staskawicz.** 1993. Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *J. Bacteriol.* **175**:4859-4869.
120. **Iriarte, M., M-P. Sory, A. Boland, A.P. Boyd, S.D. Mills, I. Lambermont, and G.R. Cornelis.** 1998. TyeA, a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors. *EMBO J.* **17**(7):1907-1918.
121. **Islam, M. R., and K. W. Shepherd.** 1991. Present status of genetics of rust resistance in flax. *Euph.* **55**:255-267.
122. **Jackson, M. W., J.B. Day, and G.V. Plano.** 1998. YscB of *Yersinia pestis* as a specific chaperone for YopN. *J. Bacteriol.* **180**(18):4912-4921.
123. **James, P., J., Halladay, and E.A. Craig.** 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.* **144**:1425-1436.
124. **Johal, G. S., and S. P. Briggs.** 1992. Reductase activity encoded by the *HMI* disease resistance gene in maize. *Science.* **258**:985-987.
125. **Jones, D. A., C.M. Thomas, K. E. Hammond-Kosack, P.J. Balint-Kurti, and J. D. G. Jones.** 1994. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science.* **266**:789-793.
126. **Kadner, R. J.** 1996. *Cytoplasmic membrane*, 2nd ed, vol. 1. ASM Press, Washington, DC.
127. **Kasahara, M., J. Nakaya, Y. Satta, and N. Takahata.** 1997. Chromosomal duplication and the emergence of the adaptive immune system. *Trends Genet.* **13**:90-92.
128. **Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, D. Gerhold, M. Stayton, H. Shen, S. Gold, J. Lorang, H.Thordal-Christensen, D. Dahlbeck, and B. Staskawicz.** 1990. Bacteria expressing avirulence gene *avrD* produce a specific elicitor of the soybean hypersensitive reaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**:112-121.
129. **Kim, J., and S.V. Beer.** 1998. HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectate lyases of a distinct class. *J.Bacteriol.* **180**(19):5203-5210.
130. **King, E. O., M. K., Ward, and D. E. Raney.** 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. and Clin. Med.* **44**:301-307.
131. **Klauser, T., J. Pohlner, and T.F. Meyer.** 1993. The secretion pathway of IgA protease-type proteins in Gram-negative bacteria. *Bioessays.* **15**:799-805.

132. **Klement, Z., G.L. Farkas, and L. Lovrekovich.** 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopatology*. **54**:474-477.
133. **Klement, Z.** 1982. Hypersensitivity, vol. 2. Academic Press, New York.
134. **Klement, Z.** 1963. Rapid detection of pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature*. **199**:299-300.
135. **Kobayashi, D., S.J. Tamaki, and N.T. Keen.** 1990. Molecular characterization of avirulence *avrD* from *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**:94-102.
136. **Koop, H. V., and H.G. Schweiger.** 1985. Regeneration of plants from individually cultivated protoplasts using an improved microculture system. *J. Plant Physiol.* **121**:245-257.
137. **Koster, M., W. Bitter, H. deCock, A. Allaoui, G.R. Cornelis, and J. Tommassen.** 1997. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol. Microbiol.* **26**(4):789-797.
138. **Kubori, T., S. Yamaguchi, and S. Aizawa.** 1997. Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of *Salmonella typhimurium* does not require any other flagellar proteins. *J. Bacteriol.* **179**:813-817.
139. **Laemmlı, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-685.
140. **Lawrence, G. J., E.J. Finnegan, M.A. Ayliffe, and J.G. Ellis.** 1995. The *L6* gene for flux rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. *Plant Cell*. **7**:1195-1206.
141. **Lawrence, J. G., and J.R. Roth.** 1996. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics*. **143**:1843-1860.
142. **Leach, J. E., and F.F. White.** 1996. Avirulence genes, p. 61-98. *In* a. N. T. K. Stacey G. (ed.), *Plant Microbe Interactions*, vol. 2. Chapman & Hall, New York.
143. **Leach, J. E., and F.F. White.** 1996. Bacterial avirulence genes. *Ann. Rev. Phytopathol.* **34**:153-179.
144. **Lee, C. A.** 1997. Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eucaryotic cells? *Trends in Microbiol.* **5**(4):148-156.
145. **Lee, C. A.** 1997. Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *Trends in Microbiol.* **5**(4):148-156.
146. **Levine, A., R. Tenhaken, R. Dixon, and C. Lamb.** 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*. **79**:583-593.
147. **Li, J., H. Ochman, E.A. Groisman, E. F. Boyd, F. Solomon, K. Nelson, and R.K. Selander.** 1995. Relationship between evolutionary rate and cellular location among the Inv/Spa invasion proteins of *Salmonella enterica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:7252-7256.
148. **Li, Y., H. Zhu, P. Kuppusamy, J.L. Zweier, and M.A. Trush.** 1998. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J.Biol.Chem.* **273**(4):2015-2023.
149. **Lidell, M. C., and S.W. Hutcheson.** 1994. Characterization of the *hrpJ* and *hrpU* operons of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61: Similarity with components of enteric bacteria involved in Flagellar biogenesis and

- demonstration of their role in Harpin_{SS} secretion. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**(4):488-497.
150. **Lindgren, P. B., R.C. Peet, and N.J. Panopoulos.** 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J. Bacteriol.* **168**(2):512-522.
 151. **Lindgren, P. B., N.J. Panopoulos, B.J. Staskawicz, and D. Dahlbeck.** 1988. Genes required for pathogenicity and hypersensitivity are conserved and interchangeable among pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Gen. Genet.* **21**:499-506.
 152. **Lindgren, P. B.** 1997. The role of *hrp* genes during plant-bacteria interactions. *Ann. Rev. Phytopathol.* **35**:129-152.
 153. **Lonetto, M. A., K.L. Brown, K.E. Rudd, and M.J. Buttner.** 1994. Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase σ factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *PNAS.* **91**:7573-7577.
 154. **Longland, A. C., A. J. Slusarenko, and J. Friend.** 1992. Pectolytic enzymes from interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and french bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Phytopathol.* **134**:75-86.
 155. **Lorang, J. M., H. Shen, D. Kobayashi, D. Cooksey, and N.T. Keen.** 1994. *avrA* and *avrE* in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* PT23 play a role in virulence on tomato plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **7**(4):508-515.
 156. **Lory, S.** 1998. Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: shared pathways of extracellular protein targeting. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:27-35.
 157. **Low, D., B. Braaten, and M. van der Woude.** 1996. Fimbriae, p. 146-157. In F. C. Neidhart, R. Curtiss, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, 2nd ed, vol. 1. ASM Press, Washington, DC.
 158. **Lowry, O. H., N.J. Rosebrugh, A.L. Farr, and R.J. Randall.** 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
 159. **Macnab, R. M.** 1992. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* **26**:131-158.
 160. **Malakooti, J., Y. Komeda, and P. Matsumura.** 1994. Molecular characterization, nucleotide sequence and expression of the *fliO*, *fliP*, *fliQ* and *fliR* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**:189-197.
 161. **Manson, M. D., J.P. Armitage, J. A. Hoch, and R. M. Macnab.** 1998. Bacterial locomotion and signal transduction. *J. Bacteriol.* **180**(5):1009-1022.
 162. **Marenda, M., B. Brito, D. Callard, S. Genin, P. Barberis, C. Boucher, and M. Arlat.** 1998. PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum hrp* genes in the presence of plant cells. *Mol. Microbiol.* **27**(2):437-453.
 163. **Marenda, M., B. Brito, D. Callard, S. Genin, P. Barberis, C. Boucher, and M. Arlat.** 1998. PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum hrp* genes in the presence of plant cells. *Mol. Microbiol.* **27**(2):437-453.
 164. **Margo, P., L. Varvaro, G. Chilosi, C. Avanzo, and G.M. Balestra.** 1994. Pectolytic enzymes produced by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**:1-6.

165. **Martin, G. B., M.C. Vicente, and S. D. Tanksley.** 1993. High-resolution linkage analysis and physical characterization of the *Pto* bacterial resistance locus in tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**(1):26-34.
166. **Martin, G. B., S.H. Brommonschenkel, J. Chunwongse, A. Frary, M. W. Ganai, R. Spivey, T. Wu, E.D. Earle, and S.D. Tanksley.** 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science.* **262**:1432-1436.
167. **Marykwas, D. L., S. A. Schmidt, and H. C. Berg.** 1996. Interacting components of the flagellar motor of *Escherichia coli* revealed by the two-hybrid system in yeast. *J. Mol. Biol.* **256**:564-576.
168. **Mehdy, M. C.** 1994. Active oxygen species in plant defence against pathogens. *Plant physiol.* **105**:467-472.
169. **Menard R., D. C., and P. J. Sansonetti.** 1996. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. *Trends in Microbiol.* **4**(6):220-226.
170. **Michiels, T., J.-C. Vannoteghem, C. L. deRouvroit, B. China, A. Gustin, P. Boudry, and G.R. Cornelis.** 1991. Analysis of *virC*, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* **173**:4994-5009.
171. **Mindrinis, M., F. Katagiri, G-L. Yu, and F.M. Ausubel.** 1994. The *A. thaliana* disease resistance gene *RPS2* encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell.* **78**:1089-1099.
172. **Mindrinis, M. N., L.G. Rahme, R.D. Frederick, E. Hatziloukas, C. Grimm, and N.J. Panopoulos.** 1990. Structure, function, regulation and evolution of genes involved in the expression of pathogenicity, the hypersensitive response and phaseolotoxin immunity in the bean halo blight pathogen, p. 74-81. *In e. a. Silver (ed.), Pseudomonas: Biotransformations, pathogenesis and evolving biotechnology.* American Society for Microbiology, Washington, DC.
173. **Mitchell, R. E.** 1984. The relevance of non-specific toxins in the expression of virulence by pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* **22**:215-245.
174. **Mukherjee, A. M., Cui Y., Liu Y., and A.K. Chatterjee.** 1997. Molecular characterization and expression of the *Erwinia carotovora hrpN_{Ecc}* gene, which encodes an elicitor of the hypersensitive reaction. *MPMI.* **10**(4):462-471.
175. **Murashige, T., and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**:473-497.
176. **Murphy, T. M., and A.J. Huerta.** 1990. Hydrogen peroxide formation in cultured rose cells in response to UV-C radiation. *Physiol. Plant.* **78**:247-253.
177. **Murphy, T. M., and C.K. Auh.** 1996. The superoxide synthase of plasma membrane preparations from cultured rose cells. *Plant Physiol.* **110**:621-629.
178. **Nikaido, H.** 1996. Outer membrane, 2nd ed, vol. 1. ASM Press, Washington, DC.
179. **Nizan, R., I. Barash, L. Valinsky, A. Lichter, and S. Manulis.** 1997. The presence of *hrp* genes on the pathogenicity-associated plasmid of the tumorigenic bacterium *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**(5):677-682.
180. **Ohnishi, K., F.Fan, G.J. Schoenhals, M.Kihara, and R.M. Macnab.** 1997. The FliO, FliP, FliQ and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly. *J.Bacteriol.* **179**(19):6092-6099.

181. **Oosawa, K., T. Ueno, and S.-I. Aizawa.** 1994. Overproduction of the bacterial flagellar switch proteins and their interactions with the MS ring complex in vitro. *J. Bacteriol.* **176**:3683-3691.
182. **Ori, N., Y. Eshed, I. Paran, G. Presting, D. Aviv, S. Tanksley, D. Zamir, and R. Fluhr.** 1997. The *I2C* family from the wilt disease resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell.* **9**:521-532.
183. **Osbourn, A. E.** 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell.* **8**:1821-1831.
184. **Parker, J. E., M.J. Coleman, V. Szabo, L.N. Frost, R. Schmidt, E. van der Biezen, T. Moores, C. Dean, M.J. Daniels, and J.D.G. Jones.** 1997. The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP5* shares similarity to the Toll and Interleukin-1 receptors with *N* and *L6*. *Plant Cell.* **9**:879-894.
185. **Parker, J. E., and M.J. Coleman.** 1997. Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition. *TIBS.* **22**:291-296.
186. **Parsot, C., R. Menard, P. Gounon, and P.J. Sansonetti.** 1995. Enhanced secretion through the *Shigella flexneri* Mxi-Spa translocon leads to assembly of extracellular proteins into macromolecular structures. *Mol. Microbiol.* **16**:291-300.
187. **Payne, P. L., and S.C. Starley.** 1998. YscO of *Yersinia pestis* is a mobile core component of the Yop secretion system. *J. Bacteriol.* **180**(15):3882-3890.
188. **Peet, R. C., P. B. Lindgren, D. K. Willis, and N. J. Panopoulos.** 1986. Identification and cloning of genes involved in phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J. Bacteriol.* **166**:1096-1105.
189. **Pettersson, J., R. Nordfelth, E. Dubinina, T. Bergman, M. Gustafsson, K.E. Magnusson, and H. Wolf-Watz.** 1996. Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science.* **273**:1231-1233.
190. **Pfitzner, U. M., and H.M. Goodman.** 1987. Isolation and characterization of cDNA clones encoding pathogenesis-related proteins from tobacco mosaic virus infected tobacco plants. *Nucl. Acids Res.* **15**:4449-4465.
191. **Pirhonen, M. U., M.C. Lidell, D.L. Rowley, S.W. Lee, S. Jin, Y. Liang, S. Silverstone, N.T. Keen, and S.W. Hutchenson.** 1996. Phenotypic expression of *Pseudomonas syringae* *avr* genes in *E.coli* is linked to the activities of the *hrp*-encoded secretion system. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**(4):252-260.
192. **Plano, G. V., and S.C. Straley.** 1993. Multiple effects of LcrD mutations in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* **175**:3536-3545.
193. **Pontier, D., L. Godiard, Y. Marco, and D. Roby.** 1994. *hsr203J*, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. *Plant J.* **5**(4):507-521.
194. **Preston, G., H.C. Huang, S.Y. He, and A. Collmer.** 1995. The HrpZ proteins of *Pseudomonas syringae* pvs. *syringae*, *glycinea* and *tomato* are encoded by an operon containing *Yersinia ysc* homologs and elicit the hypersensitive response in tomato but not Soybean. *MPMI.* **8**(5):717-732.
195. **Pryor, A. J.** 1993. The genetic complexity of fungal disease resistance genes in plants. *Adv. Plant Pathol.* **10**:281-305.
196. **Pryor, A. J.** 1987. The origin and structure of fungal disease resistance genes in plants. *Trends Genet.* **3**:157-161.
197. **Pugsley, A. P.** 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:50-108.

198. **Pugsley, A. P., and O. Possot.** 1993. The general secretory pathway of *Klebsiella oxytoca*: no evidence for relocation or assembly of pilin-like PulG protein into a multiprotein complex. *Mol. Microbiol.* **10**:665-674.
199. **Pugsley, A. P., O. Francetic, O.M. Possot, N. Sauvonnet, and K.R. Hardie.** 1997. Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Gene.* **192**:13-19.
200. **Puri, N., C. Jenner, M. Bennett, R. Stewart, J. Mansfield, N. Lyons, and J. Taylor.** 1997. Expression of *avrPphB*, an avirulence gene from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and the delivery of signals causing the hypersensitive reaction in bean. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**(2):247-256.
201. **Rahme, L. G., M.N. Mindrinos, and N.J. Panopoulos.** 1991. Genetic and transcriptional organization of the *hrp* cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* **173**(2):575-586.
202. **Rahme, L. G., M. N. Mindrinos, and N. J. Panopoulos.** 1991. Genetic and transcriptional organization of the *hrp* cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* **173**:575-586.
203. **Rahme, L. G., M.N. Mindrinos, and N.J. Panopoulos.** 1992. Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* **174**(11):3499-3507.
204. **Rechsteiner, M., and S.W. Rogers.** 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* **21**:267-271.
205. **Richter, T. E., A.J. Pryor, J.L. Bennetzen, and S.H. Hulbert.** 1995. New rust resistance genes in plants. *Genetics.* **141**:373-381.
206. **Ritter, C., and J.L. Dangl.** 1995. The *avrRpm1* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* is required for virulence on Arabidopsis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**(3):444-453.
207. **Rogers, S., R. Wells, and M. Rechsteiner.** 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science.* **234**(4774):364-368.
208. **Rogers, S. G., H. Klee, R.B. Horsch, and R.T. Fraley.** 1988. Use of cointegrating Ti plasmid vectors. Sect. A2:1-12. In Gelvin et al. .
209. **Rogers, S. O., and A. J. Bendich.** 1988. Extraction DNA from plant tissues, p. A6:1-10, *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, Belgium.
210. **Roine, E., W. Wei, J. Yuan, E.I. Nurmiaho-Lassila, N. Kalkkinen, M. Romantschuk, and S.Y. He.** 1997. Hrp pilus: An *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:3459-3464.
211. **Roine, E., J. Saarinen, N. Kalkkinen, and M. Romantschuk.** 1997. Purified HrpA of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 reassembles into pili. *FEBS Letters.* **417**:168-172.
212. **Ronald, P. C.** 1998. Resistance gene evolution. *Curr. Opinion Plant Biol.* **1**:294-298.
213. **Rosqvist, R., K-E., Magnusson, and H. Wolf-Watz.** 1994. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE into mammalian cells. *EMBO J.* **13**(4):964-972.
214. **Ryals, J., S. Uknes, and E. Ward.** 1994. Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol.* **104**:1109-1112.

215. **Sablowski, R. W. M., D.C. Baulcombe, and M. Bevan.** 1995. Expression of a flower-specific Myb protein in leaf cells using a viral vector causes ectopic activation of a target promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* **92**:6901-6905.
216. **Salmeron, J. M., G.E.D. Oldroyd, C.M.T. Rommens, S.R. Scofield, H-S. Kim, D.T. Lavelle, D. Dahlbeck, and B. J. Staskawicz.** 1996. Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. *Cell.* **86**:123-133.
217. **Salmeron, J. M. a. B. J. S.** 1993. Molecular characterization and hrp dependence of the avirulence gene *avrPto* from *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Mol. Gen. Genet.* **239**:6-16.
218. **Salmond, G. P. C., and P.J. Reeves.** 1993. Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *TIBS.* **18**:7-12.
219. **Salmond, G. P. C.** 1994. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* **32**:181-200.
220. **Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning. A Laboratory manual*, Second ed. Cold Spring Harbor.
221. **Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:5463-5467.
222. **Schmitz, A., C. Josenhans, and S. Suerbaum.** 1997. Cloning and characterization of the *Helicobacter pylori flbA* gene, which codes for a membrane protein involved in coordinated expression of flagellar genes. *J. Bacteriol.* **179**(4):987-997.
223. **Schroth, M. N., D.C. Hildebrand, and N.J.Panopoulos.** 1991. *Phytopathogenic and related plant-associated pseudomonads*, 2nd ed. Springer Verlag.
224. **Schwarz, E. M., D. Antwerp, and I.M. Verma.** 1996. Constitutive phosphorylation of I κ B α by Casein kinase II occurs preferentially at serine 293: requirement for degradation of free I κ B α . *Mol. Cell Biol.* **16**(7):3554-3559.
225. **Shapiro, L.** 1995. The bacterial flagellum:from genetic network to complex architecture. *Cell.* **80**:525-527.
226. **Shen, H., and N.T. Keen.** 1993. Characterization of the promoter of avirulence gene *avrD* from *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *J. Bacteriol.* **175**:5916-5924.
227. **Somssich, I. E., and K. Hahlbrock.** 1998. Pathogen defense in plants-a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* **3**:86-90.
228. **Song, W.-Y., G-L. Wang, L-L. Chen, H-S. Kim, L-Y. Pi, T. Holsten, J. Gardner, B. Wang, W-X. Zhai, and L-H. Zhu.** 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science.* **270**:1804-1806.
229. **Staskawicz, B. J., D., Dahlbeck, and N.T. Keen.** 1984. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:6024-6028.
230. **Sutherland, M. W.** 1991. The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **39**:79-93.
231. **Swarup, S., Y., Yang, M.T. Kingsley, and D.W. Gabriel.** 1992. A *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**:204-213.

232. **Swords, K. M. M., D. Dahlbeck, B. Kearney, M. Roy, and B.J. Staskawicz.** 1996. Spontaneous and induced mutations in a single open reading frame alter both virulence and avirulence in *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria *avrBs2*. J. Bacteriol. **178**:4661-4669.
233. **Tabor, S., and C. C. Richardson.** 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. PNAS. **82**:1074-1078.
234. **Tang, X. Y., R.D. Frederick, J. M. Zhou, D. A. Halterman, Y. L. Jia, and G.B. Martin.** 1996. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of *AvrPto* and *Pto* kinase. Science. **274**:2060-2063.
235. **Tenhaken, R., A. Levine, L. F. Brisson, R.A. Dixon, and C. Lamb.** 1995. Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**:4158-4163.
236. **Toker, A. S., and R. M. Macnab.** 1997. Distinct regions of bacterial flagellar switch protein FliM interact with FliG, FliN and CheY. J. Mol. Biol. **273**:623-634.
237. **Van den Ackerveken, G., E. Marois, and U. Bonas.** 1996. Recognition of the bacterial avirulence protein *avrBs3* occurs inside the host plant cell. Cell. **87**:1307-1316.
238. **Van Gijsegem, F., S. Genin, and C. Boucher.** 1993. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. Trends Microbiol. **1**:175-180.
239. **Van Gijsegem, F., C. Gough, C. Zischek, E. Niqueux, M. Arlat, S. Genin, P. Barberis, S. German, P. Castello, and C. Boucher.** 1995. The *hrp* locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. Mol. Microbiol. **15**(6):1095-1114.
240. **Van Loon, L. C.** 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. Eur.J.Plant Pathol. **103**:753-765.
241. **Vivian, A., and M.J. Gibbon.** 1997. Avirulence genes in plant-pathogenic bacteria: signals or weapons? Microbiology. **143**:693-704.
242. **Vogler, A. P., M. Homma, V.M. Irikura, and R.M. Macnab.** 1991. *Salmonella typhimurium* mutants defective in flagellar filament regrowth and sequence similarity of FliI to F₀F₁, vacuolar and archaeobacterial ATPase subunit. .
243. **von Heijne, G.** 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucl. Acids Res. **14**:4683-4690.
244. **Walker, J. E., M. Saraste, M.J. Runswick, and N. J. Gay.** 1982. Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. EMBO J. **1**:945-951.
245. **Walker, J. E., M. Saraste, and N. J. Gay.** 1984. The *unc* operon nucleotide sequence, regulation and structure of ATP-synthase. Biochim. Biophys. Acta. **768**:164-200.
246. **Wandersman, C., and P. Delepelaire.** 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for haemolysin secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**:4776-4780.

247. **Wang, H., J. Li, R.M. Bostock, and D.G. Gilchrist.** 1996. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell*. **8**:375-391.
248. **Watarai, M., T. Tobe, M. Yoshikawa, and C. Sasakawa.** 1995. Contact of *Shigella* with host cells triggers release of Ipa invasins and is an essential function of invasiveness. *EMBO J.* **14**(11):2461-2470.
249. **Wattiau, P., B. Bernier, P. Deslee, T. Michiels, and G. R. Cornelis.** 1994. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:10493-10497.
250. **Wattiau, P., and G. R. Cornelis.** 1993. SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in the secretion of YopE. *Mol. Microbiol.* **8**(1):123-131.
251. **Wei, Z.-M., and S.V. Beer.** 1995. *hrpL* activates *Erwinia amylovora* *hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of σ factors. *J. Bacteriol.* **177**:6201-6210.
252. **Wei, Z. M., B.J. Sneath, and S.V. Beer.** 1992. Expression of *Erwinia amylovora* *hrp* genes in response to environmental stimuli. *J. Bacteriol.* **174**:1875-1882.
253. **Wei, Z. M., R.J. Laby, C.H. Zumoff, D.W. Bauer, S.Y. He, A. Collmer, and S.V. Beer.** 1992. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science.* **257**:85-88.
254. **Wengelnik, K., C. Marie, M. Russel, and U. Bonas.** 1996. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. *J. Bacteriol.* **178**:1061-1069.
255. **Wengelnik, K. a. U. B.** 1996. HrpXv, n AraC-type regulator, activates expression of five out of six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *J. Bacteriol.* **178**:3462-3469.
256. **Whitham, S., S.P. Dinesh-Kumar, D. Choi, R. Hehl, C. Corr, and B. Baker.** 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to Toll and the Interleukin-1 receptor. *Cell.* **78**:1101-1115.
257. **Winans, S. C., D.L., Burns, and P.J. Christie.** 1996. Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol.* **4**:64-68.
258. **Woestyn, S., A. Allaoui, P. Wattiau, and G.R. Cornelis.** 1994. YscN, the putative energizer of the *Yersinia* Yop secretion machinery. *J. Bacteriol.* **176**(6):1561-1569.
259. **Xiao, Y., S. Heu, J. Yi, Y. Lu, and S.W. Hutcheson.** 1994. Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. *J. Bacteriol.* **176**:1025-1036.
260. **Xiao, Y., and S.W. Hutcheson.** 1994. A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs expression of pathogenicity and host range determinants in *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* **176**:3089-3091.
261. **Yamaguchi, S. S.-I. A., M. Kihara, M. Isomura, C. J. Jones, and R. M. Macnab.** 1986. Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **168**:1172-1179.

262. **Yoder, O. C.** 1980. Toxins in pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* **18**:103-129.
263. **Yoshida, M., W.S. Allison, F.S. Esch, and M. Futai.** 1982. The specificity of carboxyl group modification during the inactivation of the *Escherichia coli* F₁-ATPase with dicyclohexyl [¹⁴C] carbodiimide. *J. Biol. Chem.* **257**:10033-10037.
264. **Yoshimura, S., U. Yamanouchi, Y. Katayose, S. Toki, Z-X. Wang, I. Kono, N. Kurata, M. Yano, N. Iwata, and T. Sasaki.** 1998. Expression of *Xal*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:1663-1668.
265. **Young, J. M., D.W. Dye, J.F. Brandburg, C.G. Panagopoulos, and C.F. Robbs.** 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *N.Z.J. Agri. Res.* **21**:153-177.
266. **Young, N. D.** 1990. Potential applications of map-based cloning to plant pathology. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **37**:81-94.
267. **Zhao, R. N., H. J. Pathak, T.S. Reese, and S. Khan.** 1996. FliN is a major structural protein of the C ring in the *Salmonella typhimurium* flagellar basal body. *J. Mol. Biol.* **261**:195-208.
268. **Zhou, J., Y-T. Loh, R.A. Bressan, and G. Martin.** 1995. The tomato gene *Ptil* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. *Cell.* **83**:925-935.
269. **Zhou, J. X. T., and G.B. Martin.** 1997. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a *cis*-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J.* **16**(11):3207-3217.
270. **Zimmermann, S. T. N., J-M. Frachisse, W. Wirtz, J. Guern, R. Hedrich, and D. Scheel.** 1997. Receptor-mediated activation of a plant Ca⁺²-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:2751-2755.