

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



UNIVERSITY OF CRETE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Διδακτορική Διατριβή

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ Φ. ΣΑΡΡΗΣ

*Γονιδιωματική εξόρυξη και λειτουργική αξιολόγηση
βακτηριακών παραγόντων παθογένειας και μελέτη
μηχανισμών αλληλεπίδρασης Παθογόνου-Ξενιστή*



ΗΡΑΚΛΕΙΟ

Ιούνιος 2009

**Γονιδιωματική εξόρυξη και λειτουργική αξιολόγηση
βακτηριακών παραγόντων παθογένειας και μελέτη
μηχανισμών αλληλεπίδρασης Παθογόνου-Ξενιστή**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ Φ. ΣΑΡΡΗΣ

**Διπλωματούχος Μοριακής Βιολογίας, Παν/μίου *St. Kliment Ohridski*,
Sofia, 2000**

**Υποβλήθηκε ως μέρος των απαιτήσεων για τον τίτλο
του Διδάκτορα Βιολογικών Επιστημών
με έμφαση στη Μοριακή Μικροβιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών
στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης**

Επιβλέπον Καθηγητής: Ν. Ι. Πανόπουλος

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Πανόπουλος Ν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Καλαντίδης Κ. Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Σκαράκης Γ. Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Πανόπουλος Ν. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Καλαντίδης Κ. Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Σκαράκης Γ. Καθηγητής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών

Κοκκινίδης Μ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Κοτζαμπάσης Κ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Βερβερίδης Φ. Καθηγητής Τ.Ε.Ι. Κρήτης

Ντούλης Α. Ερευνητής Γ' ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.

στην μητέρα μου Αγγελική
(που δεν είναι πια κοντά μας)
στον πατέρα μου Φίλιππο
στην γυναίκα μου Γαλάτεια
στον γιό μου Φίλιππο

τα μυστικά της γνώσης ήταν, είναι και θα είναι εκεί,
περιμένοντας καρτερικά να αποκαλυφθούν σε αυτούς που
κοιτώντας βλέπουν λίγο πιο μακριά.....

Sarr.P.

ΠΡΟΛΕΓΟΜΕΝΑ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή διεκπεραιώθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιοτεχνολογίας Φυτών του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Νικολάου Πανόπουλου και της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής που αποτελούνταν από τους καθ. Ν. Πανόπουλο, καθ. Γ. Σκαράκη και επ. καθ. Κ. Καλαντίδη. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έκρινε επταμελής επιτροπή αποτελούμενη από τους προαναφερθέντες και τους καθ. Μ. Κοκκινίδη, καθ. Κ. Κοτζαμπάση, καθ. Φ. Βερβερίδη και τον Δρ. Α. Ντούλη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για την συνεργασία, την υπομονή και τις εύστοχες παρατηρήσεις.

Με την ολοκλήρωση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής νιώθω ότι κλείνει ένας μεγάλος κύκλος σπουδών στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, ο οποίος ξεκίνησε τον Οκτώβριο του 2001. Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω την υπεύθυνη του μεταπτυχιακού προγράμματος «Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών» καθηγήτρια Κ. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη.

Αισθάνομαι επίσης την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον επίβλεπonta καθηγητή μου και ακαδημαϊκό μέντορα μου καθ. Ν. Πανόπουλο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω δίπλα του ανακαλύπτοντας τον κόσμο της Μοριακής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών. Πέρα από άριστος επίβλεπων, ο κ. Πανόπουλος είναι και ένας καταπληκτικός ακαδημαϊκός δάσκαλος έχοντας πάντα μία άκρως διασαφηνιστική και ολοκληρωμένη απάντηση σε κάθε επιστημονικό ερώτημα που του έδεται.

Νιώθω επίσης την ανάγκη να ευχαριστήσω τους συνεργάτες και φίλους από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών για τις ατελείωτες ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο. Τον Δρ. Νίκο Σκανδάλη και τις υποψήφιες επί διδακτορικό φοιτήτριες Μαρίνα Μπαστάκη και Σπυριδούλα Χαρόβα, καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα Mochamed Abdelhalim.

Οφείλω επίσης να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους τους «εκκολαπτόμενους» ερευνητές που πέρασαν από το εργαστήριο και βρέθηκαν υπό την επίβλεψη μου. Την Μαρία Τζανοπούλου, τους υποψήφιους διδάκτορες Θανάση Δαλακούρα και Νικόλα Βρεττό, τον Χρήστο Ξένο, την Αθανασία Αγιομυργιαννάκη, τον Νίκο Δελημπαλταδάκη, τον Σωτήρη Ζερβέα, τον Γιώργο Λαγιώτη, την Αρετή Γαυριλάκη, την Δέσποινα Καπανταϊδάκη, και τέλος την Αντιγονίτσα (Αντιγόνη Παπανικολάου).

Θα ήταν παράληψη να μην ευχαριστήσω τα παιδιά από τα εργαστήρια Μοριακής Βιολογίας Φυτών (Δρ. Αλεξάνδρα Μπούτλα, Έλενα Νταντάμη, Τασούλη Αλεξιάδη, Heiko Schumacher, Jutta Helm, Κώστα Καραντεμίρη) και την Σεργία Τζωρτζακάκη. Καθώς και τους φίλους και συνεργάτες από το εργαστήριο Φυσιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών (Δρ. Στάσα Παπαδάκη, Δρ. Δάκη Σκοπελίτη, Δρ. Κώστα Πασχαλίδη, τους υποψήφιους διδάκτορες Τίμη Ανδρώνη και Πάνο Μόσχου και τον “kolega” Χρήστο Βελάνη).

Εσχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κουμπάρο μου και «συναγωνιστή» Δρ. Μάνο Τραντά που μαζί ξεκινήσαμε και ολοκληρώσαμε αυτόν

τον μακρύ δρόμο των μεταπτυχιακών σπουδών στο Παν/μιο Κρήτης και τον οποίο νιώθω πλέον ως δικό μου άνθρωπο.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ (και πολλά φιλιά) στην γυναίκα μου Γαλάτεια Κοκκινάκη-Σαρρή (για την ατελείωτη υπομονή της) και στον γιό μου Φίλιππο που ήρθε στην ζωή μας κατά την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της Διατριβής.

Προλεγόμενα	I
Περίληψη	III
Abstract	V

Κεφάλαιο 1^ο

ΜΕΛΕΤΗ ΝΕΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ.....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	1
<i>Αλληλεπίδραση Παθογόνου-Ξενιστή</i>	2
<i>Gram-αρνητικά παθογόνα βακτήρια</i>	3
<i>Επίπεδα άμυνας των φυτών</i>	17
<i>Πρωτεΐνες τελεστές ή πρωτεΐνες παθογένειας τύπου III (type III effectors)</i>	19
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	35
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	36
ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΕΞΟΥΥΞΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΝΕΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ.....	36
<i>Εντοπισμός νέων πιθανών πρωτεϊνών παθογένειας (T3EPs)</i>	36
<i>Εντοπισμός πιθανών γενομικών νησίδων που κωδικοποιούν T6SS στα φυτοπαθογόνα βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i></i>	49
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	57
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	59
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	67

Κεφάλαιο 2^ο

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΡΡΟΗΣ ΤΩΝ ΤΥΠΟΥ III ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΙΓΗΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΞΕΝΙΣΤΩΝ.....	78
ΕΙΣΑΓΩΓΗ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	78
<i>Εμπλοκή του Μηχανισμού γονιδιακής σίγησης στην άμυνα των φυτών</i>	86
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	92
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	94
<i>Εντοπισμός λειτουργικών περιοχών των T3EPs που είναι υπεύθυνες για την ενίσχυση της γονιδιακής σίγησης</i>	105
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	110
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	114
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	121

Κεφάλαιο 3^ο

Η ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΩΝ ΠΟΛΥΑΜΙΝΩΝ ΣΤΟΝ ΠΕΡΙΠΛΑΣΜΙΚΟ ΧΩΡΟ ΕΝΙΣΧΥΕΙ ΤΗΝ ΑΝΤΟΧΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΤΑ ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΩΜΥΚΗΤΕΣ	125
ΕΙΣΑΓΩΓΗ : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	125
<i>Άμυνα των φυτών σε μικροβιακά παθογόνα: η αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response-HR)</i>	127
<i>Πολυαμίνες και ανθεκτικότητα σε φυτοπαθογόνα</i>	129
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΝΟΤΗΤΑΣ	131
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	134
<i>Ο μεταβολισμός των πολυαμινών μεταβάλλεται στις συμβατές αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων</i>	134
<i>Οι συμβατές αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του αποπλαστικού H₂O₂</i>	134

Περιεχόμενα

Διδακτορική Διατριβή Π. Φ. Σαρρής

Τα S-ΡΑΟ διαγονιδιακά φυτά καπνού παρουσιάζουν αντοχή σε μολυσματικό στέλεχος παθογόνου βακτηρίου, σε ένα ημιβιότροφο ωομύκητα αλλά όχι και σε παθογόνο ιό.....	135
Η υπερέκφραση της ΡΑΟ επάγει βασικές και δευτερογενείς ανοσιακές αποκρίσεις ανεξάρτητες από το SA	137
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	141
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	148
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	151
<u>Κεφάλαιο 4^ο</u>	
ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ «ΤΕΛΕΣΤΕΣ» ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΩΣ «ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ» ΣΤΗΝ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	157
ΕΙΣΑΓΩΓΗ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	157
Σκοπός της εργασίας.....	161
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	163
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	169
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	170
<u>Παράρτημα</u>	172
<u>Δημοσιεύσεις</u>	180

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εντατικές έρευνες, της τελευταίας κυρίως εικοσαετίας, εστιάζονται στην κατανόηση των βασικών μηχανισμών αλληλεπίδρασης των παθογόνων μικροοργανισμών με τους ξενιστές τους, τόσο τους μηχανισμούς παθογένειας των μικροοργανισμών όσο και τους μηχανισμούς άμυνας των ξενιστών τους, σε μοριακό επίπεδο. Αν και οι γνώσεις μας σχετικά με τα παραπάνω παραμένουν ελλιπείς, σημαντική πρόοδος έχει επιτευχθεί μέσω της εφαρμογής μοριακών τεχνικών και βιοπληροφορικών εργαλείων στη μελέτη επιλεγμένων παθοσυστημάτων. Ειδικότερα, η διαδεσιμότητα της πλήρους αλληλουχίας των γονιδιωμάτων διάφορων παθογόνων μικροοργανισμών ή/και των ξενιστών τους, παρέχουν τη δυνατότητα στους ερευνητές να εμβαδύνουν περισσότερο στους μοριακούς/κυτταρικούς μηχανισμούς αλληλεπίδρασης παθογόνου-ξενιστή.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή (Δ.Δ.) χωρίζεται σε τέσσερις διακριτές ενότητες. Στην 1^η ενότητα παρουσιάζεται η βιοπληροφορική και λειτουργική ανάλυση δύο πιθανών νέων βακτηριακών πρωτεϊνών «τελεστών» παθογένειας που εκκρίνονται από το εκκριτικό σύστημα τύπου III (*type III effector proteins, T3EPs*) του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* στέλεχος B728a καθώς και ομολόγων τους από άλλους παθότυπους του είδους *P. syringae*. Ακολουθούν τα αποτελέσματα από την βιοπληροφορική ανάλυση και την γονιδιωματική εξόρυξη πιθανών γενετικών νησίδων που σχετίζονται με την κωδικοποίηση εκκριτικών συστημάτων τύπου VI (*T6SS*) στα στελέχη των τριών παθότυπων του είδους *P. syringae* για τα οποία είναι πλήρως γνωστές οι γονιδιωματικές αλληλουχίες. Τα στελέχη αυτά φαίνεται να φέρουν από μία έως δύο γονιδιακές νησίδες με υψηλή ομολογία και συνταίνια με μια γονιδιακή νησίδα που κωδικοποιεί ένα εκ των τριών *T6SS* του πολυπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*.

Στην 2^η ενότητα της Δ.Δ. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της λειτουργικής αξιολόγησης βακτηριακών *T3EPs* ως προς την επίδραση τους στους μηχανισμούς γονιδιακής σίγησης που διαμεσολαβούνται από *RNA* (*RNA mediated gene silencing*) στα φυτά, και πιο συγκεκριμένα στον μηχανισμό της μετά-μεταγραφικής γονιδιακής σίγησης (*Post transcriptional gene silencing, PTGS*). Τα αποτελέσματα αυτά αποκάλυψαν ότι ορισμένοι *T3EPs* των φυτοπαθογόνων βακτηρίων επιδρούν στα μονοπάτια επαγωγής μεταγραφικής σίγησης γονιδίων στα φυτά. Ερευνήθηκαν μια σειρά *T3EPs* από διαφορετικούς παθότυπους (*pathovars*) του είδους *P. syringae* και διαπιστώθηκε ότι ένας σημαντικός αριθμός αυτών επηρεάζει θετικά την επαγωγή της *PTGS* του γονιδίου *GFP* στο φυτό *N. benthamiana* ενώ ένας τουλάχιστον *T3EP* φαίνεται να δρα κατασταλτικά. Τα πειράματα αυτά ανέδειξαν ένα νέο τρόπο δράσης ορισμένων *T3EPs* και έδωσαν τη βάση για την ανάπτυξη μιας νέας βιοδοκιμής για το λειτουργικό χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών αυτών. Φαίνεται ότι τα φυτοπαθογόνα βακτήρια, όπως και οι ιοί, στρατολογούν ειδικές πρωτεΐνες οι οποίες στοχεύουν το μηχανισμό γονιδιακής σίγησης του φυτού στα πλαίσια πρόκλησης ασθενειών.

Στην 3^η ενότητα της Δ.Δ. διερευνήθηκε η επίδραση της περιπλάσμιχης οξειδωσης των πολυαμινών (*PAs*) στην εκδήλωση ανθεκτικότητας σε ένα βιότροφο βακτήριο, ένα ημιβιότροφο ωμούκητα και ένα ιικό παθογόνο. Τεκμηριώνεται ότι φυτά καπνού που υπέρ-εκφράζουν μια οξειδάση των *PAs* (*S-PAO*) έχουν αυξημένα επίπεδα οξειδωσης των *PAs* στον αποπλάστη σε σχέση με φυτά αγρίου τύπου και

αυξημένη μεταγραφή γονιδίων σχετιζόμενων με την διασυστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα (*systemic acquired resistance-SAR*), καθώς και δευτερογενείς αντιδράσεις ανθεκτικότητας που οδηγούν στην ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Η υψηλή ενεργότητα της *PAO* λειτουργεί ως παρεμποδιστικός παράγων στην ανάπτυξη των βακτηρίων και του ωομύκητα στον μεσοκυττάριο χώρο, με αποτέλεσμα τον σημαντικά μειωμένο αποικισμό του ξενιστή. Κατά συνέπεια, η περιπλασμική υπερέκφραση της *PAO* στο φυτό προσδίδει ανθεκτικότητα σε παθογόνα τα οποία αναπτύσσονται στο περιβάλλον του αποπλάστη, και παρουσιάζει ενδιαφέρον από πλευράς γενετικής μηχανικής για την ενίσχυση της αντοχής των φυτών σε βιότροφα ή ημιβιότροφα μικροβιακά παθογόνα.

Στην 4^η ενότητα παρουσιάζεται η συνδυασμένη αξιολόγηση και αξιοποίηση των δεδομένων της γονιδιωματικής έρευνας τόσο σε παθογόνους μικροοργανισμούς (βακτήρια και ιούς) όσο και των οικονομικής σημασίας φυτικών ειδών, αλλά και φυτών μοντέλων, για την ανάπτυξη ενός πρωτότυπου πακέτου «Λειτουργικών Δεικτών» ή «Βιοδεικτών» για την εφαρμογή του σε προγράμματα συμβατικής γενετικής βελτίωσης καλλιεργούμενων φυτών για ανθεκτικότητα σε ασθένειες. Από τα αποτελέσματα καταδεικνύεται η παραπάνω δυνατότητα με τη χρήση γονιδίων/πρωτεϊνών αμολυσματικότητας προερχόμενων από επιλεγμένους παθογόνους μικροοργανισμούς και ιούς.

SUMMARY

Intensive research during the last two decades has increasingly focused on the elucidation of the molecular basis of host-pathogen interactions in plant disease. Although many aspects of the genetic, molecular and biochemical basis of microbial and viral pathogenicity and host resistance remain unknown, significant progress has been made in the understanding of basic mechanisms of pathogenicity and host responses during pathogen invasion and host colonization. The availability of complete genome sequences of several pathogenic microorganisms and some their hosts, enables researchers to explore in greater depth the molecular/cellular mechanisms of host-pathogen interactions, focusing on selected model pathogens and model plants.

This doctoral dissertation is divided in four chapters. The 1st chapter presents the results of bioinformatic and functional analysis of two putative new bacterial type III effector proteins (T3EPs) from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and other *P. syringae* pathovars. Furthermore, the in silico analysis and genomic mining for putative type VI secretion systems (T6SSs) coded by genomic islands of three *P. syringae* pathovars with fully sequenced genomes. These strains carry one or two putative genomic loci with significant degree of homology and synteny to a T6SS locus from *P. aeruginosa*.

The 2nd chapter presents the results of investigations on the role of T3EPs on the RNA mediated gene silencing in plants. These studies revealed that transient expression of genes coding certain bacterial T3SPs, which did not elicit HR in transgenic *Nicotiana benthamiana* line 16C, enhanced GFP silencing following agro-delivery of GFP and effector gene expressing cassettes. In addition, it was shown that these T3SPs increased GFP-specific siRNA as well as nat-siRNAs and lsiRNAs accumulation levels. These effects were blocked by two viral silencing suppressors that were tested. Further analysis using genetic truncations and site directed mutants showed that the silencing enhancer activity does not involve the receptor-recognition domains of T3EPs. Our results suggest that a subset of *P. syringae* T3SPs engage the small RNA accumulation pathways in plants, thus providing evidence for a novel function and a basis for a novel functional assay for T3SPs. It appears that phytopathogenic bacteria, like plant viruses, deploy specific protein effectors to manipulate the host RNA silencing machinery in order to cause disease.

In the 3rd chapter, the results of manipulating apoplastic oxidation of polyamines (PAs) on plant responses to various plant pathogens are presented. In wild-type tobacco (*Nicotiana tabacum* ‘Xanthi’) plants, infection by the compatible pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* resulted in increased expression of the endogenous polyamine oxidase (PAO) gene and corresponding PAO enzyme activities. Polyamine homeostasis was maintained by induction of the arginine decarboxylase pathway and spermine exodus to the apoplast, where it was oxidized by the enhanced apoplastic PAO, resulting in higher accumulation of hydrogen peroxide. Plants overexpressing PAO in the apoplast showed increased tolerance against the biotrophic bacterium *P. syringae* pv. *tabaci* and the hemibiotrophic oomycete *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, but not against the *Cucumber mosaic virus*. Furthermore, in

transgenic PAO-overexpressing plants, systemic acquired resistance marker genes as well as a pronounced increase in the cell wall-based defense were found before inoculation. These results reveal that PAO is a nodal point in apoplast-localized plant-pathogen interactions, and signals parallel defense responses prior to infection, thus preventing pathogen colonization. This strategy presents a novel approach for producing transgenic plants resistant to a broad spectrum of biotrophic plant pathogens.

Finally, the 4th chapter presents a new approach to the valorization of genomic sequences data for various plant pathogens (bacteria and viruses) and host plants, for the development of a prototype molecular toolkit for disease resistance breeding and functional genome analysis in plants. In this chapter, is presented the “proof of concept” for the use of pathogen effectors as “*Functional Markers*” for conventional disease resistance breeding, based on *R-avr* gene interactions to detect, the presence/absence or co-segregation, of functional R gene alleles in a breeding population.

Κεφάλαιο 1^ο

Στο 1ο κεφάλαιο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής παρουσιάζεται η κύρια και γενική εισαγωγή. Στις σελίδες που ακολουθούν παρουσιάζεται μια επισκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τις σχέσεις παθογόνου-ξενιστή επικεντρωμένη στη μοριακή βάση και μηχανισμούς αλληλεπιδράσεων φυτών-παθογόνων. Στην συνέχεια παρουσιάζονται πειραματικά δεδομένα και αποτελέσματα της λειτουργικής και βιοπληροφορικής μελέτης καινοφανών βακτηριακών παραγόντων παθογένειας και παρατίθεται η σχετική βιβλιογραφία.

Μελέτη νέων βακτηριακών παραγόντων παθογένειας.

Εισαγωγή: Θεωρητικό υπόβαθρο

Οι διάφορες μορφές ζωής στην Γη ταξινομούνται με βάση ένα ευρέως αναγνωρισμένο σύστημα ιεράρχησης που αντικατοπτρίζει τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των οργανισμών. Οι κύριες ταξινομικές ομάδες (*taxa*), είναι: το *είδος*, το *γένος*, η *οικογένεια*, η *τάξη*, η *κλάση*, το *φύλο* και το *βασιλείο*. Σήμερα, οι περισσότεροι βιολόγοι κατατάσσουν τους ζωντανούς οργανισμούς σε πέντε βασιλεία: 1. *Μονήρη* (βακτήρια, κυανοβακτήρια και αρχαία), 2. *Πρώτιστα* (μικροφύκη και πρωτόζωα), 3. *Μύκητες* (μανιτάρια, μούχλες), 4. *Ζώα* και 5. *Φυτά*.

Η επιβίωση και η επικράτηση των οργανισμών στα διάφορα οικοσυστήματα εξαρτάται άμεσα από τις αλληλεπιδράσεις / σχέσεις τους με τους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες του εκάστοτε οικοσυστήματος. Τα διαφορετικά είδη σχέσεων των οργανισμών ενός οικοσυστήματος ταξινομούνται σε επτά κύριες κατηγορίες (Πίνακας 1).

Ένας τύπος αλληλεπίδρασης μεταξύ των βιοτικών παραγόντων στα διάφορα οικοσυστήματα είναι και ο παρασιτισμός. Με αυτό το είδος αλληλεπίδρασης πρόκειται να ασχοληθούμε στην συνέχεια. Στα πλαίσια του των παρασιτικών σχέσεων, κατατάσσονται και οι αλληλεπιδράσεις των παθογόνων μικροβίων με τους ξενιστές τους.

Επίδραση στον οργανισμό Α	Επίδραση στον οργανισμό Β	Είδος Σχέσεις	Γενική Περιγραφή Σχέσης
0	0	<i>Ουδετερότητα</i>	Ελλειψη αλληλεπίδρασης
+	0	<i>Ομοσιτισμός</i>	Ένας οργανισμός ευνοείται, ο άλλος δεν επηρεάζεται
-	-	<i>Ανταγωνισμός</i>	Σχέση που αποβαίνει σε βάρος και των δύο
+	+	<i>Συνεργασία</i>	Σχέση με αμοιβαίο όφελος μη υποχρεωτική
+	+	<i>Αλληλεξάρτηση</i>	υποχρεωτική σχέση με αμοιβαίο όφελος
+	-	<i>Παρασιτισμός</i>	Ο οργανισμός που ευνοείται (παράσιτο) είναι συνήθως μικρότερος από αυτόν που βλάπτεται (ξενιστής)
+	-	<i>Θήρευση</i>	Ο οργανισμός που ευνοείται (θηρευτής) είναι συνήθως μεγαλύτερος από αυτόν που βλάπτεται (θήραμα)

Πίνακας 1: τύποι σχέσεων που απαριθμούνται σύμφωνα με την επίδραση που έχουν.

"0" δεν υπάρχει καμία επίδραση.

"-" είναι καταστρεπτική.

"+" είναι ευεργετική.

Αλληλεπίδραση Παθογόνου-Ξενιστή

Εντατικές έρευνες, της τελευταίας κυρίως εικοσαετίας, εστιάζονται στην κατανόηση των βασικών μηχανισμών αλληλεπίδρασης των παθογόνων μικροοργανισμών με τους ξενιστές τους σε «μοριακό επίπεδο». Οι ερευνητές προσπαθούν να διαλευκάνουν τόσο τους μηχανισμούς παθογένειας των μικροοργανισμών όσο και τους μηχανισμούς άμυνας των ξενιστών τους. Όσον αφορά σε βακτηριακά παθογόνα, κατά τις τελευταίες δυο δεκαετίες επεκράτησε η αντίληψη ότι ορισμένοι βασικοί μηχανισμοί παθογένειας είναι «συντηρημένοι» σε παθογόνα φυτών, ασπόνδυλων και θηλαστικών. Πιθανολογείται επίσης η κοινή εξελικτική προέλευση των μηχανισμών αυτών με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται ως φυλογενετικά συντηρημένοι.

Αν και πολλά παραμένουν ακόμα άγνωστα για την μοριακή βάση των αλληλεπιδράσεων ξενιστών-παθογόνων βακτηρίων, σημαντική πρόοδος έχει επιτευχθεί μέσω της ανάπτυξης μοριακών τεχνικών και εργαλείων που βοηθούν προς την κατεύθυνση αυτή. Με τον τρόπο αυτό διευκολύνεται η κατανόηση των μηχανισμών παθογένειας, και σε σημαντικό βαθμό και ο ρόλος του ξενιστή κατά τη διάρκεια της εισχώρησης και του αποικισμού του από τα παθογόνα.

Ειδικότερα, η διαθεσιμότητα της πλήρους αλληλουχίας των γονιδιωμάτων διάφορων παθογόνων μικροοργανισμών, αλλά και των ξενιστών τους, παρέχουν τη δυνατότητα

Εισαγωγή

στους ερευνητές να εμβαθύνουν περισσότερο στους μοριακούς/κυτταρικούς μηχανισμούς των αλληλεπιδράσεων παθογόνου-ξενιστή.

Στην συνέχεια θα αναφερθούμε εκτενέστερα τους μηχανισμούς παθογένειας των αρνητικών κατά *Gram* παθογόνων βακτηρίων, καθώς και τους μηχανισμούς άμυνας των ξενιστών τους.

Gram-αρνητικά παθογόνα βακτήρια

Τα κατά *Gram* αρνητικά παθογόνα βακτήρια χρησιμοποιούν κοινές στρατηγικές για την αποίκηση και πρόκληση ασθενειών σε φυτικούς και ζωικούς ξενιστές. Η πλειονότητα των παθογόνων αυτών έχουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης ως προς τους ευκαρυωτικούς ξενιστές τους, αν και ορισμένα στελέχη, όπως το στέλεχος *PA14* του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*, είναι ικανά να προσβάλουν τόσο φυτικούς όσο και ζωικούς ξενιστές (π.χ. *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, ποντίκι και άνθρωπο). Η μελέτη μεταλλαγμάτων του στελέχους *PA14* επέτρεψε τον προσδιορισμό διαφόρων βακτηριακών παραγόντων παθογένειας που εμπλέκονται στην εκδήλωση της μόλυνσης τόσο στην *Arabidopsis* όσο και στα ποντίκια (Rahme, et. al. 2002). Η συμβολή των κοινών παραγόντων παθογένειας στη βακτηριακή μολυσματικότητα σε φυτικούς και ζωικούς ξενιστές, έχει αποκαλυφθεί επίσης από μελέτες σε διάφορα άλλα βακτηριακά είδη παθογόνων, όπως στα παθογόνα των θηλαστικών *Yersinia*, *Salmonella* και *Shigella*, και των φυτοπαθογόνων *Erwinia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas spp.*

Η εντατική μελέτη των μηχανισμών παθογένειας των παραπάνω μικροοργανισμών αποκάλυψε ότι ο αποικισμός και η πρόκληση της ασθένειας καθορίζεται από μια ποικιλία εξωκυτταρικών παραγόντων όπως πολυσακχαρίτες, αντχεσίνες (πρωτεΐνες πρόσφυσης, *adhesins*), τοξίνες, καθώς και ένζυμα αποδόμησης πολυμερών δομικών συστατικών του ξενιστή (π.χ. το κυτταρικό τοίχωμα στα φυτά), (Buttner, and Bonas, 2003). Αποκάλυψε επίσης ότι πέραν των εξωκυτταρικών παραγόντων παθογένειας, η παθογόνος ικανότητα των *Gram*-αρνητικών βακτηρίων βασίζεται άμεσα στην ύπαρξη πλειάδας παραγόντων πρωτεϊνικής φύσης. Οι πρωτεΐνες αυτές αναφέρονται συλλογικά ως «παράγοντες/πρωτεΐνες παθογένειας ή παθογόνου ισχύος» (*pathogenicity or virulence factors/proteins*). Οι παράγοντες αυτοί είτε εντοπίζονται στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου, είτε εκκρίνονται στο διακυττάριο χώρο, είτε εισάγονται απ' ευθείας στα κύτταρα του ξενιστή με την βοήθεια ειδικών συστημάτων πρωτεϊνικής έκκρισης/διαμετακόμισης. (Fouts et. al. 2002).

Βακτηριακοί μηχανισμοί πρωτεϊνικής έκκρισης / διαμετακόμισης

Τα *Gram*-αρνητικά παθογόνα βακτήρια εκκρίνουν ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών στις λειτουργίες των οποίων περιλαμβάνονται α) η βιογένεση οργανιδίων όπως τα συζευκτικά κανάλια (*pili*) και τα μαστίγια, β) η απόκτηση θρεπτικών στοιχείων, γ) η μολυσματικότητα και δ) η εκροή τοξινών. Η εξαγωγή αυτών των πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα γίνεται είτε σε διακριτά στάδια (μεταφορά διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης, του περιπλασμικού χώρου, και της εξωτερικής μεμβράνης του κυτταρικού φακέλου) είτε απευθείας στον τελικό τους προορισμό. Τα *Gram*(-) βακτήρια έχουν αναπτύξει διαφόρων ειδών εκκριτικά μονοπάτια ώστε να επιτύχουν την έκκριση των προαναφερθέντων παραγόντων (Πίνακας 2). Αυτά τα μονοπάτια μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κύριες ομάδες: (i) τα *Sec*-εξαρτώμενα και (ii) τα *Sec*-μη εξαρτώμενα συστήματα έκκρισης (*Kostakioti et. al., 2005*) (**Εικ. 1**).

Όνομα	Διαδικασία	Sec-εξαρτώμενο ^a	Gram -	Gram +	Σχόλια
<i>Sec (SRP-Sec)</i>	Εξαγωγή	Ναι	Ναι	Ναι	
<i>YidC</i>	Εξαγωγή και συναρμολόγηση	Μεταβλητό	Ναι	Ναι	Συναρμολόγηση πρωτεϊνών εσωτερικής μεμβράνης
<i>Tat</i>	Εξαγωγή	Ναι	Ναι	Ναι	<i>Tat</i> μεταλλάγματα εμφανίζουν μειωμένη μολυσματικότητα και επαγωγή της <i>HR</i> .
<i>YaeT (Omp85)</i>	Συναρμολόγηση	Ναι	Ναι	Όχι	Συναρμολόγηση πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης
<i>T1SS</i>	Έκκριση	Όχι	Ναι	(Ναι)	Συνήθως μικρού μεγέθους υποστρώματα στα <i>Gram</i> +
<i>T2SS</i>	Έκκριση	Ναι	Ναι	Όχι	Μεταλλάγματα των <i>gspD</i> και <i>gspE</i> έχουν μειωμένη ικανότητα επαγωγής του κυτταρικού θανάτου που συνοδεύεται από χλώρωση
<i>T3SS</i>	Έκκριση	Όχι	Ναι	Όχι	
<i>Flagellum</i>	Έκκριση	Όχι	Ναι	Ναι	Ισοδύναμο με <i>T3SS</i>
<i>T4SS</i>	Έκκριση	Μεταβλητό	Ναι	Ναι	Σύστημα σύζευξης
<i>T4PS</i>	Έκκριση	Ναι	Ναι	Ναι	Ισοδύναμο με <i>T2SS</i>
<i>Auto-secretion (T5SS)</i>	Έκκριση	Ναι	Ναι	Όχι	
<i>T6SS</i>	Έκκριση	Όχι	Ναι	Όχι	
<i>Chaperon usher</i>	Έκκριση	Ναι	Ναι	Όχι	<i>Pili</i>
<i>Esc</i>	Έκκριση	Όχι	Όχι	Ναι	
<i>TPSS</i>	Έκκριση	Ναι	Ναι	Όχι	
<i>Sortase</i>	Έκκριση	Ναι	Όχι	Ναι	<i>Pili</i>

Πίνακας 2. Πρωτεϊνικά συστήματα εξαγωγής, συναρμολόγησης και έκκρισης στα βακτήρια (βάση των: *Economou, et al. 2008; Cunnac, et. al. 2009*).

a. Για τη μεταφερόμενη πρωτεΐνη, η συναρμολόγηση των μηχανημάτων απαιτεί το σύστημα *Sec*, μη εφαρμόσιμο.

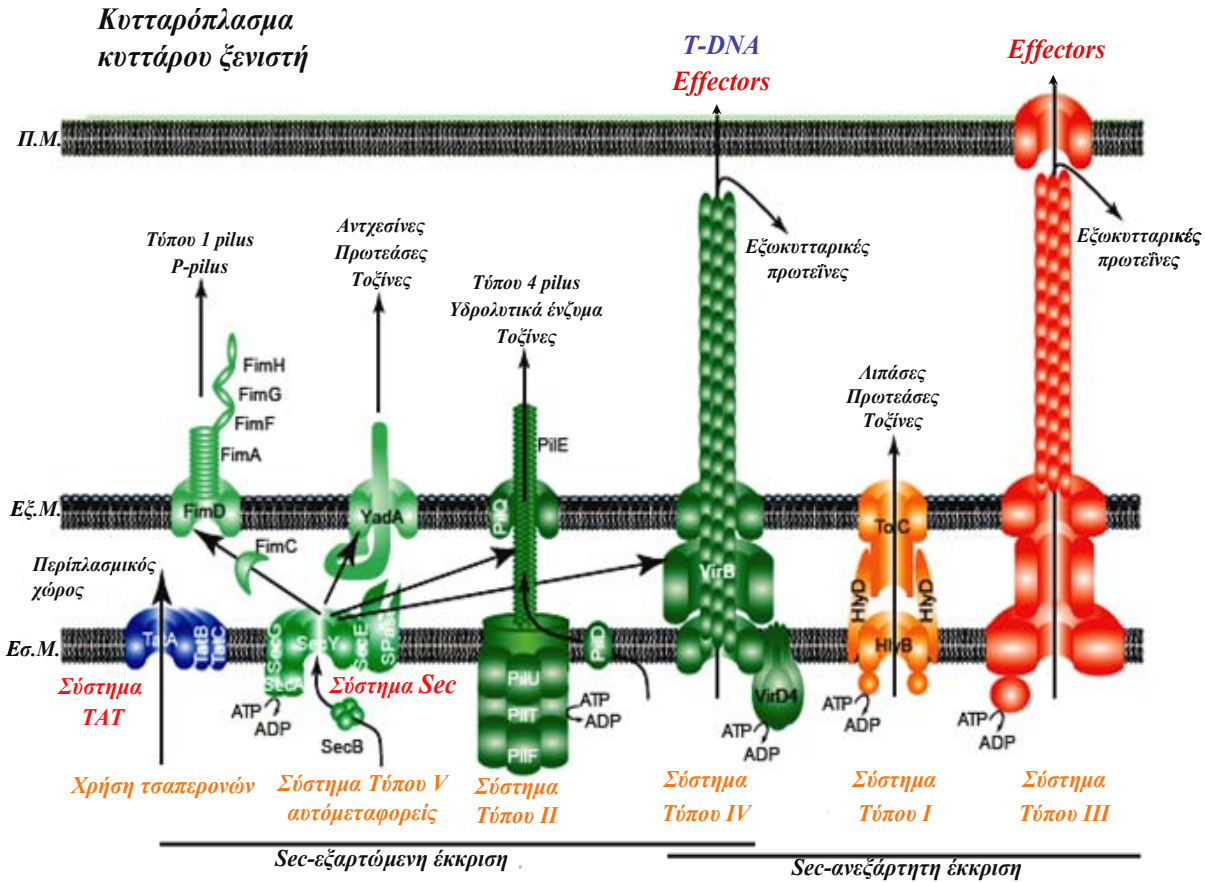
Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω των *Sec*-εξαρτώμενων καναλιών έκκρισης χρησιμοποιούν έναν κοινό μηχανισμό έκκρισης που ονομάζεται *Sec*-τρανσλοκάση (*Sec-translocator*), για τη μεταφορά διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης. Η διαφοροποίηση των καναλιών αυτών βασίζεται κυρίως στον εκκριτικό μηχανισμό διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου (*Stathopoulos, et. al. 2000*). Τα *Sec*-εξαρτώμενα μονοπάτια περιλαμβάνουν το εκκριτικό σύστημα τύπου *II* (*T2SS*), το εκκριτικό σύστημα τύπου *V* (ή *autotransporter*), την δύο-συνεργών έκκριση (*two-partner secretion*) και τα συστήματα έκκρισης τσαπερονών/συνοδών (*Kostakioti, et. al. 2005*). Η έκκριση μέσω του συστήματος τύπου *IV* (*T4SS*), μπορεί να είναι *Sec*-εξαρτώμενη, αλλά συνήθως περιγράφεται ως *Sec*- ανεξάρτητη (*Ding, et. al. 2003*).

Τα *Sec*-ανεξάρτητα μονοπάτια έκκρισης επιτρέπουν την εξαγωγή των πρωτεϊνών από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα στο εξωκυττάριο περιβάλλον σε ένα βήμα και δεν περιλαμβάνουν τους περιπλασμικούς μεσάζοντες. Αυτά τα μονοπάτια περιλαμβάνουν την έκκριση μέσω του συστήματος τύπου *I* (*T1SS*) ή *ABC* (*ATP*-δεσμευτική κασέτα) εξαγωγέων (*Binet, et. al. 1997*) και την έκκριση μέσω του συστήματος τύπου *III* (*T3SS*) (*Hueck, 1998*). Ένα εναλλακτικό *Sec*-ανεξάρτητο μονοπάτι γνωστό ως «μονοπάτι διαμετακόμισης δίδυμης-αργινίνης» (*twin-arginine translocation* ή *Tat*) υιοθετείται για τη μεταφορά των ήδη διπλωμένων πρωτεϊνών, πέρα από την εσωτερική βακτηριακή μεμβράνη. Γενικά, το σύστημα *Tat* εξυπηρετεί τη μεταφορά πρωτεϊνών στον περιπλασμικό χώρο (*Berks, et. al. 2003*). Έχει επίσης αναφερθεί η μεταφορά των *Tat* μεταφερόμενων πρωτεϊνών και διαμέσου της εξωτερικής βακτηριακής μεμβράνης μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου *II*, όπως οι φωσφολιπάσεις του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* (*Vouilhoux et. al. 2001*) (**Εικ. 1**).

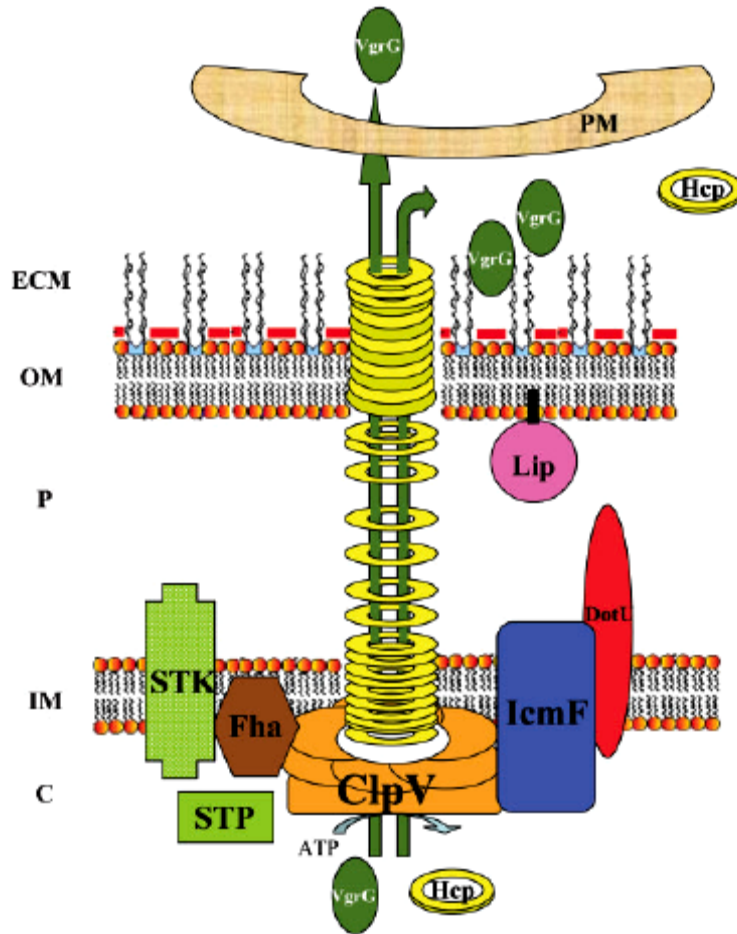
Πρόσφατες μελέτες έχουν οδηγήσει στον προσδιορισμό ενός ακόμα συστήματος έκκρισης, το οποίο ονομάστηκε εκκριτικό σύστημα τύπου *VI* (*T6SS*). Τα δομικά συστατικά του *T6SS* κωδικοποιούνται από νησίδες γονιδίων που ποικίλλουν στην οργάνωση. Αυτές οι νησίδες αρχικά αναφέρονται στην βιβλιογραφία ως *IAHP* (*IcmF-associated homologous proteins*), επειδή περιέχουν ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για έναν γνωστό παράγοντα του *T4SS* τον *IcmF* (*Das & Chaudhuri, 2003*). Αρχικά, όλα ξεκίνησαν με τη διαπίστωση ότι μία γνωστή πρωτεΐνη του *T4SS*, η *IcmF*, κωδικοποιείται μέσα σε μια συντηρημένη, μεταξύ των *Gram*-αρνητικών βακτηρίων, γονιδιακή νησίδα της οποίας όμως τα υπόλοιπα γονίδια δεν έχουν καμία ομολογία με

τα συστατικά γονίδια του T4SS. Έτσι θεωρήθηκε πιθανό τα νέα αυτά γονίδια ίσως να κωδικοποιούν τα συστατικά μιας νέας μηχανής έκκρισης, το T6SS (Εικ. 2).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση συστημάτων έκκρισης τύπου I-V στα Gram (-) βακτήρια. Τα εκκριτικά συστήματα (SSs) I, III και IV (δεξιά) θεωρείται ότι μεταφέρουν τις πρωτεΐνες σε ένα βήμα από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα στη βακτηριακή επιφάνεια και στο εξωτερικό περιβάλλον. Στην περίπτωση των SSs τύπου III και IV, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων στόχων (ξενιστής). Μια εξαίρεση για τον τύπο IV αποτελεί η τοξίνη pertussis του παθογόνου της κοκίτηδας (*Bordetella pertussis*), η οποία εκκρίνεται σε δύο βήματα και απελευθερώνεται στο εξωκυττάριο μέσο. Αυτή η εξαίρεση συνδέει το Sec και τον τύπο IV SS. Οι τύπου II και V SSs μεταφέρουν πρωτεΐνες σε δύο βήματα. Σ' αυτή την περίπτωση, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται αρχικά στον περιπλασμικό χώρο μέσω των συστημάτων Sec ή Tat πριν φθάνουν στην επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων. Το σύστημα έκκρισης τύπου V είναι ένας υποθετικός αυτό-μεταφορέας (autotransporter). Το σύστημα έκκρισης με «χρήση τσαπερονών» ή σύστημα Tat παρουσιάζεται να σχηματίζει κανάλι (pilus) τύπου 1, όπως η ουρο-παθογόνος *E. coli*. Το εκκριτικό σύστημα τύπου II εμφανίζεται να σχηματίζει κανάλι (pilus) παρόμοιο του τύπου 4, όπως στο παθογόνα στελέχη του είδους *Neisseria*.

Εσ.Μ., Εξ.Μ : εσωτερική και εξωτερική βακτηριακή μεμβράνη, αντίστοιχα. **Π.Μ.:** κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή. Όπου χρειάζεται, η υδρόλυση ATP για τη μεταφορά τονίζεται. Τα βέλη δείχνουν τη διαδρομή που ακολουθούν οι μεταφερόμενες πρωτεΐνες.



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του T6SS. Μερικά συστατικά του T6SS υποδεικνύονται στον βακτηριακό κυτταρικό φάκελο (Filloux, *et. al.* 2008). Η ClpV (πορτοκαλί) έχει χαρακτηριστεί ως ATPase, φαίνεται να βοηθά στην μεταφορά παραγόντων όπως η Hcp (κίτρινο) και η VgrG (σκούρο πράσινο) διάμεσο του βακτηριακού κυτταρικού φακέλου. Αν και οι Hcps θα μπορούσαν να εκκρίνονται ανεξάρτητα, εδώ παρουσιάζονται ως κανάλι μέσα και έξω από τον βακτηριακό κυτταρικό φάκελο. Η συσκευή μεταφοράς "VgrG" (σκούρο πράσινο βέλη) θα μπορούσε να εμπλέκεται είτε στην έγχυση του C-άκρου της αδίπλωτης VgrG (σκούρο πράσινο κύκλος) μέσα στο ευκαρυωτικό κύτταρο (ξενιστής), είτε στην απελευθέρωση της VgrG στο περιβάλλον ή στη επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων. Η Lip (ρόδινο) είναι μια υποθετική λιπο-πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης. Οι IcmF (μπλε) και DotU (κόκκινο) είναι πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης.

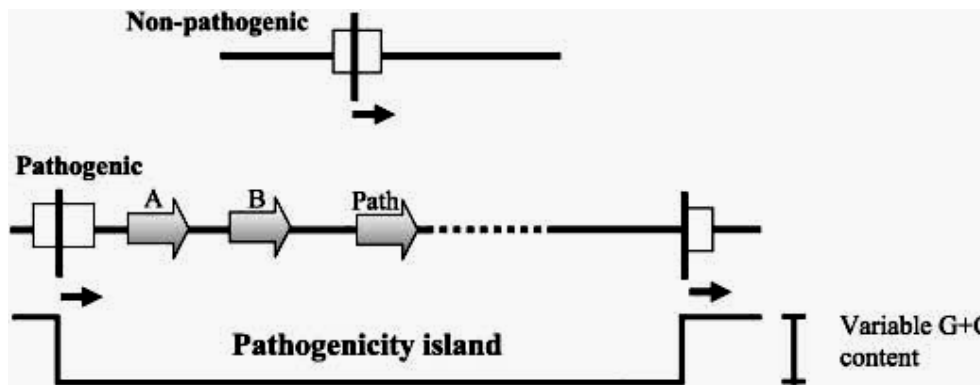
Σε μερικές περιπτώσεις η ClpV έχει αποδειχθεί ότι αλληλεπιδρά με την IcmF. Το επίπεδο της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Fha (καφετιάς) ρυθμίζει τη δραστηριότητα του T6SS. Η STK (διάστικτο ανοικτό πράσινο) είναι μία Ser/Thr κινάση, ενώ η STP (ανοικτό πράσινο) είναι μια Ser/Thr φωσφατάση.

C: βακτηριακό κυτταρόπλασμα, **IM:** βακτηριακή εσωτερική μεμβράνη **P:** βακτηριακός περιπλασματικός χώρος, **OM:** βακτηριακή εξωτερική μεμβράνη **ECM:** εξωκυττάριο περιβάλλον, **PM** (καφετιά ζώνη), κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων του ξενιστή.

Βακτηριακές Νησίδες Παθογένειας (Pathogenicity Islands-PAIs)

Ο όρος «γενομικές νησίδες» (*genomic islands*) ενώνει διαφορετικούς τύπους γενομικών στοιχείων όπως νησίδες συμβίωσης, μεταβολικές νησίδες ή/και νησίδες παθογένειας.

Ως νησίδες παθογένειας (*Pathogenicity Islands-PAIs*) καλούνται τα γενετικά στοιχεία ή μεγάλες περιοχές *DNA* (πάνω από 200 kbp) που κωδικοποιούν παράγοντες-κλειδιά εμπλεκόμενους στην παθογένεια και είναι σποραδικά κατανεμημένα μεταξύ συγγενικών στελεχών. Περιγράφηκαν για πρώτη φορά σε παθογόνα στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli* από τον *Hacker* και τους συνεργάτες του (*Hacker et al. 1990, Hacker et al. 1997*), ο οποίος ανακάλυψε ότι μία περιοχή του χρωμοσώματος παθογόνου στελέχους του βακτηρίου *E. coli* απουσιάζει από μη παθογόνους εκπροσώπους του είδους (**Εικ. 3**).



Εικόνα 3. Διαγραμματική απεικόνιση μία νησίδας παθογένειας. Στο μη παθογόνο στέλεχος, το άσπρο παραλληλόγραμμο αντιπροσωπεύει μια περιοχή-στόχο ενσωμάτωσης του *PAI* στο γονιδίωμα του στελέχους-αποδέκτη, όπως π.χ. ένα γονίδιο που κωδικοποιεί ένα *tRNA*. Η εισαγωγή της νησίδας παθογένειας στην περιοχή του γονιδίου στόχου οδηγεί στο μερικό διπλασιασμό του γονιδίου στόχου καθώς και στην δημιουργία μιας επαναληπτικής αλληλουχίας από κάθε πλευρά της νησίδας. Γονίδιο **Path**: καθοριστικός παράγοντας παθογένεια / μολυσματικότητας, Γονίδια **A** και **B**: μεταβλητά γονίδια που θα μπορούσαν να περιλάβουν π.χ. στοιχεία αλληλουχίας εισαγωγής (*insertion sequence elements*), και γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα τοπο-ειδικού ανασυνδιασμού (π.χ. *integrases* και *transposases*).

Έτσι ο *Hacker* και οι συνεργάτες του (*Hacker et. al. 1997*) καθορίζουν τα *PAIs* ως συστάδες γονιδίων που (i) περιλαμβάνουν πολλά γονίδια μολυσματικότητας, (ii) απαντώνται σποραδικά σε παθογόνα στελέχη, (iii) έχουν διαφορετική αναλογία G/C έναντι του υπολοίπου *DNA* του βακτηρίου ξενιστή, (iv) καταλαμβάνουν μεγάλες χρωμοσωμικές περιοχές, (v) πλαισιώνονται συχνά από επαναλαμβανόμενες γενομικές αλληλουχίες, (vi) οριοθετούνται από γονίδια που κωδικοποιούν *tRNA* και/ή κρυφά μεταθετά στοιχεία, και (vii) είναι ασταθή.

Εισαγωγή

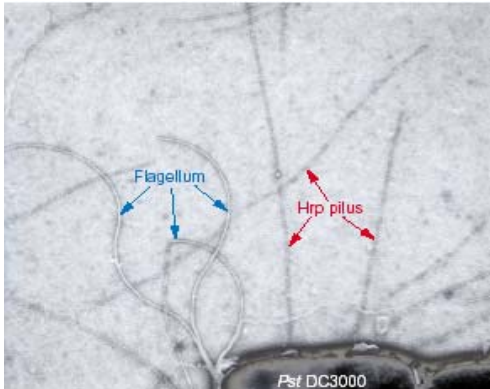
Οι Lawrence και Roth (1996) δημοσίευσαν το «Μοντέλο του εγωιστικού οπερονίου» (*Selfish Operon Model*) το οποίο ίσως προσεγγίζει περισσότερο από άλλα την φυσιολογία των PAIs. Στο μοντέλο τους αυτό δίνουν μια γενική περιγραφή για την ομαδοποίηση, στο βακτηριακό χρωμόσωμα, γονιδίων με κοντινές σχετικά λειτουργίες. Κεντρικό νόημα του *Selfish Operon Model* είναι (i) ο ανασυνδυασμός των γονιδίων και (ii) η επιλογή μέσω της οποίας διατηρούνται συνδυασμοί οι οποίοι προσφέρουν πλεονέκτημα στην αποίκηση του ξενιστή. Το μοντέλο αυτό προϋποθέτει, γενικότερα, ότι επουσιώδη γονίδια (*non-housekeeping genes*) θα ομαδοποιηθούν, ενώ ουσιώδη γονίδια όχι. Με αυτόν τον τρόπο η φυσική επιλογή οδηγεί στην ομαδοποίηση γονιδίων τα οποία επιδρούν στην φυσιολογία του ξενιστή (όπως γονίδια παθογένειας και γονίδια μολυσματικότητας). Έτσι όταν και εφόσον υπάρξουν γονίδια τα οποία προσφέρουν από κοινού κάποιο χαρακτηριστικό επιλογής, ομαδοποιούνται.

Σήμερα έχουμε περιγραφές για PAIs από διάφορα βακτηριακά γένη όπως: α) το *cap PAI* από το *Helicobacter pylori*. Πρόκειται για ένα τμήμα περίπου 40 kb το οποίο συνορεύει με αλληλουχίες των 31 bp και παρατηρείται μόνο σε στελέχη τα οποία σχετίζονται με ασθένειες του γαστρεντερικού συστήματος (Censini, et. al. 1996), β) το βακτήριο *Yersinia pestis* φέρει ένα PAI το οποίο κωδικοποιεί γονίδια που εμπλέκονται στην πρόσληψη σιδήρου μέσω της χηλικής ένωσης (σιδηροφόρου, *siderophore*) *yersiniabactin* (Rakin, et. al. 2001), γ) στο βακτήριο *Salmonella typhimurium* έχει εντοπιστεί το SPI-3, ένα PAI 17 kb το οποίο έχει εισχωρήσει σε μία *selC-tRNA* θέση και ευθύνεται για την μολυσματικότητα του συγκεκριμένου βακτηρίου (Blanc-Potard and Groisman, 1997), δ) τα PAIs του βακτηρίου *Vibrio cholerae* εντοπίζονται σε έναν βακτηριοφάγο γνωστό ως «φάγος της τοξίνης της Χολέρας» (Karaolis, et. al. 1999), ε) για την συμβίωση των αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων και των ξενιστών τους (φυτά), βρέθηκε ότι είναι απαραίτητη η παρουσία νησίδων που φέρουν γονίδια παρόμοια με αυτά των PAIs και χρησιμοποιούνται στην δέσμευση του ατμοσφαιρικού αζώτου και τη συμβίωση.

Βακτηριακό εκκριτικό σύστημα τύπου III

Η παρατήρηση ότι μια σειρά γονιδίων, στα Gram-αρνητικά παθογόνα βακτήρια, που σχετίζονται με την έκκριση παραγόντων παθογένειας, ομοιάζουν με τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για την δημιουργία του βακτηριακού μαστιγίου, οδήγησε στην ανακάλυψη του εκκριτικού συστήματος τύπου III (Michiels et. al., 1991). Το εκκριτικό

σύστημα τύπου III κωδικοποιείται από μία νησίδα παθογένειας η οποία αρχικά ονομάστηκε *Hrp* (*Hypersensitive Response and Pathogenesis*) (Lindgren et. al. 1986).



Εικόνα 4: Δημιουργία νηματοειδών σχηματισμών του βακτηρίου *P. s. pv. tomato DC3000* σε *hrp*-επαγωγίμο θρεπτικό καλλιέργειας (He, et. al. 2003).

Διακρίνονται σχηματισμένα μαστίγια (*flagellum*) καθώς και ο σχηματισμός εκκριτικών καναλιών τύπου III (*hrp pili*).

Το εκκριτικό σύστημα αυτό αποτελεί μία σύνθετη νανομηχανή που επιτρέπει στα βακτήρια να εγχέουν πρωτεΐνες «τελεστές» (*effectors proteins*) διαμέσου των ευκαριωτικών κυτταρικών μεμβρανών. Τα τελευταία χρόνια, σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στην κατανόηση της δομής, της συναρμολόγησης και στον τρόπο λειτουργίας του T3SS.

Τα κύρια δομικά συστατικά του ενιოსώματος (*injectisome*), από τη βάση του, που βρίσκεται στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα, έως την άκρη του καναλιού (*pilus*) που προεξέχει από τη βακτηριακή κυτταρική επιφάνεια, έχουν

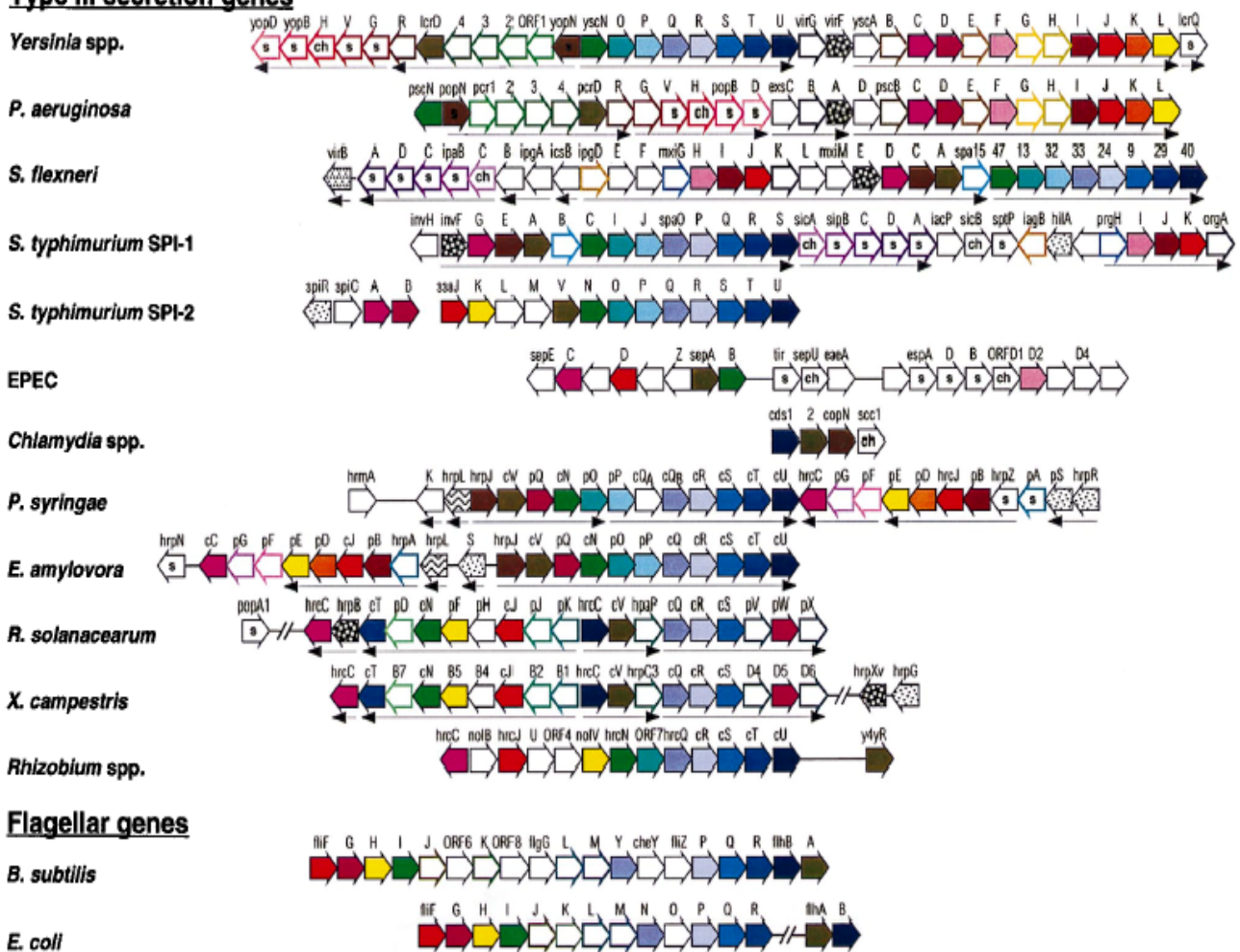
ερευνηθεί λεπτομερώς. Οι δομές διαφόρων βασικών δομικών πρωτεϊνών του συστήματος έχουν λυθεί σε ατομικό επίπεδο, πράγμα που έχει οδήγηση στην απόκτηση σημαντικής γνώσης για την διαδικασία συναρμολόγησης του T3SS. Εντούτοις, παρά τις τρέχουσες κοινές προσπάθειες μοριακών και δομικών βιολόγων, ο ρόλος πολλών από τα βασικά συστατικά αυτής της νανομηχανή, παραμένει άγνωστος.

Μέχρι σήμερα, πάνω από εικοσιπέντε είδη *Gram*-αρνητικών βακτηρίων που αλληλεπιδρούν με άλλους οργανισμούς, είτε ως παθογόνα είτε ως συμβιωτικά βακτήρια, έχουν βρεθεί να είναι εξοπλισμένα με μια ή περισσότερες γονιδιακές νησίδες που κωδικοποιούν συστατικά συσκευών πρωτεϊνικής-έκκρισης τύπου III (T3SS) (Eικ. 5).

Πρόδρομες γενετικές μελέτες που αφορούσαν στην δομή του T3SS ενιოსώματος (*injectisome*) έδειξαν ότι ένας πυρήνας οκτώ πρωτεϊνών εμφανίζουν σημαντική ομοιότητα με συστατικά του μαστιγίου (*flagellum*) (Van Gijsegem, et. al. 1995; Fields, et. al. 1994; Woestyn, et. al. 1994). Το μαστίγιο περιέχει μια ενσωματωμένη συσκευή εξαγωγής για τη διαδοχική εξαγωγή των παραγόντων, για την δημιουργία του γάντζου (*hook*) και των ινών (*filament*) (Eικ. 6). Σε μερικές περιπτώσεις, η συσκευή εξαγωγής έχει αναφερθεί να εξάγει και μη-μαστιγιακές πρωτεΐνες (Young, et. al. 1999).

Η κοινή εξελικτική προέλευση του ενιόσωματος (*injectisome*) και του μαστιγίου έγινε ακόμα προφανέστερη όταν απομονώθηκε σε καθαρή μορφή το σύμπλοκο της βελόνας (*needle complex-NC*), που κωδικοποιείται από την νησίδα παθογένειας 1 (*SPI-1*), του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella enterica* ορότυπος *typhimurium* (*Salmonella typhimurium*), και απεικονίστηκε με την βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (*Kubori, et al. 1998*). Αν και, συχνά στην βιβλιογραφία αναφέρεται ότι το *T3SS* ενιόσωμα προέρχεται από το μαστίγιο, μερικές φυλογενετικές μελέτες δεν επικυρώνουν την άποψη αυτή, δείχνοντας αντ' αυτού ότι το *T3SS* ενιόσωμα είναι τόσο αρχαίο όσο και το μαστίγιο και ότι και το δύο μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο (*Gophna, et. al. 2003*).

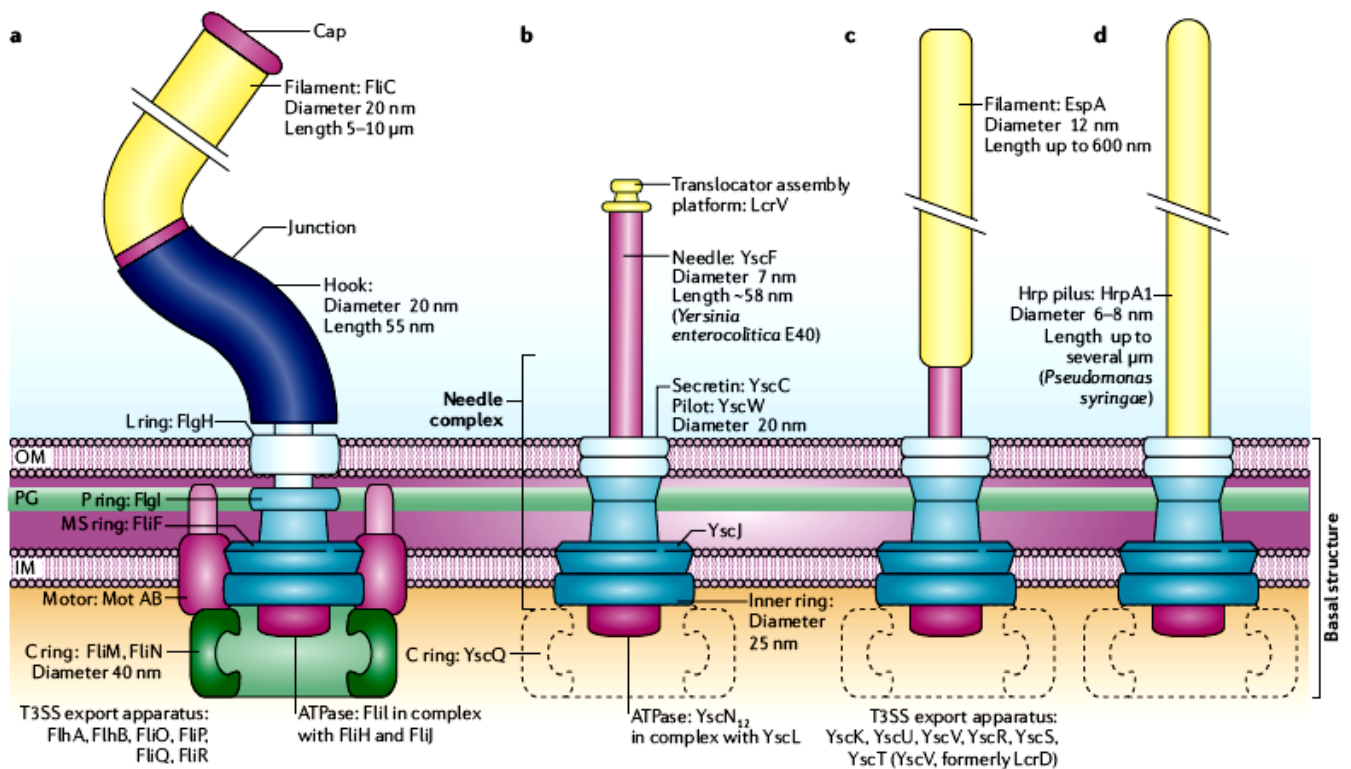
Type III secretion genes



Εικόνα 5: Γονιδιακή οργάνωση των νησίδων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες δόμησης του εκκριτικού συστήματος τύπου III σε διάφορα είδη βακτηρίων (Hueck, 1998). Εμφανίζονται επίσης γνωστά γονίδια του *T3SS* από γλαμύδια, καθώς και γονίδια βιοσύνθεσης του μαστιγίου από τα βακτήρια *B. subtilis* και *E. coli*. Οι ομολογίες των διαφόρων πρωτεϊνών εμφανίζονται με διάφορα χρώματα. Με παχιά βέλη απεικονίζονται τα ευρέως διατηρημένα γονίδια, ενώ τα γονίδια τα οποία είναι διατηρημένα μόνο σε υποομάδες, εμφανίζονται σε πλαίσιο με λεπτότερη έγχρωμη γραμμή. Με λεπτή μαύρη γραμμή εμφανίζονται περιοχές για τις οποίες δεν έχει βρεθεί πιθανή ομολογία έως σήμερα. Τα βέλη με τα διάφορα σχέδια απεικονίζουν γονίδια τα οποία κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες. Ένα μικρό *s* μέσα στο γονίδιο μαρτυρά την έκκριση της παραγόμενης πρωτεΐνης, ενώ τα γονίδια που κωδικοποιούν τσαπερόνες

μαρκάρονται με **ch**. Οι μεταφραστικές μονάδες (οπερόνια) σημειώνονται με βέλη στην κάτω μεριά των γονιδίων. Για το φυτικό εκκριτικό σύστημα τύπου III τα δομικά **hrc** και **hrp** γονίδια σημειώνονται ως **c** και **p**.

Επομένως, το *T3SS* μπορεί να θεωρηθεί ως ένα πρωτεϊνικό μονοπάτι εξαγωγής πρωτεϊνών το οποίο χρησιμοποιείται από δύο διαφορετικές νανομηχανές. Εντούτοις, στην πράξη, ο όρος *T3SS* συχνά αναφέρεται στο σύστημα το οποίο χρησιμοποιείται για την μεταφορά και την έκκριση των πρωτεϊνών τελεστών (*effector proteins*), στα πλαίσια μιας αλληλεπίδρασης ξενιστών-μικροοργανισμών (Cornelis, 2006).



Εικόνα 6. Δομή του μαστιγίου και του ενιوسώματος (Cornelis, 2006). Σχηματική απεικόνιση του μαστιγίου (a), και του *Ysc* ενιوسώματος του βακτηρίου *Yersinia spp.* (b), ενιόσωμα από εντεροπαθογόνα στελέχη *E. Coli* (*EPECs*). (c) και το ενιόσωμα από παθογόνα φυτών (d). Για τα ενιόσωματα, το δαχτυλίδι **C** (*C-ring*) απεικονίζεται με διακεκομμένη γραμμή δεδομένου ότι οι πληροφορίες για αυτό είναι ακόμα περιορισμένες. **IM**: εσωτερική μεμβράνη, **OM**: εξωτερική μεμβράνη, **PG**: στιβάδα πεπτιδογλυκάνης.

Ρόθμιση της γονιδιακής έκφρασης των ομάδων γονιδίων *hrp*

Φυλογενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα γονίδια *hrp* που κωδικοποιούν το *T3SS* των βακτηρίων *Erwinia spp.*, *Pantoea stewartii*, καθώς και εκείνων του είδους *Pseudomonas syringae*, ομαδοποιούνται με βάση την αμοιβαία ομολογία τους και σχηματίζουν την ομάδα *I* των *T3SSs*, ενώ εκείνα του γένους *Xanthomonas spp.* και του

Εισαγωγή

βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* σχηματίζουν μια δεύτερη ομάδα, την ομάδα II (Alfano και Collmer, 1997).

Η ομάδα I των *hrp* γονιδίων ρυθμίζεται μεταγραφικά από τον παράγοντα *HrpL*, ένα μέλος της οικογένειας *ECF* εναλλακτικών παραγόντων «σίγμα» (*sigma factors*) (Frederick, et. al. 2001; Wei and Beer, 1995; Xiao, et. al. 1994). Οι πρωτεΐνες *HrpL* των βακτηρίων της ομάδας αυτής εμφανίζονται ιδιαίτερα συντηρημένες ως προς τις αμινοξικές τους αλληλουχίες και όλοι αναγνωρίζουν μια συναινετική (*consensus*) αλληλουχία (**GGAACC-N15/16-CCACNNA**) που ονομάζεται «*hrp box*» και εντοπίζεται στους υποκινητές των *hrp* οπερονίων και των εκκρινόμενων *effector* πρωτεϊνών (Fouts, et. al. 2002; Frederick, et. al. 2001; Wei and Beer, 1995). Το μοτίβο *hrp box* περιέχει δύο συντηρημένες υπομονάδες. Πρόσφατες μελέτες στο βακτήριο *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophilae* έδειξαν ότι η συναινετική *hrp box* αλληλουχία μπορεί να διαιρεθεί σε κρίσιμα και μη-κρίσιμα νουκλεοτίδια. Τα πέντε νουκλεοτίδια (**GGAAC**) στο 5'-άκρο της αλληλουχίας και τα τρία νουκλεοτίδια (**ACNNA**) στο 3'-άκρο της αλληλουχίας είναι κρίσιμα, ενώ άλλα νουκλεοτίδια της συναινετικής αλληλουχίας καθώς και παρακαείμενα νουκλεοτίδια (*non-consensus*) εμφανίζονται να ασκούν σημαντική επίδραση στη δυναμική του υποκινητή (Nissan et. al. 2005). Στη βιβλιογραφία γίνεται φανερό η χρησιμότητα της συναινετικής *hrp box* αλληλουχίας ως ενός σημαντικού γενωμικού δείκτη για τον προσδιορισμό υποψηφίων γονιδίων που κωδικοποιούν *T3SS effectors* σε βακτήρια της ομάδας I, με την χρήση υπολογιστικής ανάλυσης (Fouts, et. al. 2002; Zwiesler-Vollick, et. al. 2002). Επιπλέον μελέτες, δείχνουν την εξέλιξη διαφόρων προσεγγίσεων λειτουργικής γονιδιωματικής με σκοπό τον προσδιορισμό *T3SS effectors* από διάφορα στελέχη του είδους *Pseudomonas syringae*, βασισμένες στην εξαρτώμενη, από τον παράγοντα *hrpL*, επαγωγή τους (Chang, et. al. 2005; Fouts, et. al. 2002; Lan, et. al. 2006; Losada, et. al. 2004). Πρόσφατες έρευνες επίσης, απέδειξαν ότι ο παράγοντας *HrpL* δεσμεύεται άμεσα στο νουκλεοτιδικό μοτίβο *hrp box* της αλληλουχίας του υποκινητή. Παρόλα αυτά, εντύπωση προκαλούν πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη μεταλλαγών στα νουκλεοτίδια της συναινετικής αλληλουχίας *hrp box* (στην 3'-άκρο περιοχή), τα οποία εκμηδενίζουν τη δραστηριότητα των υποκινητών, ενώ δεν φαίνεται να έχουν άμεσες επιπτώσεις στην ικανότητα δέσμευσης του παράγοντα *HrpL* (Nissan, et. al. 2005).

Η επαγωγή του *hrpL* απαιτεί την παρουσία του παράγοντα *hrpS* στο γένος *Erwinia* spp. και στο είδος *Pantoea stewartii* καθώς επίσης την ύπαρξη των *hrpS* και *hrpR* στο είδος

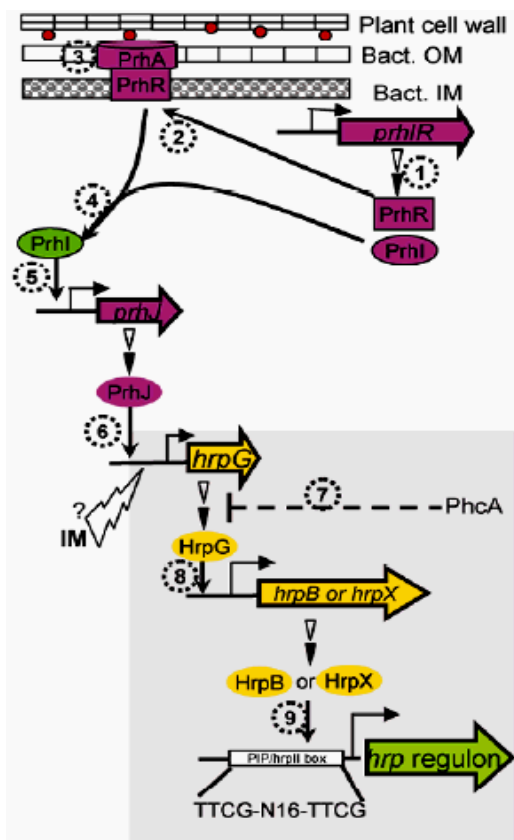
P. syringae. (Hutcheson, et. al. 2001; Merighi, et. al. 2003; Nizan-Koren, et. al. 2003; Wei, et. al. 2000). Οι πρωτεΐνες *HrpS* στα βακτήρια *Erwinia* spp., *P. stewartii*, και *P. syringae* εμφανίζουν σημαντική αμινοξική ομολογία, ενώ το γονίδιο *hrpR* φαίνεται να είναι παρόν μόνο σε βακτήρια του είδους *P. syringae*. Αποτελέσματα αλληλούχισης γονιδιωμάτων διαφόρων φυτοπαθογόνων βακτηρίων του είδους *P. syringae* έδειξαν ότι τα γονίδια *hrpR* και *hrpS* οργανώνονται σε ένα οπερόνιο που ελέγχεται από έναν υποκινητή ο οποίος εντοπίζεται άνωθεν του *hrpR* (Grimm, et. al. 1995; Hutcheson, et. al. 2001; Xiao, et. al. 1994). Οι πρωτεΐνες *HrpR* και *HrpS* ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνικών ρυθμιστών δι-συστατικών *NtrC* αλλά στερούνται την N'-τελικής περιοχής άλλων μελών της οικογένειας. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι, πιθανόν, η ρύθμιση της μεταγραφής από τις *HrpR* και *HrpS* δεν ελέγχεται άμεσα από την διαδικασία της φωσφορυλίωσης (Xiao, et. al. 1994).

Οι δύο πρωτεΐνες εμφανίζουν ιδιαίτερη ομολογία στη αλληλουχία και διαμορφώνουν ένα πρωτεϊνικό ετεροδιμερές. Η διμεροποίηση (*dimerization*) θεωρείται κρίσιμη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του *hrpL*. Το *hrpS* από μόνο του είναι σε θέση να ενεργοποιήσει την έκφραση του γονιδίου *hrpL* σε βακτήρια του είδους *P. syringae* αλλά σε πολύ χαμηλό επίπεδο. Ενώ η μέγιστη επαγωγή του *hrpL* απαιτεί την παρουσία και των δύο παραγόντων, *hrpR* και *hrpS* (Hutcheson, et. al. 2001). Αντίστοιχα συστήματα με του *hrpL* έχουν αναφερθεί και για το βακτήρια του υποείδους *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Chatterjee, et. al. 2002). Περισσότερες λεπτομέρειες για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων του *T3SS* στα βακτήρια της ομάδας I, φαίνονται στην Εικόνα 8.

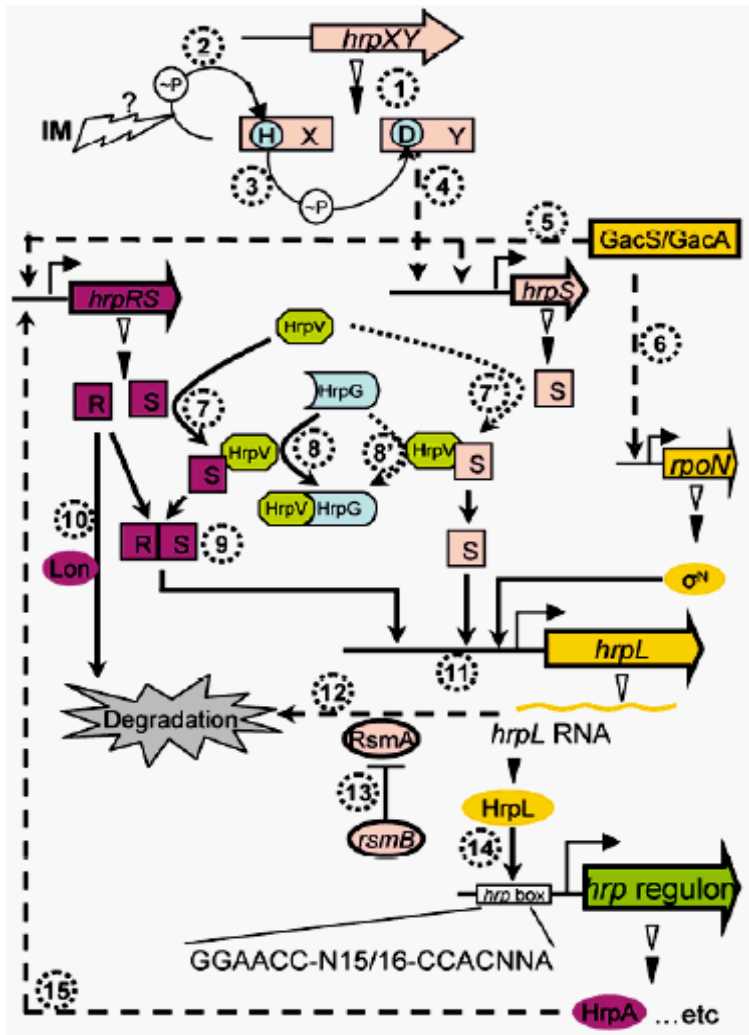
Τα περισσότερα οπερόνια της ομάδα II (*group II hrp operons*) ενεργοποιούνται από ένα *AraC-like* ενεργοποιητή, ο οποίος ονομάστηκε *HrpB* στο βακτήριο *R. solanacearum* (Genin, et. al. 1992) και *HrpX* στα βακτήρια του γένους *Xanthomonas* spp. (Kamdar, et. al. 1993; Wengelnik and Bonas, 1996). Οι πρωτεΐνες *HrpX* και *HrpB* εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλό επίπεδο ομολογίας σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας. Οι υποκινητές των *hrp* οπερονίων και των γονιδίων των *T3SS effectors*, που ρυθμίζονται από τις πρωτεΐνες *HrpX* και *HrpB*, συχνά φέρουν ένα συντηρημένο μοτίβο που αναφέρεται ως φυτό-επαγόμενος υποκινητής (*plant inducible promoter: PIP-box*) (**TTCGC-N15-TTCGC**) στα βακτήρια του γένους *Xanthomonas* spp. (Buttner and Bonas, 2002) και *hrpII-box* (**TTCG-N16-TTCG**) στο βακτήριο *R. solanacearum* (Cunnac, et. al. 2004a). Μεμονωμένες μεταλλάξεις στην συναινετική αλληλουχία νουκλεοτιδίων (*consensus sequence nucleotides*) των *PIP/hrpII-box* μειώνουν γενικά τη

Εισαγωγή

δραστικότητα των υποκινητών. Εντούτοις, αλλαγές στο διάστημα μεταξύ των δύο συντηρημένων περιοχών των *PIP/hrpII-box* φαίνεται να μπλοκάρουν την επαγωγή των γονιδίων (Cunnac, et. al. 2004a; Tsuge, et. al. 2005). Μια αναζήτηση στα γονιδιώματα των βακτηρίων *Xanthomonas* spp. και *R. solanacearum* με την συναινετική αλληλουχία στάθηκε αφορμή για τον προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού *T3SS* υποψηφίων γονιδίων που κωδικοποιούν υποψήφιους τελεστές (*effectors*) (Cunnac, et. al. 2004b; da Silva, et. al. 2002; Thieme, et. al. 2005). Μερικά από αυτά τα γονίδια προσδιορίστηκαν ως *hrpX/hrpB*-επαγόμενα γονίδια από την χρήση μικρό-συστοιχιών *DNA* (*DNA microarrays*), πειράματα παγίδων-υποκινητών και με ποσοτικό προσδιορισμό επιπέδων *cDNA* από διαφορετική έκφραση (Mukaihara, et. al. 2004; Noel, et. al. 2001; Occhialini, et. al. 2005). Εν τούτοις, πρέπει να επισημανθεί ότι αρκετοί καλά χαρακτηρισμένοι τελεστές τύπου *III* από μέλη του γένους *Xanthomonas* spp., συμπεριλαμβανομένου του *avrBs1* και των μελών της οικογένειας τελεστών *avrBs3*, εκφράζονται συστατικά και δεν εμφανίζουν *PIP-box* στους υποκινητές των γονιδίων τους. Το ίδιο παρατηρείται και στους υποκινητές μερικών *HrpX/HrpB*-ρυθμιζόμενων *effectors*, οι οποίοι δεν φαίνεται να περιλαμβάνουν αλληλουχίες *PIP/hrpII-box* και επομένως, πιθανολογείται ότι ρυθμίζονται έμμεσα από τις *HrpX/HrpB* (Buttner and Bonas, 2002; Occhialini, et. al. 2005). Περισσότερες λεπτομέρειες για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της ομάδας *II T3SSs* εμφανίζονται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7. Πρότυπα της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στο T3SS των φυτοπαθογόνων βακτηρίων της ομάδας II (Tang, et. al. 2006). (1), Οι πρωτεΐνες PrhI και PrhR κωδικοποιούνται από το οπερόνιο *prhIR*. (2), Η πρωτεΐνη PrhR εντοπίζεται στη εσωτερική βακτηριακή μεμβράνη. (3), Η πρωτεΐνη PrhA που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη είναι υπεύθυνη για την λήψη του σήματος από το τοίχωμα των φυτικών κυττάρων και την μεταφορά του στην πρωτεΐνη PrhR. (4), Η πρωτεΐνη PrhR ενεργοποιεί την PrhI. (5), Η PrhI με την σειρά της ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου *prhJ*. (6), Η πρωτεΐνη PrhJ ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου *hrpG*. (7), Η πρωτεΐνη PhcA καταστέλλει την έκφραση του *hrpG* σε μετά-μεταγραφικό επίπεδο. (8), Η πρωτεΐνη HrpG ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου *hrpX* σε βακτήρια του γένους *Xanthomonas* spp. και του *hrpB* στο βακτήριο *Ralstonia solanacearum*. (9), Οι πρωτεΐνες HrpX και HrpB ενεργοποιούν τους υποκινητές *PIP/hrpII box*. Οι παράγοντες της ομάδας II που βρίσκονται στη σκιασμένη περιοχή απαιτούνται για την ενεργοποίηση των γονιδίων *hrp* σε επαγωγικό μέσο καλλιέργειας και στα φυτά. Οι παράγοντες στην ασκίαστη περιοχή είναι γονίδια του βακτηρίου *R. solanacearum* που απαιτούνται για την ενεργοποίηση των γονιδίων *hrp* στα φυτά. IM: άγνωστο σήμα σε μέσο επαγωγής.

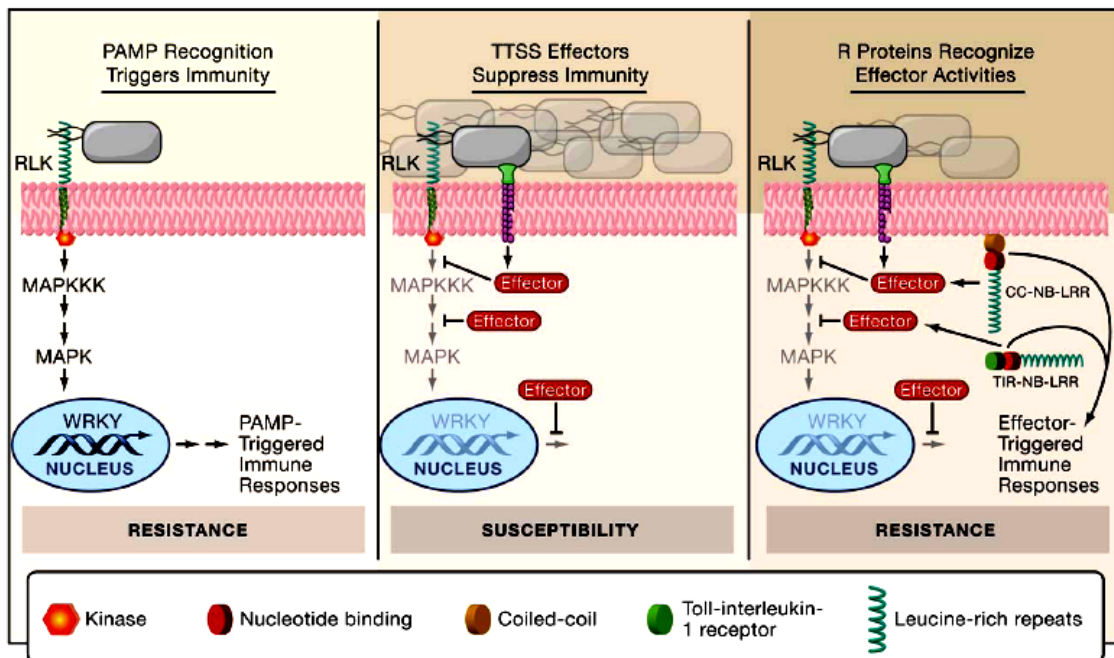


Εικόνα 8. Πρότυπα της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στο T3SS των φυτοπαθογόνων βακτηρίων της ομάδας I (Tang, et. al. 2006). Οι αριθμοί δείχνουν τα σημαντικότερα γεγονότα στην μεταγωγή σήματος. (1), το οπερόνιο *hrpXY* στα βακτήρια *Erwinia* spp. και *Pantoea stewartii* μεταγράφεται και μεταφράζεται στις πρωτεΐνες *HrpX* και *HrpY*. (2), Σήμα προκαλούμενο από μέσο επαγωγής (*IM*) προκαλεί αυτοφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης *HrpX*. (3), Η *HrpX* φωσφορυλιώνει τον παράγοντα *HrpY*. (4), Η πρωτεΐνη *HrpY* ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου *hrpS* μέσω ενός άγνωστου έως τώρα μηχανισμού. (5), Το σύμπλοκο *GacS/GacA* ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου *hrpS* στα βακτήρια *Erwinia* spp. και *Pantoea stewartii* και το οπερόνιο *hrpRS* στα βακτήρια του είδους *Pseudomonas syringae*. (6), Το σύμπλοκο *GacS/GacA* ενεργοποιεί τη μεταγραφή του παράγοντα *rpoN* στα βακτήρια *Erwinia* spp., *P. stewartii*, και *P. syringae*. (7) και (7'), Η πρωτεΐνη *HrpS* καταστέλλεται από τον παράγοντα *HrpV* μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. (8) και (8'), Η πρωτεΐνη *HrpG* αλληλεπιδρά με την *HrpV* με αποτέλεσμα την επαναενεργοποίηση την *HrpS*. Τα βήματα 7, 7', 8 και 8' αποτελούν έναν μηχανισμό αυτορύθμισης του συστήματος. (9), Οι πρωτεΐνες *HrpS* και *HrpR* διαμορφώνουν ένα ετεροδιμερές στα βακτήρια *P. syringae*. (10), Η πρωτεΐνη *HrpR* διασπάται από την πρωτεάση *Lon* στα βακτήρια του είδους *P. syringae*. (11), Οι πρωτεΐνες *HrpR* και *HrpS* των βακτηρίων *P. syringae* και *HrpS* στα βακτήρια *Erwinia* spp. και *P. stewartii* αλληλεπιδρούν με την *RpoN* στον υποκινητή του *hrpL* με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της έκφρασής του. (12), Το RNA του *hrpL* διασπάται από έναν *RsmA*-εξαρτώμενο μηχανισμό. (13), Το RNA του *rsmB* παρεμποδίζει τη λειτουργία της *RsmA*. (14), Η πρωτεΐνη *HrpL* αναγνωρίζει την αλληλουχία «*hrp box*» στον υποκινητή των *hrp* γονιδίων και ενεργοποιεί τη μεταγραφή τους. (15), Η πρωτεΐνη *HrpA* ενεργεί άνωθεν της μεταγραφής του οπερονίου *hrpRS* με αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων του T3SS.

Επίπεδα άμυνας των φυτών

Τα φυτά είναι εκτεθειμένα συνεχώς σε εν δυνάμει παθογόνα βακτήρια, τα οποία για να προκαλέσουν ασθένεια πρέπει να αποκτήσουν πρόσβαση στο εσωτερικό των φυτικών ιστών/οργάνων και αυτό αποτελεί το 1^ο επίπεδο άμυνας των φυτών. Η πρόσβαση στο εσωτερικό των φυτικών ιστών/οργάνων μπορεί επιτευχθεί με διάφορους τρόπους, είτε ενεργά είτε παθητικά, σε σημεία μηχανικής βλάβης ή μέσω φυσικών οπών όπως τα στομάτια (*stomata*), τα υδατόδια (*hydatodes*) ή τα νεκτάρια των ανθέων (*nectaries*), μέσω φορέων (συνήθως εντόμων), βροχής, ή μολυσμένου πολλαπλασιαστικού υλικού. Μόλις παραβιαστεί το εσωτερικό των φυτών, τα βακτήρια βρίσκονται αντιμέτωπα με ένα άλλο εμπόδιο: το τοίχωμα των φυτικών κυττάρων, μια άκαμπτη δομή, βασισμένη στην κυτταρίνη και άλλα πολυμερή συστατικά, που περιβάλλει κάθε φυτικό κύτταρο και αποτελεί το 2^ο επίπεδο άμυνας των φυτών έναντι των μικροβίων εν γένει. Η διείσδυση διαμέσω του κυτταρικού τοιχώματος, εκθέτει τη πλασματική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή στην επιφάνεια της οποίας βρίσκονται εξωκυττάρια υποδοχείς που αναγνωρίζουν τα ονομαζόμενα «μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με παθογόνα» (*pathogen-associated molecular patterns-PAMPs*) (**Εικ. 9**). Αυτό διαμορφώνει το 3^ο επίπεδο άμυνας των φυτών. Η ανίχνευση ενός μικροοργανισμού στην κυτταρική επιφάνεια σηματοδοτεί την λεγόμενη *PAMP*-προκαλούμενη ανοσία (*PAMP-triggered immunity, PTI*), η οποία σταματά συνήθως τη μόλυνση πριν τα μικρόβια κερδίσουν έδαφος στο εσωτερικό του φυτού. Αυτό συνιστά το 4^ο επίπεδο άμυνας των φυτικών οργανισμών. Εντούτοις, τα παθογόνα μικρόβια γενικά διαθέτουν μηχανισμούς καταστολής της *PTI*, παρεμβαίνοντας στην αναγνώριση τους από τους υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης π.χ. μέσω πολυσακχαριτικών εκκρίσεων ή με την έγχυση *T3EPs* στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Οι εγγεόμενοι *T3EPs* πιθανώς παρεμβαίνουν στη σηματοδότηση επαγωγής των μηχανισμών άμυνας του ξενιστή με αποτέλεσμα να ανακόπτουν τις αμυντικές αποκρίσεις (**Εικ. 9**). Άπαξ και απέκτησαν, εξελικτικά, τα παθογόνα την ικανότητα να καταστολής των μηχανισμών άμυνας των ξενιστών τους, τα φυτά ανέπτυξαν έναν πιο εξειδικευμένο μηχανισμό ώστε να ανιχνεύουν τα μικρόβια. Ο μηχανισμός αυτός αναφέρεται ως «ανοσία πυροδοτούμενη από τελεστές» (*effector-triggered immunity, ETI*) και αποτελεί το 5^ο και τελευταίο επίπεδο των φυτικών μηχανισμών άμυνας. Η *ETI* περιλαμβάνει την άμεση ή έμμεση αναγνώριση των μικροβιακών πρωτεϊνών παθογένειας, που χρησιμοποιούνται από τα παθογόνα για την υπονόμηση της *PTI*. Η *ETI* ελέγχεται από ένα σύνολο πρωτεϊνικών, ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων

υποδοχέων, που ονομάζονται πρωτεΐνες ανθεκτικότητας (*Resistance proteins* ή *R proteins*) των φυτών. Οι αποκρίσεις των φυτών που συνδέονται με την αναγνώριση των *T3EPs*, περιλαμβάνουν: (a) την ενεργοποίηση του εντοπισμένου κυτταρικού θανάτου γνωστού ως αντίδραση υπερευαισθησίας (*Hypersensitive Response, HR*), (b) την απελευθέρωση ενεργών μορφών οξυγόνου και νιτρικού οξειδίου, (c) την ενίσχυση των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων, (d) την παραγωγή πολυάριθμων αντιμικροβιακών δευτερογενών μεταβολιτών και πρωτεϊνών σχετιζόμενων με την άμυνα (*defense-related proteins*), (e) και τέλος την ενεργοποίηση της διασυστηματικής επίκτητης ανθεκτικότητας (*Systemic Acquired Resistance-SAR*) (Mudgett, 2005). Κατά συνέπεια, η ενεργοποίηση της ανθεκτικότητας που διαμεσολαβείται από τις πρωτεΐνες R καταστέλλει την μικροβιακή αύξηση, αλλά όχι προτού δοθεί μια, έστω και πρόσκαιρη, ευκαιρία περιορισμένου πολλαπλασιασμού στον εισβολέα (Εικ. 9). Όπως ήταν αναμενόμενο και όπως προκύπτει από πειραματικά δεδομένα, τα παθογόνα φαίνονται να προσαρμόζουν τους *T3EPs* τους ώστε να παρεμποδίζουν την *ETI* (Jamir, et. al. 2004). Σε παρακάτω κεφάλαιο αναλύεται εκτενέστερα ο μηχανισμός άμυνας *ETI* και τα είδη των πρωτεϊνών R στους φυτικούς οργανισμούς.



Εικόνα 9. Μοντέλο για την εξέλιξη της ανθεκτικότητας των φυτών έναντι των βακτηριακών παθογόνων (Chisholm, et. al. 2006). Από τα αριστερά προς τα δεξιά: Η αναγνώριση των *PAMPs* (όπως η βακτηριακή φλαγκελίνη (*flagellin*)) από εξωκυττάριους υποδοχείς που ανήκουν στην οικογένεια των κινάσων (*extracellular receptor-like kinases: RLKs*) αφυπνίζει την βασική άμυνα του φυτού (*basal immunity*), η οποία απαιτεί την συμμετοχή των μονοπατιών των *MAP* κινάσων και του μεταγραφικού επαναπρογραμματισμού από *WRKY* μεταγραφικούς παράγοντες των φυτών.

Εισαγωγή

Τα παθογόνα βακτηρίδια χρησιμοποιούν το *T3SS* για την μεταφορά των πρωτεϊνών- τελεστών (*effectors*) μέσα στο φυτικό κύτταρο. Οι *effectors* εμφανίζονται να έχουν πολλαπλούς πρωτεϊνικούς στόχους, με συνέπεια την καταστολή των βασικών ανοσιακών αποκρίσεων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη των βακτηριακών παθογόνων στον αποπλάστη (*apoplast*) του φυτού ξενιστή.

Οι πρωτεΐνες ανθεκτικότητας του φυτού (που εδώ αντιπροσωπεύονται από τις δομικές κατηγορίες *CC-NB-LRR* και *TIR-NB-LRR*, δείτε σε παρακάτω παράγραφο) αναγνωρίζουν τους *effectors* μέσω της δραστηριότητάς τους και αποκαθιστούν την ανθεκτικότητα επάγοντας την ETI. Περιορισμένη συσσώρευση βακτηρίων εμφανίζεται πριν από την αποτελεσματική έναρξη της ETI.

Πρωτεΐνες τελεστές ή πρωτεΐνες παθογένειας τύπου III (type III effectors)

Ο βασικός ρόλος του *T3SS* είναι η έκκριση παραγόντων παθογένειας, των λεγόμενων «πρωτεϊνών τελεστών» (*effector proteins*) ή πρωτεϊνών εκκρινόμενων μέσω του συστήματος τύπου III (*type-III secreted effector proteins, T3EPs*). Οι πρωτεΐνες αυτές εγχέονται στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών ξενιστών, παραλύοντας ή επαναπρογραμματίζοντας το ευκαρυωτικό κύτταρο προς όφελος του παθογόνου. Με αυτόν τον τρόπο φαίνεται ότι διαμορφώνεται η παθογόνος ικανότητα του εκάστοτε παθογόνου βακτηρίου (*Mota & Cornelis, 2005*). Οι πρωτεΐνες αυτές εμφανίζουν ένα μεγάλο ρεπερτόριο βιοχημικών δραστηριοτήτων και επηρεάζουν τη λειτουργία κρίσιμων ρυθμιστικών μορίων των ξενιστών. Μερικές από αυτές θα δούμε στην συνέχεια. Στα ζώα, οι στόχοι των *T3EPs* περιλαμβάνουν τις μικρές *GTP*-δεσμεύουσες πρωτεΐνες, τις μιτογόνο-ενεργοποιούμενες πρωτεϊνικές κινάσες (*MAPKs*), *IκB-α* και φωσφοϊνοσιτίδια (*phosphoinositides*). Η δραστηριότητα των *T3EPs* επιτρέπει στα παθογόνα βακτήρια των ανώτερων θηλαστικών να εισβάλουν στα μη-φαγοκυτταρικά κύτταρα (π.χ. *Salmonella*, *Yersinia*) ή να εμποδίσουν την φαγοκύτωση από τα φαγοκύτταρα (π.χ. *E. coli*). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή των προφλεγμονικών αποκρίσεων που προκαλούν απόπτωση, ώστε να ελεγχθεί η αυτοφαγία ή να διαμορφωθεί η ενδοκυτταρική κίνηση προς όφελος του παθογόνου (*Mota & Cornelis, 2005*).

Σε αντίθεση με τα παθογόνα βακτήρια των θηλαστικών, πολύ λίγα είναι γνωστά για τους μοριακούς μηχανισμούς με τους οποίους οι *T3EPs* των φυτοπαθογόνων βακτηρίων εμπλέκονται στην πρόκληση ασθενειών στους φυτικούς ξενιστές. Τα αναδυόμενα ερευνητικά στοιχεία προτείνουν ότι μια σημαντική λειτουργία αυτών των πρωτεϊνών εντοπίζεται στην καταστολή των μηχανισμών άμυνας των ξενιστών σε διάφορα επίπεδα (*Block, et. al. 2008*). Εντούτοις, οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους οι πρωτεΐνες παθογένειας των φυτοπαθογόνων βακτηρίων υπονομεύουν την ανοσιακή απόκριση των φυτικών ξενιστών δεν είναι επαρκώς κατανοητοί.

Ο ρόλος των T3EPs των φυτοπαθογόνων βακτηρίων

Σειρά μελετών που αφορούν στις σχέσεις αλληλεπίδρασης των φυτοπαθογόνων βακτηρίων με τους ξενιστές τους έχουν αποδείξει ότι μεταλλαγές σε δομικά συστατικά του εκκριτικού συστήματος τύπου III (T3SS), καθιστούν τα παθογόνα βακτήρια ανίκανα να υπερνικήσουν/καταστείλουν τις βασικές γραμμές άμυνας του ξενιστή και να πολλαπλασιαστούν στον διακυττάριο χώρο των φυτικών ιστών. Αυτό συνεπάγεται είτε την αδυναμία επαγωγής της ασθένειας στις «συμβατές» αντιδράσεις, ή της αντίδρασης υπερευαισθησίας στις «ασύμβατες». Για τον λόγο αυτό, η ικανότητα των φυτοπαθογόνων βακτηρίων να προκαλούν ασθένεια στους επιδεκτικούς («συμβατούς») ξενιστές τους ή να επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας (*Hypersensitive Response*-HR) σε μη επιδεκτικούς («μη συμβατούς») ξενιστές, σχετίστηκε άμεσα με την παρουσία/απουσία των τύπου III εκκρινόμενων πρωτεϊνών παθογένειας (T3EPs) ή πρωτεϊνών τελεστών (*effector proteins*). Από τα παραπάνω γίνεται εμφανές ότι οι T3EPs παίζουν ένα ρόλο «διπλού πράκτορα» στις αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων, συμβάλλοντας στην παθογένεια (συμβατές αλληλεπιδράσεις) ή επάγοντας την HR (ασύμβατες αλληλεπιδράσεις).

Η αντίδραση υπερευαισθησίας χαρακτηρίζεται από την ταχεία (εντός λίγων ωρών) νέκρωση των κυττάρων του φυτού στο σημείο εισβολής του παθογόνου. Η αντίδραση αυτή χαρακτηρίζει τις περισσότερες «ασύμβατες» αλληλεπιδράσεις παθογόνου-ξενιστή, όταν δηλαδή ένα φυτοπαθογόνο στέλεχος προσβάλλει μια ανθεκτική ποικιλία του ξενιστή (*host HR*) ή φυτά μη-ξενιστές ενός διαφορετικού είδους (*non-host HR*). Η HR έχει κυτταρολογικά χαρακτηριστικά όμοια με εκείνα του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ή της απόπτωσης (*programmed cell death*-PCD, *apoptosis*).

Από τα παραπάνω διαφαίνεται ότι ένας σημαντικός τομέας έρευνας στις αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων είναι ο προσδιορισμός τις λειτουργίας και των υποκυτταρικών στόχων των T3EPs). Ήταν γνωστό για πολλά έτη ότι τα φυτοπαθογόνα βακτήρια μπορούν να καταστείλουν τις αμυντικές αποκρίσεις των φυτών-ξενιστών. Παραδείγματος χάριν, στελέχη του βακτηρίου *P. syringae* pv. *phaseolicola*, που προκαλούν την ασθένεια του κηλιδωτού μαρασμού (*halo blight*) στη φασολιά, καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα του φυτού, καθώς και γονιδίων της βιοσύνθεσης των φυτοαλεξινών (*phytoalexins*). Οι φυτοαλεξίνες αποτελούν μια ομάδα επαγόμενων από τα παθογόνα αντιμικροβιακών ουσιών που παράγουν τα φυτά μετά από μικροβιακή προσβολή (Jakobek, et. al. 1993). Αυτό δείχνει

Εισαγωγή

ότι η επιτυχής εγκατάσταση και ανάπτυξη ενός παθογόνου βακτηρίου σε έναν φυτικό ξενιστή συσχετίζεται άμεσα με τη δυνατότητά της παρεμπόδισης των αμυντικών αποκρίσεων. Η βακτηριακή παρέμβαση στους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή συνδέθηκε στη συνέχεια, εν μέρει, με τη δράση των *T3EPs* μέσα στα μολυσμένα φυτικά κύτταρα. Στην διεθνή βιβλιογραφία αρκετές μελέτες συνηγορούν στην αποδοχή της θεωρίας αυτής. Στην *Arabidopsis* για παράδειγμα, το βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato*, τροποποιημένο ώστε να παράγει φέρει τον ετερόλογο (παραγόμενο από άλλο βακτήριο) *T3EP AvrRpt2*, παρεμποδίζει άμεσα την ενεργοποίηση των αμυντικών μηχανισμών που επάγονται από τη φυτική πρωτεΐνη ανθεκτικότητας (*Plant R protein*) *RPM1*. Η *RPM1*-εξαρτώμενη ανθεκτικότητα επάγεται έπειτα από την αναγνώριση/αλληλεπίδραση δύο άλλων *T3EPs*, (των *AvrB1* και *AvrRpm1*), του συγκεκριμένου βακτηρίου, με την πρωτεΐνη ανθεκτικότητας *RPM1* (Reuber & Ausubel, 1996; Ritter, et. al. 1996). Σε άλλες μελέτες, η *T3EP HopAB1* (παλιότερα γνωστή ως *VirPphA*) καταστέλλει τους μηχανισμούς βασικής άμυνας σε συγκεκριμένες ποικιλίες φασολιάς (συμβατού ξενιστή) (Jackson, et. al. 1999), ενώ η *AvrB2* φαίνεται να παρεμποδίζει την επαγωγή της *HR* που προκαλείται από την αναγνώριση της πρωτεΐνης *HopF3* (Tsiamis, et. al. 2000). Αυτές οι μελέτες προβλέπουν ότι, ένας αρχικός ρόλος μερικών *T3EPs* είναι η άμεση καταστολή των φυτικών μηχανισμών άμυνας μέσα στο κύτταρο του ξενιστή. Έρευνες που περιγράφονται παρακάτω ενισχύουν αυτήν την υπόθεση με την παροχή κρίσιμων μοριακών δεδομένων για τη δράση των *T3EPs* από *in planta* πειραματικά αποτελέσματα. Τα στοιχεία που θα παρατεθούν έχουν προκύψει από την εφαρμογή διαφόρων προσεγγίσεων, συμπεριλαμβανομένων νέων γενετικών *screens*, μελετών φυσικής αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών, ανάλυσης πρωτεϊνικών δομών, μεταλλαξιγένεσης σε συγκεκριμένους *T3EPs*, καθώς και από τη μελέτη του προφίλ έκφρασης των φυτικών γονιδίων που σχετίζονται με την παρουσία/απουσία του παθογόνου.

Τρόπος δράσης των T3EPs***I. Καταστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου***

Πρόσφατη μελέτη που αφορά στον *T3EP HopAB2* από το βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato* (ομόλογο του *HopAB1* του βακτηρίου *P.s. pv. phaseolicola*) δείχνει ότι αυτός ο *T3SP* παρεμποδίζει άμεσα την επαγωγή μηχανισμών ανθεκτικότητας που προκαλούνται από το γονίδιο ανθεκτικότητας *Pto* (της τομάτας), όταν το τελευταίο εισαχθεί στο φυτό μοντέλο *Nicotiana benthamiana* (το οποίο στερείται του γονιδίου

Pto). Ο *HopAB2* φαίνεται να λειτουργεί ως ένας γενικός καταστολέας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (*Programmed Cell Death-PCD*) σε διάφορα φυτικά είδη (*Abramovitch, et. al. 2003*). Έχει δειχτεί επίσης ότι, εκτός της πρωτεΐνης *HopAB2*, και η *AvrPto* φαίνεται να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ανθεκτικότητας *Pto* της τομάτας, η οποία είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης (*Kim, et. al. 2002*). Η αναγνώριση των πρωτεϊνών *HopAB2* και *AvrPto* από την *Pto* στην τομάτα, ενεργοποιεί τον παράγοντα *Prf* (μια *R* πρωτεΐνη της τομάτας που φέρει περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίων και αρκετές επαναλήψεις λευκίνης) η οποία επάγει με την σειρά της μια αλληλουχία σηματοδοτικών γεγονότων που οδηγούν στην επαγωγή της ανθεκτικότητας (*Kim, et. al. 2003*). Η συν-έκφραση των *AvrPto* και *Pto* στο φυτό μοντέλο *N. benthamiana* προκαλεί την επαγωγή *HR*, δείχνοντας ότι οι αμυντικοί μηχανισμοί που επάγονται από την *Pto* είναι συντηρημένοι και σε αυτόν τον ξενιστή. Αντίθετα όμως με το ζεύγος *AvrPto-Pto*, η συν-έκφραση του *HopAB2* και του *Pto* στην *N. benthamiana* δεν έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της *HR*. Από αυτό γίνεται φανερό ότι ο *HopAB2* ενεργεί ως «αυτό-καταστολέας» των *Pto*-επαγόμενων αμυντικών μηχανισμών που ο ίδιος προκαλεί (λόγω της αλληλεπίδρασης του με την *Pto*) στην *N. benthamiana* αλλά όχι και στην τομάτα. Μελέτες μεταλλαγμάτων του *HopAB2* έδειξαν ότι οι N- και C-τελικές περιοχές είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη *Pto* και την καταστολή του *PCD*, αντίστοιχα (*Abramovitch et. al., 2005*). Η ικανότητα καταστολής του *PCD* στην *N. benthamiana* από τον *HopAB2* δεν περιορίζεται μόνο στις αμυντικές αποκρίσεις που επάγονται από την *Pto*. Ο *HopAB2* φαίνεται να παρεμποδίζει επίσης και την επαγωγή της *HR* που διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη ανθεκτικότητας *Cf-9* (της τομάτας) όταν αυτή εκφραστεί στην *N. benthamiana*, ως απόκριση στο πεπτίδιο-επαγωγέα *Avr9* του παθογόνου *Cladosporium fulvum* (*Abramovitch, et. al. 2003*). Αυτά τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι ο *HopAB2* λειτουργεί καθοδικά (*downstream*) του σημείου δράσης των πρωτεϊνών ανθεκτικότητας, για την καταστολή της *HR* (Εικ. 10).

Δεδομένου ότι ο *PCD* συνδέεται με πολλές κυτταρικές διαδικασίες στους ευκαρυώτες (*Greenberg, et. al. 1994; Lam, 2004.*), ο *Abramovitch* και οι συνεργάτες του διερεύνησαν επίσης τη δυνατότητα της *HopAB2* να λειτουργεί ως ένας γενικός καταστολέας του κυτταρικού θανάτου. Διαπίστωσαν ότι η *HopAB2* προστατεύει τα φυτά από την επαγωγή *PCD*, μιας αντίδρασης όμοιας με την *HR*, που προκαλείται από την πρωτεΐνη *Bax* (μια προ-αποπτωτική πρωτεΐνη της οικογένειας *Bcl-2* που επάγει τον *PCD* στα ζωικά κύτταρα) (*Abramovitch, et. al. 2003*). Επιπλέον, η *HopAB2* φαίνεται να

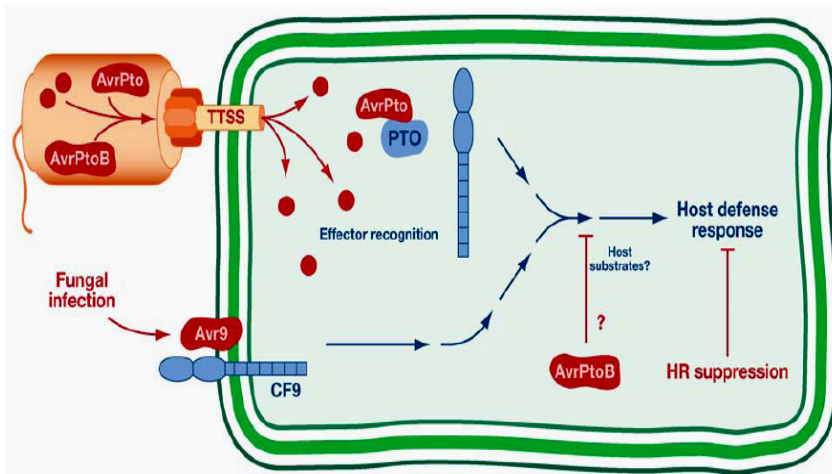
Εισαγωγή

προστατεύει κύτταρα του ζυμομύκητα (*Saccharomyces cerevisiae*) από στρες επαγόμενο *PCD*, που μπορεί να προκληθεί από το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), την μεναδιόνη (*menadione*) και από θερμικό σοκ, αλλά όχι από την αποπτοτική πρωτεΐνη *Bax* (*Abramovitch, et. al. 2003*). Δεν είναι ακόμα σαφές πώς η *HopAB2* μπορεί να είναι λειτουργικός σε τόσο διαφορετικούς οργανισμούς (από διαφορετικά βασιλεία) και αυτό επειδή οι γνώσεις μας στους μηχανισμούς που ρυθμίζουν τον *PCD* στα φυτά είναι περιορισμένες (*Lam, 2004*). Εντούτοις, η παρεμπόδιση του *PCD* από τον *HopAB2* στα φυτά και στο ζυμομύκητα φανερώνει ότι διαφορετικά ευκαρυωτικά μονοπάτια επαγωγής *PCD* μπορεί να ρυθμίζονται από συντηρημένους μηχανισμούς. Σε ακόλουθες μελέτες, τέσσερεις ακόμα *T3EPs* του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tomato* αποδείχτηκε ότι καταστέλλουν την *HR* που προκαλείται από την αναγνώριση του *T3EP HopA1*. Ο *HopA1* του βακτηρίου *P.s. pv. syringae* φαίνεται να αλληλεπιδρά με κάποια πρωτεΐνη ανθεκτικότητας του καπνού και να επάγει *HR* (*Jamir, et. al. 2003*). Αυτό φάνηκε έπειτα από τη μόλυνση φυτών καπνού με ένα μη παθογόνο στέλεχος του βακτηρίου *P. fluorescens* το οποίο φέρει το κοσμίδιο *pHIR11*. Το *pHIR11* περιέχει την συστάδα γονιδίων *hrp* του βακτηρίου *P. s. pv. syringae* 61, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες για την δημιουργία του εκκριτικού συστήματος τύπου III (*T3SS*) και του τελεστή *HopA1*. *P. fluorescens* που φέρει και εκφράζει το *pHIR11* επάγει *HR* στον καπνό λόγω της επαγωγής του *T3SS* και της έκκρισης του *HopA1*. Η συν-έκφραση των *HopAB2* ή *HopX1* ή *HopAM1-1* ή *HopE1*, ή *HopF2* (ένα ομόλογο του *HopF3* του βακτηρίου *P.s. pv. phaseolicola*) στο βακτήριο *P. fluorescens* (*pHIR11*) έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη καταστολή της *HopA1*-επαγόμενης *HR* και (με εξαίρεση τον *HopAM1-1*), την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *PR1* που σχετίζεται με την παθογένεια (*pathogenicity-related gene*). Επίσης, η παροδική έκφραση (μέσω του συστήματος του αγροβακτηρίου) καθενός από τους προαναφερθέντες *T3EPs* σε *in planta* πειράματα, προστάτευσε τα κύτταρα των φυτών από την *HopA1*-επαγόμενη *HR* αποδεικνύοντας ότι η καταστολή της *HR* πραγματοποιείται μέσα στο κύτταρο του φυτού ξενιστή.

Η δυνατότητα καταστολής του *PCD* για μερικούς *T3EPs* δεν περιορίζεται μόνο στην καταστολή της *HopA1*-επαγόμενης *HR*. Οι *HopX1*, *HopE1*, *HopF2*, και *HopG1* καταστέλλουν τον *PCD* που προκαλείται από την πρωτεΐνη *Bax*, σε φυτά αλλά και στο ζυμομύκητα. Αντίθετα όμως από το *HopAB2*, αυτοί οι *T3EPs* δεν μπορούσαν να προστατεύσουν το ζυμομύκητα από τον *PCD* που προκαλείται από το H_2O_2 .

Το γεγονός ότι βακτήρια του είδους *P. syringae* χρησιμοποιούν έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών *T3EPs* για την καταστολή του *PCD* που επάγεται από διάφορα εσωτερικά και εξωτερικά ερεθίσματα στα φυτά, κάνει φανερό ότι αυτό το παθογόνο μπορεί να είχε εξελίξει διαφορετικούς μηχανισμούς καταστολής ώστε να παρεμποδίζει τον *PCD* σε διαφορετικά στάδια της μόλυνσης.

Αυτόματα προκύπτουν τα ερωτήματα, είναι αυτό το φαινόμενο μοναδικό στα βακτήρια του είδους *P. syringae*; ή η καταστολή του *PCD* είναι μια κεντρική απόκριση στην βακτηριακή παθογένεια; Ο προσδιορισμός του μηχανισμού/ων της καταστολής του *PCD* αποτελεί την επόμενη πρόκληση για τους ερευνητές.



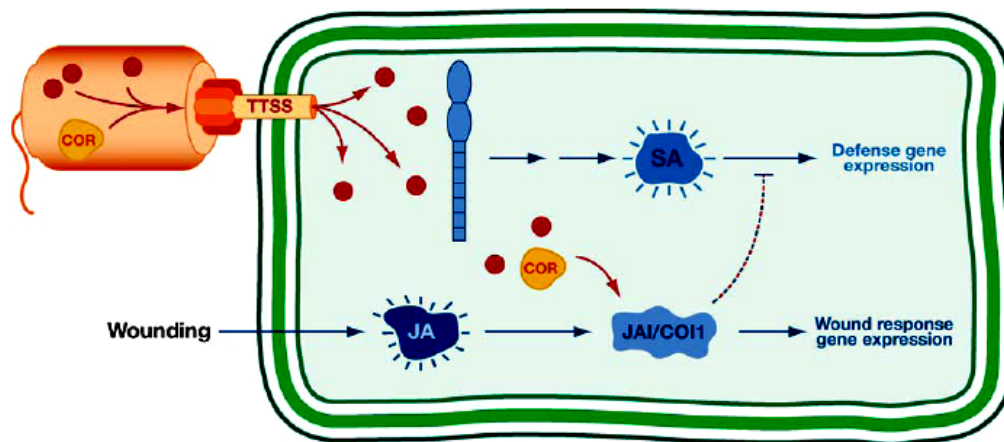
Εικόνα 10. Ο *HopAB2* (*AvrPtoB*) του βακτηρίου *P. s. pv. tomato* δρα καθοδικά (*downstream*) των πρωτεϊνών ανθεκτικότητας R για την καταστολή της *HR* στα κύτταρα των φυτών ξενιστών (*Mudgett, 2005*).

II. Ενεργοποίηση του μονοπατιού παραγωγής του Ιασμονικού οξέος (*JA*)

Ένα μεγάλος αριθμός μελετών στην βιβλιογραφία δείχνει ότι τα παθογόνα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ώστε να ελέγχουν τα επίπεδα του Σαλικυλικού οξέος (*SA*), του Ιασμονικού (*JA*), και του Αιθυλενίου (*ET*), τα οποία σχετίζονται άμεσα με τα μονοπάτια επαγωγής της άμυνας, με σκοπό τον επιτυχή αποικισμό των ξενιστών τους (*Kunkel & Brooks, 2002*). Αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι τα μονοπάτια αυτά αλληλοεπηρεάζονται, μέσω μιας σειράς θετικών ή/και αρνητικών αλληλεπιδράσεων. Παραδείγματος χάριν, τα μονοπάτια του *SA* και του *JA* των φυτών λειτουργούν ανταγωνιστικά (*Kunkel & Brooks, 2002*). Τα βακτηριακά παθογόνα, και ειδικότερα μέλη του είδους *P. syringae*, εκμεταλλεύονται αυτό το γεγονός ώστε να υπερνικήσουν την *SA*-εξαρτώμενη άμυνα των ξενιστών τους. Τα *SA*-εξαρτώμενα σηματοδοτικά μονοπάτια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην επαγωγή της τοπικής και διασυστηματικής ανθεκτικότητας σε μερικά είδη φυτοπαθογόνων βακτηρίων (*Durrant & Dong, 2004*). Εντούτοις, η ενεργοποίηση του *JA*-εξαρτώμενου σηματοδοτικού

Εισαγωγή

μονοπατιού, ενός μονοπατιού που επάγεται χαρακτηριστικά ως απόκριση σε φυτοφάγα (*herbivores*) καθώς και στο πλήγωμα (*wounding*), ρυθμίζει αρνητικά την επαγωγή των SA-εξαρτώμενων μηχανισμών άμυνας, καθιστώντας τα φυτά πιο ευπαθή στη βακτηριακή επίθεση (Ellis, et. al. 2002; Glazebrook, et. al. 2003; Zhao, et. al. 2003). Μια πρόσφατη μελέτη σε φυτά με μεταλλάγματα σε γονίδια των μονοπατιών σηματοδότησης μέσω του SA και του JA παρείχε δεδομένα για το πώς τα φυτοπαθογόνα βακτήρια χρησιμοποιούν τους T3EPs, καθώς και την φυτοτοξίνη Κορονατίνη (*Coronatine-COR*), ώστε να καταστείλουν τις SA-εξαρτώμενες ανοσιακές αποκρίσεις. Μεταλλαγμένα στελέχη του βακτηρίου *P. syringae*, με ανεπάρκεια στην παραγωγή COR, δεν παρήγαν ορατά σημάδια της ασθένειας σε *JA-insensitive* φυτά τομάτας (*jai1*), αν και ο πολλαπλασιασμός τους στον αποπλάστη ήταν συγκρίσιμος με αυτόν των στελεχών «φυσικού» τύπου (*wild type*) (Zhao, et. al. 2003). Αυτό δείχνει ότι η βακτηριακή ανάπτυξη από μόνη της δεν είναι επαρκής για την ανάπτυξη της ασθένειας και ότι άγνωστοι βακτηριακοί παράγοντες καθώς και ένα λειτουργικό μονοπάτι επαγωγής του JA απαιτούνται για την ανάπτυξη των συμπτωμάτων της ασθένειας στα φυτά. Επίσης, έχει δειχτεί ότι η παρουσία της COR και ενός λειτουργικού T3SS, απαιτούνται από το βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato* για την επαγωγή των γονιδίων του μονοπατιού του JA, καθώς και για την καταστολή γονιδίων αντιμικροβιακών πρωτεϊνών σχετιζόμενων με την παθογένεση (*pathogenesis related proteins-PR*) σε ευαίσθητα φυτά τομάτας (Zhao, et. al. 2003). Αυτό δείχνει ότι οι T3EPs τροποποιούν τα δίκτυα μεταγωγής σήματος που επάγονται από το JA και το SA (Εικ. 11).



Εικόνα 11. Το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* χρησιμοποιεί την φυτοτοξίνη κορονατίνη (*coronatine-COR*) και τους T3EPs για την ενεργοποίηση του μονοπατιού του ιασμονικού οξέος (*jasmonic acid-JA*). Με αυτόν τον τρόπο εμποδίζει ή καθυστερεί τις

Διδακτορική Διατριβή Π. Φ. Σαρρής

αμυντικές αποκρίσεις που επάγονται από το σαλικυλικό οξύ (*salicylic acid-SA*) στα κύτταρα των φυτών ξενιστών (Mudgett, 2005).

Η δημιουργία μιας διαγονιδιακής σειράς του φυτού μοντέλου *Arabidopsis*, που λειτουργεί ως σειρά «*reporter*» και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της λειτουργίας της *COR* και του *T3SS* κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης *Pseudomonas*-φυτού, οδήγησε στον προσδιορισμό πέντε *T3EPs* που φαίνεται ότι αυξάνουν την επαγωγή του *JA* (He, et. al. 2004). Ανακαλύφθηκε ότι η *COR* και το *T3SS* είναι απαραίτητα στο βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato* για την πρόκληση πρόωρης έκφρασης του γονιδίου *RAP2.6*, που σχετίζεται με την απόκριση στο *ET*, σε φυτά *Arabidopsis* *COI1* (*coronatine insensistive*). Τα μεταλλάγματα *jail* και *coil* της *Arabidopsis* δεν ανταποκρίνονται στην *COR* και παρουσιάζουν ενισχυμένη ανθεκτικότητα βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato* (Kloek, et. al. 2002; Zhao, et. al. 2003). Αυτό έδειξε ότι η έκφραση του *RAP2.6* θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως ένα γονίδιο *reporter* για την αξιολόγηση της επιρροής μεμονωμένων *T3EPs* στο μονοπάτι επαγωγής του *JA* κατά τη διάρκεια της μόλυνσης.

Συγκρινόμενα με στελέχη αγρίου τύπου του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tomato*, τα μεταλλάγματα που στερούνται τους *T3EPs* *HopK1* ή *HopX1* επάγουν ελάχιστα την έκφραση του χιμαιρικού γονιδίου *reporter* που αποτελείται από τον υποκινητή του *RAP2.6* ο οποίος ελέγχει την έκφραση του γονιδίου της λουσιφεράσης (*luciferase*), σε διαγονιδιακά φυτά *Arabidopsis*. Ενώ, στελέχη που εκφράζουν έναν από τους παρακάτω *T3EPs*: *AvrB*, *AvrRpt2*, ή *HopAB1*, επιτάχυναν την έκφραση του χιμαιρικού γονιδίου *reporter* (He, et. al. 2004). Κανένας όμως από τους πέντε *T3EPs* δεν ήταν επαρκής από μόνος του να ενεργοποιήσει την έκφραση του *RAP2.6*. Αυτό υποδηλώνει ότι για την υπονόμηση του μονοπατιού του *JA* απαιτείται ένας συνδυασμός παραγόντων παθογένειας.

Τέλος, ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι μολυσματικά στελέχη του βακτηρίου *P. syringae* καταστέλλουν ενεργά το γονίδιο *NHO1* της *Arabidopsis*. Το γονίδιο *NHO1* απαιτείται για την επαγωγή της ανθεκτικότητας σε μη-ξενιστές (*nonhost plants*) και αμολυσματικά (*avirulent*) στελέχη του βακτηρίου *P. syringae* (Lu, et. al. 2001). Η καταστολή του *NHO1* φαίνεται να αντιστρέφεται στις μεταλλάξεις *coil* της *Arabidopsis*, καταδεικνύοντας επίσης ότι η σηματοδότηση μέσω του *JA* επιδρά σε αυτήν την αλληλεπίδραση (Kang, et. al. 2003). Η συστατική υπερέκφραση του *NHO1* έδειξε να προφυλάσσει τα φυτά από την κατασταλτική δράση των παθογόνων, με συνέπεια την ενισχυμένη ανθεκτικότητα τους σε ασθένειες. Παραμένει όμως άγνωστο

Εισαγωγή

το ποιοί παράγοντες των παθογόνων καταστέλλουν την έκφραση του *NHO1*, αν και διάφορα *PAMPs* (π.χ. *flagellin*, *DNA*, ή λιποπολυσακχαρίτες) είναι υποψήφια για την καταστολή αυτή (Lu, et. al. 2001). Δεν είναι επίσης σαφές πώς το *NHO1* συμβάλλει στην ανοσοποίηση των φυτών. Το γονίδιο *NHO1* κωδικοποιεί μια κινάση της γλυκερόλης (*glycerol kinase*), η οποία είναι ένα ένζυμο περιορισμένο στον μεταβολισμό της γλυκερόλης, για την μετατροπή της σε γλυκερόλη-3-φωσφορικό (*glycerol-3-phosphate*) (Lu, et. al. 2001). Αυτό μας βάζει στον πειρασμό να σκεφτούμε ότι αλλαγές στον μεταβολισμό της γλυκερόλης μπορεί να έχει επιπτώσεις στις κυτταρικές τράπεζες των λιπιδίων, μορίων που συνδέθηκαν πρόσφατα με την ανθεκτικότητα των φυτών σε ασθένειες (Falk, et. al. 1999; Jirage, et. al. 1999; Kachroo, et. al. 2001; Maldonado, et. al. 2002).

III. Καταστολή της ενίσχυσης του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών ξενιστών

Πρόσφατες μελέτες μικροσκοπίας αποκάλυψαν ότι τα φυτά μπορούν να αναδιαμορφώσουν τα τοιχώματα των κυττάρων τους όταν μολύνονται με «συμβατά» φυτοπαθογόνα βακτήρια με μη λειτουργικό *T3SS* (αλλά όχι και με τα «αγρίου τύπου» αντίστοιχα στελέχη), με συνέπεια τον σχηματισμό παχιών προεξοχών στο κυτταρικό τοίχωμα γνωστών ως *papillae* (Bestwick, et. al. 1995; Brown, et. al. 1995). Οι Hauck et al. (2003), χρησιμοποιώντας ανάλυση *cDNA* μικροσυστοιχιών (*cDNA microarray*) κατόρθωσαν να καθορίσουν τους παράγοντες του *T3SS* που αποτρέπουν τα φυτικά κύτταρα από το να ενεργοποιήσουν τέτοιου είδους αμυντικούς μηχανισμούς. Κατάφεραν να δημιουργήσουν το πρότυπο της έκφρασης γονιδίων του ξενιστή (*A. thaliana*) που σχετίζεται με μολυσματικές διεργασίες που συνδέονται με το *T3SS* του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tomato*. Προσδιόρισαν ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων της *Arabidopsis* που φάνηκε να καταστέλλονται από το *T3SS* και παρουσιάζονται ως *SA*-ανεξάρτητα (Hauck, et. al. 2003). Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν ή προβλέπεται ότι κωδικοποιούν εκκρινόμενες πρωτεΐνες των κυτταρικών τοιχωμάτων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών, συμπεριλαμβανομένων των εξτενσινών (*extensins*) και των *germin-like* πρωτεϊνών, δύο γνωστά συστατικά των *papillae*. Αυτά είναι τα πρώτα μοριακά δεδομένα που αποδεικνύουν ότι το *T3SS* καταστέλλει εξοκυτταρικές διεργασίες στα φυτά ξενιστές, όπως ο σχηματισμός των *papillae* (Hauck, et. al. 2003). Η φύση των βακτηριακών παραγόντων, από μέλη του γένους *Pseudomonas*, που προκαλούν αναδιαμόρφωση του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών δεν είναι σαφής, αν και λιποπολυσακχαρίτες (*lipopolysaccharides-LPSs*) που παράγονται από βακτήρια του

είδους *X. campestris* pv. *vesicatoria* φαίνεται να προκαλούν μια παρόμοια απόκριση σε φυτά πιπεριάς (*Keshavarzi, et. al. 2004*).

Ο *Hauck* και οι συνεργάτες του έδειξαν επίσης ότι ο τελεστής *AvrPto*, του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tomato*, είναι ένας από τους παράγοντες παθογένειας που έχει την ικανότητα να καταστέλλει τον σχηματισμό των *papillae* (*Hauck, et. al. 2003*). Αυτό δείχθηκε χρησιμοποιώντας μια διαγονιδιακή σειρά της *Arabidopsis* που εκφράζει τον *T3EP AvrPto*. Η έκφραση του *AvrPto in planta* πειράματα απέτρεψε τον ξενιστή από το να αποκριθεί κατάλληλα, σχηματίζοντας *papillae*, σε μολύνσεις με *T3SS* μεταλλάγματα του *P. syringae* pv. *tomato*. Αυτά τα φυτά αδυνατούν να εναποθέσουν καλόζη (ένα συστατικό των *papillae*) στα κυτταρικά τοιχώματα τους. Κατά συνέπεια, τα *T3SS* μεταλλαγμένα στελέχη αυξήθηκαν αλλά απέτυχαν να προκαλέσουν συμπτώματα νέκρωσης ή υδαρής κηλίδας (*watersoaking*) στα φύλλα του φυτού (*Hauck, et. al. 2003*). Επιπλέον, τα φυτά που εκφράζουν τον *AvrPto* παρουσιάζουν ένα προφίλ γονιδιακής έκφρασης εντυπωσιακά όμοιο με αυτό των φυτών που έχουν μολυνθεί με το παθογόνο στέλεχος (*Hauck, et. al. 2003*). Δείχτηκε επίσης ότι, ένα βακτηριακό στέλεχος που φέρει μεταλλαγμένη (μη λειτουργική) την πρωτεΐνη *AvrPto* είναι επίσης σε θέση να επάγει/καταστείλει το ίδιο σύνολο *T3SS*-εξαρτώμενων γονιδίων στην *Arabidopsis*. Έτσι ενισχύεται η υπόθεση ότι περισσότεροι του ενός *T3EPs* είναι ικανοί να καταστείλουν τις αμυντικές διεργασίες ενίσχυσης των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών προωθώντας τα συμπτώματα της ασθένειας.

Δύο ακόμα *T3EPs* του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tomato* χαρακτηρίστηκαν ως καταστολείς των αμυντικών μηχανισμών που σχετίζονται με το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών. Ο *DebRoy* και οι συνεργάτες του (*DebRoy, et. al. 2004*), έδειξαν ότι οι τελεστές *HopMI* και *AvrEI* καταστέλλουν την εναπόθεση καλόζης σε φυτά *Arabidopsis* μολυσμένα με *Pseudomonas*. Αυτές οι πρωτεΐνες μαζί με τις *HopAA1* και *HrpWI* κωδικοποιούνται από έναν συντηρημένο γενετικό τόπο (*conserved effector locus-CEL*), μια συστάδα γονιδίων που είναι ευρέως συντηρημένη μεταξύ διαφορετικών παθότυπων του *P. syringae* (*Alfano, et. al. 2000*). Μεταλλάξεις που οδηγούν στην αφαίρεση (*deletion*) της *CEL* (*ΔCEL*) φαίνεται να επηρεάζουν σοβαρά τη μολυσματικότητα του βακτηρίου στην ντομάτα (*Alfano, et. al. 2000*). Η απώλεια αυτή της μολυσματικότητας οφείλεται πρώτιστα στη απώλεια της δράσης των *HopMI* και *AvrEI*. Πρέπει να αναφέρουμε εδώ ότι οι *HopMI* και *AvrEI* μπορούν να καταστείλουν αμυντικούς μηχανισμούς σχετιζόμενους με το κυτταρικό τοίχωμα οι οποίοι είναι *SA*-εξαρτώμενοι (*DebRoy, et. al. 2004*). Η λειτουργία τους αυτή όμως είναι πολύ διαφορετική από την

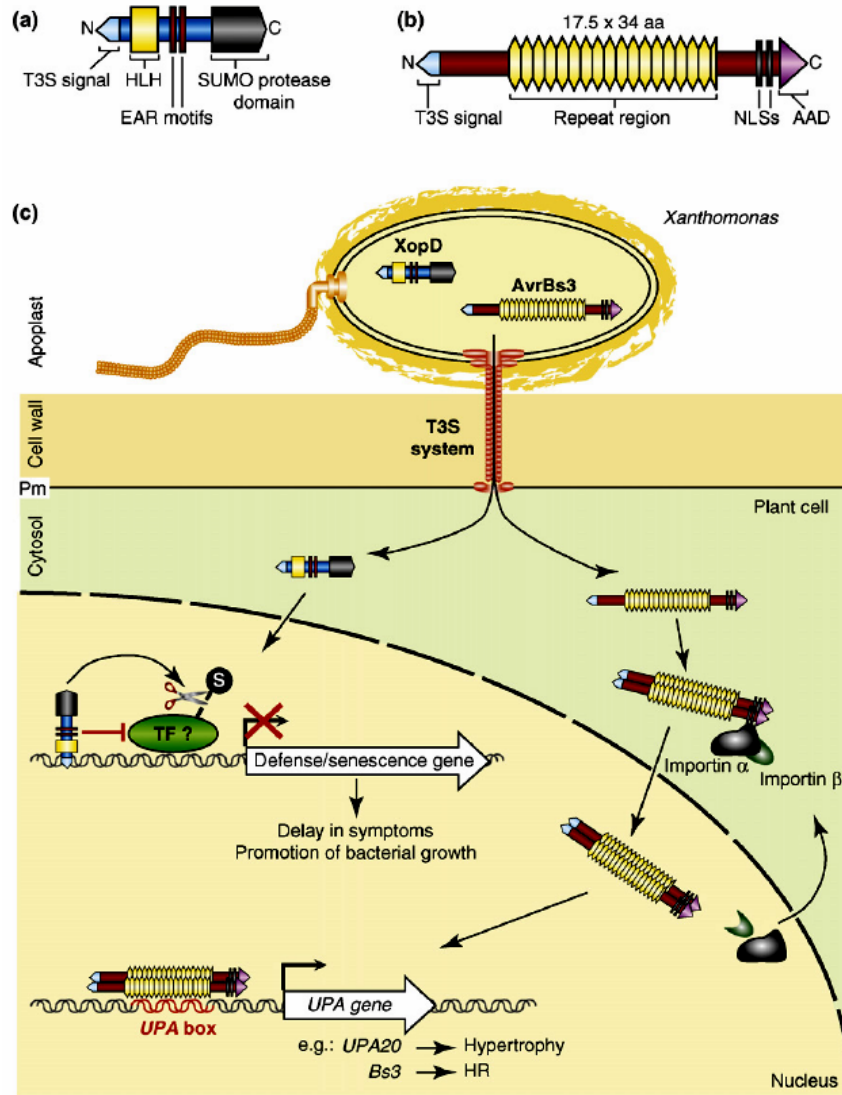
Εισαγωγή

καταστολή των SA-ανεξάρτητων αμυντικών μηχανισμών που σχετίζονται με την ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος από τον *AvrPto* όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Η χρήση και ανάλυση μικροσυστοιχιών της *Arabidopsis* έδειξε ότι ο *CEL* γενετικός τόπος δεν καταστέλλει τα κλασικά SA-επαγόμενα αμυντικά γονίδια που ενεργοποιούνται από τις πρωτεΐνες ανθεκτικότητας (*DebRoy, et. al. 2004*). Αυτό δείχνει ότι οι *HopMI* και *AvrE1* δρουν πολύ εξειδικευμένα στις βασικές SA-εξαρτώμενες αμυντικές αποκρίσεις των φυτών. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι αυτός ο μηχανισμός καταστολής προωθεί τον κυτταρικό θάνατο στους ξενιστές, ένα γεγονός που είναι κρίσιμο για την ανάπτυξη της νέκρωσης στην ασθένεια. Η ανάλυση ενός γονιδίου ορθόλογου του *AvrE1*, του *DspA/E* από την *CEL* περιοχή του *E. amylovora* επιβεβαιώνει ότι ο *DspA/E* ενεργεί επίσης ως καταστολέας της άμυνας που βασίζεται στην ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος σε αλληλεπιδράσεις *Erwinia*-μηλιάς (*DebRoy, et. al. 2004*). Αυτό δείχνει ότι η λειτουργία των *HopMI* και *AvrE1* μπορεί να είναι συντηρημένη στρατηγική παθογένειας που χρησιμοποιείται από πολλά φυτοπαθογόνα για να παράκαμψη βασικών μηχανισμών άμυνας των φυτών.

IV. Ενεργοποίηση της μεταγραφής στα φυτά

Μέλη της οικογένειας *AvrBs3* των *T3EPs*, εμφανίζονται ιδιαίτερα συντηρημένα και βρίσκονται σε πολλά βακτήρια του γένους *Xanthomonas spp.* (*Leach, et. al. 2001*). Σε αρκετές συμβατές αλληλεπιδράσεις φυτών με μέλη του γένους *Xanthomonas*, οι *T3EPs* της οικογένειας *AvrBs3* συμμετέχουν ενεργά στην προώθηση των συμπτωμάτων της ασθένειας. Παραδείγματος χάριν, ο τελεστής *AvrBs3* από το *X. campestris* pv. *vesicatoria* προκαλεί υπερτροφία των κυττάρων του μεσόφυλλου (*mesophyll*) σε φυτά πιπεριάς (*Marois, et. al. 2002*), ο *PthA* από το βακτήριο *X. citri* επάγει τη δημιουργία έλκους στα εσπεριδοειδή (*Swarup, et. al. 1991*), ο *AvrXa7* από το βακτήριο *X. oryzae* συμβάλλει στο μέγεθος της βλάβης σε φυτά ρυζιού (*Bai, et. al. 2000*), και ο *AvrB6* του βακτηρίου *X. campestris* pv. *malvacearum* συμβάλλει στην ανάπτυξη υδαρών κηλίδων (*watersoaking*) σε φύλλα βαμβακιού (*Yang et. al. 1996*). Αυτοί οι τόσο διακριτοί φαινότυποι παράγονται από μια ομάδα πολύ όμοιων στις αλληλουχίες τους πρωτεϊνών τελεστών. Οι *T3EPs* αυτοί περιέχουν ιδιαίτερα συντηρημένες N- και C-τελικές περιοχές και μια μεταβλητή κεντρική περιοχή που αποτελείται από διαδοχικές επαναλήψεις. Όλα τα μέλη της οικογένειας έχουν τρία σινιάλα πυρηνικού εντοπισμού (*nuclear localization signal-NLSs*) και *AAD* (*acidic transcriptional activation domain*) στο

καρβοξυτελικό άκρο τους. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι οι *T3EPs* αυτοί δρουν στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων διαμορφώνοντας την μεταγραφική μηχανή του ξενιστή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα σειράς μελετών, οι *AvrBs3*, *Avrb6*, *AvrXa7*, και *PthA* έχουν λειτουργικά *NLSs* (*Van den Ackerveken, et. al. 1996; Yang, et. al. 2000; Yang, et. al. 1995*) ενώ η *AAD* του *AvrXa10* ενεργοποιεί την μεταγραφή στο ζυμομύκητα και στην *Arabidopsis* (*Zhu, et. al. 1998*). Ο *AvrBs3* χρησιμοποιεί ένα από τα *NLSs* του ώστε να αλληλεπιδράσει με την ιμφορτίνη-α (*importin-α*), ένα συστατικό της πυρηνικής μηχανής εισαγωγής πρωτεϊνών (*Szurek, et. al. 2001; Szurek, et. al. 2002*). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι ο *AvrBs3*, ενδεχομένως και άλλα μέλη της οικογένειας αυτής, μπορούν να εκμεταλλευτούν την ιμφορτίνη-α για την μεταφορά τους στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων. Ένα μελλοντικό ερώτημα που πρέπει να απαντηθεί είναι ο προσδιορισμός του συνόλου των φυτικών γονιδίων που ρυθμίζονται άμεσα από κάθε μέλος της οικογένειας *AvrBs3*. Εντούτοις, ο *AvrXa7* προσδένεται κατά προτίμηση δίκλωνες *DNA* αλληλουχίες πλούσιες σε *dA/dT* (*Yang, et. al. 2000*), ενώ ο *AvrBs3* προκαλεί την έκφραση γονιδίων όμοιων με εξπανσίνες (*expansin-like genes*), που επάγονται από την αυξίνη, σε φυτά πιπεριάς (*Marois, et. al. 2002*). Τα στοιχεία αυτά δείχνουν ότι η οικογένεια *AvrBs3* των *T3EPs* επιδρά στον πυρήνα των φυτικών κυττάρων με αποτέλεσμα την υπονόμηση της μεταγραφής (**Εικ. 12**).



Εικόνα 12. Πρότυπο της μοριακής λειτουργίας των *T3EPs* *XopD* και *AvrBs3* (Kay and Bonas, 2009). Παρουσιάζονται οι πρωτεϊνικές δομές των (a) *XopD* και (b) *AvrBs3* παρουσιάζονται (c) ο προτεινόμενος τρόπος δράσης των εν λόγω *T3EPs*. Μετά από την διαμετακόμιση του μέσω του *T3SS* ο *XopD* μεταφέρεται στον πυρήνα του φυτικού κυττάρου. Εδώ προσδένεται στο DNA μη ειδικά μέσω ενός μοτίβου έλικας-βρόχου-έλικας (*helix-loop-helix* *HLH*). Μέσω δύο μοτίβων *EAR* ο *XopD* ίσως να εμποδίσει μεταγραφικούς παράγοντες του φυτικού κυττάρου που ακόμα δεν είναι γνωστοί (*TFs*). Επιπλέον, ο *XopD* έχει δραστηριότητα πρωτεάσεων *SUMO* που οδηγεί στην αποσομουύλωση (*deSUMOylation*) άγνωστων πρωτεϊνών στόχων (Hotson, et.al. 2003). Οι δραστηριότητες του *XopD* οδηγούν στην καταστολή των αμυντικών μηχανισμών και γονιδίων που σχετίζονται με το κυτταρικό γήρας με συνέπεια την καθυστέρηση των συμπτωμάτων της ασθένειας και την αύξηση του βακτηριακού πολλαπλασιασμό στο φυτό (Kim, et. al. 2008).

Ο *AvrBs3* διμερίζεται στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων και αλληλεπιδρά με την ιμφορτίνη-α μέσω των σινιάλων πυρηνικού εντοπισμού (*NLSs*) (Gurlebeck, et. al. 2006). Το πρωτεϊνικό σύμπλοκο δεσμεύεται από την ιμφορτίνη-β οδηγώντας στην εισαγωγή στον πυρήνα. Εκεί, ο *AvrBs3* δεσμεύεται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA, που ονομάζεται *UPA box*, και ενεργοποιεί τη μεταγραφή περισσότερων από 10 γονίδια *UPA* (Kay, et. al. 2007; Romer, et. al. 2007). Το *UPA20*, ένα από τα επαγόμενα γονίδια, είναι ο βασικός ρυθμιστής της κυτταρικής υπερτροφίας των φυτικών κυττάρων (Kay, et. al. 2007). Σε ανθεκτικά φυτά πιπεριάς, η ενεργοποίηση του γονιδίου ανθεκτικότητας *Bs3* οδηγεί στην επαγωγή *HR* (Romer, et. al. 2007). *AAD*: acidic activation domain, *Pm*: πλασματική μεμβράνη.

Πρόσφατα, αποδείχτηκε ότι ο *AvrBs3*, είναι ένα τυπικό μέλος μιας μεγάλης πρωτεϊνικής οικογένειας γνωστής επίσης ως *TAL T3EPs* που μοιάζουν με επαγωγείς της μεταγραφής (*transcription activator-like*) και δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες προκαλώντας άμεσα την έκφραση γονιδίων των φυτικών κυττάρων (Kay, et. al. 2007; Romer, et. al. 2007).

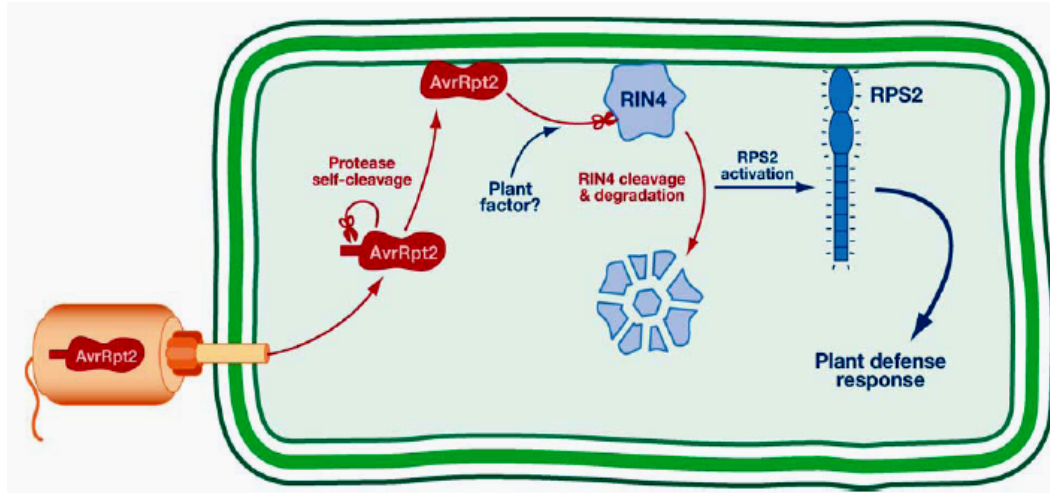
Η οικογένεια *AvrBs3* είναι η μεγαλύτερη και καλύτερα, μέχρι τώρα, μελετημένη ομάδα από τις *TAL T3EPs*, αν και είναι φανερό ότι υπάρχουν και άλλοι *T3EPs* που επίσης μιμούνται τους ευκαρυωτικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Παράδειγμα αποτελούν οι *XorD* από το βακτήριο *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Εικ. 12) και οι *HsvB* και *HsvG* από το βακτήριο *Pantoea agglomerans* (Nissan, et. al. 2006). Όπως έχει αναφερθεί η οικογένεια *AvrBs3* εντοπίζεται μόνο σε βακτήρια του γένους *Xanthomonas* spp., με μερικούς λιγότερο συντηρημένους συγγενείς στο βακτήριο *Ralstonia solanacearum*.

V. Καταστολή των πρωτεϊνών ανθεκτικότητας R

Ο *T3EP AvrRpt2* του βακτηρίου *P. syringae* pv. *tomato* φαίνεται να διαδραματίζει πολλούς ρόλους στα κύτταρα φυτών. Εντούτοις, είναι σαφές ότι ένας από τους ρόλους του στις αλληλεπιδράσεις των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* με το φυτό μοντέλο *Arabidopsis* είναι να καταστείλει άμεσα την ενεργοποίηση του *RPM1*-εξαρτώμενου μονοπατιού ανθεκτικότητας του ξενιστή. Πληθώρα νέων γενετικών και βιοχημικών στοιχείων δείχνουν ότι ο *AvrRpt2* παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του *RPM1* λειτουργώντας ως πρωτεάση κυστεΐνης (*cysteine protease*) (Marois, et. al. 2003a; Marois, et. al. 2003b, Mackey, et. al. 2003).

Η πρωτεΐνη *AvrRpt2* είναι ένας μοναδικός *T3EP* που έχει βρεθεί μόνο στο βακτήριο *P. syringae* pv. *tomato*. Ο *AvrRpt2* μεταφέρεται στα φυτικά κύτταρα, μέσω του *T3SS*, όπου υποβάλλεται σε N-τελική περικοπή από τη οποία δημιουργούνται δύο πεπτίδια (Mudgett & Staskawicz, 1999). Το C-τελικό πεπτίδιο του *AvrRpt2* είναι αρκετό ώστε να ενεργοποιήσει τη μεταγωγή αμυντικών σημάτων σε φυτά που περιέχουν το λειτουργικό γονίδιο ανθεκτικότητας *RPS2*. Επιπλέον, ο *AvrRpt2* φαίνεται να προκαλεί μια *RPS2*-ανεξάρτητη εξαφάνιση του παράγοντα *RIN4* (Marois, et. al. 2003b, Mackey, et. al. 2003), μιας νέας πρωτεΐνης που απαιτείται για την *RPM1*-εξαρτώμενη ανθεκτικότητα (Mackey, et. al. 2002). Αυτό προέτρεψε τον Axtell και τους συνεργάτες του να υποψιαστούν ότι ο *AvrRpt2* κωδικοποιεί μια *RIN4* πρωτεάση. Χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόβλεψης δομών *3D-PSSM*, καθόρισαν ότι η πρωτεΐνη *AvrRpt2* περιέχει έναν καταλυτικό κέντρο με δομικές πτυχές παρόμοιες με αυτές της σταφοπαΐνης

(*staphorain*), μιας κυστεϊνικής πρωτεάσης της οικογένειας C47 (Marois, et. al. 2003a). Σύμφωνα με αυτή την πρόβλεψη, μεταλλάξεις στον καταλυτικό κέντρο του *AvrRpt2* αποτρέπουν το τεμαχισμό του *AvrRpt2* και την διάσπαση του *RIN4*, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του *RPS2* (Marois, et. al. 2003a).



Εικόνα 13. Πρότυπο δράσης της κυστεϊνικής πρωτεάσης *AvrRpt2* σε ανθεκτικά *RPS2* φυτά *Arabidopsis* που μολύνθηκαν με *P. syringae* pv. *tomato*.

Στην συνέχεια πειραματικά αποτελέσματα από *in planta* πειράματα έδειξαν ότι ο τεμαχισμός του *AvrRpt2* είναι αυτό-καταλυτικός και ότι το *RIN4* λειτουργεί ως υπόστρωμα για τον *AvrRpt2*. Επιπλέον, αυτό στηρίζει πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι η ενεργοποίηση του *RPS2* συνδέεται με την αποδόμηση του *RIN4* (Marois, et. al. 2003b, Mackey, et. al. 2003) (Εικ. 13).

Κρίσιμα δεδομένα όσων αφορά στην ενζυματική λειτουργία των *T3EPs* προέκυψαν πρόσφατα από την μελέτες που αφορούν πέντε οικογένειες *T3EPs*. Με την υιοθέτηση λογισμικών πρόβλεψης πρωτεϊνικών δομών, οι ερευνητές προσδιόρισαν μοναδικές πρωτεϊνικές πτυχώσεις και συντηρημένα καταλυτικά αμινοξικά υπολείμματα που βρίσκονται μέσα σε αυτές τις πρωτεΐνες. Με αυτό τον τρόπο, διευκρίνισαν ότι μερικοί *T3EPs* κωδικοποιούν ένζυμα με ευδιάκριτες καταλυτικές δραστηριότητες. Αυτές οι ανακαλύψεις επέτρεψαν στους ερευνητές να εξετάσουν το μηχανισμό της δράσης των *T3EPs* και για να ερευνήσουν το πώς μεμονωμένοι *T3EPs* ενεργοποιούν αμυντικά μονοπάτια σχετιζόμενα με τις πρωτεΐνες ανθεκτικότητας. Ένας πίνακας με της ενζυμικές δραστηριότητες των γνωστότερων *T3EPs* παρατίθεται παρακάτω (Πίνακας 3).

TTE (previous name)	Species (pathovar)	Biochemical activity	Proposed virulence action
Effectors that subvert the host ubiquitination system			
HopAB2 (AvrPtoB)	<i>P.s. (tomato)</i>	E3 ligase	Alter ethylene responses Suppress cell death Suppress HopPsyA-dependent HR Suppress basal defenses Target proteins for ubiquitination
GALA1-7	<i>R. solanacearum</i>	SCF components	Target proteins for ubiquitination
Effectors with protease activity			
AvrRpt2	<i>P.s. (maculicola)</i>	Staphopain cysteine protease	Suppress basal defenses Induce JA-responsive genes Suppress RPM1-induced HR SA independent virulence function
XopD	<i>X.c. (vesicatoria)</i>	C48 cysteine protease	DeSUMOylate proteins
AvrXv4	<i>X.c. (vesicatoria)</i>	YopJ-like cysteine protease	DeSUMOylate proteins
AvrBsT	<i>X.c. (vesicatoria)</i>	YopJ-like cysteine protease	ND
AvrRxv	<i>X.c. (vesicatoria)</i>	YopJ-like cysteine protease	ND
XopJ	<i>X.c. (vesicatoria)</i>	YopJ-like cysteine protease	ND
PopP1	<i>R. solanacearum</i>	YopJ-like cysteine protease	ND
PopP2	<i>R. solanacearum</i>	YopJ-like cysteine protease	ND
HopZ2 (AvrPpiG1)	<i>P.s. (pisi)</i>	YopJ-like cysteine protease	Target host SUMOylated proteins
HopC1 (HopPtoC)	<i>P.s. (tomato)</i>	Papain-like cysteine protease	Inhibit flagellin-induced <i>NHO1</i> expression
HopN1 (HopPtoN)	<i>P.s. (tomato)</i>	Papain-like cysteine protease	Suppress cell death
HopAR1 (AvrPphB)	<i>P.s. (phaseolicola)</i>	Papain-like cysteine protease	Induce JA -responsive genes Degradation of PBS1
HopX1 (AvrPphE)	<i>P.s. (many pathovars)</i>	Cysteine protease	Induce JA -responsive genes Suppress HopPsyA-dependent HR
Effectors that alter host protein phosphorylation			
AvrB1 (AvrB)	<i>P.s. (glycinea)</i>	Serine/threonine kinase	Suppress basal defenses Induce JA-responsive genes
HopAO1 (HopPtoD2)	<i>P.s. (tomato)</i>	Protein tyrosine phosphatase	Suppress cell death Induce JA-responsive genes
HopAl1 (HolPtoAl)	<i>P.s. (tomato)</i>	Phosphothreonine lyase	Inhibit MAPK-signaling Inhibit flagellin-induced <i>NHO1</i> expression
Effectors acting as transcription factors			
AvrBs3 family (VirE3)	<i>Xanthomonas spp.</i>	Transcription factor	Suppress nonhost HR
HsvG/HsvB	<i>Pantoea agglomerans</i>	Transcription factor	Gall formation
Other activities of effectors			
AvrBs2	<i>X.c. (many pathovars)</i>	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	Required for full virulence
AvrD1 (AvrD)	<i>P.s. (many pathovars)</i>	Syringolide synthase	ND

Πίνακας 3. Γνωστές προβλεπόμενες ενζυμικές ενεργότητες. **Συντμήσεις:** *P.s.* (*Pseudomonas syringae*), *X.c.* (*Xanthomonas campestris*), *R.* (*Ralstonia*), *ND* (δεν καθορίζεται), *SUMO* (μικρός *ubiquitin-like* τροποποιητής), (*da Cunha, et. al. 2007*).

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας που παρουσιάζεται στο παρόν κεφάλαιο της διατριβής είναι η βιοπληροφορική ανάλυση και λειτουργική μελέτη καινοφανών παραγόντων παθογένειας σε αρνητικά κατά *Gram* φυτοπαθογόνα βακτήρια. Στην συνέχεια θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα από την βιοπληροφορική μελέτη και λειτουργική ανάλυση δύο πιθανών νέων *T3EPs* του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a καθώς και ομολόγων τους από άλλους παθότυπους του είδους *P. syringae*. Από την μελέτη αυτή, που έγινε σε συνεργασία με την ομάδα του *Prof. Steven Lindow* (*Department of Plant and Microbial Biology, University of California, Berkeley, USA*) προέκυψαν δεδομένα για τουλάχιστον μία πρωτεΐνη η οποία φαίνεται να είναι *T3SS* σχετιζόμενη και επάγεται κατά τη φάση του επιφυτικού αποικισμού. Στα πειραματικά μας αποτελέσματα η πρωτεΐνη αυτή προκαλεί την επαγωγή ανοσιακής απόκρισης τύπου *HR* σε φυτά δείκτες.

Ακολουθούν τα αποτελέσματα από την βιοπληροφορική μελέτη για την γονιδιωματική εξόρυξη πιθανών γενετικών νησίδων που σχετίζονται με την κωδικοποίηση εκκριτικών συστημάτων τύπου *VI* (*T6SS*) στα τρία αλληλουχημένα στελέχη των τριών παθότυπων του είδους *P. syringae*. Οι μέχρι σήμερα πληροφορίες για την ύπαρξη γονιδιωματικών νησίδων που να κωδικοποιούν *T6SS* στα κατά *Gram* αρνητικά φυτοπαθογόνα βακτήρια είναι υποτυπώδεις, σε αντίθεση με την πληθώρα των δεδομένων που συναντάμε στην βιβλιογραφία για την ύπαρξη και την λειτουργική ανάλυση των *T6SS* σε *Gram* αρνητικά παθογόνα βακτήρια των θηλαστικών.

Αποτελέσματα

Βιοπληροφορική εξόρυξη και μελέτη νέων παραγόντων παθογένειας

Εντοπισμός νέων πιθανών πρωτεϊνών παθογένειας (T3EPs)

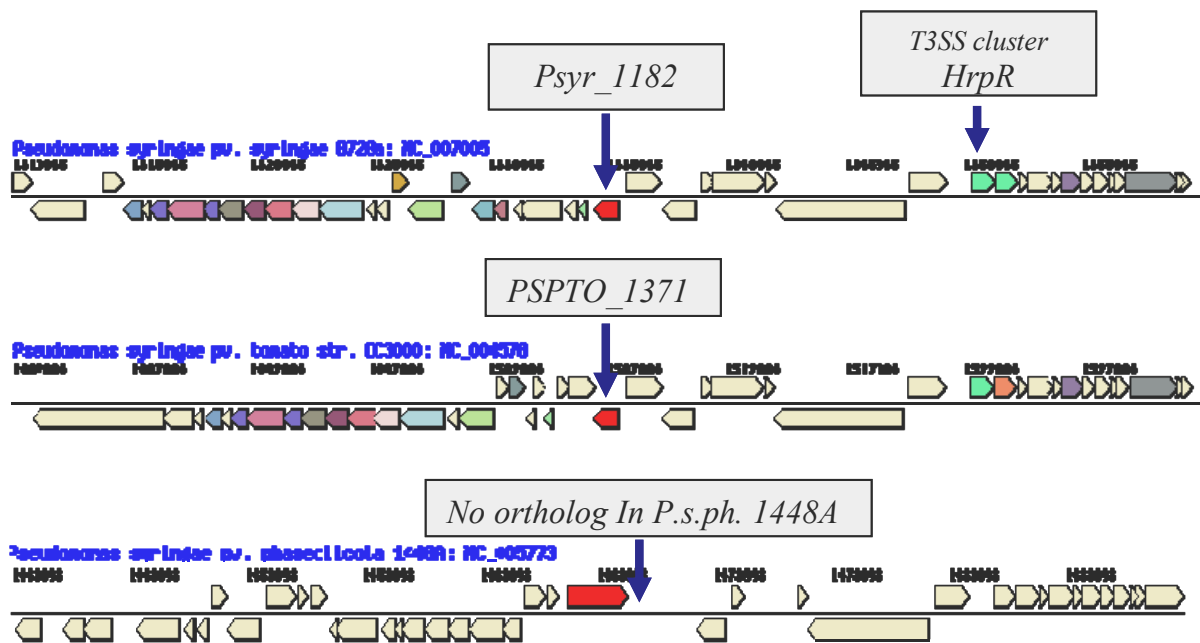
Στο μέρος αυτό της διδακτορικής διατριβής θα παρουσιαστούν τα δεδομένα για τον εντοπισμό και το λειτουργικό χαρακτηρισμό δύο νέων πιθανών πρωτεϊνών παθογένειας. Πρόκειται για τις πρωτεΐνες (α) *ORF6* από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) στέλεχος *B728a* και (β) μία ομόλογη της *PpkB* (του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*) από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Psph*) στέλεχος *1448A*.

I. Βιοπληροφορική μελέτη της πρωτεΐνης *ORF6* (γενετικός τόπος *Psyr_1182*)

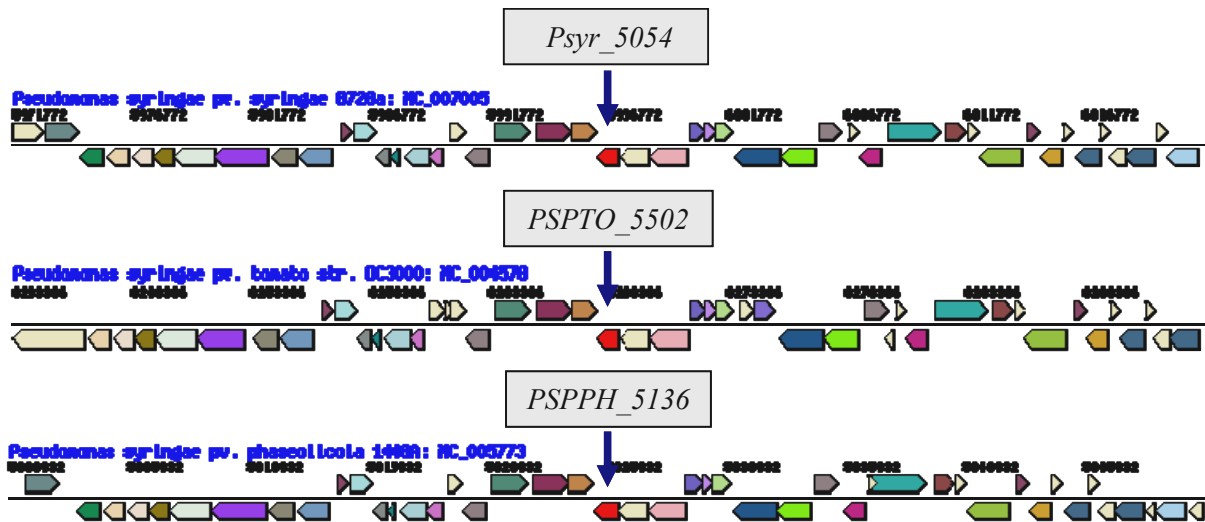
Η πρώτη εξ αυτών, η πρωτεΐνη *ORF6*, χαρτογραφείται κοντά σε άλλες πρωτεΐνες παθογένειας στο γενετικό τόπο *CEL* (*conserved effector locus*) της νησίδας παθογένειας (*hrp/hrc pathogenicity island*) του βακτηρίου *P.s. pv. syringae B728a* και δεν είχε μελετηθεί στο παρελθόν. Η χαρτογραφική θέση του γονιδίου και η υψηλή επαγωγή του κατά τον αποικισμό των φύλλων από το βακτήριο (Marco, et. al. 2005), συνιστούν ενδείξεις για την πιθανή συμμετοχή του σε κάποιο στάδιο της αλληλεπίδρασης βακτηρίου-ξενιστή.

Για την βιοπληροφορική ανάλυση αρχικά χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *BLAST* στη βάση δεδομένων *NCBI* και στη συνέχεια το πακέτο *IMG* (*Integrated Microbial Genomes*) στη βάση δεδομένων του *DOE-JGI*, χρησιμοποιώντας τις εντολές «*compare genomes*» και «*ortholog/paralog search*». Σκοπός της παραπάνω εργασίας ήταν η ανίχνευση ομολόγων του *Orf6* στα γονιδιώματα όλων των αλληλουχημένων εκπροσώπων του είδους *P. syringae*. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι: (i) υπάρχει ένα ομόλογο του *Orf6* γονίδιο στην γενετική περιοχή *CEL* («ορθόλογο») του γονιδιώματος του στελέχους *P. syringae* pv. *tomato DC3000 (Pst)* αλλά όχι και σε εκείνο του στελέχους *P. Syringae* pv. *phaseolicola 1448A (Psph)*, και (ii) και στους τρεις παθότυπους εντοπίστηκε ομόλογο γονίδιο σε άλλο γενετικό τόπο («παράλογο»). Οι παρατιθέμενες εικόνες (**Εικ. 14α-β**) δείχνουν τους τοπικούς γενετικούς χάρτες των περιοχών που κωδικοποιούν ομόλογα του *Orf6* που ανευρέθηκαν μέσω της εντολής «*ortholog/paralog search*» του *IMG*, ενώ στις **εικόνες 15** και **17α-β** εμφανίζονται οι συστοιχίες των αλληλουχιών των αμινοτελικών άκρων, των πρωτεϊνών σε όλο τους το μήκος και το εξελικτικό τους κλαδόγραμμα, αντίστοιχα.

Με την χρήση βιοπληροφορικών κριτηρίων εξετάσαμε το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης *ORF6* για την παρουσία/απουσία «υποψήφιου» σινιάλου έκκρισης μέσω του *T3SS*. Το σινιάλο αυτό χαρακτηρίζεται: **a)** από την παρουσία $\geq 10\%$ καταλοίπων σερίνης (*Ser*) στα πρώτα 50 αμινοξέα, **b)** από την παρουσία των καταλοίπων ισολευκίνης, λευκίνης, βαλίνης ή προλίνης (*Ile*, *Leu*, *Val* ή *Pro*) στην 3η ή την 4η θέση του αμινοτελικού άκρου, και **c)** από την απουσία καταλοίπων ασπαρτικού ή γλουταμινικού (*Asp* ή *Glu*) στα πρώτα 12 αμινοξέα της πρωτεΐνης.



Εικόνα 14α: Θέση των ορθολόγων γονιδίων που κωδικοποιούν ομόλογες πρωτεΐνες της *Orf6* (*Psysr_1182*) σε άλλους παθότυπους του *P. syringae*. Η περιοχή δεξιά του γονιδιακού τόπου *Psysr_1182* είναι συνταϊνική στους παθότυπους *Pss* B728a και *Pst* DC3000, ενώ στην κατατεθειμένη αλληλουχία του παθότυπου *Psph* 1448A (ιστότοπος www.Pseudomonas.org) δεν φαίνεται να υπάρχει ορθόλογο μεταφραστικό πλαίσιο. Με *HrpR* σημειώνεται η έναρξη της νησίδας γονιδίων που είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφική ρύθμιση του *T3SS* (εμφανίζεται ως συνταϊνική και στους τρεις παθότυπους).



Εικόνα 14β: Θέση των παράλογων γονιδίων που κωδικοποιούν ομόλογες πρωτεΐνες της *Orf6* (*Psyr_5054*) σε άλλους παθότυπους του *P. syringae*. Οι περιοχές δεξιά και αριστερά του γονιδιακού τόπου *Psyr_5054* είναι συντηνική και για τους τρεις παθότυπους *Pss* B728a και *Pst* DC3000, και *PspH* 1448A.

Εκ πρώτης όψεως φαίνεται ότι από τα τρία κριτήρια ικανοποιείται μόνο το δεύτερο. Όμως, έπειτα από λεπτομερή ανάλυση άλλων γνωστών και υποψηφίων *T3EPs* είδαμε ότι λίγοι από αυτούς πληρούν και τα τρία κριτήρια, μεταξύ αυτών και ορισμένοι για τους οποίους η έκκριση μέσω του *T3SS* και η *in planta* δραστηριότητά τους έχουν καταδειχθεί στο παρελθόν από διάφορες ερευνητικές ομάδες.

Psyr_1182	-----MSGPFEEKWRCISRTVTIYVGWSLFWLLLDV	31
PSPTO_1371	-----MSGPFEEKWRCFTRTVTIYVGWSLFWLLLDV	31
Psyr_5054	-----MQQTIIISKIRFLGKTIGYVGWSLFWLLLDV	31
PSPPH_5136	MRITICRFGIQPCGRQCPAIRLFFDGVLLQQTIIISKIRFLGKTIGYVGWSLFWLLLDV	60
PSPTO_5502	-----MQQTIMS KVRFLGKTIGYVGWSLFWLLLDV	31
	: : . * * : : * : *****:***	

Εικόνα 15. Συστοίχιση του αμινοτελικού άκρου των ομόλογων πρωτεϊνών του *ORF6*. Το παράλογο *PSPPH_5136* του παθότυπου *PspH* 1448A εμφανίζεται να έχει μία επιμήκυνση στην αλληλουχία του αμινοτελικού του άκρου έγινε χρήση του αλγόριθμου *CLUSTAL-W* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

Βαθύτερη ανάλυση στον γενετικό τόπο που θα έπρεπε να εντοπίζεται το ορθόλογο του *Orf6* στον παθότυπο *PspH* 1448A, αποκάλυψε την ύπαρξη δύο σημειακών μεταλλαγών οι οποίες είναι υπεύθυνες για την απουσία ομόλογου γονιδίου στο γένωμα του βακτηρίου αυτού. Την πρώτη μεταλλαγή στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του *ORF6* ομολόγου από το *PspH* 1448A αποτελεί η ένθεση μιας βάσης G (Εικ. 16a I) στην θέση 82. Η ένθεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης. Μετά την απομάκρυνση (*in silico*) της εισερχόμενης βάσης στην θέση 82, η προκύπτουσα πρωτεΐνη φαίνεται να είναι αρκετά όμοια με την *ORF6* του *Pss* B728a (Εικ. 16β). Όμως μια δεύτερη σημειακή μεταλλαγή στην θέση 213 έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός κωδικονίου λήξης της μετάφρασης (Εικ. 16a II).

I

```

1 ATGACTGGTCTTTTCGAAAAAAAATGGCGGTGCATCAGCAGAACAGTGACCTATGTTGGC
1 M T G L F E K K W R C I S R T V T Y V G
61 TGGTCGCTGTCTGGCTCTTCTCTCTGGGACCTGGCCGTGACCATGGATGTCATGCTGAT
21 W S L F W L L L A L G P G R D H G C H A D
121 CGAAGGCAAGGGCATCGATTTC CCGCTGATGCCCTCTCAGCTGCTTTGCTCGGCATTGAT
41 R R Q G H R F P A D A S H A A L L G I D

II
1 ATGACTGGTCTTTTCGAAAAAAAATGGCGGTGCATCAGCAGAACAGTGACCTATGTTGGC
1 M T G L F E K K W R C I S R T V T Y V G
61 TGGTCGCTGTCTGGCTCTTCTCTCTGGGACCTGGCCGTGACCATGGATGTCATGCTGAT
21 W S L F W L L L L W D L A V T M D V M L I
121 GAAGGCAAGGGCATCGATTTC CCGCTGATGCCCTCTCAGCTGCTTTGCTCGGCATTGATC
41 E G K G I D F P L M P L T L L C S A L I

181 GTGCTGATCAGCTTTCGCAACAAGTGCCTA AACC GCTGGTGGGAAGCGCGTACGTTG
61 V L I S F R N T S A N R W W E A R T L
241 TGGGGCGGATGGTCAATAGCTCAGCAGCTATGGCCGCCAGTGATTACCCTGATTGAA
81 W G A M V N S S R S Y G R Q V I T L I E
301 GGTAATACGATGATCGCAACAACCCCGTGAAGAAGTGCTGTTTCATCGCCACGTGGCC
101 G N T D D R N N P V K E V L F H R H V A
361 TACCTGCGGGCAC TGGCGGCCATCTCAAGGCGATGCCGGCACCGCAAAAC TCGACGGA
121 Y L R A L R A H L K G D A G T A K L D G
421 CTGTTGTCGGAGCCGAAATTCGTCGAGCCTCTGATAGCAATAACTTTC CCAATGACATT
141 L L S D A E I R R A S D S N N F P N D I
481 CTGAACGGCTCGGCGGCATCATCTCCGAAGATTTG CAGCGGGACGCATCGACGACATT
161 L N G S A A I I S E E F A A G R I D S I
541 CGTCTGGCCGAC TGGAGTCGACCATGGTCAACTGTCCAAC TCCAGGGCGGCATGGAA
181 R L A R L E S T M V E L S N C Q G G M E
601 CGCATCGTCAACACACC TCGCCCTACCCGTACGTCTATTTCCGAGGCTGTTCAGCACC
201 R I V N T P L P Y P Y V Y F P R L F S T
661 TTGTTCTGCGTATCATGCCACTGAGCATGGTAACCAACCTGGGCTGTTCCACCCGGCG
221 L F C V I M P L S M V T T L G W F T P A
721 ATATCCACAGTAGTCGGCTGCCCTCCTACTGGCAATGGACCGTATCGGCACCCACCTGCAA
241 I S T V V G C L L L A M D R I G T D L Q
781 GCGCCCTTCGGCAGCAGT CAGCACCAGATTGCGATGGAAGACTTGTGCAACACCAATCGAA
261 A P F G S S Q H Q I R M E D L C N T I E
841 AAAAACTCGCTT CGATGTTTAGTGC CCGGAAAAGCAGCTGCTGTGGACAGGCTCGCAA
281 K N L R S M F S A P E K Q L L W T G S Q
901 AGCGAGGACGGTATGCTTGGAAAGCGCATCGGCTGGCCGTTTGA
301 S E D G D A W K A H R L A V *

```

Εικόνα 16α. *In silico* μελέτη, στον αντίστοιχο του *Orf6* γενετικό τόπο, του βακτηρίου *PspH* 1448A. **I.** Με κίτρινο χρώμα έχει μαρκαριστεί η βάση που έχει εντεθεί στην θέση 82 της νουκλεοτιδικής αλυσίδας, με αποτέλεσμα την αλλαγή του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης. **II.** Αρχικά με κίτρινο σημειώνεται η απομάκρυνση της ένθεσης στην θέση 82, και με πράσινο εμφανίζεται η αλλαγή της βάσης $T \rightarrow A$ στην θέση 213 της νουκλεοτιδικής αλυσίδας, που έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία κωδικονίου λήξης (κίτρινος αστερίσκος).

```

PSPPH_ORF6      MTGLFEKRWK CISRTVTVYVGS LFWLLIWDLAVTMDVMLIEGKGI DFP LMP L T L L C S A L I 60
Psysr_1182      MSGPFEKRWK CISRTVTVYVGS LFWLLIWDVAVTMDVMLIQAGI D L P L M P L T L L C S A L I 60
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

PSPPH_ORF6      VLISFRNTSA NNRWWEARTLWGAMVNSSRSYGRQVITLIEGNTDDRN NPVK E V L F H R H V A 119
Psysr_1182      VLISFRNSSA YNRWWEARTLWGAMVNSSRSYGRQVITLIEGSANERGNP VK E V L F H R H V A 120
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

PSPPH_ORF6      YLRALRAHLKGDAGTAKLDGILLSDAETRRASDSN N F P N D I L N G S A A I I S E E F A A G R I D S I 179
Psysr_1182      YLRALRAHLKGDVSTAKLEGILLSHSEIQARAFESN N F P N D I N G S A A M I S E E F A G G R I D S I 180
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

PSPPH_ORF6      R L A R L E S T M V E L S N C Q G G M E R I V N T P L P Y P Y V Y F P R L F S T L F C V I M P L S M V T T L G W F T P A 239
Psysr_1182      R L A R L E S T M V E L S N C Q G G M E R I A N T P L P Y P Y V Y F P R L F S T L F C I I M P L S M V T T L G W F T P A 240
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

PSPPH_ORF6      I S T V V G C L L A M D R I G T D L Q A P F G S S Q H Q I R M E D L C N T I E K N L R S M F S A P E K Q L L W T G S Q 299
Psysr_1182      I S T V V G C M L L A M D R I G T D L Q A P F G A S Q H R I R M E D L C N T I E K N L R S M F D A P A R Q S L V I D S Q 300
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

PSPPH_ORF6      SEDGDAWKAHRLAV 313
Psysr_1182      DQGSANOPHRLIVY 314
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

Εικόνα 16β. Συστοίχιση της πρωτεΐνης *ORF6* (*Psyr_1182*) του βακτηρίου *Pss* B728A, με την υποθετική πρωτεΐνη απο το βακτήριο *PspH* 1448A (μετά από *in silico* διόρθωση των σημειακών μεταλλαγών). Έγινε χρήση του αλγόριθμου *CLUSTAL-W* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

```

Psysr_1182      -----MSGPFPEKRWRCISRTVTIYVGSLEFWLLWLDV 31
PSPPH_put      -----MTGLPEKRWRCISRTVTIYVGSLEFWLLWLDL 31
PSPTO_1371     -----MSGPFPEKRWRCFTRTVTIYVGSLEFWLLWLDV 31
Psysr_5054     -----MQQTIIISKIRFLGKTIYVGSLEFWLLWLDV 31
PSPPH_5136     MRTICRPGIQPCGRCQPAIRLFFDGVVLLQQTIIISKIRFLGKTIYVGSLEFWLLWLDV 60
PSPTO_5502     -----MQQTDMSKVRFLGKTIYVGSLEFWLLWLDV 31
                : : . * : : * : ***** : * :

Psysr_1182      AVTMDVFMLEIQQAGIDLPLMPLTLCCSALIVLISFRNSSAYNEWWEARTLWGAMVNSRRSY 91
PSPPH_put      AVTMDVFMLEIQQAGIDLPLMPLTLCCSALIVLISFRNTSAYNEWWEARTLWGAMVNSRRSY 91
PSPTO_1371     AVTMDVFMLEIQQAGIDLPLMPLTLCCSALIVLISFRNSSAYNEWWEARTLWGAMVNTSRSP 91
Psysr_5054     IVTVDFMFLYLEKKITLPSMPLTLGSLVWLTSPFNSSAYNEWWEARTLWGALVNSRRSP 91
PSPPH_5136     IVTVDFMFLYLEKKITLPSMPLTLGSLVWLTSPFNSSAYNEWWEARTLWGALVNSRRSP 120
PSPTO_5502     IVTVDFMFLDREKINLPSLPLTLGSLVWLTSPFNSSAYNEWWEARTLWGAMVNSRRSP 91
                ** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

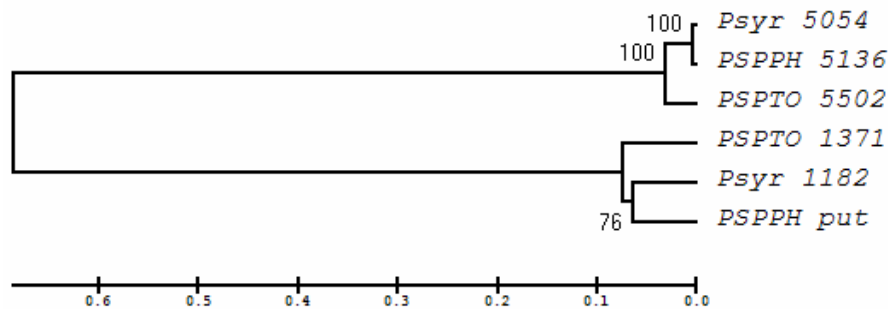
Psysr_1182      GRQVLTLEIEGSANERGNPVKEVLFNRHVAYLRALRAHLKGDVSTARLEGLLSHSEIQRR 151
PSPPH_put      GRQVITLEIEGNTDDRNNPVKEVLFNRHVAYLRALRAHLKGDAGTARLDGLLSDAEIRRAS 151
PSPTO_1371     GRQVLTLEIDGERDDLNNPVKAILPQRHVAYLRALRAHLKGDVKTARLDGLLSPDEIQRR 151
Psysr_5054     ARQVLTIVED--DDGINPVKATLLRRHVAYVRCLSAHLKGAFCGDEVQMLIPREEPERRH 149
PSPPH_5136     ARQVLTIVED--DDGINPVKATLLRRHVAYVRCLSAHLKGAFCGDEVQMLIPREEPERRH 178
PSPTO_5502     ARQVLTIVED--DNGINPVKATLLRRHVAYVRCLSAHLKGVPEPGEIQMLIPREEPERR 149
                : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

Psysr_1182      ESNFPPNDILNGSAAMIS EEFAGGRIDSIRLARLESTMVELSNQCQGMERIANTPLPYPY 211
PSPPH_put      DSNFPPNDILNGSAAMIS EEFAGGRIDSIRLARLESTMVELSNQCQGMERIVNTPLPYPY 211
PSPTO_1371     QSNFPPNDILNGSAAVISQAFAGQFDSIRLTRLESTMVDLSNQCQGMERIANTPLPYPY 211
Psysr_5054     DTNFPNDLLNTSAALLAKEYQAGRLDSIRLARLESTMVDISNQCQGMERIANTPLPYPY 209
PSPPH_5136     DTNFPNDLLNTSAALLAKEYQAGRLDSIRLARLESTMVDISNQCQGMERIANTPLPYPY 238
PSPTO_5502     DTNFPNDLLNTSAALLAKEYQAGRLDSIRLARLESTMVDLSNQCQGMERIANTPLPYPY 209
                : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

Psysr_1182      VYFPRLPSTLFCIMPLSMVTLGWFTPAISTVVGCMLLAMDRIIGTDLQAPFGASQHRIR 271
PSPPH_put      VYFPRLPSTLFCVIMPLSMVTLGWFTPAISTVVGCLLAMDRIGTDLQAPFGSSQHRIR 271
PSPTO_1371     VYFPRLPSTLFCIMPLSMVTLGWFTPAISTVVGCMLLAMDRIIGTDLQAPFGNSQHRIR 271
Psysr_5054     VAFPRLPITLFCILVPIGLVETLGWFTPLASTVVGFMLLAIKIGTDLQSPFRASEHEIQ 269
PSPPH_5136     VAFPRLPITLFCILVPIGLVETLGWFTPLASTVVGFMLLAIKIGTDLQSPFRASEHEIQ 298
PSPTO_5502     VAFPRLPITLFCILVPIGLVETLGWFTPLASTVVGFMLLAIKIGTDLQSPFRASEHVIQ 269
                * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

Psysr_1182      MEDLCNTIEKNLRSMFDPARQSLVIDSQDQGSAAWQPHRLV 314
PSPPH_put      MEDLCNTIEKNLRSMFSAPEKQLLWIGSQSDGDAWKAHRLAV 314
PSPTO_1371     MEDLCNTIEKNLQSMFSSPERQPLAIDLKAPYRGAWPTHQLAV 314
Psysr_5054     MTALCENIERNLDMLRGAQEE-----SKAS----- 295
PSPPH_5136     MTALCENIERNLDMLRGAQEE-----SKAS----- 324
PSPTO_5502     MNALCENIERNLDMLRGAQEE-----SKAS----- 295
                * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
    
```

Εικόνα 17α. Συστοίχιση των ομόλογων (ορθόλογων και παράλογων) της πρωτεΐνης *ORF6*. Στην ανάλυση συμπεριλάβαμε και την υποθετική πρωτεΐνη (*PSPPH_put*) του βακτηρίου *PspH* 1448A. Έγινε χρήση του αλγόριθμου *CLUSTAL-W* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).



Εικόνα 17β. Φυλογενετικό δέντρο όπως προκύπτει από την ανάλυση των ομόλογων της πρωτεΐνης *ORF6*. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα υπάρχουν δύο διακριτοί κλάδοι οι οποίοι αντιπροσωπεύονται ως ο ι) κλάδος των ορθόλογων (*Psysr_1182*, *PSPTO_1371*, *PSPPH_put*) και ιι) ο κλάδος των παράλογων (*Psysr_5054*, *PSPPH_5136*, *PSPTO_5502*). Για την δημιουργία του δέντρου χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *MEGA-4* (μέθοδος *UPGMA*) με *bootstrap test* (1000 επαναλήψεις) και *value* όπως φαίνεται πάνω στους βραχίονες των κλάδων.

II. Λειτουργικός χαρακτηρισμός του γονιδίου *Orf6* (*Psyr_1182*)

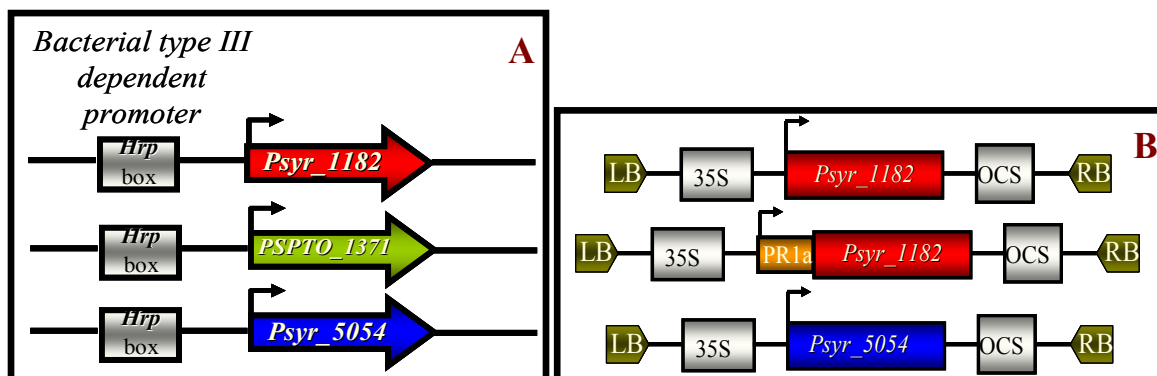
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένα, η συνεργαζόμενη ομάδα των ΗΠΑ αναζήτησε και εντόπισε στο στέλεχος *Pss* B728a γονίδια που επάγονται ειδικά κατά τη φάση του επιφυτικού αποικισμού. Στα πλαίσια των ερευνών αυτών εντοπίστηκαν μια σειρά νέων γονιδίων που ονομάστηκαν «*PIGs*» (*plant-inducible genes*). Στην ομάδα αυτή των *PIGs* γονιδίων ανήκει και το γονίδιο *orf6*, (γενετικός τόπος *Psyr_1182*, βλ. ιστότοπο του *DOE-JGI*) και φαίνεται να είναι το πιο ισχυρά φυτό-επαγόμενο γονίδιο της ομάδας *PIG* (*Marco, et. al. 2005*).

Επιδιώξαμε το λειτουργικό χαρακτηρισμό του γονιδίου *orf6* γιατί χαρτογραφείται δίπλα σε άλλους *T3EPs* στη γενετική περιοχή *CEL* (*conserved effector locus*) δίπλα στη νησίδα παθογένειας *hrp/hrc* του στελέχους B728a (**Εικ. 14a**) και δεν έχει μελετηθεί από άλλες πτυχές μέχρι τώρα. Η χαρτογραφική του θέση και η υψηλή επαγωγή του κατά τον αποικισμό των φύλλων συνιστούν ενδείξεις για τον πιθανό του ρόλο σε κάποιο(α) στάδιο(α) της αλληλεπίδρασης βακτηρίου-ξενιστή. Η υπόθεση εργασίας αρχικά ήταν ότι εάν η πρωτεΐνη *Orf6* είναι όντως *T3EP* ενδεχομένως να προκαλεί την αντίδραση υπερευαισθησίας (*HR*) σε φυτά δείκτες. Επειδή το στέλεχος *Pss* B728a αναφέρεται ως γνωστό παθογόνο στη φασολιά (*P. vulgaris, snap bean*) (*Loper and Lindow, 1987*), θεωρήσαμε πιθανό ότι σε φυτά του γένους *Nicotiana* θα προκαλεί την νεκρωτική αντίδραση *HR* που χαρακτηρίζει ασύμβατα συστήματα παθογόνου-ξενιστή.

Με αυτό το σκεπτικό, κατασκευάστηκε γονιδιακή κασέτα στην οποία το γονίδιο τέθηκε υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του φυτικού υποκινητή *35S* του ιού *Cauliflower Mosaic Virus* (*CaMV*). Η κασέτα αυτή κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα αγροβακτηρίου (*pART27*) (**Εικ. 20**) και χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα αγρο-εμποτισμού (*agroinfiltration*). Στις βιοδοκιμές αυτές, καλλιέργειες αγροβακτηρίου ενύονται στους διακυττάρους χώρους φύλλων και μεταφέρουν τα κλωνοποιημένα γονίδια στα φυτικά κύτταρα όπου αυτά εκφράζονται παροδικά (*transient expression assay*). Στις πρώτες βιοδοκιμές με αυτή τη μέθοδο δεν παρατηρήθηκε νεκρωτική αντίδραση *HR* σε φυτά των ειδών *N. benthamiana* και *N. tabacum* που χρησιμοποιήθηκαν ως φυτά «δείκτες» (**Εικ. 21**). Οι προσπάθειες μας συνεχίστηκαν με πειράματα αγρο-εμποτισμού σε άλλα φυτικά είδη. Εν τω μεταξύ, τόσο η συνεργαζόμενη ερευνητική ομάδα (προσωπική επικοινωνία) όσο και ένα άλλο εργαστήριο των ΗΠΑ (*Prof. Borris Vinantzer, Univ. North Carolina, USA*) έδειξαν ότι το στέλεχος *Pss* B728a είναι εν δυνάμει «παθογόνο» στο φυτό μοντέλο *N. benthamiana* (*Vinatzer, et. al. 2006*). Αυτό σημαίνει ότι η

Αποτελέσματα

πρόκληση αντίδρασης υπερευαισθησίας (*HR*) στα φύλλα αυτού του φυτού μέσω αγρο-εμποτισμού δεν θα ήταν αναμενόμενη. Δικές μας προσπάθειες να επιβεβαιώσουμε το αποτέλεσμα αυτό ήταν ανεπιτυχείς. Υδαρείς κηλίδες, που συνιστούν αξιόπιστα συμπτώματα τυπικής «συμβατής» αλληλεπίδρασης βακτηρίου-ξενιστή παρατηρήθηκαν μόνο με εγχύσεις υψηλών συγκεντρώσεων μολύσματος ($\sim 10^5$ βακτήρια/ml), ενώ μεμονωμένες κηλίδες δεν εμφανίστηκαν μετά από έγχυση χαμηλότερων συγκεντρώσεων μολύσματος ή με συμβατική μηχανική μόλυνση (εντριβή) των φύλλων. Με βάση τα παραπάνω, δοκιμάσαμε και άλλες μεθόδους λειτουργικού χαρακτηρισμού του γονιδίου, όπως περιγράφεται παρακάτω.



Εικόνα 20. Πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία. Στο πλαίσιο **A**, εμφανίζονται οι κατασκευές που έγιναν στον φορέα *pSPHB5* που χρησιμοποιήθηκαν για έκφραση των γονιδίων σε βακτήρια του γένους *Pseudomonas*. Στο πλαίσιο **B**, εμφανίζονται οι κατασκευές που έγιναν στον φορέα *pART27* που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα αγρο-εμποτισμού με εργαστηριακά στελέχη του είδους *Agrobacterium tumefaciens*.

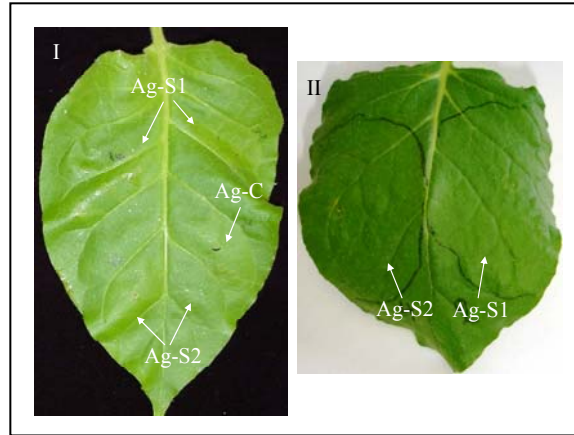
Σε μια εναλλακτική προσέγγιση για την κατάδειξη πιθανού νεκρωτικού φαινοτύπου, το γονίδιο *orf6* κλωνοποιήθηκε σε ειδικό πλασμιδιακό φορέα έκφρασης ευρέος φάσματος βακτηριακών ξενιστών (*broad host range vector*), κατάλληλο για βακτήρια του γένους *Pseudomonas* (*pBRR-MCS*), με σκοπό να εισαχθεί σε άλλα στελέχη φυτοπαθογόνων *Pseudomonas* και να γίνουν στη συνέχεια συμβατικές δοκιμές αντίδρασης υπερευαισθησίας που είναι πιο αξιόπιστες. Όμως, επειδή βιοπληροφορική ανάλυση, τόσο από την ελληνική όσον και την αμερικανική ομάδα, έδειξε ότι δεν υπάρχει το χαρακτηριστικό μοτίβο «*hrpBox*» (στοιχείο της μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων *hrc/hrp* του *T3SS* και της πλειονότητας των *avr*) ανοδικά του *orf6*, κατασκευάστηκε ειδικός πλασμιδιακός φορέας που να εξασφαλίζει την μεταγραφική έκφραση του γονιδίου στα βακτήρια στα οποία θα εισαχθεί υπό συνθήκες επαγωγής του *T3SS* (δηλ. στους διακυττάριους χώρους των φύλλων). Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκαν ειδικοί *PCR* εκκινητές με τους οποίους επετεύχθη η κλωνοποίηση του «*hrp Box*»

υποκινητή του γονιδίου *HopAA1* από το στέλεχος *Pst* DC3000 στον πολυσυνδέτη πλασμιδιακών φορέων της οικογένειας *pBRR-MCS*. Οι φορείς αυτοί ονομάστηκαν *pSPHB1*, *pSPHB2*, και *pSPHB5*, και είναι γενικά χρήσιμοι για την λειτουργική ανάλυση και άλλων γονιδίων που πιθανώς να κωδικοποιούν υποψήφιους *T3EPs*. Το πλασμίδιο *pSPHB5* που φέρει το *orf6* (Εικ. 20) υπό το μεταγραφικό έλεγχο του «*hrpBox*» υποκινητή μεταφέρθηκε σε ειδικό στέλεχος του σαπρόφυτου βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* 55 (παροχή του Prof. Allan Collmer, Cornell University, USA), που δεν προκαλεί *HR* σε φυτά λόγω του ότι στερείται *T3SS*, μαζί με το κοσμίδιο *pLN18* που φέρει όλη τη γονιδιακή νησίδα *hrp/hrc* που κωδικοποιούν το *T3SS* από το στέλεχος *Pss* 61 (παροχή του Prof. Borris Vinantzer). Η υπόθεση εργασίας είναι ότι εάν η πρωτεΐνη *ORF6* έχει ιδιότητες τύπου *Avr* (*avirulence*), δηλαδή φαινότυπο «αμολυσματικότητας», το στέλεχος [*Pf* 55 (*pLN18*)-*orf6*] που το εκφράζει αναμένεται να προκαλεί αντίδραση υπερευαισθησίας σε κάποιο/α είδη/ποικιλίες φυτών. Με το στέλεχος που προέκυψε έγιναν εγχύσεις σε φύλλα καπνού, ορισμένες από τις οποίες εκδήλωσαν υπερευαίσθητη νέκρωση (*HR*), άλλες όχι. Η εκδήλωση της *HR* σε αυτά τα πειράματα εξαρτήθηκε από την παρουσία του κοσμιδίου που παρέχει το *T3SS* όσο και από την παρουσία του ρυθμιστικού στοιχείου «*hrpBox*».

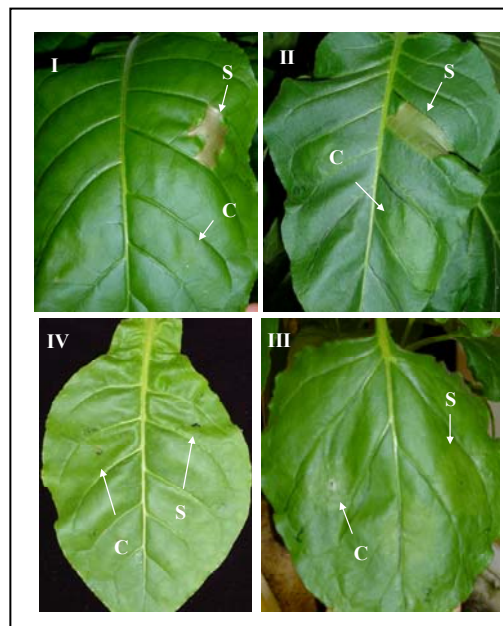
Οι βίο-δοκιμές αυτές έδειξαν τα εξής: Δύο ποικιλίες καπνού, οι *N. tabacum* cv. *Samsun* και *Xanthi*, εκδήλωσαν τυπική *HR* στο σημείο έγχυσης του στελέχους *Pf-orf6* (Εικ. 22) ενώ τα είδη *N. benthamiana* και *N. sylvestris* δεν εκδήλωσαν κάποιο φαινότυπο. Η ικανότητα της πρωτεΐνης *Orf6* να προκαλεί *HR* απαιτεί την παρουσία λειτουργικού *T3SS* αφού το στέλεχος *Pf* 55, χωρίς το κοσμίδιο *pLN18*, με μόνο το πλασμίδιο *pSPHB5-orf6*_{B728a} δεν ήταν ικανό να προκαλέσει *HR*. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από πειράματα στα οποία το πλασμίδιο *pSPHB5-orf6*_{B728a} εισήχθη και σε ενθετικό μετάλλαγμα του παθότυπου *P.s. phaseolicola* στέλεχος NPS3121 (NPS3121-4003::Tn5) που προϋπήρχε στο εργαστήριο, στο οποίο δεν λειτουργεί το *T3SS* λόγω της ένθεσης του μεταθετού στοιχείου *Tn5* (*T3SS-deficient*). Επίσης, το *Orf6* κλωνοποιήθηκε στον φορέα *pBRR-MCS5* χωρίς την παρουσία του «*hrpBox*» και εισήχθη στο στέλεχος *Pf* 55 (*pLN18*). Εγχύσεις των παραπάνω στελεχών σε φύλλα ποικιλιών καπνού που αντιδρούν θετικά στην παρουσία της πρωτεΐνης *Orf6* δεν προκάλεσαν *HR*. Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με εκείνα που παρατηρήθηκαν με το στέλεχος *Pf* 55 (*pLN18*) (*pSPHB5-orf6*_{B728a}) (*Pf-orf6*) δείχνουν ότι το *Orf6* απαιτεί λειτουργικό *T3SS* και κανένα άλλο εκκριτικό σύστημα που ενδεχομένως υπάρχει στα βακτηριακά στελέχη με τα οποία έγιναν οι εγχύσεις δεν υποκαθιστά το

Αποτελέσματα

T3SS στην αλληλεπίδραση φυτού-βακτηρίου. Συνολικά, τα παραπάνω πειράματα τεκμηριώνουν επαρκώς (ολοκληρώνουν) το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης *Orf6* ως T3EP.



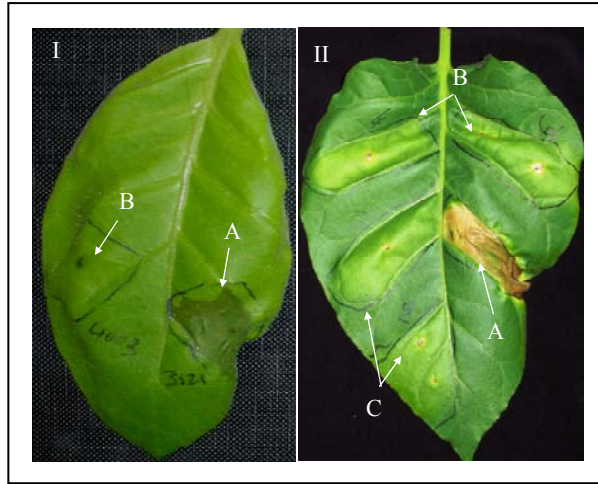
Εικόνα 21. Πειραματικά αποτελέσματα από εφαρμογές αγρο-εμποτισμού. **Ag-S1.** *A. tumefaciens-35S::Orf6_{B728a}* (*Psyr_1182*), **Ag-S2.** *A. tumefaciens-35S::Orf6_{par}* (*Psyr_5054*), **C.** αρνητικό control (αγρο-βακτήρια που φέρουν άδειο τον φορέα *pART27*), **I.** *N. tabacum* cv. *Xanthi* nc., **II.** *N. benthamiana*.



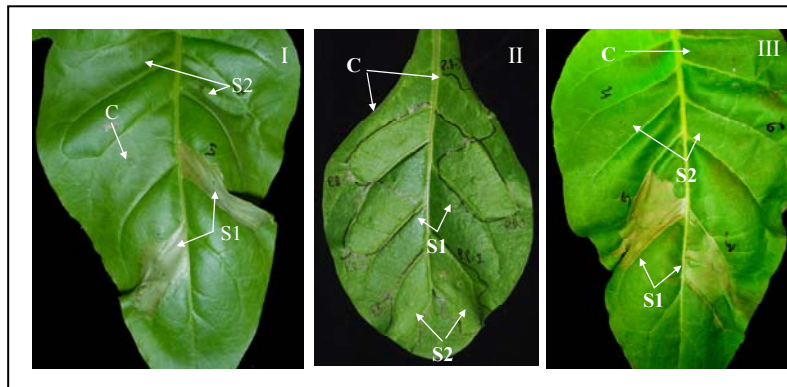
Εικόνα 22. Βακτηριακές μολύνσεις με το βακτήριο *P. fluorescens* 55_{PLN18} τροποποιημένο να φέρει το πλασμίδιο *pSPBH5::Orf6*. **I.** *N. tabacum* cv. *Basma* (N34/4), **II.** *N. tabacum* cv. *Xanthi* nc, **III.** *N. Benthamiana*, **IV.** *N. Sylvestris*. **C.** αρνητικό control (βακτήρια που φέρουν άδειο τον φορέα *pSPBH5*), **S.** *P.f.55_{PLN18} / pSPBH5::Orf6*.

Η παραπάνω πειραματική διαδικασία διεξήχθη εν μέρη και με τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το γενετικό τόπο *Psyr_5054* στο στέλεχος *Pss* B728a (εξελικτικό παράλογο του *Orf6*) και τον *PSPTO_1371* στο στέλεχος *Pst* DC3000 (ομόλογο του *Orf6*) (**Εικ. 20**). Τα πειράματα αυτά δεν έδωσαν ενδείξεις ικανότητας επαγωγής της *HR*

σε παρόμοιου τύπου βιο-δοκιμές (**Εικ. 24α**). Αυτό βέβαια δεν αποκλείει το ενδεχόμενο οι εν λόγω πρωτεΐνες να έχουν αυτή την ικανότητα σε άλλα φυτικά είδη.



Εικόνα 23. Βακτηριακές μολύνσεις. **I.** Φυτά *N. tabacum* cv. *Xanthi* πε τριών εβδομάδων μολυσμένα με **A:** *P.s.ph.* NPS3121 w.t., **B:** *P.s.ph.* 4003 (*P.s.ph.* NPS3121 *hrp* mutant), **II.** Φυτά *N. tabacum* cv. *Xanthi* πε τριών μηνών μολυσμένα με **A:** *P.s.ph.* NPS3121 w.t., **B:** *P.s.ph.* 4003 (*P.s.ph.* NPS3121 *hrp* mutant), **C:** *P.s.ph.* 4003/*pSPHB5::Orf6*_{B728a}.



Εικόνα 24α. Βακτηριακές μολύνσεις με το βακτήριο *P.f.55*_{pLN18}. **S1.** *P.f.55*_{pLN18}/*pSPHB5::Orf6*_{B728a} (*Psyr_1182*), **S2.** *P.f.55*_{pLN18} *pSPHB5::Orf6*_{par} (*Psyr_5054*), **C.** αρνητικό control (βακτήρια που φέρουν άδειο τον φορέα *pSPBH5*), **I.** *N. tabacum* cv. *Xanthi* πε, **II.** *N. tabacum* cv. *Basma* (N34/4), **III.** *N. glauca*.

Στην συνέχεια, το κωδικό πλαίσιο της *Orf6* πρωτεΐνης από το στέλεχος B728a κλωνοποιήθηκε με μία N-τελική επιμήκυνση που αντιστοιχεί στο εκκριτικό πεπτιδιο-σινιάλο της πρωτεΐνης *PR1a*. Η χμαιρική αυτή πρωτεΐνη κλωνοποιήθηκε σε γονιδιακή κασέτα στην οποία το γονίδιο τέθηκε υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του φυτικού υποκινητή *35S* του ιού *Cauliflower Mosaic Virus* (*CaMV*). Η κασέτα αυτή κλωνοποιήθηκε σε πλασμιδιακό φορέα αγροβακτηρίου (*pART27*) (**Εικ. 20**) και χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα αγρο-εμποτισμού (*agroinfiltration*), στα οποία καλλιέργειες αγροβακτηρίου ενύονται στους διακυττάριους χώρους φύλλων και μεταφέρουν τα κλωνοποιημένα γονίδια στα φυτικά κύτταρα όπου αυτά εκφράζονται παροδικά (*transient expression assay*). Με αυτόν τον τρόπο αποσκοπούσαμε στο να

Αποτελέσματα

εκφράσουμε την χιμαιρική πρωτεΐνη σε φυτικά κύτταρα και να την οδηγήσουμε στον αποπλάστη, για να ελέγξουμε αν η πρόκληση νεκρωτικού (*HR*) φαινοτύπου σε φυτά οφείλεται στη εξωκυτταρική δράση της πρωτεΐνης μετά την έγχυσή της από το βακτήριο έξω από τα φυτικά κύτταρα. Κάτι τέτοιο έχει προηγουμένως τεκμηριωθεί από το εργαστήριο μας για άλλη *T3EP*, την πρωτεΐνη *HrpZ_{PspH}* (Tampakaki, et. al. 2000). Τα αποτελέσματα του αγρο-εμποτισμού σε φυτά *N. tabacum* cv. *Xanthi* δεν έδειξαν νεκρωτικό φαινότυπο.

Η λειτουργική μελέτη της πρωτεΐνης *Orf6* θα συνεχιστεί μελλοντικά με την κατασκευή συντηγμάτων με γονίδια *reporters* για τον έλεγχο της εξωκυτταρικής ή ενδοκυτταρικής δράσης της πρωτεΐνης καθώς και με δημιουργία μεταλλαγμάτων για την μελέτη του πρωτεϊνικού μοτίβου που είναι υπεύθυνο για την πρόκληση της *HR*. Σκοπεύουμε να μελετήσουμε και ομόλογα της *Orf6* από φυτοπαθογόνα άλλου γένους (π.χ. *Xanthomonas*, *Ralstonia*, *Erwinia* κ.α.) μια και η *BLAST* ανάλυση έδειξε την ύπαρξη ομολόγων σε έναν μεγάλο αριθμό παθογόνων βακτηρίων φυτών και ζώων αλλά και ομολογία με τουλάχιστον δύο πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας του φυτού *Arabidopsis* (*AT2G45870* και *AT3G61320*).

III. Βιοπληροφορική μελέτη της πρωτεΐνη του γενετικού τόπου *Psyr_2629*

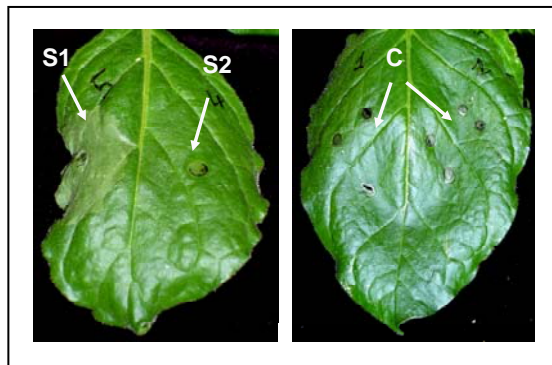
Ανάλογα πειράματα *T3SS*-εξαρτωμένης έκκρισης έγιναν και την πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τον γενετικό τόπο *Psyr_2629* που περιγράφεται σε δημοσίευση της συνεργαζόμενης ομάδας των ΗΠΑ, ως έχουσα ομολογία με πρωτεΐνες τις οικογένειας *PrkB/PrkA* κινασών/φωσφατασών. Στο στέλεχος B728a η πρωτεΐνη αυτή κωδικοποιείται από τον κλώνο 17.1 (Marko, et. al. 2005) για τον οποίο η συνεργαζόμενη ομάδα των ΗΠΑ (Marko, et. al. 2005) έδειξε ότι επίσης επάγεται κατά την φάση του επιφυτικού αποικισμού στο εν λόγω βακτήριο. Η πρωτεΐνη αυτή έχει 64% ομολογία με την πρωτεΐνη *PrkB* του πολυπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* η οποία φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο κατά την επαγωγή της παθογένειας.

Αξιοποιώντας τις παραπάνω ενδείξεις, αρχικά διερευνήθηκε η παρουσία/απουσία ομολόγων της πρωτεΐνης *PrkB* σε φυτοπαθογόνα βακτήρια με ανάλυση *BLAST* και άλλα διαθέσιμα βιοπληροφορικά εργαλεία στις βάσεις γενετικών δεδομένων του *NCBI*, και *DOE-JGI*. Όντως, εντοπίσαμε πρωτεΐνες με σημαντική ομολογία (66%) με την *PrkB* σε φυτοπαθογόνα βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των *Pss* B728a, *Pto* DC3000, *PspH* 1448A, και στο πολλαπλό παθογόνο ανθρώπου και φυτών *Pseudomonas aeruginosa*, αλλά και σε μη φυτοπαθογόνα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* που

διαθέτουν T3SS (για συντομία, στο εξής η ομόλογη πρωτεΐνη των φυτοπαθογόνων θα αναφέρεται ως *HopSP*).

Αρχικά, σε πειραματικές μολύνσεις με *P. fluorescens*55 (*pLN18*) (*pHopSP*) καθώς και σε πειράματα αγρό-εμποτισμού, δεν διαπιστώθηκε T3SS-εξαρτώμενη ή μη επαγωγή HR σε διάφορους ξενιστές.

Αλλάζοντας πειραματική προσέγγιση στην συνέχεια κατασκευάστηκαν συντήγματα του Ν΄-τελικού άκρου της πρωτεΐνης *HopSP*, με το C΄-τελικό άκρο της *avrRpt2* (αμινοξέα 80-end) (Εικ. 24β). Το C΄-τελικό άκρο της πρωτεΐνης *avrRpt2* είναι υπεύθυνο για την επαγωγή της HR σε φυτά *Arabidopsis Col-0* και *N. benthamiana* αλλά στερείται του ειδικού σινιάλου έκκρισης μέσω του T3SS. Αν η πρωτεΐνη *HopSP* είναι T3SS εκκρινόμενη, τότε θα αναμένετο να αντικαταστήσει το σινιάλο έκκρισης της *avrRpt2*. Μέσω των συντηγμάτων αυτών επιδιώχθηκε να διαπιστωθεί το ενδεχόμενο έκκρισης της πρωτεΐνης *HopSP* διαμέσου του T3SS, μελετώντας την ικανότητα επαγωγής HR στα προαναφερθέντα φυτικά είδη. Σε πειράματα βακτηριακού εμποτισμού σε φυτά δείκτες (π.χ. *N. benthamiana*) που το C΄-τελικό άκρο της πρωτεΐνης *avrRpt2* είναι υπεύθυνο για την επαγωγή της HR, δεν παρατηρήθηκε φαινότυπος (HR). Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνουμε ότι το *HopSP* δεν κωδικοποιεί T3SS σχετιζόμενη πρωτεΐνη.



Εικόνα 24β. Βακτηριακές μολύνσεις σε φυτά *N. benthamiana* με το βακτήριο *P.f.55_{pLN18}*. **S1.** *P.f.55_{pLN18}/pSPHB5::avrRpt2*, **S2.** *P.f.55_{pLN18} pSPHB5::avrRpt2-HopSP* (fusion), **C.** αρνητικό control (βακτήρια που φέρουν άδειο τον φορέα *pSPBH5*).

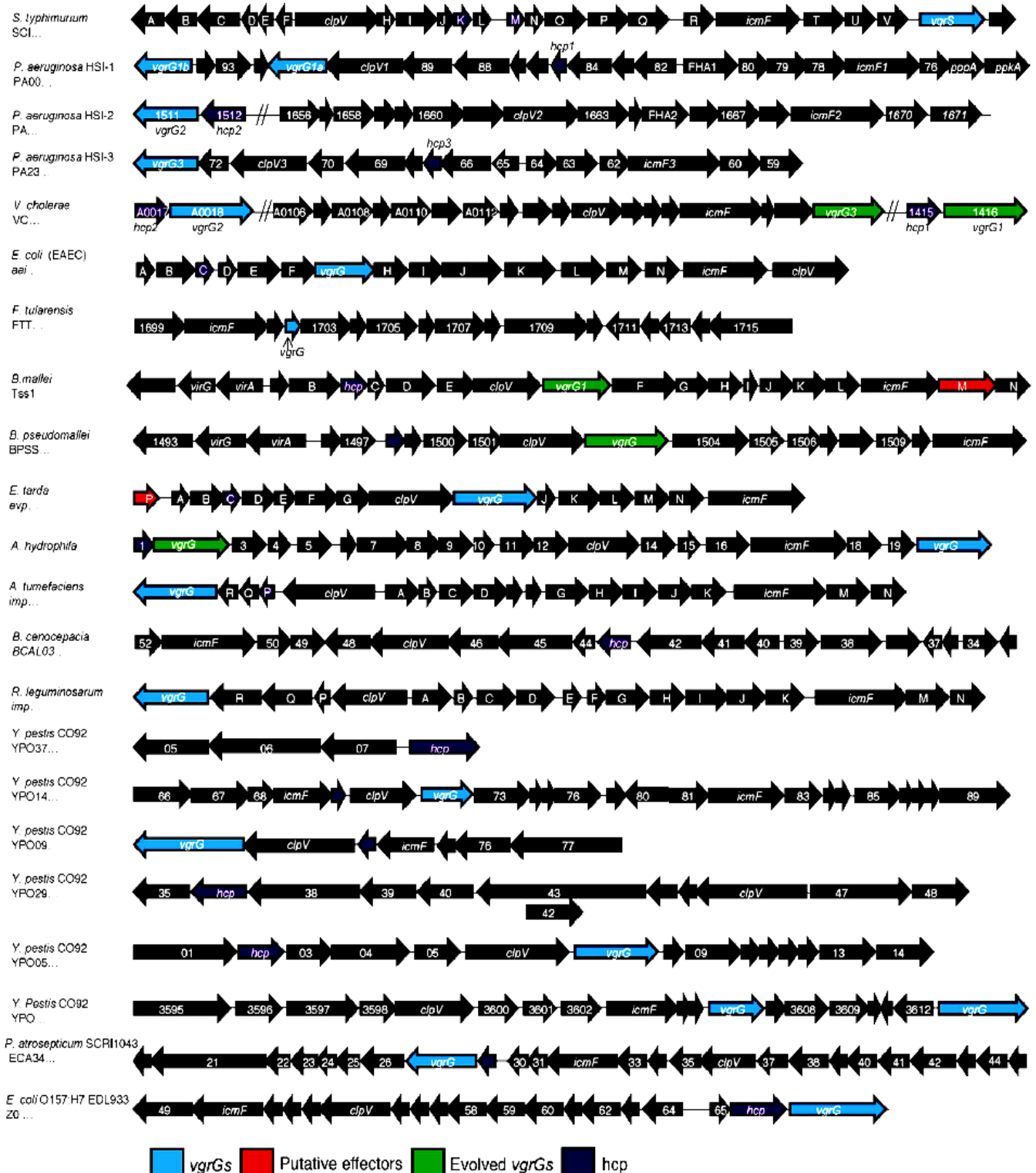
Μετάπειτα βιβλιογραφική έρευνα μας αποκάλυψε την πιθανή συμμετοχή τις οικογένειας *PrkB/PrkA* κινασών/φωσφατασών της *P. aeruginosa* στην T6SS εξαρτώμενη παθογένεια. Το ενδεχόμενο η *HopSP* να σχετίζεται με την λειτουργία του T6SS στα φυτοπαθογόνα βακτήρια, για τα οποία ελάχιστα είναι γνωστά όσον αφορά στην ύπαρξη και την λειτουργία του T6SS στην παθογένεια μας οδήγησε στη βιοπληροφορική εξόρυξη γονιδίων του συστήματος αυτού σε φυτοπαθογόνα βακτήρια.

Εντοπισμός πιθανών γενομικών νησίδων που κωδικοποιούν T6SS στα φυτοπαθογόνα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*

Το εκκριτικό σύστημα τύπου VI (HS ή T6SS) είναι ένα πρόσφατα χαρακτηρισμένο σύστημα έκκρισης πρωτεϊνών που εμφανίζεται ως ένα ενιόσωμα (*injectisome*) παρόμοιο με το σύστημα που χρησιμοποιούν οι βακτηριοφάγοι και το οποίο έχει την δυνατότητα να εισαγάγει πρωτεΐνες παθογένειας άμεσα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του ξενιστή (Bingle, et. al. 2008; Shrivastava, et. al. 2008; Cascales, et. al. 2008; Filloux, et. al. 2008). Δηλαδή, πρόκειται για μηχανισμό ανάλογο με τα T3SS και T4SS. Το T6SS εντοπίστηκε αρχικά ως μια συντηρημένη οικογένεια νησιών παθογένειας στα gram-αρνητικά βακτήρια και στη συνέχεια, το 2006, προσδιορίστηκε ως εκκριτικός μηχανισμός. Περισσότερο από το ένα τέταρτο των αλληλουχημένων βακτηριακών γονιδιωμάτων περιέχουν γονίδια που κωδικοποιούν συστατικά του T6SS. Συνήθως τα βακτήρια αυτά βρίσκονται μέσα στον κλάδο των πρωτεοβακτηρίων (*Proteobacteria*), αλλά και στους *Planctomycetes* και στα *Acidobacteria*. Το T6SS έχει αναφερθεί ότι απαιτείται για την παθογένεια σε ανθρώπινα και ζωικά παθογόνα όπως τα *Vibrio cholerae*, *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis*, και *Burkholderia mallei*, καθώς επίσης και στα φυτοπαθογόνα όπως το *Agrobacterium tumefaciens*, *Pectobacterium atrosepticum* και *Xanthomonas oryzae* (Bingle, et. al. 2008; Shrivastava, et. al. 2008; Cascales, et. al. 2008; Filloux, et. al. 2008; Liu, et. al. 2008; Wu, et. al. 2008). Επιπλέον απαιτείται για την επιτυχή αποίκιση της ρίζας από τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια (*nitrogen-fixing*) *Mesorhizobium loti* και *Rhizobium leguminosarum* (Bladergroen, et. al. 2003) Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι γονίδια που κωδικοποιούν συστατικά του T6SS έχουν εντοπιστεί επίσης σε μερικά μη-συμβιωτικά βακτήρια όπως τα *Myxococcus xanthus*, *Dechloromonas aromatica* και *Rhodopirellula baltica*, όπου μπορεί να συμβάλουν στην περιβαλλοντική προσαρμογή όπως ο σχηματισμός βιοφίλμ (*biofilm*). Βάση της σύνθεσης των διαθέσιμων πειραματικών στοιχείων, καθώς και των ομοιοτήτων στις αλληλουχίες με μερικά δομικά συστατικά του T4SS και της ουράς του βακτηριοφάγου T4, έχει προταθεί ένα πρότυπο μοτίβο για το T6SS ενιόσωμα που περιλαμβάνει μία κυτταροπλασματική τσαπερόνη (*chaperone*) με δραστικότητα *ATPase*, ένα κανάλι που γεφυρώνει την εσωτερική και την εξωτερική μεμβράνη, και μια βελόνα/αιχμή με μια πρωτεΐνη σχηματισμού πόρου (Shrivastava, et. al. 2008). Μερικά συστατικά του μηχανισμού μπορούν επίσης να ενεργήσουν ως *effectors*, καθώς μεταφέρονται μέσα στα κύτταρα του ξενιστή. Παραδείγματος χάριν η πρωτεΐνη *VgrG-1*, που είναι ένα

Διδακτορική Διατριβή Π. Φ. Σαρρής

συστατικό των T6SS από βακτήρια του είδους *Vibrio cholerae*, περιέχει μια C-τελική περιοχή που μπορεί να εισαχθεί στα μακρόφαγα κύτταρα, όπου κατευθύνει την συναρμολόγηση της ακτίνης (Pukatzki *et. al.*, 2008). Συνολικά εντούτοις, η ταυτοποίηση και οι λειτουργίες των *effectors* του T6SS είναι ακόμα ανεπαρκώς κατανοητές.

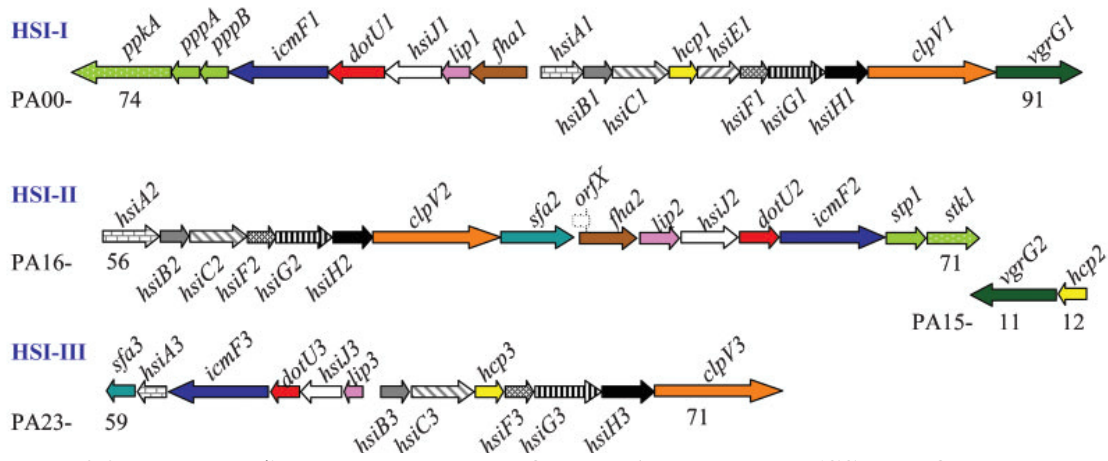


Εικόνα 25. Τα γονίδια του εκκριτικού συστήματος τύπου VI (T6SS) (Pukatzki, *et. al.* 2009). Συντηρημένες συστάδες γονιδίων σε βακτήρια με λειτουργικά T6SSs. Εμφανίζονται οι θέσεις γονιδίων που κωδικοποιούν για υποθετικούς *effectors*: κόκκινα βέλη, *vgrGs*: μπλε βέλη, *hcp*:

Αποτελέσματα

πορφυρά βέλη και *vgrGs* με C-τελικές επεκτάσεις: πράσινα βέλη. Τα βακτηριακά στελέχη και οι αντίστοιχοι αριθμοί των γονιδίων του *T6SS* παρατίθενται στην αριστερή στήλη.

Για τα αλληλουχημένα στελέχη του είδους *Pseudomonas syringae* σχεδόν τίποτα δεν είναι ακόμα γνωστό όσον αφορά στην ύπαρξη και τη λειτουργία αντίστοιχων *T6SS*. Με βάση λοιπόν τις αλληλουχίες από το περισσότερο μελετημένο *T6SS*, του βακτηρίου *P. aeruginosa*, διερευνήσαμε και εντοπίσαμε πιθανούς γενετικούς τύπους που πιθανών κωδικοποιούν *T6SSs*. Στο βακτήριο *P. aeruginosa* είναι γνωστοί τρεις γενετικοί τύποι που κωδικοποιούν λειτουργικά *T6SS* στα τα στελέχη PA14 και PAO1 (Mougous *et. al.* 2006) (Εικ. 25). Όπως προαναφέρθηκε, οι σχέσεις ομολογίας των πρωτεϊνών του γενετικού τύπου *Psyr_2629* (*PpkA/PpkB* homolog) μας οδήγησαν στην διερεύνηση των γονιδιακών νησίδων που κωδικοποιούν τα εκκριτικά συστήματα τύπου VI (*HS* ή *T6SS*) στο πολύπαθογόνο στέλεχος PA14 του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*. Το στέλεχος αυτό, όπως ήδη έχει αναφερθεί, διαθέτει τρία τέτοια συστήματα εκ των οποίων μόνο το ένα έχει επαρκώς περιγραφεί (*T6SS-1* ή *HSI-1*) (Εικ. 26). Η έκφραση του συστήματος *HSI-1* ρυθμίζεται μεταγραφικά από κοινού με το *T3SS* μέσω των γονιδίων *RetS/LadS* και μετά-μεταγραφικά μέσω των πρωτεϊνών *PpkA/PppA* (*serine-threonine kinase-phosphatase*) που κωδικοποιούνται από την ίδια τη νησίδα. Αντίθετα, το σύστημα *HSI-II* δεν ρυθμίζεται από τις πρωτεΐνες *RetS/LadS*, αλλά κωδικοποιεί μια «εν δυνάμει» πρωτεϊνική κινάση-φωσφατάση της σερίνης, ενώ το *HSI-III* δεν ρυθμίζεται από το ζεύγος *RetS/LadS* ούτε κωδικοποιεί κινάση-φωσφατάση πρωτεϊνών (Filloux, *et. al.* 2008).

P. aeruginosa

Εικόνα 26. Παρουσιάζονται τα τρία γονιδιακά clusters του *T6SS* του βακτηρίου *P. aeruginosa* (*HSI-I*, *HSI-II* και *HSI-III*) (Filloux, *et. al.* 2008). Τα γονίδια υποδεικνύονται με τον αριθμό που έχουν κατατεθεί στην βάση δεδομένων (π.χ. PA0074). Εκτός από την ονοματολογία των γνωστών γονιδίων όπως παρουσιάζονται από τον Mougous και τους συνεργάτες του (Mougous, *et. al.* 2006), γονίδια με άγνωστη λειτουργία ή ομολογία παρουσιάζονται με το ακρώνυμο *hsi* (η ονοματολογία βασίζεται στο *T6SS* του *R. leguminosarum*). Κατά συνέπεια το *hsiA* είναι ένα *impA* ομόλογο. Καταδεικνύεται επίσης, το

Διδακτορική Διατριβή Π. Φ. Σαρρής

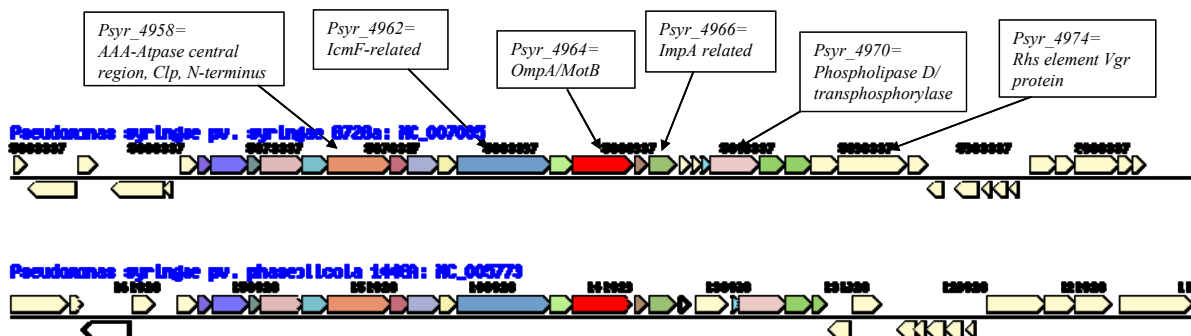
γονίδιο που κωδικοποιεί για μια υποθετική λιποπρωτεΐνη ως *lip*, το γονίδιο που κωδικοποιεί τον ενεργοποιητή του παράγοντα *sigma* ως *sfa* και το γονίδιο που κωδικοποιεί μια υποθετική *Ser/Thr* φωσφατάση του *HSI-I* ως *pppB*. Σε όλες τις περιπτώσεις τα ομόλογα γονίδια αντιπροσωπεύονται με το ίδιο χρώμα ή το ίδιο μοτίβο. Στην περίπτωση του *HSI-II* τα γονίδια *vgrG* και *hcr* καταδεικνύονται επίσης. Στο *HSI-II* το γονίδιο *orfX* εμφανίζεται με αχνή διακεκομμένη γραμμή, δείχνοντας ότι ίσως είναι ένα λάθος προβλεπόμενο γονίδιο. Η συστάδα (*cluster*) *HSI-I* αντιπροσωπεύεται από το *PA0074* έως το *PA0091*. Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι τα *PA0071-PA0073* είναι πιθανό να είναι μέρος του *HSI-I* δεδομένου ότι υπερεκφράζονται σε στέλεχος του *P. aeruginosa* με μεταλλαγή στο γονίδιο *retS* (Mougous et al., 2006).

Σε συνεργασία με τη *Dr. L. Rahme*, (*Dep. of Surgery, Harvard Medical School and Massachusetts General Hospital, Boston, MA*) και με βάση πληροφορίες που μας διέθεσε σχετικά με τα τρία *HCP* του στελέχους PA14, έγινε η αρχή για την βιοπληροφορική εξόρυξη στα γονιδιώματα των τριών πλήρως αλληλουχημένων παθότυπων του γένους *P. syringae*, με σκοπό την ανεύρεση ομολόγων πρωτεϊνών των *HCPs*. Στην *P. aeruginosa* PA14 υπάρχουν δύο ομόλογες πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από διακριτούς γενετικούς τόπους (*PA14_01100* και *PA14_34000*). Το δεύτερο από αυτά τα γονίδια χαρτογραφείται στη μία εκ των τριών γενετικών νησίδων που κωδικοποιούν τα εκκριτικά συστήματα τύπου *VI* (την *HSI-III* ή *T6SS-3*). Έτσι άρχισαν οι αναζητήσεις ομολόγων πρωτεϊνών σε άλλα (φυτοπαθογόνα) βακτήρια. Αρχικά εντοπίστηκε μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γενετικό τόπο *PSPPH_0130* που είχε κατατεθεί στη βάση δεδομένων του παθότυπου *P. syringae* pv. *phaseolicola* με τη συντομογραφία *ImpH*, χωρίς άλλες διαθέσιμες πληροφορίες στον ιστότοπο www.pseudomonas-syringae.org ή στις βάσεις δεδομένων του *NCBI* και τον ιστότοπο www.pseudomonas.com. Ομόλογα αυτής της πρωτεΐνης υπάρχουν επίσης και στους άλλους δυο παθότυπους του *P. syringae* αλλά είναι κατατεθειμένες μόνο ως «μη χαρακτηρισμένες υποθετικές πρωτεΐνες άγνωστης λειτουργίας». Στο στέλεχος B728A ομόλογη πρωτεΐνη της *ImpH* κωδικοποιείται από το γενετικό τόπο *Psyr_4957* και στο DC3000 από τον *PSPTO_5426*. Ομόλογες αυτών των πρωτεϊνών υπάρχουν και άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια, όπως και σε πολλά άλλα βακτήρια γνωστής και άγνωστης παθοβιολογίας.

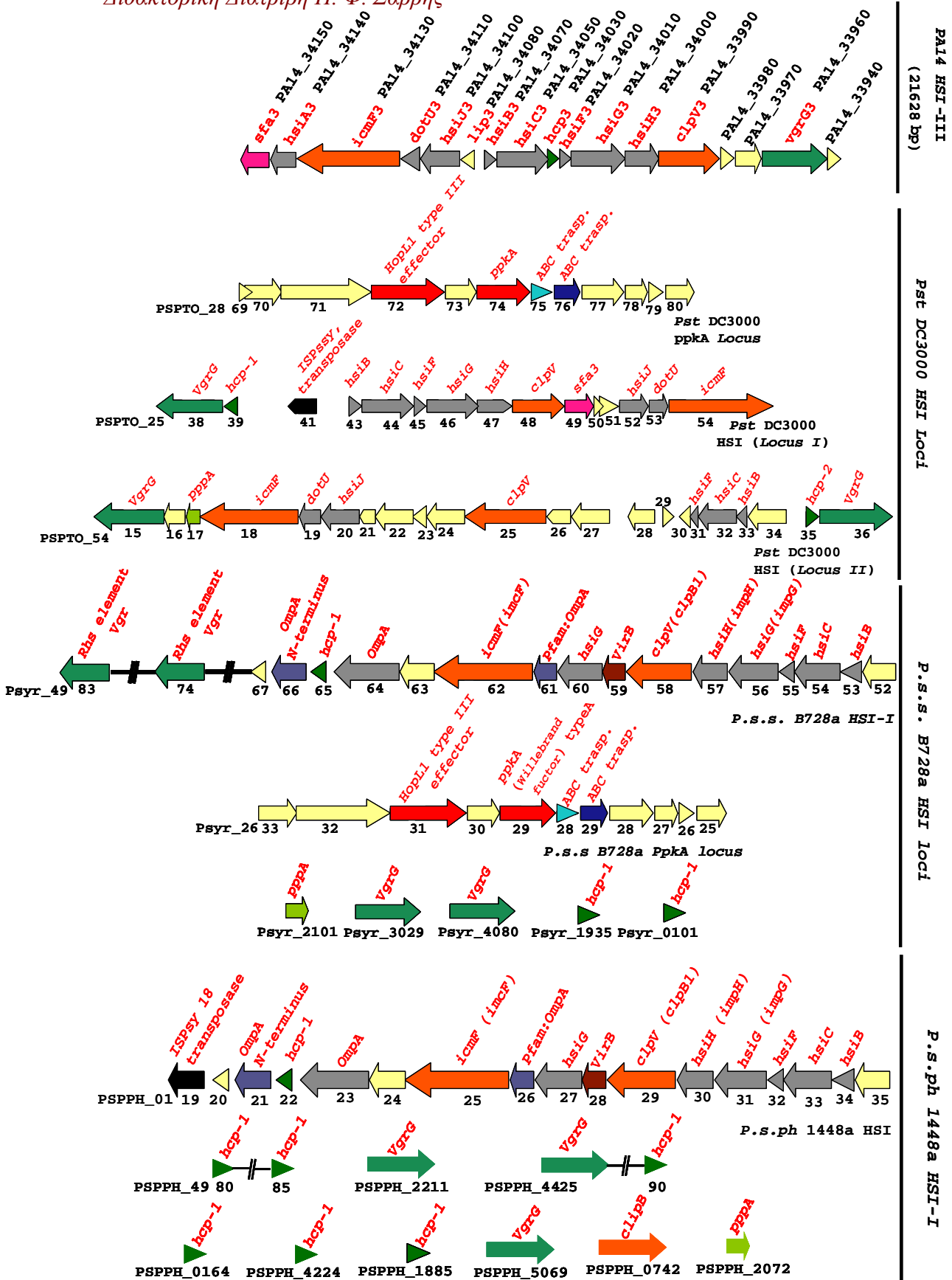
Σημαντική επίσης είναι η διαπίστωση που προέκυψε σε αυτές τις αναζητήσεις ότι, ο επόμενος (*downstream*) γενετικός τόπος στο στέλεχος PA14 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ομόλογη με τα την *ClpB*, μέλος της πρωτεϊνικής οικογένειας των *ClpB ATP*ασών. Οι πρωτεΐνες αυτές αρχικά περιγράφηκαν στη βιβλιογραφία ως ρυθμιστικά συστατικά των *ATP*-εξαρτώμενων *Clp*-πρωτεασών που έχουν βρεθεί σε οργανισμούς και των τριών «Βασιλείων». Η πρωτεΐνη *ClpB* παίζει ρόλο στη ρύθμιση της παθογόνου ισχύος (*virulence*) και κινητικότητας (*motility*) του παθογόνου *Y. enterocolitica*

(Filloux, et. al. 2008). Από την εξέταση της ομολογίας και του γενετικού πλαισίου (*genomic context*) των παραπάνω δύο πρωτεϊνών προέκυψε ότι αυτές κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται σε τοπικά συνταινικές περιοχές του χρωμοσώματος στο στέλεχος B728a και στο PA14. Η συνταίνα αυτή διατηρείται και στο γονιδίωμα του παθότυπου *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448a αλλά είναι ατελής στο γονιδίωμα του παθότυπου *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Εικ. 27). Αναζητήθηκαν επίσης και άλλα γονίδια ομόλογα πρωτεϊνών των *T6SS* όπως και πιθανοί *T6SS effectors* μέσω ανάλυσης *BLAST* στις βάσεις δεδομένων *NCBI* και www.pseudomonas.com. Από την αναζήτηση αυτή προέκυψε εκτενής συνταίνα κωδικών περιοχών του γενετικού τόπου *HSI-1* με γονίδια του στελέχους B728a, όπως και μια πλειάδα «εν δυνάμει» πρωτεϊνών *effectors*, με σχετικά χαμηλές ομολογίες (30-35%) τόσο στο πρωτέωμα του στελέχους *Pss* B728a, όσο και στους άλλους δύο παθότυπους. Με βάση τις αδημοσίευτες πληροφορίες που μας διέθεσε το εργαστήριο της *Dr. L. Rahme* επιχειρήθηκε περαιτέρω ανάλυση των *T6SS* ομολόγων πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα έδωσαν μια πιο ολοκληρωμένη και πειστική εικόνα για την ύπαρξη μίας νησίδας που περιέχει γονίδια που σχετίζονται με την πιθανή ύπαρξη *T6SS* στους παθότυπους *Pss* B728a και *Psph* 1448A και τριών στον παθότυπο *Pst* DC3000. Ενδεικτικά παρατίθενται γενετικοί χάρτες των νησίδων *T6SS* των παθότυπων *Pst* DC3000, *Pss* B728a και *Psph* 1448a στην **Εικόνα 28**. Από τα παραπάνω δεδομένα γίνεται εμφανές ότι το βακτηριακό στέλεχος *Psph* 1448a και *Pss* B728a αποτελούν πολύ καλά μοντέλα για την μελέτη του ρόλου του *T6SS* στην παθογένεια των φυτοπαθογόνων βακτηρίων του είδους *P. syringae* μια και στο γονιδίωμα τους εμφανίζεται να έχουν μία μόνο νησίδα που κωδικοποιεί ένα πιθανό *T6SS* (Εικ. 28).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση σε δύο δομικές πρωτεΐνες του *T6SS*, τις *ClpV/B* και *IcmF* (Εικ. 28, 29) χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες πρωτεϊνών από ήδη χαρακτηρισμένα *T6SSs* με την μέθοδο *UPGMA* (*bootstrap test*).

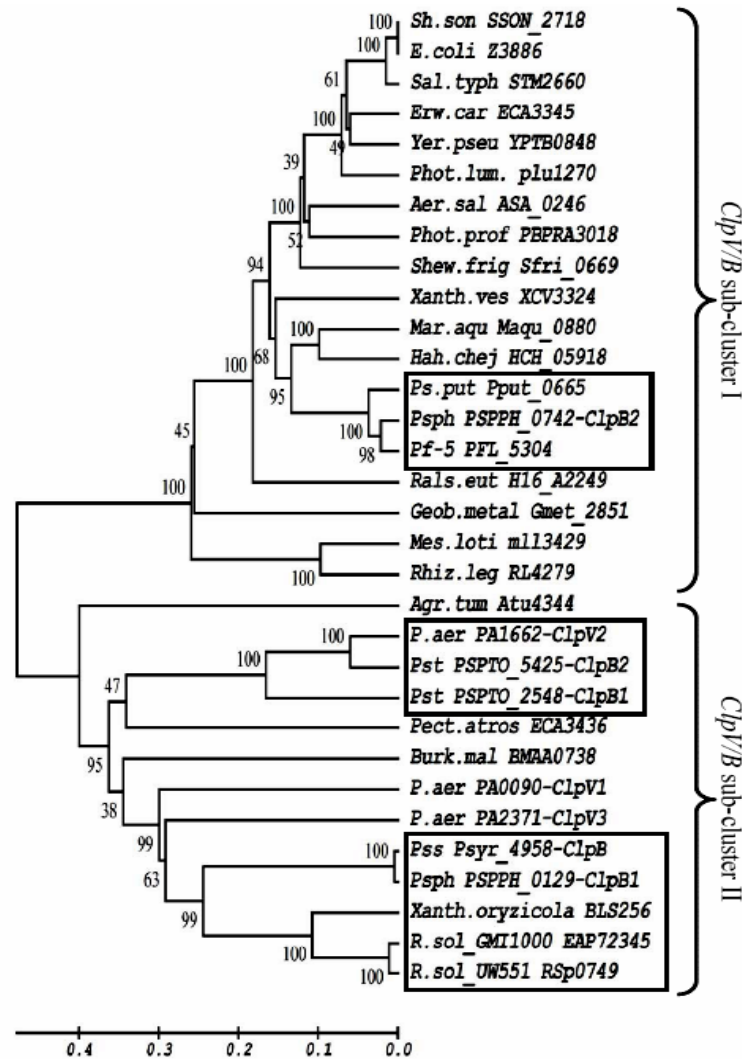


Εικόνα 27. Η δομή της νησίδας *T6SS* και κωδικοποιούμενες πρωτεΐνες στο στέλεχος *Pss*-B728a.



Εικόνα 28. Ολοκληρωμένη γραφική απεικόνιση των T6SS που ανευρέθηκαν στους παθότυπους *Pst* DC3000, *Pss* B728a και *Psph* 1448a, και σύγκριση τους με την μια εκ των τριών νησίδων T6SS του βακτηρίου *P. aeruginosa* PA14. Τα ομόλογα γονίδια εμφανίζονται με το ίδιο χρώμα. Τα γονίδια υποδεικνύονται με τον αριθμό που έχουν κατατεθεί στην βάση δεδομένων (π.χ. PSPPH_4980).

Το φυλογενετικό δέντρο που δημιουργήθηκε από την σύγκριση των αλληλουχιών των *ClpV/B* πρωτεϊνών (Εικ. 28) αποκάλυψε την ύπαρξη δύο διακριτών ομάδων *Clp* πρωτεϊνών. Στην υπό-ομάδα I (*subcluster I*) παρατηρούμε την ομαδοποίηση της *Psph ClpB2* (PSPPH_0665) με τις *Clp* πρωτεΐνες των βακτηρίων *Pseudomonas putida* και *Pseudomonas fluorescens*. Αντίθετα οι *ClpB1* (PSPPH_0129) του *Psph* και η *ClpB* (*Psyr_4958*) του *Pss* εμφανίζονται στην υπό-ομάδα II (*subcluster II*) να ομαδοποιούνται με τις *ClpB* πρωτεΐνες των βακτηρίων *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (BLS256) και *Ralstonia solanacearum* (EAP72345 και RSp0749) οι οποίες εμφανίζονται φυλογενετικά κοντά στις *ClpV1* (PA0090) και *ClpV3* (PA2371) της *Pseudomonas aeruginosa*. Στην δεύτερη υπό-ομάδα επίσης, εντοπίζονται και οι *ClpB1* (PSPTO_2548) και *ClpB2* (PSPTO_5425) του *Pst* οι οποίες φαίνεται να εμφανίζουν υψηλή συγγένεια με την *ClpV2* (PA1662) της *Pseudomonas aeruginosa*.

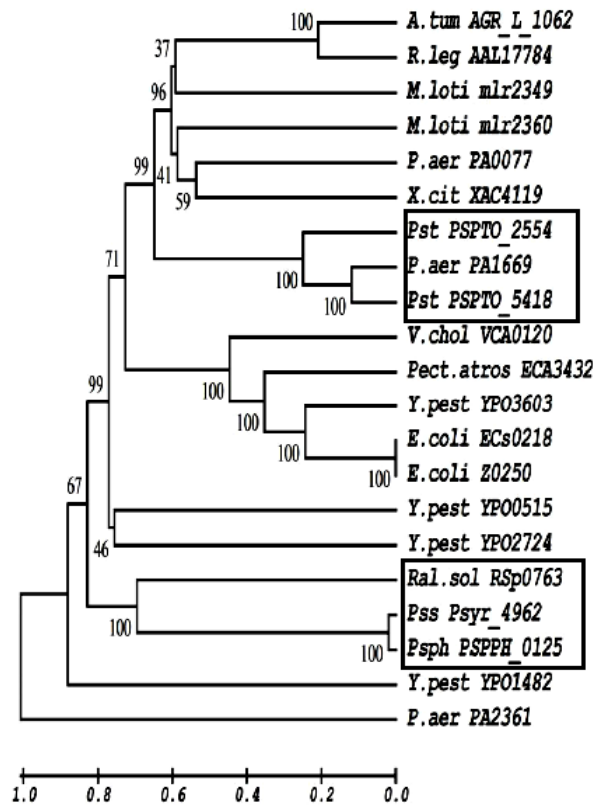


Εικόνα 28. Εξελικτική σχέση 32 γνωστών και υποθετικών *Clp-ATP*ασών. Η εξελικτική απεικόνιση προέκυψε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο UPGMA (Sneath et. al. 1973). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Poisson (Zuckerkanll, 1965) και εμφανίζονται σε μονάδες που αντιστοιχούν στον αριθμό αντικαταστάσεων αμινοξέων ανά περιοχή. Όλες οι θέσεις που περιέχουν κενά ή χαμένα στοιχεία αποβλήθηκαν από το

Διδακτορική Διατριβή Π. Φ. Σαρρής

σύνολο των δεδομένων (*Complete deletion option*). Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα *MEGA4* (Tamura et. al. 2007). Οι *Clp* πρωτεΐνες των παθότυπων του *P. syringae* εμφανίζονται σε πλαίσια, ενώ πάνω από τους κλάδους του φυλογενετικού δέντρου εμφανίζεται το *Bootstrap value*.

Το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε από την σύγκριση των αλληλουχιών των *IcmF* πρωτεϊνών (Εικ. 29) παρουσιάζει μεγαλύτερη ανομοιογένεια στην ομαδοποίηση σε σύγκριση με αυτό των *Clp* πρωτεϊνών. Παρόλα αυτά οι *IcmF* (PSPTO_2554 και PSPTO_5418) του *Pst* εμφανίζουν φυλογενετική συγγένεια και ομαδοποιούνται με την *IcmF2* (PA1669) της *Pseudomonas aeruginosa*. Ενώ η *IcmF* (PSPPH_0125) του *Psph* και η *IcmF* (*Psyr_4962*) του *Pss* φαίνεται να συγγενεύουν φυλογενετικά περισσότερο με την *IcmF* της *Ralstonia solanacearum* (RSp0763). Έκπληξη αποτελεί η θέση της *IcmF3* (PA2361) της *Pseudomonas aeruginosa* η οποία εμφανίζεται ως *out group* στην παρούσα φυλογενετική ανάλυση.



Εικόνα 29. Εξελικτική σχέση 21 γνωστών και υποθετικών *IcmF* πρωτεϊνών. Η εξελικτική απεικόνιση προέκυψε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *UPGMA* (Sneath et. al. 1973). Οι εξελικτικές αποστάσεις υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο *Poisson* (Zuckerkan dl, 1965) και εμφανίζονται σε μονάδες που αντιστοιχούν στον αριθμό αντικαταστάσεων αμινοξέων ανά περιοχή. Όλες οι θέσεις που περιέχουν κενά ή χαμένα στοιχεία αποβλήθηκαν από το σύνολο των δεδομένων (*Complete deletion option*). Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα *MEGA4* (Tamura et. al. 2007). Οι *IcmF* πρωτεΐνες των παθότυπων του *P. syringae* εμφανίζονται σε πλαίσια, ενώ πάνω από τους κλάδους του φυλογενετικού δέντρου εμφανίζεται το *Bootstrap value*.

Συζήτηση

Η πρωτεΐνη *ORF6* (*Psyr_1182*) του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, εμφανίζεται να είναι σχετιζόμενη με το εκκριτικό σύστημα τύπου III. Η έκφραση της στο σαπροφυτικό στέλεχος του βακτηρίου *P. fluorescens* 55, (τροποποιημένου να φέρει μια νησίδα παθογένειας *hrp*) και υπό τον μεταγραφικό έλεγχο ενός *hrpBox* υποκινητή, επάγει αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) σε τουλάχιστον δύο ποικιλίες καπνού αλλά όχι και σε άγριους συγγενείς τους. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι ομόλογες και παράλογες του *ORF6* από τα στελέχη *Psph* 1448a και *Pst* DC3000 δεν φαίνεται να επάγουν τον ίδιο φαινότυπο στα παραπάνω φυτά. Αυτό βέβαια δεν αποκλείει την πιθανότητα επαγωγής της *HR* σε άλλους ξενιστές.

Η μελέτη της πρωτεΐνης *ORF6* καθώς και των ομολόγων της (παράλογων και ορθόλογων) από τα βακτηριόκα στελέχη *Psph* 1448a και *Pst* DC3000, συνεχίζεται σε συνεργασία με την Δρ. Ν. Ταμπακάκη από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Ταυτόχρονα ετοιμάζουμε μια δημοσίευση των προκαταρκτικών αποτελεσμάτων. Η συνέχιση της μελέτης αφορά στον καθαρισμό, μια και σε μια πρώτη προσπάθεια η *ORF6* παρουσιάστηκε εντελώς αδιάλυτη. Στόχο για περαιτέρω μελέτη αποτελεί η εύρεση του υποκυταρικού εντοπισμού της πρωτεΐνης αφού υπάρχουν ενδείξεις ότι εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη του ξενιστή λόγω της ύπαρξης 3 τουλάχιστον δια-μεμβρανικών περιοχών στην αλληλουχία της πρωτεΐνης.

Η σύντηξη της πρωτεΐνης *ORF6* με την χαρπίνη (*harpin*) *HrpZ* του βακτηρίου *Psph* και η έκφραση του σε βακτηριακό στέλεχος του είδους *P. syringae* pv. *tabaci* θα μας δώσει ενδιαφέρουσες πληροφορίες σχετικά με την έκκριση και τον πιθανό εντοπισμό της πρωτεΐνης στα φυτικά κύτταρα. Το είδος *P. syringae* pv. *tabaci* περιέχει στο γονιδίωμα του την πρωτεΐνη *HrpZ* ακρωτηριασμένη με αποτέλεσμα να γίνεται διακριτή από το σύντηγμα *ORF6::HrpZ_{Psph}* σε *western blot* ανάλυση. Ενδιαφέρον επίσης θα είχε η μελέτη και άλλων φυτοπαθογόνων και παθογόνων βακτηρίων των θηλαστικών για τον εντοπισμό ομολόγων της *Orf6* πρωτεϊνών, καθώς και η λειτουργική μελέτη του ρόλου τους στην παθογένεια.

Η μελέτη για τον εντοπισμό γονιδιακών νησίδων ομολόγων των νησίδες που είναι υπεύθυνες για την κωδικοποίηση εκκριτικών συστημάτων τύπου VI (*T6SS*) στα φυτοπαθογόνα βακτήρια του γένους *P. syringae* αποκάλυψε την ύπαρξη *T6SS* και στα τρία αλληλουχημένα στελέχη του είδους.

Με βάση τις αδημοσίευτες πληροφορίες που μας διέθεσε το εργαστήριο της *Dr. L. Rahme* έγινε αναζήτηση στα γονιδιώματα των τριών αλληλουχημένων στελεχών των διαφορετικών παθότυπων του είδους *P. syringae*, για την εξόρυξη γονιδίων ή γονδιακών νησίδων που κωδικοποιούν *T6SS* ομόλογες πρωτεΐνες. Τα αποτελέσματα έδωσαν μια πιο ολοκληρωμένη και πειστική εικόνα για την ύπαρξη δύο νησίδων που περιέχουν γονίδια που σχετίζονται με την πιθανή ύπαρξη *T6SS* στον παθότυπο *Pss* B728a, μίας στον παθότυπο *Psph* 1448A και τριών στον παθότυπο *Pst* DC3000. Ενδεικτικά δημιουργήθηκαν οι σχετικοί γονδιακοί χάρτες των νησίδων *T6SS* των παθότυπων *Pst* DC3000, *Pss* B728a και *Psph* 1448a και εμφανίζονται στην Εικόνα 28. Από τα παραπάνω δεδομένα γίνεται εμφανές ότι το βακτηριακό στελέχη *Psph* 1448a και *Pss* B728a αποτελούν πολύ καλά μοντέλα για την μελέτη του ρόλου του *T6SS* στην παθογένεια των φυτοπαθογόνων βακτηρίων του είδους *P. syringae* μια και στο γονιδίωμα τους εμφανίζεται να έχουν μία μόνο νησίδα που κωδικοποιεί ένα πιθανό εκκριτικό σύστημα τύπου VI (*T6SS*).

Όπως γίνεται φανερό, η έρευνα για την ύπαρξη και την λειτουργική ανάλυση των *T6SS* στα φυτοπαθογόνα βακτήρια είναι ένας χώρος που μόλις άρχισε να υφίσταται ερευνητικά. Χρειάζεται αρκετή δουλειά για την ολοκληρωμένη μελέτη του πιθανού ρόλου του *T6SS* στην βακτηριακή παθογένεια. Για τον λόγο αυτό εμείς προγραμματίζουμε την δημιουργία *T6SS* μεταλλαγμάτων στο βακτήριο *P. s. pv. phaseolicola* για την μελέτη του πιθανού ρόλου του συστήματος αυτού στην παθογένεια στο φασόλι αλλά και στην επαγωγή των αμυντικών μηχανισμών σε μη συμβατούς ξενιστές. Παράλληλα σχεδιάζουμε την πειραματική διαδικασία με την οποία θα μελετήσουμε εάν η νησίδα αυτή που βρήκαμε είναι λειτουργική (δηλ. αν τα γονίδια εκφράζονται), αλλά και υπό ποιές συνθήκες.

Υλικά και Μέθοδοι

Διαδικασία κλωνοποίησης

Για την κατασκευή μίας σειράς φορέων που φέρουν γονίδια που κωδικοποιούν βακτηριακούς παράγοντες παθογένειας, επιλέχθηκαν τα σχετικά βακτηριακά στελέχη, εντοπίστηκαν οι αλληλουχίες των γονιδίων παθογένειας στις βάσεις δεδομένων *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/), *TIGR* (www.tigr.org/), *Pseudomonas syringae Genome Resources* (www.pseudomonas-syringae.org) και σχεδιάστηκαν οι εξειδικευμένοι εκκινητές για κάθε ένα από αυτά. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν ώστε να φέρουν θέσεις περιορισμού κατάλληλες για την κλωνοποίηση των γονιδίων στους διάφορους πλασμιδιακούς φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για την μεταφορά και έκφραση των κλωνοποιημένων γονιδίων σε στελέχη βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*, *Agrobacterium* και *E. coli*. Όπως και για την παροδική έκφραση τους σε φυτικά κύτταρα μέσω αagroένχυσης.

Έγινε απομόνωση ολικού DNA από καλλιέργειες των σχετικών παθογόνων βακτηρίων και εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδραση της πολυμεράσης (*PCR*) για την ενίσχυση των επιλεγμένων γονιδίων. Περισσότερες λεπτομέρειες δίνονται παρακάτω.

Καλλιέργειες βακτηρίων και ιών

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών χρησιμοποιήθηκε κυρίως 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.* (1989) Για την καλλιέργεια των *Pseudomonas* και των *Agrobacterium* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο *King's B* (*King, 1954*), σε υγρή και στερεή μορφή, παρασκευασμένο σύμφωνα με τους *King et. al.*, (με την διαφορά ότι το $MgSO_4$ αποστειρώθηκε με διήθηση και προστέθηκε ασηπτικά εκ των υστέρων στο θρεπτικό μέσο, μετά την θερμική αποστείρωση του τελευταίου). Για την απομόνωση και ταυτοποίηση στελεχών *Agrobacterium* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό επιλογής *DIM* (*Perry and Kado, 1982*). Για την καλλιέργεια στελεχών του *Ralstonia* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο *Kelman's TZC agar* (*Kelman, 1954*).

Ιικά μόλυσματα διατηρήθηκαν ως ξηραμένα φύλλα από μολυσμένα ευπαθή στον ιό φυτά (κυρίως φυτά *Nicotiana tabacum c.v Xanthi*).

Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας

Οι συνταγές για την παρασκευή των σχετικών θρεπτικών μέσων αναφέρεται παρακάτω.

LB (1 lit): 5 gr *Bacto-yeast extract*, 10 gr *Bacto-Tryptone*, 5 gr *NaCl* και 12 gr *agar* (στην περίπτωση στερεού θρεπτικού, υποστρώματος σε τρυβλία *Petri* ή δοκιμαστικούς σωλήνες), με διπλά αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 1000 ml. Το pH ρυθμίστηκε στο 7.0 πριν την αποστείρωση του θρεπτικού διαλύματος σε αυτόκαυστο κλίβανο αποστείρωσης.

KB (1 lit): 20 gr *proteose peptone* No3, 1,5 gr K_2HPO_4 , 1,5 gr $MgSO_4 \cdot 7H_2O^*$ και 12 gr *agar* (στην περίπτωση στερεού θρεπτικού, υποστρώματος σε τρυβλία *Petri* ή δοκιμαστικούς σωλήνες), με νερό σε τελικό όγκο 1000 ml. Το pH ρυθμίστηκε στο 7.2 πριν την αποστείρωση του θρεπτικού διαλύματος σε αυτόκαυστο κλίβανο αποστείρωσης.

*Το θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$) καλό είναι να προστίθεται μετά την αποστείρωση στον κλίβανο για την αποφυγή προβλημάτων καθίζησης.

Διδακτορική Διατριβή Π. Φ. Σαρρής

TZC stock solution: Περιέχει 1 gr TZC (2, 3, 5 triphenyl tetrazolium chloride) σε 100 ml ddH₂O. Το διάλυμα διατηρήθηκε σε φωτο-προστατευόμενο δοχείο, αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο για 8 min ή με φιλτράρισμα (0,22 μ filter) και φυλάχθηκε στο ψυγείο.

Βασικό Μέσο: Περιέχει 10 gr (ή 2.5 g)* Dextrose, 10 gr Peptone, 1 gr Casamino acids (Difco), 18 gr agar, ddH₂O σε τελικό όγκο 1000 ml. Αποστειρώνουμε σε αυτόκαυστο και το φυλάσσουμε στο ψυγείο.

*Η προσθήκη 2.5 gr αντί 10 gr έδωσε καλύτερο ρυθμό ανάπτυξης, ειδικά όσον αφορά στα στελέχη *Ralstonia* που μολύνουν την πατάτα (*biovar 2-A, race 3*).

Προετοιμασία τρυβλίων καλλιέργειας: Το θρεπτικό μέσο υγροποιήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων, αφέθη να κρυώσει περίπου στους 48-45°C. Έπειτα προστέθηκε 1 ml διαλύματος TZC / 200 ml θρεπτικού μέσου (συνιστώμενη αναλογία 5 ml/lit) για τελική συγκέντρωση 0.005%. Τα τρυβλία είναι καλύτερο να χρησιμοποιούνται μέχρι και 2 ημέρες μετά την παρασκευή τους (μεγαλύτερο διάστημα αποθήκευσης έχει αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη των βακτηρίων).

DIM: Διαλύθηκαν 5.0 g κελοβιόζης (*cellobiose*), 1.0 g NH₄Cl, 0.3 g MgSO₄·7H₂O, 3.0 g K₂HPO₄, 1.0 g NaH₂PO₄, 0.01 g πράσινο του μαλαχίτη (*malachite green*), και 15.0 g agar (Difco), σε ddH₂O για τελικό όγκο 1000 ml. Το θρεπτικό μέσο τοποθετήθηκε σε φωτο-προστατευόμενο δοχείο, αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο και φυλάχθηκε στο ψυγείο.

Απομόνωση γενωμικού ή ολικού DNA από βακτηριακή καλλιέργεια

Για την απομόνωση ολικού DNA από βακτήρια ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο: Φυγοκεντρούμε βακτηριακό αιώρημα όγκου 10 ml σε 3200 rpm για 15 min στους 4 °C. Συλλέγουμε το βακτηριακό ίζημα και επαναδιαλύουμε σε 9,5 ml TE (TE: 25 mM Tris-HCl με pH=8, 10 mM EDTA με pH=8). Αναδεύουμε ελαφρά και προσθέτουμε το διάλυμα λύσης (0,5 ml από 10% SDS (w/v), 50 μl από 20 mgr/ml Proteinase K). Αναδεύουμε ελαφρά και επωάζουμε στους 55°C για 60 min. Στην συνέχεια προσθέτουμε 1,8 ml από 5 M NaCl και 1,5 ml από 10% CTAB. Αναδεύουμε ελαφρά και επωάζουμε στους 65°C για 20min. Κατόπιν προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος χλωροφόρμιο/ισοαμυλικής αλκοόλης (chloroform/isoamyl alcohol) (24/1 v/v). Αναδεύουμε ελαφρά και φυγοκεντρούμε στις 10000 rpm για 15 min στους 4 °C. Στην συνέχεια συλλέγουμε το υπερκείμενο προσέχοντας να μην πάρουμε καθόλου από την ενδιάμεση διαχωριστική φάση. Προσθέτουμε με προσοχή ίσο όγκο ουδέτερης (pH 7) φαινόλης. Αναδεύουμε ελαφρά και φυγοκεντρούμε στις 3700 rpm για 15 min στους 4°C. Κατόπιν συλλέγουμε προσεκτικά το υπερκείμενο και προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφόρμιο. Αναδεύουμε ελαφρά και φυγοκεντρούμε στους 3700 rpm για 15 min στους 4 °C. Συλλέγουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 0,6 του όγκου απόλυτη ισοπροπανόλη (100%). Αναδεύουμε ελαφρά και επωάζουμε 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από περίπου 15 min το DNA γίνεται εμφανές. Συλλέγουμε το DNA με πιπέτα Pasteur καταλλήλως διαμορφωμένη με την βοήθεια φλόγιστρου. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει την συλλογή του γενωμικού DNA αποφεύγοντας το πλασμιδιακό. Αν επιθυμούμε να πάρουμε ολικό DNA τότε φυγοκεντρούμε το διάλυμα, (μετά την επώαση του με απόλυτη ισοπροπανόλη (100%) στις 13000 rpm για 20 min στους 4 °C. Πετάμε το υπερκείμενο προσεκτικά και στην πελλέτα προσθέτουμε 1 ml αιθανόλης 70%. Φυγοκεντρούμε στις 13000 rpm για 10 min στους 4 °C. Πετάμε το υπερκείμενο προσεκτικά και αφήνουμε τα δείγματα να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Προσθέτουμε 1 ml ddH₂O και τα αποθηκεύουμε στους -20 °C.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν κατάλληλα λαμβάνοντας υπόψη ποικίλες παραμέτρους όπως: απουσία εσωτερικής συμπληρωματικότητας (*hairpins*, *self-dimers*) ούτε συμπληρωματικότητα μεταξύ τους (*pair-dimers*) ιδιαίτερα στο 3' άκρο, με περιεχόμενο σε GC από 40% ως 60% και θέσεις στο 5' άκρο. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι η *Taq* πολυμεράση είτε άλλου τύπου πολυμεράσες (π.χ. *proof reading*), που διαθέτουν 3' προς 5' ενεργότητα εξωνουκλεάσης, για την αποφυγή/ μείωση της πιθανότητας λαθών κατά την σύνθεση.

Οι αντιδράσεις διάρκεσαν (25-30) κύκλους, με πρόγραμμα θερμοκρασιών προσαρμοσμένο στις θερμοκρασίες πρόσδεσης των εκκινητών.

Συνήθης σύσταση μίας αντίδρασης *PCR* ήταν:

20.0 mM *Tris-HCl* (pH 8.3-8.8)

50.0 mM *KCl*

50.0-200.0 mM *dNTPs*

0.5-2.5 mM *MgCl*

1.0-2.5 μονάδες *Taq* πολυμεράσης σε τελικό όγκο αντίδρασης 25-100 ml

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα 0,5 x *TBE* (10 x *TBE*: 108 gr *Tris-base*, 55 gr βορικού οξέος (*boric acid*), 40 ml 0.5 M *EDTA* με pH 8, *ddH₂O* για 1lit), ενώ στο πήκτωμα προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο.

Απομόνωση DNA από διάλυμα ή πήκτωμα αγαρόζης

Απομόνωση προϊόντος PCR με την χρήση κολόνας *QIAquick*

Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο: «*QIAquick PCR Purification Kit Protocol*» του εγχειριδίου της *QIAGEN*. Με αυτό το πρωτόκολλο μπορούμε να απομονώσουμε τμήματα DNA από αντίδραση PCR ή άλλες ενζυμικές αντιδράσεις. Τμήματα που είναι μεταξύ 100 bp και 10 kbp μπορούν να διαχωριστούν από εκκινητές, νουκλεοτίδια, ένζυμα και αλάτια, χρησιμοποιώντας τις κολώνες φυγοκέντρησης *QIAquick*.

Απομόνωση με τη χρήση φαινόλης

Στο διάλυμα που περιέχει το δείγμα DNA προσθέσαμε ίσο όγκο διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25 : 24 : 1 v/v). Αναδεύσαμε ισχυρά για 10 sec και φυγοκεντρίσαμε στις 12000 rpm για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέραμε το διαυγές υπερκείμενο σε νέο σωληνάκι *eppendorf*. Προσθέσαμε 1/10 του όγκου 3 M οξικού νατρίου (*CH₃COONa*) με pH 5.2 και αναδεύσαμε ισχυρά. Προσθέσαμε 2 με 2,5 όγκους παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (100%) και αναδεύσαμε ισχυρά. Φυγοκεντρίσαμε στις 13500 rpm για 15 min και απομακρύναμε το υπερκείμενο. Προσθέσαμε ίσο όγκο 70% αιθανόλη και φυγοκεντρίσαμε στις 13500 rpm για 5 min. Απομακρύναμε το υπερκείμενο, στεγνώσαμε το ίζημα σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min και επαναδιαλύσαμε στον επιθυμητό όγκο νερού.

Απομόνωση ζώνης DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο «*QIAquick Gel Extraction Kit Protocol*» από το εγχειρίδιο της *QIAGEN*. Με αυτό το πρωτόκολλο μπορούμε να απομονώσουμε τμήματα DNA από 70 ως 10.000 βάσεις, από κοινή αγαρόζη ή από αγαρόζη χαμηλού

σημείου τήξεως. Είναι συμβατό επίσης είτε με διάλυμα ηλεκτροφόρησης *TAE* είτε με *TBE*.

Ενζυμικοί χειρισμοί του DNA

Πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Δύο είδη πέψεων εκτελέστηκαν κατά την διάρκεια της κλωνοποίησης γονιδίων: οι πέψεις προετοιμασίας για την κλωνοποίηση που έγιναν σε μεγάλους όγκους (40-60μl) συνήθως και οι διαγνωστικές πέψεις είτε για τον έλεγχο των κλώνων είτε για την ταυτοποίηση του πλασμιδιακού *DNA* και οι οποίες λάμβαναν χώρα σε όγκο 20μl. Εκτελέστηκαν επίσης διπλές πέψεις όπου χρειαζόταν για την επίτευξη κατευθυνόμενης ένθεσης στον φορέα.

Ένζυμα (περιοριστικές ενδονουκλεάσες)

Τα ένζυμα δεν πρέπει να απομακρύνονται από τους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για πολύ, για τον λόγο αυτό καλό θα ήταν να προστίθενται τελευταία στο διάλυμα της αντίδρασης. Η ενεργότητα των περιοριστικών ενδονουκλεασών καθώς και των λοιπών ενζύμων μετρείται σε συμβατικές μονάδες (*standard activity units*). Στην συγκεκριμένη περίπτωση 1 U είναι η ποσότητα η απαιτούμενη για την πλήρη πέψη 1 μg *DNA* από τον βακτηριοφάγο λ σε μία ώρα. Ο αριθμός των *units* που προστίθενται στο διάλυμα αντίδρασης πρέπει να προσαρμόζεται στον αριθμό των περιοριστικών θέσεων που διαθέτει το υπόστρωμα καθώς και στην συγκέντρωση των μορίων του ίδιου του υποστρώματος. Απαιτούνται γενικά περισσότερα *units* για την πλήρη πέψη υπέρ-ελικομένου (*supercoiled*) *DNA* από ότι απαιτείται στην περίπτωση του λ *DNA*. Η ποσότητα του προστιθέμενου ενζύμου δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 10% του τελικού όγκου της αντίδρασης, και αυτό διότι το διάλυμα του ενζύμου περιέχει 50% γλυκερόλης, η τελική συγκέντρωση της οποίας στην αντίδραση δεν πρέπει να ξεπερνάει το 5%. Υπάρχει κίνδυνος τα ένζυμα να χάσουν την εξειδίκευσή τους, ως προς την αναγνώριση της αλληλουχίας κοπής, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης γλυκερόλης. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και στις περιπτώσεις όπου έχουν προστεθεί πολλά περισσότερα *units* από τα απαιτούμενα στην αντίδραση.

Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (*buffer*)

Τα ένζυμα προμηθεύονται από τις εταιρείες μαζί με ένα ρυθμιστικό διάλυμα συγκεντρωμένο κατά 10X, στο οποίο το ένζυμο έχει το 100% της απόδοσης του. Στην διάλυμα της πέψης περιορισμού το *buffer* θα πρέπει να βρίσκεται σε τελική συγκέντρωση 1X. Μερικά περιοριστικά ένζυμα απαιτούν την παρουσία *BSA* (*bovine serum albumin*) σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml, για να επιτύχουν την βέλτιστη απόδοση τους. Αντίθετα τα ένζυμα που δεν χρειάζονται την παρουσία της *BSA* για την επίτευξη της βέλτιστης απόδοσης τους δεν επηρεάζονται από την παρουσία της στο διάλυμα αντίδρασης.

Το DNA

Το προς πέψη υπόστρωμα θα πρέπει να είναι καθαρό από φαινόλες, χλωροφόρμιο, αλκοόλη, *EDTA*, απορρυπαντικά ή περίσσια άλατος τα οποία μπορούν να αναστείλουν στην ενεργότητα του ενζύμου.

Θερμοκρασία και χρόνος επώασης

Η συνιστάμενη θερμοκρασία επώασης είναι $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για τα περισσότερα ένζυμα. Τα περιοριστικά ένζυμα που έχουν απομονωθεί από θερμοφιλά βακτήρια απαιτούν υψηλότερες θερμοκρασίες από $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ως $65\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Αντίδραση λιγοποίησης

Η αντίδραση λιγοποίησης πραγματοποιήθηκε με την T4 *DNA* λιγάση η οποία έχει την δυνατότητα να συγκολλάει συμβατά προεξέχοντα αλλά και τυφλά άκρα *DNA*. Οι

Υλικά και Μέθοδοι

συνθήκες τις αντίδρασης έλαβε χώρα είτε στους 25 °C για 4 ώρες, είτε στους 16 °C σε ολονύχτια επώαση, είτε ακολουθήθηκαν συνθήκες κυκλικής αλλαγής της θερμοκρασίας από τους 10 °C στους 30 °C.

Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης

Στην αντίδραση αποφωσφορυλίωσης το *DNA* επεξεργάστηκε κατάλληλα ώστε να αποφωσφορυλιωθούν τα 5' άκρα των μορίων του. Με αυτό τον τρόπο κατά την διάρκεια της αντίδρασης λιγάσης τα άκρα του χρησιμοποιούμενου *DNA* φορέα δεν θα επανασυγκολληθούν μεταξύ τους. Έτσι υπάρχουν περισσότερες πιθανότητες ένωσης του φορέα με το επιθυμητό προς κλωνοποίηση τμήμα *DNA*. Το ένζυμο που χρησιμοποιήσαμε στην διαδικασία της αποφωσφορυλίωσης είναι η αλκαλική φωσφατάση από έντερο μόσχου (*Calf Intestine alkaline Phosphatase*). Το ένζυμο προστέθηκε μέσα στο διάλυμα της πέψης που προηγήθηκε, μια και είναι ενεργό στα περισσότερα ρυθμιστικά συστήματα και επώαστηκε στους 37 °C για μία ώρα. Στην περίπτωση που τα 5' άκρα είναι υπολειπόμενα και όχι προεξέχοντα επωάζουμε για 15 λεπτά στους 37 °C, για τα επόμενα 15 λεπτά στους 56 °C. Κατόπιν προσθέσαμε νέα ποσότητα ενζύμου και επαναλαμβάνουμε στους 37°C και 56°C από 15 λεπτά.

Απομόνωση πλασμιδιακού *DNA***Πρωτόκολλο μικρής κλίμακας με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης**

Μεταφέρουμε με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα μια αποικία από φρέσκο τρυβλίο και εμβολιάζουμε 4ml υγρού θρεπτικού μέσου (*KB* ή *LB*) που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής. Επωάζουμε τις υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων για 12-16 ώρες στους 37°C (*E. coli*) ή 25-28°C (*Φυτοπαθογόνα*) σε επωαστήρα συνεχούς ανάδευσης. Τοποθετούμε 2ml από την υγρή καλλιέργεια σε σωληνάκι τύπου *ependorf* των 2ml, ακολουθεί φυγοκέντριση των δειγμάτων στις 12.000 στροφές για 5 min στους 4°C (το υπόλοιπο της καλλιέργειας αποθηκεύεται στους 4°C). Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε την πελλέτα (βακτηριακό ίζημα) σε 100μl κρύου ισοτονικού διαλύματος I με την χρήση *vortex*. Έπειτα, προσθέτουμε 200μl από το αλκαλικό διάλυμα λύσης II. Ακολουθεί ήπια ανακίνηση του μίγματος (4-5 φορές με το χέρι). Τοποθετούμε τα δείγματα στον πάγο για 5 min. Εν συνεχεία, προσθέτουμε 150μl διαλύματος III και ακολουθεί ήπια ανακίνηση και αποθήκευση στον πάγο για 5 min. Κατόπιν το μίγμα φυγοκεντρείται στις 12.000 στροφές για 10 min στους 4°C. Ακολουθεί προσεκτική μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάκι *ependorf* των 1.5ml και προσθέτουμε ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης/χλωροφόρμιου (1:1). Αναμιγνύουμε καλά με ανακίνηση και φυγοκεντρούμε στις 12.000 στροφές για 10 min στους 4°C. Αν επιθυμούμε επαναλαμβάνουμε το προηγούμενο βήμα με χλωροφόρμιο μόνο (για καλύτερο ξέπλυμα των υπολειμμάτων φαινόλης). Στη συνέχεια κατακρημνίζουμε το *DNA* με την προσθήκη διπλάσιου όγκου απόλυτης αιθανόλης (ή 0,6 του όγκου ισοπροπανόλης). Μετά την προσθήκη της αλκοόλης, ανακινούμε τα δείγματα καλά τα αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13.500 στροφές για 20 min στους 4°C. Κατόπιν αφαιρούμε με προσοχή το υπερκείμενο και προστίθεται 1ml αιθανόλης 70%. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13.500 στροφές για 8 min στους 4°C και στη συνέχεια η πελλέτα του *DNA* αφήνεται να στεγνώσει για 15 min θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, επαναδιαλύουμε το *DNA* σε 20-40μl ddH₂O και αποθηκεύουμε στους -20°C.

Η διαδικασία που περιγράφουμε παραπάνω, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για μεγαλύτερου όγκου υγρές καλλιέργειες. Ακολουθούνται επ' ακριβώς τα βήματα της προηγούμενης παραγράφου με διαφοροποιημένες ποσότητες των διαλυμάτων I, II και III. Για ίζημα από 100ml καλλιέργειας προστίθενται 4ml από καθένα από τα τρία

Διδακτορική Διατριβή Π. Φ. Σαρρής

διαλύματα I, II και III. Τα διαλύματα φαινόλη/χλωροφόρμιο και χλωροφόρμιο προστίθενται σε ίσο όγκο με το ληφθέν υπερκείμενο. Η κατακρήμνιση του DNA γίνεται με 2,5 όγκους απόλυτης αιθανόλης (ή 0,6 του όγκου ισοπροπανόλης) και το ξέπλυμα του DNA με 3ml αιθανόλης 70%. Το DNA επαναδιαλύεται σε 100 μl ddH₂O.

Τα διαλύματα I, II και III συνίστανται από τις παρακάτω ουσίες:

Διάλυμα I: 50mM γλυκόζη, 25mM *Tris Cl*, 10mM *EDTA*, (pH: 8).

Διάλυμα II: 0,2N *NaOH*, 1% *SDS*.

Διάλυμα III: 60ml από 5M Οξικό Κάλιο, 11,5ml παγωμένο οξικό οξύ, 28,5ml ddH₂O.

Παρασκευή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Επωάζουμε το βακτηριακό στέλεχος όλο το βράδυ σε 1,5 ml θρεπτικού LB. Μολύνουμε με 1 ml εξ αυτών μια ποσότητα 200 ml LB σε φλάσκες των 2 L (για καλό αερισμό). Ακολουθεί επώαση με ισχυρή ανάδευση στους 37ο C μέχρι η οπτική απορρόφηση (OD) της καλλιέργειας στα 600nm να γίνει μεταξύ 0,6 και 0,8 (για βακτήρια του είδους *E. coli* ή 0,8-1,0 για βακτήρια του είδους *P. syringae*). Αυτό απαιτεί από 2 έως 6 ώρες. Στη συνέχεια η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 2500 στροφές/λεπτό για δέκα λεπτά, στους 4ο C. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και η βακτηριακή πελλέτα επαναδιαλύεται σε 15-30 ml διαλύματος *Tfb I* χωρίς vortex (με την βοήθεια της πιπέτας). Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30' λεπτά. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση των επαναδιαλυμένων κυττάρων στις 2000 στροφές για 10' λεπτά, στους 4ο C. Κατόπιν τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 4 ml διαλύματος *Tfb II* με προσοχή και υπομονή. Η ποσότητα των επαναδιαλυμένων κυττάρων μοιράζεται σε 80 περίπου κρύα *eppendorf* (100μL το καθένα). Τα *eppendorf* ψύχονται σε υγρό άζωτο αμέσως και αποθηκεύονται στους -80ο C.

Διαλύματα :

Tfb I: 30 mM οξικό κάλιο, 50 mM χλωριούχο μαγνήσιο, 100 mM χλωριούχο κάλιο, 10 mM χλωριούχο ασβέστιο και 15% γλυκερόλη.

Tfb II: 10 mM *MOPS*, 75 mM χλωριούχο ασβέστιο, 10 mM χλωριούχο κάλιο και 15% γλυκερόλη.

Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

Τα επιδεκτικά κύτταρα φυλάσσονται στους -80οC και πριν την χρήση τους τα αφήνουμε να ξεπαγώσουν στον πάγο (για το *E. coli*) ή σε θερμοκρασία δωματίου (για το *P. syringae*). Εν συνεχεία τα τοποθετούμε στον πάγο και προσθέτουμε 10 μl από το διάλυμα του πλασμιδιακού DNA με το οποίο θέλουμε να τα μετασχηματίσουμε (~500 ngr DNA για το *E. coli* ή ~1,0-1,5μgr DNA για το *P. syringae*). Ακολούθως αναδεύουμε τους σωλήνες και επωάζουμε στον πάγο για 30'-60' λεπτά. Στη συνέχεια ακολουθεί θερμικό σοκ τοποθετώντας τους σωλήνες για 90'' δευτερόλεπτα σε υδατόλουτρο στους 42°C και επιστρέφοντας τα αμέσως στον πάγο, όπου και παραμένουν για 5' λεπτά. Προσθέτουμε 400 μl υγρού LB και επωάζουμε στους 37οC για 30'-60' λεπτά. Στη συνέχεια εμβολιάζουμε τρυβλίο με LB και τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής και επωάζουμε για 12-16 ώρες (για το *E.coli*) 48 ώρες (για το *P. syringae*) στους 37°C ή στους 28°C αντίστοιχα.

Τριγονική σύζευξη (Triparental mating)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά των πλασμιδιακών κατασκευασμάτων (*constructs*) από το βακτήριο *E. coli* σε βακτήρια του είδους *P. syringae* καθώς και σε εργαστηριακά στελέχη του είδους *Agrobacterium tumefaciens*. Από ολονύχτια υγρή καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών που θα χρησιμοποιηθούν, 1ml φυγοκεντρείται με σκοπό την ίζηματοποίηση τους. Το βακτηριακό ίζημα κάθε στελέχους, ξεπλένεται από τα υπάρχοντα στο υγρό καλλιέργειας αντιβιοτικά, και επαναδιαλύεται σε 500μl *LB*. Αυτό επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Μετά το τρίτο πλύσιμο η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 500μl *LB*. Σε ένα καθαρό *ependorf* δημιουργούμε ένα μίγμα από 200μl του στελέχους-δέκτη, 100μl του στελέχους δότη και 100μl του βοηθητικού στελέχους. Το βοηθητικό στέλεχος (π.χ. *E. coli pRK2013*) είναι αυτό που φέρει τον παράγοντα **F** (**F+**) για την δημιουργία των συζευκτικών καναλιών. Αναμειγνύουμε με ελαφρύ *vortex*. Αφήνουμε 15-30min για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια ποσότητα των 20μl τοποθετείται στην επιφάνεια τρυβλίου *petri* με στερεού θρεπτικού υλικού χωρίς αντιβιοτικά και αφήνεται για επώαση όλο το βράδυ στους 25-28°C. Την επόμενη μέρα, με μία αποστειρωμένη λούπα αφαιρούμε μικροποσότητα βακτηριακών κυττάρων και τα απλώνουμε σε τριβλύο *petri* με στερεό θρεπτικό υλικό που περιέχει τα κατάλληλα αντιβιοτικά για να γίνει η τελική επιλογή, αποικιών-προϊόντων σύζευξης.

Ταυτοποίηση ανασυνδασμένων βακτηριακών κλώνων

Η ταυτοποίηση των βακτηριακών κλώνων γίνονται με τρεις τρόπους:

- α) με χρωματική επιλογή που βασίζεται στην ενεργότητα της γαλακτοσιδάσης, αν αυτή η δυνατότητα παρέχεται από το φορέα και το στέλεχος *E. coli* που χρησιμοποιείται,
- β) με απομόνωση πλασμιδιακού *DNA* σε μικρή κλίμακα και πέψεις ελέγχου των ανασυνδασμένων πλασμιδίων με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα,
- γ) με την εφαρμογή της *PCR* σε εκχύλισμα πλασμιδιακού *DNA* ή απευθείας σε βρασμένο αιώρημα βακτηριακών κυττάρων (*colony PCR*) από τα ανασυνδασμένα βακτήρια, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά στην κλωνοποίηση του ένθετου *DNA*.

Προετοιμασία βακτηριακού αιωρήματος για την βιοδοκιμές σε φυτά με την μέθοδο του εμποτισμού (Infiltration)

Ετοιμάζουμε φρέσκια υγρή καλλιέργεια ~10ml (εξαρτάται από το εύρος του αριθμού των φυτών που επιθυμούμε να μολύνουμε) του βακτηρίου που επιθυμούμε. Στην καλλιέργεια προσθέτουμε τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής. Αφήνουμε την καλλιέργεια σε επωαστήρα με τις κατάλληλες συνθήκες για περίπου 12-16 ώρες. Στην συνέχεια κατακρημνίζουμε τα βακτήρια με φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας 2000-2800 στροφές (όχι περισσότερο), απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το βακτηριακό ίζημα σε 10ml 10mM *MgCl2*. Κατακρημνίζουμε ξανά τα βακτήρια και αυτό επαναλαμβάνεται συνολικά τρεις φορές με σκοπό να καθαριστεί το βακτηριακό αιώρημα από τα αντιβιοτικά επιλογής του υγρού καλλιέργειας. Αφού επαναδιαλύσουμε για τρίτη φορά το βακτηριακό ίζημα, προσαρμόζουμε την οπτική πυκνότητα του βακτηριακού αιωρήματος στα 600nm (προσθέτοντας *MgCl2* 10mM αν χρειάζεται) ώστε να φτάσουμε την επιθυμητή συγκέντρωση κυττάρων στο βακτηριακό αιώρημα για την εφαρμογή, συμβουλευόμενοι την καμπύλη αναφοράς την οποία έχουμε προσχεδιάσει ώστε να γνωρίζουμε σε ποια απορρόφηση αντιστοιχεί η επιθυμητή συγκέντρωση. Για βιοδοκιμές επαγωγής της αντίδρασης υπερευαισθησίας (*HR*) η

συγκέντρωση του βακτηριακού αιωρήματος θα ήταν καλό να είναι από 5×10^6 έως 10^8 cfu/ml. Για βιοδοκιμές ελέγχου μολυσματικότητας η συγκέντρωση του βακτηριακού αιωρήματος δεν θα πρέπει να ξεπερνάει τα 10^6 cfu/ml (αυτό βέβαια εξαρτάται από το βακτηριακό είδος που μελετάμε κάθε φορά).

Η εφαρμογή της βιοδοκιμής για την επαγωγή *HR* μπορεί να γίνει ως εξής:

Με την βοήθεια μιας βελόνας από σύριγγα κάνουμε μια όσο το δυνατόν μικρότερη αμυχή στην κάτω πλευρά ενός νέου φύλλου του φυτού που επιθυμούμε να μολύνουμε. Με την σύριγγα, χωρίς την βελόνα και χωρίς πολύ πίεση πιέζουμε το βακτηριακό αιώρημα μέσω της αμυχής στον διακυττάριο χώρο του μεσόφυλλου του φυτού. Στην συνέχεια μαρκάρουμε το σημείο της μόλυνσης με έναν μαρκαδόρο, ακριβώς περιμετρικά της κηλίδας.

Για την εφαρμογή της βιοδοκιμής σε πειράματα ελέγχου της βακτηριακής μολυσματικότητας μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την προαναφερθείσα μεθοδολογία ή να προχωρήσουμε σε επάλειψη ή ψεκάσμο των φύλλων με το βακτηριακό αιώρημα. Στις περιπτώσεις αυτές είναι αναγκαίο να χρησιμοποιήσουμε διαβρεκτικό υλικό (για τη μείωση της επιφανειακής τάσης στα φύλλα) και τα φυτά να μεταφερθούν σε περιβάλλον κορεσμένο υγρασίας. Αυτό γιατί τα βακτήρια απαιτούν υψηλά ποσοστά υγρασίας ώστε να διεισδύσουν στον αποπλαστικό χώρο μέσω των στομάτων των φύλλων.

Φυλογενετική ανάλυση και κατασκευή δέντρων γενετικών αποστάσεων

Η φυλογενετική ανάλυση και η κατασκευή δέντρων φυλογενετικών αποστάσεων πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα *MEGA4 (MEGA 4.0.1)* (Tamura et. al. 2007) το οποίο κυκλοφορεί ως ελεύθερο λογισμικό στο διαδίκτυο.

Βιβλιογραφία

Abramovitch RB, Kim YJ, Chen S, Dickman MB, Martin GB. (2003). *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J.* 22:60–69.

Abramovitch RB, Martin GB. (2005). AvrPtoB: A bacterial type III effector that both elicits and suppresses programmed cell death associated with plant immunity. *FEMS Microbiology Letters* 245, pp: 1–8.

Alfano JR and Collmer A. (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: Trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J. Bacteriol.* 179, pp: 5655-5662.

Alfano JR, Charkowski AO, Deng WL, Badel JL, Petnicki-Ocwieja T, et al. (2000). The *Pseudomonas syringae* hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4856–61.

Axtell MJ, Chisholm ST, Dahlbeck D, Staskawicz BJ. (2003a). Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Mol. Microbiol.* 49:1537–466.

Axtell MJ, Staskawicz BJ. (2003b). Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* 112:369–77.

Bai J, Choi SH, Ponciano G, Leung H, Leach JE. (2000). *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13:1322–29.

Berks BC, Palmer T and Sargent F. (2003). The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. *Adv. Microb. Physiol.* Vol. 47, pp. 187–254.

Bestwick CS, Bennett MH, Mansfield JW. (1995). Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in lettuce. *Plant. Physiol.* 108:503–16.

Bingle LE, Bailey CM, Pallen MJ. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol*, 11(1) pp: 3-8.

Binet R, Letoffe S, Ghigo JM, Delepelaire P, and Wandersman C. (1997). Protein secretion by gram-negative bacterial ABC exporters. *Folia Microbiol.* (Prague) Vol. 42, pp. 179–183.

Bladergroen MR, Badelt K, Spink HP. (2003). Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. *Mol Plant Microbe Interact*, 16 pp:53-64.

- Blanc-Potard A-B and Groisman EA. (1997). The Salmonella selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J.* 17, pp: 5376–5385.
- Block A, Li G, Fu ZQ and Alfano JR. (2008). Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr. Op. in Plant Biol.*, 11 pp:396–403.
- Brown I, Mansfield J, Bonas U. (1995). Hrp genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* determine ability to suppress papilla deposition in pepper mesophyll cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8:825–36.
- Buttner D and Bonas U. (2002). Getting across—Bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 21:5313-5322.
- Buttner D and Bonas U. (2003). Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, pp. 312–319.
- Cascales E. (2008). The type VI secretion toolkit. *EMBO reports*, 9(8) pp: 735-741.
- Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R and Covacci A. (1996). Cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease associated virulence factors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 93, pp: 14648–14653.
- Chang JH, Urbach JM, Law TF, Arnold LW, Hu A, Gombar S, Grant SR, Ausubel FM and Dangl JL. (2005). A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:2549-2554.
- Chatterjee A, Cui Y and Chatterjee AK. (2002). Regulation of *Erwinia carotovora* hrpL (Ecc) (sigma-L(Ecc)), which encodes an extracytoplasmic function subfamily of sigma factor required for expression of the HRP regulon. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:971-980.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B and Staskawicz BJ. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* 124, 803–814.
- Cornelis GR. (2006). The type III secretion injectisome. *Nature Rev. Microb.* Vol. 4, 811-825.
- Cunnac S, Boucher C and Genin S. (2004a). Characterization of the cisacting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* 186:2309-2318.
- Cunnac S, Occhialini A, Barberis P, Boucher C and Genin S. (2004b). Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: Identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Mol. Microbiol.* 53:115-128.
- Cunnac S, Lindeberg M and Collmer A. (2009). Pseudomonas syringae type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Current Opinion in Microbiology*, 12 pp:53–60.

Βιβλιογραφία

- da Cunha L, Sreerekha M-V and Mackey D. (2007). Defense suppression by virulence effectors of bacterial phytopathogens. *Curr. Opin.Plant Biol.*, 10 pp: 349–357.
- da Silva AC, et. al. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417:459-463.
- Das S & Chaudhuri K. (2003). Identification of a unique IAHP (IcmF associated homologous proteins) cluster in *Vibrio cholerae* and other proteobacteria through in silico analysis. *In Silico Biol.* Vol. 3, pp. 287–300.
- DebRoy S, Thilmony R, Kwack YB, Nomura K, He SY. (2004). A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:9927–32.
- Ding Z, Atmakuri K and Christie PJ. (2003). The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates. *Trends Microbiol.* Vol. 11, pp. 527–535.
- Durrant WE, Dong X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:185–209.
- Economou A, Christie PJ, Fernandez RC, Palmer T, Plano GV and Pugsley AP. (2008). Secretion by numbers: protein traffic in prokaryotes. *Mol. Microb.*, Vol. 62(2), pp. 308–319.
- Ellis C, Karafyllidis I, Turner JG. (2002). Constitutive activation of jasmonate signaling in an *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15:1025–30.
- Falk A, Feys BJ, Frost LN, Jones JDG, Daniels MJ, Parker JE. (1999). EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3292–97.
- Fields KA, Plano GV & Straley SC. (1994). A low-Ca²⁺ response (LCR) secretion (*ysc*) locus lies within the *lcrB* region of the LCR plasmid in *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 176, 569–579.
- Filloux A, Hachani A and Bleves S. (2008). The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, Vol. 154, pp. 1570–1583.
- Fouts DE, Abramovitch RB, Alfano JR, Baldo AM, Buell CR, Cartinhour S, Chatterjee AK, D’Ascenzo M, Gwinn ML, Lazarowitz SG, Lin NC, Martin GB, Rehm AH, Schneider DJ, van Dijk K, Tang X and Collmer A. (2002). Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:2275–2280.
- Frederick RD, Ahmad M, Majerczak DR, Arroyo-Rodriguez AS, Manulis S and Coplin DL. (2001). Genetic organization of the *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* *hrp* gene cluster and sequence analysis of the *hrpA*, *hrpC*, *hrpN*, and *wtsE* operons. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:1213-1222.

- Genin S, Gough CL, Zischek C and Boucher CA. (1992). Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Microbiol.* 6:3065-3076.
- Glazebrook J, Chen W, Estes B, Chang HS, Nawrath C, et al. (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J.* 34:217–28.
- Greenberg JT, Guo A, Klessig DF, Ausubel FM. (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77:551–63.
- Grimm C, Aufsatz W and Panopoulos NJ. (1995). The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* constitutes a complex regulatory unit. *Mol. Microbiol.* 15:155-165.
- Gophna U, Ron EZ & Graur D. (2003). Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene*, 312, 151–163.
- Gurlebeck D, Thieme F, Bonas U. (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J Plant Physiol.*, 163 pp:233-255.
- Hacker J, Bender L, Ott M, Wingender J, Lund B, Marre R and Goebel W. (1990). Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extra intestinal *Escherichia coli* isolates. *Micro. Path.* 8, 213–225.
- Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I and Tschäpe H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* 23, 1089–1097.
- Hauck P, Thilmony R, He SY. (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8577–82.
- He SY, Qiaoling J. (2003). The Hrp Pilus: learning from flagella. *Curr. Opin. in Micr.*, 6:15-19.
- He P, Chintamanani S, Chen Z, Zhu L, Kunkel BN, et al. (2004). Activation of a COI1-dependent pathway in *Arabidopsis* by *Pseudomonas syringae* type III effectors and coronatine. *Plant J.* 37:589–602.
- Hotson A, Chosed R, Shu H, Orth K, Mudgett MB. (2003). *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol Microbiol.*, 50 pp:377-389.
- Hueck CJ. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Vol. 62, pp. 379–433.

Βιβλιογραφία

- Hutcheson SW, Bretz J, Sussan T, Jin S and Pak K. (2001). Enhancer- binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate hrp-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *J. Bacteriol.* 183:5589-5598.
- Jackson RW, Athanassopoulos E, Tsiamis G, Mansfield JW, Sesma A, et al. (1999). Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:10875–80.
- Jakobek JL, Smith JA, Lindgren PB. (1993). Suppression of bean defense responses by *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 5:57–63.
- Jamir Y, Guo M, Oh HS, Petnicki-Ocwieja T, Chen S, et al. (2004). Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J.* 37:554–65.
- Jirage D, Tootle TL, Reuber TL, Frost LN, Feys BJ, et al. (1999). *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13583–88.
- Kachroo P, Shanklin J, Shah J, Whittle EJ, Klessig DF. (2001). A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:9448–53.
- Kamdar HV, Kamoun S and Kado CI. (1993). Restoration of pathogenicity of avirulent *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pathovars by reciprocal complementation with the *hrpXo* and *hrpXc* genes and identification of HrpX function by sequence analyses. *J. Bacteriol.* 175:2017-2025.
- Kang L, Li J, Zhao T, Xiao F, Tang X, et al. (2003). Interplay of the *Arabidopsis* nonhost resistance gene NHO1 with bacterial virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:3519–24.
- Karaolis DKR, Somara S, Maneval DR, Johnson JA and Kaper JB. (1999). A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature*, 399, pp: 375–379.
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G, Bonas U.(2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318 pp:648-651.
- Kay S and Bonas U. (2009).How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Current Opinion in Microbiology*, 12 pp:37–43.
- Kelman A. (1954). The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 64:693-695.
- Keshavarzi M, Soylu S, Brown I, Bonas U, Nicole M, et al. (2004). Basal defenses induced in pepper by lipopolysaccharides are suppressed by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 17:805–15.

- Kim JG, Taylor KW, Hotson A, Keegan M, Schmelz EA, Mudgett MB. (2008). XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in *Xanthomonas*-infected tomato leaves. *Plant Cell*, 20 pp: 1915-1929.
- Kim YJ, Lin NC, Martin GB. (2002). Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell* 109:589–98.
- King EO, Ward MK, Raney DE. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. - *J. Lab. Clin. Med.*, 44; 301-307.
- Kloek AP, Verbsky ML, Sharma SB, Schoelz JE, Vogel J, et al. (2001). Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant J.* 26:509–22.
- Kostakioti M., Newman CL, Thanassi DG and Stathopoulos C. (2005). Mechanisms of Protein Export across the Bacterial Outer Membrane. *J. of Bacter.* p. 4306–4314.
- Kubori T. et al. (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*, 280, 602–605.
- Kunkel BN, Brooks DM. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:325–31.
- Lam E. (2004). Controlled cell death, plant survival and development. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5:305–15.
- Lan L, Deng X, Zhou J and Tang X. (2006). Genome-wide gene expression analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 reveals overlapping and distinct pathways regulated by *hrpL* and *hrpRS*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:976-987.
- Lawrence J, Roth J. (1996). Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics*, 143, 1843-1860.
- Leach JE, Vera Cruz CM, Bai J, Leung H. (2001). Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:187–224.
- Lindgren PB, Peet RC and Panopoulos NJ. (1986). Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity on bean and hypersensitivity on non-host plants. *J. Bacteriol.* 168: 512-522.
- Liu H, Coulthurst SJ, Pritchard L, Hedley PE, Ravensdale M, Humphris S, Burr T, Takle G, Brurberg MB, Birch PR, et al. (2008). Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS pathogens*, 4(6):e1000093.
- Loper JE and Lindow SE. (1987). Lack of evidence for *in situ* fluorescent pigment production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean leaf surfaces. *Phytopathology* 77 pp: 1449–1454.

- Losada L, Sussan T, Pak K, Zeyad S, Rozenbaum I and Hutcheson SW. (2004). Identification of a novel *Pseudomonas syringae* Psy61 effector with virulence and avirulence functions by a HrpL-dependent promoter-trap assay. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:254-262.
- Lu M, Tang X, Zhou JM. (2001). *Arabidopsis* NHO1 is required for general resistance against *Pseudomonas* bacteria. *Plant Cell* 13:437-47.
- Mackey D, Belkhadir Y, Alonso JM, Ecker JR, Dangl JL. (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* 112:379-89.
- Mackey D, Holt BF, Wiig A, Dangl JL. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108:743-54.
- Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ, Cameron RK. (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 419:399-403.
- Marco ML, Legac J and Lindow SE. (2005). *Pseudomonas syringae* genes induced during colonization of leaf surfaces. *Envir. Microbiol.* 7 (9), pp: 1379-1391.
- Marois E, Van den Ackerveken G, Bonas U. (2002). The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 15:637-46.
- Merighi M, Majerczak DR, Stover EH and Coplin DL. (2003). The HrpX/HrpY two-component system activates hrpS expression, the first step in the regulatory cascade controlling the Hrp regulon in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:238-248.
- Michiels T, Vanooteghem JC, de Rouvroit CL, China B, Gustin A, et al. (1991). Analysis of virC, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 173:4994-5009.
- Mota LJ & Cornelis GR. (2005). The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann. Med.* 37, 234-249.
- Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL, Joachimiak G, Ordonez CL, Lory S, Walz T, Joachimiak A, Mekalanos JJ. (2006). A Virulence Locus of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes a Protein Secretion Apparatus. *Science*, Vol. 312, pp: 1526-1530.
- Mudgett MB, Staskawicz BJ. (1999). Characterization of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* AvrRpt2 protein: demonstration of secretion and processing during bacterial pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 32:927-41.
- Mudgett MB. (2005). New Insights to the Function of Phytopathogenic Bacterial Type III Effectors in Plants *Annu. Rev. Plant Biol.* 56 pp: 509-31.

- Mukaihara T, Tamura N, Murata Y and Iwabuchi M. (2004). Genetic screening of Hrp type III-related pathogenicity genes controlled by the HrpB transcriptional activator in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* 54:863-875.
- Nissan G, Manulis S, Weinthal DM, Sessa G and Barash I. (2005). Analysis of promoters recognized by HrpL, an alternative sigma-factor protein from *Pantoea agglomerans* pv. *gypsophylae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:634-643.
- Nissan G, Manulis-Sasson S, Weinthal D, Mor H, Sessa G, Barash I. (2006). The type III effectors HsvG and HsvB of gall-forming *Pantoea agglomerans* determine host specificity and function as transcriptional activators. *Mol Microbiol*, 61 pp:1118-1131.
- Nizan-Koren R, Manulis S, Mor H, Iraki NM and Barash I. (2003). The regulatory cascade that activates the Hrp regulon in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:249-260.
- Noel L, Thieme F, Nennstiel D and Bonas U. (2001). cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Microbiol.* 41:1271-1281.
- Occhialini A, Cunnac S, Reymond N, Genin S and Boucher C. (2005). Genome-wide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB* gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:938-949.
- Pedley KF, Martin GB. (2003). Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:215-43.
- Perry KL and Kado CI. (1982). Characteristics of Ti plasmids from broad-host-range and ecologically specific biotype 2 and 3 strains for *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 151: 343-350.
- Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(39) pp:15508-15513.
- Pukatzki S, McAuley SB and Miyata ST. (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Current Opinion in Microbiology*, 12 pp: 11-17.
- Rahme LG, Ausubel FM, Cao H, Drenkard E, Goumnerov BC, Lau GW, Mahajan-Miklos S, Plotnikova J, Tan MW, Tsongalis J, Walendziewicz CL, Tompkins RG. (2002). Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 97, pp. 8815-8821.
- Rakin A, Noelting C, Schropp P and Heesemann J. (2001). Integrative module of the high-pathogenicity island of *Yesinia*. *Mol. Microbiol.* 39, 407-415.
- Reuber TL, Ausubel FM. (1996). Isolation of *Arabidopsis* genes that differentiate between resistance responses mediated by the *RPS2* and *RPM1* disease resistance genes. *Plant Cell* 8:241-49.

Βιβλιογραφία

- Ritter C, Dangl JL. (1996). Interference between two specific pathogen recognition events mediated by distinct plant disease resistance genes. *Plant Cell* 8:251–57.
- Romer P, Hahn S, Jordan T, Strauß T, Bonas U, Lahaye T. (2007). Plant–pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science*, 318:645-648.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Vol-1*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 1.24–1.34.
- Shrivastava S, Mande SS. (2008). Identification and functional characterization of gene components of Type VI secretion system in bacterial genomes. *PLoS ONE*, 3(8) pp: e2955.
- Sneath PHA & Sokal RR. (1973). *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.
- Stathopoulos C, Hendrixson DR, Thanassi DG, Hultgren SJ, Geme III JW St and Curtiss III R. (2000). Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens: an evolving story. *Microbes Infect*. Vol. 2, pp. 1061–1072.
- Swarup S, De Feyter R, Brlansky RH, Gabriel DW. (1991). A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *Xanthomonas campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Phytopathology* 81:802–9.
- Szurek B, Marois E, Bonas U, Van den Ackerveken G. (2001). Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J*. 26:523–34.
- Szurek B, Rossier O, Hause G, Bonas U. (2002). Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol. Microbiol*. 46:13–23.
- Tampakaki AP, Panopoulos NJ. (2000). Elicitation of hypersensitive cell death by extracellularly targeted HrpZPspH produced in planta. *Mol Plant Microbe Interact* 13(12) pp: 1366-74.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, pp: 1596-1599.
- Tang X, Xiao Y and Zhou J-M. (2006). Regulation of the Type III Secretion System in Phytopathogenic Bacteria. *MPMI*, Vol. 19, No. 11, pp: 1159–1166.
- Thieme F, et. al. (2005). Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J. Bacteriol*. 187:7254-7266.
- Tsiamis G, Mansfield JW, Hockenhull R, Jackson RW, Sesma A, et al. (2000). Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in

- Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO J.* 19:3204–14.
- Tsuge S, Terashima S, Furutani A, Ochiai H, Oku T, Tsuno K, Kaku H and Kubo Y. (2005). Effects on promoter activity of base substitutions in the cis-acting regulatory element of HrpXo regulons in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J. Bacteriol.* 187:2308-2314.
- Van Gijsegem F. et. al. (1995). The hrp gene 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, pp: 1095–1114.
- Van den Ackerveken G, Marois E, Bonas U. (1996). Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell* 87:1307–16.
- Vinatzer BA, Teitzel GM, Lee MW, Jelenska J, Hotton S, Fairfax K, Jenrette J and Greenberg JT. (2006). The type III effector repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and its role in survival and disease on host and non-host plants. *Mol. Microbiol.* 62 pp:26–44.
- Voulhoux R, Ball G, Ize B, Vasil ML, Lazdunski A, Wu LF and Filloux A. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J.* Vol. 20, pp. 6735–6741.
- Wei ZM and Beer SV. (1995). *hrpL* activates *Erwinia amylovora hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *J. Bacteriol.* 177 pp: 6201-6210.
- Wei Z, Kim JF and Beer S. V. (2000). Regulation of *hrp* genes and type III protein secretion in *Erwinia amylovora* by HrpX/HrpY, a novel two-component system, and HrpS. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:1251-1262.
- Wengelnik K and Bonas U. (1996). HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 178:3462-3469.
- Woestyn S, Allaoui A, Wattiau P & Cornelis GR. (1994). YscN, the putative energizer of the *Yersinia Yop* secretion machinery. *J. Bacteriol.* 176, 1561–1569.
- Wu HY, Chung PC, Shih HW, Wen SR, Lai EM. (2008). Secretome analysis uncovers an Hcp-family protein secreted via a type VI secretion system in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 2008, 190(8), pp: 2841-2850.
- Xiao Y, Heu S, Yi J, Lu Y and Hutcheson SW. (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.
- Yang B, Zhu W, Johnson LB, White FF. (2000). The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent nuclear-

Βιβλιογραφία

- localized double-stranded DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:9807–12.
- Yang Y, Gabriel DW. (1995). *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 8:627–31.
- Yang Y, Yuan Q, Gabriel DW. (1996). Watersoaking function(s) of XcmH1005 are redundantly encoded by members of the *Xanthomonas avr/pth* gene family. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 9:105–13.
- Young GM, Schmiel DH & Miller VL. (1999). A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96, 6456–6461.
- Zhao Y, Thilmony R, Bender CL, Schaller A, He SY, Howe GA. (2003). Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant J.* 36:485–99.
- Zhu W, Yang B, Chittoor JM, Johnson LB, White FF. (1998). AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 11:824–32.
- Zuckerkindl E & Pauling L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins, pp. 97-166 in *Evolving Genes and Proteins*, edited by V. Bryson and H.J. Vogel. Academic Press, New York.
- Zwiesler-Vollick J, Plovanich-Jones AE, Nomura K, Bandyopadhyay S, Joardar V, Kunkel BN and He SY. (2002). Identification of novel *hrp*-regulated genes through functional genomic analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 genome. *Mol. Microbiol.* 45:1207-1218.

Κεφάλαιο 2^ο

Στο 2ο κεφάλαιο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την μελέτη της επίδρασης των τύπου III εκκρινόμενων πρωτεϊνών παθογένειας (TZEPs) στο μηχανισμό σίγησης των κυττάρων του φυτού ξενιστή. Αρχικά δίνεται μια μικρή εισαγωγή σχετικά με τους μηχανισμούς γονιδιακής σίγησης στα φυτά. Στην συνέχεια παρουσιάζονται τα πειραματικά δεδομένα και τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή καθώς και η σχετική βιβλιογραφία.

Μελέτη της επιρροής των τύπου III εκκρινόμενων πρωτεϊνών παθογένειας των φυτοπαθογόνων βακτηρίων στον μηχανισμό γονιδιακής σίγησης των φυτών ξενιστών

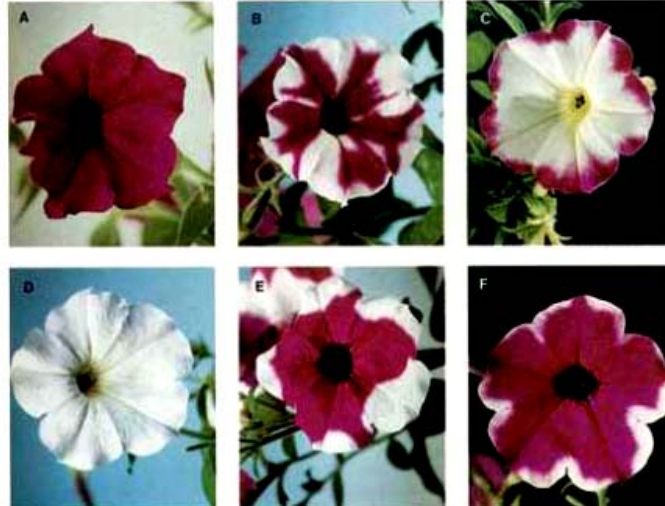
Εισαγωγή: Θεωρητικό υπόβαθρο

Η RNA επαγόμενη γονιδιακή σίγηση είναι ένας RNA-καθοδηγούμενος, μετά-μεταγραφικός μηχανισμός ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, από τους μύκητες έως τα ζώα. Ο όρος «RNA επαγόμενη γονιδιακή σίγηση» αναφέρεται συλλογικά σε ποικίλες RNA-εξαρτώμενες διαδικασίες που έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή της γονιδιακής έκφρασης. Ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης εκτός από τα μετά-μεταφραστικά επίπεδα (*Post Transcriptional Gene Silencing-PTGS*) μπορεί να δράσει και σε επίπεδο χρωματίνης, προκαλώντας την τροποποίηση της (*Transcriptional Gene Silencing- TGS*) (Brodersen and Voinnet, 2006).

Η πρώτη αναφορά στην γονιδιακή σίγηση χρονολογείται το 1990, όταν δύο ομάδες προσπάθησαν να υπερεκφράσουν ένα ένζυμο βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών με σκοπό την παραγωγή μωβ ανθέων σε φυτά πετούνιας. Αντί αυτού, τα αναμενόμενα μωβ άνθη ήταν λευκά (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990) (Εικ. 1). Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε «συν-καταστολή» και θεωρήθηκε αποτέλεσμα της συνεργιστικής δράσης τόσο του διαγονιδίου όσο και του αντίστοιχου ενδογενούς γονιδίου, με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης και των δύο

Εισαγωγή

Ο όρος *RNA* σίγηση περιλαμβάνει ένα σύνολο διαφορετικών διεργασιών που βασίζονται στην δράση διαφόρων ειδών μικρών μη κωδικών *RNAs* (*small RNAs*) που έχουν ως αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης γονιδίων των οποίων η αλληλουχία των *mRNAs* παρουσιάζουν πλήρη ή μερική συμπληρωματικότητα με τα μικρά αυτά *RNAs*.



Εικόνα 1. Καταστολή λόγω υπέρ-έκφρασης, του γονιδίου της συνθάσης της Χαλκόνης (*CHS*), ενζύμου του μονοπατιού βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών, σε άνθη πετούνιας. **A.** Άνθος πετούνιας αγρίου τύπου, **B-F.** Φαινότυποι από διάφορα επίπεδα καταστολής της *CHS*, **D.** φαινότυπος πλήρους καταστολής της *CHS* (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990).

Γενικά το φαινόμενο της *RNA* επαγόμενης γονιδιακής σίγησης (*RNA silencing*) εμφανίζεται να είναι ένας εξελικτικά συντηρημένος μηχανισμός αρνητικής ρύθμισης γονιδίων που εμπλέκεται σε ένα πλήθος σημαντικών βιολογικών φαινομένων σε ευκαρυώτες.

Όπως προαναφέρθηκε, ο μηχανισμός της σίγησης μέσω *RNA* ταξινομείται σε δυο κύριες κατηγορίες, στην μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (*transcriptional gene silencing, TGS*), όπου παρεμποδίζεται η μεταγραφή ενός γονιδίου, και στην μετά-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (*post transcriptional gene silencing, PTGS*), όπου το γονίδιο μεταγράφεται αλλά τα μετάγραφα του γίνονται στόχος συγκεκριμένων μικρών (*small RNAs*) με αποτέλεσμα την αποδόμηση τους (Matzke and Matzke, 2004). Στην συνέχεια θα ασχοληθούμε και θα δούμε εκτενέστερα τη δεύτερη κατηγορία *RNA silencing* την *PTGS*.

Ο γενικός μηχανισμός της *PTGS* περιλαμβάνει τις παρακάτω διαδικασίες:

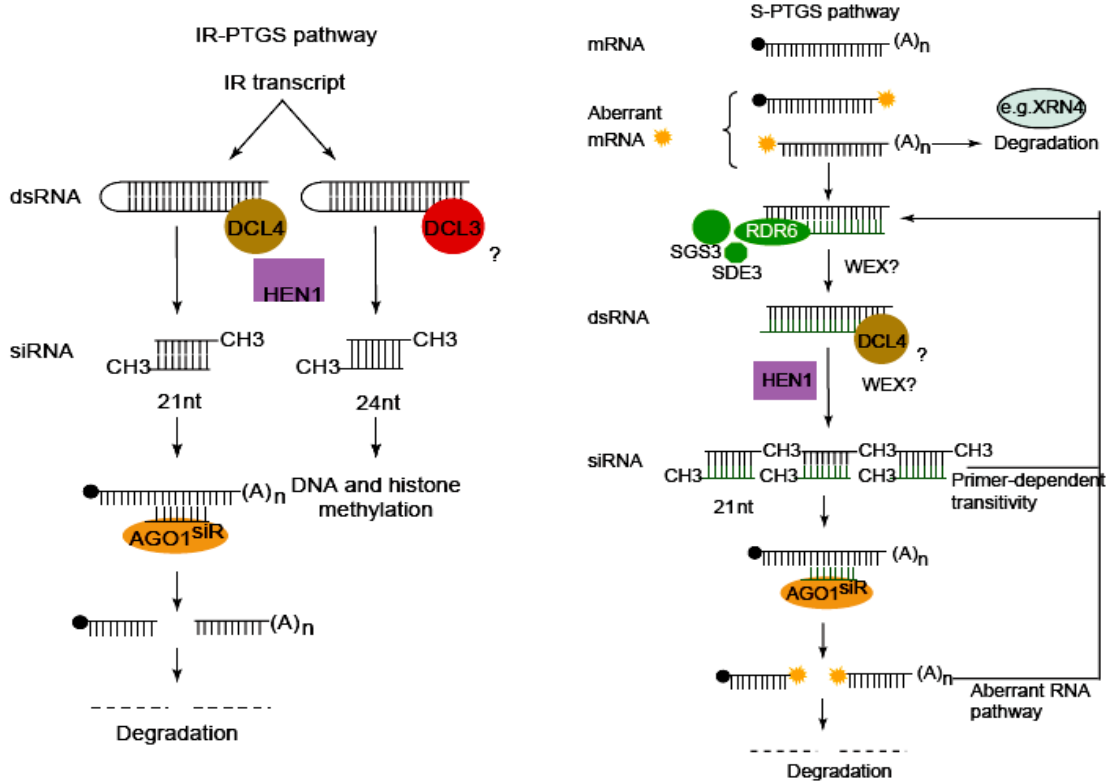
i) Αρχικά λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός ενός δίκλωνου μορίου *RNA*, το οποίο μπορεί να προέρχεται από αντιγραφή ιικού *RNA* (*viral RNA*), τη δράση μεταθετών στοιχείων, τη μεταγραφή γονιδίων ή διαγονιδίων με παλίνδρομες αλληλουχίες (*inverted-repeat transgenes, IR-PTGS*) και την υπερέκφραση διαγονιδίων. Επίσης, η υπερέκφραση

μονόκλωνου *RNA* έχει χαρακτηριστεί ως επαγωγέας του μηχανισμού *S-PTGS* (*sense, S-PTGS*), (Matzke and Matzke, 2004; Brodersen and Voinnet, 2006; Tomari and Zamore, 2006).

ii) Ακολουθεί (στον πυρήνα) μετατροπή του δίκλωνου μορίου *RNA* σε μικρά δίκλιωνα μόρια *RNA* (20-25 νουκλεοτιδίων) τα οποία ονομάζονται μικρά παρεμποδιστικά *RNAs* (*small interference-siRNAs*) (Εικ. 2). Τα προεξέχοντα 3' άκρα (2 νουκλεοτιδίων) των *siRNAs* φέρουν υδροξυλικές ομάδες ενώ στα 5' άκρα φέρουν φωσφορικές ομάδες (Zamore et al., 2001; Tang et al., 2003). Η παραγωγή των *siRNAs* γίνεται μέσω μιας ομάδας ενζύμων των *RNase-III*, καλούμενων ως *Dicers* (Bernstein, et. al. 2001). Τα ένζυμα αυτά εμφανίζονται να φέρουν μία περιοχή πρόσδεσης δίκλωνου *RNA*, μία περιοχή *RNA* ελικάσης, δραστηκότητα *RNA*άσης III και μοτίβα τύπου *PAZ* (*Piwi/Argonaute/Zwille*).

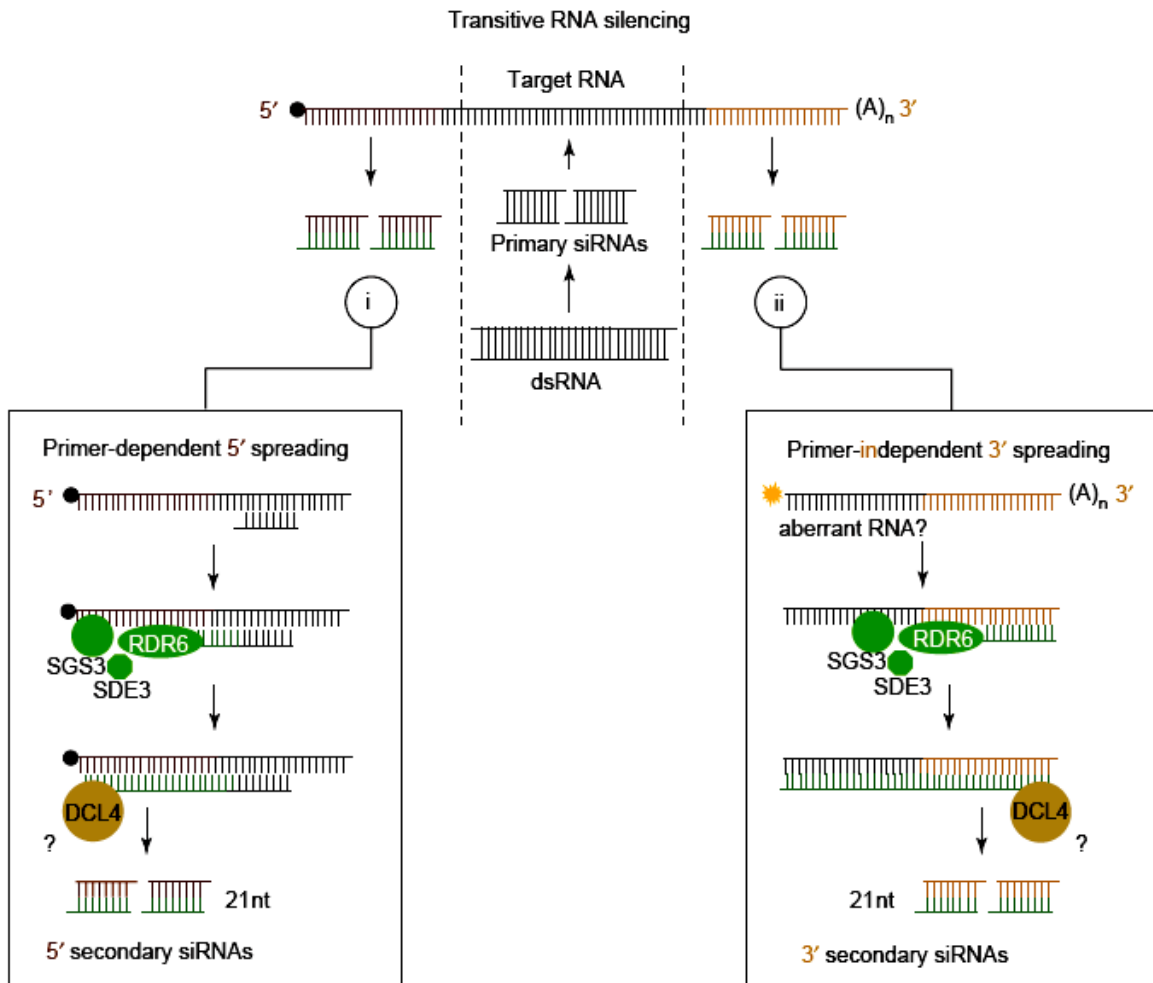
iii) Στην συνέχεια μία από τις δύο αλυσίδες των *siRNA* ενσωματώνεται σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο γνωστό με το ακρωνύμιο *RISC*, (*RNA Induced Silencing Complex*) το οποίο επιτελεί τη μεταφορά, την αποδίπλωση και την ενεργοποίηση των *siRNAs* (Εικ. 2, Εικ. 3). Η δραστηκότητα του συμπλόκου οφείλεται σε μία πρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας των Αργοναυτών (*Argonaute-Agos*). Οι πρωτεΐνες Αργοναύτες έχουν ένα μοτίβο πρόσδεσης μονόκλωνου *RNA* τύπου *PAZ*, καθώς και ένα *PIWI*, μοτίβο που ασκεί ενδονουκλεολυτική (*slicer*) ενεργότητα στους *RNA* στόχους (Liu et al., 2004; Song et al., 2004;). Έτσι, η ενεργοποιημένη *siRNA* αλυσίδα προσδένεται στο *mRNA*-στόχο. Η δέσμευση αυτή αποτελεί το σήμα/εντολή για την ενδονουκλεόλυση του *mRNA*. Η δράση μιας *RNA*-εξαρτώμενης *RNA*-πολυμεράσης (*RdRP*) μπορεί να συμβάλλει σε μερικές περιπτώσεις στον πολλαπλασιασμό του σήματος σίγησης με αντιγραφή των μονόκλωνων *RNA* στόχων προς δίκλιωνα μόρια με απώτερο σκοπό την αύξηση των επιπέδων των *siRNAs* (Tang et al., 2003).

Πέρα των *siRNAs* στην διαδικασία του *PTGS*, τα τελευταία χρόνια έχει δειχτεί ότι συμμετέχουν μερικές ακόμα κατηγορίες *small RNAs* (*miRNAs*, *nat-siRNAs*, *IsiRNAs*, *tasiRNAs*) που κύριος ρόλος τους είναι η καταστολή, μέσω της αποδόμησης, των *mRNA* στόχων.



Εικόνα 2: Το μονοπάτι της IR-PTGS (Brodersen and Voinnet, 2006). Τα IR (*Inverted Repeats*) κατασκευάσματα, που συνήθως χρησιμοποιούνται για την επαγωγή του RNAi στα φυτά, παράγουν δίκλιωνα (*ds*) μεταγράφα τα οποία είναι πλήρως συμπληρωματικά. Δύο διακριτά ένζυμα *Dicer-like* (*DCL*) φαίνεται να ευθύνονται για την παραγωγή των *ds* μεταγράφων. Η *DCL3* πιθανώς παράγει τα *siRNAs* μεγέθους 24 nt, τα οποία κατευθύνονται στο DNA ή επάγουν την τροποποίηση (μεθυλίωση) των ιστονών σε ομόλογους γενετικούς τόπους (**Εικ. 3**). Η *DCL4* είναι πιθανώς το ένζυμο που ευθύνεται για την παραγωγή των 21 nt *siRNAs* από το *dsRNA*. Η μία αλυσίδα των *siRNAs* αυτών ενσωματώνεται στο *AGO1-RISC* σύμπλοκο για να καθοδηγήσει τον ενδονουκλεολυτικό κατακερματισμό (*endonucleolytic cleavage*) του ομόλογου RNA, οδηγώντας στην αποδόμηση του. Και τα δύο είδη *siRNAs* υποβάλλονται σε *HEN1*-μεσολαβούμενη μεθυλίωση σε 3' άκρα τους.

Το μονοπάτι της S-PTGS. Το μονοπάτι παρουσιάζεται εδώ όπως επάγεται από RNAs με παρεκκλίνοντα (*aberrant*) χαρακτηριστικά, αν και μπορεί να υπάρξουν και εναλλακτικοί επαγωγείς. Ως *aberrant RNAs* θα μπορούσαν να εκληφθούν μόρια RNA με έλλειψη της πολυ-(A) ουράς ή με έλλειψη της καλύπτρας (*cap*) στο 5' άκρο. Τα τελευταία θα οδηγούσαν κανονικά στην αποδόμηση του RNA μέσω της δραστηριότητας της 5'-3' εξωνουκλεάσης (*exonuclease*) *XRN4*. Η απουσία όμως της *XRN4* έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση ακάλυπτων (*uncapped*) μορίων *mRNAs*, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο τη μετατροπή τους σε *dsRNAs* από τη συνδυασμένη δράση των παραγόντων RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση-6 (*RDR6*), *SGS3*, *SDE3* και ενδεχομένως του παράγοντα *WEX*. Το *dsRNA* που παράγεται, στην συνέχεια υποβάλλεται σε επεξεργασία από μία *DCL*, πιθανόν την *DCL4*, παράγοντας *siRNAs* αποκλειστικά της κατηγορίας μεγέθους των 21 nt που μεθυλιώνονται από τον παράγοντα *HEN1*. Αυτά τα μόρια μπορούν έπειτα να χρησιμοποιηθούν σε δύο σεντ αντιδράσεων. Κατ' αρχάς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές από την *RDR6* για να ενισχύσουν την παραγωγή *dsRNA* μορίων από τα μονόκλιωνα (*single-stranded*) πρότυπα, μέσω ενός φαινομένου γνωστού ως «μεταβατικότητα» (*transitivity*). Μπορούν επίσης να ενσωματωθούν στο *AGO1-RISC* σύμπλοκο για να καθοδηγήσουν τον ειδικό κατακερματισμό του ομόλογου RNA. Τα προϊόντα που προκύπτουν από τον κατακερματισμό θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως *aberrant RNAs* και έτσι να προωθήσουν την περαιτέρω παραγωγή *dsRNA*, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της αντίδρασης.



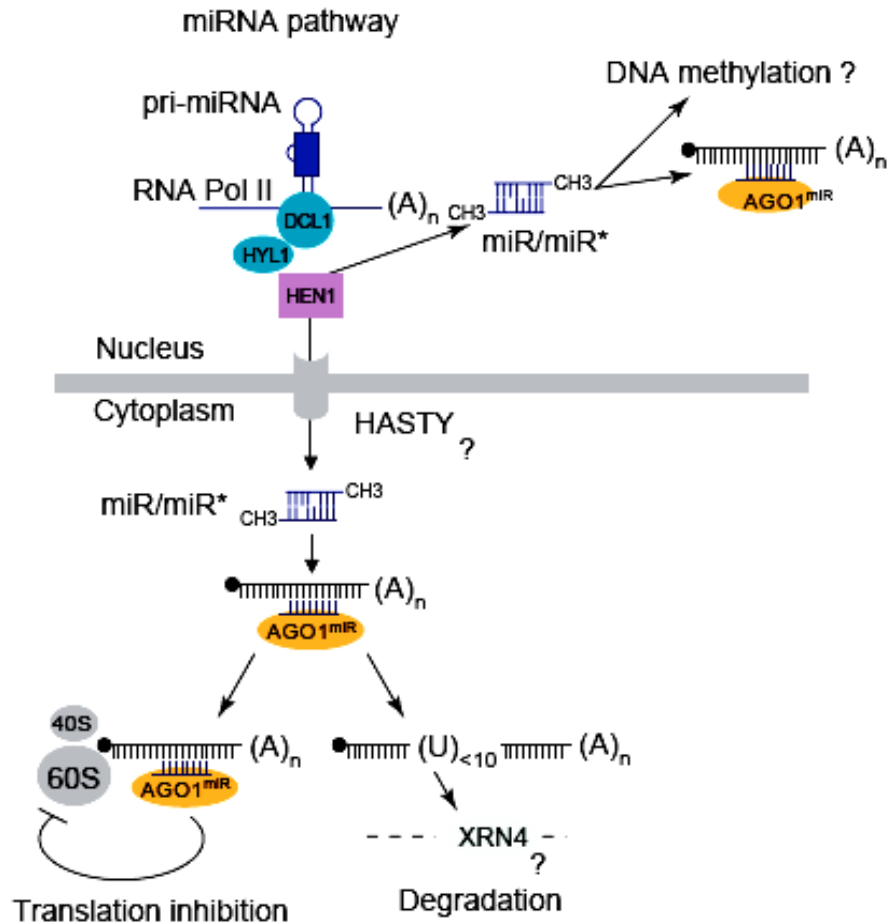
Εικόνα 3. Μεταβατική RNA σίγηση (*Transitive RNA silencing*) (Brodersen and Voinnet, 2006).

Στην μεταβατική RNA σίγηση, ένα *dsRNA*, πηγή των αρχικών *siRNAs*, επάγει την παραγωγή δευτερευόντων *siRNAs* από τα 5' και 3' άκρα του αρχικού τμήματος-στόχου ενός μεταγράφου. Η παραγωγή των 5' δευτερευόντων *siRNAs*: (i) μπορεί να εξηγηθεί από την RDR6/SGS3/SDE3-εξαρτώμενη σύνθεση συμπληρωματικής αλυσίδας που παράγεται με εκκινήτη ένα από τα αρχικά *siRNAs*. Η παραγωγή των 3' δευτερευόντων *siRNAs* (ii) δεν μπορεί να εξηγηθεί από την ύπαρξη εκκινήτων-αρχικών *siRNAs*. Είναι πιθανόν το τεμαχισμένο RNA (αποτέλεσμα του αρχικού *siRNA*-κατευθυνόμενου κατακερματισμού των μεταγράφων) να αναγνωρίζεται ως *aberrant RNA*. Με αυτόν τον τρόπο αρχίζει η σύνθεση *dsRNA* όπως στην *S-PTGS*. Οι 5' και 3' αντιδράσεις δεν πρέπει να θεωρηθούν αποκλειστικές, δεδομένου ότι τα *siRNAs* που παρήχθησαν στο (ii) μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως εκκινήτες στην περαιτέρω σύνθεση *dsRNA*, σύμφωνα με το σχεδιάγραμμα όπως απεικονίζεται στο (i). Η *DCL4* παρουσιάζεται ως πιθανώς εμπλεκόμενη στην βιογένεση των 5' και 3' δευτερευόντων *siRNAs*. Σε αντίθεση από τα αρχικά *siRNAs* (που μπορεί να είναι 21 nt και 24 nt στο μέγεθος), τα δευτερεύοντα *siRNAs* είναι αποκλειστικά της κατηγορίας μεγέθους των 21 nt. Παραμένει ασαφές εάν τα αρχικά *siRNAs* των 24 nt μπορούν να προκαλέσουν *transitive RNA silencing*.

Εισαγωγή

miRNAs: Μια δεύτερη μεγάλη κατηγορία μικρών RNAs, είναι τα *miRNA* (**Εικ. 4**). Αυτά προέρχονται από την επεξεργασία κανονικών μεταγράφων, (από την δράση της RNA πολυμεράσης II), τα οποία εμφανίζουν δευτεροταγείς δομές φουρκέτας (*Parizotto, et. al. 2004*). Η δίκλωνη περιοχή της φουρκέτας περιέχει το *miRNA*, το οποίο απελευθερώνεται με την δράση RNAσών τύπου III. Τα περισσότερα *miRNAs* μεταγράφονται από γενωμικές περιοχές διακριτές από αυτές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και αποτελούν αυτόνομες μεταγραφικές μονάδες. Αυτό αποτελεί κανόνα στην περίπτωση των φυτικών *miRNAs*, (αν και τα μισά από τα ζωικά *miRNA* εντοπίζονται σε ιντρόνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες).

Ο μηχανισμός βιογένεσης και δράσης των *miRNAs* παρουσιάζεται στην εικόνα 4. Η βιογένεση των *miRNAs* στα φυτά διαφέρει από αυτή στα ζώα, ως προς το ότι τα δυο βήματα κοπής λαμβάνουν χώρα στον πυρήνα και καταλύονται από την *DCL1* με την συμμετοχή της *dsRNA* προσδεδεμένης μεθυλοτρανσφεράσης *HYL1*. Η πρωτεΐνη *HASTY*, ομόλογη της εξπορτίνης-5 (*exportin-5*), εξάγει το δίκλωνο *miRNA/miRNA* στο κυτταρόπλασμα όπου ενσωματώνεται στο σύμπλοκο *RISC* (*Jones-Rhoades, et. al. 2006*). Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό των φυτικών *miRNA* είναι το γεγονός ότι μεθυλιώνονται στο 3' άκρο από την πρωτεΐνη *HEN1*. Η μεθυλίωση πιστεύεται ότι προστατεύει τα *miRNAs* από αποικοδόμηση ή βοηθάει την ενσωμάτωσή τους στο *RISC* (*Yu, et. al. 2005*). Μετά την ενσωμάτωση των *miRNAs* στο *RISC*, οδηγούν το σύμπλοκο στον στόχο του με βάση την συμπληρωματικότητα των βάσεων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την κοπή των μεταγράφων-στόχων όπου η συμπληρωματικότητα είναι σχεδόν τέλεια, με αποτέλεσμα την μεταφραστική αναστολή. Ουσιαστικά στα φυτά, τα *miRNAs* δρουν με τρόπο ανάλογο των *siRNAs*, καθώς προκαλούν την κοπή του στόχου τους, με τη διαφορά ότι το μετάγραφο-στόχος δεν είναι ομόλογο της περιοχής από την οποία προέρχονται τα *miRNAs*. Οι στόχοι των *miRNAs* είναι συνήθως μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και τη ρύθμιση φυσιολογικών διεργασιών. Τελευταία, ο *Navarro* και οι συνεργάτες του (*Navarro et. al., 2008*), έδειξαν την συμμετοχή των *miRNAs* σε μηχανισμούς που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών σε προσβολή από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η σημασία της *miRNA*-εξαρτώμενης ρύθμισης γίνεται εμφανής από το γεγονός ότι πολλά *miRNAs*, αλλά και οι στόχοι τους, είναι εξελικτικά συντηρημένα σε διάφορα φυτικά είδη (*Axtel, et. al. 2005*).

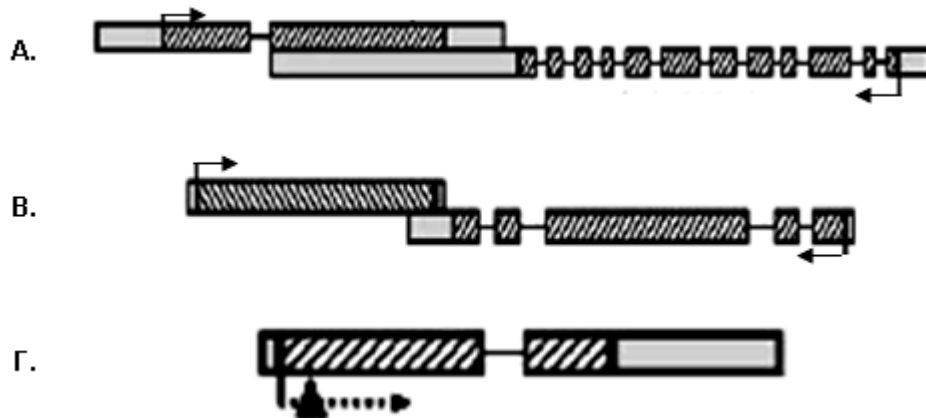


Εικόνα 4. Μονοπάτι βιογένεσης και δράσης των miRNAs (Brodersen and Voinnet, 2006). Τα μετάγραφα των *pri-miRNAs* με τις χαρακτηριστικές δομές (*fold-back structures*) αποτελούν προϊόντα της δράσης της *pol. II*. Η θέση του ώριμου *miRNA* (*miR*) εμφανίζεται στο μπλε πλαίσιο πάνω στο *pri-miRNA*. Η συνδυασμένη πυρηνική δράση των *DCL1*, *HYL1* και *HEN1* έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός ώριμου, μεθυλιωμένου *miRNA*. Κατά την εξαγωγή από τον πυρήνα, που ενδεχομένως πραγματοποιείται με την βοήθεια της πρωτεΐνης *HASTY* (ομόλογη της *exportin-5* της *Arabidopsis*), το ώριμο *miRNA* ενσωματώνεται στο σύμπλοκο *AGO1-RISC* και προωθεί την επαγωγή δύο πιθανών *set* αντιδράσεων. Μια πρώτη αντίδραση (δεξιά) θα οδηγούσε στο ενδονουκλεολυτικό κατακερματισμό του ομόλογου *RNA*, όπως και αυτόν που κατευθύνεται από τα 21nt *siRNAs*. Αυτό θα οδηγούσε σε ένα *poly-uridylated 5'*-άκρο τεμαχισμένου τμήματος - μια τροποποίηση που πιθανόν θα προωθούσε το γρήγορο *turnover* του - και ένα πιο σταθερό τμήμα 3' που θα μπορούσε να υποδομηθεί από την *XRN4* εξωνουκλεάση. Το σχεδιάγραμμα παρουσιάζει επίσης το ενδεχόμενο επίδρασης των ώριμων *miRNAs* σε αλληλουχίες ομόλογες εντός του πυρήνα. Οι ενδο-πυρηνικές δραστηριότητες των ώριμων *miRNAs* περιλαμβάνουν τον κατακερματισμό ομόλογων *RNA* (με ενσωμάτωση σε ένα υποθετικό πυρηνικό *RISC*) καθώς και τη μεθυλίωση του *DNA*. Μια δεύτερη αντίδραση (αριστερά) θα οδηγούσε στην παρεμπόδιση της μετάφρασης, ενδεχομένως στο επίπεδο της έναρξης της διαδικασίας.

nat-siRNAs: Ο Borsani και οι συνεργάτες του (Borsani, et. al. 2005), πρόσφατα ανακάλυψαν μια νέα κατηγορία ενδογενών *siRNAs* που προέρχονται από αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές ενός ζευγαριού φυσικών «αντί-νοηματικών» (*antisense*) αντιγράφων (*NATs*) ενός γονιδίου (Εικ. 5). Στην ίδια μελέτη αναφέρεται η

Εισαγωγή

συμμετοχή των *nat-siRNAs* στην ανθεκτικότητα των φυτών στην αλατότητα. Η ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ του φυτού μοντέλου *Arabidopsis*, μέσω μιας βάσης δεδομένων μικρό-συστοιχιών (*microarrays*), αποκάλυψε ότι σε πολλές περιπτώσεις, ένα αντίγραφο *NAT* ζευγαριού (υπεύθυνου για την παραγωγή *nat-siRNAs*), επάγεται ειδικά υπό ορισμένες αβιοτικές ή βιοτικές καταπονήσεις. Στην *Arabidopsis* έχουν χαρακτηριστεί περισσότερα από 1000 *NATs*. Τα *NATs* ίσως χρησιμεύουν ως μια από τις βασικότερες πηγές ενδογενών *siRNAs* για την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα.



Εικόνα 5. Ο μηχανισμός παραγωγής των *nat-siRNAs* (βασισμένο στο Katiyar-Agarwal *et. al.*, 2006). Παρουσιάζονται τρεις πιθανοί γενετικοί τόποι που μπορούν να παράγουν *nat-siRNAs*. Οι αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές που ευθύνονται για την παραγωγή των *nat-siRNAs* εμφανίζονται με ανοιχτό γκρι χρώμα ενώ η κατεύθυνση μεταγραφής επισημαίνεται με μαύρα βέλη. Ένα επαγόμενο μετάγραφο μπορεί να υβριδίζει με ένα υπάρχον *antisense* μετάγραφο και να προκαλέσει την παραγωγή *nat-siRNA*, με συνέπεια την σίγηση του *antisense* μετάγραφου, της περιοχής παραγωγής του (*cis*) ή άλλων ομόλογων τόπων (*trans*).

***lsiRNAs*:** Η Katiyar-Agarwal και οι συνάδελφοι της (Katiyar-Agarwal, *et. al.* 2007), πρόσφατα προσδιόρισαν μια νέα κατηγορία ενδογενών μικρών *RNAs* μήκους 30-40-nt στην *Arabidopsis*. Αυτά τα μικρά *RNAs* μοιράζονται πολλά κοινά βιοσυνθετικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα με τα γνωστά ενδογενή *nat-siRNAs*, και ονομάζονται *long siRNAs* (*lsiRNAs*) λόγω του μεγέθους τους. Τα *lsiRNAs* που έχουν προσδιοριστεί μέχρι τώρα επάγονται είτε σε μη συμβατές αλληλεπιδράσεις παθογόνου-ξενιστή είτε υπό συγκεκριμένες αναπτυξιακές συνθήκες. Ένα από τα *lsiRNAs*, (*AtlsiRNA-1*) συγκεκριμένα, φαίνεται να επάγεται έντονα μετά από μόλυνση φυτών *Arabidopsis* με το βακτήριο *P. syringae* *pv.* *tomato* (*Pst*) στο οποίο έχει εισαχθεί το γονίδιο *avrRpt2* (Katiyar-Agarwal, *et. al.* 2007) με αποτέλεσμα να είναι «ασύμβατο» παθογόνο.

Εμπλοκή του Μηχανισμού γονιδιακής σίγησης στην άμυνα των φυτών

I. Αμυντικός μηχανισμός έναντι των ιώσεων

Στα φυτά, ο μηχανισμός της γονιδιακής σίγησης (*RNA interference-RNAi*) λειτουργεί ως ανοσοποιητικό σύστημα που κατευθύνεται ενάντια στα ιικά παθογόνα (Baulcombe, 2004). Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από RNA ιούς, μακριά μόρια *dsRNAs* παραγόμενα ως ενδιάμεσα προϊόντα της αντιγραφής των ιικών RNAs, επάγουν τον μηχανισμό της *RNAi*. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή του ιικού *dsRNA* σε λειτουργικά μικρά RNA μόρια μεγέθους 21-22 nt και λίγο μεγαλύτερων 24-26 nt (*small interfering RNAs-siRNA*) (Hamilton, et. al. 2002), μέσω της επίδρασης διαφόρων *Dicer-like (DCLs)* ενζύμων (Tang, et. al. 2003). Σε φυτά *Arabidopsis thaliana*, είναι γνωστές τέσσερις *DCLs*. Από αυτές, η *DCL1* απαιτείται για την βιογένεση των *miRNA* (Εικ. 4), η *DCL2* για την βιογένεση των προερχόμενων από τον ιό *siRNA* (Εικ. 2) και η *DCL3* για την βιογένεση των μακρύτερων *siRNA* (Kurihara and Watanabe, 2004; Xie et. al. 2004). Η μία αλυσίδα των κοντών *siRNA* ενσωματώνεται στο σύμπλοκο *RISC*, και έπειτα το σύμπλοκο *siRNA-RISC* καθίσταται υπεύθυνο για τη διάσπαση του ιικού RNA. Όταν η *RNAi* επάγεται σε ένα μέρος του φυτού ξενιστή, διαδίδεται με τη μορφή σήματος σίγησης από κύτταρο σε κύτταρο και διασυστηματικά (*systemically*), με αποτέλεσμα την πρόκληση *RNAi* σε απομακρυσμένους ιστούς των φυτών ξενιστών. Στην βιβλιογραφία προτείνεται ότι τα κοντά *siRNAs* διαδραματίζουν τον ρόλο του σήματος στη μετακίνηση μεταξύ των κυττάρων (συμπλαστικά) (Himber, et. al. 2003) ενώ τα μακριά *siRNAs* στην διασυστηματική μετακίνησή του σήματος (Hamilton, et. al. 2002). Εάν αυτά τα σήματα διαδοθούν και ο μηχανισμός της *RNAi* καθιερωθεί πριν από μια προερχόμενη ιική μόλυνση, τα ιικά RNAs διασπώνται πριν προλάβουν να πολλαπλασιαστούν στο σημείο της μόλυνσης (Voinnet, et. al. 2000).

Για να καταφέρουν οι ιοί να υπερνικήσουν τους *RNAi*-επαγόμενους μηχανισμούς άμυνας, έχουν αναπτύξει έναν στρατηγικό μηχανισμό αντεπίθεσης ενάντια στην *RNAi*. Πάνω από 20 πρωτεΐνες καταστολείς της *RNAi* (*silencing suppressors*) έχουν προσδιοριστεί σε διάφορους ιούς των φυτών (Moissiard and Voinnet, 2004; Silhavy and Burgyn, 2004) καθώς και σε ιούς που προσβάλλουν ζώα και έντομα όπως ο ιός της γρίπης και ο *Flock house virus* (Li, et. al. 2002, 2004; Lu and Cullen, 2004). Οι καταστολείς αυτοί συνήθως εμπλέκονται στην ιική παθογένεια και την συσσώρευση των ιο-σωματίων στα κύτταρα του ξενιστή. Εντούτοις, οι πρωτεΐνες αυτές δεν έχουν προφανή ομοιότητα στην αλληλουχία τους και είναι φυλογενετικά διακριτές. Αυτό

Εισαγωγή

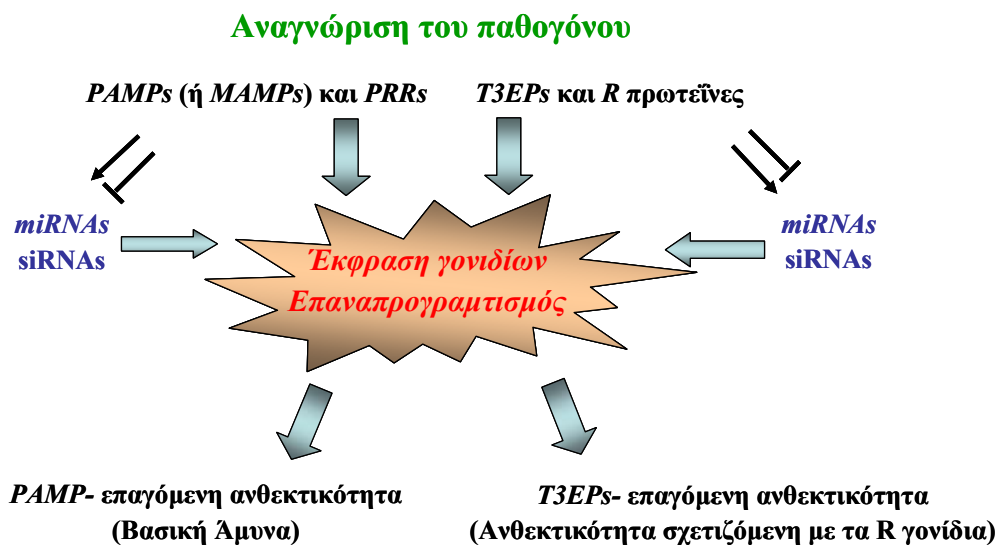
συνιστά ένδειξη ότι οι διάφοροι ιικοί καταστολείς φαίνεται να ενεργούν σε διαφορετικά στάδια του μονοπατιού της *RNAi*.

Ορισμένοι από τους στόχους των ικών *RNAi* καταστολέων (*suppressors*) έχουν προσδιορισθεί και μελετηθεί από διάφορες ερευνητικές ομάδες. Παραδείγματος χάριν, η πρωτεΐνη *p19* των ιών του είδους *Tombusvirus* φαίνεται να δεσμεύει τα δίκλιωνα κοντά (21-24 nt) *siRNAs* με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει την ενσωμάτωσή τους στο σύμπλοκο *RISC* (Vargason, et. al. 2003; Lakatos, et. al. 2004). Ομοίως και η πρωτεΐνη *p21* των ιών του είδους *Closterovirus* έχει τη δυνατότητα να δεσμεύει τα δίκλιωνα *siRNA* μόρια (Chapman, et. al. 2004). Η πρωτεΐνη *NS1*, που κωδικοποιείται από τον ιό της γρίπης (*Influenza virus*), φαίνεται ότι έχει τη δυνατότητα να δεσμεύει μακριά μόρια *dsRNA* καθώς και κοντά δίκλιωνα *siRNA* (Li, et. al. 2004). Το *VAI RNA* των *Αδενοϊών* (*Adenoviruses*) φαίνεται να δεσμεύεται στο σύμπλοκο *Dicer* (Lu and Cullen, 2004). Η πρωτεΐνη *HC-Pro* των *Potyvirus* έχει αναφερθεί ότι παρεμποδίζει τον *DCL*-μεσολαβούμενο κατακερματισμό των μακριών *dsRNA* μορίων (Dunoyer, et. al. 2004) καθώς και το *RISC*-μεσολαβούμενο κατακερματισμό του *mRNA* παρεμποδίζοντας την αποδίπλωση των δίκλωνων *miRNA* και *siRNA* (Chapman, et. al. 2004). Η πρωτεΐνη *p25* των *Potexviruses* και η *2b* των *Cucumoviruses*, με την σειρά τους, φαίνεται ότι παρεμποδίζουν τη διασυστηματική μετακίνηση του σιγητικού σήματος (Voinnet, et. al. 2000; Guo and Ding, 2002). Επιπλέον, μερικοί ιικοί *RNAi* καταστολείς, συμπεριλαμβανομένων των *HC-Pro*, *p19* και του *p15* των *Furoviruses*, επιδρούν σε ένα μονοπάτι βιογένεσης των *miRNA* που μοιράζεται κοινά στοιχεία με το μονοπάτι επαγωγής της *RNAi*, με αποτέλεσμα την πρόκληση αναπτυξιακών ανωμαλιών στην *A. thaliana* (Chapman, et. al. 2004; Dunoyer, et. al. 2004). Κατά συνέπεια, ο προσδιορισμός και η ανάλυση των ικών καταστολέων της *RNAi* είναι απαραίτητα όχι μόνο για τη διευκρίνιση των μηχανισμών της ικής μόλυνσης αλλά και για την ανατομία των μονοπατιών επαγωγής της *RNA* διαμεσολαβούμενης γονιδιακής σίγησης, όπως και για την αποσαφήνιση της εμπλοκής του μηχανισμού αυτού στην άμυνα των φυτών.

II. Ενδείξεις συμμετοχής του μηχανισμού σε προσβολή από παθογόνα βακτήρια

Μέχρι πριν μερικά χρόνια υπήρχαν ελάχιστες ενδείξεις για την συμμετοχή του μηχανισμού της *RNA* επαγόμενης γονιδιακής σίγησης (*RNAi*) στις αλληλεπιδράσεις παθογόνων βακτηρίων και φυτών. Πρόσφατες μελέτες όμως έχουν δείξει ότι ο μηχανισμός *RNAi* ίσως αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό στην αλληλεπίδραση των φυτών ξενιστών με τα παθογόνα βακτήρια. όπως προαναφέρθηκε, η *Katiyar-Agarwal*

και οι συνεργάτες της (Katiyar-Agarwal, *et. al.* 2006) παρουσίασαν την ανακάλυψη ενός ενδογενούς *siRNA*, (*nat-siRNAATGB2*), το οποίο φαίνεται να επάγεται ειδικά, σε φυτά *Arabidopsis thaliana*, κατά τη διάρκεια ασύμβατης αλληλεπίδρασης με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* τροποποιημένο να φέρει το *T3SP* γονίδιο *avrRpt2*. Αυτό το *nat-siRNA* φαίνεται να συμβάλλει στην επαγωγή ανθεκτικότητας εξειδικευμένης ως προς την φυλή του παθογόνου (*Race specific resistance*) που προκαλείται από την πρωτεΐνη ανθεκτικότητας *RPS2*. Αυτό επιτυγχάνεται με την καταστολή του γονιδίου *PPRL*, ενός υποθετικού αρνητικού ρυθμιστή της επαγωγής του γονιδίου ανθεκτικότητας *RPS2* (Εικ. 6).



Εικόνα 6. Συσχέτιση των μικρών RNAs με την επαγωγή της άμυνας στα φυτά (βασισμένο στο Jin, 2008). Ορισμένα φυτικά ενδογενή μικρά RNAs (*miRNAs* και *siRNAs*) φαίνεται να υπέρ- ή υπό-εκφράζονται έπειτα από μόλυνση με παθογόνα ή/και έπειτα από την ενεργοποίηση των *R* γονιδίων ή άλλων γονιδίων αμυντικών αποκρίσεων κατά την έκφραση της άμυνας στα φυτά. Αυτά τα μικρά RNAs συμβάλλουν στον επανα-προγραμματισμό της έκφρασης γονιδίων και καθορίζουν με ακρίβεια τις αποκρίσεις ανθεκτικότητας και άμυνας των φυτών.

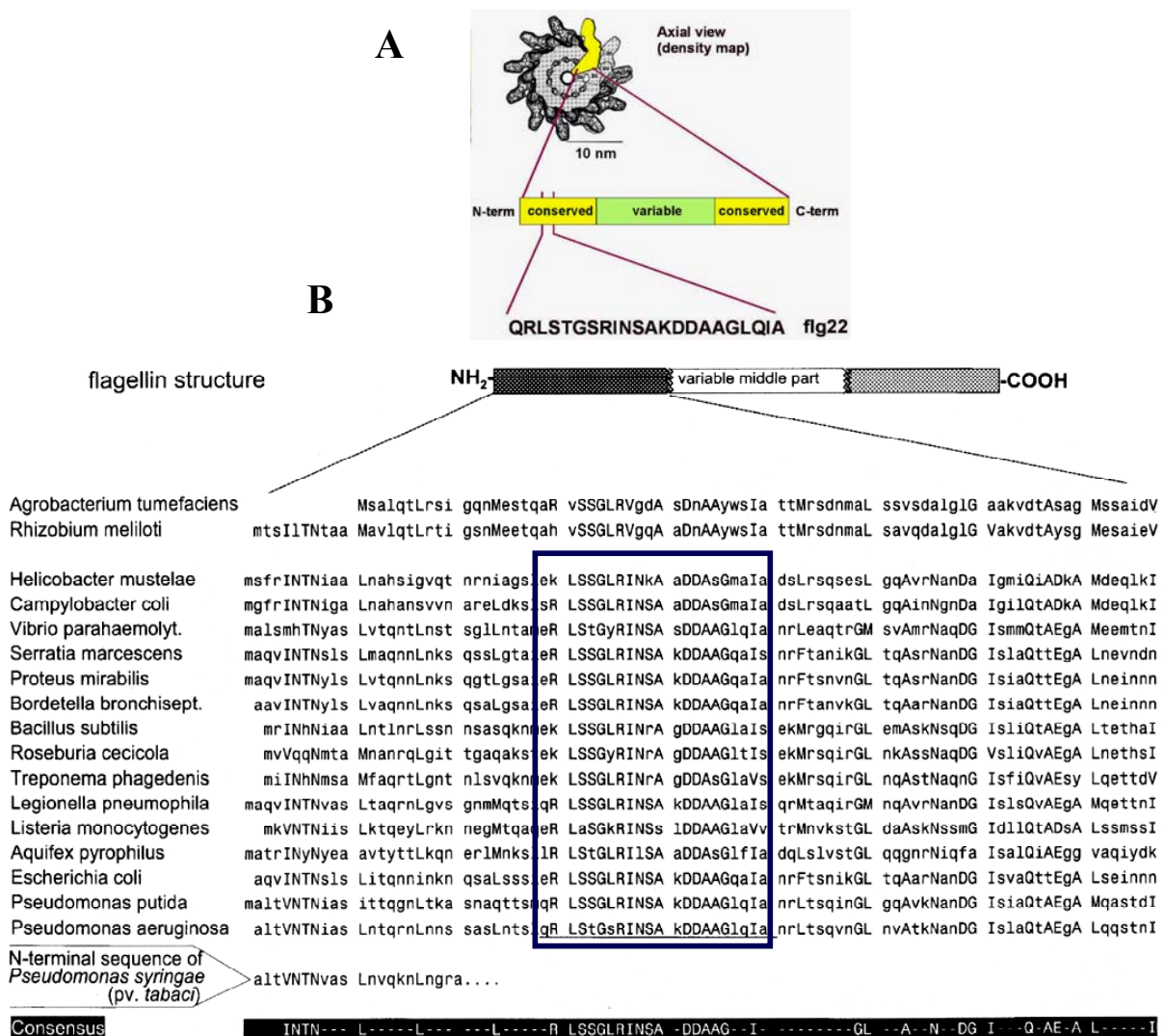
Επιπλέον, ο Navarro και οι συνεργάτες του (Navarro *et. al.*, 2006), δημοσίευσαν την επαγωγή ενός φυτικού *microRNA* (*miR393*), επαγόμενο από την βακτηριακή φλαγγελίνη (*flagellin*), που αποτελεί δομικό συστατικό του βακτηριακού μαστιγίου (Εικ. 7). Η φλαγγελίνη, και πιο συγκεκριμένα ένα τμήμα της, το πεπτίδιο *flg22*, λειτουργεί ως απαγωγέας της βασικής άμυνας σε φυτά *Arabidopsis*. Αυτό το *miRNA* φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά (καταστέλλει) τα *mRNAs* των υποδοχέων *TIR1*, *AFB2*, και *AFB3* της αυξίνης (*auxin*). Το *miR393* επάγεται από το βακτηριακό PAMP (βλέπε κεφάλαιο 1) πεπτίδιο *flg22* σε 20-60 λεπτά μετά την εφαρμογή. Ενώ η έκφραση των στόχων του *miR393*, ο υποδοχέας της αυξίνης *TIR1* (*Transport Inhibitor Response 1*)

Εισαγωγή

και δύο λειτουργικά παράλογα (*paralogs*) του (*AFB2* και *AFB3*), φαίνεται να μειώνονται κατά την παροχή *flg22* σε φυτά. Συστατική υπερέκφραση ενός άλλου παραλόγου του *TIR1* που δεν αποτελεί στόχο του *miR393*, του *AFB1*, σε *tirl-1* μετάλλαγμα της *Arabidopsis*, οδηγεί σε ενισχυμένη ευαισθησία στο παθογόνο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000, ενώ σειρές υπερέκφρασης του *miR393* εμφανίζουν περιορισμένη βακτηριακή ανάπτυξη. Κατά συνέπεια, συμπερασματικά προκύπτει ότι το *miR393* συμβάλλει στην *flg22*-επαγόμενη βασική άμυνα μέσω της στόχευσης των *mRNAs* των υποδοχέων της αυξίνης, με αποτέλεσμα την καταστολή του σήματος της αυξίνης στην *Arabidopsis*. Αυτή η μελέτη έδειξε επίσης ότι η καταστολή του σήματος της αυξίνης περιορίζει την αποπλαστική ανάπτυξη του πληθυσμού του *P. syringae* στην *Arabidopsis*. Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται εμφανής η εμπλοκή της αυξίνης στην ευπάθεια των φυτών στις ασθένειες, καθώς και η *miRNA*-μεσολαβούμενη καταστολή του σινιάλου της αυξίνης στην ανθεκτικότητα στα παθογόνα βακτήρια.

Με τη μελέτη του προφίλ έκφρασης των *small RNAs* σε φύλλα *Arabidopsis*, μία και τρεις ώρες μετά από εμβολιασμό με το μη-παθογόνο μετάλλαγμα *Pst DC3000-DhrcC*, ο *Fahlgren* και οι συνεργάτες του (*Fahlgren et. al. 2007*) προσδιόρισαν τρία *miRNAs*, το *miR393*, το *miR167*, και το *miR160* που εμφανίζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης μετά από τη μόλυνση. Το στέλεχος *Pst DC3000-DhrcC* έχει μια μεταλλαγή στη βασική μηχανή μεταφοράς και έκκρισης των *T3EPs*, στο τύπου *III* σύστημα έκκρισης (*T3SS*). Αυτό το στέλεχος προκαλεί αμυντικές αποκρίσεις επαγόμενες από τα *PAMPs* (*PAMP-triggered immunity, PTI*, βλέπε κεφάλαιο 1) στα φυτά με αποτέλεσμα την ανικανότητα πρόκλησης των συμπτωμάτων της ασθένειας. Κατά τρόπο ενδιαφέροντα και τα τρία *miRNAs* φαίνεται να ρυθμίζουν αρνητικά το μονοπάτι επαγωγής σήματος της αυξίνης είτε με τη στόχευση των γονιδίων των υποδοχέων της αυξίνης είτε των παραγόντων απόκρισης στην αυξίνη. Τα παθο-επαγόμενα αυτά *miRNAs* είναι πιθανό να σιγούν τους αρνητικούς ρυθμιστές των μονοπατιών επαγωγής της ανθεκτικότητας των φυτών. Το *miR825* φαίνεται να καταστέλλεται κατά την μόλυνση με το *Pst DC3000-DhrcC*, ενώ για αυτό έχουν προβλεφθεί τρεις πιθανοί στόχοι, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου της *Remorin*, γονίδιο της οικογένειας *zinc finger homeobox*, και ένα *frataxin*-σχετιζόμενο γονίδιο (*Fahlgren et. al. 2007*). Αυτοί οι προβλεπόμενοι στόχοι του *miR825*, είναι πιθανόν να ρυθμίζονται θετικά κατά την μόλυνση και ίσως ρυθμίζουν θετικά τις αμυντικές αποκρίσεις των φυτών, αν και οι λειτουργίες τους δεν έχουν επιβεβαιωθεί με πειραματικά δεδομένα.

Ο *Dunoyer* και οι συνεργάτες του με μια πρόσφατη εργασία τους (*Dunoyer, et al. 2006*), προτείνουν ότι τα *siRNAs* που αντιστοιχούν στο μεταφερόμενο *T-DNA* των ογκογόνων βακτηρίων του είδους *Agrobacterium tumefaciens*, φαίνεται να συσσωρεύονται στους μολυσμένους από *A. tumefaciens* ιστούς. Έδειξαν επίσης ότι φυτά με ανεπάρκεια στον μηχανισμό της *RNAi* είναι υπερβολικά ευαίσθητα στο *A. tumefaciens*. Στην ίδια εργασία προτείνουν ότι η επιτυχία της μόλυνσης στηρίζεται άμεσα σε ένα ισχυρό αντί-σιγητικό (*anti-silencing*) μηχανισμό που φαίνεται ότι καθιερώνεται στους καρκινικούς όγκους (*crown galls*) και με τον οποίο παρεμποδίζεται η σύνθεση των *siRNA*. Αυτή η παρεμπόδιση φαίνεται να έχει μέτριες (ή καθόλου) παρενέργειες στα μονοπάτια βιογένεσης των *miRNA* και αποδεικνύεται ότι είναι ουσιαστική για την ανάπτυξη των ασθενειών.



Εικόνα 7. Α. Η δομή των ινιδίων φλαγγελίνης σε απεικόνιση κάθετης τομής βακτηριακού μαστιγίου. Β. Συστοίχιση του N-τελικού άκρου της αμινοξικής αλληλουχίας της φλαγγελίνης από διάφορα είδη βακτηρίων (*Felix, et al. 1999*).

Εισαγωγή

Η *Katiyar-Agarwal* και οι συνεργάτες της, σε μια νέα εργασία τους (*Katiyar-Agarwal, et. al. 2007*) προσδιόρισαν μια νέα κατηγορία μικρών *RNAs* στην *Arabidopsis*. Τα μόρια αυτά είναι μακρύτερα (30-40 nt) από τα έως τώρα γνωστά *siRNAs* και για τον λόγο αυτό ονομάστηκαν μακριά *siRNAs* (*long siRNAs-lsiRNAs*) και μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα με τα γνωστά *siRNAs*. Τα *lsiRNAs* φαίνεται να επάγονται από την ασύμβατη αντίδραση φυτών-παθογόνων ή υπό συγκεκριμένες αναπτυξιακές συνθήκες. Στην εργασία της *Katiyar-Agarwal* και των συνεργατών της, αναφέρεται ότι ένα από τα *lsiRNAs*, το *AtlsiRNA-1*, επάγεται συγκεκριμένα σε ασύμβατες αλληλεπιδράσεις του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* που φέρει το γονίδιο *avrRpt2* με φυτά *Arabidopsis*.

Ο *Navarro* και οι συνεργάτες του (*Navarro, et. al. 2008*), δημοσίευσαν πρόσφατα την ικανότητα καταστολής του μονοπατιού βιογένεσης των *miRNAs* από τους βακτηριακούς *T3SPs*. Έχουν προσδιορίσει συγκεκριμένους *T3SPs* του βακτηρίου *P. syringae* που φαίνεται να καταστέλλουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση κάποιων *miRNAs* που σχετίζονται με *PAMP* (*Pathogen Associated Molecular Patterns* βλ. προηγούμενο κεφάλαιο) ή την βιογένεση των *miRNA*. Προτείνουν ότι τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν στοιχεία για την εξέλιξη βακτηριακών μηχανισμών που σκοπό έχουν την καταστολή του μηχανισμού της *RNA* επαγόμενης γονιδιακής σίγησης, με αποτέλεσμα την πρόκληση ασθενειών.

Τέλος, σε μια πρόσφατη εργασία της, η *Ellendorff* και οι συνεργάτες της (*Ellendorff, et. al. 2009*), δημοσίευσαν ενδείξεις για το ότι η γονιδιακή σίγηση διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην άμυνα των φυτών ενάντια σε πολυκύτταρα μικροβιακά παθογόνα όπως οι μύκητες που προσβάλλουν τα αγγεία του ριζικού συστήματος και ανήκουν στο γένος *Verticillium dahliae*. Στην μελέτη αυτή εξετάζονται διάφοροι παράγοντες των μονοπατιών επαγωγής της *RNA* εξαρτώμενης σίγησης, σε μεταλλάγματα του φυτού *Arabidopsis*, εκ των οποίων πολλά βρέθηκαν να έχουν επιπτώσεις στην επαγωγή της άμυνας έναντι του *Verticillium dahliae*. Αξιοσημείωτο όμως είναι ότι στην ίδια μελέτη δεν καταγράφεται καμία διαφοροποίηση προς άλλους παθογόνους μύκητες, όπως για παράδειγμα οι *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, και *Plectosphaerella cucumerina*, αλλά ούτε και στο παθογόνο των αδρομυκώσεων *Fusarium oxysporum*. Από τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής γίνεται εμφανές ότι τα μεταλλάγματα γονιδίων που εμπλέκονται στη σίγηση στην *Arabidopsis* φαίνεται να χωρίζονται σε δύο τουλάχιστον ομάδες. Αυτά που εμφανίζουν αυξημένη ευπάθεια στο παθογόνο (*Verticillium dahliae*) έναντι του μάρτυρα (*control*), και σε αυτά που

εμφανίζονται ανθεκτικότερα σε σχέση με τον μάρτυρα. Στην πρώτη ομάδα μεταλλάξεων φαίνεται να ανήκουν τα μεταλλάγματα των παραγόντων που σχετίζονται με την *TGS* (*transcriptional gene silencing*) και την μεθυλίωση του *DNA*, ενώ στην δεύτερη ομάδα ανήκουν μεταλλάγματα του κλασικού *PTGS* (*post-transcriptional gene silencing*). Γίνεται λοιπόν εμφανές ότι το *V. dahliae* χρειάζεται ενεργό τον μηχανισμό του *PTGS* για να μπορέσει να μολύνει επιτυχώς τον ξενιστή του.

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας που παρουσιάζεται στο κεφάλαιο αυτό ήταν η λειτουργική αξιολόγηση βακτηριακών πρωτεϊνών παθογένειας (*T3EPs*) ως προς την επίδραση τους στους μηχανισμούς *RNA* επαγόμενης γονιδιακής σίγησης (*RNA mediated gene silencing*) στα φυτά, και πιο συγκεκριμένα στον μηχανισμό του *PTGS* (*Post transcriptional gene silencing*).

Για τον μέχρι σήμερα εντοπισμό και το λειτουργικό χαρακτηρισμό των γονιδίων που κωδικοποιούν *T3EPs*, βασιζόμαστε σε μια σειρά πειραματικών μεθόδων. Μεταξύ αυτών είναι οι δοκιμές «αμολυσματικότητας», (*avirulence function*) δηλαδή η ικανότητα τους να εμποδίζουν την εκδήλωση της ασθένειας σε επιλεγμένα φυτά ξενιστές όταν μεταφερθούν σε κατάλληλα παθογόνα στελέχη. Εργαλείο για τον εντοπισμό και τον λειτουργικό χαρακτηρισμό τους, αποτελεί επίσης η βιοπληροφορική ανάλυση «*guilt by association*», π.χ. η γειτνίαση με γονίδια που κωδικοποιούν την εκκριτική μηχανή *T3SS* ή πιθανές τσαπερόνες, μεταγραφική ρύθμιση όμοια με εκείνη των δομικών γονιδίων του *T3SS*, παρουσία ειδικών αμινοτελικών αλληλουχιών-σινιάλων για έκκριση μέσω του *T3SS*, τεχνικές μεταλλαξιγένεσης και φαινοτυπικής ανάλυσης «υψηλής διέλευσης» (*high throughput screens*). Τέλος οι βιοδοκιμές έκκρισης/ενδοκυτταρικής μεταφοράς λειτουργικά εξαρτώμενης από το *T3SS*. Οι περισσότεροι από τους *T3EPs* που μελετήσαμε στην παρούσα εργασία έχουν καταδειχτεί με παρόμοιες μεθόδους ως λειτουργικοί *T3EPs* (Πίνακας 2).

Για την μελέτη της επίδρασης των *T3EPs* στον μηχανισμό της *RNA* επαγόμενης γονιδιακής σίγησης συνεργαστήκαμε με το εργαστήριο του Δρ. Κ. Καλαντίδη (Επ. Καθηγητή Αναπτυξιακής Βιολογίας Φυτών, Παν/μίου Κρήτης). Αρχικά δημιουργήσαμε ένα πακέτο από γνωστούς και νέους/πιθανούς *T3EPs*, με σκοπό να μελετήσουμε την επίδραση τους στην σίγηση ενός συγκεκριμένου γονιδίου στόχου, που στην προκειμένη περίπτωση είναι το γονίδιο *reporter* της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (*Green Fluorescent Protein, GFP*). Η λειτουργική μελέτη της επίδρασης των *T3EPs* στον μηχανισμό του *PTGS*, βασίστηκε στην μέθοδο του συν-αγροεμποτισμού και στην

Εισαγωγή

χρήση μια διαγονιδιακής σειράς του φυτού μοντέλου *Nicotiana benthamiana* (σειρά 16C). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήσαμε την *N. benthamiana* 16C η οποία εκφράζει συστατικά το *reporter* γονίδιο της *GFP* (*m4GFP-ER*) υπό το μεταγραφικό έλεγχο του ιικού υποκινητή *35S* του *Cauliflower Mosaic Virus* (*CaMV*) και μια αλληλουχία λήξης της μεταγραφής *Ocs* του γονιδίου της οκτοπίνης, όπως περιγράφονται από τον Ruiz και τους συνεργάτες του (Ruiz, *et. al.* 1998). Η σειρά αυτή παραχωρήθηκε ευγενικά από Prof. Baulcombe, του εργαστηρίου Sainsbury, John Innes Centre, Norwich, UK.

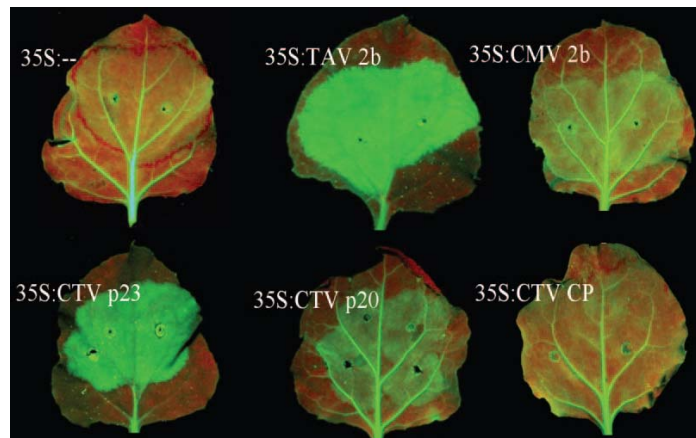
Η επαγωγή του σιγητικού μηχανισμού *PTGS* για την σίγηση του γονιδίου της *GFP* επιτυγχάνεται με παροδική υπερέκφραση του ίδιου γονιδίου στα φύλλα φυτών *N. benthamiana* 16C μέσω αγροεμποτισμού με αγροβακτηριακό στέλεχος που περιέχει το γονίδιο *gfp* σε ειδικά σχεδιασμένη γονιδιακή κασσέτα κλωνοποιημένη σε T1 πλασμίδιο, υπό τον έλεγχο του συστατικού υποκινητή *CaMV-35S*. Η υπερέκφραση της *GFP* (υψηλά ποσοστά *mRNA* στο κυτταρόπλασμα) οδηγεί στην επαγωγή της μετά-μεταγραφικής γονιδιακής σίγησης (*PTGS*) του γονιδίου της *gfp* στην περιοχή του αγροεμποτισμού.

Για την μελέτη της επίδρασης των *T3EPs* στην προ-επαγόμενη *PTGS*, χρησιμοποιήσαμε δύο αγροβακτηριακά στελέχη που είχαν τροποποιηθεί να φέρουν την *m4GFP-ER* (στέλεχος A) και τον εκάστοτε υπό μελέτη *T3EP* (στέλεχος B), αντίστοιχα. Ακολούθησαν πειράματα συν-αγροεμποτισμού με τα δύο αυτά αγροβακτηριακά στελέχη, σε φυτά *N. benthamiana* 16C. Η έκφραση της *m4GFP-ER* στα σημεία του εμποτισμού με το στέλεχος A επάγει την *PTGS* για το γονίδιο της *gfp*, ενώ η έκφραση του εκάστοτε *T3EP* στο ίδιο σημείο, μέσω του στελέχους B, αποκαλύπτει την επίδραση του στον μηχανισμό της προ-επαγόμενης *PTGS*. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος B με άδειο φορέα (χωρίς τον υπό εξέταση *T3EP*). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών όπως περιγράφονται παρακάτω έδειξαν εμφανή επίδραση των *T3EPs* στον μηχανισμό του *PTGS*.

Αποτελέσματα

Όπως προαναφέρεται στην εισαγωγή, για τον εντοπισμό και το λειτουργικό χαρακτηρισμό των γονιδίων που κωδικοποιούν *T3EPs*, σήμερα βασιζόμαστε σε μια σειρά πειραματικών μεθόδων. Στη ενότητα αυτή θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα από την μελέτη της αλληλεπίδραση των *T3EPs* με τους μηχανισμούς γονιδιακής σίγησης του ξενιστή. Η μεθοδολογία της μελέτης αυτής βασίζεται στη χρήση μιας γενετικά τροποποιημένης σειράς του φυτού *Nicotiana benthamiana* (σειρά 16c), η οποία έχει τροποποιηθεί ώστε να εκφράζει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (*Green Fluorescent Protein, GFP*) υπό τον έλεγχο του συστατικού υποκινητή *CaMV-35S*.

Η σειρά αυτή έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς, σε πολλά εργαστήρια, για τη μελέτη του φαινομένου της καταστολής της γονιδιακής σίγησης (*suppression of gene silencing*) από ικές πρωτεΐνες (**Εικ. 8**).

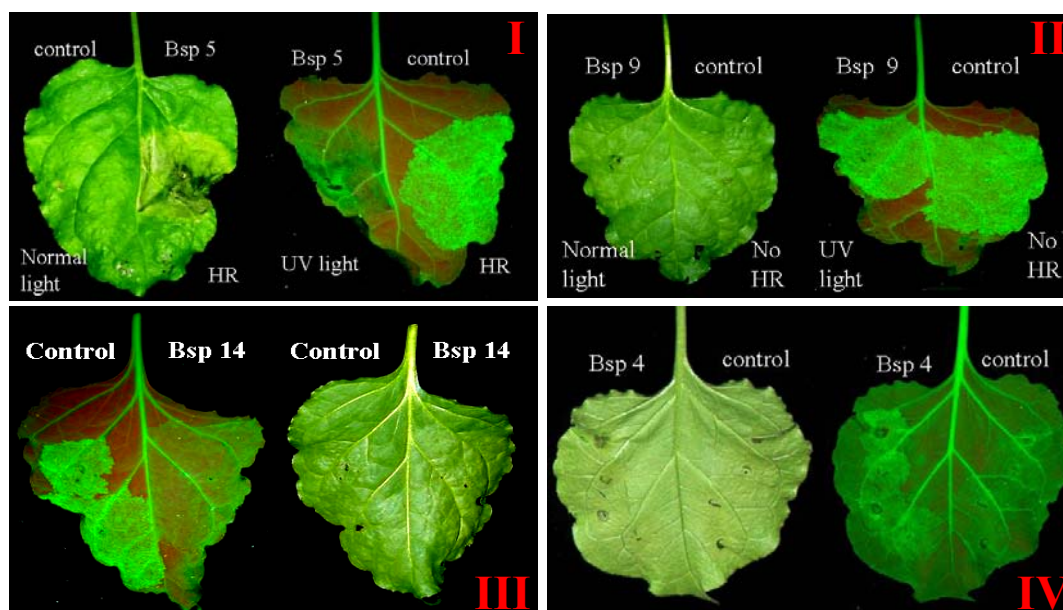


Εικόνα 8. Μελέτη της δράσης των ικών καταστολέων της γονιδιακής σίγησης: *TAV-2b*, *CMV-2b*, *CTV-p23*, και *CTV-p20*. *35S--*: control 1, *CTV-CP*: control 2 (Lu, et. al. 2004).

Η επαγωγή του μηχανισμού σίγησης επιτυγχάνεται με παροδική υπερέκφραση του ίδιου γονιδίου στα φύλλα του φυτού μέσω αγροεμποτισμού με στέλεχος αγροβακτηρίου που περιέχει το γονίδιο *gfp* σε ειδικά σχεδιασμένη γονιδιακή κασσέτα κλωνοποιημένη σε *Ti* πλασμίδιο υπό τον έλεγχο του συστατικού υποκινητή *CaMV-35S*. Η υπερέκφραση της *GFP* συνεπάγεται υψηλά επίπεδα *mRNA* στο κυτταρόπλασμα, το οποίο οδηγεί στην επαγωγή της μετά-μεταγραφικής σίγησης του γονιδίου *gfp* στην περιοχή του αγρό-εμποτισμού.

Από την μελέτη 16 διαφορετικών, γνωστών ή νέων/πιθανών *T3EPs* προέκυψαν τεσσάρων ειδών αποτελέσματα (1) Βακτηριακοί *T3EPs* που έδειξαν αντίδραση υπερευαισθησίας (*HR*), (2) Βακτηριακοί *T3EPs* που δεν επηρεάζουν τη σίγησης της *GFP*, (3) Βακτηριακοί *T3EPs* που φαίνεται ότι ενισχύουν τη σίγηση και (4)

Βακτηριακοί *T3EPs* που φαίνεται ότι αναστέλλουν τη σίγηση της *GFP* (Εικ. 9a, b, πίνακας 1).



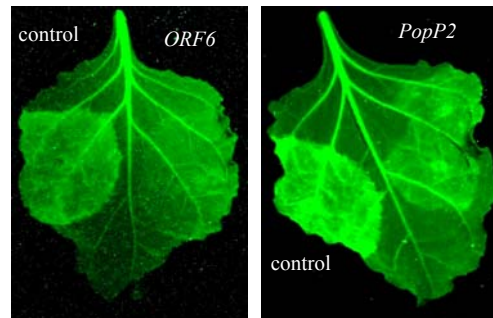
Εικόνα 9a. Δείγματα επίδρασης των *T3EPs* κατά την εκτέλεση των πειραμάτων για την μελέτη της επίδρασης τους στον μηχανισμό του *PTGS*. **I.** *T3EP* ο οποίος προκάλεσε αντίδραση υπερευαισθησίας, **II.** *T3EP* χωρίς εμφανή επίδραση στον μηχανισμό της *PTGS*, **III.** *T3EP* που φαίνεται να ενισχύει το φαινόμενο της *PTGS* της *GFP* και **IV.** *T3EP* φαίνεται ότι αναστέλλει τη σίγηση της *GFP*. *Bsp5*: *HopPtoD2*, *Bsp9*: *HopPtoK*, *Bsp14*: *avrPstF_{ORF2}*, *Bsp4*: *avrRps4*.

	<i>Gene name</i>	<i>Phenotype</i>	<i>Origin</i>
1	<i>AvrPto1</i>	<i>Silencing enhancement</i>	<i>Pst</i> DC3001
2	<i>AvrPtoC2</i>	<i>late HR</i>	<i>Pst</i> DC3001
3	<i>AvrRps4</i>	<i>Silencing suppression</i>	<i>Pspi</i> R3
4	<i>HopPtoD2</i>	<i>HR</i>	<i>Pst</i> DC3001
5	<i>AvrPphE</i>	~control (no phenotype)	<i>Psph</i> NPS3121
6	<i>HopPtoJ</i>	~control (no phenotype)	<i>Pst</i> DC3001
7	<i>avrPphF_{ORF2}</i>	<i>Silencing enhancement</i>	<i>Psph</i> R7
8	<i>HopPtoK</i>	~control (no phenotype)	<i>Pst</i> DC3001
9	<i>HopPtoH</i>	~control (no phenotype)	<i>Pst</i> DC3001
10	<i>pthG</i>	<i>Clorosis & late HR</i>	<i>P.a.gyps</i>
11	<i>AvrPphB</i>	<i>HR</i>	<i>Psph</i> NPS3121
12	<i>virPphA</i>	<i>Silencing enhancement</i>	<i>Psph</i> R4
13	<i>AvrPtoF_{ORF2}</i>	<i>Silencing enhancement</i>	<i>Pst</i> DC3001
14	<i>AvrPtoE</i>	<i>Silencing enhancement</i>	<i>Pst</i> DC3001
15	<i>ORF6</i>	<i>Silencing enhancement</i>	<i>Pss</i> B728a
16	<i>PopP2</i>	<i>Silencing enhancement</i>	<i>R.sol</i> GMI1000

Πίνακας 1. Αποτελέσματα επίδρασης των *T3EPs* κατά την εκτέλεση των πειραμάτων για τη μελέτη της επιρροής τους στον μηχανισμό του *PTGS*.

Α/Α	Όνομα αντ γονιδίου	Κοινός φορέας κλωνοποίησης	Φορέας έκφρασης σε βακτηριακό κύτταρο	Αγροβακτηριακός φορέας	Προέλευση γονιδίου
1	HopPtoK (w/o hrp Box)	pGEM-T easy pART7		pART27	<i>P.s.t. DC3001</i>
2	HopPtoK + hrp Box	pGEM-T easy	pBBR1-MCS4		<i>P.s.t. DC3001</i>
3	virPphA + hrp Box		pBBR1-MCS2		<i>P.s.ph Race 7</i>
4	virPphA (w/o hrp Box)	pGEM-T easy pUC-A7-Tx		pBin-Hyg-Tx	<i>P.s.ph Race 4</i>
5	HopPtoJ + hrp Box	pGEM-T easy	pBBR1-MCS4		<i>P.s.t. DC3001</i>
6	HopPtoJ (w/o hrp Box)	pGEM-T easy	pART7	pART27	<i>P.s.t. DC3001</i>
7	HopPtoH +hrp Box	pGEM-T easy	pBBR1-MCS4		<i>P.s.t. DC3001</i>
8	HopPtoH (w/o hrp Box)	pGEM-T easy	pART7	pART27	<i>P.s.t. DC3001</i>
9	avrPtoB +hrp Box	pGEM-T easy	pBBR1-MCS1		<i>P.s.t. DC3001</i>
10	avrPtoB (w/o hrp box)	pGEM-Teasy pART7			<i>P.s.t. DC3001</i>
11	avrPtoI + hrp Box	pGEM-T easy	pBBR1-MCS4		<i>P.s.t. DC3001</i>
12	avrPtoI (w/o hrp box)	pART7		pART27	<i>P.s.t. DC3001</i>
13	HopPtoD2 + hrp Box	pGEM-T easy	pBBR1-MCS2		<i>P.s.t. DC3001</i>
14	HopPtoD2 (w/o hrp box)	pART7		pART27	<i>P.s.t. DC3001</i>
15	avrPtoC2 + hrp Box		pBBR1-MCS4		<i>P.s.t. DC3001</i>
16	avrPtoC2 (w/o hrp Box)	pGEM-T easy pART7		pART27	<i>P.s.t. DC3001</i>
17	avrPtoC2 (w/o hrp Box)	pART7		pART27	<i>E. amylovora</i>
18	avrPtoF ORF1+ORF2 + hrp Box		pBBR1-MCS1		<i>P.s.t. DC3001</i>
19	avrPtoF ORF1+ hrp Box		pBBR1-MCS2		<i>P.s.t. DC3001</i>
20	avrPtoF ORF2 (w/o hrp Box)	pGEM-T easy pUC-A7-Tx		pBin-Hyg-Tx	<i>P.s.t. DC3001</i>
21	avrPtoE + hrp Box		pBBR1-MCS1		<i>P.s.t. DC3001</i>
22	avrPtoE (w/o hrp Box)	pUC-A7-Tx		pBin-Hyg-Tx	<i>P.s.t. DC3001</i>
23	avrPphF ORF2 (w/o hrp Box)	pART7	pET 18b	pART27	<i>P.s.ph Race 7</i>
24	avrPphE (w/o hrp Box)	pART7	pET 18b	pART27	<i>P.s.ph NPS3121</i>
25	avrPphB + hrp Box		pBBR1-MCS1 pBBR1-MCS2		<i>P.s.ph Race 7</i>
26	avrPphB (w/o hrp Box)	pUC-A7-Tx		pBin-Hyg-Tx	<i>P.s.ph Race 4</i>
27	avrPphC + hrp Box	pT 20	pBBR1-MCS1		<i>P.s.ph Race 7</i>
28a	avrRps4 (w/o hrp Box)	pSPHB5 pART7		pART27	<i>P.s.pi Race 3</i>
28b	avrRps4 (w/o hrp Box)	pSPHB5 pART7		pART27	<i>Ppi-151 Race 2</i>
29	CMV-Y_CP	pART7		pART27	<i>CMV-Y</i>
30	AvrPtoF_ORF1-avrPphF_ORF2		pBBR1-MCS1		<i>Pst DC3001- Pph Race 7</i>
31	pthG	pART7		pART27	<i>P.aggl pv. gypsophilae</i>
32	TMV-Helicase Domain				<i>TMV-U1</i>
33	avrRt2	pART7	pSPHB5	pART27	<i>P.s.t. JL1065</i>
34a	ORF6 _{B728a} (P _{5yr} _1182)		pSPHB5	pART27	<i>P.s.s. B728a</i>
34b	ORF6 _{B728a} (P _{5yr} _5054)		pSPHB5		<i>P.s.s. B728a</i>
34c	ORF6 _{DC3000} (PSPTO_1371)		pSPHB5		<i>P.s.t. DC3000</i>
35	PpkB Homolog (<i>HopSP</i>)	pART7	pSPHB5	pART27	<i>P.s.ph Race 6</i>
36	ToMV (TMV-L) CP	pART7		pART27	<i>TMV-L</i>
37	TCV CP			pBIN19	<i>TCV</i>
38	PopP2	pART7	pSPHB5	pART27	<i>R. solanacearum GMI 1000</i>
39	virPphA N-terminus	pGEM-Teasy	pUC-A7-Tx	pBin-Hyg-Tx	<i>P.s.ph Race 4</i>
40	virPphA C-terminus	pGEM-Teasy	pUC-A7-Tx	pBin-Hyg-Tx	<i>P.s.ph Race 4</i>

Πίνακας 2. Λίστα κλωνοποιημένων βακτηριακών *T3EPs* και ικών παραγόντων παθογένειας. (Οι φορείς *pGEM-T easy* χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των προϊόντων PCR χωρίς την χρήση θέσεων κοπής από περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Στις άλλες περιπτώσεις τα προϊόντα PCR κλωνοποιήθηκαν μετά από πέψη με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες στις ομώνυμες θέσεις του πολυσυνδέτη των πλασμιδίων που αναφέρονται).



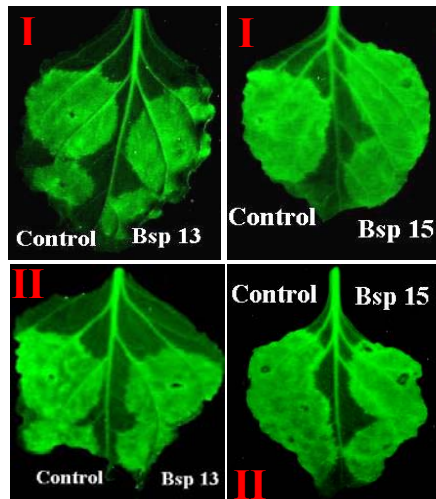
Εικόνα 9b. Ενίσχυση της σίγησης από τους *T3EPs* *ORF6* από το στέλεχος *Pss* B728a και *PopP2* από το βακτήριο *Ralstonia solanacearum* GM11000 κατά την εκτέλεση των πειραμάτων για την μελέτη της επίδρασης τους στον μηχανισμό του *PTGS*.

Στην συνέχεια επικεντρωθήκαμε στη μελέτη τριών γνωστών *T3EPs* που φαίνεται ότι λειτουργούν ως ενισχυτές της σίγησης του γονιδίου της *GFP* και ελέγξαμε αν οι φαινότυποι που παρατηρούμε σχετίζονται με τον μηχανισμό της *RNA* επαγόμενης *PTGS*. Έτσι αποφασίσαμε να μελετήσουμε πιο διεξοδικά τους τελεστές *AvrPtoE* (νέο όνομα *HopX1*), *VirPphA* (νέο όνομα *HopABI*) και *AvrPphFORF2* (νέο όνομα *HopF2*).

Για την περαιτέρω ανάλυση και την επιβεβαίωση της εμπλοκής του μηχανισμού της σίγησης, χρησιμοποιήσαμε δύο γνωστούς ιικούς καταστολείς της *PTGS*: τον καταστολέα P38 (viral coat protein) του *Turnip crinkle virus* (*TCV*) (Thomas, et. al. 2003) και τον καταστολέα P19 του *Cymbidium Ringspot Tombusvirus* (*CymRSV*) (Havelda, et. al. 2003). Σε συνδυασμένη αγροέκφραση των *T3EPs* με τους ιικούς καταστολείς της γονιδιακής σίγησης, το αγροβακτηριακό στέλεχος που εκφράζει την *GFP* συνενύεται με άλλο στέλεχος αγροβακτηρίου που εκφράζει την ική πρωτεΐνη και σε αυτά προστίθεται και το αγροβακτηριακό στέλεχος που φέρει τον υπό μελέτη τελεστή (**Εικ. 10**). Σε διαφορετική προσέγγιση του ίδιου πειράματος, χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικά βακτηριακά αιωρήματα: το πρώτο περιείχε τα αγροβακτηριακά στελέχη που εκφράζουν την *GFP* και τον υπό μελέτη *T3EP* και το δεύτερο τα στελέχη που εκφράζουν την *GFP* και τον έναν από του δύο ιικούς καταστολής της σίγησης. Τα αγροβακτηριακά αιωρήματα στην συνέχεια συνενύονται στους διακυττάριους χώρους φύλλων του *N. benthamiana* σε μερικώς επικαλυπτόμενες περιοχές και στις επόμενες μέρες καταγράφονται διαφορές στην ένταση του φθορισμού στα σημεία αλληλοεπικάλυψης, κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (**Εικ. 11**). Οι ικές πρωτεΐνες καταστολής της γονιδιακής σίγησης παρεμποδίζουν τον φυτικό μηχανισμό καταστολής

της έκφρασης της *GFP*. Όπως φαίνεται και από τις εικόνες 11 και 12 οι ιικοί καταστολείς της *PTGS* είναι ικανοί να αναιρέσουν τον φαινότυπο απόσβεσης του φθορισμού της *GFP* που επάγουν οι *T3EPs*. Τα αποτελέσματα αυτά συνάδουν με την υπόθεση ότι η ικανότητα καταστολής του φθορισμού της *GFP* από τους *T3EPs* είναι εξαρτώμενο από τον σιγητικό μηχανισμό του φυτού.

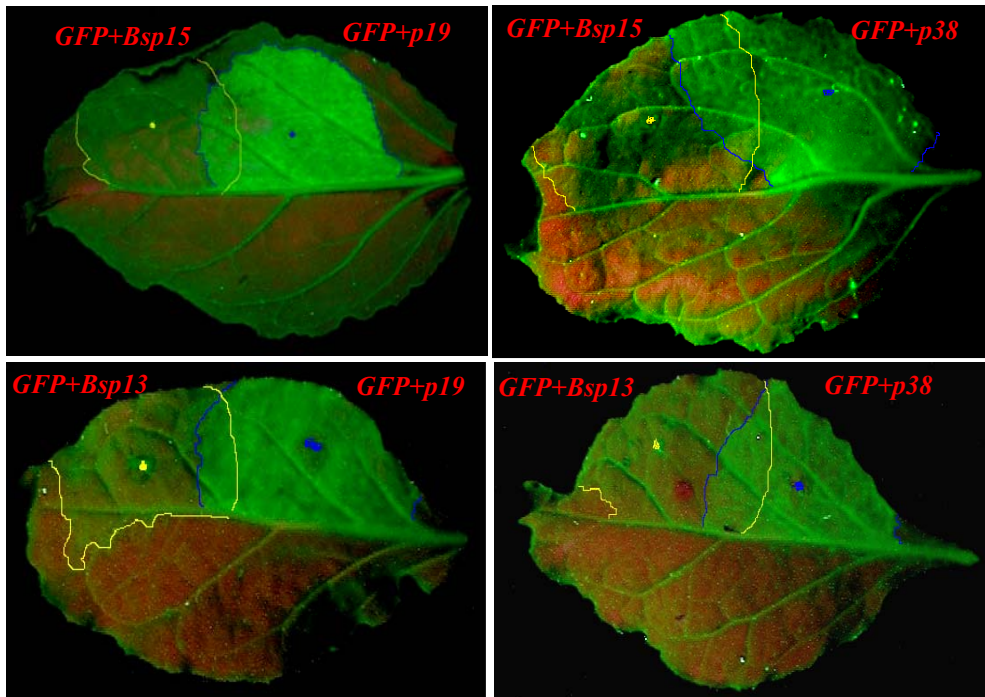
Το επόμενο βήμα ήταν να μελετήσουμε το φαινόμενο σε μοριακό επίπεδο και πιο συγκεκριμένα σε επίπεδο παραγωγής των *mRNAs* και *siRNAs* του γονιδίου *GFP*. Για τον σκοπό αυτό επαναλάβαμε τους αγρο-εμποτισμούς (**Εικ. 12**) και συλλέξαμε υλικό από τις αγρό-εμποτισμένες περιοχές φύλλων από τις οποίες επιχειρήσαμε να καταδείξουμε την παρουσία *siRNAs* και *mRNAs* ειδικών για την *GFP* και να ποσοτικοποιήσουμε τα επίπεδα τους παρουσία και απουσία των *T3EPs*.



Εικόνα 10. Αντιστροφή του φαινομένου της σίγησης της *GFP* που προκαλείται από τους *T3EPs* *HopX1* και *HopAB1*, παρουσία των *silencing suppressor p38* και *p19*.

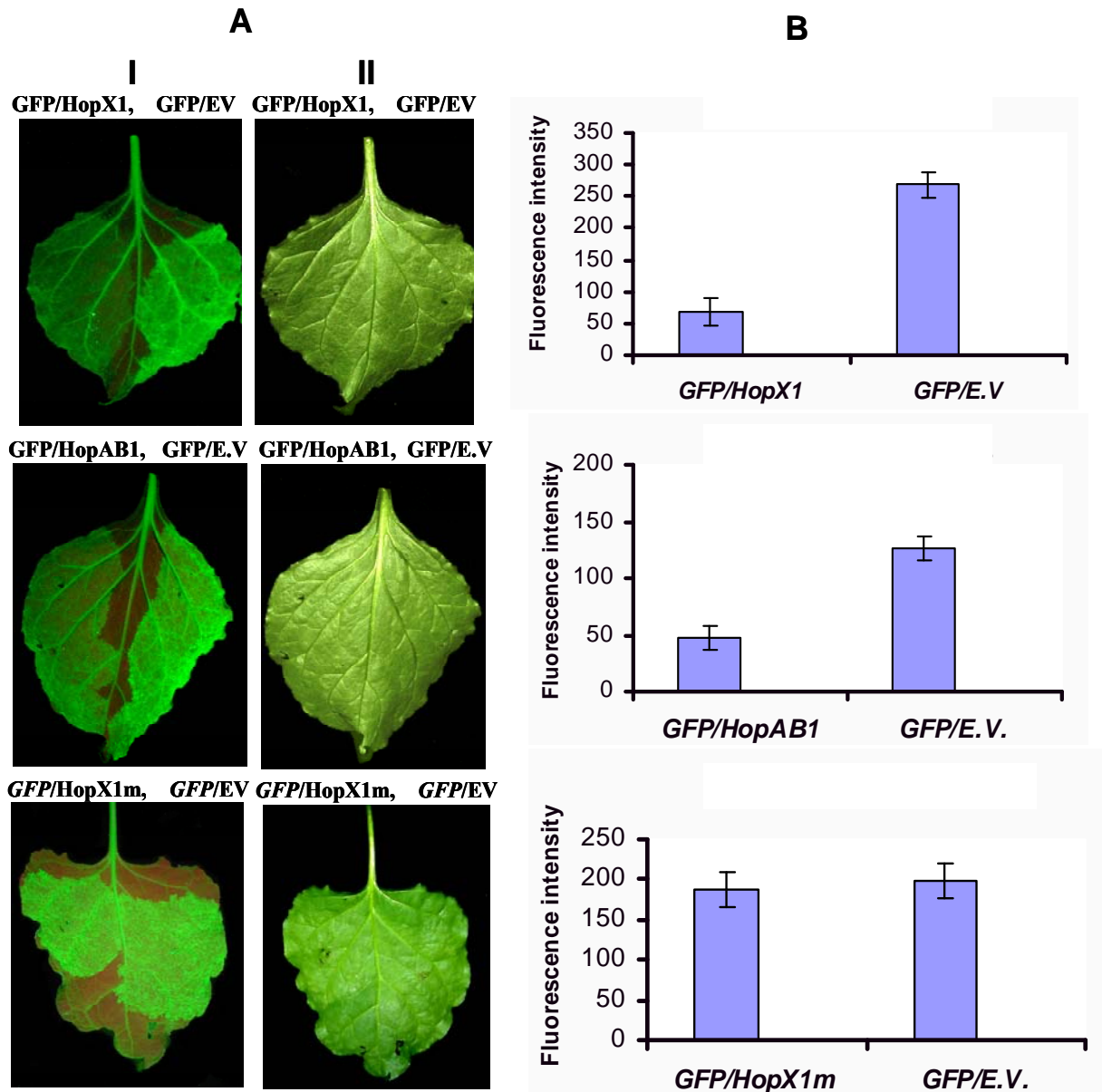
I. Control: *Atum::GFP+Atum::E.V.+Atum::p19*, **Bsp13:** *Atum::GFP+Atum::HopAB1+Atum::p19*, **Bsp15:** *Atum::GFP + Atum::HopX1 +Atum::p19*.

II. Control: *Atum::GFP+Atum::E.V.+Atum::p38*, **Bsp13:** *Atum::GFP+Atum::HopAB1+Atum::p38*, **Bsp15:** *Atum::GFP + Atum::HopX1 +Atum::p38*.



Εικόνα 11. Αντιστροφή του φαινομένου της σίγησης της *GFP* που προκαλείται από τους *T3EPs* *HopX1* και *HopABI*, παρουσία των *silencing suppressor* *p38* και *p19*, σε επικαλυπτόμενες κηλίδες. ***Bsp13***: *HopABI*, ***Bsp15***: *HopX1*.

Για τα πειράματα αυτά εντοπίσαμε και χρησιμοποιήσαμε επίσης ένα φυσικό μετάλλαγμα της πρωτεΐνης *HopX1* προερχόμενο από το βακτηριακό στέλεχος *PspH* NPS3121 φυλή 1, το οποίο χρησιμοποιήσαμε ως αρνητικό μάρτυρα (το μετάλλαγμα θα αναφέρεται ως *HopX1m*). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *HopX1m* περιέχει μία ένθεση του μεταθετού στοιχείου *IS5* στο C-τελικό άκρο της κωδικής περιοχής με αποτέλεσμα να έχει χάσει την δυνατότητα επαγωγής της *HR* σε φυτά που φέρουν το λειτουργικά αντίστοιχο *R* γονίδιο (*Inoue, et. al. 1999*). Το μετάλλαγμα αυτό, όπως διαπιστώσαμε, επίσης δεν επάγει την *HR* στην *N. benthamiana*. Κατά την συλλογή του υλικού για την εξαγωγή του RNA φωτογραφίσαμε τα δείγματα σε UV και κανονικό φωτισμό με σκοπό να μετρήσουμε την διαφορά στα επίπεδα φθορισμού της *GFP* σε κάθε δείγμα χωριστά. Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 12 τα επίπεδα της *GFP* παρουσία των λειτουργικών *HopX1* και *HopABI* είναι εμφανώς πιο μειωμένα σε σχέση με το μάρτυρα, σε αντίθεση με τα επίπεδα της *GFP* παρουσία του μεταλλάγματος *HopX1m* τα οποία δεν εμφανίζουν σχεδόν καμία διαφοροποίηση σε σύγκριση με το μάρτυρα. Αυτό συνιστά ένδειξη ότι στην περίπτωση της *HopX1* η περιοχή για τη σίγηση της *GFP* πιθανώς να είναι η αμινοτελική.

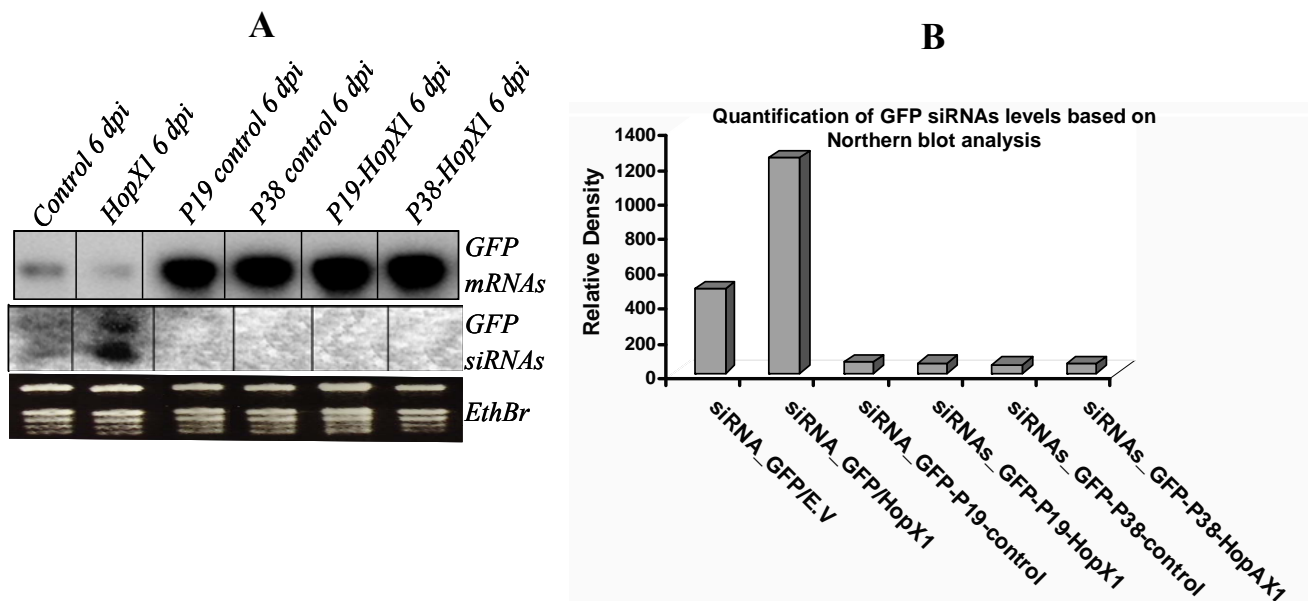


Εικόνα 12. Επίδραση των HopX1, HopAB1 και HopX1m σε τοπικά επαγόμενη σίγηση της GFP σε φυτά *N. benthamiana* 16C. (A). Δοκιμή φθορισμού της GFP. Μίξη (1:1) αεροβακτηριδίων, που φέρνουν τα κατασκευάσματα έκφρασης που υποδεικνύονται επάνω από τις εικόνες, ενέθηκαν σε φύλλα *N. benthamiana* 16c και φωτογραφίστηκαν 6 ημέρες μετά τον εμβολιασμό (*dpi*). Ο αγρο-εμποτισμός (*Agroinfiltration*) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται από τον *Hamilton* και τους συνεργάτες του (*Hamilton et al., 2002*). Ο φθορισμός της GFP ελέγχθηκε 4 και 6 *dpi* με έναν φορητό UV λαμπτήρα. Τα φυτά φωτογραφίστηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή *NIKON COOLPIX 990* σε UV (**I**) κανονικό φωτισμό (**II**) και οι εικόνες υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τη χρήση του προγράμματος *Adobe Photoshop CS2*. (**B**). Πυκνομετρικός (*densitometric*) προσδιορισμός της ποσότητας του φθορισμού της GFP στις περιοχές εμποτισμού των φύλλων, με την χρήση του προγράμματος *Image J* (στον άξονα y η κλίμακα δίνεται σε σχετικές τιμές). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον 10 φορές σε ξεχωριστά φυτά.

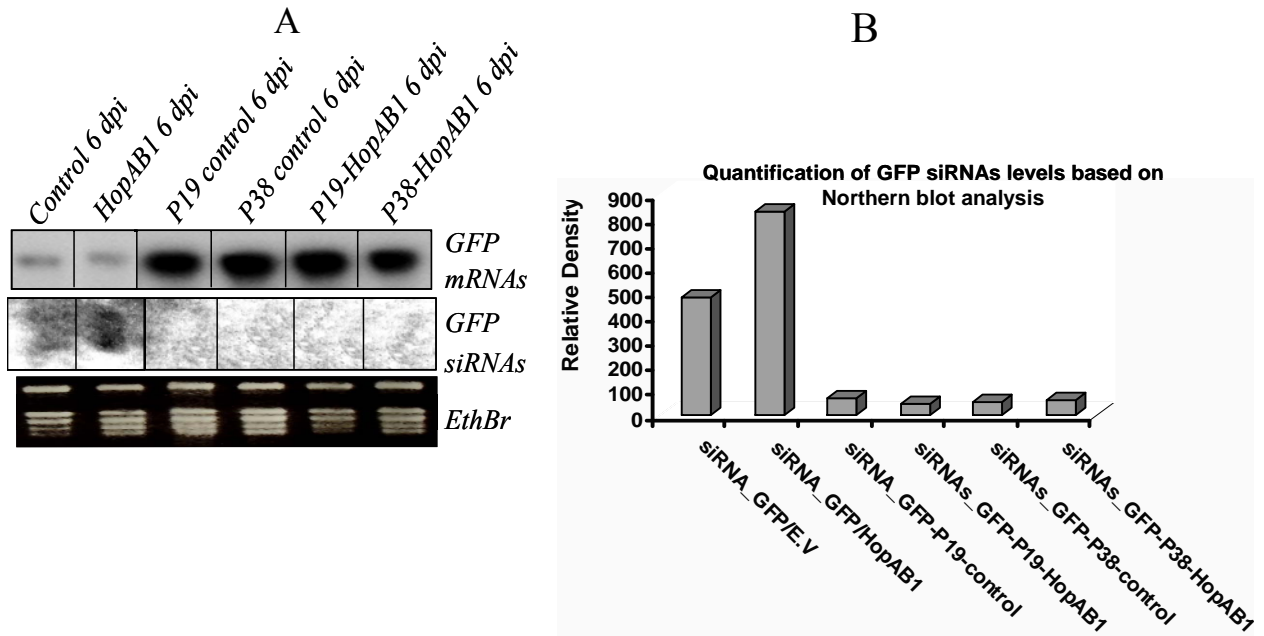
Η ανάλυση κατά *Northern* για τα *mRNA* και *siRNAs* της GFP έδειξε ότι η αντιστροφή του φαινοτύπου σίγησης της GFP παρατηρείται και σε μοριακό επίπεδο. Συγκεκριμένα,

Αποτελέσματα

παρατηρήθηκε υπέρ-συσσώρευση των *GFP-mRNAs* και μείωση αντίστοιχα των *GFP-siRNAs* στις περιοχές έκφρασης των δύο ικών καταστολέων της σίγησης σε σύγκριση με τα επίπεδα *GFP-mRNAs* και *GFP-siRNAs* κατά την απουσία τους (Εικ. 13, 14). Η ικανότητα των ικών καταστολέων να αντιστρέφουν το φαινόμενο της ενίσχυσης της *PTGS* που προκαλείται από τους *HopX1* και *HopAB1*, συνιστά απόδειξη ότι ο φαινόμενος μείωσης του φθορισμού της *GFP* παρουσία των πρωτεϊνών τελεστών, είναι εξαρτώμενος από τον μηχανισμό της σίγησης του φυτού.



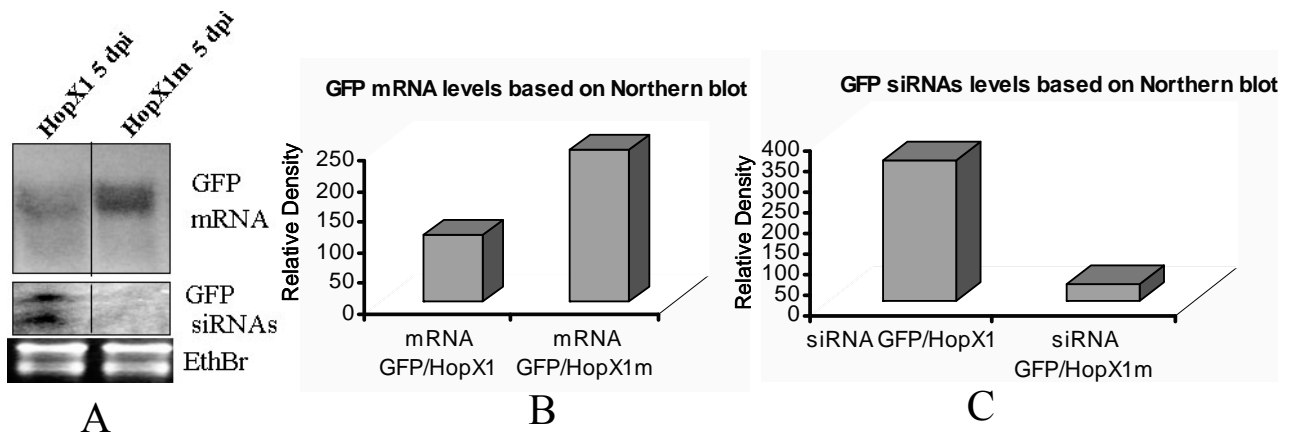
Εικόνα 13. Η έκφραση του *HopX1* ενισχύει την *RNA* εξαρτώμενη σίγηση της *GFP*. (A), Επίπεδα *mRNA* και *siRNA* της *GFP* 6 μετά των αγροεμποτισμό (6 dpi) που υποδεικνύονται επάνω από τις εικόνες. Παρατηρείται μια σαφής μείωση των επιπέδων του *GFP-mRNA* και αύξηση των επιπέδων των *siRNAs*, συγκριτικά με το μάρτυρα κατά την παρουσία του *HopX1* στις 6 dpi. Αυτό αποδεικνύει την ενίσχυση της σίγησης της *GFP* από τον εν λόγω τελεστή. Η συν-έκφραση των ικών καταστολέων *p19* και *p38* αντίστοιχα, μειώνει τα επίπεδα *mRNA* και *siRNAs* της *GFP* από τους ιστούς (μη ανιχνεύσιμα). (B), Ποσοτικοποίηση των επιπέδων των *GFP-siRNA*. Παρουσία του *HopX1* τα επίπεδα των *GFP-siRNAs* αυξάνονται περίπου τρεις φορές, έναντι του δείγματος μάρτυρα (*GFP /E.V.*) ενώ αντίθετα δεν εμφανίζονται καθόλου στα δείγματα που εκφράζονται οι *p19* και *p38*.



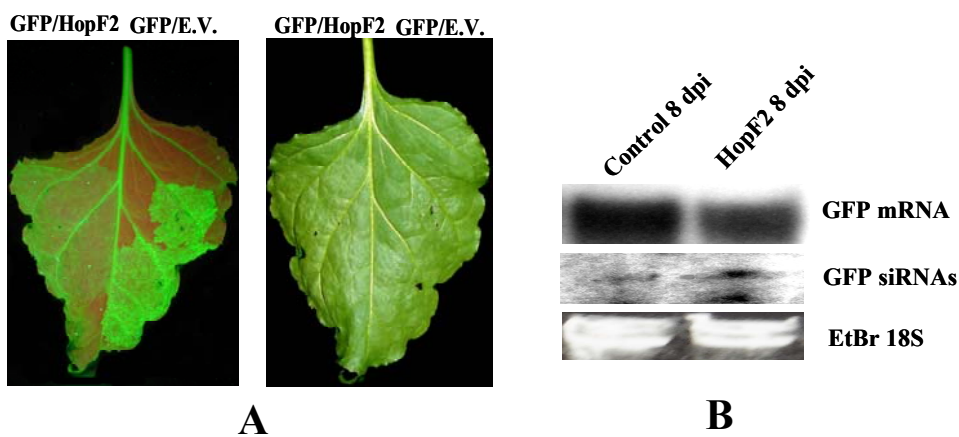
Εικόνα 14. Η έκφραση του *HopAB1* ενισχύει την RNA εξαρτώμενη σίγηση της GFP. (A). Επίπεδα mRNA και siRNA της GFP 6 dpi σε ιστούς μετά από αγρο-εμποτισμό όπως υποδεικνύονται επάνω από τις εικόνες. Μια μείωση των επιπέδων του GFP-mRNA και αύξηση της συσσώρευσης των siRNAs παρατηρείται συγκριτικά με το control κατά την παρουσία του *HopAB1* 6dpi. Αυτό αποδεικνύει την ενίσχυση της σίγησης της GFP από τον T3EP αυτόν. Η έκφραση των ικών καταστολέων *p19* και *p38* αντίστοιχα, αναστρέφει το φαινόμενο. Τα επίπεδα mRNA και siRNAs της GFP από τους ιστούς μετά από τον αγρο-εμποτισμό υποδεικνύονται επάνω από τις εικόνες. **(B).** Ντεσιτομετρικός προσδιορισμός των επιπέδων των GFP-siRNA. Παρουσία του *HopAB1* τα επίπεδα των GFP-siRNAs αυξάνονται περίπου στο διπλάσιο, έναντι του δείγματος ελέγχου (control E.V.) ενώ αντίθετα δεν εμφανίζονται καθόλου στα δείγματα που εκφράζονται οι *p19* και *p38*.

Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα από την ανάλυση των GFP-mRNAs και GFP-siRNAs παρουσία των *HopX1* και *HopAB1*, η έκφραση του *HopX1m* δεν φαίνεται να διαφοροποιεί τα επίπεδα έκφρασης της GFP συγκριτικά με το μάρτυρα. Συγκριτική ανάλυση των επιπέδων των GFP-mRNAs και GFP-siRNAs παρουσία των δύο πρωτεϊνών (*HopX1* και *HopX1m*) έδειξε επίσης ότι η *HopX1m* δεν φαίνεται να έχει οποιαδήποτε επίδραση στην επαγωγή της σίγησης της GFP (Εικ. 15).

Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά των πρωτεϊνών *HopX1* και *HopAB1* προέκυψαν και με τον T3EP *HopF2* του βακτηριακού στελέχους *Pst* DC3001 (Εικ. 16).



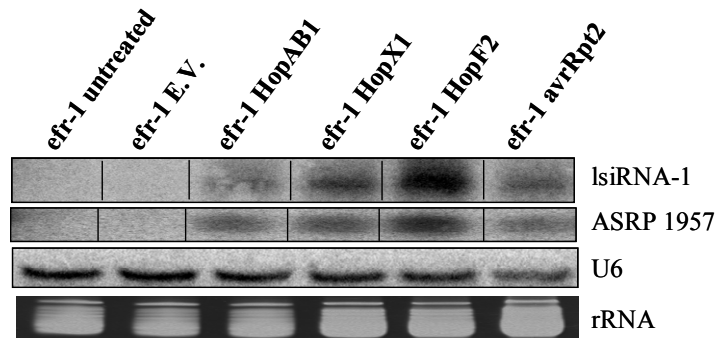
Εικόνα 15. Η έκφραση του μεταλλάγματος *HopX1m* δεν επηρεάζει τον μηχανισμό της σίγησης της *GFP* σε φυτά *N. benthamiana* 16C. (A). Επίπεδα των *mRNA* και *siRNA* της *GFP* σε αγρο-εμποτισμένους ιστούς, όπως υποδεικνύονται κάτω από τις εικόνες. Τα *GFP-siRNAs* εμφανίζονται 5-6 μέρες μετά τον εμποτισμό (*dpi*). Παρατηρείται ισχυρή συσσώρευση των *GFP-siRNAs* σε φύλλα στα οποία εκφράζεται η *HopX1* αλλά όχι και σε εκείνα που εκφράζεται η *HopX1m*. Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων των *mRNA*, (B) και των επιπέδων των *siRNA*, (C) σε πειράματα συν-έκφρασης των *HopX1* και *HopX1m* με την *GFP*.



Εικόνα 16. Η έκφραση του *HopF2* φαίνεται να ενισχύει την *RNA* εξαρτώμενη σίγηση της *GFP*. (A). Δοκιμή φθορισμού της *GFP*. Μίγμα (1:1) αγροβακτηριακών στελεχών που φέρουν τα κατασκευάσματα έκφρασης που υποδεικνύονται πάνω από τις εικόνες, εμποτίστηκαν σε φύλλα *N. benthamiana* 16c και φωτογραφίστηκαν 8 ημέρες μετά τον εμποτισμό (8dpi). Ο φθορισμός της *GFP* ελέγχθηκε 6, 4 και 8dpi με έναν φορητό *UV* λαμπτήρα. (B). επίπεδα *mRNA* και *siRNA* της *GFP* σε εμποτισμένους ιστούς, όπως υποδεικνύεται πάνω από τις εικόνες. Τα επίπεδα των *GFP-siRNAs* εμφανίζονται 6-8 dpi. Η ισχυρή συσσώρευση των *GFP-siRNAs* εμφανίζεται σε φύλλα στα οποία η *GFP* συν-εκφράζεται με την *HopF2* αλλά όχι και σε εκείνα του *control* (*GFP/E.V.*).

Πρόσφατες μελέτες (Katiyar-Agarwal, et. al. 2006; Katiyar-Agarwal, et. al. 2007) έδειξαν ότι ένα ενδογενές *siRNA* (*natural siRNA* ή *nat-siRNA*), το *nat-siRNAATGB2* (*ASRP 1957*), και μια νέα κατηγορία μικρών *RNAs* ονομαζόμενα και «μακριά» *siRNAs*

(*long siRNAs* ή *lsiRNAs*), λόγω του μήκους τους 30-40 nt, φαίνεται ότι μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα γνωστά *siRNAs*, καθώς και αυτά επάγονται από στελέχη του είδους *P. syringae* που φέρνουν τον *T3EP avrRpt2* στην *A. thaliana*. Σε συνεργασία με την *Prof. Hailing Jin* (*Department of Plant Pathology and Microbiology, Center for Plant Cell Biology and Institute for Integrative Genome Biology, University of California, Riverside*), μελετήσαμε την επίδραση των *HopAB1*, *HopX1* και *HopF2* στα επίπεδα έκφρασης των ενδογενών *si-RNAs* (*lsiRNA* και *nat-siRNA*) στο φυτό μοντέλο *A. thaliana*. Τα πειράματα για την μελέτη της πιθανής επίδρασης των *HopAB1*, *HopX1*, και *HopF2* στη συσσώρευση των *lsiRNA* και *nat-siRNA* έγιναν και στην σειρά *efr-1* της *Arabidopsis*. Τα φυτά της σειράς αυτής φέρουν μια μεταλλαγή (*deletion*) στο γονίδιο *efr-1* που έχει ως αποτέλεσμα την μη ενεργοποίηση της βασικής άμυνας από τον *elongation factor 1* του αγροβακτηρίου και χρησιμοποιούνται κατά κανόνα σε πειράματα γονιδιακής σίγησης (*Zipfel, et. al. 2006*). Για την παρούσα μελέτη, αγροβακτηριακά στελέχη που έφεραν γονιδιακές κασέτες έκφρασης των τελεστών *HopAB1*, *HopX1* και *HopF2* (*35S::HopAB1*, *35S::HopX1* και *35S::HopF2*) χρησιμοποιήθηκαν, μαζί με στελέχη που φέρνουν την κασέτα έκφρασης *35S::avrRpt2* ως θετικό μάρτυρα. Τα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης έδειξαν μια θετική επίδραση και από τους τρεις *T3SPs* στα επίπεδα συσσώρευσης και των δύο κατηγοριών αυτών των μικρών *RNAs* στην *Arabidopsis* (Εικ. 17). Τα επίπεδα συσσώρευσης για το *lsi-* και *nat-siRNAs* συμπεριφέρονται παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν για τα *GFP-siRNAs*.



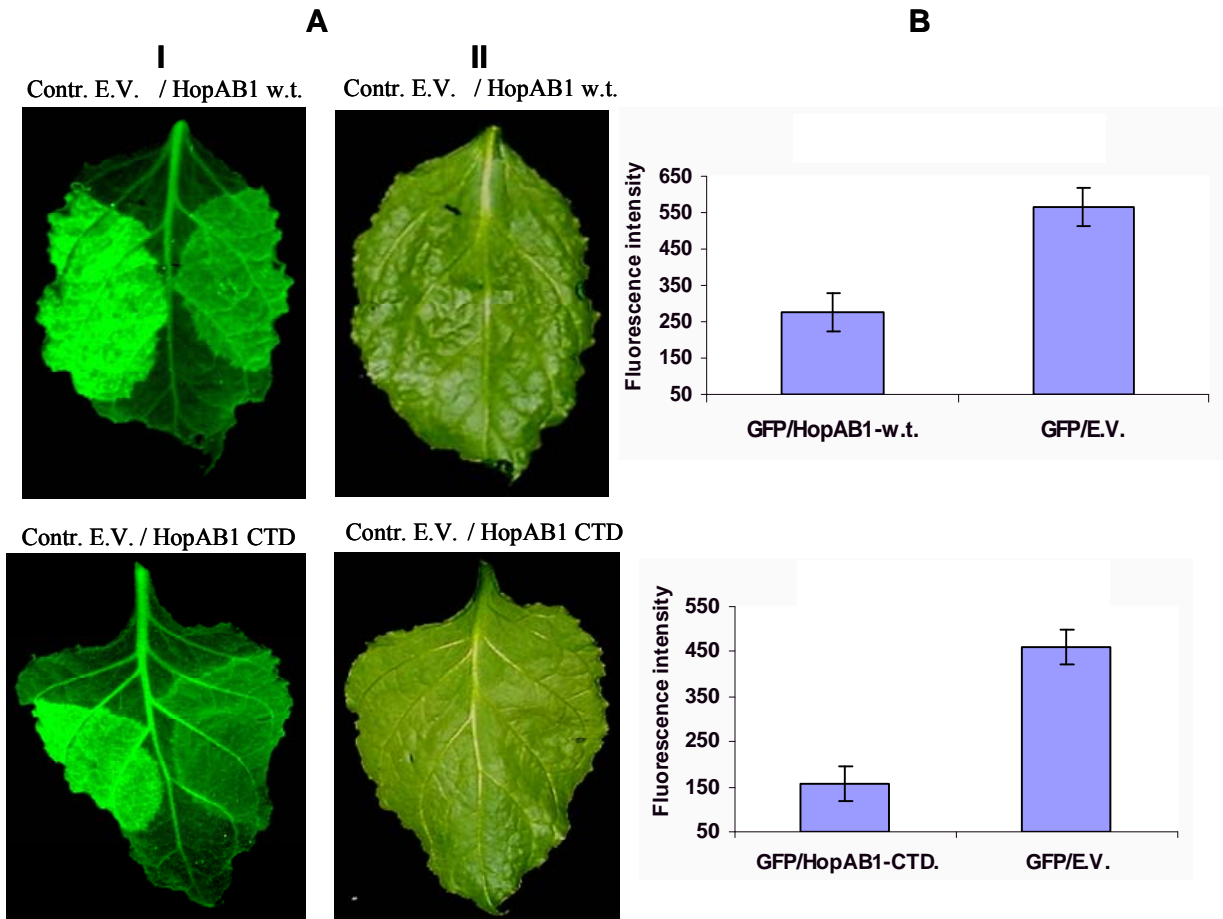
Εικόνα 17. Έκφραση των *35S::HopAB1*, *35S::HopX1* και *35S::HopF2* σε φυτά *Arabidopsis efr-1* και μελέτη της επίδρασης τους στην συσσώρευση των *lsiRNA* και *nat-siRNA*. Όπως έχει περιγραφεί προηγουμένα (*Katiyar-Agarwal, et. al. 2006; Katiyar-Agarwal, et. al. 2007*) έχει ανακαλυφθεί ένα ενδογενές *siRNA*, *nat-siRNA* (*ASRP 1957*), και μια νέα κατηγορία μικρών *RNAs*, τα επονομαζόμενα μακριά *siRNAs* (*lsiRNAs*), μήκους 30-40 nt, τα οποία μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα με γνωστά *siRNAs*. Εδώ εμφανίζονται τα αποτελέσματα από την μελέτη της πιθανής επίδρασης των *HopAB1*, *HopX1*, και *HopF2* στη συσσώρευση των *lsiRNA* και *nat-siRNA* σε φυτά της σειράς *efr-1* της *Arabidopsis*. Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αγροβακτηριακά στελέχη που φέρνουν τις γονιδιακές κασέτες *35S::HopAB1*, *35S::HopX1* και *35S::HopF2*, καθώς επίσης και το *35S::avrRpt2* που χρησιμοποιήθηκε ως θετικό μάρτυρα. Η φωτογραφία μας διατέθηκε από την *Dr. Jin*.

Εντοπισμός της Περιοχής των T3EPs που είναι υπεύθυνες για την ενίσχυση της γονιδιακής σίγησης

Στην συνέχεια για να διερευνήσουμε πιο λεπτομερώς την ικανότητα των T3EPs να ενισχύουν την γονιδιακή σίγηση, αξιοποιήσαμε προηγούμενες μελέτες λειτουργικής ανάλυσης περιοχών των πρωτεϊνών *HopAB1* και *HopX1* που είναι υπεύθυνες για τις μέχρι τώρα γνωστές λειτουργίες στα φυτικά κύτταρα. Η πρωτεΐνη *HopAB1*, αρχικά προσδιορίστηκε ως παράγον παθογένειας (*virulence factor*) στο μεγάλο πλασμίδιο του βακτηριακού στελέχους *PspH* 1449B και ανήκει σε μια οικογένεια ομολόγων τελεστών της οποίας ιδρυτικό μέλος είναι η πρωτεΐνη *HopAB2* από βακτηριακό στέλεχος *Pst* DC3000. Η C-τελική περιοχή της *HopAB1* έχει ομολογία αμινοξικής αλληλουχίας περίπου 72% με την C-τελική περιοχή της *HopAB2*, ενώ τα N-τελικά άκρα των δύο πρωτεϊνών εμφανίζουν μεγαλύτερο ποσοστό ετερογένειας (ομολογία περίπου 46%). Η *HopAB2* είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη και έχει μελετηθεί εκτενώς. Σύμφωνα με τον *Abramovitch* και τους συνεργάτες του (*Abramovitch, et. al. 2005*), η C-τελική περιοχή του *HopAB2* (CTD, αμινοξικά κατάλοιπα 308-553), είναι επαρκής για να καταστείλει τον κυτταρικό θάνατο (PCD) σχετιζόμενο με την *HR*. Τα τελικά 44 αμινοξέα της πρωτεΐνης είναι απαραίτητα για την καταστολή του κυτταρικού θανάτου σε φυτά ντομάτα, ενώ όταν αποκόπτεται (*deletion*), η περικομμένη *HopAB2* επάγει *HR* μέσω της αλληλεπίδρασης της με τις πρωτεΐνες ανθεκτικότητας *Pto* και *Rsb* (*Pto- and Rsb-mediated HR*). Επίσης, η διαγραφή της CTD επιτρέπει στην αμινο-τελική περιοχή της *HopAB2* (*HopAB2*₁₋₃₈₇) να επάγει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σχετιζόμενο με την άμυνα σε πολλές ποικιλίες τομάτας (*Abramovitch, et. al. 2003*). Το *HopAB2* CTD εμφανίζει τρισδιάστατη δομική ομολογία με *U-box* πρωτεΐνες (ευκαρυωτικές *E3 ubiquitin ligases*), ενώ η *E3 ligase* δραστηριότητα της, έχει καταδειχτεί *in vitro* (*Janjusevic, et. al. 2006*). Η N-τελική περιοχή (*HopAB2*₁₋₃₈₇) της πρωτεΐνης αλληλεπιδρά φυσικώς με την κινάση *Fen* (*fenthion-sensitivity gene*) της τομάτας και αυτή η αλληλεπίδραση είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της ανοσιακής απόκρισης στα φυτά που φέρουν το γονίδιο *fen* (*Janjusevic, et. al. 2006*). Η περιοχή CTD της *HopAB2* συμπικουτινώνει ειδικά την πρωτεΐνη *Fen* και προωθεί με αυτόν τον τρόπο την αποδόμηση του από το πρωτεόσωμα. Αυτή η αποδόμηση οδηγεί στην ευπάθεια των φυτών τομάτας που εκφράζουν το γονίδιο *fen* (*Rosebrock, et. al. 2007*).

Στην παρούσα μελέτη κατασκευάστηκε μια κασσέτα έκφρασης της CTD του *HopAB1* (*HopAB1*₃₇₆₋₅₃₉) σε φυτά υπό τον μεταγραφικό έλεγχο τον υποκινητή 35S του ιού *CaMV*

(35S::ABI_CTD). Η κατασκευή αυτή ελέγχθηκε ως προς την ικανότητα της να επηρεάζει τον μηχανισμό της σίγησης στην *N. benthamiana*. Κατά τρόπο ενδιαφέροντα, το τμήμα *HopABI*₃₇₆₋₅₃₉ της πρωτεΐνης φαίνεται να διατηρεί την ικανότητα του να ενισχύει την σίγηση της *GFP*, όπως και η ολόπρωτεΐνη *HopABI* (Εικ. 18).

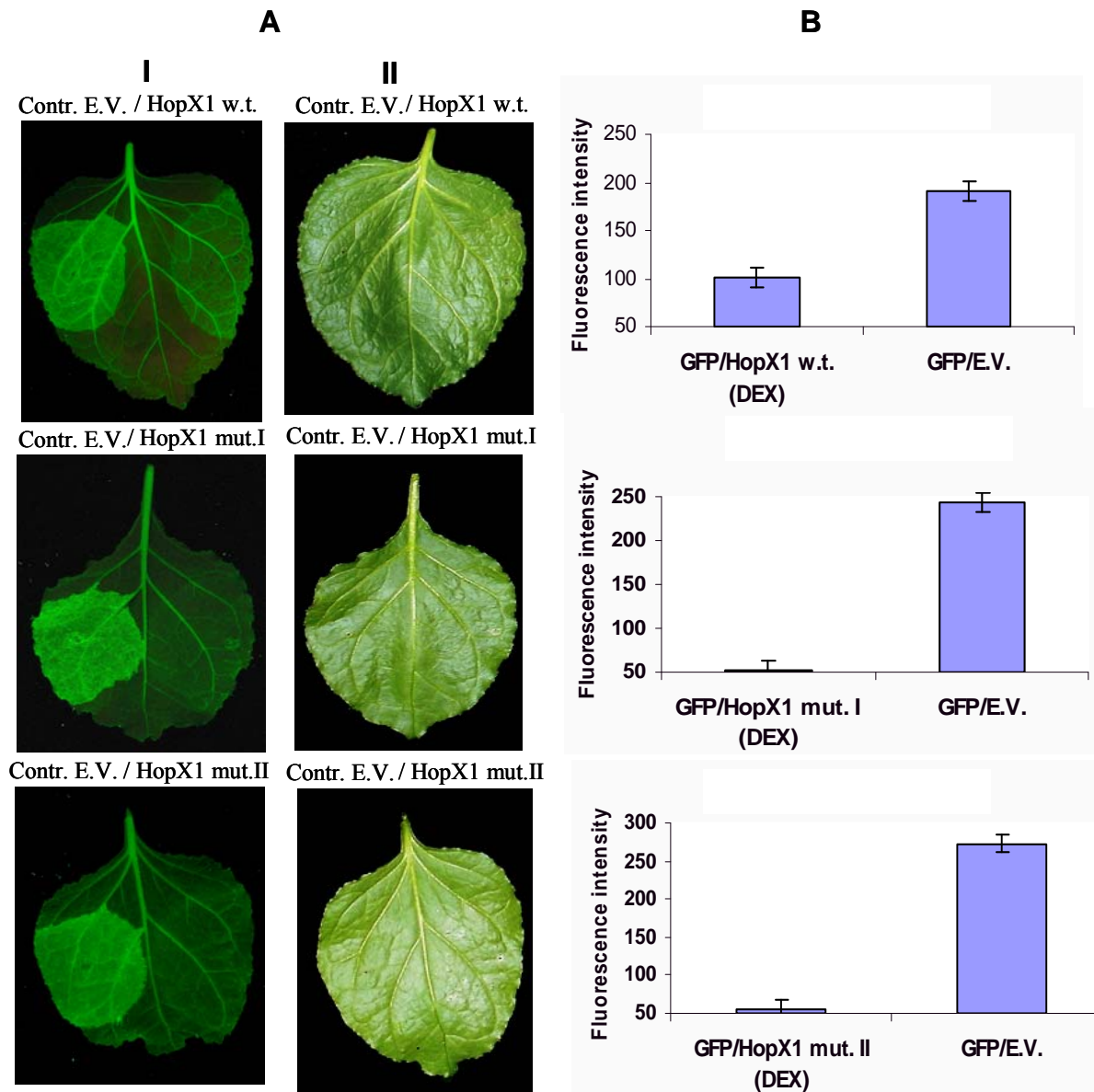


Εικόνα 18. Επίδραση των πρωτεϊνών *HopABI* w.t. και *HopABI-CTD* (*HopABI*₃₇₆₋₅₃₉) στην επαγωγή RNA εξαρτώμενης σίγησης της *GFP* σε φυτά *N. benthamiana* 16C.

Τα *HopABI* w.t. και τα *HopABI-CTD* έχουν κλωνοποιηθεί υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή 35S του *CaMV* στον αγροβακτηριακό φορέα *pBin-Hyg-Tx*. **(A)**. Δοκιμή φθορισμού της *GFP*. Μίγμα (1:1) αγροβακτηριακών στελεχών που φέρνουν τα κατασκευάσματα έκφρασης που υποδεικνύονται πάνω από τις εικόνες εγχύθηκαν σε φύλλα του φυτού *N. benthamiana* 16c, τα οποία φωτογραφήθηκαν 5 ημέρες μετά τον εμποτισμό (5dpi). Ο φθορισμός της *GFP* ελέγχθηκε 4, 5 και 6 dpi (με φορητό UV λαμπτήρα). Τα φυτά φωτογραφίστηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή *NIKON COOLPIX 990* σε UV **(I)**, και κανονικό φωτισμό **(II)**. **(B)**. Πυκνομετρική (*densitometric*) ανάλυση και προσδιορισμός των επιπέδων φθορισμού της *GFP* στις εμποτισμένες περιοχές των φύλλων, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα *Image J* (στον άξονα y η κλίμακα δίνεται σε σχετικές τιμές).

Σύμφωνα με τον *Nimchuk* και τους συνεργάτες του, (*Nimchuk, et. al. 2007*) η πρωτεΐνη *HopX1* φέρει μια υποθετική καταλυτική τριάδα υψηλής ομολογίας με μια συντηρημένη περιοχή καταλυτικής τριάδας των ευκαριωτικών ενζύμων *PNGase*, καθώς και μια νεοφανή συντηρημένη N-τελική περιοχή. Τόσο, η καταλυτική τριάδα όσο και η N-τελική περιοχή απαιτούνται για την αμοιβαία αναγνώριση του γονιδίου *hopX1* με το γονίδιο ανθεκτικότητας *R2* σε ανθεκτικές ποικιλίες φασολιάς, αλλά και για την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου στην *Arabidopsis* (*Nimchuk, et. al. 2007*). Μια μεταλλαγή στην καταλυτική τριάδα (C182A) και μια τριπλή αντικατάσταση καταλοίπων αλανίνης στην N-τελική συντηρημένη περιοχή, που αντιστοιχεί στα αμινοξέα *R122*, *N124*, και *D126* ακυρώνουν την *R2*-εξαρτώμενη ανοσιακή απόκριση σε ανθεκτικές ποικιλίες φασολιών, καθώς και την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου στην *Arabidopsis* (*Nimchuk, et. al. 2007*). Εξετάσαμε τα προαναφερθέντα μεταλλάγματα που μας διατέθηκαν από τον *Dr. Dangl*, ως προς τη ικανότητα τους ενίσχυσης της σίγησης της *GFP* στην *N. benthamiana* 16C με περιοδική έκφραση των κασετών *35S::GFP* και των εν λόγω μεταλλαγμάτων της *HopX1* κλωνοποιημένα σε κασέτες με υποκινητή επαγόμενο παρουσία δεκαμεθαζονης (*Nimchuk, et. al. 2007*). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κανένα από τα μεταλλάγματα δεν είχε σημαντική επίδραση στο φαινότυπο σίγησης της *GFP* (**Εικ. 19**).

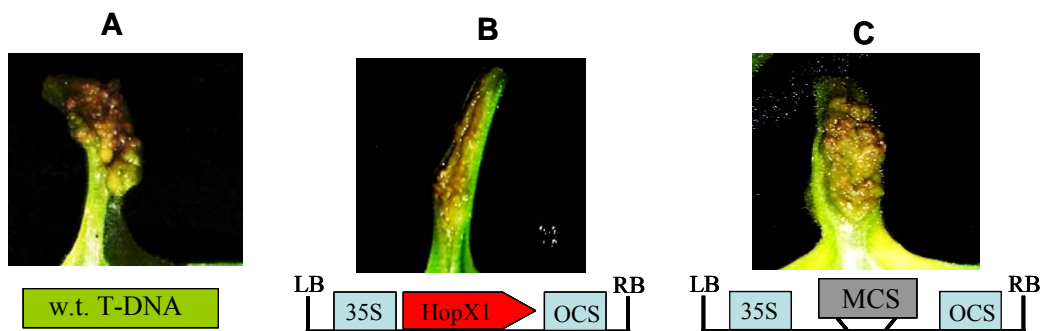
Τα αποτελέσματα των πειραμάτων με την αμινοτελικά ελλειμματική (*truncation*) *HopABI* καθώς και με τα μεταλλάγματα της *HopX1*, υποδηλώνουν ότι οι πρωτεϊνικές επικράτειες που είναι υπεύθυνες για το φαινόμενο της ενίσχυσης της σίγησης της *GFP* στις δύο πρωτεΐνες δεν συμπίπτουν με τις περιοχές που είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση των *T3EPs* αυτών με τις λειτουργικά αντίστοιχες φυτικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην εκδήλωση ανθεκτικότητας τύπου *HR*.



Εικόνα 19. Επίδραση των *HopX1 w.t.*, *HopX1 mut. 1* (μεταλλαγή τριπλής υποκατάστασης *R122*, *N124*, και *D126* στην N-τελική περιοχή) και *HopX1 mut. 2* (μεταλλαγή *C182A* στην καταλυτική τριάδα) στην σίγηση του *GFP* σε φυτά *N. benthamiana* 16C.

Τα *HopX1 w.t.* και οι δύο μεταλλαγές έχουν κλωνοποιηθεί υπό τον μεταγραφικό έλεγχο ενός επαγόμενου (*inducible*) με δεκαμεθαζόνη 20 µg/ml (*dexamethasone-DEX*) υποκινητή στον φορέα *pTA7002* και μας παραχωρήθηκαν από τον *Prof. J. Dangl*. **(A)**. Δοκιμή φθορισμού *GFP*. Μίγμα (1:1) στελεχών αγροβακτηρίου που έφεραν τα κατασκευάσματα έκφρασης όπως υποδεικνύονται πάνω από τις εικόνες χρησιμοποιήθηκαν για αγρο-εμποτισμό φύλλων *N. benthamiana* 16c. Τα φύλλα φωτογραφήθηκαν 6 ημέρες μετά τον εμποτισμό (6 *dpi*), ενώ ο φθορισμός της *GFP* ελέγχθηκε στις 4 και στις 6 *dpi* με έναν φορητό *UV* λαμπτήρα **(I)** και κανονικό φωτισμό **(II)**. **(B)**. Πυκνομετρικός (*densitometric*) προσδιορισμός του φθορισμού της *GFP* στις αγρο-εμποτισμένες περιοχές των φύλλων, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα *Image J* (στον άξονα y η κλίμακα δίνεται σε σχετικές τιμές).

Στην συνέχεια, και με βάση τα συμπεράσματα των *Dunoyer* και των συνεργατών του (2006), υποθέσαμε ότι η υπερέκφραση των *T3SPs*, που ενισχύουν την σίγηση, θα αναμένετο να παρεμποδίσει το σχηματισμό καρκινικού όγκου από ογκογόνο στέλεχος Αγροβακτηρίου. Για την διερεύνηση της υπόθεσης αυτής το πλασμίδιο που φέρει την γονιδιακή κασέτα *35S::HopXI* εισήχθη στο στέλεχος *A. tumefaciens* A281, το οποίο έχει την ικανότητα να προκαλεί τον σχηματισμό καρκινικού κάλου στους ξενιστές του (*Katoun, et. al. 2003*). Οι μολύνσεις πραγματοποιήθηκαν με την χρήση διπλού ως μάρτυρα, του στελέχους *A. tumefaciens* A281 με και χωρίς τον *pART27* (κενός φορέας-*E.V.*). Τέσσερις αντιπροσωπευτικοί μίσχοι φύλλων εμβολιάστηκαν με το κάθε στέλεχος και σημειώθηκε και φωτογράφησε η ανάπτυξη των όγκων 28 μέρες μετά την μόλυνση (28 *dpi*). Ο σχηματισμός χαρακτηριστικού καρκινικού κάλου παρατηρήθηκε στους μίσχους που μολύνθηκαν με τα στελέχη αγρίου τύπου με και χωρίς τον *E.V.* (**Εικ. 20**). Αντίθετα, στο 85% των μίσχων που μολύνθηκαν με το *A. tumefaciens* A281 που έφερε την κασέτα έκφρασης *35S::HopXI* δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη κάλου. Ενδιαφέρον αποτέλεσε η παρατήρηση μιας ήπιας νέκρωσης στην επιδερμίδα γύρω από την περιοχή της μόλυνσης με το στέλεχος A281-*35S::HopXI*. Αυτά τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τέσσερις φορές και με τουλάχιστον τρία φυτά ανά πείραμα, με τα παρόμοια αποτελέσματα.



Εικόνα 20. Ανάπτυξη κορωνοτόν κάλων στους μίσχους *N. benthamiana* μετά από μόλυνση με το ογκογόνο στέλεχος *A. tumefaciens* A281. Οι μίσχοι φωτογραφήθηκαν 28 ημέρες μετά από την μόλυνση με: (A). *A. tumefaciens* A281 (*A. tumefaciens* C58C1 που φέρει το ογκογόνο πλασμίδιο *pTiBo542*), (B). *A. tumefaciens* A281 που φέρνει την κασέτα *35S::HopXI* και (C). *A. tumefaciens* A281 που φέρει τον δυαδικό *pART27* (κενός φορέας-*E.V.*). Τα σχετικά στοιχεία των *T-DNAs* εμφανίζονται σχηματικά κάτω από τις φωτογραφίες. *35S*: υποκινητής *35S* του ιού του μωσαϊκού του κουνουπιδιού (*CaMV*), *OCS*: αλληλουχία λήξης της μεταγραφής του γονιδίου συνθάσης της οκτοπίνης (*octopine synthase*). Τέσσερις μίσχοι μολύνθηκαν με κάθε στέλεχος και όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τουλάχιστον τέσσερις φορές.

Συζήτηση

Οι μελέτες μας αποκάλυψαν ότι ορισμένοι *T3SPs* των φυτοπαθογόνων βακτηρίων επιδρούν στα μονοπάτια επαγωγής μεταγραφικής σίγησης γονιδίων στα φυτά. Ερευνήσαμε δεκαέξι *T3SPs* από διαφορετικούς παθότυπους (*pathovars*) του είδους *P. syringae* και διαπιστώσαμε ότι μια σημαντική αναλογία (περίπου ένα τέταρτο αυτών) επηρεάζει την επαγωγή της σίγησης του γονιδίου της *GFP* στο φυτό *N. benthamiana* 16c. Η πλειοψηφία αυτών των *T3SPs* έχουν αποδειχθεί ότι έχουν δραστηριότητα τελεστών με βάση διάφορα κριτήρια, είτε με την επαγωγή *HR* σε ένα ή περισσότερα φυτικά είδη, είτε με την θετική συμβολή στην παθογένεια σε συγκεκριμένα παθοσυστήματα φυτο-βακτηρίων. Αν και έχουν προταθεί υποθετικά καταλυτικά μοτίβα για μερικούς από αυτούς, η ακριβής λειτουργία/ες και οι υπό-κυτταρικοί στόχοι τους δεν έχουν ακόμα πλήρως προσδιοριστεί, εκτός από λίγες εξαιρέσεις. Η ανικανότητα των *T3SPs* που μελετήθηκαν εδώ να επάγουν *HR* ή άλλα μακροσκοπικά συμπτώματα σε φυτά *N. benthamiana* 16C μας επέτρεψε να ερευνήσουμε τον φαινότυπο ενίσχυσης της σίγησης, ελλείψει των νεκρωτικών αντιδράσεων, όπως αυτές που χαρακτηρίζουν την *HR*. Ο έλεγχος της δραστηριότητας αυτής έγινε με την μελέτη των μεταβολών στον φθορισμό της *GFP* στα αγροεμποτισμένα φύλλα, παράλληλα με τους κατάλληλους μάρτυρες. Για τρεις από τους *T3SPs* που μελετήθηκαν λεπτομερέστερα, ο φαινότυπος ενίσχυσης της σίγησης αρχικά βασίστηκε στην παρατήρηση των μεταβολών του φθορισμού της *GFP* σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα μετά τον αγροεμποτισμό (4-8 dpi) και επιβεβαιώθηκε στη συνέχεια με την ανίχνευση των επιπέδων των *siRNA* που αντιστοιχούν στην *GFP* στις περιοχές αγροεμποτισμού φύλλων του φυτού *N. benthamiana* 16C καθώς και των *nat-siRNAs* και *lsiRNAs* σε φύλλα του φυτού *A. thaliana*. Η ανίχνευση των παραπάνω μικρών *RNAs*, καθώς και η μείωση του επιπέδου του *GFP-mRNA* στις περιοχές αγροεμποτισμού στα φύλλα, καθώς και η αναστολή όλων των παραμέτρων (φθορισμός *GFP*, μικρά *RNAs*) που μελετήθηκαν συνιστούν, αθροιστικά, επαρκείς ενδείξεις ότι πρόκειται περί εμπλοκής των εν λόγω τελεστών στο μετά-μεταγραφικό επίπεδο (*post transcriptional gene silencing, PTGS*). Χωρίς όμως αυτό να αποκλείει την εμπλοκή στο επίπεδο της μεταγραφικής σίγησης (*transcriptional gene silencing, TGS*). Ενώ ο ακριβής μηχανισμός της εμπλοκής των *T3SPs* στην σίγηση απαιτεί περαιτέρω μελέτη, η δοκιμή φθορισμού της *GFP* σε αυτό ή άλλα είδη φυτών δεικτών μετά από αγροεμποτισμό ή ενδεχομένως, και με άλλη μέθοδο έκφρασης των

T3SPs, αποτελεί κατάλληλο εργαλείο για την ανίχνευση πιθανής δραστικότητα σίγησης των T3SPs.

Οι βακτηριακοί ενισχυτές της RNA σίγησης (*Bacterial Enhancers of RNA Silencing-BERSs*) που μελετήθηκαν λεπτομερέστερα (*HopX1*, *HopAB1* και *HopF2*) έδωσαν την ισχυρότερη ενίσχυση της σίγησης της *GFP*, στο φυτό *N. benthamiana* σειρά 16c, η οποία προκαλείται από την παροδική υπερέκφραση της κασσέτας *35S::GFP*. Δεδομένου ότι οι T3SPs που είναι λειτουργικοί σε αυτήν την δοκιμή δεν προκαλούν HR στην *N. benthamiana*, οι παρατηρηθείσες μεταβολές στον φθορισμό της *GFP* είναι απίθανο να οφείλονται στην κατάρρευση του φυτικού ιστού προκαλούμενη από τους T3EPs μετά τον αγροεμποτισμό. Είναι κατανοητό ότι η ενδοκυτταρική συσσώρευση των T3EPs μπορεί να προκαλέσει άλλους τύπους στρες στα κύτταρα. Εντούτοις, η αντιστροφή του φαινοτύπου των BERSs από την συν-έκφραση διαφορετικών φυτοικών καταστολέων της σίγησης, είναι πρόσθετη απόδειξη για την επίδραση των T3SPs στον σιγητικό μηχανισμό των φυτών.

Η παρέμβαση των βακτηριακών παθογόνων στον μηχανισμό γονιδιακής σίγησης των φυτών έχει δείχτει στα πλαίσια συμβατών αλλά και ασυμβάτων αλληλεπιδράσεων βακτηρίων-φυτών. Η *Katiyar-Agarwal* και οι συνεργάτες της (2006, 2007) χρησιμοποιώντας ένα παθογόνο (συμβατό) βακτηριακό στέλεχος το οποίο μετέτρεψαν σε αμολυσματικό (ασύμβατο) με την μεταφορά σε αυτό ενός ετερόλογου T3SP (του *AvrRpt2*) από στέλεχος του ετερόλογου παθογόνου *P. syringae* pv. *pisii*. Ο εν λόγω T3SP αναγνωρίζεται από την πρωτεΐνη ανθεκτικότητας RPS2 που είναι ένας υποδοχέας της *Arabidopsis* με μοτίβο κινάσης. Επίσης ο *Navarro* και οι συνεργάτες του (2008) έδειξαν ότι μερικοί T3SPs του συμβατού στελέχους *Pst* DC3000 έχουν τη δυνατότητα να καταστέλλουν τη συσσώρευση *miRNAs* στην *Arabidopsis*, μετά από παροδική έκφραση τους με την μέθοδο του αγροεμποτισμού. Τα δικά μας αποτελέσματα επεκτείνουν αυτές τις μελέτες, με την κατάδειξη της δυνατότητας μεμονωμένων T3SPs του βακτηριακού είδους *P. syringae* να ενισχύουν τη συσσώρευση των *siRNA* σε ένα άλλο φυτό μοντέλο (*N. benthamiana*), αποκαλύπτοντας μια νέα λειτουργία για αυτές τις βακτηριακές πρωτεΐνες.

Προκειμένου να οριοθετήσουμε στις T3EPs την περιοχή που ευθύνεται για την ενίσχυση της σίγησης, χρησιμοποιήσαμε μεταλλάγματα της *HopAB1* και της *HopX1*. Η πρωτεΐνη *HopAB2* (ομόλογη της *HopAB1* που χρησιμοποιούμε στην μελέτη μας) είναι πολύλειτουργικός τελεστής, με τρεις διακριτές λειτουργικές περιοχές (*Abramovitch, et al. 2005*). Το καρβοξυτελικό άκρο της *HopAB2* (*C-terminal Domain-CTD*) από το

αμινοξύ 308 έως το 535 είναι επαρκές για την καταστολή του *PCD* σχετιζόμενου με την επαγωγή της *HR*, ενώ τα τελικά 44 αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης είναι απαραίτητα για την καταστολή του κυτταρικού θανάτου στην τομάτα. Επίσης, τα αμινο-τελικά αμινοξικά κατάλοιπα 1-387 του *HopAB2* αναγνωρίζονται από τον παράγοντα ανθεκτικότητας *Fen* που υπάρχει σε ορισμένες ποικιλίες τομάτας, με αποτέλεσμα την πρόκληση *PCD* σχετιζόμενο με την ανοσιακή απόκριση (Abramovitch, et. al. 2003). Το *CTD* έχει καταδειχθεί δραστικότητα *E3 ligase in vitro* (Janjusevic, et. al. 2006), πιο συγκεκριμένα ουμπικουτινώνει (*ubiquitinating*) τον παράγοντα *Fen* με αποτέλεσμα να προωθείται η πρωτεοσωμική του αποδόμηση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να καθιστά τα φυτά τομάτας που εκφράζουν το *Fen* σε ευπαθή σε μολύνσεις από το βακτήριο *Pst* DC3000 (Janjusevic et. al., 2007). Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή ομολογία και την παρόμοια δευτεροταγή δομή των περιοχών της *HopAB1* επιδιώξαμε να προσδιορίσουμε τις περιοχές που είναι αρμόδιες για το φαινότυπο *BERS*. Έτσι, το *CTD* της πρωτεΐνης *HopAB1* έδειξε πλήρη ικανότητα ενίσχυσης της σίγησης της *GFP*. Στην περίπτωση του *HopX1*, η ικανότητα της ενίσχυσης της σίγησης φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από τα υποθετικά κέντρα αλληλεπίδρασης με φυτικές πρωτεΐνες, που προτείνονται από την ομάδα του Dr. J. Dangl (Nimchuk et. al., 2007).

Ο Dunoyer και οι συνεργάτες του (Dunoyer, et. al. 2006) έδειξαν ότι μεταλλάγματα της *A. thaliana* σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεϊνικά συστατικά του σιγητικού μηχανισμού (μεταλλαγές στην *RNA* εξαρτώμενη *RNA* πολυμεράση *-rdr6*) όπως και σειρές υπερέκφρασης του ικού καταστολέα της σίγησης *p38*, ήταν υπερβολικά-ευαίσθητες στο σχηματισμό καρκινικού κάλου από φυσικού τύπου αγροβακτήρια. Συνεπώς, υποθέσαμε ότι οι *BERS*-ενεργές πρωτεΐνες ίσως ενισχύσουν την ανθεκτικότητα των φυτών στην αγροβακτηριακή ογκογένεση. Διαπιστώσαμε ότι η παρουσία της κασσέτας έκφρασης *35S::HopX1* στο αγρίου τύπου στέλεχος του *A. tumefaciens* A281, παρεμπόδισε το σχηματισμό καρκινικού κάλου σε μίσχους φύλλων του φυτού *N. benthamiana*.

Οι μελέτες μας εγείρουν μια σειρά από ενδιαφέροντα ερωτήματα για περαιτέρω διερεύνηση. Κατ' αρχάς, πώς οι *BERSs* εμπλέκονται στον μηχανισμό γονιδιακής σίγησης των φυτών, σε μοριακό επίπεδο και πώς αυτό επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην καταστολή των αμυντικών μηχανισμών των ξενιστών; Δεύτερον, πώς τα βακτηριακά παθογόνα χρησιμοποιούν τους *BERSs* στα πλαίσια της παθογένειας; Στα πειράματά μας, οι διαφορές στην ένταση του φθορισμού της *GFP* παρατηρήθηκαν αρχικά στις 4 *dpi*. Στις δοκιμές αγρο-εμποτισμού, η πλήρης έκφραση

Αποτελέσματα

των παροδικά εκφραζόμενων γονιδίων (*transgenes*) εξελίσσεται σε διάστημα αρκετών ημερών. Δεδομένου ότι πολλά φυτικά γονίδια σχετικά με τις ασθένειες επάγονται σε αρχικά στάδια της μόλυνσης, είναι ενδιαφέρον να μελετηθεί εάν ο φαινότυπος που προκαλείται από τους *BERSs* εκδηλώνεται σε αρχικά στάδια της παθογένειας. Τρίτον, πόσο διαδεδομένη είναι η ικανότητα της ενίσχυσης της γονιδιακής σίγησης σε πρωτεΐνες τελεστές που απαντώνται σε άλλα γονιδιώματα φυτοπαθογόνων; Βιοπληροφορική αναζήτηση σε πλήρως ή μερικώς αλληλουχημένα γονιδιώματα φυτοπαθογόνων βακτηρίων αποκαλύπτει την παρουσία μεγάλου αριθμού *T3SPs* που εμφανίζουν ομολογία με τις πρωτεΐνες *BERS*. Παραδείγματος χάριν, η *Psph* 1448A έχει κωδικά γονίδια για τις πρωτεΐνες *HrAB1* και την *HopF2* (καθώς επίσης και την *HopX1* αλλά με μια σημειακή μεταλλαγή άγνωστης φαινοτυπικής σημασίας). Επιπλέον, ορισμένοι *T3SPs* συμπεριφέρονται ως καταστολείς της σίγησης στις αναλύσεις μας (π.χ. *AnrRps4*). Τέταρτον, χρησιμοποιούν τα παθογόνα βακτήρια γενικά (και ενδεχομένως οι μύκητες) *BERS*-ενεργές πρωτεΐνες στη στρατηγική παθογένεσης; Πέμπτον, δεδομένου ότι το σύστημα έκκρισης τύπου III είναι διαδεδομένο στα *Gram*-αρνητικά βακτήρια (*Tampakaki et. al., 2004*), θα ήταν ενδιαφέρον να ερευνηθεί η δυνατότητα των παθογόνων βακτηρίων των θηλαστικών να επιδρούν επίσης στο μηχανισμό της *RNA* επαγόμενης σίγησης για να προκαλέσουν ασθένεια στους αντίστοιχους ξενιστές τους. Τέλος, θα μπορούσαν οι πρωτεΐνες που ενισχύουν τη σίγηση να αποτελέσουν χρήσιμο εργαλείο γενετικής μηχανικής για την δημιουργία ανθεκτικών φυτών σε φυτοπαθογόνους ιούς.

Υλικά και Μέθοδοι

Όλοι οι χειρισμοί DNA για την κατασκευή πλασμιδίων έγιναν σε γενικά πλαίσια σύμφωνα με τις μεθόδους μοριακής βιολογίας που περιγράφονται στο εγχειρίδιο *Molecular cloning* (Sambrook, et. al. 1989). Τυχόν εξειδικευμένα πρωτόκολλα περιγράφονται στα επόμενα εδάφια ή στις τεχνικές οδηγίες χρήσης των εταιριών προμήθειας.

Απομόνωση ολικού RNA από φυτικό ιστό με την χρήση του TRIZOL

Η διαδικασία υλοποιήθηκε ως εξής:

α. Ιστός

Ομογενοποίηση των δειγμάτων ιστού σε 1-1,5 ml του αντιδραστηρίου TRIZOL ανά 50-150 mg του ιστού. Ο όγκος δειγμάτων δεν πρέπει να υπερβεί 10% του όγκου του αντιδραστηρίου TRIZOL (*TRIZOL® Reagent, Cat. No. 15596-018*) που χρησιμοποιείται για την ομογενοποίηση.

Προαιρετικά: ένα πρόσθετο βήμα καθαρισμού μπορεί να απαιτηθεί για δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, λίπος, πολυσακχαρίτες ή εξωκυττάριο υλικό όπως οι μύες και κόνδυλοι των φυτών. Μετά από την ομογενοποίηση, αφαιρείται το αδιάλυτο υλικό από το ομογενοποιημένο με φυγοκέντριση στις 12.000×g για 10 λεπτά στους 2 με 8°C. Το ίζημα που προκύπτει περιέχει τις κυτταρικές μεμβράνες, τους πολυσακχαρίτες, και υψηλού μοριακού βάρους DNA, ενώ το υπερκείμενο περιέχει το RNA.

β. Φάση Διαχωρισμού

Επώαση των ομογενοποιημένων δειγμάτων για 5 λεπτά στους 15 με 30°C για πλήρη διαχωρισμό των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων. Προσθέτουμε 0,2 ml χλωροφόρμιο ανά 1 ml αντιδραστηρίου TRIZOL. Αναδεύουμε τα σωληνάκια με τα δείγματα σθεναρά με το χέρι για 15 δευτερόλεπτα και τα επωάζουμε στους 15 με 30°C για 2 έως 3 λεπτά. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα σε όχι περισσότερες από 12.000×g για 15 λεπτά στους 2 με 8°C. Μετά από τη φυγοκέντριση, το μίγμα έχει διαχωριστεί σε μία κατώτερη κόκκινη φάση (τη φάση φαινόλης-χλωροφορμίου), μια ενδιάμεση φάση, και μια άχρωμη ανώτερη υδάτινη φάση. Το RNA βρίσκεται στην ανώτερη υδάτινη φάση. Ο όγκος της υδάτινης φάσης είναι περίπου το 60% του όγκου του αντιδραστηρίου TRIZOL που χρησιμοποιήσαμε αρχικά για την ομογενοποίηση.

γ. Κατακρήμνιση του RNA

Μεταφέρουμε την υδάτινη φάση σε νέο σωληνάκι τύπου *eppendorf*, και φυλάσσουμε την οργανική φάση εάν επιδιώκουμε την μετέπειτα απομόνωση του DNA ή των πρωτεϊνών του δείγματος. Κατακρημνίζουμε το RNA από την υδάτινη φάση με τη χρήση απόλυτης ισοπροπανόλης. Χρησιμοποιούμε 0,5 ml ισοπροπανόλης για κάθε 1 ml αντιδραστηρίου TRIZOL που χρησιμοποιείται για την αρχική ομογενοποίηση. Επωάζουμε τα δείγματα στους 15 με 30°C για 10 λεπτά και φυγοκεντρούμε σε όχι περισσότερες από 12.000×g για 10 λεπτά στους 2 με 8°C. Το ίζημα RNA, συχνά αόρατο πριν από τη φυγοκέντριση, διαμορφώνει μία κολλοειδή πελλέτα στην μία πλευρά και τον πυθμένα του σωλήνα *eppendorf*.

Προαιρετικά: Η ακόλουθη τροποποίηση στην κατακρήμνιση του RNA (βήμα γ) αφαιρεί παράγοντες που πιθανόν μολύνουν το απομονωμένο RNA. Προσθέτουμε στην υδάτινη φάση 0,25 ml ισοπροπανόλης και ακολουθεί προσθήκη 0,25 ml ενός διαλύματος κατακρήμνισης υψηλής αλατότητας (0,8 M sodium citrate και 1,2 M NaCl) ανά 1 ml αντιδραστηρίου TRIZOL που χρησιμοποιήσαμε για την αρχική ομογενοποίηση.

Υλικά και Μέθοδοι

Αναμιγνύουμε το προκύπτον διάλυμα, φυγοκεντρούμε και συνεχίζουμε την απομόνωση όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο. Η τροποποίηση αυτή βοηθάει στην αποτελεσματική κατακρήμνιση του RNA, διατηρώντας τους πολυσακχαρίτες και τις πρωτεογλυκάνες (proteoglycans) σε διαλυτή μορφή. Ένας συνδυασμός της τροποποιημένης κατακρήμνισης με την πρόσθετη φυγοκέντριση αμέσως μετά την ομοιογενοποίηση επιτρέπουν την απομόνωση καθαρού RNA από φυτικό ιστό που περιέχει πολύ υψηλά επίπεδα πολυσακχαριτών.

δ. Πλύση του RNA

Αφαιρούμε το υπερκείμενο. Πλένουμε την πελλέτα του RNA μία φορά με 75% αιθανόλη, προσθέτοντας τουλάχιστον 1 ml αιθανόλης 75% για κάθε 1 ml αντιδραστηρίου TRIZOL που χρησιμοποιήσαμε για την αρχική ομοιογενοποίηση. Αναμιγνύουμε το δείγμα σε συσκευή vortex και φυγοκεντρούμε σε όχι περισσότερες από 7.500×g για 5 λεπτά στους 2 με 8 °C.

ε. Επαναδιάλυση του RNA

Στο τέλος της διαδικασίας, στεγνώνουμε εν συντομία το ίζημα του RNA (στέγνωμα με αέρα ή με την χρήση κενού για 5-10 λεπτά). Δεν στεγνώνουμε το RNA με φυγοκέντριση υπό κενό. Είναι σημαντικό να μην αφηθεί η πελλέτα του RNA να στεγνώσει εντελώς δεδομένου ότι αυτό θα μειώσει πολύ τη διαλυτότητά της. (Τα μερικώς διαλυμένα δείγματα RNA έχουν μια αναλογία απορρόφησης A260/280 < 1.6). Επαναδιαλύουμε το RNA στο RNase-free νερό ή σε διάλυμα 0,5% SDS και επωάζουμε για 10 λεπτά στους 55 με 60 °C. (αποφεύγουμε το SDS εάν το RNA χρησιμοποιηθεί σε ενζυμικές αντιδράσεις). Το RNA μπορεί επίσης να επαναδιαλυθεί σε 100% φορμαμίδιου (απιονισμένου) και να αποθηκευτεί στους -80C.

Ανάλυση κατά Northern.

A. Ανάλυση ολικού RNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα δείγματα RNA (έως 20-30μg) αναμιγνύονται με ίσο όγκο διαλύματος φόρτωσης (1x MOPS buffer, 50% φορμαμίδη, 8% φορμαλδεΰδη, 0.02% μπλε βρωμοφαινόλης). Για την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA βράζουμε τα δείγματα για 5 min σε *bain-marie*. Στην συνέχεια μεταφέρουμε τα δείγματα αμέσως σε πάγο και κατόπιν τα φορτώνουμε στο πήκτωμα αγαρόζης. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 100V σε διάλυμα 1x MOPS (3-*N-morpholino*) *propanesulfonic acid*, 6% φορμαλδεΰδη. Στην συνέχεια, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA ακολουθεί χρώση του πηκτώματος αγαρόζης με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογράφησή του σε λάμπα UV.

Ακολουθεί μεταφορά του RNA σε νάιλον μεμβράνη υβριδοποίησης Nytran® N (Schleicher & Schuell) με την κλασική μέθοδο του τριχοειδούς μεταφοράς (capillary-blotting) σύμφωνα με τους Sambrook, *et. al.* (1989). Η μονιμοποίηση των μεταφερομένων μορίων RNA στην μεμβράνη επιτυγχάνεται με την επίδραση UV ακτινοβολίας (120 mJoules/30 sec). Η μεμβράνη φυλάσσεται σε άνυδρο περιβάλλον μέχρι την υβριδοποίηση με τον κατάλληλο ραδιοσημασμένο ανιχνευτή.

Πήκτωμα αγαρόζης: Διαλύουμε 1gr αγαρόζης σε 74 ml H₂O. Στο σχεδόν κρύο διάλυμα προσθέτουμε 16 ml φορμαλδεΰδης και 10 ml 10x MOPS buffer (0.2 M MOPS, 50 mM οξικό νάτριο, 10 mM EDTA).

B. Υβριδοποίηση μεμβράνης

Για την υβριδοποίηση της μεμβράνης απαιτείται η διαδικασία της προϋβριδοποίησης. Η προϋβριδοποίηση είναι το στάδιο εκείνο όπου ελαχιστοποιείται η πιθανότητα της μη-εξειδικευμένη πρόσδεση του ραδιοσημασμένου ανιχνευτή. Στην φάση αυτή η μεμβράνη τοποθετείται σε κύλινδρο υβριδοποίησης με το κατάλληλο διάλυμα

Διδακτορική Διατριβή Π. Φ. Σαρρής

προϋβριδοποίησης. Στο διάλυμα προσθέτουμε διάλυμα Denhard που λειτουργεί ως αποτρεπτικό της μη-ειδικής πρόσδεσης του σημασμένου ανιχνευτή. Διαδικαστικά, η μεμβράνη τοποθετείται προσεκτικά σε κύλινδρο υβριδοποίησης προσθέτοντας διάλυμα προϋβριδοποίησης τελικού όγκου 20 ml: 2x SSC [(20x) 3M NaCl, 0,3 M sodium citrate, pH=7.0 με NaOH], 0.5% SDS (10%), 0,625x Denhards solution [(50x) 10% φικόλη, 10% BSA, 10% PVP] και (προαιρετικά 0,1 mgr/ml tRNA [10 mgr/ml]).

Η προϋβριδοποίηση διαρκεί περίπου 1,5-2 h στους 65 °C υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθεί αποδιάταξη του ραδιοσημασμένου ανιχνευτή για 5 λεπτά στους 100 °C, και μεταφορά άμεσα σε πάγο. Έπειτα φυγοκεντρούμε το διάλυμα του αποδιαταγμένου ανιχνευτή στιγμιαία και το αναμειγνύουμε με φρέσκο διάλυμα υβριδοποίησης προθερμασμένο στους 68 °C, αντικαθιστώντας με αυτό το διάλυμα προϋβριδοποίησης. Η υβριδοποίηση διαρκεί 12-16 h (overnight) στους 65 °C.

Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύματος υβριδοποίησης και πλύσιμο της μεμβράνης δύο φορές για 15 min σε διάλυμα 2xSSC και 0,2 % SDS. Το παραπάνω διάλυμα διευκολύνει την απομάκρυνση των μη-δεσμευμένων ραδιενεργών μορίων του ανιχνευτή από την μεμβράνη. Τέλος η μεμβράνη κλείνεται σε ειδική σακούλα νάilon (πλαστικοποιείται), προκειμένου να διατηρηθεί υγρή και τοποθετείται σε μεταλλική θήκη (κασσέτα) για έκθεση. Στην κασσέτα τοποθετείται κατάλληλο φιλμ και ολόκληρη η συσκευή παραμένει για όσο διάστημα χρειαστεί (σε αυτή τη περίπτωση 2-5 ημέρες) στους -80 °C.

Γ. Σήμανση DNA ανιχνευτή με την μέθοδο του *random priming*

Ποσότητα DNA προς σήμανση (10-100 ng σε όγκο 7.5 μl) αναμειγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης LS (11.5 μl), που περιέχει τα τυχαίας αλληλουχίας εξαμερή και μη σημασμένα νουκλεοτίδια. Τα τυχαία εξαμερή είναι εξαμερή τυχαίας αλληλουχίας κάποια από τα οποία αναμένεται να έχουν αλληλουχία συμπληρωματική με το DNA που χρησιμοποιούμε ως εκμαγείο για σύνθεση, με αποτέλεσμα να δράσουν ως εκκινητές σύνθεσης νέου DNA με το ένζυμο Klenow DNA-πολυμεράση. Η Klenow πολυμεράση είναι ένα θραύσμα της DNA πολυμεράσης I του βακτηρίου *E. coli* το οποίο δεν έχει 5'→3' εξωνουκλεολυτική δράση.

Αρχικά βράζουμε το διάλυμα που περιέχει το DNA στους 95 °C με σκοπό την αναδιάταξη του. Στην συνέχεια τοποθετούμε στον πάγο προς αποφυγή επαναδιάταξης των μορίων, και στην συνέχεια προσθέτουμε τα υπόλοιπα διαλύματα. Η αντίδραση της σήμανσης διαρκεί 3 h στους 37 °C.

LS: περιέχει 25 μέρη HEPES 1M pH=6,5 (το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης): 25 μέρη DTM (περιέχει τα μη σημασμένα νουκλεοτίδια: 0,1 mM dGTP, 0,1 mM TTP σε 250mM Tris-HCl pH=8, 25 mM MgCl₂, 50 mM β-mercaptoethanol]: 7 μέρη OL (περιέχει τα τυχαία εξαμερή: 1 mM Tris-HCl pH=7,5, 1 mM EDTA, 90 units/ml random primers), 2 μl γ-p32-dCTP και γ-p32-dATP, 5 μονάδες Klenow, 1 μg/ml BSA σε συνολικό όγκο αντίδρασης: 25 μl.

Δ. Απομάκρυνση μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων μέσω διέλευσης από στήλη χρωματογραφίας και μέτρηση της ραδιοσήμανσης.

Με το πέρας της αντίδρασης σήμανσης στους 37°C το μίγμα της αντίδρασης ρυθμίζεται σε τελικό όγκο 100 μl και διέρχεται από στήλη χρωματογραφίας διήθησης Sephadex G-50 για την απομάκρυνση των μη ενσωματωμένων ραδιοσημασμένων νουκλεοτιδίων. Εναλλακτικά μπορούμε να περάσουμε το μείγμα με φυγοκέντριση από ειδική κολόνα καθαρισμού η οποία περιέχει σφαιρίδια agar. Ακολουθεί μέτρηση της ραδιοσήμανσης του ανιχνευτή σε μετρητή υγρού σπινθηρισμού (liquid scintillation counter).

Ανίχνευση siRNAs μετά από ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Για την ανίχνευση των siRNA το εκχύλισμα ολικού RNA από φυτικό ιστό υποβάλλεται σε ηλεκτροφόρηση, σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Το πήκτωμα περιέχει ουρία η οποία έχει την ιδιότητα να αποδιατάσσει τις δίκλωνες δομές των μορίων του RNA. Επίσης περιέχει 12% ακρυλαμίδα, συγκέντρωση που είναι κατάλληλη για τον διαχωρισμό μικρών μορίων RNA μήκους 23-25 νουκλεοτιδίων. Το πήκτωμα παρασκευάζεται από μείγμα μόνο και δις-ακρυλαμίδης σε αναλογία 38:2 αντίστοιχα. Η δις-ακρυλαμίδα βοηθά τον πολυμερισμό των μορίων της μόνο-ακρυλαμίδης που αποτελούν το πλέγμα του πηκτώματος. Οι πολυμεριστές APS (Ammonium persulfate) και το TEMED (N'N'N'N'-tetramethylethylen-diamin) δημιουργούν ενεργές ρίζες (radicals) που ξεκινούν την διαδικασία πολυμερισμού.

Ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης επιτυγχάνεται μεταξύ δυο ορθογωνίων υάλινων πλακών πάχους 2 mm και στο πάνω μέρος πριν το πολυμερισμό τοποθετείται ειδικό πλαστικό κατάλληλου πάχους και θέσεων, το οποίο σχηματίζει τα «πηγάδια» όπου θα φορτωθούν τα δείγματα.

Πριν την χρήση το πήκτωμα προθερμαίνεται με σύνδεση στην ηλεκτροφορητική συσκευή, χωρίς δείγματα, σε διάλυμα TBE (0.5x) στα 45-50 mA μέχρι η θερμοκρασία να φτάσει στους 50°C. Η θέρμανση εξασφαλίζει την διατήρηση των δειγμάτων σε μονόκλινη μορφή. Η ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση μεταλλικής πλάκας στη συσκευή.

Πριν την ηλεκτροφόρηση, στα δείγματα RNA προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φόρτωσης (loading buffer), και ακολουθεί θέρμανση στους 75°C για 5 min και άμεση σύντομη ψύξη στους 0°C.

Οι θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων στο πήκτωμα ξεπλένονται από τα υπολείμματα ουρίας πριν την τοποθέτηση των δειγμάτων. Η συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι 45 mA σταθερή ένταση ρεύματος, 800V τάση και θερμοκρασία μεταξύ 50-55 °C. Η ηλεκτροφόρηση σταματά όταν η χρωστική του διαλύματος φόρτωσης των δειγμάτων φτάσει περίπου 5 cm πριν το τέλος του πηκτώματος.

Αποδιατακτικό πήκτωμα: περιέχει, 17 ml του μείγματος πολυακρυλαμίδης (12%), 15 ml RNase free αποστειρωμένου H₂O, 25,22 gr ουρία (25,22 w/w), 6 ml TBE (Tris-boric acid EDTA) (0.3x), 0.05 ml TEMED και 0.25 ml APS 10%.

Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer): αποτελείται από 95% φορμαμίδα, 1mM EDTA (ethylene-diamine tetra-acetate) pH=8.0, 0.1% κυανού της βρωμοφαινόλης και 0.1% κυανού του ξυλενίου.

ΣΤ. Μεταφορά σε μεμβράνη υβριδοποίησης με την χρήση συσκευής *Semi-dry transfer* (για 12-15% siRNAs PAA gels)

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ξεπλένουμε το gel με 1x TBE για 10 min ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα ουρίας (αποφεύγεται η παρατεταμένη χρώση με EtBr και το ξέπλυμα γιατί τα μικρά RNAs διαχέονται εύκολα από την μήτρα του πηκτώματος).

Εκτέλεση:

Τοποθετούμε 6 φύλλα χαρτιού Whatman, εμβαπτισμένα σε 1x TBE, στην κάτω πλάκα της συσκευής ημι-ξηρής μεταφοράς (semi-drier). Μεταφέρουμε τη μεμβράνη (με πόρους όχι μεγαλύτερους από 20nm) εμβαπτισμένη σε 1x TBE. Στην συνέχεια τοποθετούμε το πήκτωμα και πάνω σε αυτό τα 6 φύλλα χαρτιού Whatman εμβαπτισμένα σε 1x TBE. Κλείνουμε το καπάκι της συσκευής, βιδώνουμε προσεκτικά και μεταφέρουμε το σύστημα σε δωμάτιο χαμηλής θερμοκρασίας (cold-Room, 5 °C).

Για τον καθορισμό του παρεχόμενου ρεύματος στη συσκευή ημι-ξηρής μεταφοράς πρέπει να υπολογίσουμε ότι στο εμβαδόν του πηκτώματος, για κάθε cm² αντιστοιχούν

Διδακτορική Διατριβή Π. Φ. Σαρής

3mA (ύψος x πλάτος x 3 = συνολικά mA). Αφού ρυθμίσουμε την συσκευή, τη θέτουμε σε λειτουργία για ακριβώς 30 min (όχι περισσότερο γιατί τα μικρά RNAs διαπερνούν την μεμβράνη και χάνονται).

Προσοχή:

1. Δεν ξεπλένουμε την πλάκα της συσκευής ημι-ξηρής μεταφοράς με αιθανόλη
2. Δεν χρησιμοποιούμε TBE στο οποίο το pH έχει ρυθμιστεί με οξύ ή βάση (αυτό καταστρέφει τις μεταλλικές πλάκες της συσκευής)
3. Στην συσκευή τοποθετούμε πρώτα την μεμβράνη και μετά το πήκτωμα (το αντίθετο θα κάψει την μεμβράνη).
4. Ελέγχουμε τα ηλεκτρόδια να είναι πάντοτε σωστά τοποθετημένα, (μαύρο→μαύρο πόλο, κόκκινο→κόκκινο πόλο).

Πλύσιμο μεμβράνης

Συνθήκες πλύσης της μεμβράνης για υβριδοποίηση Southern:

1. 2x με 2x SSC για 15 λεπτά κάθε φορά στους 65 °C
2. 2x με 2x SSC/0.1% SDS -προθερμασμένου στους 65 °C- για 15 λεπτά στους 65 °C
3. 2x με 1x SSC/0.5% SDS -προθερμασμένου στους 65 °C- για 15 λεπτά στους 65 °C
4. 2x 0.5x SSC/1 % SDS -προθερμασμένου στους 65 °C- για 15 λεπτά στους 65 °C

Συνθήκες πλύσης της μεμβράνης για υβριδοποίηση Northern:

1. 2x με 2x SSC για 15 λεπτά κάθε φορά στους 65 °C
 2. 2x με 2x SSC/0.5% SDS -προθερμασμένου στους 65 °C- για 15 λεπτά στους 65 °C
 3. 2x με 0,1x SSC/0.1% SDS -προθερμασμένου στους 65 °C- για 15 λεπτά στους 65°C.
- Τα δυο τελευταία βήματα (ή το τελευταίο στην περίπτωση υβριδοποίησης Northern) είναι προαιρετικά και παραλείπονται στην περίπτωση της ύπαρξης εντοπισμένων σημάτων και απουσίας «θορύβου» ραδιενέργειας στη μεμβράνη λόγω μη ειδικής πρόσδεσης του ανιχνευτή. Η έκθεση του φιλμ αυτοραδιογραφίας (X-RAY film) πραγματοποιείται στους -80 °C σε ειδικά διαμορφωμένες οθόνες ενίσχυσης σήματος (intensities screens) και διαρκεί από λίγες ώρες έως μερικές ημέρες .

RT-PCR.

Η μέθοδος αυτή είναι μια παραλλαγή της κλασσικής αντίδρασης πολυμεράσης σε συνδυασμό με την αντίστροφη μεταγραφή μορίων mRNA σε DNA. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο εκλεκτικός πολλαπλασιασμός μιας αλληλουχίας που καθορίζεται από δυο εκκινητές με την χρήση εκχυλίσματος ολικού ή mRNA ως μήτρα. Η RT-PCR περιλαμβάνει ένα πρώτο βήμα πολυμερισμού DNA χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα RNA με την δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, ακολουθούμενο από αποικοδόμηση του RNA με την δράση της RNase H, και στην συνέχεια συμβατική αλυσιδωτή αντίδραση DNA-πολυμεράσης. Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της μεθόδου. Στην πρώτη η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής είναι μηχανιστικά και χωροχρονικά διαχωρισμένη από την αντίστοιχη της αλυσιδωτής αντίδρασης DNA-πολυμεράσης ενώ στην δεύτερη το μείγμα της αντίδρασης είναι κοινό για τα δυο ένζυμα, απλά η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής και του πολυμερισμού στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης συμβαίνουν διαδοχικά με αλλαγή της θερμοκρασίας (η Taq πολυμεράση έχει μικρή ενεργότητα στην άριστη θερμοκρασία δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης). Αρχικά, εκκινητές (oligo -dT ή τυχαία εξαμερή ή εκκινητής ειδικός για την προς ενίσχυση αλληλουχία) και RNA (η ποσότητα του RNA καθορίζεται από το ένζυμο που χρησιμοποιείται, στην περίπτωση της Thermoscript reverse transcriptase η απαιτούμενη ποσότητα είναι 2 μg RNA) αποδιατάσσεται στους 65 °C για 5 λεπτά και ακολούθως τοποθετούνται στο σωλήνα

Υλικά και Μέθοδοι

αντίδρασης στους 4 °C. Το μείγμα της αντίδρασης έχει τελική συγκέντρωση 50 mM Tris acetate (pH 8.4), 75 mM potassium acetate, 8 mM magnesium acetate, 0.5 mM dNTPs, 5 mM DTT, 40 μονάδες RNase inhibitor, 1.5 μονάδες Reverse transcriptase. Στο μείγμα RNA-εκκινήτων προστίθεται ο κατάλληλος όγκος από το μείγμα της αντίδρασης και η αντίδραση συνεχίζεται στους 37-50 °C (ανάλογα με το ένζυμο που χρησιμοποιούμε) για 1-2 ώρες.

Μετασηματισμός Αγροβακτηριακών κυττάρων με την μέθοδο ψύξης-απόψυξης (*Freeze-throw*).

Καλλιέργεια Αγροβακτηριακού στελέχους μικρής κλίμακας, που προήλθε από εμβολιασμό μοναδιαίας αποικίας σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (με τα κατάλληλα αντιβιοτικά), χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 100 ml LB σε φιάλη του 1 lit. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται στους 28 °C με συνεχή ανάδευση μέχρι η οπτική πυκνότητα να αντιστοιχεί σε 5×10^8 - 10^9 κύτταρα/ml. Τα αγροβακτηριακά κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4 °C και το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε παγωμένο διάλυμα 1ml/10ml 20 mM CaCl₂ όγκου καλλιέργειας. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, επαναιώρηση του ιζήματος σε 2ml/100 ml καλλιέργειας διαλύματος 20 mM CaCl₂/10% γλυκερόλη. Το αιώρημα κατανέμεται σε ποσότητα 100-150μl σε προψυγμένους σωλήνες Eppendorf και ακολουθεί άμεση ψύξη σε υγρό άζωτο και διατήρηση στους -80°C.

Για κάθε μετασηματισμό αποψύχεται ποσότητα 100-150 μl κυττάρων σε πάγο, αναμειγνύεται με 1-1.5 μg πλασμιδίου και επωάζεται στον πάγο για 15 λεπτά. Ακολουθεί ακαριαία κατάψυξη σε υγρό άζωτο για 5 λεπτά και άμεση απόψυξη για 25 λεπτά στους 37 °C. Στην συνέχεια προστίθεται ποσότητα υγρού θρεπτικού και τα κύτταρα επωάζονται με ανακίνηση στους 28 °C για 3-4 h. Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση στις 3000 rpm και επίστρωση σε τρυβλία θρεπτικού άγαρ με τα κατάλληλα αντιβιοτικά.

Ηλεκτροπόρωση (electroporation).

Η μέθοδος που περιγράφεται χρησιμοποιείται για την παρασκευή ηλεκτρο-δεκτικών κυττάρων *E. coli* ή *Agrobacterium* (Lu, et. al. 2003).

Καλλιέργεια βακτηριακού στελέχους μικρής κλίμακας, που προήλθε από εμβολιασμό μοναδιαίας αποικίας σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (με τα κατάλληλα αντιβιοτικά), χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 0.5 lit του ίδιου θρεπτικού μέσου σε φιάλη των 2 lit. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται μέχρι η οπτική πυκνότητα να αντιστοιχεί στα 5×10^8 κύτταρα/ml. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα επαναιωρείται σε παγωμένο αποστειρωμένο νερό (2 x αρχικού όγκου καλλιέργειας) και επανασυλλέγεται με φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία της πλύσης με παγωμένο αποστειρωμένο νερό στις ίδιες συνθήκες, με σκοπό την απομάκρυνση των αλάτων που επηρεάζουν την ηλεκτρική αγωγιμότητα σε μετέπειτα στάδιο. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά στους 4°C και επαναιωρούνται σε 10% γλυκερόλη (1/10 αρχικού όγκου καλλιέργειας). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και επαναιώρηση των κυττάρων σε τελική πυκνότητα 2×10^{11} κύτταρα/ml. Το κυτταρικό αιώρημα μοιράζεται σε προψυγμένους σωλήνες Eppendorf (100μl), καταψύχονται σε υγρό άζωτο και διατηρούνται στους -80°C.

Αποψυγμένα σε πάγο κύτταρα αναμειγνύονται με 1 μg πλασμδιακού DNA και μεταφέρονται στην κατάλληλη κυψελίδα υπό στείρες συνθήκες. Ακολουθεί μετασηματισμός στις ακόλουθες συνθήκες (*E. coli*: 2.3 kV, 25 μF, 200 Ω, Time constant= 5-5.2 ms; *Agrobacterium*: 2.5 kV, 25 mF, 400 Ω, Time constant=9-9.5 ms). Στην συνέχεια μεταφέρονται σε 1 ml LB χωρίς αντιβιοτικά και επωάζονται για 2-4 h

στους 28 °C (37 °C για το *E. coli*). Αφού συλλεχτούν και συμπυκνωθούν με φυγοκέντρηση χρησιμοποιούνται για την επίστρωση σε τρυβλία με τα κατάλληλα αντιβιοτικά επιλογής.

Αγρο-έγχυση (Agroinfiltration).

Μοναδιαίες αποικίες *Agrobacterium* εμβολιάζονται σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας υγρό θρεπτικό μέσο LB με τα απαραίτητα αντιβιοτικά και 20 μM ακετοσυριγκόνη. Η καλλιέργεια επώαζεται για 1.5-2 μέρες στους 28 °C με συνεχή ανακίνηση. Στην συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά στους 4 °C και επαναιωρούνται σε ίσο όγκο επαγωγικού θρεπτικού MMA για την έκφραση των οπερονίων *vir* του ογκογόνου πλασμιδίου. Ακολουθεί επώαση στους 28 °C για 1-3 h με συνεχή ανακίνηση. Στη συνέχεια συλλέγονται τα κύτταρα με φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και επαναιωρούνται σε 10 mM αποστειρωμένου MgCl₂. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και η διαδικασία επαναλαμβάνεται για δυο ακόμη φορές.

Τελικά επαναιωρούνται τα κύτταρα σε τελική πυκνότητα 5 x 10⁸ κύτταρα/ml. Στην περίπτωση που απαιτείται από το πείραμα (όπως στην περίπτωση του συν-εμποτισμού) γίνεται αγρο-έγχυση με περισσότερα από ένα στελέχη τα οποία αναμειγνύονται σε ίσες ποσότητες (1:1). Με την βοήθεια αιχμηρού αντικειμένου (π.χ. βελόνα από σύριγγα) δημιουργείται οπή στην κάτω επιφάνεια του φύλλου στην οποία προσαρμόζεται σύριγγα (χωρίς βελόνα) η οποία περιέχει το αγροβακτηριακό αιώρημα το οποίο εγχέεται στους μεσοκυττάριους χώρους. Τα φυτά τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης με φωτοπερίοδο 16 hs φως/8 hs σκοτάδι, στους 23/19°C για τέσσερις μέρες, συνθήκες που υποβοηθούν την μεταφορά των T-DNA κασετών από τα *Agrobacterium*, πριν μεταφερθούν σε συνθήκες θερμοκηπίου.

MMA: 10 mM MES pH=5.6 σε MS υγρό, με προσθήκη 200 μM ακετοσυριγκόνης.

MS: Macroelements 100 ml (stock 10x), Microelements 1ml (stock 1000x), Βιταμίνες 1 ml (stock 1000x), FeEDTA 0.042 gr, Sucrose 20 gr.

Βιβλιογραφία

Abramovitch RB, Kim YJ, Chen S, Dickman MB, Martin GB. (2003). *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J*, 22 pp: 60–69.

Abramovitch RB, Martin GB. (2005). AvrPtoB: A bacterial type III effector that both elicits and suppresses programmed cell death associated with plant immunity. *FEMS Microbiol Lett*, 245, pp: 1–8.

Axtel MJ, Bartel DP. (2005). Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *The Plant Cell* 17, pp: 1658-1673.

Baulcombe D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431, pp: 356–363.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM and Hannon GJ (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), pp: 363–366.

Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R and Zhu J-K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* 123. pp: 1279–1291.

Brodersen P and Voinnet O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics*, 22(5), pp: 268-280.

Chapman EJ, Prokhnevsky AI, Gopinath K, Dolja VV and Carrington JC. (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 18, pp: 1179–1186.

Dunoyer P, Lecellier CH, Parizotto EA, Himber C and Voinnet O. (2004). Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16, pp: 1235–1250.

Dunoyer P, Himber C and Voinnet O. (2006). Induction, suppression and requirement of RNA-silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections. *Nature Genetics* 38, pp: 258–263.

Ellendorff U, Fradin EF, de Jonge R and Thomma BPHJ. (2009). RNA silencing is required for *Arabidopsis* defence against *Verticillium* wilt disease. *Jour. Exper. Botany*, Vol. 60, No. 2, pp. 591–602.

Fahlgren N. et al. (2007). High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS ONE* 2, e219.

Felix G, Duran JD, Volko S and Boller T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal*, 18, 3, pp: 265–276.

Guo HS, Ding SW. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J* 21, pp: 398–407.

- Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 21, pp: 4671–4679.
- Havelda Z, Hornyik C, Crescenzi A, and Burgyan J. (2003). In Situ Characterization of *Cymbidium Ringspot Tombusvirus* Infection-Induced Posttranscriptional Gene Silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Jour. of Virol.* 77, 10, pp: 6082–6086.
- Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O. (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* 22, pp: 4523-4533.
- Inoue Y and Takikawa Y. (1999). Investigation of repeating sequences in *hrpL* neighboring region of *Pseudomonas syringae* Strains. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 65, pp: 100-109.
- Janjusevic R., Abramovitch RB, Martin GB, Stebbins CE. (2006). A Bacterial Inhibitor of Host Programmed Cell Death Defenses Is an E3 Ubiquitin Ligase. *Science*, 13; 311(5758), pp: 222-6.
- Jin H. (2008). Endogenous small RNAs and antibacterial immunity in plants. *FEBS Lett.*, doi:10.1016/j.febslet.2008.06.053.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP and Bartel B. (2006). MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 57, pp: 19-53.
- Kamoun S, Hamada W, and Huitema E. (2003). Agrosuppression: A Bioassay for the Hypersensitive Response Suited to High-Throughput Screening. *Mol. Plant-Micr. Interact.* 16, 7–13.
- Katiyar-Agarwal S, Morgan SR, Dahlbeck D, Borsani O, Villegas A Jr, Zhu J-K, Staskawicz BJ, and Jin H. (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 47, pp: 18002–18007.
- Katiyar-Agarwal S, Gao S, Vivian-Smith A and Jin H. (2007). A novel class of bacteria-induced small RNAs in Arabidopsis. *Genes and Dev.* 21 pp: 3123-34.
- Kurihara Y, Watanabe Y. (2004). Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 101. pp: 12753–12758.
- Lakatos L, Szittyá G, Silhavy D and Burgyan J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J* 23, pp: 876–884.
- Li H, Li WX, Ding SW. (2002). Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 296, pp: 1319–1321.
- Li WX, Li H, Lu R, Li F, Dus M, Atkinson P, Brydon EWA, Johnson KL, Garcia-Sastre A, Ball LA, Palese P, Ding SW. (2004). Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, pp: 1350–1355.

Βιβλιογραφία

- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, and Hannon GJ. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305, 5689, pp: 1437–1441.
- Lu R, Folimonov A, Shintaku M, Li W-X, Falk BW, Dawson WO and Ding S-W. (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 101, 44, pp: 15742–15747.
- Lu S, Cullen BR. (2004). Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and microRNA biogenesis. *J Virol* 78, pp: 12868–12876.
- Matzke MA, and Matzke AJM. (2004). Planting the seeds of a new paradigm. *Plos Biology*, 2, 5, pp: 582-586.
- Moissiard G, Voinnet O. (2004). Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol Plant Pathol* 5, pp: 71–82.
- Napoli C, Lemieux C, and Jorgensen R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*, 2(4), pp: 279-289.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, O'Voinnet O, Jones JDG. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312:436-9.
- Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY and Voinnet O. (2008). Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science*, 321 pp: 964-7.
- Nimchuk LZ, Fisher EJ, Desveaux D, Chang JH, and Dangl JL. (2007). The HopX (AvrPphE) Family of *Pseudomonas syringae* Type III Effectors Require a Catalytic Triad and a Novel N-Terminal Domain for Function. *Mol. Plant-Micr. Interact.* 20, 4, pp: 346–357.
- Parizotto EA, Dunoyer P, Rahm N, Himber C. and Voinnet O. (2004). In vivo investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Genes Dev.* 18, pp: 2237-2242.
- Rosebrock TR, Zeng L, Brady JJ, Abramovitch RB, Xiao F, and Martin GB. (2007). A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature*, 448, 7151, pp: 370–374.
- Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell*, 10, pp: 937–946.
- Silhavy D, Burgyan J. (2004). Effects and side-effects of viral RNA silencing suppressors on short RNAs. *Trends Plant Sci* 9, pp: 76–83.
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, and Joshua-Tor L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305, pp: 1434–1437.

- Tampakaki PA, Fadouloglou VE, Gazi AD, Panopoulos NJ and Kokkinidis M. (2004). Conserved features of type III secretion. *Cellul. Microb.* 6, 9 pp: 805–816.
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, and Zamore PD. (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes & Development*, 17, pp: 49-63.
- Tomari Y, and Zamore PD. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes & Development*, 19, pp: 517-529.
- Thomas LC, Leh V, Lederer C, and Maulea AJ. (2003). Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* 306, 33–41.
- van der Krol AR, Mur LA, de Lange P, Mol JN, and Stuitje AR. (1990). Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. *Plant Molecular Biology*, 14(4), pp: 457-466.
- Vargason JM, Szittyá G, Burgyan J, Hall TMT. (2003). Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115: 799–811.
- Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103: 157–167.
- Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2: e104.
- Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, Steward R and Chen X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 307, pp: 932-935.
- Zamore PD. (2001). RNA interference: listening to the sound of silence. *Nature Structural Biology*, 8, pp: 746–750.
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T and Felix G. (2006). Perception of the Bacterial PAMP EFTu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Cell*, 125, pp: 749.

Κεφάλαιο 3^ο

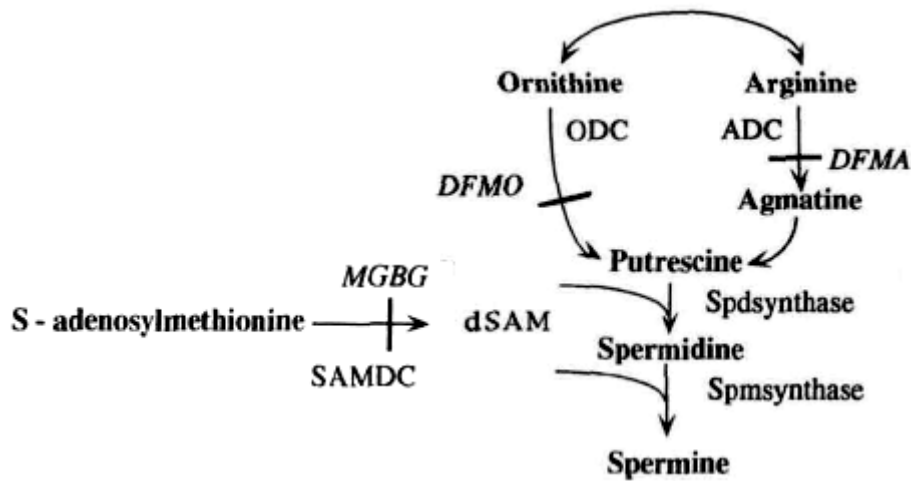
Στο 3ο κεφάλαιο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής παρουσιάζεται τα αποτελέσματα από την μελέτη της επίδρασης της οξείδωσης των πολυαμινών στον αποπλάστη στην ανθεκτικότητα των φυτών σε παθογόνους μικροοργανισμούς. Αρχικά δίνεται μια συνοπτική εισαγωγή σχετικά με την φύση και βιοσυνθετική προέλευση των φυτικών πολυαμινών και επισκόπηση της πρόσφατης σχετικής βιβλιογραφίας. Στην συνέχεια ακολουθούν τα πειραματικά δεδομένα και τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν.

Η οξείδωση των πολυαμινών στον περιπλασματικό χώρο ενισχύει την αντοχή των φυτών σε παθογόνα βακτήρια και ωομύκητες

Εισαγωγή: Θεωρητικό υπόβαθρο

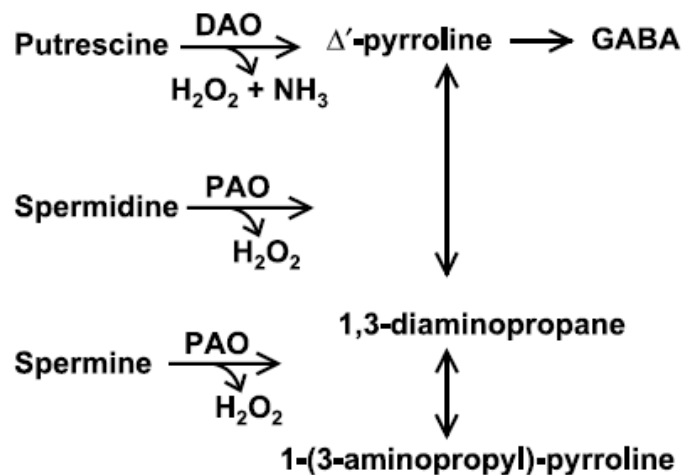
Οι πολυαμίνες (*Polyamines-PAs*) είναι αλειφατικές αμίνες που στα φυτά θεωρείται ότι έχουν ως πρόδρομα μόρια τους την αργινίνη (*Arg*) και/ή την ορνιθίνη (*Orn*), μέσω μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν τα ένζυμα αποκαρβοξυλάση της αργινίνης (*Arg-decarboxylase-ADC*; EC4.1.1.19) ή αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης (*Orn-decarboxylase-ODC*; EC4.1.1.17), αντίστοιχα (**Εικ. 1**). Στις φυτικές *PAs* συμπεριλαμβάνονται η διαμίνη πουτρεσίνη (*putrescine, Put*), και οι ανώτερες *PAs* σπερμιδίνη (*spermidine, Spd*) και σπερμίνη (*spermine, Spm*). Αυτά τα μικρά, βασικού χαρακτήρα μόρια είναι πανταχού παρόντα στην φύση, και φαίνεται να εμπλέκονται σε ποικίλες αναπτυξιακές διαδικασίες στα ανώτερα φυτά, συμπεριλαμβανομένης της κυτταροδιαίρεσης, της εμβρυογένεσης, καθώς επίσης στις γήρανση, όπως και στις αποκρίσεις των φυτών στο στρες (*Martin-Tanguy, 1997*).

Η *Put*, το πρόδρομο μόριο των ανώτερων *PAs*, παράγεται από τα βιοσυνθετικά μονοπάτια *ADC* και/ή *ODC* (**Εικ. 1**). Η βιοσύνθεση των *Spd* και *Spm* απαιτεί τις συντονισμένες λειτουργίες της σπερμιδικής συνθάσης (*spermidine synthase-SPDS*; EC2.5.1.16)/*S-adenosyl-L-Met decarboxylase (SAMDC*; EC4.1.4.50) και της σπερμινικής συνθάσης (*spermine synthase-SPMS*; EC2.5.1.22)/*SAMDC*, αντίστοιχα. Η σύνδεση των *PAs* με την προστασία των φυτών από στρεσογόνους παράγοντες έχει προταθεί από καιρό, βασιζόμενη κυρίως σε φαρμακολογικές μελέτες και στην μελέτη των αλλαγών των ενδοκυτταρικών τίτλων των *PA* (*Alcazar, et al. 2006*).



Εικόνα 1. Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των πολυαμινών. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στα αρχικά βιοσυνθετικά βήματα είναι τα *ADC*, *ODC*, και *SAMDC*. Παρουσιάζονται επίσης και τα σημεία δράσης των αναστολέων *DL-a-difluoromethylarginine* (*DFMA*), *DL-a-difluoromethylornithine* (*DFMO*) και *methylglyoxal-bis (guanylylhydrazone)* (*MGBG*). Βιοσυνθετικά πρόδρομα μόρια είναι ορνιθίνη (*ORN*), αργινίνη (*ARG*) και *S*-αδενοσυλομεθιονίνη (*Dsam: decarboxylated S-adenosylmethionine*).

Οι *PA*s καταβολίζονται μέσω μιας ή περισσότερων οξειδασών των διαμινών (*diamine oxidases-DAO*) και των οξειδασών των πολυαμινών (*polyamine oxidases-PAO*) (**Εικ. 2**) (*Bagni & Tassoni, 2001*). Υπάρχουν δεδομένα που αποκαλύπτουν ότι, στα φυτά, τα ένζυμα *DAO* και *PAO* εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρικό τοίχωμα (*Angelini, et al. 1993; Sebela, et al. 2001*), ενώ η *DAO* φαίνεται να ελευθερώνεται στον αποπλάστη (*Moller & McPherson, 1998*).



Εικόνα 2. Καταβολισμός των *Put*, *Spd* και *Spm* από τις οξειδάσες των αμινών. *DAO*: οξειδάση διαμινών, *PAO*: οξειδάση πολυαμινών, *GABA*: γ-αμινοβουτυρικό οξύ.

Ως αποτέλεσμα της δράσης της *DAO*, η *Put* μπορεί να οξειδωθεί σε *Δ'-πυρολίνη* (*Δ'-pyrroline* με την ταυτόχρονη απελευθέρωση αμμωνίας και υπεροξειδίου του υδρογόνου

Διδακτορική Διατριβή Π. Φ. Σαρρής

(H₂O₂) (**Εικ. 2**). Η οξειδωση της *Spm* από την *PAO* παράγει 1,3-αμινοπροπυλπυρρολίνη (1,3-aminopropylpyrroline), μαζί με διαμινοπροπάνιο (*diaminopropane*) και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂, **Εικ. 2**) (*Bagni & Tassoni, 2001*). Οι *PAs* βρίσκονται στο τοίχωμα των φυτικών κυττάρων όπου εμφανίζονται συνδεδεμένες με πηκτινικούς πολυσακχαρίτες (*pectic polysaccharides*) και θεωρείται ότι ελέγχουν την εναπόθεση λιγνίνης και το *pH* του κυτταρικού τοιχώματος (*Angelini, et al, 1993; D'Orazi & Bagni, 1987*). Πράγματι, έχει καταδειχθεί ότι οι *PAs* είναι ουσιώδεις για την διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του αναπτυσσόμενου φυτικού κυτταρικού τοιχώματος, με την ενίσχυση των συνδέσεων μεταξύ των τμημάτων του τοιχώματος (*Berta, et al. 1997*).

Οι *PAs* λειτουργούν επίσης ως πρόδρομα μόρια για την σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών όπως η νικοτίνη, ενώ μπορούν επίσης να συζευχτούν με φαινολικά οξέα με αποτέλεσμα την παραγωγή αμιδίων του υδροξυκιναμικού οξέως (*hydroxycinnamic acid amides*) (*Martin-Tanguy, 1997*). Αυτές οι συζευγμένες *PAs* έχουν συνδεθεί με την άμυνα των φυτών έπειτα από μολύνσεις με παθογόνα (*Martin-Tanguy, 1997; Walters, 2000*). Εντούτοις, σε αυτό το κεφάλαιο, θα εστιάσουμε στις λιγότερο μελετημένες ελεύθερες *PAs* και την συμμετοχή των προϊόντων του καταβολισμού τους στην άμυνα των φυτών.

Άμυνα των φυτών-ξενιστών: η αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response-HR)

Ο *Stakman* (1915) περιέγραψε αρχικά την υπερευαισθησία ως μία γρήγορη, εντοπισμένη νέκρωση των κυττάρων του ξενιστή στο σημείο της μόλυνσης από παθογόνους μύκητες. Αυτή η υπερευαίσθητη αντίδραση (*HR*) μπορεί να εμφανιστεί ως απόκριση σε ένα αμολυσματικό παθογόνο, σε αλληλεπιδράσεις παθογόνου-ξενιστή στις οποίες εκδηλώνεται ανθεκτικότητα σε ορισμένες φυλές του παθογόνου (*race-specific resistance*), καθώς επίσης και σε πολλές περιπτώσεις ανθεκτικότητας φυτών με ετερόλογα παθογόνα (*nonhost resistance*) (*Heath, 1989; Mansfield, 1990; Mansfield, et al. 1997*) και χαρακτηρίζεται από την επαγωγή γρήγορου θανάτου ενός ή περιορισμένου αριθμού κυττάρων κοντά στο σημείο εισβολής από το παθογόνο (*Heath, 2000*). Τα επόμενα σηματοδοτικά γεγονότα υποτίθεται ότι συντονίζουν την τοπική ή/και συστηματική ενεργοποίηση μιας σειράς αμυντικών αποκρίσεων, οι οποίες διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην άμυνα του ξενιστή (*Morel & Dangl, 1997*). Εντούτοις, ακόμα δεν είναι πλήρως κατανοητό εάν η *HR* είναι η αιτία ή συνέπεια της ανθεκτικότητας στις ασθένειες, και εάν ο υπερευαίσθητος κυτταρικός θάνατος είναι

Εισαγωγή

βασική απαίτηση για την ανθεκτικότητα (Richael & Gilchrist, 1999). Πράγματι, σε μια πρόσφατη εργασία τους, ο Hennin και οι συνεργάτες του (2002) έδειξαν ότι στην ντομάτα, ο υπερευαίσθητος κυτταρικός θάνατος που συνδέεται με την απόκριση στην αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης ανθεκτικότητας Cf9 με τον παράγοντα μολυσματικότητας Avr9 του παθογόνου μύκητα *Cladosporium fulvum*, δεν απαιτείται για την ποσοτική ανθεκτικότητα στην ασθένεια (*quantitative resistance*). Είναι πλέον γνωστό ότι μια πληθώρα φυσικών, φυσιολογικών και μοριακών αλλαγών συσχετίζονται με την HR, συμπεριλαμβανομένης της εναπόθεσης λιγνίνης και καλόζης στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών (Friend, 1976; Kauss, 1987), καθώς επίσης η παραγωγή φυτοαλεξινών (*phytoalexins*), υδρολυτικών ενζύμων και πρωτεϊνών σχετιζόμενων με την παθογένεση (*pathogenesis-related proteins-PR*) (Dixon, 1986; Boller, 1987; Sticher et al., 1997). Σε μια σειρά διαφόρων αλληλεπιδράσεων ξενιστή-παθογόνων, η HR συνδέεται επίσης με την άμεση παραγωγή και συσσώρευση ενεργών μορφών οξυγόνου (*Reactive Oxygen Species-ROS*) (Low & Merida, 1996), οι οποίες παρουσιάζουν τοξική δράση μέσω βλαβών στο DNA, αποδόμησης ή τροποποίησης πρωτεϊνών, και υπεροξειδωσής των λιπιδίων (Imlay & Linn, 1988). Ο όρος ROS (*reactive oxygen species*) περιγράφει τις ελεύθερες ρίζες και άλλες και μη ριζικού χαρακτήρα ενεργές μορφές οξυγόνου, συμπεριλαμβανομένου του υπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\bullet-}$) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Στα ανώτερα φυτά, τα ROS μπορεί να δημιουργηθούν από ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών ενζυμικών συστημάτων, συμπεριλαμβανομένης μίας συνδεδεμένης στην μεμβράνη οξειδάσης (*NADPH oxidase*) (Dwyer et al., 1996), μίας λιποξυγενάσης (*lipoxygenase*) (Croft et al., 1990), μίας αποπλαστικής περοξειδάσης (*apoplast peroxidase*) (Bolwell et al., 1995), και ενός συστήματος οξειδασών γερμίνης/οξαλικού (*germin/oxalate*) (Wojtaszek, 1997). Ο μηχανισμός παραγωγής ROS που έχει μελετηθεί περισσότερο όλων είναι το σύστημα οξειδασών NADPH (Bolwell et al., 2002).

Στην άμυνα των φυτών, το H_2O_2 εμπλέκεται κυρίως σε δομικές αμυντικές αποκρίσεις (Bolwell, 1993), ως αντιμικροβιακός παράγοντας (Peng & Kuc, 1992), και ως σηματοδοτικό μόριο στην επαγωγή της συστηματικής επίκτητης ανθεκτικότητας (Chen et al., 1993). Ο Bestwick και οι συνεργάτες του (1997) έδειξαν ότι η μόλυνση με αγρίου τύπου (*WT*) στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* οδήγησε σε μια ταχέως επαγόμενη HR κατά τη διάρκεια της οποίας εντοπίστηκε υψηλή συσσώρευση H_2O_2 στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών στο σημείο όπου είχαν ενεθεί τα βακτήρια. Στην HR του κριθαριού που προκαλείτε από το μύκητα *Blumeria*

Διδακτορική Διατριβή Π. Φ. Σαρρής

graminis f.sp. *hordei*, (παθογόνο αίτιο της ασθένειας ωίδιο) οι *Thordal-Christensen* και οι συνεργάτες τους (1997) κατέδειξαν την συσσώρευση H_2O_2 στο κυτταρικό τοίχωμα των επιδερμικών κυττάρων γύρω από το βλαστικό σωλήνα του μύκητα από την 6η ώρα μετά από την μόλυνση και γύρω από το απρεσσόριο (*appressorium*) 15 ώρες μετά. Στη συνέχεια, ο *Vanacker* και οι συνεργάτες του (2000) έδειξαν ότι στο σύστημα ωιδίου-κριθαριού, στις περιοχές επαγωγής της *HR*, η συσσώρευση του H_2O_2 εμφανίζεται αρχικά στο μεσώφυλλο (*mesophyll*) κάτω από τα μολυσμένα επιδερμικά κύτταρα. Έπειτα, το H_2O_2 εξαφανίζεται από μεσώφυλλο και συσσωρεύεται γύρω από τα μολυσμένα επιδερμικά κύτταρα. *ROS* όπως το H_2O_2 παράγονται επίσης σε ασύμβατες αλληλεπιδράσεις στις οποίες η αντίδραση των φυτών δεν οδηγεί σε *HR*. Πρόσφατα, οι *Borden & Higgins* (2002) διαπίστωσαν ότι σε συμβατές και ασύμβατες αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών ντομάτας και του παθογόνου *Cladosporium fulvum*, τα κονίδια και οι αρχικοί βλαστικοί σωλήνες του μύκητα προκαλούν μια εντοπισμένη αντίδραση στον ξενιστή που χαρακτηρίζεται από την παραγωγή H_2O_2 , καθώς και μια ποικιλία αποκρίσεων του φυτού που περιλαμβάνουν την διασύνδεση πρωτεϊνών (*protein cross-linking*), την εναπόθεση καλόζης, και τη συσσώρευση φαινολικών ενώσεων. Τα στοιχεία τους υποστηρίζουν προηγούμενες παρατηρήσεις ότι σε αυτό το σύστημα ξενιστή-παθογόνου, τα *ROS* διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στον περιορισμό της αποίκισης του φυτού από το μύκητα, ίσως με το να ενεργούν εν μέρει ως σηματοδοτικά μόρια για τις αμυντικές αποκρίσεις των φυτών (*Borden & Higgins, 2002*).

Πολυαμίνες και ανθεκτικότητα σε φυτοπαθγόνα

Ο ρόλος των ελεύθερων *PAs* στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και παθογόνων έχει διερευνηθεί σε λίγες περιπτώσεις και το μεγαλύτερο μέρος των δημοσιευμένων εργασιών αφορά στην εκδήλωση της *HR* στα πλαίσια ασύμβατων αλληλεπιδράσεων παθογόνου-ξενιστή. Ο *Negrel* και οι συνεργάτες του (1984) πειραματιζόμενοι με το φυτό *N. tabacum* cv. *Xanthi n.c.*, έδειξαν ότι στην *HR* που εκδηλώνεται έπειτα από μόλυνση με τον ιό του μωσαϊκού του καπνού (*TMV*) παρατηρείται μια αύξηση (περίπου 20 φορές) στην ενεργότητα της *ODC*. Αυτή η αύξηση της ενεργότητας της *ODC* εμφανίστηκε στα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα και προηγήθηκε του κυτταρικού θανάτου. Ενδιαφέρον έχει επίσης το γεγονός ότι η αύξηση της ενεργότητας της *ODC* δεν συνοδεύθηκε από μεγάλες αλλαγές στα επίπεδα της πουτρεσίνης (*putrescine-Put*) ή της σπερμιδίνης (*spermidine-Spd*) και της σπερμίνης (*spermine-Spm*) (*Negrel, et al.*

Εισαγωγή

1984). Σε μια πιο πρόσφατη εργασία του ο *Torrighiani* και οι συνεργάτες του (1997), χρησιμοποιώντας ως μοντέλο μελέτης το φυτό *N. tabacum cv. Samsun NN*, έδειξαν ότι η *HR* που εκδηλώνεται μετά από μόλυνση με *TMV* οδηγεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις ελεύθερης και δεσμευμένης *Put* και *Spd*, ιδιαίτερα στις νεκρωτικές περιοχές 3-5 μέρες μετά από την μόλυνση. Οι ενεργότητες των *ODC* και *ADC* αυξήθηκαν επίσης στις νεκρωτικές περιοχές κατά τη διάρκεια της επαγωγής της *HR* σε αυτήν την αλληλεπίδραση (*Torrighiani, et al. 1997*). Πιο πρόσφατα, ο *Marini* και οι συνεργάτες του (2001), χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα, επιβεβαίωσαν τα προηγούμενα συμπεράσματα του *Torrighiani* και των συνεργατών του (1997) και έδειξαν ότι η *HR* συνοδεύεται επίσης από αυξανόμενη ενεργότητα του καταβολικού ενζύμου *DAO*.

Στις αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων ο μεσοκυττάριος χώρος είναι συχνά η πρώτη περιοχή που εγκαθίστανται τα εξωκυτταρικά παθογόνα. Ήταν ενδιαφέροντα επομένως τα ευρήματα του *Yamakawa* και των συνεργατών του (1998) οι οποίοι βρήκαν μια συσσώρευση (περίπου 20 φορές) της ελεύθερης *Spm* στον μεσοκυττάριο χώρο φύλλων καπνών κατά την επαγωγή της *HR* έπειτα από μόλυνση με *TMV*. Αυτή η συσσώρευση *Spm* εντοπίστηκε μόνο στον μεσοκυττάριο χώρο και δεν συνοδεύεται από αλλαγή στα επίπεδα της ελεύθερης *Spm* σε επίπεδο ολόκληρου φύλλου (*Yamakawa, et al. 1998*). Διαπιστώθηκε επίσης ότι η συσσώρευση *Spm* συνοδεύτηκε από την επαγωγή των *PR* πρωτεϊνών καθώς και ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας έναντι στον *TMV* μέσω ενός μονοπατιού ανεξάρτητου από το *SA (salicylic acid)*. Στη συνέχεια, ο *Hiraga* και οι συνεργάτες του (2000) βρήκαν ότι μία περοξειδάση (*peroxidase*) του καπνού (*trpxC1*) που επάγεται κατά την *HR* που ακολουθεί μόλυνση από τον *TMV*, επάγεται και από την *Spm*, αλλά όχι το *SA (salicylate)*, το μεθυλ-γιασμονικό (*methyl jasmonate-MJ*) ή το *ethephon* (εξωγενώς παρεχόμενο πρόδρομο βιοσύνθεσης του αιθυλενίου). Η αδυναμία επαγωγής του *trpxC1* από αυτές τις ενώσεις εμφανίζεται να είναι μοναδική μεταξύ των σχετιζόμενων με την άμυνα γονιδίων του καπνού και συνιστά ένδειξη πιθανής ύπαρξης άγνωστου/ων επαγωγέα/ων για αυτό το γονίδιο κατά την πρόκληση της *HR*.

Όλα τα παραδείγματα που περιγράφονται παραπάνω αφορούν τη μελέτη του ρόλου των πολυαμινών στην εκδήλωση της ανθεκτικότητας τύπου *HR* που επάγεται έπειτα μόλυνση ανθεκτικών γονοτύπων καπνού με *TMV* (*ασύμβατες αλληλεπιδράσεις*). Σε μια μεταγενέστερη εργασία που επίσης αφορούσε άλλο ασύμβατο παθοσύστημα (κριθαριού-οιδίου, *barley- Blumeria graminis f. sp. Hordei*), με ανθεκτικότητα τύπου *HR* οι *Cowley & Walters* (2002a) παρατήρησαν αύξηση στα επίπεδα ελεύθερης και δεσμευμένης *Put*, *Spd* και *Spm* 1-4 μέρες μετά από την μόλυνση. Αυτή η αύξηση στα

επίπεδα των *PAs* συνοδεύθηκε από αυξανόμενη βιοσυνθετική δραστηριότητα, καθώς και από αυξανόμενη ενεργότητα των καταβολικών ενζύμων *DAO* και *PAO*. Σε παράλληλη μελέτη ασύμβατης αλληλεπίδρασης στο ίδιο παθοσύστημα όπου όμως η ανθεκτικότητα βασιζόταν σε αδυναμία διείσδυσης του παθογόνου στους ιστούς του ξενιστή, η ελεύθερη *Spd* και οι δεσμευμένες μορφές των *Put* και *Spd* αυξήθηκαν 1-3 ημέρες μετά από την μόλυνση. Η αύξηση αυτή συνοδεύθηκε από αυξανόμενες δραστηριότητες των *DAO* και *PAO* (Cowley & Walters, 2002b). Επίσης, σε σπορόφυτα κριθαριού όπου ο μεταβολισμός των πολυαμινών μεταβάλλεται μετά από παροχή *MJ*, παρατηρήθηκε επαγωγή συστηματικής προστασίας στο ωίδιο και αύξηση της ενεργότητας της *DAO* καθώς επίσης και ενεργοποίηση της αμμωνιακής λυάσης της φαινυλαλανίνης (*phenylalanine ammonia lyase*) και της περοξειδάσης (*peroxidase*) στα φύλλα που εκδήλωναν συστηματική προστασία (Walters et al., 2002). Σε αυτήν την εργασία, η παροχή *MJ* οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων δεσμευμένης αλλά διαλυτής *Put* και *Spd* στα διασυστηματικά προστατευμένα φύλλα, αλλά δεν επέφερε καμία αλλαγή στα επίπεδα των ελεύθερων *PAs*.

Σκοπός της Ενότητας

Η παρούσα ενότητα της διδακτορικής διατριβής έγινε σε συνεργασία με τον υπ. Δρ. Παναγιώτη Ν. Μόσχου, και άλλα μέλη της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου «Φυσιολογίας και Βιοχημείας Φυτών» (καθ. Καλλιόπη Ρουμπελάκη-Αγγελάκη), τα ονόματα και η συμμετοχή των οποίων αναφέρονται στη δημοσίευση *Moschou & Sarris et al.* (2009).

Όπως αναφέρθηκε διεξοδικά στη εισαγωγή της παρούσας ενότητας, οι έως τώρα μελέτες επί του πιθανού ρόλου της *PAO* και των *PA* αφορούσαν στις ασύμβατες αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων. Με σκοπό να διευρύνουμε τις γνώσεις μας για τον πιθανό ρόλο του μεταβολισμού των *PAs* στις αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων, εξετάσαμε εάν το αποπλαστικό καταβολικό ένζυμο *PAO*, που ευθύνεται για την παραγωγή H_2O_2 , συμμετέχει ή όχι σε συμβατές αλληλεπιδράσεις παθογόνου-ξενιστού. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο μεταβολισμός των πολυαμινών, μετά από μόλυνση με τρία συμβατά παθογόνα, σε διαγονιδιακές σειρές του φυτού *N. tabacum cv. Xanthi*. Οι σειρές αυτές είχαν τροποποιηθεί ώστε (a) να υπέρ-εκφράζουν το ένζυμο *PAO* του καλαμποκιού (*Zea mays*) (*S-PAO*) ή (b) να υπο-εκφράζουν το ενδογενές γονιδίου που κωδικοποιεί το ίδιο ένζυμο στον καπνό, με την χρήση τεχνολογίας αντι-κωδικής καταστολής (*antisense suppression*) (*A-PAO*) (Moschou, et al. 2008b). Οι παραπάνω σειρές του *N. tabacum cv. Xanthi* μολύνθηκαν με (1) το βιότροφο παθογόνο βακτήριο

Εισαγωγή

Pseudomonas syringae pv. *tabaci* (PS), (2) τον ημι-βιότροφο (*hemibiotrophic*) ωομύκητα (*Oomycete*) *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (PP), και (3) τον ιό του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV). Το βακτήριο PS προκαλεί την ασθένεια "wild fire", μια από τις πιο καταστρεπτικές ασθένειες του καπνού στο πεδίο. Οι ωομύκητες μοιάζουν μορφολογικά με τους κυρίως μύκητες («*true fungi*») αλλά τοποθετούνται σε διακριτό φυλογενετικό κλάδο και είναι επιθετικά παθογόνα των φυτών και των ζώων. Ειδικότερα, στο γένος *Phytophthora* ταξινομούνται πάνω από 60 διαφορετικά είδη, εκ των οποίων όλα πλην τριών είναι παθογόνα των φυτών και είναι υπεύθυνα για τις σοβαρότερες ασθένειες των δικοτυλήδων, συμπεριλαμβανομένου του «περονόσπορου» της πατάτας (*potato late blight*) και του ξαφνικού θανάτου της δρυός (*sudden oak death*) (Erwin and Ribeiro, 1996; Appiah, et al. 2004). Οι ωομύκητες και οι καθ' εαυτού μύκητες υιοθετούν παρόμοιες στρατηγικές μόλυνσης αλλά διαφέρουν στην σύσταση των κυτταρικών τους τοιχωμάτων και ορισμένα άλλα βιοχημικά χαρακτηριστικά (Badreddine, et al. 2008), κατά συνέπεια, είναι ανθεκτικοί στα περισσότερα μυκητοκτόνα. Επιπλέον, χαρακτηρίζονται από μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα και υπερνικούν γρήγορα τη μονογονιδιακή ανθεκτικότητα των γενετικά βελτιωμένων ποικιλιών των ξενιστών τους. Ο ιός CMV έχει ένα τριμερές γονιδίωμα RNA θετικής-πολικότητας και μολύνει πολλά διαφορετικά είδη φυτών (Palukaitis, et al. 1992), προκαλώντας ανοικτό πράσινο ή κίτρινο μωσαϊκό και μείωση της ανάπτυξης του φυτού.

Στην παρούσα μελέτη τεκμηριώνεται ότι στα διαγονιδιακά φυτά *S-PAO*, σε αντίθεση με τα *A-PAO* και τα αγρίου τύπου, τα υψηλά επίπεδα οξειδωσης των *PAs* στον αποπλάστη ευθύνονται για την έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με την διασυστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα (*systemic acquired resistance-SAR*), καθώς και δευτερογενών αντιδράσεων ανθεκτικότητας που οδηγούν στην ενίσχυση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Επίσης, η υψηλή ενεργότητα της *PAO* λειτουργεί ως παρεμποδιστικός παράγοντας στην ανάπτυξη των βακτηρίων και του ωομύκητα στον μεσοκυττάριο χώρο, με αποτέλεσμα τον σημαντικά μειωμένο αποικισμό του ξενιστή. Κατά συνέπεια, τα συμπτώματα της μόλυνσης σε φύλλα είναι «ήπια» και για τα δύο παθογόνα (PS και PP). Δεν παρατηρήθηκε όμως το ίδιο και στην περίπτωση του CMV. Αυτά τα αποτελέσματα προσθέτουν νέα δεδομένα για το ρόλο της αποπλαστικής *PAO* στην παραγωγή H₂O₂ στον αποπλάστη και την ενεργοποίηση μηχανισμών ανθεκτικότητας στα πλαίσια συμβατών αλληλεπιδράσεων φυτού-παθογόνου. Η υπερέκφραση της *PAO* οδηγεί σε ανθεκτικότητα στα παθογόνα τα οποία αναπτύσσονται στο περιβάλλον του

αποπλάστη, και παρουσιάζει ενδιαφέρον από πλευράς γενετικής μηχανικής για την ενίσχυση της αντοχής των φυτών σε βιότροφα ή ημιβιότροφα μικροβιακά παθογόνα.

Αποτελέσματα

Ο μεταβολισμός των πολυαμινών μεταβάλλεται στις συμβατές αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων

Σε φύλλα καπνού αγρίου τύπου, που μολύνθηκαν με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* στέλεχος SFP-2124, το γονίδιο που κωδικοποιεί την ενδογενή *PAO* εμφανίζεται ως ενωρίς επαγόμενο. Το επίπεδο των μεταγράφων του γονιδίου αυξήθηκε σημαντικά περίπου 12 ώρες μετά την μόλυνση (*hpi*) έναντι του αντίστοιχου μάρτυρα (*mok-inoculation*), όπως προέκυψε από την ανάλυση με *PCR*-αντίστροφης μεταγραφής (*Moschou & Sarris, et. al. 2009*). Η πρωτεΐνη *PAO* και οι ενζυματική ενεργότητα της παρουσίασαν παράλληλη αύξηση, με ανώτατα όρια τιμών επίσης στις 12 *hpi* ενώ στις 24 και 48 *hpi* η δραστηριότητα της *PAO* επέστρεψε στα αρχικά επίπεδα (*Moschou & Sarris, et. al. 2009*). Έτσι, η *PAO* παρουσίασε παροδική αύξηση κατά τα αρχικά στάδια της μόλυνσης.

Εν όψει των παραπάνω, ήταν ενδιαφέρον να εξεταστούν οι αλλαγές στις *PAs* ενδοκυτταρικά αλλά και στον μεσοκυττάριο χώρο, σε φυτά καπνού αγρίου τύπου έπειτα από μόλυνση με παθογόνο. Και οι τρεις κύριες *PAs*, οι *Put*, *Spd*, και κυρίως η *Spm*, εμφανίστηκαν αρκετά αυξημένες ενδοκυτταρικά στις 12 *hpi* (*Moschou & Sarris, et. al. 2009*). Η *Spm* και η *Put* εμφανίστηκαν αυξημένες κατά 2,5- και 2-φορές, αντίστοιχα, ενώ η *Spd* παρουσίασε μία ελαφρά αύξηση (*Moschou & Sarris, et. al. 2009*). Η αύξησης αυτές ήταν παροδικές, αφού και οι τρεις *PAs* μειώθηκαν στις 24 και 48 *hpi* (*Moschou & Sarris, et. al. 2009*). Την γρηγορότερη πτώση παρουσίασε η *Spm* (περίπου 50% στις 24 και 48 *hpi*), ενώ η *Put* και η *Spd* μειώθηκαν σε χαμηλότερο ποσοστό. Αντίθετα, στον αποπλάστη, η πιο εντυπωσιακή αύξηση ήταν αυτή της *Spm* (αύξηση 18-φορές στις 12 *hpi*). Η *Put* δεν παρουσίασε σημαντική συσσώρευση, ενώ η *Spd* παρουσίασε πολύ μικρή αύξηση (*Moschou & Sarris, et. al. 2009*).

Οι συμβατές αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση του αποπλαστικού H_2O_2

Σε πρόσφατη εργασία (*Moschou et al, 2008c*) διαπιστώθηκε ότι η αβιοτική καταπόνηση (υψηλής αλατότητα) προκαλεί την έκκριση *Spd* στον αποπλάστη, όπου οξειδώνεται από την *PAO* που βρίσκεται συνδεδεμένη στο κυτταρικό τοίχωμα, παράγοντας H_2O_2 . Το παραγόμενο H_2O_2 ανάλογα με την ποσότητα του, σηματοδοτεί είτε τις μοριακές αμυντικές αποκρίσεις στο στρες είτε τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (*PCD*) (*Moschou et Al, 2008c*). Στην παρούσα μελέτη,

ακολουθήσαμε την ίδια στρατηγική προκειμένου να ερευνήσουμε εάν κάτι παρόμοιο συμβαίνει σε βιοτικές καταπονήσεις, ειδικότερα στις συμβατές αλληλεπιδράσεις φυτών-παθογόνων. Κατά την μόλυνση των *S-PAO* φυτών με το βακτηριακό στέλεχος *PS SFP2124*, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του αποπλαστικού H_2O_2 3,8-φορές στις 12 *hpi*. Στην συνέχεια το επίπεδο του H_2O_2 μειώθηκε, (Moschou & Sarris, et. al. 2009). Αντίθετα στα *A-PAO* και τα αγρίου τύπου φυτά παρατηρήθηκε μικρή αύξηση των επιπέδων του H_2O_2 , τα οποία παρέμειναν κάπως υψηλότερα απ' τα αντίστοιχα των μαρτύρων (Moschou & Sarris, et. al. 2009). Επίσης, η συσσώρευση του H_2O_2 που επάγεται απο το βακτήριο *PS*, ήταν εμφανής σύντομα μετά από την μόλυνση στον αποπλάστη των διαγονιδιακών *S-PAO* φυτών, ενώ μια μέτρια αύξηση παρατηρήθηκε στα φυτά αγρίου τύπου και τα *A-PAO* (Moschou & Sarris, et. al. 2009). Αυτά τα αποτελέσματα μαρτυρούν έναν άμεσο θετικό συσχετισμό μεταξύ της συσσώρευσης του H_2O_2 και της ενεργότητας της *PAO* στον αποπλάστη των μολυσμένων με το βακτήριο φυτών, δείχνοντας ότι η *PAO* έχει επιπτώσεις άμεσα στο αποπλαστικό φορτίο των *ROS* κατά την μόλυνση.

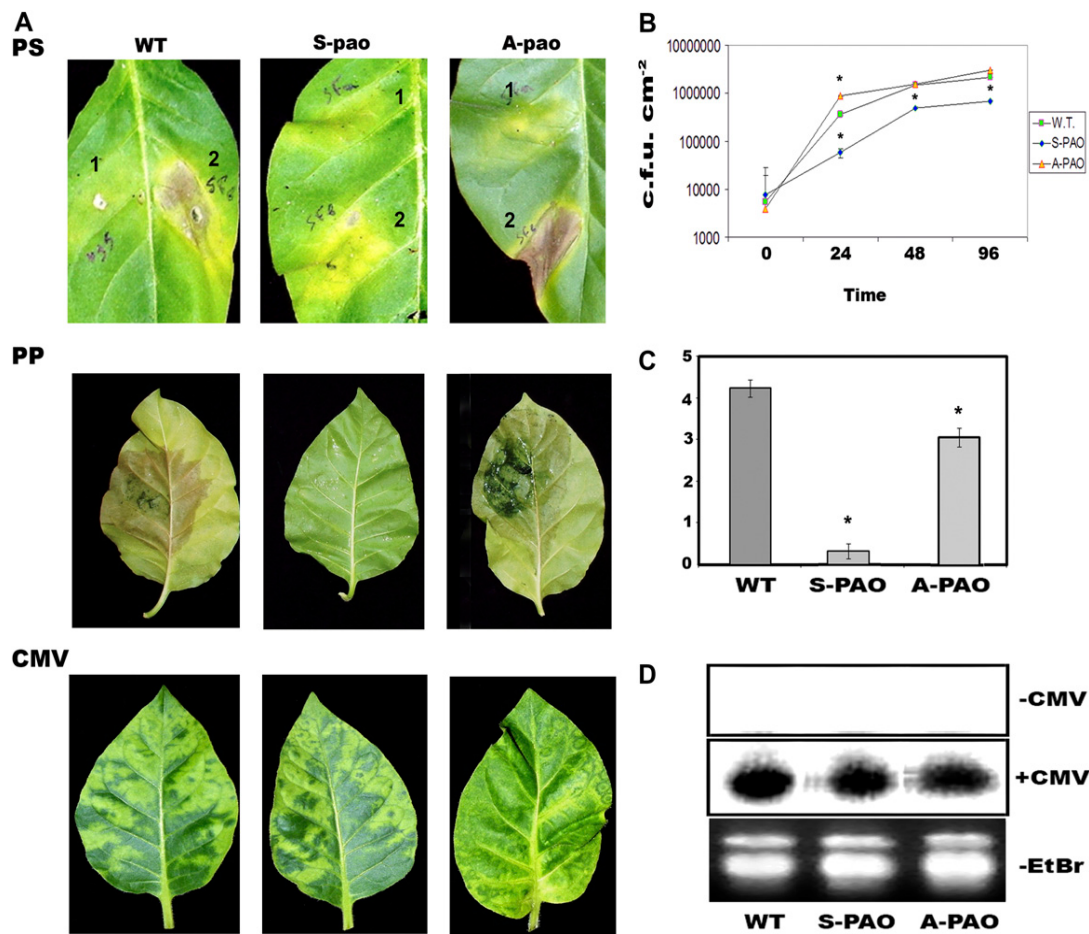
Τα S-PAO διαγονιδιακά φυτά καπνού εκδηλώνουν αντοχή σε μολυσματικό στέλεχος παθογόνου βακτηρίου, σε ένα ημιβιότροφο ωομύκητα αλλά όχι και σε παθογόνο ιό

Για να αξιολογήσουμε εάν η αλλαγή της έκφρασης του γονιδίου κωδικοποιεί την *PAO* έχει επιπτώσεις στην ανθεκτικότητα των φυτών στις ασθένειες, αξιολογήθηκαν φυτά *S-PAO* και *A-PAO* (Moschou, et al. 2008a, 2008b), αρχικά ως προς την ευπάθεια τους σε βακτηριακή μόλυνση. Τα φυτά *S-PAO* παρουσίασαν περισσότερη από 10 φορές, αύξηση, ενώ τα φυτά *A-PAO* παρουσιάζουν μείωση της τάξης του 50%, στην ενεργότητα της *PAO* σε σύγκριση με φυτά αγρίου τύπου (Moschou, et al. 2008b).

Τα διαγονιδιακά φυτά μολύνθηκαν με δύο διαφορετικά στελέχη του παθογόνου *PS*, με τον ημιβιότροφο ωομύκητα *PP*, και με τον ιό *CMV*. Το στέλεχος *BPIC1514* του *PS* που εμφανίζει μειωμένη παθογόνο ικανότητα, και το στέλεχος *PS SFP-2124* με υψηλή παθογόνο ικανότητα, χρησιμοποιήθηκαν αρχικά. Για την επανάληψη και την συνέχεια των πειραμάτων επιλέχτηκε το τελευταίο λόγο της ταχύτερης πρόκλησης των συμπτωμάτων της ασθένειας.

Μετά από τον εμβολιασμό με χαμηλής πυκνότητας αιώρημα (10^4 *cfu/ml*) του στελέχους *PS SFP-2124* δεν παρατηρήθηκαν συμπτώματα σε κανένα από τους τρεις γονοτύπους. Σαφής διαφοροποίηση μεταξύ γονοτύπων παρατηρήθηκε όμως σε υψηλότερη συγκέντρωση (5×10^5 *cfu/ml*) του βακτηριακού μολύσματος: τα φυτά *S-PAO*

έδειξαν σχεδόν πλήρη ανθεκτικότητα, σε αντίθεση με τα φυτά *A-PAO* και αγρίου τύπου τα οποία ανέπτυξαν τα χαρακτηριστικά συμπτώματα της μόλυνσης. Τα συμπτώματα στα φυτά αγρίου τύπου και *A-PAO* εμφανίστηκαν ως περιφερειακή απώλεια της χλωροφύλλης (χλώρωση) που πιθανώς να οφείλεται στην παραγωγή ταμπτοξίνης της τοξίνης που χαρακτηρίζει το βακτήριο *PS* και οδηγεί σταδιακά στην κατάρρευση του ιστού (**Εικ. 1Α**). Επίσης εντυπωσιακή ήταν η διαφοροποίηση των γονοτύπων ως προς την εμφάνιση συμπτωμάτων προοδευτικής σήψης του φύλλου μετά από μόλυνση με τον ωομύκητα *PP* (**Εικ. 1Α**). Αντίθετα, καμία φαινοτυπική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των γονοτύπων μετά από μόλυνση με τον *CMV* (**Εικ. 1Α**).



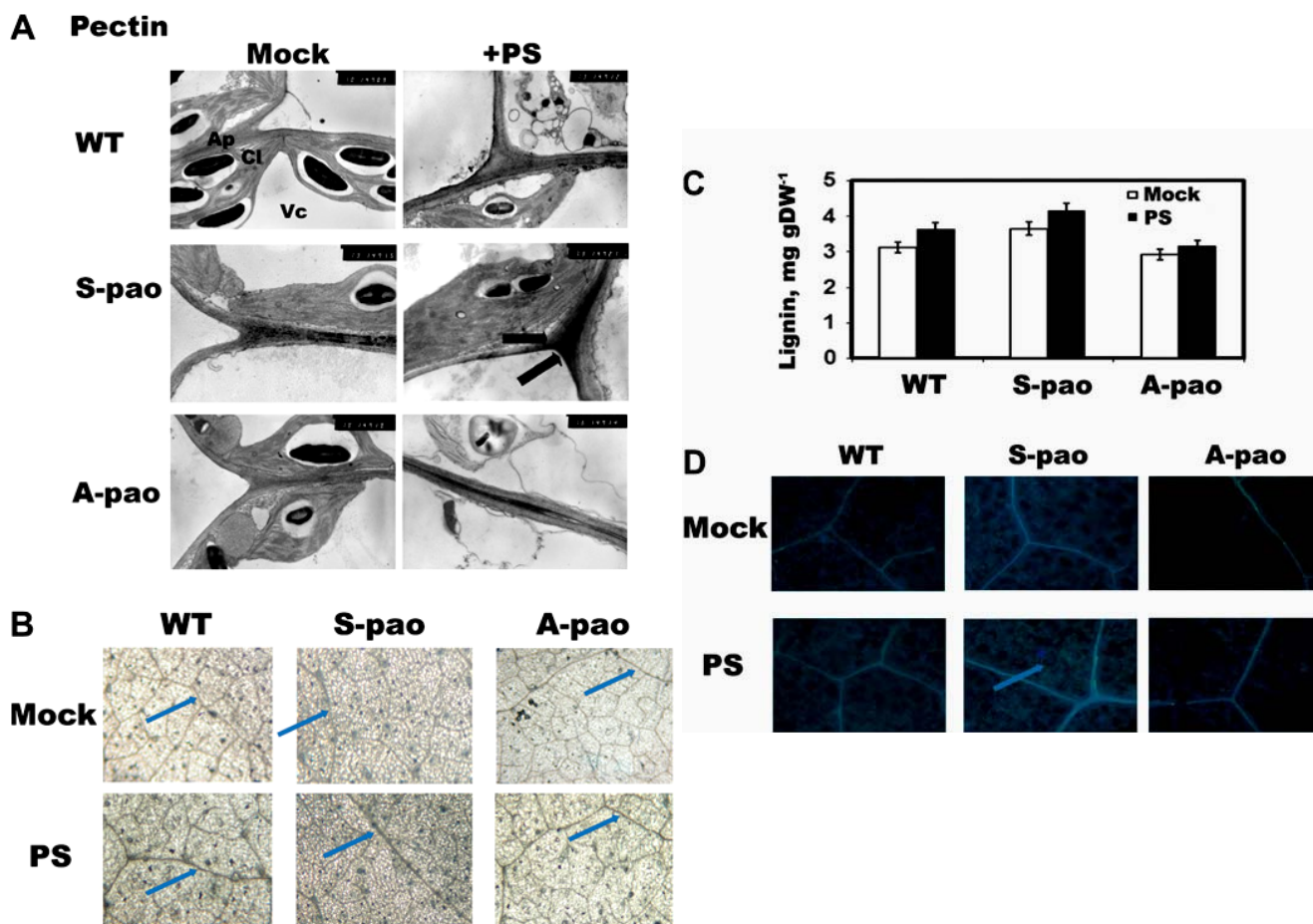
Εικόνα 1. Συμπτώματα ασθένειας σε φυτά αγρίου τύπου (*WT*) και διαγονιδιακά *S-PAO* και *A-PAO* που μολύνθηκαν με *PS* (SFP-2124), *PP*, και *CMV* και ποσοτικοποίηση της ανάπτυξης του βακτηρίου *PS*. **A. Συμπτώματα** σε φύλλα που μολύνθηκαν με *PS* (αρχικό μόλυσμα: 10^4 :1 ή 5×10^5 :2 colony-forming units [c.f.u.]/cm²), *PP* ή *CMV*. **B.** Αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού σε φύλλα που μολύνθηκαν με το *PS* SFP-2124 σε συνάρτηση με το χρόνο. **C.** Διάμετρος των νεκρωτικών περιοχών που προκλήθηκαν από μόλυνση με το παθογόνο *PP*. Τα στοιχεία προέρχονται από τρία ανεξάρτητα πειράματα, και οι αστερίσκοι δείχνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές από τους αντίστοιχους μάρτυρες σε $P < 0.05$ (στον άξονα y οι τιμές αντιστοιχούν σε cm εξάπλωσης του παθογόνου από το σημείο μόλυνσης), **D.** Ποσοτικοποίηση των *mRNA* της καμινδιακής πρωτεΐνης του *CMV*. Παρατίθεται και ο μάρτυρας για τον έλεγχο της ίσης φόρτωσης του πηκτώματος. Χρώση των RNA με *EtBr* 0,5 μg/mL-1 σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%, w/v).

Για να διαπιστωθεί εάν η έλλειψη συμπτωμάτων στα φυτά *S-PAO* οφείλεται σε μειωμένο πολλαπλασιασμό των βακτηρίων *PS*, καθώς και στη μειωμένη μυκηλιακή ανάπτυξη του ωομύκητα *PP*, έγινε ποσοτική ανάλυση πληθυσμών για το *PS* και εκτίμηση την ακτίνα ανάπτυξης του μολύσματος για το *PP* γύρω από το σημείο τοποθέτησης του μολύσματος (**Εικ. 1B** και **C**). Η πληθυσμιακή καμπύλη του *PS* και η ενδοφυτική (*endophytic*) ανάπτυξη του *PP* στα φυτά *S-PAO* βρέθηκαν σημαντικά μειωμένες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στα φυτά *A-PAO* και αγρίου τύπου (**Εικ. 1B** και **C**, $P < 0.05$). Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και με το μειωμένης μολυσματικότητας στέλεχος BPIC1514 του *PS*. Πιο συγκεκριμένα, αν και όπως στα αγρίου τύπου φυτά ο βακτηριακός πληθυσμός στα φυτά *S-PAO* αυξήθηκε ήδη στις πρώτες 24 *hpi*, το μέγιστο της πληθυσμιακής καμπύλης του *PS* ήταν σημαντικά χαμηλότερο περίπου (10 φορές) σε σύγκριση με τα φυτά αγρίου τύπου (**Εικ. 1B**, $P < 0.05$). Η αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού του *PS* στα φυτά *A-PAO* ήταν ελαφρώς υψηλότερη στις 24 *hpi* (**Εικ. 1B**, $P < 0.05$). Στα πειράματα μόλυνσης των φύλλων με *PP*, τα φυτά *S-PAO* ήταν εντυπωσιακά πιο ανθεκτικά (**Εικ. 1C**, $P < 0.05$), ενώ η ενδοφυτική ανάπτυξη του ωομύκητα στα φύλλα των *A-PAO* ήταν ελαφρώς πιο αργή έναντι αυτής στα φύλλα των φυτών αγρίου τύπου στο διάστημα των 8 ημερών μετά την μόλυνση, αλλά η ανάπτυξη του παθογόνου στη συνέχεια εξελίχθηκε κατά τρόπο παρόμοιο με αυτόν σε φύλλα αγρίου τύπου (**Εικ. 1C**, $P < 0.05$). Σε αντίθεση με τα παραπάνω αποτελέσματα, καμία διαφορά μεταξύ γονοτύπων ως προς την ένταση ή τον τύπο των συμπτωμάτων δεν παρατηρήθηκε μετά από μόλυνση με τον ιό *CMV* (**Εικ. 1D**).

Η υπερέκφραση της PAO επάγει βασικές και δευτερογενείς ανοσιακές αποκρίσεις ανεξάρτητες από το SA

Οι βασικές αμυντικές αποκρίσεις των φυτών στα παθογόνα περιλαμβάνουν τροποποιήσεις συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος όπως της κυτταρίνης, πηκτινικών συστατικών, ημικυτταρινών, λιγνίνης και καλόζης. Αυτό μας προέτρεψε να εξετάσουμε εάν η διαφοροποίηση των επιπέδων έκφρασης/ενεργότητας της *PAO* οδηγούν σε διαφοροποίηση της δομής των κυτταρικών τοιχωμάτων πριν και μετά την μόλυνση των φυτών με *PS* σε αγρίου τύπου και διαγονιδιακά φυτά *PAO*. Στα *S-PAO* φυτά παρατηρήθηκε αυξημένη περιεκτικότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων σε πηκτίνη τόσο πριν όσο και μετά τη μόλυνση, ενώ στα *A-PAO* και αγρίου τύπου φυτά αύξηση της περιεκτικότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων σε πηκτίνη έγινε εμφανής μόνο μετά την μόλυνση (**Εικ. 2A**). Η περιεκτικότητα σε λιγνίνη εμφάνισε μια πολύ μικρή αύξηση

στα *S-PAO* φυτά, ενώ μειώθηκε στα *A-PAO* σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου (10%, *Εικ. 2B* και *C*). Επιπλέον, η εναπόθεση καλόζης ήταν σημαντικά υψηλότερη στα *S-PAO* φυτά σε σχέση με τα *A-PAO* και τα αγρίου τύπου, τόσο πριν όσο και μετά τη μόλυνση (*Εικ. 2D*, $P < 0.05$). Αυτά τα στοιχεία ενισχύουν την άποψη ότι η αυξημένη ενεργότητα της *PAO* στον αποπλάστη επηρεάζει τις βασικές αμυντικές αποκρίσεις των φυτών ενάντια στα παθογόνα στο επίπεδο δόμησης/ενίσχυσης του κυτταρικού τοιχώματος.



Εικόνα 2. *In situ* προσδιορισμός της ποσότητας της πηκτίνης, λιγνίνης, και καλόζης σε φυτά αγρίου τύπου (*WT*) και τις διαγονιδιακές σειρές *S-PAO* και *A-PAO* πριν και 24 ώρες μετά από μόλυνση με *PS* (strain SFP-2124) (**A**. Αποτελέσματα *TEM* με ειδική χρώση για τον εντοπισμό της πηκτίνης. Τα φυτά μολύνθηκαν με *PS* και δείγματα λήφθηκαν στις 24 *hpi*. *AP*: αποπλάστης, *CL*: χλωροπλάστης, *Vc*: χυμοτόπιο. **B**. *In situ* μέτρηση της εναπόθεσης λιγνίνης (παχύτερες νευρώσεις). **C**. Περιεκτικότητα σε λιγνίνη (ανά *mg* ξηρού βάρους [*DW*]). **D**. *In situ* ανίχνευση της εναπόθεσης καλόζης στις 24 *hpi* (μπλε και άσπρες περιοχές που περιβάλλουν τα κύτταρα). Τα βέλη δείχνουν τη συσσώρευση της πηκτίνης, λιγνίνης, και καλόζης.

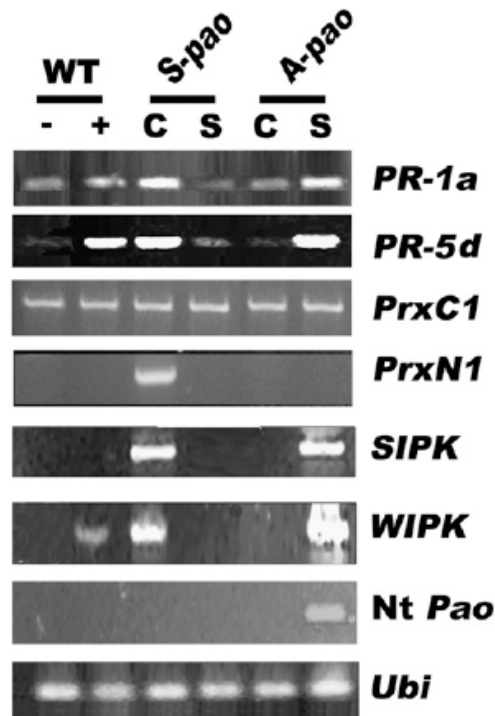
Πέρα από τις ιστολογικές διαφοροποιήσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, οι αντιδράσεις των φυτών σε προσβολές από παθογόνα περιλαμβάνουν την αναδιάταξη της έκφρασης μίας πληθώρας γονιδίων σχετιζόμενων με την άμυνα τους. Από τα πιο γνωστά παραδείγματα είναι η επαγωγή της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν

πρωτεΐνες σχετιζόμενες με τη παθογένεση (*Pathogenesis Related Proteins -PR*), η επαγωγή μονοπατιών σηματοδότησης στα οποία συμμετέχουν αλυσίδες *MAP* κινασών (*MAPK cascades*). Ειδικότερα, έχει δειχθεί ότι δύο *MAPKs*, η *SIPK* (*salicylic acid-induced protein kinase*) και η *WIPK* (*wounding-induced protein kinase*) εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος (*signalling*) κατά την απόκριση φυτών καπνού σε μόλυνση από ποικίλα παθογόνα και το μονοπάτι σηματοδότησης *NtMEK2-SIPK/WIPK* εμπλέκεται στη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων βιοσύνθεσης πολυαμινών, ιδιαίτερα πουτρεσίνης, στον καπνό (*Jang et al 2009*). Επίσης, σχετικά με τις πολυαμίνες, έχει δειχθεί ότι τα γονίδια *PrxC1* και *PrxNI* (γνωστά και ως *trpxC1* και *trpxNI*) συμμετέχουν στο μονοπάτι σηματοδότησης στο οποίο εμπλέκεται η *Spm* (*Hiraga, et al. 2000*). Η αύξηση της οξειδωσης των *PAs* στα *S-PAO* φυτά καθώς και η αυξημένη τους ανθεκτικότητα μπορεί να σχετίζεται με τη διαφορική επαγωγή των σχετικών με άμυνα γονιδίων (*PR genes*), καθώς η επαγωγή τους έχει δειχθεί ότι επάγεται μεταξύ άλλων και από το H_2O_2 , ειδικά στη περίπτωση της *SIPK* (*Kroj, et al. 2003*). Τα επίπεδα των *mRNAs* των *PR-1a* και *PR-5db* παρουσιάστηκαν σημαντικά αυξημένα στα *S-PAO* φυτά σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, όπως φαίνεται από την ανάλυση με *RT-PCR* (**Εικ. 3**), σε αντίθεση με τα *A-PAO* και *WT* φυτά. Αξιοπεριεργό όμως είναι ότι ενώ τα επίπεδα των μεταγράφων αυτών των γονιδίων μετά τη μόλυνση με *PS* αυξήθηκαν στα *A-PAO* και *WT* φυτά, το αντίθετο συμβαίνει στα *S-PAO* φυτά, όπου μετά τη μόλυνση αυτά μειώθηκαν (**Εικ. 3**, *PR-1a* και *PR-5db*). Τα επίπεδα του *PrxC1* μετάγραφου δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των τριών γονοτύπων ή των συνθηκών (μόλυνση ή μη) που εξετάστηκαν (**Εικ. 3**). Επίσης, το επίπεδο *PrxNI-mRNA* εμφανίστηκε σημαντικά αυξημένο στα *S-PAO*, σε σχέση με τα *WT* και *A-PAO* φυτά, σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, ενώ μετά τη μόλυνση με *PS* το δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τους τρεις γονοτύπους (**Εικ. 3**). Επί πλέον, τα μετάγραφα των γονιδίων *SIPK* και *WIPK* ακολούθησαν το ίδιο πρότυπο με αυτά των *PR-1a*, *PR-5d* και *Prx-NI* όσον αφορά τόσο στους τρεις γονότυπους όσο και στους χειρισμούς (μόλυνση ή όχι με *PS*). Μετάγραφα του ενδογενούς γονιδίου του καπνού *NtPAO* υπό τις συνθήκες αυτές (24 ώρες μετά την μόλυνση) δεν ανιχνεύθηκε στα παρόντα πειράματα παρά μόνο στα *A-PAO* φυτά μετά τη μόλυνση (τα φυτά αυτά έχουν αυξημένα ενδογενή επίπεδα του *mRNA* της *NtPAO*, καθώς η μείωση των επιπέδων της *PAO* δεν οφείλεται σε μετά-μεταγραφική σίγηση που δε θα επέτρεπε αύξηση του μεταγράφου).

Γονίδια όπως η *SIPK* και η *WIPK* έχει δειχθεί ότι επάγονται, μεταξύ άλλων, και από το *SA* (*Sharma et al. 2003*). Προκειμένου να διερευνηθεί εάν το *SA* συμμετέχει ή

Αποτελέσματα

όχι στη παρατηρούμενη ανθεκτικότητα των *S-PAO* φυτών και ειδικότερα στη επαγωγή των *SIPK* και *WIPK*, προσδιορίστηκαν τα συνολικά επίπεδα του *SA* σε φύλλα καπνού πριν και σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά από μόλυνση με *PS*. Δώδεκα ώρες μετά τη μόλυνση με το στέλεχος SFP-2124 (*PS*), τα επίπεδα του *SA* αυξήθηκαν σημαντικά και τους τρεις γονοτύπους αλλά με σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στα *S-PAO* φυτά σε σύγκριση με τα *WT* και *S-PAO* φυτά, ενώ τα επίπεδα του *SA* μειώθηκαν σταδιακά 24 και 48 hpi παρ' όλο που τα *S-PAO* φυτά διατήρησαν υψηλότερα επίπεδα *SA* στις 48 hpi (Moschou & Sarris, et. al. 2009). Σε φυτά που δεν μολύνθηκαν με *PS* τα επίπεδα του *SA* δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ γονοτύπων (Moschou & Sarris, et. al. 2009). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η παρατηρούμενη επαγωγή των γονιδίων *SIPK* και *WIPK* (καθώς και άλλα *SAR*-σχετιζόμενα γονίδια) στα *S-PAO* φυτά συμβαίνει ανεξάρτητα από το *SA*.



Εικόνα 3. Αφθονία των *mRNA* των γονιδίων *PR-1a*, *PR-5db* (*PR-5d* στην εικόνα), *PrxC1*, *PrxN1*, *SIPK*, *WIPK* και *NtPAO* πριν και 24 ώρες μετά από την μόλυνση με το παθογόνο βακτήριο *P. syringae* pv. *tabaci* σε φυτά αγρίου τύπου (*WT*) και διαγονιδιακά *S-PAO* και *A-PAO*. Τα επίπεδα των *mRNAs* υπολογίστηκαν με ημι-ποσοτική (*semi-quantitative*) *RT-PCR*, και ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της *Ubi*. Τα *PCR* προϊόντα αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά σε πηκτώματα αγαρόζης (1,5%, w/v)- βρωμιούχου αιθιδίου (0.5 μg ml⁻¹). -: προσομοίωση μόλυνσης (με *buffer*), +: μόλυνση με *PS*.

Συζήτηση

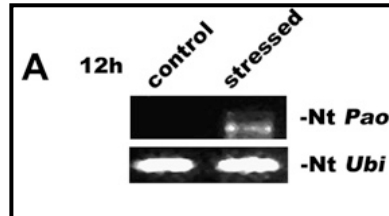
Τα παθογόνα των φυτών χρησιμοποιούν μία πληθώρα επιθετικών στρατηγικών για την αποίκηση και παρασιτισμό στον ξενιστή τους. Τα φυτά με την σειρά τους ενεργοποιούν μία παρόμοια πληθώρα αμυντικών μηχανισμών ώστε να ανταπεξέλθουν στην επικείμενη μόλυνση (Hirt *et al.* 2002). Έχει βρεθεί ότι σε αλληλεπιδράσεις παθογόνου-ξενιστή το H_2O_2 παίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνα των φυτών. Το H_2O_2 μπορεί να δρα απευθείας σαν αντι-μικροβιακή ουσία και έτσι να αναστείλει τη μικροβιακή ανάπτυξη, ή να δρα έμμεσα επάγοντας μηχανισμούς δομικής ενίσχυσης του κυτταρικού τοιχώματος καθώς και ως δευτερογενές σήμα σε ένα μονοπάτι μεταγωγής που έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή γονιδίων που συμμετέχουν σε άλλους μηχανισμούς βιοχημικής άμυνας (Lamb and Dixon, 1997). Παρ' όλα αυτά, η συνεχής παραγωγή και υπερσυσσώρευση H_2O_2 μπορεί να αποβεί επιζήμια για τα φυτικά κύτταρα και να οδηγήσει στην επαγωγή του συνδρόμου του *PCD*. Προκειμένου να αποφύγουν προβλήματα αυτού του τύπου, τα φυτά χρησιμοποιούν στρατηγικές όπου τα υποστρώματα και τα οξειδωτικά ένζυμα είναι πολλές φορές χρονοτοπικά διαχωρισμένα.

Όσον αφορά στην αποπλαστική οξειδάση των *PAs* (*PAO*) καθώς και στο υπόστρωμά της (*Spd/SPm*), σε συνθήκες καταπόνησεων, παρουσιάζουν αύξηση η οποία καταλήγει σε οξείδωση των πολυαμινών και παραγωγή *ROS*. Η παραγωγή αυτή κρίνεται σημαντική καθώς ο αποπλάστης στερείται σε μεγάλο βαθμό ενός ισχυρού αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Επί πλέον, στο κυτταρικό αυτό διαμέρισμα υπάρχουν σχετικά λίγα ένζυμα ή άλλα συστατικά που είναι ευαίσθητα σε αυξημένες συγκεντρώσεις H_2O_2 . Ο Μόσχου και οι συνεργάτες του (2008b) έχουν δείξει ότι η *PAO* είναι το ένζυμο κλειδί της παραγωγής H_2O_2 στον αποπλάστη φύλλων καπνού μέσω της οξείδωσης των ανώτερων *PAs* κατά την αβιοτική καταπόνηση. Σε συνθήκες αβιοτικής καταπόνησης (υψηλή αλατότητα), η *Spd* εκκρίνεται στον αποπλάστη όπου οξειδώνεται παράγοντας H_2O_2 . Η συγκέντρωση του παραγόμενου H_2O_2 φαίνεται να καθορίζει την μοίρα των φυτικών κυττάρων. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, το H_2O_2 επάγει μία σειρά από αμυντικά γονίδια, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις (πάνω από ένα ανεκτό για το φυτό «κατώφλι») επάγει τον *PCD*. Επομένως, ανάλογα με τα επίπεδα υπερέκφρασης της *PAO*, τα αυξημένα επίπεδα H_2O_2 μπορούν να αλλάξουν την κατάσταση της κυτταρικής μοίρας από την επαγωγή της άμυνας στον *PCD*.

Προκειμένου να εξαχθεί κάποιο χρήσιμο συμπέρασμα σχετικά με το ρόλο της *PAO* στις βιοτικές καταπονήσεις, χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη οι γενετικά

Αποτελέσματα

τροποποιημένες σειρές καπνού *S-PAO* και *A-PAO*, οι οποίες μολύνθηκαν με ένα παθογόνο βακτήριο, έναν παθογόνο ωομύκητα, καθώς και με τον ιό *CMV*. Η μόλυνση με *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* SFP2124 (*PS*) σε φυτά *WT* έδειξε ότι το γονίδιο *PAO* του καπνού (*NtPAO*) επάχθηκε και η ανοσοενεργή πρωτεΐνη της *PAO* συσσωρεύτηκε σε μικρό χρονικό διάστημα μετά την μόλυνση (**Εικ. 4**) (*Moschou & Sarris, et. al. 2009*).



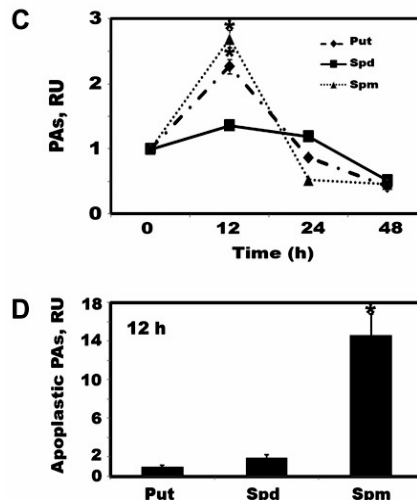
Εικόνα 4. Έλεγχος των επιπέδων *mRNA*, της πρωτεΐνης και της δραστηριότητας της ενδογενούς *PAO* (*NtPAO*) σε φυτά καπνού αγρίου τύπου μετά από μόλυνση με *P. syringae* pv. *tabaci* SFP-2124 (*PS*) (*Moschou & Sarris, et. al. 2009*).

Α. Ανάλυση των επιπέδων *mRNA* της *NtPAO* 12 *hpi* με *RT-PCR*. Ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *NtUbi* σε φυτά αγρίου τύπου που μολύνθηκαν με *PS*. Τα προϊόντα της *RT-PCR* αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αγαρόζης (1,5%, w/v) και εντοπίστηκαν με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (0,5 μg/ml).

Ακολούθως, τα βιοσυνθετικά ένζυμα των *PAs* επάχθηκαν, με την *ADC* να δείχνει το μεγαλύτερο βαθμό επαγωγής, με αποτέλεσμα να παραχθούν υψηλά επίπεδα *PAs* (*Moschou & Sarris, et. al. 2009*). Τα υψηλά αυτά επίπεδα *PAs* αποτελούν υπόστρωμα για τη *PAO* με αποτέλεσμα την παραγωγή H_2O_2 . Αντίθετα με τα αποτελέσματα αυτά, που αφορούν συμβατή αλληλεπίδραση φυτού-βακτηριακού παθογόνου, ο *Yoda* και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η *ODC* είναι το ένζυμο που επάγεται σε μεγαλύτερο βαθμό στο καπνό κατά την διάρκεια μη-συμβατής αλληλεπίδρασης ιικού παθογόνου-φυτού που οδηγεί στην επαγωγή αντίδρασης *HR* (*Yoda, et al. 2003; 2006*). Στην παρούσα μελέτη, οι μέγιστες αυξήσεις των βιοσυνθετικών ενζύμων των *PAs* αντικατοπτρίζονται από την παράλληλη αύξηση των αντιστοίχων επιπέδων των *PAs* στις 12 *h* μετά την μόλυνση, ειδικά της *Spm* που μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα της *PAO* (του υπερ-εκφραζόμενου ενζύμου στα *S-PAO* φυτά καπνού) για παραγωγή του H_2O_2 στον αποπλάστη (**Εικ. 5**) (*Moschou & Sarris, et. al. 2009*).

Η αυξημένη παραγωγή του H_2O_2 ήταν πολύ πιο εμφανής στα *S-PAO* φυτά. Από αυτό φαίνεται ότι η *PAO* συμμετέχει ενεργά στη παραγωγή του αποπλαστικού H_2O_2 . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την προ της μόλυνσης επαγωγή γονιδίων/μηχανισμών φυτικής άμυνας στα *S-PAO* φυτά, τα οποία έδειξαν ανθεκτικότητα στη μόλυνση με το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (*PS*) και τον ωομύκητα *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (*PP*), και ειδικότερα στο δεύτερο όπου παρουσίασαν σχεδόν

πλήρη ανοσία. Αντίθετα, τα *A-PAO* φυτά, έδειξαν ελαφρά αυξημένη συμπτωματολογία σε σχέση με τα αντίστοιχα φυτά *WT* μετά από μόλυνση με το *PS*, καθώς και ελαφρώς αυξημένο ρυθμό αποίκησης σε ενωρίς στάδια μετά τη μόλυνση. Η μείωση του ρυθμού μυκηλιακής ανάπτυξης του *PP* στα *A-PAO* φυτά μπορεί να οφείλεται εν μέρει στα αυξημένα επίπεδα της *Spm* στον αποπλάστη των φύλλων, που πιθανόν να αναστέλλει τη βιοσύνθεση της *Put* και της *Spd* στον ωομύκητα (*Chibucos and Morris, 2006*). Τα είδη του γένους *Phytophthora* έχειδειχθεί ότι εκφράζουν μεταφορείς των *PAs*, που σχετίζονται με τη πρόσληψή τους καθώς και με τη ρύθμιση των επιπέδων τους κατά τη βλαστητική ανάπτυξη (*Chibucos and Morris, 2006*).



Εικόνα 5. Τίτλοι των *PAs* σε φυτά αγρίου τύπου που μολύνθηκαν με το βακτήριο *P. syringae* pv. *tabaci* SFP-2124 (*PS*) (*Moschou & Sarris, et. al. 2009*). **C.** Τίτλοι των *Put*, *Spd*, και *Spm* πριν την μόλυνση και 12, 24 και 48 *hpi* σε σχετικές μονάδες συγκριτικά με τους αντίστοιχους μάρτυρες. **D.** Τίτλοι των αποπλαστικών *Put*, *Spd*, και *Spm* στις 12 *hpi* σε σχετικές μονάδες συγκριτικά με αυτά των αντίστοιχων *controls*. Οι αστερίσκοι δείχνουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές από τους αντίστοιχους μάρτυρες σε $P < 0.05$.

Στην περίπτωση του *CMV*, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ γονοτύπων που εξετάστηκαν ως προς τα επίπεδα της του ιικού *RNA*. Υποθέτουμε ότι το αποπλαστικά παραγόμενο (στα *S-PAO* φυτά) H_2O_2 δε μπορεί να περιορίσει τον πολλαπλασιασμό του *CMV* (ενδοκυτταρικό παθογόνο) ή τη διακυτταρική του μεταφορά μέσω των πλασμοδεσμάτων, αν και μπορεί να εισέλθει χωρίς δυσκολία στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι ενδοκυτταρικά εντοπίζονται τα περισσότερα συστήματα απόσβεσης των *ROS*, μια και αυτά αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για την φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου σε περίπτωση απορύθμισης των επιπέδων τους. Η αυξημένη οξειδωση των *PAs* κατά συνέπεια οδηγεί σε αύξηση της ανθεκτικότητας των φυτών σε εξωκυτταρικά παθογόνα βακτήρια και ωομύκητες, ενώ δεν παρουσιάζετε το ίδιο και για τα ενδοκυτταρικά ικά παθογόνα.

Πρόσφατη δημοσίευση (Marina et al. 2008) κατέληξαν σε παρόμοια συμπεράσματα όσον αφορά στο ρόλο των πολυαμινών στην απόκριση φυτών καπνού στο βακτηριακό παθογόνων *Pseudomonas viridiflava*. Όπως και στην περίπτωση του βακτηρίου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, αυτά τα παθογόνα πολλαπλασιάζονται στους διακυττάρους χώρους του ξενιστή στα ενωρίς στάδια της μόλυνσης, ενώ χλωρωτικά και νεκρωτικά συμπτώματα εμφανίζονται μόνο σε προχωρημένα στάδια της μόλυνσης. Επομένως, τα βακτήρια αυτά χαρακτηρίζονται ως βιότροφα, τουλάχιστον στα αρχικά στάδια εξέλιξης της ασθένειας. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση του ωομύκητα *PP*. Αντίθετα με αυτές τις περιπτώσεις, σε μολύνσεις από παθογόνα που χαρακτηρίζονται ως νεκρότροφα (*Sclerotinia sclerotiorum*) αλλαγές στα επίπεδα πολυαμινών στον αποπλάστη αποβαίνουν αρνητικές για τον ξενιστή και οδηγούν σε αυξημένη ευπάθεια στο παθογόνο. Θα είχε ενδιαφέρον να διερευνηθεί αν αυτοί οι συσχετισμοί μεταξύ της στρατηγικής παρασιτισμού (νεκροτροφία/βιοτροφία) ισχύουν και πιο γενικά για τα μικροβιακά παθογόνα φυτών

Η μελέτη της οξειδωσης των ανώτερων *PAs* σε σχέση με την επαγωγή αμυντικών αποκρίσεων του ξενιστή, που μπορεί με τη σειρά τους να σχετίζονται με την ανθεκτικότητα, έδειξε ότι τα *S-PAO* φυτά παρουσίασαν διττή επαγωγή τόσο των μηχανισμών της δομικής όσο και αυτών της βιοχημικής άμυνας τους. Η πρώτη περιλαμβάνει μια σειρά αλλαγών που δεν παρακωλύουν την αρχική διείσδυση του παθογόνου στο φυτικό κύτταρο, όπως για παράδειγμα οι τροποποιήσεις/ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος. Οι τροποποιήσεις αυτές περιλαμβάνουν τη συσσώρευση πηκτίνης καθώς και την εναπόθεση καλόζης και λιγνίνης. Τα *S-PAO* φυτά παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα ενεργοποίησης των μηχανισμών αυτών, τόσο υπό συνθήκες μόλυνσης όσο και απουσία του παθογόνου (**Εικ. 2**).

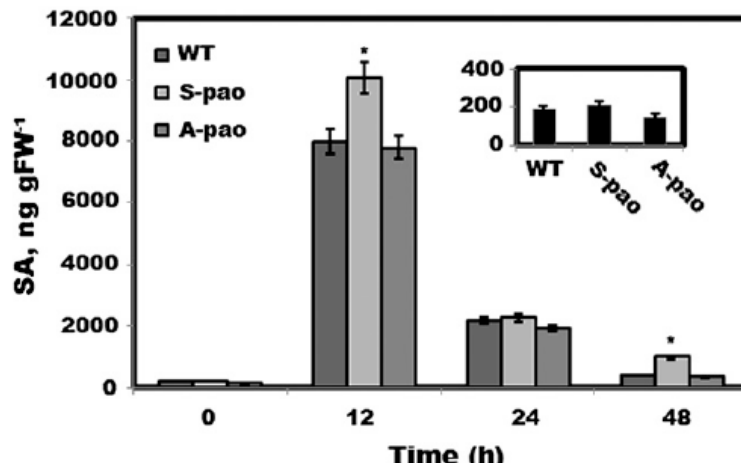
Ο Μόσχος και οι συνεργάτες του (Moschou, et al. 2008) έδειξαν ότι στα *S-PAO* φυτά τα αντιοξειδωτικά γονίδια ήταν προ-επαγμένα, όπως και στη περίπτωση της *SAR*. Επί πλέον, μία ισχυρή έκθεση σε O_3 , που παράγει O_2^- και H_2O_2 στον αποπλάστη, σηματοδοτεί σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα ορμονών όπως το αιθυλένιο, το *SA* και το Ιασμονικό οξύ και ενεργοποιεί μία σειρά από επί πλέον σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση (Ahlfors et al., 2004). Τα πρωτογενή σηματοδοτικά γεγονότα που επάγονται από το αποπλαστικά παραγόμενο, μέσω του O_3 , H_2O_2 περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των *MAPK* (*Mitogen Activated Protein Kinases*). Οι φυτικές *MAPK* φαίνεται να επάγονται από μία πληθώρα βιοτικών και αβιοτικών

αντιδράσεων, ορμονικών αντιδράσεων, ρυθμίσεων της κυτταρικής ανάπτυξης και εν τέλει φαίνεται να εκφράζονται διαφορεικά καθ' όλη τη διαδικασία της ανάπτυξης των φυτών. Σε φυτά καπνού, έχειδειχτεί ότι το O₃ αύξησε την ενεργότητα των *SIPK* (*Salicylate-Induced Protein Kinase*) και *WIPK* (*Wound Inducible Protein Kinase*) (*Samuel and Ellis, 2002*) και οδήγησε σε ενεργοποίηση των *PR* πρωτεϊνών (*Kroj, et al. 2003*), ενώ η *SIPK* του καπνού περιγράφηκε σαν *SA*-ενεργοποιούμενη *MAPK* (*Zhang, et al. 1998*).

Έχειδειχτεί ότι στις αλληλεπιδράσεις φυτού-παθογόνου οι *MAPKs* εμπλέκονται στην ενεργοποίηση διαφόρων γονιδίων που σχετίζονται άμεσα με τις αμυντικές αποκρίσεις του ξενιστή (*Kroj et al., 2003*). Η μελέτη της αυξημένης αποπλαστικής οξειδωσης των *PAs* οδήγησε στην αύξηση των επιπέδων μεταγραφής διαφόρων *SAR* σχετιζόμενων γονιδίων που εξαρτώνται από τη παραγωγή H₂O₂. Έτσι, γονίδια όπως η *PR-1a*, *PR-5db*, *PrxNI* καθώς και οι δύο *MAPKs*, *WIPK* και *SIPK*, εμφανίζονται προεπαγμένα στα *S-PAO*. Οι *PR* πρωτεΐνες θεωρείται ότι σχετίζονται με την άμεση αμυντική απόκριση σε παθολογικές προσβολές, ενώ γονίδια όπως η *PrxCI* και *PrxNI* (γνωστά και ως *trpxCI* και *trpxNI*) έχει προηγουμένωςδειχθεί ότι σχετίζονται με το σηματοδοτικό μονοπάτι της *Spm* κατά τη μόλυνση φυτών καπνού με τον ιό *TMV* (*Hiraga, et al. 2000*). Πρόσφατα επίσης, δείχθηκε ότι η οξειδωση της *Spd* ότι επάγει την *PR-1a* σε φυτά καπνού (*Lazzarato et al., 2009*). Προκαλεί ενδιαφέρον το γεγονός ότι στα *S-PAO* φυτά τα γονίδια αυτά δεν επάγονται επί πλέον μετά την μόλυνση, κάτι που δεν ισχύει για τα *WT* και *A-PAO* φυτά. Η διαφορεική αντίδραση των *S-PAO* ήταν πολύ όμοια με αυτή που έχει προηγουμένως περιγραφεί και κατά την οποία η έναρξη της καταπόνησης οδήγησε στην αναστολή των αντιοξειδωτικών γονιδίων (*Negrel et al., 1984; Mitsuya et al., 2009*). Επί πλέον, με εξωγενή χορήγηση των *PAs* στον αποπλάστη των *S-PAO* φυτών, αντί για συσσώρευση των μεταγράφων *SAR*-σχετιζόμενων γονιδίων *PR1a* και *PR5db* παρατηρήθηκε μείωση των αντιστοίχων μεταγράφων σε αντίθεση με τα *WT* και *A-PAO*, φυτά (*Moschou & Sarris, et. al. 2009*). Η άποψη ότι η *PAO* δε σχετίζεται με επί πλέον αποκρίσεις σε σχέση με αυτές που παρατηρούνται πριν τη μόλυνση ενισχύεται.

Υποθέσαμε ότι η προ-επαγωγή των παραπάνω γονιδίων που παρατηρείται στα *S-PAO* φυτά ίσως να οφείλεται στο *SA*. Στο παρελθόν έχειδειχτεί ότι η αύξηση του *SA* αποτελεί κομβικό σημείο για τη παραγωγή *ROS* κατά τη μόλυνση από παθογόνα, ενώ η *SAR* σχετίζεται άμεσα με την αύξηση των επιπέδων του *SA*. Παρ' όλα αυτά σε αρκετές περιπτώσεις, η σχετιζόμενη με *SAR* επαγωγή γονιδίων έχειδειχθεί ότι μπορεί να είναι

ανεξάρτητη από τη συσσώρευση SA (Yasuda *et al.*, 2003). Σύμφωνα με τα προηγούμενα, καθώς τα γονίδια όπως η *SIPK* και *WIPK* ενεργοποιούνται, ήταν αναμενόμενη και μία πιθανή αύξηση των επιπέδων του SA στα *S-PAO* φυτά. Σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης δεν παρατηρήθηκαν αυξήσεις των επιπέδων του SA τόσο στα *S-PAO* όσο και στα *A-PAO* ΓΤΦ, υποδηλώνοντας ότι η παρατηρούμενη αύξηση της συσσώρευσης των αντίστοιχων *mRNAs* συμβαίνει ανεξάρτητα από το SA (Εικ. 6) (Moschou & Sarris, *et. al.* 2009).



Εικόνα 6 (Moschou & Sarris, *et. al.* 2009). Συσσώρευση SA σε φύλλα μολυσμένα με *P. syringae pv. tabaci* PSF-2124 στις 0, 12, 24, και 48 hpi. Το ένθεμα παρουσιάζει τους αρχικούς (πριν την μόλυνση) συνολικούς τίτλους του SA σε φυτά μάρτυρες (μη μολυσμένα). FW: φρέσκο βάρος, WT: αγρίου τύπου.

Επί πλέον, τα υψηλότερα επίπεδα του SA μετά τη μόλυνση στα *S-PAO* μπορεί να οφείλεται στα μικρότερα επίπεδα του μικροβιακού φορτίου του *PS* σε αυτά τα φυτά, καθώς όπως έχει δείχτει στο παρελθόν, τα παθογόνα βακτήρια είναι τουλάχιστον μερικώς υπεύθυνα για την αναστολή των αμυντικών αντιδράσεων όπως η συσσώρευση του SA (Vivian, and Arnold, 2000; Abramovitch, 2006). Από τα προηγούμενα γίνεται πλέον κατανοητός ο κύριος ρόλος της *PAO* στην ενεργοποίηση επί πλέον αμυντικών αντιδράσεων ανεξάρτητα από το SA.

Συμπερασματικά, στο κεφάλαιο αυτό δείχθηκε ότι η αποπλαστική δράση της *PAO* αποτελεί σημαντικό κομμάτι της άμυνας εναντίων των εξωκυτταρικών βιότροφων παθογόνων κατά τις συμβατές αντιδράσεις. Επί πλέον, φάνηκε ότι η δράση της *PAO* στον αποπλάστη προκαλεί σημαντικές δομικές αλλαγές που ενισχύουν επί πλέον την άμυνα των φυτών στα παθογόνα. Με βάση τα παραπάνω, ενίσχυση του καταβολισμού των πολυαμινών στον κυτταρικό αποπλάστη μέσω γενετικής τροποποίησης του φυτού, ενδεχομένως και με τη στρατολόγηση υποκινητών/ρυθμιστικών στοιχείων που αποκρίνονται στην μόλυνση από βιότροφους

Διδακτορική Διατριβή Π. Φ. Σαρρή

παθογόνους μικροοργανισμούς, αξίζει να μελετηθεί περισσότερο ως στρατηγική ενίσχυσης της «οριζόντιας» ανθεκτικότητας φυτών σε μικροβιακές προσβολές.

Η ολοκλήρωση των πειραμάτων που αναφέρονται στον παρόν κεφάλαιο έγινε με την συμμετοχή μιας ομάδας ερευνητών από το εργαστήριο Μοριακής Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών (υπεύθυνος καθ. Ν. Πανόπουλος) και το εργαστήριο Φυσιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών (υπεύθυνη καθ. Κ. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη). Για τον λόγο αυτό θεωρώ υποχρέωση μου να αναφέρω τους τομείς ευθύνης του καθ' ενός από αυτούς.

*Η σύλληψη της ιδέας και ο σχεδιασμός της πειραματικής προσέγγισης έγιναν από τους Π. Φ. Σαρρή και Π. Μόσχου. Οι βιοχημικές αναλύσεις των ΓΤΦ και οι αναλύσεις κατά Western έγιναν από τον Π. Μόσχου. Οι βακτηριακές και ιικές μολύνσεις, οι αναλύσεις βακτηριακών πληθυσμών και η ποσοτικοποίηση του ιού σε μολυσμένα φυτά έγιναν από τον Π. Σαρρή. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία και οι χρώσεις των ιστών έγιναν από τους Π. Σαρρή, Π. Μόσχου, Κ. Πασχαλίδη και Α. Ανδριοπούλου. Οι αναλύσεις με ημιποσοτική RT-PCR των μεταγράφων των γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών καθώς και οι αναλύσεις κατά Northern των PR mRNA έγιναν από τους Π. Σαρρή και Π. Μόσχου. Οι μολύνσεις με την *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae* και η αξιολόγηση και αναλύσεις των αποτελεσμάτων των μολύνσεων έγιναν από τον Δρ. Ν. Σκανδάλη. Η σχετική δημοσίευση παρατίθεται σε παράρτημα στο τέλος της Διδακτορικής Διατριβής.*

Υλικά και Μέθοδοι

Φυτικό υλικό και συνθήκες ανάπτυξης

Φυτά *Nicotiana tabacum* cv *Xanthi* μετασηματισμένα με το *cDNA* του γονιδίου της *PAO* του φυτού *Zea mays* υπό τον υποκινητή 35S, σε θετική (*sense*) ή αρνητική (*antisense*) πολικότητα από (Tavladoraki, et al. 1998) χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη την πορεία των πειραμάτων μόλυνσης. Η κατασκευή και χαρακτηρισμός των σειρών που χρησιμοποιήθηκαν έχει ήδη περιγραφεί (Moschou, MSc thesis 2006). Οι συνθήκες ανάπτυξης τους ήταν 16/8 h φως/σκοτάδι, θερμοκρασία 25 ± 1 oC και υγρασία 75% σε θάλαμο σταθερών συνθηκών. Μη ΓΤΦ *Nicotiana tabacum* cv *Xanthi* χρησιμοποιήθηκαν ως φυτά μάρτυρες και αναφέρονται ως *WT*.

Απομόνωση ολικού *mRNA*

Η απομόνωση ολικού *mRNA* πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρωτόκολλο της Τριζόλης, όπως περιγράφεται στο Κεφ. 2. Μέρος του απομονωμένου ολικού *mRNA* ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % (w/v) το οποίο περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (*EtBr*) σε τελική συγκέντρωση $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ και η συγκέντρωσή του εκτιμήθηκε φασματομετρικά σε φασματοφωτόμετρο «*NanoDrop^R*» 1000 (*Nanojet, USA*). Σημειώνεται ότι όλα τα πλαστικά και γυάλινα υλικά είχαν αποστειρωθεί πριν τη χρήση, όπως επίσης και όλα χημικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, εκτός της φαινόλης και του χλωροφορμίου.

Κλωνοποίηση τμήματος του *cDNA* του γονιδίου *Pao*

Ολικό *mRNA* από μίσχους καπνού φυτών *WT* εκχυλίστηκε και χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφάσης με χρήση της *Omniscript (Reverse Transcription Kit, Invitrogen)*, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για τη κλωνοποίηση μέρους του γονιδίου της *PAO*, πραγματοποιήθηκε στοίχιση των γονιδίων *Nicotiana benthamiana* και *Arabidopsis thaliana* και σχεδιάστηκαν εκκινητές με τις αλληλουχίες που φαίνονται στον πίνακα του παραρτήματος, από τους οποίους παράγεται προϊόν 621 bp. Το προϊόν κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα *pGEM T-easy (Promega)* σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και αλληλουχήθηκε.

Οι εκκινητές για το *Pao-cDNA* χρησιμοποιήθηκαν για αντιδράσεις ποσοτικής *RT-PCR* 30 και 35 κύκλων (λογαριθμική φάση; 2 min at 94 °C αρχική αποδιάταξη, 40 s στους 94 °C ενδοκυκλική αποδιάταξη, 55 °C ένωση των εκκινητών, a 1-min επιμήκυνση, και 7-min τελική επιμήκυνση). Επίσης, αντιδράσεις που επωάστηκαν με *DNase I* αλλά δεν επωάστηκαν με *RT*, χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικά πειράματα ελέγχου.

Απομόνωση και καθαρισμός *DNA* αλληλουχιών από πήκτωμα αγαρόζης

Οι αλληλουχίες *DNA* απομονώθηκαν με εμπορικά διαθέσιμο προϊόν (*QIAquick PCR and gel Clean-Up System, Promega, USA*).

Κλωνοποίηση γονιδίων

Τα γονίδια που περιγράφονται στο κεφάλαιο αυτό υποκλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα *pGEM T-easy (Promega, USA)*, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι εκκινητές (primers) για τη κλωνοποίηση περιγράφονται στο Πίνακα 2 του παραρτήματος.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφ. 1.

Ποσοτική Εκτίμηση των Επιπέδων των Μεταγράφων

Για τη ποσοτικοποίηση των επιπέδων των μεταγράφων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ημιποσοτική RT-PCR. Συγκεκριμένα, ολικό mRNA από μολυσμένα και μη μολυσμένα φύλλα εκχυλίστηκε (βλ. Κεφ. 2) και επώαστηκε με ελεύθερη από RNase DNase I για 45min στους 37oC. Τα δείγματα στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για RT-PCR χρησιμοποιώντας ως εκκινητή *polyT* και το ένζυμο *SuperRT* σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (*HT Biotechnology, England*). Η κανονικοποίηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το mRNA του γονιδίου της ακτίνης (*actin*) ή της *ubiquitin*. Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση αντιδράσεων PCR, 30, 35, 37 και 40 κύκλων (1 min αρχική αποδιάταξη στους 94 oC , 35 sec ενδοκυκλική αποδιάταξη στους 94 oC, 30 sec ένωση των εκκινητών στους 53 oC, 30 sec επιμήκυνση στους 72 oC, 5 min τελική επιμήκυνση στους 72oC) και τα προϊόντα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (w/v) προκειμένου να εκτιμηθεί εάν η παραγωγή του προϊόντος παραμένει στη λογαριθμική κλίμακα.

Βακτηριακές καλλιέργειες *Pseudomonas syringae*

Καλλιέργειες ανθεκτικών στο αντιβιοτικό ριφαμπικίνη (*Rif*) βακτηρίων του είδους *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* στέλεχος BPIC1514 και SFP-2124 αναπτύχθηκαν στους 28°C στους 24 h σε θρεπτικό *Luria-Bertani (LB)* pH 7,0 εμπλουτισμένο με (*Rif*, 80 µg ml⁻¹). Το θρεπτικό μέσο LB παρασκευάστηκε σύμφωνα με τον *Miller (1972)* (βλ. κεφ. 1).

Μόλυνση Μεσόφυλλου με το βακτήριο *Pseudomonas syringae*

Τα βακτήρια επαναδιαλύθηκαν σε 10 mM MgCl₂, μετά από φυγοκέντριση και πλύσιμο (2800 g 10 min στους 4 oC, 2 φορές πλύσιμο σε ψυχρό MgCl₂) και η OD τους εκτιμήθηκε φωτομετρικά στα 600 nm (OD₆₀₀=0,3). Πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα από φυτά 5- ή 6-εβδομάδων χρησιμοποιήθηκαν για τη μόλυνση με τα βακτήρια. Τα συγκεκριμένα φυτά αναπτύχθηκαν σε θερμοκήπιο και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο 1 ημέρα πριν τη μόλυνση. Τα βακτήρια αραιώθηκαν με διαδοχικές αραιώσεις [5×10^5 colony-forming units (cfu) ml⁻¹] και στη συνέχεια ενέθηκαν στον αποπλάστη των φυτών σε ΓΤΦ και σε φυτά *WT*, όπως περιγράφεται στον *Klement et al. (1964)* και τα φυτά διατηρήθηκαν στο εργαστήριο με φωτισμό και θερμοκρασία δωματίου (RT) (24oC).

Καλλιέργειες του ωομύκητα *Phytophthora parasitica*

Το στέλεχος της *Phytophthora parasitica* (syn. *nicotianae*) var *nicotianae* φυλή Tucker 0 που απομονώθηκε από καπνό (χορηγήθηκε ευγενικά από τον *Arnaud Bottin Université de Toulouse*), αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο *V-8 agar medium* (50 mL του *V-8* χυμού και 20 g L⁻¹ agar, pH 5.0) στους 23 °C και διατηρήθηκαν στους 15 °C σε σκοτάδι.

Μόλυνση Μεσόφυλλου με τον ωομύκητα *Phytophthora parasitica*

Πλάκες νεαρών μυκηλίων, κόπηκαν με τη βοήθεια φελοτρυπητήρα διαμέτρου 15-mm και τοποθετήθηκαν ανάποδα σε φύλλα φυτών 4 εβδομάδων. Οι πλάκες καλύφθηκαν με υγρό βαμβάκι και τα φύλλα επώαστηκαν για 7 ημέρες στους 23°C σε τετράγωνα τριβλία 20x20 cm.

Μόλυνση Μεσόφυλλου με τον ιό CMV

Για τη μόλυνση μεσόφυλλων *WT* και ΓΤΦ φυτών με τον ιό CMV χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μηχανικής μόλυνσης. Συγκεκριμένα, ήδη μολυσμένα φύλλα λειοτριβήθηκαν παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4/K_2HPO_4 και τα ισοσμάτια που απομονώθηκαν μετά από φυγοκέντριση χρησιμοποιήθηκαν για μόλυνση στο τρίτο και τέταρτο φύλλο φυτών ηλικίας 5- έως 7-εβδομάδων. Επτά και 12 ημέρες μετά τη μόλυνση, δείγματα λήφθηκαν από όλα τα μολυσμένα φύλλα και αποθηκεύτηκαν στους $-20^{\circ}C$. Συνολικά τα φυτά αναπτύχθηκαν για 40 ημέρες μετά τη μόλυνση παρακολουθώντας και σκοράροντας τα συμπτώματα της μόλυνσης.

Μικροσκοπία διέλευσης για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της πηκτίνης

Για την ανίχνευση της πηκτίνης, μικρά τμήματα ιστού ($2-5 \text{ mm}^2$) από τη κεντρική περιοχή της νεύρωσης φυτών καπνού (3ο φύλλο) στερεώθηκαν για 4h σε ένα μίγμα 0.05% (w/v) ερυθρού του ρουθηνίου και 3% (v/v) γλουταραλδεΐδης σε 50 mM CB, pH 7.4. Μετά το πλύσιμο στο ίδιο ΡΔ, οι ιστοί μετά τη διαδικασία στερέωσης σε 1% (w/v) OsO_4 , στη συνέχεια αφυδατώθηκαν σε διαδοχικά διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έγκληση σε ρητίνη μικρού ιξώδους (*Sprur's low-viscosity resin*, *Sprur*, 1969). Οι τομές υπέστησαν χρώση με οξεικό ουρανίλιο.

Ανίχνευση και Ποσοτικοποίηση της λιγνίνης

Φύλλα που είχαν μολυνθεί καθώς και τα αντίστοιχα πειράματα αρνητικού ελέγχου, επώαστηκαν σε απόλυτη μεθανόλη για παραπάνω από 3 ημέρες ώστε να απομακρυνθούν οι χρωστικές τους. Η λιγνιτοποίηση του κυτταρικού τοιχώματος έγινε ορατή με επώαση των δειγμάτων σε 1 mL of 1% (w/v) φλορογλουκινόλης σε 70% (v/v) αιθανόλη. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε γυάλινη επιφάνεια και μεταχειρίστηκαν με σταγόνες πυκνού HCl. Μετά από 5min, το επιπλέον HCl αφαιρέθηκε από τις επιφάνειες των φύλλων και αντικαταστάθηκε με ddH₂O και τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο. Η λιγνίνη επίσης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του θειογλυκολικού οξέως σύμφωνα με τους *Dos Santos et al.* (2004). Τα επίπεδα λιγνίνης εκφράστηκαν ως σύμπλοκο mg λιγνίνης-θειογλυκολικού g^{-1} ξηρού βάρους του φύλλου χρησιμοποιώντας τη μοριακή απορρόφηση $\epsilon=17.87 \text{ g L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Εναπόθεση καλόζης

Η εναπόθεση καλόζης σε φύλλα παρατηρήθηκε αφού τα δείγματα είχαν επωασθεί σε 95% (v/v) αιθανόλη ώστε να απομακρυνθούν οι χρωστικές και στη συνέχεια επώαστηκαν σε μπλε της ανιλίνης και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (*Nikon Eclipse E800 I*, *Tokyo*, *Japan*) με φίλτρο διέγερσης (*excitation filter*) EX 450-490 και φίλτρο εκπομπής (*emission filter*) BA 520 χρησιμοποιώντας ως σύστημα καταγραφής και απεικόνισης το *SONY 655 SONY DXC-950P* (*Tokyo*, *Japan*).

Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με *one-way* ανάλυση διακύμανσης (ANOVA).

Ανάλυση εικόνας

Η ανάλυση εικόνας πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό *Image J*.

Βιβλιογραφία

- Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB. (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 601–611.
- Alcazar R, Marco F, Cuevas JC, Patron M, Ferrando A, Carrasco P, Tiburcio AF, Altabella T. (2006). Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol. Lett.* 28, 1867-1876.
- Ahlfors R, Macioszek V, Rudd J, Broscher` M, Schlichting R, Scheel D, Kangasjarvi J. (2004). Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant J.* 40, 512–522.
- Angelini R, Bragaloni M, Federico R, Infantino A, Porta-Puglia A. (1993). Involvement of polyamines, diamine oxidase and peroxidase in resistance of chick-pea to *Ascochyta rabiei*. *J. Plant Physiol.* 142, 704–709.
- Appiah AA, Jennings P, Turner JA. (2004). *Phytophthora ramorum*: one pathogen and many diseases, an emerging threat to forest ecosystems and ornamental plant life. *Mycologist* 18, 145–150.
- Badreddine I, Lafitte C, Heux L, Skandalis N, Spanou Z, Martinez Y, Esquerre-Tugaye MT, Bulone V, Dumas B, Bottin A (2008) Cell wall chitosaccharides are essential components and exposed patterns of the phytopathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Eukaryot. Cell* 7, 91–108.
- Bagni N, Tassoni A. (2001). Biosynthesis oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20, 301–317.
- Berta G, Altamura MM, Fuscone A, Cerruti F, Capitani F, Bagni N. (1997). The plant cell wall is altered by inhibitors of polyamine biosynthesis. *New Phytol.* 137, 569-577.
- Bestwick CS, Brown IR, Bennett MHR, Mansfield JW. (1997). Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Cell* 9, 209–221.
- Boller T. (1987). Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. In: Kusuge T, Nester EW, eds. *Plant-microbe interactions: molecular and genetic perspectives, Vol. II*. New York, USA: Macmillan, 247–262.
- Bolwell GP. (1993). Dynamic aspects of the plant extracellular matrix. *Internatl. Rev. of Cytol.* 146, 261–324.
- Bolwell GP, Butt VS, Davies DR, Zimmerlin A. (1995). The origin of the oxidative burst in plants. *Free Rad. Res.* 23, 517–532.
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* 53, 1367–1376.

Βιβλιογραφία

- Borden S, Higgins VJ. (2002). Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 61, 227–236.
- Chen Z, Silva R, Klessig D. (1993). Involvement of reactive oxygen species in the induction of systemic acquired resistance by salicylic acid in plants. *Science* 262, 1883–1886.
- Chibucos MC, Morris PF. (2006). Levels of polyamines and kinetic characterization of their uptake in the soybean pathogen *Phytophthora sojae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3350–3356.
- Cowley T, Walters DR. (2002a). Polyamine metabolism in barley reacting hypersensitively to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Plant, Cell & Environ.* 25, 461–468.
- Cowley T, Walters DR. (2002b). Polyamine Metabolism in an Incompatible Interaction Between Barley and the Powdery Mildew Fungus, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *J. Phytopathol.* 150, 1–7.
- Croft KPC, Voisey CR, Slusarenko AJ. (1990). Mechanism of hypersensitive cell collapse: Correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L.) inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 36, 49–62.
- Dixon RA. (1986). The phytoalexin response: elicitation, signalling, and control of host gene expression. *Biol Rev.* 61, 239–291.
- Dos Santos WD, Ferrarese MLL, Finger A, Teixeira ACN, Ferrarese-Filho O. (2004). Lignification and related enzymes in Glycine max root growth inhibition by ferulic acid. *J. Chem. Ecol.* 30, 1203–1212.
- D’Orazi D, Bagni N. (1987). In vitro interactions between polyamines and pectic substances. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 1159–1163.
- Dwyer SC, Legendre L, Low PA, Leto TL. (1996). Plant and human neutrophil oxidative burst complexes contain immunologically related proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1289, 231–237.
- Erwin CE, Ribeiro OK. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St. Paul.
- Friend J. (1976). Lignification in infected tissue. In: Friend J, Threlfall DR, eds. *Biochemical aspects of plant-parasite relationships*. New York, USA: Academic Press, 291–303.
- Heath MC. (1989). A comparison of fungal growth and plant responses in cowpea and bean cultivars inoculated with urediospores and basidiospores of the cowpea rust fungus. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 34, 415–426.
- Heath MC. (2000). Hypersensitive response-related cell death. *Plant Molec. Biol.* 44, 321–334.

Hennin C, Diederichsen E, Hofte M. (2002). Resistance to fungal pathogen triggered by the *Cf9-Avr9* response in tomato and oilseed rape in the absence of hypersensitive cell death. *Molec. Plant Pathol.* 3, 31–41.

Hiraga S, Ito H, Yamakawa H, Ohtsubo N, Seo S, Mitsuhashi I, Matsui H, Honma M, Ohashi Y. (2000). An HR-induced tobacco peroxidase gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl-jasmonate, and ethephon. *Molec. Plant–Micr. Interact.* 13: 210–216.

Hirt H. (2002). A new blueprint for plant pathogen resistance. *Nat. Biotechnol.* 20: 450–451.

Imlay JA, Linn S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240, 1302–1304.

Jang E-K, Min K-H, Kim S-H, Nam S-H, Zhang S, Kim YC, Cho BH, Yang K-Y (2009). Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in the Signaling for polyamine biosynthesis in tobacco. *Plant Cell Physiol.* 50, 658–664.

Kauss H. (1987). Some aspects of calcium-dependant regulation in plant metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 47–92.

Klement Z, Farkas GL, Lovrekovich L. (1964). Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54, 474–477.

Kotzabasis K, Christakis-Hampsas MD, Roubelakis-Angelakis KA. (1993). A narrow-bore HPLC method for the identification and quantitation of free, conjugated, and bound polyamines. *Anal. Biochem.* 214, 484–489.

Kroj T, Rudd JJ, Nurnberger T, Gabler Y, Lee J, Scheel D. (2003). Mitogenactivated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J. Biol. Chem.* 278, 2256–2264.

Lamb C, Dixon RA. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251–275.

Lazzarato L, Trebbi G, Pagnucco C, Franchin C, Torrigiani P, Betti L. (2009). Exogenous spermidine, arsenic and b-aminobutyric acid modulate tobacco resistance to tobacco mosaic virus, and affect local and systemic glucosylsalicylic acid levels and arginine decarboxylase gene expression in tobacco leaves. *J. Plant Physiol.* 166, 90–100.

Low PS, Merida JR. (1996). The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiol. Plant.* 96, 533–542.

Mansfield JW. (1990). Recognition and response in plant–fungus interactions. In: Fraser RSS, ed. *Recognition and response in plant–virus interactions*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 31–52.

Mansfield JW, Bennett MH, Bestwick CS, Woods-Tor AM. (1997). Phenotypic expression of gene–for–gene interactions involving fungal and bacterial pathogens:

Βιβλιογραφία

- Variation from recognition to response. In: Crute IR, Holub EB, eds. *The gene-for-gene relationships in host-parasite interactions*. London, UK: CAB International, 265–291.
- Marina M, Maiale SJ, Rossi FR, Romero MF, Rivas EI, Garriz A, Ruiz OA, and Pieckenstein, FL. (2008). Apoplastic polyamine oxidation plays different roles in local responses of tobacco to infection by the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and the biotrophic bacterium *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiol.* 147, 2164–2178.
- Marini F, Betti L, Scramagli S, Biondi S, Torrigiani P. (2001). Polyamine metabolism is upregulated in response to tobacco mosaic virus in hypersensitive, but not in susceptible, tobacco. *New Phytol.* 149, 301–309.
- Martin-Tanguy J. (1997). Conjugated polyamines and reproductive development: Biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol. Plant.* 100, 675–688.
- Mitsuya Y, Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Matsumura H, Takahashi H, Terauchi R, Tomonobu K. (2009). Spermine signalling plays a significant role in the defense response of *Arabidopsis thaliana* to cucumber mosaic virus. *J. Plant Physiol.* 166, 626–643.
- Moller SG, McPherson MJ. (1998). Developmental expression and biochemical analysis of the *Arabidopsis ataol* gene encoding an H₂O₂-generating diamine oxidase. *Plant J.* 13, 781–791.
- Morel J-B, Dangl JL. (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Different.* 4, 671–683.
- Moschou PN, Delis ID, Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA. (2008a). Transgenic tobacco plants overexpressing polyamine oxidase are not able to cope with oxidative burst generated by abiotic factors. *Physiol. Plant.* 133, 140–156.
- Moschou PN, Paschalidis KA, Delis ID, Andriopoulou AH, Lagiotis GD, Yakoumakis DI, Roubelakis-Angelakis KA. (2008b). Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco. *Plant Cell* 20, 1708–1724.
- Moschou PN, Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA. (2008c). Plant polyamine catabolism: the state of the art. *Plant Signal. Behav.* 3, 1061–1066.
- Moschou PN, Sarris PF, Skandalis N, Andriopoulou AH, Paschalidis KA, Panopoulos NJ, and Roubelakis-Angelakis KA. (2009). Engineered Polyamine Catabolism Preinduces Tolerance of Tobacco to Bacteria and Oomycetes. *Plant Physiol.* 149, 1970–1981.
- Negrel J, Vallee J-C, Martin C. (1984). Ornithine decarboxylase activity and the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 23, 2747–2751.
- Palukaitis P, Roossinck MJ, Dietzgen RG, Francki RI (1992) Cucumber mosaic virus. *Adv. Virus Res.* 41, 281–348.

- Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA. (2005a). Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant: correlations with age, cell division/ expansion, and differentiation. *Plant Physiol.* 138: 142–152.
- Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA. (2005b). Sites and regulation of polyamine catabolism in the tobacco plant: correlations with cell division/expansion, cell cycle progression, and vascular development. *Plant Physiol.* 138: 2174–2184.
- Peng M, Kuc J. (1992). Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf discs. *Phytopathology* 82, 696–699.
- Primikiriou NI, Roubelakis-Angelakis KA. (1999). Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L. cell-suspension cultures. *Planta* 208, 574–582.
- Primikiriou NI, Roubelakis-Angelakis KA. (2001). Indications for posttranslational regulation of *Vitis vinifera* L. arginine decarboxylase. *Plant Mol. Biol.* 45, 669–678.
- Richael C, Gilchrist D. (1999). The hypersensitive response: a case of hold or fold? *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 55, 9–12.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Samuel MA, Ellis BE. (2002). Double jeopardy: both overexpression and suppression of a redox-activated plant mitogen-activated protein kinase render tobacco plants ozone sensitive. *Plant Cell* 14, 2059–2069.
- Sebela M, Radová A, Angelini R, Tavladoraki P, Frébort I, Peè P. (2001). FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant Sci.* 160, 197–207.
- Sharma PC, Ito ZA, Shimizu ZT, Terauchi ZR, Kamoun S, Saitoh ZH. (2003). Virus-induced silencing of WIPK and SIPK genes reduces resistance to a bacterial pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Genet. Genom.* 269, 583–591.
- Spurr AR. (1969). A low viscosity embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct. Res.* 26, 31–43.
- Stakman EC. (1915). Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J. Agr. Res.* 4, 193–199.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Mettraux JP. 1997. Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 235–270.
- Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Seo S, Ohashi Y, Kusano T. (2003). Spermine signalling in tobacco: activation of mitogen-activated protein kinases by spermine is mediated through mitochondrial dysfunction. *Plant J.* 36, 820–829.

Βιβλιογραφία

Tavladoraki P, Schinina ME, Cecconi F, Di Agostino S, Manera F, Rea G, Mariottini P, Federico R, Angelini R. (1998). Maize polyamine oxidase: primary structure from protein and cDNA sequencing. *FEBS Lett.* 426, 62–66.

Torrigiani P, Rabiti AL, Bortolotti G, Betti L, Marani F, Canova A, Bagni N. (1997). Polyamine synthesis and accumulation in the hypersensitive response to TMV in *Nicotiana tabacum*. *New Phytol.* 135, 467–473.

Vanacker H, Carver TLW, Foyer CH. (2000). Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley–powdery mildew interaction. *Plant Physiol.* 123, 1289–1300.

Vivian A, Arnold DL. (2000). Bacterial effector genes and their role in host-pathogen interactions. *J. Plant Pathol.* 82, 163–178.

Walters DR. (2000). Polyamines in plant–microbe interactions. *Physiol.Molec. Plant Pathol.* 57, 137–146.

Walters D, Cowley T, Mitchell A. (2002). Methyl-jasmonate alters polyamine metabolism and induces systemic protection against powdery mildew infection in barley seedlings. *J. Exp. Bot.* 53, 747–756.

Wojtaszek P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322, 681–692.

Yamakawa H, Kamada H, Satoh M, Ohashi Y. (1998). Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 118, 1213–1222.

Yasuda M, Nakashita H, Hasegawa S, Nishioka M, Arai Y, Uramoto M, Yamaguchi I, Yoshida S. (2003). N-Cyanomethyl-2-chloroisonicotinamide induces systemic acquired resistance in *Arabidopsis* without salicylic acid accumulation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 322–328.

Yoda H, Yamaguchi Y, Sano H. (2003). Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiol.* 132, 1973–1981.

Yoda H, Hiroi Y, Sano H. (2006). Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiol.* 142, 193–206.

Zhang S, Klessig DF. (1998). The tobacco wounding-activated mitogenactivated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7225–7230.

Κεφάλαιο 4^ο

Στο 4ο κεφάλαιο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της διερεύνησης της δυνατότητας χρήσης των μικροβιακών και ιικών πρωτεϊνών τελεστών ως «λειτουργικών δεικτών» στη γονιδιωματική ανάλυση, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως νέο εργαλείο σε προγράμματα συμβατικής γενετικής βελτίωσης για ανθεκτικότητα των φυτών σε ασθένειες και ως εργαλείο στην μελέτη της ποικιλομορφίας ειδών αγρονομικού και αγρό-οικολογικού ενδιαφέροντος. Προκαταρκτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή των «λειτουργικών δεικτών» σε πατρικές σειρές και απογόνους διασταυρώσεων μεταξύ επιλεγμένων ειδών/ποικιλιών καπνού με βακτηριακούς και ιικούς effectors παρουσιάζονται.

Πρωτεΐνες «τελεστές» των παθογόνων ως «λειτουργικοί δείκτες» στη γονιδιωματική ανάλυση και στην γενετική βελτίωση της ανθεκτικότητας στον φυτών σε ασθένειες

Εισαγωγή: Θεωρητικό υπόβαθρο

Η δυνατότητα των φυτικών ειδών να στοιχειοθετούν και να πλαισιώνουν μια αμυντική απόκριση σε εν δυνάμει παθογόνους μικροοργανισμούς, θεωρείται κυρίαρχος παράγων της εξέλιξης και της αναπτυξιακής επιτυχίας τους. Σύμφωνα με αρχαία απολιθωμάτων, η εμφάνιση των πρώτων χερσαίων φυτών χρονολογείται περίπου πριν 480 εκατομμύρια έτη. Εντούτοις, με βάση μοριακές εκτιμήσεις η εμφάνιση τους τοποθετείται ίσως και πριν από 700 εκατομμύρια έτη (Heckman, et. al. 2001). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ύπαρξη ενδείξεων ότι η εμφάνιση των πρώτων χερσαίων φυτών, φαίνεται να διευκολύνθηκε από την αλληλεπίδραση τους με συμβιωτικούς μύκητες και ότι τα φυτά έχουν συνεξελιχθεί με τα μικρόβια από την πρώτη τους εμφάνιση στη Γη (Gehrig, et. al. 1996).

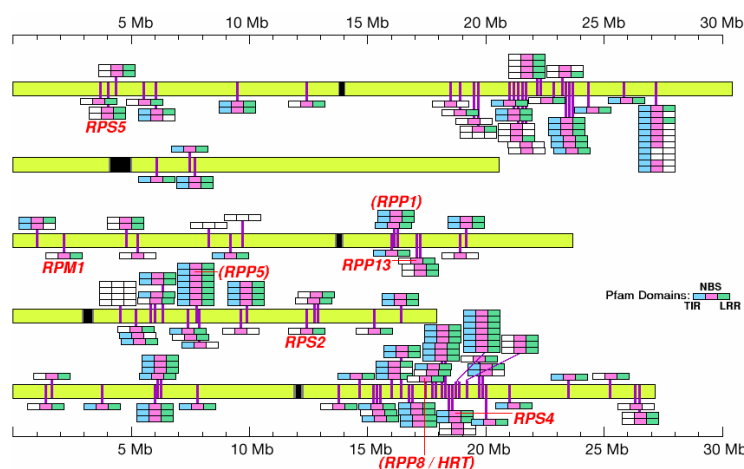
Αν και μόνο υποθέσεις μπορούμε να κάνουμε για τα γεγονότα που ακολούθησαν, είναι φανερό ότι η εξέλιξη των φυτών της ξηράς έχει προχωρήσει παράλληλα με εκείνη των αλληλεπιδράσεων με των επιφυτικών, συμβιωτικών και παθογόνων μικροβίων.

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο (Κεφ. 1), τα φυτά, όπως και τα ζώα, βάλλονται συνεχώς από μια πλειάδα πιθανών παθογόνων. Όλο και περισσότερα στοιχεία δείχνουν ότι οι αμυντικοί μηχανισμοί των φυτών είναι τουλάχιστον όσο σύνθετοι είναι και αυτοί των σπονδυλωτών.

Σε αντίθεση όμως με τα ζώα τα φυτά δεν έχουν κυκλοφορικό σύστημα με αποτέλεσμα να μην μπορούν να στηριχθούν σε ένα εξειδικευμένο, πολλαπλασιαστικό ανοσοποιητικό σύστημα. Επομένως κάθε φυτικό κύτταρο πρέπει να είναι ικανό να αμυνθεί, ακόμα κι αν αυτή η αντίδραση περιορίζεται τοπικά, σε επίπεδο μερικών κυττάρων ή διαδίδεται συστηματικά σε ολόκληρο το φυτό.

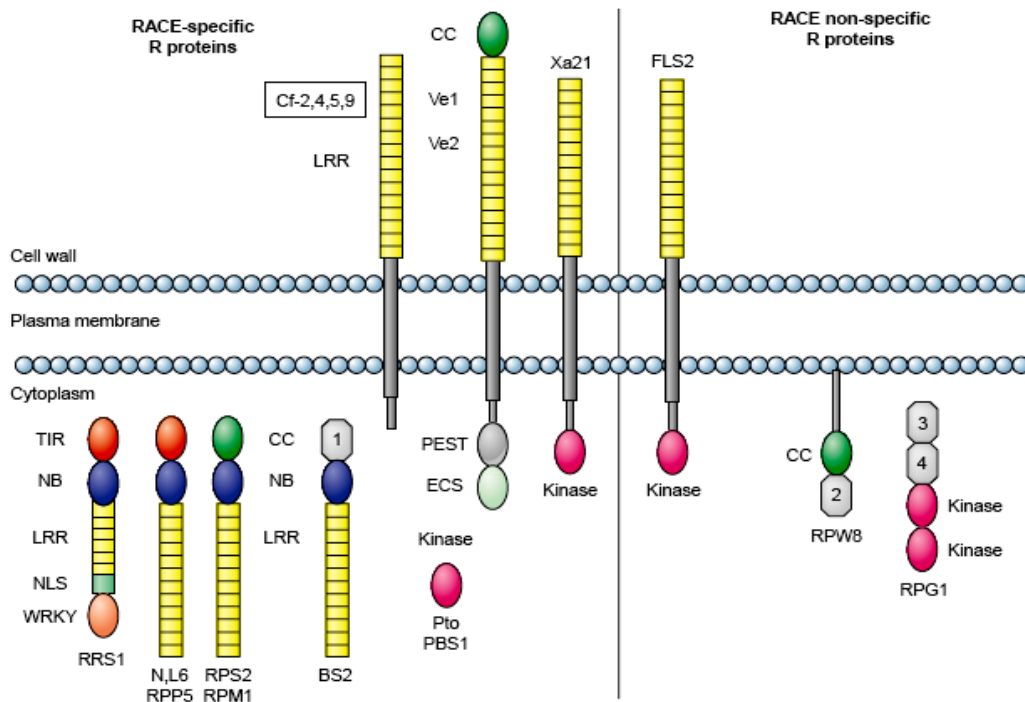
Στα φυτά, όπως και σε άλλους ανώτερους οργανισμούς, υπάρχουν τόσο επαγόμενοι (*induced*) όσο και συστατικοί (*constitutive*) μηχανισμοί αντοχής σε παθογόνα.

Στα φυτά συχνά, αν και όχι πάντα, η ανθεκτικότητα στις ασθένειες καθορίζεται γενετικά από κυρίαρχα γονίδια. Η κλωνοποίηση και η μελέτη τέτοιων γονιδίων ανθεκτικότητας (*Resistance* ή *R genes*) παρέχει πληροφορίες για την εξέλιξη και την πιθανή λειτουργία τους σε μοριακό επίπεδο. Γονίδια παρόμοια με τα γονίδια *R* των φυτών έχουν προσδιοριστεί και στα θηλαστικά. Αρκετοί ερευνητές σήμερα πιστεύουν ότι το αμυντικό σύστημα των φυτών έχει αρχαία προέλευση και προηγήθηκε χρονικά της εξέλιξης του ανοσοποιητικού συστήματος των σπονδυλωτών. Τα κλασσικά γενετικά, και κυρίως τα μοριακά και γονιδιωματικά δεδομένα δείχνουν ότι τα γονίδια *R* είναι συχνά συγκεντρωμένα σε ομάδες στο γονιδίωμα των φυτικών οργανισμών (*Εικ. 1*). Αυτό έχει εξελικτικές, μηχανιστικές και λειτουργικές πτυχές ορισμένες από τις οποίες (π.χ. λειτουργικά ομόλογα ή ψευδογονίδια), έχουν ιδιαίτερη σημασία στα πλαίσια της εργασίας μας όπως θα παρουσιαστεί στην συνέχεια.



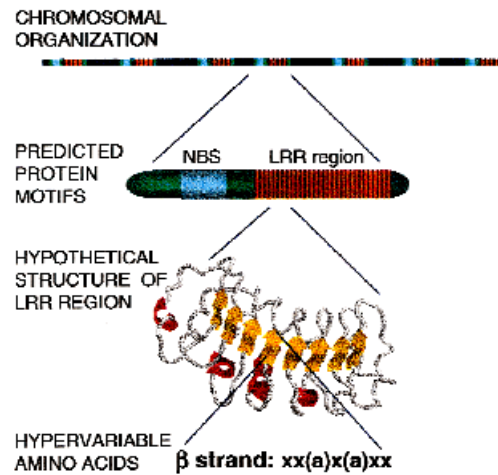
Εικόνα 1. Η κατανομή των «επώνυμων» (κόκκινο σύμβολα) και «ανώνυμων» γονιδίων ανθεκτικότητας (*R*) στα 5 χρωμοσώματα του φυτού μοντέλου *Arabidopsis thaliana*, (Blake Meyers: http://pgfsun.ucdavis.edu/niblrrs/At_RGenes/).

Από λειτουργικής πλευράς, ιδιαίτερη σημασία έχει το γεγονός ότι τα γονίδια ανθεκτικότητας (*R genes*) που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε διαφορετικά παθογόνα και έχουν κλωνοποιηθεί από διάφορα φυτικά είδη, κωδικοποιούν πρωτεΐνες που έχουν κοινά δομικά μοτίβα (**Εικ. 2a, b**). Τα μοτίβα αυτά μαρτυρούν τη συμμετοχή των πρωτεϊνών αυτών σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες *R* έχουν επαναλαμβανόμενα μοτίβα πλούσια σε λευκίνη (*leucine-rich repeat* - *LRR*). Σε αυτήν την περιοχή, ακολουθίες που κωδικοποιούν αμινοξικά κατάλοιπα εκτεθειμένα στο υδρόφιλο περιβάλλον (*solvent-exposed*) είναι υπερμεταβλητές (*hyper-variable*) και έχουν υψηλές αναλογίες από μη συνώνυμες ή και συνώνυμες υποκαταστάσεις αμινοξέων. Αυτό πιθανόν υποδηλώνει ότι έχουν εξελιχθεί έτσι ώστε να ανιχνεύουν μια ποικιλία παραγόντων προερχόμενων από διάφορα παθογόνα.



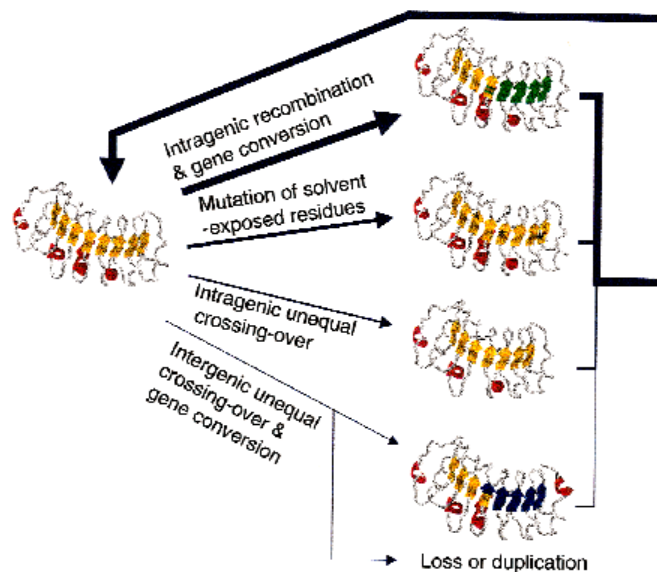
Εικόνα 2a. Κατηγορίες γονιδίων ανθεκτικότητας (*Hammond-Kosack, et. al. 2003*) με βάση τα δομικά του μοτίβα, **ECS**: σήμα ενδοκύττωσης, **L6**: γονίδιο ανθεκτικότητας στην σκωρίαση του λιναριού 6, **PBS1**: γονίδιο ανθεκτικότητας στη βακτηριακή κηλίδωση από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* που εκφράζει το γονίδιο *avrPphB*, **Pto**: γονίδιο ανθεκτικότητας στο *P. syringae* *pv. tomato*, **RPG1**: γονίδιο ανθεκτικότητας στο *Puccinia graminis f.sp. tritici* 1, **RPM1**: γονίδιο ανθεκτικότητας στο βακτήριο *P. syringae* *pv. maculicola* που εκφράζει το γονίδιο *avrRpm1* ή *avrB*, **RPP5**: γονίδιο ανθεκτικότητας στον ωμόμκητα *Peronospora parasitica*, **RPW8**: γονίδιο ανθεκτικότητας στο ωίδιο (*powdery mildew*), **RRS1**: γονίδιο ανθεκτικότητας στο βακτήριο *Ralstonia solanacearum* 1, **Xa21**: γονίδιο ανθεκτικότητας στο βακτήριο *Xanthomonas oryzae* *pv. oryzae*, **BS2**: γονίδιο ανθεκτικότητας στη βακτηριακή κηλίδωση της πιπεριάς 2, **Cf-2,4,5,9**: γονίδιο ανθεκτικότητας στο μύκητα *Cladosporium fulvum* φυλή 2, 4, 5 και 9.

CC: coiled coil, NBS: nucleotide binding site, LRR: leucine-rich repeat, TIR: Toll and Interleukin-1 domain, NLS: nuclear localisation sequences, PEST: Pro-Glu-Ser-Thr-like αλληλουχία, WRKY: φυτικές πρωτεΐνες (zinc-finger proteins) με ρόλο μεταγραφικού παράγοντα, συχνά επαγόμενες κατά την αντίδραση του φυτού σε παθογόνα.



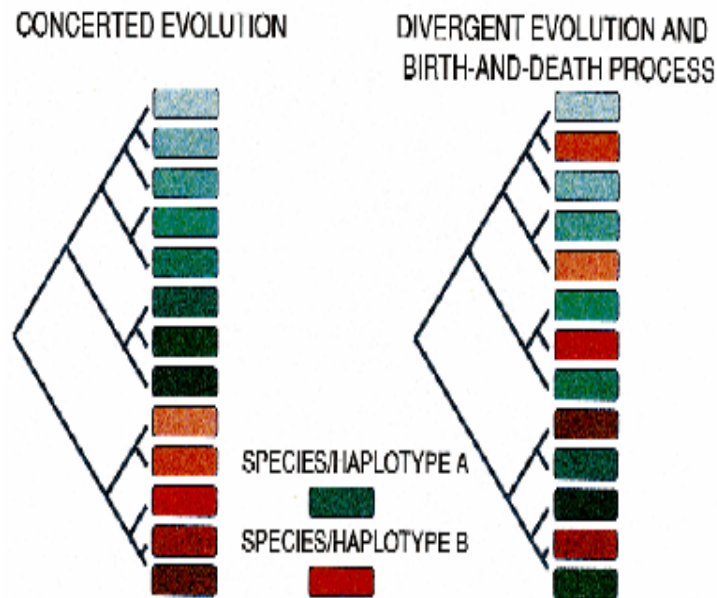
Εικόνα 2b. Η οργάνωση και η δομή των γονιδίων ανθεκτικότητας και των πρωτεϊνικών προϊόντων τους (Michelmore and Meyers, 1998). Η κωδικοποίηση χρώματος των πρωτεϊνικών μοτίβων: Μπλε: nucleotide binding site, πορτοκαλί: περιοχή LRR. Η υποθετική δομή που παρουσιάζεται για ένα μέρος της περιοχής LRR προέρχεται από ένα πρότυπο για τον υποδοχέα της θυρεοτροπίνης (Kajava, et. al. 1995). Στη συναινετική αλληλουχία για το β-πτυχή, (X) οποιοδήποτε αμινοξύ (α) αλειφατικά υπολείμματα.

Παλιότερα, από εξελικτικής πλευράς η δημιουργία νέων μορφών ανθεκτικότητας, είχε θεωρηθεί ότι περιλαμβάνει συχνά την άνισο-διάσχιση (*unequal crossing-over*) προϋπαρχόντων γονιδίων ή ακόμα και μετατροπές (*gene conversion*) στα γονίδια αυτά (Pryor and Ellis 1993; Richter et al. 1995; Hammond-Kosack and Jones 1997; Hulbert 1997; Parniske et al. 1997). Εντούτοις, οι συγκρίσεις μεταξύ των απλότυπων ανθεκτικότητας αποκαλύπτουν ότι τα ορθόλογα γονίδια (*orthologs*) είναι περισσότερο όμοια από τα παράλογα (*paralogs*) υπονοώντας ένα χαμηλό ποσοστό ομογενοποίησης των αλληλουχιών τους λόγω της άνισο-διάσχισης ή της μετατροπής (*conversion*) γονιδιακών αλληλουχιών (Michelmore and Meyers, 1998) (Εικ. 3).



Εικόνα 3. Συνέπειες των γενετικών αλλαγών στα γονίδια ανθεκτικότητας στην περιοχή LRR (Michelmore and Meyers, 1998).

Ένα από τα προτεινόμενα μοντέλα στην βιβλιογραφία, δίνει έμφαση στην «αποκλίνουσα εξέλιξη» (*divergent evolution*) των εκτεθειμένων στο υδρόφιλο περιβάλλον (*solvent-exposed*) αμινοξικών κατάλοιπων των *LRR* περιοχών. Αυτό έχει ως συνέπεια την εξέλιξη μεμονωμένων γονιδίων *R* μέσα σε έναν απλότυπο (**Εικ. 4**) (*Nei, et. al. 1997*). Η άνισο-διάσχιση και οι μετατροπές γονιδίων μέσα στα γένη, είναι σημαντικοί παράγοντες αλλά δεν αποτελούν τους αρχικούς μηχανισμούς παραγωγής της παραλλακτικότητας.



Εικόνα 4. Φυλογενετική διανομή της παραλλακτικότητας της ακολουθίας που αναμένεται για τα ομόλογα των *R* γονιδίων, υπό διαφορετικών τύπων εξέλιξη (*Michelmore and Meyers, 1998*).

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας που παρουσιάζεται σε αυτό το κεφάλαιο είναι η συνδυασμένη αξιολόγηση και αξιοποίηση των δεδομένων της γονιδιωματικής έρευνας τόσο σε παθογόνους μικροοργανισμούς (βακτήρια και ιούς) όσο και των οικονομικής σημασίας φυτικών ειδών αλλά και φυτών μοντέλων. Αρχικά επιθυμούσαμε την ανάπτυξη και κατάδειξη της χρησιμότητας, σε εργαστηριακή κλίμακα (*proof of concept*), ενός πρωτότυπου πακέτου «Λειτουργικών Δεικτών» ή «Βιοδεικτών» για την εφαρμογή του σε προγράμματα κλασσικής γενετικής βελτίωσης ποικιλιών καλλιεργούμενων φυτών για ανθεκτικότητα σε ασθένειες («Φυτοπαθοβελτίωση»). Καθώς επίσης και στη χρήση των «Βιοδεικτών» ως εργαλείο στη φυλογενετική

Διδακτορική Διατριβή Σαρρής Φ. Παναγιώτης

ταυτοποίηση φυτικών ειδών, με βάση την καταγραφή της παρουσίας/απουσίας συγκεκριμένων λειτουργικών γονιδίων ανθεκτικότητας.

Η τεχνολογία των «Βιοδεικτών» ευελπιστούμε να χρησιμοποιηθεί ως συνοδό εργαλείο στην μελέτη της διάσχισης και συν-διάσχισης γονιδίων ανθεκτικότητας σε προγράμματα βελτίωσης φυτικών ειδών οικονομικού ενδιαφέροντος (βασιζόμενο στην μεθοδολογία που εξηγείται στη συνέχεια).

Σήμερα, στην βελτιωτική προσπάθεια ανάπτυξης νέων ποικιλιών η κληρονόμηση των γονιδίων ανθεκτικότητας, στους απογόνους *FI* κ.τ.λ. γενεών μιας διασταύρωσης μπορεί να γίνει με δύο κυρίως τρόπους:

- α) Με μολύνσεις των απογόνων μιας διασταύρωσης με το κατάλληλο παθογόνο (με τις δυσκολίες και τους κινδύνους που αυτές συνεπάγονται π.χ. διασπορά του παθογόνου),
- β) Με την χρήση μοριακών δεικτών, στενά συνδεδεμένων με γονίδια (εντοπίζονται δυσκολίες στην ανάπτυξη τους ιδιαίτερα σε φυτικά είδη με μη αλληλουχημένο η πυκνά χαρτογραφημένο γονιδίωμα).

Η τεχνολογία των «Βιοδεικτών» βασίζεται στην αποδεδειγμένη ομαδοποίηση (*clustering*) των γονιδίων ανθεκτικότητας στο γονιδίωμα των φυτών. Λόγω της ομαδοποίησης αυτής και με την χρήση των «Βιοδεικτών» ο βελτιωτής θα δύναται να παρακολουθεί έμμεσα ή άμεσα την κληρονόμηση της ανθεκτικότητας που τον ενδιαφέρει, παρακολουθώντας ουσιαστικά το αποτέλεσμα της αντίδρασης (αντίδραση υπερευαισθησίας - *HR*) μεταξύ γνωστών γονιδίων αμολυσματικότητας (*avirulence-avr*, βλέπε κεφ. 1), του παθογόνου, για τα οποία υπάρχουν λειτουργικά αντίστοιχα γονίδια *R* στο φυτό, καθώς και τη συγκληρονόμηση γονιδίων ανθεκτικότητας τα οποία βρίσκονται στον ίδιο ή κοντινό γενετικό τόπο με την ανθεκτικότητα που μελετάει.

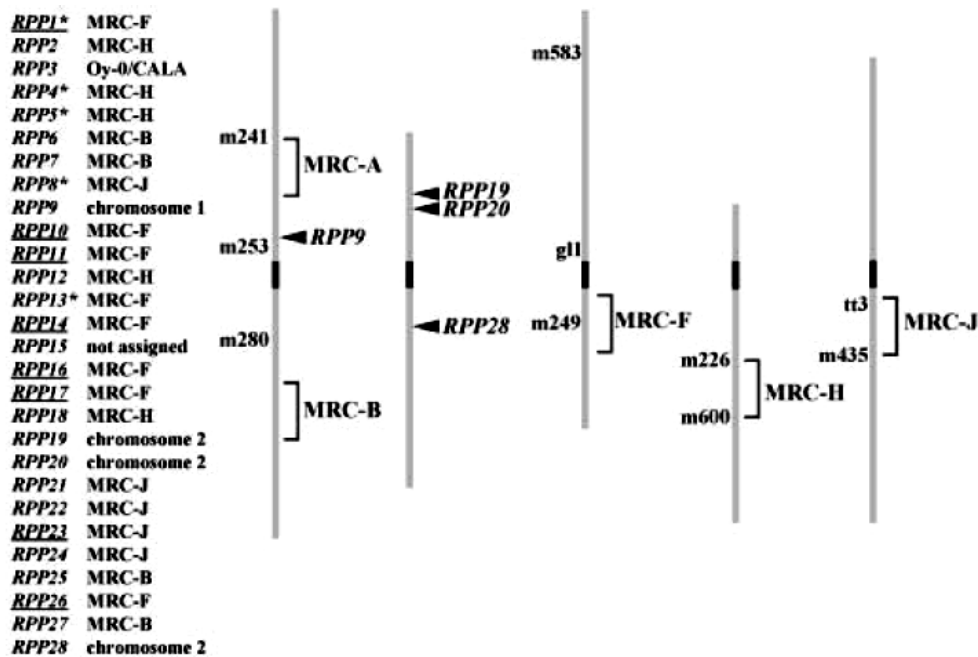
Στην περίπτωση των φυτοπαθογόνων ιών είναι δυνατόν να παρακολουθούμε άμεσα την ανθεκτικότητα βασιζόμενοι στην εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (αντί διασυστηματικής μόλυνσης από τον ιό), στις ήδη γνωστές ικές πρωτεΐνες οι οποίες λειτουργούν ως παράγοντες αμολυσματικότητας (π.χ. το τμήμα της ελικάσης της ρεπλικάσης του *TMV*, η καψιδιακή πρωτεΐνη του *CMV-Y*, η καψιδιακή πρωτεΐνη του *ToMV* κ.α.) χωρίς να απαιτείται η μόλυνση των υπό μελέτη φυτών με τον ιό.

Αποτελέσματα

Αρχικά είχαμε αποφασίσει να προσεγγίσουμε πειραματικά την υπόθεση μας χρησιμοποιώντας το φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* του οποίου το γονιδίωμα είναι στο σύνολο του γνωστό και κατά συνέπεια είναι γνωστές οι αλληλουχίες και οι γενετικοί τόποι αρκετών γονιδίων ανθεκτικότητας σε διάφορα παθογόνα.

Για παράδειγμα, το χρωμόσωμα 5 της *Arabidopsis thaliana* (NCBI: NC_003076) είναι περίπου 27.892.486bp. Αυτό μεταφράζεται σε 138.80cM (*The Arabidopsis Information Resource* <http://arabidopsis.org/servlets/mapper?chr=5>). Λαμβάνοντας αυτά υπόψη καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι: στην *Arabidopsis thaliana* κατά μέσο όρο γενετικής απόστασης 1 cM, μεταξύ γονιδιακών τομέων, αντιστοιχεί περίπου με φυσική απόσταση 201 kb, εξαιρουμένων των περιπτώσεων «υπερσύνδεσης».

Μετά από επισκόπηση πολλών βιβλιογραφικών και χαρτογραφικών δεδομένων εντοπίστηκε μια συγκεκριμένη περιοχή στο χρωμόσωμα 5 της *Arabidopsis* η οποία αναλύθηκε πιο λεπτομερώς. Στην περιοχή αυτή (**Εικ. 5**), που βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 5, έχουν χαρακτηριστεί, έως σήμερα, δέκα γονίδια γνωστής ανθεκτικότητας σε διάφορα παθογόνα (*RAC3*, *RPS4*, *HRT*, *TTR1* και πέντε ξεχωριστοί *RPP* γενετικοί τόποι στους οποίους εντοπίζονται τα γονίδια *RCY1*, *RPP8* και *HPT*) (Botella et al., 1997; Takahashi et al., 2001).



Εικόνα 5. Κατανομή των χαρτογραφημένων γονιδίων *RPP* κατά μήκος των πέντε χρωμοσωμάτων της *Arabidopsis thaliana* (Slusarenco and Schlaich, 2003). **Αριστερά:** αριθμητικός κατάλογος των 27 γνωστών γονιδίων *RPP* με τον χρωμοσωμικό ή *MRC* (major recognition gene complexes) εντοπισμό τους. **Δεξιά:** γραφική αναπαράσταση των 5

Διδακτορική Διατριβή Σαρρής Φ. Παναγιώτης

χρωμοσωμάτων της *Arabidopsis* με το χρωμόσωμα 1 στα αριστερά και το χρωμόσωμα πέντε στα δεξιά. Τα κεντρομερίδια παρουσιάζονται ως μαύρα κουτιά. Οι δείκτες χαρτογράφησης δίνονται αριστερά του χρωμοσώματος. Η περιοχή ενός MRC, σχετιζόμενη με την ανθεκτικότητα στον μύκητα *Peronospora parasitica*, είναι υποδειγμένη με μία μαύρη αγκύλη και ο γεωμετρικός τόπος ενός συγκεκριμένου γονιδίου RPP παρουσιάζεται με μαύρο βέλος δεξιά του χρωμοσώματος. Τα υποψήφια γονίδια R τις *Arabidopsis* ονομάστηκαν γονίδια RPP (*Recognition of Peronospora parasitica*) (Crute et al, 1993).

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του χρωμοσώματος 5, του οικότυπου *Columbia (Col)*, μεταξύ των μοριακών δεικτών *MNL12/flr1* και *MQD19/flr1* είναι διαθέσιμη στο: *The Arabidopsis Information Resource (TAIR, <http://www.arabidopsis.org>)*. Στην περιοχή αυτή προσδιορίστηκε το γονίδιο *rpp8* το οποίο είναι αλληλόμορφο τριών κυρίαρχων γονιδίων R, το **RPP8** (στον οικότυπο *Ler*), το **HRT** (οικότυπο *Dijon-17* και *Dijon-0*) και το **RCY-1** [οικότυποι *C24*, *Coimbra (Co-1)* και *Buchen/Lauenburg (Bch-1)*], τα οποία παρέχουν ανθεκτικότητα στη *Peronospora parasitica* (*Hyaloperonospora parasitica* φυλές: Emco5, Madi1, Noco2), τον ιό *TCV* (*Turnip Crinkle Virus*) και τον ιό *CMV-Y* αντίστοιχα.

Η πρωτεΐνη *RCY-1* παρουσιάζει αμινοξική ομοιότητα της τάξης του 92.1%, 91.3% και 92.0% με τις πρωτεΐνες *RPP8*, *HRT* και *rpp8*, αντίστοιχα. Επίσης η πρωτεΐνη *RCY-1* παρουσιάζει αμινοξική ομοιότητα σχεδόν 100% με μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αντίστοιχο γονίδιο που απομονώθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση (*PCR*), ενισχύθηκε από τον ανθεκτικό στον *CMV-Y* οικότυπο, *Co-1* (Takahashi, et.al. 2002). Κατά τρόπο ενδιαφέροντα, οι καψιδιακές πρωτεΐνες (*coat protein*) των ιών *CMV-Y* και *TCV*, που δεν παρουσιάζουν καμία ομοιότητα μεταξύ τους σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας, είναι οι επαγωγείς (*elicitors*) της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε οικότυπους της αραβιδόψης που έχουν τα αλληλόμορφα γονίδια *RCY1* και *HRT*, αντίστοιχα.

Το γονίδιο *Rps4* επίσης εντοπίζεται στην περιοχή *MRC-J* του χρωμοσώματος 5 και καθορίζει την ανθεκτικότητα που εμφανίζεται ως αντίδραση υπερευαισθησίας, στο παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato DC3000* όταν σε αυτόν έχει εισαχθεί το γονίδιο *avrRps4*, το οποίο απομονώθηκε αρχικά από το βακτήριο *P. syringae* pv. *pisi race 2* (Hinsch & Staskawicz, 1996), καθώς και σε μετασηματισμένα φυτά καπνού που εκφράζουν το γονίδιο *RPS4* (Zhang, et. al. 2004). Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 1217 αμινοξέων, της οποίας το Ν'-τελικό άκρο έχει ομολογία με την ενδοκυτταρική περιοχή των πρωτεϊνικών υποδοχέων *Toll* της *Drosophila* και των υποδοχέα της ιντερλευκίνης των θηλαστικών (*interleukin-1, TIR-NBS-LRR*).

Το γονίδιο αυτό έχει χαρακτηριστεί ως λειτουργικό τουλάχιστον σε τουλάχιστον 20 οικότυπους της *Arabidopsis* [π.χ. *Col-0* (*Columbia*), *Ler* (*Landsberg erecta*), *Ws-0* (*Wassilewskija*) και *Po-1* (*Poppelsdorf*)], ενώ παρουσιάζεται ως μη λειτουργικό στον οικότυπο *RLD* (*non-functional rps4-RLD allele*). Η φυσική (πραγματική) χρωμοσωμική απόσταση μεταξύ του γενετικού τόπου του γονιδίου *RPS4* (θέση: 18.339.141bp-18.343.249bp) και του *RPP8/HRT*, στον οικότυπο *Col-0*, (θέση: 17.479.839bp-17.484.676bp) είναι περίπου **858.573bp**, που αντιστοιχεί θεωρητικά σε γενετική απόσταση περίπου **4.27 cM** (βλ. προηγούμενα). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα θεωρήσαμε ότι το εν λόγω γονιδιακό ζεύγος (δηλ. η αντίδραση *avrRps4/RPS4*) να μπορεί να αξιοποιηθεί ως δείκτης της συν-διάσχισης των παραπάνω γονιδίων ανθεκτικότητας (*CRY-1* και *RPS4*), άρα και ως δείκτης πιθανής συν-κληρονόμησης της ανθεκτικότητας στον *CMV-Y*.

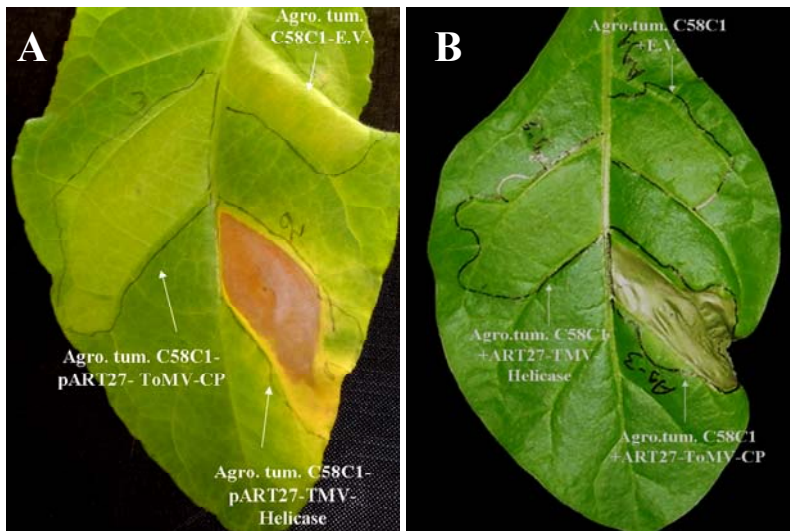
Η παραπάνω σχεδιαστική προσέγγιση εγκαταλείφθηκε λόγω της έλλειψης ειδικών εγκαταστάσεων. Η έλλειψη αυτή καθιστούσε πολύ δύσκολη την ανάπτυξη, την διασταύρωση και τις βιοδοκιμές στους διάφορους οικότυπους του φυτού *Arabidopsis*.

Έτσι για τη μελέτη της κληρονομικής διάσχισης ανθεκτικότητας και την εργαστηριακή απόδειξη της θεωρίας των «Βιοδεικτών» (**Εικ. 9**) επιλέξαμε τελικά να προχωρήσουμε στις παρακάτω διασταυρώσεις

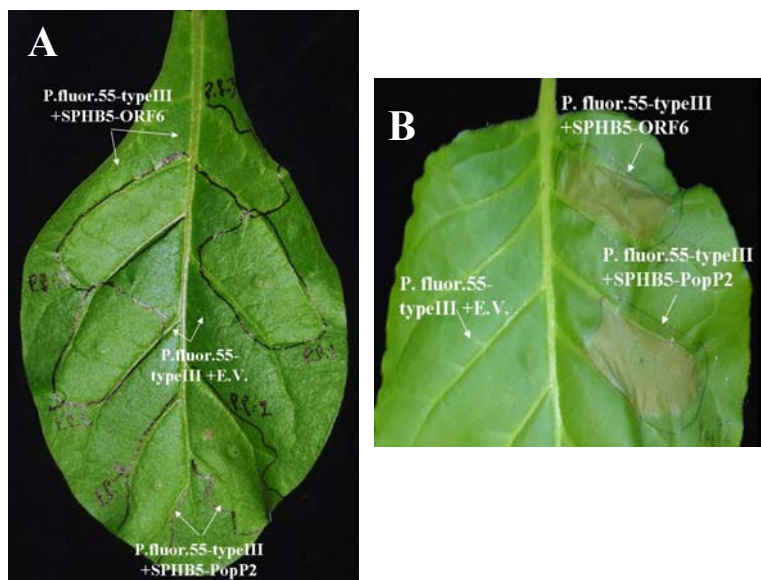
1. *N. sylvestris* N'N' x *N. tabacum* cv. *Xanthi* NN
2. *N. tabacum* cv. *Bright Yellow* (BY) N'N' x *N. tabacum* cv. *Xanthi* NN

Η ποικιλία *N. tabacum* cv. *Xanthi* NN είναι φορέας του γονιδίου ανθεκτικότητας *N* το οποίο έχει δείχτει ότι αλληλεπιδρά με την περιοχή «Ελικάσης» στην Ρεπλικάση του ιού *TMV* επάγοντας *HR* (**Εικ. 6**). Σύμφωνα με αποτελέσματα πειραματικών μας μολύνσεων με διάφορα γονίδια αμολυσματικότητας, από στελέχη φυτοπαθογόνων βακτηρίων, φάνηκε ότι η *N. tabacum* cv. *Xanthi* φέρει και γονίδια ανθεκτικότητας που αναγνωρίζουν της πρωτεΐνες παθογένειας *ORF6* (του βακτηρίου *P.s. pv. syringae* B728a) και την πρωτεΐνη *PopP2* (του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum* GM11000) (**Εικ. 7**).

Το είδος *N. sylvestris* και η ποικιλία *N. tabacum* cv. *Bright Yellow* (BY) είναι φορείς του γονιδίου ανθεκτικότητας *N'* το οποίο αναγνωρίζει την καψιδιακή πρωτεΐνη του ιού *ToMV* επάγοντας *HR* (Saito, et. al. 1987) (**Εικ. 6**).



Εικόνα 6. Βιοδοκιμή Αγρόεμπότισμού με τα πλασμιδίων *pART27-ToMV-CP* και *pART27-TMV-Helicase* σε φυτά *N. tabacum* cv. *Xanthi* NN (A) και *N. sylvestris* N' N' (B).



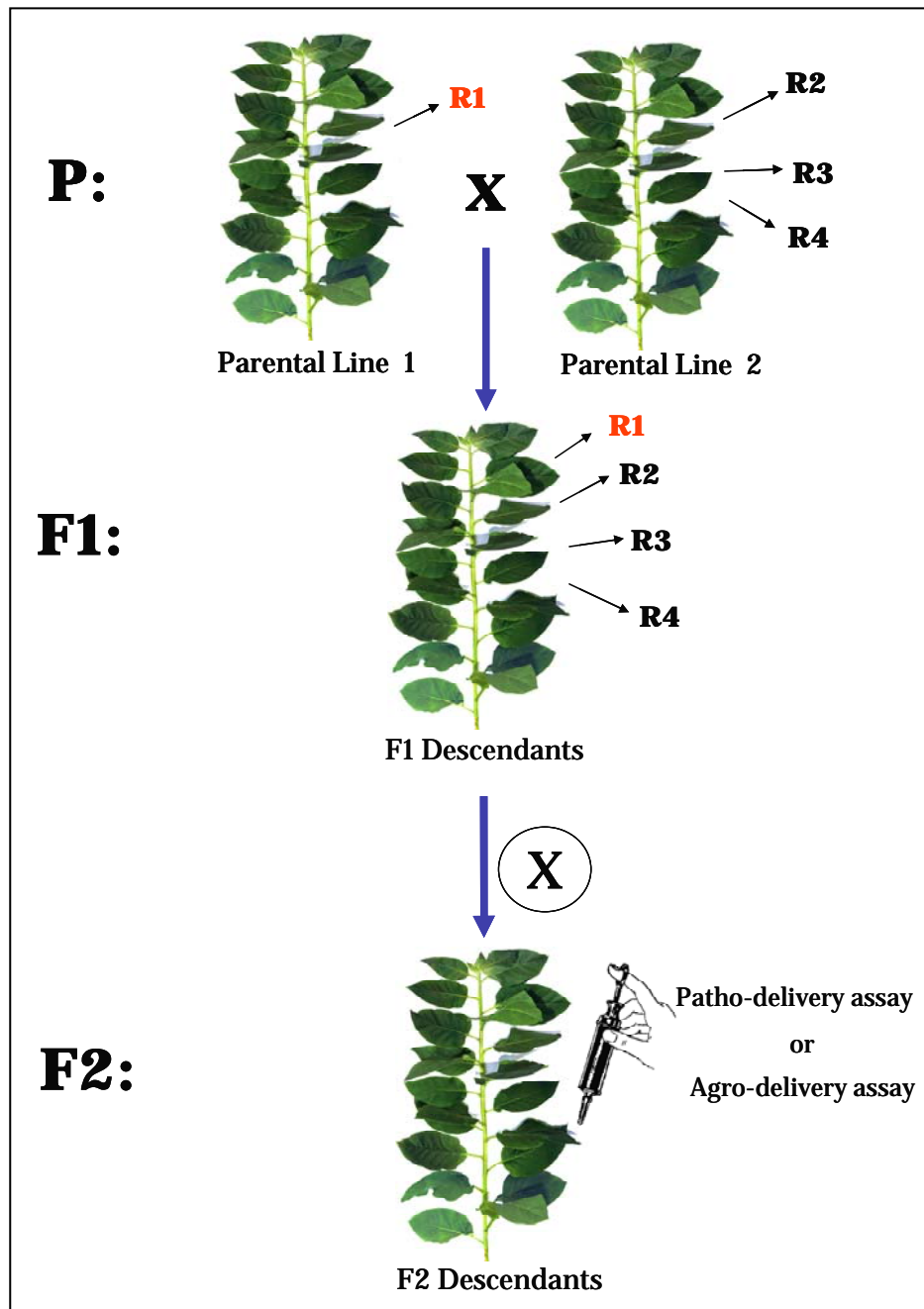
Εικόνα 7. Βιοδοκιμές με τους effectors *ORF6* και *PopP2* με το σύστημα *Pseudomonas fluorescens* 55_{pLN18} σε φυτά *N. sylvestris* (A), *N. tabacum* cv. *Xanthi* NN (B).

Στην συνέχεια διασταυρώσαμε τα είδη *Nicotiana sylvestris* και *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi* NN, ώστε να μελετήσουμε τον τρόπο κληρονομησης των γονιδίων ανθεκτικότητας για τις πρωτεΐνες *ToMV-CP*, *TMV-Helicase*, *ORF6* (*P. s. pv. syringae* B728a), και *PopP2* (*Ralstonia solanacearum*). Σκοπός μας ήταν, όπως έχει προαναφερθεί, να αναπτύξουμε μια νέα μεθοδολογία/εργαλείο για την μελέτη της διάσχισης γονιδίων ανθεκτικότητας σε προγράμματα κλασσικής βελτίωσης φυτών.

Οι *F1* απόγονοι της παραπάνω διασταύρωσης ήταν σχεδόν στο σύνολο τους στείροι (**Εικ. 8**). Κάποιοι από αυτούς έδωσαν ελάχιστους *F2* απογόνους (περίπου 15), τους οποίους μελετήσαμε για την συνδιάσχιση των προαναφερθέντων γονιδίων ανθεκτικότητας. Η μελέτη αυτή έδειξε τη διάσχιση 3:1 για όλα τα υπό μελέτη γονίδια.



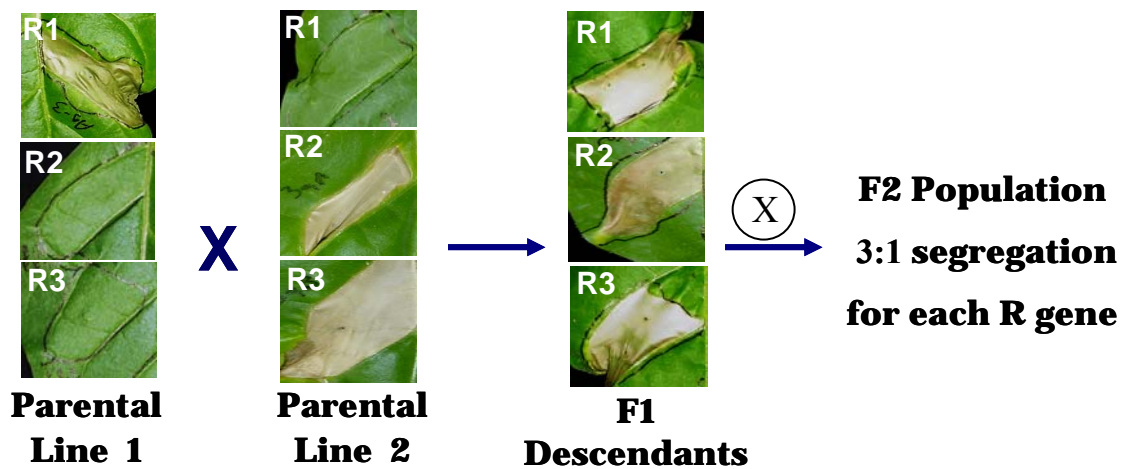
Εικόνα 8. Παρουσίαση φυτικών ειδών *N. sylvestris*, *N. tabacum* cv. *Xanthi* και των απογόνων της διασταύρωσης τους. Οι απόγονοι ομοιάζουν περισσότερο με το είδος *N. tabacum* και ήταν σχεδόν όλοι στείριοι.



Εικόνα 9. Σχηματική παρουσίαση της θεωρίας των «Λειτουργικών Δεικτών» ή «Βιοδεικτών». Οι πατρικές σειρές 1 και 2 φέρνουν τα γονίδια ανθεκτικότητας (R) που μας ενδιαφέρουν. Ο F1 πληθυσμός φέρνει όλα τα κυρίαρχα γονίδια R. Ο πληθυσμός F2 παρουσιάζει τη μέγιστη διάσχιση των χαρακτήρων ανθεκτικότητας. Επίσης αντί του

πληθυσμού F2 οι δοκιμές αυτού του τύπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιβεβαίωση της επιθυμητής ανθεκτικότητας σε καλλιεργούμενες ποικιλίες ή υβρίδια διαφόρων φυτικών ειδών.

Η πειραματική διαδικασία συνεχίστηκε με την διασταύρωση των ποικιλιών *N. tabacum cv. Bright Yellow (BY) N'N'* και *N. tabacum cv. Xanthi NN*. Τα πειραματικά μας αποτελέσματα έδειξαν ότι και η ποικιλία *BY* φέρει ένα λειτουργικά αντίστοιχο γονίδιο *R* το οποίο αλληλεπιδρά με την βακτηριακή πρωτεΐνη *ORF6* επάγοντας *HR*. Αυτό καθιστά δύσκολη την μελέτη της κληρονομής αυτού του γονιδίου ανθεκτικότητας μία και είναι παρόν και στις δύο πατρικές σειρές. Οι απόγονοι της *F1* γενεάς έφεραν τα γονίδια ανθεκτικότητας *N* και *N'* καθώς και ένα υποθετικό γονίδιο ανθεκτικότητας που αλληλεπιδρά με το βακτηριακό γονίδιο *PopP2*. Στις αντίστοιχες βιοδοκιμές όσα *F1* φυτά ελέγχθηκαν εμφάνισαν αντίδραση υπερευαισθησίας έπειτα από την υπερέκφραση των γονιδίων *TMV-helicase*, *ToMV-CP* και *PopP2*. Στην *F2* γενεά η μελέτη κληρονομής έδειξε διάσχιση 3:1 για όλα τα υπό μελέτη γονίδια (**Εικ. 10**)



Εικόνα 10. Βιοδοκιμές in planta με υπερέκφραση μικροβιακών γονιδίων. Η πατρική σειρά 1 φέρνει ένα από τα τρία υπό μελέτη γονίδια *R* [*R1*: Γονίδιο *N'*, που αλληλεπιδρά με την καψιδιακή πρωτεΐνη του *ToMV* (Saito, et. al. 1987)]. Η πατρική σειρά 2 φέρνει δύο εκ των τριών υπό μελέτη γονιδίων *R* [*R2*: Γονίδιο *N*, που αλληλεπιδρά με την *helicase* της 126kD replicase του *TMV*, (Les Erickson, et al 1999)], *R3*: ομόλογο του γονιδίου ανθεκτικότητας *RRS1* της *Arabidopsis*. [Το γονίδιο αυτό φαίνεται να αλληλεπιδρά με την βακτηριακή τύπου III εκκρινόμενη πρωτεΐνη *PopP2* (Deslandes, et. al. 2003)].

Συζήτηση

Η μελέτη της δυνατότητα εφαρμογής των «Λειτουργικών Δεικτών» ή «Βιοδεικτών» σε πιθανά προγράμματα κλασσικής γενετικής βελτίωσης φυτών, μας έδειξε ότι η χρήση ενός εργαλείου σαν αυτό θα παρείχε σημαντική βοήθεια στα χέρια του βελτιωτή για εφαρμογή σε προγράμματα «Φυτοπαθοβελτίωσης».

Η μελέτη για την αξιολόγηση των «Βιοδεικτών» συνεχίζεται σήμερα στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας φυτών στο Παν/μιο Κρήτης, με τον εμπλουτισμό της συλλογής των μικροβιακών και ιικών παραγόντων παθογένειας (ή παραγόντων αμολυσματικότητας). Προγραμματίζουμε επίσης να μελετήσουμε την πιθανή χρήση των παραπάνω δεικτών ως εργαλείο για εφαρμογή σε μελέτες φυλογενετικής ανάλυσης διαφόρων φυτικών ειδών (ή ποικιλιών και οικότυπων του ίδιου είδους). Πιστεύουμε ότι η καταγραφή της παρουσίας ή απουσίας λειτουργικά αντίστοιχων γονιδίων ανθεκτικότητας θα βοηθούσε στη φυλογενετική ανάλυση των φυτικών ειδών. Αρχικά σχεδιάζουμε να εφαρμόσουμε την μέθοδο αυτή για φυλογενετική μελέτη σε γνωστές ποικιλίες καπνού και σε άγριους συγγενείς από το γένος *Nicotiana*. Ευελπιστούμε να καταδείξουμε την χρησιμότητα των «Βιοδεικτών» ως επικουρικό εργαλείο στην φυλογενετική μελέτη των φυτών.

Η χρήση του παραπάνω εργαλείου δεν σταματάει όμως εδώ. Σκοπεύουμε να χρησιμοποιήσουμε γνωστά και πιθανά ιικά γονίδια αμολυσματικότητας ως «Βιοδείκτες» για την μελέτη της παρουσίας γονιδίων ανθεκτικότητας σε διάφορους ιούς, σε εμπορικές καλλιεργούμενες ποικιλίες και υβρίδια λαχανοκομικών ειδών. Η ιδέα προέκυψε έπειτα από την δημοσιοποίηση προβλημάτων σε γνωστά εμπορικά υβρίδια τομάτας στην περιοχή της Ιεράπετρας και του Τυμπακίου. Στην προκειμένη περίπτωση οι «Βιοδείκτες» θα αποτελούσαν ένα γρήγορο και αξιόπιστο εργαλείο για την πιστοποίηση της ανθεκτικότητας των καλλιεργούμενων λαχανοκομικών ειδών σε διάφορους ιούς.

Βιβλιογραφία

Botella MA, Coleman MJ, Hughes DE, Nishimura MT, Jones JDG, and Somerville SC. (1997). Map positions of 47 Arabidopsis sequences with sequence similarity to disease resistance genes. *Plant J.* 12, pp: 1197–1211.

Crute IR, Holub EB, Tör M, Brose E and Beynon JL. (1993). The identification and mapping of loci in Arabidopsis thaliana for recognition of the fungal pathogens *Peronospora parasitica* (downy mildew) and *Albugo candida* (white blister). In *Advances in the Molecular Genetics of Plant–Microbe Interactions* (Nester, E.W. and Verma, D.P.S., eds), Vol. 2, pp: 437–444.

Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich M, Genin S, and Marco Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *PNAS*, vol. 100, no. 13, pp: 8024-8029.

Erickson LF, Holzberg S, Calderon-Urrea A, Handley V, Axtell M, Corr C and Baker B. (1999). The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco, *The Plant Journal*, 18(1), pp: 67-75.

Gehrig H, Schussler A, and Kluge M. (1996). *Geosiphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis. *J. Mol. Evol.* 43, pp: 71–81.

Hammond-Kosack KE and Jones JDG. (1997). Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, pp: 575–607.

Hammond-Kosack KE and Parker JE. (2003) Deciphering plant–pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotech* 14, pp:177–193.

Heckman DS, Geiser DM, Eidell BR, Stauffer RL, Kardos NL, and Hedges SB. (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293, pp: 1129–1133.

Hinsch M, and Staskawicz B. (1996). Identification of a new Arabidopsis disease resistance locus, RPS4, and cloning of the corresponding avirulence gene, *avrRps4*, from *Pseudomonas syringae* pv. *psis*. *Mol Plant–Microbe Interact* 9: 55–61.

Hulbert SH. (1997). Structure and evolution of the Rp1 complex conferring rust resistance in maize. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, pp: 293–310.

Kajava AV, Vassart G and Wodak SJ. (1995). Modeling of the three-dimensional structure of proteins with the typical leucine-rich repeats. *Structure* 3, pp: 867–877.

Michelmore RW and Meyers BC. (1998). Clusters of Resistance Genes in Plants Evolve by Divergent Selection and a Birth-and-Death Process, *Genome Rese*, 8 pp: 1113–1130.

- Nei M, Gu X, and Sitnikova T. (1997). Evolution by the birth-and-death process in multigene families of the vertebrate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, pp: 7799–7806.
- Parniske M, Hammond-Kosack KE, Golstein C, Thomas CM, Jones DA, Harrison K, Wulff BBH and Jones JDG. 1997. Novel disease resistance specificities result from sequence exchange between tandemly repeated genes at the Cf-4/9 locus of tomato. *Cell* 91, pp: 821–832.
- Pryor T and Ellis J. (1993). The genetic complexity of fungal resistance in plants. *Adv. Plant Pathol.* 10, pp: 282–305.
- Richter TE, Prior TJ, Bennetzen JL and Hulbert SH. (1995). New rust resistance specificities associated with recombination in the Rpl complex in maize. *Genetics* 141, pp: 373–381.
- Saito T, Meshi T, Takamatsu N, and Okada Y. (1987). Coat protein gene sequence of tobacco mosaic virus encodes a host response determinant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 84, pp. 6074-6077.
- Slusarenco AJ and Schlaich NL. (2003). Downy mildew of *Arabidopsis thaliana* caused by *Hyaloperonospora Parasitica* (formerly *Peronospora parasitica*). *Mol Plant Path* 4(3), pp: 159–170.
- Takahashi H, Suzuki M, Natsuaki K, Shigyo T, Hino K, Teraoka T, Hosokawa D and Ehara Y. (2001). Mapping the virus and host genes involved in the resistance response in cucumber mosaic virus-infected *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 42, pp: 340–347.
- Takahashi H, Miller J, Nozaki Y, Sukanto, Takeda M, Shah J, Hase S, Ikegami M, Ehara Y and Dinesh-Kumar SP. (2002). RCY1, an *Arabidopsis thaliana* RPP8/HRT family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. *Plant J* 32, 655–667.
- Zhang Y, Dorey S, Swiderski M, Jones JD. (2004). Expression of RPS4 in tobacco induces an AvrRps4-independent HR that requires EDS1, SGT1 and HSP90. *Plant J*, 40:213-224.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Πίνακας 1. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των βακτηριακών και ιικών πρωτεϊνών παθογένειας.

<i>Gene name</i>	<i>Upper Primer seq.</i>	<i>Lower Primer seq.</i>
<i>HopPtoK (w/o hrp box)</i>	5'-AGAGGGATCCAATGAATCGCAT-3'	5'-CTTTGACGCTCTAGAAAAATTCGG-3'
<i>HopPtoK+hrpBox</i>	5'-CAATCGGTTTAATCACTCGAGG-3'	5'-CTTTGACGCTCTAGAAAAATTCGG-3'
<i>VirPphA</i>	5'-GGAGTGGAGGATCCATATGCCGGTA-3'	5'-TTCGCCCTGCAGACCGATGCTCTC-3'
<i>HopPtoJ (w/o hrpBox)</i>	5'-TCCTCGAGTAAAGAGAGAACCCTC-3'	5'-AACATGACCCCTCTAGATTGCC-3'
<i>HopPtoJ+hrpBox</i>	5'-GCACGATGGATCCGGCGTAAA-3'	5'-AACATGACCCCTCTAGATTGCC-3'
<i>HopPtoH (w/o hrpBox)</i>	5'-CAACTCAATAAGCTTTCAGGATAACT-3'	5'-AATTCGGCGTTTGTCTAGATTCC-3'
<i>HopPtoH+hrpBox</i>	5'-GCACGACCGGATCCATCTC-3'	5'-AATTCGGCGTTTGTCTAGATTCC-3'
<i>avrPtoB (w/o hrpBox)</i>	5'-GTCCGCAGGCAGAAGCTTGGAGAG-3'	5'-CCAGGGTCTAGAGGAAAGGTGTG-3'
<i>AvrPto1 (w/o hrpBox)</i>	5'-CTAAAGAGGGAATTCGAATGGGAAATAT-3'	5'-AGGCCGTGTGCGTCTAGATTATG-3'
<i>AvrPto1+hrpBox</i>	5'-TTATAAGCTTGGAAACCGATCCGCT-3'	5'-ACCTCTGAATTCACCTGTAAATAC-3'
<i>HopPtoD2</i>	5'-CGTCAGCGAATTCCTCAACCGAGA-3'	5'-GGTGAAAGCTTGCAGGAGAAACT-3'
<i>AvrPpiC2pto</i>	5'-TAGGGCGCTGAATTCATGACAATCGTG-3'	5'-AAGTGAGCGGATCCTGGAGCGAGT-3'
<i>HopPtoC</i>	5'-CTGATTTCTCGAGCATGATACGCGGCAT-3'	5'-CTGGGTCTCCAAGTGTAGTGGGATCC-3'
<i>HopPtoC (Erw. amyI)</i>	5'-GGGACTCGAGTCGATGAACAATC-3'	5'-GTTGATACCATTAAGCTTTATTATCAGGC-3'
<i>avrPphF ORF1</i>	5'-CGGTACCAGCTCTGCTCACT-3'	5'-TTCTCGAGAATGGTTTCCTCTTTTAA-3'
<i>avrPphF ORF2</i>	5'-AGAGGATCCCATTATGGGTAATATTTG-3'	5'-CATCAGTTTAGTCGACCACCGAT-3'
<i>avrPtoE (w/o hrpBox)</i>	5'-TCGTCTAGATAAAATGAAAATACA-3'	5'-GGTCTGCAGAGCGCTGGCATCGTG-3'
<i>avrPtoE+hrpBox</i>	5'-AGATTAGGGAACAAGCTTGGTGGG-3'	5'-GGTCTACAAAGAGCTCGCATCCTG-3'
<i>avrPphF ORF2</i>	5'-CATCTCGAGAACGTTTAAATGGGTAATATC-3'	5'-GTCGGTGTGGGATCCGGGGA-3'
<i>avrPphF ORF1+ORF2</i>	5'-CAGGGATCCACGTACATGAAAAGG-3'	5'-GTGCTACTCGAGGATATTGACC-3'
<i>avrPphE</i>	5'-GCCCCACTCGAGGAGGAACATAGAGAAT-3'	5'-CGTACGGATCCATACATTATCTTCGTGGAGGC-3'
<i>avrPphB</i>	5'-GTTTTGAGGTTTCATATGAAAATAGGTAC-3'	5'-CGGGATCCGGCTGGGTTTTTTGCTTC-3'
<i>avrPphC</i>	5'-ATGACCGCGGGATGTGTACT-3'	5'-CTGCCATGGTCTTACTGAGG-3'
<i>avrRps4</i>	5'-GCATTGAATCTTTGACAAAAGAGGCT-3'	5'-GCCCTACCCAAGCTTATTTAAAATG-3'
<i>CMV-Y_CP</i>	5'-TTGTGTCGTAGAATTCAGTCGAGTC-3'	5'-GAGGGAGGATCCTGGGAACA-3'
<i>pthG</i>	5'-ATATCATGTCTCGAGAACTAAGCT-3'	5'-TGCATAAGCATTCTAGAACAATCG-3'
<i>TMV-helicase domain</i>	5'-CAGATTCGTTAACTCGAGAGCAG-3'	5'-AAGATTGGAAGCTTTGAACACCGA-3'
<i>avrRpt2</i>	5'-CAACGGACGAATTCACAAGCTCCC-3'	5'-CGCCACGTGAAGCTTCCCTGC-3'
<i>ORF6_{B728a} (P_{Syr} 1182)</i>	5'-CAGCACTCGAGTGCCGCAATGTCT-3'	5'-ATAAATAGCGACAAGCTTGCTGGCA-3'
<i>ORF6_{B728a} (P_{Syr} 5054)</i>	5'-TTTCTCGAGGGGGTGGTTCTTATGCAG-3'	5'-GACGCCTCAAGCTTTTCATGAAGCC-3'
<i>ORF6_{DC3000} (P_{SPTO} 1371)</i>	5'-GAGGAGTGAATTCATGTCTGGTCTTCGAG-3'	5'-GTTTTTCTAGATGCTCAGACCGCCAATTGATG-3'
<i>PpkB homolog P_{sph} 1448a</i>	5'-TGTGACCGCGGCTCGAGTCT-3'	5'-CTGCAAAGCTTTGAGGAGTGCTG-3'
<i>ToMV(TMV-L)_CP</i>	5'-ACGTCGCTCGAGGATTGA-3'	5'-CACAAACTCTAGATTTACGACC-3'
<i>TCV_CP</i>	5'-GGGTTCTAGATGGAAAATGATCCTAGAG-3'	5'-AGAACCCGGTTACTAAATCTGAGTGCTTGC-3'
<i>PopP2</i>	5'-CCTACGACGACTCGAGACGAT-3'	5'-CCGACAAGCTTGATTTAGTTGGT-3'
<i>virPphA C-term</i>	5'-GCTGTAGGATCCGCGGTGATGCC-3'	5'-TTCGCCCTGCAGACCGATGCTCTC-3'
<i>virPphA N-term</i>	5'-GGAGTGGAGGATCCATATGCCGGTA-3'	5'-ATTCTGCAGTGGCATCACCGCCAAACTTAC-3'

Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τη κλωνοποίηση των γονιδίων *PAO*, *samdc*, *PR1a*, *PR5db*, *PrxC1*, *PrxN1*, *SipK*, *WipK*, *Actin* και *Ubiquitin*.

Αλληλουχίες εκκινητών	Γονίδιο	Αριθμός κατάθεσης (Accession No.)
Forward: 5'-GCCGTGCCCAAAATTCTCAACAAG-3'	PR1a (<i>N. tabacum</i>)	NCBI LOCUS: X12485
Reverse: 5'-CTTGATATCAAGCAGAACAATCCATAC-3'		
Forward: 5'-GATGGTGCTGGTAGAGGTTGGTG-3'	PR5dB (<i>N. tabacum</i>)	NCBI LOCUS: AB121785
Reverse: 5'-AGGATGGCTAGCTCCACTCAATCTG-3'		
Forward: 5'-CTGTTGTCATTCTGGGAGGTCC-3'	PrxC1 (<i>N. tabacum</i>)	NCBI LOCUS: AB027752
Reverse: 5'-TTATACGCGAGGTCCGAGGAAG-3'		
Forward: 5'-GCACACTATTGGAACCGCAG-3'	PrxN1 (<i>N. tabacum</i>)	NCBI LOCUS: AB027753
Reverse: 5'-AACAGCAACTTCACTCTGTAAATGC-3'		
Forward: 5'-TTCCACCACCACAGAGAGAGG-3'	SipK (<i>N. tabacum</i>)	NCBI LOCUS: NTU94192
Reverse: 5'-ATGATTGTCGACGGTAAAGAGGA-3'		
Forward: 5'-CCAAGTATCGTCCTCCTATTATGCC-3'	WipK (<i>N. tabacum</i>)	NCBI LOCUS: AB052964
Reverse: 5'-TGAAGATGCAACCGACAGACC-3'		
Forward: 5'-GGCAGGATAAGGAAGGA-3'	Pao (<i>N. tabacum</i>)	NCBI LOCUS: AB200262
Reverse: 5'-GTCTGTTAGCATTGGTGTCT-3'		
Forward: 5'-TCTAGATGGATTCCGGCCTTG-3'	Samdc (<i>N. tabacum</i>)	NCBI LOCUS: AF321142
Reverse: 5'-GGTACCCAGAGTAAACATGC-3'		
Forward: 5'-GATTTGCTGGTGATGATGC-3'	Actin (<i>N. tabacum</i>)	NCBI LOCUS: X63603
Reverse: 5'-AAGGGTGCTTCAGTAAGTAG-3'		
Forward: 5'-AGCTGAGGGGAGGAATG-3'	Ubiquitin (<i>N. tabacum</i>)	NCBI LOCUS: U66264*
Reverse: 5'-GCAACCTAGAAACCACC-3'		

Πίνακας 3. Γονίδια του βακτηρίου *P. s. pv. phaseolicola* 1448a που σχετίζονται με το πιθανό T6SS

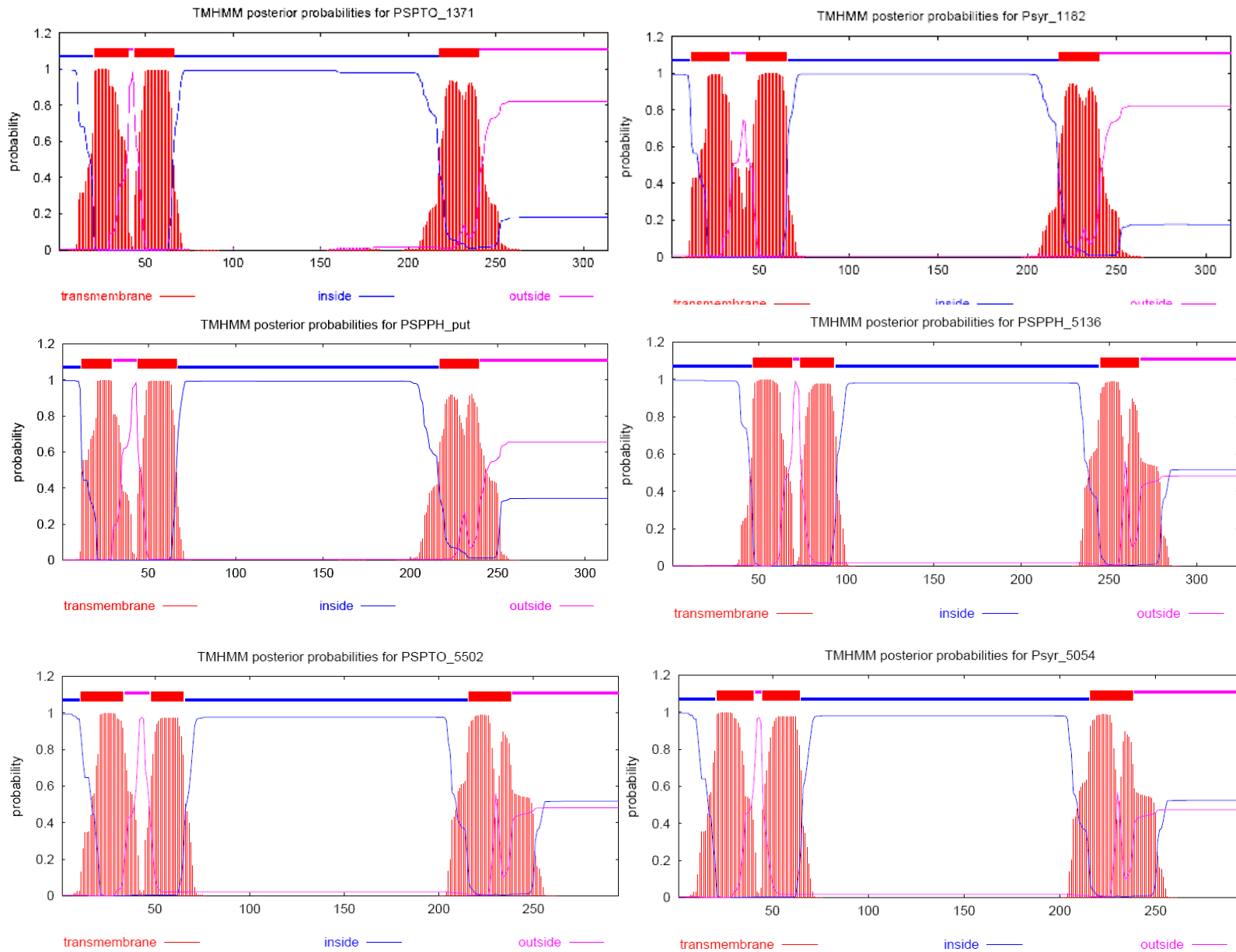
<i>Psph</i> 1448a genes	Homologous Locus ID	Strain	Product Name	Query Start	Query Stop	Subject Start	Subject Stop	Percent Identity	Alignment Length	Mismatches	Gaps	Bit Score	Expect Value
PSPPH_0121	PA0082	PAO1	hypothetical protein	24	331	18	312	22.94	327	201	10	56.6	4.0E-9
	PA1656	PAO1	hypothetical protein	1	149	1	142	28.29	152	96	4	53.5	3.0E-8
PSPPH_0122	PA0085	PAO1	conserved hypothetical protein	1	168	1	159	32.54	169	103	4	69.3	2.0E-13
	PA2367	PAO1	hypothetical protein	55	170	54	163	29.17	120	71	3	46.6	1.0E-6
PSPPH_0123	PA0077	PAO1	hypothetical protein	102	474	30	404	36.22	381	229	8	196.0	6.0E-51
	PA1669	PAO1	hypothetical protein	124	568	131	580	31.14	472	276	13	160.0	4.0E-40
	PA2361	PAO1	hypothetical protein	122	509	55	426	22.55	408	260	14	59.7	1.0E-9
PSPPH_0124	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PSPPH_0125	PA1669	PAO1	hypothetical protein	8	555	12	564	28.72	571	366	15	174.0	6.0E-44
	PA0077	PAO1	hypothetical protein	69	555	1	486	30.12	508	312	15	172.0	2.0E-43
	PA1669	PAO1	hypothetical protein	745	1260	631	1133	24.24	528	363	15	115.0	3.0E-26
	PA0077	PAO1	hypothetical protein	681	1253	495	1052	21.26	602	401	20	80.1	1.0E-15
	PA2361	PAO1	hypothetical protein	102	366	41	293	22.39	268	190	7	47.4	9.0E-6
PSPPH_0126	PA1668	PAO1	hypothetical protein	69	222	113	268	33.33	159	98	6	72.4	3.0E-14
	PA0078	PAO1	hypothetical protein	52	216	101	271	28.00	175	112	5	57.4	1.0E-9
	PA2362	PAO1	hypothetical protein	69	148	76	155	33.33	81	52	2	34.7	0.0080
PSPPH_0127	PA0079	PAO1	hypothetical protein	1	445	1	442	30.22	450	301	9	154.0	1.0E-38
	PA1667	PAO1	hypothetical protein	6	445	5	441	26.40	447	312	10	120.0	3.0E-28
	PA2363	PAO1	hypothetical protein	7	223	8	218	30.80	224	135	8	68.9	9.0E-13
PSPPH_0128	PA1666	PAO1	hypothetical protein	56	153	35	132	32.65	98	66	0	57.4	1.0E-9
	PA0080	PAO1	hypothetical protein	56	157	27	128	26.47	102	75	0	44.3	1.0E-5
PSPPH_0129	PA0090	PAO1	probable ClpA/B-type chaperone	5	864	8	896	52.25	890	394	5	828.0	0.0
	PA2371	PAO1	probable ClpA/B-type protease	1	841	1	849	54.13	859	366	8	784.0	0.0
	PA1662	PAO1	probable ClpA/B-type protease	80	860	82	870	49.20	809	363	10	666.0	0.0
PSPPH_0130	PA0089	PAO1	hypothetical protein	4	338	5	324	32.14	336	211	6	162.0	3.0E-41
	PA1661	PAO1	hypothetical protein	23	338	22	325	29.65	317	209	6	126.0	3.0E-30
	PA2370	PAO1	hypothetical protein	1	334	1	319	27.68	336	224	7	117.0	2.0E-27
PSPPH_0131	PA0088	PAO1	hypothetical protein	5	608	5	617	34.72	625	375	12	342.0	8.0E-95
	PA2369	PAO1	hypothetical protein	4	605	8	592	33.39	608	376	12	285.0	6.0E-78
	PA1660	PAO1	hypothetical protein	76	610	2	526	30.38	553	339	16	211.0	1.0E-55
PSPPH_0132	PA2368	PAO1	hypothetical protein	40	133	30	114	25.53	94	61	1	31.6	0.036
	PA0087	PAO1	hypothetical protein	38	156	41	161	23.77	122	89	2	30.4	0.08
PSPPH_0133	PA2366	PAO1	uricase PuuD	25	495	19	489	60.30	471	187	0	554.0	6.0E-159
	PA0084	PAO1	conserved hypothetical protein	14	497	9	495	50.72	487	237	2	442.0	3.0E-125
	PA1658	PAO1	conserved hypothetical protein	12	494	4	488	42.09	487	276	3	350.0	2.0E-97
PSPPH_0134	PA2365	PAO1	conserved hypothetical protein	5	176	3	174	56.40	172	75	0	192.0	1.0E-50
	PA0083	PAO1	conserved	1	160	1	159	43.12	160	90	1	133.0	1.0E-32

	PA1657	PAO1	hypothetical protein conserved hypothetical protein	1	175	1	168	33.33	177	107	4	81.3	5.0E-17
PSPPH_0135	-----	-----	-----	-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PSPPH_4980	PA0085	PAO1	conserved hypothetical protein	1	160	1	159	32.3	161	106	2	81.6	3.0E-17
PSPPH_4985	PA2367	PAO1	hypothetical protein	12	161	12	162	32.26	155	96	5	72.8	1.0E-14
	PA0085	PAO1	conserved hypothetical protein	1	143	1	140	36.11	144	87	3	79.3	2.0E-16
PSPPH_2211	PA2367	PAO1	hypothetical protein	52	164	51	163	31.62	117	72	3	64.7	4.0E-12
	PA0095	PAO1	conserved hypothetical protein	7	448	28	456	23.23	465	298	14	75.5	1.0E-14
PSPPH_4425	PA0091	PAO1	conserved hypothetical protein	30	376	27	447	24.82	427	235	12	89.0	9.0E-19
PSPPH_4490	PA0085	PAO1	conserved hypothetical protein	1	154	1	155	31.85	157	102	3	78.6	3.0E-16
	PA2367	PAO1	hypothetical protein	10	159	10	162	30.32	155	101	4	61.2	4.0E-11
PSPPH_0164	PA0085	PAO1	conserved hypothetical protein	1	160	1	159	33.54	161	104	2	79.7	1.0E-16
	PA2367	PAO1	hypothetical protein	12	161	12	162	31.82	154	98	4	73.6	9.0E-15
PSPPH_4224	PA0085	PAO1	conserved hypothetical protein	1	162	1	159	30.67	163	108	3	73.2	1.0E-14
	PA2367	PAO1	hypothetical protein	12	164	12	163	26.75	157	106	5	57.0	9.0E-10
PSPPH_1885	PA0085	PAO1	conserved hypothetical protein	1	154	1	155	32.48	157	101	3	73.6	8.0E-15
	PA2367	PAO1	hypothetical protein	10	159	10	162	29.03	155	103	4	58.9	2.0E-10
PSPPH_5069	PA0091	PAO1	conserved hypothetical protein	29	615	18	611	34.54	608	363	12	346.0	4.0E-96
	PA2373	PAO1	conserved hypothetical protein	75	580	65	551	33.72	513	307	10	281.0	2.0E-76
PSPPH_0742	PA2371	PAO1	probable ClpA/B- type protease	26	832	30	848	39.28	835	463	11	472.0	5.0E-134
	PA1662	PAO1	probable ClpA/B- type protease	34	776	43	794	40.50	763	423	12	468.0	1.0E-132
	PA0090	PAO1	probable ClpA/B- type chaperone	26	776	33	816	38.13	792	441	10	465.0	7.0E-132
PSPPH_2072	PA0074	PAO1	serine/threonine protein kinase PpkA	284	500	36	252	29.65	226	141	4	62.4	1.0E-10
	PA0075	PAO1	probable phosphoprotein phosphatase	23	223	20	240	26.34	224	139	5	61.2	2.0E-10
	PA1670	PAO1	serine/threonine phosphoprotein phosphatase Stp1	98	223	102	241	31.69	142	79	4	57.4	3.0E-9
	PA1671	PAO1	serine-threonine kinase Stk1	374	496	179	305	34.59	133	71	5	53.9	4.0E-8

Πίνακας 4. Γονίδια του βακτηρίου *P. s. pv. syringae* B728a που σχετίζονται με το πιθανό T6SS

<i>Pss</i> B728a Locus ID	PAO1 Homolog Locus ID	Product Name	Query Start	Query Stop	Subject Start	Subject Stop	Percent Identity	Alignment Length	Mismatches	Gaps	Bit Score	Expect Value
P syr_4953	PA2365	conserved hypothetical protein	5	176	3	174	56.98	172	74	0	194.0	3.0E-51
	PA0083	conserved hypothetical protein	1	160	1	159	43.12	160	90	1	134.0	6.0E-33
	PA1657	conserved hypothetical protein	1	175	1	168	33.33	177	107	4	82.0	3.0E-17
P syr_4954	PA2366	uricase PuvD	25	495	19	489	60.30	471	187	0	554.0	6.0E-159
	PA0084	conserved hypothetical protein	14	497	9	495	50.72	487	237	2	442.0	3.0E-125
	PA1658	conserved hypothetical protein	12	494	4	488	42.09	487	276	3	350.0	2.0E-97
P syr_4955	PA2368	hypothetical protein	40	133	30	114	25.53	94	61	1	31.6	0.036
	PA0087	hypothetical protein	38	156	41	161	22.95	122	90	2	30.0	0.1
P syr_4956	PA0088	hypothetical protein	5	608	5	617	34.72	625	375	12	342.0	8.0E-95
	PA2369	hypothetical protein	4	605	8	592	33.22	608	377	13	282.0	7.0E-77
	PA1660	hypothetical protein	76	610	2	526	30.20	553	340	16	207.0	2.0E-54
P syr_4957	PA0089	hypothetical protein	4	338	5	324	32.14	336	211	6	162.0	4.0E-41
	PA1661	hypothetical protein	23	338	22	325	29.65	317	209	6	125.0	5.0E-30
	PA2370	hypothetical protein	1	334	1	319	27.38	336	225	7	115.0	8.0E-27
P syr_4958	PA0090	probable ClpA/B-type chaperone	5	864	8	896	52.02	890	396	4	825.0	0.0
	PA2371	probable ClpA/B-type protease	1	841	1	849	53.78	859	369	8	782.0	0.0
	PA1662	probable ClpA/B-type protease	80	860	82	870	48.95	809	365	9	666.0	0.0
P syr_4959	PA1666	hypothetical protein	56	153	35	132	33.67	98	65	0	58.9	4.0E-10
	PA0080	hypothetical protein	56	157	27	128	25.49	102	76	0	43.5	2.0E-5
P syr_4960	PA0079	hypothetical protein	1	445	1	442	30.44	450	300	9	156.0	4.0E-39
	PA1667	hypothetical protein	6	445	5	441	26.40	447	312	10	120.0	2.0E-28
	PA2363	hypothetical protein	7	223	8	218	31.25	224	134	8	70.1	4.0E-13
P syr_4961	PA1668	hypothetical protein	69	222	113	268	33.33	159	98	6	72.4	3.0E-14
	PA0078	hypothetical protein	52	216	101	271	28.00	175	112	5	57.4	1.0E-9
	PA2362	hypothetical protein	69	148	76	155	33.33	81	52	2	34.7	0.0080
P syr_4962	PA0077	hypothetical protein	69	559	1	486	30.20	510	313	14	184.0	5.0E-47
	PA1669	hypothetical protein	8	559	12	564	28.55	578	362	17	171.0	4.0E-43
	PA1669	hypothetical protein	749	1264	631	1133	24.24	528	363	15	118.0	4.0E-27
	PA0077	hypothetical protein	590	1257	412	1052	21.29	695	466	22	81.3	5.0E-16
	PA2361	hypothetical protein	102	366	41	293	22.39	268	190	7	55.5	3.0E-8
P syr_4963	PA0076	hypothetical protein	2	136	4	140	23.57	140	99	4	28.1	1.1
P syr_4964	PA0077	hypothetical protein	114	478	41	408	36.27	375	222	8	185.0	2.0E-47
	PA1669	hypothetical protein	124	568	131	580	31.55	466	282	13	149.0	1.0E-36
	PA2361	hypothetical protein	122	509	55	426	23.53	408	256	15	49.7	1.0E-6
P syr_4965	PA0085	conserved hypothetical protein	1	168	1	159	34.91	169	99	4	72.4	2.0E-14
	PA2367	hypothetical protein	55	170	54	163	29.17	120	71	3	47.0	9.0E-7

Psyr_4966	PA2360	hypothetical protein	6	358	8	363	30.22	364	235	10	131.0	1.0E-31
	PA0082	hypothetical protein	22	328	18	312	23.64	313	215	8	59.7	4.0E-10
	PA1656	hypothetical protein	8	147	12	142	27.66	141	91	3	53.1	4.0E-8
Psyr_4967	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Psyr_4974	PA0091	conserved hypothetical protein	18	545	2	507	29.68	539	335	13	231.0	3.0E-61
Psyr_4983	PA0091	conserved hypothetical protein	23	613	14	611	34.05	608	374	12	351.0	1.0E-97
Psyr_2101	PA0074	serine/threonine protein kinase PpkA	251	453	2	206	31.88	207	135	4	66.6	6.0E-12
	PA0075	probable phosphoprotein phosphatase	23	223	20	240	27.68	224	136	5	62.4	1.0E-10
	PA1670	serine/threonine phosphoprotein phosphatase Stp1	98	223	102	241	31.21	141	81	3	56.6	6.0E-9
	PA1671	serine-threonine kinase Stk1	326	496	130	305	32.24	183	105	7	52.0	1.0E-7
	PA2329	probable ATP- binding component of ABC transporter	139	184	175	223	36.73	49	28	1	28.9	1.3
Psyr_3029	PA0091	conserved hypothetical protein	11	461	6	445	22.04	481	304	19	61.6	2.0E-10
Psyr_4080	PA0095	conserved hypothetical protein	50	508	42	496	34.40	468	285	9	278.0	2.0E-75
Psyr_1935	PA0085	conserved hypothetical protein	1	156	1	155	33.12	157	102	2	84.7	4.0E-18
	PA2367	hypothetical protein	12	161	12	162	31.17	154	99	4	68.9	2.0E-13
Psyr_0101	PA0085	conserved hypothetical protein	1	143	1	140	36.81	144	86	3	82.0	2.0E-17
	PA2367	hypothetical protein	52	164	51	163	31.62	117	72	3	64.7	4.0E-12



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της πρόβλεψης για την ύπαρξη διαμεμβρανικών περιοχών στις ομόλογες πρωτεΐνες της *ORF6*

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ

Engineered Polyamine Catabolism Preinduces Tolerance of Tobacco to Bacteria and Oomycetes¹[C][W][OA]

Panagiotis N. Moschou², Panagiotis F. Sarris², Nicholas Skandalis, Athina H. Andriopoulou, Konstantinos A. Paschalidis, Nickolas J. Panopoulos, and Kalliopi A. Roubelakis-Angelakis*

Department of Biology, University of Crete, Crete, 71409 Heraklion, Greece (P.N.M., P.F.S., N.S., A.H.A., K.A.P., N.J.P., K.A.R.-A.); and Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology, Hellas, Heraklion 71110, Greece (P.F.S., N.S., N.J.P.)

Polyamine oxidase (PAO) catalyzes the oxidative catabolism of spermidine and spermine, generating hydrogen peroxide. In wild-type tobacco (*Nicotiana tabacum* 'Xanthi') plants, infection by the compatible pathogen *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* resulted in increased PAO gene and corresponding PAO enzyme activities; polyamine homeostasis was maintained by induction of the arginine decarboxylase pathway and spermine was excreted into the apoplast, where it was oxidized by the enhanced apoplastic PAO, resulting in higher hydrogen peroxide accumulation. Moreover, plants overexpressing PAO showed preinduced disease tolerance against the biotrophic bacterium *P. syringae* pv *tabaci* and the hemibiotrophic oomycete *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* but not against the *Cucumber mosaic virus*. Furthermore, in transgenic PAO-overexpressing plants, systemic acquired resistance marker genes as well as a pronounced increase in the cell wall-based defense were found before inoculation. These results reveal that PAO is a nodal point in a specific apoplast-localized plant-pathogen interaction, which also signals parallel defense responses, thus preventing pathogen colonization. This strategy presents a novel approach for producing transgenic plants resistant to a broad spectrum of plant pathogens.

The resistance of plants to invading pathogens is mediated by a complex array of defense responses (Goodman and Novacky, 1994; Jackson and Taylor, 1996) and nonspecific immunity to subsequent infection known as systemic acquired resistance (SAR; Ryals et al., 1996). The generation of reactive oxygen species (ROS), the oxidative burst, in response to microbial pathogen attack is a ubiquitous early part of the resistance mechanisms of plant cells in both compatible and incompatible plant-pathogen interactions. Several studies of plant-pathogen interactions and those modeled by elicitor treatment of cultured cells have suggested that although ROS generation by NADPH oxidase is a dominant mechanism in most plant species, more mechanisms could operate; in French bean (*Phaseolus vulgaris*) cells treated with a cell wall elicitor from *Colletotrichum lindemuthianum*, the major source of ROS was dependent on an extracellular peroxidase (Bolwell et al., 2002). The second

component, the extracellular alkalinization, occurs as a result of the Ca²⁺ and proton influxes and the K⁺ efflux common to most elicitation systems as one of the earliest responses. The third component, the actual reductant/substrate, has remained elusive (Bolwell et al., 2002).

Polyamines (PAs) are aliphatic amines that in plants derive either from Arg or Orn, via the Arg decarboxylase (ADC; EC4.1.1.19) or the Orn decarboxylase (ODC; EC4.1.1.17) pathway, respectively. Common PAs include diamine, putrescine (Put), and higher PAs (spermidine [Spd] and spermine [Spm]). Put, the precursor of higher PAs, is produced by the ADC and/or ODC pathway, and Spd and Spm biosynthesis requires the concerted action of spermidine synthase (SPDS; EC 2.5.1.16)/S-adenosyl-L-Met decarboxylase (SAMDC; EC 4.1.4.50) and spermine synthase (SPMS; EC 2.5.1.22)/SAMDC, respectively. That PAs are linked to protection against stress challenges in plants has long been proposed, based mostly on studies with pharmacological means and alterations of the intracellular PA titers (Alcazar et al., 2006).

The best-known enzyme that catabolizes higher PAs, generating hydrogen peroxide (H₂O₂) and reducing intracellular PA titers, is polyamine oxidase (PAO; EC 1.5.3.3). PAOs are localized to peroxisomes and in the apoplast (Rea et al., 2004; Moschou et al., 2008d). Recently, we showed that during abiotic stress, apoplastic PAO is responsible for apoplastic ROS generation (Moschou et al., 2008a, 2008b). Upon abiotic stress, Spd is secreted into the apoplast, where it is oxidized by PAO, producing H₂O₂. Depending on its

¹ This work was supported by COST605 Action.

² These authors contributed equally to the article.

* Corresponding author; e-mail poproube@biology.uoc.gr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Kalliopi A. Roubelakis-Angelakis (poproube@biology.uoc.gr).

[C] Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

[W] The online version of this article contains Web-only data.

[OA] Open Access articles can be viewed online without a subscription.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.108.134932

levels ("signatures") and the intracellular PA homeostasis, the generated H₂O₂ signals tolerance-effector genes to abiotic stress or induces the execution of the programmed cell death (PCD) syndrome (Moschou et al., 2008a).

Yoda et al. (2003, 2006) reported that in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants resistant to *Tobacco mosaic virus* (TMV), PAO expression and PA titers increased in tissues exhibiting the TMV-induced hypersensitive response (HR), an incompatible plant-pathogen interaction. Cell death caused by TMV infection or cryptogein, an oomycete-originated elicitor, was partially mediated by H₂O₂ generated through PA catabolism. The substrate of PAO for H₂O₂ production was Spd, which accumulated in the apoplast during HR elicitation. Thus, PAO RNA interference lines exhibited significantly reduced HR rates when treated with cryptogein (Yoda et al., 2006). Moreover, Takahashi et al. (2003) provided evidence for the correlation of Spm oxidation and induction of HR-associated and defense-related genes. In addition, tolerance to TMV infection by treatment with Spm was modulated independently of salicylate (SA; Takahashi et al., 2003).

The previous studies were focused on the putative role of PAO in incompatible plant-microbe interactions. To further our understanding of the potential role of PA catabolism in plant-pathogen interactions, we examined whether or not the apoplastic PAO, a H₂O₂-producing enzyme, participates in the defense responses against three compatible pathogenic models using tobacco cv Xanthi transgenic plants overexpressing (S-PAO) and down-regulating (A-PAO) the maize (*Zea mays*) PAO gene (Moschou et al., 2008b). These plants were challenged with (1) the biotrophic bacterium *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* (PS), (2) the hemibiotrophic oomycete *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* (PP), and (3) the RNA virus *Cucumber mosaic virus* (CMV). PS causes "wildfire," one of the most destructive diseases affecting field tobacco plants. Oomycetes are fungus-like eukaryotic microorganisms that are aggressive pathogens of plants and animals. The genus *Phytophthora* consists of over 60 different species; all but three species are plant pathogens and are responsible for the most serious diseases of dicotyledonous plants, including potato late blight and sudden oak death (Erwin and Ribeiro, 1996; Appiah et al., 2004). Oomycetes and true fungi employ similar infection strategies but are different in their cell walls (Badreddine et al., 2008); thus, they are resistant to most fungicides (<http://www.frac.info>). Moreover, they quickly overcome plant resistance genes. The virus CMV is a tripartite, systemic, positive-sense RNA virus that infects many different plant species (for review, see Palukaitis et al., 1992), causing light-green or yellow mosaics and stunted growth.

In this study, we show that, in S-PAO but not in A-PAO transgenics and in wild-type plants, high PA oxidation in the apoplast preinduced responses such as the expression of SAR-linked genes, along with secondary tolerance reactions leading to cell wall

strengthening. Also, higher PAO activity inhibited bacterial and oomycete growth and colonization. As a result, the leaf symptoms of infection were minimized in both the PS- and PP-infected plants but, interestingly, not in the CMV-infected plants. These results add a new insight on the function of the apoplastic PAO in the generation of H₂O₂ in the apoplast during compatible plant-pathogen interactions, whose overexpression confers tolerance to specific pathogens that depend on the apoplast for their growth, and present a novel means of engineering pathogen tolerance in plants.

RESULTS

PA Metabolism Is Altered by Compatible Plant-Pathogen Infections

In wild-type tobacco leaves infiltrated with the pathogenic bacterium PS strain SFP-2124, PAO was an early-responsive gene; the abundance of its transcript level increased significantly at 12 h postinoculation (hpi) compared with the corresponding control (mock treatment), as shown by reverse transcription (RT)-PCR analysis (Fig. 1A; *NtPAO* gene). PAO protein and the specific PAO enzymatic activities showed similar increases, thus showing maximum levels at 12 hpi (Fig. 1B; $P < 0.05$). PAO specific activity increased 3.5-fold compared with the corresponding mock-treated plants at 12 hpi, and at 24 and 48 hpi PAO activity returned to basal levels (Fig. 1C; $P < 0.05$). Thus, PAO showed a transient early increase during pathogenic attack.

To examine whether increased PA oxidation induced the PA biosynthetic pathway in an effort to maintain intracellular PA homeostasis, the main PA biosynthetic enzymes ADC, ODC, SAMDC, SPDS, and SPMS were monitored. In fact, ADC specific activity was significantly induced upon treatment with the pathogen (58% at 12 hpi, 3-fold at 24 and 48 hpi; $P < 0.05$; Fig. 2, A and B). ADC protein levels increased as well at all time points examined, mostly at 12 hpi (Fig. 2B), suggesting de novo ADC protein synthesis (Fig. 1B; $P < 0.05$). Interestingly, ADC specific activity was higher at 48 hpi compared with 12 hpi, when ADC protein content was higher, suggesting posttranslational modifications of the ADC protein, acting in concert with its de novo synthesis to efficiently maintain PA homeostasis. On the contrary, ODC specific activity showed a minor initial increase (28% at 12 hpi) and decreased progressively thereafter (10% and 86% at 24 and 48 hpi, respectively; Fig. 2A, ODC). SAMDC specific activity followed a similar trend to ODC, with an initial increase (approximately 25% at 12 hpi) and a reduction thereafter (90% at 24 and 48 hpi; Fig. 2A; $P < 0.05$). Interestingly, SPDS specific activity exhibited a significant initial increase (2.5-fold at 12 hpi) and decreased thereafter (50% and 83% at 24 and 48 hpi; Fig. 2A; $P < 0.05$). SPMS could not be detected in that

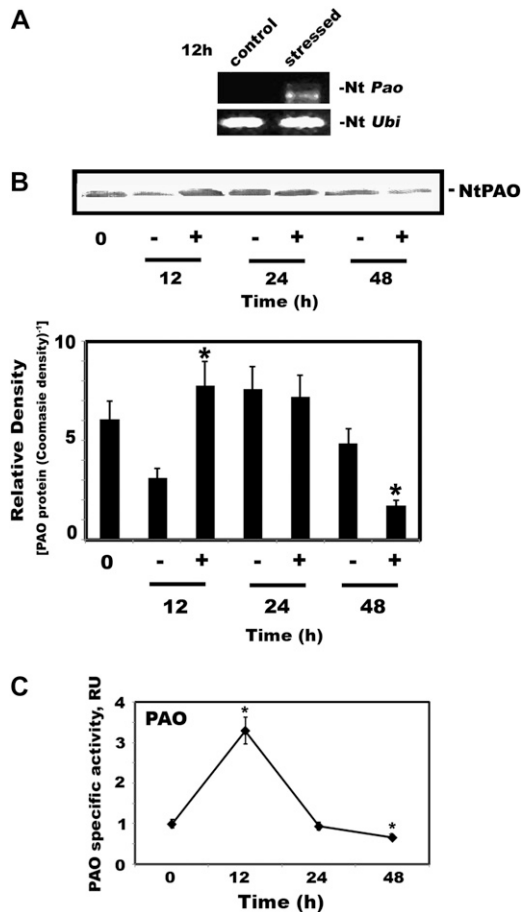


Figure 1. Abundance of *NtPAO* mRNA levels, PAO protein, and specific activity in wild-type plants treated with PS. A, RT-PCR analysis for the *NtPAO* mRNA expression level at 12 hpi. Samples were standardized using the *NtUbi* gene in wild-type plants treated with PS, and PCR products were electrophoretically resolved on ethidium bromide ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$)-containing agarose gels (1.5%, w/v). B, Western-blot analysis of the PAO protein levels using an anti-M-PAO specific antibody ($50 \mu\text{g lane}^{-1}$) preinoculation and at 12, 24, and 48 hpi. -, Mock treatment; +, PS inoculation. C, PAO specific activity levels in relative activity units (RU). Data are means \pm SE of three independent experiments, and asterisks indicate statistical significance from the corresponding controls at $P < 0.05$.

developmental stage. Thus, ADC seems to be the main route for PA titer maintenance in compatible interactions, while ODC possesses this role in incompatible ones (Negrel et al., 1984; Yoda et al., 2003, 2006).

It was of interest to examine the alterations in intracellular and intercellular PAs in wild-type tobacco brought about by the pathogen infections. All three main PAs, Put, Spd, and mostly Spm, significantly increased intracellularly at 12 hpi (Fig. 2C). Spm and Put exhibited 2.5- and 2-fold increases, respectively, whereas Spd increased only slightly (Fig. 2C; $P < 0.05$). On the other hand, all three PAs decreased at 24 and 48 hpi (Fig. 2C). Interestingly, the faster decline was that of Spm (approximately 50% at 24 and 48 hpi; Fig. 2C),

while Put and Spd declined at a lower rate (Fig. 2C). On the contrary, in the apoplastic compartment, the most striking increase was that of Spm (18-fold increase at 12 hpi); Put did not accumulate significantly, and Spd showed only a minor increase (Fig. 2D).

Compatible Plant-Pathogen Interaction Results in Increased Apoplastic H_2O_2

We showed recently that abiotic stress induces secretion of Spd into the apoplastic compartment, where it is oxidized by the cell wall-associated PAO; the generated H_2O_2 , depending on its size, signals either molecular stress defense responses or PCD (Moschou et al., 2008c). In this work, we followed the same strategy in order to investigate whether a similar phenomenon takes place in the compatible plant-pathogen interactions. Upon inoculation with PS bacteria, in *S-PAO* plants a 3.8-fold increase in the apoplastic H_2O_2 levels at 12 hpi was apparent and declined thereafter, as indicated using the H_2O_2 -specific dye 3,3'-diaminobenzidine (Fig. 3, A and B), while in *A-PAO* and wild-type plants a slight increase of H_2O_2 levels was found, which remained somewhat higher than in the corresponding mock-treated plants (Fig. 3B; $P < 0.05$). To further verify the localization of H_2O_2 , transmission electron microscopy (TEM) specific for H_2O_2 was used, and the results confirmed its extracellular increase, as evidenced by the electron-dense black spots detected specifically in the apoplast (Fig. 4). Also, PS-elicited H_2O_2 accumulation was evident soon after inoculation in the apoplast of the *S-PAO* transgenic plants, while only a moderate increase was found in *A-PAO* and wild-type plants (Fig. 4). These results support a direct positive correlation between H_2O_2 accumulation and PAO activity in the apoplast of PS-infected plants and that PAO directly affects the apoplastic ROS load upon elicitation.

S-PAO Transgenic Tobacco Exhibits Tolerance to Virulent Bacterial Pathogens and to a Hemibiotrophic Oomycete But Not to a Virus

To evaluate whether alteration of the *PAO* gene affects plant disease resistance, *S-PAO* and *A-PAO* plants were assessed (Moschou et al., 2008a, 2008b). The *S-PAO* plants showed a more than 10-fold increase, whereas the *A-PAO* plants showed a 50% decrease, of PAO specific activity when compared with wild-type plants (Moschou et al., 2008b). The transgenic tobacco plants were challenged with two distinct strains of the virulent pathogen PS, with the hemibiotrophic oomycete PP, and with CMV. One PS strain with mild pathogenicity aggressiveness, PS BPIC1514, and a second strain with high pathogenicity aggressiveness, PS SFP-2124, were initially used. The latter was chosen because it induces more rapidly the wildfire symptoms. No symptoms were observed after inoculation with the most virulent PS in *S-PAO* plants, in contrast to *A-PAO* and wild-type plants, which

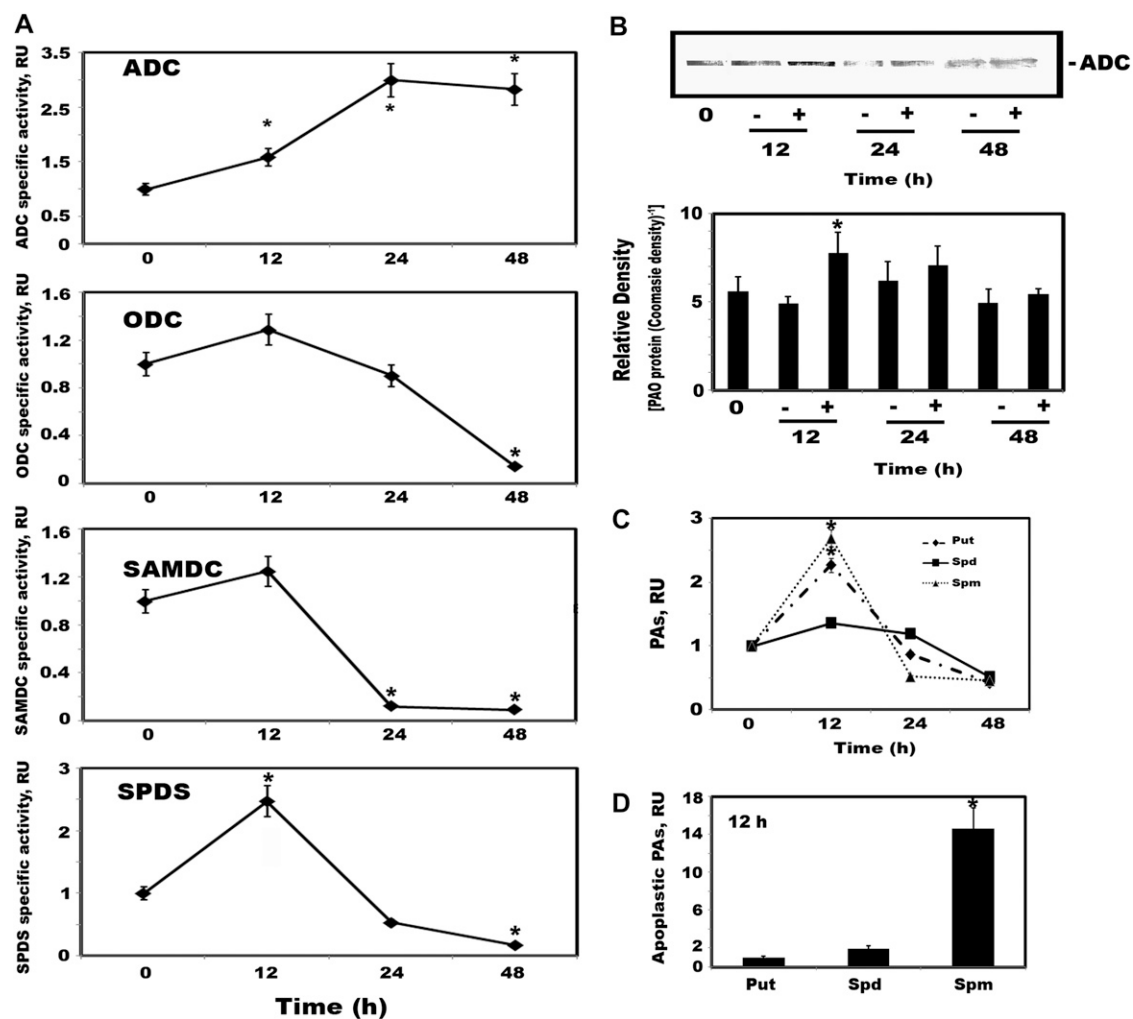


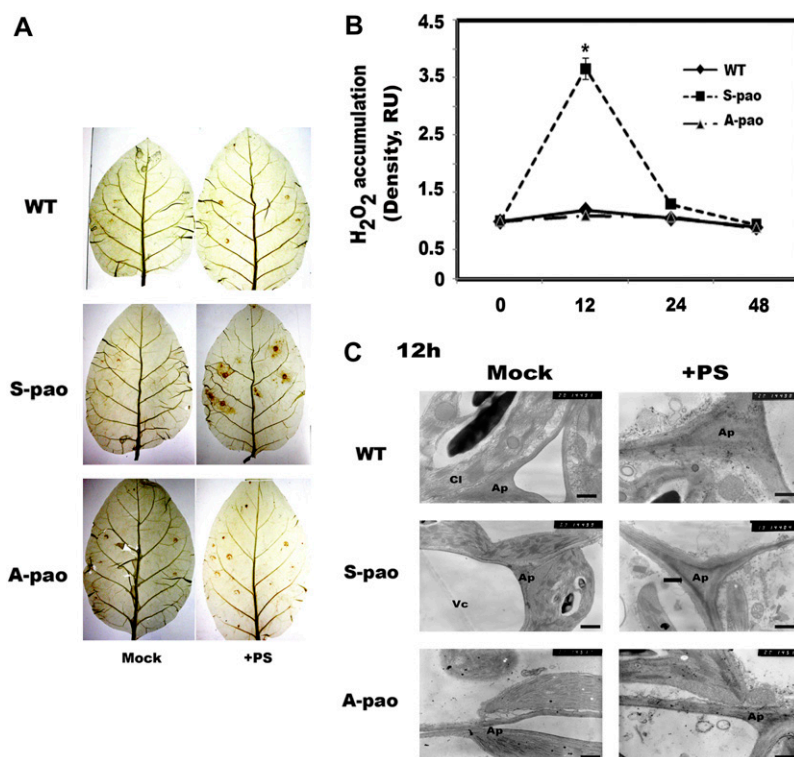
Figure 2. Specific activity of ADC, ODC, SAMDC, SPDS, and PA titers in wild-type plants treated with PS. A, ADC, ODC, SAMDC, and SPDS specific activities preinoculation and at 12, 24, and 48 hpi in relative units (RU). B, Western-blot analysis of the ADC protein levels using an anti-ADC specific antibody ($30 \mu\text{g lane}^{-1}$) preinoculation and at 12, 24, and 48 hpi. -, Mock treatment; +, PS inoculation. C, Put, Spd, and Spm titers preinoculation and at 12, 24, and 48 hpi in relative units compared with the corresponding mock-treated plants. D, Apoplastic Put, Spd, and Spm titers at 12 hpi in relative units compared with the corresponding mock-treated plants. Data are means \pm SE of three independent experiments, and asterisks indicate statistically significant differences from the corresponding controls at $P < 0.05$.

developed typical symptoms of infection by both PS and PP pathogens (Fig. 4A). Symptoms in wild-type and A-PAO plants appeared as spatial chlorophyll loss leading to tissue collapse (Fig. 4A). On the contrary, no phenotypical differences were observed between the genotypes used when challenged with CMV (Fig. 4A).

To investigate if the lack of symptoms in the S-PAO plants was due to a lower growth rate of bacteria and lower growth of PP mycelia, population analyses for PS and estimation of PP radial growth were performed, respectively (Fig. 4, B and C). The growth rate of PS and endophytic growth of PP in S-PAO plants were significantly lower compared with the corresponding values in A-PAO and wild-type plants (Fig. 4, B and C; $P < 0.05$). The same trend was observed when using the mild PS strain (data not

shown). More specifically, although as in wild-type plants the bacterial population in S-PAO plants increased significantly at 24 hpi, the rate of PS growth was significantly lower (Fig. 4B; $P < 0.05$). Thus, in wild-type plants and A-PAO plants as well, the increase in growth rate of PS was dramatic, reaching 10-fold higher colony-forming units compared with S-PAO plants (Fig. 4B; $P < 0.05$). The PS growth rate in A-PAO plants was slightly higher at 24 hpi (Fig. 4B; $P < 0.05$). During the PP infection of tobacco leaves, S-PAO plants were dramatically more tolerant to PP infection (Fig. 4C; $P < 0.05$). Interestingly, the endophytic growth in A-PAO leaves was slightly slower compared with that of control leaves at 8 d postinoculation, but eventually the whole leaf was infected in a manner similar to PP infection of wild-type tobacco

Figure 3. H_2O_2 levels in wild-type (WT), *S-PAO*, and *A-PAO* transgenic leaves and quantitative in situ ROS localization in the apoplast of wild-type, *S-PAO*, and *A-PAO* transgenic lines using TEM and $CeCl_3$, which precipitates in the presence of H_2O_2 , forming black adducts. A, H_2O_2 levels in leaves infiltrated either with mock inoculant or PS at 12 hpi, indicated as brownish spots. B, Densitometric analysis of the brownish adducts formed, corresponding to H_2O_2 levels preinoculation and at 12, 24, and 48 hpi. Data are means \pm SE of three independent experiments, and asterisk indicates statistically significant difference from the corresponding wild-type plants at $P < 0.05$. RU, Relative units. C, H_2O_2 -specific TEM at 12 hpi. Plants were mock-inoculated or inoculated with PS. Ap, Apoplast; Cl, chloroplast; Vc, vacuole. The arrowhead indicates apoplastic H_2O_2 accumulation. Bars = 0.4 μ m. [See online article for color version of this figure.]



leaves (Fig. 4C; $P < 0.05$). Finally, no differences in the multiplication rates were found in the examined genotypes challenged with CMV (Fig. 4D).

Modulation of PAO Induces Primary and Secondary Biotic Stress Responses Independent of SA

Primary defense responses of plants to pathogens involve cell wall-associated modifications of cellulose and hemicellulose-interacting compounds, such as pectins, lignins, and callose. This prompted us to examine if the altered PAO levels resulted in differences in the structures of plant cell walls preinoculation and postinoculation with PS in the wild-type and *PAO* transgenic plants. Pectin content increased both preinoculation and postinoculation in *S-PAO* plants, while an increase in the pectin content was evident only postinoculation in *A-PAO* and wild-type plants (Fig. 5A). Lignin content was only slightly modulated in *S-PAO* plants, while it was reduced in *A-PAO* plants when compared with wild-type plants (10%; Fig. 5, B and C). Moreover, callose deposition was significantly higher in *S-PAO* in contrast to *A-PAO* plants (Fig. 5D; $P < 0.05$). These data reinforce the view that increased PAO activity in the apoplast influences the primary defense responses against pathogens.

On the other hand, secondary plant defense responses involve readjustment of the expression of a wide array of defense-related genes. Among the best-known examples are the genes encoding for the pathogenesis-related (PR) proteins, while genes such

as *PrxC1* and *PrxN1* have been shown to participate in the Spm signaling pathway (Yamakawa et al., 1998). One would expect that the increased PA oxidation in *S-PAO* plants and their higher tolerance could imply differential induction of the respective defense-related genes, since their induction has been shown to be signaled by, among others, H_2O_2 , especially in the case of *SIPK* (Kroj et al., 2003). The *PR-1a* and *PR-5db* mRNA levels were significantly higher in mock-treated *S-PAO* plants, as shown by RT-PCR, in contrast to *A-PAO* and wild-type plants (Fig. 6). On the other hand, these genes were down-regulated postinoculation in *S-PAO* plants and were slightly induced in *A-PAO* and wild-type plants (Fig. 6, *PR-1a* and *PR-5db*). *PrxC1* transcript levels were not significantly different between the genotypes examined (Fig. 6). Also, *PrxN1* was significantly higher in mock-treated *S-PAO* plants, while in the inoculated *S-PAO*, *A-PAO*, and wild-type plants, *PrxN1* was not detectable (Fig. 6). In addition, *SIPK* and *WIPK* followed the same trend as *PR-1a*, *PR-5db*, and *PrxN1*. On the other hand, *NtPAO* under these conditions was detectable only in *A-PAO* plants postinoculation. It should be noted that the increase of the *NtPAO* transcript was expected, since in these transgenic lines the reduction of PAO activity is due to the translational inhibition and not to the posttranscriptional gene silencing that would not allow an increase in the transcript, as suggested previously (Moschou et al., 2008b).

To further support that differential oxidation of PAs had affected the observed transcript accumulation

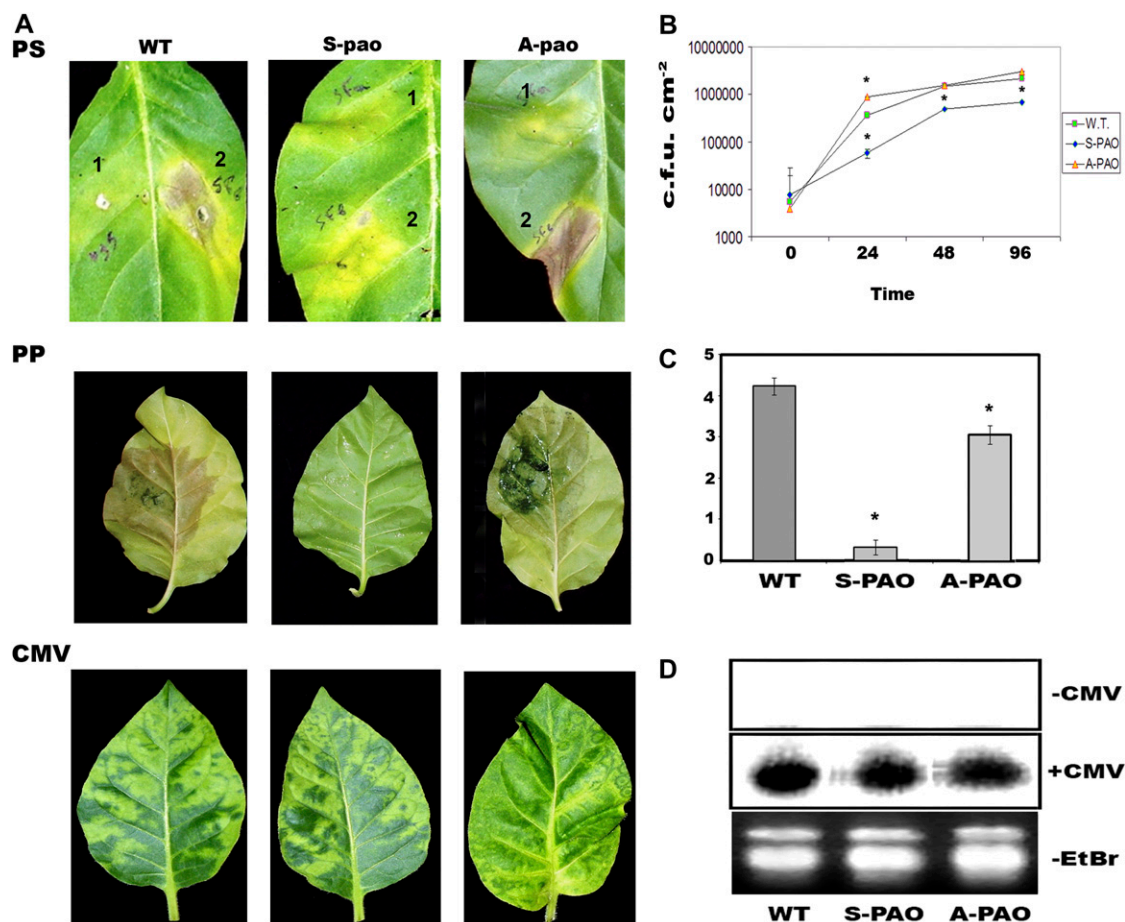


Figure 4. Phenotypes and growth rates in wild-type (WT) and S-PAO and A-PAO transgenic plants inoculated with PS, PP, and CMV. A, Phenotypes of leaves inoculated with PS (10^4 : 1 or 5×10^5 : 2 colony-forming units [c.f.u.] cm^{-2} initial inoculum), PP, or CMV. B, Population analysis of leaves treated with PS strain SFP-2124. C, Diameters of the necrotic areas induced by PP infection. Data are means \pm SE of three independent experiments, and asterisks indicate statistically significant differences from the corresponding controls at $P < 0.05$. D, Abundance of CMV coat protein-encoding mRNA and equal gel loading according to ethidium bromide (EtBr; $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$)-containing agarose gels (1.5%, w/v). [See online article for color version of this figure.]

postinoculation, we supplied PAs exogenously that were infiltrated in the apoplast and followed the expression levels of *PR-1a* and *PR-5db* at 12 h after treatment. Exogenous supply of PAs in wild-type plants efficiently induced *PR-1a* and *PR-5db* in a dose-responsive manner. In contrast, in S-PAO plants, *PR-1a* transcript did not increase; instead, both transcripts declined, except with 10 mM Spd, when an increase of *PR-5db* was observed, suggesting the activation of a different pathway (Fig. 7). On the other hand, addition of PAs to the A-PAO plants led to *PR-1a* and *PR-5db* mRNA accumulation, at a slower rate since only high levels of Spd and Spm (10 mM) were effective in these plants (Fig. 7). Put exerted a similar effect in A-PAO and wild-type plants (Fig. 7), whereas in S-PAO plants, a significant reduction of both transcripts was found. These results further confirm that PA oxidation in the apoplast efficiently induces PR-encoding genes, while in S-PAO plants they were

induced prior to infection. Thus, controlled PA oxidation is responsible for the induction of a wide array of defense genes.

Genes such as *SIPK* and *WIPK* are induced by increased SA (Sharma et al., 2003). To reveal whether SA participates in the tolerance observed in S-PAO plants and, more specifically, in *SIPK* and *WIPK* induction, total SA titers were determined in tobacco leaves preinoculation and postinoculation. Postinoculation with PS, S-PAO plants exhibited significantly higher levels in contrast to A-PAO plants, when compared with wild-type plants, while SA titers progressively declined at 24 and 48 hpi, although again, S-PAO plants showed significantly higher SA titers (Fig. 8; $P < 0.05$). On the other hand, in control plants, the differences in total SA titers were not significantly different (Fig. 8, inset). These results reveal that the observed induction of *SIPK* and *WIPK* (and the rest of the SAR-associated genes) in S-PAO plants is not SA dependent.

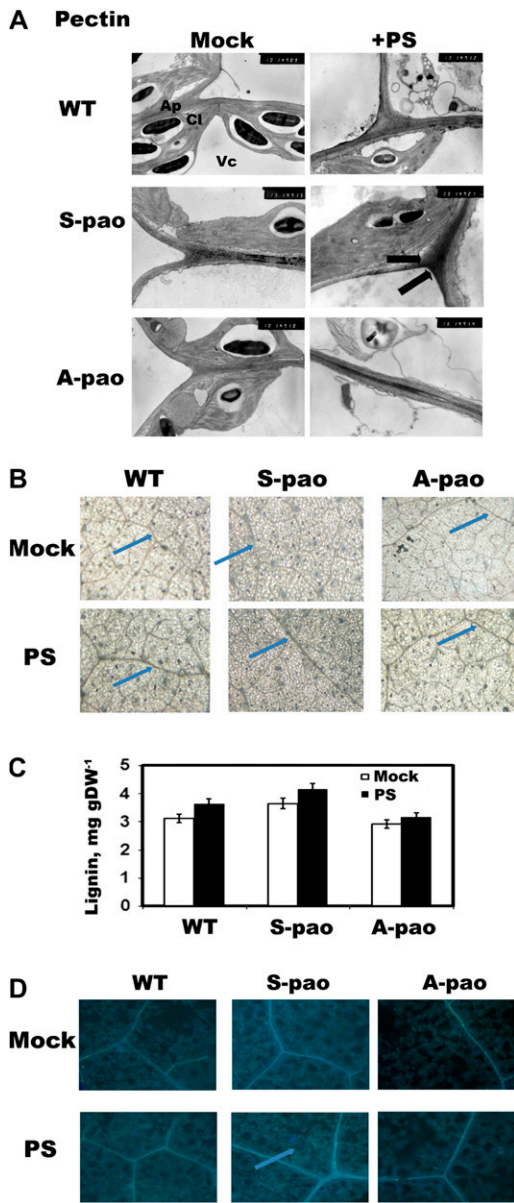


Figure 5. In situ pectin, lignin, and callose quantification in wild-type (WT) and *S-PAO* and *A-PAO* transgenic lines, and SA quantitation analysis. **A**, Pectin-specific TEM results. Plants were mock-inoculated or inoculated with PS at 24 hpi. Ap, Apoplast; Cl, chloroplast; Vc, vacuole. **B**, In situ lignin content (thicker veins and cell walls shown in gray). **C**, Lignin content (per mg dry weight [DW]). **D**, In situ detection of callose deposition in mock- or PS-inoculated leaves at 24 hpi (blue-white areas surrounding the cells). Arrows indicate the accumulation of pectin, lignin, and callose. [See online article for color version of this figure.]

DISCUSSION

Plant pathogens employ a wide array of offensive strategies, and plants activate a similar array of defense responses to thwart pathogen attack (Hirt, 2002). H₂O₂ can act directly as an antimicrobial agent inhibiting pathogen growth, indirectly in the cross-linking

of cell walls, or it can participate as a second messenger in the signaling network that targets the expression of defense genes (Lamb and Dixon, 1997). However, the constitutive overproduction of H₂O₂ could be detrimental to plant cells inducing the PCD syndrome. To overcome this, we employed a strategy that involves the spatial partitioning of an apoplastic H₂O₂-generating enzyme (PAO) with its substrate (Spd/Spm), which only under stress conditions meet to produce H₂O₂. Significant H₂O₂ production in the apoplast is facilitated by the absence of antioxidant machinery in that compartment. Moreover, the absence of H₂O₂-sensitive partners in the apoplast grants this compartment the unique ability to withstand high ROS load. Recently, apoplastic PAO was identified as one enzyme mediating the generation of H₂O₂ in the apoplast via oxidation of higher PAs under abiotic stress (Moschou et al., 2008b). Upon abiotic stress, Spd is secreted into the apoplast, where it is oxidized by PAO, and the resulting H₂O₂, depending on its “signature,” signals either expression of defense gene(s) conferring tolerance or of genes inducing PCD syndrome. Thus, overexpression of PAO in tobacco plants resulted in high apoplastic H₂O₂ content and increased sensitivity to abiotic stress (Moschou et al., 2008a, 2008b).

In this work, we attempted to establish the role of PAO in biotic stress following leaf infection with bacterium, oomycete, and viral pathogens, using transgenic tobacco plants with overexpressed or down-regulated *PAO* gene. Postinfection with PS, the

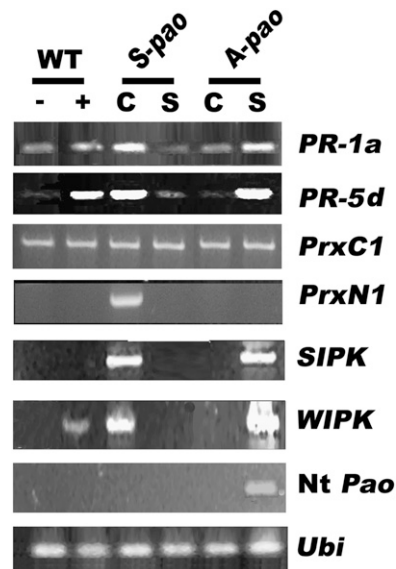


Figure 6. Abundance of mRNA of *PR-1a*, *PR-5db*, *PrxC1*, *PrxN1*, *SIPK*, *WIPK*, and *NtPAO* (endogenous) genes before and after inoculation with PS in wild-type (WT) and *S-PAO* and *A-PAO* transgenic plants. mRNA levels were estimated using semi-quantitative RT-PCR, and as a loading control the *Ubi* gene was used. PCR products were electrophoretically resolved on ethidium bromide (0.5 µg mL⁻¹)-containing agarose gels (1.5%, w/v). -, Mock treatment; +, PS inoculation.

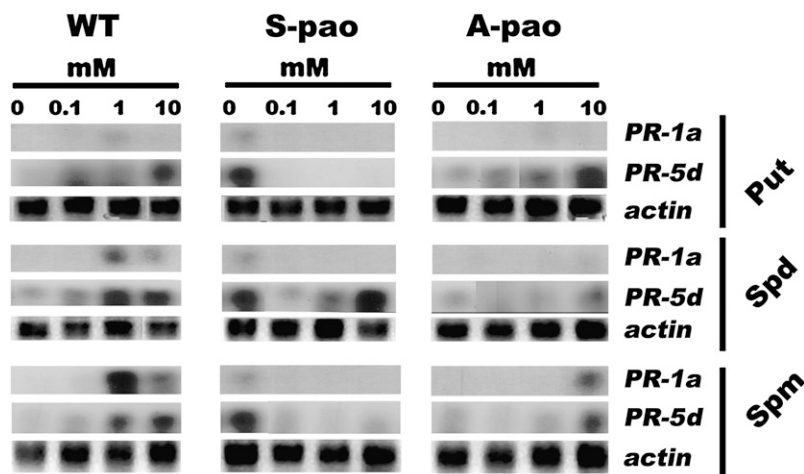


Figure 7. Abundance of *PR-1a* and *PR-5d* mRNAs after exogenous PA application in wild-type (WT) and S-PAO and A-PAO transgenic plants.

NtPAO gene was induced and PAO immunoreactive protein accumulated shortly after in wild-type tobacco plants (Fig. 1). Concomitantly, the PA biosynthetic enzymes were induced with ADC to be the most responsive enzyme to maintain PA homeostasis during compatible plant-pathogen interactions and to supplement PAO with substrates (Fig. 2). On the contrary, ODC was shown to be the responsive enzyme for PA synthesis in tobacco plants during the HR response (Yoda et al., 2003, 2006). The maximum increase in the PA biosynthetic activities was mirrored by a parallel increase of the corresponding PA titers at 12 hpi, mostly those of Spm in the apoplastic compartment, which could serve as substrate for the PAO-derived H_2O_2 production in the apoplast (Fig. 3).

The increase of H_2O_2 was significantly more evident in S-PAO plants. Thus, PAO actively participates in the apoplastic ROS production. Moreover, S-PAO plants exhibited tolerance to PS and PP, mostly to the latter. On the contrary, A-PAO plants showed slightly increased symptomatology (Fig. 4) with respect to the corresponding wild-type plants infected by PS and also an increased colonization rate. A slight delay in the PP mycelial growth in A-PAO plants could be attributed to the elevated levels of Spm in the apoplast, which down-regulate Put and Spd synthesis of the oomycetes (Chibucos and Morris, 2006); *Phytophthora* species have been shown to express transporters for such PAs, involved in their direct uptake as well as in their regulation in the mycelial cells during vegetative growth (Chibucos and Morris, 2006). That CMV transmission was not affected in the examined transgenic genotypes could be due to the fact that PAO could not affect the intracellular multiplication of the virus. Thus, increased higher PA oxidation results in increased tolerance to bacteria and oomycetes, whereas lower PA oxidation does not seem to be detrimental to the overall tolerance. The latter findings suggest that additional mechanisms could supplement the losses in the capacity of PA oxidation, such as NAD(P)H oxidase and peroxidases.

Moreover, we strived to examine if overexpression of PAO had resulted in the induction of a preinfection response, which could as well contribute to tolerance of S-PAO plants to both the bacterium and the oomycete. Candidates for that could be the activation of the host's basal defense (i.e. alterations in the structure of the cell wall and/or expression of pathogenesis-related genes). The first line of defense against the pathogenic challenge is associated with the plant cell wall, in which certain modifications take place during attack, respecting the rule "the harder the better." These modifications involve increased pectin and lignin contents and callose deposition, facilitating plant defense. Thus, S-PAO plants showed enhanced pectin content, under both normal growth and biotic stress conditions. Furthermore, lignin content was only slightly higher in S-PAO plants when compared with wild-type plants, whereas the opposite was true for A-PAO plants. In addition, callose depositions in S-PAO plants were significantly higher compared with wild-type and A-PAO plants (Fig. 5). The latter could render PP unable to infect tobacco plants, as plant defense

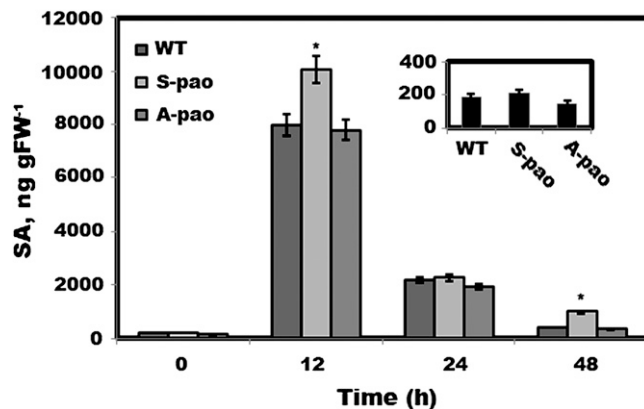


Figure 8. Accumulation of SA in PS-inoculated leaves at 0, 12, 24, and 48 hpi. The inset shows total SA titers in control plants. FW, Fresh weight; WT, wild type.

responses to oomycete involve callose and lignin deposition (Walters, 2003).

In our earlier work, we showed that in *S-PAO* plants antioxidant genes were preinduced (Moschou et al., 2008a), as in the case of SAR. Additionally, an acute exposure to O_3 , which produces O_2^- and H_2O_2 in the apoplast, elicited changes in the levels of plant hormones, such as ethylene, SA, and jasmonic acid, and activated several other signaling pathways leading to changes in gene expression (Ahlfors et al., 2004). The primary signaling events induced by apoplastic O_3 -derived H_2O_2 involved mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation. Plant MAPK cascades appear to be involved in a multitude of biotic and abiotic stress responses, hormone responses, and regulation of cell division, and overall they are expressed throughout the development of plants. In tobacco, O_3 increased the activity of SIPK and WIPK (Samuel and Ellis, 2002) oriented to the activation of the PR proteins (Kroj et al., 2003), while tobacco SIPK was described as a SA-activated MAPK (Zhang and Klessig, 1998).

In plant-pathogen interactions, MAPKs are involved in controlling subsets of genes activated during defense responses (Kroj et al., 2003). This prompted us to investigate the effect of the increased PA-derived apoplastic H_2O_2 production in the induction of MAPKs that regulate the expression of SAR-activated genes. Thus, in *S-PAO* plants, some important genes that contribute to tolerance were induced prior to inoculation. These genes included *PR-1a*, *PR-5db*, *PrxN1*, and two MAPKs, namely *SIPK* and *WIPK*. On the contrary, *PrxC1* was not induced (Fig. 6). The PR proteins are considered to be involved in the postinfection defense against biotic stress challenge, while genes such as *PrxC1* and *PrxN1* have been shown previously to be involved in the Spm signaling pathway that takes place during TMV infection of tobacco plants and to depend upon Spm oxidation in the apoplast of tobacco plants for their activation (Takahashi et al., 2003). Recently, Spd oxidation was also shown to activate *PR-1a* transcription in tobacco plants (Lazzarato et al., 2009). Interestingly, these genes were not further induced in *S-PAO* plants postinoculation, whereas they were further induced in wild-type and *A-PAO* plants. The differential response in *S-PAO* plants was very similar to that reported previously, in which the onset of stress resulted in the inhibition of antioxidant gene induction (Negrel et al., 1984; Moschou et al., 2008a; Mitsuya et al., 2009). Moreover, by supplying exogenously higher PAs in the apoplast of *S-PAO* plants, instead of higher SAR-associated gene accumulation, as was the case in wild-type and *A-PAO*, a decline in the corresponding transcripts was observed (Fig. 7). Thus, the view that an additional PAO-dependent response is not significantly implicated in the biotic tolerance response of *S-PAO* plants is reinforced.

The preinduced increments observed in *S-PAO* plants could be dictated by the SA. Moreover, SA increase has been considered to be a nodal point in ROS production during pathogenic challenge, and

SAR is preceded by an increase in the SA content, although SAR-associated gene induction was shown to be independent of SA accumulation in some cases (Yasuda et al., 2003). Thus, since genes like *SIPK* and *WIPK* were activated, one would expect that the increase of SA in *S-PAO* plants would be responsible for the induction of the defense genes and also for the concomitant cell wall modifications. Interestingly, under control conditions, no increase in SA content could be found in either *S-PAO* or *A-PAO* plants, suggesting that the induction of these genes was SA independent (Fig. 8). Moreover, the higher SA content postinoculation in the *S-PAO* plants was probably due to lower postinoculation PS levels in the leaves of these plants, since bacteria are at least partly responsible for the inhibition of the defense responses, like SA accumulation (Vivian and Arnold, 2000; Abramovitch et al., 2006). These data reinforce the view that increased PA oxidation can solely activate at least some defense responses independently of SA.

In summary, this work provides evidence that the apoplastic PAO is an important player in defense signaling during compatible plant-pathogen interactions, excluding compatible viral infections. Moreover, PAO induces plant tolerance mechanisms that can lead to tolerance against devastating plant diseases. Thus, genetic engineering for PAO overexpression can be an efficient method for enhancing the tolerance of plants to bacteria and oomycetes.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Grown Conditions

Tobacco plants (*Nicotiana tabacum* 'Xanthi') were grown in a growth chamber with irradiance of approximately $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperature of $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, 16/8-h photoperiod, and 75% relative humidity. Transgenic tobacco *S-PAO* (lines S2.2 and S4) and *A-PAO* (lines A2 and A6) plants were constructed as described previously (Moschou et al., 2008b). Data presented from transgenic plants derived from lines S2.2 and A2, whereas lines S4 and A6 showed similar results.

PA Analysis, Protein Extraction, and Enzyme Assays

Apoplastic and total PAs were determined as described previously (Kotzabasis et al., 1993; Moschou et al., 2008b). Total proteins were extracted as described (Primikiriou and Roubelakis-Angelakis, 2001). For the PAO assay, a spectrophotometric method developed by Federiko et al. (1985) was used with minor modifications. A radiometric method was also used for PAO assays according to Paschalidis and Roubelakis-Angelakis (2005a). ADC, ODC, and SAMDC were assayed by measuring the release of $^{14}\text{CO}_2$; L-[1- ^{14}C] Arg, L-[1- ^{14}C] Orn, and S-adenosyl-L-Met S-[carboxyl- ^{14}C], respectively (American Radiolabeled Chemicals), were used as radioactive substrates. Labeled CO_2 was counted in an LS 6000SE (Beckman) scintillation counter (Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, 2005b). SPDS and SPMS were assayed by measuring the formation of Spd and Spm, respectively, according to Paschalidis and Roubelakis-Angelakis (2005a). Specific enzymatic activities were expressed as relative units with respect to the corresponding controls.

Protein Gel Blotting, RNA Extraction, and DNA and RNA Gel Blotting

Total protein extracts were electrophoretically resolved, transferred to membranes, and hybridized against an anti-PAO maize (*Zea mays*) polyclonal

antibody (Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, 2005a) or an anti-ADC grape (*Vitis vinifera*) polyclonal antibody (Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, 2005a). For RNA gel blotting, total RNA was extracted according to Miller (1972), transferred to a membrane, and hybridized to the corresponding ^{32}P -labeled probe prepared using the RadPrime DNA labeling kit as described by the manufacturer (Invitrogen). Probes were prepared as described previously (Paschalidis and Roubelakis-Angelakis, 2005a, 2005b). X-ray films (Kodak) and low exposure times were used for visualization.

cDNA Cloning and RT-PCR

All genes assessed in this study were cloned in a pGEM T-Easy vector (Promega) and sequenced. The primers used for RT-PCR and the cloning are described in Supplemental Table S1.

For quantitative reactions, total mRNA from leaves was extracted and treated with RNase-free DNase I for 45 min at 37°C (Iandolino et al., 2004). The samples were then subjected to RT-PCR using poly(T) as primer and the Super RT enzyme according to the manufacturer's instructions (Takara). The samples were normalized according to the *NtUbi* gene (this was also replicated with the *NtActin* gene). More specifically, samples were used for 20, 30, 35, and 40 cycles of PCR (4 min at 94°C initial denaturation, 30 s at 94°C cycling denaturation, 52°C–55°C primer annealing, 45–60-s extension, and a 7-min final extension) and analyzed using agarose gel electrophoresis to estimate whether the reaction was still in the logarithmic phase.

Bacterial Strains and Cultivation, Leaf Inoculation, and Bacterial Population Counts

Cultures of rifampicin-resistant *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* strains BPIC1514 and SFP-2124 were grown for 24 h at 28°C on Luria-Bertani (LB) medium at pH 7.0. LB medium was from the recipe of Miller (1972). Bacteria were suspended in 10 mM MgCl_2 , and the density was determined photometrically (optical density at 600 nm).

Fully expanded leaves from 5- to 6-week-old tobacco Xanthi plants were used for bacterial and oomycete inoculation. Four-week-old tobacco plants were used for virulence assays. Plants were grown under greenhouse conditions and transferred to the laboratory 1 d before inoculation.

For virulence assays, PS was grown at 28°C for 48 h in liquid LB medium supplemented with the appropriate antibiotic (rifampicin, 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Bacterial cells were harvested by spin-down at 2,800 rpm for 10 min in 4°C, washed two times in cold 10 mM MgCl_2 , and finally resuspended to an optical density at 600 nm of 0.3 (approximately 5×10^7 colony-forming units mL^{-1}) in sterile 10 mM MgCl_2 . Bacterial suspensions (5×10^5 colony-forming units mL^{-1}) obtained by serial dilution were infiltrated using a blunt syringe into the intercellular spaces of leaves from all transgenic lines and wild-type tobacco (at the five- to 10-leaf stage, abaxial surface) following the methods of Klement et al. (1964), and plants were maintained in the laboratory with illumination at room temperature (24°C).

Bacterial multiplication in tobacco leaves was monitored by cutting leaf discs from the inoculation sites with a 0.6-cm-diameter borer, homogenizing them in 10 mM MgCl_2 , and serially diluting the homogenate, which was then spread onto LB agar with appropriate antibiotic (rifampicin, 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$) to allow colony development at 28°C (Tsiamis et al., 2000). Colonies were counted after incubating the plates for 48 h at 28°C.

Oomycete Strain, Culture, and Inoculation Conditions

The *Phytophthora parasitica* (syn *nicotianae*) var *nicotianae* Tucker race 0 is a tobacco isolate, kindly supplied by Arnaud Bottin (Université de Toulouse). It was routinely grown on V-8 agar medium (50 mL of V-8 juice and 20 g L^{-1} agar, pH 5.0) at 23°C and maintained at 15°C in the dark. Plugs of young mycelium, growing on V-8 agar, were cut out using a 15-mm-diameter cork borer and placed upside down on leaves of 4-week-old plants. Mycelium plugs were covered with a fine layer of moisturized cotton, and leaves were incubated for 7 d at 23°C in trays that were kept tightly shut in order to ensure 100% relative humidity for the first 3 d. Leaves were allowed a few hours of daylight, and subsequently, a relative humidity of about 70% was kept in the trays. Endophytic growth of PP was assessed by measuring the radial growth of PP in the infected tissue, which developed a water-soaked appearance.

Transmission Tests of CMV

Mechanical transmission tests were carried out using leaves from CMV-infected tobacco. The leaves were ground in phosphate buffer, and inoculation was performed by application to the third and fourth leaves of 5- to 7-week-old plants. Seven and 12 d postinoculation, separate samples were taken from inoculated leaves of all plants and stored at –20°C. Plants were kept in the glasshouse for 40 d. All samples were tested for the presence of CMV by RNA gel-blot analysis for the CMV coat protein.

TEM for H_2O_2 and Pectin Localization

H_2O_2 was also detected by the cerium chloride (CeCl_3) method, as described (Bestwick et al., 1997). In brief, small pieces (2–5 mm^2) of tissues from the central laminae region of tobacco third leaves were incubated in freshly prepared 50 mM MOPS buffer, pH 7.2, containing 5 mM CeCl_3 for 1 h. Subsequently, the samples were fixed in a mixture of 1.25% (v/v) glutaraldehyde and 1.25% (v/v) paraformaldehyde in 50 mM cacodylate buffer (CB), pH 7.2, for 1 h. After washing in CB, samples were postfixed overnight in 1% osmium tetroxide (prepared in CB), dehydrated in a graded ethanol series, and embedded in London Resin White. Ultrathin sections were examined by TEM at 80 kV without poststaining. To confirm the specificity of CeCl_3 staining for H_2O_2 , samples were incubated for 20 min in 50 mM MOPS, pH 7.2, containing either 1 mM sodium azide (to inhibit peroxidase) or 25 mg mL^{-1} bovine liver catalase (to decompose H_2O_2). They were then transferred to CeCl_3 solution, incubated for 1 h, and processed for TEM as described above. Some samples were fixed without the CeCl_3 treatment. After postfixation in OsO_4 , samples were processed for TEM as outlined above.

For pectin detection, sections from central laminae regions of tobacco third leaves were fixed for 4 h in a mixture of 0.05% (w/v) ruthenium red and 3% (v/v) glutaraldehyde in 50 mM CB, pH 7.4. After washing in the same buffer, the samples were postfixed in 1% (w/v) osmium tetroxide. After dehydration in a graded series of acetone, they were embedded in Spurr's low-viscosity resin (Spurr, 1969). Ultrathin sections were stained with uranyl acetate.

Lignin Detection and Quantification

Leaves were excised from inoculated plants and cleared from pigments by immersion in three changes of absolute methanol over 3 d. Lignification of leaf cells was visualized by incubating cleared leaves overnight in 1 mL of 1% (w/v) phloroglucinol in 70% (v/v) ethanol. The leaf tissue was then mounted on glass slides with a few drops of concentrated HCl. After 5 min, excess HCl was drained from the slides and replaced with deionized water for light microscopy.

Accumulation of lignin was quantified by the thioglycolic acid reaction according to Dos Santos et al. (2004). Lignin content was expressed as mg lignin-thioglycolic acid complex g^{-1} leaf dry weight using molar absorptivity of 17.87 $\text{g L}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Callose Deposition

To visualize callose deposition, leaves were cleared in 95% ethanol, stained with aniline blue, and examined for fluorescence as described with a UV microscope (Adam and Somerville, 1996).

SA Analysis

For total SA extraction, 200 mg of leaf tissue was ground with liquid N_2 and SA was extracted once with 1 mL of 90% (v/v) methanol and once with 1 mL of 100% (v/v) methanol. The two extracts were combined and dried under gaseous N_2 and then resuspended in 1 mL of 5% TCA. Twenty microliters of HCl was added, and samples were incubated in boiling water for 30 min. The SA was extracted in cyclohexane:ethyl ether:isopropanol (50:50:1), and the extract was dried under gaseous N_2 and resuspended in 200 μL of methanol. Fifty microliters of each sample was analyzed using an HP 1100 high-performance liquid chromatograph (Hewlett-Packard). The mobile phase consisted of methanol:water:acetic acid (54:45:1). An isocratic flow rate of 0.550 mL min^{-1} was used, and SA was detected at 311 nm after elution from a 4 × 250-mm C-18 reverse-phase column (Analysentechnik) using a controlled column temperature of 30°C. The SA retention time was approximately 10 min.

Image and Statistical Analyses

Image and pixel analyses and mRNA quantification were performed with ImageJ 1.37v (rsb.info.nih.gov/ij/), and statistical analysis was performed with SPSS 14v (www.spss.com).

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under the following accession numbers: *NtPAO*, AB200262; *M-PAO*, AJ002204; *NtPR-1a*, X12485; *NtPR-5db*, AB121785; *NtPrxC1*, AB027752; *NtPrxN1*, AB027753; *NtSIPK*, NTU94192; *NtWIPK*, AB052964; *NtActin*, X63603; *NtUbi*, U66264.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Table S1. Sequences of the primers used in this study.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Alexandra Siakouli, Eva Papadogiorgaki, and Sotiris Zerveas for excellent technical assistance.

Received December 24, 2008; accepted February 4, 2009; published February 13, 2009.

LITERATURE CITED

- Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB (2006) Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 601–611
- Adam L, Somerville SC (1996) Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 9: 341–356
- Ahlfors R, Macioszek V, Rudd J, Broschei M, Schlichting R, Scheel D, Kangasjarvi J (2004) Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant J* 40: 512–522
- Alcazar R, Marco F, Cuevas JC, Patron M, Ferrando A, Carrasco P, Tiburcio AF, Altabella T (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol Lett* 28: 1867–1876
- Appiah AA, Jennings P, Turner JA (2004) *Phytophthora ramorum*: one pathogen and many diseases, an emerging threat to forest ecosystems and ornamental plant life. *Mycologist* 18: 145–150
- Badreddine I, Lafitte C, Heux L, Skandalis N, Spanou Z, Martinez Y, Esquerré-Tugayé MT, Bulone V, Dumas B, Bottin A (2008) Cell wall chitosaccharides are essential components and exposed patterns of the phytopathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Eukaryot Cell* 7: 91–108
- Bestwick CS, Brown IR, Bennet MH, Mansfield JW (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* 9: 209–221
- Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* 53: 1367–1376
- Chibucos MC, Morris PF (2006) Levels of polyamines and kinetic characterization of their uptake in the soybean pathogen *Phytophthora sojae*. *Appl Environ Microbiol* 72: 3350–3356
- Dos Santos WD, Ferrarese MLL, Finger A, Teixeira ACN, Ferrarese-Filho O (2004) Lignification and related enzymes in *Glycine max* root growth-inhibition by ferulic acid. *J Chem Ecol* 30: 1203–1212
- Erwin CE, Ribeiro OK (1996) *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St. Paul
- Federico R, Angelini R, Cesta A, Pini C (1985) Determination of diamine oxidase in lentil seedlings by enzymic activity and immunoactivity. *Plant Physiol* 79: 62–64
- Goodman RN, Novacky AJ (1994) The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens: A Resistance Phenomenon. APS Press, St. Paul
- Hirt H (2002) A new blueprint for plant pathogen resistance. *Nat Biotechnol* 20: 450–451
- Iandolino AB, da Silva FG, Lim H, Choi H, Williams LE, Cook DR (2004) High-quality RNA, cDNA, and derived EST libraries from grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol Biol Rep* 22: 269–278
- Jackson AO, Taylor CB (1996) Plant-microbe interactions: life and death at the interface. *Plant Cell* 8: 1651–1668
- Klement Z, Farkas GL, Lovrekovich L (1964) Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54: 474–477
- Kotzabasis K, Christakis-Hampsas MD, Roubelakis-Angelakis KA (1993) A narrow-bore HPLC method for the identification and quantitation of free, conjugated, and bound polyamines. *Anal Biochem* 214: 484–489
- Kroj T, Rudd JJ, Nurnberger T, Gabler Y, Lee J, Scheel D (2003) Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J Biol Chem* 278: 2256–2264
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 251–275
- Lazzarato L, Trebbi G, Pagnucco C, Franchin C, Torrigiani P, Betti L (2009) Exogenous spermidine, arsenic and β -aminobutyric acid modulate tobacco resistance to tobacco mosaic virus, and affect local and systemic glucosylsalicylic acid levels and arginine decarboxylase gene expression in tobacco leaves. *J Plant Physiol* 166: 90–100
- Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Mitsuya Y, Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Matsumura H, Takahashi H, Terauchi R, Tomonobu K (2009) Spermine signaling plays a significant role in the defense response of *Arabidopsis thaliana* to cucumber mosaic virus. *J Plant Physiol* 166: 626–643
- Moschou PN, Delis ID, Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA (2008a) Transgenic tobacco plants overexpressing polyamine oxidase are not able to cope with oxidative burst generated by abiotic factors. *Physiol Plant* 133: 140–156
- Moschou PN, Paschalidis KA, Delis ID, Andriopoulou AH, Lagiotis GD, Yakoumakis DI, Roubelakis-Angelakis KA (2008b) Spermidine exodus and oxidation in the apoplast induced by abiotic stress is responsible for H₂O₂ signatures that direct tolerance responses in tobacco. *Plant Cell* 20: 1708–1724
- Moschou PN, Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA (2008c) Plant polyamine catabolism: the state of the art. *Plant Signal Behav* 3: 1061–1066
- Moschou PN, Sanmartin M, Andriopoulou AH, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ, Roubelakis-Angelakis KA (2008d) Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 147: 1845–1857
- Negrel J, Vallee JN, Martin C (1984) Ornithine decarboxylase activity and the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 23: 2747–2751
- Palukaitis P, Roossinck MJ, Dietzgen RG, Francki RI (1992) Cucumber mosaic virus. *Adv Virus Res* 41: 281–348
- Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA (2005a) Spatial and temporal distribution of polyamine levels and polyamine anabolism in different organs/tissues of the tobacco plant: correlations with age, cell division/expansion, and differentiation. *Plant Physiol* 138: 142–152
- Paschalidis KA, Roubelakis-Angelakis KA (2005b) Sites and regulation of polyamine catabolism in the tobacco plant: correlations with cell division/expansion, cell cycle progression, and vascular development. *Plant Physiol* 138: 2174–2184
- Primikiriou NI, Roubelakis-Angelakis KA (2001) Indications for post-translational regulation of *Vitis vinifera* L. arginine decarboxylase. *Plant Mol Biol* 45: 669–678
- Rea G, de Pinto MC, Tavazza R, Biondi S, Gobbi V, Ferrante P, De Gara L, Federico R, Angelini R, Tavladoraki P (2004) Ectopic expression of maize polyamine oxidase and pea copper amine oxidase in the cell wall of tobacco plants. *Plant Physiol* 134: 1414–1426
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willitis MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809–1819
- Samuel MA, Ellis BE (2002) Double jeopardy: both overexpression and suppression of a redox-activated plant mitogen-activated protein kinase render tobacco plants ozone sensitive. *Plant Cell* 14: 2059–2069
- Sharma PC, Ito ZA, Shimizu ZT, Terauchi ZR, Kamoun S, Saitoh ZH (2003) Virus-induced silencing of WIPK and SIPK genes reduces resis-

- tance to a bacterial pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Genet Genomics* **269**: 583–591
- Spurr AR** (1969) A low viscosity embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* **26**: 31–43
- Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Seo S, Ohashi Y, Kusano T** (2003) Spermine signalling in tobacco: activation of mitogen-activated protein kinases by spermine is mediated through mitochondrial dysfunction. *Plant J* **36**: 820–829
- Tsiamis G, Mansfield JW, Hockenull R, Jackson RW, Sesma A, Athanassopoulos E, Bennet MA, Stevens C, Vivian A, Taylor JD, et al** (2000) Cultivar specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO J* **19**: 3204–3214
- Vivian A, Arnold DL** (2000) Bacterial effector genes and their role in host-pathogen interactions. *J Plant Pathol* **82**: 163–178
- Walters DR** (2003) Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* **64**: 97–107
- Yamakawa H, Kamada H, Satoh M, Ohashi Y** (1998) Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* **118**: 1213–1222
- Yasuda M, Nakashita H, Hasegawa S, Nishioka M, Arai Y, Uramoto M, Yamaguchi I, Yoshida S** (2003) N-Cyanomethyl-2-chloroisonicotinamide induces systemic acquired resistance in *Arabidopsis* without salicylic acid accumulation. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**: 322–328
- Yoda H, Hiroi Y, Sano H** (2006) Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiol* **142**: 193–206
- Yoda H, Yamaguchi Y, Sano H** (2003) Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiol* **132**: 1973–1981
- Zhang S, Klessig DF** (1998) The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7225–7230

1 **Running head:** T3EPs engage host silencing machinery

2 ***Corresponding author:** Prof. Nickolas J. Panopoulos

3 Department of Biology, University of Crete

4 P.O. Box 2208, 71409, Heraklion Crete, Greece

5 Tel.: +30 2810 394369, Fax: +30 2810 394408

6 Email: panopoul@imbb.forth.gr

7

8 **Phytobacterial Type III Effectors Engage the Plant RNA Silencing Machinery**

9

10 *Panagiotis F. Sarris*^{1,2}, *Konstantinos Karademiris*^{1,2}, *Shang Gao*³, *Hailing Jin*³,
11 *Kriton Kalantidis*^{1,2} and *Nickolas J. Panopoulos*^{1,2*}

12

13 ¹Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion, Greece,

14

15 ²Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and
16 Technology, Hellas, PO Box 1527, Heraklion 71110, Crete, Greece,

17

18 ³Department of Plant Pathology and Microbiology, Center for Plant Cell Biology and
19 Institute for Integrative Genome Biology, University of California, Riverside,
20 California 92521, USA

21

22 **Research Area: Plant Microbe Interaction**

23

24 **The author responsible for distribution of materials integral to the findings**
25 **presented in this article in accordance with the policy described in the**
26 **Instructions for Authors (www.plospathogens.org) is: Prof. Nickolas J.**
27 **Panopoulos (panopoul@imbb.forth.gr).**

1 **ABSTRACT**

2 Plant and animal pathogenic bacteria deploy a variable arsenal of type III effector
3 proteins (T3SPs) to manipulate host defense. Specific biochemical functions and
4 molecular/sub-cellular targets have been demonstrated or proposed for a growing
5 number of T3SPs, but remain unknown for the majority of them. We show that
6 transient expression of genes coding certain bacterial T3SPs (HopAB1, HopX1 and
7 HopF2), which did not elicit HR in transgenic *Nicotiana benthamiana* 16C line,
8 enhanced GFP silencing following agro-delivery of GFP and effector gene expressing
9 cassettes. In addition, we show these T3SPs genes increased GFP-specific siRNA as
10 well as nat-siRNAs and lsiRNAs accumulation levels. These effects were blocked by
11 two viral silencing suppressors. Further analysis using genetic truncations and site-
12 directed mutants showed that the silencing enhancer activity does not involve the
13 receptor-recognition domains of HopAB1 and HopX1. Our results suggest that a
14 subset of *P. syringae* T3SPs engage the small RNA accumulation pathways in plants,
15 thus providing evidence for a novel function and a basis for a novel functional assay
16 for T3SPs. It appears that phytopathogenic bacteria, like plant viruses, deploy specific
17 protein effectors to manipulate the host RNA silencing machinery in order to cause
18 disease.

19
20

1 **Running head:** Putative T6SS in *P. syringae* pathovars

2

3 **Corresponding author:** Prof. Nickolas J. Panopoulos

4 Department of Biology, University of Crete

5 P.O. Box 2208, 71409, Heraklion Crete, Greece

6 Tel.: +30 2810 394369, Fax: +30 2810 394408

7 Email: panopoul@imbb.forth.gr

8

9 **In silico analysis for *Pseudomonas syringae* putative type VI secretion system**

10 Panagiotis F. Sarris, Nicholas Skandalis and Nickolas J. Panopoulos

11

12 **Research Area: Bacterial protein secretion**

13 Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion, Greece and

14 Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and

15 Technology, Hellas, PO Box 1527, Heraklion 71110, Crete, Greece

16

17

18

19 **The author responsible for distribution of materials integral to the findings**

20 **presented in this article in accordance with the policy described in the**

21 **Instructions for Authors (Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology)**

22 **is: Prof. Nickolas J. Panopoulos (panopoul@imbb.forth.gr).**

1 **Introduction**

2
3 Protein secretion/translocation systems of Gram-negative bacteria play central
4 roles in the interactions with the biotic or abiotic environments. The extracytoplasmic
5 destinations of the passenger proteins include the inner and outer plasma membranes,
6 the periplasmic space, the extracellular medium, and the plasma membrane,
7 cytoplasm, nucleus or cellular organelles of other organisms. Indeed, a number of
8 bacterial proteins are destined to enter the cellular environment or membrane of
9 eukaryotes. It has become increasingly apparent that pathogenic or commensal
10 bacteria evolved sophisticated protein secretion/translocation pathways to deliver
11 ready-made catalytic or bioactive proteins (effectors or toxins) to eukaryotic hosts
12 (interkingdom protein transfer). These pathways are often complex multiprotein
13 channels that bypass both bacterial periplasmic space and the prokaryote-eukaryote
14 intercellular space altogether. Such pathways are the so-called type I (T1SS), type III
15 (T3SS), Type IV (T4SS) and type VI (T6SS) protein export systems (*Economou et.*
16 *al., 2006*). The T4SSs is the only system that transports genetic molecules both
17 between bacteria and across the prokaryote-eukaryote phylogenetic divide (*Tseng et.*
18 *al., 2009*).

19 The T6SS is a recently characterized secretion system that appears to
20 constitute an injectisome (phage-tail-like), which has the potential to translocate
21 effector proteins directly into the host cell cytoplasm (*Bingle et. al., 2008; Cascales,*
22 *2008; Filloux et. al., 2008; Shrivastava et. al., 2008*), analogous to the T3SS and
23 T4SS machineries. The T6SS at first drew attention as a conserved family of
24 pathogenicity islands or as an atypical T4SS gene locus in Gram-negative bacteria,
25 before being identified as protein-encoding secretory machinery by the J. Mougous
26 lab (Harvard Medical School) and shown to be required for *Vibrio cholerae* virulence
27 on *Dictyostelium* (*Pukatzki et. al., 2006*). The T6SS of *V. cholerae* and *Pseudomonas*
28 *aeruginosa* were involved in exportation of Hcp (Haemolysin-Coregulated Protein)
29 the valine-glycine repeat (Vgr) proteins, proposed effectors that were associated with
30 cytotoxicity in some in vitro models, but their exact function is still speculative
31 (*Mougous et. al., 2006; Pukatzki et. al., 2006*). In detail, the N-terminal domains of
32 Vgr proteins show strong homology with the bacteriophage T4 proteins gp27 and gp5,
33 which are constituents of the phage baseplate (*Pukatzki et. al., 2007*) and are reported
34 to function as actin cross-linkers in the eukaryotic host cytoplasm. Likewise, the Hcp1

Πρόσθετες
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Molecular polymorphisms between populations of *Pseudoperonospora cubensis* from Greece and the Czech Republic and the phytopathological and phylogenetic implications

P. Sarris^{a,b}, M. Abdelhalim^{a,d}, M. Kitner^c, N. Skandalis^{a,b}, N. Panopoulos^{a,b}, A. Doulis^{d*} and A. Lebeda^c

^aLaboratory of Molecular Plant Pathology and Plant Biotechnology, Department of Biology, University of Crete, GR-71004 Heraklion;

^bInstitute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology, Hellas, PO Box 1527, GR-71110 Heraklion, Greece; ^cDepartment of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc-Holice, Czech Republic; and ^dLaboratory of Plant Biotechnology, Institute of Viticulture, Floriculture & Vegetable Crops, National Agricultural Research Foundation of Greece (NAGREF), PO Box 2229, GR-71003 Heraklion, Greece

Molecular genetic polymorphisms within *Pseudoperonospora cubensis* isolates of different geographic origins were investigated to establish their phylogenetic relationships and to assess genetic variability between two distant pathogen populations. Thirty isolates originating from Greece (Crete; 15), the Czech Republic (13), the Netherlands (one) and France (one) were analysed by AFLP fingerprinting and ITS 5-8S rDNA sequence analysis. All isolates were obtained from cucumber (*Cucumis sativus*) plants showing typical downy mildew symptoms. Four AFLP primer combinations produced a total of 288 high-quality bands of which 45% were polymorphic, allowing isolates to be grouped into two separate clusters: one including the Central European (Czech Republic) and Western European (the Netherlands and France) and the other the Cretan isolates. Within each AFLP cluster there was some variation, which could be accounted for by geographic origin or pathogenicity. The two populations (Cretan vs. Central and Western European) exhibited a high degree of genetic isolation. There was no clear AFLP grouping of isolates on the basis of pathotypes. No variability was detected in the ITS1 region; however, ITS2 sequences grouped *P. cubensis* isolates in two subclusters: one with all investigated European and the other with Asian isolates. The two subclusters formed a larger *P. cubensis* cluster which was differentiated from the cluster of the neighbouring species *Pseudoperonospora humuli*. Within *P. cubensis*, AFLP fingerprints could resolve genetically isolated populations, even on small or medium geographic scales, while ITS2 sequence showed differences on a global scale, being only suitable for phylogenetic analyses.

Keywords: *Cucumis sativus*, cucurbit downy mildew, genetic diversity, pathotypes, *Pseudoperonospora humuli*

Introduction

The obligate parasite *Pseudoperonospora cubensis*, the causal agent of cucurbit downy mildew (Göker *et al.*, 2007), causes significant economic losses in cucurbits such as *Cucumis*, *Cucurbita* and *Citrullus* around the world (Lebeda *et al.*, 2007b). *Pseudoperonospora cubensis* has been the most destructive disease agent affecting field and glasshouse cucumbers throughout Central and Southeast Europe, including Greece (Fanourakis *et al.*, 2001) and

the Czech Republic (Lebeda & Schwinn, 1994; Lebeda & Urban, 2007).

Recent studies on the evolution of obligate parasitism and downy mildews showed that plant parasitism has independently evolved as a nutrition strategy in both true fungi and oomycetes. Within the obligate biotrophic downy mildews, four morphologically and ecologically distinct subgroups were defined by Göker *et al.* (2007). The first group is represented by the genera *Peronospora* and *Pseudoperonospora* with brownish-violet conidiosporangia. *Pseudoperonospora* appears as monophyletic with high bootstrap values (Göker *et al.*, 2007). A comparative morphological and molecular (ITS-rDNA) study of *P. cubensis* and *P. humuli* showed that the genus *Pseudoperonospora* is a unique taxonomic group, but because the

*E-mail: andreas.doulis@nagref-her.gr

two species are very similar, *P. humuli* was suggested as a synonym of *P. cubensis* (Choi *et al.*, 2005). However, on the basis of ITS rDNA analysis it was proposed that within *P. cubensis* there is very limited intraspecific variability (Choi *et al.*, 2005), which is in distinct contrast with the pathogenic variability in this species (Lebeda & Widrlechner, 2003; Lebeda *et al.*, 2006). In light of the above, it is evident that more detailed studies focused on intraspecific variability among *P. cubensis* isolates and populations are required (Lebeda *et al.*, 2006).

Pseudoperonospora cubensis belongs to a group of 'the highest risk pathogens' with high evolutionary potential (Fanourakis *et al.*, 2001; Lebeda *et al.*, 2006; Lebeda & Urban, 2007; Urban & Lebeda, 2007). Morphological and, especially, pathogenic variability of this oomycete appear to depend on host and environmental conditions (Lebeda & Widrlechner, 2003). Host–parasite specificity and interactions involving *P. cubensis* exhibit significant variations at both the individual and population levels. However, phytopathological and genetic knowledge of the interactions between individual *P. cubensis* isolates and a broad range of accessions of most important genera of cultivated cucurbits (e.g. *Cucumis*, *Cucurbita* and *Citrullus*) remains limited (Lebeda *et al.*, 2006). Differentiation of *P. cubensis* pathogenicity at the level of pathotypes was clarified (Lebeda & Widrlechner, 2003), but detailed elaboration of pathogenic variation at the level of races is still lacking. Analysis of all available data showed that race-specificity is common in interactions of some *Cucurbitaceae* and *P. cubensis* (Lebeda *et al.*, 2006). The most promising host for *P. cubensis* race differentiation is *Cucumis melo* (Lebeda *et al.*, 2006, 2007a) and development of this host–pathogen system would be very important for novel combined classical and molecular approaches to detailed population studies (Lebeda *et al.*, 2006).

AFLP fingerprinting is a widely used typing technique that employs anonymous structural markers producing high molecular polymorphisms and allows for classifications and genetic characterization, even at fine-scale diversity in local populations, without previous sequence knowledge (reviewed by Cooke & Lees, 2004). AFLP typing has already been used for investigating genetic diversity in other plant pathogenic oomycetes, such as *Peronosclerospora sorghi* (Perumal *et al.*, 2006), *Phytophthora sojae* and *Phytophthora vignae* (May *et al.*, 2003), but not in *P. cubensis*. On the other hand, internal transcribed spacer regions of rDNA (ITS) exhibit nucleotide differences of taxonomic significance, especially above the species level (Cooke *et al.*, 2002). Thus far, the nucleotide sequence of the ITS1-5.8S-ITS2 subunit of rDNA has been used only for taxonomic and phylogenetic studies of downy mildew pathogens (Choi *et al.*, 2003; Voglmayr, 2008), but not for detailed intraspecific population studies of isolates from geographically isolated areas, as in the present investigation of *P. cubensis*. In addition, currently available genetic and molecular data are not sufficient for identification of *P. cubensis* by comparison to key reference isolates of the genus. Consequently, the objective

of the present work was to conduct a preliminary study on the genetic diversity of *P. cubensis* originating from different geographic areas (Crete; Czech Republic and Central Europe; the Western European countries France and the Netherlands), where intensive cultivation of Cucurbitaceae is practiced. The working hypothesis was that geographic isolation and different genetic structures of the host (cultivars) have led to independently evolving pathogen populations. Relationships between the results obtained by AFLP and non-transcribed regions of rDNA (ITS) on one hand and pathogenicity on the other were also investigated.

Materials and methods

Origin of isolates

The 30 *P. cubensis* isolates used for AFLP and rDNA-ITS analysis, their geographic origins, collection dates and previously determined pathotypes are presented in Table 1. Isolates originating from Greece were collected during the 2006 growing season, from fresh samples (single leaves) of different varieties and commercial hybrids of cucumber (*Cucumis sativus*) grown in the localities of Hierapetra (eastern part of the island of Crete), Heraklion, Tympaki and the Messara plain (South-Central parts of Crete). Isolates originating from Central Europe (Czech Republic) were originally collected mostly in the main growing areas, but also in areas with unusual climatic conditions for cucurbit cultivation (e.g. hilly areas), during the 2000–04 growing seasons (Urban & Lebeda, 2006, 2007). Additional isolates (PC 1/97, PC 1/88) had been collected during the 1980s and 1990s (Lebeda & Gadasová, 2002). Two isolates from geographic areas external to the main study areas were also included: one from the Netherlands (PC 1/00) and one from France (PC 3/00) (Lebeda & Gadasová, 2002; Lebeda & Widrlechner, 2003). The non-Greek isolates were obtained from the permanent Collection of Plant Pathogenic Fungi maintained in the Department of Botany, Palacký University in Olomouc, Czech Republic (<http://botany.upol.cz>).

Pathogen isolation and multiplication

Leaves of 6- to 8-week-old plants of a highly susceptible cucumber cultivar, Marketer 430, were used for pathogen multiplication. Plants were grown under optimal conditions (25°C/15°C day/night, daily watering, weekly fertilization) in a glasshouse and were not treated chemically (Lebeda & Gadasová, 2002; Lebeda & Widrlechner, 2003). Inoculum was prepared by shaking a small piece of infected leaf tissue in sterile distilled water (SDW) and atomized over the abaxial surface of leaves detached from c. 6- to 8-week-old cucumber plants. Inoculated leaves were placed in plastic boxes (110 × 85 × 45 mm) on wet filter paper and incubated for 1–2 days in humid conditions at approximately 15°C in a growth chamber (Lebeda & Gadasová, 2002). The pathogen produced fresh sporangioophores with spores after 7–8 days' incubation.

Table 1 *Pseudoperonospora cubensis* isolates used in the present study

No.	Country of origin	Locality	Region	Isolation code	Phenogram code ^a	Pathotype ^b	Collection date
1	Czech Republic	Valtice	Jihomoravský	PC 12/00	JM_12/00	11/10/14	08/2000
2	Czech Republic	Kojetín	Olomoucký	PC 26/01a	OL_26/01a	3/14/14	08/2001
3	Czech Republic	Kojetín	Olomoucký	PC 26/01	OL_26/01b	n/a	08/2001
4	Czech Republic	Přerov nad Labem	Stredočeský	PC 75/01	SC_75/01	15/14/14	08/2001
5	Czech Republic	Vacenovice	Jihomoravský	PC 39/01a	JM_39/01a	15/15/15	08/2001
6	Czech Republic	Vacenovice	Jihomoravský	PC 39/01	JM_39/01b	n/a	08/2001
7	Czech Republic	Lysá nad Labem	Stredočeský	PC 85/03	SC_85/03	15/14/11	08/2003
8	Czech Republic	Tasovice	Jihomoravský	PC 57/01	JM_57/01	15/10/12	08/2001
9	Czech Republic	Olomouc	Olomoucký	PC 1/97	OL_1/97	15/10/11	08/1997
10	Czech Republic	Ostrožská Nová Ves	Zlínský	PC 54/03	ZL_54/03	15/15/14	08/2003
11	Czech Republic	Smržice	Olomoucký	PC 1/88	OL_1/88	3/2/10	08/1998
12	Czech Republic	Nedakonice	Zlínský	PC 35/01	ZL_35/01	15/2/0	08/2001
13	Czech Republic	Olomouc – Holice	Olomoucký	PC 74/01	OL_74/01	15/7/14	08/2001
14	Netherlands	Enkhuizen	Noord-Holland	PC 1/00	WE_1/00	11/2/10	09/2000
15	France	Nimes	Western Europe Lanquedoc	PC 3/00	WE_3/00	3/0/0	08/2000
16	Greece	Heraklion	Central Crete	SFP_2811	CEC_2811	n/a	03/2006
17	Greece	Tymbaki	Central Crete	SFP_2812	CEC_2812	n/a	05/2006
18	Greece	Tymbaki	Central Crete	SFP_2813	CEC_2813	n/a	05/2006
19	Greece	Hierapetra	Hierapetra	SFP_2409	HIE_2409	n/a	03/2006
20	Greece	Hierapetra	Hierapetra	SFP_2410	HIE_2410	n/a	03/2006
21	Greece	Hierapetra	Hierapetra	SFP_2411	HIE_2411	n/a	03/2006
22	Greece	Hierapetra	Hierapetra	SFP_2412	HIE_2412	n/a	03/2006
23	Greece	Hierapetra	Hierapetra	SFP_2413	HIE_2413	n/a	03/2006
24	Greece	Messara	Central Crete	SFP_2814	CEC_2814	n/a	05/2006
25	Greece	Messara	Central Crete	SFP_2815	CEC_2815	n/a	05/2006
26	Greece	Messara	Central Crete	SFP_2816	CEC_2816	n/a	05/2006
27	Greece	Messara	Central Crete	SFP_2817	CEC_2817	n/a	05/2006
28	Greece	Messara	Central Crete	SFP_2818	CEC_2818	n/a	05/2006
29	Greece	Messara	Central Crete	SFP_2819	CEC_2819	n/a	05/2006
30	Greece	Messara	Central Crete	SFP_2820	CEC_2820	n/a	05/2006

^aExtra prefixes were added to facilitate visual grouping regarding isolate geographic origin.

^bData from Lebeda & Urban (2007) and Lebeda & Widrechner (2003); n/a, not available.

Spores were harvested in SDW from at least three leaves fully covered by sporulation. One millilitre of spore suspension was transferred to Eppendorf tubes and stored at -80°C for DNA extraction.

DNA extraction

Total DNA was extracted from frozen spore suspensions by a modified CTAB method (Riethmüller *et al.*, 2002). To remove potential PCR inhibitors from spores, the DNA extraction protocol occasionally included a re-purification step employing the Nucleo-Spin Tissue XS (Macherey-Nagel GmbH & Co.).

Fluorescent dye-labelled amplified fragment length polymorphism (fAFLP) analysis

Digestion and ligation

AFLP analysis was performed according to Vos *et al.* (1995) as modified by Vakalounakis *et al.* (2005), employing 150 ng genomic DNA for the initial digestion. The

ligation of adaptors was performed using $50\ \mu\text{M}$ *Mse*I and $5\ \mu\text{M}$ *Eco*RI of each adaptor.

Pre-selective and selective amplifications

Pre-selective and selective amplifications were performed as described by Vakalounakis *et al.* (2005) with the following modifications. Selective amplification was carried out with four primer combinations, E-AG/M-CC, E-AA/M-CC, E-AC/M-CA and E-AA/M-CA obtained from the Foundation for Research and Technology–Hellas, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Microchemistry Laboratory (FORTH-IMBB), Greece. An initial denaturation of $94^{\circ}\text{C}/30\ \text{s}$ was followed by one cycle of $94^{\circ}\text{C}/30\ \text{s}$ (denaturation), $65^{\circ}\text{C}/30\ \text{s}$ (annealing) and $72^{\circ}\text{C}/1\ \text{min}$ (extension). In the next 12 cycles the annealing temperature was lowered from 65°C to 56°C . The last 23 cycles consisted of $94^{\circ}\text{C}/30\ \text{s}$ (denaturation), $56^{\circ}\text{C}/30\ \text{s}$ (annealing), $72^{\circ}\text{C}/5\ \text{min}$ final extension. Amplicons were resolved on a LI-COR Biosciences automated electrophoresis sequencer IR2 System as a service at the sequencing facility of FORTH-IMBB using standard conditions. Molecular

sizing standards (50–700 bp; LICOR Biosciences, cat. no. 4000-45) were employed.

To assess reproducibility of AFLP profiles, separate ligations, PCR amplifications and band scoring were performed on the same extracted DNA in duplicate for the whole set of isolates using two randomly selected primer combinations. Error rates were computed separately for each of the two primer combinations.

AFLP analysis

Individual AFLP fingerprints were scored by SAGA (MX module) independently by two individuals for presence or absence (1–0) of all loci, and the data were reconciled. Fragment sizes were determined according to their migration distance relative to the 50- to 700-bp size standards. Only polymorphic loci were included in the data matrix for subsequent phenetic and genetic analyses. Measures of genetic relatedness (pairwise genetic similarities) were produced with the NTSYS (version 2.2n for PC) software employing the Jaccard similarity coefficient (Jaccard, 1908). The output of this procedure is shown as a sequential agglomerative hierarchical nested cluster analysis phenogram (SAHN; Sneath & Sokal, 1973) employing the unpaired group mean arithmetic average clustering (UPGMA) method (Fig. 2). A bootstrap analysis of 1000 permutations was used to test reliability of branches in the phenogram using WINBOOT software [1996, International Rice Research Institute (IRRI)]. Significant bootstrap values (> 60%) were added at the corresponding nodes (Fig. 2). In a separate approach, AFLP data were subjected to analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) to test for the significance of molecular variability between and within pre-assigned groups of isolates (populations) using the GENALEX 6 software (Peakall & Smouse, 2006). AMOVA converts a phenotypic distance matrix into an equivalent analysis of variance, and allows estimation of variance components for AFLP haplotypes by partitioning variance among and within populations (Collado-Romero *et al.*, 2006). Subsequently, variance components can be used to calculate the Φ_{ST} statistic (Φ_{ST}) that summarizes the degree of differentiation between populations and is analogous to Wright's *F* statistic (Excoffier *et al.*, 1992). AMOVA was performed to test significance of population structure both among and within geographic origin of isolates (Czech and Western Europe versus Greek). Comparisons were conducted by computing Φ_{ST} between pairs of populations. The level of significance for Φ_{ST} values was computed by 1000 permutations and established at a $P < 0.05$ (Tables 3 and 4).

ITS-rDNA PCR amplification and sequencing

Thirteen Greek and nine Czech isolates were subjected to ITS-rDNA sequence analysis. For the amplification of the complete ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA, the primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATA TGC-3') were used (White *et al.*, 1990). PCR was conducted in a final

reaction volume of 50 μ L employing a PT-200 thermal cycler (MJ Research). Each reaction tube contained 1.5 μ L template DNA (100 ng μ L⁻¹) and 5 μ L reaction buffer (50 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂, pH 8.0), 2.5 μ L of 2.5 mM dNTP, 0.4 μ L of both forward and reverse (50 pmol μ L⁻¹) primers, 0.5 μ L *Taq* polymerase (5 U μ L⁻¹), and 40.1 μ L double-distilled H₂O. PCR was performed by initially denaturing template DNA at 94°C/5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C/30 s, annealing at 50°C/45 s, and extension at 72°C/1.5 min, with the final extension set at 72°C/10 min. The PCR products, of the correct size for the ITS region (820 bp), were purified, cloned and transformed to *Escherichia coli* DH10B as described previously (Choi *et al.*, 2005). Purified plasmids were sequenced on an IR2 System automated polyacrylamide gel sequencer (LICOR Bio-sciences).

ITS-rDNA sequence alignment and data analysis

ITS sequences were edited with the DNAMAN computer package (Lynnon Co.) to obtain the complete ITS1-5.8S-ITS2 regions. For comparison purposes, all previously deposited ITS1 and ITS2 rDNA sequences of *P. cubensis* and *P. humuli* from the NCBI database were also included for sequence alignment and tree construction. Phylogenetic relations were inferred using the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987) offered in MEGA4 software (Tamura *et al.*, 2007). The optimal tree with the sum of branch lengths of 0.07184853 was constructed. The percentage of replicate trees in which the associated isolates clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) was calculated (Felsenstein, 1985). The phylogenetic tree was linearized assuming equal evolutionary rates in all lineages (Takezaki *et al.*, 2004). The tree was drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the maximum composite likelihood method (Tamura *et al.*, 2004) and were expressed as the number of base substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (complete deletion option). Comparisons were conducted initially for the whole ITS1-5.8S-ITS2 region and subsequently for each ITS region independently. Further analyses included only the ITS2 region, as the other two regions showed no variability.

Results

AFLP polymorphism

A total of 131 unambiguous and easily discernible AFLP fragments ranging in size from 50 to 700 bp were obtained from the set of 30 *P. cubensis* isolates analysed in this study (Fig. 1). Total number of bands and polymorphism for each primer combination are shown in Table 2. Percentage polymorphism ranged from 24 to 74%. Primer combination E-AC/M-CA yielded an error rate of

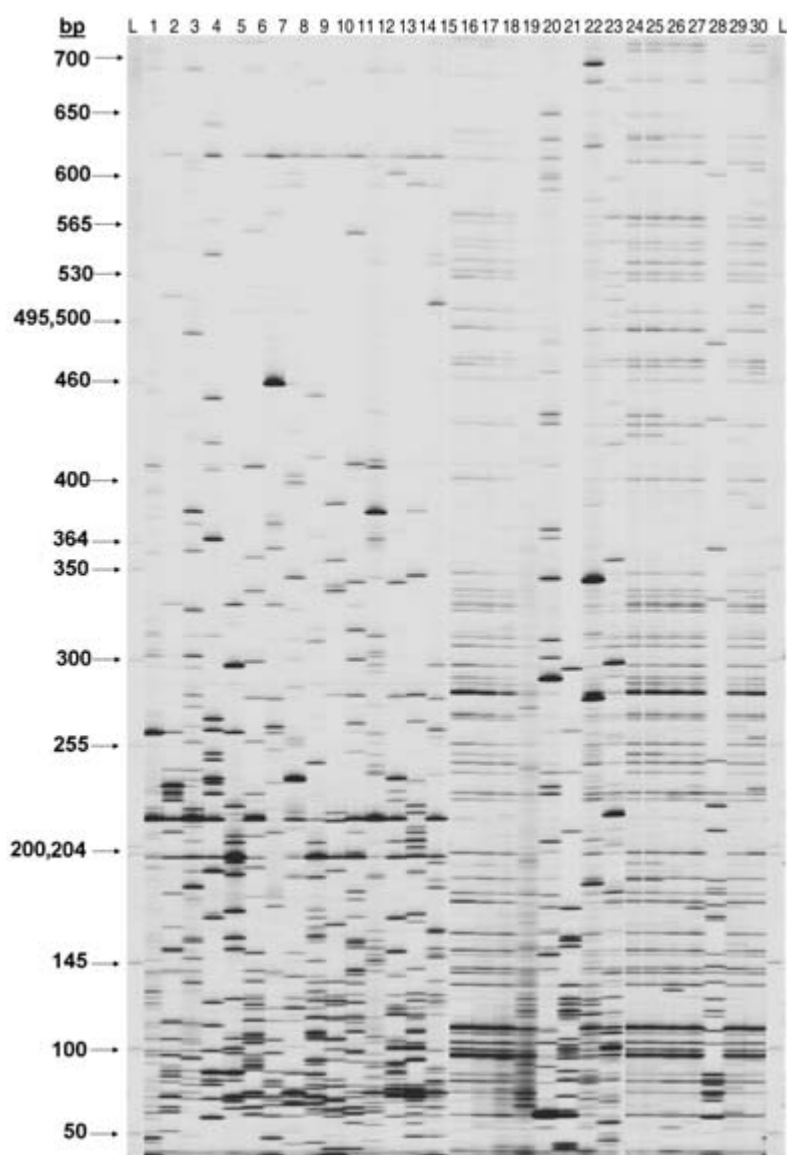


Figure 1 Representative polyacrylamide gel with AFLP fingerprints of 30 isolates of *Pseudoperonospora cubensis* using primer combination E-AA/M-CA. Isolate numbering as in Table 1. L, size ladder (50–700 bp). Lanes 1–15, Czech Republic and Western Europe (Netherlands and France) isolates; 16–30 Greek isolates.

Table 2 AFLP primer combinations employed to analyse *Pseudoperonospora cubensis* isolates and polymorphic fragments (bands) produced

Primer combination	Number of bands		Polymorphism (%)
	Total	Polymorphic	
E-AG / M-CC	50	37	74
E-AA / M-CC	70	29	41
E-AA / M-CA	103	49	47
E-AC / M-CA	65	16	24
Total	288	131	45.4

2.3% in a total of 480 bands counted across all loci and isolates after removing non-polymorphic or poor-quality bands. For primer combination E-AG/M-CC equivalent numbers were 1.4% and 1110. Both error rates compared

very favourably with similar published rates (Groenewald *et al.*, 2008).

Based on AFLP data a phenogram was constructed using Jaccard's similarity coefficient and the UPGMA clustering algorithm. Arbitrarily, two main clades were distinguished (Fig. 2), one containing all isolates from the Czech Republic and Western Europe and the other including all isolates from Crete (Greece). This analysis clearly demonstrated that the Mediterranean pathogen population was very different from those occurring in Central and Western Europe. Within both metapopulations there was some variation which could be attributed to geographic origin (locality, region), pathogenicity (occurrence of different pathotypes and races) or other features (e.g. fungicide resistance).

Initially, AMOVA analysis was conducted for the overall experiment, treating each region as an independent

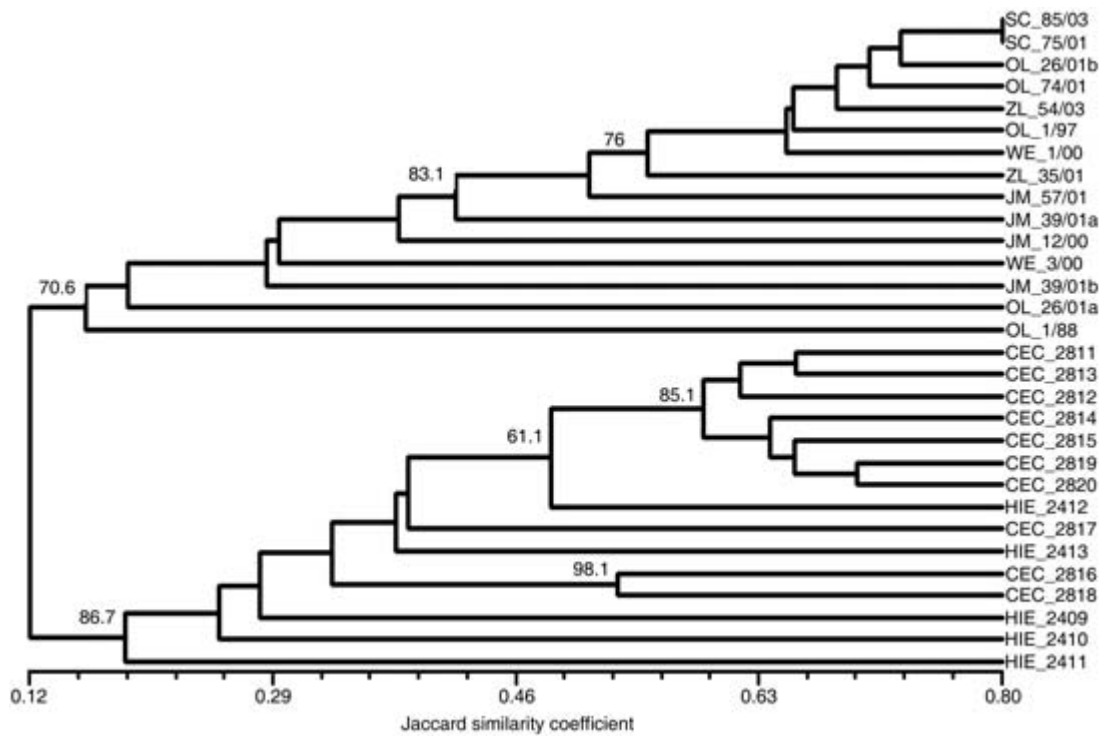


Figure 2 UPGMA phenogram of 30 *Pseudoperonospora cubensis* isolates based on 131 AFLP loci. Isolate codes, indicating geographical origin, are explained in Table 1 (WE, Western Europe; JM, OL, ZL and SC, Czech Republic; HIE, Hierapetra, Crete; CEC, Central Crete). Numbers at nodes indicate significant (> 60%) bootstrap values.

Table 3 Analysis of molecular variance (AMOVA) for *Pseudoperonospora cubensis* isolates according to region. (a) Variance partitioning and test (Φ_{ST}) significance. (b) Sample size and sum of squares within each region

(a)						
Source of variance	d.f. ^a	Variance components	Percentage of total variance	Φ statistic (Φ_{ST})	Probability ^b (P)	
Among populations	6	6.539	23	0.235	0.001	
Within populations	23	21.332	77			

(b)							
	Population (region)						
	Western Europe (Netherlands and France)	Czech Republic				Greece	
		Jihomoravský	Olomoucký ^e	Stredočeský	Zlínský	Central Crete	Hierapetra, Crete
Sample size	2	4	5	2	2	10	5
Sum of squares within population	19.000	35.250	77.600	9.500	24.000	243.279	82.000

^aDegrees of freedom.

^bProbability of a larger value obtained by chance, determined by 1000 permutations of the data.

statistical population (Table 3). The overall experimental data were statistically significant (Table 3a, $\Phi_{ST} = 0.235$). Region of origin, sample size (number of isolates) and corresponding variance components are shown in Table 3b. Subsequently, follow-up analyses were carried out to determine the source of variance significance. For this purpose, two separate AMOVA analyses were conducted, first involving, only the Czech and Western European isolates and secondly, only the Greek populations. No population

was found significantly different from any other within either country (data not shown). Consequently, isolates from all regions from each country were pulled together and treated as two new aggregate populations (i.e. each country forming one population, with Czech isolates also encompassing Western European ones). Significant differences were found between these two geographically distant and separated populations (Table 4a, $\Phi_{ST} = 0.426$). Sample size and corresponding variance components for

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) for *Pseudoperonospora cubensis* isolates according to country of origin (Czech Republic and Western Europe vs. Greece). (a) Variance partitioning and test (Φ_{ST}) significance. (b) Sample size and sum of squares within each country

(a)					
Source of variance	d.f. ^a	Variance components	Percentage of total variance	Φ statistic (Φ_{ST})	Probability ^b (<i>P</i>)
Among populations	1	14.461	43	0.426	0.001
Within populations	28	19.448	57		

(b)		
	Population (country of origin)	
	Czech Republic and Western Europe	Greece
Sample size	15	15
Sum of squares within populations	246.000	298.533

^aDegrees of freedom.^bProbability of a larger value obtained by chance, determined by 1000 permutations of the data.

each country are shown in Table 4b. Results in Table 4 corroborate the AFLP phenogram, since isolates were grouped in two clades: one for each country.

ITS rDNA comparison and cluster analysis

The ITS1-5.8S-ITS2 region was found to be 802 bp long. Sequences from the ITS1 and 5.8S regions were excluded from subsequent analysis since they showed no variability and only the tree corresponding to the ITS2 region is shown. A total of 421 positions, corresponding to the ITS2 region, were included in the final dataset for cluster analysis. All ITS2 rDNA sequences from the Greek and Czech isolates of *P. cubensis* analysed here (total 23) formed a common European subcluster together with *P. cubensis* HV_222, collected from Austria (NCBI GenBank accession no. AY198306) (Fig. 3). A second differentiated subcluster included seven *P. cubensis* and two *P. humuli* isolates, all of Asian origin (Fig. 3). This latter subcluster exhibited enhanced internal variability when compared with the European subcluster. The two subclusters formed a larger *P. cubensis* cluster which was differentiated from the *P. humuli* cluster that comprised six isolates. Clusters were supported by moderate bootstrap values (61–67%). Concatenation of ITS1-5.8S-ITS2 did not support any differentiation between samples used in this study and those obtained from NCBI GenBank. It can be assumed that when comparing the entire ITS1-5.8S-ITS2 sequence, very high conservation of the ITS1 region coupled with complete conservation of the 5.8S region reduces the overall nucleotide substitution rate (substitutions per base pair), which consequently reduces the statistical power of the phylogenetic methods to distinguish genetic differentiation among populations. Molecular variance among the Greek and Czech isolates, assessed as ITS nucleotide polymorphisms, did not correlate with their geographic origin. This is in contrast to what was found with AFLP analysis. These data show that AFLP polymorphisms are more suitable for population genetic studies, while ITS nucleotide polymorphism

analysis seems more powerful for phylogenetic studies. All ITS rDNA sequences produced in the framework of the present study were deposited in NCBI GenBank under accession numbers EU876584–EU876604.

Discussion

Host specificity is an important aspect of oomycete variation and population biology, since host-restricted species are highly dependent on the abundance of their hosts (Drenth & Goodwin, 1999). This phenomenon is also known for cucurbit downy mildew (*P. cubensis*), which is one of the most economically important oomycete pathogens (Lebeda & Widrechner, 2003). The pathogen is widely distributed throughout the world (Palti & Cohen, 1980) and can inflict major production losses in both open-field and protected culture (Lebeda & Widrechner, 2004). Yield losses in some crops and countries (e.g. cucumber in the former Czechoslovakia) can reach over 80% (Lebeda & Schwinn, 1994).

In US population studies with *P. cubensis* it was hypothesized that transport of the pathogen can occur over long distances via atmospheric wind currents (Holmes *et al.*, 2004). This possibility has also been suggested for Europe, e.g. transport of conidiosporangia from Central Europe to Scandinavia (Lebeda & Schwinn, 1994). However, there are currently no published data on inter- and intra-population variability of *P. cubensis*, or direct experimental evidence for long-distance transport and pathogen migration. Detailed population studies are not available for *P. cubensis*, in contrast to other oomycetes. Nevertheless, preliminary results on variation in pathogenicity and fungicide resistance of Czech isolates of *P. cubensis* showed that the pathogen population is very diverse and dynamic in time and space (Lebeda & Urban, 2007). Furthermore, comparison of pathogenicity of individual *P. cubensis* isolates originating from various European countries showed differences among them (Lebeda & Gadasová, 2002). However, the genetic and molecular background of this variation is not known.

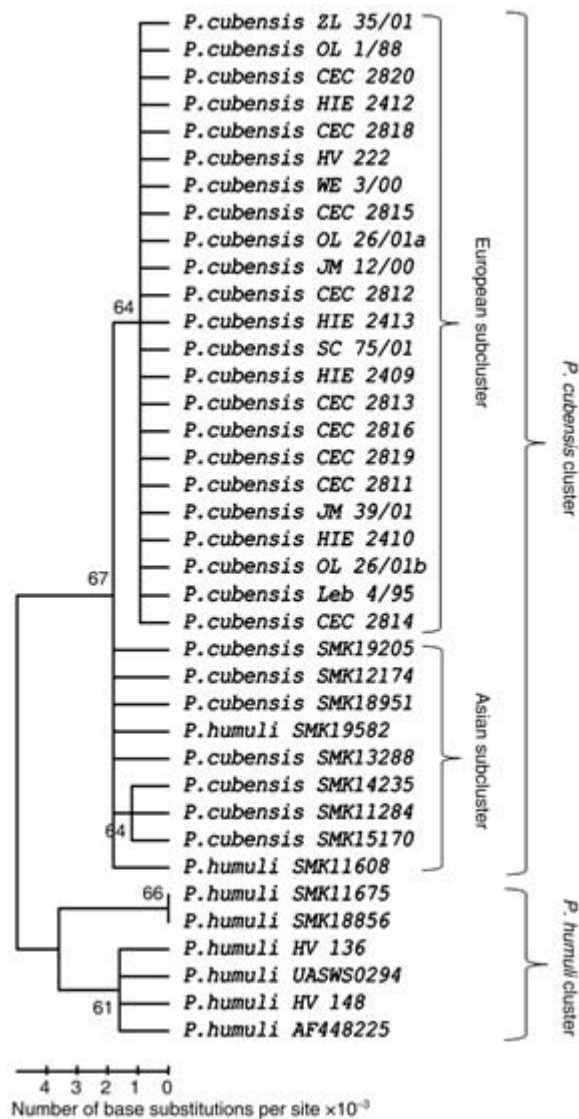


Figure 3 Neighbour-joining tree of 38 ITS2 rDNA regions (linearized) of *Pseudoperonospora cubensis* isolates including Greek, Czech and other isolates of *P. cubensis* and *Pseudoperonospora humuli* from NCBI GENE BANK. Bootstrap support (based on 1000 iterations) is indicated above each node, with only values > 60% being shown.

The main purpose of this study was to assess the comparative efficiency of two distinct molecular techniques (AFLP and ITS rDNA) in investigating the degree of inter- and intra-population polymorphism in *P. cubensis* isolates originating from two geographically distant areas: the Mediterranean island of Crete (Greece) and countries of Central (Czech Republic) and Western (the Netherlands and France) Europe. The data obtained (AFLP analysis) showed that the two populations (Greece/Crete and Central Europe) are genetically isolated, although the reasons for this isolation require more extensive investigation. In addition, it became evident that the clustering of Greek isolates follows more or less their geographical

distribution within Crete, in contrast to the Czech and Western European pathogen population, in which geographic correlations could not be established. For Cretan regions alone there seemed to be some grouping between HIE (Hierapetra) and CEC (Central Crete) samples. However, given the small sample size employed in the present study, no statistically valid conclusions can be drawn regarding the efficacy of the AFLP method to differentiate isolates collected on smaller geographic scales (i.e. within a single region and/or country). Similar conclusions were reached about the geographic variation of Greek *Plasmopara viticola* populations (Rumbou & Gessler, 2006). Populations from mainland regions were found to have high genotypic diversity and limited clonality; however, populations under Mediterranean-island conditions showed mostly limited variation. Populations from different islands were differentiated from each other, whereas genetic divergence was also found among sub-populations of the same plot (Rumbou & Gessler, 2006).

There are about 60 cucurbit species known to be hosts of *P. cubensis* (Lebeda *et al.*, 2006). However, only some host genera and species (e.g. *Cucumis*, *Cucurbita* and *Citrullus*) are frequently and seriously attacked by the pathogen. In Central Europe and the Czech Republic, *P. cubensis* attacks mainly cucumbers (*Cucumis sativus*) and sometimes muskmelon (*C. melo*), but not *Cucurbita* and *Citrullus* spp. (Lebeda & Urban, 2007). A similar situation also occurs in Crete, where *P. cubensis* is very common and one of the most damaging pathogens in greenhouse cucumber crops (Fanourakis *et al.*, 2001). Molecular polymorphism could be influenced by the original host plant from which *P. cubensis* isolates were collected. Studies on host specificity and virulence factor frequency of the oomycete *Bremia lactucae* (Lebeda *et al.*, 2008) showed that common virulence factors in pathogen populations occurring on *Lactuca serriola* (prickly lettuce) matched with high prevalence some of the race-specific resistance genes/factors (*Dm* genes or R-factors) originating also from *L. serriola*, but not from *L. sativa* (cultivated lettuce). This demonstrates the close adaptation of *B. lactucae* virulence to its host plant's (*L. serriola*) genetic background.

In the present study, all *P. cubensis* isolates originated from the single host species cucumber. Therefore, a potential source of genetic polymorphism of the pathogen cannot be accounted for, since all isolates were recovered from the same host. At the lower taxonomic level, polymorphisms could be influenced by adaptation to specific host genotypes (cultivar, hybrid, etc). This hypothesis could not be tested either, since no pertinent information was registered during pathogen collection. On the other hand, for the Czech and Western European isolates there is detailed information about pathotypes (Lebeda & Gadasová, 2002; Lebeda & Widrlechner, 2003) and, in many cases, fungicide resistance (Lebeda & Urban, 2007; Urban & Lebeda, 2007). Regarding the latter, no substantial differences can be seen among the isolates since most are resistant or tolerant to metalaxyl (Ridomil Plus 48 WP) and sensitive to propamocarb (Previcur 607 SL) and

fosetyl-Al (Aliette 80 WP). In contrast, there is a large variation in pathogenicity. Isolates could be divided into two main pathotype groups differing primarily in their pathogenicity on *Cucumis* genotypes (*C. sativus* and *C. melo*) (values in the first triplet), and secondarily to *Cucurbita* spp. (Values in the second triplet) and other genera of Cucurbitaceae (third triplet) (Lebeda & Widrlechner, 2003), where values in each triplet range from 1 (low pathogenicity) to 15 (high pathogenicity). The first group (low pathogenicity on *Cucumis*; low values in the first triplet) was represented by only three isolates (PC 1/88, PC 3/00 and PC 26/01a; Table 1), which, interestingly, grouped together according to AFLP fingerprints (Fig. 2). There was only one possible exception to this grouping (isolate PC 39/01b, derived as a subculture from a previously isolated strain, PC 39/01). The pathotype of this isolate is not known with certainty. Isolates of the second group (medium pathogenicity on *Cucumis* spp. exhibited by two isolates, PC 1/00 and PC 12/00 and high pathogenicity on *Cucumis* spp., expressed by medium and high values, respectively, in the first triplet) were grouped together in a large cluster (Fig. 2). In this cluster some relationships between the similarities in pathogenicity and AFLP loci polymorphism could be recognized. For example, two isolates (SC_85/03 and SC_75/01) with very similar pathotypes [15/14/11 and 15/14/14, respectively; Lebeda & Widrlechner (2003)] were located in the uppermost cluster. Pathotypes are primarily distinguished by pathogenicity assessed against a series of different plant host species underlining a multi-locus control of this composite trait. Consequently, and in addition to small sample sizes, this could be another reason why AFLP fingerprinting of *P. cubensis* did not produce clear grouping at the pathotype level. Available cucumber germplasm accessions and recent commercial cucumber cultivars do not possess effective resistance to *P. cubensis* (reviewed by Lebeda & Widrlechner, 2003). In addition, race-specific interactions between *C. sativus* and *P. cubensis* are unknown (Lebeda *et al.*, 2006), but clear race-specific interaction patterns were identified between different *P. cubensis* isolates and *Cucumis melo* (Lebeda *et al.*, 2006, 2007a) and *Cucurbita* spp. (*C. pepo*, *C. maxima*) (Lebeda *et al.*, 2006). The polymorphism and grouping of isolates with different pathotypes demonstrated here supports the supposition that different races of *P. cubensis* could also be differentiated. Furthermore, progress in development of differentiation methods for *P. cubensis* races (Lebeda *et al.*, 2006, 2007a) will allow for detailed interpretation of molecular polymorphism of *P. cubensis* on the basis of host-pathogen genetics.

ITS2 sequence analysis differentiated European from Asian isolates of *P. cubensis*, indicating that, at this large geographic scale, ITS2 could be sufficient to indicate genetic differentiation of populations. ITS2 sequence divergence increases between the neighbouring species *P. cubensis* and *P. humuli*. In addition, ITS2 sequence differentiated all *P. cubensis* and *P. humuli* isolates from other related species (data not shown), indicating that this approach could be applied for species differentiation. The

P. cubensis ITS1-5.8S-ITS2 region was found to be 802 bp long, which is in full agreement with the findings of Choi *et al.* (2005) for both *P. cubensis* and *P. humuli*. Nevertheless, Choi *et al.* (2005), employing the entire ITS1-5.8S-ITS2 concatemer for their taxonomic analysis, did not detect any significant species-specific differences and hence proposed to reduce *P. humuli* to the status of a taxonomic synonym of *P. cubensis*. On the other hand, for the reasons explained earlier, employing the ITS2 sequence alone allowed for the separation of the two species (i.e. *P. cubensis* vs. *P. humuli*). Evidently, for some as-yet-unknown reason (e.g. functional, structural or other constraints), mutations accumulate in the ITS2 region but not in ITS1.

This study represents the first attempt to evaluate the molecular polymorphisms of *P. cubensis* as a starting point for detailed population genetic analyses. The present results need to be validated against a broader sampling scheme and detailed phytopathological attributes (e.g. variation of pathotype, race and fungicide resistance) of *P. cubensis* isolates. This will provide the basis for investigating the sources and shifts in genetic diversity within and between *P. cubensis* populations.

Acknowledgements

The authors thank Dr Peter Spencer-Phillips (UWE, Bristol, UK) and Dr E. Ladoudakis (University of Crete, Heraklion, Greece) for critical reading and comments on the first draft of the manuscript. This research was supported by grants: (i) MSM 6198959215 (Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic) and (ii) National Program of Genepool Conservation of Microorganisms and Small Animals of Economic Importance (Ministry of Agriculture of the Czech Republic) to AL; (iii) SP-DEL 4 PATHOSYST from the Greek Secretariat for Research and Technology to NP; and (iv) 05PAV061 Development of Industrial Research & Technology from the Greek Secretariat for Research and Technology to AD and NP. We thank Professor N. Fanourakis for providing some unpublished information about *P. cubensis* in Crete and Mr D. Yiakoumakis, MSc, for conducting preliminary AFLP experiments.

References

- Choi YJ, Hong SB, Shin HD, 2003. Diversity of the *Hyaloperonospora parasitica* complex from core brassicaceous hosts based on ITS rDNA sequences. *Mycological Research* 107, 1314–22.
- Choi YJ, Hong SB, Shin HD, 2005. A re-consideration of *Pseudoperonospora cubensis* and *P. humuli* based on molecular and morphological data. *Mycological Research* 109, 841–8.
- Collado-Romero M, Mercado-Blanco J, Olivares-Garcia C, Valverde-Corredor A, Jimenez-Diaz RM, 2006. Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction markers. *Phytopathology* 96, 485–95.

- Cooke DEL, Lees AK, 2004. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathology* 53, 692–704.
- Cooke DEL, Williams NA, Williamson B, Duncan JM, 2002. An ITS-based phylogenetic analysis of the relationships between *Peronospora* and *Phytophthora*. In: Spencer-Phillips PTN, Gisi U, Lebeda A, eds. *Advances in Downy Mildew Research*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 161–5.
- Drenth A, Goodwin SB, 1999. Populations structure of oomycetes. In: Worrall JJ, ed. *Structure and Dynamics of Fungal Populations*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 195–224.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM, 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–91.
- Fanourakis NE, Iliaki I, Fanouraki M, Petsas S, 2001. New sources of resistance against the populations of downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) of cucumber in Greece. In: *2nd International Symposium on Cucurbits, 28th September–1st October, 2001, Epochal, Tsukuba, Japan*. 21 (abstract).
- Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 738–91.
- Göker M, Voglmayr H, Riethmüller A, Oberwinkler F, 2007. How do obligate parasites evolve? A multi-gene phylogenetic analysis of downy mildews. *Fungal Genetics and Biology* 44, 105–22.
- Groenewald M, Linde CC, Groenewald JZ, Crous PW, 2008. Indirect evidence for sexual reproduction in *Cercospora beticola* populations from sugar beet. *Plant Pathology* 57, 25–32.
- Holmes GJ, Main CE, Keverer ZT III, 2004. Cucurbit downy mildew: a unique pathosystem for disease forecasting. In: Spencer-Phillips PTN, Jeger M, eds. *Advances in Downy Mildew Research*, Vol. 2. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 69–80.
- Jaccard P, 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 44, 223–70.
- Lebeda A, Gadasová V, 2002. Pathogenic variation of *Pseudoperonospora cubensis* in the Czech Republic and some European countries. *Acta Horticulturae* 588, 137–41.
- Lebeda A, Schwinn FJ, 1994. The downy mildews – an overview of recent research progress. *Journal of Plant Diseases and Protection* 101, 225–54.
- Lebeda A, Urban J, 2007. Temporal changes in pathogenicity and fungicide resistance in *Pseudoperonospora cubensis* populations. *Acta Horticulturae* 731, 327–36.
- Lebeda A, Widrlechner MP, 2003. A set of Cucurbitaceae taxa for differentiation of *Pseudoperonospora cubensis* pathotypes. *Journal of Plant Diseases and Protection* 110, 337–49.
- Lebeda A, Widrlechner MP, 2004. Response of wild and weedy *Cucurbita* L. to pathotypes of *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & Curt.) Rostov. (Cucurbit downy mildew). In: Spencer-Phillips PTN, Jeger M, eds. *Advances in Downy Mildew Research*, Vol. 2. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 203–10.
- Lebeda A, Widrlechner MP, Urban J, 2006. Individual and population aspects of interactions between cucurbits and *Pseudoperonospora cubensis*: pathotypes and races. In: Holmes GJ, ed. *Proceedings of Cucurbitaceae 2006*. Raleigh, NC, USA: Universal Press, 453–67.
- Lebeda A, Štěpánková J, Kršková M, Widrlechner MP, 2007a. Resistance in *Cucumis melo* germplasm to *Pseudoperonospora cubensis* pathotypes. In: Lebeda A, Spencer-Phillips PTN, eds. *Advances in Downy Mildew Research*, Vol. 3. Palacký University in Olomouc and JOLA, v.o.s., Kostelec na Hané, Czech Republic, 157–67.
- Lebeda A, Widrlechner MP, Staub J, Ezura H, Zalapa J, Krštková E, 2007b. Cucurbits (Cucurbitaceae; *Cucumis* spp., *Cucurbita* spp., *Citrullus* spp.). In: Singh R, ed. *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement Series, Volume 3 – Vegetable Crops*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 271–376.
- Lebeda A, Petrželová I, Maryška Z, 2008. Structure and variation in the wild-plant pathosystem: *Lactuca serriola*–*Bremia lactucae*. *European Journal of Plant Pathology* 122, 127–46.
- May KJ, Drenth A, Irwin JAG, 2003. Interspecific hybrids between the homothallic *Phytophthora sojae* and *Phytophthora vignae*. *Australasian Plant Pathology* 32, 353–9.
- Palti J, Cohen Y, 1980. Downy mildew of cucurbits (*Pseudoperonospora cubensis*): the fungus and its hosts, distribution, epidemiology and control. *Phytoparasitica* 8, 109–47.
- Peakall R, Smouse P, 2006. GENALEX6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288–95.
- Perumal R, Isakeit T, Menz M, Katile S, No E-G, Magill CW, 2006. Characterization and genetic distance analysis of isolates of *Peronosclerospora sorghi* using AFLP fingerprinting. *Mycological Research* 110, 471–8.
- Riethmüller A, Voglmayr H, Göker M, Weiß M, Oberwinkler F, 2002. Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 94, 834–49.
- Rumbou A, Gessler C, 2006. Particular structure of *Plasmopara viticola* populations evolved under Greek island conditions. *Phytopathology* 96, 501–9.
- Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406–25.
- Sneath PHA, Sokal RR, 1973. *Numerical Taxonomy*. San Francisco, CA, USA: Freeman.
- Takezaki N, Figueroa F, Zaleska-Rutczynska Z, Takahata N, Klein J, 2004. The phylogenetic relationship of tetrapod, coelacanth, and lungfish revealed by the sequences of forty-four nuclear genes. *Molecular Biology and Evolution* 21, 1512–24.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596–9.
- Tamura K, Nei M, Kumar S, 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 101, 11030–5.
- Urban J, Lebeda A, 2006. Fungicide resistance in cucurbit downy mildew – methodological, biological and population aspects. *Annals of Applied Biology* 149, 63–75.

- Urban J, Lebeda A, 2007. Variation of fungicide resistance in Czech populations of *Pseudoperonospora cubensis*. *Journal of Phytopathology* **155**, 143–51.
- Vakalounakis DJ, Doulis AG, Klironomou E, 2005. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* attacking melon under natural conditions in Crete. *Plant Pathology* **54**, 339–46.
- Voglmayr H, 2008. Progress and challenges in systematics of downy mildews and white blister rusts: new insights from genes and morphology. *European Journal of Plant Pathology* **122**, 3–18.
- Vos P, Hoger R, Bleeker M *et al.*, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407–14.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand H, Sninsky JS, White TJ, eds. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. San Diego, CA, USA: Academic Press, 315–22.



<http://mc.manuscriptcentral.com/fems>

**Pseudomonas syringae pv phaseolicola 1448A:
Bioinformatics analysis of a second Type III Secretion
System and evolutionary implications.**

Journal:	<i>FEMS Microbiology Letters</i>
Manuscript ID:	FEMSLE-09-06-0492
Manuscript Type:	Research Letter
Date Submitted by the Author:	10-Jun-2009
Complete List of Authors:	Gazi, Anastasia; IMBB/FORTH, Protein Structure Fadouloglou, Vasiliki; IMBB/FORTH, Protein Structure Charova, Spyridoula; University of Crete, Biology Mathioudakis, Nikolaos; University of Crete, Biology Sarris, Panayiotis; IMBB/FORTH, Plant Biotechnology Panopoulos, Nickolas; University of Crete, Biology Kokkinidis, Michael; IMBB/FORTH, Protein Structure; University of Crete, Biology
Keywords:	Type III Secretion, <i>Pseudomonas syringae</i> , pathogenicity islands



1
2
3 1 ***Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* 1448A: Bioinformatics**
4
5
6 2 **analysis of a second Type III Secretion System and evolutionary**
7
8
9 3 **implications.**
10
11
12 4

13
14 5 Anastasia D. Gazi^{1,2}, Vasiliki E. Fadouloglou¹, Spyridoula N. Charova¹, Nikolaos
15
16 6 Mathioudakis¹, Panayiotis Sarris¹, Nickolas J. Panopoulos^{1,2} & Michael
17
18 7 Kokkinidis^{1,2,*}.
19
20
21 8

22
23 9 ¹ Department of Biology, University of Crete, Vasilika Vouton, GR 71409, P.O. Box 2208, Heraklion,
24
25 10 Crete, Greece

26
27 11 ² Institute of Molecular Biology & Biotechnology, Foundation of Research & Technology, Vasilika
28
29 12 Vouton, GR 71110, Heraklion, Crete, Greece
30
31 13

32
33 14
34
35 15 **Correspondence:** Michael Kokkinidis, Institute of Molecular Biology & Biotechnology, Foundation
36
37 16 of Research & Technology, Vasilika Vouton, GR 71110, Heraklion, Crete, Greece. Tel:
38
39 17 +00302810394351; e-mail: kokkinid@imbb.forth.gr
40
41 18

42
43 19
44
45 20 **Keywords:** Type III Secretion, *Pseudomonas syringae*, pathogenicity islands
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Although the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pathovars has been studied extensively, unexpected findings are being uncovered through genome sequencing. The *P. syringae* pv phaseolicola (*Pph*) strain 1448A genome codes for a type III secretion system (T3SS) in addition to the well characterized *Hrc1* (*hrc/hrp*) system (Joardar *et al.*, 2005). *In silico* analysis of this second T3SS gene cluster revealed similarities to the T3S injectisome of the *Rhizobium* family, an indication of a possible horizontal gene transfer event. Unlike other members of *P. syringae*, *P. syringae* pv phaseolicola, the pathogen of common bean, occasionally exhibits systemic spread in its host. A comparative synteny and homology of the T3SS gene clusters of two *Rhizobium etli* strains, predominant nodulators of the common bean and hypothetical donors of the second T3SS to *P. syringae* pv phaseolicola strain 1448A, was carried out. Surprisingly, the putative second T3SS seems to possess some intermediate features between the T3SS of the *R. etli* and *Bradyrhizobium japonicum* T3SS, suggesting the possibility of recent acquisition of an old but still unknown Rhizobial T3SS.

Introduction

Gram negative bacteria deploy various types of protein secretion systems for bypassing their two membrane barriers and exporting selected sets of proteins to the cell surface or to the extracellular space (Economou *et al.*, 2006). Type III (T3SS) and type IV secretion systems (T4SS) are directly related to pathogenicity and constitute essential mediators of the interactions between gram-negative bacteria and eukaryotes (Cascales & Christie, 2003; Gazi *et al.*, 2009; Tampakaki *et al.*, 2004; Troisfontaines & Cornelis, 2005). These two pathways possess a dual role; they contribute significantly to protein secretion at initial stages while efficiently translocating bacterial proteins or DNA to the host cell cytoplasm when are fully-developed.

Seven main families of T3S injectisomes have evolved to serve various needs in bacterial - eukaryotic cell communication. Two T3SS families, the *Hrc1* and *Hrc2*, occur exclusively in plant pathogenic