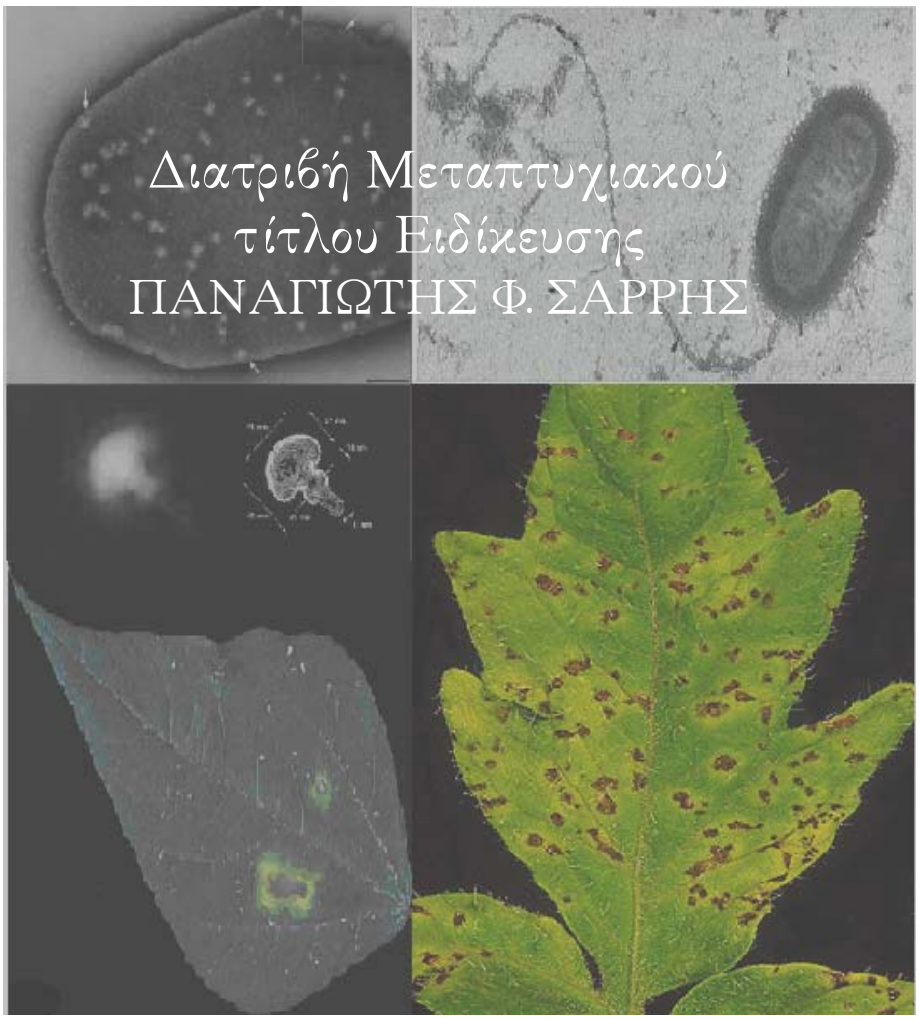
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

Απομόνωση και βιολογικός χαρακτηρισμός, γονιδίων φυλετικής εξειδίκευσης από φυτοπαθογόνα βακτήρια του γένους ***Pseudomonas***



Επιβλέπων Καθηγητής: Ν. Ι. Πανόπουλος
Δεύτερος Εξεταστής: Επίκουρος Καθηγήτρια Ε. Τσαγρή

ΗΡΑΚΛΕΙΟ
2004

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

Διατριβή Μεταπτυχιακού
τίτλου Ειδίκευσης

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ Φ. ΣΑΡΡΗΣ

Απομόνωση και βιολογικός χαρακτηρισμός, γονιδίων φυλετικής εξειδίκευσης από φυτοπαθογόνα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ
& ΑΡΧΙΚΗΣ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗΣ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ	ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ Συγχρηματοδότηση Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (Ε.Κ.Τ.)

«Το έργο συγχρηματοδοτείται κατά 75% από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) και κατά 25% από Εθνικούς Πόρους (ΥΠΕΠΘ/ΕΥΔ ΕΠΕΑΕΚ)»

Επιβλέπων Καθηγητής: Ν. Ι. Πανόπουλος
Δεύτερος Εξεταστής: Επίκουρος Καθηγήτρια Ε. Τσαγρή

Την διατριβή αυτή την αφιερώνω στην οικογένεια μου και ιδιαίτερα στην μητέρα μου η οποία δεν είναι πια κοντά μας...

«...δεν είσαι παρά εκείνο στο οποίο σε οδηγεί η βαθιά σου επιθυμία.
Η επιθυμία σου, καθορίζει ανάλογα τη θέληση σου.
Η θέληση σου, καθορίζει ανάλογα τις πράξεις σου.
Η ακολουθία των πράξεων σου υφαίνει το πεπρωμένο σου...»

Μπριχανταρανιακα Ουπανισαντ IV.4.5

Επιτροπή αξιολόγησης

Νίκος Πανόπουλος :

Ευθυμία Τσαγρή :

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγγραφή της διατριβής αυτής αποτελεί την αρχή της κατανόησης και της εισαγωγής μου στον επιστημονικό τρόπο σκέψης. Αυτό το οφείλω κατά κύριο λόγω στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Νίκο Πανόπουλο ο οποίος είχε την διάθεση να μου μεταδώσει τις γνώσεις του, μου έδειξε εμπιστοσύνη και μου προσέφερε την ευκαιρία να ενδριφίσω στον μαγευτικό κόσμο της Μοριακής Μικροβιολογίας. Κύριε Νίκο σας ευχαριστώ πολύ!

Η ολοκλήρωση της διατριβής αυτής δεν ήταν εύκολη δουλειά, θα γινόταν όμως ακόμα δυσκολότερη χωρίς την παρουσία, την συμπαράσταση και την βοήθεια κάποιων ανθρώπων.

Για το λόγω αυτό αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον φίλο και συνάδελφο Νίκο Σκανδάλη για την βοήθεια και τις γνώσεις του, που μου προσέφερε κατά το ¨στήσιμο¨ και την ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους της διατριβής μου.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στην Γαλάτεια Κοκκινάκη, που στάθηκε δίπλα μου στηρίζοντας με σε όλες τις δύσκολες στιγμές μου, δίνοντας μου πάντα την κατάλληλη συμβουλή. Είναι ο άνθρωπος που αφιέρωσε πάρα πολύ χρόνο από τον χρόνο της για να ακούει τις επιστημονικές μου (και όχι μόνο) ανησυχίες και να βρίσκεται συνεχώς δίπλα μου. Σε ευχαριστώ πραγματικά!

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον φίλο και συνάδελφο Μάνο Τραντά για τις πολλές ώρες συζητήσεων επιστημονικού περιεχομένου μέσα από τις οποίες ξεπήδησαν αρκετές ενδιαφέρουσες ιδέες αλλά και ερωτήματα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα Gram-αρνητικά παθογόνα βακτήρια χρησιμοποιούν κοινές στρατηγικές για την αποίκηση και πρόκληση ασθενειών σε φυτικούς και ζωικούς ξενιστές. Ο αποικισμός και η πρόκληση ασθένειας στους ευκαρυωτικούς ιστούς από τα βακτήρια καθορίζεται από μια ποικιλία εξωκυτταρικών παραγόντων όπως: πολυσακχαρίτες, αντχεσίνες, τοξίνες καθώς και ένζυμα αποδόμησης πολυμερών δομικών συστατικών του ξενιστή. Έχουν επίσης ταυτοποιηθεί τρία συντηρημένα μονοπάτια έκκρισης πρωτεϊνών (τύπου I, II, III, IV) τα οποία συμβάλουν στην διαδικασία της παθογένειας.

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III (TTSS), φαίνεται να αποκτήθηκε από τα Gram-αρνητικά βακτήρια, μέσω κάποιων μηχανισμών οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς. Η πλειονότητα των συστατικών του TTSS, φαίνεται να εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη έχοντας δομικές ομοιότητες με συστατικά της οργάνωσης του βακτηριακού μαστιγίου.

Μεγάλος αριθμός gram-αρνητικών παθογόνων χρησιμοποιούν το τύπου III σύστημα έκκρισης ως συντηρημένο και την ίδια στιγμή ισχυρά προσαρμοσμένη μηχανή παθογένειας. Αν και ο μηχανισμός αυτός είναι συντηρημένος, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες έχουν υψηλό ποσοστό ανομοιογένειας και οι ποικιλία των ασθενειών που προκαλούνται από τα παθογόνα αυτά σε διάφορους ξενιστές οφείλονται στον μεγάλο αριθμό διαφορετικών εκκρινόμενων πρωτεϊνών. Πολλές από τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα με παράγοντες του κυττάρου ξενιστή, σε εναλλακτική μεταγωγή σήματος και περισσότερες από αυτές δρουν μέσα στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα, στο οποίο μεταφέρονται δια μέσο του εκκριτικού συστήματος III.

Τα γονίδια τα οποία κωδικεύουν για το εκκριτικό σύστημα τύπου III συχνά ομαδοποιούνται με τους μολυσματογόνους αυτούς παράγοντες σε νησίδες παθογένειας (Pathogenicity Islands, PAIs) ή σε μεγάλα εξωχρωμοσωμικά γενετικά στοιχεία (πλασμίδια). Το σύστημα III δείχνει να είναι ο αποκλειστικός μηχανισμός μεταφοράς των πρωτεϊνών παθογένειας στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Στην περίπτωση των φυτοπαθογόνων βακτηρίων και στην μόλυνση από αυτά, ανθεκτικών ποικιλιών φυτών, οι μολυσματικές πρωτεΐνες που μεταφέρονται μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III προκαλούν αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR), η οποία χαρακτηρίζεται από μια γρήγορη (εντός 24 – 48 ωρών) επαγωγή προγραμματισμένου θανάτου των φυτικών κυττάρων που είναι σε επαφή με το παθογόνο. Οι πρωτεΐνες αυτές αναφέρονται ως **πρωτεΐνες αμολυσματικότητας**.

Στην εργασία αυτή έγινε έλεγχος της λειτουργικής εξειδίκευσης γονιδίων φυλετικής εξειδίκευσης, του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000, ως προς τον φαινότυπο αμολυσματικότητας σε γενετικά χαρακτηρισμένες ποικιλίες φασολιού, οι οποίες δείχνουν γνωστές αντιδράσεις γονιδίου-προς-γονίδιο με τα ομόλογα γονίδια *avr* του, παθογόνου στην φασολιά, βακτήριο *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola.*

Abstract

hrp genes control the ability of phytopathogenic bacteria to cause disease and to elicit hypersensitive reactions on resistant plants. Genetic and biochemical studies have demonstrated that Hrp proteins are components of type III secretion systems, regulatory proteins, proteinaceous elicitors of the hypersensitive reaction, and enzymes needed for synthesis of periplasmic glucans. Significantly, type III secretion systems are involved in the secretion of pathogenicity proteins in bacterial pathogens of animals. The transcriptional activation of a number of bacterial avirulence (*avr*) genes is controlled by Hrp regulatory proteins, and recent experimental evidence suggests that Avr proteins may be transported via Hrp secretion systems. It has also been hypothesized that pathogenicity and/or virulence gene products exit bacterial phytopathogens via Hrp pathways. Thus, *hrp* genes may be one of the most important groups of genes found in phytopathogenic bacteria in relationship to pathogenicity and host range.

According to "gene-for-gene" theory, concerning interactions between plants and their pathogens, incompatibility (no disease) requires a dominant or semidominant resistance (*R*) gene in the plant, and the corresponding avirulence (*avr*) gene/protein in the pathogen. Many plant/pathogen interactions are of this type. *R* genes are presumed to (*a*) enable plants to detect *avr*-gene-specified pathogen molecules, (*b*) initiate signal transduction to activate defenses, and (*c*) have the capacity to evolve new *R* gene specificities rapidly. Isolation of *R* genes has revealed four main classes of *R* gene sequences whose products appear to activate a similar range of defense mechanisms.

In this study, the functional specialization of racial specialization genes concerning the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000 was studied. The whole project was based on the detection of the avirulence phenotype in genetically characterized varieties of bean. The latter show known gene-to-gene reactions with the homologous avr genes from pathogenic in bean bacterium *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola*.

1. Εισαγωγή *3*
1.1 Γενικά **3**
1.2 Βακτηριακά συστήματα έκκρισης **3**
1.2.1 Εκκριτικό σύστημα τύπου I 5
1.2.2 Εκκριτικό σύστημα τύπου II και IV 6
1.2.3 Εκκριτικό σύστημα τύπου III (Type III secretion system, TTSS) 8
1.2.4 Αγωγός Hrp 11
1.3 Ο ρόλος του εκκριτικού συστήματος III στην βακτηριακή παθογένεια. **13**
1.3.1 Φυτοπαθογόνα βακτήρια 13
1.3.2 Αντίδραση υπερευαισθησίας 15
1.3.3 Γονίδια ανθεκτικότητας των φυτών 17
1.3.4 Βακτηριακές πρωτεΐνες εκκρινόμενες μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III 20
1.4 Pseudomonas syringae **24**
1.4.1 Pseudomonas syringae pv. phaseolicola 24
1.4.2 Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 24
2. Ο σκοπός της εργασίας αυτής *28*
3. Υλικά και μέθοδοι *29*
3.1 Υλικά **30**
3.1.1 Προέλευση αντιδραστηρίων και υλικών 30
3.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς-Στελέχη βακτηρίων **30**
3.1.3 Καλλιέργειες βακτηρίων 31
3.1.4 Θρεπτικά υλικά 31
3.2 Μέθοδοι **32**
3.2.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA 32
3.2.2 Πρωτόκολλο μεσαίας κλίμακας με την βοήθεια στήλης ανιοντοανταλλαγής (QIAGEN) 34
3.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA 36
3.2.4 Ενζυμικοί χειρισμοί του DNA 36
3.2.5 Απομόνωση DNA από διάλυμα μετά τον ενζυμικό χειρισμό 40
3.2.6 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων 41
3.2.7 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων 41

3.2.8 Τριγονική σύζευξη (Triparental mating) 42
3.2.9 Ταυτοποίηση ανασυνδιασμένων βακτηριακών κλώνων 43
3.2.10 Προετοιμασία βακτηριακού αιωρήματος για την μόλυνση φυτών με την μέθοδο του εμποτισμού (Infiltration) 43
3.2.11 Δημιουργία ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών σε αντιβιοτικά 44
4. Αποτελέσματα *45*
4.1 Αναφορά αποτελεσμάτων για το γονίδιο avrPstE **46**
4.1.1 Συζήτηση αποτελεσμάτων από τις μολύνσεις με το Pph race6 (+PstE) και το Pph RW60 (+PstE) 58
4.2 Αναφορά αποτελεσμάτων για το γονίδιο PstC2 ..... **60**
4.2.1 Συζήτηση αποτελεσμάτων από τις μολύνσεις με το Pph race6 (+PstC2) και το Pph RW60 (+PstC2) 66
4.3 Αναφορά αποτελεσμάτων για το γονίδιο PstF **69**
4.3.1 Ομολογία των ORF2 των γονιδίων avrPphF / PstF 70
4.3.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων από τις μολύνσεις με το Pph race6 (+PstF) και το Pph RW60 (+PstF) 80
4.4 Μολύνσεις με μετασχηματισμένα βακτήρια του είδους P. **aptata** **83**
Βιβλιογραφία *84*

1. Εισαγωγή

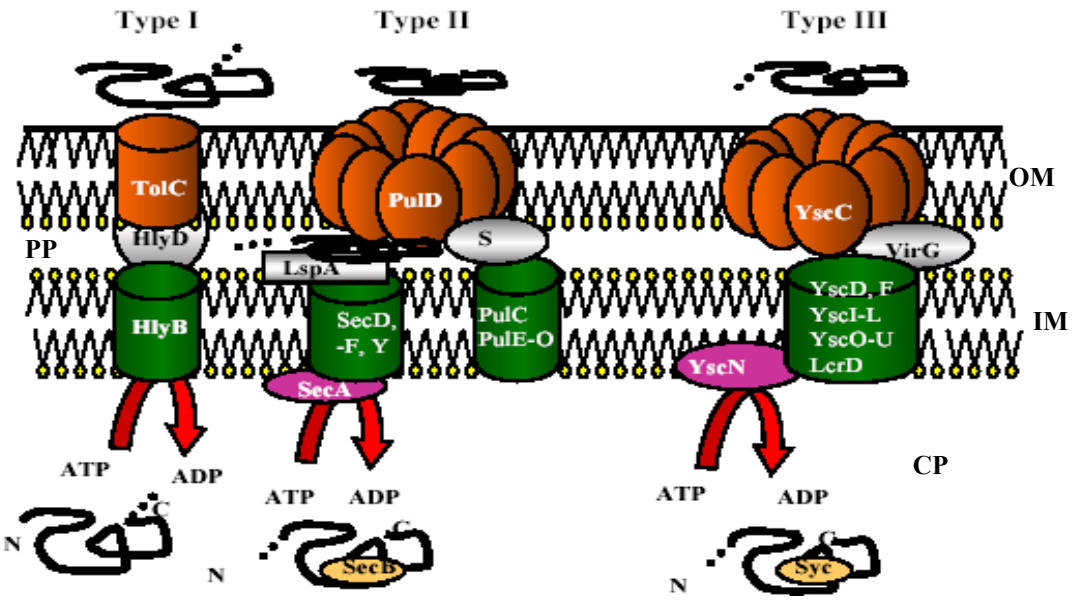
1.1 Γενικά

Τα 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. Όμως ορισμένα βακτηριακά στελέχη, όπως το *Pseudomonas aeroginosa* PA14 είναι ικανό να προσβάλει φυτικούς και ζωικούς ξενιστές, όπως το φυτό *Arabidopsis thaliana* και το ποντίκι. Ο αποικισμός και η πρόκληση ασθένειας στους ευκαρυωτικούς ιστούς από τα βακτήρια καθορίζεται από μια ποικιλία εξωκυτταρικών παραγόντων όπως: πολυσακχαρίτες, αντιχεσίνες, τοξίνες καθώς και ένζυμα αποδόμησης πολυμερών δομικών συστατικών του ξενιστή. Πέραν αυτών η αλληλεπίδραση των παθογόνων βακτηρίων με τα κύτταρα του ξενιστή χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη άλλων παραγόντων πρωτεϊνικής φύσης (συλλογικά αναφερόμενοι ως ¨πρωτεΐνες παθογένειας¨) οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου, εκκρίνονται στο διακυττάριο χώρο ή εισάγονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή, με την βοήθεια ειδικών συστημάτων έκκρισης / διαμετακόμισης. Οι παράγοντες που εισάγονται στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, παρεμβαίνουν στους κυτταρικούς μηχανισμούς του. Οι παράγοντες αυτοί είναι πολυάριθμοι και παρουσιάζουν μια ποικιλία λειτουργιών, όπως: πρωτεόλυση, αιμόλυση, κυτταροτοξικότητα, πρωτεϊνική φωσφορυλίωση και αποφωσφορυλίωση κ.α. (13).

1.2 Βακτηριακά συστήματα έκκρισης

Έχουν ταυτοποιηθεί τρία συντηρημένα μονοπάτια έκκρισης πρωτεϊνών, πέραν του γενικού εκκριτικού μονοπατιού (GSP, General Secretory Pathway) που ονομάζονται εκκριτικά συστήματα τύπου I, II, III (Εικ. 1). Πιο πρόσφατα, ένα άλλο μονοπάτι μεταφοράς περιγράφηκε με βάση τη σύγκριση αλληλουχιών των συστατικών των εκκριτικών μονοπατιών και αυτό αναφέρεται ως μονοπάτι τύπου IV. Οι συστατικές πρωτεΐνες αυτών των εκκριτικών μηχανών, με εξαίρεση του τύπου I, έχουν ομοιότητα με εκείνες που κατευθύνουν το σχηματισμό επιφανειακών

εξαρτημάτων όπως τα μαστίγια (flagella) και οι συζευκτικοί αγωγοί (pili). Η ενδιαφέρουσα αυτή σύνδεση υποδηλώνει ότι υπάρχουν περιορισμένοι δρόμοι για τη διάσχιση των δύο διαφορετικών μεμβρανών στα Gram-αρνητικά βακτήρια, οι οποίοι μπορούν να είναι προϊόν συγκλίνουσας ή αποκλίνουσας εξέλιξης.



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των τύπου I, II, III, εκκριτικών συστημάτων. Ως παραδείγματα δίνονται: alpha-hemolysis έκκριση του βακτηρίου *E. coli* (τύπου I), pullulanase έκκριση του *Klebsiela oxytosa* (τύπου II) και Yop έκκριση του *Yersinia* (τύπου III). OM- εξωτερική μεμβράνη, PP- περιπλάσμιο, IM- εσωτερική μεμβράνη, CP- κυτταρόπλασμα. Επισημαίνεται η υδρόλυση ATP από τα HlyB, SecA, και YscN. Ο εντοπισμός των σινιάλων έκκρισης φαίνεται στις εκκρινόμενες πρωτεΐνες. Τα συστήματα τύπου II και III εμπλέκουν κυτταροπλασματικές τσαπερόνες (SecB και Syc, αντίστοιχα) οι οποίες δεσμεύονται στις εκκρινόμενες πρωτεΐνες. Στο τύπου II σύστημα έκκρισης το αμινοτελικό σινιάλο έκκρισης (διακεκομμένο), κόβεται από μία περιπλασμική πεπτιδάση (LspA) μετά την έξοδο της πρωτεΐνης δια μέσου του μονοπατιού *sec*. Στα εκκριτικά συστήματα II και III υπάρχει ομολογία στους παράγοντες τις εξωτερικής μεμβράνης (PulD και YscC) ενώ οι πρωτεΐνες PlsS και VirG που βρίσκονται στον περιπλασμικό χώρο και αντιδρούν με τις PulD και YscC, διαφέρουν. (21)

1.2.1 Εκκριτικό σύστημα τύπου Ι

Το σύστημα αυτό είναι ανεξάρτητο από το γενικό εκκριτικό μονοπάτι (General Secretory Pathway-GSP), το οποίο δομείται από τα προϊόντα των γονιδίων *sec*. Το σύστημα έκκρισης τύπου Ι εκκρίνει πρωτεΐνες που δεν έχουν τα κλασικά πεπτίδια έκκρισης και απαιτεί τρία ή τέσσερα βοηθητικά πολυπεπτίδια τα οποία σχηματίζουν ένα διαμεμβρανικό κανάλι μέσω του οποίου μεταφέρεται το εκκρινόμενο μόριο. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα βοηθητικά πολυπεπτίδια είναι συνήθως ομαδοποιημένα μαζί με τα γονίδια που κωδικοποιούν τα εκκρινόμενα μόρια. Το σύστημα τύπου Ι εμπλέκει ένα πολυπεπτίδιο ομόλογο των μεταφορέων τύπου ABC (ABC transporter, ATP binding cassette), που πιστεύεται ότι παρέχει την ενέργεια που απαιτείται στη διάρκεια της μεταφοράς. Τα υπόλοιπα στοιχεία της εκκριτικής μηχανής είναι μία πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης που σχετίζεται δομικά με την πρωτεΐνη TolC της *E.coli* και μια διμερής πρωτεΐνη που εκτείνεται μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης και ανήκει σε μια οικογένεια μορίων, που αναφέρονται ως πρωτεΐνες σύντηξης μεμβρανών (membrane fusion proteins). Η πληροφορία για την έκκριση εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό τμήμα των πρωτεϊνών-υποστρωμάτων, οι οποίες εκκρίνονται στο εξωκυττάριο μέσο κατευθείαν από το κυτταρόπλασμα, παρακάμπτοντας πλήρως το περίπλασμα. Παραδείγματα πρωτεϊνών, στα Gram-αρνητικά βακτήρια, που εκκρίνονται απ' αυτό το μονοπάτι, είναι η αιμολυσίνη (haemolysin) παθογόνων στελεχών της *E.coli* (30), και ορισμένες πρωτεάσες του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* και του φυτοπαθογόνο βακτηρίου *Erwinia chrysanthemi*.

1.2.2 Εκκριτικό σύστημα τύπου II και IV

Τα εκκριτικά συστήματα τύπου II και IV περιλαμβάνουν ένα χωριστό στάδιο μεταφοράς διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης προς τον κυτταρικό φάκελο. Αν και τα δύο αυτά συστήματα διαφέρουν στο τρόπο μεταφοράς διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης, η εξαγωγή των πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα, γίνεται δια μέσου του συστήματος **sec** και στις δύο περιπτώσεις (13). Το εκκριτικό μονοπάτι τύπου II αποτελεί επέκταση του γενικού μονοπατιού έκκρισης πρωτεϊνών (GSP) (40, 42). Η έκκριση στο σύστημα αυτό πραγματοποιείται σε δύο διακριτά στάδια. Στο πρώτο στάδιο οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στο περίπλασμα διασχίζοντας την εσωτερική μεμβράνη μέσω του μονοπατιού Sec. Το σινιάλο για την έκκριση εντοπίζεται σε ένα κλασσικό αμινοτελικό πεπτίδιο έκκρισης (περίπου 30 αμινοξέα), το οποίο αναγνωρίζεται και αποκόπτεται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο του μονοπατιού Sec. Στο βακτήριο *E. coli* το μονοπάτι sec απαρτίζεται από έναν αριθμό πρωτεϊνών της εσωτερικής μεμβράνης, μια κυτταροπλασματική ATPάση και την περιπλασμική πεπτιδάση η οποία αποκόπτει το πεπτίδιο-σινιάλο μεταφοράς (Εικ.1). Αρκετές ακόμα συμπληρωματικές πρωτεΐνες συμμετέχουν για την δημιουργία του συστήματος έκκρισης II. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το περίπλασμα στο εξωκυττάριο χώρο, από ένα εξειδικευμένο εκκριτικό σύστημα (40, 46). Από το σύστημα αυτό εκκρίνονται πολλοί διαφορετικοί τύποί πρωτεϊνών, όπως ένζυμα και τοξίνες. Παραδείγματα έκκρισης από το εκκριτικό σύστημα II αποτελούν: υδρολυτικά ένζυμα του γένους *Erwinia ssp*, έκκριση εξωτοξίνης A, φωσφολιπάσης C, και άλλων πρωτεϊνών του βακτηρίου *Pseudomonas aeroginosa*, έκκριση αμυλάσης και πρωτεάσης από το *Aeromonas hydrophila* και έκκριση πολυγαλακτουρονάσης και άλλων υδρολυτικών ενζύμων από το *Xanthomonas campestris*. Το εκκριτικό σύστημα II είναι το βασικό σύστημα έκκρισης των ενζύμων αποδόμησης των πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος / μεμβράνης του ξενιστή από Gram-αρνητικά βακτήρια.

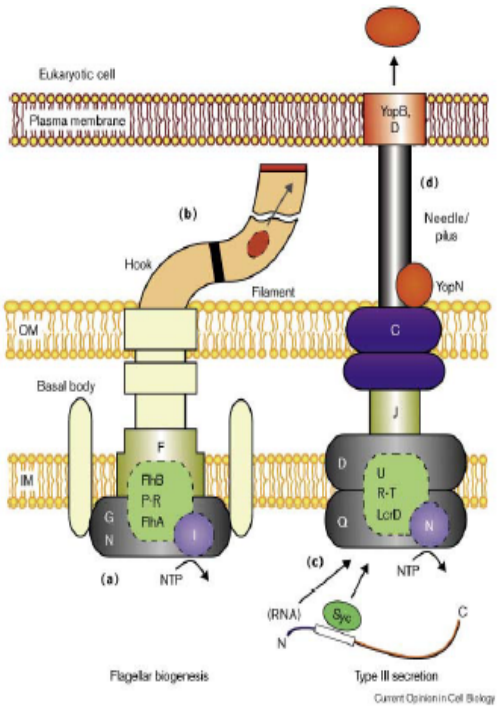
Στο εκκριτικό σύστημα τύπου II του βακτηρίου *Klebsiella oxytoca*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο για την μελέτη του συστήματος αυτού, συμμετέχουν

14 διαφορετικά δομικά συστατικά (41), η πλειονότητα των οποίων είναι πρωτεΐνες της εσωτερικής βακτηριακής μεμβράνης. Μία από τις πρωτεΐνες αυτές περιέχει ένα συντηρημένο μοτίβο ABC για δέσμευση ATP, όπως επίσης και μία πρωτεΐνη ενσωματωμένη στην εξωτερική μεμβράνη, που πιστεύεται ότι χρησιμεύει ως ένα κανάλι διόδου μεταξύ του περιπλάσματος και του εξωκυττάριου μέσου. Τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις πρωτεΐνες είναι συνήθως οργανωμένα σε μεταγραφικές ομάδες. Τμήματα του εκκριτικού συστήματος ΙΙ έχουν ομολογία με άλλα εκκριτικά συστήματα όπως για παράδειγμα αυτό που διαχειρίζεται τον σχηματισμό και την έκκριση του N-methyl-Phe κανάλι του *P. aeroginosa* και άλλων βακτηρίων καθώς και με το σύστημα ενδομεταφοράς DNA του *Haemophilus influenzae* και *Bacillus Subtilis* (13).

Το εκκριτικό σύστημα τύπου IV αποτελείται από διάφορες ομάδες πρωτεϊνών, μία από τις οποίες ονομάζονται αυτομεταφορείς. Η χρησιμότητα του συστήματος έκκρισης αυτού έγκειται στο ότι χρησιμοποιείται από παθογόνα στελέχη του *Agrobacterium tumefaciens* για την μεταφορά ενός τμήματος DNA, από ένα πλασμιδίου 200kb (Ti plasmid, Tumor inducing plasmid) το οποίο ευθύνεται για την επαγωγή και την δημιουργία του κορωνοτού κάλου στον ξενιστή.

Στο σύστημα ΙΙ αυτές οι πρωτεΐνες εκκρίνονται δια μέσου του μονοπατιού sec και αποκόπτεται το αμινοτελικό σινιάλο έκκρισης. Η πληροφορία που απαιτείται για την μεταφορά δια μέσου της εξωτερικής μεμβράνης, βρίσκεται εξ ολοκλήρου μέσα στην εκκρινόμενη πρωτεΐνη (13).

1.2.3 Εκκριτικό σύστημα τύπου III (Type III secretion system, TTSS)



Εικόνα 2:Βασικό σωμάτιο του μαστιγίου συνδέει την εσωτερική με την εξωτερική μεμβράνη και παρέχει θέση πρόσφυσης του νηματίου. Το κυτταροπλασματικό τμήμα του βασικού σωματίου φαίνεται να περιέχει το μηχανισμό ο οποίος οδηγεί στην έκκριση και τη συγκρότηση του μαστιγίου. Ο μηχανισμός αυτός εξάγει μονομερείς υπομονάδες φλαγγελίνης, μέσω ενός κεντρικού καναλιού, που απαιτούνται για την οργάνωση του αναπτυσσόμενου μαστιγίου. Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι η συσκευή του μαστιγίου λειτουργεί στο πρωτεϊνικό εκκριτικό σύστημα τύπου III (61)

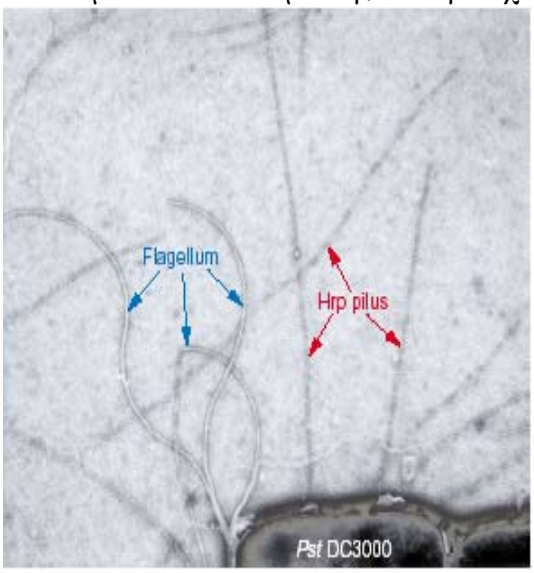
Τα Gram-αρνητικά βακτήρια φαίνεται να απέκτησαν το εκκριτικό σύστημα τύπου III (TTSS), μέσω κάποιων μηχανισμών οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς. Η πλειονότητα των συστατικών του TTSS, φαίνεται να εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη έχοντας δομικές ομοιότητες με συστατικά της οργάνωσης του βακτηριακού μαστιγίου (Εικ.2,3) (22). Το εκκριτικό σύστημα III όπως και το σύστημα I είναι ανεξάρτητο από το σύστημα έκκρισης *sec* και αποτελείται από περίπου 20 πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων μια ενδοκυτταρική μεμβρανική ATPάση. Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης του συστήματος, έχουν ομολογία με τις πρωτεΐνες βιογένεση του μαστιγίου των Gram-αρνητικών αλλά και των Gram-θετικών βακτηρίων (Εικ.2,3) (13), ενώ μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης παρουσιάζει ομολογία με την πρωτεΐνη PulD του εκκριτικού συστήματος II. Όλα τα εκκριτικά συστήματα τύπου III των ζωικών και φυτικών παθογόνων βακτηρίων έχουν από κοινού έναν αριθμό κύριων δομικών συστατικών που είναι συντηρημένα (22).

Αυτά τα συστατικά μπορούν να διαχωριστούν σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα

ανήκουν οι προβλεπόμενες εξωτερικές πρωτεΐνες της μεμβράνης (*peripheral membrane proteins*) συμπεριλαμβανομένης και μιας πρωτεΐνης που παρουσιάζει αλληλουχική ομοιότητα με μια οικογένεια μεταφορικών πρωτεϊνών καθώς και λιγότερο συντηρημένες λιποπρωτεΐνες. Η άλλη ομάδα αποτελείται από πολλές πρωτεΐνες πλήρους ενσωμάτωσης στην μεμβράνη (*integral membrane proteins*) που παρουσιάζουν ομοιότητες με τη συσκευή βιογένεσης του μαστιγίου. Η υπερμοριακή δομή που συνδέεται με το τύπου ΙΙΙ σύστημα μεταφοράς της *Salmonella typhimurium* απομονώθηκε και απεικονίστηκε με την βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (33). Αυτή η δομή, που ονομάζεται σύμπλοκο βελόνας (needle complex), εκτείνεται στην εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη του βακτηριακού φακέλου. Το σύμπλοκο βελόνας είναι μια μακριά άδεια δομή σχεδόν 120 nm μήκος και συντίθεται από δύο κύριες υποδομές (Εικ.2). Σε αντίθεση με το σύμπλοκο βελόνας, μερικά τύπου ΙΙΙ συστήματα διαθέτουν άλλες υπερμοριακές δομές που δύναται να λειτουργούν για την παράδοση πρωτεϊνών στο κύτταρο του ξενιστή (18, 32). Αυτές είναι δομές αποτελούμενες από πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω του συστήματος τύπου ΙΙΙ. Οι πρωτεΐνες αυτές συναρμολογούνται στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου κατόπιν επαφής με το κύτταρο ξενιστή και διαφέρουν μεταξύ διαφορετικών παθογόνων. Για παράδειγμα η *S. typhimurium* και η εντεροπαθογόνος *Escherichia coli* παράγουν νηματοειδείς κατασκευές περίπου 50nm σε διάμετρο που γεφυρώνουν τα βακτήρια και το κύτταρο του ξενιστή (18, 32). Σε αντίθεση η *P. syringae* παράγει ένα λεπτότερο (6-8nm σε διάμετρο) σωληνίσκο που ίσως διαπερνά το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα (Εικ.3) (44). Οι δομικές διαφορές που υπάρχουν σε αυτές τις κατασκευές μεταξύ των ζωικών και φυτικών παθογόνων βακτηρίων αντανακλούν την διαφορετική κυτταρική οργάνωση των ζωικών και φυτικών οργανισμών στους οποίους παρασιτούν. Η *P. aeruginosa* στέλεχος PA14 όμως όπως προαναφέρθηκε, δεν είναι μόνο ένα ανθρώπινο ευκαιριακό παθογόνο αλλά είναι ικανό να προκαλέσει ασθένεια και σε φυτά *Arabidopsis* (39). Αυτό το παθογόνο έχει οπλιστεί με την ικανότητα να αποικεί επιφάνειες και ζωικών και φυτικών κυττάρων και να αποφεύγει τα διαφορετικά συστήματα εποπτείας των τόσο εξελικτικά απομακρυσμένων ξενιστών του. Τα γονίδια τα οποία κωδικεύουν για το εκκριτικό

σύστημα τύπου III συχνά ομαδοποιούνται με άλλους μολυσματογόνους παράγοντες σε νησίδες παθογένειας (Pathogenicity Islands, PAIs) ή σε μεγάλα εξωχρωμοσωμικά γενετικά στοιχεία (πλασμίδια).

Το αμινοτελικό άκρο της αλληλουχίας των εκκρινόμενων πρωτεϊνών δια μέσου του συστήματος τύπου III δεν παρουσιάζει δομικές ομοιότητες οι οποίες να δρουν ως κοινό σινιάλο έκκρισης. Εξαντλητικές μελέτες μεταλλαξοποίησης του αμινοτελικού άκρου ορισμένων εκκρινόμενων πρωτεϊνών δια μέσου του συστήματος III, έδειξαν ότι ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων δεν αναστέλλει την έκκριση των πρωτεϊνών αυτών. Τελευταία προτάθηκε ότι το σινιάλο έκκρισης βρίσκεται στο 5΄-άκρο του mRNA που κωδικεύει για τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες αυτές. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες απαιτούν την ύπαρξη μικρών κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών με δράση τσαπερόνης, για την προστασία των εκκρινόμενων παραγόντων από πρώιμη αλληλεπίδραση με ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες. Σε αντίθεση με το εκκριτικό σύστημα I, το σύστημα III δείχνει να είναι ο αποκλειστικός μηχανισμός μεταφοράς των πρωτεϊνών παθογένειας στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Σε πολλές περιπτώσεις, η έκκριση μέσω του συστήματος III φαίνεται να ελέγχεται από την φυσική επαφή του βακτηρίου με την επιφάνεια του κυττάρου στόχου. Η αξιοσημείωτη ικανότητα του εκκριτικού συστήματος τύπου III να μεταφέρει πρωτεΐνες από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή, μελετήθηκε πρώτα στο βακτήριο *Yersinia pseudotuberculosis* το 1994 (45, 50). Τα φυτοπαθογόνα βακτήρια



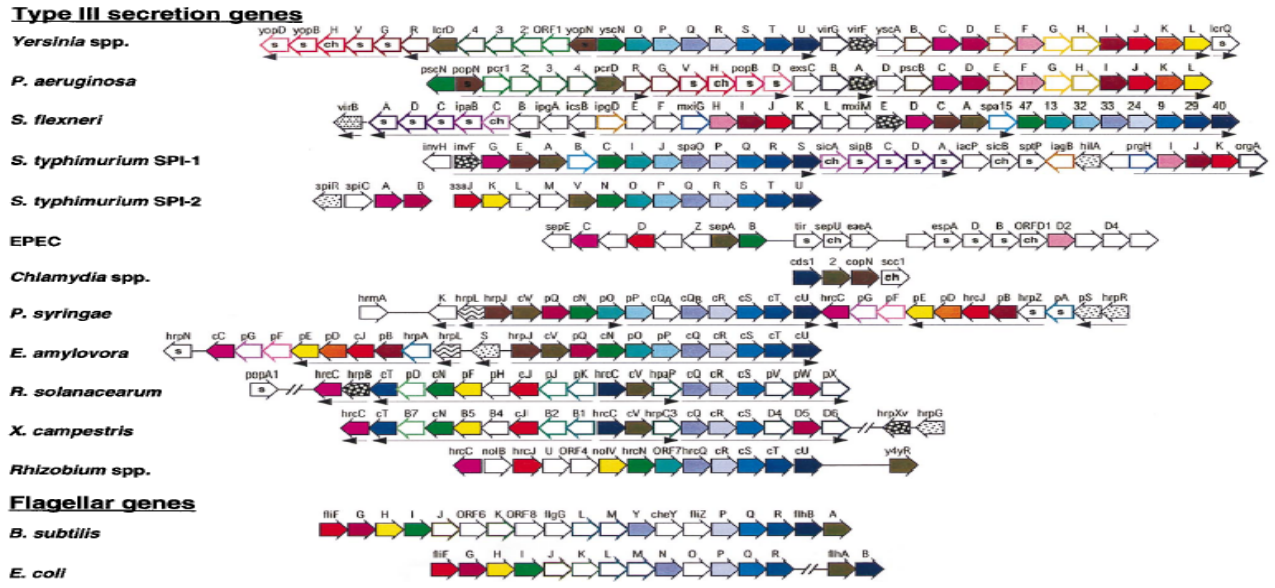
Εικόνα 3: Δημιουργία νηματοειδών σχηματισμών του βακτηρίου *P. syringae* pv. tomato DC3000 σε hrp-επαγώγιμο θρεπτικό. Το *Pst* DC3000 δημιουργεί δύο είδη νηματοειδών σχηματισμών: α) μαστίγια (flagellum) διαμέτρου περίπου 15nm τα οποία βρίσκονται τοποθετημένα στον ένα πόλο του βακτηρίου και β) Hrp pilus διαμέτρου 8nm περίπου, βρίσκονται τοποθετημένα σε όλη την επιφάνεια του βακτηρίου. (46)

τα οποία φέρουν το εκκριτικό σύστημα τύπου III, μπορούμε να τα χωρίσουμε σε δύο ομάδες: την ομάδα I (*P. syringae* και *Erwinia* spp) και την ομάδα II (*R. solanacearum* και *Xanthomonas* spp), τα οποία διαφέρουν, μεταξύ άλλων και ως προς την ομολογία των συστατικών πρωτεϊνών τους (2).

1.2.4 Αγωγός Hrp

Ένας παράγοντας κλειδί κατά την έκκριση δια μέσου του εκκριτικού συστήματος III είναι ένας σχηματισμός της επιφάνειας του βακτηρίου, ο οποίος ονομάζεται κανάλι (ή αγωγός) Hrp (Εικ.3,5). Αρκετές μελέτες έδειξαν ότι το κανάλι Hrp εξυπηρετεί την μεταφορά των εκκρινόμενων πρωτεϊνών από το εκκριτικό σύστημα τύπου III και είναι συναρμολογημένο με τρόπο παρόμοιο με αυτόν του μαστιγίου. Το κανάλι Hrp μοιάζει να είναι ισοδύναμο με τον βελονοειδή σχηματισμό του εκκριτικού συστήματος τύπου III των ζωικών παθογόνων βακτηρίων. Είναι ένας λεπτός (8nm σε διάμετρο και πάνω από 2μm σε μήκος) σχηματισμός της επιφάνειας του βακτηρίου, ο οποίος παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000 (Εικ.3) (44). Στο βακτήριο *P. syringae* η συναρμολόγηση του καναλιού *Hrp* εξαρτάται από τα γονίδια *hrp* τα οποία συμμετέχουν στην ρύθμιση ή τον σχηματισμό του εκκριτικού συστήματος τύπου III (44). Τα γονίδια *hrp* ανακαλύφθηκαν και πρωτοπεριγράφηκαν στο βακτήριο Pseudomonas syringae pv. phaseolicola, ως μια ομάδα γονιδίων απαραίτητων για την πρόκληση ασθένειας "halo blight" σε ευαίσθητες ποικιλίες φασολιάς, καθώς και της αντίδρασης υπερευαισθησίας (hypersensitive reaction, HR) σε ανθεκτικά στο βακτήριο φυτά, όπως π.χ. ο καπνός, η τομάτα, ή ανθεκτικών ποικιλιών φασολιού (Lindgren et. al. 1986). Μετά τον εντοπισμό του καναλιού *Hrp* στο *P. syringae* το 1997, βρέθηκαν και σε άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια με εκκριτικά συστήματα τύπου III, hrp-εξαρτώμενα κανάλια μεταφοράς: *Ralstonia solanacearum* (55), *Erwinia amylovora* (26), και *Xanthomonas campestris* καθώς και του συμβιωτικού βακτηρίου *Sinorhizobium fredii* (29). Οι βασικές υπομονάδες του *hrp*-εξαρτημένου καναλιού είναι μικρές πρωτεΐνες (6-11 kDa) (Εικ.5) (48), αλλά η αλληλουχίες τους είναι πολύ διαφορετικές ακόμα και ανάμεσα σε διάφορους παθότυπους του είδους *P. syringae*. Οι δευτεροταγείς δομές όμως αυτών των πρωτεϊνών είναι αρκετά όμοιες,

σχηματίζοντας αποκλειστικά α έλικες (29). Μόνο το αμινοτελικό άκρο (τα πρώτα 50 αμινοξέα) της πρωτεΐνης HrpA των παθότυπων του βακτηρίου *P. syringae* περιέχουν β πτυχές (53). Μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί άλλες πρωτεΐνες ως δομικά συστατικά του καναλιού Hrp εκτός από την HrpA (στο *P. syringae* και *Erwinia amylovora*) και HrpΥ (στο *Ralstonia solanacearum*). Το βακτήριο *P. syringae pv. tomato* DC 3000 για παράδειγμα εκκρίνει τρεις πρωτεΐνες (HrpA, HrpW και HrpZ) σε καλλιέργεια και μόνο η HrpA συνκαθαρίζεται μαζί με το κανάλι Hrp (44). Τα μεταλλάγματα *hrpA* των *P. syringae* και του *Erwinia amylovora* καθώς και τα μεταλλάγματα HrpΥ του *Ralstonia solanacearum* δεν προκαλούν ασθένεια σε ευπαθείς ξενιστές, αλλά δεν επάγουν ούτε την αντίδραση υπερευαισθησίας σε ανθεκτικούς ξενιστές (44, 55, 26) υποστηρίζοντας έτσι την ανάγκη της ύπαρξης του καναλιού Hrp για την αλληλεπίδραση του βακτηρίου με τα κύτταρα του φυτού.



Πίνακας 1: Γονιδιακή οργάνωση του εκκριτικού συστήματος τύπου III σε διάφορα είδη βακτηρίων και στα χλαμίδια, καθώς και των γονιδίων βιοσύνθεσης του μαστιγίου των βακτηρίων *B. subtilis* και *E. coli*. Οι ομολογίες των διαφόρων πρωτεϊνών δείχνονται με τα διάφορα χρώματα. Τα παχιά βέλη δείχνουν τα ευρέως διατηρημένα γονίδια, ενώ τα γονίδια τα οποία είναι διατηρημένα μόνο σε υποομάδες, είναι μαρκαρισμένα με πλαίσιο λεπτότερης έγχρωμης γραμμής. Με λεπτή μαύρη γραμμή μαρκάρονται περιοχές που δεν έχει βρεθεί ομολογία έως τώρα. Τα βέλη με τα διάφορα σχέδια δείχνουν γονίδια τα οποία είναι μεταγραφικοί παράγοντες. Ένα μικρό s μέσα στο γονίδιο δείχνει την έκκριση της παραγόμενης πρωτεΐνης, ενώ τα γονίδια που κωδικεύουν για τσαπερόνες μαρκάρονται με ch. Οι μεταφραστικές μονάδες μαρκάρονται με βέλη στην κάτω μεριά των γονιδίων. Για το φυτικό εκκριτικό σύστημα τύπου III τα hrc και hrp γονίδια δίνονται ως c και p. (21)

1.3 Ο ρόλος του εκκριτικού συστήματος ΙΙΙ στην βακτηριακή παθογένεια.

Μεγάλος αριθμός gram-αρνητικών παθογόνων χρησιμοποιούν το τύπου ΙΙΙ σύστημα έκκρισης ως συντηρημένο και την ίδια στιγμή ισχυρά προσαρμοσμένη μηχανή παθογένειας. Αν και ο μηχανισμός αυτός είναι συντηρημένος, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες έχουν υψηλό ποσοστό ανομοιογένειας και οι ποικιλία των ασθενειών που προκαλούνται από τα παθογόνα αυτά σε διάφορους ξενιστές οφείλονται στον μεγάλο αριθμό διαφορετικών εκκρινόμενων πρωτεϊνών. Πολλές από τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα με παράγοντες του κυττάρου ξενιστή, σε εναλλακτική μεταγωγή σήματος και περισσότερες από αυτές δρουν μέσα στο ευκαρυωτικό κυτταρόπλασμα, στο οποίο μεταφέρονται δια μέσο του εκκριτικού συστήματος ΙΙΙ. Είδη ζωικών gram-αρνητικών παθογόνων βακτηρίων όπως: *Yersinia* sp., *Salmonella typhimurium*, enteropathogenic *E. coli*, *P. aeruginosa* και *Chlamydia* sp., αλλά και πολλά φυτοπαθογόνα gram-αρνητικά βακτήρια όπως: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* και *Xanthomonas* χρησιμοποιούν το εκκριτικό σύστημα ΙΙΙ ως σύστημα παθογένειας.

1.3.1 Φυτοπαθογόνα βακτήρια

Το εκκριτικό σύστημα τύπου ΙΙΙ συναντάται, όπως προαναφέρθηκε και στα τέσσερα βασικά γένη των φυτοπαθογόνων βακτηρίων και απαιτείται για την κοινή τους ικανότητα να μολύνουν τους δεκτικούς φυτικούς ξενιστές. Τα φυτοπαθογόνα βακτήρια προκαλούν ασθένειες των ακολούθων 5 κατηγοριών:

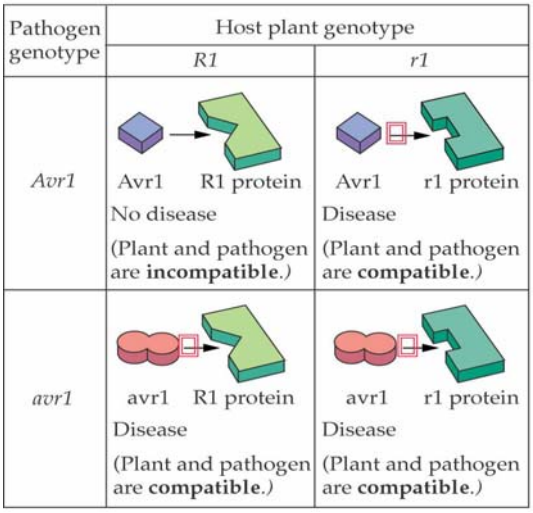
1. υπερπλασίες-καρκινώματα (galls)
2. μαρασμό, αποπληξίες (wilt)
3. βακτηριακές προσβολές των αγγείων του ξύλου (αδροβακτηριώσεις)
4. κηλιδώσεις (leaf spots)
5. υγρές σήψεις (soft rots).

Γονίδια τα οποία κωδικεύουν ένα υποτιθέμενο εκκριτικό σύστημα τύπου ΙΙΙ, έχουν βρεθεί και στο γένος *Rhizobium* spp. (16, 21), μέλη του οποίου εμπλέκονται στην

δημιουργία φυματίων σε διάφορα είδη φυτών της οικογένειας των ψυχανθών.

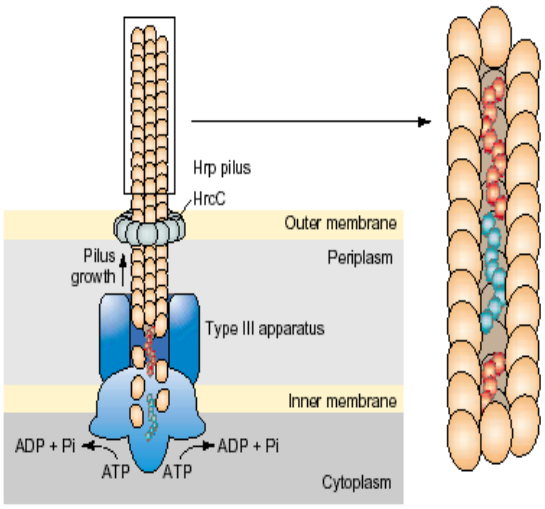
Οι *hrp* δέσμες γονιδίων των φυτικών παθογόνων χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, με βάση την συντήρηση των αλληλουχιών: στην ομάδα I ανήκουν το *Erwinia amylovora* (9), *Erwinia chrysanthemi* (28) και το *P. syringae* και στην ομάδα II τα *Ralstonia solanacearum* και *Xanthomonas campestris*. Η ρύθμιση της έκφρασης των *hrp* διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων. Στην ομάδα I η έκφραση ελέγχεται από την πρωτεΐνη HrpL, ένα μέλος της υποοικογένειας ECF (Extracytoplasmic Function) των παραγόντων σίγμα (60), ενώ στην ομάδα II οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες HrpX και HrpG στην *X. campestris* και η HrpB στο *R. solanacearum* φαίνεται να δρουν σαν ανιχνευτές (sensors) και πρωτεΐνες αντίδρασης (response regulators), αντίστοιχα, για ένα σύστημα ανίχνευσης δύο συστατικών (two-component system) τύπου AraC (58).

1.3.2 Αντίδραση υπερευαισθησίας



Εικόνα 4 (Buchanan et al.)

Το εκκριτικό σύστημα τύπου ΙΙΙ παίζει βασικό ρόλο στην επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας-**HR** (Hypersensitive Response) σε φυτά τα οποία δεν είναι δεκτικοί ξενιστές για τα συγκεκριμένα παθογόνα. Η αντίδραση HR χαρακτηρίζεται από περιορισμένη νέκρωση του φυτικού ιστού και την παραγωγή φαινολικών και αντιμικροβιακών παραγόντων στην περιοχή της βακτηριακής μόλυνσης. Η HR είναι αντίδραση στην βακτηριακή μόλυνση και απαιτεί de novo γονιδιακή έκφραση από πλευράς φυτού, παραγωγή πρωτεϊνών, διακύμανση των συγκεντρώσεων ασβεστίου εντός/εκτός των μεμβρανών και δραστικότητα της ATPάσης από τα φυτά (20). Αν και η HR είναι μικροσκοπική αντίδραση σε φυσικές συνθήκες, γίνεται μακροσκοπική, εμφανής και άμεσα καθορισμένη στο εργαστήριο όπου ο φυτικός ιστός μολύνεται με μεγάλο αριθμό φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Τα βακτηριακά γονίδια τα οποία απαιτούνται για την μόλυνση στους δεκτικούς ξενιστές αλλά και την επαγωγή της HR στους μη δεκτικούς, έχουν οριστεί ως ***hrp*** (hypersensitive response and pathogenicity genes) (36) και αυτό το όνομα διατηρείται ακόμα ως γενικός προσδιορισμός του εκκριτικού συστήματος ΙΙΙ των φυτοπαθογόνων βακτηρίων. Σε μερικά φυτοπαθογόνα, πρωτεϊνικοί επαγωγείς της λοίμωξης και/ή της HR έχουν ταυτοποιηθεί και φαίνεται να εκκρίνονται δια μέσον του εκκριτικού συστήματος ΙΙΙ και του Hrp καναλιού (Εικ.5) (4,7,20,59). Για παράδειγμα, οι ¨χαρπίνες¨ (δομικά όμοιες εκκρινόμενες πρωτεΐνες *HrpN* από το *E. amylovora* και *HrpZ* από το *P. syringae)* επάγουν HR σε φυτά μη ξενιστές όταν ενεθούν σε αυτά σε καθαρή μορφή. Επίσης μεταλλάγματα με μεταλλαγές στα γονίδια των πρωτεϊνών αυτών, σε ορισμένα τουλάχιστον βακτήρια που έχουν μελετηθεί επισταμένως, είναι μη μολυσματογόνα σε δεκτικούς ξενιστές (20, 59).



Εικόνα 5: Μοντέλο συναρμολόγησης του Hrp καναλιού και μεταφορά των πρωτεϊνών δράσης. Οι υπομονάδες του καναλιού Hrp (πιλίνες-με πορτοκαλί) βρίσκονται στον περιπλασμικό χώρο σε συνεργασία με το εκκριτικό σύστημα τύπου III (με μπλε) το οποίο χρησιμοποιεί ATP. Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες (κόκκινο, πράσινο) αλληλεπιδρούν με το αναπτυσσόμενο Hrp κανάλι εντός του εκκριτικού συστήματος III και μεταφέρονται ως φορτίο σε ταινία μεταφοράς εντός του καναλιού (δεξιά). Η έκκριση των πρωτεϊνών και η απελευθέρωση του στο κύτταρο του ξενιστή ίσως γίνεται με τον αποπολυμερισμό της κορυφής του Hrp καναλιού η οποία ίσως καλύπτεται από πρωτεΐνη καλύμματος. (27)

Η αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) ή φαινότυπος ανθεκτικότητας (ασύμβατη αλληλεπίδραση παθογόνου-ξενιστή), σε μη δεκτικούς ξενιστές, προϋποθέτει την ύπαρξη γονιδίων αμολυσματικότητας (*avr genes*) στο παθογόνο και λειτουργικά αντίστοιχων γονιδίων ανθεκτικότητας (Resistance genes-R genes) στον ξενιστή (Εικ.4) (52,56). Οι μεταλλαγές σε γονίδια αμολυσματικότητας (*avr*) επιτρέπουν στα παθογόνα να προκαλέσουν ασθένεια σε ορισμένους ανθεκτικούς ξενιστές, καθώς και η εισαγωγή γονιδίων ανθεκτικότητας σε δεκτικούς ξενιστές, προσδίδει ανθεκτικότητα σε παθογόνα τα οποία φέρουν το κατάλληλη *avr* γονίδιο. Η αλληλεπίδραση R-*avr* γονιδίων για την πρόκληση HR, θέτει σε μοριακή βάση την ερμηνεία της θεωρίας γονίδιου-πρός-γονίδιο (*gene-for-gene* hypothesis του Floor) (Εικ.4) (15). Η θεωρία αυτή υποθέτει την ύπαρξη στο φυτικό κύτταρο ενός υποδοχέα για την Avr πρωτεΐνη ο οποίος κωδικεύεται από το R γονίδιο του ξενιστή. Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών (*R-Avr interaction*) μπορεί να προκαλέσει την δημιουργία σήματος το οποίο εν τέλει να οδηγήσει στην επαγωγή αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) ή/και άλλων μηχανισμών ανθεκτικότητας του ξενιστή στο παθογόνο (5,34,52). Η δράση των πρωτεϊνών αμολυσματικότητας όπως και των παραγόντων παθογένειας των βακτηρίων, εξαρτάται φαινοτυπικά από την

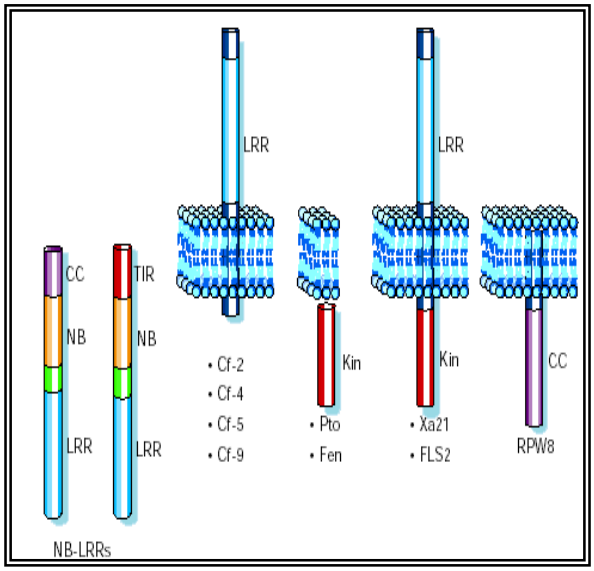
λειτουργικότητα του εκκριτικού συστήματος ΙΙΙ (19, 31, 38, 43). Πολλές *avr*-κωδικοποιούμενες πρωτεΐνες έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν HR όταν εκφραστούν μέσα σε κύτταρα του ξενιστή (19, 35, 54). Φυσικά οι πρωτεΐνες αμολυσματικότητας εισέρχονται στο κύτταρο του ξενιστή δια μέσου του εκκριτικού συστήματος ΙΙΙ, όπως και οι παράγοντες μολυσματικότητας του είδους *Yersinia* spp και άλλων παθογόνων βακτηρίων.

1.3.3 Γονίδια ανθεκτικότητας των φυτών

Τα περισσότερα φυτά είναι ανθεκτικά στα περισσότερα φυτοπαθογόνα. Η παθητική προστασία έναντι των φυτοπαθογόνων τα οποία δεν έχουν εξειδίκευση ως προς τον ξενιστή, βασίζεται σε προϋπάρχοντες μορφολογικούς ή φυσιολογικούς φραγμούς, (όπως π.χ. στρώσεις κηροειδούς ουσίας, οι οποίες βρίσκονται στην επιφάνεια της επιδερμίδας των φύλλων, καθώς και προσχηματισμένων αντιμικροβιακών ουσιών) (25). Οι Φυτοπαθογόνοι μικροοργανισμοί με την σειρά τους μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, αυτοί οι οποίοι νεκρώνουν τον ξενιστή και διατρέφονται από τα υπολείμματα των νεκρών κυττάρων (νεκρότροφα) και αυτούς οι οποίοι απαιτούν ζωντανό ξενιστή για να ολοκληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο (βιότροφα).

Η αλληλεπιδράσεις φυτών–παθογόνων και ιδιαιτέρως αυτές μεταξύ των βιότροφων παθογόνων-φυτών επηρεάζονται από ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ *avr* γονίδια των παθογόνων και αλληλομορφων γονιδίων ανθεκτικότητας (Resistance genes) R των φυτών. Όταν τα λειτουργικά αντίστοιχα R και avr γονίδια είναι παρόντα το αποτέλεσμα την αλληλεπίδρασης τους είναι η εκδήλωση ανθεκτικότητας. Αν ένα από τα δύο (R ή avr) λείπει ή είναι ανενεργό, τότε εκδηλώνεται ασθένεια (συμβατή αλληλεπίδραση παθογόνου-ξενιστή). Τα γονίδια R των φυτών αποτελούν πολυμορφικούς παράγοντες μιας ειδικής αντίδρασης μοριακής αναγνώρισης. Η ενδογενής ανοσία που προκαλείται από την ύπαρξη και την δράση των R γονιδίων τοποθετείται σε ένα ή περισσότερα βασικά μονοπάτια άμυνας. Η βασική άμυνα αναστέλλει την εξάπλωση των παθογόνων μετά από την μόλυνση και το ξεκίνημα της λοίμωξης. Η ύπαρξη της βασικής άμυνας συμπεραίνεται από την μελέτη μεταλλαγμάτων τα οποία είναι πιο ευπαθή στην δράση των παθογόνων σε σύγκριση

με τους γονείς τους. Τα R γονίδια που έχουν απομονωθεί από φυτά μοντέλα αλλά και από καλλιεργούμενα ήδη, τα τελευταία 5-10 χρόνια προσδίδουν ανθεκτικότητα σε βακτήρια, μύκητες, ιούς ακόμα και νηματώδεις αλλά και σε έντομα (8, 27). Παρ΄ όλη την μεγάλη γκάμα παθογόνων στα οποία δρουν τα R γονίδια, οι πρωτεΐνες που κωδικεύουν μόνο πέντε είδη πρωτεϊνών, από άποψη προβλεπόμενης δομής (Εικ6).

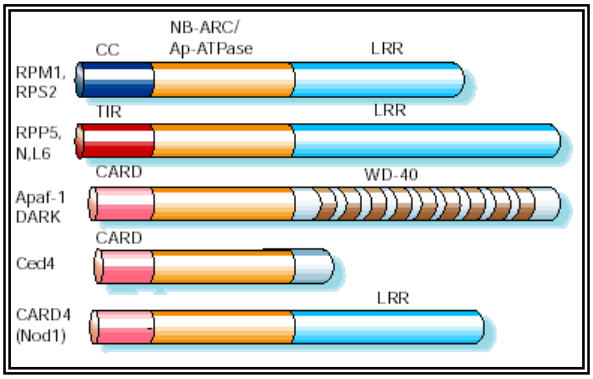


Εικόνα 6: Παρουσίαση της θέσης εντοπισμού και της δομής των πέντε βασικών κατηγοριών πρωτεϊνών ανθεκτικότητας των φυτών. Τα *Xa1* και *Cf-x* φέρουν μια αλληλουχία τοποθέτησης στην μεμβράνη και μια εξωμεμβρανική LRR (φερμουάρ λευκίνης) αλληλουχία. Το προϊόν του γονιδίου *RPW8* φέρει ένα σινιάλο άγκυρα στο αμινο-τελικό άκρο του. Το γονίδιο *pto* κωδικεύει μια κυτταροπλασματική Ser/Thr κινάση, η οποία μπορεί να δεσμεύεται στην μεμβράνη με το αμινο-τελικό άκρο. Η μεγαλύτερη ομάδα των R πρωτεϊνών, η NB-LRR είναι πιθανόν κυτταροπλασματικές (αν και μπορεί να αλληλεπιδρούν με την μεμβράνη) και φέρουν διαφορετικά αμινο-τελικά άκρα. (23)

Η μεγαλύτερη ομάδα των R γονιδίων κωδικεύουν πρωτεΐνες οι οποίες φέρουν «φερμουάρ λευκίνης» και αλληλουχίες που αλληλεπιδρούν με νουκλεοτίδια. (Nucleotide-Binding site plus Leucine-Rich Repeat-**NB-LRR**) (Εικ.6). Βιοπληροφορικές αναλύσεις κατά κανόνα δεν δίνουν ενδείξεις για τον κυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών αυτών, όμως τουλάχιστον μία NB-LRR πρωτεΐνη εντοπίζεται στην μεμβράνη (10). Το πιο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό τους είναι ο μεγάλος αριθμός καρβοξυ-τελικών LRRs. Κάθε R πρωτεΐνη περιέχει μία περιοχή αλληλεπίδρασης με νουκλεοτίδια (Nucleotide-Binding, **NB**) η οποία σε άλλες πρωτεΐνες είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση με ATP ή GTP (47). Η NB περιοχή είναι μέρος ενός μεγαλύτερου πεδίου το οποίο περιλαμβάνει R πρωτεΐνες, κάποιους ευκαρυωτικούς παράγοντες κυτταρικού θανάτου όπως Apaf-1 και Ced4, με μεγάλη ομολογία (Εικ.7). Η ολοκλήρωση της αλληλούχισης του γονιδιόματος του φυτού *Arabidopsis* βοήθησε την σε βάθος μελέτη της ποικιλίας των NB-LRR R γονιδίων

σε ένα φυτό (23). Βρέθηκαν περίπου 150 αλληλουχίες να έχουν ομολογία με την NB-LRR ομάδα των R γονιδίων. Οι αλληλουχίες αυτές είναι ακανόνιστα τοποθετημένες στα διάφορα χρωμοσώματα: 49 στο χρωμόσωμα 1, 2 στο χρωμόσωμα 2, 16 στο χρωμόσωμα 3, 28 στο χρωμόσωμα 4 και 55 στο χρωμόσωμα 5.

Παρά το γεγονός ότι πολλά R γονίδια που έχουν απομονωθεί, ανήκουν σε εντοπισμένες πολυγονιδιακές οικογένειες, υπάρχουν 46 μονές ομολογίες με R γονίδια στο *Arabidopsis*, 25 ζεύγη, 7 περιοχές με 3 αντίγραφα και μεμονωμένες γονιδιακές περιοχές με 4, 5, 7, 8 και 9 NB-LRR γονίδια. Έχουν εντοπιστεί 14 αντίγραφα της οικογένειας RPP7 στο χρωμόσωμα 1. Στην *Arabidopsis* υπάρχουν περισσότερα TIR-NB-LRR γονίδια (Toll Interleukine Receptor) (περίπου 60%) από ότι CC-NB-LRR γονίδια (Coiled Coil) (περίπου 40%).



Εικόνα 7: Σύγκριση R πρωτεϊνών με πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στον κυτταρικό θάνατο. Εκτός από την περιοχή δέσμευσης με νουκλεοτίδια, οι R πρωτεΐνες, η Apa-1 και η Ced4 έχουν επιπλέον ομολογία στην NB-ARC περιοχή η οποία ίσως υποδηλώνει ομοιότητα στον τρόπο δράσης (23).

1.3.4 Βακτηριακές πρωτεΐνες εκκρινόμενες μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου ΙΙΙ

Τα συστήματα έκκρισης τύπου ΙΙΙ των ζωικών και φυτικών παθογόνων gram αρνητικών βακτηρίων θεωρούνται ότι εξελίχτηκαν για να μεταφέρουν στο κύτταρο του ξενιστή μια σειρά πρωτεϊνών που έχουν την ικανότητα να διεγείρουν αντιδράσεις άμυνας ή να παρεμβαίνουν με άλλους άγνωστους τρόπους στις κυτταρικές λειτουργίες του ξενιστή ή και τα δύο.

Στα φυτικά παθογόνα οι πρωτεΐνες μολυσματικότητας έχουν διαφορετικές δράσεις. Οι δράσεις αυτές εξαρτώνται από το αν το φυτό είναι συμβατό την βακτηριακή μόλυνση ή ανθεκτικό, οπότε καθιστά το παθογόνο μη μολυσματικό. Στα ανθεκτικά φυτά, οι μολυσματικές πρωτεΐνες που μεταφέρονται μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου ΙΙΙ προκαλούν αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR), η οποία χαρακτηρίζεται από μια γρήγορη (εντός 24 – 48 ωρών) επαγωγή προγραμματισμένου θανάτου των φυτικών κυττάρων που είναι σε επαφή με το παθογόνο (1). Σε μη ανθεκτικούς (συμβατούς) ξενιστές τα ίδια παθογόνα συνεχίζουν να αυξάνονται και να διαδίδονται στον ενδοκυττάριο χώρο του μολυσμένου οργάνου για αρκετές μέρες πριν την παραγωγή ορατών συμπτωμάτων της ασθένειας. Τα γονίδια τα οποία κωδικεύουν για τις πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται γονίδια αμολυσματικότητας, *avr* (avirulence), ή σε πιο πρόσφατη μετονομασία, γονίδια *hop* (hrp dependent outer proteins). Τα τελευταία χρόνια έχουν κλωνοποιηθεί πολλά γονίδια αμολυσματικότητας από διάφορα παθογόνα βακτήρια. Πριν την κλωνοποίηση, η ύπαρξη των *avr* γονιδίων τεκμηριώνεται από τις διαφορές στον φαινότυπο των αλληλεπιδράσεων (συμβατών ή ασύμβατων), συγκεκριμένων σειρών παθογόνων με φυτά ξενιστές. Κάθε στέλεχος ή φυλή δεδομένου παθογόνου μπορεί να έχει πολλαπλά γονίδια αμολυσματικότητας, συνδυασμός των *avr* γονιδίων μέσα σε ένα στέλεχος καθορίζει τη φυσιολογία της φυλής της παθοσειράς αυτής (24). Για τον λόγο αυτό τα *avr* γονίδια προσδίδουν την «ιδιαιτερότητα της φυλής» σε ένα παθογόνο το οποίο δίνει συμβατή αντίδραση σε σχέση με το φυτικό είδος που αλληλεπιδρά. Για παράδειγμα το *avrA*, το πρώτο γονίδιο αμολυσματικότητας που χαρακτηρίστηκε,

κλωνοποιήθηκε από το παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* φυλή 6 και όταν μεταφέρθηκε σε άλλες φυλές του *P. syringae* pv. *glycinea*, αυτές απέκτησαν την δυνατότητα να προκαλούν HR μόνο σε ποικιλίες σόγιας οι οποίες έφεραν το γονίδιο ανθεκτικότητας *Rpg2* (51). Σε ένα είδος ή σε ένα παθότυπο, τα γονίδια αμολυσματικότητας, υποθετικά, σε γενετικό επίπεδο, είναι εκείνα με την μεγαλύτερη ποικιλότητα στην εξελικτική πορεία της αλληλεπίδρασης ξενιστή παθογόνου (24). Τα γονίδια *avr* επίσης είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση των παθογόνων από μη δεκτικούς ξενιστές άλλου φυτικού είδους. Αυτό το είδος γονιδίων αμολυσματικότητας, πολλές φορές αναφέρονται ως ετερόλογα γονίδια αμολυσματικότητας. Το πρώτο ετερόλογο γονίδιο *avr*, το *avrRxv* απομονώθηκε από το βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Όταν το γονίδιο αυτό μεταφερθεί στο βακτήριο *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* το οποίο είναι συμβατό παθογόνο του φασολιού, πυροδοτεί την HR (61).

Επίσης γονίδια τα οποία έχουν αρχικά βρεθεί να ελέγχουν την μολυσματικότητα σε ποικιλίες των φυσικών ξενιστών τους, στην συνέχεια βρέθηκε να προκαλούν αμολυσματικότητα (HR) σε έναν μεγάλο αριθμό άλλων φυτών μη ξενιστών. Έτσι το *avrPphB* από το βακτήριο *P. syringae* pv. *phaseolicola* όταν μεταφερθεί στο βακτήριο *P. syringae* pv. *pisi* προκαλεί HR σε όλες τις ποικιλίες μπιζελιού οι οποίες εξετάστηκαν, ενώ το *avrPpiA* από το βακτήριο *P. syringae* pv. *pisi* όταν μεταφερθεί στο βακτήριο *P. syringae* pv. *phaseolicola* δείχνει ένα πρότυπο διαφοροποίησης σε διάφορες ποικιλίες φασολιού. Το γονίδιο *avrPphB* του βακτηρίου *P. syringae* pv. *phaseolicola* δείχνει να αλληλεπιδρά με το γονίδιο *RPS5* του *Arabidopsis thaliana* (49).

Μελέτες της δομής των *avr* γονιδίων και των προϊόντων τους γενικά έδειξαν: α) πολύ μικρή νουκλεοτιδική ομολογία μεταξύ διαφόρων *avr* γονιδίων αλλά και άλλων αλληλουχιών στις βάσεις δεδομένων, β) τα περισσότερα γονίδια κωδικεύουν για ένα προϊόν, έχουν δηλαδή ένα ORF (εκτός από ορισμένα όπως το *avrPphF* το οποίο κωδικεύει και μια τσαπερόνη), και γ) πρόσφατα έχει καταδειχθεί για ορισμένα από τα προϊόντα των *avr* γονιδίων ότι έχουν αναγνωρίσιμα λειτουργικά μοτίβα (62). Δεν υπάρχουν όμως αρκετά καταδεικτικά πειράματα για την μεταφορά των Avr

πρωτεϊνών δια μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Παρόλα αυτά υπάρχουν σαφείς ενδείξεις της δράσης τους στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων (49).

Από άποψη πρωτοταγής δομής υπάρχουν δύο ομάδες *avr* γονιδίων. Αυτά τα οποία έχουν ομοιότητα με το *avrBs3* και αυτά που δεν έχουν (56). Γονίδια τα οποία μοιάζουν με το *avrBs3* έχουν βρεθεί σε αρκετούς παθότυπους του *X. campestris* και έχουν αρκετά ευδιάκριτα χαρακτηριστικά: α) αλληλουχία 102bp η οποία επαναλαμβάνεται 15.5 έως 25 φορές, β) 34 επαναλήψεις αμινοξέων, εντοπισμένες κεντρικά μέσα στο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) του γονιδίου.

Τα εναπομείναντα *avr* γονίδια αποτελούν την δεύτερη ομάδα γονιδίων, τα οποία κωδικεύουν σχετικά μικρές πρωτεΐνες (18-40 kDa). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι υδρόφιλες και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου (57). Τα γονίδια αυτά έχουν βρεθεί κυρίως στο βακτήριο *P. syringae* αλλά έχουν εντοπιστεί και στα *X. campestris* και *R. solanacearum*. Τα προϊόντα μερικών από αυτά τα γονίδια είναι μεγαλύτερα, όπως το *avrA* (100kDa) από το *P. syringae pv. glycinea*, το *avrBs2* (80kDa) από το *X. campestris pv. vesicatoria* και *avrXca* (67kDa) από το *X. campestris pv. raphani*. Πολλά από αυτά τα *avr* γονίδια έχουν αναλογία G+C μεταξύ 40.0 και 50.0% το οποίο είναι κάτω από το φυσιολογικό ποσοστό G+C του συνολικού γενόματος των βακτηρίων αυτών (59.0-61.0% για το *P. syringae* και 63.5-69.2% για το *X. campestris*). Αυτό ίσως δείχνει ότι τα γονίδια αυτά έχουν αποκτηθεί από προγόνους με χαμηλή αναλογία G+C, μέσω οριζόντιας μεταφοράς (6,2). Η υπόθεση αυτή βέβαια είναι δύσκολο να αποδειχθεί. Εκτός αυτού όμως είναι κατανοητό ότι αυτά τα γνωρίσματα ίσως έχουν λειτουργική σημασία για τις παραγόμενες πρωτεΐνες.

Εκτός από τις Avr πρωτεΐνες το εκκριτικό σύστημα τύπου III εκκρίνει μια ακόμα ομάδα πρωτεϊνών με το όνομα χαρπίνες (59,2). Αυτές είναι πλούσιες σε γλυκίνη, άνευ κυστεϊνών, θερμικά σταθερές πρωτεΐνες που μπορούν να προκαλέσουν την αντίδραση υπερευαισθησίας αν προστεθούν εξωγενώς. Η πρώτη από αυτές τις πρωτεΐνες απομονώθηκε από το βακτήριο *E. amylovora* και μεταλλάξεις στο *hrpN*

γονίδιο του αφαιρεί την ικανότητα να προκαλέσει HR σε μη δεκτικούς ξενιστές ή να προκαλέσει ασθένεια στην αχλαδιά (59).

Οι χαρπίνες είναι εκκρινόμενες πρωτεΐνες οι οποίες δεν εμπλέκονται δομικά στον εκκριτικό αγωγό (*Hrp pilus*). Παρόμοια γονίδια, *hrpZ* στο *P. syringae* pv. *syringae* και *hrpN* στο *E. chrysanthemi* έχουν απομονωθεί και η έκκριση των προϊόντων τους εξαρτάται από το *hrp* γονιδιακό σύμπλεγμα (*hrp gene cluster*). Μια άλλη χαρπίνη η HrpW, η οποία περιέχει στο C-άκρο της μια περιοχή μοναδική για μια ομάδα ενζύμων, τις πηκτικές λυάσες, έχει απομονωθεί από το βακτήριο *E. amylovora* (17). Πιθανολογείται ότι η αλληλουχία αυτή είναι υπεύθυνη για την μεταφορά/πρόσδεση της πρωτεΐνης στο τοίχωμα του κυττάρου ξενιστή. Αντίθετα προς τις Avr πρωτεΐνες που χρειάζεται να παραδοθούν στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων, οι χαρπίνες μπορούν να προκαλέσουν HR όταν μεταφέρονται στην επιφάνεια των φυτικών κυττάρων (63), και να σχηματίζουν ιοντο-διαπερατά κανάλια σε τεχνητές διλιπιδικές μεμβράνες in vitro (64).

1.4 Pseudomonas syringae

Η ταξινομική ομάδα βακτηρίων *Pseudomonas syringae*, περιλαμβάνει τόσο επιφυτικά όσο και φυτοπαθογόνα βακτήρια, τα οποία χαρακτηρίζονται από στενή εξειδίκευση ως προς διάφορα είδη φυτών και κατατάσσονται ως «παθότυποι» (pathovars). Μέχρι σήμερα είναι γνωστοί περισσότεροι από 50 παθότυποι, οι οποίοι είναι καταχωρημένοι στην ομάδα αυτή, βάση της φυσιολογία τους και των βιοχημικών χαρακτηριστικών τους. Οι *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* και *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000 είναι δύο μέλη της ομάδας αυτής, με εξαιρετική σημασία για την έρευνα στον τομέα της Μοριακής Φυτοπαθολογίας τα τελευταία 15-20 χρόνια.

1.4.1 Pseudomonas syringae pv. phaseolicola

Το βακτήριο αυτό όπως και τα περισσότερα μέλη της ομάδας του, προκαλεί τις εξής δύο αντιδράσεις: α) επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) σε φυτά μη ξενιστές μετά από περίπου 24 hrs, ή β) ασθένεια με χαρακτηριστικά συμπτώματα: κηλιδώσεις στα σημεία της μόλυνσης, χλώρωση στα νεαρά φύλλα λόγω της δράσης της εξωτοξίνης που παράγει (φασεολοτοξίνη) και νανισμό στα φυτά ξενιστές. Στην φασολιά τα συμπτώματα εντοπίζονται στα φύλλα και στους λοβούς. Τα συμπτώματα της ασθένειας στα ευπαθή φυτά αλλά και η HR αντίδραση στα ανθεκτικά, εξαρτώνται από το σύμπλοκο γονιδίων *hrp* τα οποία βρίσκονται στο χρωμόσωμα του βακτηρίου.

1.4.2 Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000

Το βακτήριο αυτό έχει χαρακτηριστεί ως «το σωστό παθογόνο, στο σωστό φυτό, την κατάλληλη στιγμή». Το βακτήριο *P. syringae pv tomato DC3000* καθώς και συγγενικό του pathovar *P. syringae pv maculicola* αποτελούν αντικείμενα εντατικής μελέτης, όχι μόνο για τις ασθένειες που προκαλούν στην τομάτα και σε φυτά του

γένους cruciferae, αλλά και γιατί είναι φυτοπαθογόνα του φυτού μοντέλου *Arabidopsis thaliana*.

Έτσι λοιπόν τα βακτήρια αυτά χρησιμοποιούνται για να μελετηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί τις αντίδρασης του ξενιστή στην μόλυνση, αλλά και η κατανόηση του μηχανισμού της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR).

Η ανάλυση της μοριακής βάσης της παθογένειας στο *P. s. pv. tomato* DC3000 αποκαλύπτει ένα σύμπλοκο αλληλεπιδράσεων μεταξύ βακτηρίου και φυτικών κυττάρων, το οποίο εξαρτάται από την συντονισμένη έκφραση διαφόρων παραγόντων παθογένειας και μολυσματικότητας. Το σύμπλοκο αυτό περιλαμβάνει τοξίνες (coronatine), εξωκυτταρικές πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, καθώς και την μεταφορά πρωτεϊνών μέσα στα κύτταρα του φυτού με την βοήθεια του εκκριτικού συστήματος τύπου III (Hrp secretion system).

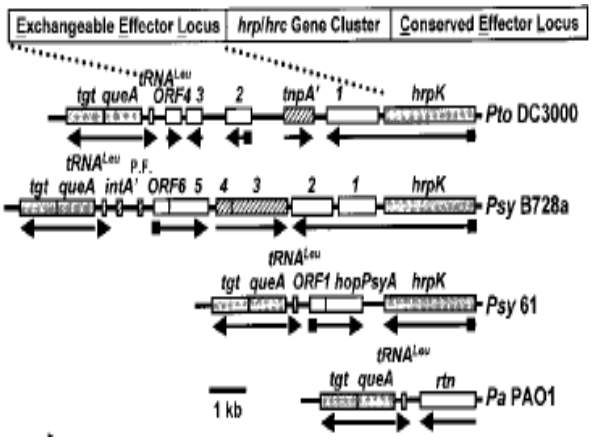
Γενικά χαρακτηριστικά: είναι Gram-αρνητικό αερόβιο βακτήριο. Είναι ραβδόμορφο και μετακινείται με πολικά τοποθετημένα μαστίγια. Είναι oxidase αρνητικό καθώς και arginine dihydrolase αρνητικό. DNA 58-60 mol% GC. Προκαλεί αντίδραση υπερευαισθησίας στον καπνό.

Συμπτώματα παθογένειας: <u>στην τομάτα (*Lycopersicon esculentum*)</u> προκαλεί καφέ-μαύρες κηλίδες οι οποίες πολλές φορές περιβάλλονται από ένα χλωρωτικό στεφάνι. Στον καρπό προκαλεί μαύρες επιφανειακές κηλίδες όταν ακόμα ο καρπός είναι πράσινος και βαθύτερες καθώς ο καρπός ωριμάζει. Σε φυτά τα οποία έχουν μολυνθεί από μικρά προκαλείται νανισμός και απώλεια της απόδοσης.

<u>*A.thaliana:*</u> προκαλούνται υδαρείς (water-soaked spreading) βλάβες, οι οποίες μερικές φορές περιβάλλονται από χλωρωτικό στεφάνι.

Επιδημιολογία: Το παθογόνο μεταφέρεται με τον σπόρο. Μπορεί να ζήσει ως σαπρόφυτο σε φυτικά υπολείμματα και στο χώμα καθώς και στην επιφάνεια των φύλλων. Διασκορπίζεται με την βροχή και διεισδύει μέσω τραυματισμών. Η ανάπτυξη του εξαρτάται από την υγρασία των φύλλων και την θερμοκρασία (optimum 13 – 25 ^{O}C).

1.4.2.1 Το βακτήριο P. s. pv. tomato DC3000 ως μοντέλο



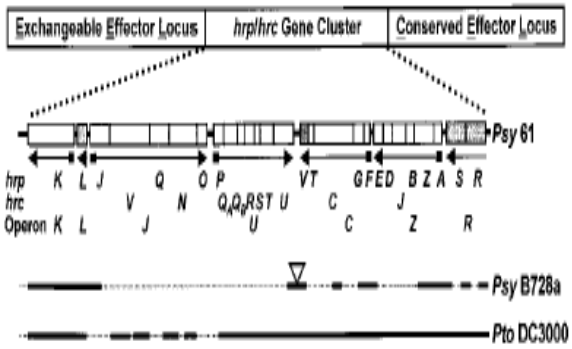
Εικόνα 8: Η περιοχές EEL των βακτηρίων *Pto* DC300, *Psy* B728a, *Psy* 61 και η tgt-queA-tRNALeu περιοχή του *P. aeruginosa*. (Alfano et al., PNAS, 2000)

Τεχνικές όπως οι RFLP, RAPD και AFLP έδειξαν ότι το βακτήριο *P. s. pv. tomato* DC3000 καθώς και το *P. s. pv. maculicola* ανήκουν στο ίδιο γενετικό είδος (genospecies): P. syringae γενετικό είδος III (11,37). Το *P. s. pv. tomato* DC3000 ανήκει στα βακτήρια της ομάδας I όσον αφορά τον τύπο του εκκριτικού συστήματος τύπου III, το σύστημα αυτό είναι σχετικά πιο κοντά με εκείνο του *Yersinia* spp παρά με εκείνο του *Xanthomonas* spp. Το εκκριτικό σύστημα τύπου III στο *P. s. pv. tomato* DC3000 ρυθμίζεται επίσης από *hrp* γονίδια, τα οποία κωδικεύουν ένα μίγμα από δομικούς και ρυθμιστικούς παράγοντες οι οποίοι δεν είναι συντηρημένοι, αν και πολλά *hrp* γονίδια του *P. s. pv. tomato* DC3000 δείχνουν να είναι συντηρημένα και σε άλλα φυτοπαθογόνα της ομάδας I. Η στόχευση ορισμένων πρωτεϊνών στο εκκριτικό σύστημα τύπου III φαίνεται να γίνεται σε επίπεδο RNA και πιθανώς το RNA να περιλαμβάνει στον σχηματισμό λούπας την αλληλουχία Shine-Dalgarno καθώς και το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. Η εξαρτώμενη από το RNA μεταφορά έχει αποδειχτεί πειραματικά για την εκκρινόμενη πρωτεΐνη *AvrPto* (3).

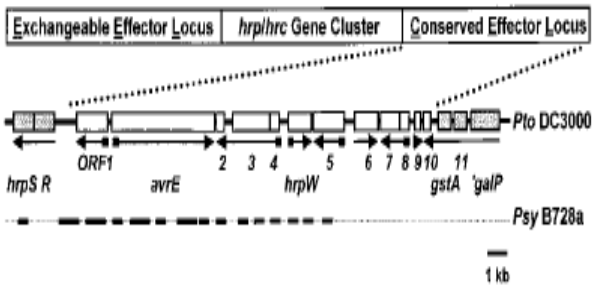
Το σύμπλεγμα των γονιδίων *hrp* στο *P. syringae* βρίσκεται στο κέντρο της νησίδας παθογένειας με τρεις διακριτούς γενετικούς τόπους που συνεισφέρουν διαφορετικά στην παθογένεια (Εικ.8,9,10). Τα *hrp* γονίδια των στελεχών 61 και DC3000 ομοιάζουν στην διευθέτηση τους παρόλο που τα *hrpA* γονίδια είναι σημαντικά διαφορετικά (28% ταυτόσημη αμινοξική αλληλουχία). Σε αντίθεση τα γονίδια *hrpA* των στελεχών 61 και B728a είναι 100% ταυτόσημα.

Παρόλα αυτά το B728a ξεχωρίζει από μια 3,6kb ένθεση που περιέχει ομόλογα των γονιδίων Ea59 και Ea31 του βακτηριοφάγου λ (12).

Η περιοχή μετά το κωδικόνιο λήξης του *hrpK* είναι εντελώς διαφορετική στα τρία στελέχη της *P. syringae* (Psy 61, Psy B728a, Pto DC3000). Αυτή η περιοχή ονομάζεται EEL (Exchangeable Effector Locus) (Εικ.8) και διαθέτει ένα σημαντικά χαμηλότερο περιεχόμενο σε G+C από την υπόλοιπη νησίδα παθογένειας και το γένομα της *P. syringae*. Ποικίλει στο μήκος της από 2,5kb ως 7,3kb στα τρία παραπάνω στελέχη και οριοθετείται από τις αλληλουχίες του *hrpK* και του *tRNALeu-queA-tgt*. Το τελευταίο έχει επίσης βρεθεί στην *P. aeruginosa* αλλά χωρίς σύνδεσμο με τα γονίδια του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Από την άλλη μεριά του συμπλέγματος των γονιδίων *hrp/hrc*, πέραν του *hrpR*, εντοπίζονται συντηρημένες αλληλουχίες CEL (conserved effector locus) περίπου 17kb (Εικ.10). Οι ομοιότητες που παρουσιάζονται μεταξύ της νησίδας παθογένειας της *P. syringae* και των ζωικών παθογόνων βακτηρίων είναι οι εξής: α) η παρουσία πολλών γονιδίων που σχετίζονται με την μολυσματικότητα (πολλά από αυτά με χαμηλότερο σχετικά περιεχόμενο σε G+C) σε μια μεγάλη (50kb) χρωμοσωμική περιοχή, β) σύνδεση στο 3΄ άκρο με ένα tRNA γονίδιο, γ) απώλεια του γενετικού αυτού τόπου σε στενό συγγενικό είδος, και δ) αστάθεια και κατοχή πολλών αλληλουχιών που έχουν χαρακτηριστικά μεταθετών στοιχείων (ιδιαίτερα στην EEL περιοχή) (12).



Εικόνα 9: Η περιοχή (hrp Gene claster) των hrp γονιδίων στων νησίδων Hrp, των βακτηρίων *Psy* 61, Psy B728a και *Pto* DC3000 (Alfano et al., PNAS, 2000)



Εικόνα 10: Η συντηρημένη περιοχή (CEL) των βακτηρίων *Pto* DC3000 και *Psy* B728a. Η νουκλεοτιδική ομολογία των αλληλουχημένων περιοχών είναι μεταξύ 72% και 83%.
(Alfano et al., PNAS, 2000)

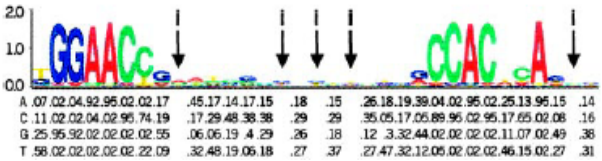
2. Ο σκοπός της εργασίας αυτής

Η εργασία αυτή ξεκίνησε με την διερεύνηση στο έως τότε γνωστό τμήμα του γονιδιόματος του βακτηρίου *Pseudomonas syringae pv tomato* DC3000, για τον εντοπισμό περιοχών ομόλογων με τα ήδη γνωστά γονίδια αμολυσματικότητας *avrPphF* και *avrPphE* του βακτηρίου *Pseudomonas syringae pv phaseolicola*, καθώς και του γονιδίου *avrPpiC2* του βακτηρίου *Pseudomonas syringae pv pisi*.

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα βιοπληροφορικής, DNAman, DNAstar και OMIGA, οι on line βάσεις δεδομένων NCBI και TIGR καθώς και τα on line εργαλεία βιοπληροφορικης PROSITE, CLUSTAL-W κ.α. Η διερεύνηση της ομολογίας έγινε σε επίπεδο νουκλεοτιδίων και αμινοξέων. Για λόγους ευχρηστίας τα γονίδια τα οποία μελετήθηκαν θα αναφέρονται με τα εξής ονόματα:

- **AvrPphE (pto)** D.N°: NP808672 ως ***avrPstE***
- **HopPtoC** D.N° : NP790436 ως ***avrPstC2***
- **SchF** D.N° : NP790352 ως ***avrPstF ORF1***
- **HopPtoF** D.N° : NP790351 ως ***avrPstF ORF2***

Ο εκινητής των avr γονιδίων (*hrp box*) του βακτηρίου *Pseudomonas syringae pv tomato* DC3000 έχει μια συγκεκριμένη αλληλουχία (Εικ.11) (14).



Εικόνα 11:Γενική εικόνα του εκινητή των hrp γονιδίων του βακτηρίου *Pseudomonas syringae pv tomato* DC3000. (13)

Για τον εντοπισμό και την μελέτη των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η ήδη γνωστή αλληλουχία των αρχέτυπων γονιδίων από το βακτήριο *Pseudomonas syringae pv phaseolicola* για αναζήτηση ομολογίας μέσω του προγράμματος BLAST στο αλληλουχημένο τμήμα του γονιδιόματος του *P.s. pv. tomato* το οποίο βρίσκεται στο διαδίκτυο στην βάση δεδομένων TIGR. Αφού βρέθηκε ομολογία, το επόμενο βήμα ήταν η εύρεση των κωδικονίων έναρξης (ATG) και της περιοχής όπου βρίσκεται το *hrp box* του

γονιδίου. Αφού βρέθηκαν τα ATG των γονιδίων, έγινε μετάφραση της αλληλουχίας του DNA με την βοήθεια του προγράμματος DNAman, ώστε να ακολουθήσει στοίχιση με το πρόγραμμα BLAST σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας. Τα αποτελέσματα των διαδικασιών αυτών παρατίθενται σε παρακάτω ενότητα.

Σκοπός της εργασίας ήταν ο έλεγχος της λειτουργικής εξειδίκευσης των γονιδίων που προαναφέρθηκαν ως προς τον φαινότυπο της αμολυσματικότητας σε γενετικά χαρακτηρισμένες ποικιλίες φασολιού, οι οποίες δείχνουν γνωστές αντιδράσεις γονιδίου-προς-γονίδιο με τα ομόλογα γονίδια *avr* του παθογόνου στην φασολιά βακτήριο *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola*. Για τον λόγο αυτό μετασχηματίστηκαν στελέχη του βακτηρίου (επιλεγμένες φυλές) και τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την μόλυνση διαφόρων ποικιλιών φασολιού (βλέπε παρακάτω). Έγινε επίσης μετασχηματισμός βακτηρίων του είδους *Pseudomonas aptata* με τα παραπάνω γονίδια ώστε να γίνει έλεγχος παθογένειας σε διάφορες ποικιλίες σακχαρότευτλων, θεωρούμενα ως ένα άλλο ετερόλογο ξενιστή των βακτηρίων από τα οποία προήλθαν τα προαναφερθέντα γονίδια *avr*. Έγινε επίσης κλωνοποίηση των ίδιων γονιδίων σε φορείς έκφρασης στο *A. tumefaciens*. Σκοπός μας ήταν ο μετασχηματισμός του αφοπλισμένου ογκογόνου στελέχους *A. tumefaciens* LBA 4404 αλλά και στελεχών αγρίου τύπου ώστε να μελετηθούν τα αποτελέσματα της έκφρασης των γονιδίων αυτών εντός του κυττάρου διαφόρων ξενιστών με την μέθοδο του αγροεμποτισμού και να ελεγχθεί η πειραματική εφαρμογή της μεθόδου της ¨Αγροκαταστολής¨, καταστολής της ογκογόνου δράσης του *A. tumefaciens* αγρίου τύπου (Agro-suppression) σε ευρύτερο φάσμα ξενιστών.

3. Υλικά και μέθοδοι

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή έλαβαν χώρα τεχνικές και πειράματα απομόνωσης γενομικού και πλασμιδιακού DNA βακτηρίων, κλωνοποίησης γονιδίων, ανάλυσης βακτηριακού πληθυσμού, έλεγχος παθογένειας μετασχηματισμένων και μη βακτηρίων, καθώς και μελέτες βιοπληροφορικής για την εύρεση ομόλογων γονιδίων και πρωτεϊνών. Στο κεφάλαιο αυτό θα αναφερθούμε εκτενέστερα στην

θεωρία και πρακτική των μεθόδων αυτών και θα παραθέσουμε τους πλήρεις χάρτες κάθε κατασκευής.

3.1 Υλικά

3.1.1 Προέλευση αντιδραστηρίων και υλικών

Τα υλικά, που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής προήλθαν από τις εταιρείες PHARMACIA, PROMEGA, SIGMA CHEMICALS, United States Biochemicals (USB), STRATAGENE και MERK. Τα περιοριστικά ένζυμα για την κοπή και κλωνοποίηση των νουκλεϊκών οξέων προήλθαν από τις εταιρείες MINOTECH, New England Biolabs (NEB) και PROMEGA. Τα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας των βακτηριακών στελεχών ήταν από την DIFCO, MERK και SIGMA CHEMICALS. Τα ολιγονουκλεοτίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης προήλθαν από την εταιρεία MINOTECH.

3.1.2 Πλασμιδιακοί φορείς-Στελέχη βακτηρίων

Για τη δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς: για έκφραση στο βακτήριο *Pseudomonas* χρησιμοποιήθηκαν οι φορείς της οικογένειας pBBR1 MCS, για το *Agrobacterium* οι φορείς, pBIN-Hyg-Tx (προσφορά από Dr. M.Gatz) και pART27, όπως και οι φορείς pART7 και pUC-A7-Tx για κατασκευή κασέτας για ευκαρυωτική έκφραση. Καθώς επίσης και το πλασμίδιο pRK2013 για υποβοηθούμενη συζευκτική μεταφορά πλασμιδίων στο *Agrobacterium* και στο *Pseudomonas*.

Τα βακτηριακά στελέχη *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν : DH5a και HB101, οι γονότυποι των οποίων περιγράφονται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο των Sambrook et al. Το στέλεχος HB101(pRK2013) χρησιμοποιήθηκε για την τρι-γονική σύζευξη. Τα στελέχη της Ψευδομονάδας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, Φυλή 6, το *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola RW60 καθώς και το *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000. Για το γενετικό μετασχηματισμό

των φυτών χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Αγροβακτηρίου LBA4404 (Rif^R), καθώς και Αγροβακτηρίου αγρίου τύπου, για τον έλεγχο ογκογένεσης ή της καταστολής της (Agrosuppression).

3.1.3 Καλλιέργειες βακτηρίων

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών *E. coli* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο LB (Luria and Bertani), τόσο σε υγρή όσο και σε στερεά μορφή. Τα θρεπτικά υλικά, στερεά και υγρά, καθώς και τα διαλύματα των αντιβιοτικών παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τους Sambrook et al. Για την καλλιέργεια των Ψευδομονάδων και των Αγροβακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο King's B (KB), σε υγρή και στερεή μορφή, παρασκευασμένο σύμφωνα με τους King et al., εκτός του ότι το MgSO4 αποστειρώθηκε με διήθηση και προστέθηκε ασηπτικά εκ των υστέρων στο θρεπτικό μέσο, μετά την θερμική αποστείρωση του τελευταίου.

3.1.4 Θρεπτικά υλικά

Για την ανάπτυξη των βακτηρίων P. syringae, *A. tumefaciens* και E. coli όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά διαλύματα LB (Luria-Bertani) και KB (King's B). Η σύστασή τους αναφέρεται παρακάτω.

Για 1lit **LB**: 5g εκχύλισμα ζύμης, 10 g tryptone, 5 g NaCl και 12 g άγαρ (στην περίπτωση που επιθυμούμε να φτιάξουμε στερεό θρεπτικό, σε petri, δοκιμαστικούς σωλήνες κτλ) με νερό σε τελικό όγκο 1 L.

Κατόπιν αποστειρώνουμε το θρεπτικό διάλυμα σε αυτόκαυστο κλίβανο αποστείρωσης.

Για 1lit **KB**: 20 g proteose peptone No3, 1,5 g K_2HPO_4, 1,5 g $MgSO_4$ και 12 g άγαρ με νερό σε τελικό όγκο 1L. Το θειϊκό μαγνήσιο προστίθεται μετά την αποστείρωση στον κλίβανο λόγω προβλημάτων καθίζησης.

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

<u>Πρωτόκολλο μεσαίας κλίμακας με την βοήθεια φαινόλης</u>:

Διαμοιράζουμε σε 2 falcons των 50 ml, 100 ml βακτηριακής καλλιέργειας, που μεγάλωναν για όλη τη νύχτα (O/N) στους 37 C^0 (για το βακτήριο *E. coli*) ή στους 28 C^0 (για τα βακτήρια *Agrobacterium* και *P. syringae*) και τα φυγοκεντρούμε στις 3500 rpm για 30 λεπτά. Χύνουμε το υπερκείμενο αφήνοντας το ίζημα όσο πιο στεγνό γίνεται. Από δω και στο εξής δουλεύουμε στους 4 C^0. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 2 ml διαλύματος GET (50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM TrisCl pH=8), αναδεύουμε ισχυρά με την βοήθεια vortex, και μεταφέρουμε σε δοκιμαστικούς σωλήνες Corex. (Η γλυκόζη διατηρεί την οσμωτική πίεση και εμποδίζει την λύση των κυττάρων. Το EDTA εξασθενεί την κυτταρική μεμβράνη και απομακρύνει τα ιόντα Mg που χρησιμοποιούν οι DNases, προστατεύοντας έτσι το DNA). Προσθέτουμε 4 ml φρέσκου διαλύματος: 0,2N NaOH, 1% SDS και αναδεύουμε αντιστρέφοντας τους σωλήνες 2-3 φορές. (Το SDS διαλυτοποιεί τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και αποδομεί τις κυτταρικές πρωτεΐνες. Το NaOH διαχωρίζει το δίκλωνο DNA σε μονόκλωνα μόρια. Τα πλασμίδια παρόλα αυτά παραμένουν ενωμένα σαν ένα δακτυλίδι μέσα στο άλλο και στο επόμενο βήμα επανέρχονται στην αρχική δίκλωνη μορφή τους. Σε αυτό το στάδιο δεν αναδεύουμε ισχυρά μια και αυτό θα έχει σαν κατάληξη την παραλαβή γενομικού DNA. Το διάλυμα NaOH πρέπει να είναι φρέσκο ή να έχει φυλαχτεί σε φιάλη με ελαστικό πώμα σφραγισμένο με βαζελίνη (ώστε να μην έχει λάβει χώρα οξίνιση μέσω του διοξειδίου του άνθρακα που βρίσκεται στον αέρα). Προσθέτουμε 3 ml παγωμένο διάλυμα 5M CH3COO-, 3M K+ (KCl), pH=4,8 και αναδεύουμε απότομα. Επωάζουμε στους 4 C^0 για 5 λεπτά. (Το διάλυμα αυτό εξουδετερώνει το βασικό pH λόγω του NaOH και επιτρέπει την επανάκτηση της διπλόκλωνης μορφής του DNA. Το CH_3COOK κατακρημνίζει το SDS, τις πρωτεϊνες, τα λιπίδια και μεγάλα μόρια DNA). Φυγοκεντρούμε στις 15000g για 30 λεπτά, στους 4 C^0. (Με αυτόν τον τρόπο διαχωρίζουμε την διαλυτή φάση από το ίζημα). Φιλτράρουμε σε χωνάκι με υαλοβάμβακα και παίρνουμε το

υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα falcon 15ml. Προσθέτουμε 0,05 mg/ml Rnase A (QIAGEN) και επωάζουμε στους 37ο C για 20 λεπτά. Προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος φαινόλης - χλωροφόρμιου σε αναλογία 1:1, αναδεύουμε ισχυρά με την βοήθεια συσκευής vortex και φυγοκεντρούμε στις 3500 rpm για 5 λεπτά. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καινούριο σωλήνα falcon και προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφορμίου, αναδεύουμε ισχυρά με την βοήθεια συσκευής vortex και φυγοκεντρούμε στις 3500 rpm για 5 λεπτά. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε σωλήνα Corex. Προσθέτουμε 0.7M παγωμένη ισοπροπανόλη και αναδεύουμε. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 30 λεπτά στους 4 C^0. Χύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 2 ml 70% αιθανόλης στο ίζημα. Φυγοκεντρούμε στις 13000rpm για 30 λεπτά στους 4 C^0. Χύνουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε καλά το ίζημα. Επαναδιαλύουμε σε 100 μl H2O.

<u>Πρωτόκολλο μικρής κλίμακας με την βοήθεια φαινόλης</u>: Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η μέθοδος της αλκαλικής λύσης.

Απομόνωση πλασμιδίων από υγρές καλλιέργειες των 2 ml: Μεταφέρουμε με μια αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα μια αποικία από φρέσκο τριβλύο και εμβολιάζουμε 2 ml υγρού θρεπτικού μέσου KB ή LB προσθέτοντας την κατάλληλη ποσότητα αντιβιοτικού. Τοποθετούμε για επώαση τις υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων για όλη τη νύχτα (O/N) στους 37 ºC (*E. coli*) ή 25-28 ºC (*Pseudomonas* ή *Agrobacterium*) με συνεχή ανακίνηση. Ακολουθεί φυγοκέντριση των 1,5 ml της υγρής καλλιέργειας στις 12.000 στροφές για 30΄΄ στους 4 ºC. Το υπόλοιπο της καλλιέργειας αποθηκεύεται στους 4 ºC. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε την πελλέτα σε 100 μL από κρύο διάλυμα I με vortex. Κατόπιν προσθέτουμε 200 μL από το διάλυμα II. Ακολουθεί ήπια ανακίνηση του μίγματος 4-5 φορές. Τοποθετούμε στον πάγο. Στη συνέχεια προσθέτουμε 150 μL διαλύματος III ακολουθεί ήπια ανακίνηση και αποθήκευση στον πάγο για 5΄ λεπτά. Κατόπιν το μίγμα φυγοκεντρείται στις 12.000 στροφές για 5΄ λεπτά στους 4º C. Ακολουθεί μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωληνάκι και προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος φαινόλης – χλωροφορμίου (1:1). Ανάμιξη με ανακίνηση και φυγοκέντριση στις 12.000 στροφές για 2΄ λεπτά στους 4ο C. Το προηγούμενο βήμα επαναλαμβάνεται με

χλωροφόρμιο μόνο για να ξεπλυθούν τα υπολείμματα της φαινόλης. Στη συνέχεια κατακρημνίζεται το DNA με διπλάσιο όγκο απόλυτης αιθανόλης .Το μίγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 2΄ λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντριση στις 12.000 στροφές για 5΄ λεπτά στους 4° C. Κατόπιν αφαιρείται με προσοχή το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml αιθανόλης 70%. Το μίγμα φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες και στη συνέχεια η πελλέτα του DNA αφήνεται να στεγνώσει για δέκα λεπτά στους 37° C. Τέλος το DNA επαναδιαλύεται σε 50 ή 20 μL αποστειρωμένου νερού και αποθηκεύεται στους −20° C.

Η διαδικασία, όπως περιγράψαμε και παραπάνω, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για μεγαλύτερου όγκου υγρές καλλιέργεια. Ακολουθούνται έπ' ακριβώς τα βήματα της προηγούμενης περιγραφής με διαφορά μόνο στις ποσότητες των διαλυμάτων που προστίθενται. Έτσι για ίζημα από 100 ml καλλιέργειας προστίθενται 4 ml από καθένα από τα τρία διαλύματα I, II και III. Τα διαλύματα φαινόλης / χλωροφορμίου, χλωροφορμίου προστίθενται σε ίσο όγκο προς το ληφθέν υπερκείμενο. Η κατακρήμνιση του DNA γίνεται με 2,5 όγκους απόλυτης αιθανόλης και το ξέπλυμα του ιζήματος με 3 ml αιθανόλης 70%. Το DNA επαναδιαλύεται σε 100 μL H_2O.

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

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

Διάλυμα II: 0,2 N NaOH, 1% SDS.

Διάλυμα III: 60 ml από 5 M οξικό κάλιο, 11,5 ml παγωμένο οξικό οξύ, 28,5 ml νερό.

3.2.2 Πρωτόκολλο μεσαίας κλίμακας με την βοήθεια στήλης ανιοντοανταλλαγής (QIAGEN)

100 ml βακτηριακής καλλιέργειας, που μεγάλωναν O/N στους 37ο C, διαμοιράζονται σε 2 falcons των 50 ml και φυγοκεντρούνται στις 3500 rpm για 30 λεπτά. Πετάμε το υπερκείμενο αφήνοντας το ίζημα όσο πιο στεγνό γίνεται. Από δω και στο εξής δουλεύουμε στους 4ο C. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε διάλυμα: 50mM Tris pH 8, 10mM EDTA, 100μg/ml RNase A. Προσθέτουμε 4 ml διαλύματος 200mM NaOH, 1%SDS (w/v) και αναμιγνύουμε ελαφρά, επωάζουμε σε

θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Προσθέτουμε 4 ml παγωμένου διαλύματος 3M CH3COOK pH 5,5, αναμιγνύουμε ελαφρά και επωάζουμε στον πάγο για 15 ως 20 λεπτά. Φυγοκεντρούμε στα 20000xg για 30 λεπτά στους 4° C και παίρνουμε το υπερκείμενο που περιέχει το πλασμίδιο. Φιλτράρουμε σε χωνάκι με υαλοβάμβακα και παίρνουμε το υπερκείμενο σε καθαρό falcon. Εξισορροπούμε την στήλη QIAGEN-tip 100 με 4 ml διαλύματος: 750mM NaCl, 50mM MOPS pH 7, 15% ισοπροπανόλη (v/v), 0,15% Triton X-100 (v/v) σε θερμοκρασία δωματίου. (Το διάλυμα διέρχεται στη στήλη παθητικά. Το υλικό της στήλης περιέχει θετικά φορτισμένες ομάδες DEAE [diethylaminoethanol] που συγκρατούν τον αρνητικά φορτισμένο σκελετό φωσφόρων του DNA). Παρουσία 750mM NaCl στην στήλη δεν μπορούν να κρατηθούν πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, μεταβολίτες και χρωστικές). Φορτώνουμε στην στήλη το υπερκείμενο και αφήνουμε να περάσει με την βαρύτητα. Ακολουθούν 2 εκπλύσεις της στήλης με 10 ml διαλύματος: 1M NaCl, 50mM MOPS pH 7 και 15% ισοπροπανόλη (v/v). (Παρουσία 1M αλατιού απομακρύνονται από την στήλη tRNA, 5S RNA και rRNA που τυχόν κατακρατήθηκαν στο προηγούμενο βήμα). Η έκλυση του DNA γίνεται με 5 ml διαλύματος 1,25 M NaCl, 50mM TrisCl pH 8,5 και 15% ισοπροπανόλη (v/v). (Σε αυτό το βήμα αυξάνεται το pH για να εκλουσθεί το πλασμίδιο σε μικρότερη συγκέντρωση NaCl, ίση με 1,25 M). Κατακρημνίζουμε το DNA με 0,7 όγκους ισοπροπανόλης φυγοκεντρώντας στα 15.000xg για 30 λεπτά, στους 4° C. (Κατακρήμνιση με προπανόλη οδηγεί σε λιγότερη κατακρήμνιση αλάτων). Ξεπλένουμε το ίζημα με 2ml 70% αιθανόλης και φυγοκεντρούμε στα 15.000xg για 10 λεπτά. Προσεχτικά αφαιρούμε το υπερκείμενο. Στεγνώνουμε το ίζημα για 5 με 10 λεπτά και το επαναδιαλύουμε σε 100 μl H_2O.

3.2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA

Ηλεκτροφόρηση είναι η τεχνική κατά την οποία φορτισμένα μόρια κινούνται σε ηλεκτρικά πεδία. Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει σε διάλυμα ή με κάποιο στερεό μέσο (ηλεκτροφόρηση σε ζώνες). Η κινητικότητα του κάθε μορίου είναι ανάλογη της εφαρμοζόμενης τάσης επί το καθαρό φορτίο του μορίου δια την τριβή που εμφανίζεται λόγω του σχήματος και του μεγέθους του.

Στην μέθοδο της ηλεκτροφόρησης πηκτής τα μόρια διαχωρίζονται σε υδατικά διαλύματα μέσα σε μια μήτρα πηκτής. Μέσα στις πηκτές αναπτύσσονται τριβές που ορίζουν και την αποτελεσματικότητα των διαχωρισμών. Στην ηλεκτροφόρηση του DNA χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης σε συγκεντρώσεις από 0.7% ως 2% ανάλογα με το μήκος του τμήματος ή των τμημάτων που θέλουμε να δούμε κάθε φορά. Η ηλεκτροφόρηση έλαβε σε διάλυμα TBE (10x TBE: 108 g Tris base 55 g boric acid 40 ml 0.5 M EDTA, pH=8 distilled water to 1 liter), ενώ η πηκτή είχε στερεοποιηθεί παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου για να είναι ορατή η εξέλιξη της ηλεκτροφόρησης.

3.2.4 Ενζυμικοί χειρισμοί του DNA

<u>Πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες</u>

Δύο είδη πέψεων εκτελέστηκαν κατά την διάρκεια της κλωνοποίησης: 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 υλικού στον φορέα.

Ένζυμα

Τα ένζυμα δεν πρέπει να απομακρύνονται από τους −20ο C και θα πρέπει να είναι τα τελευταία που προστίθενται στο διάλυμα της αντίδρασης. Η ενεργότητα των περιοριστικών ενδονουκλεασών καθώς και των λοιπών ενζύμων μετριέται σε συμβατικές μονάδες (standard activity units). Στην συγκεκριμένη περίπτωση 1U είναι η ποσότητα η απαιτούμενη για την πλήρη πέψη 1μg λ DNA 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 στο ίδιο το υπόστρωμα. Απαιτούνται γενικά περισσότερα Units για την πλήρη πέψη supercoiled DNA από ότι απαιτείται στην περίπτωση του λ DNA. Η ποσότητα του προστιθέμενου ενζύμου δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 10% του όγκου της αντίδρασης διότι προμηθεύεται σε 50% διάλυμα γλυκερόλης, η τελική συγκέντρωση της οποίας στην αντίδραση δεν πρέπει να ξεπερνάει το 5%. Τα ένζυμα μπορεί να χάσουν την ειδικότητα τους λόγω υψηλής συγκέντρωσης γλυκερόλης καθώς επίσης και στις περιπτώσεις όπου έχουν προστεθεί πολλά περισσότερα Units από τα απαιτούμενα στην αντίδραση.

Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (buffer)

Τα ένζυμα προμηθεύονται από της εταιρείες μαζί με ένα ρυθμιστικό διάλυμα συγκεντρωμένο κατά 10X, στο οποίο το ένζυμο έχει 100% βέλτιστη απόδοση. Στην αντίδραση της πέψης θα πρέπει να περιέχεται τελικά αυτό σε συγκέντρωση 1X. Μερικά περιοριστικά ένζυμα απαιτούν την παρουσία BSA (bovine serum albumin) σε τελική συγκέντρωση 100 μg/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 όταν αυτή είναι παρούσα στο διάλυμα αντίδρασης.

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 ^{o}C για τα περισσότερα ένζυμα. Τα περιοριστικά ένζυμα που έχουν απομονωθεί από θερμόφιλα βακτήρια απαιτούν υψηλότερες θερμοκρασίες από 50 ^{o}C ως 65 ^{o}C. Ο χρόνος επώασης συνήθως είναι μεγαλύτερος από τον απαιτούμενο και χρησιμοποιούνται μικρότερες ποσότητες ενζύμου.

Αντίδραση λιγάσης

Η αντίδραση λιγάσης έγινε με την T4 DNA λιγάση η οποία έχει την δυνατότητα να συγκολλάει συμβατά προεξέχοντα αλλά και τυφλά άκρα DNA. Οι συνθήκες τις αντίδρασης ήταν είτε στους 25 ^{o}C για 4 ώρες, είτε στους 16 ^{o}C σε ολονύχτια επώαση, είτε ακολουθήθηκαν συνθήκες κυκλικής αλλαγής της θερμοκρασίας από τους 10° C στους 30 ^{o}C, (Lund *et al.,* 1996).

Αντίδραση αποφωσφορυλίωσης

Στην κλωνοποίηση ο φορέας επεξεργάζεται κατάλληλα ώστε να αποφωσφορυλιωθούν τα 5΄ άκρα του. Με αυτό τον τρόπο κατά την διάρκεια της αντίδρασης λιγάσης τα άκρα του δεν θα επανασυνκολλήθουν μεταξύ τους. Με τον τρόπο αυτό υπάρχουν περισσότερες πιθανότητες ένωσης του φορέα με το επιθυμητό προς κλωνοποίηση τμήμα DNA. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται κατά την διαδικασία της αποφωσφορυλίωσης, είναι η αλκαλική φωσφατάση η οποία απομονώθηκε από έντερο μόσχου (Calf Intestine alkaline Phosphatase). Το ένζυμο προστίθεται συνήθως μέσα στο διάλυμα της πέψης η οποία έχει προηγηθεί, μια και είναι ενεργό στα περισσότερα ρυθμιστικά συστήματα και επωάζεται 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 προσθέτουμε νέα ποσότητα ενζύμου και επαναλαμβάνουμε στους 37°C και 56°C από 15 λεπτά.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η PCR είναι μία εργαστηριακά ελεγχόμενη, in vitro, αντίδραση πολυμερισμού του DNA, η οποία μιμείται ως ένα βαθμό την φυσική διαδικασία του αναδιπλασιασμού του DNA. Συγκεκριμένα καταλύεται από μία DNA-εξαρτώμενη-DNA-πολυμεράση, η οποία βάσει ενός δίκλωνου, τοπικά ξεδιπλωμένου τεμαχίου DNA (template) και παρουσία ενός ζεύγους κατάλληλων εκκινητών, των τεσσάρων dNTPs ιόντων Mg^{++}, κλπ, συνθέτει in vitro έναν τεράστιο αριθμό νέων μορίων DNA. Η διαδικασία αυτή καλείται ενίσχυση ή μεγένθηση του DNA. Οι εκκινητές σχεδιάζονται κατάλληλα λαμβάνοντας υπόψη ποικίλες παραμέτρους όπως: να μην παρουσιάζουν εσωτερική συμπληρωματικότητα (hairpins, self-dimers) ούτε συμπληρωματικότητα μεταξύ τους (pair-dimers) κυρίως όχι στο 3΄ άκρο, το περιεχόμενο σε GC πρέπει να είναι από 40% ως 60%, καθώς και ότι η χρήση περιοριστικών θέσεων πρέπει να γίνεται προς το 5' άκρο. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι η Taq πολυμεράση είτε η DeepVent (Biolabs). Η Taq πολυμεράση δεν διαθέτει 3' προς 5' ενεργότητα εξωνουκλεάσης, σε αντίθεση με την DeepVent και δεν μπορεί να διορθώσει τα λάθη της. Έτσι τα ενισχυμένα τμήματα πιθανών να φέρουν συχνότερες μεταλλαγές.

Η PCR περιλαμβάνει μία ακολουθία ταυτόσημων κύκλων (25-35), καθένας από τους οποίους αποτελείται από τρία στάδια:

- Το στάδιο της αποδιάταξης του εκμαγείου DNA
- Το στάδιο της επανασύνδεσης του εκμαγείου με τους εκκινητές
- Το στάδιο της επιμήκυνσης των δεσμευμένων εκκινητών

Συνήθης σύσταση μίας αντίδρασης PCR:
20.0mM Tris-HCl (pH 8.3-8.8)
50.0mM KCl
50.0-200.0mM dNTPs
0.5-2.5mM MgCl
1.0-2.5 μονάδες Taq πολυμεράσης
Τελικός όγκος αντίδρασης 25-100ml

3.2.5 Απομόνωση DNA από διάλυμα μετά τον ενζυμικό χειρισμό

Απομόνωση με QIAquick

Ακολουθούμε 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 ενζυματικές αντιδράσεις. Τμήματα που είναι μεταξύ 100 bp και 10kb μπορούν να διαχωριστούν από εκκινητές, νουκλεοτίδια, ένζυμα και αλάτια, χρησιμοποιώντας τις κολώνες φυγοκέντρησης QIAquick.

Απομόνωση με φαινόλες

Προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης / χλωροφορμίου / ισοαμυλικής αλκοόλης (25 : 24 : 1) στο διάλυμα όπου έχουμε το προς καθαρισμό δείγμα DNA. Αναδεύουμε ισχυρά για 10 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρούμε στις 12000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέρουμε την διαυγή φάση σε νέο eppendorf. Προσθέτουμε 1/10 του όγκου 3M CH3COONa pH 5.2 και αναδεύουμε ισχυρά. Προσθέτουμε 2 με 2,5 όγκους απόλυτης αιθανόλης (100%) παγωμένης και αναδεύουμε ισχυρά. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 13500 rpm και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Προσθέτουμε ίσο όγκο 70% αιθανόλη και φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 13500rpm. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, στεγνώνουμε το ίζημα στον αέρα και επαναδιαλύουμε στον επιθυμητό όγκο νερού.

Απομόνωση ζώνης DNA από gel αγαρόζης

Ακολουθούμε το πρωτόκολλο QIAquick Gel Extraction Kit Protocol του εγχειριδίου 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.

3.2.6 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων

Επωάζουμε τα στελέχη του βακτηρίου *E. Coli* (JM 83, HB 101) όλο το βράδυ με 1,5 ml θρεπτικού LB. Μολύνουμε με 1 ml από την προηγούμενη καλλιέργεια μια ποσότητα 200 ml LB αντίστοιχα, που βρίσκετε σε φλάσκες των 2 L για καλό αερισμό. Ακολουθεί επώαση με ισχυρή ανάδευση στους 37° C μέχρι η οπτική απορρόφηση (OD) στα 600 nm να γίνει μεταξύ 0,6 και 0,8. Αυτό απαιτεί περίπου 2 ώρες. Στη συνέχεια η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 2500 στροφές για δέκα λεπτά και στους 4° C. Κατόπιν απορρίπτεται το υπερκείμενο και η βακτηριακή πελλέτα επαναδιαλύεται σε 15-30 ml διαλύματος Tfb I χωρίς vortex και στην συνέχεια τοποθετείται στον πάγο. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 30΄ λεπτά. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντριση των επαναδιαλυμένων κυττάρων στις 2000 στροφές για 10΄ λεπτά και στους 4° C. Κατόπιν επαναδιαλύονται τα κύτταρα σε 4 ml διαλύματος Tfb II με προσοχή και υπομονή. Η ποσότητα των επαναδιαλυμένων κυττάρων μοιράζεται σε 80 περίπου κρύα eppendorf (100μL το καθένα). Τέλος τα eppendorf ψύχονται σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους −80° C.

Διαλύματα Tfb I και Tfb II :

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.

3.2.7 Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

Τα επιδεκτικά κύτταρα φυλάσσονται στους −80oC και πριν την χρήση τους τα αφήνουμε να ξεπαγώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία τα τοποθετούμε στον πάγο και παίρνουμε 100 μl για κάθε μετασχηματισμό σε ξεχωριστούς σωλήνες eppedorf. Προσθέτουμε στο διάλυμα των επιδεκτικών κυττάρων 10 μl από το διάλυμα του DNA με το οποίο θέλουμε να τα μετασχηματίσουμε [στην συγκεκριμένη περίπτωση: pHIS-X1(34) και pHIS-X1(19)]. 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 τους στον πάγο, όπου και παραμένουν για 5΄ λεπτά. Προσθέτουμε 400 μl υγρού LB (Luria Bertani medium: 1% bacto-tryptose, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl) και επωάζουμε στους 37°C για 30΄ – 60΄ λεπτά. Στη συνέχεια εμβολιάζουμε τριβλίο που περιέχει LB (Luria Bertani medium: 1% bacto-tryptose, 0.5%bacto-yeast extract, 1% NaCl, 1.5% bacto-agar) και αμπικιλίνη και επωάζουμε O/N στους 37°C.

3.2.8 Τριγονική σύζευξη (Triparental mating)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την μεταφορά των πλασμιδίων / κατασκευασμάτων (constructs) από το *E. coli* στο *P. syringae pv. phaseolicola* και σε *Agrobacterium tumefaciens.*

Χρησιμοποιήθηκαν τα βακτήρια:

1. *E. coli* JM 83 που περιέχει το κατασκευασμένο πλασμίδιο (donor)
2. *E. coli* (pRK 2013) το οποίο χρησιμοποιείται ως βοηθητικό στέλεχος για την μεταφορά μη συζευκτικών πλασμιδίων κλωνοποίησης (helper)
3. *P. syringae pv. phaseolicola* Race 6 και RW60, A. tumefaciens LBA4404 και A. tumefaciens αγρίου τύπου (recipient).

Από O/N (ολονύχτια) υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων, 1ml φυγοκεντρείται με σκοπό την ίζηματοποίηση των βακτηρίων. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 500μl LB. Αυτό επαναλαμβάνεται τρεις φορές (για το ξέπλύμα των αντιβιοτικών). Μετά το τρίτο πλύσιμο η πελλέτα επαναδιαλύεται σε 500μl LB. Σε ένα eppendorf παρασκευάζουμε ένα μίγμα από 200μl του στελέχους-δέκτη, 100μl στελέχους δότη και 100μl του βοηθητικού στελέχους. Αναμειγνύουμε με vortex. Αφήνουμε 15-30min για επώαση. Στην συνέχεια ποσότητα των 20μl τοποθετείται στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υλικού σε τριβλύο petri χωρίς αντιβιοτικά όπου και αφήνεται O/N στους 25-28 °C. Κατόπιν, με μία αποστειρωμένη λούπα αφαιρούμε μικροποσότητα βακτηρίων και τα απλώνουμε σε στερεό θρεπτικό υλικό με τα κατάλληλα αντιβιοτικά για να γίνει η τελική επιλογή, αποικιών-προϊόντων σύζευξης.

3.2.9 Ταυτοποίηση ανασυνδιασμένων βακτηριακών κλώνων

Η ταυτοποίηση των βακτηριακών κλώνων γίνονταν 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 πέψη των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα,

γ) με την εφαρμογή της PCR σε εκχύλισμα πλασμιδιακού DNA από τα ανασυνδιασμένα βακτήρια, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά στην κλωνοποίηση του ένθετου DNA.

3.2.10 Προετοιμασία βακτηριακού αιωρήματος για την μόλυνση φυτών με την μέθοδο του εμποτισμού (Infiltration)

Ετοιμάζουμε υγρή καλλιέργεια 10ml του βακτηρίου με το οποίο επιθυμούμε να μολύνουμε το φυτό. Στην καλλιέργεια προσθέτουμε τα κατάλληλα αντιβιοτικά ώστε να αποφύγουμε πιθανές μολύνσεις από άλλα βακτήρια. Αφήνουμε την καλλιέργεια σε επωαστήρα με τις κατάλληλες συνθήκες για περίπου 12 ώρες. Στην συνέχεια κατακρημνίζουμε τα βακτήρια με φυγοκέντριση χαμηλής ταχύτητας/διάρκειας, απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε την βακτηριακό ίζημα σε 10ml $MgCl_2$ 10mM. Κατακρημνίζουμε ξανά τα βακτήρια και αυτό επαναλαμβάνεται συνολικά 3 φορές με σκοπό να καθαριστεί το βακτηριακό αιώρημα από τα αντιβιοτικά του υγρού καλλιέργειας. Αφού επαναδιαλύσουμε για τρίτη φορά το βακτηριακό ίζημα, προσαρμόζουμε την οπτική πυκνότητα του βακτηριακου αιωρήματος στα 600nm (προσθέτοντας $MgCl_2$ 10mM αν χρειάζεται) ώστε να φτάσουμε την επιθυμητή συγκέντρωση κυττάρων στο βακτηριακό αιώρημα για την μόλυνση, συμβουλευόμενοι την καμπύλη αναφοράς την οποία έχουμε προσχεδιάσει ώστε να γνωρίζουμε σε ποια απορρόφηση αντιστοιχεί η επιθυμητή συγκέντρωση.

Με την βοήθεια μιας βελόνας από σύριγγα κάνουμε μια όσο το δυνατόν μικρότερη αμυχή στην κάτω πλευρά ενός νέου φύλλου του φυτού που θέλουμε 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.

3.2.11 Δημιουργία ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών σε αντιβιοτικά

Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία ανθεκτικότητας στην Ρυφαπμυκίνη (Rif) Αγροβακτηριακών στελεχών αγρίου τύπου.

Σε 10ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας προσθέτουμε 5μg/ml Rif και αφήνουμε σε επωαστήρα ανάδευσης περίπου 48-60 ώρες. Μετά το διάστημα αυτό παίρνουμε 5μl από την καλλιέργειας και τα προσθέτουμε σε υγρό καλλιέργειας στο οποίο έχουμε προσθέσει Rif 10μg/ml. Αφήνουμε για επώαση 48 ώρες. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται με συνεχή αύξηση της συγκέντρωσης της Rif (15μg/ml, 20μg/ml, 30μg/ml κτλ) έως ότου φτάσουμε την συγκέντρωση της Rif στην καλλιέργεια στα 80μg/ml. Κατόπιν με μια βακτηριακή λούπα παίρνουμε από την βακτηριακή καλλιέργεια και απλώνουμε σε petri με θρεπτικό και 80-90μg/ml Rif. Από το petri αυτό επιλέγουμε μία μόνο αποικία την οποία καλλιεργούμε και την διατηρούμε ως stock, σε μικροφυαλίδια με 30% γλυκερόλη στους −80 °C.

4. Αποτελέσματα

Όπως προαναφέρθηκε στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο φυλές του βακτηρίου *P. syringae pv. phaseolicola* οι φυλή **6** και η **RW60**, στελέχη του είδους *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 (αφοπλισμένο στέλεχος) αλλά και στελέχη αγρίου τύπου και τέλος στελέχη του είδους *Pseudomonas syringae pv. aptata* (παθογόνο των σακχαρότευτλων). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές ποικιλίες φασολιού, οι **TG (Tender Green), CW (Canadian Wander), RM (Red Mexican), A43**. Στον πίνακα που παρατίθεται παρακάτω φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις των ποικιλιών αυτών του φασολιού με όλες τις φυλές του βακτηρίου *P. syringae pv. phaseolicola* που είχαν χαρακτηριστεί σε προηγούμενες μελέτες.

AvrPphE-R2						1	2	3	4	5	6	7	8	9	
										1375A	1448A	1449B			RW60
AvrPphB-R3						A1	.	.	.	A1	.	A1	.	A1	.
						.	A2	.	A2	A2	.	A2	.	.	A2
						.	.	A3	A3	.	.	.	.	.	.
						.	.	.	.	A4	.	.	.	.	.
						A5	.	.	.	.	.	A5	A5	.	A5
Διάφορες ποικιλίες Φασολιού	**R γονίδια**														
Canadian Wonder (CW)	.	.	.	.	.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	hr
A52 (ZAA54)	.	.	.	R4	.	S	S	S	S	*	S	S	S	S	
Tendergreen (TG)	.	.	R3	.	.	S	S	*	*	S	S	S	S	S	HR
Red Mxican (RM)	R1	.	.	R4	.	*	S	S	S	*	S	*	S	*	**HR**
A53 (ZAA55)	.	.	R3	R4	.	S	S	*	*	*	S	S	S	S	
A43 (ZAA12)	.	R2	R3	R4	R5	S	*	*	*	*	S	*	*	*	HR

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ

S : Susceptible, * : Resistant (HR), RW60 : προέρχεται από το στέλεχος 1449B (φυλή **7**) με απώλεια του πλασμιδίου pAV511, το οποίο περιέχει τα γονίδια: *virPphA*, *avrPphC*, *avrPphF*, *avrD*.

Γονιδιακές αντιστοιχίες (αλληλεπιδράσεις) που οδηγούν σε ασυμβατότητα παθογόνου/ξενιστή: *AvrPphB-R3* (γρηγορότερη HR σε σύγκριση με την αλληλεπίδραση *avrPphE-R2*), *avrPphF-R1*, *avrPphE-R2*.

Avr γονίδια: *avrPphF*: A1, *avrPphE*: A2, *avrPphB*: A3. Είναι γνωστό ότι τα γονίδια avrPphB και *avrPphE* είναι χρωμοσωμικά, ενώ το avrPphF βρίσκεται στο πλασμίδιο pAV511. (60)

4.1 Αναφορά αποτελεσμάτων για το γονίδιο avrPstE

Για τον εντοπισμό και την μελέτη του *avrPstE*, χρησιμοποιήθηκε η ήδη γνωστή αλληλουχία του *avrPphE* του βακτηρίου *P. syringae pv. phaseolicola*, για αναζήτηση BLAST στο έως τότε αλληλουχημένο τμήμα του γονιδιόματος του βακτηρίου *P.s. pv. tomato DC3000*.

Όντως βρέθηκε μία νουκλεοτιδική περιοχή με ομολογία της τάξης του 74% , η περιοχή αυτή περιλαμβάνει ένα ανοικτό κωδικό πλαίσιο με το κωδικόνιο έναρξης (ATG) στην θέση 166-168 του οποίου προηγείται ένα στο κοινό μοτίβο αλληλουχίας που παρουσιάζουν οι υποκινητές (promoters) των *avr* γονιδίων (hrp box) (βλ. παραπάνω). Έτσι το τμήμα το οποίο επιλέχτηκε για κλωνοποίηση είναι το εξής:

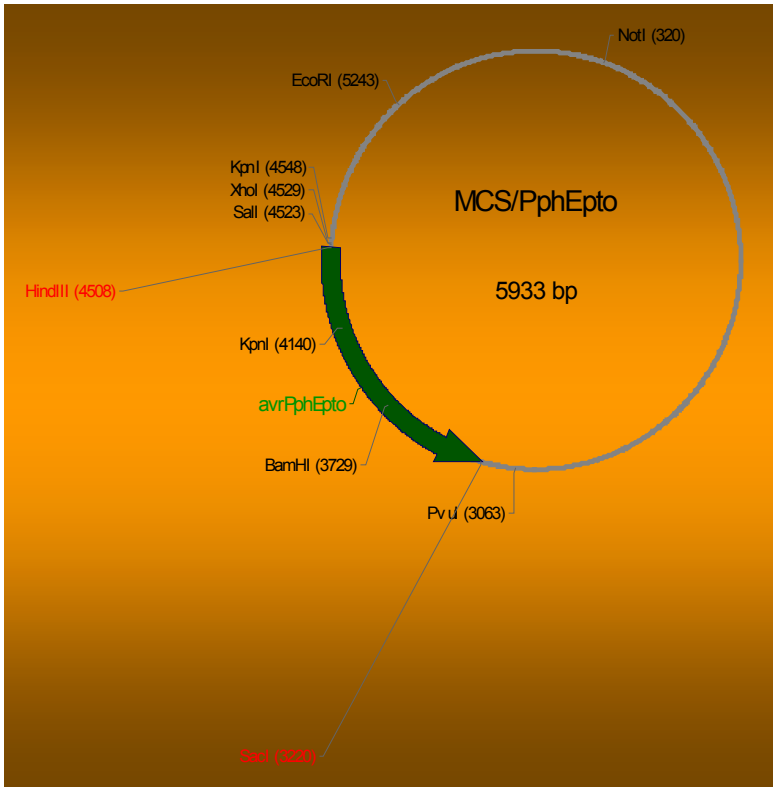
```
1       GCTGTTGCCG CTAAAGCTGG ATTTCCACAT CAGTGAAAGC TCTGCGCGCA GATTAATGTT
61      GCTTCAGCGG CTATGGCATA GATTAGGGAA CTTGCTTGGT GGGAACTGAC CCGGCCAAAT
121     GACGACATAG CTAGCATGAT GAAAGTATTT AATTCGTTGA GATAAAATGA AAATACATAA
181     CGCTGGCCTA ACCCCACCTT TGCCGGGCAT TTCGAATGGA AACGTTGGAA AGGCGGCGCA
241     ATCATCAATA ACTCAACCGC AGAGCCAGCA AGGCTCTTAT GGCTTGCCAC CAGAAAGCTC
301     TGAGACTCGC CCTGATAGGG CGCGTGCGAA CTATCCATAT TCATCAGTAC AAACACGGTT
361     GCCGCCCGTT GCGTCTGCTG GGAAACCGCT GCCTGATACA CCATCTTCTT TGCCCGGCTA
421     CTTACTGTTG CGAAGGCTGG ACCATCGCCC TGTGGATCAG GAAGGTACCA AAAGTCTGAT
481     CCCGGCAGAC AAGGCTGTGG CTGAAGCGCG CCGTGCATTG CCCTTTGGAA GAGGCAATAT
541     TGATGTGGAT GCGCAACTTT CCAATCTGGA AAGTGGAGCC CGCACCCTTG CAGCAAGGTG
601     CTTGAGAAAA GATGCCGAGG CCGCCGGTCA TGAGCCTATG CCTGCGAATG AGCCGATGAA
661     CTGGCATGTT CTTGTTGCGA TGTCAGGCCA GGTGTTCGGC GCGGGCAACT GTGGCGAACA
721     TGCTCGTATA GCGAGCTTCG CCTATGGAGC TTTGGCCCAG GAAAACGGAC GATCTGAATA
781     TGAAAACATC TACTTGGCTG CATCGACTGA GGAAGATCAT GTGTGGGCTG AAACCGACGA
841     ATCCCAGTCT GGCACCTCAA CGATTGTCAT GGATCCGTGG TCAAATGGTT CAGCCATATT
901     TGCGGAGGAC AGTAGGTTTG CGAAAAATCG AAATGCTGTA GAGCGTACGG ATACGTTTAA
961     TCTTTCAACC GCAGCCGAAG CGGGCAAAAT TACGCGTGAG ACAGCCGAGA AGGCTTTGAC
1021    GCAGGTCACA ACCCGATTGC AGAAACGCCT GGCGGATCAG CAGGAGCAAG TCTCGCCCAT
1081    CAAAAGTGGT CGCTATCGAC CAGAAAAATC GGTACTTGAT GATGCATTTG TCCGCAGAGT
1141    GAGCGACAAG TTGACCTCCC CTGATTTGCG GCGTGCACTA CAGGTAGATA TTGAAGCGGT
1201    CGGAGTCGCA ATGTCGCTCG GCACCAAGGG CGTCAAGGAC GCTACTCGAC AAGCCCGACC
1261    TTTGGTTGAG CTTGCAGTGA AGGTCGCCTC TCCTCAAGGC TTGGCGAGAC GAGATGTCTG
1321    AAACCTGAAC TCGCATTTTA AAGTACGTAC GTTAAGAATA AGCGCCCCAT TCATTCACGA
1381    TGCCAGCGCT TTGTAGACCG TCGAACGACC GATCTTCA
```

Παραπάνω παρατίθεται η περιοχή του γονιδιόματος του βακτηρίου *P. syringae pv. tomato DC3000* που περιέχει το γονίδιο PstE. Με ροζ χρώμα είναι μαρκαρισμένες οι περιοχές με τις οποίες σχεδιάσθηκαν οι primers για την PCR ενώ με μπλε και πράσινο είναι μαρκαρισμένες το ATG και το *hrpbox* αντίστοιχα.

Το γονίδιο κλωνοποιήθηκε με τους εξής primers:

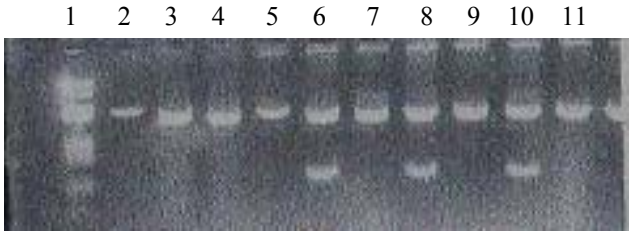
HindIII
F:5'-AGATTAGGGAACAAGCTTGGTGGGAACTGA-3'
SacI
R: 5'-GGTCTACAAAGAGCTCGCATCGTGAA-3'

Η κλωνοποίηση έγινε στον φορέα pBBR1 MCS (Chl^R). Ο χάρτης του κατασκευάσματος pBBRI MCS/*avrPstE* φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:

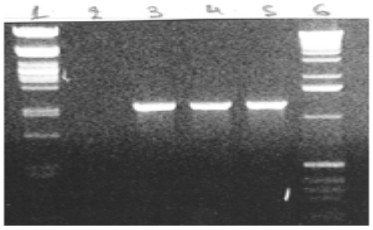


Χάρτης κλωνοποίησης του γονιδίου PstE (μαζί με το hrpbox) σε φορέα κατάλληλο για έκφραση σε *Pseudomonas*.

Τα κατασκευάσματα ελέγχθηκαν με ενζυμικές πέψεις περιορισμού (Φώτο 2):



Φώτο 2:Πέψεις ελέγχου του construct pBBR1MCS+PstE.
1.λ DNA κομμένο με EcoRi και HindIII
2 έως 11. Δήγματα από minipreps κομμένα με HindIII και SacI. Βλέπουμε ότι στα δήγματα 6, 8 και 10 το γονίδιο PstE υπάρχει στο construct και αποκόπηκε μετά την πέψη.



Φώτο 1: Εδώ φαίνονται τα αποτελέσματα της PCR για το γονίδιο PstE.
1.λ DNAκομμένο με EcoRI και HindII
2έως 5 δήγματα PCR. Τα δήγματα 3, 4 και 5 είναι θετικά
6. λ DNA κομμένο με PstI

Το επόμενο βήμα ήταν να γίνει στοίχιση της αλληλουχίας του *PstE* και *avrPphE* με το πρόγραμμα CLUSTAL-W, αναζήτηση πιθανών ομολογιών με πρωτεΐνες/γονίδια στις διάφορες βάσεις δεδομένων με το πρόγραμμα BLAST, καθώς και σύγκριση των δύο ομόλογων, του *avrPphE* και *PstE* πρωτεϊνών σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας. Τα αποτελέσματα από την σύγκριση αυτή έχουν ως εξής:

```
AvrPstE: 1    MKIHNAGLTPPLPGISNGNVGKAAQSSITQPQSQQGSYGLPPESSETRPDRARANYPYSS 180
              M+IH+AG + P PG S     KA QSS  Q  +   S    PE+  T+    R NYPYSS
avrPphE:1     MRIHSAGHSLPAPGPSVETTEKAVQSSSAQNPASCSSQTERPEAGSTQ---VRPNYPYSS 57

       181    VQTRLPPVASAGKPLPDTPSSLPGYLLLRRLDHRPVDQEGTKSLIPADKAVAEARRALPF 360
              V+TRLPPV+S G+ + DTPSSLPGYLLLRRLD RP+D++  K+L+PAD+A+ EARRALPF
       58     VKTRLPPVSSTGQAISDTPSSLPGYLLLRRLDRRPLDEDSIKALVPADEALREARRALPF 117

       361    GRGNIDVDAQLSNLESGARTLAARCLRKDAEAAGHEPMPANEPMNWHVLVAMSGQVFGAG 540
              GRGNIDVDAQ ++L+SGAR +AA+ LRKDAE AGHEPMP N+ MNWHVLVAMSGQVFGAG
       118    GRGNIDVDAQRTHLQSGARAVAAKRLRKDAERAGHEPMPENDEMNWHVLVAMSGQVFGAG 177

       541    NCGEHARIASFAYGALAQENGRSEYENIYLAASTEEDHVWAETDESQSGTSTIVMDPWSN 720
              NCGEHARIASFAYGALAQE+GRS  E I+LA    +DHVWAETD S +G+S IVMDPWSN
       178    NCGEHARIASFAYGALAQESGRSPREKIHLAEQPGKDHVWAETDNSSAGSSPIVMDPWSN 237

       721    GSAIFAEDSRFAKNRNAVERTDTFNLSTAAEAGKITRETAEKALTQVTTRLQKRLADQQE 900
              G+AI AEDSRFAK+R+AVERT +F L+ AAEAGK+ RETAE  LT  T+RLQKRLADQ
       238    GAAILAEDSRFAKDRSAVERTYSFTLAMAAEAGKVARETAENVLTHTTSRLQKRLADQLP 297

       901    QVSPIKSGRYRPEKSVLDDAFVRRVSDKLTSPDLRRALQVDIEAVGVAMSLGTKGVKDAT 1080
               VSP++ GRY+PEKSVLD+AF RRVSDKL S D RRALQ++IEAVGVAMSLG +GVK
       298    NVSPLEGGRYQPEKSVLDEAFARRVSDKLNSDDPRRALQMEIEAVGVAMSLGAEGVKTVA 357

       1081   RQARPLVELAVKVASPQGLARR 1146
              RQA  +V  A  VAS +G+  R
       358    RQAPKVVRQARSVASSKGMPPR 379
```

Score = 494 bits (1272), Expect = e-138
Identities = 256/382 (67%), Positives = 301/382 (78%)
Frame = +1

Κατά την διερεύνηση στις βάσεις δεδομένων, βρέθηκαν ομοιότητες με γνωστές AVR πρωτεΐνες από άλλους παθότυπους του γένους *Pseudomonas*, μερικές από τις οποίες παρατίθενται παρακάτω:

PstE / unknown [Pseudomonas syringae pv. syringae]

```
PstE:   1     MKIHNAGLTPPLPGISNGNVGKAAQSSITQPQSQQGSYGLPPESSETRPDRARANYPYSS 180
              M+IH++G     P  S   V KA QSS  Q Q++    G P E  E+R  +AR NYPYSS
        1     MRIHSSGHGISGPVSSAETVEKAVQSS-AQAQNEASHSG-PSEHPESRSCQARPNYPYSS 58
```

```
181  VQTRLPPVASAGKPLPDTPSSLPGYLLLRRLDHRPVDQEGTKSLIPADKAVAEARRALPF 360
     V+TRLPPVASAG+ L +TPSSLPGYLLLRRLD RP+DQ+  K LIPAD+AV EARRALPF
59   VKTRLPPVASAGQSLSETPSSLPGYLLLRRLDRRPLDQDAIKGLIPADEAVGEARRALPF 118

361  GRGNIDVDAQLSNLESGARTLAARCLRKDAEAAGHEPMPANEPMNWHVLVAMSGQVFGAG 540
     GRGNIDVDAQ SNLESGARTLAAR LRKDAE AGHEPMP NE MNWHVLVAMSGQVFGAG
119  GRGNIDVDAQRSNLESGARTLAARRLRKDAETAGHEPMPENEDMNWHVLVAMSGQVFGAG 178

541  NCGEHARIASFAYGALAQENGRSEYENIYLAASTEEDHVWAETDESQSGTSTIVMDPWSN 720
     NCGEHARIASFAYGA AQE GR+  ENI+LAA + EDHVWAETD+S +G+S IVMDPWSN
179  NCGEHARIASFAYGASAQEKGRAGDENIHLAAQSGEDHVWAETDDSSAGSSPIVMDPWSN 238

721  GSAIFAEDSRFAKNRNAVERTDTFNLSTAAEAGKITRETAEKALTQVTTRLQKRLADQQE 900
     G A+FAEDSRFAK+R AVERTD+F LSTAA+AGKITRETAEKALTQ T+RLQ+RLADQQ
239  GPAVFAEDSRFAKDRRAVERTDSFTLSTAAKAGKITRETAEKALTQATSRLQQRLADQQA 298

901  QVSPIKSGRYRPEKSVLDDAFVRRVSDKLTSPDLRRALQVDIEAVGVAMSLGTKGVKDAT 1080
     QVSP++ GRYR E SVLDDAF RRVSD L + D RRALQV+IEA GVAMSLG +GVK
299  QVSPVEGGRYRQENSVLDDAFARRVSDMLNNADPRRALQVEIEASGVAMSLGAQGVKTVV 358

1081 RQARPLVELAVKVASPQGLARR 1146
     RQA  +V  A  VAS +G++ R
359  RQAPKVVRQARGVASAKGMSPR 380
```

Score = 519 bits (1337), Expect = e-146
Identities = 276/382 (72%), Positives = 310/382 (81%)
Frame = +1

PstE / hypothetical protein [Pseudomonas syringae pv. syringae B728a]

```
PstE:  331  VAEARRALPFGRGNIDVDAQLSNLESGARTLAARCLRKDAEAAGHEPMPANEPMNWHVLV 510
       + EARRALPFGRGNIDVDAQ SNLESGARTLAAR LRKDAE AGHEPMP NE MNWHVLV
       1    MGEARRALPFGRGNIDVDAQRSNLESGARTLAARRLRKDAETAGHEPMPENEDMNWHVLV 60

       511  AMSGQVFGAGNCGEHARIASFAYGALAQENGRSEYENIYLAASTEEDHVWAETDESQSGT 690
            AMSGQVFGAGNCGEHARIASFAYGA AQE GR+  ENI+LAA + EDHVWAETD+S +G+
       61   AMSGQVFGAGNCGEHARIASFAYGASAQEKGRAGDENIHLAAQSGEDHVWAETDDSSAGS 120

       691  STIVMDPWSNGSAIFAEDSRFAKNRNAVERTDTFNLSTAAEAGKITRETAEKALTQVTTR 870
            S IVMDPWSNG A+FAEDSRFAK+R AVERTD+F LSTAA+AGKITRETAEKALTQ T+R
       121  SPIVMDPWSNGPAVFAEDSRFAKDRRAVERTDSFTLSTAAKAGKITRETAEKALTQATSR 180

       871  LQKRLADQQEQVSPIKSGRYRPEKSVLDDAFVRRVSDKLTSPDLRRALQVDIEAVGVAMS 1050
            LQ+RLADQQ QVSP++ GRYR E SVLDDAF RRVSD L + D RRALQV+IEA GVAMS
       181  LQQRLADQQAQVSPVEGGRYRQENSVLDDAFARRVSDMLNNADPRRALQVEIEASGVAMS 240

       1051 LGTKGVKDATRQARPLVELAVKVASPQGLARR 1146
            LG +GVK   RQA  +V  A  VAS +G++ R
       241  LGAQGVKTVVRQAPKVVRQARGVASAKGMSPR 272
```

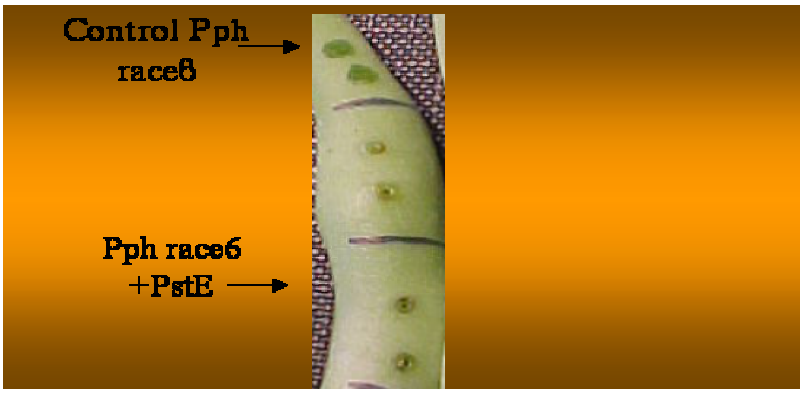
Score = 408 bits (1048), Expect = e-113
Identities = 210/272 (77%), Positives = 232/272 (85%)
Frame = +1

Από τα αποτελέσματα της αναζήτησης ομολογιών προκύπτει ότι το γονίδιο *PstE* είναι αρκετά συντηρημένο σε διάφορες παθοσειρές του βακτηρίου *P. syringae*.

Μετά την κλωνοποίηση του γονιδίου, έγινε εισαγωγή του πλασμιδίου pBBR1 MCS-*AvrPstE* σε στελέχη *P. syringae pv. phaseolicola* (*Pph*) Race 6 και *Pph* RW60 (ανθεκτικά στην ριφαμπυκίνη, Rif) με την μέθοδο της τριγονικής βακτηριακής σύζευξης (triparental mating). Έγινε επιλογή αποικιών με διπλή ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, στη ριφαμπυκίνη και στην χλοραμφενικόλη (Chl). Τα βακτήρια αυτά καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό KB (με Rif/Chl) και οι καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν για την μόλυνση φυτών φασολιού, διαφόρων ποικιλιών (RM, CW, TG, A43) με την μέθοδο του εμποτισμού σε φύλλα, καθώς και σε λοβούς, με την δημιουργία πληγής με μολυσμένο αιχμηρό αντικείμενο (ξύλινη οδοντογλυφίδα). Κατά τις μολύνσεις, ως μάρτυρες (controls) χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *Pph* Race 6 και *Pph* RW60 χωρίς το πλασμίδιο pBBR1 MCS-*AvrPstE*. Τα αποτελέσματα από τις μολύνσεις παρατίθενται, παρακάτω.

Μολύνσεις με το βακτήριο Pph Race 6(+avrPstE)

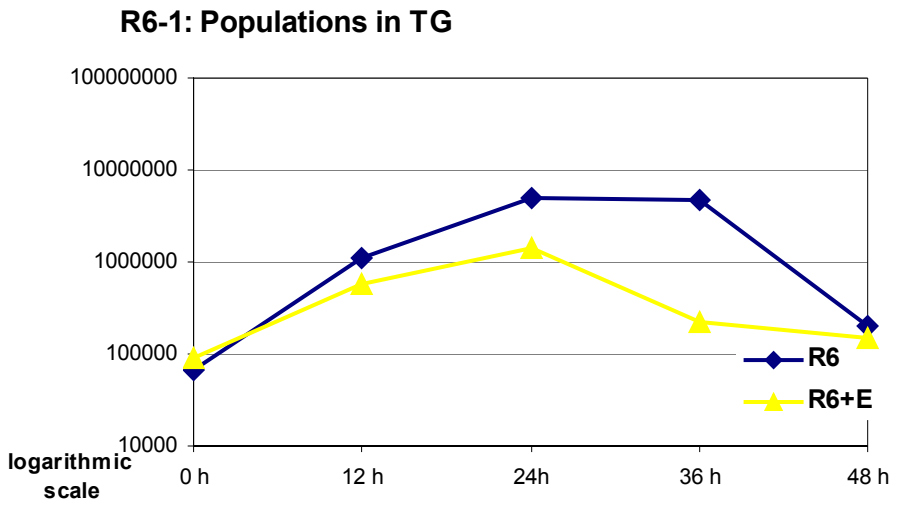
Στην ποικιλία **TG (Tender Green)** το στέλεχος *Pph* Race 6 δίνει συμβατή αντίδραση. Όπως όμως φαίνεται και από την παρακάτω εικόνα (φώτο1) η μόλυνση με το στέλεχος *Pph* Race 6 (+*avrPstE*) δίνει ασθενέστερης συμβατότητας αντίδραση:



Φώτο 1 (TG)

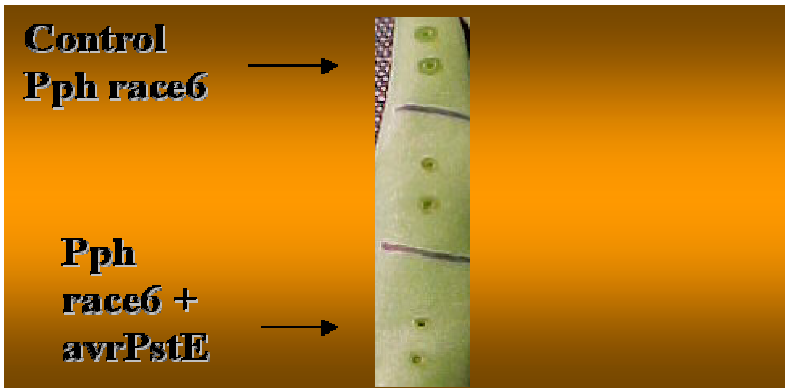
Στο επάνω μέρος της εικόνας βλέπουμε την μόλυνση με το στέλεχος μάρτυρα η αντίδραση είναι συμβατή (compatible). Όπως βλέπουμε στην μόλυνση με το *Pph*

Race 6 (+*avrPstE*) η αντίδραση μολυσματικότητας είναι ασθενέστερη. Το αποτέλεσμα αυτό πιστοποιείται και από την ανάλυση πληθυσμού (population analysis) όπως φαίνεται στο παρακάτω γράφημα.



Γράφημα 1: Βακτηριακός πληθυσμός (colony forming units/cm^2 φύλλου) του στελέχους Pph race 6 (PstE) σε διακυττάριο χώρο φύλλων φασολιάς της ποικιλίας Tendergreen. Τις πρώτες 48 ώρες μετά την μόλυνση.

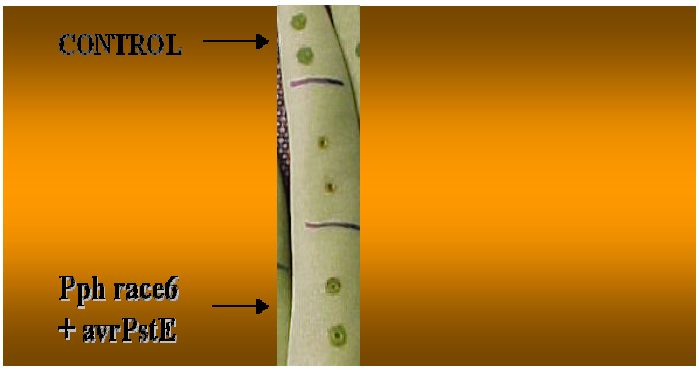
Στην ποικιλία **A 43**, στην αντίδραση του βακτηρίου *Pph* Race 6 (+*avrPstE*) φαίνεται ότι η συμβατότητα ξενιστού/παθογόνου μειώνεται αισθητά (φώτο2):



Φώτο 2 (A 43)

Εδώ είναι φανερό ότι μολυσματικότητα του *Pph* Race 6 (+*avrPstE*) είναι αρκετά μικρότερη έως μηδενική.

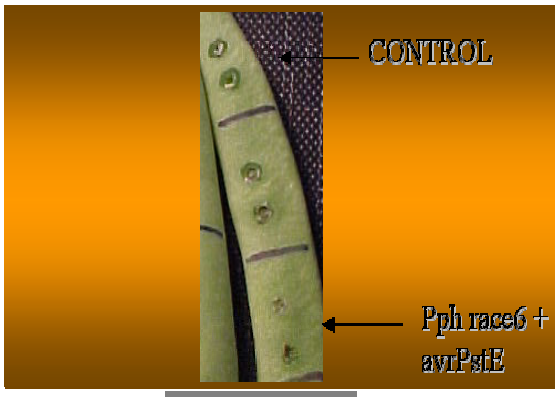
Στην ποικιλία **CW**, η αντίδραση του βακτηρίου Pph Race 6+avrPstE ακολουθεί συμπτωματολογικά αυτή του συμβατού μάρτυρα (φώτο3):



Φώτο 3 (CW)

Εδώ φαίνεται ξεκάθαρα ότι τα συμπτώματα της μόλυνσης με το συμβατό στέλεχος μάρτυρα (control) δεν έχουν καμία διαφοροποίηση από αυτά του βακτηρίου *Pph* Race 6*(+avrPstE)*.

Στην ποικιλία**, RM (Red Mexican)** η αντίδραση έχει σημαντική διαφοροποίηση από αυτή του μάρτυρα (control) (Φώτο 4):



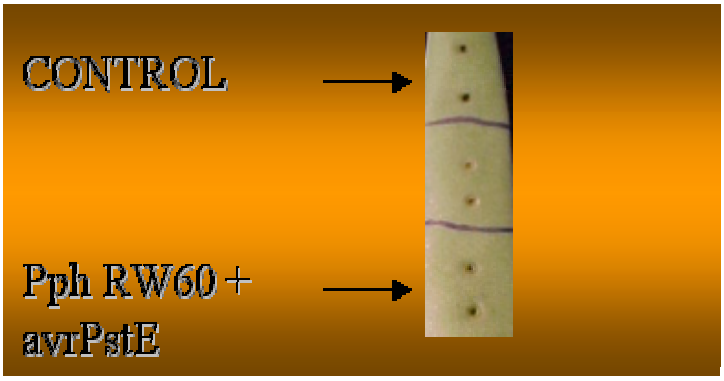
Φώτο 4 (RM)

Εδώ, βλέπουμε μια χαρακτηριστική αντίδραση υπερευαισθησίας (HR), σε αντίθεση με αυτή του μάρτυρα (control) η οποία είναι συμβατή.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι υπάρχει κάποια εξειδίκευση όσον αφορά την ποικιλία του φασολιού και την δράση του γονιδίου *PstE*, διαφορετική από αυτή του γονιδίου *avrPphE*.

Μολύνσεις με το στελέχους Pph RW60+avrPstE

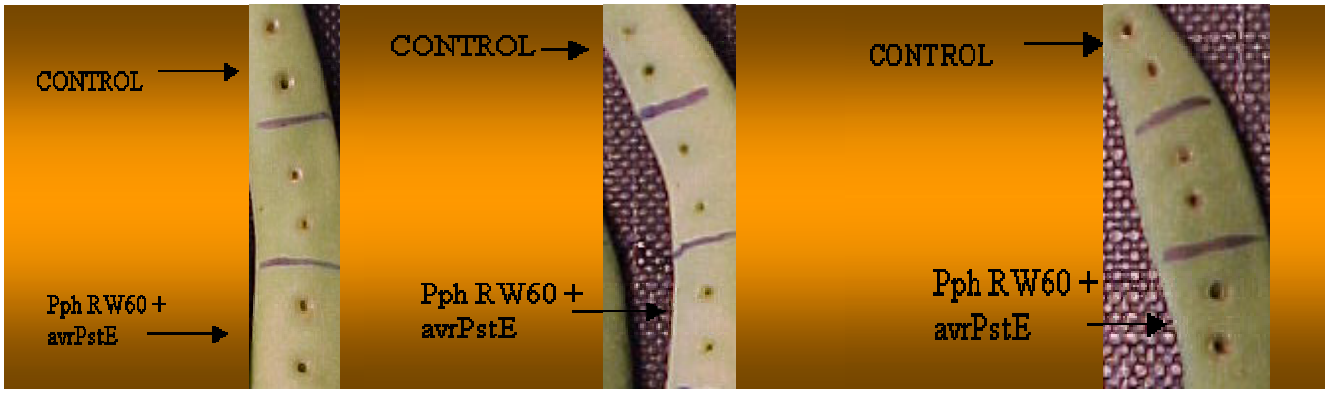
Στην ποικιλία **CW** υπάρχει μία μικρή διαφοροποίηση ως προς τον χρόνο εκδήλωσης και τα συμπτώματα της μόλυνσης (Φώτο 1^{α}):



Φώτο 1^{α} (CW)

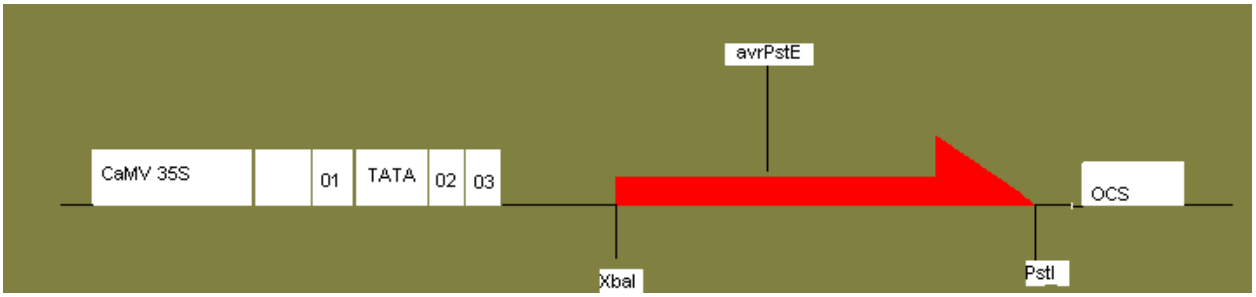
Στην Φώτο 1^{α} δίνεται η εντύπωση της εμφάνιση υδαρούς κηλίδας στην περιφέρεια του σημείου μολύνσεως με το στέλεχος RW60 (+PstE).

Στις υπόλοιπες ποικιλίες τα συμπτώματα δεν έχουν καμία εμφανή διαφοροποίηση από αυτά που δίνει ο μάρτυρας (control), (Φώτο 2^{α}, 3^{α}, 4^{α}):



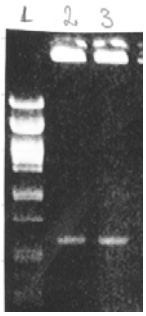
Φώτο 2^{α} (A 43) Φώτο 3^{α} (TG) Φώτο4^{α} (RM)

Το γονίδιο *PstE*, κλωνοποιήθηκε σε αγροβακτηριακό φορέα, με σκοπό την εισαγωγή και την έκφραση του σε φυτικά κύτταρα με την μέθοδο του αγροεμποτισμού (Agro_infiltration). Για την διαδικασία αυτή το γονίδιο κλωνοποιήθηκε χωρίς τον υποκινητή και το (hrpbox) του και ετέθη υπό του ρυθμιστικού ελέγχου του ιικού υποκινητή (CaMV 35S promoter) για την έκφραση σε ευκαρυωτικό σύστημα. Επιλέχτηκε το ζεύγος αγροβακτηριακών φορέων: pUC A7-Tx (ενδιάμεσος φορέας κλωνοποίησης) και Bin-Hyg-Tx (φορέας δυαδικού συστήματος Αγροβακτηρίου). Ο χάρτης του κατασκευάσματος (construct) που κατασκευάστηκε φαίνεται στα παρακάτω σχεδιαγράμματα:



1. Σχεδιάγραμμα κατεύθυνσης του γονιδίου avrPstE στον φορέα Bin-Hyg-Tx

Ο έλεγχος για την ύπαρξη του construct στο Αγροβακτήριο έγινε με PCR σε αποικίες του αγροβακτηρίου, και τα αποτελέσματα φαίνονται στην Φώτο 3.



Φώτο 3: Ελεγκτικές PCR για την εξακρίβωση της μεταφοράς του construct pBBRIMCS+PstE στο Αγροβακτήριο LBA 4404 και στο Αγροβακτήριο ενός στελέχους αγρίου τύπου.

1. λ DNA, πέψη με EcoRI και HindIII
2. Αγροβακτήριο LBA 4404 (pBin-Hyg-Tx)
3. Αγροβακτήριο αγρίου τύπου (pBin-Hyg-Tx)

Το πλασμίδιο pBBR1 MCS-*AvrPstE* εισήχθη στο *A. tumefaciens* LBA 4404, καθώς και στο αγρίου τύπου στέλεχος *A. tumefaciens* A2. Με την μέθοδο του αγροεμποτισμού μολύνθηκαν φυτά τομάτας και φασολιάς ποικιλίας A43 με τα μετασχηματισμένα αγροβακτήρια. Οι μολύνσεις αυτές έδειξαν ότι η ενδοκυτταρική έκφραση της πρωτεΐνης *PstE* σε φυτά φασολιάς είναι ικανή να δώσει αντίδραση υπερευαισθησίας (νέκρωση). Στις παρακάτω φωτογραφίες φαίνονται οι συμπτωματολογικές ενδείξεις.

Τα δείγματα 1ο και 2ο αφορούν μολύνσεις που έγιναν σε ποικιλία φασολιού A43 με το στέλεχος *A. tumefaciens* LBA4404 (+pBin-*PstE*). Ως μάρτυρας (control)

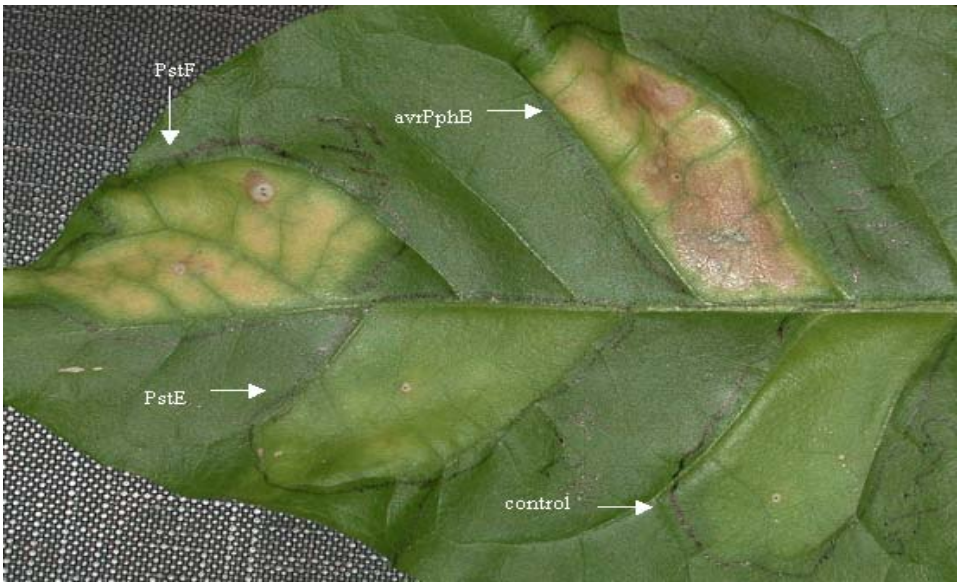
χρησιμοποιήθηκε το LBA4404 χωρίς το γονίδιο *PstE*. Στις φωτογραφίες τα συμπτώματα της HR είναι ευδιάκριτα, 7-10 ημέρες μετά την μόλυνση. Στα φυτά τομάτας το *A. tumefaciens*. A_2 το οποίο περιέχει το γονίδιο *PstE* χάνει την δυνατότητα δημιουργίας κορωνοτού κάλου.

Φώτο1: Control: A. tumefaciens A2 (wild type) oncogenic

Φώτο2: A. tumefaciens A2 (wild type) + pBin-avrPstE

Όπως γίνεται φανερό από την φωτογραφία **1**, το Αγροβακτήριο αγρίου τύπου έχει είδη αρχίσει να διαμορφώνει κορωνοτό κάλο (7-10 ημέρες μετά την μόλυνση) το οποίο φαίνεται από την παραμόρφωση των ιστών γύρω από το σημείο της μόλυνσης. Στην περίπτωση της φωτογραφίας **2**, όταν το ογκογόνο στέλεχος A. tumefaciens περιέχει το γονίδιο *PstE* χάνει την δυνατότητα ανάπτυξης κορωνοτού κάλου. Αυτό συμβαίνει διότι παράλληλα με μεταφερόμενο τμήμα του αγρίου τύπου πλασμιδίου, στο φυτικό κύτταρο μεταφέρεται και η κασέτα η οποία περιέχει το γονίδιο *PstE*. Όπως γίνεται φανερό από το αποτέλεσμα αυτό η πρωτεΐνη PstE αλληλεπιδρά ενδοκυτταρικά προκαλώντας νέκρωση (αντίδραση υπερευαισθησίας) στα κύτταρα τα οποία έχουν προσβληθεί από τα Αγροβακτήρια, τα οποία νεκρώνονται προτού αναπτυχθούν σε αγρίου τύπου καρκινικό όγκο.

Έγιναν επίσης μολύνσεις σε φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum,* ποικιλία Ξάνθη) με *A. tumefaciens* LBA 4404 το οποίο έφερε: 1) ως θετικό μάρτυρα: το γονίδιο *avrPphB* σε pBin-Hyg-Tx, 2) ως αρνητικό μάρτυρα τον φορέα pBin-Hyg-Tx, και 3) το PstE στον pBin-Hyg-Tx. Τα αποτελέσματα των μολύνσεων φαίνονται παρακάτω (Φωτο3).



Φωτο 3: Μολύνσεις σε *Nicotiana tabacum*

Βλέπουμε ότι κατά την μόλυνση με *A. tumefaciens* LBA 4404 (pBin-Hyg-Tx – PstE) δεν παίρνουμε συμπτώματα αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR), τα συμπτώματα είναι ίδια με εκείνα του αρνητικού μάρτυρα. Στην μόλυνση με τον θετικό μάρτυρα *A. tumefaciens* LBA 4404 (pBin-Hyg-Tx – avrPphB) τα συμπτώματα της αντίδρασης υπερευαισθησίας είναι εμφανέστατα. Η απουσία νέκρωσης στην παρουσία του γονιδίου PstE συνιστά ένδειξη ότι στην ποικιλία αυτή του καπνού δεν υπάρχει η κατάλληλη R πρωτεΐνη να αλληλεπιδράσει με την πρωτεΐνη PstE ώστε να πυροδοτηθεί η κυτταρική νέκρωση (HR).

4.1.1 Συζήτηση αποτελεσμάτων από τις μολύνσεις με το Pph race6 (+PstE) και το Pph RW60 (+PstE)

Όπως φαίνεται από τον πίνακα αλληλεπιδράσεων (σελ. 45) το στέλεχος 1449B (φυλή 6) του *Pph* δίνει συμβατή αντίδραση στην ποικιλία A43, η ποικιλία αυτή περιέχει ένα μη λειτουργικό αντίγραφο του γονιδίου R2 (*avrPphE)*, (ομόλογο του *PstE)*, το οποίο αλληλεπιδρά με το γονίδιο R2 στο φασόλι και προκαλεί νέκρωση (αντίδραση υπερευαισθησίας), (58). Επίσης, το στέλεχος αυτό δεν έχει βρεθεί να περιέχει κανένα από τα A1, A2, A3, A4 και A5 γονίδια αμολυσματικότητας (δες πίνακα σελ 45), για τον λόγο αυτό δίνει συμβατές αντιδράσεις με τις ποικιλίες TG, CW, RM και A43. Έτσι η φυλή 6 η οποία φέρει το γονίδιο *PstE* αναμένεται να δώσει αντίδραση υπερευαισθησίας μόνο στην ποικιλία A43 η οποία φέρει το R2. Όμως όπως φαίνεται και στον πίνακα αποτελεσμάτων των μολύνσεων σε λοβούς παρακάτω, το στέλεχος 1449B *Pph race 6 (+PstE)* δίνει HR και στην ποικιλία RM η οποία δεν έχει το γονίδιο R2. Επίσης, το στέλεχος αυτό καθυστερεί την εκδήλωση συμβατής αντίδρασης στις ποικιλίες TG και A43, τις οποίες σε κάποιες επαναλήψεις του πειράματος τις μετατρέπει σε ασθενή νέκρωση (HR-). Το αποτέλεσμα αυτό συνιστά ένδειξη ότι η πρωτεΐνη *PstE* ίσως αλληλεπιδρά με άλλον υποδοχέα (διαφορετικό απ΄ αυτόν που αλληλεπιδρά το *avrPphE*) εντός του φυτικού κυττάρου. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από τα αποτελέσματα με το Agrobacterium(βλ. παρακάτω).

Οι αντιδράσεις και τα αποτελέσματα των μολύνσεων του στελέχους 1449B *Pph* RW60 (+*PstE*) δίνουν τα αναμενόμενα αποτελέσματα ως προς την HR. Στην περίπτωση της ποικιλίας CW φαίνεται να μειώνεται η ένταση της αντίδρασης υπερευαισθησίας. Το βακτήριο *Pph* RW60 περιέχει τα γονίδια αμολυσματικότητας A2 και A5 (όπως φαίνεται από τον πίνακα σελ. 45).

Pods / 24hrs	A43	TG	CW	RM
R6	++	+	+	++
R6+PstE	HR-	HR--	++	HR---
RW60	HR-	HR--	HR--	HR-
RW60+PstE	HR-	HR-	HR---	HR-

Pods / 36hrs	A43	TG	CW	RM
R6	+++	+++	+++	+++
R6+PstE	HR-	HR--	+++	HR-
RW60	HR	HR-	HR--	HR
RW60+PstE	HR-	HR-	HR---	HR-

Pods / 60hrs	A43	TG	CW	RM
R6	+++	+++	+++	+++
R6+PstE	HR-	HR--	+++	HR
RW60	HR+	HR+	HR	HR+
RW60+PstE	HR	HR-	HR---	HR+

ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΟΛΥΝΣΕΩΝ -1

+++: συμβατή αντίδραση, HR : τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας, HR+: ισχυρότερη αντίδραση υπερευαισθησίας, HR-: μη ορατή αντίδραση ή πολύ ασθενέστερη αντίδραση υπερευαισθησίας, HR--: ασθενής αντίδραση υπερευαισθησίας, HR---: μηδενική αντίδραση υπερευαισθησίας (¨null¨ reaction).

Το στέλεχος *Pph RW60* περιέχει το γονίδιο *avrPphE* στο χρωμοσωμικό του DNA και προκαλεί αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) στην ποικιλία A43, ενώ το στέλεχος 1449A (φυλή 7) από την οποία προέρχεται, προκαλεί HR μόνο στις ποικιλίες RM λόγο ως αλληλεπίδραση των γονιδίων A1 (*avrPphF*, πίνακας σελ. 45) και του αντίστοιχου γονιδίου R1 στην ποικιλία RM.

Στις μολύνσεις με το στέλεχος *Pph* RW60 *(+PstE)* τα αποτελέσματα φαίνεται να είναι τα αναμενόμενα καθώς και στην περίπτωση του CW, όπου στις 24 ώρες μετά την μόλυνση δίνετε η εντύπωση της υδαρούς περιφέρειας στο σημείο αυτό και η οποία αργότερα μετατρέπεται σε HR^{-} (ασθενής αντίδραση υπερευαισθησία).

4.2 Αναφορά αποτελεσμάτων για το γονίδιο PstC2

Για τον εντοπισμό και την κλωνοποίηση του *γονιδίου PstC2*, χρησιμοποιήθηκε η ήδη γνωστή αλληλουχία του *avrPpiC2* του βακτηρίου *P. syringae pv. pisi*, για αναζήτηση ομόλογων αλληλουχιών μέσω του προγράμματος BLAST στο έως τότε αλληλουχημένο τμήμα του γονιδιόματος του *P.s. pv. tomato DC3000*.

Βρέθηκε μια περιοχή με νουκλεοτιδική ομολογία 99% , στην οποία εντοπίζεται και χαρακτηριστικό μοτίβο *hrpbox* προ του κωδικονίου έναρξης (ATG), βασιζόμενοι στο κοινό μοτίβο αλληλουχίας των υποκινητών των *avr* γονιδίων (βλ. παραπάνω). Έτσι το τμήμα το οποίο επιλέχτηκε για κλωνοποίηση είναι το εξής:

```
1      GGCCTACTGA TTTCTATAGC ATGATACGCG GCATAAAACC GTTCCTGATT TTACGTACCA
61     AACCCAAGAA AAACAGGCTG CCCCCACTTC AGAAAAGTCA GGGAACTGAA CCGCTTATGA
121    AACCACTCAT TTCGCATCTT TTTGAATAGG GCGCTGAAAA TATGACAATC GTGTCTGGAC
181    ACATCGGAAA ACACCCAAGC CTAACCACTG TTCAAGCTGG GTCTTCGGCT TCGGTCGAGA
241    ATCAAATGCC TGATCCTGCA CAGTTCAGTG ATGGACGGTG GAAAAAGCTT CCGACCCAAT
301    TGTCGTCAAT TACATTGGCG AGATTCGATC AGGATATTTG CACGAATAAT CATGGCATCA
361    GTCAGCGTGC AATGTGCTTT GGCCTTTCAT TGAGCTGGAT TAACATGATT CATGCCGGGA
421    AAGATCATGT TACGCCCTAT GCATCGGCAG AAAGAATGAG GTTTCTGGGT TCCTTTGAAG
481    GGGTGGTGCA TGCTCGTACT GTTCATAACT TCTATCGGAC TGAGCACAAA TTTCTGATGG
541    AGCAAGCTTC CGCAAACCCC GGAGTATCAA GTGGCGCGAT GGCTGGCACA GAAAGTTTAT
601    TGCAAGCTGC TGAGTTGAAG GGGTTAAAGC TTCAACCTGT TCTAGAGGAC AAGTCGAACT
661    CAGGCCTACC CTTCCTAATT GCGTGTAAGC AGTCAGGGCG GCAGGTGAGC ACAGATGAAG
721    CTGCGCTAAG CTCCTTATGT GATGCAATTG TAGAAAATAA GAGAGGGGTA ATGGTGATAT
781    ACAGCCAAGA AATTGCCCAC GCTTTGGGCT TTTCTGTATC ATCAGATGGC AAAAGAGCGA
841    CCTTATTTGA TCCCAATCTC GGAGAGTTTC ATACACACTC GAAAGCGTTG GCTGATACTA
901    TCGAAAACAT ATCATCGGCA GATGGGCTGC CTTTAATCGG CGTTCAAGTA TTCGCTTCAA
961    AAATACACTG ACTTGAAGTC TCCAAGCTCT ACCTTGTGGA TTCCACTACA CTTGGAGACC
1021   CAGCCCGATT ATTTGGACAC TCGCTCCACG CTCCGCTCAC TTGGACAGGC C
```

Με ροζ χρώμα μαρκάρονται οι περιοχές με βάση τις οποίες σχεδιάστηκαν οι εκκινητές (primers) και με μπλε το κωδικόνιο έναρξης του γονιδίου.

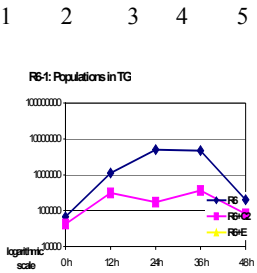
Η κλωνοποίηση του γονιδίου έγινε με τους παρακάτω εκκινητές (Φώτο 1):

XhoI

F: 5'-TTACGTACCAAACTCGAGAAAAACAGG-3'

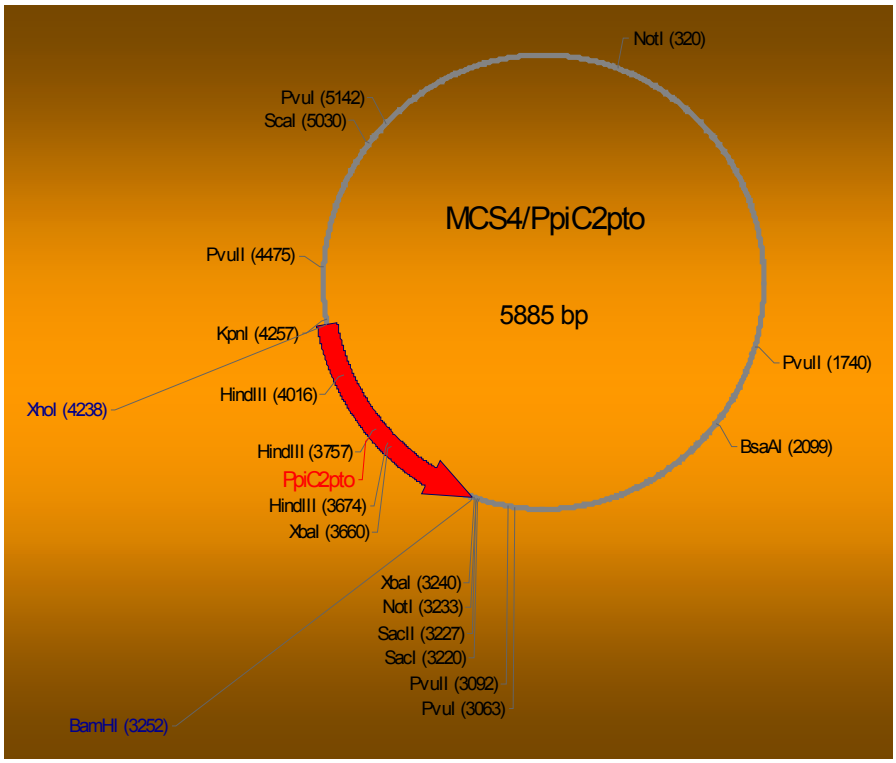
BamHI

R: 5'-AAGTGAGCGGATCCTGGAGCGAGTG-3'



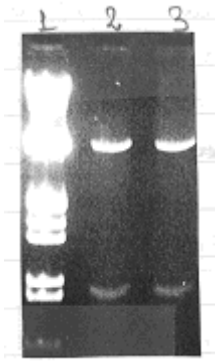
Φώτο 1: αποτελέσματα PCR για το γονίδιο PstC2:
1. λDNA κομμένο με EcoRI και HindIII
2-5. δείγματα PCR.

Η κλωνοποίηση του γονιδίου *PstC2* έγινε σε φορέα της οικογένειας pBBR1MCS4 (Amp^R), το κατασκεύασμα φαίνεται στο σχήμα 1 παρακάτω:



Σχήμα 1: Κατασκεύασμα pBBR1MCS4/PstC2

Το παραπάνω κατασκεύασμα ελέγχθηκε με περιοριστικές πέψεις (Φώτο 2)



Φώτο 2: αποτελέσματα ελεγχτικών πέψεων με BamHI και XhoI για το construct pBBR1 MCS4/PstC2
1. λDNA κομμένο με EcoRI και HindIII
2-3. δείγματα.

Σε αντιστοίχηση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών με το πρόγραμμα CLUSTAL-W έδειξε πολύ υψηλή ομολογίας των δύο γονιδίων *avrPpiC2* και *PstC2* σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας (μόνο ένα κατάλοιπο διαφέρει μεταξύ τους):

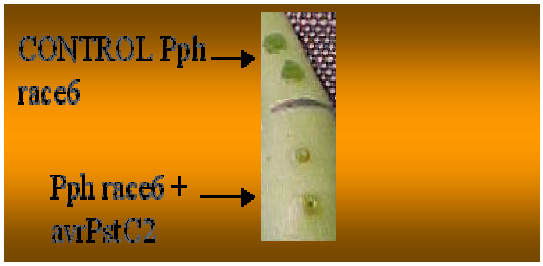
```
PstC2   1   MTIVSGHIGKHPSLTTVQAGSSASVENQMPDPAQFSDGRWKKLPTQLSSITLARFDQDIC 60
            MTIVSGHIGKHPSLTTVQAGSSASVENQMPDPAQFSDGRWKKLPTQLSSITLARFDQ+IC
PpiC2:  1   MTIVSGHIGKHPSLTTVQAGSSASVENQMPDPAQFSDGRWKKLPTQLSSITLARFDQNIC 60

        61  TNNHGISQRAMCFGLSLSWINMIHAGKDHVTPYASAERMRFLGSFEGVVHARTVHNFYRT 120
            TNNHGISQRAMCFGLSLSWINMIHAGKDHVTPYASAERMRFLGSFEGVVHARTVHNFYRT
        61  TNNHGISQRAMCFGLSLSWINMIHAGKDHVTPYASAERMRFLGSFEGVVHARTVHNFYRT 120

        121 EHKFLMEQASANPGVSSGAMAGTESLLQAAELKGLKLQPVLEDKSNSGLPFLIACKQSGR 180
            EHKFLMEQASANPGVSSGAMAGTESLLQAAELKGLKLQPVLEDKSNSGLPFLIACKQSGR
        121 EHKFLMEQASANPGVSSGAMAGTESLLQAAELKGLKLQPVLEDKSNSGLPFLIACKQSGR 180

        181 QVSTDEAALSSLCDAIVENKRGVMVIYSQEIAHALGFSVSSDGKRATLFDPNLGEFHTHS 240
            QVSTDEAALSSLCDAIVENKRGVMVIYSQEIAHALGFSVSSDGKRATLFDPNLGEFHTHS
        181 QVSTDEAALSSLCDAIVENKRGVMVIYSQEIAHALGFSVSSDGKRATLFDPNLGEFHTHS 240

        241 KALADTIENISSADGLPLIGVQVFASKIH 269
            KALADTIENISSADGLPLIGVQVFASKIH
        241 KALADTIENISSADGLPLIGVQVFASKIH 269

                Score =  528 bits (1359), Expect = e-149
          Identities = 269/269 (100%), Positives = 269/269 (100%)
```

Από το αποτέλεσμα της σύγκρισης των δύο πρωτεϊνών φαίνεται ότι πρόκειται ουσιαστικά για την ίδια πρωτεΐνη.

Μετά την κλωνοποίηση του, το γονιδίο, εισήχθη στο στέλεχος *Pph* Race 6 και *Pph* RW60 (ανθεκτικά στην Rif) με την μέθοδο της τριγονικής βακτηριακής σύζευξης (triparental mating). Έγινε επιλογή αποικιών με διπλή ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά (Rif και στην Αμπισιλήνη, Amp). Τα βακτήρια αυτά καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο KB (με Rif/Amp) και οι καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν για την μόλυνση φύλλων φασολιού, διαφόρων ποικιλιών (RM, CW, TG, A43) με την μέθοδο του εμποτισμού, καθώς και σε λοβούς με την δημιουργία πληγής με μολυσμένο αιχμηρό αντικείμενο (ξύλινη οδοντογλυφίδα). Κατά τις μολύνσεις, ως μάρτυρες (control) χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *Pph* Race 6 και *Pph RW60* χωρίς το πλασμίδιο pBBR1MCS2. Τα αποτελέσματα από τις μολύνσεις φαίνονται, παρακάτω.

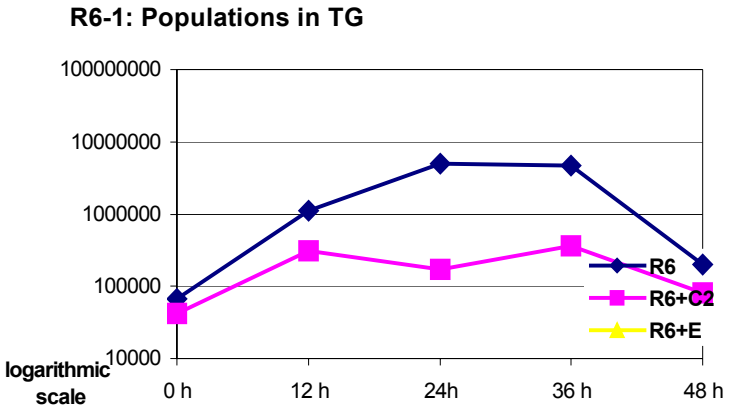
Μολύνσεις με το βακτήριο Pph Race 6+avrPstC2

Στην ποικιλία TG παρατηρείται μείωση της συμβατής αντίδρασης (υδαρή κηλίδα) σε σύγκριση με αυτή του μάρτυρα (control) Φώτο Α:



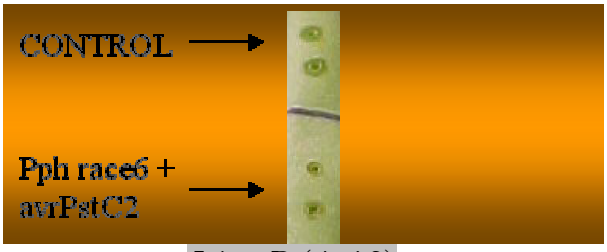
Φώτο Α (TG)

Στο επάνω μέρος της εικόνας βλέπουμε την μόλυνση με το στέλεχος *Pph* Race 6 (control). Η αντίδραση είναι συμβατή (compatible). Όπως βλέπουμε στην μόλυνση με το *Pph* Race 6(+*PstC2)* η αντίδραση είναι μικρότερης συμβατότητας. Για την πιστοποίηση του αποτελέσματος αυτού έγινε ανάλυση πληθυσμού (population analysis) και τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω γράφημα:



Γράφημα ανάλυσης πληθυσμού για τα βακτήρια Pph race6 +PstC2 και Pph race6

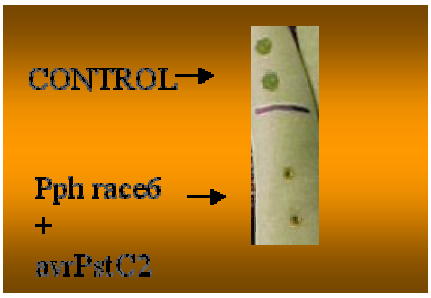
Στην ποικιλία **A 43**, στην αντίδραση του στελέχους *Pph* Race 6(+*PstC2*) φαίνεται ότι η συμβατότητα του παθογόνου/ξενιστή μειώνεται, Φώτο Β:



Φώτο Β (A 43)

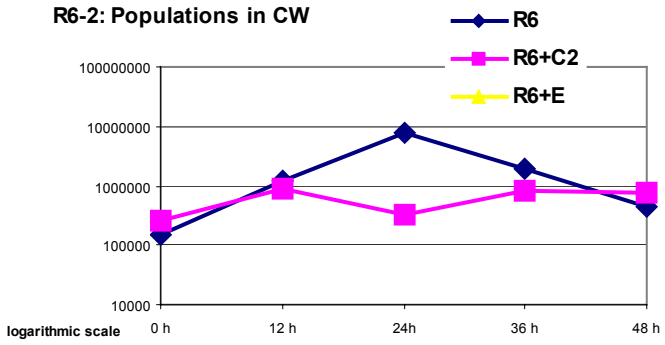
Από την Φώτο Β γίνεται φανερό ότι μολυσματικότητα του *Pph* Race 6(+*PstC2)* είναι μικρότερη όχι όμως μηδενική.

Στην ποικιλία **CW**, η αντίδραση του βακτηρίου *Pph* Race 6(+*PstC2)* συμπτωματολογικά έχει αρκετά μεγάλη διαφοροποίηση από αυτή του μάρτυρα (control), Φώτο Γ:



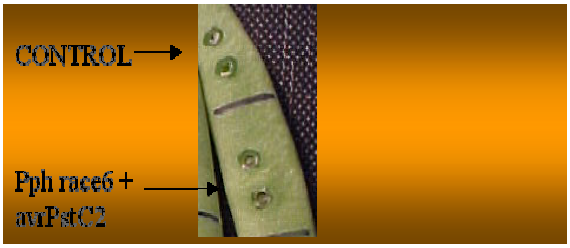
Φώτο Γ (CW)

Εδώ η αντίδραση στην μόλυνση με το βακτήριο *Pph* Race 6(+*PstC2*), δείχνει να είναι τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας (HR). Για την τεκμηρίωση του αποτελέσματος αυτού έγινε ανάλυση πληθυσμού (population analysis) και τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω γράφημα:



Γράφημα ανάλυσης πληθυσμού για τα βακτήρια *Pph* race6 (+*PstC2)* και *Pph* race6

Στην ποικιλία **RM**, η αντίδραση του βακτηρίου *Pph* Race 6(+*PstC2*) ακολουθεί συμπτωματολογικά αυτή του μάρτυρα (control), Φώτο Δ:

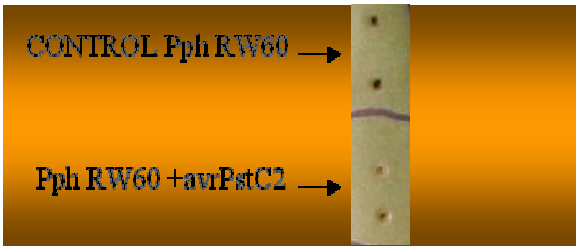


Φώτο Δ (RM)

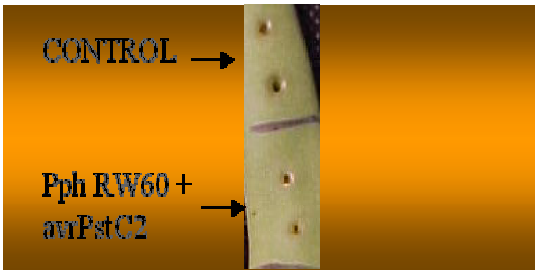
Εδώ βλέπουμε ξεκάθαρα ότι τα συμπτώματα της μόλυνσης με το μάρτυρα (control) δεν έχουν καμία διαφοροποίηση από αυτά του βακτηρίου *Pph* Race 6(+*PstC2*).

Μολύνσεις με το βακτήριο Pph RW60+avrPstC2

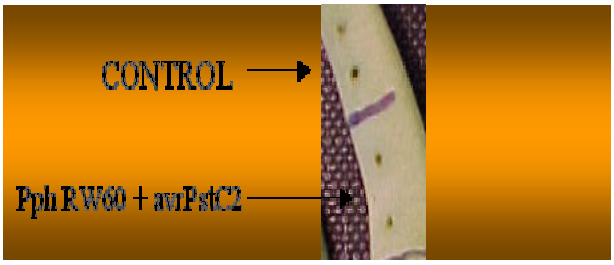
Στις μολύνσεις που έγιναν με το βακτήριο *Pph RW60(+PstC2)*, παρατηρούνται διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα αποτελέσματα που δίνει ο μάρτυρας (control) και αυτών του βακτηρίου *Pph* RW60(+*PstC2*) στην ποικιλία **CW** [εντονότερη HR από τον μάρτυρα (control)], στις υπόλοιπες ποικιλίες δεν παρατηρούνται διαφοροποιήσεις, Φώτο Α1, Β1, Γ1, Δ1:



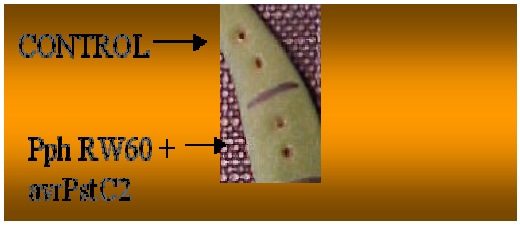
Φώτο Α1 (CW)



Φώτο Β1 (Α 43)



Φώτο Γ1 (TG)



Φώτο Δ1 (RM)

4.2.1 Συζήτηση αποτελεσμάτων από τις μολύνσεις με το Pph race6 (+PstC2) και το Pph RW60 (+PstC2)

Το ομόλογο γονίδιο του *PstC2*, το *avrPpiC2* απομονώθηκε από το βακτήριο *P. syringae pv. pisi* φυλή 5 (59). Τα γονίδια αυτά που βρίσκονται στο χρωμόσωμα των αντίστοιχων βακτηρίων από τα οποία απομονώθηκαν. Το γονίδιο *avrPpiC2* μετά την απομόνωση και κλωνοποίηση του εισήχθη στο βακτήριο *P. syringae pv. phaseolicola*, με το οποίο μολύνθηκαν διάφορες ποικιλίες φασολιάς (RM, TG, CW, και A43). Τα αποτελέσματα των μολύνσεων ήταν η πρόκληση ισχυρής HR σε ποικιλία όπου το στέλεχος δείκτης δίνει συμβατή αντίδραση (59). Οι δύο πρωτεΐνες

οι οποίες κωδικεύωνται από τα παραπάνω γονίδια, έχουν ομολογία 100% (μία αμινοξική διαφορά), πράγμα που ενισχύει την υπόθεση πρόσφατης οριζόντιας μεταφοράς γονιδίου αμολυσματικότητας μεταξύ δύο παθότυπων του βακτηρίου *P. syringae* που έχουν διαφορετικό φάσμα ξενιστών.

Τα αποτελέσματα των μολύνσεων σε λοβούς φασολιάς με τα βακτήρια *Pph RW60 (+PstC2)* και *Pph race6 (+PstC2)* φαίνονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα:

Pods / 24hrs	A43	TG	CW	RM
RW60	HR-	HR--	HR--	HR-
RW60+PstC2	HR	HR-	HR	HR
DC3000	HR+	HR+	HR+++	HR+
Pods / 24hrs	A43	TG	CW	RM
R6	++	+	+	++
R6+PstC2	HR--	HR--	HR	N
DC3000	HR	HR	HR+	N

Pods / 36hrs	A43	TG	CW	RM
RW60	HR	HR-	HR--	HR
RW60+PstC2	HR-	HR-	HR++	HR
DC3000	HR+	HR++	HR+++	HR+
Pods / 36hrs	A43	TG	CW	RM
R6	+++	+++	+++	+++
R6+PstC2	HR-	HR-	HR+	+
DC3000	HR+++	HR++	HR++	HR

Pods / 60hrs	A43	TG	CW	RM
RW60	HR+	HR+	HR	HR+
RW60+PstC2	HR	HR+	HR+++	HR+
DC3000	HR+	HR++	HR+++	HR+
Pods / 60hrs	A43	TG	CW	RM
R6	+++	+++	+++	+++
R6+PstC2	HR-	HR-	HR+	++
DC3000	HR+++	HR++	HR++	HR+

ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΟΛΥΝΣΕΩΝ -2

+++: συμβατή αντίδραση, HR : τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας, HR+: ισχυρότερη αντίδραση υπερευαισθησίας, HR-: μη ορατή αντίδραση ή πολύ ασθενέστερη αντίδραση υπερευαισθησίας, HR--: ασθενής αντίδραση υπερευαισθησίας, HR---: μηδενική αντίδραση υπερευαισθησίας (¨null¨ reaction).

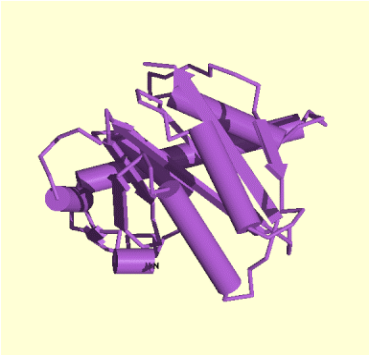
Τα αποτελέσματα που πήραμε από τις μολύνσεις με το στέλεχος *Pph* RW60 *(+PstC2)* ήταν τα αναμενόμενα δηλαδή η επαγωγή αντίδρασης υπερευαισθησίας. Στην περίπτωση όμως των αποτελεσμάτων από τις μολύνσεις με το στέλεχος *Pph* race6 *+PstC2* δεν είναι τα αναμενόμενα (59), και προπάντων στην ποικιλία RM. Στις υπόλοιπες ποικιλίες φαίνεται η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης *PstC2* με κάποιο

φυτικό υποδοχέα, με αποτέλεσμα την επαγωγή αντίδρασης υπερευαισθησίας ή την μείωση της μολυσματικής ικανότητας του βακτηρίου.

Σε ανάλυση in silico (στην βάση δεδομένων PDB id με την μέθοδο ¨Fold recognition¨ χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Treading) της πρωτεΐνης που κωδικεύεται από το γονίδιο *PstC2* προέκυψε δομική ομολογία, από το κατάλοιπο αρ. 53 της πρωτεΐνης και μετά, με μία κυστέινο-πρωτεάση (cysteine protease) του βακτηρίου *P. syringae pv. phaseolicola*, την *avrPphB* , όπως φαίνεται και στην σύγκριση των αλληλουχιών που ακολουθεί:

```
          ---------------------------------------------------CHHHHEEE
avrPphB   ---------------------------------------------------SLSDFSVA
PstC2     MTIVSGHIGKHPSLTTVQAGSSASVENQMPDPAQFSDGRWKKLPTQLSSITLARFDQNIC
          CCEECCCCCCCCCCEEEECCCCCCHHHCCCCCHHCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCH
                  10        20        30        40        50        60

                      20        30                40        50
          ECCCCCCC--CHHHHHHHHHHCCCCCC-------HHHHHHHHCCCCHHHHHHHHHHHHHH
avrPphB   SRDVNHNN--ICAGLSTEWLVMSSDGD-------AESRMDHLDYNGEGQSRGSERHQVYN
PstC2     TNNHGISQRAMCFGLSLSWINMIHAGKDHVTPYASAERMRFL-GSFEGVVHARTVHNFYR
          HCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCHHHHHHHHHHH-HHHHHHHHHHHHHHHHH
                  70        80        90       100       110

             60        70         80            90       100
          ----HHHHHHHHCCCCC-HHHHHHHHHHHHC---CCEECCCCEEEECCCC----------
avrPphB   ----DALRAALSNDDEA-PFFTASTAVIEDA---GFSLRREPKTVHASGG----------
PstC2     TEHKFLMEQASANPGVSSGAMAGTESLLQAAELKGLKL-QPVLEDKSNSGLPFLIACKQS
          HHHHHHHHHHHCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHCCCC-CHHCCCCCCCCCHHHHCCCC
                  130       140       150       160       170

                      110       120       130         140       150
          ------HHHHHHHHHHHCCCCCEEEEEEEECCCEEEEEEEEEE--CCEEEEEECCCEEE
avrPphB   ------SAQLGQTVAHDVAQSGRKHLLSLRFANVQGHAIACSCE--GSQFKLFDPNLGEF
PstC2     GRQVSTDEAALSSLCDAIVENKR-GVMVIYSQEI-AHALGFSVSSDGKRATLFDPNLGEF
          CCHHHHHHHHHHHHHHHHHCCC-CEEEEEHHHH-HHHHHEEECCCCCEEEEECCCCCHH
                   190       200       210       220       230

              160                 170       180
          EEECCCHHHHHHHH----------HHHHHHCCCCEEEEEEEEEC
avrPphB   QSSRSAAPQLIKGL----------IDHYNSLNYDVACVNEFRVSV
PstC2     HTHSKALADTIENISSADGLPLIGVQVFASKIH------------
          HHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCHHHHHHHHHHCC------------
           240       250       260
```

Percentage Identity = 20.2%



Στην φωτογραφία φαίνεται η δομή της πρωτεΐνης avrPphB

4.3 Αναφορά αποτελεσμάτων για το γονίδιο PstF

Είναι γνωστό ότι το γονίδιο *avrPphF* αποτελείται από δύο ORFs (60). Το πρώτο από τα δύο αυτά ORFs κωδικεύει για μια πρωτεΐνη η οποία πιστεύεται ότι λειτουργεί ως σαπερώνη του προϊόντος που κωδικεύει το δεύτερο ORF και αποτελεί την δραστική πρωτεΐνη (effector protein). Μετά από μελέτη στο έως τότε αλληλουχιμένο τμήμα του γονιδιόματος του βακτηρίου *P. syringae pv. tomato DC3000*, βρέθηκε ότι ισχύει το ίδιο και στην περίπτωση του γονιδίου *PstF*. Έτσι η περιοχή η οποία επιλέχτηκε για την δημιουργία των primers για την PCR είναι η παρακάτω:

```
1       CGGATAGAAC AGCGAGATCG GCTGGTCAGG ATCGTCTATC GGACGGTTAC GATCTGCGCG
61      CCCGCCAGCA GCTCTGCTCA CTGACGAGCA TCATCAAAAA GGGAACCTGA TGCTGCTCAG
121     TGACCACTCA TAACCTTAAA TTATGAGGAT ATGAGGAGAT GCATTATGAA AAACGCATTT
181     GACCTGCTTG TGGAAGGGCT GGCTAAGGAC TACAACATGC CGCCCTTGCC TGACAAGAAA
241     CATATCGATG AAGTCTATTG CTTTGAGTTT CAAAGTGGTA TGAACGTAAA AGTATACCAA
301     GACGAATTTC GCTGGGTATA TTTCACCGCT GACGTTGGGA CATTTCAAGA TAGCAGTATT
361     GACACATTAA ACTACGCGCT CCAGCTGAAC AACTTTAGCC TTAGAAAACC TTTCCTGACC
421     TTCGGAATGA CGAAGGAGAA AAATGGTGTA TTGCATACAC GCACCCCCTT GATTGAGGTA
481     GACAACGTGC AAATGCGCAG GATATTTGAG GAGCTTATAG GCGTGGCAGG TGAAATCAGA
541     AAAACACTAA AACTCAAATA GTAGCGAGGA AGTTTTTTAG CCTTGTGAAC TCTGGTAATG
601     TCACATAAAT GCATCAATAT TACATGGGCA CTGTACATAC ACCAGAGCGT CGGGCATAAA
661     AGAAGCAATC TGCAGTTTTT AAAAAGAGGA AACCATTATA GGTAATATTT GCGGCACCTC
721     GGGCTCACGT CATGTGTATA GCCCATCCCA TACACAACGA ATAACTTCAG CTCCCTCTAC
781     ATCCACTCAT GTTGGTGGAG ATACACTGAC ATCCATTCAT CAGCTTTCGC ATAGTCAGAG
841     AGAGCAGTTT CTGAACATGC ATGATCCAAT GAGAGTAATG GGACTTGACC ATGATACCGA
901     GCTTTTCAGA ACGACGGATA GTCGCTATAT AAAAAACGAT AAACTCGCGG GCAATCCACA
961     ATCCATGGCG AGTATCCTTA TGCATGAAGA ACTGCGCCCC AATCGTTTTG CCAGCCATAC
1021    AGGTGCCCAA CCACACGAAG CAAGGGCGTA CGTTCCGAAA AGAATAAAAG CCACCGATCT
1081    AGGAGTTCCA TCACTGAACG TAATGACTGG CTCGCTAGCG CGAGACGGAA TTAGAGCTTA
1141    TGATCACATG AGTGATAATC AGGTCTCTGT CAAAATGCGA CTGGGAGATT TTCTCGAAAG
1201    GGGTGGCAAG GTCTATGCCG ACGCTTCGTC TGTAGCTGAC GATGGGGAAA CATCACAAGC
1261    TCTGATTGTC ACATTGCCCA AAGGACAGAA AGTGCCGGTC GAAAGGGTCT GAATATCGGT
1321    GCTCGTCTAA ACTGTAGATG AGCATCTCAA GCGTGTCGCA AACGCAGCGT CACAGACTCA
1381    TATCCACTTT ATGCATGCAA ATAGCGGGTT ACTCTGCATC GACAGAAAAG
```

Στην αλληλουχία με κόκκινο χρώμα δίνεται το ORF1 και με μπλε το ORF2. Με ροζ χρώμα είναι μαρκαρισμένες οι περιοχές από τις οποίες σχεδιάστηκαν οι primers για το ORF1 και με πράσινο οι περιοχές από τις οποίες σχεδιάστηκαν οι primers για το ORF2.

4.3.1 Ομολογία των ORF2 των γονιδίων avrPphF / PstF

```
ORF2(Pst ATG)  -------------------------------------------------------MHDPMR 6
ORF2*(Pst GTG) ------------VYSPSHTQRITS-APSTSTHVGGDTLTSIHQLSHSQREQFLNMHDPMR 47
orf2 Pph       MGNICNSGGVSRTYSPPTSPVYGSGVSSPSRFVGQYTLTSIHQLSSEERENFLDAHDPMR 60
                                                                     *****

ORF2A           VMGLDHDTELFRTTDSRYIKNDKLAGNPQSMASILMHEELRPNRFASHTGAQPHEARAYV 66
ORF2G           VMGLDHDTELFRTTDSRYIKNDKLAGNPQSMASILMHEELRPNRFASHTGAQPHEARAYV 107
orf2            VYDLNSETSVYRTTQREYVRNGYATGNPNSGAIIALHEELQESPYAQHIGARPDQADAYR 120
                * .*: :*.::***: .*::*.  :***:* * * :****: . :*.* **:*.:* **

ORF2A           PKRIKATDLGVPSLNVMTGSLARDGIRAYDHMSDNQVSVKMRLGDFLERGGKVYADASSV 126
ORF2G           PKRIKATDLGVPSLNVMTGSLARDGIRAYDHMSDNQVSVKMRLGDFLERGGKVYADASSV 167
orf2            PRTAHVSSLNTPSLNVMAGQGALSALRGYAGS--DHVTTEMRLGDFLDQGGKVYSDTSAM 178
                *:  :.:.*..******:*. * ..:*.*     ::*:.:*******::*****:*:*::

ORF2A           ADDGETSQALIVTLPKGQKVPVERV- 151
ORF2G           ADDGETSQALIVTLPKGQKVPVERV- 192
orf2            SAGGDSVEALIVTLPKGRKVPVNILD 204
                : .*:: :*********:****: :
```

Στην περίπτωση του ORF2* το τμήμα της πρωτεΐνης το οποίο είναι χρωματισμένο κόκκινο, αντιστοιχεί σε εναλλακτικό κωδικόνιο έναρξης της μεταγραφής (alternative start codon [GTG]) το οποίο βρίσκεται 123 νουκλεοτίδια πέραν του ATG. Βλέπουμε ότι η ομολογία της περιοχής αυτής με την αντίστοιχη περιοχή της πρωτεΐνης AvrPphF ORF2 είναι αρκετά μεγάλη. Για τον λόγο αυτό επιλέχτηκε να κλωνοποιηθεί το ORF2* με εκκινητή (primer) ο οποίος βρίσκεται πριν το κωδικόνιο GTG.

Όσον αφορά το προϊών του *PstF* ORF1, έγινε μια συγκριτική μελέτη μεταξύ γνωστών βακτηριακών σαπερονών και της PstF ORF1 πρωτεΐνης για τον έλεγχο πιθανών συντηρημένων αλληλουχιών αμινοξέων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα / συστοιχήσεων:

Type III chaperones	**Organism**	**Type III effectors**	**GenBank accession number**
CesT	*E. coli O157:H7*	Tir	BAB37983
SigE	*Salmonella enterica*	SigD	
Orf1	*Pseudomonas aeruginosa*	ExoS	AAA66490
SycE	*Yersinia pseudoturbeculosis*	YopE	
SycT	*Y. enterocolitica*	YopN	AAD16809
SycH	*Y. pseudotuberculosis*	YopH	AAA99011
SpcU	*P. aeruginosa*		AAC16024
SycN	*Y. enterocolitica*	YopN	AAD16821
OrfA	*Erwinia amylovora*	OrfB	
ShcA	*P. syringae*	HopPsyA	

Orf155	*Y. enterocolitica*		AAD16802
SicP	*S.*	SptP	
ORF1 PphF	*P.syringae pv phaseolicola*	ORF2 avrPphF	
ORF1 schF	*P.syringae pv tomato DC3000*	ORF2 hopPtoF	NP790351

```
ORF1PphF        -MKNSFDRLIDGLAKDYGMPGFPEKKHEHEVYCFEFKE-VSIRIYQDK--FKWVYFLSDI 56
ORF1PstF        -MKNAFDLLVEGLAKDYNMPPLPDKKHIDEVYCFEFQSGMNVKVYQDE--FRWVYFTADV 57
CesT            -MSSRSELLLEKFAEKIGIGSIS--FNENRLCSFAIDEIYYISLSDAN--DEYMMIYGVC 55
OrfU            -MSSRSELLLDRFAEKIGVGSIS--FNENRLCSFAIDEIYYISLSDAS--DEYMMIYGVC 55
Orf1            -MNPLYRAAIHQLFLALDLPTPN---DEESVLSLQVGPHLCHLAEHPT--DHLLMFTR-- 52
SycE            -MYS-FEQAITQLFQQLSLSIPD---TIEPVIGVKVGEFACHITEHPV--GQILMFTLPS 53
SycT            -MQTTFTELMQQLFLKLGLNHQV---NENDVYTFEVDGHIQVLIACYH--QQWVQLFSEL 54
SycH            --MRTYSSLLEEFATELGLEEIET--NELGHGAVTIDKIWVVHLAPIN--EKELVAFMRA 54
OrfA            --MMIIQDLLGALARRLEAGTLS--LEAGQLCCLQVNGLEMTLEWLEQ--QNMLFVYLSV 54
ShcA            ----------------MEMPALA--FDDKGACNMIIDKAFALTLLRDD--DTHQRLLLIG 40
Orf155          MINTTFTELLQKIASHFGLDKLS--QDEYGLCELILNDRVVIMLRADEILNRLTLLGPIL 58
SpcU            --------MIDTWLAQWGLRLPS---SNDATLRLQPAEGPELVMERLEG---GWLFVVEL 46
SycN            --MSWIEPIISHFCQDLGVPTSS---PLSPLIQLEMAQSGTLQLEQHG-----ATLTLWL 50
SicP            ----------------MGLPLTF---DDNNQCLLLLDSDIFTSIEAKD---DIWLLNGMI 38


ORF1pphF        GVID-NLDSNACQSLLRLNEFNLRT--PFFTVGLNEKKDGVVHTRIPLLNLDNVEMRRVF 113
ORF1Fpto        GTFQ-DSSIDTLNYALQLNNFSLRK--PFLTFGMTKEKNGVLHTRTPLIEVDNVQMRRIF 114
CesT            GKFP-TDNSNFALEILNANLWFAENGGPYLCYEAG-AQSLLLALRFPLDDATPEKLENEI 113
OrfU            GKFP-TDNPNFALEILNANLWFAENGGPYLCYESG-AQSLLLALRFPLDDATPEKLENEI 113
Orf1            -----LEGQGD-ATASEQNLFSQDPCKPILGRDPE-SGERLLWNRQPLQLLDRAQIHHQL 105
SycE            -----LDNNNEKETLLSHNIFSQDILKPILSWDEV-GGHPVLWNRQPLNSLDNNSLYTQL 107
SycT            G----------ADLPTNDNLFGEHWPAHVQG---RLDGKSILWSQQSLVGLDIDEMQAWL 101
SycH            G--I-LTGQSQLYDILRKNLFSPLSG--VIRCALDKDDHWLLWSQLNINDTSGTQLASVL 109
OrfA            GTLSGTESSTLLSDILAANLFHYGSSDGAAFGLDKEKNELLLFQRFQLSSVDEASFVSAC 114
ShcA            LLEP--HEDLPLQRLLAGALNPLVNAGPGIGWDEQ-SGLYHAYQSIPREKVSVEMLKLEI 97
Orf155          GFSGPEARSTASQLFFCYSINALNKDGPCFAWSEE--LGLIAFKHLSLGELNVENVSKEI 116
SpcU            GLVP--SGLPLGVILQLLQVNSPFSSLAPVKLAADDAGRLVLWAEARDGVDDVDALNRLH 104
SycN            ARSLAWHQCEDAMVKALTLTAAQKSGALPLRAGWLGENQLVLFVSLDERSLTLPLLHQAF 110
SicP            IPLSPVCGDSIWRQIMVINGELAANNEGTLAYIDAAETLLLIHAITDLT--NTYHIISQL 96


ORF1pphF        EALLN---------------LSGEVKKRLDLSESSV--------- 134
ORF1Fpto        EELIG---------------VAGEIRKTLKLK------------- 131
CesT            EVVVKSMENLYLVLHNQGITLENEHMKIEEISSSDNKHYYAGR-- 156
OrfU            EVVVKSMENLYLVLHNQGITLENEHMKIEEISSSDNKHYYAGR-- 156
Orf1            EQLVA----------------AAEELR------------------ 116
SycE            EMLVQ----------------GAERLQTSSLISPPRSFS------ 130
SycT            ERFIDDIEQ----------RKEPQNTKFQPNSTSPILFI------ 130
SycH            TSLVDKAVTLS---------CEPTMKKEEDDHRPSSSHLLV---- 141
OrfA            VQMIEVAKRWQGKFLHG---RALPTAAPRMLAQPGLTLNLAGKIK 156
ShcA            AGLVE-------------------WMKCWREART----------- 112
Orf155          ANFYDWLSLVS--LPAETQQELPPHTQSTQSTQSTQSVKWG---- 155
SpcU            DRLREGHSRLVP------LLEPTGELVPAQIQTSALVFV------ 137
SycN            EQLLR-------------------LQQEVLAP------------ 123
SicP            ESFVN----------------QQEALKNILQEYAKV--------- 116
```

Με PCR κλωνοποιήθηκε το γονίδιο *PstF* από το γονιδίωμα του βακτηρίου *P. s. pv. tomato DC3000*. Για την υπερέκφραση του στα βακτήρια *P. s. pv. phaseolicola* φυλή 6 και RW60.

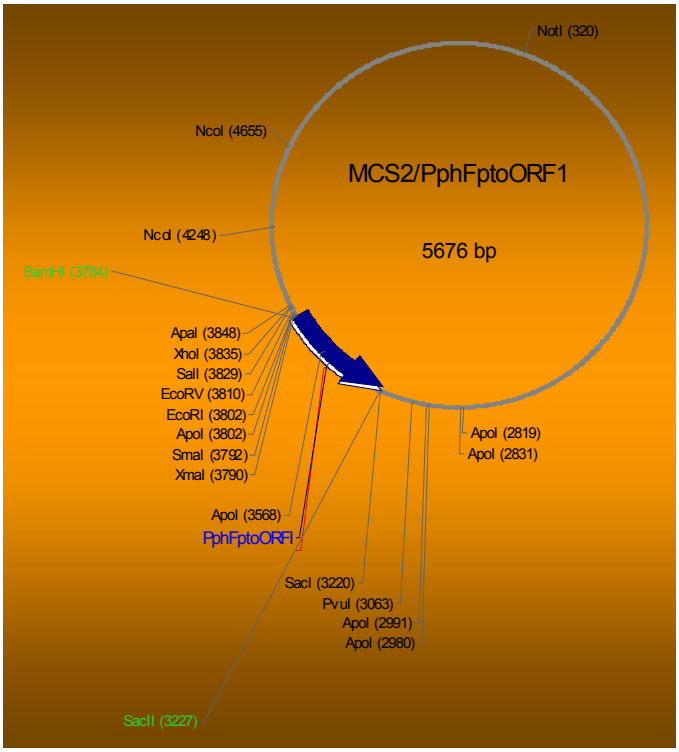
Στην PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εξής primers:

BamHI
AvrPstF ORF1: F: 5'-GACGAGGATCCTCAAAAAGGGAACC-3'
SacI
R: 5'-ATGCCCGCGGCTCTGGTGTATGTA-3'

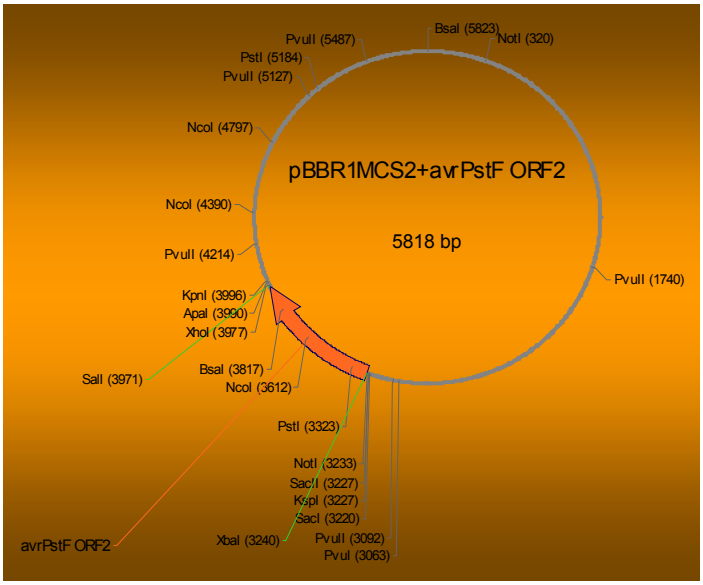
XbaI
AvrPstF ORF2: F: 5'-GCCTTGTGAACTCTAGAAATGTCA-3'
SalI
R: 5'-CATCAGTTTAGTCGACCACCGAT-3'

BamHI
AvrPstF all: F: 5'-GACGAGGATCCTCAAAAAGGGAACC-3'
SalI
R: 5'-CATCAGTTTAGTCGACCACCGAT-3'

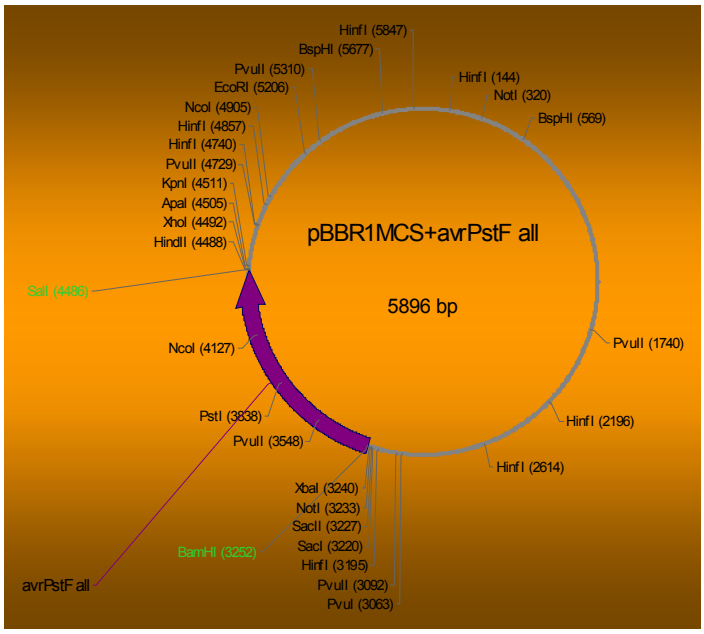
Η κλωνοποίηση του γονιδίου *PstF* έγινε σε φορείς της οικογένειας pBBR1 MCS. Τα κατασκευάσματα φαίνεται στα παρακάτω σχήματα:



Κατασκεύασμα (construct) pBBR1 MCS2/PstF ORF1 (km^R)



Κατασκεύασμα (construct) pBBR1 MCS2/PstF ORF2 (km^R)



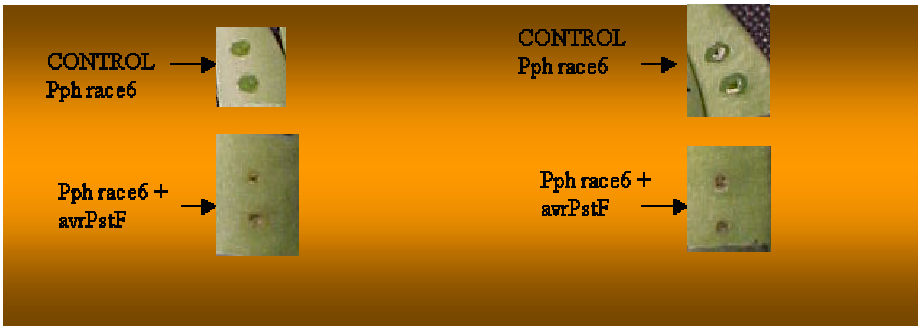
Κατασκεύασμα (construct) pBBR1 MCS/PstF ORF1 και ORF2 (chl^R)

Μετά την κλωνοποίηση των γονιδίων, τα πλασμίδια *pBBR1MCS PstF ORF1, ORF2, PstFall* εισήχθησαν στα στελέχη *Pph* φυλή 6 και *Pph* RW60 (ανθεκτικά στην Rif) με την μέθοδο της τριγονικής βακτηριακής σύζευξης (triparental mating). Έγινε επιλογή αποικιών με διπλή ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, στη Rif και στην ανθεκτικότητα που προσδίδει ο κάθε φορέας. Τα βακτήρια αυτά καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό KB (με τα κατάλληλα αντιβιοτικά) και οι καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν για την μόλυνση φυτών φασολιού, διαφόρων ποικιλιών (RM, CW, TG, A43) με την μέθοδο του εμποτισμού (infiltration) σε φύλλα, καθώς και σε λοβούς όπως αναφέρθηκε και για τα άλλα *Pst* γονίδια σε προηγούμενα εδάφια. Κατά τις μολύνσεις, ως μάρτυρας (control) χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *Pph* Race 6 και *Pph* RW60 χωρίς τα πλασμίδια (constructs).

Μολύνσεις με το στέλεχος Pph Race 6 (+ PstF) (all)

Και στην περίπτωση του γονιδίου *PstF* τα αποτελέσματα είναι ξεκάθαρα. Το γονίδιο αυτό, όπως φαίνεται από τις μολύνσεις, όταν εισαχθεί στο στέλεχος *Pph* race6, καταστέλλει την συμβατή αντίδραση του βακτηρίου. Το αποτέλεσμα της μόλυνσης στην περίπτωση αυτή είναι εμφανέστατη αντίδραση υπερευαισθησίας όπως φαίνεται και από τις Φώτο Α2, Β2, Γ2 και Δ2:

Φώτο Α2 (Α43) Φώτο Β2 (TG)



Φώτο Γ2 (CW) Φώτο Δ2 (RM)

Μολύνσεις με το στέλεχος Pph RW60(+avrPstF)

Όταν το γονίδιο *PstF* εισαχθεί στο στέλεχος *Pph* RW60, τότε όπως φαίνεται από τις μολύνσεις που έγιναν, υπάρχει διαφοροποίηση του φαινοτύπου από αυτόν του μάρτυρα (control). Η αντίδραση υπερευαισθησίας του στελέχους *Pph* RW60(+*avrPstF)* είναι ισχυρότερη στις ποικιλίες CW και A43 Τα αποτελέσματα των μολύνσεων φαίνονται στις παρακάτω Φώτο (A3 και B3):

Φωτο A3 (CW) Φωτο B3 (A43)

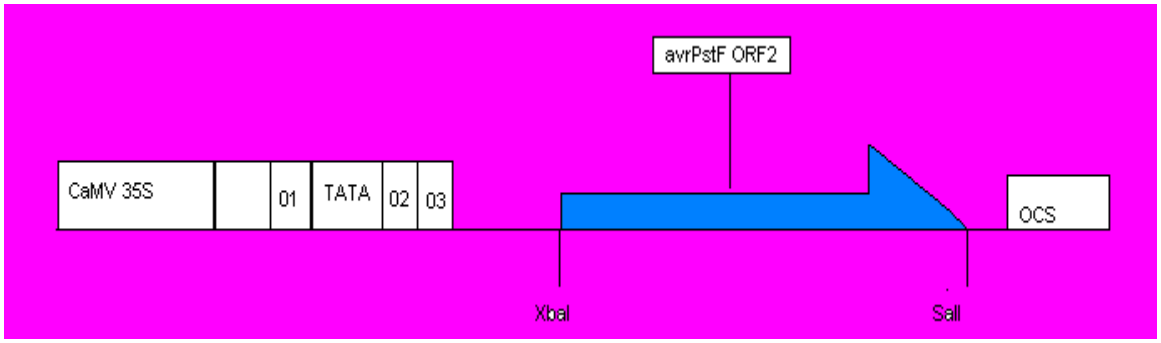
Φωτο Γ3 (RM) Φωτο Δ3 (TG)

Όπως βλέπουμε από τις φωτογραφίες Γ3 και Δ3, τα συμπτώματα των μολύνσεων στις ποικιλίες RM και TG δεν έχουν φαινοτυπική διαφοροποίηση από τον μάρτυρα (control).

Στη συνέχεια το γονίδιο *PstF* ORF2 κλωνοποιήθηκε σε αγροβακτηριακό φορέα, με σκοπό την έκφραση του σε φυτικά κύτταρα με την μέθοδο του αγρο-εμποτισμού

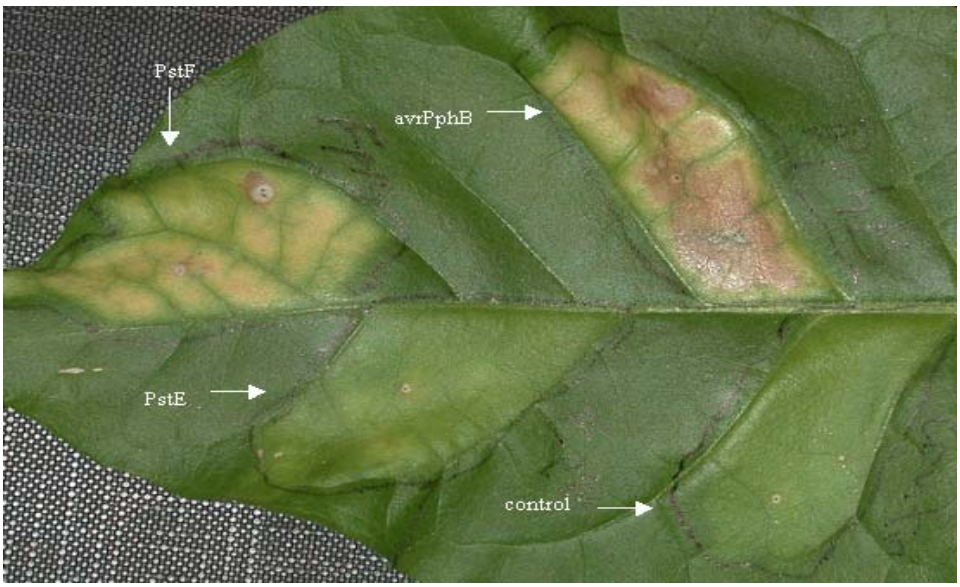
(Agro_infiltration). Από το γονίδιο *avrPstF* επιλέχτηκε να κλωνοποιηθεί μόνο το ORF2 διότι στα έως τώρα ερευνητικά δεδομένα, στο βακτήριο *P. syringae pv. phaseolicola,* φαίνεται ότι από το γονίδιο *avrPphF* η πρωτεΐνη η οποία παράγεται από το ORF1 δεν εντοπίζεται μέσα στο φυτικό κύτταρο αλλά παραμένει στο βακτηριακό κύτταρο (60).

Για την διαδικασία αυτή τα γονίδια κλωνοποιήθηκαν χωρίς τους υποκινητές (promoters και τα hrp box) τους αλλά υπό την επιρροή ιικού υποκινητή (CaMV 35S). Επιλέχτηκαν ένα ζεύγος αγροβακτηριακών φορέων, οι pUC A7-Tx, Bin-Hyg-Tx. Ο χάρτης του πλασμιδίου (construct) φαίνεται στο παρακάτω σχεδιάγραμμα:



Σχεδιάγραμμα κλωνοποίησης του γονιδίου *PstF* ORF2 στον φορέα Bin-Hyg-Tx

Το παραπάνω πλασμίδιο (construct) εισήχθη στο αφοπλισμένο *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, καθώς και στο αγρίου τύπου (μολυσματικό) A. tumefaciens A2 (ανθεκτικό στην Rif). Με την μέθοδο του αγρο-εμποτισμού (Agro_infiltration) μολύνθηκαν φυτά καπνού (var. Xanthi). Οι μολύνσεις αυτές έδειξαν ότι η ενδοκυτταρική έκφραση της πρωτεΐνης *PstF ORF2* στον καπνό, είναι ικανή να δώσει νέκρωση (αντίδραση υπερευαισθησίας). Επίσης οι μολύνσεις με το αγρίου τύπου (μολυσματικό) Αγροβακτήριο έδηξαν ότι η πρωτεΐνη *PstF* ORF2 εκφραζόμενη, αποτρέπει την δημιουργία κορωνοτού κάλου. Στις παρακάτω φωτογραφίες φαίνονται οι συμπτωματολογικές ενδείξεις:

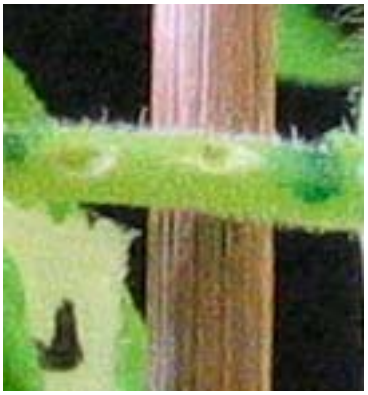


Στην παραπάνω φωτογραφία παρουσιάζεται η μόλυνση φύλλων καπνού με το βακτήριο *Agro. tum.* LBA4404 + PstF ORF2. Είναι εμφανής η αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) η οποία έχει προκληθεί από την έκφραση του διαγονιδίου στα κύτταρα του φυτού, το ίδιο βλέπουμε και στο θετικό μάρτυρα (avrPphB). Από το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται ότι στην ποικιλία αυτή του καπνού υπάρχει κάποια R πρωτεΐνη η οποία αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PstF ORF2, συνέπεια του οποίου είναι η επαγωγή της HR.

Ο σκοπός της εισαγωγής των πλασμιδίων (constructs) στο μολυσματικό στέλεχος του Αγροβακτηρίου όπως προαναφέρθηκε είναι η αναστολή της δημιουργίας του

κορωνοτού κάλου λόγο της έκφρασης της πρωτεΐνης *PstF* ORF2 στα κύτταρα του φυτού (τομάτα) και κατά συνέπεια της επαγωγή αντίδρασης υπερευαισθησίας. Στις φωτογραφίες που ακολουθούν φαίνονται τα αποτελέσματα.

Μάρτυρας: Αγροβακτήριο αγρίου τύπου χωρίς το construct



Μόλυνση με το βακτήριο Agro. tum. +PstF ORF2

4.3.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων από τις μολύνσεις με το Pph race6 (+PstF) και το Pph RW60 (+PstF)

Τα στελέχη *P. s. pv. phaseolicola* φυλή 6 και RW60 δεν φέρουν το ομόλογο γονίδιο (*avrPphF*) του *PstF* το οποίο περιέχεται στην φυλή 7 και είναι πλασμιδιακό (60). Το στέλεχος *Pph* φυλή 6 *(+PstF)* δίνει ασύμβατη αντίδραση (νέκρωση, HR) στις τρεις ποικιλίες φασολιού που χρησιμοποιήθηκαν στις μολύνσεις εκτός από την ποικιλία TG στην οποία η αντίδραση φαίνεται να είναι μηδενική (¨null reaction¨). Στην ποικιλία RM ο υποδοχέας της πρωτεΐνης *AvrPphF* (R1) υπάρχει οπότε όπως φαίνεται η πρωτεΐνη *PstF* ίσος αντιδρά με τον υποδοχέα αυτόν και κατά συνέπεια δίνει νέκρωση (αντίδραση υπερευαισθησίας).

Στις υπόλοιπες ποικιλίες όμως ο υποδοχέας αυτός (R1) δεν έχει βρεθεί. Αυτό ίσος σημαίνει ότι η πρωτεΐνη *PstF* αντιδρά με άλλον/ους υποδοχέα/χείς. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι ενδοκυτταρική όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα των μολύνσεων με το Αγροβακτήριο αγρίου τύπου στον καπνό και στην τομάτα (βλ. παραπάνω).

Η αντίδραση υπερευαισθησίας η οποία επάγετε από τις μολύνσεις με το στέλεχος *Pph RW60* φαίνεται να ενισχύεται στις μολύνσεις με το *Pph RW60(+PstF)*, κυρίως στις ποικιλίες A43 και CW. Το στέλεχος *Pph* RW60 περιέχει το *avr* γονίδιο (αμολυσματικότητας) A2, το οποίο στην ποικιλία A43 (που έχει βρεθεί ότι περιέχει το R2 γονίδιο) δίνει HR (αντίδραση υπερευαισθησίας). Στην μόλυνση όμως με το στέλεχος *Pph RW60 (+PstF)* η HR (αντίδραση υπερευαισθησίας) φαίνεται να είναι κατά πολύ ισχυρότερη. Αυτό δείχνει ότι η πρωτεΐνη *PstF* είναι ικανή να δώσει αντίδραση υπερευαισθησίας η οποία καλύπτει αυτήν του A2 (*avrPphE*).

Σε αντίθεση με το γονίδιο *avrPphF* το οποίο δείχνει να είναι γονίδιο αμολυσματικότητας στην ποικιλία RM και γονίδιο μολυσματικότητας στην ποικιλία CW και στην σόγια, το γονίδιο *PstF* δείχνει να συμπεριφέρεται ως γονίδιο αμολυσματικότητας σε όλες τις ποικιλίες φασολιού.

Τα αποτελέσματα των μολύνσεων σε λοβούς φασολιάς με τα στελέχη *Pph RW60 (+PstF)* και *Pph race6 (+PstF)* φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3):

Pods / 24hrs	A43	TG	CW	RM
RW60	HR-	HR--	HR--	HR-
RW60+PstF	HR+++	HR++	HR+++	HR+
DC3000	HR+	HR+	HR+++	HR+
Pods / 24hrs	A43	TG	CW	RM
R6	++	+	+	++
R6+PstF	HR	N	HR	N
DC3000	HR	HR	HR+	N

Pods / 36hrs	A43	TG	CW	RM
RW60	HR	HR-	HR--	HR
RW60+PstF	HR+++	HR++	HR+++	HR+
DC3000	HR+	HR++	HR+++	HR+
Pods / 36hrs	A43	TG	CW	RM
R6	+++	+++	+++	+++
R6+PstF	HR++	HR---	HR+	HR
DC3000	HR+++	HR++	HR++	HR

Pods / 60hrs	A43	TG	CW	RM
RW60	HR+	HR+	HR	HR+
RW60+PstF	HR+++	HR++	HR+++	HR+
DC3000	HR+	HR++	HR+++	HR+
Pods / 60hrs	A43	TG	CW	RM
R6	+++	+++	+++	+++
R6+PstF	HR++	HR--- (S-)	HR+	HR+
DC3000	HR+++	HR++	HR++	HR+

ΠΙΝΑΚΑΣ ΜΟΛΥΝΣΕΩΝ -3

+++: συμβατή αντίδραση, HR : τυπική αντίδραση υπερευαισθησίας, HR+: ισχυρότερη αντίδραση υπερευαισθησίας, HR-: μη ορατή αντίδραση ή πολύ ασθενέστερη αντίδραση υπερευαισθησίας, HR--: ασθενής αντίδραση υπερευαισθησίας, HR---: μηδενική αντίδραση υπερευαισθησίας (¨null¨ reaction).

Σε in silico ανάλυση της πρωτεΐνης του ORF1 του γονιδίου *PstF*, στην βάση δεδομένων PDB (χρησιμοποιώντας την μέθοδο του Folder Recognition με το πρόγραμμα Threading) βρέθηκε ομολογία με την τύπου III τσαπερόνη έκκρισης του βακτηρίου *E. coli* όπως φαίνεται στην σύγκριση των αλληλουχιών που ακολουθεί:

```
                    10         20         30         40         50
                CCCHHHHHHHHHHHHCCCCC--CCCCCCCCEEEECCCCEEEEECCCCCEEEEEEEEEEC
Tts chaperone   MSSRSELLLEKFAEKIGIGSI--SFNENRLCSFAIDEIYYISLSDANDEYMMIYGVCGKF
PstF ORF1       MKNAFDLLVEGLAKDYNMPPLPDKKHIDEVYCFEFQSGMNVKVYQDEFRWVYFTADVGTF
                CCCHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCEEEEEECCCCEEEEEECCEEEEEEEECCCEE
                        10         20         30         40         50         60
```

```
                70        80          90        100       110
CCCCHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCEEEEE---CCCCEEEEEEEEEECCCCCHHHHHHHHHH
PTDNSNFALEILNANLWFAENGGPYLCYE---AGAQSLLLALRFPLDDATPEKLENEIEV
QDSSIDTLNYALQLNNF--SLRKPFLTFGMTKEKNG--VLHTRTPLIEVDNVQMRRIFEE
ECCCHHHHHHHHHCCCC--CCCCCEEEEECCCCCCC--EEEECCCEEECCCHHHHHHHHH
          70          80        90         100       110
```

```
   120       130       140
HHHHHHHHHHHHHCCCCCCCEEEECC
VVKSMENLYLVLHNQGITLKIEEISS
LIGVAGEIRKTLKLK-----------
HHCCCCCCCEEECCC-----------
 120       130
```

Percentage Identity = 13.7%

Η πρωτεΐνη που φαίνεται στην παραπάνω σύγκριση (Tts chaperone) προέρχεται από το εντεροπαθογόνο βακτήριο *E. coli.*

Τσαπερόνη έκκρισης τύπου ΙΙΙ, από το βακτήριο E. coli.

4.4 Μολύνσεις με μετασχηματισμένα βακτήρια του είδους P. aptata

Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν στελέχη του είδους *Pseudomonas aptata* με πλασμίδια τα οποία φέρουν πιθανά γονίδια αμολυσματικότητας (pBBR1MCS-PstE, pBBR1MCS4-PstC2, pBBR1MCS-PtoB) του βακτηρίου *P. s. pv. tomato* DC3000. Έγινε μετασχηματισμός βακτηρίων του είδους *P. aptata* με τα παραπάνω γονίδια ώστε να γίνει έλεγχος παθογένειας σε διάφορες ποικιλίες σακχαρότευτλων, θεωρούμενα ως ένα άλλο ετερόλογο ξενιστή των βακτηρίων από τα οποία προήλθαν τα προαναφερθέντα γονίδια *avr*. Όπως βλέπουμε στην φωτογραφία παρακάτω όλα τα μετασχηματισμένα βακτήρια έδηξαν επαγωγή αντίδρασης υπερευαισθησίας κατά τις μολύνσεις. Το μόλυσμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης σε βακτηριακά κύτταρα, 10^7 cfu/ml.

Φωτο 1: Μολύνσεις σε φύλα σακχαρότευτλου

Βιβλιογραφία

(1) **Alfano J.R., & Collmer A.**, 1996, Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell* **8**, 1683.

(2) **Alfano J. R. & Collmer A.**, 1997, The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. *J. Bacteriol.* **179**, 5655.

(3) **Anderson et al.**, 1999 : Proc. Natl Acad. Sci. USA, 96:12 839-12 843.

(4) **Arlat, M., F. Van Gijsegem, J. C. Huet, J. C. Pernollet, and C. A. Boucher.** 1994. PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. EMBO J. **13**:543–553.

(5) **Baker, B., P. Zambryski, B. Staskawicz, and S. P. Dinesh-Kumar.** 1997. Signaling in plant-microbe interactions. Science **276**:726–733.

(6) **Barinaga M.**, 1996. The "alien DNA" of virulence genes. *Science* **272**: 1262.

(7) **Bauer, D. W., Z. M. Wei, S. V. Beer, and A. Collmer.** 1995. *Erwinia chrysanthemi* harpin*Ech*: an elicitor of the hypersensitive response that contributes to soft-rot pathogenesis. Mol. Plant-Microbe Interact. **8**:484–491.

(8) **Bent, A.** Function meets structure in the study of plant disease resistance genes. *Plant Cell* **8,**1757–1771 (1996).

(9) **Bogdanove A. J., Wei Z.-M., Zhao L., Beer S. V.**, 1996, *Erwinia amylovora* secretes harpin via a type III pathway and contains a homologue of yopN of *Yersinia*. *Journal of Bacteriology* **178**, 1720.

(10) **Boyes, D. C., Nam, J. & Dangl, J. L.** 1998, The *Arabidopsis thaliana RPM1* disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95,** 15849–15854.

(11) **Clerc at al** 1998: Appl. Environ. Microbiol. **64**:1180-1187.

(12) **Collmer, A., Alfano, J. R., Anderson, D. M., Badel, J. L., Deng, W.-L., Fouts, D. E., Rehm, A. H., Rojas, C. M., Schneewind, O. & van Dijk, K.** (2000) in *Biology*

of Plant-Microbe Interactions, eds. de Wit, P. J. G. M., Bisseling, T. & Stiekema, W. (Int. Soc. Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul), Vol. 2., pp. 65–70.

(13) **Derrick E. Fouts et al** : Genomewide identification of Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor, PNAS _ February 19, 2002 _ vol. 99 _ no. 4 _ **2275–2280.**

(13a) Elingboe, A.H. (1976) Genetics of host-parasite interactions. In *Encyclopedia of Plant Physiology. Physiological Plant Pathology* **Vol. 4** Hetefuss, R., and Williams, P.H. (ed.) Berli-Heidelberg-New York: Springer, pp. 179-192.

(14) Flor, H.H. (1955) Host parasite interaction in flax rust-its genetic and other implications. *Phytopathology* **45**: 680-685.

(14a) **Flor, H. H.** 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev. Phytopathol. **9**:275–296.

(15) **Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W. J. Broughton, A. Rosenthal, and X. Perret.** 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature **387**:394–401.

(16) **Gaudriault S., Brisset M-N., Barney M-A.,** 1998. HrpW of *Erwinia amylovora*, a new Hrp-secreted protein. *FEBS Letters* **428**: 224-228.

(17) **Ginocchio C., Olmsted S. B., Wells C. L., Galan J. E.,** 1994, *Cell* **76**, 717.

(18) **Gopalan, S., D. W. Bauer, J. R. Alfano, A. O. Loniello, S. Y. He, and A. Collmer.** 1996. Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plant cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. Plant Cell **8**:1095–1105.

(19) **He, S. Y., H. C. Huang, and A. Collmer.** 1993. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: a protein that is secreted via the *hrp* pathway and elicits the hypersensitive response in plants. Cell **73**:1255–1266.

(20) **He, X.-T., H. B. Krishnan, and S. G. Pueppke.** 1997. Genes controlling cultivar-specific nodulation of soybean by *Rhizobium fredii* are homologous genes encoding type III secretion systems in other bacteria. GenBank accession no. L12251.

(21) **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol. Molec. Biol.Rev. **62**:379-433.

(22) **Initiative, T. A. G.** Analysis of the genome of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408,** 796–815 (2000).

(23) **Dangl, J. L. & Jonathan D. G. Jones** 14 June 2001: Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature, 411: 826-833.

(24) **Jin Q, Hu W, Brown I, McGhee G, Hart P, Jones AL, He SY**: Mol Microbiol 2001, **40**:1129-1139.

(25) **Jones, J. D. G.** Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr. Opin. Plant Biol.*

(26) **Kim et al.,** 1998 *Mol. Plant Microb. Interact.* **11**: 1247 or 563??

(27) **Koebnik R**: Trends Microbiol 2001, **9**:586-590.

(28) **Knapp, S., J. Hacker, T. Jarchau, and W. Goebel**. 1986. Large, unstable inserts in the chromosome affect virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* O6 strain 536. J. Bacteriol. **168**:22–30.

(29) **Knoop, V., B. Staskawicz, and U. Bonas**. 1991. Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. J. Bacteriol. **173**:7142–7150.

(30) **Knutton S. et al.**, 1998, EMBO J. 17 :2166.

(31) **Kubori T. et al.,** 1998, Science **280**:602.

(32) **Lamb, C. J.** 1994. Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. Cell **76**:419–422.

(33) **Leister, R. T., F. M. Ausubel, and F. Katagiri**. 1996. Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the *Arabidopsis* genes RPS2 and RPM1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**:15497–11502.

(34) **Lindgren, P. B., R. C. Peet, and N. J. H. Panopoulos**. 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity on bean plants and hypersensitive response on nonhost plants. J. Bacteriol. **168**:512–522.

(35) **Manceau and Horvaiw**, 1997: Appl. Environ. Microbiol. **63**:498-505.

(36) **Pirhonen, M. U., M. C. Lidell, D. L. Rowley, S. W. Lee, S. Jin, Y. Liang, S. Silverstone, N. T. Keen, and S. W. Hutcheson.** 1996. Phenotypic expression of *Pseudomonas syringae avr* genes in *E. coli* is linked to the activities of the *hrp*-encoded secretion system. Mol. Plant-Microbe Interact. **9**:252–260.

(37) **Plotnikova M., Rahme L. G., Ausubel F. M.,** 2000, *Plant Physiol.* **124**:1766.

(38) **Pugsley, A. P.** 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. **57**:50-108.

(39) **Pugsley, A. P., and O. Possot.** 1993. The general secretory pathway of *Klebsiella oxytoca*: no evidence for relocation or assembly of pilin-like PulG protein into a multiprotein complex. Mol. Microbiol. **10**:665-674.

(40) **Pugsley, A. P., O. Francetic, O.M. Possot, N. Sauvonnet, and K.R. Hardie.** 1997. Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria. Gene. **192**:13-19.

(41) **Puri, N., C. Jenner, M. Bennett, R. Stewart, J. Mansfield, N. Lyons, and J. Taylor.** 1997. Expression of *avrPphB*, an avirulence gene from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and the delivery of signals causing the hypersensitive reaction in bean. Mol. Plant-Microbe Interact. **10**:247–256.

(42) **Roine E, Wei W, Yuan J, Nurmiaho-Lassila E-L, Kalkkinen N, Romantschuk M, He SY**: Proc Natl Acad Sci USA 1997, **94**:3459-3464.

(43) **Rosqvist R, Magnusson K, Woif-Watz H**: EMBO J 1994, **13**:964-972.

(44) **Salmond, G. P. C.** 1994. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. **32**:181-200.

(45) **Saraste, M., Sibbald, P. R. & Wittinghofer, A.**: The P-loop—a common motif in ATP- and GTPbinding proteins. *Trends Biotechnol.* **15,** 430–435 (1990).

(46) **Sheng Yang He, Qiaoling J**: Current Opinion in Microbiol 2003, **6**:15-19.

(47) **Simonich M.T., Innes R.W.,** 1995. A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for the *avrPph3* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Molecular Plant-Microbe Interactions **8**: 637-640.

(48) **Sory MP, Corrnelis GR**: Mol Mikrobiol 1994, **14**:583-594.

(49) **Staskawicz, B. J., F. M. Ausubel, B. J. Baker, J. G. Ellis, and J. D. Jones.** 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. Science **268**:661–667.

(50) **Taira S, Tuimala J, Roine E, Nurmiaho-Lassila EL, Savilahti H, Romantschuk M**: Mol Microbiol 1999, **34**:737-744.

(51) **Van den Ackerveken, G., E. Marois, and U. Bonas.** 1996. Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. Cell **87**:1307–1316.

(52) **Van Gijsegem F, Vasse J, Camus J, Marenda M, Boucher C**: Mol Microbiol 2000, **36**:249-260.

(53) **Vivian, A., and M. J. Gibbon.** 1997. Avirulence genes in plant-pathogenic bacteria: signals or weapons? Microbiology **143**:693–704.

(54) **Vivian A. and D.L. Arnold 2000**: *Bacterial effector genes and their role in host-pathogen interactions,* Journal of Plant Pathology, **82** (3), 163-178.

(55) **Wangelnik & Bonas**, 1996. HrpXv, an AraC-type regulator, activates axpression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *J. Bacteriol.* **178**, 1061.

(56) **Wei, Z. M., R. J. Laby, C. H. Zumoff, D. W. Bauer, S. Y. He, A. Collmer, and S. V. Beer.** 1992. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Science **257**:85–88.

(57) **Wei Z.-M. & Beer S. V.**, 1995. hrpL activates Erwinia amylovora hrp gene transcription and is a member of the ECF subfamily of σ factors. *J. Bacteriol.* **175**, 6201.

(58) **Mansfield J., Janner C., Hockenhull R., Bennett A. M., Stewart B., Stewart R.** 1994. Characterization of *avrPphE*, a Gene for cultivar-specific Avirulance from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Which is physically linked to *hrpY*, a new *hrp* gene identified in the Halo-Blight Bacterium. MPMI Vol. 7, No. **6**, 1994, pp. 726-739.

(60) **Tsiamis G., Mansfield W. J., Hockenhull R., Jackson W. R., Sesma A., Athanassopoulos E., Bennett A. M., Stevens C., Vivian A., Taylor D. J., Murillo J.** 2000. Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola*, that cause of bean halo-blight disease. EMBO Journal Vol. **19** No. 13 pp. 3204-3214, 2000.

(61) Thanassi, D. G., and S.J. Hultgren. (2000). Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. Curr. Opin. Cell Biol. **12**:420-430.

(62) **Buttner and Bonas,** 2003. Curr. Opin. Plant Biol. **6**:312-319.

(63) **Tampakaki,** 2000. MPMI **13**:1366-1374.

(64) **Lee J. et. al**. 2002. PNAS **98**:289-294.