

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

**Διατριβή  
Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης**

**Βιολογική Δράση Της Πρωτεΐνης AvrPphB Και  
Μοριακός Χαρακτηρισμός Γονιδίων Και Πρωτεϊνών  
Του Εκκριτικού Συστήματος Τύπου III Του Φυτοπαθογόνου  
Βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola***

**ΜΠΑΣΤΑΚΗ ΜΑΡΙΝΑ**

**Υπεύθυνος Καθηγητής: Νίκος Πανόπουλος**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ  
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2000**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών, του Βιολογικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά το χρονικό διάστημα 1999-2000.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή Νίκο Πανόπουλο, όχι μόνο για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ στον τομέα της Βιοτεχνολογίας στο εργαστήριο του, αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για την ηθική και επιστημονική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια εκτέλεσης της διατριβής μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Δ. Καρδάση για το χρόνο που διέθεσε ως δεύτερος βαθμολογητής, για την διόρθωση του τελικού κειμένου.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών, όπου έγινε η εκπόνηση της παρούσας διατριβής, για την άψογη συνεργασία τους και το φιλικό περιβάλλον. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Νατάσα Ταμπακάκη για την επιστημονική υποστήριξη αλλά τη συνεχή παρουσία και συμπαράστασή της τόσο στις ευχάριστες όσο και στις δύσκολες, σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα το Νίκο για την ουσιαστική συμβολή του στη μορφοποίηση του τελικού κειμένου, αλλά κυρίως για τη συμπαράσταση, την κατανόηση και την υπομονή του όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θέλω να εκφράσω τη βαθιά ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου για την κατανόηση, την αγάπη και την αδιάκοπη ηθική συμπαράστασή τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	8
<b>1.1. Γενικά</b> .....	9
<b>1.2. Αντίδραση Υπερευαισθησίας φυτών σε παθογόνα</b> .....	10
<b>1.3. Γονίδια ανθεκτικότητας (resistance genes, R)</b> .....	10
<b>1.4. Λειτουργία των γονιδίων αμολυσματικότητας (avirulence, avr)</b> .....	11
<b>1.5. Γονίδια <i>hrp</i></b> .....	13
<b>1.6. Το φυτοπαθογόνο βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i></b> .....	14
<b>1.7. Έκκριση πρωτεϊνών στα Gram-αρνητικά βακτήρια</b> .....	14
1.7.1. Γενικά.....	14
1.7.2. Εκκριτικό μονοπάτι τύπου I.....	15
1.7.3. Εκκριτικό μονοπάτι τύπου II .....	16
1.7.4. Εκκριτικό μονοπάτι τύπου III .....	17
1.7.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά .....	17
1.7.4.2. Εξελικτική εκδοχή της δημιουργίας των εκκριτικών συστημάτων τύπου III.....	18
1.7.4.3. Δομικά συστατικά και ρύθμιση της εκκριτικής μηχανής τύπου III.....	20
1.7.4.4. Εκκριτικό σύστημα τύπου III στην <i>P. syringae</i> .....	23
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	27
<b>2.1. ΥΛΙΚΑ</b> .....	28
2.1.1. Προέλευση αντιδραστηρίων και υλικών.....	28
2.1.2. Πλασμιδιακοί φορείς –Στελέχη βακτηρίων και σακχαρομύκητα.....	28
2.1.3. Καλλιέργειες βακτηρίων και σακχαρομύκητα.....	28
2.1.4. Πλασμιδιακές κατασκευές .....	29
2.1.5. Φυτικό υλικό .....	32
<b>2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	32
2.2.1. Παρασκευή και ανάλυση νουκλεϊκών οξέων .....	32

2.2.1.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	32
2.2.1.2. Απομόνωση ολικού RNA από φυτικά κύτταρα.....	32
2.2.1.3. Πέψη μορίων με ένζυμα περιορισμού.....	33
2.2.1.4. Ηλεκτροφορητική ανάλυση, απομόνωση και καθαρισμός τιμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	33
2.2.1.5. Διαδικασίες υποκλωνοποίησης μορίων DNA.....	33
2.2.1.6. Ταυτοποίηση ανασυνδιασμένων βακτηριακών κλώνων.....	34
2.2.1.7. Μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR).....	35
2.2.1.8. Αντίστροφη μεταγραφή και Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (RT-PCR).....	36
2.2.2. Μετασχηματισμός προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων.....	37
2.2.2.1. Μετασχηματισμός βακτηρίων <i>E.coli</i> με πλασμιδιακό DNA.....	37
2.2.2.2. Μετασχηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα.....	37
2.2.3. Μέθοδος έκφρασης γονιδίων σε φυτά.....	38
2.2.3.1. Μόλυνση φυτών καπνού με τον ιικό φορέα PVX 202.....	38
2.2.4. Βιοδοκιμή.....	39
2.2.4.1. Μέτρηση ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης σε μετασχηματισμένα κύτταρα σακχαρομύκητα.....	39
2.2.5. Παρασκευή και ανάλυση πρωτεϊνών.....	40
2.2.5.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα <i>E.coli</i> .....	40
2.2.5.2. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από φυτικά κύτταρα.....	40
2.2.5.3. Ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών.....	40
2.2.5.4. Ανίχνευση ολικών πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.....	41
2.2.5.6. Ανάλυση Western.....	41
2.2.5.7. Έκφραση και καθαρισμός πρωτεϊνών από στήλη συγγενείας Ni- NTA αγαρόζης.....	42
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>44</b>

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Έλεγχος της ικανότητας της μικρότερης μορφής της πρωτεΐνης <i>AnrPphB</i> να οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, όταν εκφράζεται σε φυτικά κύτταρα.....</b>	<b>45</b>
--	-----------

3.1. Γενικά.....	46
3.2. Έκφραση της μικρότερης μορφής της πρωτεΐνης AvrPphB σε φυτά καπνού και τομάτας με το υικό σύστημα έκφρασης PVX202. ....	48
3.3. Επαγωγή του γονιδίου <i>hsr203J</i> κατά την έκφραση της μικρότερης μορφής της πρωτεΐνης avrPphB.....	50
3.4. Συζήτηση.....	52
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Μελέτη του εκκριτικού συστήματος τύπου III στο φυτοπαθογόνο βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>.....</b>	<b>55</b>
4.1. Γενικά.....	56
4.2. Απομόνωση και ταυτοποίηση των γονιδίων <i>hrpF</i> , <i>hrpG</i> , <i>hrpT</i> και <i>hrpV</i> του φυτοπαθογόνο βακτήριο <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> .....	57
4.3. Έκφραση των πρωτεϊνών HrpF, HrpG, HrpT και HrpV σε <i>E.coli</i> . ....	65
4.4. Έλεγχος της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών HrpF, HrpG, HrpT και HrpV με τις πρωτεΐνες HrpZ και AvrPto με το σύστημα των δύο υβριδίων.....	72
4.5. Έλεγχος τυχόν αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφόρων πρωτεϊνικών συστατικών του εκκριτικού συστήματος III στην <i>P. s. phaseolicola</i> . ....	74
4.5. Συζήτηση.....	78
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>81</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χαρακτηριστική ικανότητα πολλών φυτοπαθογόνων βακτηρίων να επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) σε ανθεκτικά φυτά ή να εκδηλώνουν παθογένεια σε φυτά ξενιστές, εξαρτάται από τα γονίδια *hrp* και *hrc*, που συγκροτούν το εκκριτικό σύστημα τύπου III. Το μονοπάτι αυτό ελέγχει την έκκριση μιας ομάδας πρωτεϊνών, μεταξύ των οποίων είναι και οι πρωτεΐνες Avr. Προκειμένου να προσδιοριστεί η βιολογική δράση της ελλειμματικής, ως προς τα 62 πρώτα αμινοξικά κατάλοιπα, μορφής της πρωτεΐνης AvrPphB, (AvrPphB-Δ62G63M) του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, χρησιμοποιήθηκε το παροδικό ιικό σύστημα έκφρασης, που βασίζεται στον ιό PVX202. Η έκφραση της πρωτεΐνης AvrPphB-Δ62G63M σε φυτά καπνού (*Nicotiana benthamiana*), προκάλεσε την ολοκληρωτική τους νέκρωση, προτείνοντας ότι η έλλειψη των 62 πρώτων αμινοξέων έχει μικρή επίδραση στην ικανότητα της πρωτεΐνης AvrPphB να πυροδοτεί την HR. Επιπλέον, απομονώθηκαν και μελετήθηκαν τα γονίδια *hrp* της μεταγραφικής μονάδας *hrpC* από το ίδιο φυτοπαθογόνο και διερευνήθηκε η πιθανότητα τυχόν αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνικών συστατικών του μονοπατιού Hrp, με σκοπό τη συμβολή στη σκιαγράφιση ενός δομικού και λειτουργικού μοντέλου της εκκριτικής συσκευής τύπου III στα φυτοπαθογόνα βακτήρια.

## ABSTRACT

The ability of many plant pathogenic bacteria to elicit the hypersensitive response (HR) on resistant host plants or on non-host plants, as well as to be pathogenic in their host plants is dependent on the presence of a cluster of genes, called *hrp* (hypersensitive reaction and pathogenicity). Certain *hrp* genes encode components of a specialized protein secretion pathway, called “type III” secretion system that appears to be dedicated to the secretion of virulence proteins in both plant and animal pathogens. Nine of the *hrp* genes have homologs in animal-pathogenic *Yersinia*, *Shigella*, and *Salmonella* spp., and these have been renamed *hrc* (for HR and conserved). In order to examine the biological activity of a truncated version of AvrPphB protein (AvrPphB-62G63M), lacking the first 62 amino acid residues, we used a transient expression system, based on virus PVX202 (Potato Virus X). The expression of AvrPphB-62G63M protein in *Nicotiana benthamiana* plants caused a severe necrosis, suggesting that the elimination of the 62 amino acid residues, had little affect on the ability of AvrPphB protein to trigger HR. In addition, *hrp* genes, belonging to the *hrpC* transcriptional unit, were cloned out of the same pathogen. In order to understand the structure and the functional role of the type III secretion apparatus in plant pathogenic bacteria, we investigated the possible interactions among the components of the Hrp pathway.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## 1.1. Γενικά

Ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από την προσβολή φυτών από παθογόνους μικροοργανισμούς και ιούς, έχει κινήσει τα τελευταία χρόνια το έντονο ενδιαφέρον των βιολόγων εξ' αιτίας του συχνού συσχετισμού του με την ανθεκτικότητα των φυτών, σε μικροβιακές και ιολογικές μολύνσεις. Φαίνεται να υπάρχουν δύο τύποι φυτικού κυτταρικού θανάτου που σχετίζονται με τη μόλυνση από παθογόνα: ένας γρήγορος, υπερευαίσθητος κυτταρικός θάνατος (hypersensitive response) που εντοπίζεται στη θέση της αρχικής μόλυνσης κατά την εξέλιξη μιας ασύμβατης αλληλεπίδρασης (incompatible interaction) μεταξύ ενός ανθεκτικού φυτού και ενός μη μολυσματικού (avirulent) παθογόνου και ένας αργός κυτταρικός θάνατος, ο οποίος εξαπλώνεται πέρα από το σημείο της προσβολής, κατά την εξέλιξη ορισμένων συμβατών αλληλεπιδράσεων (compatible interactions) που εμπλέκουν ένα ανθεκτικό φυτό και ένα μολυσματικό (virulent), νεκρογόνο παθογόνο και οδηγεί στην εκδήλωση ασθένειας. Ο υπερευαίσθητος κυτταρικός θάνατος συνοδεύεται από την επαγωγή ενός πακέτου αμυντικών αποκρίσεων, που περιλαμβάνουν την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου (AOS), τη συσσώρευση αντιμικροβιακών συστατικών (φυτοαλλεξίνες) και την ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος που καταλήγει στη δημιουργία φυσικών εμποδίων στην εξάπλωση του παθογόνου σε παρακείμενους ιστούς του ξενιστή (12, 19, 24). Συνεπώς, ο υπερευαίσθητος κυτταρικός θάνατος φαίνεται να είναι μια μορφή αυτοκτονίας του τοπικά μολυσμένου ιστού, για την προστασία από την εξάπλωση του παθογόνου σε υγιείς φυτικούς ιστούς. Αντίθετα, ο αργός, κυτταρικός θάνατος δεν εμποδίζει αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό ή την εξάπλωση του παθογόνου και ως εκ τούτου δεν συσχετίζεται με αυτό που θεωρείται ανθεκτικότητα σε ασθένειες.

Είναι ενδιαφέρον ότι τόσο ο υπερευαίσθητος όσο και ο σχετιζόμενος με την παθογένεια κυτταρικός θάνατος, μπορεί να οδηγήσει σε μία διασυστηματική, ευρέου φάσματος, αμυντική απόκριση σε ολόκληρο το φυτό, που ονομάζεται “διασυστηματική επίκτητη ανθεκτικότητα” (Systemic acquired resistance, SAR) (74). Η SAR είναι αποτελεσματική ενάντια σε μεταγενέστερες μολύνσεις από το ίδιο ή διαφορετικό παθογόνο.

## 1.2. Αντίδραση Υπερευαισθησίας φυτών σε παθογόνα.

Ο γρήγορος κυτταρικός θάνατος, περιορισμένης έκτασης, που σχετίζεται με τον περιορισμό του παθογόνου και την ενεργοποίηση του φυτικού μηχανισμού άμυνας, ονομάστηκε αντίδραση υπερευαισθησίας (*hypersensitive response*, HR).

Η αντίδραση αυτή πρωτοπαρατηρήθηκε στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα από τον Gäumann, ο οποίος μελετούσε την ιστολογία της αντίδρασης φυτών, από ανθεκτικές και ευαίσθητες ποικιλίες σιτηρών, σε μολύνσεις από διαφορετικές φυλές του μύκητα *Puccinia graminis* (παθογόνο αίτιο της σκωρίασης) (1). Πολλές δεκαετίες αργότερα, ο Klement και οι συνεργάτες του περιέγραψαν το ίδιο φαινόμενο σε βακτηριακά παθογόνα των φυτών (45). Οι περιορισμένης έκτασης, νεκρωτικές κηλίδες που προκαλούν ορισμένες ικές μολύνσεις σε φυτά δείκτες, εμπίπτουν στην ίδια κατηγορία.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά της αντίδρασης υπερευαισθησίας είναι: α) για την επαγωγή της απαιτείται προσωρινά, ενεργός βακτηριακός μεταβολισμός, ώστε να παραχθούν οι επαγωγείς της, οι οποίοι δεν προσχηματίζονται αλλά παράγονται μετά τη διείσδυση του βακτηρίου στον φυτικό αποπλάστη (44, 70), β) η επαγωγή της απαιτεί στενή επαφή μεταξύ βακτηρίου και φυτικών κυττάρων (79), και γ) σε ορισμένους συνδυασμούς φυτού-βακτηρίου, ένα βακτήριο είναι ικανό να πυροδοτήσει τον κυτταρικό θάνατο ενός φυτικού κυττάρου (87). Πρόσφατες μαρτυρίες υποδεικνύουν ότι η HR είναι μέρος ενός προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (*programmed cell death*), που ενεργοποιείται στα φυτά μετά την προσβολή παθογόνων (26, 90).

## 1.3. Γονίδια ανθεκτικότητας (*resistance genes*, R).

Η έκβαση της αλληλεπίδρασης μεταξύ φυτών και παθογόνων μικροοργανισμών καθορίζεται τόσο από τη γενετική σύσταση του παθογόνου όσο και από εκείνη του φυτού. Ο Flor πρώτος παρατήρησε ότι η ανθεκτικότητα των φυτών καθορίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις από μονά επικρατή γονίδια ανθεκτικότητας (*resistance genes*, R genes) στο φυτό και λειτουργικά αντίστοιχα γονίδια αμολυσματικότητας (*avirulence genes*, avr) στο παθογόνο, διατυπώνοντας έτσι την υπόθεση “γονιδίου-προς-γονίδιο” (*gene-for-gene hypothesis*) (20). Αυτό σημαίνει ότι η ανθεκτικότητα εκδηλώνεται μόνο

όταν το φυτό-ξενιστής φέρει ένα συγκεκριμένο γονίδιο ανθεκτικότητας (R) και το παθογόνο ένα λειτουργικά αντίστοιχο γονίδιο αμολυσματικότητας (*avr*).

Η ανάπτυξη νέων μοριακών τεχνικών οδήγησε στην απομόνωση πολλών γονιδίων ανθεκτικότητας από φυτά την τελευταία δεκαετία, καθ'ένα από τα οποία εμφανίζει εξειδίκευση σε διαφορετικά παθογόνα π.χ. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Tobacco Mosaic Virus (TMV)*, *Cladosporium fulvum* και *Melampsora lini*. Το εκπληκτικό με τα γονίδια αυτά είναι ότι εμφανίζουν ομοιότητες στη δομή ακόμα και όταν η εξειδίκευσή τους αφορά παθογόνα με εντελώς διαφορετική βιολογία και τρόπους παθογένειας. Κοινό χαρακτηριστικό πολλών κλωνοποιημένων R γονιδίων είναι ότι διαθέτουν υδρόφοβες περιοχές (transmembrane motifs, TM), περιοχές για δέσμευση νουκλεοτιδίων (nucleotide binding sites, NBS), περιοχές κινασών πρωτεϊνών (protein kinase motifs, PK) και περιοχές πλούσιες σε επαναλαμβανόμενα κατάλοιπα λευκίνης (leucine-rich repeats, LRR) (81). Άλλα φυτικά γονίδια που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα περιλαμβάνουν τυπικά μόρια μεταβίβασης σήματος, όπως τα γονίδια Pto και Pti της τομάτας (59, 101). Παρόλο που τα προϊόντα των γονιδίων R εμφανίζουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά εμφανίζουν και μεγάλο βαθμό πολυμορφισμού (8).

Η απομόνωση των γονιδίων ανθεκτικότητας έχει συμβάλει σημαντικά όχι μόνο στη μοριακή ανάλυση των αλληλεπιδράσεων φυτών-παθογόνων αλλά και στην κατανόηση των διαδικασιών με τις οποίες δημιουργούνται νέα γονίδια ανθεκτικότητας. Τέλος, τα γονίδια R αποτελούν χρήσιμα μοριακά εργαλεία για τη γενετική τροποποίηση των φυτών με στόχο την αντιμετώπιση των φυτικών ασθενειών με τη δημιουργία νέων ανθεκτικών ποικιλιών.

#### **1.4. Λειτουργία των γονιδίων αμολυσματικότητας (*avr*ulence, *avr*).**

Η απομόνωση των περισσότερων *avr* γονιδίων βασίστηκε στην ικανότητά τους να ελέγχουν την εξειδίκευση των αλληλεπιδράσεων φυτού-παθογόνου και να μετατρέπουν μία παθογόνο φυλή (*virulent race*) σε μη-παθογόνο (*avirulent*), ως προς μία συγκεκριμένη ποικιλία φυτού, όταν μεταφερθούν σ' αυτήν με κατάλληλη τεχνική. Με τον τρόπο αυτό απομονώθηκε το πρώτο *avr* γονίδιο από το φυτοπαθογόνο βακτήριο

*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (41). Με τον ίδιο τρόπο έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα περισσότερα από 30 βακτηριακά γονίδια *avr* (16, 49).

Ο τρόπος της μοριακής αναγνώρισης των *avr* γονιδίων από τα φυτά παραμένει άγνωστος σε πολλές περιπτώσεις. Εντούτοις, σε ορισμένες περιπτώσεις τα προϊόντα των *avr* γονιδίων είναι πρωτεΐνες οι οποίες είτε εκκρίνονται από το παθογόνο στον φυτικό αποπλάστη μέσω του γενικού εκκριτικού μονοπατιού, είτε εκκρίνονται μέσα στο φυτικό κύτταρο χρησιμοποιώντας ένα εξειδικευμένο βακτηριακό εκκριτικό μηχανισμό (τύπου III) που εμφανίζει πολλά κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ ζωικών και φυτικών παθογόνων.

Τα κύρια χαρακτηριστικά των γονιδίων *avr* είναι: 1) οι αλληλουχίες τους δεν εμφανίζουν ομολογία σε νουκλεοτιδικό ή πρωτεϊνικό επίπεδο, αλλά ούτε και με άλλες πρωτεΐνες που έχουν καταχωρηθεί μέχρι σήμερα στις τράπεζες δεδομένων. Ενδιαφέρουσα εξαίρεση αποτελεί η πρωτεΐνη *avrRxv* της *Xanthomonas campestris*, η οποία εμφανίζει ομοιότητα με την πρωτεΐνη *AvrI* της *Salmonella typhimurium* και την πρωτεΐνη *YopJ* της *Yersinia pseudotuberculosis*, τα οποία είναι ζωικά παθογόνα, καθώς και με το προϊόν του γονιδίου *y410* από το συμβιωτικό βακτήριο *Rhizobium* spp. (21), 2) επάγονται *in planta*, δηλαδή μετά από μόλυνση των βακτηρίων στο φυτό, καθώς και σε ελάχιστα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας, 3) κωδικοποιούν υδροφιλικές πρωτεΐνες που δεν έχουν πεπτίδια έκκρισης ή διαμεμβρανικές περιοχές 4) παρόλο που οι πρωτεΐνες *Avr* των βακτηριακών παθογόνων θεωρούνται υπεύθυνες για την μοριακή αναγνώριση των παθογόνων από τα ανθεκτικά φυτά, εντούτοις δεν έχουν ανιχνευθεί έξω από τα βακτηριακά κύτταρα και καμία από τις βακτηριακές πρωτεΐνες *Avr* δεν επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας, όταν ενύεται στο διακυττάριο χώρο φύλλων, φυτών που φέρουν το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας. Η αντίδραση υπερευαισθησίας επάγεται μόνο όταν ζωντανά παθογόνα βακτήρια που φέρουν τα γονίδια *avr* ενύονται στον αποπλάστη ή (τεχνητά) όταν εκφραστούν ενδογενώς στα φυτικά κύτταρα (αναφορά η παρούσα εργασία). Ο λόγος είναι ότι η φαινοτυπική έκφραση των *avr* γονιδίων στα βακτήρια απαιτεί την παρουσία μιας άλλης ομάδας γονιδίων, τα γονίδια *hrp* (63).

### 1.5. Γονίδια *hrp*.

Στις αρχές του 1980 ένας αριθμός ερευνητών άρχισε να χρησιμοποιεί την μεταλλαξογένεση με μεταθετά στοιχεία για την ανακάλυψη βακτηριακών γονιδίων που διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε ποικίλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και παθογόνων. Η χρησιμοποίηση αυτής της τεχνικής στα φυτοπαθογόνα βακτήρια της ταξινομικής ομάδας *Pseudomonas syringae* παρείχε την πρώτη μαρτυρία για την ύπαρξη γενετικών βακτηριακών καθοριστών η παρουσία των οποίων ήταν απαραίτητη, όχι μόνο για την επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε ανθεκτικά φυτά, αλλά και για την ικανότητά τους να προκαλούν ασθένεια σε φυτά ξενιστές (54). Για το λόγο αυτό τα γονίδια αυτά ονομάστηκαν *hrp* (hypersensitive reaction and pathogenicity). Μετέπειτα μελέτες οδήγησαν στη χαρτογράφηση της ομάδας των γονιδίων *hrp* σε μία περιοχή 25kb, του γονιδιώματος της *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* και άλλων συγγενών παθογόνων (32, 53, 54, 67). Ανάλογες ομάδες γονιδίων ταυτοποιήθηκαν σε φυτοπαθογόνα βακτήρια του γένους *Ralstonia*, *Xanthomonas* και *Erwinia* που είναι ταξινομικά απόμακρα τόσο μεταξύ τους όσο και σε σχέση με τα μέλη του γένους *Pseudomonas*. Παρά τις φαινοτυπικές τους ομοιότητες, οι ομάδες των *hrp* γονιδίων δεν είναι ταυτόσημες αλλά διαχωρίζονται σε δύο οικογένειες. Η πρώτη αποτελείται από τις γονιδιακές ομάδες *hrp* που προέρχονται από τα βακτήρια του γένους *Ralstonia* και *Xanthomonas* και η δεύτερη από βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και *Erwinia* (2). Ορισμένα από αυτά εμφανίζονται συντηρημένα μεταξύ των δύο γονιδιακών ομάδων *hrp* και παρουσιάζουν ομοιότητες με παράγοντες παθογένειας των ζωικών παθογόνων του γένους *Yersinia*, *Salmonella* και *Shigella* καθώς επίσης και με γονίδια της οργάνωσης του μαστιγίου των εντεροβακτηρίων. Τα γονίδια αυτά προσδιορίζουν ένα νέο βακτηριακό εκκριτικό σύστημα που είναι γνωστό ως εκκριτικό σύστημα τύπου III. Το γεγονός ότι τα γονίδια αυτά εμφανίζονται συντηρημένα σε όλα τα βακτήρια που διαθέτουν εκκριτικό σύστημα τύπου III, οδήγησε στην επωνομασία τους ως γονίδια *hrc* (hrp gene conserved) (10).

## **1.6. Το φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae*.**

Η *Pseudomonas syringae* αποτελεί μέλος μιας σημαντικής ομάδας Gram-αρνητικών βακτηριακών παθογόνων, φυτών και ζώων, τα οποία εξαρτώνται από το εκκριτικό σύστημα τύπου III για τη μεταφορά παραγόντων παθογένειας στα κύτταρα των ξενιστών τους. Με βάση την παθογονική της εξειδίκευση για διάφορα φυτικά είδη, η *Pseudomonas syringae* διαιρείται σε περισσότερους από 40 “παθότυπους” (pathovars) (100). Τα βακτήρια αυτά προκαλούν κηλιδώσεις στα φύλλα και νεκρώσεις σε άλλους ιστούς/όργανα φυτών-ξενιστών τους ενώ επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας σε ανθεκτικά φυτά (31). Στα φυτά ξενιστές, τα συμπτώματα τυπικά αναπτύσσονται μετά από αρκετές ημέρες βακτηριακής ανάπτυξης στους ενδοκυττάριους χώρους των φύλλων ή άλλων παρεγχυματικών ιστών, ενώ στα ανθεκτικά φυτά, ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, που χαρακτηρίζει την αντίδραση υπερευαισθησίας, λαμβάνει χώρα μέσα σε 24 ώρες, σε φυτικά κύτταρα που βρίσκονται σε επαφή με το βακτήριο (69).

## **1.7. Έκκριση πρωτεϊνών στα Gram-αρνητικά βακτήρια.**

### **1.7.1. Γενικά.**

Στα Gram-αρνητικά παθογόνα έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα, 4 διαφορετικά εκκριτικά μονοπάτια για πρωτεΐνες. Τα μονοπάτια αυτά είναι υπεύθυνα για τη μεταφορά διαλυτών εξωκυτταρικών ενζύμων στο περιβάλλον μέσο, ή για την εξειδικευμένη στόχευση πρωτεϊνών παθογένειας στο κύτταρο-ξενιστή. Σε πολλές περιπτώσεις τα μονοπάτια έκκρισης πρωτεϊνών εμφανίζουν ομοιότητες με αυτά που εμπλέκονται στη συναρμολόγηση βακτηριακών εξαρτημάτων, όπως τα μαστίγια ή τα ινίδια σύζευξης. Ο συνδυασμός βιοχημικής και γενετικής ανάλυσης αποκάλυψε ότι τα μονοπάτια πρωτεϊνικής έκκρισης και ο επιφανειακός εντοπισμός διαφόρων οργανιδίων είναι μηχανιστικά παρόμοια, κάτι το οποίο δεν ήταν εμφανές από την απλή σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των σχετιζόμενων πρωτεϊνών. Η επιλογή για το μονοπάτι το οποίο θα χρησιμοποιήσει μια πρωτεΐνη για την εξαγωγή της δεν επιβάλλεται μόνο από την εξειδικευμένη απαίτηση της εκκρινόμενης πρωτεΐνης να διασχίσει τον κυτταρικό

φάκελο στη λειτουργική της μορφή, αλλά και από την ανάγκη να εξασφαλίσει τη μεταφορά της στη σωστή θέση δράσης, έξω από το βακτηριακό κύτταρο.

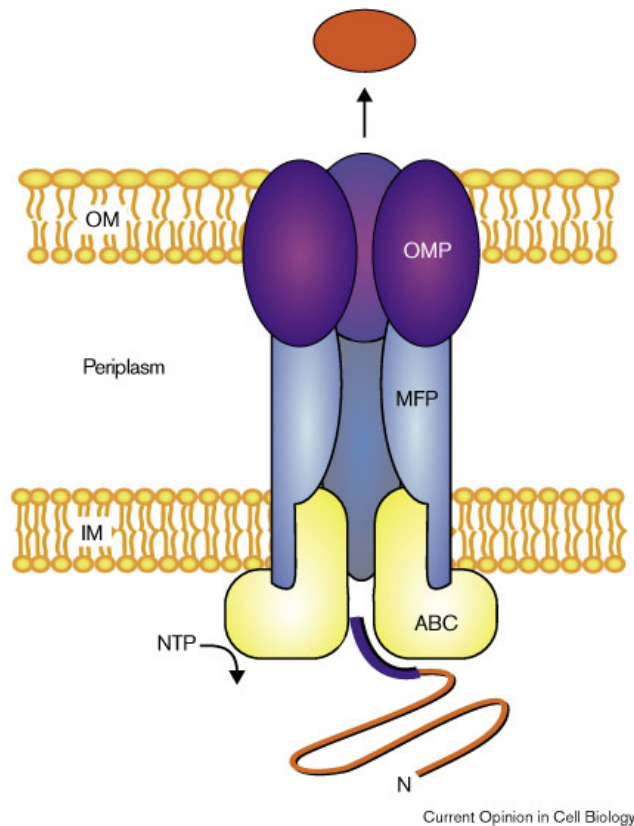
Η ανάλυση της σχέσης σε επίπεδο αλληλουχίας των διαφόρων μηχανών εξωκυττάριας έκκρισης και η λειτουργική συμπληρωματικότητα μεμονωμένων εκκριτικών συστατικών μεταξύ τους, επέτρεψε την ταξινόμηση των εκκριτικών συστημάτων σε μηχανιστικά συγγενείς κατηγορίες. Ο βασικός μηχανισμός της έκκρισης που διέπει τα συστήματα αυτά φαίνεται να είναι παρόμοιος ή ταυτόσημος. Με βάση τις ομοιότητες αυτές έχουν προσδιοριστεί 3 συντηρημένα εκκριτικά μονοπάτια τα οποία ονομάζονται εκκριτικά συστήματα τύπου I, II και III. (75). Πρόσφατα, η σύγκριση των ομοιοτήτων σε επίπεδο αλληλουχίας μεταξύ των συστατικών των διαφόρων εκκριτικών μονοπατιών, οδήγησε στον προσδιορισμό ενός άλλου μονοπατιού μεταφοράς, το οποίο αναφέρεται ως εκκριτικό μονοπάτι τύπου IV (95).

Σε αντίθεση με τα μονοπάτια που απαιτούν την παρουσία βοηθητικών παραγόντων, έχει προσδιοριστεί ένας εκκριτικός μηχανισμός αυτομεταφοράς ο οποίος λειτουργεί με αυτοπροωθούμενη απελευθέρωση των πρωτεϊνών. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αυτού του μηχανισμού αποτελεί η έκκριση της πρωτεΐνης IgA του παθογόνου *Neisseria gonorrhoeae* (43). Αυτό το μονοπάτι αυτομεταφοράς φαίνεται να λειτουργεί σε μια ποικιλία διαφορετικών Gram-αρνητικών παθογόνων και ίσως να προσδιορίζει ένα νέο εκκριτικό πρωτεϊνικό μηχανισμό.

### **1.7.2. Εκκριτικό μονοπάτι τύπου I.**

Το εκκριτικό μονοπάτι τύπου I χρησιμοποιείται από ένα ευρύ φάσμα Gram-αρνητικών βακτηρίων για την έκκριση τοξινών, πρωτεασών και λιπασών (9). Το σύστημα αυτό είναι ανεξάρτητο από το γενικό εκκριτικό μονοπάτι (general secretion pathway, GSP), που δομείται από τα προϊόντα των *sec* γονιδίων και εκκρίνει πρωτεΐνες απ' ευθείας, από το κυτόπλασμα στην εξωτερική μεμβράνη χωρίς την παρουσία περιπλασμικού ενδιάμεσου (Εικ.1.1). Από τα υποστρώματα του μονοπατιού αυτού απουσιάζει το κλασικό αμινοτελικό πεπτίδιο-σινιάλο και τη θέση του κατέχει ένα καρβοξυτελικό σινιάλο έκκρισης, 60 αμινοξέων (9). Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, ο εκκριτικός μηχανισμός τύπου I αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες: ένα

μεταφορέα τύπου ABC (ABC transporter, ATP binding cassette), που εδράζει στην εσωτερική βακτηριακή μεμβράνη, μία διμερή πρωτεΐνη που συνδέει την εσωτερική και την εξωτερική μεμβράνη και ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών σύντηξης μεμβρανών (18) και τέλος μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης που σχετίζεται με την πρωτεΐνη TolC της *Escherichia coli* (89).

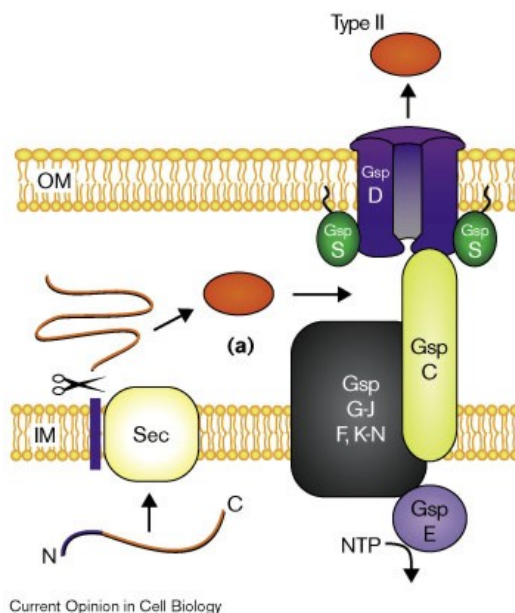


**Εικόνα 1.1:** Εκκριτικό μονοπάτι τύπου I στα Gram-αρνητικά βακτήρια (85).

### 1.7.3. Εκκριτικό μονοπάτι τύπου II.

Το εκκριτικό μονοπάτι τύπου II αντιπροσωπεύει την 3<sup>η</sup> τελική διακλάδωση του γενικού εκκριτικού μονοπατιού. Το μονοπάτι αυτό είναι υπεύθυνο για την έκκριση εξωκυτταρικών ενζύμων και τοξινών από ένα μεγάλο αριθμό Gram-αρνητικών βακτηρίων (65, 73, 82).





**Εικόνα 1.2:** Εκκριτικό μονοπάτι τύπου II στα Gram-αρνητικά βακτήρια (85).

Οι πρωτεΐνες εκκρίνονται πρώτα στο περίπλασμα μέσω του μονοπατιού *Sec* και στη συνέχεια μεταφέρονται στον εξωκυττάριο χώρο με τη βοήθεια ενός εξειδικευμένου εκκριτικού μηχανισμού που αποτελείται από τουλάχιστον 12 διαφορετικά συστατικά. Η πλειοψηφία των συστατικών αυτών είναι πρωτεΐνες της εσωτερικής μεμβράνης. Στον εκκριτικό μηχανισμό τύπου II συμμετέχει και μία πρωτεΐνη, ενσωματωμένη στην εξωτερική μεμβράνη, η οποία φαίνεται να λειτουργεί ως κανάλι σύνδεσης του περιπλάσματος με το εξωκυττάριο μέσο (Εικ. 1.2).

#### 1.7.4. Εκκριτικό μονοπάτι τύπου III.

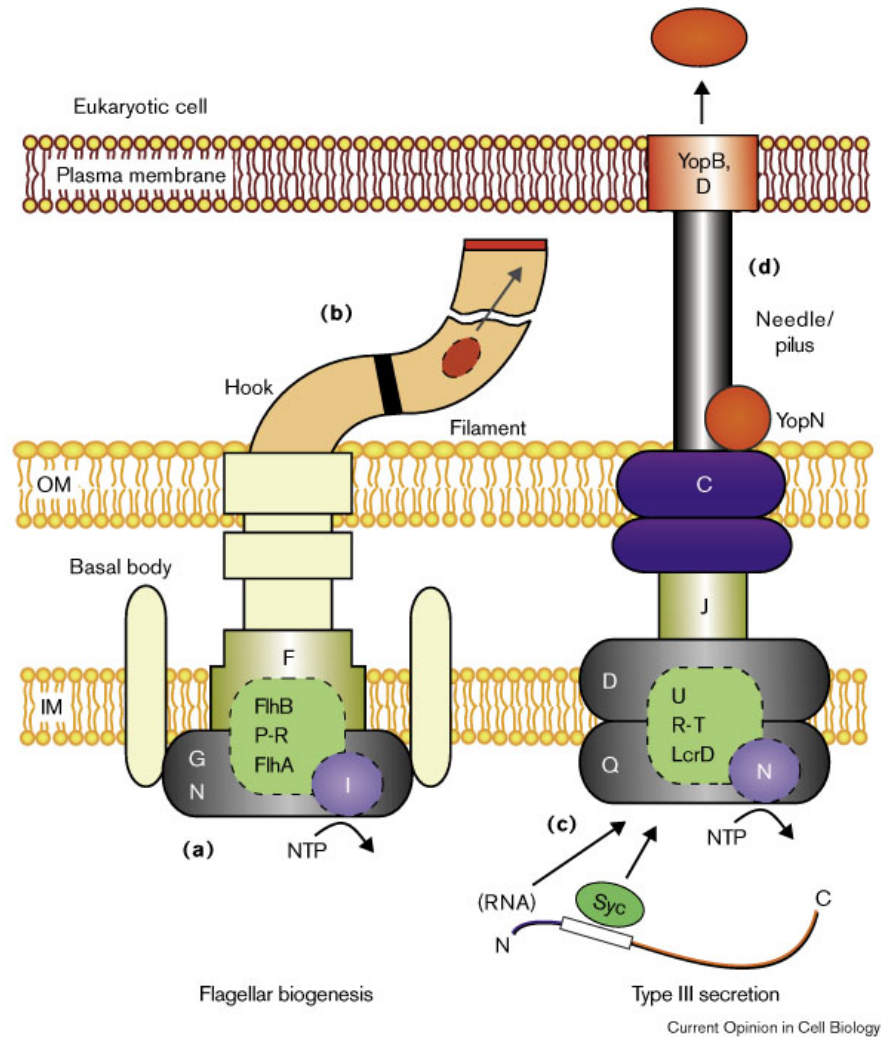
##### 1.7.4.1. Γενικά χαρακτηριστικά.

Το εκκριτικό μονοπάτι τύπου III είναι υπεύθυνο για την κυτοπλασμική μεταφορά παραγόντων παθογένειας (effector protein) στα κύτταρα του ξενιστή και χρησιμοποιείται από ένα μεγάλο αριθμό φυτικών και ζωικών παθογόνων (36, 50). Το εκκριτικό σύστημα

τύπου III αποτελείται από περίπου 20 εκκριτικά συστατικά, τα οποία συναρμολογούνται σε μία υπερδομή που συνδέει τις μεμβράνες του βακτηριακού φακέλου. Τα εκκριτικά συστήματα τύπου III έχουν 3 ιδιαίτερα χαρακτηριστικά: 1) την απουσία ενός πεπτιδίου-οδηγού στις εκκρινόμενες πρωτεΐνες, το οποίο είναι χαρακτηριστικό των πρωτεϊνών που εκκρίνονται μέσω του γενικού εκκριτικού μονοπατιού, 2) την απαίτηση βοηθητικών πρωτεϊνικών παραγόντων (τσαπερόνες) για τη μεταφορά πολλών από τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες και 3) την ευρέως διαδεδομένη απαίτηση για επαφή με το κύτταρο του ξενιστή προκειμένου να πραγματοποιηθεί πλήρης ενεργοποίηση του εκκριτικού μηχανισμού.

#### **1.7.4.2. Εξελικτική εκδοχή της δημιουργίας των εκκριτικών συστημάτων τύπου III.**

Τα Gram-αρνητικά βακτήρια φαίνεται να απέκτησαν τα εκκριτικά συστήματα τύπου III, μέσω κάποιων μηχανισμών οριζόντιας γονιδιακής μεταφοράς. Η πλειοψηφία των συστατικών του εκκριτικού μηχανισμού τύπου III, φαίνεται να εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη και έχουν δομικές ομοιότητες με συστατικά της οργάνωσης του μαστιγίου (36). Το βασικό σωματίο του μαστιγίου συνδέει την εσωτερική με την εξωτερική μεμβράνη και παρέχει θέση πρόσφυσης του νηματίου (56). Το κυτοπλασμικό τμήμα του βασικού σωματίου φαίνεται να περιέχει το μηχανισμό ο οποίος οδηγεί στην έκκριση και τη συγκρότηση του μαστιγίου (Εικ. 1.3). Ο μηχανισμός αυτός εξάγει μονομερές υπομονάδες φλαγγελίνης, μέσω ενός κεντρικού καναλιού, που απαιτούνται για την οργάνωση του αναπτυσσόμενου μαστιγίου. Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι η συσκευή του μαστιγίου λειτουργεί σαν ένα πρωτεϊνικό εκκριτικό σύστημα (99).



**Εικόνα 1.3:** Συγκριτική απεικόνιση του μοντέλου του εκκριτικού συστήματος τύπου III και της βιογένεσης του μαστιγίου (85).

Παραδόξως, συστατικά του εκκριτικού μηχανισμού τύπου III στα φυτοπαθγόνα βακτήρια είναι στενότερα συσχετισμένα με συστατικά της συσκευής του μαστιγίου, σε σχέση με τα ομόλογά τους στα ζωικά παθγόνα βακτήρια. Είναι λοιπόν πιθανό, τα εκκριτικά συστήματα τύπου III να εμφανίστηκαν στα φυτοπαθγόνα βακτήρια, ως μια εξελικτική προσαρμογή του μαστιγίου, προκειμένου να εκκριθούν και άλλες πρωτεΐνες εκτός της φλαγγελίνης, διευκολύνοντας έτσι τα βακτήρια αυτά ν' αναπτύξουν στενότερη σχέση με τα φυτικά ή ζωικά κύτταρα (Εικ. 1.3).

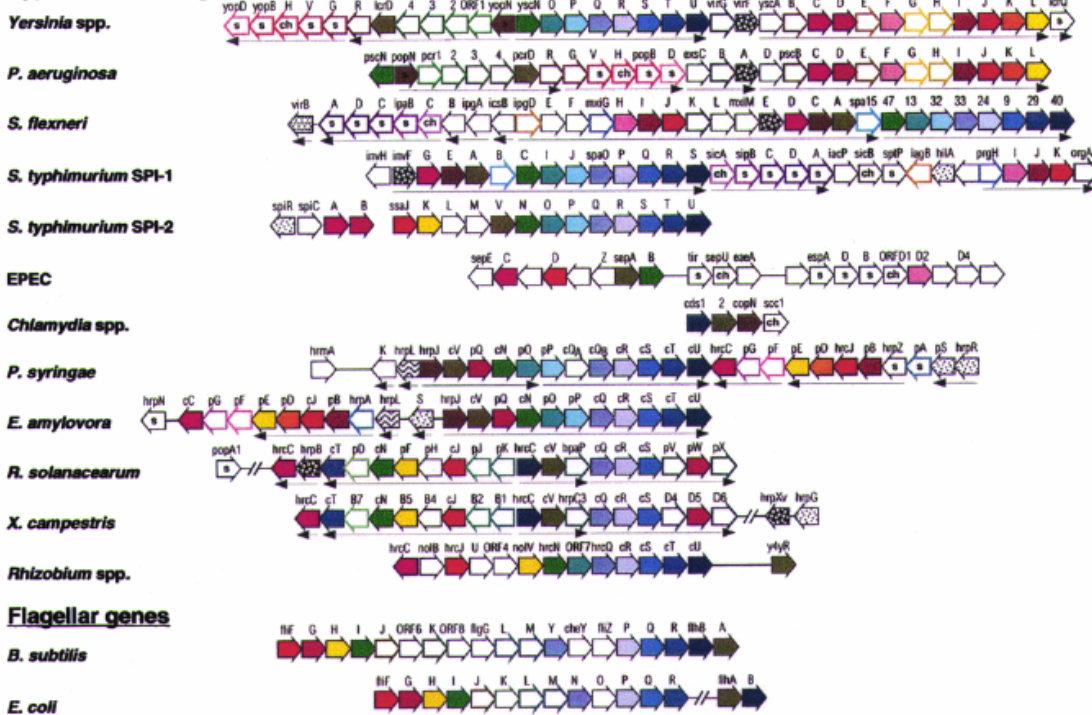
#### 1.7.4.3. Δομικά συστατικά και ρύθμιση της εκκριτικής μηχανής τύπου III.

Όλα τα γνωστά εκκριτικά συστήματα τύπου III, ζωικών και φυτικών παθογόνων βακτηρίων, μοιράζονται έναν αριθμό βασικών δομικών συστατικών τα οποία είναι ιδιαίτερα συντηρημένα (36, 50) (Εικ. 1.4). Τα συστατικά αυτά μπορούν να διαιρεθούν σε δύο τουλάχιστον ομάδες. Η μία ομάδα αποτελείται από πρωτεΐνες που προβλέπεται να εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη, περιλαμβάνοντας μία πρωτεΐνη που εμφανίζει ομοιότητες στην αλληλουχία με τους πρωτεϊνικούς μεταφορείς της οικογένειας των σεκρετινών (secretin) και μερικές λιγότερο συντηρημένες λιποπρωτεΐνες. Η άλλη ομάδα αποτελείται από πρωτεΐνες ενσωματωμένες στη μεμβράνη, οι οποίες εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με συστατικά του μαστιγίου.

Πρόσφατα, απομονώθηκε μια υπερμοριακή δομή που σχετίζεται με το εκκριτικό σύστημα τύπου III της *Salmonella typhimurium* (47). Η δομή αυτή, που ονομάστηκε σύμπλοκο «σύριγγας», διαπερνά τόσο την εσωτερική όσο και την εξωτερική μεμβράνη του βακτηριακού φακέλου και μοιάζει με το βασικό σωματίο του μαστιγίου, υποστηρίζοντας περαιτέρω την αναπτυξιακή σχέση του μαστιγίου με τα εκκριτικά συστήματα τύπου III. Είναι πιθανό ότι το σύμπλοκο «σύριγγας», λειτουργεί σαν ένας κοίλος αγωγός μέσω του οποίου οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες διασχίζουν τους διάφορους φραγμούς του βακτηριακού φακέλου.

Εκτός από το σύμπλοκο «σύριγγας», ορισμένα εκκριτικά συστήματα τύπου III σχηματίζουν διαφορετικές υπερμοριακές δομές που φαίνεται να συμμετέχουν στην μεταφορά “effector” πρωτεϊνών μέσα στο κύτταρο του ξενιστή (46, 71). Οι δομές αυτές διαφέρουν πολύ μεταξύ διαφορετικών παθογόνων. Για παράδειγμα, η *S. typhimurium* και το εντεροπαθογόνο *E. coli* παράγουν νηματοειδή εξαρτήματα που συνδέουν τα βακτήρια με το κύτταρο-ξενιστή και τα οποία φαίνεται να αποβάλλονται όταν διεγείρονται κυτταρικές αποκρίσεις (46).

### Type III secretion genes



**Εικόνα 1.4:** Γενετική οργάνωση των εκκριτικών συστημάτων τύπου III και των γονιδίων βιοσύνθεσης του μαστιγίου από *B.subtilis* και *E.coli*. Τα ομόλογα γονίδια υποδεικνύονται με το ίδιο χρώμα. Τα εκκριτικά συστήματα τύπου III των ζωικών και φυτικών παθογόνων είναι ομαδοποιημένα σύμφωνα με τις γενετικές τους ομοιότητες. Τα γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες απεικονίζονται με ασπρόμαυρες κουκίδες. Ένα μικρό s μέσα στο σύμβολο του γονιδίου υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί εκκρίνεται, ενώ τα γονίδια που κωδικοποιούν τσαπερόνες είναι σημειωμένα με ch. Τα βέλη κάτω από τα γονίδια καθορίζουν τις μεταγραφικές μονάδες, όπου αυτές είναι γνωστές. Για τα εκκριτικά συστήματα τύπου III των φυτοπαθογόνων, τα ονόματα των γονιδίων *hrc* και *hrp* αντικαθίστανται ορισμένες φορές με *c* και *p* αντίστοιχα. (36.)

Αντίθετα, η *Pseudomonas syringae* παράγει ένα αρκετά λεπτότερο αγωγό, ο οποίος ίσως διαπερνά το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα (71). Αν και οι δομές αυτές φαίνεται να απαιτούνται στα βακτήρια για τη μεταφορά “effector” πρωτεϊνών στο κύτταρο-ξενιστή μέσω των συστημάτων τύπου III, δεν είναι γνωστό αν λειτουργούν ως αγωγοί ή ως παράγοντες προσκόλλησης οι οποίοι διευκολύνουν την επαφή των βακτηρίων με τα κύτταρα του ξενιστή.

Τα πρωτεϊνικά υποστρώματα του μονοπατιού τύπου III φέρουν πολλαπλά σινιάλα που τα οδηγούν στο μονοπάτι έκκρισης και τελικά σε υποκυτταρικούς στόχους μέσα στον ξενιστή. Πειραματικές μελέτες προσδιόρισαν ότι το εκκριτικό σινιάλο θα πρέπει να βρίσκεται στη δομή του mRNA και ίσως οδηγεί το σύμπλοκο ριβοσώματος-RNA στο εκκριτικό σύστημα τύπου III για συζευγμένη μετάφραση και έκκριση (5). Το εκκριτικό σινιάλο δύο πρωτεϊνών του φυτοπαθογόνου *P. syringae*, (AvrB και AvrPto), φαίνεται επίσης να βρίσκεται στο mRNA τους, το οποίο υποδηλώνει ότι αυτός ο τύπος αναγνώρισης του υποστρώματος προς εξαγωγή ίσως να είναι ένα γενικό χαρακτηριστικό των εκκριτικών συστημάτων τύπου III (6). Εντούτοις, πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω του συστήματος τύπου III μπορούν να εκκρίνονται μετά-μεταφραστικά μέσω ενός εναλλακτικού σινιάλου έκκρισης (4, 5, 14). Ο εναλλακτικός αυτός μηχανισμός εμπλέκει τη λειτουργία εξειδικευμένων τσαπερονών που δεσμεύουν τις συγγενικές εκκρινόμενες πρωτεΐνες που ταξιδεύουν στο μονοπάτι τύπου III (78, 91, 92). Οι τσαπερόνες ίσως έχουν διαφορετικούς ή επικαλυπτόμενους ρόλους ως πλοηγοί της έκκρισης ή της μετατόπισης ή και ως παράγοντες καταμερισμού (partitioning factors) που εμποδίζουν την πρόωρη συσσωμάτωση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών στο βακτηριακό κυτόπλασμα, μια διαδικασία που θα τις καθιστούσε στόχους για πρόωρη αποδόμηση (4, 5, 14).

Η έκφραση των συστατικών του εκκριτικού μηχανισμού τύπου III, ρυθμίζεται τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μετά-μεταφραστικό επίπεδο. Η μεταγραφική ρύθμιση πραγματοποιείται από έναν ή περισσότερους μεταγραφικούς παράγοντες καθώς και από συστατικά των οικουμενικών ρυθμιστικών δικτύων, τα οποία ελέγχουν την έκφραση σε απόκριση ποικίλων περιβαλλοντικών ερεθισμάτων όπως η θερμοκρασία, η οσμωτικότητα, η διαθεσιμότητα θρεπτικών στοιχείων, τα δισθενή κατιόντα (και ιδιαίτερα του ασβεστίου  $Ca^{++}$ ), το pH και η φάση ανάπτυξης.

Σε ορισμένα βακτήρια η έκφραση των γονιδίων τύπου III ελέγχεται και από την ίδια τη διαδικασία της έκκρισης. Η στρατηγική αυτή ταυτοποιήθηκε αρχικά στο σύστημα που σχετίζεται με την συναρμολόγηση του μαστιγίου και πιο πρόσφατα περιγράφηκε στο εντερικό παθογόνο *Yersinia* spp. (62).

Η μετά-μεταφραστική ρύθμιση της διαδικασίας της έκκρισης είναι λιγότερο κατανοητή. Φαίνεται ότι, τουλάχιστον σε ορισμένα συστήματα, το φυσιολογικό σινιάλο το οποίο διεγείρει αυτό το ρυθμιστικό μονοπάτι εμπλέκει την επαφή με παράγοντες του

ξενιστή (contact stimulus), όπως έχει αναφερθεί στην περίπτωση των εντερικών παθογόνων του γένους *Salmonella*, *Yersinia* και *Shigella* (23, 60, 72).

#### 1.7.4.4. Εκκριτικό σύστημα τύπου III στην *P. syringae*.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα Gram-αρνητικά φυτοπαθογόνα βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Ralstonia* και *Xanthomonas*, περιέχουν μια ομάδα γονιδίων, τα γονίδια *hrp*, τα οποία είναι απαραίτητα για την αλληλεπίδραση των φυτοπαθογόνων βακτηρίων τόσο με ευαίσθητες όσο και με ανθεκτικές ποικιλίες φυτών και προσδιορίζουν το βακτηριακό εκκριτικό σύστημα που είναι γνωστό ως εκκριτικό σύστημα τύπου III.

Στην *P. syringae* pv. *syringae* 61, η ομάδα των γονιδίων αυτών καταλαμβάνει μία περιοχή 25 kb και περιέχει 27 γονίδια *hrp* και ένα γονίδιο τύπου *avr* το *hrmA*, τα οποία είναι οργανωμένα σε 7 οπερόνια (3, 33). Στην *P. syringae* pv. *phaseolicola* η γονιδιακή ομάδα *hrp* εμφανίζει μεγάλη ομολογία τόσο σε επίπεδο αλληλουχίας όσο και σε επίπεδο οργάνωσης και ρύθμισης, με μόνη εξαίρεση την αντικατάσταση του γονιδίου *hrmA* από το γονίδιο *avrPphE*. Επειδή η αλληλούχιση των γονιδίων *hrp* από την *P. syringae* pv. *phaseolicola* δεν έχει ολοκληρωθεί, η περιγραφή θα γίνει με βάση την *P. syringae* pv. *syringae* 61. Τα γονίδια που κωδικοποιούν την εκκριτική μηχανή είναι οργανωμένα σε 4 μεταγραφικές ομάδες που οργανώνονται ως εξής: *hrpJcVpQcNpO*, *hrpPcQABRSTU*, *hrpFGcCpTV* και *hrpAZBcJpDE* (13, 33, 34, 52) (Εικ. 1.5).

Η έκφραση των γονιδίων του εκκριτικού συστήματος τύπου III στην *P. syringae* επάγεται *in planta*, στα πρώτα στάδια που ακολουθούν μετά την επαφή του βακτηρίου με το φυτικό ιστό (98). Επαγωγή των γονιδίων αυτών, αλλά σε μικρότερο βαθμό, παρατηρείται και κατά την καλλιέργειά τους σε θρεπτικό μέσο με ελάχιστη συγκέντρωση αλάτων. Αντίθετα, σύνθετες πηγές αζώτου, υψηλό pH, υψηλή τιμή οσμωμοριακότητας και ορισμένες πηγές άνθρακα, έχουν κατασταλτική επίδραση στην έκφραση των *hrp* γονιδίων (68, 98). Φαίνεται λοιπόν ότι η έκφραση των γονιδίων *hrp* που επάγεται μετά από επαφή με το φυτό, οφείλεται σε αλλαγές των συνθηκών θρέψης και είναι πιθανή η εμπλοκή εξειδικευμένων φυτικών παραγόντων.

Η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων *hrp* ελέγχεται από δύο ενεργοποιητές (HrpS και HrpR), της οικογένειας των ρυθμιστών απόκρισης (response regulators) και ένα εναλλακτικό παράγοντα  $\sigma$  (HrpL,  $\sigma^L$ ) (27, 28, 97). Οι πρωτεΐνες HrpS και HrpR εμφανίζουν ομοιότητες τόσο μεταξύ τους όσο και με άλλα μέλη της υποοικογένειας NtrC των ρυθμιστών απόκρισης, οι περισσότεροι από τους οποίους αλληλεπιδρούν με το ολοένζυμο της  $\sigma^{54}$  RNA πολυμεράσης.

Οι πρωτεΐνες HrpS και HrpR ενεργοποιούν τη μεταγραφή του γονιδίου *hrpL* που κωδικοποιεί τον παράγοντα  $\sigma^L$ . Η πρωτεΐνη HrpL εμφανίζει ομοιότητες με την υποοικογένεια ECF (extracytoplasmic functions), των παραγόντων  $\sigma$  (55) και είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή των γονιδίων του εκκριτικού συστήματος τύπου III (37, 96).

Τα υπόλοιπα γονίδια της ομάδας *hrp* κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εκκρίνονται στο εξωκυττάριο μέσο των βακτηρίων (*hrpA*, *HrpW* και *HrpZ*) και πρωτεΐνες που οργανώνουν το εκκριτικό μονοπάτι Hrp, το οποίο όπως αναφέρθηκε ανήκει στην κατηγορία των εκκριτικών μονοπατιών τύπου III (2, 30). Εννέα πρωτεΐνες της κατηγορίας αυτής είναι συντηρημένες σε όλα τα φυτικά και ζωικά παθογόνα βακτήρια, που διαθέτουν το εκκριτικό σύστημα τύπου III και για το λόγο αυτό τα γονίδια που τις κωδικοποιούν ονομάζονται γονίδια *hrc* (hypersensitive reaction and conserved) (11). Ο πιθανός βιοχημικός ρόλος των πρωτεϊνών Hrp και Hrc έχει προσδιοριστεί με βάση τις ομολογίες που εμφανίζουν με τα γονίδια των ζωικών παθογόνων. Με εξαίρεση την πρωτεΐνη HrcC, ομόλογα όλων των συντηρημένων γονιδίων βρίσκονται και στο σύστημα οργάνωσης του μαστιγίου στα ευβακτήρια (2, 30). Η HrcC ανήκει στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης, που συναντώνται στο μονοπάτι τύπου II και σε άλλα μονοπάτια που συμμετέχουν στη μεταφορά μακρομορίων (35). Η θέση των πρωτεϊνών Hrc στο κύτταρο καθώς και η πιθανή λειτουργία τους έχει προσδιοριστεί στην *P. syringae* pv. *syringae* με ανάλυση μη πολικών μεταλλαγών στα αντίστοιχα γονίδια. Έτσι, η HrcJ προβλέπεται ότι είναι μια λιποπρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης (33). Η HrcN περιέχει μια περιοχή δέσμευσης ATP και πιθανόν να παρέχει ενέργεια στη διαδικασία της έκκρισης (33, 52), ενώ οι υπόλοιπες συντηρημένες πρωτεΐνες θεωρείται ότι εντοπίζονται πιθανόν στην εσωτερική μεμβράνη (2, 13, 35).

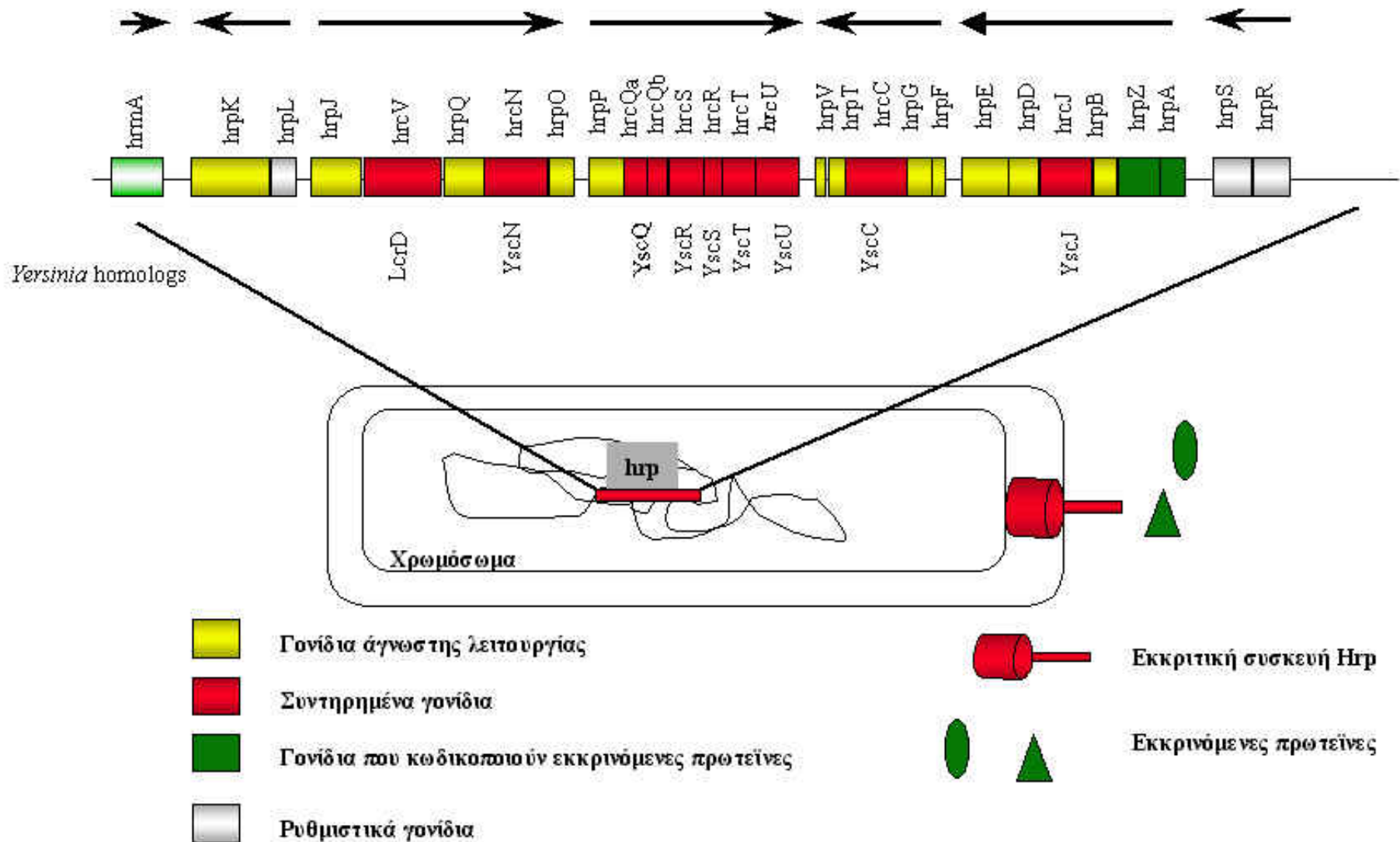


Δύο κατηγορίες εξωκυττάριων πρωτεϊνών έχουν ταυτοποιηθεί: οι χαρπίνες (harpins) και οι πιλίνες (pilins). Οι χαρπίνες (HrpZ και HrpW) είναι πρωτεΐνες πλούσιες σε γλυκίνες, υδρόφιλες, θερμοσταθερές, δεν έχουν κυστεΐνες, δεν έχουν αμινοτελικά πεπτίδια έκκρισης, αλλά εκκρίνονται στο βακτηριακό θρεπτικό μέσο. Η έκφραση και η έκκρισή τους εξαρτάται από τα γονίδια *hrp* και έχουν την ικανότητα να επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας όταν ενύονται, σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις, στον αποπλάστη των φυτών (2, 93).

Η δεύτερη κατηγορία εξωκυττάριων πρωτεϊνών Hrp αντιπροσωπεύεται από την πιλίνη HrpA της *Pseudomonas syringae*. Η πρωτεΐνη HrpA, είναι μια μικρή υδρόφιλη πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *hrpA*, το οποίο βρίσκεται αμέσως πριν από το γονίδιο *hrpZ*, στο ίδιο οπερόνιο. Η πρωτοταγής αλληλουχία της HrpA δεν εμφανίζει ομοιότητες με άλλες πρωτεΐνες. Η HrpA βρέθηκε να σχετίζεται με μία νέα σωληνοειδή μορφή που ονομάζεται Hrp pilus (71).

Η δημιουργία του αγωγού Hrp στην *P. syringae* εξαρτάται από δύο τουλάχιστον συστατικά του εκκριτικού μηχανισμού Hrp: τον μεταγραφικό ενεργοποιητή HrpS και την πρωτεΐνη HrcC, που εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη και εμπλέκεται στην έκκριση. Εντούτοις, η λειτουργία των περισσότερων πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα γονίδια του εκκριτικού συστήματος τύπου III, παραμένει άγνωστη ή αινιγματική.

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



**Εικόνα 1.5:** Τα γονίδια *hrp* της *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 και οι πιθανές λειτουργίες τους. Τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της μεταγραφής για κάθε οπερόνιο. Τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην έκκριση είναι χρωματισμένα κίτρινα και κόκκινα. Τα κίτρινα δεν έχουν γνωστές βιοχημικές λειτουργίες, ενώ τα κόκκινα είναι συντηρημένα σε όλα τα εκκριτικά συστήματα τύπου III. Τα γονίδια που κωδικοποιούν εκκρινόμενες πρωτεΐνες (π.χ. HrpZ και HrpA) είναι χρωματισμένα πράσινα, ενώ εκείνα που συμμετέχουν στη ρύθμιση είναι χρωματισμένα γκρι. Το *hrmA* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη τύπου Anv και στη θέση αυτή η *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* έχει το γονίδιο *anvPphE*.

# **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## **2.1. ΥΛΙΚΑ**

### **2.1.1. Προέλευση αντιδραστηρίων και υλικών.**

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης προήλθαν από τις εταιρίες BOEHRINGER MANHEIM, PHARMACIE, PROMEGA, SIGMA CHEMICALS, GIBCO BRL, STRATAGENE και MERCK.

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

Τα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας των βακτηριακών στελεχών και στελεχών του σακχαρομύκητα ήταν από την DIFCO και MERCK.

Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης αγοράστηκαν από τις εταιρίες SCHLEICHER & SHUELL και GELMAN ενώ οι μεμβράνες PVDF από την GELMAN.

Τα ολιγονουκλεοτίδια συντέθηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας του IMBB (ITE)

### **2.1.2. Πλασμιδιακοί φορείς –Στελέχη βακτηρίων και σακχαρομύκητα**

Για τη δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς: pET16B (NOVAGEN), pAS2-1 και pACT2 (CLONTECH). Το πλασμίδιο pPL6 φέρει ένα ένθετο τμήμα περίπου 28 kb, που περιέχει σχεδόν όλη τη γονιδιακή ομάδα *hrp*, του στελέχους *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 στον κοσμιδιακό φορέα pLAFR3 (67).

Τα βακτηριακά στελέχη *E.coli* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: DH5a και BL21(DE3)plysS, οι γονότυποι των οποίων περιγράφονται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο των Sambrook et al. (76).

Το στέλεχος του σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το PJ69-4A (39).

### **2.1.3. Καλλιέργειες βακτηρίων και σακχαρομύκητα.**

Για την καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών του *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. (76).

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

#### **2.1.4. Πλασμιδιακές κατασκευές.**

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

Για την έκφραση των κωδικών περιοχών των γονιδίων *hrp* της *P.syringae* pv. *phaseolicola*, σε κύτταρα *E.coli* χρησιμοποιήθηκε ο φορέας έκφρασης pET16b. Ο φορέας αυτός επιτρέπει την έκφραση γονιδίων υπό τον έλεγχο του υποκινητή T7 του φάγου Φ10 και επιπλέον, οι πρωτεΐνες που παράγονται φέρουν στο αμινοτελικό άκρο τους μία αλληλουχία 10 ιστιδινών, επιτρέποντας έτσι τον καθαρισμό τους με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη αгарόζης νικελίου (Ni-NTA agarose). Το στέλεχος BL21(DE3)plysS της *E.coli* επιλέχθηκε γιατί εκφράζει την T7 RNA πολυμεράση. Πέντε γονίδια *hrp* που υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα αυτό απομονώθηκαν με τη μέθοδο της PCR από το κοσμίδιο pPL6, το οποίο φέρει σχεδόν όλη τη γονιδιακή ομάδα *hrp* της *P.syringae* pv. *phaseolicola*.

Όλα τα γονίδια υποκλωνοποιήθηκαν ως Nde I/BamHI τμήματα στις αντίστοιχες θέσεις περιορισμού του παραπάνω φορέα.

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

Ο έλεγχος των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων βασίστηκε στο σύστημα των δύο υβριδίων που έχει αναπτυχθεί στο σακχαρομύκητα. Το σύστημα αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι πολλοί ευκαρυωτικοί μεταγραφικοί ενεργοποιητές αποτελούνται από δύο διακεκριμένες και ανεξάρτητες λειτουργικά περιοχές. Έτσι, ο μεταγραφικός ενεργοποιητής GAL4, του σακχαρομύκητα περιέχει μία περιοχή για δέσμευση στο DNA (DNA-BD, DNA-binding domain), και μια περιοχή απαραίτητη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής (AD, activation domain). Η περιοχή DNA-BD αναγνωρίζει και δεσμεύεται σε μία αλληλουχία (UAS), που βρίσκεται στον

υποκινητή γονιδίων που ενεργοποιούνται από τον GAL4, ενώ η περιοχή AD, αλληλεπιδρά με άλλα συστατικά της μεταγραφικής μηχανής που απαιτούνται για την έναρξη της μεταγραφής. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το σύστημα MATCHMAKER, το οποίο βασίζεται στον GAL4 και χρησιμοποιεί δύο διαφορετικούς φορείς κλωνοποίησης, τους pAS2-1 και pACT2. Ο φορέας pAS2-1 επιτρέπει τη δημιουργία χμαιρικών πρωτεϊνών με την περιοχή AD του GAL4 (αα 768-881), ενώ ο pACT2 επιτρέπει τη δημιουργία χμαιρικών πρωτεϊνών με την περιοχή DNA-BD του GAL4 (αα 1-147). Οι φορείς αυτοί έχουν την αλληλουχία που απαιτείται για την έναρξη της αντιγραφής του DNA στον σακχαρομύκητα (2μ *ori*) και διαφορετικούς δείκτες επιλογής (*TRP1* για pAS2-1 και *LEU* για pACT2). Οι χμαιρικές πρωτεΐνες εκφράζονται συνεχώς, κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της αλκοολικής αφυδρογονάσης. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες εισήχθησαν σε κύτταρα ζύμης PJ69-4A.

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

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

**PAS2-1/AvrPphB-Δ62:** Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Nde I /BamH I της κατασκευής pET16b/AvrPphB-Δ62G στις θέσεις περιορισμού Nde I/BamH I του φορέα pAS2-1.

**pACT2/AvrPto:** Προέκυψε από την ένθεση ενός Nru I που περιείχε την κωδική περιοχή του γονιδίου *avrPto* (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), στη μοναδική θέση Sma I του φορέα pACT2.

**PAS2-1/HrpV:** Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Nde I /BamH I της κατασκευής pET16b/HrpV στις αντίστοιχες θέσεις περιορισμού του φορέα pAS2-1.

**PAS2-1/HrpD:** Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Nde I /BamH I της κατασκευής pET16b/HrpD στις αντίστοιχες θέσεις περιορισμού του φορέα pAS2-1.

**PAS2-1/HrpG:** Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Nde I /BamH I της κατασκευής pET16b/HrpG στις αντίστοιχες θέσεις περιορισμού του φορέα pAS2-1.

**PAS2-1/HrpF:** Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Nde I /BamH I της κατασκευής pET16b/HrpFG στις αντίστοιχες θέσεις περιορισμού του φορέα pAS2-1.

**PAS2-1/HrpT:** Προέκυψε με υποκλωνοποίηση της περιοχής Nde I /BamH I της κατασκευής pET16b/HrpTV στις αντίστοιχες θέσεις περιορισμού του φορέα pAS2-1.

**Πλασμιδιακές κατασκευές για έκφραση γονιδίων σε φυτά.**

**PVX202/AnrPphB-62G63M:** Προέκυψε από την ένθεση ενός τμήματος που περιείχε την κωδική αλληλουχία του γονιδίου *anrPphB*, από την οποία απουσίαζαν τα 62 πρώτα αμινοξέα, στον φορέα PVX202. Το τμήμα αυτό απομονώθηκε με τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το πλασμίδιο pBR322/AnrPphB (προσφορά του Dr. J. Mansfield) ενώ τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.1. Ακολούθησε πέψη του προϊόντος της PCR με τα περιοριστικά ένζυμα Nde I/BamH I και μετά από επεξεργασία των 5' και 3' άκρων του με το ένζυμο Klenow, υποκλωνοποιήθηκε στη μοναδική θέση Nru I του φορέα PVX202.

**Πίνακας 2.1:** Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.

Προϊόν PCR	Μήτρα-DNA	Ολιγονουκλεοτίδια
<i>HrpD</i>	pPL6	5'-GCGCGTGCC <u>CATATG</u> GAGCTGATTGCC-3' 5'-CAGGCAGGATCC <u>CAGTGGCAGT</u> CAGCG-3'
<i>HrpFG</i>	pPL6	5'-TGGAATATAAG <u>CATATG</u> ATAAGTTTCAAATC-3' 5'-CAATAAAGGGATCCACATCAAGGCC-3'
<i>HrpG</i>	pPL6	5'-AGCCGGCTAC <u>CATATG</u> ACCAAAAATG-3' 5'-CAATAAAGGGATCCACATCAAGGCC-3'
<i>HrpTV</i>	pPL6	5'-CAAGGGAGCGAAC <u>CATATG</u> AAGATCAGTAGC-3' 5'-GGTGCATAGGATCCGGCTGACAAGAACG-3'

<i>HrpV</i>	pPL6	5'-GTTAAAGGATTACATATGATTGAGGTAAAGG-3' 5'-GGTGCATAGGATCCGGCTGACAAGAACG-3'
<i>avrPphB-62G63M</i>	Pbr322/ <i>avrPphB</i>	5'-CACTGGGCGATCATATGTGTGCATCCTC-3' 5'-CGGGATCCGGCTGGGTTTTTTTGCTTC-3'

### 2.1.5. Φυτικό υλικό.

Για τη μόλυνση με τον ιό PVX202 χρησιμοποιήθηκαν φυτά καπνού (*Nicotiana benthamiana*) και τομάτας (*Lycopersicon esculentum* cv. Rio Grande). Τα φυτά αναπτύχθηκαν στο χώρο του θερμοκηπίου, όπου η θερμοκρασία ήταν 25 °C.

## 2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.2.1. Παρασκευή και ανάλυση νουκλεϊκών οξέων.

#### 2.2.1.1. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

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

- α) Μέθοδος βρασμού
- β) Μέθοδος αλκαλικής λύσης

Οι αναλυτικές μέθοδοι γι' αυτές τις διαδικασίες καθώς και η σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά στους Sambrook et al. (76). Στις περιπτώσεις που ήταν απαραίτητη η παρασκευή μεγαλύτερων ποσοτήτων DNA και υψηλότερης καθαρότητας εφαρμόστηκε η μέθοδος της μοριακής διήθησης με στήλες διαχωρισμού QIAGEN. Το αναλυτικό πρωτόκολλο και οι συστάσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στο σχετικό εγχειρίδιο της εταιρίας.

#### 2.2.1.2. Απομόνωση ολικού RNA από φυτικά κύτταρα.

Ο φυτικός ιστός κονιοροποιήθηκε σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια το RNA εκχυλίστηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRI-REAGENT (SIGMA). Το αντιδραστήριο αυτό επιτρέπει την ταυτόχρονη εκχύλιση από ένα δείγμα RNA, DNA



και πρωτεϊνών. Σε 100mg ιστού προστίθεται 1ml αντιδραστηρίου. Ακολουθεί ανακίνηση με vortex και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται στις 12000 xg, για 10 λεπτά στους 4°C. Συλλέγεται το υπερκείμενο και εκχυλίζεται δύο φορές με φαινόλη/χλωροφόρμιο (1:1). Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο φυγοκέντρησης (erpendorf) όπου κατακρημνίζεται με 2 όγκους 100% αιθανόλης και 1/10 του όγκου 3M οξικού νατρίου pH 5.2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 xg, για 20 λεπτά στους 4°C και το ίζημα (RNA) που προκύπτει πλύνεται με 70% αιθανόλη. Η επαναδιάλυση του ιζήματος γίνεται σε αποστειρωμένο ddH<sub>2</sub>O.

#### **2.2.1.3. Πέψη μορίων με ένζυμα περιορισμού.**

Οι περιοριστικές πέψεις πραγματοποιήθηκαν με βάση τις άριστες συνθήκες στις οποίες λειτουργεί κάθε ένζυμο (θερμοκρασία, pH, μοριακότητα ρυθμιστικού διαλύματος σε άλατα), σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας και τα πρωτόκολλα που περιγράφονται σε σχετικό εργαστηριακό εγχειρίδιο (76).

#### **2.2.1.4. Ηλεκτροφορητική ανάλυση, απομόνωση και καθαρισμός τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.**

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

#### **2.2.1.5. Διαδικασίες υποκλωνοποίησης μορίων DNA.**

Οι συνήθεις διαδικασίες υποκλωνοποίησης σε πλασμιδιακούς φορείς περιλαμβάνουν τη συνένωση δύο τμημάτων DNA με συμβατά άκρα, με τη βοήθεια του ενζύμου T4 DNA Ligase. Στις περιπτώσεις που δεν ήταν δυνατή η επιλογή συμβατών άκρων, φορέων και ενθέματος, γινόταν τροποποίηση έτσι ώστε να μην

διαθέτουν μονόκλωνο τμήμα. Έτσι, η δημιουργία των “τυφλών άκρων” έγινε με τη χρήση του μεγάλου ενζυμικού κλάσματος Klepaw της πολυμεράσης I του DNA της *E.coli*. Το ένζυμο αυτό είναι ικανό παρουσία δεσοξυριβονουκλεοτιδίων να «γεμίζει» 5' υπολειπόμενα άκρα που αφήνουν οι περιοριστικές πέψεις των περισσότερων ενζύμων. Η συνήθης αντίδραση περιλαμβάνει ένα ρυθμιστικό διάλυμα με pH 8.0 και περιεκτικότητα σε  $MgCl_2$  10mM, 5μg DNA, 0.1mM δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) και 150 u/ml ενζύμου. Η αντίδραση επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολουθεί θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου με επώαση στους 70°C. Το ίδιο ένζυμο είναι ικανό να υδρολύει τα 3' προεξέχοντα μονόκλιωνα άκρα που προκύπτουν από πέψεις περιοριστικών ενζύμων αρκεί στην παραπάνω τυπική αντίδραση να παραλειφθεί η προσθήκη δεσοξυριβονουκλεοτιδίων.

**Αντίδραση σύνδεσης δύο μορίων DNA.** Στις αντιδράσεις σύνδεσης (ligation) δύο μορίων DNA χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο λιγάση του βακτηριοφάγου T4. Στις περιπτώσεις όπου τα άκρα των δύο μορίων ήταν συμβατά, η συγκέντρωση του συνολικού DNA δεν ξεπερνούσε τα 50ng/μl αντίδρασης, για πλασμίδια μεσαίου μεγέθους (3-8kb), ενώ η ποσότητα της λιγάσης ήταν 5 Weiss units/μl. Η αντίδραση περιλαμβάνει 1mM ATP. Στις αντιδράσεις σύνδεσης ο υπολογισμός της αναλογίας φορέα/ενθέματος βασιζόταν στην επίτευξη μοριακής αναλογίας 1/5-1/10 (φορέας/ένθεμα) ανάλογα με το μέγεθός τους. Ο χρόνος επώασης της αντίδρασης ήταν 12-18 ώρες στους 16°C. Στις περιπτώσεις όπου τα άκρα ήταν τυφλά διατηρήθηκαν οι παρακάτω μοριακές αναλογίες αλλά η ποσότητα της λιγάσης διπλασιάστηκε.

#### **2.2.1.6. Ταυτοποίηση ανασυνδιασμένων βακτηριακών κλώνων.**

Η ταυτοποίηση των βακτηριακών κλώνων έγινε με δύο τρόπους:

**α)** απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα και πέψη των ανασυνδιασμένων πλασμιδίων με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα, και

**β)** *in situ* υβριδοποίηση των ανασυνδιασμένων βακτηριακών κλώνων, μετά την μεταφορά τους σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (GELMAN) και με ανιχνευτή το προς κλωνοποίηση ένθεμα.

### 2.2.1.7. Μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR).

Για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης απαιτούνται τα εξής:

- Το DNA στόχος που θέλουμε να ενισχύσουμε: Το DNA μπορεί να προέρχεται από διάφορες πηγές τόσο από ζωντανούς όσο και από μονιμοποιημένους ιστούς και από κάθε άλλη πηγή από την οποία μπορούμε να απομονώσουμε μικρή ποσότητα DNA. Μπορεί να είναι καθαρό ή να περιέχει προσμίξεις και άλλων βιολογικών συστατικών, μπορεί να είναι μόνο η αλληλουχία που θέλουμε να ενισχύσουμε ή απλά να την περιέχει σε πολύ μικρό ποσοστό.
- Τα τριφωσφορικά δεσοξυνουκλεοτίδια των τεσσάρων βάσεων (dNTPs).
- Η DNA πολυμεράση: χρησιμοποιείται η Taq πολυμεράση που απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermos aquaticus*. Η πολυμεράση αυτή είναι θερμοανθεκτική και έχει υψηλή άριστη θερμοκρασία δράσης. Έτσι, παραμένει σταθερή στους 90-95 °C, όπου λαμβάνει χώρα η αποδιάταξη και επιτρέπει την αύξηση της θερμοκρασίας υβριδισμού σε υψηλά επίπεδα, εκμηδενίζοντας έτσι τον κίνδυνο των λάθος υβριδισμών, αλλά και της θερμοκρασίας σύνθεσης του DNA επιταχύνοντας έτσι την διαδικασία.
- Οι εκκινητές: Ως εκκινητές χρησιμοποιούνται ολιγονουκλεοτίδια 18-30 βάσεων. Οι δύο εκκινητές που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να έχουν παρόμοιο GC περιεχόμενο, καθόλου συμπληρωματικότητα κυρίως στο 3' άκρο και ελάχιστη ή καθόλου δευτεροταγή δομή.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα: το ρυθμιστικό διάλυμα θα πρέπει να περιέχει ιόντα Mg<sup>++</sup>. Η σύσταση του ποικίλλει ανάλογα με τις ιδιαίτερες συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η PCR. Έχει βρεθεί ότι η λειτουργικότητα των εκκινητών σχετίζεται, σε ορισμένες περιπτώσεις, με την συγκέντρωση του μαγνησίου του οποίου η τελική αναλογία φαίνεται να συνδέεται στοιχειομετρικά με την αναλογία των dNTPs.
- Τέλος, προστίθεται mineral oil το οποίο εμποδίζει την εξάτμιση που μπορεί να συμβεί λόγω των υψηλών θερμοκρασιών που αναπτύσσονται για τις ανάγκες της αντίδρασης και διατηρεί τις συνθήκες σταθερές.

Τα στάδια που συνιστούν έναν πλήρη κύκλο της PCR είναι:

1. Αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων του DNA για την παραγωγή μονόκλωνων αλυσίδων που κατόπιν θα αποτελέσουν μήτρες αντιγραφής για την πολυμεράση. Η αποδιάταξη πραγματοποιείται με θέρμανση στους 93-95°C για 5 λεπτά.

2. Πτώση της θερμοκρασίας ικανή να επιτρέψει στους εκκινητές να υβριδιστούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στα μονόκλιωνα πλέον μόρια του DNA-στόχου, τα οποία εξακολουθούν να διατηρούνται σε ήπιες συνθήκες αποδιάταξης.
3. Τέλος, με τη δράση της DNA πολυμεράσης λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του DNA και η δημιουργία δίκλωνων μορίων. Η θερμοκρασία στη φάση αυτή είναι 72°C, που είναι η άριστη για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή για 5 περίπου λεπτά, έτσι ώστε να υπάρχει χρόνος για την αντιγραφή.

Στο τέλος αυτής της περιόδου, η αντίδραση γίνεται στους 94°C για λίγα δευτερόλεπτα αυτή τη φορά, έτσι ώστε τα μικρά δίκλιωνα μόρια που παρήχθησαν να αποδιαταχθούν και να αποτελέσουν μόρια έναρξης για ένα ακόμη κύκλο αντιγραφής, σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Ο αριθμός των κύκλων αντιγραφής κυμαίνεται από 30-60 (38).

#### **2.2.1.8. Αντίστροφη μεταγραφή και Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (RT-PCR).**

Η μέθοδος αυτή πραγματοποιείται σε δύο στάδια:

##### **A) Η σύνθεση του cDNA.**

Για τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) απαιτείται η αποδιάταξη 1μg ολικού RNA, το οποίο έχει εκ των προτέρων απομονωθεί από φυτικά κύτταρα. με τη χρήση του αντιδραστήριου TRI-REAGENT (SIGMA). Η αποδιάταξη λαμβάνει χώρα παρουσία κατάλληλου εκκινητή, σε συγκέντρωση 0.5 μg/μg RNA, στους 70 °C για 10 λεπτά ή στους 94 °C για 2 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του μείγματος στις 13000 rpm για λίγα δευτερόλεπτα και άμεση τοποθέτηση στον πάγο. Στη συνέχεια προετοιμάζεται η αντίδραση σύνθεσης, συνολικού όγκου 20μl, που περιέχει τα ακόλουθα συστατικά: 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1x ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης<sup>1</sup>, 1mM dNTPs, 1unit/μl RNasin, 15units/μg αντίστροφης μεταγραφάσης και το ήδη αποδιαταγμένο μίγμα RNA/εκκινητή. Ακολουθεί προσθήκη αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O μέχρι συμπλήρωσης του όγκου των 20μl. Στη συνέχεια, η αντίδραση επωάζεται στους 42 °C για 45 λεπτά, αμέσως μετά στους 85 °C για 5 λεπτά και στον πάγο για 5 λεπτά. Ακολουθεί η προσθήκη 1μl RNase H και επώαση της αντίδρασης στους 37 °C για 30 λεπτά.

**1:** Η ακριβής σύσταση των διαλυμάτων αναφέρεται στο εγχειρίδιο της εταιρίας GIBCO BRL.

### **B) PCR**

Η αντίδραση της PCR έγινε σύμφωνα με την μέθοδο 2.2.1.7. Η μόνη διαφορά είναι ότι ως DNA-μήτρα χρησιμοποιείται το cDNA.

## **2.2.2. Μετασχηματισμός προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων.**

### **2.2.2.1. Μετασχηματισμός βακτηρίων *E.coli* με πλασμιδιακό DNA.**

**α. Δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων:** Τα βακτήρια καλλιεργούνται σε καλλιέργεια των 100ml σε κωνική των 1000ml, με επαρκή αερισμό, μέχρι οπτικής πυκνότητας 0.4 (600nm). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2500 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C, επαναιώρηση και επώαση για 20 λεπτά στους 4°C, σε 20ml διαλύματος 100mM RbCl<sub>2</sub>, 50mM MnCl<sub>2</sub>, 30mM CH<sub>3</sub>COOK, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 15% γλυκερόλη, pH 5.8. Στη συνέχεια τα βακτήρια επαναφυγοκεντρούνται και επαναιωρούνται σε 5ml διαλύματος: 10mM MOPS, 10mM RbCl<sub>2</sub>, 75mM CaCl<sub>2</sub>, 15% γλυκερόλη, pH 7.0. Τα βακτήρια χρησιμοποιούνται αμέσως ή αποθηκεύονται στους -80°C σε κλάσματα των 200μl.

**β. Μετασχηματισμός κυττάρων:** Τα βακτήρια που είχαν υποστεί την παραπάνω διαδικασία επωάζονταν για 30 λεπτά στον πάγο παρουσία του DNA με το οποίο θα μετασχηματίζονταν, ακολουθούσε επώαση στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα και αμέσως μετά μεταφέρονταν σε πάγο για 2 λεπτά. Στη συνέχεια επωάζονταν στους 37°C για 1ώρα, μετά την προσθήκη 400μl θρεπτικού μέσου LB. Τέλος ακολουθούσε επίστρωση 50-100μl μείγματος σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB που περιείχε τα κατάλληλα αντιβιοτικά.

### **2.2.2.2. Μετασχηματισμός κυττάρων σακχαρομύκητα.**

Για το μετασχηματισμό κυττάρων σακχαρομύκητα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος TRAF0, όπως περιγράφεται στο εργαστηριακό εγχειρίδιο των Ausubel et al. (7).

Συνοπτικά, 50 ml θρεπτικού διαλύματος YEP ή κατάλληλου διαλύματος SD συμπληρωμένου με τα κατάλληλα αμινοξέα, εμβολιάζονται με μία αποικία και επωάζονται μέχρι τίτλου κυττάρων  $2 \times 10^7$ /ml. Τα κύτταρα αραιώνονται σε

καλλιέργειες των 50 ml και σε τίτλο  $2 \times 10^6$ /ml. Η επώαση συνεχίζεται για 4-5 ώρες ακόμη στους 30°C με έντονη ανάδευση, μέχρι ο αριθμός των κυττάρων να φτάσει τα  $2 \times 10^7$ . Στο σημείο αυτό τα κύτταρα συλλέγονται και φυγοκεντρώνονται 5 λεπτά στις 3000 rpm και ξεπλένονται μία φορά με απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος 0.1 M οξικού λιθίου (LiAc), ώστε ο τίτλος των κυττάρων να είναι  $2 \times 10^9$ /ml. Τα κύτταρα μοιράζονται ανά 50 μl, φυγοκεντρώνονται και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται με τη σειρά τα εξής:

240μl 50% PEG 3.350

36μl 1M Liac

50μl 2 mg/ml Salmon Sperm DNA

10 μg DNA σε συνολικό όγκο 50μl

Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) μέχρι ομοιογενούς ανάμιξης και επώαση στους 30°C, για 30 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα υφίστανται θερμικό shock στους 42°C για 15 λεπτά. Τέλος τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται, επαναδιαλύονται σε 150μl αποστειρωμένου νερού και απλώνονται σε κατάλληλα τρυβλία επιλογής. Η επώαση διαρκεί 3 ημέρες για να εμφανιστούν τα κύτταρα που έχουν υποστεί επιλογή.

### **2.2.3. Μέθοδος έκφρασης γονιδίων σε φυτά.**

#### **2.2.3.1. Μόλυνση φυτών καπνού με τον ιικό φορέα PVX 202.**

Φυτά καπνού και τομάτας 4 εβδομάδων, μολύνθηκαν με τον ιό PVX 202 καθώς και με τις ανασυνδιασμένες κατασκευές, που δημιουργήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Η διαδικασία πραγματοποιείται με ήπιο τρίψιμο των φύλλων τα οποία έχουν σκονιστεί με carborundum και περιλαμβάνει δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο τα φυτά μολύνονται με υπερελικωμένο πλασμιδιακό DNA και στο δεύτερο στάδιο με εκχύλισμα από τα ήδη μολυσμένα φυτά. Αρχικά λοιπόν, δύο φύλλα ανά φυτό μολύνονται το καθένα, με 5μg υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA, σε 30 μl διαλύματος 50mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7.0. Λίγες μέρες αργότερα, τα ανώτερα της μόλυνσης φύλλα λειοτριβούνται χωριστά σε 0.5 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 8.2. Το εκχύλισμα φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο χρησιμοποιείται είτε για ανάλυση πρωτεϊνών, είτε για νέα μόλυνση άλλων φυτών. Φαινοτυπικά η μόλυνση

διαπιστώνεται με την εμφάνιση χλωρωτικών κηλίδων και βιοχημικά με την ανίχνευση της καμινδιακής πρωτεΐνης του ιού χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα ενάντια στην ίδια πρωτεΐνη.

#### **2.2.4. Βιοδοκιμή.**

##### **2.2.4.1. Μέτρηση ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης σε μετασχηματισμένα κύτταρα σακχαρομύκητα.**

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

Η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης ανιχνεύτηκε με δύο τρόπους: α) με τη μέθοδο των φίλτρων, κατά την οποία οι αποικίες μεταφέρονται σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης, και στη συνέχεια εκτελείται η δοκιμή, χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα X-Gal και β) με τη μέθοδο της υγρής καλλιέργειας, χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα ONPG. Η πρώτη μέθοδος επιτρέπει μόνο ποιοτική ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης και επιπλέον το υπόστρωμα X-Gal είναι 10<sup>6</sup> φορές πιο ευαίσθητο απ'ότι το ONPG. Η δεύτερη μέθοδος έχει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει την ποσοτική εκτίμηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης και έτσι μπορεί να υπολογιστεί η ισχύς της αλληλεπίδρασης.

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

## **2.2.5. Παρασκευή και ανάλυση πρωτεϊνών.**

### **2.2.5.1. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα *E.coli*.**

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

### **2.2.5.2. Απομόνωση ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από φυτικά κύτταρα.**

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

### **2.2.5.3. Ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών.**

Ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε σε αποδιατακτικά πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli (48). Το πήκτωμα ανάλυσης (resolving gel) περιείχε 12-17% πολυακρυλαμίδη (ανάλογα με το μέγεθος της αναλυμένης πρωτεΐνης), 375mM Tris pH 8.8, 0.1%SDS, ammonium persulfate και TEMED. Το πήκτωμα επιστοίβασης (stacking gel) περιείχε 4% πολυακρυλαμίδη 125mM Tris pH 6.8, 0.1%SDS, ammonium persulfate και TEMED. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης περιείχε 25mM Tris, 192mM Glycine pH 8.0 και 0.1 SDS. Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος: 100mM Tris pH 6.8, 200mM DTT, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol, θερμαίνονται στους 100°C για 5 λεπτά και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης



είναι 20mA ανά πηκτώμα, μέχρι το μέτωπο να φτάσει στο πηκτώμα ανάλυσης και 30mA στη διάρκεια της ανάλυσης, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης οι ολικές πρωτεΐνες ανιχνεύονται χρωματικά με χρώση Coomassie brilliant blue R-250, ενώ οι ειδικές πρωτεΐνες ανιχνεύονται μετά τη μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος.

#### **2.2.5.4. Ανίχνευση ολικών πρωτεϊνών σε πηκτώμα πολυακρυλαμίδης.**

Για την ανίχνευση ολικών πρωτεϊνών σε πηκτώμα πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χρώσης με Coomassie brilliant blue R-250, όπου το πηκτώμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα 50% μεθανόλης, 10% οξικό οξύ, 0.002% Coomassie brilliant blue R-250 για 1-2 ώρες με ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί αποχρωματισμός του πηκτώματος σε διάλυμα 50% μεθανόλης, 10% οξικού οξέος μέχρι οι πρωτεϊνικές ζώνες να γίνουν ορατές και στη συνέχεια διατηρείται σε 0.07% οξικό οξύ, 7% γλυκερόλη ή ξηραίνεται.

#### **2.2.5.6. Ανάλυση Western.**

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

Κατά τη διαδικασία αυτή 5-10μg ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος αναλύεται σε πηκτώμα ακρυλαμίδης, κατά το σύστημα Laemmli. Στη συνέχεια ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ηλεκτροαποτύπωση (electro blotting). Κατά τη διαδικασία αυτή το πηκτώμα ακρυλαμίδης και η μεμβράνη τοποθετούνται εν μέσω δύο ηλεκτροδίων γραφίτη εμποτισμένων με διάλυμα 25mM Tris base, 192mM γλυκίνη και 20% μεθανόλη. Εφαρμόζεται τάση στα ηλεκτρόδια σύμφωνα με τον αριθμητικό τύπο  $0.8\text{mA} \times \text{cm}^2$  για 90 λεπτά, και στην συνέχεια η μεμβράνη ξηραίνεται στον αέρα. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα TBS (100mM Tris-Cl pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20) και 3% BSA ή 5% σκόνη γάλακτος, για 30-60 λεπτά, ενώ στη συνέχεια προστίθεται το κατάλληλο κάθε φορά αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση. Η επώαση με το αντίσωμα γίνεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρεις πλύσεις των 10 λεπτών με περίσσεια διαλύματος TBS και στη συνέχεια στο ίδιο

διάλυμα προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα, στο οποίο η μεμβράνη θα επωαστεί για άλλη μία ώρα. Μετά το τέλος της διαδικασίας αυτής ακολουθούν εκ νέου πλύσεις με TBS και τέλος πραγματοποιείται η εμφάνιση ανάλογα με το ένζυμο που είναι προσδεμένο στο δεύτερο αντίσωμα. Σε όλες τις περιπτώσεις ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε anti-IgG-alkaline phosphatase (PROMEGA). Η πρόσδεση του δεύτερου αντισώματος πιστοποιήθηκε χρωματικά. Η χρωματική αντίχνευση γίνεται κατά την αντίδραση της αλκαλικής φωσφατάσης σε διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης (100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris pH 9.5) με την προσθήκη των υποστρωμάτων NBT (66μl/10ml) και BCIP (33μl/10ml). Η αντίδραση ολοκληρώνεται συνήθως σε 30-60 λεπτά.

#### **2.2.5.7. Έκφραση και καθαρισμός πρωτεϊνών από στήλη συγγενείας Ni- NTA αγαρόζης.**

Η έκφραση των πρωτεϊνών AnrPphB και AnrPphB-63N, τα γονίδια των οποίων είχαν κλωνοποιηθεί στο φορέα έκφρασης pET16b, έγινε σε κύτταρα *E.coli* του στελέχους BL21(DE3). Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό LB (100ml), παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών, στους 37°C μέχρις οπτικής πυκνότητας OD<sub>600</sub>=0.5-0.7. Στη συνέχεια επαγόταν η έκφραση του γονιδίου με προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1mM. Η καλλιέργεια επωαζόταν στους 30°C για 3 ώρες και ακολούθως τα κύτταρα κατακρημνίζονταν με φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 20 λεπτά. Η λύση των κυττάρων γινόταν, σε αποδιατακτικές ή μη αποδιατακτικές συνθήκες, ανάλογα με την πρωτεΐνη που παρήγαγαν. Έτσι, τα κύτταρα λύνονταν στο κατάλληλο διάλυμα με τρεις διαδοχικούς κύκλους ψύξης/απόψυξης. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 12000g, ώστε να παραλάβουμε το υπερκείμενο.

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

Στο κυτταρικό εκχύλισμα 2ml προστίθεται 500ml από 50% αιώρημα Ni- NTA αγαρόζης και το μείγμα αναδεύεται στους 4°C ( μη-αποδιατακτικές συνθήκες) ή σε θερμοκρασία δωματίου (αποδιατακτικές συνθήκες), για 60 λεπτά. Πριν την προσθήκη του κυτταρικού εκχυλίσματος, η στήλη εξισορροπείται με κατάλληλο διάλυμα, ανάλογα με τις συνθήκες καθαρισμού. Στη συνέχεια, το μείγμα εφαρμόζεται σε

στήλη μήκους 10cm και διατομής 3mm, με το κάτω άκρο κλειστό, μέχρι η αραρόζη να πακεταρισθεί. Τότε απομακρύνεται το πώμα και συλλέγεται το πρώτο κλάσμα (FT, flow through). Η στήλη πλένεται δύο φορές με κατάλληλο διάλυμα και ακολουθεί η έκλυση της πρωτεΐνης με ιμιδαζόλιο, στην περίπτωση των μη-αποδιατακτικών συνθηκών ή σε όξινο pH, στις περιπτώσεις αποδιατακτικών συνθηκών. Τα κλάσματα αναλύονται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί χρώση με Coomassie blue R-250 και ανάλυση Western με το αντίσωμα anti-His-AP-conjugate (QIAGEN), προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ταυτότητα της πρωτεϊνικής ζώνης.

# **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Έλεγχος της ικανότητας της μικρότερης μορφής της πρωτεΐνης AnrPphB να οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, όταν εκφράζεται σε φυτικά κύτταρα.**

### 3.1. Γενικά.

Η *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* επάγει την τοπική νεκρωτική αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά μη-ξενιστές (incompatible reaction), όπως ο καπνός και σε ανθεκτικές ποικιλίες φασολιάς (*Phaseolus vulgaris* L.). Η HR εκδηλώνεται μέσα σε 24 ώρες, κατά τη διάρκεια της οποίας παρατηρείται περιορισμένος πολλαπλασιασμός των βακτηρίων και παρεμποδίζεται η εξάπλωση του παθογόνου στο φυτό. Η εξειδικευμένη ανθεκτικότητα ορισμένων ποικιλιών φασολιάς, βασίζεται σε αλληλεπιδράσεις γονιδίου-προς-γονίδιο και εμπλέκει 5 γνωστά γονίδια ανθεκτικότητας (*R*) του ξενιστή και 5 λειτουργικά αντίστοιχα γονίδια αμολυσματικότητας (*avr*) του παθογόνου, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (40, 58). Από τα γονίδια *avr* του παθογόνου αυτού, 3 έχουν ταυτοποιηθεί και αντιστοιχούν στα γονίδια *R1*, *R2* και *R3* (40, 58, 86). Ένα απ' αυτά, το *avr PphB*, αντιστοιχεί στο γονίδιο *R3* της φασολιάς. Πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι το γονίδιο *avrPphB* δεν απαιτείται γενικά για την εκδήλωση παθογένειας της *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, σε ποικιλίες του ξενιστή που φέρουν το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας *R3*.

Οι βακτηριακές πρωτεΐνες *Avr* δεν επάγουν γενικά την αντίδραση υπερευαισθησίας HR ή άλλα ορατά συμπτώματα, όταν χορηγούνται εξωτερικά σε φυτικούς ιστούς (22). Φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες αυτές μεταφέρονται απ' ευθείας, από το παθογόνο στο φυτό, αν και ο φυσικός τρόπος μεταφοράς δεν έχει διευκρινιστεί.

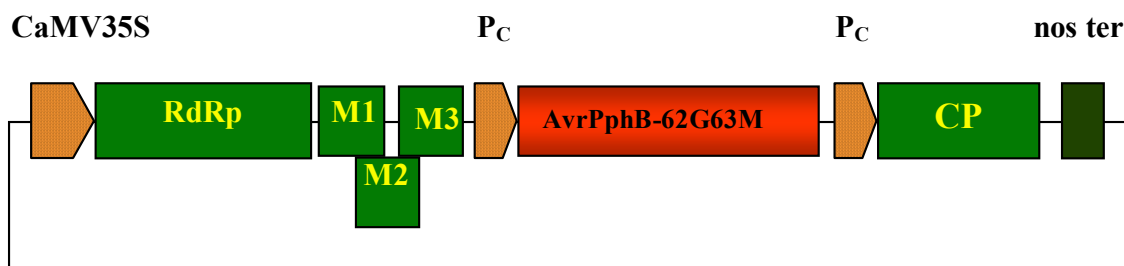
Μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει γνωστός ο ακριβής μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου το γονίδιο *AvrPphB* επάγει την HR στα φυτά. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν, ότι η πρωτεΐνη αυτή πρωτεολύεται δίνοντας γένεση σε ένα αμινοτελικό και ένα καρβοξυτελικό τμήμα, μεγέθους 6 και 28 kDa αντίστοιχα, όταν εκφράζεται στον αρχέτυπο ξενιστή της (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) καθώς και σε δύο ετερόλογους ξενιστές (*E.coli* και yeast) (66).

Στη μελέτη αυτή ελέγχθηκε αν η μικρότερη μορφή των 28 kDa της πρωτεΐνης *AvrPphB*, από την οποία απουσιάζουν τα 62 πρώτα αμινοξέα, εξακολουθεί να έχει την ικανότητα της πλήρους μήκους πρωτεΐνης, για επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε διάφορα φυτικά είδη, ενώ το αμινοτελικό τμήμα των 6 kDa στερείται αυτής της ικανότητας.

Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ο ικός φορέας έκφρασης PVX 202 ως παροδικό σύστημα έκφρασης σε φυτά του γονιδίου *avrPphB*, από το κωδικόνιο 63 έως το κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης. Το γονίδιο αυτό ονομάστηκε *avrPphB-*

*Δ62G63M* γιατί η περικοπή αυτή μετέτρεψε το κωδικόνιο της γλυκίνης στη θέση 63 σε κωδικόνιο μεθειονίνης. Στα επόμενα εδάφια το γονίδιο αυτό θα αναφέρεται ως *avrPphB-Δ62* και η αντίστοιχη πρωτεΐνη *AnrPphB-Δ62*.

Το σύστημα έκφρασης PVX202 βασίζεται στην έκφραση του εισαγόμενου γονιδίου μέσω της έκφρασης του ιού που το φέρει (57). Για το σκοπό αυτό, όλο το γονιδίωμα του ιού έχει κλωνοποιηθεί σε κατάλληλο φορέα έκφρασης κάτω από τον έλεγχο του ισχυρού φυτικού υποκινητή *CaMV 35S*, μέσω του οποίου γίνεται η μεταγραφή του ιικού γενώματος μέσα σε φυτά. Ο ιός έχει τροποποιηθεί γενετικά ώστε να περιέχει θέση κλωνοποίησης ξένων γονιδίων, κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή της καψιδιακής του πρωτεΐνης, που για το σκοπό αυτό έχει διπλασιαστεί πάνω στο ιικό γένωμα. Η χρήση του PVX για έκφραση γονιδίων στα φυτά έχει το πλεονέκτημα, ότι ο ιός πολλαπλασιάζεται σε πολλά αντίγραφα ανά κύτταρο και έτσι επιτρέπει την παραγωγή πρωτεϊνών σε μεγάλες συγκεντρώσεις, ενώ λόγω της διασυστηματικής μόλυνσης που προκαλεί, το γονίδιο εκφράζεται σε όλο το φυτό. Επιπλέον, το σύστημα αυτό είναι ευκολότερο στους χειρισμούς και δίνει πολύ πιο γρήγορα αποτελέσματα σε σύγκριση με τον μόνιμο μετασηματισμό των φυτών, με την προϋπόθεση ότι τα συμπτώματα του PVX δεν εμπλέκονται στο φαινότυπο που προκύπτει από την έκφραση του ξένου γονιδίου και βέβαια θα πρέπει να είναι ήπια στο φυτό που χρησιμοποιείται για την μελέτη του γονιδίου. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι για την μόλυνση των φυτών με τον ιό PVX, μέσω του PVX202, χρησιμοποιείται πλασμιδιακό DNA και όχι *in vitro* παραγόμενο RNA του ιού. Η μόλυνση γίνεται μηχανικά με DNA, το οποίο επιβιώνει μέσα στα φυτικά κύτταρα και μάλιστα παράγει ιικό RNA. Στην εικόνα 3.1 παρουσιάζεται η γενετική οργάνωση του γονιδιώματος του ιού PVX, καθώς και η ένθεση της μικρότερης μορφής του γονιδίου *avrPphB* στον PVX.



**Εικόνα 3.1:** Σχηματική απεικόνιση της γενετικής οργάνωσης του ιικού φορέα PVX202 καθώς και της ένθεσης σ' αυτόν του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη AvrPphB-62G63M. Στο διάγραμμα απεικονίζονται τα πέντε μεταφραστικά πλαίσια ανάγωσης (ORFs) του ιού PVX. Τα πρώτα τέσσερα ORFs (RdRp, M1, M2, M3) του PVX μεταγράφονται από τον υποκινητή CaMV35S, και κωδικοποιούν πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αντιγραφή του ιικού RNA (RdRp), για τη διακυττάρια μεταφορά του στο φυτό (M1-M3) και για την εγκαθίδρυση του ιικού RNA (CP). Το τελευταίο ORF μεταγράφεται από τον υποκινητή της καψιδιακής πρωτεΐνης του PVX ( $P_{CP}$ ). Η θέση του πολυσυνδότη βρίσκεται μεταξύ των δύο υποκινητών  $P_{CP}$  και στη θέση αυτή έχει κλωνοποιηθεί το γονίδιο που εκφράζει τη μικρότερη μορφή της πρωτεΐνης AvrPphB. Nos ter: αλληλουχία τερματισμού από το γονίδιο της συνθάσης της νοπαλίνης (norpaline synthase) του Αγροβακτηρίου (*Agrobacterium tumefaciens*).

### 3.2. Έκφραση της μικρότερης μορφής της πρωτεΐνης AvrPphB σε φυτά καπνού και τομάτας με το ικό σύστημα έκφρασης PVX202.

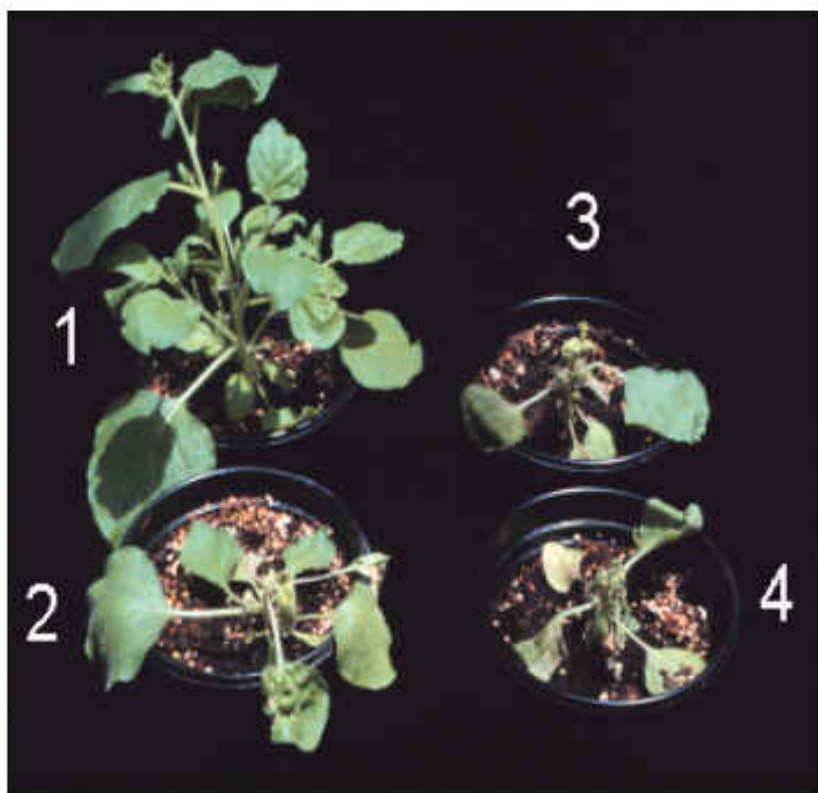
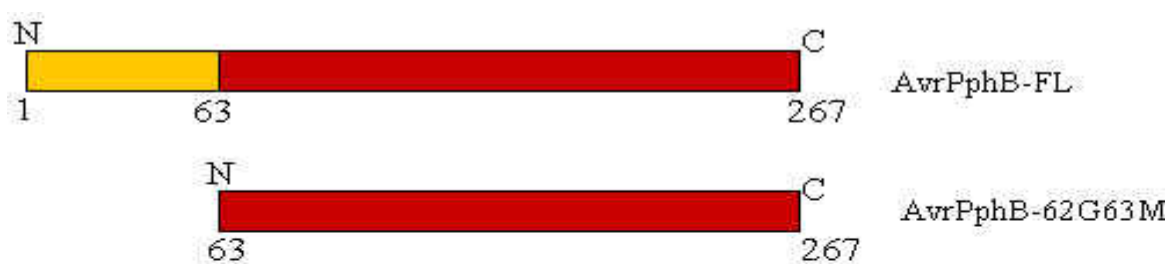
Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι η καλλιέργεια του φυτοπαθογόνου *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola σε συνθήκες επαγωγής των γονιδίων *hrp*, οδηγεί σε συσσώρευση της πρωτεΐνης AvrPphB, υπό τη μορφή ενός μικρότερου πεπτιδίου 28 kDa, στο κυτταρικό ίζημα (66). Στη συνέχεια, αμινοτελική αλληλούχιση του πεπτιδίου αυτού έδειξε ότι προκύπτει με κοπή της αρχικής πρωτεΐνης στο αμινοξικό κατάλοιπο της θέσης 62. Πρόσφατα, έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη AvrPphB φέρει μία ενδεχόμενη ευκαρυωτική αλληλουχία ( $G_{63}CASSGV_{70}$ ) που περιέχει θέση μυριστυλίωσης (myristoylation site) (61). Η μυριστυλίωση πιθανώς υποβοηθάει την προσχώρηση των πρωτεϊνών Avir στη μεμβράνη.

Προκειμένου να εξεταστεί αν η έκφραση της μικρότερης μορφής του γονιδίου *avrPphB* μέσα στο φυτικό κύτταρο οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μόλυνσης σε φυτά καπνού (*Nicotiana benthamiana*) και τομάτας (*Lycopersicon esculentum* cv. Rio Grande), τα οποία είναι επιδεκτικοί ξενιστές του ιού PVX αλλά και ανθεκτικά στο φυτοπαθογόνο *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola.

Τα φυτά καπνού που μολύνθηκαν με τον φορέα PVX202 ανέπτυξαν χλωρωτικές κηλίδες, τυπικά συμπτώματα της ασθένειας που προκαλεί ο ιός PVX, μία εβδομάδα μετά τη μόλυνση. Τα συμπτώματα του χλωρωτικού μωσαϊκού εξαπλώθηκαν προοδευτικά σε ολόκληρο το φυτό, 15 ημέρες μετά τη μόλυνση. Αντίθετα τα φυτά καπνού που μολύνθηκαν με τον ανασυνδυασμένο ιό



PVX202/AvrPphB-Δ62 ανέπτυξαν νεκρωτικές κηλίδες 15-20 ημέρες μετά τη μόλυνση. Πολύ γρήγορα η νέκρωση έγινε καθολική προκαλώντας το θάνατο ολόκληρου του φυτού. Επιπλέον, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα φυτά αυτά ανέπτυξαν εκτός από νεκρωτικές κηλίδες και τα τυπικά συμπτώματα του ιού, τόσο σε διαφορετικά σημεία του ίδιου φύλλου, όσο και σε διαφορετικά φύλλα του ίδιου φυτού (Εικ. 3.2).



**Εικόνα 3.2:** Συμπτώματα νέκρωσης σε φυτά καπνού *Nicotiana benthamiana* 15 ημέρες μετά την μόλυνση από τους ανασυνδυασμένους ιούς PVX/AvrPphB και PVX/AvrPphB-62G63M. **1.** Φυτό καπνού μολυσμένο με τον ιό PVX. **2.** Φυτό καπνού μολυσμένο με τον ανασυνδυασμένο ιό PVX/AvrPphB-62G63M. **3., 4.** Φυτά καπνού μολυσμένα με τον ανασυνδυασμένο ιό PVX/AvrPphB-62G63M.

Ανάλογα συμπτώματα νέκρωσης, εμφανίστηκαν και σε φυτά τομάτας που μολύνθηκαν με τον ίδιο ιό. Εντούτοις, σε αντίθεση με τα φυτά καπνού, δεν παρατηρήθηκε ολοκληρωτική νέκρωση φυτών τομάτας που εξέφραζαν την πρωτεΐνη AvnRphBΔ62. Ως θετικός μάρτυρας των παραπάνω πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν φυτά καπνού μολυσμένα με τον ανασυνδυασμένο ιό PVX202/*avnRphB* που έφερε την πλήρους μήκους πρωτεΐνη AvnRphB, για την οποία ήταν γνωστό από προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο, ότι η έκφρασή της σε φυτά καπνού είναι ικανή να επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR), απουσία άλλων βακτηριακών πρωτεϊνών.

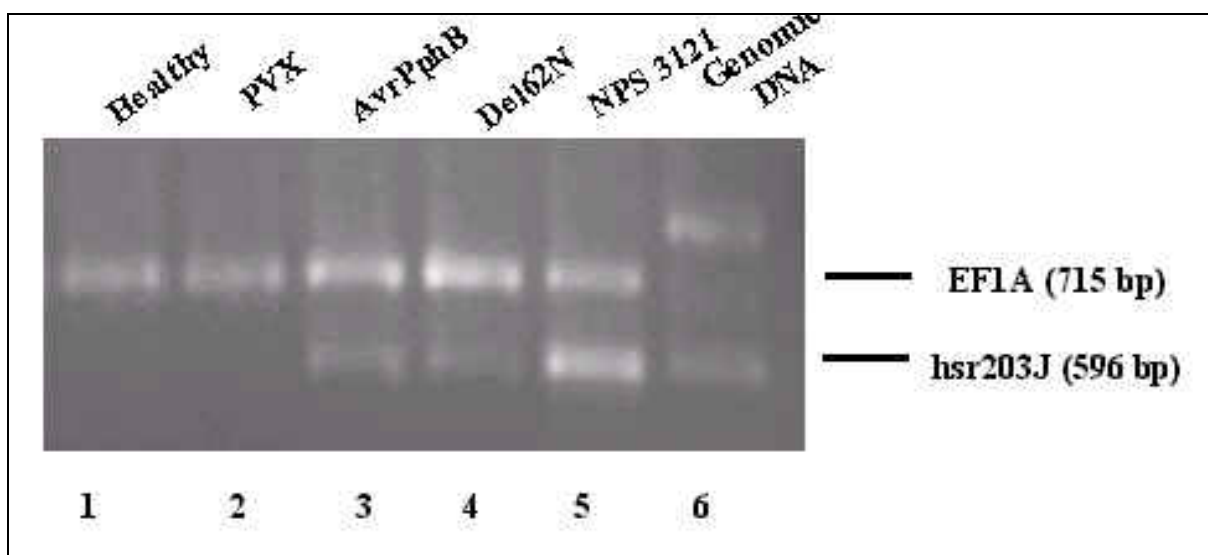
Επιπλέον, είχε προσδιοριστεί, από προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο, ότι η μοριακή αναγνώριση της πρωτεΐνης AvnRphB πραγματοποιείται μέσα στα φυτικά κύτταρα και είναι αυτή που οδηγεί τελικά στην επαγωγή της HR. Αξίζει να σημειωθεί ότι καμία από τις δύο μορφές της πρωτεΐνης AvnRphB που εξετάστηκαν, δεν ανιχνεύτηκε σε πειράματα ανοσολογικής ανάλυσης συνολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων φύλλων από φυτά μολυσμένα με τον αντίστοιχο ανασυνδυασμένο ιό PVX.

### **3.3. Επαγωγή του γονιδίου *hsr203J* κατά την έκφραση της μικρότερης μορφής της πρωτεΐνης *avnRphB*.**

Το γονίδιο *hsr203J* χρησιμοποιείται ως μοριακός δείκτης στο μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από την αντίδραση υπερευαισθησίας, γιατί η έκφρασή του είναι εξειδικευμένη και επάγεται στα πρώτα στάδια έναρξης της αντίδρασης. Για να προσδιοριστεί ότι η νέκρωση που παρατηρήθηκε από την ενδογενή παραγωγή της πρωτεΐνης AvnRphB καθώς και της μικρότερης μορφής της (AvnRphB-Δ62), έχει μοριακά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την HR, εξετάστηκε η επαγωγή αυτού του γονιδίου σε φυτά *N. benthamiana*. Τα φυτά που εξετάστηκαν ήταν μολυσμένα είτε με τον ανασυνδυασμένο ιό PVX/AvnRphB ή με τον ιό PVX/AvnRphB-Δ62. Εφόσον η έκφραση του γονιδίου *hsr203J* ενδέχεται να είναι παροδική (64) και η εξάπλωση του ανασυνδυασμένου ιού είναι χρονικά παρατεταμένη, ήταν αδύνατο να εικάσουμε εκ των προτέρων την επαγωγή του.

Η ανάλυση εκχυλισμάτων συνολικού RNA από φύλλα φυτών καπνού τα οποία είχαν εκ των προτέρων μολυνθεί με τον ανασυνδυασμένο ιό PVX, που έφερε την πλήρη ή τη μικρότερη μορφή της πρωτεΐνης AvnRphB, οδήγησε στην ανίχνευση μεταγράφων του γονιδίου *hsr203J*. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της

RT-PCR. Τα δείγματα που εξετάστηκαν συλλέχθηκαν από διαφορετικά μολυσμένα φυτά και σε διαφορετικούς χρόνους για τον κάθε ιό. Στην περίπτωση του ανασυνδυασμένου ιού PVX/AvrPphB τα δείγματα πάρθηκαν 3, 4 και 5 ημέρες μετά την μόλυνση ενώ από φυτά μολυσμένα με τον ιό PVX/AvrPphB-Δ62, 8 και 12 ημέρες μετά την μόλυνση. Κατά τη συλλογή, τα φύλλα δεν είχαν κανένα ορατό σύμπτωμα. Εν τούτοις, τα μητρικά τους φυτά νεκρώθηκαν μετά την πάροδο λίγων ημερών και στις δύο περιπτώσεις μόλυνσης. Επαγωγή του γονιδίου *hsr203J* παρατηρήθηκε μόνο στα δείγματα που συλλέχθηκαν 4 και 8 ημέρες μετά τη μόλυνση φυτών, με τους ανασυνδυασμένους ιούς PVX/AvrPphB και PVX/AvrPphB-Δ62, αντίστοιχα. Ανάλογο αποτέλεσμα δεν υπήρξε στις περιπτώσεις φύλλων που προήλθαν από φυτά υγιή ή μολυσμένα με τον ιό PVX. Ως σύστημα εσωτερικού ελέγχου, στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο EF1A που κωδικοποιεί τον παράγοντα επιμήκυνσης 1A (elongation factor). (Εικ. 3.3). Στην περίπτωση των φυτών που εξέφραζαν την πλήρη μορφή της πρωτεΐνης AvrPphB, τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με πειράματα Northern blot ανάλυσης που πραγματοποιήθηκαν από συνεργάτη του εργαστηρίου (Δρ. Ν. Ταμπακάκη).



**Εικόνα 3.3:** Επαγωγή του γονιδίου *hsr203J*. Για την ανάλυση με τη μέθοδο της RT-PCR εκχυλίστηκε ολικό RNA από: **1.** Φύλλα καπνού υγιών φυτών. **2.** Διασυστηματικώς μολυσμένα φύλλα καπνού, 8 ημέρες μετά από μόλυνση με τον ιό PVX. **3.** Διασυστηματικώς μολυσμένα φύλλα καπνού, 4 ημέρες μετά από μόλυνση με τον ιό PVX/AvrPphB. **4.** Διασυστηματικώς μολυσμένα φύλλα καπνού, 8 ημέρες μετά από μόλυνση με τον ιό PVX/AvrPphB-62G63M. **5.** Φύλλα καπνού, 6 ώρες μετά την έγχυση βακτηριακού αιωρήματος (*P.s.phaseolicola*) στον αποπλάστη. **6.** Γενομικό DNA εκχυλισμένο από υγιή φύλλα φυτών καπνού.

Η παροδική επαγωγή του γονιδίου *hsr203J* υποδεικνύει ότι, ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από την *in planta* έκφραση και των δύο μορφών της πρωτεΐνης AvrPphB που εξετάστηκαν, είναι εξειδικευμένος της HR και το γονίδιο *hsr203J* συμμετέχει στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος που οδηγεί, από την αναγνώριση της AvrPphB από τον αντίστοιχο φυτικό υποδοχέα στην ενεργοποίηση γονιδίων άμυνας και τελικά στη νέκρωση των φυτικών κυττάρων.

### 3.4. Συζήτηση.

Το επικρατέστερο μοντέλο για τις αποκρίσεις ανθεκτικότητας που οφείλονται στη λειτουργία των γονιδίων *avr*, υποστηρίζει ότι η μοριακή αναγνώριση των γονιδίων αυτών από πρωτεΐνες ανθεκτικότητας, άμεσα ή έμμεσα, πραγματοποιείται εντός ή εκτός των φυτικών κυττάρων. Το μοντέλο αυτό στηρίζεται πρωταρχικά, στο γεγονός ότι η λειτουργία των πρωτεϊνών Avr *in planta*, είναι η επαγωγή μιας μορφής κυτταρικού θανάτου που εξαρτάται από τα γονίδια ανθεκτικότητας, R (25, 51, 77, 83, 84, 88). Έτσι, τα γονίδια *avr* αναμένεται να παράγουν μοριακά σήματα τα οποία αναγνωρίζονται από υποδοχείς που κωδικοποιούνται από τα γονίδια ανθεκτικότητας. Παρά ταύτα, άμεση φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ *avr* και R γονιδιακών προϊόντων μέχρι σήμερα είχε παρατηρηθεί σε μία μόνο περίπτωση και αφορά τις πρωτεΐνες Pto και AvrPto (77, 84). Έμμεσες αλλά ισχυρές αποδείξεις για τη θέση δράσης των πρωτεϊνών Avr, έχουν προέλθει από την παροδική έκφραση σε φυτά, πολλών πρωτεϊνών Avr από βακτήρια και μύκητες, αποδεικνύοντας ότι πολλές απ' αυτές δρουν μέσα στο φυτικό κύτταρο.

Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι η παροδική έκφραση του γονιδίου *avrPphB*, οδηγεί σε επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε μια ποικιλία φυτικών ειδών, περιλαμβάνοντας τον καπνό και την τομάτα και την φασολιά. Ο κυτταρικός θάνατος που επάγεται από την παροδική έκφραση του γονιδίου *avrPphB* έχει τα ίδια φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με την αντίδραση υπερευαισθησίας που επάγεται από την *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* όταν εκφράζει το ίδιο γονίδιο. Επιπλέον, η έκφραση του γονιδίου *avrPphB* από τον ιικό φορέα PVX, προκάλεσε την προοδευτική νέκρωση ολόκληρου του φυτού, στην περίπτωση του καπνού (*N. benthamiana*). Ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από την έκφραση

του γονιδίου αυτού και η απουσία του στο βακτηριακό μέσο καλλιέργειας υπό συνθήκες επαγωγής των γονιδίων *hrp*, παρέχουν ισχυρή ένδειξη ότι η μεταφορά του γονιδίου *avrPphB* μέσω του εκκριτικού συστήματος τύπου III, γίνεται απ' ευθείας μέσα στα φυτικά κύτταρα, όπως ήδη έχει αναφερθεί για άλλες βακτηριακές πρωτεΐνες Avt.

Στην παρούσα μελέτη αποδείχτηκε ότι η έκφραση της μικρότερης μορφής της πρωτεΐνης AvtPphB προκαλεί νέκρωση σε φυτά καπνού (*N. benthamiana*), προτείνοντας ότι η έλλειψη των 62 πρώτων αμινοξέων έχει μικρή επίδραση στην επαγωγική ενεργότητα της πρωτεΐνης. Εντούτοις, παρατηρήθηκε σημαντική καθυστέρηση στην εκδήλωση του νεκρωτικού φαινοτύπου που αναπτύχθηκε από την έκφραση της πρωτεΐνης AvtPphB-Δ62, σε σχέση με την πλήρους μήκους AvtPphB. Δύο πιθανές ερμηνείες αποδίδονται στο γεγονός αυτό. Η πρώτη είναι ότι το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης συμβάλλει στην ικανότητα αναγνώρισης από τον υποδοχέα της και συνεπώς στην ανάπτυξη της νέκρωσης και η δεύτερη αφορά το ότι η μικρότερη μορφή της πρωτεΐνης δεν μυριστυλιώνεται, καθώς το κατάλοιπο γλυκίνης στη θέση 63 έχει αντικατασταθεί από μεθειονίνη. Η πιθανότητα αυτή υποστηρίζεται από πρόσφατα δεδομένα που αναφέρουν ότι η μυριστυλίωση των πρωτεϊνών AvtRpm1, AvtB και AvtPphB ενισχύει σημαντικά τις -εξειδικευμένες για τα *R* γονίδια- αποκρίσεις όταν οι πρωτεΐνες αυτές εκφράζονται μέσα στα φυτικά κύτταρα ενώ ταυτόχρονα διευκολύνει την πρόσβαση των παραγόντων αυτών στην υποκυτταρική θέση λειτουργίας τους (61). Τα παραπάνω δεδομένα σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μυριστυλίωση της πρωτεΐνης AvtPphB δεν είναι απαραίτητη για την ουσιαστική επαγωγική ενεργότητα της πρωτεΐνης.

Η αδυναμία και των δύο μορφών της πρωτεΐνης AvtPphB να οδηγήσει τα φυτά τομάτας σε ολοκληρωτική νέκρωση, μπορεί να οφείλεται είτε σε χαμηλότερο όριο ευαισθησίας της τομάτας για την πρωτεΐνη ή στην ύπαρξη ενός αποδοτικότερου μονοπατιού σηματοδότησης της HR, στον καπνό. Τα μέχρι τώρα δεδομένα υποδηλώνουν ότι διαφορετικά μεταξύ τους φυτικά είδη, φέρουν το αντίστοιχο λειτουργικά γονίδιο *R* καθώς και όλα τα υπόλοιπα συστατικά του μονοπατιού που απαιτούνται για την αναγνώριση της πρωτεΐνης AvtPphB.

Επιπροσθέτως, η νέκρωση που προκαλείται τόσο από τη μικρότερη όσο και από την πλήρη μορφή της πρωτεΐνης AvtPphB, σχετίζεται με την παροδική επαγωγή ενός τουλάχιστον γονιδίου (*hsr203J*) εξειδικευμένου για την HR. Το μετάγραφο του

γονιδίου *hsr203J* ανιχνεύθηκε 4 και 8 ημέρες μετά την μόλυνση φυτών καπνού (*N. Benthamiana*), από τους ανασυνδυασμένους ιούς PVX202/AvrPphB και PVX202/AvrPphB-62G63M, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί το γονίδιο αυτό επάγεται πριν από την εκδήλωση της νέκρωσης των φυτικών ιστών.

Αν η διαίρεση της πρωτεΐνης AvrPphB, σε ένα αμινοτελικό (6 kDa) και ένα καρβοξυτελικό (28 kDa) τμήμα, είναι αναγκαία προϋπόθεση για την μυριστυλίωση και τον εντοπισμό στη μεμβράνη του ξενιστή, οδηγώντας έτσι στην αναγνώριση της πρωτεΐνης από τον αντίστοιχο υποδοχέα και τη σηματοδότηση της HR είναι κάτι το οποίο θα πρέπει να διερευνηθεί.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Μελέτη του εκκριτικού συστήματος τύπου  
III στο φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv.  
*phaseolicola*.**

#### 4.1. Γενικά.

Η χαρακτηριστική ικανότητα πολλών φυτοπαθογόνων βακτηρίων να επάγουν την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) σε ανθεκτικά φυτά ή να εκδηλώνουν παθογένεια σε φυτά ξενιστές, εξαρτάται από τα γονίδια *hrp* και *hrc*, που συγκροτούν το εκκριτικό σύστημα τύπου III (2). Τα γονίδια *hrc* αντιπροσωπεύουν μία υποομάδα των γονιδίων *hrp*, τα οποία είναι συντηρημένα μεταξύ των διαφόρων εκκριτικών συστημάτων τύπου III, σε φυτικά και ζωικά παθογόνα (11).

Οι μεταγραφικές ομάδες *hrpJ*, *hrpU*, *hrpZ* και *hrpC*, κωδικοποιούν 22 πρωτεΐνες Hrp. Μεταξύ αυτών, το γονίδιο *hrcC* είναι ιδιαίτερα μελετημένο και έχει βρεθεί ότι κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης. Η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη για την πρωτεϊνική έκκριση τύπου III και κατέχει πρωταρχικό ρόλο στη μετατόπιση πρωτεϊνών στο εξωκυττάριο μέσο (2, 13, 94). Το γονίδιο *hrcC*, των βακτηρίων *Erwinia amylovora* και *Pseudomonas syringae*, περιβάλλεται από 4 μικρά γονίδια και όλα μαζί συγκροτούν το οπερόνιο *hrpC*. Τα 4 αυτά γονίδια, *hrpF*, *hrpG*, *hrpT* και *hrpV*, φαίνεται να είναι χαρακτηριστικά της ομάδας I του συμπλέγματος των *hrp* γονιδίων (*E. amylovora* και *P. syringae*), ενώ απουσιάζουν από την ομάδα II (*Ralstonia solanacearum* και *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) (17, 42). Οι ομάδες I και II των γονιδίων *hrp* διαφέρουν επίσης ως προς τα ρυθμιστικά τους συστατικά. Έτσι, τα γονίδια *hrp* της ομάδας I ενεργοποιούνται από ένα εναλλακτικό παράγοντα σ, ενώ αυτά της ομάδας II από ένα ομόλογο της πρωτεΐνης AraC (2). Απαραίτητη συμμετοχή στον εκκριτικό μηχανισμό τύπου III, έχει αποδοθεί σε πολλές πρωτεΐνες Hrc, ενώ ελάχιστα είναι γνωστά για τη λειτουργία των πρωτεϊνών Hrp στο μονοπάτι αυτό.

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

Στην παρούσα μελέτη απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Hrp του οπερονίου *hrpC* στο φυτοπαθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* και ελέγχθηκε η τυχόν αλληλεπίδρασή τους με άλλες πρωτεΐνες. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η πιθανότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ



διαφόρων πρωτεϊνικών συστατικών του εκκριτικού συστήματος τύπου III, στο ίδιο φυτοπαθογόνο. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ήταν το σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης.

#### **4.2. Απομόνωση και ταυτοποίηση των γονιδίων *hrpF*, *hrpG*, *hrpT* και *hrpV* του φυτοπαθογόνου βακτήριου *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.**

Η αλληλουχία των γονιδίων *hrpF*, *hrpG*, *hrpT* και *hrpV* από *P. syringae* pv. *phaseolicola* δεν ήταν γνωστή. Για το λόγο αυτό απομονώθηκαν με τη μέθοδο της PCR από το κοσμίδιο pPL6 και στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκαν στο φορέα έκφρασης pET16b. Ο σχεδιασμός των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR βασίστηκε στην ήδη γνωστή αλληλουχία των αντίστοιχων γονιδίων από την *P. syringae* pv. *glycinea*. Δυσκολίες που εμφανίστηκαν στην επιλογή κατάλληλων εκκινητών, μας οδήγησαν στην απομόνωση των γονιδίων αυτών, ανά ζεύγη. Έτσι, το γονίδιο *hrpF* απομονώθηκε μαζί με το γονίδιο *hrpG* και το γονίδιο *hrpT* μαζί με το *hrpV*. Οι πλασμιδιακές κατασκευές που δημιουργήθηκαν από την υποκλωνοποίηση στο φορέα έκφρασης pET16b ονομάστηκαν pET16b/HrpFG και pET16b/HrpTV, αντίστοιχα. Τόσο οι νουκλεοτιδικές όσο και οι αμινοξικές αλληλουχίες των γονιδίων αυτών συγκρίθηκαν με τις αλληλουχίες των αντίστοιχων γονιδίων από *P. syringae* pv. *glycinea* και *P. syringae* pv. *syringae* (Εικ. 4.3-4.6). Επειδή οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ταυτοποιήθηκαν από τα ήδη κλωνοποιημένα προϊόντα της PCR, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα, κάποια από τις μεταλλαγές (σε σχέση με τους άλλους δύο παθότυπους) να είναι προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής, η σύγκριση έδειξε ότι οι πρωτεΐνες HrpF, HrpG και HrpT εμφανίζονται πλήρως συντηρημένες στους παθότυπους *phaseolicola* και *glycinea* ενώ μικρή διαφορά παρουσίασε η πρωτεΐνη HrpV (Εικ. 2.7-2.10). Οι φυσικοχημικές ιδιότητες και τα δομικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών αυτών παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1.

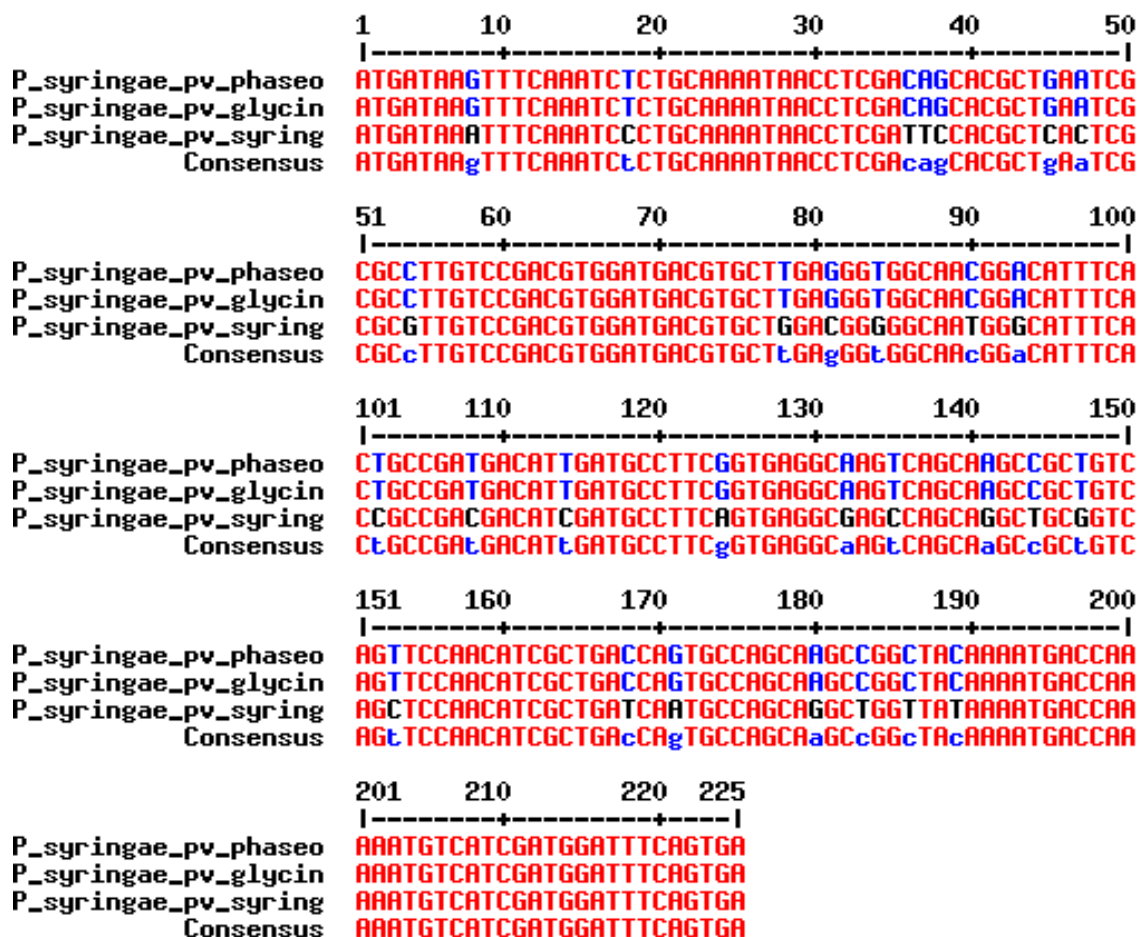
```
ATGATAAGTTTCAAATCTCTGCAAATAACCTCGACAGCACGCTGA
ATCGCGCCTTGTCCGACGTGGATGACGTGCTTGAGGGTGGCAACGG
ACATTTCACTGCCGATGACATTGATGCCTTCGGTGAGGCAAGTCAG
CAAGCCGCTGTCAGTTCCAACATCGCTGACCAGTGCCAGCAAGCCG
GCTACAAAATGACCAAAAATGTCATCGATGGATTTAGTGAAGTTTCG
CTGAGGTCGTCGGCCAGTGGTGTGATCAGCGTCCAGCGACTGCGCT
GGACTGCTGGGTTCGACGACGCCAACGTCCGCCTGGAAGTGGTTGGT
CATGGAATACGTTGCAGCATTGAGCTGCTCGATCCCTACGATGCCA
ATGACTCCCAACGCATCGAGGCGTTGCTCAGCCACGGGGGTGCCAG
CCTTGCGTGTGCCTGTGATGGCGCCTTCGCCATTGATCCGCAGACCC
GCTGCATGGTCTGGTCACTGGATACCCAACCCCTGCAACCTCGC
CGATCTACTCGCTCGCCTTGAAAGGCTGGCCAATCAGCGTGC GGCC
TTGCTCAGCCTGATGCAGACCACCATTTGGCGACATGACCCCCGCGA
TATCCGGGCGCACGACCCTCAATCACCGGCAACCGGGAGTTTGA
```

**Εικόνα 4.1:** Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων *hrpF* και *hrpG*. Τα κωδικόνια έναρξης και λήξης της μετάφρασης των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν εμφανίζονται με μπλε και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα.

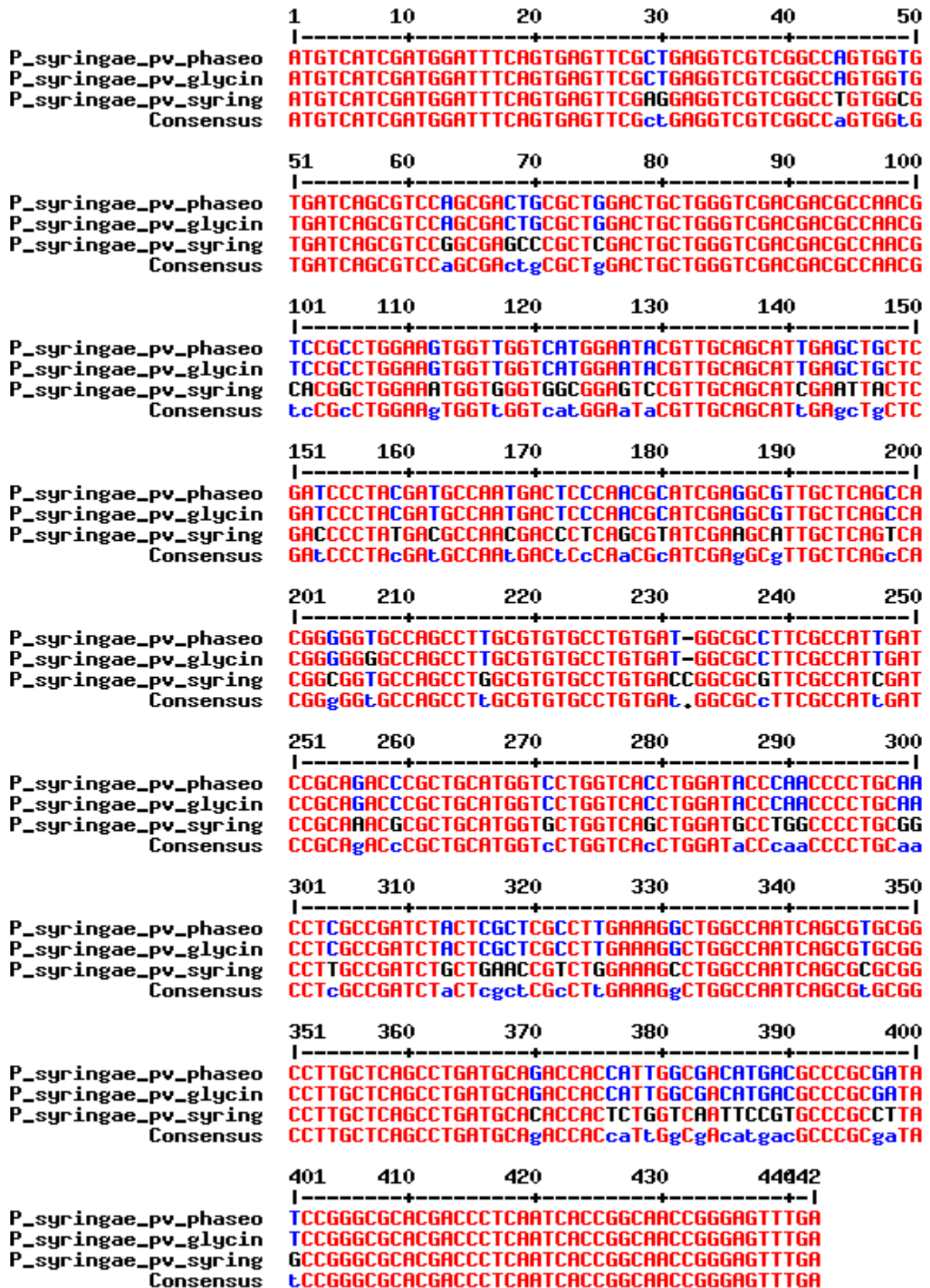
```
ATGAAGATCAGTAGCATTGCAGTTGTGCTGGTGTGCTGTTTCGCTACCC
TGTCGGGGTGTGCCACCCATGGCTGTACGGGAGTTGCCTGCAAACG
TCCGGACTCCACAAACCGCGAACTGGTTCATCTGGTGGCCGCCGGAC
ATGCGCGACGGTCTGGACGACCAGGACCACGAGCGGGATTACACA
GTCGTGAAGTTAAAGGATTAGAAATGATTGAGGTAAAGGAAAAAG
CGGCGTTCTACTACAACGTCGCTGCCCAGAGCCCTGCTGTCTGGCC
GGTGGCAAACCGAGTGTCTTCGTCAGTCGGCGTGAGCATCATGAC
TGGGGCATCGCGCTGCACATCGAAGGGCGTGCGCTGCGTCCCAGAC
AACTGAGAGAGGCGCTGCAAATGAGGTTCTCAGAGGCCGAGCGGT
TCCGTAACACTTTCTGTTTCTGGATGTACAGCGTGATTTTGTAGTG
TGGCATGCCGTAAGCGACGCGCCGGATGCCGTCACCAACCTGGATG
ACATACGGCGACATGAGTTGATGCTGGCAGGCCTAGAACACCTGGC
TTAGGCAATTCTGT
```

**Εικόνα 4.2:** Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των πρωτεϊνών HrpT και HrpV. Τα κωδικόνια έναρξης και λήξης της μετάφρασης εμφανίζονται με γαλάζιο και πορτοκαλί χρώμα αντίστοιχα.

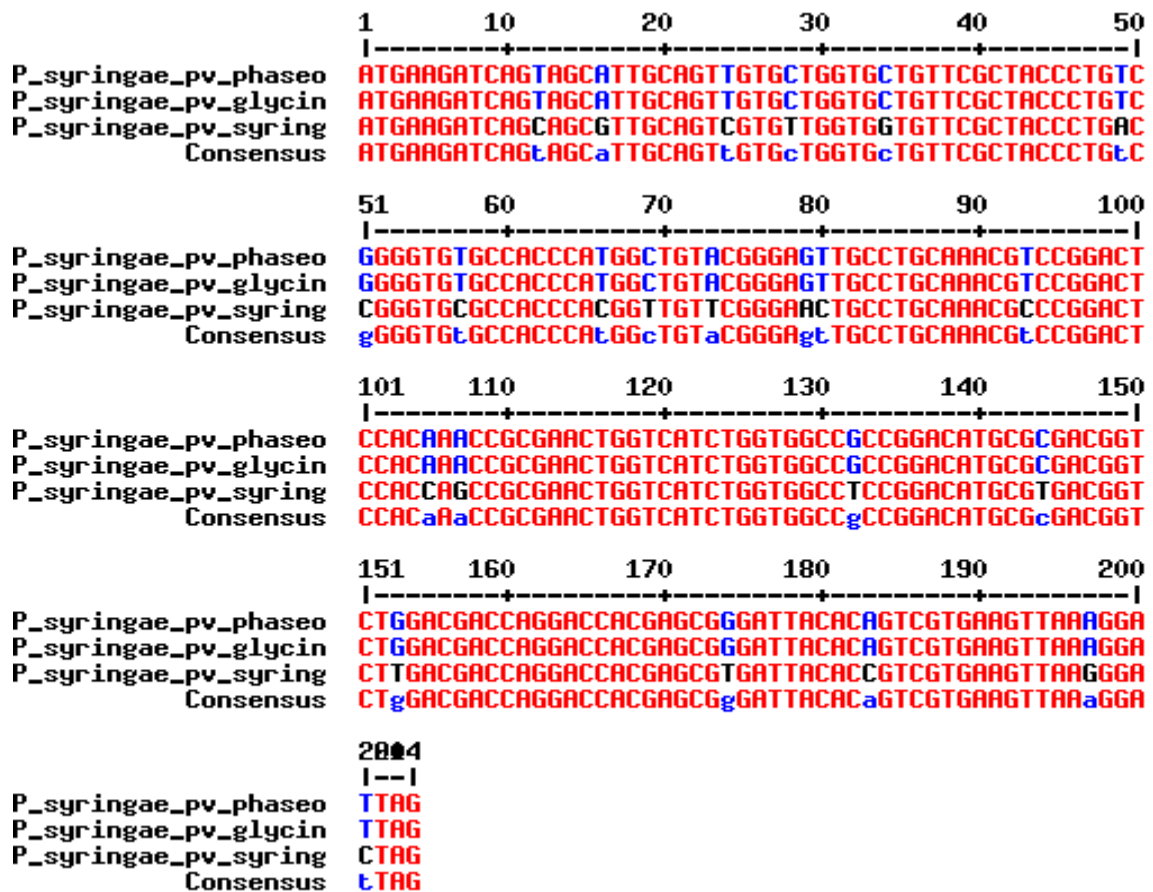
**Εικόνα 4.3:** Σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HrpF στο φυτοπαθογόνο *P. syringae* pathovars phaseolicola, glycinea και syringae, με τη χρήση του προγράμματος Multalin. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμφανίζουν 100%, 50% και 0% ομολογία μεταξύ των τριών παθότυπων απεικονίζονται με κόκκινο, μπλε και μαύρο χρώμα, αντίστοιχα.



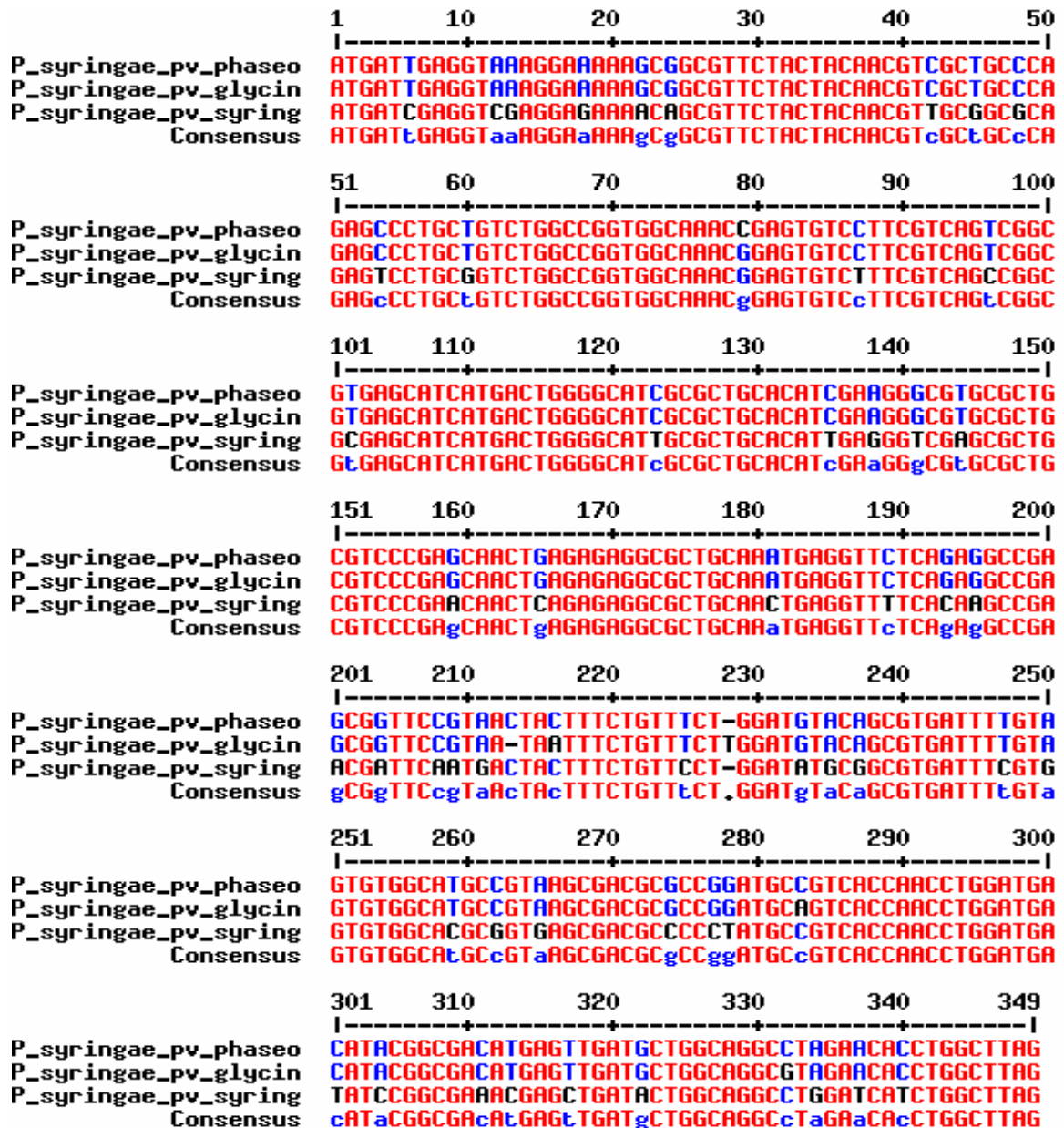
**Εικόνα 4.4:** Σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HrpG στο φυτοπαθογόνο *P. syringae* pathovars phaseolicola, glycinea και syringae, με τη χρήση του προγράμματος Multalin. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμφανίζουν 100%, 50% και 0% ομολογία μεταξύ των τριών παθότυπων απεικονίζονται με κόκκινο, μπλε και μαύρο χρώμα, αντίστοιχα.



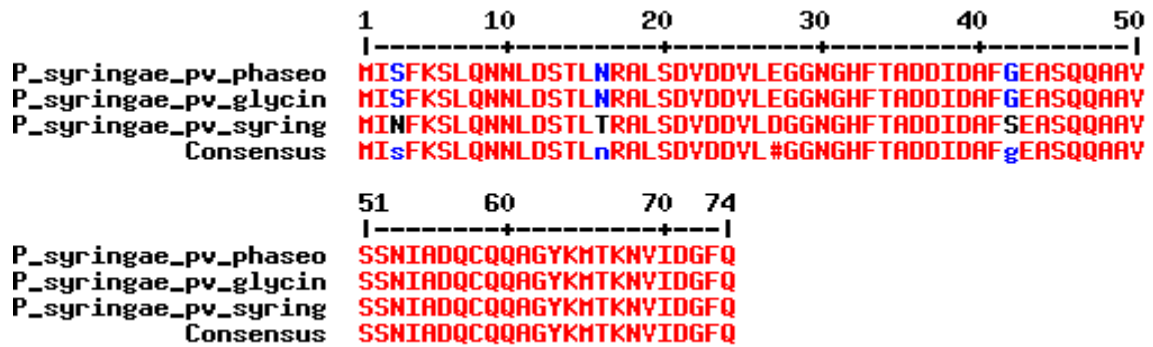
**Εικόνα 4.5:** Σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HrpT στο φυτοπαθογόνο *P. syringae* pathovars phaseolicola, glycinea και syringae, με τη χρήση του προγράμματος Multalin. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμφανίζουν 100%, 50% και 0% ομολογία μεταξύ των τριών παθότυπων απεικονίζονται με κόκκινο, μπλε και μαύρο χρώμα, αντίστοιχα.



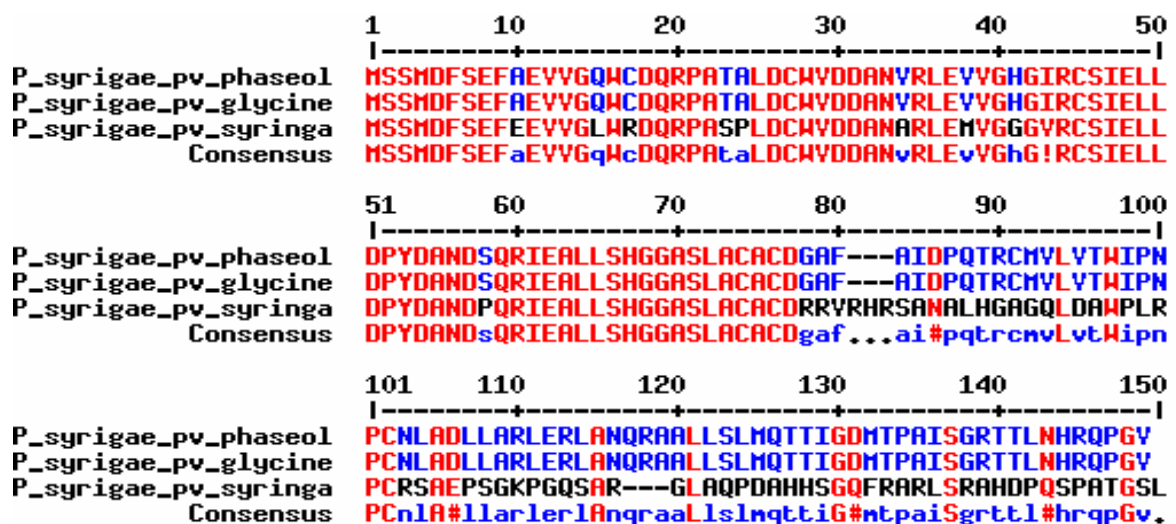
**Εικόνα 4.6:** Σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HrpV στο φυτοπαθογόνο *P. syringae* pathovars phaseolicola, glycinea και syringae, με τη χρήση του προγράμματος Multalin. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμφανίζουν 100%, 50% και 0% ομολογία μεταξύ των τριών παθότυπων απεικονίζονται με κόκκινο, μπλε και μαύρο χρώμα, αντίστοιχα.



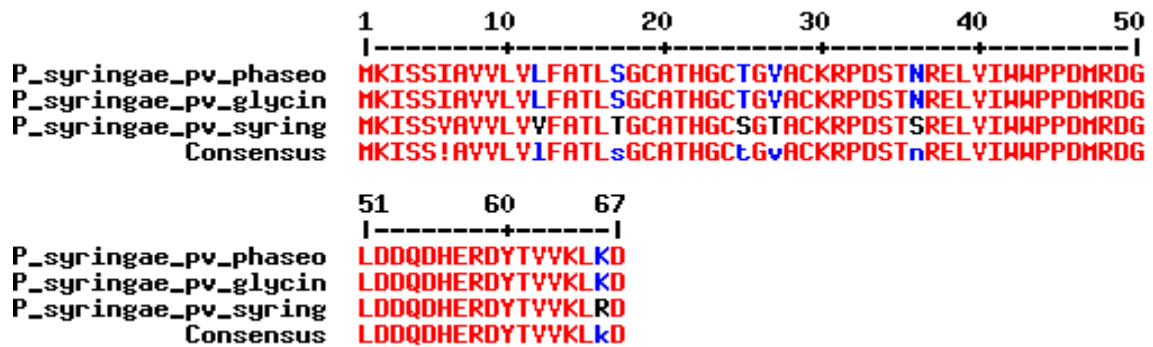
**Εικόνα 4.7:** Σύγκριση της πρωτοταγούς αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HrpF στο φυτοπαθογόνο *P. syringae* pathovars phaseolicola, glycinea και syringae, με τη χρήση του προγράμματος Multalin. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμφανίζουν 100%, 50% και 0% ομολογία μεταξύ των τριών παθότυπων απεικονίζονται με κόκκινο, μπλε και μαύρο χρώμα, αντίστοιχα.



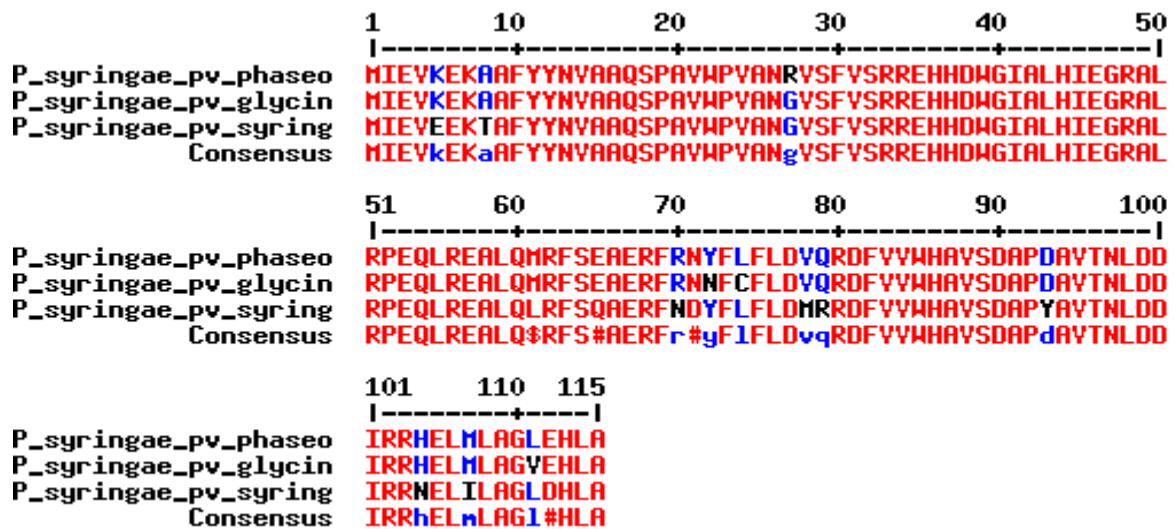
**Εικόνα 4.8:** Σύγκριση της πρωτοταγούς αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HrpG στο φυτοπαθογόνο *P. syringae* pathovars phaseolicola, glycinea και syringae, με τη χρήση του προγράμματος Multalin. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμφανίζουν 100%, 50% και 0% ομολογία μεταξύ των τριών παθότυπων απεικονίζονται με κόκκινο, μπλε και μαύρο χρώμα, αντίστοιχα.



**Εικόνα 4.9:** Σύγκριση της πρωτοταγούς αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HrpT στο φυτοπαθογόνο *P. syringae* pathovars phaseolicola, glycinea και syringae, με τη χρήση του προγράμματος Multalin. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμφανίζουν 100%, 50% και 0% ομολογία μεταξύ των τριών παθότυπων απεικονίζονται με κόκκινο, μπλε και μαύρο χρώμα, αντίστοιχα.



**Εικόνα 4.10:** Σύγκριση της πρωτοταγούς αλληλουχίας του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HrpV στο φυτοπαθογόνο *P. syringae* pathovars phaseolicola, glycinea και syringae, με τη χρήση του προγράμματος Multalin. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που εμφανίζουν 100%, 50% και 0% ομολογία μεταξύ των τριών παθότυπων απεικονίζονται με κόκκινο, μπλε και μαύρο χρώμα, αντίστοιχα.





### 4.3. Έκφραση των πρωτεϊνών HrpF, HrpG, HrpT και HrpV σε *E.coli*.

Τα γονίδια των πρωτεϊνών HrpF, HrpG, HrpT και HrpV, αφού απομονώθηκαν με PCR από το κοσμίδιο pPL6, το οποίο φέρει όλη τη γονιδιακή ομάδα *hrp* της *P. syringae* pv. *phaseolicola*, υποκλωνοποιήθηκαν στον φορέα έκφρασης, με His-tag, pET16b. Με το φορέα έκφρασης pET16b οι πρωτεΐνες εκφράζονται επισημασμένες μαζί με μια μικρή αλληλουχία 10 ιστιδινών στο αμινοτελικό άκρο τους, διευκολύνοντας έτσι τον καθαρισμό τους με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη Ni-NTA-αγαρόζης. Ο έλεγχος της έκφρασης στο φορέα αυτό γίνεται τον υποκινητή T7, επιτρέποντας έτσι την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων πρωτεΐνης από το στέλεχος της *E. Coli* BL21(DE3)plysS, το οποίο εκφράζει την πολυμεράση T7, από χρωμοσωμιακή θέση, υπό τον έλεγχο του υποκινητή *lacUV5*. Έτσι, οι κατασκευές εισήχθησαν, χωριστά, στο στέλεχος αυτό και ελέγχθηκε η έκφραση της κάθε πρωτεΐνης μετά από επαγωγή με IPTG. Το επίπεδο έκφρασης κάθε πρωτεΐνης ήταν διαφορετικό. Έτσι, οι πρωτεΐνες HrpT και HrpV εκφράζονταν σε πολύ υψηλά επίπεδα και ανιχνεύονταν με χρώση Coomassie blue, μετά από ανάλυσή τους σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αλλά και με ανάλυση Western χρησιμοποιώντας κατάλληλο αντίσωμα που αναγνωρίζει την αλληλουχία των ιστιδινών (anti-His-AP-conjugate), ενώ οι πρωτεΐνες HrpF και HrpG δεν ανιχνεύτηκαν με καμία από τις προηγούμενες μεθόδους.

**Πίνακας 4.1:** Φυσικοχημικές ιδιότητες και χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών Hrp που κωδικοποιούνται από τη μεταγραφική μονάδα *hrpC*.

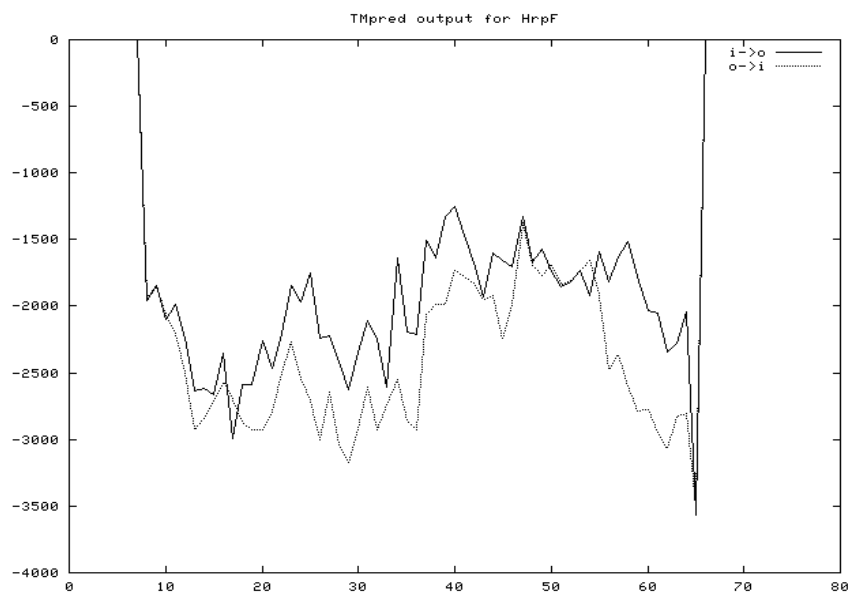
Πρωτεΐνη	Αμινοξέα	MB (kDa)	pI	Πιθανή λειτουργία και χαρακτηριστικά
HrpF	74	7.93	4.07	Άγνωστη
HrpG	146	15.87	4.61	Άγνωστη, 1TM
HrpT	67	7.48	5.50	Άγνωστη, 1TM
HrpV	115	13.46	6.04	Άγνωστη

**HrpF:** Με βάση την ανάλυση υδροφοβικότητας της (Εικ. 4.12), η πρωτεΐνη HrpF προβλέπεται να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Παρά το μικρό της μέγεθος (74αα) και το γεγονός ότι η πρωτεΐνη δεν περιέχει υδρόφοβες περιοχές, οπότε θα μπορούσε να καθαριστεί από το κυτοπλασμικό κλάσμα των βακτηρίων, ο καθαρισμός της δεν έγινε εφικτός ακόμα και κάτω από ισχυρές αποδιατακτικές συνθήκες (8M

<b>1</b>	MISFKSLQNN	LDSTLNRALS	DVDDVLEGGN
<b>31</b>	GHFTADDIDA	FGEASQQAAV	SSNIADQCQQ
<b>61</b>	AGYKMTKNVI	DGFQ	

Urea). Η αδυναμία ανίχνευσης της πρωτεΐνης πιθανόν να οφειλόταν σε χαμηλό επίπεδο έκφρασης. Μια άλλη εκδοχή είναι ότι η πρωτεΐνη είναι ασταθής οπότε δεν είναι δυνατή η ανίχνευσή της.

**Εικόνα 4.11:** Πρωτοταγής αλληλουχία της πρωτεΐνης HrpF από *P.s.phaseolicola*.



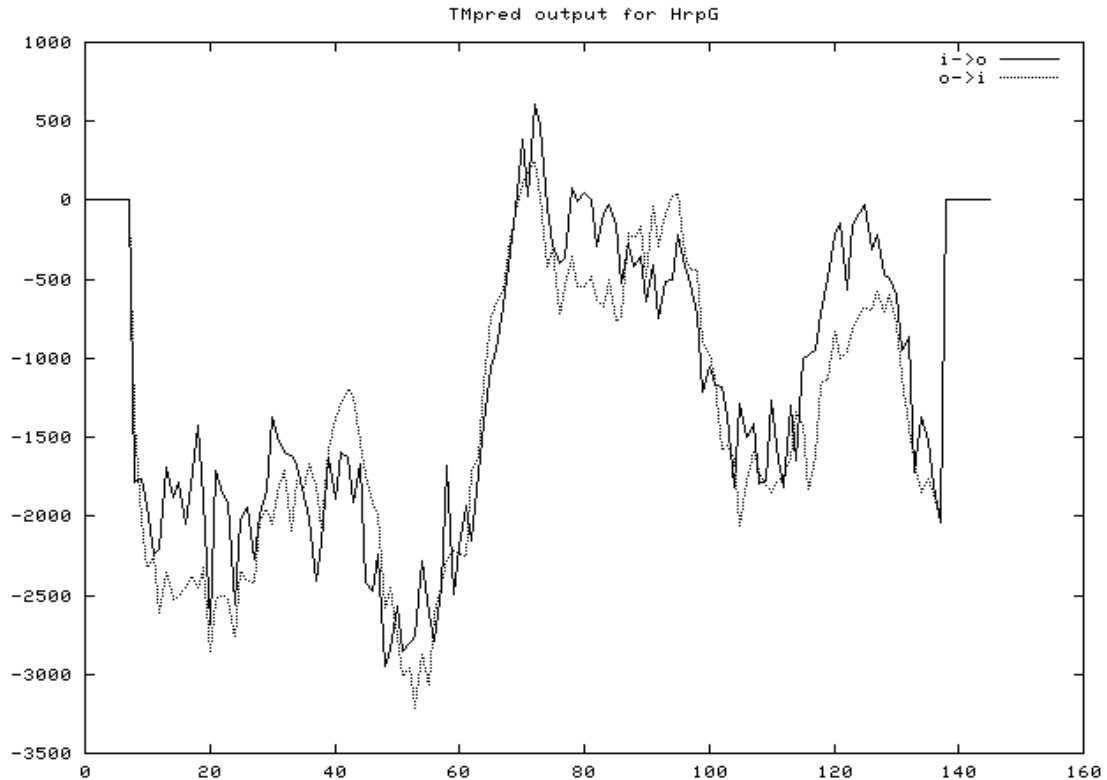
**Εικόνα 4.12:** Διάγραμμα υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης HrpF από *P.s.phaseolicola*, όπως προέκυψε από ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας με το πρόγραμμα TmPred.

**HrpG:** Με βάση την ανάλυση υδροφοβικότητας της (Εικ.4.14), η πρωτεΐνη HrpG προβλέπεται να έχει μία υδρόφοβη περιοχή. Το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης προβλέπεται να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και το καρβοξυτελικό της στο περίπλασμα του κυττάρου. Για το λόγο αυτό η εκχύλισή της από τα κύτταρα της *E. coli*, καθώς και ο καθαρισμός της, με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη Ni-NTA αραρόζης, πραγματοποιήθηκε κάτω από ισχυρές αποδιατακτικές συνθήκες (8M Urea). Παρόλα αυτά δεν ήταν δυνατή η ανίχνευσή της μετά από χρώση με coomassie

<b>1</b>	MSSMDFSEFA	EVVGQWCDQR	PATALDCWVD	DANVRLEVVG
<b>41</b>	HGIRCSIELL	DPYDANDSQR	<u>IEALLSHGGA</u>	<u>SLACACDGAF</u>
<b>81</b>	<u>AIDPQTRCMV</u>	LVTWIPNPCN	LADLLARLER	LANQRAALLS
<b>121</b>	LMQTTIGDMT	PAISGRTTLN	HRQPGV	

blue, αλλά ούτε και με το αντίσωμα anti-His-AP-conjugate. Η αδυναμία ανίχνευσής της μπορεί να οφείλεται είτε σε αστάθεια της πρωτεΐνης μέσα στα κύτταρα ή σε πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασής της.

**Εικόνα 4.13:** Πρωτοταγής αλληλουχία της πρωτεΐνης HrpG από *P.s. phaseolicola*. Η υδρόφοβη περιοχή σημειώνεται με υπογράμμιση.



**Εικόνα 4.14:** Διάγραμμα υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης HrpG από *P.s.phaseolicola*, όπως προέκυψε από ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας με το πρόγραμμα Tmpred.

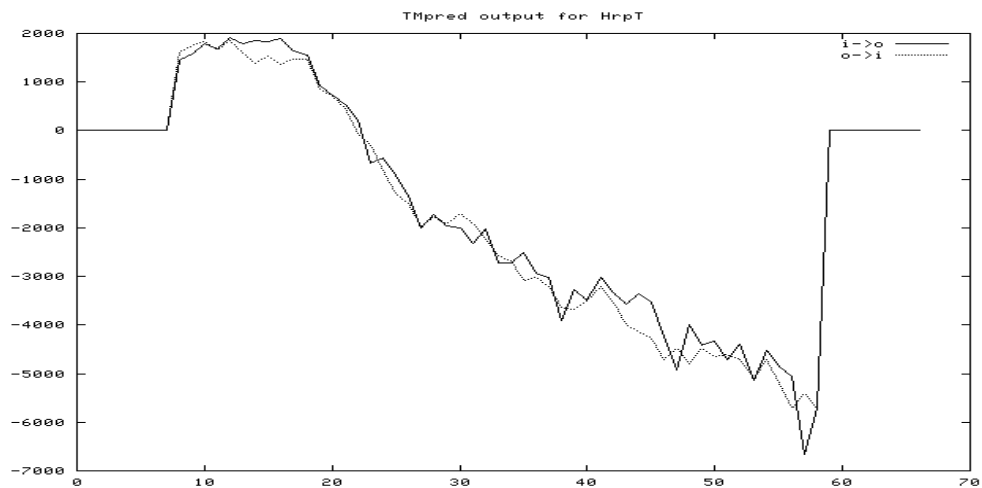
**HrpT:** Με βάση την ανάλυση υδροφοβικότητας της (Εικ.4.16), η πρωτεΐνη HrpT προβλέπεται να έχει μία υδρόφοβη περιοχή. Το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης προβλέπεται να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και το καρβοξυτελικό της στο περίπλασμα του κυττάρου ενώ μικρή είναι η πιθανότητα για αντίστροφο εντοπισμό. Η εκχύλισή της από τα κύτταρα της *E. coli*, καθώς και ο καθαρισμός της, με χρωματογραφία συγγένειας από στήλη Ni-NTA αгарόζης, πραγματοποιήθηκε κάτω από ισχυρές αποδιατακτικές συνθήκες (8M Urea). Η ταυτότητα της

```
1  MKISSIAVVL  VLFATLSGCA  THGCTGVACK  RPDSTNRELV
41  IWWPPDMRDG  LDDQDHERDY  TVVKLKD
```

καθαρισμένης πρωτεΐνης επιβεβαιώθηκε με ανάλυση Western χρησιμοποιώντας το

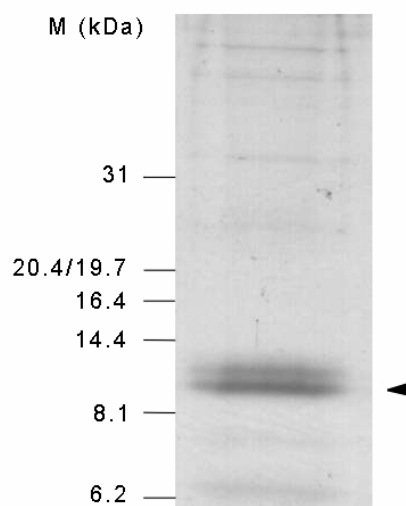
**Εικόνα 4.15:** Πρωτοταγής αλληλουχία της πρωτεΐνης HrpT από *P.s. phaseolicola*. Η υδρόφοβη περιοχή σημειώνεται με υπογράμμιση.

αντίσωμα anti-His-AP-conjugate (Εικ. 4.17).



**Εικόνα 4.16:** Διάγραμμα υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης HrpT από *P.s.phaseolicola*, όπως προέκυψε από ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας με το πρόγραμμα TmPred.

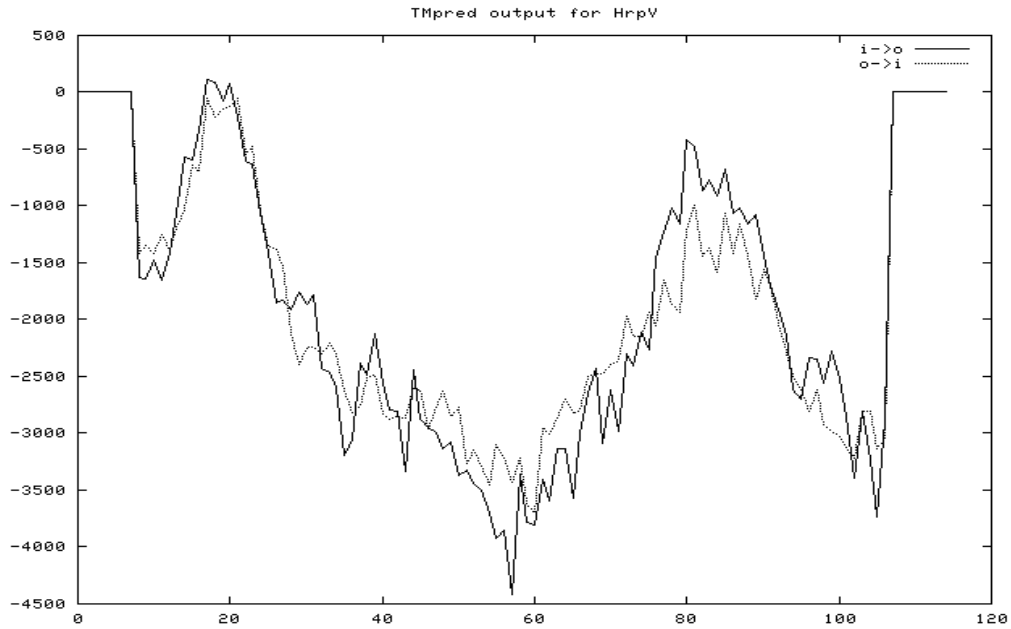
**Εικόνα 4.17:** Καθαρισμένη πρωτεΐνη His<sub>10</sub>-HrpT με χρωματογραφία από στήλη Ni-NTA αгарόζης. Η πρωτεΐνη αναλύθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (17%) και ανιχνεύθηκε μετά από χρώση με coomassie blue.



**HrpV:** Με βάση την ανάλυση υδροφοβικότητας της (Εικ. 4.19), η πρωτεΐνη HrpV προβλέπεται να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Παρά το γεγονός ότι η πρωτεΐνη δεν περιέχει υδρόφοβες περιοχές, δεν ήταν εφικτός ο καθαρισμός της από το κυτοπλασμικό κλάσμα των βακτηρίων. Ο καθαρισμός της πραγματοποιήθηκε κάτω από ισχυρές αποδιατακτικές συνθήκες (8M Urea). Η ταυτότητα της καθαρισμένης πρωτεΐνης επιβεβαιώθηκε με ανάλυση western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-His-AP-conjugate (Εικ. 4.20).

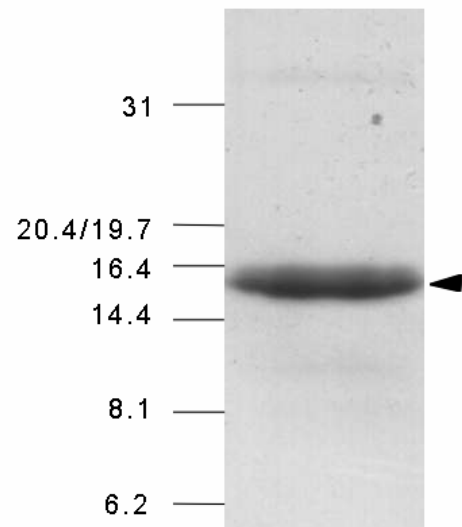
```
1  MIEVKEKA AF  YYNVAAQSPA  VWPVANRV SF  VSRREHHDWG
41  IALHIEGRAL  RPEQLREALQ  MRFSEAERFR  NYFLFLDVQR
81  DFVVWHAVSD  APDAVTNLDD  IRRHELMLAG  LEHLA
```

**Εικόνα 4.18:** Πρωτοταγής αλληλουχία της πρωτεΐνης HrpV από *P.s. phaseolicola*.



**Εικόνα 4.19:** Διάγραμμα υδροφοβικότητας της πρωτεΐνης HrpV από *P.s.phaseolicola*, όπως προέκυψε από ανάλυση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας με το πρόγραμμα TmPred.

**Εικόνα 4.20:** Καθαρισμένη πρωτεΐνη His<sub>10</sub>-HrpV με χρωματογραφία από στήλη Ni-NTA αгарόζης. Η πρωτεΐνη αναλύθηκε σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμίδης (17%) και ανιχνεύθηκε μετά από χρώση με coomassie blue.



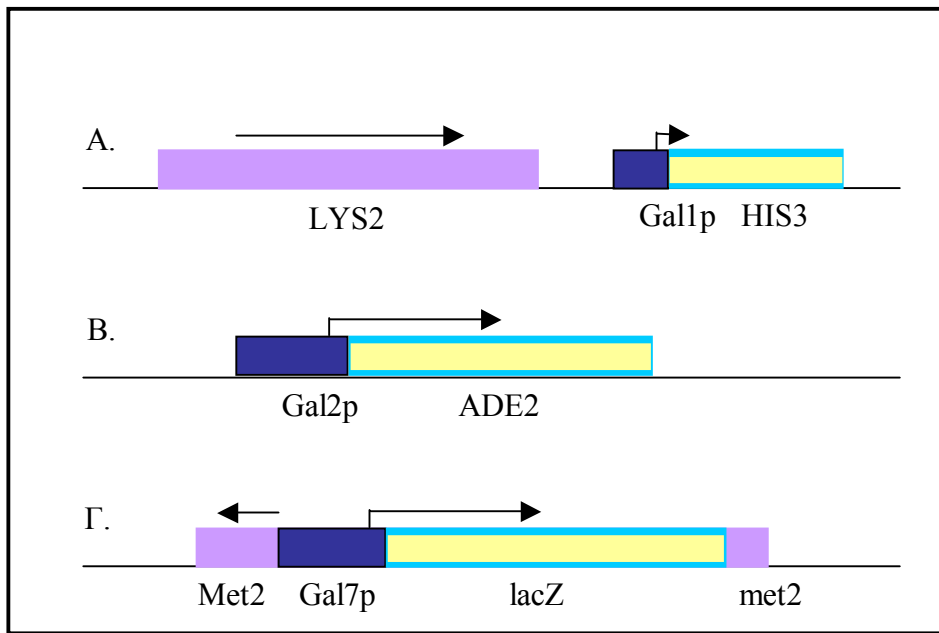
#### 4.4. Έλεγχος της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών HrpF, HrpG, HrpT και HrpV με τις πρωτεΐνες HrpZ και AnrPto με το σύστημα των δύο υβριδίων.

Προκειμένου να εξεταστεί αν οι HrpF, HrpG, HrpT και HrpV αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες HrpZ και AnrPto χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης. Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος ζύμης PJ69-4A, το οποίο περιέχει τρία διαφορετικά γονίδια επιλογής (*ade*, *his*, *lacZ*), κάθε ένα από τα οποία εκφράζεται από διαφορετικό υποκινητή (Εικ. 4.21), ελαττώνοντας έτσι την πιθανότητα ψευδοθετικών μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης. Επιπλέον, το στέλεχος αυτό έχει το αγρίου-τύπου γονίδιο *ADE2*, η έκφραση του οποίου οδηγεί στην εμφάνιση αποικιών που έχουν άσπρο χρώμα, ενώ η μη έκφρασή του δίνει αποικίες με κόκκινο χρώμα. Το γονίδιο *ADE2* μεταγράφεται μόνο μετά από ανασύσταση της ενεργότητας του μεταγραφικού παράγοντα Gal4, λόγω αλληλεπίδρασης των συντηγμένων πρωτεϊνών, ο οποίος δεσμεύεται στον τοκινητή Gal2. Έτσι, η ανάπτυξη των κυττάρων σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει αδενίνη δίνει τη δυνατότητα να διαπιστωθεί η ύπαρξη θετικής ή αρνητικής αλληλεπίδρασης από το χρώμα των αποικιών: άσπρο=θετική αλληλεπίδραση και κόκκινο=αρνητική αλληλεπίδραση.

Κάθε ένα από τα γονίδια *hrpF*, *hrpG*, *hrpT* και *hrpV* συντήχθηκε στο ίδιο εκφραστικό πλαίσιο ανάγνωσης με την αμινοτελική περιοχή του Gal4 που περιέχει το τμήμα που δεσμεύεται στο DNA (DNA binding domain), στο φορέα έκφρασης pAS2-1. Το γονίδιο της AnrPto συντήχθηκε στο ίδιο εκφραστικό πλαίσιο ανάγνωσης με την αμινοτελική περιοχή του Gal4 που περιέχει το τμήμα που απαιτείται για ενεργοποίηση της μεταγραφής (Gal4-activation domain), στο φορέα έκφρασης pACT2, ενώ το γονίδιο της HrpZ προϋπήρχε στο φορέα αυτόν (Εικ. 4.22).

Οι κατασκευές αυτές εισήχθησαν στο στέλεχος που προαναφέρθηκε και η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης έγινε σε πλήρες ελάχιστο θρεπτικό μέσο (CM: complete minimal medium) που δεν περιείχε τα αμινοξέα λευκίνη και τρυπτοφάνη. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η ικανότητα των μετασχηματισμένων κυττάρων να αναπτύσσονται σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε λευκίνη, τρυπτοφάνη, αδενίνη και ιστιδίνη, αλλά και μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης, για να διαπιστωθεί αν οι χιμαιρικές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν.





**Εικόνα 4.21:** Γενετική δομή στα γονίδια αναφοράς του στελέχους της ζύμης PJ69-4A. Οι Gal4 επαγόμενοι υποκιμητές θποδεικνύονται με ■, τα γονίδια αναφοράς με ■, και οι γειτονικές κωδικοποιούσες περιοχές με ■.  
 Α) Η δομή του γονιδίου αναφοράς *LYS2::GAL1-HIS3*. Β) Η δομή του γονιδίου αναφοράς *GAL2-ADE2*. Γ) Η δομή του γονιδίου αναφοράς *met2::GAL7-lacZ*.

Η αδυναμία των μετασχηματισμένων κυττάρων ν' αναπτυχθούν σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε αδενίνη και ιστιδίνη σε συνδιασμό με την έλλειψη ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης σημαίνει ότι καμία από τις πρωτεΐνες HrpF, HrpG, HrpT και HrpV δεν αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη HrpZ αλλά ούτε και με την AnrPto.

pAS2-1/HrpF:	Gal4 BD	HrpF	pACT2/HrpZ:	Gal4 AD	HrpZ
pAS2-1/HrpF:	Gal4 BD	HrpF	pACT2/AvrPto:	Gal4 AD	AvrPto
pAS2-1/HrpG:	Gal4 BD	HrpG	pACT2/HrpZ:	Gal4 AD	HrpZ
pAS2-1/HrpG:	Gal4 BD	HrpG	pACT2/AvrPto:	Gal4 AD	AvrPto
pAS2-1/HrpT:	Gal4 BD	HrpT	pACT2/HrpZ:	Gal4 AD	HrpZ
pAS2-1/HrpT:	Gal4 BD	HrpT	pACT2/AvrPto:	Gal4 AD	AvrPto
pAS2-1/HrpV:	Gal4 BD	HrpV	pACT2/HrpZ:	Gal4 AD	HrpZ
pAS2-1/HrpV:	Gal4 BD	HrpV	pACT2/AvrPto:	Gal4 AD	AvrPto

**Είκονα 4.22:** Πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στο σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης. Gal4 BD: Gal4 DNA binding domain, Gal4 AD: Gal4 activation domain.

#### 4.5. Έλεγχος τυχόν αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφόρων πρωτεϊνικών συστατικών του εκκριτικού συστήματος III στην *P. s. phaseolicola*.

Μετά τον έλεγχο των πρωτεϊνών του οπερονίου *hrpC*, θελήσαμε να επεκτείνουμε τις προσπάθειες μας για την εύρεση τυχόν αλληλεπιδράσεων μεταξύ άλλων πρωτεϊνικών συστατικών του εκκριτικού συστήματος τύπου III. Οι μελέτες αυτές βασίστηκαν και πάλι στη χρήση του συστήματος των δύο υβριδίων της ζύμης. Οι νέες κατασκευές δημιουργήθηκαν με την υποκλωνοποίηση των γονιδίων *hrpO*, *AvrPto*, *AvrPphB-Δ62* (που κωδικοποιεί τη μικρότερη μορφή της πρωτεΐνης ΑνιPphB) και *hrpD* στο φορέα έκφρασης pAS2-1 και την υποκλωνοποίηση του γονιδίου *hrpO*, στο φορέα έκφρασης pACT2. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν προϋπήρχαν ήδη ως ένθετα στους παραπάνω φορείς.

<b>pAS2-1/HrpD:</b>	Gal4 BD	HrpD
<b>pAS2-1/HrpO:</b>	Gal4 BD	HrpO
<b>pAS2-1/AvrPto:</b>	Gal4 BD	AvrPto
<b>pAS2-1/AvrPphB-62G63M:</b>	Gal4 BD	AvrPphB-62G63M
<b>pACT2/HrpO:</b>	Gal4 AD	HrpO

**Εικόνα 4.23:** Νέες πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στο σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης. Gal4 BD: Gal4 DNA binding domain, Gal4 AD: Gal4 activation domain.

Η έλλειψη ικανότητας των μετασχηματισμένων κυττάρων να αναπτύσσονται σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε λευκίνη, τρυπτοφάνη, αδενίνη και ιστιδίνη, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι χιμαιρικές πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν. Οι μόνες περιπτώσεις ανάπτυξης μετασχηματισμένων κυττάρων σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε αδενίνη και ιστιδίνη, αφορούσαν πρωτεϊνικούς συνδιασμούς στους οποίους συμμετείχε η πρωτεΐνη HrpE. Όμως, η πρωτεΐνη αυτή είχε την ιδιότητα να αυτοενεργοποιείται όταν βρισκόταν συντηγμένη, στο ίδιο εκφραστικό πλαίσιο ανάγνωσης με την αμινοτελική περιοχή του Gal4 που περιέχει το τμήμα που απαιτείται για ενεργοποίηση της μεταγραφής (Gal4-activation domain), στο φορέα έκφρασης pACT2 και συνεκφραζόταν με τον φορέα pAS2-1, που της παρείχε την περιοχή δέσμευσης στο DNA (DNA binding domain). Στη συνέχεια η μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης επιβεβαίωσε το αρνητικό του αποτελέσματος. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια που παρέχει το σύστημα των δύο υβριδίων (Matchmaker system), τα οποία ήταν: pCL1 και pVA3-1 + pTD1-1, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τόσο τα πλασμίδια του συστήματος, pAS2-1 + pACT2 και pLAM5'-1 + pTD1-1 όσο και κάθε μία από τις πρωτεΐνες που ελέγχθηκαν συντηγμένη στο φορέα έκφρασης pAS2-1 ή pACT2, η οποία συνεκφραζόταν με τον

φορέα pACT2 ή pAS2-1, αντίστοιχα. Οι πρωτεϊνικοί συνδιασμοί που ελέγχθηκαν καθώς και τα αποτελέσματα των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων φαίνονται στον πίνακα 4.2 που ακολουθεί.

**Πίνακας 4.2:** Συνδυασμοί πρωτεϊνικών συστατικών του εκκριτικού συστήματος III στο φυτοπαθογόνο *P.s.phaseolicola*, για τους οποίους ελέγχθηκε η πιθανότητα αλληλεπίδρασης με το σύστημα των δύο υβριδίων της ζύμης. Στη στήλη -Ade, -His απεικονίζεται η ικανότητα των μετασχηματισμένων κυττάρων ν' αναπτύσσονται σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε αδενίνη και ιστιδίνη. (+): Ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων απουσία αδενίνης και ιστιδίνης, (-): Αδυναμία ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων απουσία αδενίνης και ιστιδίνης και (+/-): Μόνο ορισμένα από τα μετασχηματισμένα κύτταρα αναπτύσσονταν απουσία αδενίνης και ιστιδίνης.

pACT2	pAS2-1	-Ade, -His
AvrPphB-62G63M	HrpO	-
AvrPto	HrpO	-
AvrPto	HrcN	-
AvrPto	HrpV	-
AvrPto	HrpE	+/-
AvrPto	HrpD	-
AvrPto	HrpG	-
AvrPto	HrpT	-
AvrPto	HrpF	-
AvrPto	HrcU <sub>c</sub>	-
AvrPto	HrcV <sub>c</sub>	-
HrpZ	HrpO	-
HrpZ	HrcN	-
HrpZ	HrpE	+/-
HrpZ	HrpD	-
HrpZ	HrpG	-
HrpZ	HrpF	-
HrpZ	HrpT	-
HrpZ	HrpV	-

HrpZ	HrcU <sub>c</sub>	-
HrpZ	HrcV <sub>c</sub>	-
HrpO	HrpV	-
HrpO	HrpD	-
HrpO	AvrPphB-62G63M	-
HrpE	AvrPphB-62G63M	+/-
HrpE	HrpD	+/-
HrpE	HrpF	+/-
HrpE	HrpG	-
HrpE	HrpT	-
HrpE	HrpV	+
HrpE	HrpB	+/-
HrpE	AvrPto	+/-
HrcN	HrpB	-
HrcN	AvrPphB-62G63M	-

#### 4.5. Συζήτηση.

Παρά το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες HrpF, HrpG και HrpT δεν απαντώνται σε ζωικά παθογόνα βακτήρια, εμφανίζονται συντηρημένες μεταξύ διαφορετικών παθότυπων της *P. syringae* ενώ έχουν βρεθεί και σε άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια, όπως η *E. amylovora* (17), υποδεικνύοντας έτσι ότι έχουν εξειδικευμένες λειτουργίες στην παθογένεια των φυτών. Εντούτοις, οι λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών στο εκκριτικό μονοπάτι Hrp παραμένουν άγνωστες. Η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης HrpT οδηγεί στην πρόβλεψη μιας υποτιθέμενης λιποπρωτεΐνης, η οποία ίσως λειτουργεί ως μια HrpC τσαπερόνη. Η αντίληψη αυτή βασίζεται σε δύο παρατηρήσεις: α) ομόλογα της πρωτεΐνης HrpC, τα οποία εμπλέκονται στον εκκριτικό μηχανισμό τύπου II απαιτούν την παρουσία μιας παρόμοιας, μικρής, λιποπρωτεϊνικής τσαπερόνης για την ένθεσή τους στην εξωτερική μεμβράνη (29) και β) από την ομάδα II των *hrp* γονιδίων απουσιάζει μία λιποπρωτεΐνη όπως η HrpT και οι πρωτεΐνες HrcC δεν διαθέτουν την καρβοξυτελική περιοχή που φαίνεται να αλληλεπιδρά μ' αυτές τις τσαπερόνες. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες HrcC της ομάδας I των γονιδίων *hrp* διαθέτουν αυτή την περιοχή (15). Εντούτοις, η λειτουργία της πρωτεΐνης HrpT παραμένει απροσδιόριστη στα βακτήρια αυτά.

Η πρωτεΐνη HrpV φαίνεται να είναι αρνητικός ρυθμιστής των ενεργοποιητών HrpR/S και HrpL και είναι η πρώτη που έχει αναφερθεί με τέτοια δράση στο εκκριτικό μονοπάτι Hrp της *P. syringae*. Εντούτοις, για την κατανόηση του ρόλου της είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η υπερέκφρασή της περιορίζει την έκφραση του οπερονίου *hrp*, ενώ η διαγραφή της οδηγεί σε μικρή αύξηση της έκφρασής του. Μία εξήγηση γι' αυτό θα ήταν η παρουσία ενός λειτουργικά ισοδύναμου αντιγράφου του γονιδίου *hrpV* κάπου αλλού μέσα στο γένωμα. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με ότι έχει αναφερθεί για τους αρνητικούς ρυθμιστές, YscM1 και YscM2, του οπερονίου Yop στην *Yersinia enterocolitica* (80). Έχουν αναφερθεί τρεις υποθετικοί ρόλοι τους οποίους θα μπορούσε να διαδραματίζει η πρωτεΐνη HrpV, ως αρνητικός ρυθμιστής: α) η HrpV ίσως να λειτουργεί ως ανάδρομος αρνητικός ρυθμιστής εμποδίζοντας την υπερπαραγωγή της HrcC. Ο τοπολογικός εντοπισμός του γονιδίου *hrpV* στο τέλος του *hrpC* οπερονίου βασίζεται σ' αυτήν ακριβώς την υπόθεση. β) μια δεύτερη υποθετική λειτουργία της HrpV είναι να καθυστερεί την έκφραση άλλων *hrp* οπερονίων έως ότου σχηματιστεί το κανάλι των HrcC πολυμερών στην εξωτερική μεμβράνη. Το μοντέλο αυτό βασίζεται στη γενική ιδέα ότι το εκκριτικό σύστημα τύπου III έχει αναπτυχθεί μέσω της στρατολόγησης δύο διαφορετικών μετατοπιστών: ένα σύστημα

για μετατόπιση από το κυτταρόπλασμα στην εσωτερική μεμβράνη (που κωδικοποιείται από τα οπερόνια *hrpJ* και *hrpU*) και την HrcC για μετατόπιση στο εξωτερικό βακτηριακό μέσο. Η πρόωρη έκφραση των οπερονίων *hrpJ* και *hrpU* μπορεί να οδηγεί σε άγονο εντοπισμό κάποιων Hrp και Avr πρωτεϊνών στο περίπλασμα (13). Αν η HrpV καταστέλλει προνομιακά το οπερόνιο *hrpC* ή τα οπερόνια *hrpJ* και *hrpU*, αυτό θα πρέπει να καθορίζεται από παράγοντες, πρόσθετους του HrpL, οι οποίοι επηρεάζουν την έκφραση των οπερονίων αυτών και γ) μια τρίτη υποθετική λειτουργία που αποδίδεται στην πρωτεΐνη HrpV είναι η αύξηση της έκφρασης των γονιδίων *hrp* μετά από επαφή με το κύτταρο-ξενιστή, μέσω της μετακίνησής της από το βακτηριακό κύτταρο. Κάτι τέτοιο θα ήταν ανάλογο με την, εξαρτώμενη από την επαφή με τον ξενιστή, έκκριση της πρωτεΐνης LcrQ, ενός αρνητικού ρυθμιστή της έκφρασης των γονιδίων *gor* και *ysc*, στη *Yersinia spp.* (62). Η έκκριση της HrpV, αν αυτή συμβαίνει δεν φαίνεται να είναι εφικτή σε καλλιέργεια, γιατί οι μεταλλαγές που μπλοκάρουν την έκκριση των πρωτεϊνών Hrp δεν καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων *hrp*, όπως θα αναμενόταν από τη συσσώρευση ενός φυσιολογικά εκκρινόμενου αρνητικού ρυθμιστή. Το γεγονός ότι η HrpV μπορεί να εκκρίνεται στηρίζεται επιπλέον στην παρατήρηση ότι η υπερέκφρασή της έχει μια σχετικά μικρή επίδραση στην επαγωγή της HR σε φυτά καπνού (17), ενώ αντιθέτως καταργεί την έκφραση των γονιδίων *hrp* σε καλλιέργεια. Κάτι τέτοιο θα ήταν κατανοητό αν, η HrpV εκκρινόταν στο φυτό αλλά όχι σε καλλιέργεια. Ανεξάρτητα όμως από το ποια υπόθεση είναι σωστή, είναι σημαντικό ν' αναφέρουμε ότι μεταλλαγές στο γονίδιο *hrpV* επιδρούν στην παθογένεια της *P. syringae* pv. *syringae* 61 στην φασολιά (17). Τέλος, γνωρίζοντας πόσο πολύπλοκες είναι οι λειτουργίες που χαρακτηρίζουν το μονοπάτι Hrp στην έκκριση πρωτεϊνών και την παθογένεια δεν είναι απρόβλεπτη η ύπαρξη ενός τουλάχιστον αρνητικού ρυθμιστή για τον έλεγχο του συστήματος.

Για τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος τύπου III, που ελέγχθηκαν στην παρούσα μελέτη ως προς την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με άλλα πρωτεϊνικά συστατικά του ίδιου συστήματος δεν έχει προκύψει κανένα νέο στοιχείο όσον αφορά τη δομή ή τη λειτουργία τους, πέρα από τα ήδη προαναφερθέντα (εισαγωγή αυτής της εργασίας).

Η έλλειψη ικανότητας των μετασχηματισμένων κυττάρων ζύμης, στα οποία εκφάζονταν ταυτόχρονα δύο πρωτεϊνικά συστατικά του μονοπατιού Hrp, να αναπτύσσονται απουσία αδενίνης και ιστιδίνης, καθώς και η έλλειψη ενεργότητας

της β-γαλακτοσιδάσης οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι χιμαιρικές πρωτεΐνες δεν αλληλεπιδρούν. Όμως, το αρνητικό αυτό αποτέλεσμα μπορεί να αποδοθεί σε αδυναμία του συστήματος ν' ανιχνεύσει μια ενδεχόμενη αλληλεπίδραση, λόγω του ότι το σύστημα βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, που συμβαίνουν στον πυρήνα. Είναι πιθανό ότι πυρηνικές πρωτεΐνες παρεμποδίζουν την ειδική αλληλεπίδραση των δύο χιμαιρικών πρωτεϊνών. Πιθανόν επίσης, να απαιτείται και ένας τρίτος παράγοντας, ο οποίος λειτουργεί ως συνδέτης μεταξύ των πρωτεϊνών και ο οποίος απουσιάζει από τον πυρήνα.



# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- 1           **Agrios, G. N.** 1988. Plant Pathology, 4th ed. Academic Press, san  
Diego.
- 2           **Alfano, J. R. and A. Collmer.** 1997. The type III (Hrp)  
secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr  
proteins, and death. J. Bacteriol. **179**(18):5655-5662.
- 3           **Alfano, J. R., H.S. Kim, T.P. Delaney, and A. Collmer.** 1997.  
Evidence that the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrp*-linked *hrmA*  
gene encodes an Avr-like protein that acts in an *hrp*-dependent manner  
within tobacco cells. Mol. Plant Microbe Interact. **10**(5):580-588.
- 4           **Anderson, D. M., and O. Schneewind.** 1997. A mRNA signal  
for the type III secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*.  
Science. **278**:1140-1143.
- 5           **Anderson, D. M., and O. Schneewind.** 1999. *Yersinia*  
*enterocolitica* type III secretion: an mRNA signal that couples translation  
and secretion of YopQ. Mol. Microbiol. **31**:1139-1148.
- 6           **Anderson, D. M., D.E. Fouts, A. Collmer, and O. Schneewind.**  
1999. Reciprocal secretion of proteins by the bacterial type III machines  
of plant and animal pathogens suggests universal recognition of mRNA  
targeting signals. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**:12839-12843.
- 7           **Ausubel, F. M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G.**  
**Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl.** (1987). Current protocols in  
molecular biology. Publishing Associates and Wiley-Interscience, New  
York.
- 8           **Baker, B., P. Zambryski, B. Staskawicz, and S.P. Dinesh-**  
**Kumar.** 1997. Signalling in plant-microbe interactions. Science.  
**276**:726-733.
- 9           **Binet, R., S. Létoffé, J.M. Ghigo, P. Delepelaire, and**  
**C.Wandersman.** 1997. Protein secretion by Gram-negative bacterial  
ABC exporters – a review. Gene. **192**:7-11.
- 10          **Bischoff, D. S., and G.W. Ordal.** 1992. Identification and  
characterization of FliY, a novel component of the *Bacillus subtilis*  
flagellar switch complex. Mol. Microbiol. **6**:4900-4908.

- 11 **Bogdanove, A. J., S.V. Beer, U. Bonas, C.A. Boucher, A. Collmer, D.L. Coplin, G.R. Cornelis, H.C. Huang, S.W. Hutcheson, N.J. Pnopoulos, and F. VanGijsegem.** 1996. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **20**:681-683.
- 12 **Bolwell, G. P.** 1999. Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 287-294.
- 13 **Charkowski, A. O., H.C. Huang, and A. Collmer.** 1997. Altered localization of HrpZ in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* *hrp* mutants suggests that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membranes of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **179**:3866-3874.
- 14 **Cheng, L. W., D.M. Anderson, and O. Schneewind.** 1997. Two independent type III secretion mechanisms for YopE in *Yersinia enterocolitica*. *Mol. Microbiol.* **24**:757-765.
- 15 **Daeﬂer, S., I. Guilvout, K.R. Hardie, A.P. Pugsley, and M. Russel.** (1997). The C-terminal domain of the secretin PulD contains the binding site for its cognate chaperone, PulS, and confers PulS dependence on pIV<sup>fl</sup> function. *Mol. Microbiol.* **24**:465-475.
- 16 **Dangl, J. L.** 1995. Genes involved in bacterial pathogenesis of plants. In U. S. Singh, R. P. Singh, K. Kohmoto eds, *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases: Histochemical, Biochemical, Genetic and Molecular Bases, Vol 1, Prokaryotes*. Pergamon, New York, pp 293-304.
- 17 **Deng, W.-L., G. Preston, A. Collmer, C.-J. Chang, and H.-C. Huang.** (1998). Characterization of the *hrpC* and *hrpRS* operons in *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, tomato and glycinea and analysis of the ability of *hrpF*, *hrpG*, *hrcC*, *hrpT*, and *hrpV* mutants to elicit the hypersensitive response and disease in plants. *J. Bacteriol.* **180**:4523-4531.

- 18            **Dinh, T., I.T. Paulsen, and M.H. Saier.** 1994. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **176**:3825-3831.
- 19            **Dixon, R. A., M.J. Harrison, and C.J. Lamb.** 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Ann. Rev. Phytopathol.* **32**:479-501.
- 20            **Flor, H. H.** 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**:275-296.
- 21            **Galan, J. E.** 1998. Avirulence genes in animal pathogens. *Trends in Microbiol.* **6**(1):3-6.
- 22            **Galan, J.E., and A. Collmer.** (1999). Type III secretion machines: Bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science.* **284**:1322-1328.
- 23            **Ginocchio, C. C., S.B. Olmsted, C.L. Wells, and J.E. Galan.** 1994. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell.* **76**: 717-724.
- 24            **Goodman, R. N., and A. Novacky.** 1994. *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogen. A Resistance Phenomenon.* American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- 25            **Gopalan, S., D.W. Bauer, J.R. Alfano, A.O. Loniello, S.H. He, and A. Collmer.** (1996). Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plant cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. *Plant Cell.* **8**:1095-1105.
- 26            **Greenberg, J. T., A. Guo, D.F. Klessig, and F.M. Ausubel.** 1994. Programmed cell death in plants: a pathogen triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell.* **77**: 551-563.

- 27           **Grimm, C., and N.J. Panopoulos.** 1989. The predicted protein product of a pathogenicity locus from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola is homologous to a highly conserved domain of several prokaryotic regulatory proteins. *J. Bacteriol.* **171**:5031-5038.
- 28           **Grimm, C., W. Aufsatz, and N.J. Panopoulos.** 1995. The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola constitutes a complex regulatory unit. *Mol. Microbiol.* **15**:155-165.
- 29           **Hardie, K. R., S. Lory, and A.P. Pugsley.** (1996). Insertion of an outer membrane protein in *Escherichia coli* requires a chaperone-like protein. *EMBO J.* **15**:978-988.
- 30           **He, S. Y.** 1997. Hrp-controlled interkingdom protein transport: learning from flagellar assembly? *Trends Microbiol.* **5**:489-495.
- 31           **Hirano, S. S., and C.D. Upper.** 1990. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**: 155-177.
- 32           **Huang, H. C., S.W. Hutcheson, and A. Collmer.** 1991. Characterization of the *hrp* cluster from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 and *TnphoA* tagging of exported or membrane-spanning Hrp proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**:469-476.
- 33           **Huang, H.-C., R-H. Lin, C-J. Chang, A. Collmer, and W-L. Deng.** 1995. The complete *hrp* gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of genes required for Harpin<sub>pss</sub> secretion that are arranged collinearly with *Yersinia ysc* homologs. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**(5):733-746.
- 34           **Huang, H.-C., S.Y. He, D.W. Bauer, and A. Collmer.** 1992. The *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *HrpH* product, an envelope protein required for elicitation of the hypersensitive response in plants. *J. Bacteriol.* **174**:6878-6885.
- 35           **Huang, H.-C., Y. Xiao, R-H. Lin, Y. Lu, S.W. Hutcheson, and A. Collmer.** (1993). Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrpJ* and *hrpI* genes: Homology of HrpI to a superfamily of proteins associated with protein translocation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**(4):515-520.

- 36           **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Molec. Biol.Rev.* **62**:379-433.
- 37           **Innes, R. W., A.F. Bent, B.N. Kunkel, S.R. Bisgrove, and B.J. Staskawicz.** 1993. Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *J. Bacteriol.* **175**:4859-4869.
- 38           **Innis, M. A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White.** (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* Academic Press.
- 39           **James, P., J. Halladay, and E.A. Craig.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.* **144**:1425-1436.
- 40           **Jenner, C., E. Hitchin, J. Mansfield, K. Walters, P. Betteridge, and J. Taylor.** (1991). Gene-for-gene interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Phaseolus*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**:553-562.
- 41           **Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, D. Gerhold, M. Stayton, H. Shen, S. Gold, J. Lorang, H. Thordal-Christensen, D. Dahlbeck, and B. Staskawicz.** 1990. Bacteria expressing avirulence gene D produce a specific elicitor of the soybean hypersensitive reaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* **3**:112-121.
- 42           **Kim, J. F., Z.-M. Wei, and S.V. Beer.** (1997). The *hrpA* and *hrpC* operons of *Erwinia amylovora* encode components of a type III pathway that secretes harpin. *J. Bacteriol.* **179**:1690-1697.
- 43           **Klauser, T., J. Pohlner, and T.F. Meyer.** 1993. The secretion pathway of IgA protease-type proteins in Gram-negative bacteria. *Bioassays.* **15**:799-805.
- 44           **Klement, Z., and R.N. Goodman.** 1967. The role of the living bacterial cell and induction time in the hypersensitive reaction of the tobacco plant. *Phytopathology* **57**:322-323.

- 45           **Klement, Z., G.L. Farkas, and L. Lovrekovich.** 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* **54**:474-477.
- 46           **Knutton, S., I. Rosenshine, M.J. Pallen, I. Nisan, B.C. Neves, C. Bain, and C. Wolff.** 1998. A novel EspA-associated surface organelle of enterobacteric *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J.* **17**:2166-2176.
- 47           **Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, and J.E. Galán.** 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science.* **280**:602-605.
- 48           **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- 49           **Leach, J. E., and F.F. White.** 1996. Bacterial avirulence genes. *Ann. Rev. Phytopathol.* **34**:153-179.
- 50           **Lee, C. A.** 1997. Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eukaryotic cells? *Trends Microbiol.* **5**:148-156.
- 51           **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. U.S.A.* **93**:15497-15502.
- 52           **Lidell, M. C., and S.W. Hutcheson.** 1994. Characterization of the *hrpJ* and *hrpU* operons of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61: similarity with components of enteric bacteria involved in the flagellar biogenesis and demonstration of their role in Harpin<sub>pss</sub> secretion. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**(4):488-497.
- 53           **Lindgren, P. B., N.J. Panopoulos, B.J. Staskawicz, and D. Dahlbeck.** 1988. Genes required for pathogenicity and hypersensitivity are conserved and interchangeable among pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Gen. Genet.* **21**:499-506.

- 54            **Lindgren, P. B., R.C. Peet, and N.J. Panopoulos.** 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J. Bacteriol.* **168**(2):512-522.
- 55            **Lonetto, M. A., K.L. Brown, K.E. Rudd, and M.J. Buttner.** 1994. Analysis of the *Streptomyces coelicolor sig E* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:7573-7577.
- 56            **Macnab, R. M.** 1996. Flagella and motility. In *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology, 2nd edn. Edited by Neidhardt FC. Washington DC: ASM Press, pp.123-145.
- 57            **Maia, I. G., and F. Bernardi.** (1996). Nucleic acid-binding properties of a bacterially expressed potato virus Y helper component-proteinase. *J. Gen. Virol.* **70**(3):513-524.
- 58            **Mansfield, J., C. Jenner, R. Hockenhull, M.A. Bennett, and R. Stewart.** (1994). Characterization of *avrPphE*, a gene for cultivar-specific avirulence from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* which is physically linked to *hrpY*, a new *hrp* gene identified in the halo-blight bacterium. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**:726-739.
- 59            **Martin G. B., S. Brommonschenkel, J. Chunwongse, A. Frary, M.W. Ganal, et al.** 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science.* **262**:1432-1436.
- 60            **Ménard, R., P. Sansonetti, and C. Parsot.** 1994. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J.* **13**:5293-5302.
- 61            **Nimchuk, Z., E. Marois, S. Kjemtrup, R.T. Leister, F. Katagiri, and J.L. Dangl.** (2000). Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell.* **101**:353-363.



- 62            **Petterson, J., R. Nordfelth, E. Dubinina, T. Bergman, M. Gustafsson, K.E. Magnusson, and H. Wolf-Watz.** 1996. Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science*. **273**:1231-1233.
- 63            **Pirhonen, M. U., M.C. Lidell, D.L. Rowley, S.W. Lee, S. Jin, Y. Liang, S. Silverstone, N.T. Keen, and S.W. Hutchenson.** 1996. Phenotypic expression of *Pseudomonas syringae avr* genes in *E.coli* is linked to the activities of the hrp-encoded secretion system. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**(4):252-260.
- 64            **Pontier, D., L. Godiard, Y. Marco, and D. Roby.** (1994). *hsr203J*, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. *Plant J.* **5**:507-521.
- 65            **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 – a review. *Gene*. **192**:13-19.
- 66            **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.
- 67            **Rahme, L. G., M.N. Mindrinos, and N.J. Panopoulos.** (1991). Genetic and transcriptional organization of the *hrp* cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* **173**:575-583.
- 68            **Rahme, L. G., M.N. Mindrinos, and N.J. Panopoulos.** 1992. Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* **174**:3499-3507.
- 69            **Richael, C., and D. Gilchrist.** 1999. The hypersensitive response: a case of hold or fold? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**(1):5-12.

- 70            **Roebuck, P., R. Sexton, J.W. Mansfield.** 1978. Ultrastructural observations on the development of the hypersensitive reactions in leaves of *Phaseolus vulgaris* cv. Red Mexican inoculated with *Pseudomonas phaseolicola* (race 1). *Physiol. Plant Pathol.* **12**:151-157.
- 71            **Roine, E., W. Wei, J. Yuan, E-L. Nurmiäho-Lassila, N. Kalkkinen, M. Romatschuk, and S.Y. He.** 1997. Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:3459-3464.
- 72            **Rosqvist, R., K.E. Magnusson, and H. Wolf-Watz.** 1994. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE into mammalian cells. *EMBO J.* **13**(4):964-972.
- 73            **Russel, M.** 1998. Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type III protein secretion systems. *J. Mol. Biol.* **279**:485-499.
- 74            **Ryals, J., S. Uknes, and E. Ward.** 1994. Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol.* **104**:1109-1112.
- 75            **Salmond, G. P., and P.J. Reeves.** 1993. Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Biochem. Sci.* **18**:7-12.
- 76            **Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** (1989). *Molecular cloning. A Laboratory manual*, Second ed. Cold Spring Harbor.
- 77            **Scofield, S. R., C.M. Tobias, J.P. Rathjen, J.H. Chang, D.T. Iavelle, R.W. Michelmore, et al.** (1996). Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science.* **274**:2063-2065.
- 78            **Sory, M-P., A. Boland, I. Lambermount, and G. Cornelis.** 1995. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**:11998-12002.
- 79            **Stall, R. E., and A.A. Cook.** 1979. Evidence that bacterial contact with the plant cell is necessary for the hypersensitive reaction but not the susceptible reaction. *Physiol. Plant Pathol.* **14**:77-84.

- 80                    **Stanier, J., M. Iriarte, and G.R. Cornelis.** (1997). YscM1 and YscM2, two *Yersinia enterocolitica* proteins causing downregulation of *yop* transcription. *Mol. Microbiol.* **26**:833-843.
- 81                    **Staskawicz, B. J., F.M. Ausubel, B.J. Baker, J.G. Ellis, and J.D.G. Jones.** 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**:661-667.
- 82                    **Stathopoulos, C., D.R. Hendrixson, D.G. Thanassi, S.J. Hultgren, J.W. St. Geme III, and R. Curtiss III.** 2000. Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in Gram-negative pathogens: an evolving story. *Microbes Infect.* in press.
- 83                    **Stevens, C., M.A. Bennett, E. Athanassopoulos, G. Tsiamis, J.D. Taylor, and J.W. Mansfield.** (1998). Sequence variations in alleles of the avirulence gene *avrPphE.R2* from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* lead to loss of recognition of the AvrPphE protein within bean cells and a gain in cultivar-specific virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**:637-640.
- 84                    **Tang, X., R.D. Frederick, J. Zhou, D.A. Kalterman, Y. Jia, and G.B. Martin.** (1996). Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science.* **274**:2060-2063.
- 85                    **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.
- 86                    **Tsiamis, G., J.W. Mansfield, R. Hockenhull, R.W. Jackson, A. Sesma, E. Athanassopoulos, M.A. Bennett, C. Stevens, A. Vivian, J.D. Taylor, and J. Murillo.** (2000). Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. (submitted).
- 87                    **Turner, J. G., and A. Novacky** 1974. The quantitative relation between plant and bacterial cells involved in the hypersensitive reaction. *Phytopathology* **64**:885-890.
- 88                    **Van der Ackercken, G., E. Marois, and U. Bonas.** (1996). Recognition of the bacterial avirulence protein *avrBs3* occurs inside the host plant cell. *Cell.* **87**:1307-1316.

- 89            **Wandersman, C., and P. Delepelaire.** 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**:4776-4780.
- 90            **Wang, H., J. Li, R.M. Bostock, and D.G. Gilchrist.** 1996. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. Plant cell. **8**:375-391.
- 91            **Wattiau, P., and G.R. Cornelis.**1993. SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in the secretion of YopE. Mol. Microbiol. **8**:123-131.
- 92            **Wattiau, P., B. Bernier, P. Deslée, T. Michiels, and G.R. Cornelis.** 1994. Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**:10493-10497.
- 93            **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.
- 94            **Wengelnik, K., C. Marie, M. Russel, and U. Bonas.** (1996). Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive response. J. Bacteriol. **178**:1061-1069.
- 95            **Winans, S. C., D.L. Burns, and P.J. Christie.** 1996. Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. Trends Microbiol. **4**:64-68.
- 96            **Xiao, Y., and S.W. Hutcheson.** 1994. A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs expression of pathogenicity and host range determinants in *Pseudomonas syringae*. J. Bacteriol. **176**:3089-3091.
- 97            **Xiao, Y., S. Heu, J. Yi, Y. Lu, and S.W. Hutcheson.** 1994. Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. J. Bacteriol. **176**:1025-1036.

- 98            **Xiao, Y., Y. Lu, S. Heu, and S.W. Hutcheson.** 1992. Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp* cluster. *J. Bacteriol.* **174**:1734-1741.
- 99            **Young, G. M., D.H. Schmiel, and V.L. Miller.** 1999. A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **96**:6456-6461.
- 100           **Young, J. M., D.W. Dye, J.F. Brandburg, C.G. Panagopoulos, and C.F. Robbs.** 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *N.Z.J. Agri. Res.* **21**:153-177.
- 101           **Zhou, J., Y.T. Loh, R.A. Bressan, and G.B. Martin.** 1995. The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by *Pto* and is involved in the hypersensitive response. *Cell.* **83**:925-935.