



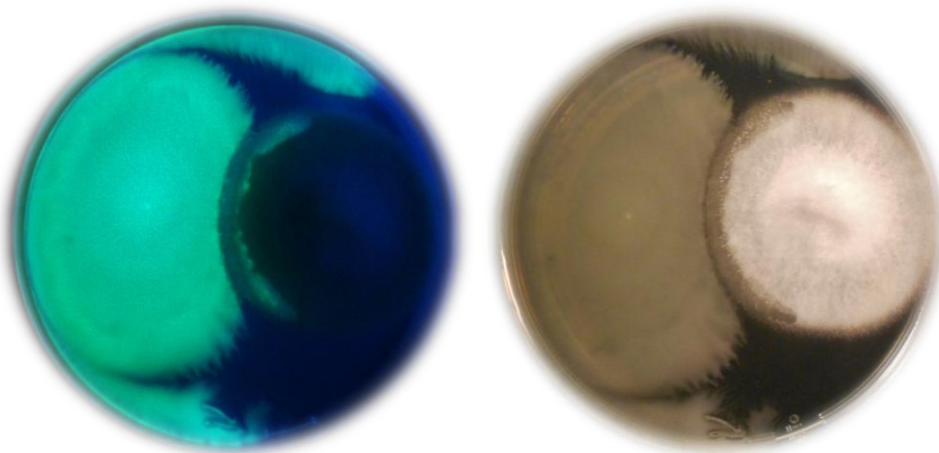
ΤΜΗΜΑ: Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας

Π.Μ.Σ: Αγρο-βιοτεχνολογία Φυτών και Μικροοργανισμών Γεωργικής Σημασίας

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μοριακή ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός
γονιδίων που κωδικοποιούν λιποπεπτίδια και
άλλα γονίδια, τα οποία εμπλέκονται στο
βιολογικό έλεγχο και στην ομαδική κίνηση του
στελέχους *Pseudomonas fluorescens* X**



ΠΩΛΙΝΑ Χ. ΤΣΑΛΓΑΤΙΔΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΚΑΤΙΝΑΚΗΣ

ΑΘΗΝΑ, 2016

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μοριακή ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός γονιδίων που κωδικοποιούν λιποπεπτίδια και άλλα γονίδια, τα οποία εμπλέκονται στο βιολογικό έλεγχο και στην ομαδική κίνηση του στελέχους *Pseudomonas fluorescens* X

ΠΩΛΙΝΑ Χ. ΤΣΑΛΓΑΤΙΔΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΚΑΤΙΝΑΚΗΣ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Καθηγητής κος **Κατινάκης Παναγιώτης** - Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής,
Εργαστήριο Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας

Αναπληρωτής Καθηγητής κος **Γεωργακόπουλος Δημήτριος** - Τμήμα Επιστήμης
Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα **Αντωνίου Πολύμνια** - Τμήμα Επιστήμης Φυτικής
Παραγωγής, Εργαστήριο Φυτοπαθολογίας

Περίληψη

Το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* X, αποτελεί ένα πολύ καλό ανταγωνιστικό στέλεχος εναντίον πολλών παθογόνων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των φυτοπαθογόνων μυκήτων, *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* και *Botrytis cinerea*. Τόσο το βακτηριακό στέλεχος *Ps. fluorescens* X όσο και τα μεταλλαγμένα βακτηριακά στελέχη του *Pseudomonas fluorescens* p93 και δ40, έχουν την ικανότητα να αναχαιτίζουν την ανάπτυξη αυτών των μικροοργανισμών με την άμεση καταστροφή των μυκηλιακών υφών των μυκήτων, εμφανίζοντας πολύ έντονη ομαδική κινητικότητα και την έκκριση του επιφανειοδραστικού κυκλικού λιποπεπτιδίου με αντιβιοτική δράση, massetolide A. Η έκκριση των βακτηριακών πρωτεϊνών- τελεστών στον εξωκυττάριο χώρο, αποτελεί βασικό βήμα στην παθογένεια και τη βακτηριακή μολυσματικότητα. Το πιο πρόσφατα μελετώμενο εκκριτικό σύστημα είναι το T6SS (τύπου VI εκκριτικό σύστημα), που μπορεί να μεταφέρει τους μολυσματικούς παράγοντες τόσο στο εξωκυττάριο μέσο, είτε απευθείας στο κύτταρο στόχο. Με τη μοριακή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, ταυτοποιήθηκε πλήρως η νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων των μη ριβοσωμικών πεπτιδικών συνθετασών (NRPS), που εμπλέκονται στην παραγωγή του αντιβιοτικού massetolide A, ενώ ανιχνεύτηκε και το σύμπλεγμα των γονιδίων που κωδικοποιούν για το τύπου VI εκκριτικό σύστημα.

Επιστημονική Περιοχή: Περιβαλλοντική Μικροβιολογία

Λέξεις Κλειδιά: Βιολογικός έλεγχος, Pseudomonas fluorescens, εκκριτικό σύστημα τύπου VI (T6SS), κυκλικό λιποπεπτίδιο

Abstract

Molecular identification and characterization of genes encoding for lipopeptides and other genes which are involved in biological control and swarming motility of *Pseudomonas fluorescens* strain X

The bacteria *Pseudomonas fluorescens* X, is a competitive bacterial strain against several pathogenic microorganisms, including the phytopathogenic fungi *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea*. The bacterial strain *Ps. fluorescens* X and its mutant strains *Pseudomonas fluorescens* p93 και δ40 have the ability to inhibit the growth of these microorganisms by direct destruction of filamentous hyphae of the fungi, displaying a great swarming motility and secreting the cyclic lipopeptide surfactant with antibiotic activity, massetolide A. The secretion of the bacterial protein- effectors into the extracellular space plays an important role in bacterial pathogenesis and virulence. The most recently studied secretion system is the T6SS (type VI secretion system), which can transfer the infectious agents into the extracellular medium, either directly into the target cell. With the molecular analysis, the nucleotide sequence of Non- Ribosomal Peptide Synthetases (NRPS), which are involved in production of the massetolide A antibiotic, was fully identified, whereas at the same time the gene complex encoding for the type VI secretion system was also detected.

Scientific area: Environmental Microbiology

Keywords: Biological control, Pseudomonas fluorescens, type six secretion system (T6SS), cyclic lipopeptide

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, του τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Αγροβιοτεχνολογία φυτών και Μικροοργανισμών Γεωργικής Σημασίας».

Θα ήθελα επομένως να εκφράσω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου στον επιβλέπων καθηγητή μου, κ. Παναγιώτη Κατινάκη, που με δέχτηκε στο εργαστήριο του, μου μετέδωσε απλόχερα τις γνώσεις του και με βοήθησε να εναρμονιστώ στο χώρο και στο σύνολο του εργαστηρίου, με τον καλύτερο δυνατό τρόπο. Ευχαριστώ για όλες τις συμβουλές, τις συζητήσεις αλλά και την καθοδήγηση, που μου δόθηκαν από μέρος του, τα τρία τελευταία χρόνια που βρίσκομαι στο εργαστήριο, προκειμένου να ολοκληρωθεί επιτυχώς τόσο η πτυχιακή μου μελέτη αλλά και η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή. Η βοήθειά του ήταν καταλυτική για την ωρίμανση μου ως φοιτήτρια, ως επιστήμονας και ως άνθρωπος, με τις συμβουλές του να μην περιορίζονται σε επιστημονικό επίπεδο .

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Αναστασία Βενιεράκη, μέλος του Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού του εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, για την βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης της πειραματικής μου μελέτης, καθώς και για την συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Χωρίς την άμεση και συνεχή προσφορά των γνώσεων, του χρόνου και της καλής διάθεσής της, δεν θα ήταν δυνατή η επιτυχή ολοκλήρωση της πειραματικής μου μελέτης.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την αρμονική συνύπαρξη και συνεργασία εντός του χώρου του εργαστηρίου, καθώς και την απλόχερη βοήθειά τους όποτε την είχα ανάγκη.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες του στον κ. Δημήτριο Γεωργακόπουλο τόσο για την προσφορά των βακτηριακών στελεχών με τα οποία ασχολήθηκα στην πτυχιακή αλλά και μεταπτυχιακή μου μελέτη καθώς και την κ. Πολύμνια Αντωνίου, για το χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής, ως μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	8
Abstract	9
1. Εισαγωγή.....	10
1.1 Βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i>	10
1.2 Φθορίζοντα βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i>	11
1.3 Βακτήρια και φυτά.....	11
1.3.1 Ο ρόλος των βακτηρίων στη βιολογική καταπολέμηση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών	12
1.3.2 Επίδραση των βακτηρίων του γένους <i>Pseudomonas</i> έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων	13
1.3.3 Σημαντικότερες ομάδες αντιβιοτικών που παράγονται από ανταγωνιστικά βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i>	14
1.3.3.1 Λιποπεπτίδια (LPs)	15
1.3.3.2 2,4-διακετυλφλορογλουκινόλη (DAPG)	16
1.3.3.3 Φεναζίνες.....	17
1.3.4 Παραγωγή λυτικών ενζύμων από ανταγωνιστικά βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i>	18
1.3.5 Παραγωγή άλλων παραπροϊόντων από ανταγωνιστικά βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i>	18
1.3.6 Ανταγωνισμός για θρεπτικά και κατάληψη των διαθέσιμων θέσεων αποικισμού στο ριζικό σύστημα των φυτών – Παραγωγή σιδηροφόρων	19
1.4 Η κινητικότητα των βακτηρίων- Κατηγορίες επιφανειακής κινητικότητας.....	20
1.4.1 Η δομή του βακτηριακού μαστιγίου	21
1.4.2 Παραγωγή αντιμικροβιακών επιφανειοδραστικών ουσιών βακτηρίων του γένους <i>Pseudomonas</i>	24
1.4.2.1 Γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή αντιμικροβιακών επιφανειοδραστικών ενώσεων από βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i>	25
1.4.2.2 Μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθέσεις (NRPS)	27
1.5 Εκκριτικά Συστήματα	32
1.5.1 Sec και Tat εκκριτικοί μηχανισμοί	34
1.5.1.1 Sec μονοπάτι	36
1.5.1.1.1 Το SecB μονοπάτι	37

1.5.1.1.2 Το SRP μονοπάτι	38
1.5.1.2 Tat μονοπάτι	39
1.5.2 Τύπου I εκκριτικό σύστημα	41
1.5.3 Τύπου II εκκριτικό σύστημα	43
1.5.4 Τύπου III εκκριτικό σύστημα	44
1.5.5 Τύπου IV εκκριτικό σύστημα	46
1.5.6 Τύπου V εκκριτικό σύστημα	48
1.5.7 Τύπου VI εκκριτικό σύστημα	51
1.5.7.1 Η αρχιτεκτονική του T6SS	52
1.5.7.2 Επιδρώσες πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το T6SS	56
1.6 Σκοπός πτυχιακής μελέτης	58
2. Υλικά και μέθοδοι	59
2.1 Βιολογικό υλικό	59
2.2 Απομόνωση του γονιδιώματος του βακτηρίου <i>Pseudomonas fluorescens</i> X	60
2.2.1 Illumina dye sequencing	61
2.2 Βιοπληροφορική μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση των γονιδίων που εμπλέκονται στην ανταγωνιστικότητα του βακτηριακού στελέχους <i>Pseudomonas fluorescens</i> X	62
2.4 Μοριακές τεχνικές που εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση των γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή του αντιβιοτικού massetolide A του βακτηριακού στελέχους <i>Pseudomonas fluorescens</i> X	64
2.4.1 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)	64
2.4.2 Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	66
2.4.3 Ανάκτηση κλάσματος δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων από πήκτωμα αγαρόζης	68
2.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA με φασματοσκοπική ανάλυση	69
2.4.5 Υποκλωνοποίηση των τμημάτων DNA σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα	69
2.4.6 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων <i>Escherichia coli</i>	71

2.4.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα <i>Escherichia coli</i> μέσω της διαδικασίας του βρασμού	73
2.4.8 Πέψη πλασμιδιακού DNA με τη χρήση ενζύμων περιορισμού	74
2.4.9 Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA	75
2.4.10 Αλληλούχιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (Sequencing)	76
2.5 Ομαδική κινητικότητα των βακτηριακών στελεχών X, P93 και δ40 σε στερεό θρεπτικό μέσο NA, 0,3% (w/v), 0,5% (w/v) και 1,5% (w/v) περιεκτικότητας σε άγαρ	76
2.6 Ομαδική κινητικότητα των βακτηριακών στελεχών <i>Pseudomonas fluorescens</i> X, XGFP, p93 και δ40 εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων	78
2.6.1 Η συμβολή της μολυσματικότητας των βακτηριακών στελεχών <i>Pseudomonas fluorescens</i> X, p93 και δ40 εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων	78
2.7 Ομαδική κινητικότητα του βακτηριακού στελέχους <i>Pseudomonas fluorescens</i> XGFP εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> και εναντίον του <i>Pseudomonas sp.</i> P3	79
3. Αποτελέσματα	80
3.1 Γονιδιακή κατασκευή του massetolide A	80
3.2 Γονιδιακή κατασκευή του T6SS	82
3.2.1 Επιδρώσα πρωτεΐνη που παράγεται από το T6SS	84
3.3 Ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα των βακτηριακών στελεχών X, p93 και δ40 σε στερεό θρεπτικό μέσο NA 0,3% (w/v), 0,5% (w/v) και 1,5% (w/v) περιεκτικότητας σε άγαρ	85
3.4 Μελέτη της ανταγωνιστικότητας των βακτηριακών στελεχών <i>Pseudomonas fluorescens</i> X και XGFP εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων	87
3.5 Μελέτη της ανταγωνιστικότητας των βακτηριακών στελεχών <i>Pseudomonas fluorescens</i> X, p93 και δ40 εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων	88
3.5.1 <i>Botrytis cinerea</i> και <i>Pseudomonas fluorescens</i> X	89
3.5.2 <i>Botrytis cinerea</i> και <i>Pseudomonas fluorescens</i> p93	91
3.5.3 <i>Botrytis cinerea</i> και <i>Pseudomonas fluorescens</i> δ40	93
3.5.4 <i>Fusarium oxysporum</i> και <i>Pseudomonas fluorescens</i> X	95
3.5.5 <i>Fusarium oxysporum</i> και <i>Pseudomonas fluorescens</i> p93	97
3.5.6 <i>Fusarium oxysporum</i> και <i>Pseudomonas fluorescens</i> δ40	99
3.5.7 <i>Phytophthora infestans</i> και <i>Pseudomonas fluorescens</i> X	101
3.5.8 <i>Phytophthora infestans</i> και <i>Pseudomonas fluorescens</i> p93	103

3.5.9 <i>Phytophthora infestans</i> και <i>Pseudomonas fluorescens</i> δ40	105
3.5.10 <i>Rhizoctonia solani</i> και <i>Pseudomonas fluorescens</i> X	107
3.5.11 <i>Rhizoctonia solani</i> και <i>Pseudomonas fluorescens</i> p93	109
3.5.12 <i>Rhizoctonia solani</i> και <i>Pseudomonas fluorescens</i> δ40	111
3.6 Επίδραση της ανταγωνιστικότητας του βακτηριακού στελέχους <i>Pseudomonas fluorescens</i> XGFP εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> και εναντίον του βακτηριακού στελέχους <i>Pseudomonas</i> sp. P3.....	113
4. Συζήτηση	115
5. Βιβλιογραφία	120

1. Εισαγωγή

1.1 Βακτήρια του γένους *Pseudomonas*

Το γένος *Pseudomonas*, ανήκει στην γ-υποκατηγορία των Πρωτεοβακτηρίων, στην οικογένεια *Pseudomonaceae*, περιλαμβάνοντας περισσότερα από 190 είδη (Gardan *et.al.*, 2002). Είναι μια κατηγορία βακτηρίων που έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται σε μια ευρεία ποικιλία οικοτόπων, όπως είναι τα επιφανειακά ύδατα, οι υδροφόροι ορίζοντες, το θαλασσινό νερό, το έδαφος, καθώς και κάθε είδος βλάστησης (Harrigan, 1998). Επιπλέον, έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα χαμηλής θρεπτικής αξίας, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να αποτελέσουν επικίνδυνα παθογόνα βακτήρια, εξαιτίας της αντοχής τους έναντι ποικίλων φυσικών και χημικών ενώσεων. Ωστόσο, πολύ όξινα περιβάλλοντα, με pH κάτω από 5,5, καθώς και περιβάλλοντα με πολύ υψηλές θερμοκρασίες, δεν ευνοούν την ανάπτυξή τους, με μικρές όμως εξαιρέσεις (Harrigan, 1998).

Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* είναι αερόβια, ραβδοειδούς σχήματος, Gram- αρνητικά βακτήρια, τα οποία κινούνται μέσω ενός ή περισσότερων πολικών μαστιγίων (Harrigan, 1998). Υπό ορισμένες συνθήκες ανάπτυξης, καθώς και σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, μπορεί να επάγεται νηματοποίηση των κυττάρων σε στελέχη των βακτηρίων *Pseudomonas putida* και *Pseudomonas fluorescens*. Έχουν πλήρη αερόβιο μεταβολισμό, δεν παρουσιάζουν οξεαντοχή, ενώ δεν έχουν την ικανότητα σχηματισμού σπορίων ή κύστεων. Το ποσοστό του DNA τους σε γουανίνη-κυτοσίνη (GC) κυμαίνεται μεταξύ 57 και 70%, κάνοντάς το ιδιαίτερα σταθερό σε συνθήκες με έντονες θερμοκρασιακές αυξομειώσεις (Harrigan, 1998).

Οι Ψευδομονάδες αποτελούν μια πολύ πλούσια πηγή πλασμιδίων, τα οποία φέρουν γονίδια, υπεύθυνα για την πραγματοποίηση μιας ευρείας ποικιλίας λειτουργιών, απαραίτητα για την επιβίωσή τους, όπως αντοχή σε αντιβιοτικά και διάφορους αντιβακτηριακούς παράγοντες, καθώς και αντοχή σε βακτηριοφάγους και βακτηριοσίνες (Harrigan, 1998). Ταυτόχρονα, έχουν πλασμίδια που φέρουν γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα, υπεύθυνα για την αποικοδόμηση μονοπατιών συγκεκριμένων αρωματικών ενώσεων, είτε των αλογωμένων παραγώγων τους (Harrigan, 1998).

1.2 Φθορίζοντα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*

Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δύο πολύ σημαντικές κατηγορίες, σε φθορίζοντα και μη φθορίζοντα (Harrigan, 1998). Τα φθορίζοντα *Pseudomonas*, έχουν την ικανότητα να παράγουν ειδικές, υδροδιαλυτές, χρωστικές ουσίες, που έχουν την δυνατότητα να διαχέονται ελεύθερα στο μέσο ανάπτυξης και να φθορίζουν έντονα, υπό την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (Harrigan, 1998). Η παραγωγή αυτών των χρωστικών είναι μια ιδιότητα μεταξύ άλλων, των *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichorii* και του *P. flavescens* (Harrigan, 1998). Σήμερα γνωρίζουμε ότι αυτές οι χρωστικές είναι χρωμοπεπτίδια, που αποτελούνται από τρία βασικά μέρη, ένα χρωμοφόρο κυνολινικής φύσης, μια πεπτιδική αλυσίδα και μια πλευρική αλυσίδα, ποικίλων συνδυασμών (Harrigan, 1998). Δεδομένου ότι υπάρχουν διαφορετικά χρωμοφόρα, πεπτίδια και πλευρικές αλυσίδες, ο δυνατός αριθμός χρωστικών που μπορούν να παραχθούν είναι αρκετά μεγάλος (Harrigan, 1998). Μια μεγάλη ποικιλία περιβαλλοντικών παραγόντων μπορεί να επηρεάσει τη σύνθεση αυτών των χρωστικών ουσιών, κυρίως η χημική φύση του οργανικού άνθρακα, η πηγή ενέργειας, το επίπεδο αερισμού, το μέσο καλλιέργειας, το pH, ο φωτισμός, καθώς και τα κατιόντα Mg^{2+} , Zn^{2+} και F^{3+} (Meyer και Abdallah, 1978).

1.3 Βακτήρια και φυτά

Η μεταβολική δραστηριότητα των βακτηρίων του εδάφους συμβάλλει σημαντικά στη βελτίωση της γονιμότητάς του και στην ικανότητά του να στηρίζει την ορθή ανάπτυξη των φυτών (Harrigan, 1998). Με τη σειρά τους, τα φυτικά υπολείμματα και τα εκκρίματα της ρίζας, είναι η πιο σημαντική πηγή άνθρακα και ενέργειας για την επιβίωση των ετερότροφων μικροβιακών πληθυσμών του εδάφους (Harrigan, 1998). Ταυτόχρονα, οι φυτικές επιφάνειες όσο και οι εσωτερικοί χώροι των φυτών, αποτελούν σημαντικούς οικότοπους για τους μικροοργανισμούς, ενώ τα θρεπτικά συστατικά που διαρρέουν από τα εναέρια μέρη των φυτών, υποστηρίζουν σημαντικά τη μικροβιακή ανάπτυξη στην επιφάνεια τους (Harrigan, 1998). Υπάρχουν ωστόσο και ορισμένοι μικροοργανισμοί που έχουν την δυνατότητα να αναπτύσσονται και να επιβιώνουν, μόνο σε σχέση με τα φυτά (Harrigan, 1998).

Η σχέση ενός φυτικού οργανισμού με ένα βακτήριο μπορεί να είναι είτε επωφέλης, είτε επιζήμια (Vidaver και Lambrecht, 2004). Όλες οι επιφάνειες των φυτών έχουν πάνω τους μικρόβια, που ονομάζονται επιφυτικά, καθώς και ορισμένα μικρόβια που ζουν μέσα στα φυτά και ονομάζονται ενδοφυτικά (Vidaver και Lambrecht, 2004). Τα βακτήρια είναι από εκείνους τους μικροοργανισμούς που μπορούν να εποικίσουν επιτυχώς το φυτό και να αναπτυχθούν εντός του (Vidaver και Lambrecht, 2004). Παρ' όλο που το βακτηριακό κύτταρο δεν μπορεί να είναι ορατό χωρίς τη χρήση μικροσκοπίου, επί του φυτού μεγάλοι πληθυσμοί βακτηρίων γίνονται αντιληπτοί ως συσσωματώματα σε μορφή υγρού (βακτηριακή εξίδρωση), ως βιοφίλμ, είτε ως παχύρευστα ελαιώδη υγρά (Vidaver και Lambrecht, 2004).

1.3.1 Ο ρόλος των βακτηρίων στην Βιολογική Καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών

Τα περισσότερα βακτήρια που συνδέονται με την εξωτερική επιφάνεια των φυτών είναι και μη παθογόνα βακτήρια (Bahme και Schroth, 1987). Ωστόσο η σύνδεση των βακτηρίων με τα φυτά συνεχίζεται και την περιοχή της ριζόσφαιρας. Τα εδάφη είναι πολύ πλούσια σε βακτηριακό πληθυσμό, σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο περιβάλλον, το οποίο εξηγείται από το ευρύ φάσμα των περιβαλλοντικών μεταβολών, στις βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες που τα χαρακτηρίζουν (Raaijmakers και Mazzola, 2012). Προκειμένου να επιβιώσουν, τα βακτήρια ανέπτυξαν ένα ευρύ φάσμα μηχανισμών για την αντιμετώπιση κάθε ανταγωνιστή ή θηρευτή συμπεριλαμβανομένων φυτοπαθογόνων βακτηρίων, ιών και μυκήτων, ενεργώντας δυνητικά ως παράγοντες βιολογικής καταπολέμησης (Bahme και Schroth, 1987; Raaijmakers και Mazzola, 2012).

Ως **βιολογική καταπολέμηση** μπορεί να ορισθεί η χρήση ενός οργανισμού, για να καταστείλει την ανάπτυξη ενός άλλου, που ενεργεί ως αγρονομικά επιβλαβής οργανισμός ή παράσιτο, είτε ως περιβαλλοντικά ζημιογόνος (Bahme και Schroth, 1987). Η καταστολή της δράσης των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις τύπους ανταγωνισμού, τον άμεσο, τον μικτού τύπου και τον έμμεσο ανταγωνισμό (Pal και Gardener, 2006). Ο άμεσος ανταγωνισμός, επιτυγχάνεται με τον μηχανισμό του υπερπαρασιτισμού, όπου ο παθογόνος μικροοργανισμός δέχεται άμεση επίθεση από τον εξειδικευμένο, για την

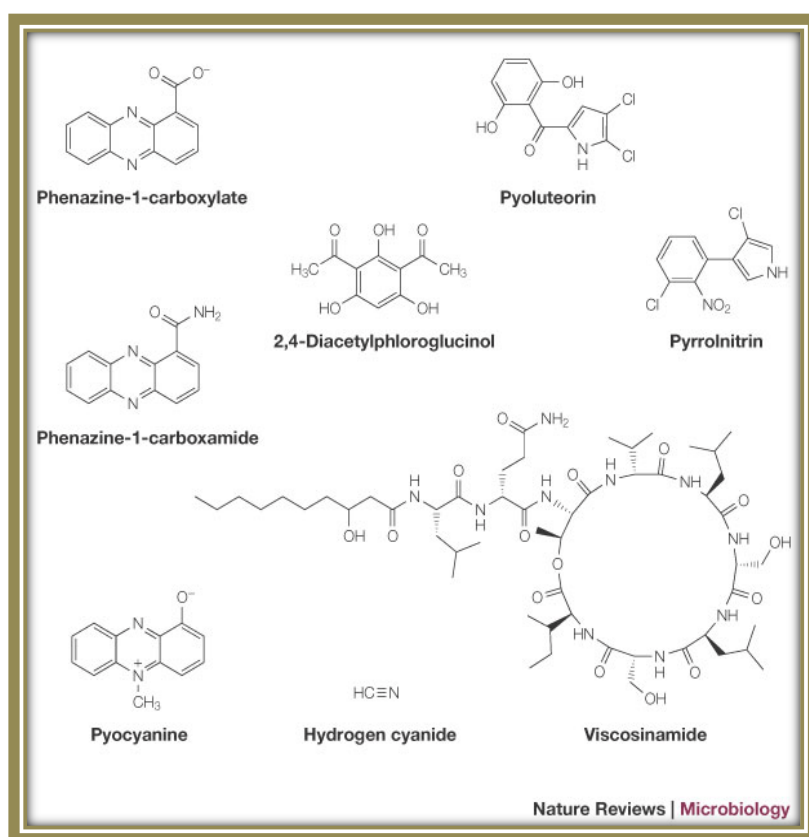
καταπολέμησή του, βιολογικό παράγοντα (Pal και Gardener, 2006). Ο ανταγωνισμός μικτού τύπου, αναφέρεται στην καταστολή της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών μέσω της παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιβιοτικών, έκκρισης λυτικών ενζύμων και σημαντικών υποπροϊόντων των βακτηρίων καθώς και άλλων φυσικών και χημικών προϊόντων (Pal και Gardener, 2006). Τέλος ο έμμεσος ανταγωνισμός, αναφέρεται στον ανταγωνισμό θέσης μεταξύ παθογόνου και μη παθογόνου μικροοργανισμού, για τη λήψη των απαραίτητων, για την ανάπτυξή τους, θρεπτικών συστατικών και ιχνοστοιχείων του εδάφους (πχ. δέσμευση του τρισθενή σιδήρου μέσω σιδηροφόρων), είτε εκκριμάτων της ρίζας, καθώς και στην επαγωγή ανθεκτικότητας του ξενιστή (Pal και Gardener, 2006).

1.3.2 Επίδραση των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* έναντι φυτοπαθογόνων μυκήτων

Οι φθορίζουσες Ψευδομονάδες, έχουν μελετηθεί για δεκαετίες για την επίδρασή τους να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών, μέσω της συστηματικής καταστολής των εδαφογενών φυτικών ασθενειών (Bakker *et.al.*, 2007). Οι μηχανισμοί που ακολουθούν και παίζουν σημαντικό ρόλο στην καταστολή της δράσης των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών από αυτά τα βακτήρια περιλαμβάνουν, την παραγωγή των σιδηροφόρων για τον ανταγωνισμό για σίδηρο, την παραγωγή αντιβιοτικών, λυτικών ενζύμων και άλλων παραπροϊόντων, καθώς και την ενεργοποίηση της επαγόμενης διασυστηματικής αντοχής (ISR) (Bakker *et.al.*, 2007).

1.3.3 Σημαντικότερες ομάδες αντιβιοτικών που παράγονται από ανταγωνιστικά βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp.

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ενώσεις οι οποίες μπορούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις να καταστείλουν την ανάπτυξη και να σκοτώσουν άλλους μικροοργανισμούς (Pal και Gardener, 2006). Τα περισσότερα βακτήρια μπορούν να παράγουν και να εκκρίνουν περισσότερες από μια ενώσεις με αντιβιοτική δράση (Pal και Gardener, 2006). Το επίπεδο οξυγόνου, η θερμοκρασία, το pH, οι πηγές αζώτου και άνθρακα καθώς και τα ιχνοστοιχεία του εδάφους, αποτελούν σημαντικούς βιοτικούς παράγοντες, που επηρεάζουν την παραγωγή αντιβιοτικών από τα ανταγωνιστικά βακτηριακά στελέχη (Raaijmakers, 2002). Ωστόσο, βιοτικοί παράγοντες, όπως το



Εικόνα 1: Κατηγορίες αντιβιοτικών, που παράγοντα από τα είδη βακτηρίων του γένους *Pseudomonas*.

αντιβιοτικών ενώσεων, για τις οποίες είναι κατανοητός εν μέρει ο τρόπος δράσης τους και συνδέονται καλύτερα με τον βιολογικό έλεγχο των ασθενειών των ριζών είναι οι, **φenaζίνες** (phenazine), **φλορογλυκινόλες** (phloroglucinols), η **πυολουτεορίνη** (pyoluteorin), η **πυρρολνιτρίνη** (pyrrolnitrin), τα **κυκλικά**

φυτό ξενιστής, το είδος του παθογόνου, η αυτόχθων μικροχλωρίδα και η πυκνότητα των κυττάρων του ανταγωνιστικού στελέχους, παίζουν εξίσου καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή των αντιβιοτικών (Raaijmakers, 2002). Σύμφωνα με τους Haas και Défago, έξι τάξεις των

λιποπεπτίδια (cyclic lipopeptides) και το **πτητικό υδροκυάνιο** (HCN) (Εικόνα 1) (Haas και Défago, 2005).

1.3.3.1 Λιποπεπτίδια (LPs)

Τα **λιποπεπτίδια** (LPs) αποτελούν μια δομικά διαφορετική ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών, που παράγονται από έναν ευρύ αριθμό βακτηρίων και μυκήτων, ενώ παρουσιάζουν σημαντικές αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, ανοσοκατασταλτικές και επιφανειοδραστικές ιδιότητες (Raaijmakers *et.al.*, 2010). Τα επιφανειοδραστικά λιποπεπτίδια αποτελούνται από μια λιπιδιακή ουρά που συνδέεται με ένα γραμμικό ή κυκλικό ολιγοπεπτίδιο (Raaijmakers *et.al.*, 2010). Τα **κυκλικά λιποπεπτίδια** (CLPs) απαρτίζονται από λιπιδιακή ουρά, η οποία συνδέεται με ένα κυκλικό ολιγοπεπτίδιο, το οποίο κυκλοποιείται από ένα λακτονικό δακτύλιο μεταξύ δύο αμινοξέων της πεπτιδικής αλυσίδας (Van de Mortel *et.al.*, 2009). Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και *Bacillus*, αποτελούν τα πιο συχνά μελετώμενα είδη για την παραγωγή των κυκλικών λιποπεπτιδίων, καθώς συναντώνται σε ένα ευρύ φάσμα ενδιαιτημάτων, περιλαμβάνοντας τόσο παθογόνα όσο και ωφέλιμα στελέχη και παρουσιάζουν ποικιλία ενεργειακών και διατροφικών απαιτήσεων (Raaijmakers *et.al.*, 2010). Μεταξύ των πεπτιδίων που παράγονται από διάφορα είδη του γένους *Pseudomonas*, υπάρχει εμφανής δομική ποικιλομορφία που οφείλεται, τόσο σε διαφορές στο μήκος και τη σύνθεση του λιπιδιακού τμήματος, όσο και από τον τύπο, τον αριθμό και τη διάταξη των αμινοξέων της πεπτιδικής αλυσίδας (Nybroe και Sorensen, 2004; Stein, 2005; Raaijmakers *et.al.*, 2006; Ongena και Jacques, 2008; Gross and Loper, 2009). Βασιζόμενοι σε αυτά τα δομικά χαρακτηριστικά, τα CLPs, που παράγονται από τις Ψευδομονάδες, ταξινομούνται σε τέσσερις μεγάλες ομάδες: τις βισκοσίνη (**viscosin**), αμφισίνη (**amphisin**), τολασίνη (**tolaasin**) και συρινγκομυκίνη (**syringomycin**) (Nybroe και Sorensen, 2004). Κατά τα τελευταία χρόνια έχει ταυτοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός νέων δομικών LPs από βακτήρια του γένους *Pseudomonas* συμπεριλαμβανομένων της αρθροφακτίνης (**arthrofactin**) του *Pseudomonas sp.* στελέχους MIS38 (Roongsawang *et.al.*, 2003), της πουτισουλβίνης (**putisoulvins**) I και II του *Pseudomonas putida* (Kuijper *et.al.*, 2004; Kruijt *et.al.*, 2009), της ορφαμίδης (**orfamide**) του *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (Paulsen *et.al.*, 2005), της ψευδοδεσμίδης (**pseudodesmin**) A και B (Sinnaeve *et.al.*,

2009) και της μασσετολίδης A (**massetolide A**) του *Pseudomonas fluorescens* (Van de Mortel *et.al.*, 2009). Αρκετά από αυτά τα LPs έχουν δομικά χαρακτηριστικά, που διαφέρουν από τις τέσσερις κύριες ομάδες κυκλικού LP και κάνουν την αρχική κατάταξη πιο διάχυτη (Raaijmakers *et.al.*, 2010). Σε φυσικά περιβάλλοντα έχει παρατηρηθεί ότι τα CLPs εμφανίζουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στις αλληλεπιδράσεις τους έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (Raaijmakers *et.al.*, 2010). Όταν πραγματοποιήθηκαν πειράματα *in vitro* σε βακτηριακά στελέχη του γένους *Pseudomonas*, για την δράση των CLPs που παρήγαγαν, παρατηρήθηκε τόσο η λυτική όσο και η ανασταλτική δράσης τους, έναντι ενός ευρέως φάσματος μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των ιών, μυκοπλασμάτων, βακτηρίων, μυκήτων και ωομυκήτων (Raaijmakers *et.al.*, 2010). Έχει παρατηρηθεί και αποδειχθεί πειραματικά ότι εμφανίζουν πολύ σημαντικές αντιμυκητιακές ιδιότητες, επηρεάζοντας τη μορφολογία και τη φυσιολογία των κυττάρων αυτών (Raaijmakers *et.al.*, 2010). Σε πειράματα και με την έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις massetolide A έναντι του παθογόνου *Phytophthora infestans*, παρατηρήθηκε μικροσκοπικά η εμφάνιση διογκώσεων στις μυκηλιακές υφές, με ταυτόχρονη μείωση του ξηρού βάρους του μυκηλίου και ιδιαίτερη αύξηση των διακλαδώσεων των υφών (Van de Mortel *et.al.*, 2009). Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε άμεση λύση των ζωοσπορίων εξαιτίας της δράσης του massetolide A, επάγοντας τον σχηματισμό διαμεμβρανικών πόρων (Raaijmakers *et.al.*, 2010). Για έναν μεγάλο αριθμό CLPs συμπεριλαμβανομένων των tolaasin, syringomycin, viscosin και putisolvin παρατηρείται η δράση αυτών εντός των μεμβρανών, σχηματίζοντας πόρους, ικανούς να οδηγήσουν σε κυτταρική λύση (Raaijmakers *et.al.*, 2010). Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από τους De Bruijn και De Kock το viscosin αναστέλλει άμεσα την κινητικότητα των ζωοσπορίων, ενώ είναι ικανή η συγκέντρωση των 50μg mL⁻¹ προκειμένου να παρατηρηθεί λύση των κυττάρων τους (De Bruijn *et.al.*, 2007).

1.3.3.2 2,4-διακέτυλφλορογλουκινόλη (DAPG)

Το αντιβιοτικό πολυκετιδίου **2,4-διακέτυλφλορογλουκινόλη (DAPG)** που λαμβάνεται από το *Pseudomonas fluorescens*, είναι πολύ σημαντικό καθώς παίζει καθοριστικό ρόλο στη καταστολή ενός μεγάλου αριθμού ασθενειών των

καλλιεργειών (Keel και Défago, 1997). Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την καταπολέμηση του φυτοπαθογόνου μύκητα *Pythium ultimum* παρατηρήθηκε η άμεση επίδραση του 2,4-DAPG, προκαλώντας την άμεση καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης του μύκητα και ταυτόχρονα την αναστολή της ανάπτυξης των ζωοσπορίων του (De Souza *et.al.*, 2003). Προκειμένου να αποδειχθεί η σημασία του 2,4-DAPG στην προστασία των φυτών, πραγματοποιήθηκαν μελέτες με τη δημιουργία 2,4-DAPG αρνητικών μεταλλάξεων του *Pseudomonas fluorescens* και μη παραγωγικών στελεχών, στα οποία είχαν μεταφερθεί 2,4-DAPG βιοσυνθετικά πλασμίδια (Schnider *et.al.*, 2000). Με την προσέγγιση αυτή έχει αποδειχθεί ότι το αντιβιοτικό συμβάλλει στον έλεγχο μια σειράς ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων της μαύρης σήψης της ρίζας του καπνού (Keel *et.al.*, 1992), το πλάγιασμα των αγρωστωδών (Keel *et.al.*, 1992), την ριζοκτονία του ζαχαρότευτλου (Fenton *et.al.*, 1992) και τη βακτηριακή μαλακή σήψη της πατάτας (Cronin *et.al.*, 1997). Η παραγωγή του 2,4-DAPG από φθορίζοντα στελέχη του γένους *Pseudomonas*, υποκινείται σε πολλά στελέχη από τη γλυκόζη (Duffy και Défago, 1999), πιο σπάνια από τη σακχαρόζη ή την αιθανόλη (Duffy και Défago, 1999; Tambong και Höfte, 2001), ενώ ο θειικός ψευδάργυρος και το μολυβδαινικό αμμώνιο έχουν αναφερθεί να ευνοούν την παραγωγή του αντιβιοτικού (Duffy και Défago, 1999).

1.3.3.3 Φεναζίνες

Η **φεναζίνη** είναι μια χαμηλού μοριακού βάρους, αζωτούχα, ετεροκυκλική ένωση, που αποτελείται από μια έντονη χρωστική ουσία, που παράγεται από τα βακτηριακά στελέχη των γενών *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* και *Streptomyces* (Tambong και Höfte, 2001). Η αντιοξειδωτική δράση της φεναζίνης, εξαρτάται από το ποσοστό μετασχηματισμού της ένωσης σε αναγωγική και οξειδωτική, σε συνδυασμό με την συσσώρευση των τοξικών ριζών υπεροξειδίου στο κύτταρο στόχο (Hasset, 1993). Οι φεναζίνες φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, παράγουν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, δρουν ως κυτταρικά σήματα που ρυθμίζουν τα πρότυπα της γονιδιακής έκφρασης, συμβάλλουν στον σχηματισμό βιοϋμενίων, ενισχύουν την επιβίωση των βακτηρίων, ενώ φαίνεται να ενεργοποιούν και την επαγόμενη διασυστηματική αντοχή στα φυτά (ISR) (Pierson και Pierson, 2010).

1.3.4 Παραγωγή λυτικών ενζύμων από ανταγωνιστικά βακτήρια του γένους *Pseudomonas*

Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να παράγουν και να εκκρίνουν μια ποικιλία άλλων δευτερογενών μεταβολιτών, παρεμποδίζοντας οποιαδήποτε δραστηριότητα και ανάπτυξη του παθογόνου οργανισμού (Pal και Gardener, 2006). Αυτοί οι μικροοργανισμοί παράγουν λυτικά ένζυμα, τα οποία υδrolύουν μια ευρεία ποικιλία πολυμερικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων της χυτίνης, της κυτταρίνης, διαφόρων πρωτεϊνών, της ημικυτταρίνης, καθώς και του DNA (Pal και Gardener, 2006). Τέτοια ένζυμα μπορεί να είναι χυτινάσες, κυτταρινάσες, είτε πρωτεϊνάσες (Pal και Gardener, 2006). Ενώ η βασική τους λειτουργία είναι να λύουν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, τα ένζυμα αυτά αποδομούν ταυτόχρονα τα φυτικά υπολείμματα και τη μη νεκρή οργανική ύλη (Pal και Gardener, 2006). Η δράση τους αυτή είναι πολύ σημαντική, καθώς είναι γνωστό πως πολλοί μικροοργανισμοί και κυρίως οι μύκητες, διαχειμάζουν στα φυτικά υπολείμματα προκειμένου να επιβιώσουν (Pal και Gardener, 2006).

1.3.5 Παραγωγή άλλων παραπροϊόντων από ανταγωνιστικά βακτήρια του γένους *Pseudomonas*

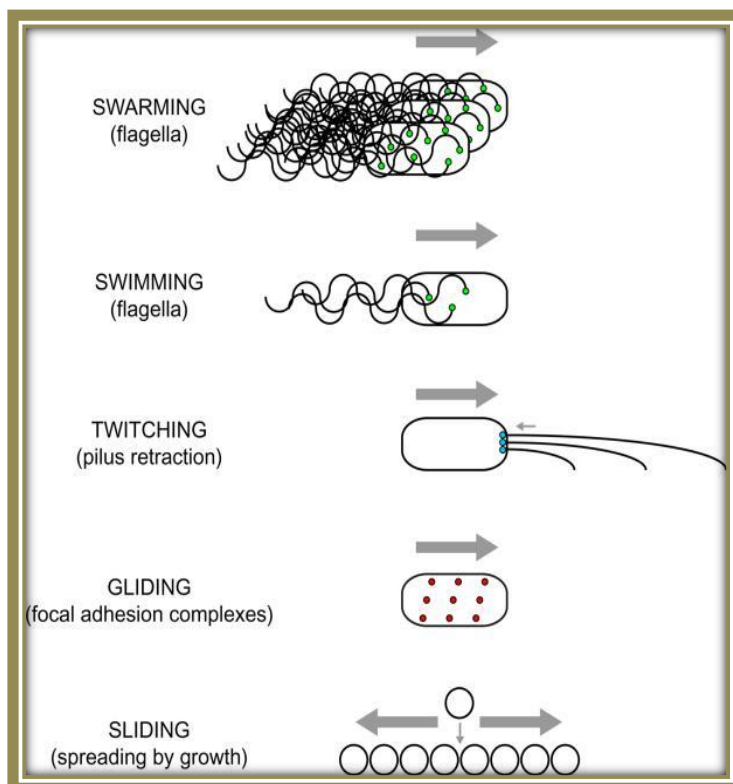
Ταυτόχρονα υπάρχουν και άλλα μικροβιακά παραπροϊόντα που δρουν ως καταστολείς της ανάπτυξης των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, όπως είναι το υδροκυάνιο, η αμμωνία ή το διοξείδιο του άνθρακα (Pal και Gardener, 2006). Το **υδροκυάνιο (HCN)**, μπορεί πολύ αποτελεσματικά να μπλοκάρει το οξειδωτικό μονοπάτι του κυτοχρώματος, ενώ συγχρόνως είναι πολύ τοξικό προς όλους τους αερόβιους μικροοργανισμούς, ακόμα και αν υπάρχει σε ελάχιστες συγκεντρώσεις (Pal και Gardener, 2006). Η παραγωγή HCN από συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη του γένους *Pseudomonas fluorescens*, συμβάλει σε μεγάλο βαθμό στην καταστολή φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών στην περιοχή της ριζόσφαιρας (Pal και Gardener, 2006).

1.3.6 Ανταγωνισμός για θρεπτικά και κατάληψη των διαθέσιμων θέσεων αποικισμού στο ριζικό σύστημα των φυτών.- Παραγωγή σιδηροφόρων

Από τη μικροβιακή προοπτική, το έδαφος και οι επιφάνειες ανάπτυξης των φυτών είναι συχνά περιβάλλοντα πολύ φτωχά σε θρεπτική αξία (Pal και Gardener, 2006). Προκειμένου ένας μικροοργανισμός να εποικήσει με επιτυχία τη φυτόσφαιρα, θα πρέπει να ανταγωνισθεί με επιτυχία για τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά του εδάφους (Pal και Gardener, 2006). Παρ' όλο που είναι πολύ δύσκολο να αποδειχθεί άμεσα, φαίνεται ότι ο ανταγωνισμός μεταξύ παθογόνων και μη παθογόνων μικροοργανισμών για θρεπτικά συστατικά, μειώνει σημαντικά τη συχνότητα και ταυτόχρονα τη σοβαρότητα μιας ασθένειας (Van Dijk και Nelson, 2000). Για παράδειγμα, ο επιτυχής καταβολισμός κάποιων θρεπτικών συστατικών (πχ. λιπαρών οξέων) στην περιοχή της σπερματοσφαιρας, έχει αποδειχθεί ως ένας σημαντικός μηχανισμός καταστολής της ανάπτυξης του μύκητα *Pythium ultimum* από το βακτήριο *Enterobacter cloacae* (Van Dijk και Nelson, 2000). Τα βακτήρια αυτά, εποικίζουν εκείνες τις περιοχές που έχουν άμεσα διαθέσιμο νερό και θρεπτικά συστατικά υψηλής περιεκτικότητας σε άνθρακα, όπως είναι τα άκρα των πλευρικών ριζών, τα πληγωμένα επιδερμικά κύτταρα και νεκτάρια, καθώς και τη ζελατινώδη έκκριση στην περιοχή της ρίζα (Pal και Gardener, 2006). Ο βιολογικός έλεγχος που βασίζεται στον ανταγωνισμό για σπάνια, αλλά απαραίτητα ιχνοστοιχεία, όπως ο σίδηρος, έχει επίσης εξετασθεί (Pal και Gardener, 2006). Ο σίδηρος είναι πολύ περιορισμένος στην περιοχή της ριζόσφαιρας και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH του εδάφους (Pal και Gardener, 2006). Σε υψηλά οξειδωμένα και καλά αεριζόμενα εδάφη, ο σίδηρος είναι παρών, σε μορφή τρισθενούς σιδήρου, όντας σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και αδιάλυτος στο νερό (pH 7,4) (Lindsay, 1979). Προκειμένου να προσαρμοσθούν, οι μικροοργανισμοί ανέπτυξαν τα σιδηροφόρα, που αποτελούν τα πιο ισχυρά μέσα δέσμευσης του τρισθενή σιδήρου (Pal και Gardener, 2006). Ο σίδηρος παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη σύνθεση του RNA, το οξειδωτικό στρες και τη μεταγραφή των γονιδίων που εμπλέκονται στο σύστημα μεταφοράς του σιδήρου (Braun and Mahren, 2005). Στην βιολογική καταπολέμηση εμφανίζει πολύ σημαντικό ρόλο, καθώς βακτηριακά στελέχη στην περιοχή της ριζόσφαιρας του φυτού, που έχουν αναπτύξει σιδηροφόρα, μπορούν να δεσμεύσουν τον υπάρχων σίδηρο, περιορίζοντας τον

διαθέσιμο σίδηρο, σε ενδεχόμενους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς (Loper, 1988).

1.4 Η κινητικότητα των βακτηρίων. Κατηγορίες επιφανειακής κινητικότητας



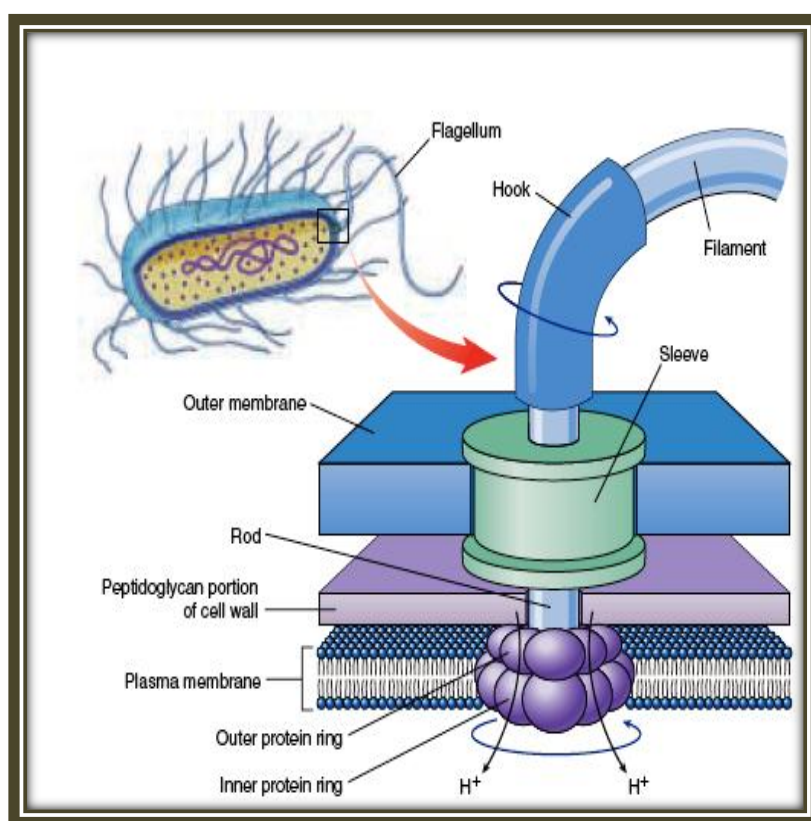
Εικόνα 2: Κατηγορίες κινητικότητας των βακτηρίων.

Η κινητικότητα είναι διαδεδομένη σε όλους τους προκαρυώτες, ωστόσο καμία δομή δεν παρέχει κινητικότητα σε όλους τους μικροοργανισμούς σε όλες τις περιπτώσεις (Bardy *et.al.*, 2003). Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να εποικούν μια ποικιλία περιβαλλόντων, κάνοντας έτσι επιτακτική την ανάγκη τους να αναπτύσσουν πολλούς και

εξειδικευμένους μηχανισμούς προκειμένου να μπορέσουν να επιβιώσουν. Έτσι μπορούν να κινούνται και σε υγρές και σε στερεές επιφάνειες, μέσω έξι διαφορετικών κατηγοριών κινητικότητας, την *swarming* (ομαδική), την *swimming* (κολυμβητική), την *gliding*, την *twitching*, την *sliding* και την *darting* κινητικότητα (Kearns, 2010) (Εικόνα 2). Η **swarming** (ομαδική) κινητικότητα μπορεί να ορισθεί ως μια ταχεία, πολυκύτταρη, βακτηριακή κίνηση πάνω σε κάποια επιφάνεια, που εξαρτάται πλήρως από την ύπαρξη μαστιγίων για να πραγματοποιηθεί (Kearns, 2010). Η **swimming** κινητικότητα είναι ένας τρόπος βακτηριακής μετακίνησης, που πραγματοποιείται επίσης παρουσία περιστρεφόμενου μαστιγίου, σε αντίθεση όμως με την *swarming* κινητικότητα, λαμβάνει χώρα σε μεμονωμένα κύτταρα και για βακτήρια που κινούνται σε υγρές επιφάνειες (Kearns, 2010). Η **twitching** κινητικότητα είναι επιφανειακή κινητικότητα και απαιτεί την παρουσία ινιδίων τύπου IV, παρέχοντας στα βακτηριακά κύτταρα αργή κίνηση μέσω της επιμήκυνσης

και αναδίπλωσής τους (Mattick, 2002). Η **gliding** κινητικότητα είναι μια ενεργή επιφανειακή κινητικότητα που λαμβάνει χώρα κατά μήκος του μεγάλου άξονα του κυττάρου, χωρίς τη βοήθεια μαστιγίων ή ινιδίων (Kearns, 2010). Έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα κινούνται με τη βοήθεια συμπλόκων προσκόλλησης, τα οποία δεσμεύονται στο εκάστοτε υπόστρωμα (Mignot, 2007). Η **sliding** κινητικότητα είναι μια μορφή παθητικής διασποράς, που δεν απαιτεί κάποιο μηχανισμό κίνησης, αλλά με την παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών, μειώνεται η επιφανειακή τάση, επιτρέποντας στην αποικία να εξαπλωθεί (Henrichsen, 1972). Τέλος η **darting** κινητικότητα έχει μελετηθεί λιγότερο από όλες τις παραπάνω, γνωρίζοντας μόνο ότι πραγματοποιείται με τη βοήθεια ενός ενιαίου πολικού μαστιγίου παίρνοντας την μορφή διάττοντος αστέρος.

1.4.1 Η δομή βακτηριακού μαστιγίου



Εικόνα 3: Δομή του βακτηριακού μαστιγίου

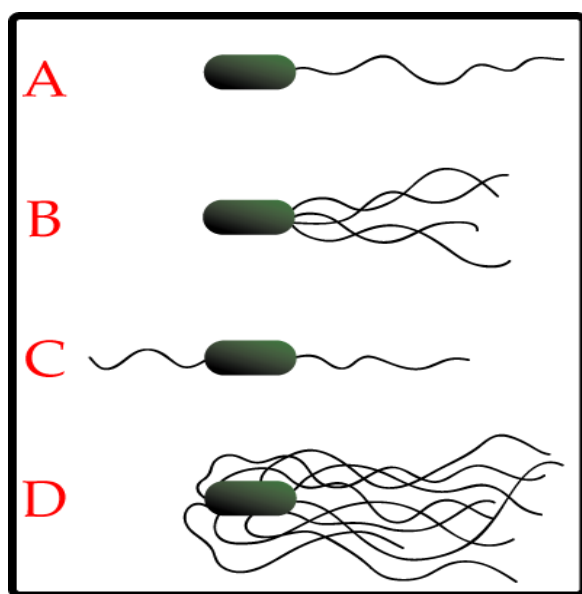
Από τις δομές που παρέχουν κινητικότητα στους μικροοργανισμούς, το βακτηριακό μαστίγιο (**flagellar**) είναι ο πλέον καλά μελετώμενος και πιο γνωστός μηχανισμός (Aldridge και Hughes, 2002). Συντιθέμενο από περισσότερα των 20 ειδών πρωτεϊνών, με άλλα 30 είδη να απαιτούνται για την ρύθμιση και τη

συναρμολόγησή του, είναι από τα πιο πολύπλοκα οργανίδια όλων των προκαρυωτών (Macnab, 1999). Το βακτηριακό μαστίγιο είναι μία περιστροφική δομή που καθοδηγείται από έναν κινητήρα (**motor**) ο οποίος βρίσκεται στη βάση

του, αποτελούμενο ταυτόχρονα από ένα νήμα, που ενεργεί ως έλικα (Bardy *et.al.*, 2003). Το μαστίγιο αποτελείται από τρεις βασικές δομές, το **νήμα**, το **άγκιστρο** (hook) και το **βασικό σωματίο** (Bardy *et.al.*, 2003). Το νήμα έχει συνήθως διάμετρο περίπου 20 nm και αποτελείται από χιλιάδες αντίγραφα μιας πρωτεΐνης που ονομάζεται φλαγκελλίνη (**flagellin**), ενώ πολύ σπάνια αποτελείται από πολλά διαφορετικά είδη πρωτεϊνών φλαγκελλίνης. Η άκρη του μαστιγίου καλύπτεται από τη βασική πρωτεΐνη HAP2. Η σύνδεση του νήματος με το βασικό σωματίο, πραγματοποιείται με τη βοήθεια του άγκιστρου που αποτελείται από μία μοναδική πρωτεΐνη, ενώ η σύνδεση του νήματος και του άγκιστρου απαιτεί την παρουσία έστω και μικρής ποσότητας δύο πρωτεϊνών, των HAP1 και HAP3 (Bardy *et.al.*, 2003). Το βασικό σωματίο αποτελείται από μια ράβδο (**rod**), μια σειρά δακτυλίων (**rings**), τις πρωτεΐνες Mot, το συγκρότημα του διακόπτη και τη διάταξη μαστιγίου εξαγωγής (Bardy *et.al.*, 2003). Οι δακτύλιοι αγκιστρώνονται επί του μαστιγίου στην περιοχή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (MS δακτύλιοι), της πεπτιδογλυκάνης (P δακτύλιοι) και της εξωτερικής μεμβράνης (L δακτύλιοι) του βακτηρίου (Bardy *et.al.*, 2003). Τα Gram⁺ βακτήρια έχουν μαστίγια που στερούνται των P και L δακτυλίων (Bardy *et.al.*, 2003), ενώ οι πρωτεΐνες του συγκροτήματος του διακόπτη (FliG, FliM, FliN), καθορίζουν την αλλαγή της περιστροφής του μαστιγίου, μεταβάλλοντας έτσι την αλλαγή στην κινητικότητα του βακτηρίου (Bardy *et.al.*, 2003). Οι MotA και MotB πρωτεΐνες, σχηματίζουν ένα κανάλι ιόντων, όπου η ροή των ιόντων μέσω του καναλιού, προκαλεί αλλαγή στη δομή της MotA πρωτεΐνης που επιδρά με την FliG, παράγοντας ροπή (Garza *et.al.*, 1995; Kojima και Blair, 2001; Gabel και Berg, 2003). Η ροπή που παράγεται από το νήμα, είναι ικανή να προκαλέσει swimming κινητικότητα σε υγρές επιφάνειες και swarming κινητικότητα σε στερεές επιφάνειες (Kearns, 2010). Ένας τρόπος με τον οποίο ρυθμίζονται τα μαστίγια, είναι το επίπεδο της γονιδιακής έκφρασης (Guttenplan και Kearns, 2013). Συνήθως τα γονίδια είναι οργανωμένα σε ρυθμιστικές ιεραρχίες που καλούνται κλάσεις, τις I, II, III και σε ορισμένες περιπτώσεις την IV, οι οποίες εξαρτώνται από τον εκάστοτε οργανισμό και καθορίζουν πολλά χαρακτηριστικά του μαστιγίου και τελικά της κάθε κίνησης του βακτηρίου (Kutsukake *et.al.*, 1992). Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο ρυθμίζονται τα μαστίγια, αναφέρεται στο λειτουργικό επίπεδο, όπου η κινητική συμπεριφορά του βακτηρίου, ελέγχεται από τη χημειοταξία (Wadhams και

Armitage, 2004). Ως **χημειοταξία**, ορίζεται η κατευθυνόμενη κίνηση σε χημική διαβάθμιση, που ελέγχεται από τη συχνότητα με την οποία το βακτήριο αλλάζει την κατεύθυνση της περιστροφής του μαστιγίου (Berg και Brown, 1972). Οι κινητήρες των μαστιγίων συνήθως περιστρέφονται δεξιόστροφα ή αριστερόστροφα, με την περιστροφή προς τη μια κατεύθυνση να επάγει τη swimming κινητικότητα και με την περιστροφή προς την άλλη να αναγκάζει τα κύτταρα να αποκτήσουν νέο προσανατολισμό (Larsen *et.al.*, 1974).

Διαφορετικά είδη βακτηρίων, παρουσιάζουν διαφορετικούς αριθμούς και δομές



Εικόνα 4: Κατηγορίες βακτηρίων με βάση τη δομή και τον αριθμό των μαστιγίων τους

μαστιγίων, με αποτέλεσμα να κατατάσσονται σε τέσσερις διαφορετικές ομάδες (**εικόνα 4**). Στην πρώτη ομάδα κατατάσσονται τα **Μονότριχα** (Monotrichous) βακτήρια, τα οποία εμφανίζουν ένα ενιαίο μαστίγιο (**Εικόνα 4A**). Στην δεύτερη ομάδα υπάρχουν τα **Λοφότριχα** (Lophotrichous) βακτήρια, τα οποία εμφανίζουν πολλαπλά μαστίγια που εκβάλλονται από το ίδιο σημείο επί της βακτηριακής επιφάνειας και τα

οποία δρουν συνεργηστικά, οδηγώντας το βακτήριο προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση (**Εικόνα 4B**). Τα **Αμφίτριχα** (Amphitrichous) βακτήρια τα οποία ανήκουν στην τρίτη ομάδα (**Εικόνα 4C**), έχουν δύο μαστίγια, ένα σε καθένα από τα δύο αντίθετα άκρα του κυττάρου, που τους επιτρέπουν να αλλάζουν άμεσα την πορεία κίνησής τους, με τη δράση του ενός μαστιγίου κάθε φορά. Τέλος υπάρχουν τα **Περίτριχα** (Peritrichous) βακτήρια (**Εικόνα 4D**), τα οποία εμφανίζουν πολλαπλά μαστίγια που προεξέχουν από όλα τα σημεία του βακτηριακού κυττάρου (Kim και McCarter, 2000).

1.4.2 Παραγωγή αντιμικροβιακών επιφανειοδραστικών ουσιών των βακτηρίων *Pseudomonas fluorescens*

Πολλά βακτήρια που εμφανίζουν swarming κινητικότητα έχουν την ικανότητα να συνθέτουν και να εκκρίνουν επιφανειοδραστικές ουσίες (Kearns, 2010). Οι ουσίες αυτές είναι αμφιφιλικά μόρια που μειώνουν την τάση μεταξύ του υποστρώματος και των βακτηριακών κυττάρων, προκειμένου να διευκολυνθεί η διασπορά τους πάνω στις επιφάνειες (Kearns, 2010). Οι επιφανειοδραστικές ουσίες συχνά εμφανίζονται ως ένα διαυγές, υδατικό στρώμα που προηγείται των κυττάρων που κινούνται ομαδικά (Kearns and Losick, 2003; Senesi *et.al.*, 2002; Rashid και Kornberg, 2000). Πέρα από την επαγωγή της ομαδικής κινητικότητας, οι επιφανειοδραστικές ουσίες συχνά μπορούν να δράσουν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες (Andersen *et.al.*, 2003; Wasserman *et.al.*, 1961; Carrillo *et.al.*, 2003). Ως εκ τούτου, η swarming κινητικότητα ακολουθεί μια ολοκληρωμένη στρατηγική, στην οποία οι επιφανειοδραστικές ουσίες που εκκρίνονται προκειμένου να εξαπλωθεί το βακτήριο σε όλη την επιφάνεια του μέσου ανάπτυξης, εμποδίζουν ταυτόχρονα τον αποικισμό και την ανάπτυξη άλλων ανταγωνιστικών μικροοργανισμών στο ίδιο περιβάλλον ανάπτυξης (Kearns, 2010). Μια βιολογική επιφανειοδραστική ένωση, μπορεί να θεωρηθεί συνήθως πιο αποτελεσματική, πιο επιλεκτική, πιο φιλική προς το περιβάλλον και ταυτόχρονα πιο σταθερή από πολλές συνθετικές ενώσεις, αυξάνοντας τη σημασία της (Carrillo *et.al.* 2003). Η σύνθεση του λιποπεπτιδίου amphisin από το ανταγωνιστικό, βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas* sp. DSS73, εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Pythium ultimum* και *Rhizoctonia solani*, μπορεί να αποτελέσει ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αντιμικροβιακής επιφανειοδραστικής ουσίας (Duffy και Défago, 2000). Η σύνθεση του αντιμυκητιακού λιποπεπτιδίου viscosin, από το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* SBW25 (Laycock *et.al.*, 1991), είτε της surfactin από το βακτήριο *Bacillus subtilis*, αποτελούν επίσης παραδείγματα δραστικών επιφανειοδραστικών ουσιών (Carrillo *et.al.*, 2003).

1.4.2.1 Γονίδια που εμπλέκονται στην παραγωγή αντιμυκητιακών επιφανειοδραστικών ενώσεων από βακτήρια του γένους *Pseudomonas*

Στα φθορίζοντα στελέχη *Pseudomonas*, η βιοσύνθεση των αντιμυκητιακών ενώσεων ρυθμίζεται από μια σειρά ενδογενών σημάτων, τα οποία διαχέονται μέσω μιας κινάσης και ενός ρυθμιστή της μεταγραφικής απόκρισης, τα οποία κωδικοποιούνται από δύο συστήματα γονιδίων, τα **GacS** και **GacA** αντίστοιχα (Duffy και Défago, 2000), μέσω σίγμα παραγόντων που κωδικοποιούνται από το *proS* γονίδιο (Sarniguet *et.al.*, 1995) και μέσω του συστήματος αίσθησης πυκνότητας του πληθυσμού (**Quorum Sensing**) (Pierson *et.al.*, 1998). Τα ρυθμιστικά συστήματα των δύο παραγόντων GacS/GacA, έχουν αποδειχθεί ως τα πιο βασικά μέσα για την επιτυχή προσαρμογή των μικροοργανισμών σε περιβάλλοντα με μεταβαλλόμενες συνθήκες (Brensic *et.al.*, 2009). Τα συστήματα αυτά, είναι ικανά να αφομοιώνουν ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, καθορίζοντας διάφορες αποκρίσεις, από τη γονιδιακή έκφραση και την κινητικότητα των βακτηρίων ως την ενζυμική δραστηριότητα τους (Gao *et.al.*, 2007). Η πλειοψηφία αυτών των αποκρίσεων συνδέεται με τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, αξιοποιώντας την ικανότητα των φωσφορυλιωμένων (ή αποφωσφορυλιωμένων) ρυθμιστών απόκρισης, να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, οι οποίες προηγούνται των ρυθμιστικών γονιδίων, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η μεταγραφή τους (Brensic *et.al.*, 2009). Ως εκ τούτου, τα συστήματα αυτών των δύο παραγόντων, συχνά συμμετέχουν σε πολύπλοκα δίκτυα, όπου ελέγχουν την έκφραση άλλων ρυθμιστικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των μεταγραφικών ρυθμιστικών παραγόντων και των μικρών ρυθμιστικών παραγόντων RNAs (sRNAs) (Valverde και Haas, 2008). Τα συστήματα αυτά είναι ικανά να ρυθμίζουν την έκφραση μιας ποικιλίας φαινοτύπων, συμπεριλαμβανομένων της παραγωγής εξωκυτταρικών ενζύμων, έκκρισης τοξινών, μορίων που καθορίζουν το σύστημα αίσθησης πυκνότητας του πληθυσμού, διάφορες μεταβολικές διεργασίες, καθώς και την κινητικότητα των βακτηρίων (Brensic *et.al.*, 2009). Σχεδόν 20 ομόλογα των GacS και GacA έχουν βρεθεί και ταυτοποιηθεί σε εντερικά βακτήρια (*E.coli*, *Salmonella enteric* και *Erwinia carotovora*), βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, *Vibrio* και *Azotobacter* (Heeb και Haas, 2001). Για την ακρίβεια το GacS προσδιορίζει μια ομάδα συντηρημένων

γονιδίων σε βακτήρια του γένους *Pseudomonas* που κωδικοποιούν λειτουργικές και συγγενικά ομόλογες κινάσες, για παράδειγμα τις *arpA*, *lemA*, *pheN*, και *repA* (Kitten *et.al.*, 1998). Τυχαίες μεταλλάξεις σε κάθε ένα από τα *gacA* και *gacS* γονίδια, είχαν ως αποτέλεσμα να μπλοκάρουν τη βιοσύνθεση των αντιμικροβιακών ενώσεων υδροκυάνιο, 2,4-διακετυλφθορογλουκινόλη, πυουλουτεορίνη και πυρρολνιτρίνη, σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* CHAO (Duffy και Défago, 2000). Ταυτόχρονα παρουσίασαν αλλαγή τόσο στη μορφολογία των αποικιών τους, όντας μεγαλύτερες και πιο επίπεδες, όσο και στην κινητικότητα τους, εμφανίζοντας αλλοιωμένη κινητικότητα σε σχέση με τα αγρίου τύπου βακτηριακά στελέχη (Duffy και Défago, 2000; Goodier and Ahmer, 2001). Ως αποτέλεσμα αυτών είναι ότι τα συστήματα των δύο αυτών παραγόντων μπορούν να επηρεάσουν και να εμφανίσουν αρνητικές επιπτώσεις, τόσο στην παραγωγή διαφόρων τύπων αντιβιοτικών όσο και στα συστατικά της κυτταρικής επιφάνειας, επηρεάζοντας άμεσα τη μορφολογία των βακτηριακών κυττάρων αλλά και την κινητικότητά τους (Heeb και Haas, 2001).

Τα κυκλικά λιποπεπτίδια συντίθενται από ένα μεγάλο αριθμό **μη ριβοσωμικών πεπτιδικών συνθετασών (NRPS, Non Ribosomal Peptide Synthetases)**, οι οποίες ρυθμίζουν μεγάλο αριθμό ενζυμικών μονοπατιών, με αποτέλεσμα την σταδιακή τροποποίηση και ενσωμάτωση των αμινοξέων στην πεπτιδική αλυσίδα (Sieber και Marahiel, 2005; Finking και Marahiel, 2004). Οι μεταγραφικοί παράγοντες τύπου **LuxR**, κατέχουν επίσης καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή μεγάλου αριθμού κυκλικών λιποπεπτιδίων στα βακτηριακά είδη του γένους *Pseudomonas* (De Bruijn και Raaijmakers, 2009). Το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* SBW25 παράγει σε μεγάλο βαθμό το κυκλικό λιποπεπτίδιο βισκοσίνη, με τη βιοσύνθεσή του να καθορίζεται από το σύστημα των NRPS, που κωδικοποιούνται από τρία μεγάλα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (Open Reading Frames- ORFs) που ονομάζονται *viscA*, *viscB* και *viscC*. Σε αντίθεση με τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση άλλων λιποπεπτιδίων, τα *visc* γονίδια δεν συνδέονται μεταξύ τους, με το *viscA* να απέχει αρκετά από τα *viscBC* συμπλέγματα γονιδίων, στο γονιδίωμα του SBW25 (De Bruijn *et.al.*, 2007). Μελετώντας το βακτηριακό στέλεχος SBW25, πραγματοποιήθηκε κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση θέσης, στα γονίδια που κωδικοποιούν για κάθε έναν από τους δύο αναγνωρισμένους LuxR τύπου

ρυθμιστές, που ορίστηκαν ως ViscAR και ViscBCR. Αποτέλεσμά αυτού ήταν να μειωθούν σημαντικά τα επίπεδα μεταγραφής των βιοσυνθετικών γονιδίων *viscABC*, με αποτέλεσμα να μειωθεί πολύ η παραγωγή του αντιβιοτικού βισκοσίνη (De Bruijn και Raaijmakers, 2009). Παρόμοιος είναι και ο τρόπος παραγωγής του αντιβιοτικού μασσετολίδη που παράγεται από το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* SS101, με τη βιοσύνθεσή του να καθορίζεται από τα γονίδια *massA*, *massB* και *massC* (De Bruijn *et.al.*, 2008).

1.4.2.2 Μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθάσεις (NRPS)

Οι μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθάσεις (NRPS) διαθέτουν μια αρθρωτή δομή, με κάθε λειτουργική μονάδα (module), να αποτελεί ένα δομικό στοιχείο ως αποτέλεσμα της σταδιακής ενσωμάτωσης ενός αμινοξέος στην πεπτιδική αλυσίδα (Gewolb, 2002; Sieber και Marahiel, 2005). Τις περισσότερες φορές τόσο η διάταξη όσο και ο αριθμός των δομικών μονάδων μιας NRPS πρωτεΐνης είναι συγγραμμική με την αλληλουχία των αμινοξέων της χαρακτηριστικής ομάδας των κυκλικών λιποπεπτιδίων. Οι λειτουργικές μονάδες μπορούν περαιτέρω να υποδιαιρεθούν σε **μονάδες έναρξης και επιμήκυνσης της διαδικασίας** (Finking και Marahiel, 2004).

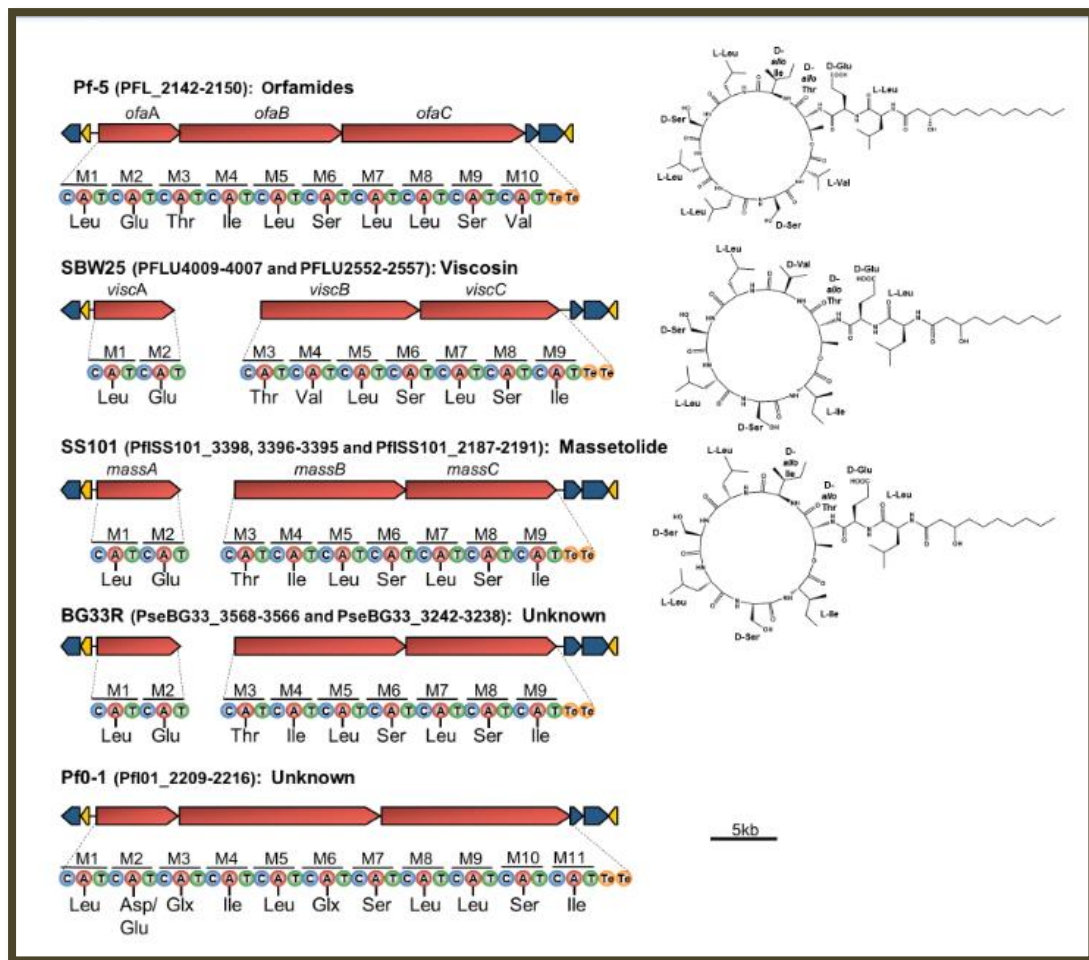
Γενικά οι μονάδες επιμήκυνσης των NRPS αποτελούνται από μια **δομή αδενυλίωσης (A)**, η οποία είναι υπεύθυνη για την επιλογή και την ενεργοποίηση των αμινοξέων, μια **δομή θειολίωσης (T)**, για την θειοεστεροποίηση του ενεργοποιημένου αμινοξέος και μια **δομή συμπίκνωσης (C)**, που είναι υπεύθυνη για τον πεπτιδικό δεσμό μεταξύ δύο γειτονικών υποστρωμάτων, για την επιμήκυνση της πεπτιδικής αλυσίδας (Finking και Marahiel, 2004).

Οι μονάδες έναρξης της διαδικασίας παρέχουν το πρώτο αμινοξύ για τη σύνθεση του πεπτιδίου και συνήθως στερούνται C- δομής (Finking και Marahiel, 2004). Οι καταλυτικές περιοχές παράγουν ένα γραμμικό πεπτίδιο το οποίο διασπάται στο τέλος της γραμμικής αλληλουχίας από μία **δομή θειοεστεράσης (TE)**, η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση ενός γραμμικού προϊόντος ή ενός κυκλικού πεπτιδίου, μέσω μιας αντίδρασης διαμοριακής κυκλοποίησης (Kohli *et.al.*, 2002; Sieber και Marahiel, 2005). Επιπλέον πολλά βακτήρια του γένους *Pseudomonas* έχουν ένα παρόμοιο οργανωμένο των τριών μελών NRPS σύστημα, που αποτελείται από ένα

εναρκτήριο NRPS γονίδιο, που συνδέεται με ένα συγγενές γονίδιο της Lux-R οικογένειας, αλλά σε απόσταση από το οπερόνιο σε σχέση με τα άλλα δύο NRPS γονίδια (Li *et.al.*, 2013).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για την παραγωγή αρκετών CLP's μπορούν να υπάρχουν είτε ως ενιαίες συστάδες γονιδίων, όπως είναι η ορφαμίδη- A (orfamide-A) στο γονιδίωμα του *Pseudomonas fluorescens* Pf-05, ή σε δύο ξεχωριστές θέσεις, όπως είναι στο γονιδίωμα των *Pseudomonas fluorescens* SS101 και SBW25, που παράγουν τα αντιβιοτικά μασσετολίδη-A (massetolide A) και βισκοσίνη (viscosin), αντίστοιχα (De Bruijn *et.al.*, 2007; De Bruijn *et.al.*, 2008). Μετά την πραγματοποίηση τυχαίας μεταλλαξιγένεσης με ένθεση μεταθετού στοιχείου, κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης θέσης, κλωνοποίησης του τεχνητού βακτηριακού χρωμοσώματος (BAC), γονιδιωματικής ανάλυσης και αλληλοσυμπλήρωσης (complementation), βρέθηκε ότι η βιοσύνθεση του αντιβιοτικού massetolide A, διέπεται από τρία μεγάλα NRPS γονίδια, τα οποία ορίζονται ως *massA*, *massB* και *massC* (De Bruijn *et.al.*, 2007). Ύστερα από την ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών των NRPS, βρέθηκαν δύο λειτουργικές μονάδες στο MassA, τέσσερις στο MassB και τρεις στο MassC, με κάθε μία να αποτελείται από C, T και A δομές, καθώς και από δύο δομές TE, οι οποίες συναντώνται στο MassC (De Bruijn *et.al.*, 2007). Συγκρίνοντας τα γονίδια που συμμετέχουν στην παραγωγή των CLPs στα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, τα *massA*, *massB* και *massC* γονίδια, παρουσίασαν πολύ μεγάλη ομοιότητα (81-84% identity) σε σύγκριση με τα *viscA*, *viscB* και *viscC* γονίδια που κωδικοποιούν για το αντιβιοτικό βισκοσίνη (viscosin), του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* SBW25 (De Bruijn *et.al.*, 2008) **(Εικόνα 5)**.

Αν και στις περισσότερες CLP συστάδες γονιδίων, τα NRPS γονίδια συνδέονται φυσικά μεταξύ τους, στο *Ps. fluorescens* SBW25, το *viscA* βρίσκεται περίπου 1.62 Mb πιο μακριά από τα *viscB* και *viscC* (Raaijmakers *et.al.*, 2006). Επίσης και το *massA* είναι πιο απομακρυσμένο από τα *massB* και *massC* (De Bruijn *et.al.*, 2007), σε αντίθεση με τα γονίδια που κωδικοποιούν για το αντιβιοτικό ορφαμίδη A (orfamide-A), τα οποία είναι παρόντα σε μία ενιαία συστάδα γονιδίων, στο γονιδίωμα του *Ps. fluorescens* Pf-5 (Gross *et.al.*, 2007).



Εικόνα 5: Η διάταξη των συστάδων γονιδίων και η προβλεπόμενη σύνθεση των αμινοξέων της πεπτιδικής αλυσίδας των CLPs σε πέντε γονιδιώματα. Τα NRPSS (κόκκινα βελάνια) έχουν εννιά με δώδεκα δομικές μονάδες (M1-M11), με κάθε μία να περιέχει μια δομή συμπύκνωσης (condensation, C), μια δομή αδενυλίωσης (adenylation, A), και μια δομή θειολίωσης (thiolation, T), με δύο δομές θειοεστεράσης (TE) στο τελικό άκρο. Τα αμινοξέα που προβλέπεται ότι θα ενσωματωθούν στην πολυπεπτιδική αλυσίδα του CLP, εμφανίζονται κάτω από κάθε δομή αδενυλίωσης. Οι δομές των orfamide A, viscosin και massetolide παρουσιάζονται στα δεξιά των αντίστοιχων συστάδων γονιδίων. Η οργάνωση των βιοσυνθετικών συστάδων, οι οποίες περιλαμβάνουν γονίδια που κωδικοποιούν τους ρυθμιστικούς παράγοντες LysR (κίτρινα βέλη) και τις πρωτεΐνες εκροής (μπλε βέλη), είναι παρόμοιο μεταξύ των γονιδιωμάτων (De Bruijn *et.al.*, 2008).

Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από τους De Souza *et.al.* διαπιστώθηκε ότι το *Ps. fluorescens* SS101 δεν παράγει μόνο το αντιβιοτικό massetolide A, αλλά τουλάχιστον άλλα τέσσερα κυκλικά λιποπεπτίδια (De Souza *et.al.*, 2003). Ύστερα από ESI-MS/MS και NMR ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, τα μελετώμενα CLP's διαχωρίστηκαν μεταξύ τους με βάση τις μοριακές τους μάζες. Η κύρια κορυφή με χρόνο κατακράτησης (retention time) 91.3 min, αντιστοιχεί στο massetolide- A (De Souza *et.al.*, 2003). Οι κορυφές με χρόνο κατακράτησης 62.9 και 79.4 min ταυτοποιήθηκαν ότι αντιστοιχούν στα κυκλικά λιποπεπτίδια viscosin και massetolide- D αντίστοιχα (De Bruijn *et.al.*, 2008). Το CLP viscosin διαφέρει από το

massetolide-A με την αντικατάσταση της άλλο- ισολευκίνης στο τέταρτο αμινοξύ με μία βαλίνη και με το massetolide- D με το massetolide- A με την αντικατάσταση της ισολευκίνης στο ένατο αμινοξύ με μια λευκίνη (De Bruijn *et.al.*, 2008). Οι μικρές κορυφές στα 47.2 και 54.7 min που προσδιορίστηκαν με NMR και ESI- MS/MS ανάλυση, ταυτοποιήθηκαν ως massetolide- E και massetolide- F αντίστοιχα. Τα massetolide- E και F μοιάζουν πολύ με το λιποπεπτίδιο viscosin, με τη μόνη διαφορά να έγκειται στο ένατο αμινοξύ, όπου η ισολευκίνη στο massetolide- E αντικαθίσταται από βαλίνη και η ισολευκίνη στο massetolide- F αντικαθίσταται από μια λευκίνη (De Bruijn *et.al.*, 2008) (Εικόνα 6).

Peak	Rt (min)	Name	[M+H] ⁺ m/z	AA sequence of peptide moiety								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	47.2	massetolide E	1112	Leu	Glu	<i>α</i> Thr	Val	Leu	Ser	Leu	Ser	Val
2	51.3	unidentified	1158									
3	54.7	massetolide F*	1126	Leu	Glu	<i>α</i> Thr	Val	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu
4	57.0	unidentified (related to peak 2)	1158									
5	62.9	viscosin	1126	Leu	Glu	<i>α</i> Thr	Val	Leu	Ser	Leu	Ser	Ile
6	65.0	isomer of massetolide A*	1140	Leu	Glu	<i>α</i> Thr	<i>α</i> Ile	Leu/Ile	Ser	Leu/Ile	Ser	Ile
7	68.7	massetolide L	1126	Leu	Glu	<i>α</i> Thr	<i>α</i> Ile	Leu	Ser	Leu	Ser	Val
8	79.4	massetolide D	1140	Leu	Glu	<i>α</i> Thr	<i>α</i> Ile	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu
9	91.3	massetolide A	1140	Leu	Glu	<i>α</i> Thr	<i>α</i> Ile	Leu	Ser	Leu	Ser	Ile

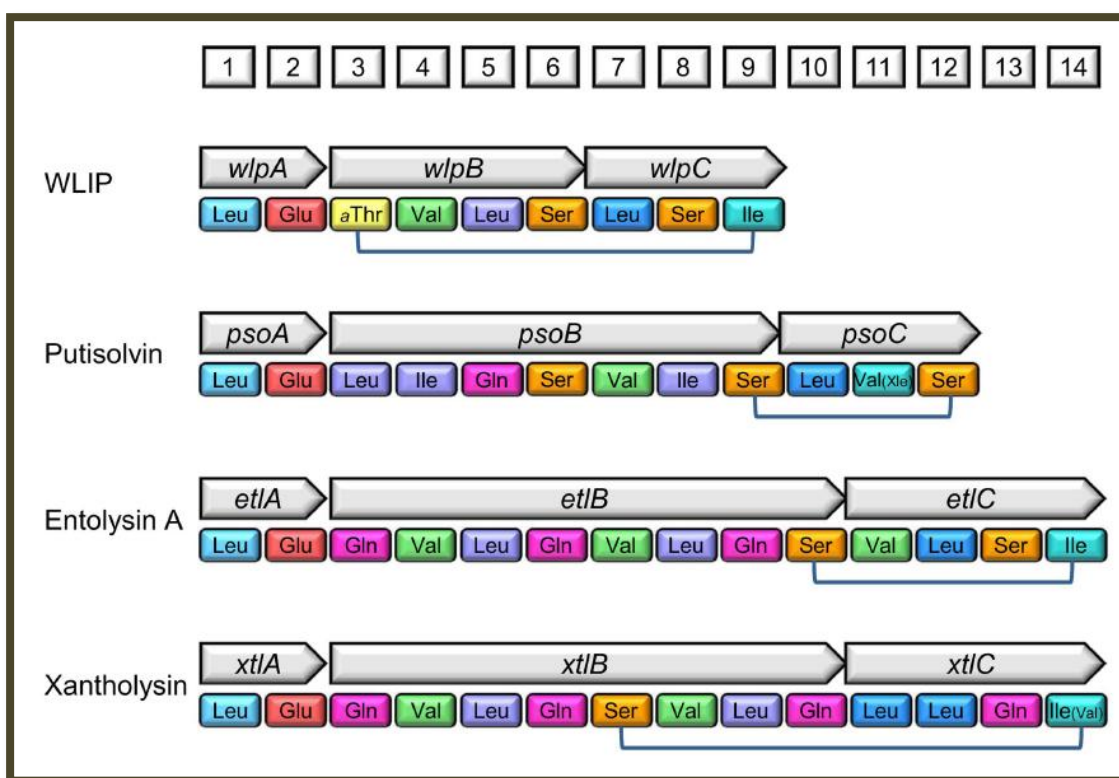
* tentatively

Εικόνα 6: Η HPLC ανάλυση του ακατέργαστου εκχυλίσματος της επιφανειοδραστικής ουσίας του *P. fluorescens* SS101. Η κύρια κορυφή (κορυφή 9) αντιπροσωπεύει το massetolide A. Παρουσιάζονται οι αριθμητικές τιμές των κορυφών, οι χρόνοι κατακράτησης, τα ονόματα και οι μάζες (m/z) των ψευδομοριακών ιόντων καθώς και η αμινοξική αλληλουχία της πεπτιδικής αλυσίδας για κάθε μία από τις κορυφές του χρωματογραφήματος.

Το βακτήριο *Pseudomonas putida* BW11M1, το οποίο απομονώθηκε από την περιοχή της ριζόσφαιρας, παράγει ένα μίγμα ομοειδών κυκλικών λιποπεπτιδίων, τα οποία χαρακτηρίζονται ως **xantholysins** (ξανθολυσίνες). Μετά από *in silico* ανάλυση στο BW11M1 βρέθηκαν τρία NRPSs που ορίζονται ως XtlA, XtlB και XtlC και περιλαμβάνουν δύο, τρεις και τέσσερις λειτουργικές μονάδες αντίστοιχα, με την κάθε μια να αποτελείται από μια C, T και A δομή (Li *et.al.*, 2013). Όπως στα περισσότερα γνωστά βιοσυνθετικά μονοπάτια των λιποπεπτιδίων σε βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, το δομικό στοιχείο τερματισμού του XtlC αποτελείται από δύο διαδοχικές δομές θειοεστεράσης (TE), τις TE1 και TE2 (Li *et.al.*, 2013).

Το βακτήριο *Pseudomonas entomophila* L48, παράγει το κυκλικό λιποπεπτίδιο **entolysin** (εντολυσίνη). Τα NRPSs γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεσή του entolysin A ορίζονται ως *etIA*, *etIB* και *etIC* (Vallet-Gely *et.al.*, 2010). Αναλύοντας την νουκλεοτιδική αλληλουχία των αμινοξέων, βρέθηκε ότι τα EtIA, EtIB και EtIC έχουν

δύο, οκτώ και τέσσερις δομικές μονάδες αντίστοιχα, που αντιστοιχούν και στον αριθμό των αμινοξέων που βρέθηκαν στο entolysin (Vallet-Gely *et.al.*, 2010). Συγκρίνοντας τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των xantholysin και entolysin, το *xtlA* ταυτίζεται κατά 75% με το *etlA*, το *xtlB* κατά 69% με το *etlB* και το *xtlC* ταυτίζεται κατά 72% με το *etlC*. Μετά από τη σύγκριση της πεπτιδικής αλυσίδας των xantholysin και entolysin A, παρατηρήθηκαν τουλάχιστον έξι σημεία στα οποία διέφεραν μεταξύ τους, ενώ βρέθηκε να έχουν μεγάλη δομική ομοιότητα με τα κυκλικά λιποπεπτίδια putisolvin (PsoABC) και WLIP (ένα λιποπεπτίδιο της οικογένειας των βισκοσινών) (WlpABC). Αυτές οι τέσσερις κατηγορίες που παράγονται από τα βακτηριακά είδη *Pseudomonas putida*, έχουν πολύ παρόμοια Α-δομή στις εναρκτήριες συνθάσες (EtlA, PsoA, XtlA and WlpA) (Vallet-Gely *et.al.*, 2010) (Εικόνα 7).

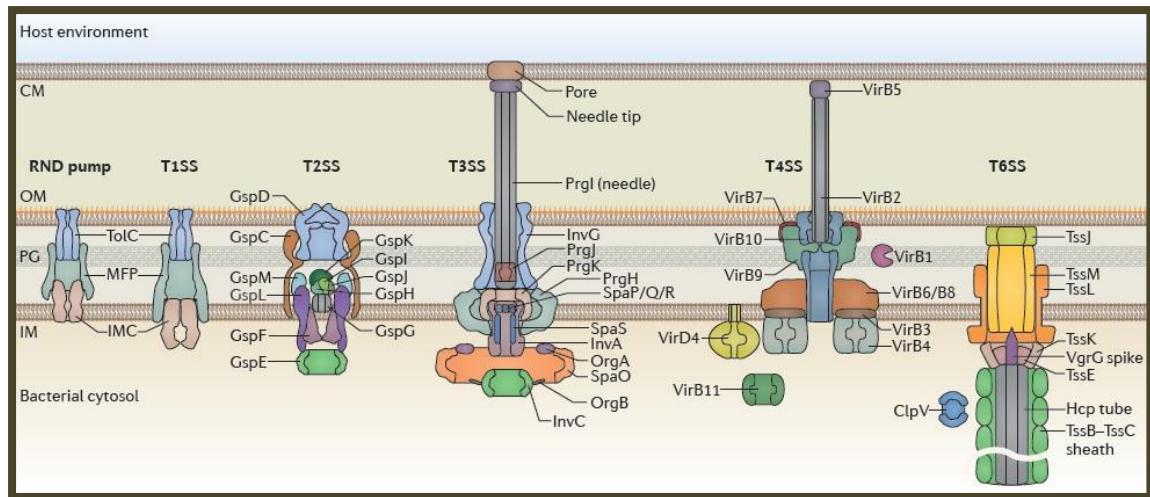


Εικόνα 7: Ένζυμα βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* με παρόμοιες Α δομές. Τα αντίστοιχα γονίδια έναρξης των NRPS βρίσκονται πιο απομακρυσμένα από τα ζεύγη γονιδίων που κωδικοποιούν για τα μεσαία και τελικά NRPSs γονίδια, εκτός του οπερονίου για την παραγωγή του putisolvin (PsoABC). Η σύνθεση της πεπτιδικής αλυσίδας από την διαδοχική δράση των δομικών στοιχείων, προχωρά με ένα συν-γραμμικό τρόπο, με την ενσωμάτωση του κάθε αμινοξέος στις θέσεις που τους αντιστοιχούν.

1.5 Εκκριτικά Συστήματα

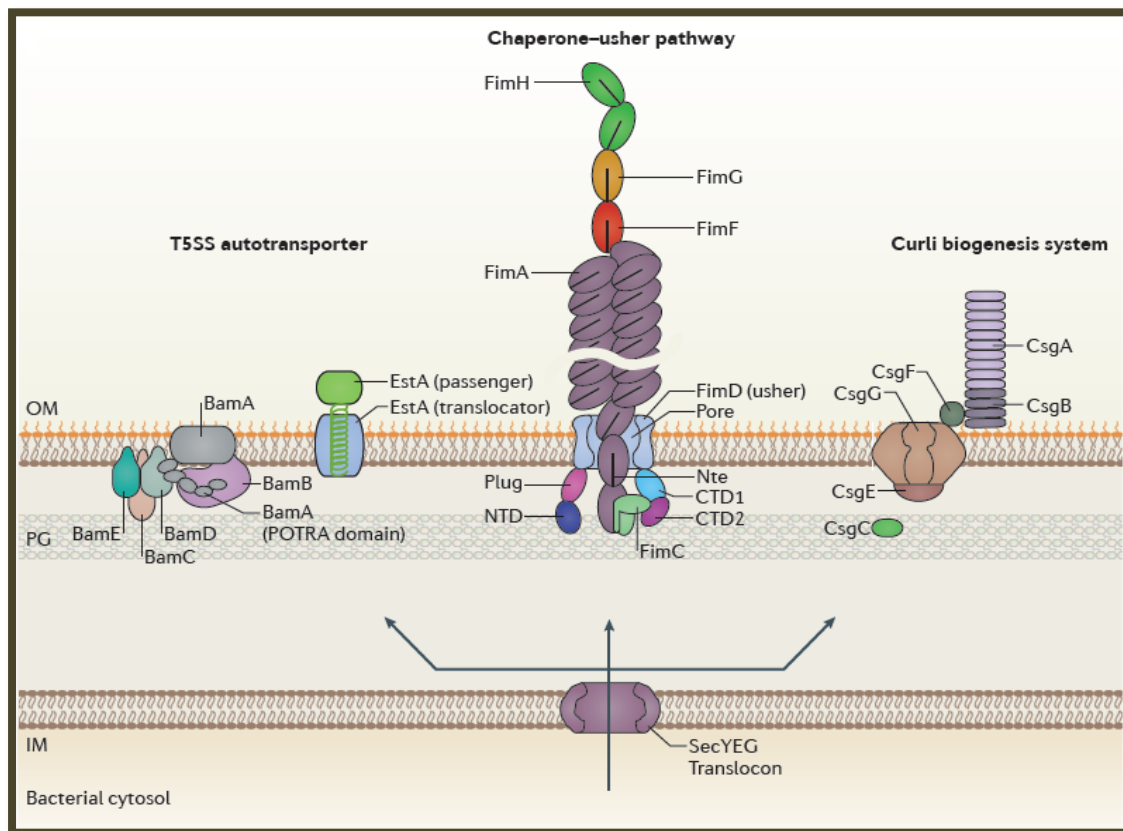
Τα βακτήρια έχουν αναπτύξει μια ευρεία ποικιλία εξειδικευμένων μακρομοριακών νανομηχανισμών, οι οποίοι εκκρίνουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων μικρών μορίων, πρωτεϊνών καθώς και του DNA (Costa *et.al.*, 2015). Αυτά τα υποστρώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στις αποκρίσεις των βακτηρίων στο περιβάλλον που διαβιούν, καθώς και σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες, όπως είναι η προσκόλληση, η παθογένεια, η προσαρμογή και η επιβίωση τους (Costa *et.al.*, 2015). Με την ταχεία συσσώρευση των αλληλουχιών των βακτηριακών γονιδιωμάτων, οι γνώσεις μας για την πολυπλοκότητα των βακτηριακών συστημάτων έκκρισης των πρωτεϊνών έχουν διευρυνθεί εκτενώς (Tseng *et.al.*, 2009). Ανάλογα με το εκκριτικό σύστημα, τα εκκρινόμενα υποστρώματα μπορεί να εμφανίσουν τρεις προτεινόμενες συμπεριφορές, είτε να παραμείνουν συνδεδεμένα στην εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων (OM), είτε να απελευθερωθούν στον εξωκυττάριο χώρο, είτε να εγχέονται σε ένα κύτταρο στόχο (τόσο ευκαρυωτικό όσο και προκαρυωτικό κύτταρο) (Gelach και Hensel, 2007). Στα κατά Gram αρνητικά βακτήρια, αυτοί οι μηχανισμοί μπορεί να χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, σε εκείνους που εκτείνονται τόσο στην **εξωτερική (OM)** όσο και στην **εσωτερική (IM) μεμβράνη**, και σε εκείνους που καλύπτουν μόνο την εξωτερική μεμβράνη (Gelach και Hensel, 2007).

Πέντε εκκριτικά συστήματα που εκτείνονται στη διπλή μεμβράνη έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα και ταξινομούνται ως τύπος I εκκριτικό σύστημα (T1SS), T2SS, T3SS, T4SS και T6SS.



Εικόνα 8: Απεικόνιση των εκκριτικών συστημάτων τύπου I (T1SS), T2SS, T3SS, T4SS και T6SS που εκτείνονται τόσο στην εσωτερική όσο και στην εξωτερική μεμβράνη.

Τα εκκριτικά συστήματα που εκτείνονται μόνο στην εξωτερική μεμβράνη, περιλαμβάνουν το T5SS και τους μηχανισμούς που συγκεντρώνουν τις αποφύσεις στην επιφάνεια των κυττάρων.



Εικόνα 9: Τύπου VI εκκριτικό σύστημα, που εκτείνεται μόνο στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου.

Η έκκριση των υποστρωμάτων διαμέσου του βακτηριακού φακέλου περιλαμβάνει τον εκκριτικό μηχανισμό είτε ενός, είτε δύο σταδίων (Rêgo *et.al.*, 2010). Εκτός από το T2SS, όλα τα διπλής μεμβράνης εκτεινόμενα εκκριτικά συστήματα, (T1SS, T3SS, T4SS και T6SS), χρησιμοποιούν τον μηχανισμό ενός σταδίου, έτσι ώστε τα υποστρώματα να μεταφέρονται απ' ευθείας από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα προς τον περιπλαστικό χώρο, είτε σε κάποιο κύτταρο στόχο (Rêgo *et.al.*, 2010). Τα OM εκτεινόμενα εκκριτικά συστήματα (το T5SS, το μονοπάτι της βοηθητικής πρωτεΐνης (chaperone) για τη βιογένεση του τύπου I ή του P τριχιδίου και το curli εκκριτικό σύστημα) και το εκτεινόμενο στη διπλή μεμβράνη εκκριτικό σύστημα T2SS, χρησιμοποιούν έναν μηχανισμό έκκρισης δύο σταδίων, όπου τα υποστρώματα κινούνται πρώτα στον περιπλαστικό χώρο από IM μεταφορείς, μέσω του **γενικού εκκριτικού μηχανισμού (Sec)** ή του **συστήματος μετατόπισης διπλής αργινίνης (Tat)** μηχανισμού και μεταφέρεται στη συνέχεια στην OM, είτε εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο μέσω ενός ειδικού OM εκκριτικού συστήματος (Tseng *et.al.*, 2009; Rêgo *et.al.*, 2010). Κανένα από τα επτά εκκριτικά συστήματα είναι συνεχώς ενεργά, γι' αυτό το λόγο έχει υποθεθεί ότι η έκκριση μπορεί να διεγερθεί από την αναγνώριση των υποδοχέων των ξενιστών από εξειδικευμένα μόρια προσκόλλησης, που ονομάζονται αδεσίνες (Gelach και Hensel, 2007).

1.5.1 Sec και Tat εκκριτικοί μηχανισμοί

Το γενικό εκκριτικό μονοπάτι (Sec) καθώς και το μονοπάτι μετατόπισης της διπλής αργινίνης (Tat), είναι καθολικά τόσο για τα βακτήρια, τα αρχαία, όσο και για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Müller, 2005; Papanikou *et.al.*, 2007; Albers *et.al.*, 2006). Στα αρχαία και τα θετικά κατά Gram βακτήρια τα δύο μονοπάτια είναι υπεύθυνα για την έκκριση των πρωτεϊνών δια μέσω της μονής πλασματικής μεμβράνης, ενώ στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι υπεύθυνα για την μεταφορά των πρωτεϊνών στο περιπλαστικό χώρο (Tseng *et.al.*, 2009). Οι περισσότερες πρωτεΐνες που μεταφέρονται από τα μονοπάτια Sec και Tat παραμένουν στο εσωτερικό του κυττάρου, είτε στον περιπλαστικό χώρο, είτε στην εσωτερική μεμβράνη (Green και Mecsas, 2016). Ωστόσο στα Gram⁻ βακτήρια οι πρωτεΐνες που μεταφέρονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη είτε στον περιπλαστικό χώρο του κυττάρου, μέσω του Sec ή του Tat μονοπατιού, μπορούν

είτε να παραμένουν σε αυτά τα διαμερίσματα, ή να μεταφέρονται εκτός του κυττάρου με τη βοήθεια ενός άλλου εκκριντικού συστήματος (Green και Mecsas, 2016). Παρ' όλο που οι Sec και Tat μηχανισμοί έχουν πολλά κοινά στοιχεία μεταξύ τους, μεταφέρουν τις πρωτεΐνες με πολύ διαφορετικό τρόπο (Green και Mecsas, 2016).

Οι πρωτεΐνες των βακτηρίων και των αρχαίων που βρίσκονται εκτός του κυτταροπλάσματος συνήθως συντίθενται με σηματοδοτικά αμινοτελικά πεπτίδια, που στοχεύουν είτε στο Sec, είτε στο Tat μονοπάτι εξαγωγής των πρωτεϊνών (Palmer *et.al.*, 2012). Η βασική λειτουργική διαφορά μεταξύ αυτών των δύο συστημάτων εξαγωγής, είναι ότι η συσκευή Sec μετατρέπει τα πολυπεπτίδια σε μία μη δομημένη κατάσταση, ενώ το Tat μονοπάτι μεταφέρει πρωτεΐνες που έχουν ήδη αναδιπλωθεί (Palmer *et.al.*, 2012). Το Sec μονοπάτι είναι καθολικά συντηρημένο, απαραίτητο και συνήθως αποτελεί την κύρια οδό εξαγωγής των πρωτεϊνών (Palmer *et.al.*, 2012). Αντιθέτως το Tat μονοπάτι έχει βρεθεί σε μερικά, αλλά όχι όλα, τα είδη βακτηρίων και αρχαίων και έχει χαρακτηριστεί ως απαραίτητο σε μερικούς μόνο οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου παθογόνου *Mycobacterium tuberculosis* (Saint-Joanis *et.al.*, 2006), του συμβιωτικού αζωτοδεσμευτικού βακτηρίου *Sinorhizobium meliloti* (Pickering *et.al.*, 2010) και του επιθετικού βακτηρίου *Bdellovibrio bacteriovorus* (Chang *et.al.*, 2011).

Συνήθως το Tat μονοπάτι μεταφέρει λιγότερες πρωτεΐνες από ότι το Sec μονοπάτι, αλλά παρ' όλα αυτά κατέχει καθοριστικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού της αναπνευστικής και φωτοσυνθετικής ενέργειας, στη απορρόφηση του φωσφόρου και του σιδήρου (Ize *et.al.*, 2004; Létoffé *et.al.*, 2009; Mickael *et.al.*, 2010), στην κυτταρική διαίρεση (Stanley *et.al.*, 2001), την κυτταρική κινητικότητα (Ochsner *et.al.*, 2002; Ding *et.al.*, 2003), το quorum sensing (Stevenson *et.al.*, 2007), τον μεταβολισμό των οργανοφωσφορικών (Gorla *et.al.*, 2009), την αντοχή σε βαρέα μέταλλα (Ize *et.al.*, 2004) και αντιμικροβιακά πεπτίδια (Weatherspoon-Griffin *et.al.*, 2007), καθώς και την καθήλωση του συμβιωτικού αζώτου (Meloni *et.al.*, 2003; Krehenbrink *et.al.*, 2008).

1.5.1.1 Sec Μονοπάτι

Μετά τη σύνθεση τους στο ριβόσωμα και μέχρι την άφιξή τους στη λειτουργική τους θέση, οι πρωτεΐνες έρχονται αντιμέτωπες με το μονοπάτι ωρίμανσής τους, το οποίο είναι γεμάτο εμπόδια (Nijeholt και Driessen, 2012). Για τους προκαρυώτες ένα τέτοιο εμπόδιο αποτελεί η εσωτερική μεμβράνη, κατά την οποία οι περισσότερες πρωτεΐνες κατευθύνονται είτε κατά μήκος της, είτε εντός της λιπιδιακής διπλοστοιβάδας (Nijeholt και Driessen, 2012). Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών κινούνται κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης μέσω του Sec μονοπατιού, το οποίο αποτελείται από ένα σύνολο κυτοσολικών και μεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες συνεργάζονται προκειμένου να διευκολύνουν την μεταφορά της εκκρινόμενης πρωτεΐνης (Nijeholt και Driessen, 2012). Αυτό το μονοπάτι παρέχει επίσης μία δίοδο για τις μεμβρανικές πρωτεΐνες να εισέρχονται εντός της εσωτερικής μεμβράνης (Nijeholt και Driessen, 2012).

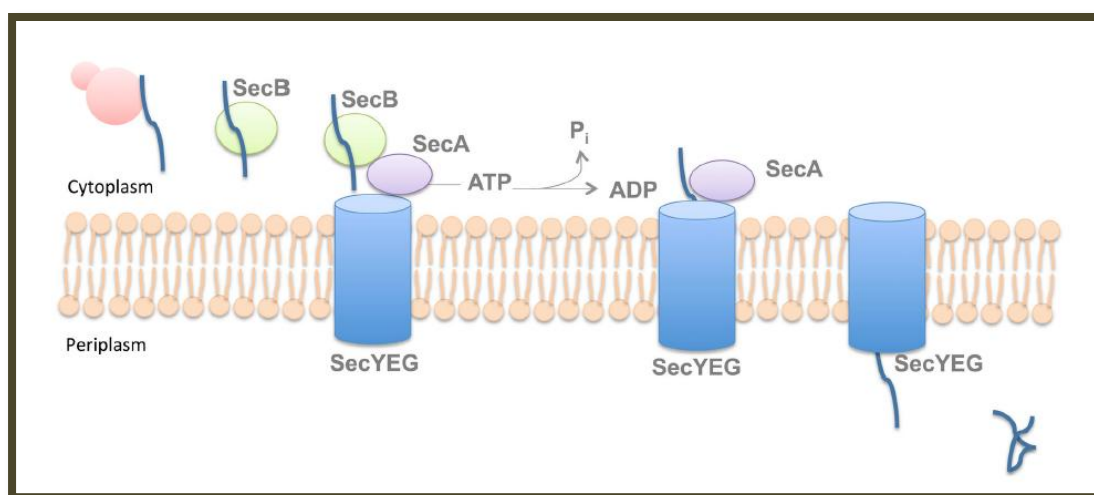
Το Sec μονοπάτι μεταφέρει κυρίως πρωτεΐνες στη μη αναδιπλωμένη τους μορφή (Green και Mecsas, 2016). Αυτό το σύστημα αποτελείται από τρία μέρη, μία πρωτεΐνη στόχο, μία πρωτεΐνη κινητήρα και ένα ολοκληρωμένο διαμεμβρανικό κανάλι αγωγής, το οποίο ονομάζεται **SecYEG** μεταθετάση (Paranikou *et.al.*, 2007). Όλες οι εκκρινόμενες και πιο σπάνια οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που χρησιμοποιούν το Sec εκκριτικό μονοπάτι συντίθενται ως 'προ- πρωτεΐνες' με N-τελικές σηματοδοτικές αλληλουχίες, οι οποίες απομακρύνονται πρωτεολυτικά σε μετα-μεταθετικό (μεταγενέστερο) στάδιο (Chatzi *et.al.*, 2013). Τα σηματοδοτικά πεπτίδια ξεχωρίζουν τις εκκριτικές πρωτεΐνες από εκείνες στο κυτταρόπλασμα, λειτουργούν ως σηματοδότες διεύθυνσης από το ριβόσωμα στη μεμβράνη και ενεργεί στη μεμβράνη ως αλλοστερικό στοιχείο για την ενεργοποίηση του Sec καναλιού (Hegde, και Bernstein, 2006; Gouridis *et.al.*, 2009). Μια βασική προϋπόθεση για τις Sec προ-πρωτεΐνες είναι ότι θα πρέπει να παραμένουν μη αναδιπλωμένες (Chatzi *et.al.*, 2013). Εξαιτίας των κύριων χαρακτηριστικών της δομής της αλυσίδας των προ-πρωτεϊνών και της χρήσης εξειδικευμένων βοηθητικών πρωτεϊνών, σχεδόν όλες οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες αποφεύγουν την αναδίπλωση και διατηρούνται σε μια μη φυσική κατάσταση (Paranikou *et.al.*, 2007; Akeda και Galán, 2005; Economou *et.al.*, 2006). Συχνά ο κεντρικός πυρήνας του Sec μηχανισμού, που περιλαμβάνει το SecYEG κανάλι, χειρίζεται τόσο την ενσωμάτωση στην πλασματική μεμβράνη,

καθώς και την έκκριση δια μέσω αυτής (Chatzi *et.al.*, 2013). Σε όλες τις περιπτώσεις η μεταφορά δεν είναι αυθόρμητη, αλλά απαιτεί εισροές μεταβολικής ενέργειας (Chatzi *et.al.*, 2013).

Η μετακίνηση εκτός του Sec μονοπατιού στηρίζεται σε μια υδρόφοβη σηματοδοτική αλληλουχία στο N-τελικό άκρο της εκκρινόμενης πρωτεΐνης, μήκους 20 αμινοξέων περίπου και περιέχει τρεις περιοχές, ένα θετικά φορτισμένο αμινοτελικό άκρο, έναν υδρόφοβο πυρήνα και ένα πολικό καρβοξυτελικό άκρο (Paranikou *et.al.*, 2007). Οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται στον περιπλαστικό χώρο, είτε εκτός του κυττάρου μέσω του Sec μονοπατιού, περιέχουν τις ειδικές **SecB** σηματοδοτικές αλληλουχίες, ενώ οι πρωτεΐνες που παραμένουν στην εσωτερική μεμβράνη περιέχουν ένα σωματίδιο αναγνώρισης σήματος (**SRP** σηματοδοτικές αλληλουχίες) (Paranikou *et.al.*, 2007).

1.5.1.1.1 Το SecB μονοπάτι

Σε πολλά αρνητικά κατά Gram βακτήρια, οι πρωτεΐνες που προορίζονται για μεταφορά εκτός του περιπλαστικού χώρου ή έξω από το κύτταρο, περιέχουν μια αφαιρούμενη σηματοδοτική αλληλουχία που αναγνωρίζεται από την SecB πρωτεΐνη. Αυτή η πρωτεΐνη χρησιμεύει ως συνοδός πρωτεΐνη (τσαπερόνη), που δεσμεύεται σε προ- εκκριτικές πρωτεΐνες και εμποδίζει την αναδίπλωσή τους (Randall και Hardy, 2002).

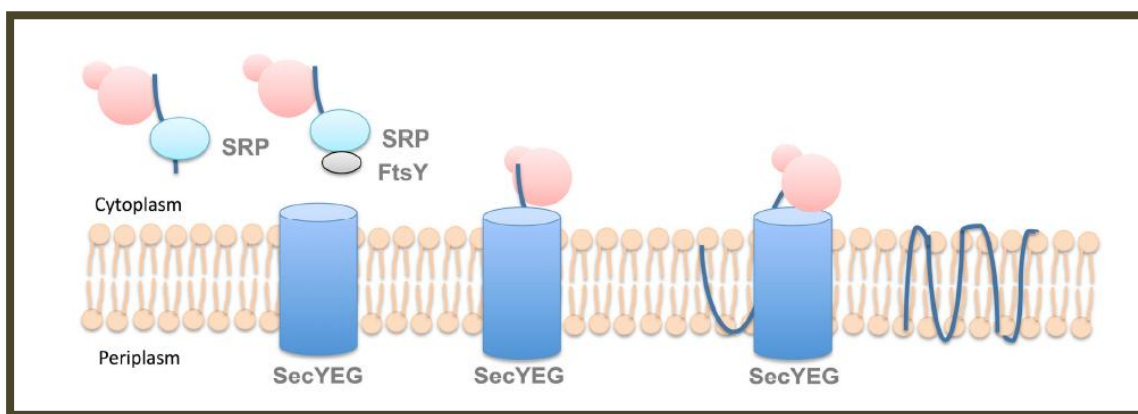


Εικόνα 10: Οι πρωτεΐνες που προορίζονται για τον περιπλαστικό χώρο (ή την εξωκυτταρική απελευθέρωση) μετατοπίζονται μέσω ενός μετα- μεταφραστικού μηχανισμού και περιέχει μια αφαιρούμενη σηματοδοτική αλληλουχία, η οποία αναγνωρίζεται από την SecB πρωτεΐνη. Η SecB δεσμεύει προ- εκκρινόμενες πρωτεΐνες και αποτρέπει την αναδίπλωσή τους, ενώ ταυτόχρονα μεταφέρει τα υποστρώματά τους στη SecA. Η SecA οδηγεί τις πρωτεΐνες στο SecYEG κανάλι και ταυτόχρονα χρησιμεύει ως ATPάση, παρέχοντας την απαραίτητη ενέργεια για την πρωτεϊνική μεταφορά. Πραγματοποιώντας τη μεταφορά μέσω του SecYEG καναλιού, οι πρωτεΐνες αναδιπλώνονται στο περίπλασμα (Green και Mecsas, 2016).

Η SecB τότε μεταφέρει τα υποστρώματά της στη SecA, μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που οδηγεί τις πρωτεΐνες στο SecYEG κανάλι και ταυτόχρονα λειτουργεί ως ATP-άση που παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την μεταφορά των πρωτεϊνών (Hartl *et.al.*, 1990). Πριν από τη μεταφορά διαμέσου του καναλιού, μια πρωτεάση αποκόπτει την SecB σηματοδοτική αλληλουχία από την πρωτεΐνη, και η εκκρινόμενη πρωτεΐνη στη συνέχεια αναδιπλώνεται κατά τη μεταφορά της στον περιπλαστικό χώρο (Mogensen και Otzen, 2005). Ενώ πολλές πρωτεΐνες που μετακινούνται μέσω του SecB μηχανισμού παραμένουν στον περιπλαστικό χώρο, μερικές τελικά θα γίνουν εξωκυττάριας (Green και Mecsas, 2016). Από τη στιγμή που αυτές οι πρωτεΐνες μετακινηθούν στον περιπλαστικό χώρο, μπορούν να μεταφερθούν κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης με τη βοήθεια των εκκριτικών συστημάτων T2SS και T4SS (Green και Mecsas, 2016).

1.5.1.1.2 Το SRP μονοπάτι

Το Sec σύστημα μπορεί να μεταφέρει επίσης πρωτεΐνες που προορίζονται να παραμείνουν στην εσωτερική μεμβράνη, μέσω του SRP μονοπατιού (Green και Mecsas, 2016).



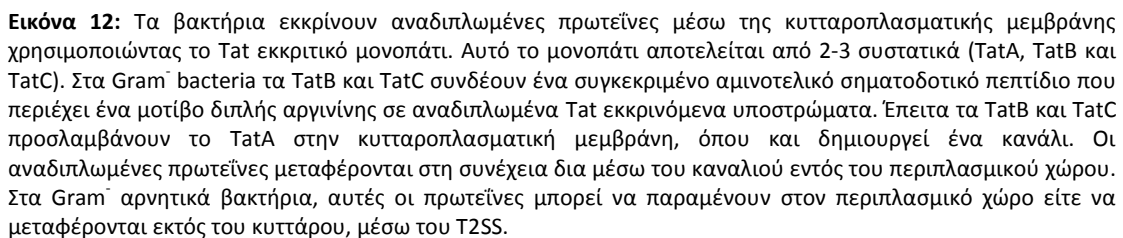
Εικόνα 11: Το Sec μονοπάτι χρησιμοποιεί έναν συν-μεταφραστικό μηχανισμό εξαγωγής για να εκκρίνει πρωτεΐνες που προορίζονται για την εσωτερική μεμβράνη. Αυτές οι πρωτεΐνες περιέχουν μια σηματοδοτική αλληλουχία που αναγνωρίζεται από SRP σωματίδιο. Κατά τη διάρκεια της μετάφρασης, το SRP σωματίδιο δεσμεύει τις πρωτεΐνες στόχους καθώς αυτές παράγονται από το ριβόσωμα και προσλαμβάνουν την πρωτεΐνη σύνδεσης FtsY. Η FtsY μεταφέρει το σύμπλοκο ριβόσωμα- πρωτεΐνη στο SecYEG κανάλι, το οποίο μεταφέρει τη νέα πρωτεΐνη δια μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς δια μέσω του καναλιού, η διαμεμβρανική δομή είναι σε θέση να εκκριθεί από την πλευρά του καναλιού εντός της μεμβράνης, όπου η πρωτεΐνη παραμένει προσκολλημένη (Green και Mecsas, 2016).

Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες συχνά περιέχουν υδρόφοβες περιοχές και για αυτό το λόγο μπορεί να είναι και ασταθείς (Green και Mecsas, 2016). Έτσι η έκκριση των πρωτεϊνών από το SRP μονοπάτι χρησιμοποιεί έναν συν- μεταφραστικό μηχανισμό

εξαγωγής, ο οποίος συνδέει τη μετάφραση της πρωτεΐνης από το ριβόσωμα με την έκκριση από το SecYEG κανάλι (Luirink και Sinning, 2004). Το SRP μονοπάτι στηρίζεται στο SRP σωματίδιο, το οποίο περιέχει ένα μικρό, 4,5S RNA τμήμα που δεσμεύεται σε μια πρωτεΐνη, την **Ffh** (Luirink και Sinning, 2004). Κατά τη διάρκεια της έκκρισης των πρωτεϊνών μέσω αυτού του μονοπατιού, το SRP πρώτα δεσμεύει τη διαμεμβρανική περιοχή των πρωτεϊνών, όπως προκύπτουν από το ριβόσωμα και στη συνέχεια δεσμεύει τη πρωτεΐνη σύνδεσης **FtsY**, η οποία μεταφέρει το σύμπλοκο ριβόσωμα- πρωτεΐνη στο SecYEG κανάλι (Sijbrandi *et.al.*, 2003; Papanikou *et.al.*, 2007). Η μετάφραση της πρωτεΐνης οδηγεί στη συνέχεια την έκκριση της εν τω γεννάσθαι πρωτεΐνης, μέσα στο κανάλι (Green και Mecsas, 2016). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, η διαμεμβρανική δομή της πρωτεΐνης διαφεύγει δια μέσου του καναλιού, εντός της μεμβράνης, όπου και παραμένει προσκολλημένη (Paetzel *et.al.*, 2002).

1.5.1.2 Tat μονοπάτι

Τα βακτήρια και οι χλωροπλάστες έχουν διακριτές πορείες για τη μεταφορά των πρωτεϊνών εντός ή δια μέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, για τα βακτήρια, ή των μεμβρανών των θυλακοειδών, για τους χλωροπλάστες (Müller και Klösger, 2005). Τα μονοπάτια αυτά διαφέρουν ως προς το είδος των πρωτεϊνών που μεταφέρουν και ο μηχανισμός με τον οποίο λειτουργούν είναι εξαιρετικά συντηρημένος μεταξύ του προκαρυώτη και του ενδοσυμβιωτικού οργανιδίου (Müller και Bernd Klösger, 2005). Στα βακτήρια, οι περισσότερες από τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες διασχίζουν την κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω του συντηρημένου Sec μονοπατιού, στη μη αναδιπλωμένη διαμόρφωσή τους, ενώ μόνο ένα σύνολο βακτηριακών πρωτεϊνών εξάγεται μέσω του μονοπατιού της διπλής αργινίνης (De Keyser *et.al.*, 2003; Müller *et.al.*, 2000). Σε αντίθεση με το Sec μονοπάτι, το Tat μονοπάτι κατά κύριο λόγο εκκρίνει πρωτεΐνες οι οποίες είναι πλήρως αναδιπλωμένες (Robinson και Bolhuis, 2004). Το όνομα Tat επινοήθηκε από το χαρακτηριστικό μοτίβο της διπλής αργινίνης που είναι παρόν στο αμινοτελικό άκρο (N- περιοχή) της σηματοδοτικής αλληλουχίας του Tat υποστρώματος (Berks, 1996; Chaddock *et.al.*, 1995).



40

(Müller, 2005). Η Tat σηματοδοτική αλληλουχία περιέχει ένα ζευγάρι αργινινών στο S-R-R μοτίβο στο αμινοτελικό άκρο της αναδιπλωμένης πρωτεΐνης (Müller, 2005). Ενώ κάθε μια από αυτές τις τρεις πρωτεΐνες όταν απουσιάζει, μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την μεταφορά της εξαρτώμενης διπλής αργινίνης (R-R) (Müller και Klösigen, 2005). Παρά το γεγονός ότι οι περισσότερες πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το Tat μονοπάτι στα κατά Gram θετικά βακτήρια απελευθερώνονται εξωκυτταρικά, στα κατά Gram αρνητικά βακτήρια, οι πρωτεΐνες μπορούν είτε να παραμείνουν στον περιπλασμικό χώρο, ή να μεταφερθούν εκτός του κυττάρου, με τη βοήθεια του TSS2 εκκριτικού μηχανισμού (Green και Mecsas, 2016).

Ενώ το Tat μονοπάτι είναι σημαντικό για τη φυσιολογία και την επιβίωση τόσο των παθογόνων, όσο και των μη παθογόνων βακτηρίων, ένας μεγάλος αριθμός παθογόνων βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων των *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner *et.al.*, 2002), *Yersinia pseudotuberculosis* (Lavander *et.al.*, 2006) και *E. coli* O157:H7 (Pradel *et.al.*, 2003), απαιτούν ένα λειτουργικό Tat μονοπάτι για πλήρη μολυσματικότητα. Το ένζυμο της φωσφολιπάσης -C είναι ένα αξιόλογο παράδειγμα Tat εκκρινόμενων πρωτεϊνών που χρησιμεύουν ως λοιμογόννοι παράγοντες για έναν μεγάλο αριθμό παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων των *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner *et.al.*, 2002), *Legionella pneumophila* (Rossier και Cianciotto, 2005) και του *Mycobacterium tuberculosis* (McDonough *et.al.*, 2008). Αυτά τα ένζυμα, τα οποία διασπούν τα φωσφολιπίδια αμέσως πριν τη φωσφορική ομάδα, μπορούν να εξυπηρετήσουν ένα πλήθος λειτουργιών κατά τη διάρκεια της μόλυνσης, όπως είναι η καταστολή της δραστηριότητας των ανοσοποιητικών κυττάρων καθώς και η επαγωγή της ενδοκυτταρικής επιβίωσης (Songer, 1997).

1.5.2 Type I Secretion System

Το εκκριτικό σύστημα τύπου I (T1SS), έχει βρεθεί σε έναν μεγάλο αριθμό κατά Gram αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων παθογόνων των φυτών και των ζώων, όπου μεταφέρουν τα υποστρώματά τους με μια διαδικασία του ενός σταδίου, κατά μήκος της εσωτερικής και της εξωτερικής βακτηριακής μεμβράνης (Thomas *et.al.*, 2014). Σε αντίθεση με άλλα συστήματα μεταφοράς των πρωτεϊνών που βρέθηκαν στα Gram αρνητικά βακτήρια, το T1SS μοιάζει πολύ με μια μεγάλη οικογένεια ATP- δεσμευόμενης κασέτας μεταφορέων (ABC μεταφορείς), οι οποίοι

εξάγουν μικρά μόρια, όπως είναι αντιβιοτικά και τοξίνες εξωτερικά του κυττάρου (Symmons *et.al.*, 2009). Μερικά βακτήρια μπορεί να έχουν πολλά τύπου I εκκριτικά συστήματα, καθ' ένα από τα οποία στοχεύουν στη μεταφορά ενός ή περισσότερων μη αναδιπλωμένων υποστρώματων (Delepelaire, 2004). Αυτά τα υποστρώματα ποικίλουν σε λειτουργία και περιλαμβάνουν πεπτικά ένζυμα, όπως είναι οι πρωτεάσες και οι λιπάσες, αδεσίνες, αιμοδεσμευόμενες πρωτεΐνες και πρωτεΐνες με επαναλήψεις στα μοτίβα των τοξινών (Repeats in Toxins Motifs, **RTX**) (Green και Mecsas, 2016). Τα υποστρώματα του T1SS είναι γενικά ανεξάρτητα του Sec μονοπατιού και συνήθως περιέχουν μια C- τελική σηματοδοτική αλληλουχία που αναγνωρίζεται από το T1SS και παραμένει μη διασπασμένο (Green και Mecsas, 2016).

Το εκκριτικό σύστημα τύπου I, αποτελείται από τρία βασικά δομικά συστατικά. Μία ABC πρωτεΐνη μεταφοράς στην εσωτερική μεμβράνη, μια πρωτεΐνη σύντηξης της μεμβράνης (Membrane Fusion Protein, **MFP**) που διασχίζει την εσωτερική μεμβράνη και τη γεφυρώνει με τον συντελεστή εξωτερικής μεμβράνης (Outer Membrane Factor, **OMF**), στην εξωτερική μεμβράνη (Thomas *et.al.*, 2014). Το συστατικό του ABC μεταφορέα καταλύει το ATP προκειμένου να διοχετεύει την απαραίτητη ενέργεια για τη μεταφορά του υποστρώματος, αλληλεπιδρά με την MFP, ενώ συμμετέχει και στην αναγνώριση του υποστρώματος (Kanonenberg *et.al.*, 2013). Η MFP συνεργάζεται με τον ABC μεταφορέα στην εσωτερική μεμβράνη και εκτείνεται στον περιπλαστικό χώρο προκειμένου να συνδεθεί με τον OMF (Letoffe *et.al.*, 1996; Pimenta *et.al.*, 1999; Lee *et.al.*, 2012). Πιο συγκεκριμένα ο OMF δημιουργεί έναν πόρο στην εξωτερική μεμβράνη που επιτρέπει τη μετακίνηση του υποστρώματος στη μη αναδιπλωμένη του μορφή (Green και Mecsas, 2016).

Οι ABC μεταφορείς του T1SS χωρίζονται περαιτέρω σε τρεις κατηγορίες με βάση τις αμινοτελικές τους αλληλουχίες (Kanonenberg *et.al.*, 2013). Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τους ABC μεταφορείς οι οποίοι την περιοχή πεπτιδάσης C39, η οποία ανήκει με βάση το δομικό μοτίβο στην υπεροικογένεια της παπαΐνης και έχουν σκοπό να αναγνωρίζουν και να διασπούν το αμινοτελικό άκρο των υποστρώματων. Η δεύτερη κατηγορία των ABC μεταφορέων περιέχουν μια περιοχή πεπτιδάσης που ομοιάζει της C39 (CDL), η οποία στερείται πρωτεολυτικής δραστηριότητας και ως εκ τούτου δεν μπορεί να διασπάσει τα ορισμένα του υποστρώματα (Lecher *et.al.*,

2012). Τα υποστρώματα των ABC μεταφορέων με τις CDL περιοχές, περιέχουν γενικά RTX μοτίβα και είναι πολύ μεγαλύτερα από εκείνα που εκκρίνονται από τους ABC μεταφορείς που περιέχουν τη C39 πεπτιδάση. Τα RTX μοτίβα έχουν την ικανότητα να συμπλοκοποιούνται με το ασβέστιο της εξωκυτταρικής περιοχής και όχι σε ενδοκυτταρικό επίπεδο. Η συμπλοκοποίηση αυτών των πρωτεϊνών με το ασβέστιο οδηγεί στην αναδίπλωσή τους, με αποτέλεσμα να παραμένουν στη μη αναδιπλωμένη τους μορφή όσο βρίσκονται εντός του κυττάρου (Linhartová *et.al.*, 2010). Τέλος οι ABC μεταφορείς της τρίτης κατηγορίας στερούνται κάθε επιπρόσθετης αλληλουχίας στην αμινοτελική περιοχή τους. Τα υποστρώματά τους μπορεί να περιέχουν είτε όχι RTX μοτίβα, σε μικρότερο ωστόσο μέγεθος από εκείνα των υποστρώματα των ABC μεταφορέων με τις CDL περιοχές, ενώ έχουν σήματα έκκρισης στην C-τελική περιοχή τους (Delepelair, 2004).

1.5.3 Type II Secretion System

Το εκκριτικό σύστημα τύπου II (T2SS) είναι συντηρημένο στα περισσότερα είδη των Gram αρνητικών βακτηρίων, μεταφέροντας πρωτεΐνες από τον περιπλασμικό χώρο προς το εξωκυτταρικό περιβάλλον. Επειδή το κανάλι διόδου του T2SS βρίσκεται μόνο στην εξωτερική μεμβράνη, οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω αυτού του μηχανισμού πρέπει πρώτα να μεταφέρονται στον περιπλασμικό χώρο μέσω του Sec ή Tat εκκριτικού μονοπατιού, προκειμένου να μεταφερθούν τα πρωτεϊνικά υποστρώματα διαμέσου της εσωτερικής μεμβράνης (Green και Mecsas, 2016). Για το λόγο αυτό τα υποστρώματα του T2SS θα πρέπει να έχουν μία Sec- ή Tat- τύπου διασπώμενη αλληλουχία στο αμινοτελικό τους άκρο (Korotkov *et.al.*, 2012). Ταυτόχρονα επειδή το τύπου II εκκριτικό σύστημα, εκκρίνει υποστρώματα στην αναδιπλωμένη τους μορφή, οι πρωτεΐνες που μεταφέρονται δια μέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης από το Sec μονοπάτι θα πρέπει να αναδιπλώνονται στον περιπλασμικό χώρο πριν την εξαγωγή τους μέσω του T2SS.

Τα εκκριτικά συστήματα τύπου II έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν μια ποικιλία εξειδικευμένων υποστρωμάτων, εκτός του βακτηριακού κυττάρου, συμβάλλοντας στη μολυσματικότητα των βακτηριακών παθογόνων (Korotkov *et.al.*, 2012). Σε αρκετά βακτηριακά είδη, απαιτείται από το T2SS η έκκριση πολλαπλών υποστρωμάτων, ενώ σε άλλα χρησιμοποιείται για τη μεταφορά μίας μόνο

πρωτεΐνης (Cianciotto *et.al.*, 2005). Αυτές οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες μπορεί να έχουν πολλαπλές βιολογικές λειτουργίες, αλλά κατά κύριο λόγο είναι ένζυμα όπως, πρωτεάσες, λιπάσες και φωσφατάσες, καθώς και αρκετές πρωτεΐνες που επεξεργάζονται υδατάνθρακες (Korotkov *et.al.*, 2012).

Τα τύπου II εκκριτικά συστήματα, είναι πολύπλοκα και αποτελούνται από 15 διαφορετικές πρωτεΐνες, οι οποίες χωρίζονται σε τέσσερις υποκατηγορίες, το σύμπλοκο της εξωτερικής μεμβράνης, την πλατφόρμα της εσωτερικής μεμβράνης, την εκκρινόμενη ΑΤΡάση και τα ψευδοτριχίδια (Korotkov *et.al.*, 2012). Το σύμπλοκο της εξωτερικής μεμβράνης, όπου και βρίσκεται, χρησιμεύει ως κανάλι μετατόπισης των αναδιπλωμένων υποστρωμάτων του T2SS από τον περιπλασμικό χώρο (Korotkov *et.al.*, 2011). Το κανάλι αυτό συντίθεται από μια πολυμερή πρωτεΐνη, την σεκρετίνη (secretin) η οποία αποτελείται από μια μακριά αμινοτελική αλληλουχία, η οποία πιστεύεται ότι εκτείνεται από την εξωτερική μεμβράνη προς τον περιπλασμικό χώρο, προκειμένου να έρθει σε επαφή και με τις άλλες πρωτεΐνες του T2SS της εσωτερικής μεμβράνης (Korotkov *et.al.*, 2011). Η πλατφόρμα της εσωτερικής μεμβράνης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο κατά τη διαδικασία της έκκρισης, επικοινωνώντας με την σεκρετίνη, τα ψευδοτριχίδια και την ΑΤΡάση προκειμένου να συντονίζει την έκκριση των υποστρωμάτων (Korotkov *et.al.*, 2012). Η ΑΤΡάση βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και παρέχει την απαραίτητη ενέργεια στο σύστημα, ενώ ο ρόλος των ψευδοτριχιδίων, όπως ορίζει και το όνομά τους, είναι εξελικτικά σχετική και δομικά παρόμοια με πρωτεΐνες των IV τριχιδίων (pili) των βακτηριακών, κυτταρικών επιφανειών καθώς και σε άλλα βακτηριακά συστήματα (Korotkov *et.al.*, 2012; Sauvonnet *et.al.*, 2000). Έτσι κατά το εκκριτικό σύστημα τύπου II, η κυτταροπλασματική ΑΤΡάση οδηγεί στην απόσυρση των ψευδοτριχιδίων προκειμένου να μεταφερθούν οι αναδιπλωμένες, εκκρινόμενες πρωτεΐνες από τον περιπλασμικό χώρο, μέσω του καναλιού της σεκρετίνης, στον εξωκυττάριο χώρο (Korotkov *et.al.*, 2012; Hobbs και Mattick, 1993; Shevchik *et.al.*, 1997).

1.5.4 Type III Secretion System

Το εκκριτικό σύστημα τύπου III (**T3SS**), συναντάται σε Gram αρνητικά βακτήρια που αλληλεπιδρούν τόσο με φυτικούς όσο και με ζωικούς ξενιστές, είτε ως παθογόνα

είτε ως συμβιωτές (Cornelis, 2006; Grant *et.al.*, 2006; Mota και Cornelis, 2005). Το εκκριτικό σύστημα τύπου III έχει χαρακτηριστεί ως injectisome και ως μηχανισμός που παραπέμπει σε 'βελόνα- σύριγγα', εξαιτίας της δομής του, έχοντας κοινή εξελικτική προέλευση με το βακτηριακό μαστίγιο (Cornelis, 2006). Κύριος ρόλος αυτού του μηχανισμού είναι να εκκρίνει μια ευρεία ποικιλία πρωτεϊνικών υποστρωμάτων κατά μήκος της εσωτερικής και της εξωτερικής βακτηριακής μεμβράνης, εντός του κυτταροπλάσματος των κυττάρων ξενιστών, όπου και ρυθμίζουν ένα μεγάλο εύρος των κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων των ανοσολογικών και αμυντικών αντιδράσεων (Grant *et.al.*, 2006; Mota και Cornelis, 2005). Ταυτόχρονα τα περισσότερα T3SS μεταφέρουν τα υποστρώματα τους στην εσωτερική μεμβράνη ενός ευκαρυωτικού κυττάρου- στόχο ακολουθώντας τα ίδια βήματα. Ενώ αρχικά είχαν ανακαλυφθεί σε παθογόνα βακτήρια, οι μηχανισμοί του εκκριτικού συστήματος τύπου III έχουν ταυτοποιηθεί και σε αζωτορρυθμιστικά ριζόβια, συμβιωτές των φυτών, της μύγας τσε-τσε (*Sodalis glossinidius*), του νηματώδους (*Photorhabdus Luminescens*) και του ανθρώπινου συμβιωτικού βακτηρίου *Pantonea agglomerans*, αποδεικνύοντας ότι το T3SS αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των αλληλεπιδράσεων του ξενιστή με το μικροβίωμα, παρά με την παθογένεια ειδικότερα (Cornelis, 2006).

Έχουν βρεθεί επτά οικογένειες μηχανισμών του εκκριτικού συστήματος τύπου III, εκ των οποίων οι δύο έχουν ταυτοποιηθεί σε φυτοπαθογόνα βακτήρια (Hrp1 και Hrp2), ενώ το T3SS των ριζόβιων βακτηρίων σχηματίζουν μια ξεχωριστή οικογένεια (Cornelis, 2006). Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν επτά οικογένειες μηχανισμών, το T3SS αποτελείται από 9 βασικές πρωτεΐνες, υψηλά συντηρημένες μεταξύ όλων των μηχανισμών, που ονομάζονται **Hrp** πρωτεΐνες στην περίπτωση των φυτοπαθογόνων βακτηρίων, 8 εκ των οποίων είναι επίσης συντηρημένες για τον μηχανισμό του μαστιγίου και έχει βρεθεί ότι σχετίζονται εξελικτικά με την πρωτεΐνη φλαγκελίνη (flagellin) (Cornelis, 2006; Abrusci *et.al.*, 2014; Burkinshaw και Strynadka, 2014; Kubori *et.al.*, 1998). Εκτός αυτών των 9 βασικών πρωτεϊνών, τα εκκριτικά συστήματα τύπου III έχουν επιπλέον 10 με 20 πρωτεΐνες που παίζουν είτε καθοριστικό είτε σημαντικό ρόλο για τη λειτουργία τους. Τα δομικά συστατικά του T3SS κωδικοποιούνται συνήθως από γονίδια οργανωμένα σε οπερόνια, που μπορούν να βρεθούν είτε στις περιοχές παθογένειας του βακτηριακού

χρωμοσώματος, είτε σε πλασμίδια και υπόκεινται συνήθως σε οριζόντια μεταφορά γονιδίων (Green και Mecsas, 2016). Το T3SS μπορεί να χωρισθεί σε τρία κύρια συστατικά, το βασικό σώμα ή βασικό σύμπλεγμα, το εξάρτημα της βελόνας και το σύμπλεγμα μετατόπισης (translocon) (Abrusci *et.al.*, 2014). Το βασικό σύμπλεγμα περιέχει συστατικά του κυτταροπλάσματος και καλύπτουν την εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη, σχηματίζοντας μια δομή που μοιάζει με πρίζα και αποτελείται από πολλούς δακτυλίους με μία κεντρική ράβδο (Kubori *et.al.*, 1998). Στα περισσότερα συστήματα το βασικό σύμπλεγμα αποτελείται από 15 πρωτεΐνες (Abrusci *et.al.*, 2014; Burkinshaw και Strynadka, 2014).

Το σύμπλοκο του T3SS άκρου, που βρίσκεται εξωτερικά στην άκρη της βελόνας, παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανίχνευση των κυττάρων ξενιστών και ρυθμίζουν την έκκριση των τελεστών (Price *et.al.*, 1991; Picking *et.al.*, 2005). Επίσης είναι απαραίτητο για την εισαγωγή του καναλιού μετατόπισης εντός της μεμβράνης των κυττάρων ξενιστών (translocon ή translocation channel) (Picking *et.al.*, 2005; Holmström *et.al.*, 2001). Αυτό το κανάλι μετατόπισης είναι απαραίτητο για τη διέλευση των τελεστών μέσω των μεμβρανών του κυττάρου ξενιστή, αλλά όχι για την έκκριση αυτών εκτός του βακτηρίου (Håkansson *et.al.*, 1993; Håkansson *et.al.*, 1996). Τα κανάλια μετατόπισης συναρμολογούνται κατά την επαφή τους με τα κύτταρα του ξενιστή και σχηματίζουν έναν πόρο που είναι απαραίτητος για την μεταφορά του τελεστή (Holmström *et.al.*, 2001).

Η μεταφορά των τελεστών του T3SS στα κύτταρα- ξενιστών, είναι απαραίτητη για τη μολυσματικότητα πολλών παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων ειδών *Yersinia*, *Salmonella* και *Shigella* (Büttner, 2012). Τα τελευταία 25 χρόνια έχει γίνει μεγάλη έρευνα για την κατανόηση των λειτουργιών των τελεστών- πρωτεϊνών του TIII εκκριτικού συστήματος, οι οποίες ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των διαφόρων παθογόνων καθώς και στις επιπτώσεις τους στα κύτταρα των ξενιστών (Angot *et.al.*, 2007; Ham *et.al.*, 2011; Spanò και Galán, 2013; Tosi *et.al.*, 2013).

1.5.5 Type IV Secretion System

Τα εκκριτικά συστήματα τύπου IV (**T4SS**), σχετίζονται άμεσα με τα συστήματα σύζευξης του βακτηριακού DNA και μπορούν να εκκρίνουν μία ευρεία ποικιλία υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των απλών πρωτεϊνών, συμπλέγματα

πρωτεϊνών, είτε συμπλέγματα πρωτεϊνών με DNA (Cascales και Christie, 2003). Τα εκκριτικά συστήματα τύπου IV εκκρίνουν υποστρώματα σε μία ευρεία ποικιλία κυττάρων ξενιστών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, είτε του ίδιου είτε διαφορετικού είδους, καθώς και σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Αυτά τα μακρομοριακά συμπλέγματα συναντώνται κυρίως στα κατά Gram αρνητικά βακτήρια, όπου μεταφέρουν τα υποστρώματα δια μέσω των εσωτερικών όσο και εξωτερικών μεμβρανών. Όπως το T3SS, έτσι και το T4SS μπορεί να εκτείνεται ως την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή, επιτρέποντας την άμεση μεταφορά των υποστρωμάτων εντός του κυτταροπλάσματος του κυττάρου στόχου. Καθώς το T4SS έχει τη δυνατότητα να μεταφέρει DNA όσο και πρωτεΐνες, μπορεί να πραγματοποιήσει ένα πλήθος λειτουργιών, όπως είναι η συζευκτική μεταφορά του DNA, η πρόσληψη και η απελευθέρωση του DNA καθώς και η μεταφορά των πρωτεϊνών τελεστών ή των συμπλεγμάτων πρωτεϊνών και DNA- πρωτεϊνών απευθείας στα κύτταρα στόχους.

Πολλοί οργανισμοί έχουν ομόλογα τύπου IV εκκριτικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων *Agrobacterium tumefaciens* C58 (VirB), *Helicobacter pylori* (CAG; ComB), *Pseudomonas aeruginosa* (TraS/TraB), *Bordetella pertussis* (Ptl), *E. coli* (Tra), *Legionella pneumophila* (Dot), καθώς και ο αζωτοβελτιωτικός φυτοσυμβιωτικός οργανισμός *Mesorhizobium loti* (Christie και Cascales, 2005; Hubber *et.al.*, 2007). Μπορεί τα συστήματα αυτά να έχουν λειτουργικές ομοιότητες, δεν έχουν ωστόσο όλα τον ίδιο συνδυασμό γονιδίων (Saier, 2006). Από όλα τα T4SS που έχουν χαρακτηριστεί, η μόνη κοινή πρωτεΐνη είναι η VirB10 (TrbI).

Το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* αποτελεί τον οργανισμό μοντέλο για τη μελέτη του T4SS, επικεντρώνοντας τη προσοχή στο VirB/D σύστημα. Το VirB/D του T4SS περιέχει 12 πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάζονται VirB1- VirB11 και VirD4 (Fronzes *et.al.*, 2009). Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες συνδέονται με την εξωτερική μεμβράνη και είναι πολλαπλών αντιγράφων, αλληλεπιδρώντας τόσο με τον εαυτό τους, όσο και μεταξύ τους. Οι VirB6-10 πρωτεΐνες βρίσκονται στον περιπλασμικό χώρο, την εσωτερική και την εξωτερική μεμβράνη και σχηματίζουν το κανάλι έκκρισης, καθώς και τις πρωτεΐνες πρόσβασης. Οι VirB4, VirB11 και VirD4 εντοπίζονται στην εσωτερική μεμβράνη και χρησιμεύουν ως ATP-ασες που

τροφοδοτούν το σύστημα με ενέργεια. Επιπλέον η VirD4 λειτουργεί και ως πρωτεΐνη σύζευξης που συνδέει τις πρωτεΐνες πριν από την έκκρισή τους, μέσω του καναλιού έκκρισης. Γενικά το T4SS περιλαμβάνει και ένα εξωκυτταρικό νημάτιο, το οποίο συντίθεται από μία κύρια (VirB2) και μία δευτερεύουσα (VirB5) υπομονάδα.

Το υπόστρωμα DNA ή πρωτεΐνης, πρώτα έρχεται σε επαφή με την VirD4, η οποία λειτουργεί σαν μοριακή πύλη στη βάση του εκκριτικού μηχανισμού και το μεταφέρει στη VirB11, η οποία στη συνέχεια μεταφέρει το υπόστρωμα στο σύμπλοκο του καναλιού της εσωτερικής μεμβράνης (Atmakuri *et.al.*, 2004). Τέλος, το υπόστρωμα μεταφέρεται κατά μήκος του περιπλασμικού χώρου στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο της εξωτερικής μεμβράνης.

Ο ακριβής ρόλος του νηματίου του T4SS δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί πλήρως. Μια υπόθεση είναι ότι χρησιμεύει απλώς ως συσκευή σύνδεσης, επιτρέποντας έτσι στα βακτήρια να έρχονται σε άμεση επαφή με τα κύτταρα στόχους (Fronzes *et.al.*, 2009). Από την άλλη πιστεύεται ότι το νημάτιο μπορεί στην πραγματικότητα να λειτουργήσει ως ο αγωγός για τη μεταφορά του υποστρώματος, ιδιαίτερα εντός των κυττάρων ξενιστών (Babić *et.al.*, 2008).

Πολλά παθογόνα βακτήρια έχουν βρεθεί να χρησιμοποιούν το T4SS για τη μολυσματικότητα τους, μεταξύ των οποίων το *Neisseria gonorrhoeae*, το οποίο χρησιμοποιεί το T4SS ώστε να μεσολαβήσει για την πρόσληψη του μολυσματικού γονιδίου, το *Helicobacter pylori* και το *Legionella pneumophila*, τα οποία χρησιμοποιούν το T4SS για τη μεταφορά των πρωτεϊνών τελεστών ενός των κυττάρων ξενιστών κατά τη διάρκεια της λοίμωξης, με σκοπό τη διάταξη των στρατηγικών της άμυνάς τους Hamilton και Dillard, 2006; Backert και Meyer, 2006). Αυτές οι πρωτεΐνες τελεστές έχουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών. Για παράδειγμα το ενδοκυτταρικό παθογόνο *Legionella pneumophila* χρησιμοποιεί το T4SS προκειμένου να μεταφέρει πάνω από 200 πρωτεΐνες τελεστές εντός των κυττάρων ξενιστών, όπου και παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση της αρχιτεκτονικής του κυττάρου, δημιουργώντας κατάλληλες συνθήκες για τη βακτηριακή αντιγραφή (Isberg *et.al.*, 2009).

1.5.6 Type V Secretion System

Υπάρχουν τρεις υποκατηγορίες του τύπου V εκκριτικού μηχανισμού (**T5SS**). Οι αρχέτυπες βακτηριακές πρωτεΐνες που εκκρίνονται μέσω του T5SS (T5aSS

υποκατηγορία), αποτελούνται από μία **N- τελική περιοχή μεταφοράς**, μεγέθους 40-400 Kd, μια δομή σύνδεσης και από μια **συντηρημένη μεταθετή C- τελική περιοχή**, η οποία σχηματίζει δομή βήτα βαρελίου (beta barrel) (Jacob-Dubuisson *et.al.*, 2004; Dautin και Bernstein, 2007; Bernstein, 2007; Henderson *et.al.*, 2004). Οι πρωτεΐνες συντίθενται από ένα N- τελικό σηματοδοτικό πεπτίδιο, το οποίο κατευθύνει την εξαγωγή τους στον περιπλαστικό χώρο, μέσω του Sec μηχανισμού. Το βήτα βαρέλι μπορεί να εισαχθεί στην εξωτερική μεμβράνη και είναι απαραίτητο για τη μετατόπιση της περιοχής μεταφοράς στον εξωκυττάριο χώρο. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως είναι οι αδεσίνες, η περιοχή μεταφοράς παραμένει προσκολλημένη στην εξωτερική μεμβράνη, ενώ σε άλλες διασπάται από το βήτα βαρέλι και σχηματίζει ένα ευδιάλυτο υδρολυτικό ένζυμο ή τοξίνη. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ονομαστεί **αυτομεταφερόμενες** καθώς οι C-τελικές περιοχές σχηματίζουν μια δομή βήτα βαρελίου με τη δυνατότητα σχηματισμού ενός πόρου, μέσω του οποίου η N- τελική περιοχή θα μπορούσε να περάσει (Jacob-Dubuisson *et.al.*, 2004; Dautin και Bernstein, 2007; Bernstein, 2007; Henderson *et.al.*, 2004). Σύμφωνα με δομικές μελέτες που έχουν γίνει, η δομή του βήτα βαρελίου δεν είναι σε θέση να μεταφέρει την περιοχή μεταφοράς από μόνη της έχοντας την ανάγκη μιας βοηθητικής πρωτεΐνης, ίσως της Omp85/YaeT, η οποία βοηθάει τη μεταφορά της κατά μήκος της εξωτερικής μεμβράνης (Bernstein, 2007).

Όπως στο T5aSS και στη δεύτερη υποκατηγορία πρωτεϊνών που εκκρίνονται μέσω του T5cSS, συντίθενται μέσω ενός ενιαίου πολυπεπτιδίου που αποτελείται από τρία κύρια δομικά στοιχεία, ένα N- τελικό σηματοδοτικό πεπτίδιο, μια κεντρική δομή μεταφοράς, που αντιστοιχεί στο λειτουργικό τμήμα του μορίου και μία C- τελική μονάδα μετατόπισης (**Translocation Unit, TU**) η οποία σχηματίζει ένα ενιαίο βήτα βαρέλι διαμέσου της εξωτερικής μεμβράνης και επιτρέπει τη μετατόπιση της λειτουργικής δομής μεταφοράς στην επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων αλλά και εντός τους (Henderson *et.al.*, 2004). Η διαφορά των δύο αυτών εκκριτικών συστημάτων έγκειται στο γεγονός ότι τα T5aSS διαθέτουν μια ενιαία μονάδα μετατόπισης σε σύγκριση με τα T5cSS που έχουν μόνο το 1/3 της μονάδας μετατόπισης, με αποτέλεσμα να απαιτείται ο τριμερισμός τους προκειμένου να σχηματισθεί μία λειτουργική μονάδα μετατόπισης στην εξωτερική μεμβράνη (Cotter *et.al.*, 2005; Meng *et.al.*, 2006; Surana *et.al.*, 2004).

Στη τρίτη υποκατηγορία των πρωτεϊνών του T5SS, που ονομάζεται T5bSS, αποτελείται από ζεύγη πρωτεϊνών κατά τις οποίες, το ένα ζεύγος φέρει τη δομή του βήτα βαρελίου και το άλλο ζεύγος είναι η εκκρινόμενη πρωτεΐνη. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται επίσης έκκριση δύο ζευγών (**Two Partner Secretion, TPS**) (Jacob-Dubuisson *et.al.*, 2004). Ο μηχανισμός της έκκρισης των δύο ζευγών έχει παρατηρηθεί σε ένα μεγάλο πλήθος Gram αρνητικών βακτηρίων και είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνο για τη μεταφορά μεγάλων σε μέγεθος, μολυσματικών πρωτεϊνών, όπως είναι η νηματοειδής αιμοσυγκολλητίνη του *Bordetella pertussis* καθώς και οι αιμισυγκολλητίνες υψηλού μοριακού βάρους του *Haemophilus influenzae* (Lambert-Buisine *et.al.*, 1998; McCann *et.al.*, 2014).

Ένας πολύ μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών εκκρίνεται μέσω του T5SS, πολύ μεγαλύτερος και από εκείνον του τύπου II εκκριτικού συστήματος, με πάνω από 500 μόνο στην T5Ass υποκατηγορία (Jacob-Dubuisson *et.al.*, 2004; Dautin και Bernstein, 2007; Bernstein, 2007; Henderson *et.al.*, 2004). Οι περισσότερες από τις T5SS εκκρινόμενες πρωτεΐνες που έχουν χαρακτηριστεί ως σήμερα, συμβάλλουν στη μολυσματικότητα ζωικών ή ανθρώπινων παθογόνων (Jacob-Dubuisson *et.al.*, 2004; Dautin και Bernstein, 2007; Bernstein, 2007; Henderson *et.al.*, 2004). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών είναι οι αδενοσίνες, όπως οι AIDA-I και Ag43 του *E. coli*, η Hia του *Haemophilus influenzae*, η YadA του *Yersinia enterocolitica* και η Prn του *Bordetella pertussis*, τοξίνες όπως η VacA του *Helicobacter pylori*, πρωτεάσες όπως η IgA του *Neisseria gonorrhoeae* και του *Neisseria meningitidis*, η SepA του *Shigella flexneri* και η PrtS του *Serratia marcescens* (Jacob-Dubuisson *et.al.*, 2004; Dautin και Bernstein, 2007; Bernstein, 2007; Henderson *et.al.*, 2004). Οι T5bSS (TPS) πρωτεΐνες που εκκρίνονται περιλαμβάνουν αδενοσίνες, όπως είναι οι HecA/HecB του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemii*) καθώς και κυτολυσίνες όπως είναι οι ShlA/ShlB του *Serratia marcescens*, οι HpmA/HpmB του *Proteus mirabilis* και οι EthA/EthB του *Edwardsiella tarda*.

1.5.7 Type VI Secretion System

Τα βακτήρια έχουν αναπτύξει ένα πλήθος στρατηγικών και μοριακών μηχανισμών, που τους επιτρέπουν τον εποικισμό και την επιβίωση σε ένα πλήθος περιβαλλόντων (Hachani *et.al.*, 2016). Η έκκριση των βακτηριακών πρωτεϊνών- τελεστών στον εξωκυττάριο χώρο αποτελεί ένα βασικό βήμα στην παθογένεια και στην βακτηριακή μολυσματικότητα (Karitein και Mogk, 2013). Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των βακτηριακών κυττάρων με τους οργανισμούς- ξενιστές, άλλα βακτήρια καθώς και το αβιοτικό περιβάλλον (Desvaux *et.al.*, 2009). Μέχρι σήμερα, 6 βασικά εκκριτικά συστήματα έχουν περιγραφεί στα Gram⁻ βακτήρια (Τύπου I-VI) (Cianfanelli *et.al.*, 2016), με το πιο πρόσφατο περιγραφόμενο το εκκριτικό σύστημα τύπου VI (**T6SS**) (Pukatzki *et.al.*, 2006). Αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 2006, ως ένα νέο εκκριτικό σύστημα στα βακτήρια *Pseudomonas aeruginosa* και *Vibrio cholerae* (Pukatzki *et.al.*, 2006; Mougous *et.al.*, 2006), όπου είχε εμπλακεί στην παθογένεια τους και έκτοτε συναντάται στο 25% των Gram⁻ βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων πολλών ανθρώπινων και ζωικών παθογόνων, καθιστώντας το, το πιο διαδεδομένο εξειδικευμένο εκκριτικό σύστημα (Bingle *et.al.*, 2008). Αυτή η πολύπλοκη πρωτεΐνη απελευθερώνει μολυσματικούς παράγοντες στο εξωκυτταρικό μέσο, είτε τους μεταφέρει απευθείας στο κύτταρο στόχο (Merieau, 2014). Παρ' όλο που τα περισσότερα από αυτά τα βακτήρια εμφανίζουν ένα μοναδικό T6SS σύμπλοκο, πολλαπλά διακριτά αντίγραφα αυτού έχουν ταυτοποιηθεί σε αρκετά είδη. Για παράδειγμα τα βακτήρια *Burkholderia pseudomallei* και *Burkholderia thailandensis* έχουν εμφανίσει έξι και πέντε αντίγραφα του τύπου VI εκκριτικού συστήματος, αντίστοιχα, ενώ το *Pseudomonas aeruginosa* διαθέτει τρία αντίγραφα, τα H1-T6SS, H2-T6SS και H3-T6SS (Schwarz *et.al.*, 2010; Filloux *et.al.*, 2008).

Ενδιαφέρον αποτελεί, το γεγονός ότι αυτά τα αντίγραφα δεν είναι λειτουργικώς περιττά, καθώς στο *B. thailandensis* το T6SS-1 χρησιμοποιείται προκειμένου να ενεργοποιηθεί ο βακτηριακός ανταγωνισμός, ενώ από την άλλη το T6SS-5 επάγει τη διαμεμβρανική εξάπλωση στα μολυσμένα μακροφάγα (Schwarz *et.al.*, 2010). Ομοίως, στο *P. aeruginosa* το H1-T6SS σύμπλοκο καθορίζει τη νέκρωση των βακτηρίων, ενώ το H2-T6SS στοχεύει τόσο σε προκαρυωτικά όσο και σε ευκαρυωτικά κύτταρα (Hood *et.al.*, 2010; Russell *et.al.*, 2013; Jiang *et.al.*, 2014). Με

βάση τη κατανομή του σε όλα τα βακτηριακά φύλα, τρεις κατηγορίες T6SS έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία, τα T6SS^I, T6SS^{II} και T6SS^{III}, με τις δύο τελευταίες κατηγορίες πρόσφατα να περιγράφονται (Hachani *et.al.*, 2016). Η κατηγορία III περιορίζεται στο φύλο *Bacteroidetes* και εμπλέκεται στον βακτηριακό ανταγωνισμό, ενώ η κατηγορία II εμφανίζεται σε μία τάξη των γ- Πρωτεοβακτηρίων που περιλαμβάνει τα είδη *Francisella* και είναι απαραίτητος για τη μολυσματικότητά τους (Russell *et.al.*, 2013; Bruin *et.al.*, 2007).

1.5.7.1 Η αρχιτεκτονική του T6SS

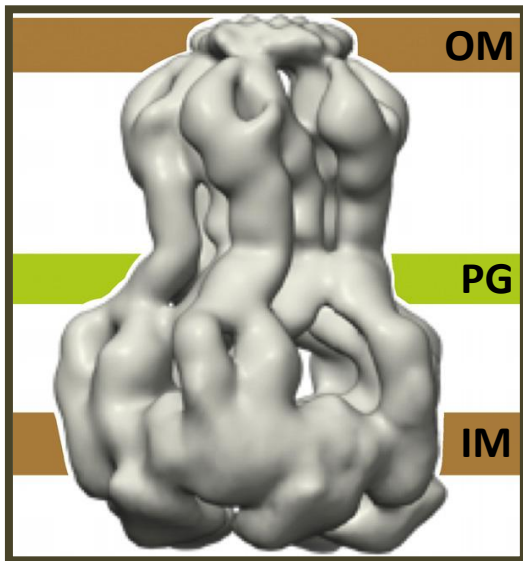
Τα εκκριτικά συστήματα τύπου VI, κωδικοποιούνται όλα από ένα μεγάλο και μεταβλητό σύμπλεγμα γονιδίων, που διαφέρει μεταξύ των βακτηριακών ειδών όσο αφορά τη σειρά των γονιδίων αλλά και τον προσανατολισμό τους (Merieau, 2014; Coulthurst, 2013). Ωστόσο όλα αποτελούνται από μια ομάδα συντηρημένων, βασικών γονιδίων, που αποτελούν και τον κεντρικό πυρήνα (Boyer *et.al.*, 2009; Zheng και Leung, 2007). Ύστερα από συστηματικές μεταλλάξεις που πραγματοποιήθηκαν στα βακτήρια *Edwardsiella tarda* και *Vibrio cholerae*, αποδείχθηκε ότι καθένα από τα 13 συντηρημένα γονίδια του T6SS είναι απαραίτητα προκειμένου να λειτουργήσει το εκκριτικό σύστημα (Zheng και Leung, 2007; Zheng και Mekalanos, 2011).

Αν και οι λειτουργίες αυτών των πρωτεϊνών δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως, έχει υποτεθεί ότι αυτά τα βοηθητικά στοιχεία μπορεί να διευκολύνουν ή να ρυθμίζουν τη διάταξη του T6SS ή θα μπορούσαν ακόμη να προσδώσουν επιπρόσθετες λειτουργίες στο σύστημα έκκρισης (Cascales και Cambillau, 2012). Σχετικά με τα συστατικά που κωδικοποιούνται από τα 13 βασικά γονίδια, αρκετά από αυτά παρουσιάζουν κοινές δομικές ιδιότητες με την ουρά, τις ακίδες, τη θήκη και τις πρωτεΐνες του δίσκου της βάσης του βακτηριοφάγου ιού, ενώ μια δεύτερη κατηγορία ομάδων πρωτεϊνών ενσωματώνονται στην εσωτερική ή εξωτερική μεμβράνη (Cascales και Cambillau, 2012). Ωστόσο ένας αριθμός βασικών συστατικών δεν παρουσιάζει σαφή δομική ομολογία με βακτηριοφάγους ή πρωτεΐνες που σχετίζονται με την μεμβράνη, με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η δημιουργία δομικών και βιοχημικών δεδομένων για την πλήρη κατανόηση των λειτουργιών τους (Cascales και Cambillau, 2012).

Ύστερα από την πραγματοποίηση βιοπληροφορικής μελέτης, βρέθηκε ότι αυτά τα γονίδια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συνδέονται με τη μεμβράνη, την ενιαία μεμβράνη (TssL, TssM), είτε τις λιποπρωτεΐνες (TssJ) (Silverman *et.al.*, 2012). Η δεύτερη κατηγορία γονιδίων κωδικοποιεί πρωτεΐνες που παρουσιάζουν μεγάλη συσχέτιση και ομοιότητα με τα συστατικά της ουράς των βακτηριοφάγων ιών (Hcp, VgrG, TssB, TssC, TssE) (Silverman *et.al.*, 2012). Κατά κύριο λόγο αυτή η ομολογία είναι εμφανής σε διαρθρωτικό επίπεδο, όχι όμως σε επίπεδο αλληλουχίας (Silverman *et.al.*, 2012). Ενώ η τελευταία κατηγορία περιλαμβάνει πρωτεΐνες για τις οποίες δεν απορρέει καμία λειτουργία από *in silico* αναλύσεις (TssA, TssF, TssG, TssK) (Silverman *et.al.*, 2012).

Το σύμπλεγμα αγκίστρωσης που βρίσκεται συνδεδεμένο στην εξωτερική μεμβράνη αποτελείται συνήθως από τρεις υπομονάδες, τις **TssL**, **TssM**, και **TssJ**. Η TssJ είναι μια λιποπρωτεΐνη αγκιστρωμένη στην εξωτερική μεμβράνη και εκτεθειμένη στον περιπλαστικό χώρο (Aschtgen *et.al.*, 2008). Οι κρυσταλλικές δομές από αρκετούς οργανισμούς αποκαλύπτουν μία κοινή αναδίπλωση της τρανσθυρετίνης (transthyretin) (δομής β- sandwich με β- πτυχωτές επιφάνειες) και έναν μεταβλητό βρόγχο μεταξύ της 1 και 2 β- έλικας που είναι σημαντικός για την αλληλεπίδραση με την TssM (Felisberto-Rodrigues *et.al.*, 2011; Rao *et.al.*, 2011; Robb *et.al.*, 2013). Η TssM είναι αγκιστρωμένη στην εσωτερική μεμβράνη από τρεις διαμεμβρανικές περιοχές και διαθέτει μια μεγάλη περιπλαστική δομή, που περιλαμβάνει τη C-τερματική περιοχή η οποία αλληλεπιδρά με την TssJ (Felisberto-Rodrigues *et.al.*, 2011). Το τρίτο συστατικό, η TssL εδράζεται στην εσωτερική μεμβράνη μέσω μιας ενιαίας διαμεμβρανικής έλικας. Η κυτταροπλασματική αμινοτελική δομή του TssL δημιουργεί μια αμοιβαία σταθερή αλληλεπίδραση με την TssM, ενώ δομικές μελέτες αυτής της περιοχής έχουν αποκαλύψει μια αναδίπλωση η οποία περιλαμβάνει δύο ελικοειδές δέσμες (Robb *et.al.*, 2012; Durand *et.al.*, 2012; Chang *et.al.*, 2015). Στα περισσότερα T6SS, η TssL έχει μία επιπλέον OmpA/MotB περιοχή, στη C-τελική περιοχή του περιπλαστικού χώρου, που μοιάζει της περιοχής πρόσδεσης της πεπτιδογλυκάνης (Aschtgen *et.al.*, 2010). Όταν αυτή η περιοχή απουσιάζει, η λειτουργία της αντικαθίσταται από μια εξαρτημένη μεμβρανική πρωτεΐνη, την TagL, η οποία αλληλεπιδρά με την TssL (Aschtgen *et.al.*, 2010).

Ύστερα από τη μελέτη της δομής του TssLMJ μεμβρανικού συμπλόκου με ηλεκτρονική μικροσκοπία (electron microscopy, EM), βρέθηκε στα 11.6 Å και αποκάλυψε μια δομή πέντε πτυχώσεων, η οποία εκτείνεται από τη βάση στην κυτταροπλασματική και την εσωτερική μεμβράνη, εντός της άκρης ενός περιπλαστικού συμπλόκου που έρχεται σε επαφή με την εξωτερική μεμβράνη (Durand *et.al.*, 2015).



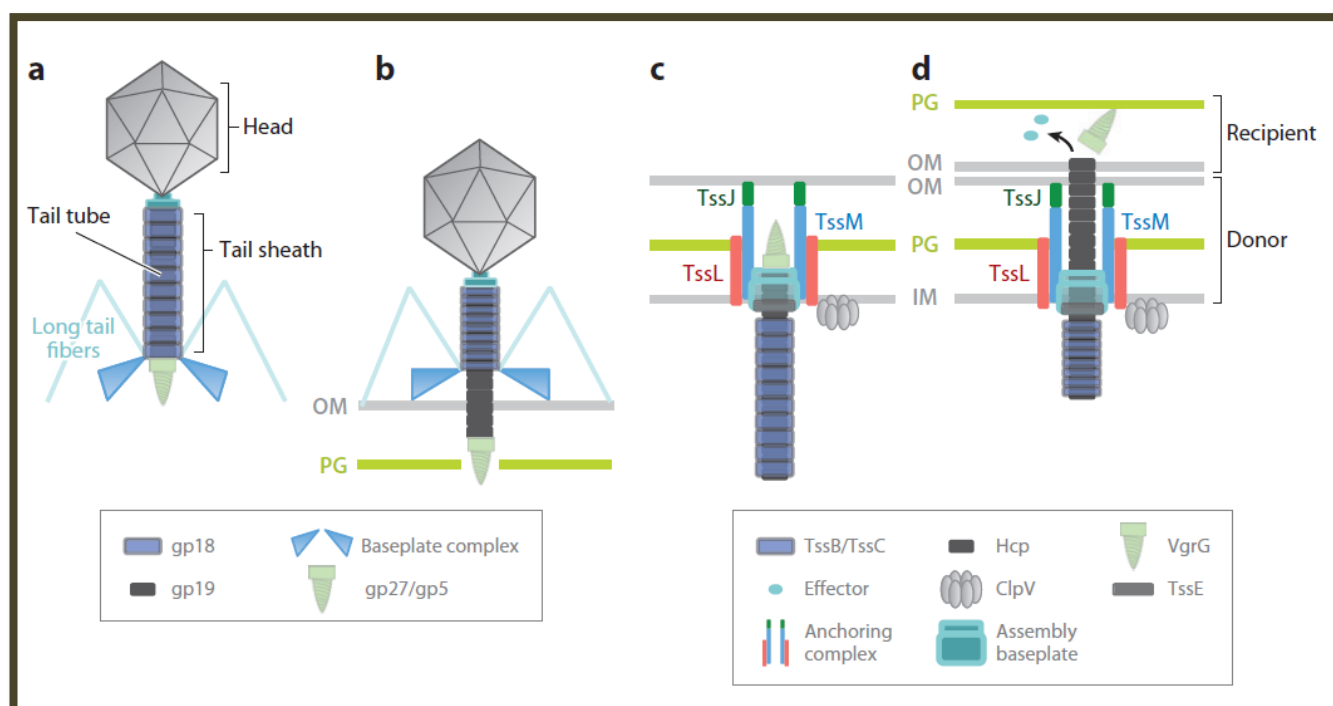
Εικόνα 13: Η δομή του TssLMJ μεμβρανικού συμπλόκου του Sci-1 του τύπου VI εκκριτικού συστήματος (T6SS) στο *Escherichia coli* όπως παρατηρείται σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο, ύστερα από αρνητική χρώση (Negative stain). Συντομογραφίες: **IM**, innermembrane (Εσωτερική Μεμβράνη); **OM**, outer membrane (Εξωτερική Μεμβράνη); **PG**, peptidoglycan (Πεπτιδογλυκάνη) (Cianfanelli *et.al.*, 2016 by Dr Eric Cascales).

Το σύμπλοκο αυτό συγκροτείται διαδοχικά από τις TssJ, TssM και TssL, ενώ σε μεγάλες διαμορφωτικές αλλαγές κατά τη συναρμολόγησή τους σε ένα ενεργό T6SS, μπορεί να προκαλέσει το C- τελικό άκρο του TssM να διασχίσει την εξωτερική μεμβράνη και να σχηματισθεί ένας παροδικός πόρος, μέσω του οποίου θα διαπεράσει η ακίδα διάτρησης (Durand *et.al.*, 2015).

Από την αρχή της μελέτης του T6SS έχει γίνει άμεσος συσχετισμός των συστατικών του εκκριτικού συστήματος, με τα στοιχεία της συστατικής ουράς του T4 βακτηριοφάγου ιού (Leiman *et.al.*, 2009) (**Εικόνα 14**). Υπάρχουν αρκετά στοιχεία, όμοια με του φάγου, που καθιστούν ένα ενεργό T6SS, όπως είναι οι TssB και TssC πρωτεΐνες ισοδύναμες εκείνων της συστατικής θήκης του βακτηριοφάγου. Η συν-ρυθμιζόμενη πρωτεΐνη της αιμολυσίνης (**Hcp**), είναι παρόμοια της **gpV** πρωτεΐνης του σωλήνα της ουράς, η **TssE** πρωτεΐνη, όμοια της **gp25** πρωτεΐνης της βάσης της πλάκας του φάγου και η επαναλαμβανόμενη πρωτεΐνη βαλίνης-γλυκίνης (**VgrG**),

που αποτελεί μια σύντηξη των **gp5** και **gp27** πρωτεϊνών του T4 βακτηριοφάγου (Leiman *et.al.*, 2009; Kanamaru, 2009).

Για την ακρίβεια τα εξωκυττάρια συστατικά του T6SS, **Hcp** και **VgrG** σχηματίζουν μια κατασκευή έγχυσης που παραπέμπει σε βελόνα και η οποία ομοιάζει πολύ της ουράς του βακτηριοφάγου ιού (Coulthurst, 2013). Η Hcp πρωτεΐνη η οποία παρουσιάζει πολύ μεγάλη δομική ομοιότητα στην gpV πρωτεΐνη του σωλήνα της ουράς του λ βακτηριοφάγου, σχηματίζει εξαμερείς δακτυλίους οι οποίοι στοιβάζονται ο ένας πάνω στον άλλον σχηματίζοντας μια δομή που παραπέμπει σε σωλήνα (Mougous *et.al.*, 2006; Pell *et.al.*, 2009). Από την άλλη, το τριμερές της VgrG πρωτεΐνης πιστεύεται ότι τοποθετείται στο άκρο του Hcp σωλήνα και σχηματίζει μια δομή όμοια της συσκευής διάτρησης των κυττάρων, που μοιάζει με ακίδα (Leiman *et.al.*, 2009).



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του T4 βακτηριοφάγου σε σύγκριση με τη δομή του T6SS. Ομόλογα και ανάλογα τμήματα του τύπου VI εκκριτικού συστήματος (T6SS) και του T4 φάγου, έχουν χρωματιστεί το ίδιο. **(a)** Ο σωλήνας της ουράς του T4 βακτηριοφάγου περιβάλλεται από μία θήκη και καταλήγει σε μια συσκευή διάτρησης των κυττάρων (gp27/gp5). **(b)** Κατά τη πρόσδεση με τα κύτταρο ξενιστή, η βάση της πλάκας του T4 βακτηριοφάγου υφίσταται μια διαμορφωτική αλλαγή που προκαλεί τη συστολή της θήκης της ουράς και καταλήγει στη διάτρηση της εξωτερικής μεμβράνης (OM) και στη μεταφορά του DNA. Αναπαράσταση απενεργοποιημένων **(c)** και ενεργοποιημένων **(d)** καταστάσεων του T6SS που εξαρτάται από τη θέση των πρωτεϊνών και την αλληλεπίδραση μεταξύ των υπομονάδων του T6SS. Οι τρεις πρωτεΐνες που συνδέονται με τη μεμβράνη, οι TssL, TssM και TssJ σχηματίζουν ένα σύμπλοκο συνδεδεμένο στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης μέσω του TssL. **(c)** Οι TssB και TssC μπορεί να σχηματίζουν μια δομή που παραπέμπει σε θήκη, περικλείοντας τον Hcp σωλήνα εντός του περιπλασματικού χώρου. **(d)** Η

ενεργοποίηση του T6SS συμμετέχει στη μεταφορά των τελεστών σε κάποιο κύτταρο ξενιστή, μέσω του Hcp σωλήνα. Κατ' αναλογία με τον T4 βακτηριοφάγο, η δομή που μοιάζει με θήκη, μπορεί να ωθήσει, μέσω της συστολής, τον Hcp σωλήνα προς τον εξωκυττάριο χώρο ή κατ' ευθείαν στο κύτταρο ξενιστή.

Οι **VipA** και **VipB** (TssB και TssC αντίστοιχα) πρωτεΐνες, μπορούν να συγκεντρωθούν σε μεγάλους σωλήνες και μπορούν να σχηματίσουν μια συσταλτική ουρά, όμοια με δομή ελύτρου στο κυτταρόπλασμα (Basler *et.al.*, 2012, Bönemann *et.al.*, 2009). Η συστολή αυτού του σωλήνα όπως έχει παρατηρηθεί και μικροσκοπικά, μπορεί να ωθήσει την Hcp/VgrG δομή καθώς και τις πρωτεΐνες- τελεστές, εκτός του εκκρινόμενου κυττάρου και εντός του κυττάρου- στόχου (Basler *et.al.*, 2012). Η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη TssE, επίσης παρουσιάζει μια ανιχνεύσιμη ομοιότητα με την gr25 πρωτεΐνη του T4 βακτηριοφάγου και μπορεί να αποτελέσει μέρος της δομής που παραπέμπει στον δίσκο της βάσης του συστήματος (Lossi *et.al.*, 2011). Για άλλα βασικά συστατικά όπως είναι οι TssA, F, G και K, έχει βρεθεί ύστερα από πειράματα ότι κατά την απουσία οποιωνδήποτε λειτουργικών πληροφοριών που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, να επηρεάζεται η λειτουργία του μηχανισμού τους. Επομένως θα μπορούσαν να αποτελούν επίσης μέρος του βασικού συμπλόκου και να σχετίζονται με τον δίσκο βάσης του φάγου (Basler *et.al.*, 2012). Κατά την μικροσκοπική ανάλυση, πράγματι παρατηρήθηκε ότι η VipA-B κατασκευή συνδέεται με την εσωτερική μεμβράνη με μια κωνοειδή κυτταροπλασματική δομή (Basler *et.al.*, 2012). Συχνά, το τμήμα του T6SS, όμοιο της ουράς του βακτηριοφάγου, αναφέρεται και ως «ανεστραμμένη» ουρά φάγου ή μηχανήμα έγχυσης φάγου, που απλά ανακλά την αντίστροφη τοπολογία, δηλαδή οι βακτηριοφάγοι χτυπούν το βακτηριακό κύτταρο από έξω, ενώ το T6SS λειτουργεί από μέσα προς τα έξω (Coulthurst, 2013).

1.5.7.2 Επιδρώσεις πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το T6SS

Τα πρώτα συστατικά που ταυτοποιήθηκαν ότι σχετίζονται με το T6SS, είναι οι Hcp και VgrG πρωτεΐνες (Pukatzki *et.al.*, 2006), καθώς και οι δύο ήταν ανιχνεύσιμες στο υπερκείμενο καλλιέργειας. Ακόμη και σήμερα, η έκκριση αυτών των πρωτεϊνών αποτελεί καλό δείκτη για τη ομαλή λειτουργία του T6SS (Coulthurst, 2013). Αυτό συμβαίνει καθώς είναι γνωστό ότι οι πρωτεΐνες ωθούνται στο εξωτερικό των βακτηριακών κυττάρων μόνο όταν το T6SS είναι λειτουργικό και ενεργό, ενώ

ταυτόχρονα μερικά τμήματα της Hcp/VgrG “βελόνας” αποκόπτονται από τον υπόλοιπο μηχανισμό και είναι ανιχνεύσιμα στο μέσο καλλιέργειας (Coulthurst, 2013). Το εκκριτικό σύστημα τύπου VI μπορεί να παράγει ένα πλήθος διαφορετικών τοξινών, γνωστές και ως επιδρώσες πρωτεΐνες, εντός των κυττάρων στόχων. Αυτοί οι αντι- βακτηριακοί τελεστές μπορεί να είναι είτε υδρολάσες της πεπτιδογλυκάνης που στοχεύουν στην αποδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος, όπως είναι οι Tse1-3 του *Pseudomonas aeruginosa*, DNAσες που δρουν στο κυτταρόπλασμα, είτε τοξίνες που στοχεύουν στη διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης (Hood *et.al.*, 2010; Cascales και Cambillau, 2012 Boyer *et.al.*, 2009; Mougous *et.al.*, 2006).

Ορίζοντας ως επιδρώσες πρωτεΐνες εκείνες που εκκρίνονται από ένα εκκριτικό σύστημα, μεταφέρονται μέσα σε κάποιο κύτταρο στόχο και επιδρούν σε αυτό, αποδεικνύεται ότι ορισμένες μόνο εξειδικευμένες VgrG πρωτεΐνες μπορούν στην πραγματικότητα να εμφανίσουν λειτουργία τελεστή (Coulthurst, 2013). Λαμβάνοντας υπόψη ότι όλα τα T6SS περιέχουν τουλάχιστον έναν μικρότερο πυρήνα VgrG, χωρίς κάποια προφανή δομή τελεστή, μόνο μία μειοψηφία των VgrGs έχουν εξελιχθεί, με τα περισσότερα συστήματα ωστόσο να μην έχουν εξελιγμένα VgrGs (Pukatzki *et.al.*, 2007, Pukatzki *et.al.*, 2009). Αυτές οι εξελιγμένες VgrG πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγάλου μεγέθους επιμήκυνση του C- τελικού άκρου, το οποίο μάλλον φέρει μια επιπλέον επιδρώσα δομή (Pukatzki *et.al.*, 2009). Οι C- τελικές περιοχές των εξελιγμένων VgrGs παρουσιάζουν μία σειρά από προβλεπόμενες λειτουργίες, ως εγκάρσια σύνδεση με την ακτίνη, ADP- ριβοσυλτρανσφεράση, λιπάση, μεταλλοπρωτεάση, δέσμευση ή υδρόλυση της πεπτιδογλυκάνης και χιτοζανάση (Blondel *et.al.*, 2009; De Maayer *et.al.*, 2011; Pukatzki *et.al.*, 2007, 2009). Επαναλαμβανόμενες PAAR αλληλουχίες σε πρωτεΐνες στο τέλος του συμπλέγματος των T6SS γονιδίων, έχει αποδειχθεί τελευταία ότι ενώνονται με τη τριμερή VgrG πρωτεΐνη ολοκληρώνοντας την αιχμηρή ακίδα και αποτελεί έτσι βασικό συστατικό του τύπου VI εκκριτικού μηχανισμού,. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο βακτήριο *Serratia marcescens*, μετάλλαξη τόσο στα VgrG1 και VgrG2 γονίδια του, όσο και στα αντίστοιχα Rhs γονίδια που φέρουν την επαναλαμβανόμενη PAAR αλληλουχία, οδήγησε στην καταστολή της λειτουργικότητας του T6SS (Fritsch *et.al.* 2013; Cianfanelli *et.al.*, 2016). Επομένως η PAAR επαναλαμβανόμενη δομή στην Rhs πρωτεΐνη, σε συνδυασμό με το σύμπλοκο

της VgrG και Hcr πρωτεΐνης, μπορούν να θεωρηθούν απαραίτητα συστατικά του T6SS για την ομαλή λειτουργία του μηχανισμού.

1.6 Στόχος μεταπτυχιακής μελέτης

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη διερεύνηση των γονιδίων που εμπλέκονται στην ανταγωνιστικότητα του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas fluorescens* X, εναντίον πλήθους φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* Χ καθώς και τα μεταλλαγμένα του βακτηριακά στελέχη p93 και δ40, τα οποία προσφέρθηκαν από τον κ. Γεωργακόπουλο (Αναπληρωτής Καθηγητής), από το εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το βακτηριακό στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* Χ, που απομονώθηκε από τη ριζόσφαιρα σπορόφυτων αγγουριού, αποτελεί ένα καλό ανταγωνιστικό βακτηριακό στέλεχος, έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Pythium ultimum*, καταστέλλοντας την ριζοκτονία (Georgakopoulos *et.al.*, 2002). Προκειμένου να μελετηθεί πλήρως ο μηχανισμός με τον οποίο καταστέλλεται η ριζοκτονία από το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος, πραγματοποιήθηκε Tn5 τυχαία μεταλλαξιγένεση, με ένθεση μεταθετού στοιχείου (sup-). Βρέθηκαν έτσι και απομονώθηκαν 9 μεταλλαγμένα στελέχη, του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas fluorescens* Χ, μεταξύ των οποίων τα p93 και δ40, κάθε ένα από τα οποία έφερε ένα μοναδικό μεταθετό στοιχείο ένθεσης στο χρωμόσωμά του. Αποτέλεσμα αυτής της μεταλλαγής ήταν η παρεμπόδιση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, για το δ40 στέλεχος που σχετίζεται με τη τοξίνη mangotoxin και για το p93 με μια πρωτεΐνη που ανήκει στην curin υπερικογένεια (Kremmydas *et.al.*, 2013).

Οι καλλιέργειες των βακτηρίων διατηρούνται για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο (NA), παρουσία 20% γλυκερόλης στους -80°C. Οι στέρεες καλλιέργειες διατηρούνται στους 4 °C για διάστημα μερικών εβδομάδων σε στερεό θρεπτικό μέσο NA, παρουσία του κατάλληλου, για το κάθε στέλεχος, αντιβιοτικού.

2.2 Απομόνωση του γονιδιώματος του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* X

Προκειμένου να σταλεί το γονιδίωμα του *Pseudomonas fluorescens* X για αλληλούχιση, έπρεπε πρώτα να γίνει η απομόνωσή του. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν εκείνο που ορίζεται από την εταιρία Macherey-Nagel (MN-NucleoSpin Tissue Kit) και έχει τα εξής βήματα.

- Καλλιέργεια του βακτηρίου σε 5ml υγρού θρεπτικού NB (Nutrient Broth), με τη προσθήκη 40μl του κατάλληλου αντιβιοτικού (ΡΙφαμπικίνη, Rif)
- Ακολούθησε επώαση για 19h στους 28°C
- 1ml από την αντίστοιχη καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε eppendorf των 2ml και φυγοκεντρήθηκε στις 12000 rpm για 2 min
- Με το τέλος της διαδικασίας απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε, σε 180μl διαλύματος T₁ (Lysis buffer) και αμέσως προστέθηκαν 25μl διαλύματος πρωτεϊνάσης K (20 mg/ml σε ddH₂O)
- Έπειτα πραγματοποιήθηκε μηχανική ανακίνηση (vortex) και επώαση στους 56°C για 1 έως 5 ώρες, ώστε να γίνει η λύση των κυττάρων (ώσπου το ελαιώδες να καταστεί διαυγές), κατά τη διάρκεια των οποίων το δείγμα ανακινείται συχνά
- Έπειτα έγινε η προσθήκη 200 μl διαλύματος B3 και ακολούθησε η επώαση τους στους 70°C για 10 λεπτά, υπό συχνή ανακίνηση
- Στη συνέχεια έγινε η προσθήκη 210 μl 100% v/v αιθανόλης, με καλή ανακίνηση του δείγματος και στη συνέχεια η μεταφορά του σε κολώνα NucleoSpin Tissue column όπου και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση στις 12000rpm για 1 λεπτό
- Έπειτα ακολούθησε έκπλυση του δείγματος με 500μl διαλύματος BW και φυγοκέντρωση στις 12000rpm για 1 λεπτό
- Το ίζημα επαναδιαλύθηκε με 20-30 μl ddH₂O και το απομονωμένο DNA αποθηκεύθηκε στους -20°C.

2.2.1 Illumina dye sequencing

Η Illumina αλληλούχιση είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της σειράς των ζευγών βάσεων του DNA, γνωστή και ως DNA αλληλούχιση. Η τεχνική Illumina λειτουργεί κατά τα τρία βασικά βήματα της ενίσχυσης, αλληλούχισης και ανάλυσης. Η διαδικασία απαιτεί την απομόνωση του DNA και τον τεμαχισμό του σε μικρότερα τμήματα, ενώ εφαρμόζονται και άλλες μοριακές τροποποιήσεις, που λειτουργούν ως σημεία αναφοράς κατά την ενίσχυση, αλληλούχιση και ανάλυση του γονιδιώματος. Το τροποποιημένο DNA φορτώνεται σε ένα εξειδικευμένο τσιπ, στο κάτω μέρος του οποίου βρίσκονται εκατοντάδες χιλιάδες ολιγονουκλεοτίδια. Αυτά είναι αγκιστρωμένα στο τσιπ και είναι σε θέση να δεσμεύσουν θραύσματα DNA που έχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες. Μόλις τα θραύσματα DNA δεσμευθούν, ξεκινά μια διαδικασία που ονομάζεται cluster generation, όπου και παράγονται περίπου 1000 αντίτυπα από το κάθε κομμάτι του DNA. Στη συνέχεια εισάγονται οι εκκινητές και τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια στο τσιπ. Αυτά τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια αναγκάζουν τους εκκινητές να προσθέτουν ανεστραμμένους 3' αναστολείς σε ένα νουκλεοτίδιο τη φορά, καθώς και ετικέτες φθορισμού. Μετά από κάθε κύκλο σύνθεσης το τσιπ φωτογραφίζεται και στην εικόνα που αποτυπώνεται στον υπολογιστή, καθορίζεται ποια βάση προστέθηκε πρώτη από το μήκος κύματος της ετικέτας φθορισμού και το καταγράφει για κάθε σημείο του τσιπ. Μετά από κάθε γύρω τα μη ενσωματωμένα μόρια ξεπλένονται. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται μέχρι τη πλήρη αλληλούχιση του DNA δείγματος (Meyer και Kircher, 2010).

Αφού στάλθηκε το γονιδίωμα για Illumina αλληλούχιση, τα αποτελέσματα στάλθηκαν σε ηλεκτρονική μορφή προκειμένου να γίνει η επεξεργασία τους. Αποτέλεσμα της αλληλούχισης ήταν μια συνεχής σειρά αλληλεπικαλυπτόμενων κλώνων (**contigs**) διαφόρων μεγεθών που προέκυψαν από την επανασυναρμολόγηση των μικρών θραυσμάτων DNA κατά την αλληλούχιση. Μεταξύ αυτών των τμημάτων και κατά μήκος ολόκληρου του γονιδιώματος υπήρχαν κενά (**gaps**) των οποίων η νουκλεοτιδική αλληλουχία ήταν άγνωστη.

2.3 Βιοπληροφορική μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση των γονιδίων που εμπλέκονται στη ανταγωνιστικότητα του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas fluorescens* X

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση των γονιδίων που εμπλέκονται στην ανταγωνιστικότητα του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas fluorescens* X, είτε με την παραγωγή του κυκλικού λιποπεπτιδίου massetolide A, είτε κατά την έκκριση πρωτεϊνών τελεστών μέσω του T6SS. Για την ανίχνευση αυτών των γονιδίων πραγματοποιήθηκε η κατάλληλη βιοπληροφορική μελέτη.

Με τη βοήθεια των βάσεων δεδομένων **UniProt (Universal Protein Recourse)**, **NCBI (National Center for Biotechnology Information)** και **IMG (Integrated Microbial Genomes system)**, αναζητήθηκαν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των γονιδίων που μας ενδιαφέρουν, από συγγενή βακτηριακά στελέχη με το *Pseudomonas fluorescens* X. Έπειτα με τη βοήθεια της μηχανής αναζήτησης **BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)** του NCBI, έγινε σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των γονιδίων που απομονώθηκαν, με την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδιώματος του *Ps. fluorescens* X. Δίνοντας βάση στο ποσοστό κάλυψης (**Query Cover**) μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, καθώς και στο ποσοστό ομολογίας τους (**Identity**), απομονώθηκαν οι νουκλεοτιδικές περιοχές του γονιδιώματός με τα υψηλότερα ποσοστά των παραπάνω παραμέτρων. Αφού έγινε σάρωση όλου του γονιδιώματος, απομονώθηκαν όλα τα τμήματα DNA που φέρουν υψηλή ομολογία με τα ενδιαφερόμενα γονίδια ή τα τμήματα γονιδίων.

- **Massetolide A**

Ύστερα από την πραγματοποίηση των παραπάνω διαδικασιών, τοποθετήθηκαν όλα τα κομμάτια του DNA στη σειρά σύμφωνα με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία των NRPS που εμπλέκονται στην παραγωγή του αντιβιοτικού massetolide A, όπως έχει καταγραφεί στις βάσεις δεδομένων. Ωστόσο, μεταξύ των μελετώμενων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών βρέθηκαν πολλά κενά (**Gaps**), τα οποία έπρεπε να κλείσουν με το σχεδιασμό των κατάλληλων εκκινητών εκατέρωθεν αυτών και την εφαρμογή μιας σειράς μοριακών τεχνικών.

Για τον ορθό σχεδιασμό των εκκινητών έγινε χρήση του εργαλείου **Multiple Sequence Alignment** της βάσης δεδομένων EMBL- EBI. Στόχος αυτού ήταν να γίνει σύγκριση των τμημάτων DNA του γονιδιώματός μας, σε σχέση με τα ομόλογα τμήματα των γονιδίων από άλλους συγγενείς οργανισμούς που έχουν την ικανότητα να παράγουν το αντίστοιχο, είτε υψηλής συγγένειας με το μελετώμενο, κυκλικό λιποπεπτίδιο.

Τα τμήματα των γονιδίων που είχαν 100% ομολογία μεταξύ τους, είτε διέφεραν κατά μία ή δύο βάσεις, επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές. Προκειμένου να σχεδιαστούν σωστά οι εκκινητές έπρεπε:

- Οι αλληλουχίες τους να μην είναι συμπληρωματικές, ειδικά στο 3' άκρο
- Οι αλληλουχίες να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε GC ώστε οι Tm θερμοκρασίες τους (Temperature melting) να μη διαφέρουν σημαντικά
- Η αλληλουχία του κάθε εκκινητή δε περιείχε συμπληρωματικές περιοχές, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε φουρκέτες (hair- pins), κατά τη διάρκεια της αποδιάταξης
- Τέλος, κατά το σχεδιασμό των εκκινητών η κατανομή των νουκλεοτιδίων έπρεπε να είναι τυχαία και να αποφευχθούν οι περιοχές με πολυπουρίνες ή πολυπυριμιδίνες καθώς και επαναλήψεις ίδιων διατάξεων νουκλεοτιδίων.

Το μέγεθός τους κυμαίνονταν μεταξύ 20-25 βάσεων ενώ το ποσοστό τους σε GC ήταν >45%.

- **T6SS**

Το τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που περιέχει τα 13 βασικά γονίδια που εμπλέκονται στην ορθή λειτουργία του εκκριτικού συστήματος τύπου VI, βρέθηκε ακέραιο στο γονιδίωμα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* X, με αποτέλεσμα να είναι διαθέσιμο για περαιτέρω βιοπληροφορική μελέτη.

2.4 Μοριακές τεχνικές που εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση των γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή του αντιβιοτικού massetolide A του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas fluorescens* X

2.4.1 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction- PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, μας επιτρέπει να πολλαπλασιάσουμε εκθετικά τα τμήματα DNA που μας ενδιαφέρουν. Στο παρόν πείραμα εφαρμόστηκε, προκειμένου να ενισχυθούν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των περιοχών μεταξύ κενών στις περιοχές των NRPS γονιδίων, προκειμένου να βρεθεί η πλήρης νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή του αντιβιοτικού massetolide A.

Η μέθοδος βασίζεται σε διαδοχικούς κύκλους αντιγραφής (συνήθως 25-35) που ξεκινούν από καθορισμένες θέσεις μιας μήτρας DNA. Κάθε κύκλος αποτελείται από τρία βασικά στάδια:

- Αποδιάταξη της μήτρας DNA (Denature DNA) : **94-96°C**
- Υβριδισμός των εκκινητών στις συμπληρωματικές, προς αυτούς, αλληλουχίες (Annealing) : **45-68°C**
- Επιμήκυνση των εκκινητών (Extension) : **72°C**

Συνήθως η αποδιάταξη του DNA πραγματοποιείται για 30 sec στους 95°C και ισχύει για τις περισσότερες αλληλουχίες DNA. Όταν οι αλληλουχίες είναι πλούσιες σε ποσοστά GC, τότε απαιτείται μια αρχική αποδιάταξη στους 95-96°C για 2-4 min, προκειμένου να αποδιαταχθεί πλήρως η αλληλουχία του DNA. Το στάδιο του υβριδισμού διαρκεί συνήθως 15-60 sec, ενώ η θερμοκρασία πραγματοποίησής του εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) των εκκινητών και κυμαίνεται μεταξύ 45-68°C. Τέλος, η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η επιμήκυνση των εκκινητών, είναι οι 72°C.

Για την πραγματοποίηση μιας τυπικής διαδικασίας PCR απαιτούνται, μια DNA-μήτρα, που περιλαμβάνει την επιθυμητή αλληλουχία στόχο, μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση προκειμένου να καταλύσει τη σύνθεση του DNA, ένα ζευγάρι εκκινητών (primers), οι οποίοι χρησιμοποιούνται από την πολυμεράση ως

εναρκτήρια τμήματα για τη σύνθεση του DNA, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), δισθενή κατιόντα (συνήθως Mg^{+2}), προκειμένου να λειτουργήσει σωστά η θερμοσταθερή πολυμεράση και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), προκειμένου το pH να διατηρείται στο 8,3-8,5 σε θερμοκρασία δωματίου.

Η αναλογία των συστατικών της PCR είναι η εξής:

Συστατικά	Όγκος (μl)
Buffer 10x	10
dNTPs	2
Forward Primer	2
Reverse Primer	2
DNA polymerase	1
DMSO	4
DNA (50ng)	1
ddH ₂ O	78
Τελικός όγκος	100

Πίνακας 1: Αναλογία των συστατικών που απαιτούνται για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματοποιείται πλέον σε ειδικά μηχανήματα, τους θερμικούς κυκλοποιητές, όπου και ρυθμίζεται το κατάλληλο πρόγραμμα για κάθε δείγμα που μελετάται, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να ενισχυθούν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των κενών μεταξύ των NRPS περιοχών, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Gene region	Forward Primmer	Reverse Primmer
234_655	ACYCGCAGGTCGCGGTTGTT	TCGCACCAGTGCAACCTGGT
655_139A	CASTGGAACGCCACCGCSCA	AGGTCGCCGGTGCGGTACAT
139A_139B	CGCACCCCTGTTCAAGCCAGCC	CCTTTCTACTACGTCAGCGAAA
139B_802	CCACCAGCGATGAAGTGCTGCAAC	GTTCAAGTGAAAGCTYTCRGTGAG
802_746	TGGTGCCTGGATGCGGTGATCAA	GGTRATGTCCAGSTGTTTGCCGG
401_442	ACCTGGCCGGTAACCTTGGA	CAGRGTCCCCGCGTTGATCG
442_436	TGCCGGYACGCTGACCSTCGGCA	GCCGCTGTCGAGCTTGGCCAGGGT
436_424	GTGCCGATTGCCAAGGACAG	TGCGCGTGACGACGTARGG
424_345A	CGCACCAAYTACCCGCTSACG	CGGCTGACCAGTTGCGGCACG
345A_345B	GTRCCGCTGGACGTCAAYGC	ATCAGGCTSACSGCCAGCAA
345B_536	AGCCTGATGCACYTGGCCTGGG	TCGGTGGGGCCGTAGTTGTTGA
834_721	CAGGACATCTAYCCSTGGCG	GCCAGCAGGTTGGCYTGCTGG
721_457	GCCCAGCARCGCCTGTGGTT	GCCTCGGTGCTCRGCTCGCC
676_947	CACTTTACSTTGCTCAAGGCGCC	GCGTTTTCRATATCGCCGCGTTC
734_626	TCGACAGCATCATGCAGACGGT	AAGTGTGCGTAGGCCTGCTGGC

Πίνακας 2: Forward εκκινητές και Reverse εκκινητές προκειμένου να ενισχυθούν οι περιοχές των κενών των NRPS γονιδίων

2.4.2 Ανάλυση δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την ενίσχυση των τμημάτων DNA που μας ενδιαφέρουν, πραγματοποιείται ο έλεγχος του μεγέθους και της ποιότητας των τμημάτων DNA, μέσω του διαχωρισμού των μορίων σε πήκτωμα αγαρόζης, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης πραγματοποιήθηκαν τα εξής βήματα:

- Διάλυση 1,2gr αγαρόζης σε 100ml κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος, σε κωνική φιάλη Erlenmeyer
- Θέρμανση του διαλύματος ώπου να διαλυθεί η αγαρόζη με βρασμό
- Προσθήκη 3μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr)

- Τοποθέτηση του διαλύματος σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, με την προσθήκη κατάλληλων χτενιών, ώσπου να στερεοποιηθεί το διάλυμα και μετατραπεί σε ένα ζελατινώδες και πορώδες πήκτωμα

Μετά την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης, έγινε η απομάκρυνση των χτενιών, ενώ προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα **TAE 1x** (Tris-base, Acetic acid, EDTA), pH 8,0. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν στις εσοχές που είχαν δημιουργηθεί στο πήκτωμα από τα κατάλληλα χτένια και εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο, προκειμένου το DNA να μετακινηθεί από το θετικό πόλο προς τον αρνητικό, καθώς είναι αρνητικά φορτισμένο μόριο.

Η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου, το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος (συγκέντρωση αγαρόζης), καθώς και το μέγεθος των μορίων του DNA, είναι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την ικανότητα των μορίων του DNA να διαχωρισθούν στο πήκτωμα. Τα μικρότερα μόρια DNA έχουν την ικανότητα να μετακινούνται ταχύτερα ανάμεσα στους πόρους του πηκτώματος σε σχέση με τα μεγαλύτερα, με αποτέλεσμα τόσο η συγκέντρωση της αγαρόζης όσο και η ισχύς του ηλεκτρικού πεδίου να εξαρτώνται άμεσα από το μέγεθος των μορίων του DNA. Πήκτωμα με χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (0,4- 1,2 % w/v) χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA, ενώ πηκτώματα με υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (ως 2,5% w/v) χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό μικρών μορίων DNA.

Η προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου στο διάλυμα αγαρόζης ήταν απαραίτητη προκειμένου τα τμήματα DNA να γίνουν ορατά υπό την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Το βρωμιούχο αιθίδιο, έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται στην μεγάλη αύλακα του DNA, με αποτέλεσμα τμήματα DNA, που είναι τουλάχιστον 10ng, να φθορίζουν.

Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε ειδικό μηχάνημα, για την έκθεσή του σε υπεριώδη ακτινοβολία. Ο φθορισμός που παράγεται ανιχνεύεται με κατάλληλη συσκευή απεικόνισης, που αποθηκεύει την εικόνα του πηκτώματος.

Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση της ποιότητας του γονιδιωματικού DNA, καθώς και ο προσδιορισμός του μεγέθους του.

2.4.3 Ανάκτηση κλάσματος δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων από πήκτωμα αγαρόζης

Μετά την ηλεκτροφόρηση, πραγματοποιήθηκε η ανάκτηση των κλασμάτων DNA από την πηκτή αγαρόζης. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του *NucleoSpin® Gel* και *PCR Clean-up*. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Κοπή του επιθυμητού τμήματος DNA με τη χρήση νυστεριού, τοποθέτησή του σε collection tube του 1,5μl και ζύγισή του σε ζυγαριά ακριβείας
- Προσθήκη διπλάσιου όγκου ρυθμιστικού διαλύματος NT1 και επώαση του δείγματος στους 50-52°C για 5-10 min, προκειμένου να διαλυθεί η αγαρόζη. Ανά 2-3 min το δείγμα αναταράσσονταν στο vortex προκειμένου να επιταχυνθεί η διαδικασία
- Έπειτα, 700μl του δείγματος απομακρύνθηκαν και τοποθετήθηκαν σε στήλη NoLiD column, κάτω από την οποία τοποθετήθηκε ένα collection tube των 2ml και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min.
- Το DNA προσδέθηκε στη στήλη, ενώ το υπόλοιπο δείγμα που διαπέρασε τη στήλη και συλλέχθηκε στο collection tube, απομακρύνθηκε
- Η διαδικασία επαναλήφθηκε για το υπόλοιπο δείγμα που δεν συλλέχθηκε αρχικά
- Έπειτα ακολούθησε πλύση της στήλης με προσθήκη 700μl διαλύματος NT3, που περιέχει αιθανόλη και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 1 min στις 13000 rpm
- Το δείγμα που διαπέρασε τη στήλη απομακρύνθηκε, ενώ πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντρηση για 2 min, χωρίς την προσθήκη διαλύματος αιθανόλης, προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως περίσσεια αιθανόλης από το δείγμα
- Σε επόμενο στάδιο, έγινε μεταφορά της στήλης σε νέο erpendorf 1,5ml, με προσθήκη στη στήλη 15-30μl διαλύματος NE, προκειμένου να πραγματοποιηθεί πλήρης έκλυση του DNA ενώ επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min
- Τέλος, αφού πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 2 min στις 13000 rpm, το δείγμα φυλάχθηκε στους -20°C.

2.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA με φασματοσκοπική ανάλυση

Μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA είναι η φασματοφωτομετρική ανάλυση, με τη χρήση φασματοφωτόμετρου μικροποσοτήτων. Η φασματοφωτομετρική ανάλυση βασίζεται στην ιδιότητα των νουκλεϊκών οξέων να απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία, σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Στο παρόν πείραμα όπου τα δείγματα είναι τμήματα DNA, η υπεριώδη ακτινοβολία που θα απορροφηθεί ήταν μήκους κύματος 260 nm. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου τύπου NanoDrop® ND1000 Spectrophotometer, το οποίο συνδέεται σε οθόνη υπολογιστή για την καταγραφή της οπτικής πυκνότητας (OD) και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

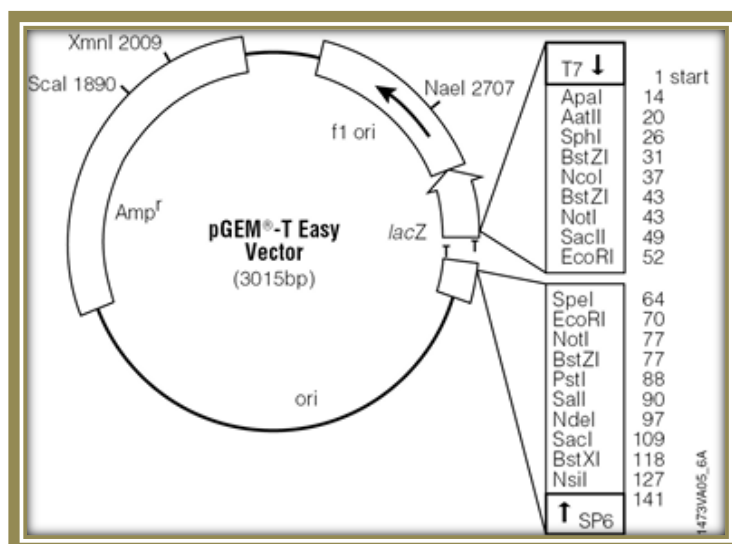
- Ρύθμιση του φωτόμετρου για ανάλυση DNA δείγματος
- Καθαρισμός των οπτικών επιφανειών με προσθήκη 1μl ddH₂O στην κάτω οπτική επιφάνεια του φωτόμετρου. Καθαρισμός του δείγματος με πετσέτα από τις επιφάνειες
- Μηδενισμός του οργάνου με προσθήκη 1μl ρυθμιστικού διαλύματος NE και έπειτα απομάκρυνσή του με πετσέτα
- Εισαγωγή 1μl δείγματος DNA, καταγραφή της αναλογίας OD_{260nm}: OD_{280nm} και εκτίμηση της καθαρότητας του δείγματος
- Καθαρισμός των οπτικών επιφανειών με προσθήκη 1μl ddH₂O και κλείσιμο του προγράμματος

Όταν η αναλογία κυμαίνεται γύρω στο 1,8, οι μετρήσεις θεωρούνται πολύ καλές και τα δείγματα πολύ καθαρά. Όταν όμως η αναλογία είναι μικρότερη από 1,8, τα δείγματα θεωρούνται ότι περιέχουν και άλλες προσμίξεις, που αλλοιώνουν τη μέτρηση.

2.4.5 Υποκλωνοποίηση των τμημάτων DNA σε κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα

Η λιγοποίηση (ligation) είναι μια διαδικασία που σκοπό έχει τη σύνδεση δύο θραυσμάτων νουκλεϊκών οξέων με τη βοήθεια ενός ενζύμου, όπως την εισαγωγή ενός τμήματος DNA σε ένα κατάλληλο πλασμιδιακό φορέα. Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι η υποκλωνοποίηση των μελετώμενων τμημάτων DNA, προκειμένου να

είναι πιο εύκολος ο χειρισμός τους, καθώς και ο προσδιορισμός της ακριβούς νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους. Τα άκρα των θραυσμάτων του DNA συνδέονται με τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ του 3'-υδροξυτελικού άκρου του ενός τμήματος και του 5'-αμινοτελικού άκρου του άλλου τμήματος DNA.



Εικόνα 15: Πλασμιδιακός φορέας pGEM-T Easy.

Ο πλασμιδιακός φορέας που θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να φέρει ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά, απαραίτητα για την επιλογή του. Στο παρόν πείραμα έγινε η επιλογή του πλασμιδιακού φορέα

pGEM-T easy (εικόνα 7).

Το πλασμίδιο φέρει μια

αρχή αντιγραφής (**ori**), διαθέτει δύο δείκτες επιλογής, ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό **αμπικιλίνη** (Amp) και ένα γονίδιο **lacZ** που παράγει την β-γαλακτοζιδάση. Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης βρίσκεται υπό τον μεταγραφικό έλεγχο των παραπάνω προαγωγέων, ενώ η μεταγραφή επάγεται παρουσία του χημικού αναλόγου της λακτόζης IPTG. Η β-γαλακτοσιδάση μεταβολίζει την οργανική ένωση X-gal, παράγοντας μια αδρανή ουσία μπλε χρώματος. Η ένθεση του ξένου τμήματος DNA στην περιοχή του πολυσυνδέτη, διακόπτει τη μεταγραφή του γονιδίου *lacZ*, με αποτέλεσμα την αδυναμία μεταβολισμού της X-gal.

Ο φορέας έχει υποστεί πέψη με το ένζυμο περιορισμού **EcoRI** και στα τυφλά άκρα που δημιουργήθηκαν προστέθηκαν βάσεις θυμίνης, προκειμένου να αποφευχθεί η επανασυγκόλλησή τους, αλλά και να βελτιωθεί η ενσωμάτωση του ένθετου τμήματος στον πλασμιδιακό φορέα.

Στην αντίδραση ενσωμάτωσης (ligation), για τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας δημιουργίας ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, η αναλογία των μορίων του πλασμιδιακού φορέα και του προς ένθεση τμήματος DNA ρυθμίζεται στο 1:3. Η

αραίωση τόσο του φορέα όσο και του ένθετου τμήματος DNA γίνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε να διευκολύνεται η επίτευξη της απαιτούμενης αναλογίας.

Αναλογία των συστατικών που απαιτούνται για την πραγματοποίηση της υποκλωνοποίησης:

Συστατικά	Όγκος (μl)
Vector (pGEM-T Easy)	0,5
Enzyme (T ₄ DNA ligase)	0,5
Buffer 10x	1,0
Insert	(Εξαρτάται από το μέγεθός του)
ddH ₂ O	-
Τελικός Όγκος	10

Πίνακας 3: Αναλογία των συστατικών που απαιτούνται για την πραγματοποίηση της υποκλωνοποίησης στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy.

Η διαδικασία της λιγοποίησης πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 4°C και διαρκεί 16 h.

2.4.6 Μετασχηματισμός δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli*

Μετασχηματισμός (transformation) είναι μια διαδικασία κατά την οποία ξένο DNA μεταφέρεται μέσα σε ένα κύτταρο. Ο μετασχηματισμός πραγματοποιείται με φυσικό τρόπο σε ορισμένους οργανισμούς, όπως είναι τα βακτήρια. Στη συγκεκριμένη περίπτωση γίνεται μεταφορά του γενετικού υλικού εντός του κυττάρου των βακτηρίων, με τη βοήθεια των πλασμιδίων. Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων με πλασμίδια είναι σημαντικός καθώς τα βακτήρια χρησιμοποιούνται ως μέσο για την αποθήκευση αλλά και την αντιγραφή των πλασμιδίων. Προκειμένου τα βακτηριακά στελέχη να μετατραπούν πιο εύκολα σε δεκτικά και να έχουν την ικανότητα να διατηρούν το πλασμίδιο εντός του κυττάρου, χωρίς να γίνεται αναδιάταξη του πλασμιδιακού DNA, αρκετές γενετικές τροποποιήσεις έχουν πραγματοποιηθεί. Ταυτόχρονα, έχουν γίνει ειδικές επεξεργασίες που αυξάνουν την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού των βακτηρίων και τα καθιστούν πιο

επιρρεπή, είτε σε χημικό είτε σε ηλεκτρικό μετασχηματισμό, κάνοντάς τα δεκτικά κύτταρα (competent cells).

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος ***Escherichia coli* XL-Blue** , για το μετασχηματισμό. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα επόμενα βήματα:

- Αρχικά λήφθηκαν τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* XL-Blue, από τους -80°C και τοποθετήθηκαν απευθείας στον πάγο για απόψυξη, για περίπου 20-30 min
- Ταυτόχρονα λήφθηκαν από τους 4°C τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό μέσο LA (Luria-Bertani Agar), με αντιβιοτικό αμπικιλίνη (Amp), στερεωμένα με αγαρόζη περιεκτικότητας 1,5% και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης θερμοκρασίας 37°C για 20 min
- Στον πάγο τοποθετήθηκε επίσης το προϊόν της λιγοποίησης, ώσπου να ξεπαγώσει
- Σε αρχικό όγκο 10μl DNA, προστέθηκαν 60μl δεκτικών βακτηριακών κυττάρων XL-Blue και τοποθετήθηκαν στον πάγο για 20-30min
- Έπειτα το μίγμα τοποθετήθηκε σε υγρό θάλαμο επώασης, ρυθμισμένο στους 42°C, προκειμένου να υποστούν τα κύτταρα θερμικό σοκ, για 70 sec
- Με το πέρας της διαδικασίας το μίγμα μεταφέρθηκε απευθείας στον πάγο για επώαση για 2-3 min
- Έπειτα έγινε η προσθήκη 200μl LB στο μίγμα και τοποθετήθηκε σε θάλαμο επώασης, ρυθμισμένο στους 37°C για 15 min. Σε αυτό το στάδιο τα βακτηριακά κύτταρα παράγουν τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το πλασμίδιο και θα τους προσδώσουν την απαραίτητη ανθεκτικότητα απέναντι σε αντιβιοτικά (αμπικιλίνη στη προκειμένη περίπτωση)
- Με το πέρας της επώασης, προστέθηκαν στο μίγμα 50μl X-gal συγκέντρωσης 2% (w/v) και 2μl IPTG, προκειμένου να γίνει η επιλογή των αποικιών που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο
- Τέλος, αφού έγινε καλή ανάδευση του μίγματος με πιπέτα, πραγματοποιήθηκε η επίστρωση στο τρυβλίο που περιείχε θρεπτικό LB- Amp

και μεταφέρθηκε στο θάλαμο επώασης, ρυθμισμένο στους 37°C, για όλη τη νύχτα

2.4.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli* μέσω της διαδικασίας του βρασμού

Τα κύτταρα που κατάφεραν να επιβιώσουν στο τρυβλίο, παρουσία του αντιβιοτικού αμπικιλλίνη, ήταν και εκείνα που επιλέχθηκαν για τη απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Τα κύτταρα αυτά δεν είχαν μεταχρωματισθεί σε μπλε αποικίες αλλά παρέμειναν λευκά, ενώ ήταν εκείνα που περιείχαν το πλασμίδιο με το επιθυμητό προς ανάλυση ένθετο τμήμα DNA. Οι 3-4 αποικίες που επιλέχθηκαν, αναπτύχθηκαν σε μπουκαλάκια McCartney που περιείχαν θρεπτικό μέσο ανάπτυξης LB παρουσία αμπικιλλίνης για 19 ώρες στους 37°C σε θάλαμο επώασης υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Στην παρούσα μελέτη η απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία του βρασμού.

- 1,5ml της καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε erpendorf των 2ml και φυγοκεντρήθηκε για περίπου 3 min σε 13000 rpm
- Με το πέρας της διαδικασίας το υπερκείμενο απομακρύνεται από το erpendorf
- Έπειτα προστέθηκαν 150μl ρυθμιστικού διαλύματος STET και πραγματοποιήθηκε έντονη ανατάραξη στο στατό προκειμένου να διαλυθούν πλήρως τα κύτταρα
- 2μl λυσοζύμης προστέθηκαν στο erpendorf και ακολούθησε καλή ανατάραξη στο στατό, προκειμένου να σπάσουν οι κυτταρικές μεμβράνες, παρασέρνοντας το γενωμικό DNA
- Σε επόμενο βήμα πραγματοποιήθηκε βρασμός 45 sec προκειμένου να παραμείνει μόνο το πλασμιδιακό DNA
- Έπειτα, αφού πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 20 min σε 13000 rpm, με οδοντογλυφίδα απομακρύνθηκε το ίζημα
- Ακολούθησε η προσθήκη 180μl ισοπροπανόλης και αφού ανακινήθηκε καλά, φυγοκεντρήθηκε για 5 min σε 13000 rpm. Η ισοπροπανόλη έχει την

ικανότητα να συσσωματώνει τα νουκλεϊκά οξέα, ώστε με το τέλος της φυγοκέντρησης να παραμείνει στο erpendorf ως ίζημα

- Έπειτα, αφού έγινε η απομάκρυνση του υπερκειμένου με πιπέτα, το υπόλοιπο δείγμα επώαστηκε στους 37°C για 20 min προκειμένου να εξατμισθεί όση ποσότητα προπανόλης είχε παραμείνει στο erpendorf
- Τέλος, έγινε η προσθήκη 20μl ddH₂O και πραγματοποιήθηκε καλή ανακίνηση

2.4.8 Πέψη πλασμιδιακού DNA με τη χρήση ενζύμων περιορισμού

Η πέψη πραγματοποιείται, με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία του επιθυμητού ένθετου τμήματος DNA στον πλασμιδιακό φορέα. Στην προκειμένη περίπτωση αυτό το ένζυμο είναι το **EcoRI**. Στο διάλυμα γίνεται και η προσθήκη του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος προκειμένου το ένζυμο να δράσει. Επίσης απομακρύνεται το υπάρχον RNA, με την προσθήκη του ενζύμου RNase.

Οι αναλογίες των συστατικών της πέψης είναι οι εξής:

Συστατικά	Όγκος (μl)
DNA (50ng/ μl)	3-4
RNase	0,2
<i>EcoRI</i>	0,5
<i>EcoRI</i> buffer	2
ddH ₂ O	13,3
Τελικός Όγκος	20

Πίνακας 4: Αναλογία των συστατικών που απαιτούνται για την πραγματοποίηση πέψης του πλασμιδιακού DNA

Μετά την ανάμιξη των συστατικών σε erpendorf των 25μl και την καλή ανάμιξή τους, το μίγμα μεταφέρθηκε σε υγρό θάλαμο επώασης για 2 ώρες ρυθμισμένο στους 37°C. Μετά το τέλος της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του αναμενόμενου, επιθυμητού τμήματος DNA. Ανάλογα από το αποτέλεσμα, επιλέγεται ένα δείγμα

προκειμένου να πραγματοποιηθεί η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του *NucleoSpin® Plasmid* της Macherey- Nagel.

2.4.9 Απομόνωση του πλασμιδιακού DNA

Αφού πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση και επιλέχθηκε το κατάλληλο δείγμα για την ορθότερη και καλύτερου αποτελέσματος απομόνωση πλασμιδιακού DNA, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- 2ml από την αντίστοιχη καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε errendorf των 2ml και φυγοκεντρήθηκε στις 12000 rpm για 3 min
- Η διαδικασία επαναλήφθηκε με προσθήκη 1,5ml από την υπόλοιπη καλλιέργεια, αφού πρώτα απομακρύνθηκε το υπερκείμενο
- Με το τέλος της διαδικασίας απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύθηκε, σε 250μl διαλύματος A₁, ικανού να διαλύσει πλήρως το βακτηριακό ίζημα
- Σε επόμενο βήμα αφού έγινε η προσθήκη 250μl διαλύματος A₂ και καλή ανακίνησή του 6-8 με το χέρι, αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για επώαση για 5min
- Έπειτα έγινε η προσθήκη 300μl διαλύματος A₃ και αφού ανακινήθηκε καλά, φυγοκεντρήθηκε για 5min σε 12000 rpm
- 750μl του υπερκειμένου απομακρύνθηκαν και μεταφέρθηκαν σε NoLiD Column μέσα collection tube των 2ml
- Αφού πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 1 min σε 12000 rpm, το υπερκείμενο από το collection tube απομακρύνθηκε. Σε αυτό το στάδιο το επιθυμητό πλασμιδιακό DNA έχει προσδεθεί στη στήλη και το υπόλοιπο διάλυμα έχει απομακρυνθεί
- Έπειτα έγινε η προσθήκη 600μl διαλύματος A₄ που περιέχει αιθανόλη και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση του δείγματος για 1 min στα 12000 rpm.
- Αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, η φυγοκέντρηση επαναλήφθηκε προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη από το δείγμα
- Η στήλη έπειτα μεταφέρθηκε σε νέο collection tube των 1,5ml και αφού προστέθηκαν 50μl ρυθμιστικού διαλύματος AE, προκειμένου να γίνει

έκλουση του DNA που ήταν προσδεδεμένο στη στήλη, αφέθηκε για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min

- Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min σε 15000rpm
- Τέλος το δείγμα αποθηκεύτηκε στους -20°C

2.4.10 Αλληλούχιση νουκλεοτιδικών ακολουθιών (sequencing)

Αφού έγινε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA μέσω πρωτοκόλλου του *NucleoSpin® Plasmid* της Macherey- Nagel, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία του επιθυμητού τμήματος DNA. Το υπόλοιπο δείγμα, αφού σημειώθηκε το προβλεπόμενο μέγεθός του, στάλθηκε για αλληλούχιση. Οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστά για όλες τις μελετώμενες νουκλεοτιδικές περιοχές και στάλθηκαν όλα για αλληλούχιση.

2.5 Ομαδική κινητικότητα των βακτηριακών στελεχών X, p93 και δ40 σε στερεό θρεπτικό μέσο NA, 0,3% (w/v), 0,5% (w/v) και 1,5% (w/v) περιεκτικότητας σε άγαρ

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν προκειμένου μελετηθεί η ομαδική κινητικότητα των βακτηριακών στελεχών X, p93 και δ40 σε θρεπτικό υπόστρωμα NA ήταν τα εξής:

- Αρχικά τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια (Nutrient Broth) NB των 5ml, παρουσία κατάλληλων αντιβιοτικών, σε θάλαμο επώασης υπό ανάδευση ρυθμισμένο στους 28°C για 19 ώρες.

Βακτηριακό στέλεχος	Αντιβιοτικά
X	ΡΙφαμπικίνη (Rif)
δ40	ΡΙφαμπικίνη (Rif), Καναμυκίνη (Kan)
p93	ΡΙφαμπικίνη (Rif), Καναμυκίνη (Kan)

- Την επόμενη ημέρα και αφού αναπτύχθηκαν όλα τα μελετώμενα βακτηριακά στελέχη, φτιάχτηκε θρεπτικό υλικό NA (nutrient agar), αφού ζυγίστηκαν τα κατάλληλα συστατικά σε ζυγαριά ακριβείας, σύμφωνα με την παρακάτω αναλογία:

Συστατικά	Ποσότητα
Peptone	5gr
Nutrient Broth	3gr
Agar	0,5%
dH ₂ O	1l
Τελικός όγκος	1l

- Σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν 20ml θρεπτικού υλικού, οπότε ανάλογα με την επιθυμητή ποσότητα υπολογίζεται, κάθε φορά η αντίστοιχη αναλογία των συστατικών
- Αφού αναμίχθηκαν τα Peptone, Nutrient Agar και dH₂O, σε φλάσκα και αναδεύθηκαν καλά ώσπου να διαλυθούν πλήρως, έγινε ο διαχωρισμός του διαλύματος σε 2 φλάσκες καθώς η ομαδική κινητικότητα μελετήθηκε σε δύο διαχειρίσεις (παρουσία και απουσία γλυκόζης)
- Έπειτα πραγματοποιήθηκε η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας άγαρ ξεχωριστά σε κάθε φλάσκα, καθώς το άγαρ έχει την ιδιότητα να μην ομογενοποιείται αν δεν θερμανθεί
- Τέλος οι φλάσκες, αφού σφραγίστηκαν καλά με αλουμινόχαρτο, στάλθηκαν για αποστείρωση
- Η αποστείρωση πραγματοποιείται στους 121°C για 20 min
- Έπειτα αφού σημειώθηκαν τα τρυβλία με τα ακριβή στοιχεία της κάθε διαχείρισης, έγινε η επίστρωσή τους με το διάλυμα NA
- Τέλος, αφού στερεοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός 3μl των μελετώμενων βακτηριακών στελεχών (spotting) και επώασή τους σε θάλαμο επώασης ρυθμισμένος στους 25°C για 19 ώρες

Μετά από 19 ώρες αποτυπώθηκαν τα αποτελέσματα της ομαδικής κινητικότητας των βακτηριακών στελεχών

2.6 Ομαδική κινητικότητα των βακτηριακών στελεχών *Pseudomonas fluorescens* X, XGFP, p93 και δ40 εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων

Ο έλεγχος της επίδρασης της ομαδικής κινητικότητας των βακτηριακών στελεχών *Pseudomonas fluorescens* X, XGFP, p93 και δ40 έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans* και *Rhizoctonia solani*, πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία Petri με θρεπτικό μέσο NA, στερεοποιημένο με άγαρ 0,5%.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ώσπου να παρατηρηθεί και να αποτυπωθεί η αλληλεπίδραση των βακτηριακών στελεχών με τους μύκητες είναι ίδια με την παραπάνω, με τη διαφορά ότι ο εμβολιασμός του υποστρώματος με τον αντίστοιχο μύκητα πραγματοποιήθηκε την ημέρα παρασκευής του θρεπτικού υλικού, ενώ ο εμβολιασμός του κάθε βακτηριακού στελέχους με τον αντίστοιχο μύκητα, εξαρτήθηκε από το αναπτυξιακό στάδιο του μύκητα.

Οι παρατηρήσεις καθώς και η αποτύπωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε σε χρονικό διάστημα 2 ημερών.

Η παρατήρηση της συμβολής της ομαδικής κινητικότητας των βακτηριακών στελεχών *Pseudomonas fluorescens* X και XGFP πραγματοποιήθηκε υπό την έκθεσή τους στην ορατή (VIS) αλλά και στην υπεριώδη (UV) ακτινοβολία, προκειμένου να γίνει καλύτερη παρατήρηση των αποτελεσμάτων.

2.6.1 Η συμβολή της ανταγωνιστικότητας των βακτηριακών στελεχών *Pseudomonas fluorescens* X, p93 και δ40 εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων

Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε η ζωτικότητα των φυτοπαθογόνων μυκήτων, ύστερα από την αλληλεπίδρασή τους με τα βακτηριακά στελέχη σε τρυβλία Petri με θρεπτικό μέσο NA, στερεοποιημένα με άγαρ 0,5% (w/v). Αφού παρατηρήθηκε επικάλυψη τμήματος του μυκηλίου των μυκήτων από το εκάστοτε βακτηριακό στέλεχος, λήφθηκε κομμάτι αυτού για επανακαλλιέργεια. Η ανάπτυξή τους έγινε σε τρυβλία θρεπτικού μέσου NA, στερεοποιημένα με άγαρ 0,5% (w/v), με την προσθήκη αντιβιοτικού στρεπτομυκίνης και καναμυκίνης. Στόχος αυτού του πειράματος ήταν να θανατωθούν τα βακτηριακά κύτταρα, προκειμένου να

παρατηρηθεί η ζωτικότητα των μυκήτων χωρίς την περαιτέρω ανταγωνιστική δράση των βακτηρίων. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 25°C και η παρατήρησή τους γίνονταν σε καθημερινή βάση, διάρκειας 5 ημερών.

2.7 Ομαδική κινητικότητα του βακτηριακού στελέχους εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* και εναντίον του *Pseudomonas sp.* P3

Ο έλεγχος της επίδρασης της ομαδικής κινητικότητας του βακτηριακού στελέχους έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* και έναντι του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas sp.* P3 πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία Petri με θρεπτικό μέσο NA, στερεοποιημένο με άγαρ 0,5%.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ώσπου να παρατηρηθεί και να αποτυπωθεί η αλληλεπίδραση του XGFP βακτηριακού στελέχους με τους μικροοργανισμούς είναι ίδια με τη 2.5, με τη διαφορά ότι:

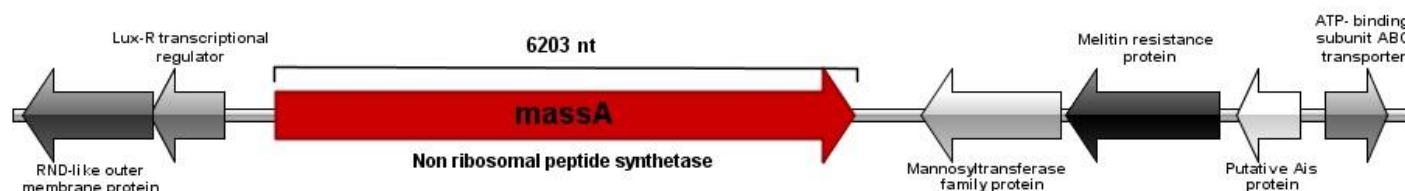
- Ο εμβολιασμός του υποστρώματος με τον μύκητα πραγματοποιήθηκε την ημέρα παρασκευής του θρεπτικού υλικού και ο εμβολιασμός με το P3 εξαρτήθηκε από το αναπτυξιακό στάδιο του μύκητα
- Ο εμβολιασμός του υποστρώματος με τα βακτηριακά στελέχη XGFP και P3 πραγματοποιήθηκε την ίδια μέρα με την παρασκευή του θρεπτικού υλικού.

3. Αποτελέσματα

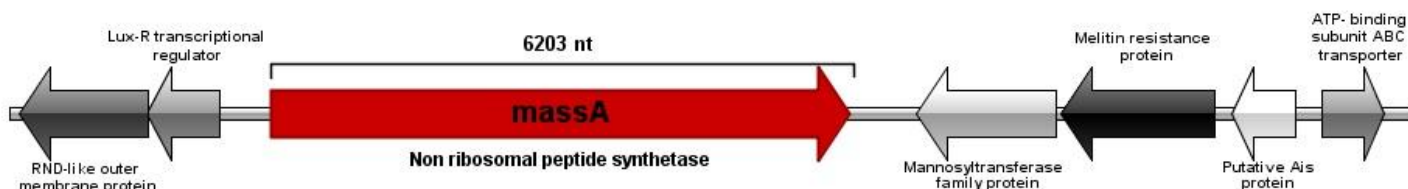
3.1 Γονιδιακή κατασκευή του massetolide A

Ύστερα από την πραγματοποίηση των κατάλληλων μοριακών τεχνικών για την ένωση των κενών μεταξύ των μη ριβοσωμικών πεπτιδικών συνθετασών (NRPS) του κυκλικού λιποπεπτιδίου massetolide A, δημιουργήθηκε η ενιαία νουκλεοτιδική αλληλουχία για την παραγωγή του συγκεκριμένου αντιβιοτικού. Για την πραγματοποίηση της γονιδιακής κατασκευής χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **IBS 1.0.1** (Illustrator for Biological Sequences).

Pseudomonas fluorescens X



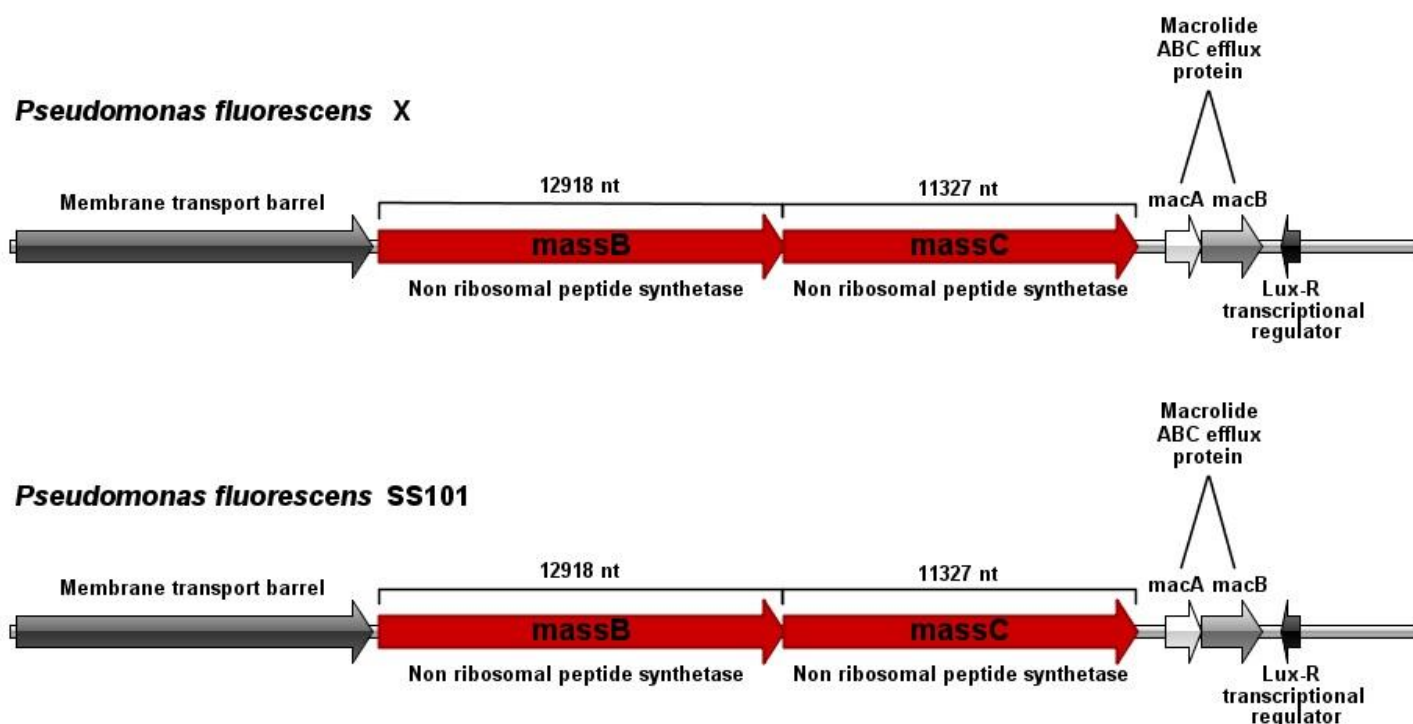
Pseudomonas fluorescens SS101



Εικόνα 16: Γονιδιακή κατασκευή του massetolide A σε σύγκριση με τη γονιδιακή κατασκευή του massetolide A του *Pseudomonas fluorescens* SS101. Η γονιδιακή κατασκευή δημιουργήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος IBS 1.0.1. Με κόκκινο χρώμα είναι σημειώνεται το NRPS γονίδιο *massA*, το οποίο είναι απομακρυσμένο από τα άλλα δύο NRPS γονίδια, *massB* και *massC*.

Αριστερά του *massA* γονιδίου βρέθηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία για την παραγωγή της πρωτεΐνης της εξωτερικής μεμβράνης, που ανήκει στην οικογένεια του RND (Resistance Nodulation and cell Division) εκκριτικού συστήματος. Η τριμερής πρωτεΐνη του RND εκκριτικού συστήματος βρέθηκε και σε άλλα βακτηριακά στελέχη που παράγουν κυκλικά λιποπεπτίδια, όπως είναι το *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* που παράγει το αντιβιοτικό syringomycin (Kang και Gross, 2005), το *Pseudomonas fluorescens* SS101 που παράγει το massetolide A (92% ομολογία), καθώς και το *Pseudomonas fluorescens* SBW25 που παράγει το

αντιβιοτικό viscosin. Οι μεταλλάξεις που πραγματοποιήθηκαν, από τους Kang και Gross, στα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση του αντιβιοτικού syringomycin στο βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής του αντιβιοτικού γύρω στο 40-60%. Τα αποτελέσματα αυτά κάνουν απαραίτητη την ύπαρξή του γονιδίου για τη μεταφορά του εκάστοτε παραγόμενου λιποπεπτιδίου εκτός της μεμβράνης, όπως το massetolide A. Στην ίδια πλευρά υπάρχει και το ORF για την παραγωγή του ρυθμιστικού παράγοντα τύπου Lux-R, όπου έχει βρεθεί και σε άλλα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, όπως το *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Παρά το γεγονός ότι είναι ακόμη άγνωστος ο ρόλος του στην παραγωγή του massetolide A, υπερέκφραση αυτού του γονιδίου στο *Pseudomonas fluorescens* SS101 (95% ομολογία), είχε ως αποτέλεσμα στην αύξηση της βιοσύνθεσης και έκκρισης του αντιβιοτικού (De Bruijn *et.al.* 2008). Δεξιά του *massA* βρέθηκαν άλλα τρία ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια τα οποία παρουσιάζουν ομολογία κατά 95% με την αλληλουχία του SS101 για την παραγωγή του mannosyltransferase, 94% ομολογία για την παραγωγή της πρωτεΐνης ανθεκτικότητας στη melitin και κατά 96% ομολογία για την παραγωγή της Ais πρωτεΐνης (De Bruijn *et.al.* 2008).



Εικόνα 17: Γονιδιακή κατασκευή του massetolide A σε σύγκριση με τη γονιδιακή κατασκευή του massetolide A του *Pseudomonas fluorescens* SS101. Η γονιδιακή κατασκευή δημιουργήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος IBS 1.0.1. Με κόκκινο χρώμα είναι σημειώνεται τα NRPS γονίδια, *massB* και *massC*.

Μετά από την πραγματοποίηση της κατάλληλης βιοπληροφορικής μελέτης, βρέθηκαν εκτός των NRPS γονιδίων που εμπλέκονται για την παραγωγή του κυκλικού λιποπεπτιδίου massetolide A και γονίδια εκατέρωθεν αυτών, που μπορεί να συμμετέχουν για την ορθή σύνθεση και έκκριση του αντιβιοτικού. Αριστερά των NRPS γονιδίων *massBC*, βρίσκεται το ORF μεγέθους περίπου 11.3kb, το οποίο παρουσιάζει ομολογία 94% με ένα βαρέλι μεταφοράς της εξωτερικής μεμβράνης στο *Pseudomonas fluorescens* SS101. Δεξιά του *massBC* βρέθηκαν δύο ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια με 96% ομολογία και τα δύο, με τις εκκριτικές πρωτεΐνες macrolide τύπου ABC, MacA και MacB του *Pseudomonas fluorescens* SS101. Τα γονίδια αυτά είναι συντηρημένα στο τέλος των *MassBC* μεταξύ διαφορετικών βακτηρίων του γένους *Pseudomonas* που παράγουν κυκλικά λιποπεπτίδια, υποδεικνύοντας ότι τα MacA και MacB ομόλογα παίζουν πιθανόν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά των κυκλικών λιποπεπτιδίων. Το τελευταίο αναγνωστικό πλαίσιο που συναντάται στο τέλος του συμπλέγματος γονιδίων για την παραγωγή του massetolide A, έχει ομολογία 95% με τους μεταγραφικούς παράγοντες τύπου Lux-R (Εικόνα 16-17).

3.2 Γονιδιακή κατασκευή του T6SS

Ύστερα από την πραγματοποίηση της κατάλληλης βιοπληροφορικής μελέτης στο γονιδίωμα του *Pseudomonas fluorescens* X, διαπιστώθηκε ότι το βακτήριο φέρει τα γονίδια που κωδικοποιούν για το εκκριτικό σύστημα τύπου VI. Η γονιδιακή κατασκευή του T6SS σχεδιάστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος **IBS 1.0.1** (Illustrator for Biological Sequences). Με τη βοήθεια του εργαλείου Translate tool, του ExPASy, έγινε η μετάφραση των γονιδίων καθώς και η καταγραφή του προσανατολισμού τους. Μέσω του εργαλείου BLAST έγινε η σύγκρισή των T6SS γονιδίων με τα αντίστοιχα γονίδια των συγγενικών βακτηρίων *Pseudomonas* sp. WCS374, *Pseudomonas fluorescens* A506, *Pseudomonas* sp. CFT9 και *Pseudomonas fluorescens* FH5, όσο αφορά τη διάταξή αλλά και τον προσανατολισμό τους (Εικόνα 18).

Pseudomonas fluorescens X



Pseudomonas sp. WCS374



Pseudomonas fluorescens A506



Pseudomonas sp. CFT9



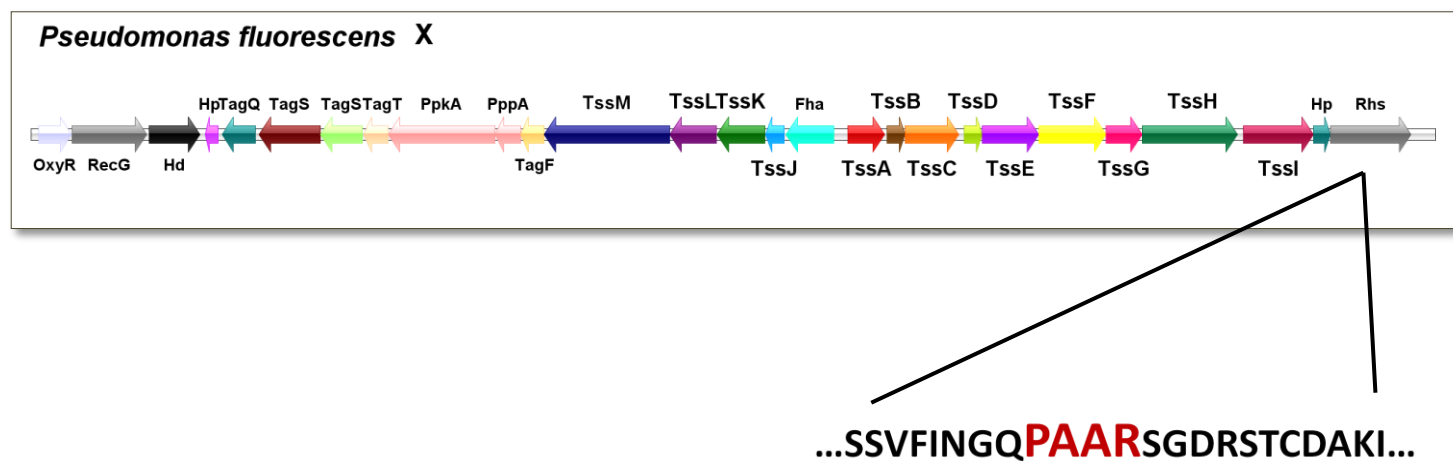
Pseudomonas fluorescens FH5



Εικόνα 18: Γονιδιακή κατασκευή του τύπου VI εκκριτικού συστήματος του *Pseudomonas fluorescens* X, σε σύγκριση με τις γονιδιακές κατασκευές των του T6SS των *Pseudomonas* sp.WCS374, *Pseudomonas fluorescens* A506, *Pseudomonas* sp.CFT9 και *Pseudomonas fluorescens* FH5. Οι γονιδιακές κατασκευές δημιουργήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος IBS 1.0.1. Με τη βοήθεια του εργαλείου Translation tool του ExPASy αλλά και του εργαλείου BLAST της βάσης δεδομένων NCBI βρέθηκε τόσο η σειρά των γονιδίων όσο και ο προσανατολισμός που ακολουθούν. Η γονιδιακή κατασκευή δημιουργήθηκε τόσο για τα 13 βασικά δομικά γονίδια του T6SS (TssM, TssL, TssK, TssJ, TssA, TssB, TssC, TssD, TssE, TssF, TssG, TssH και TssI), όσο και για τα υπόλοιπα γονίδια που βρίσκονται εκατέρωθεν αυτών και εμπλέκονται στο μηχανισμό (TagQ, TagS, TagT, PpkA, PppA, TagF, Fha, Rhs).

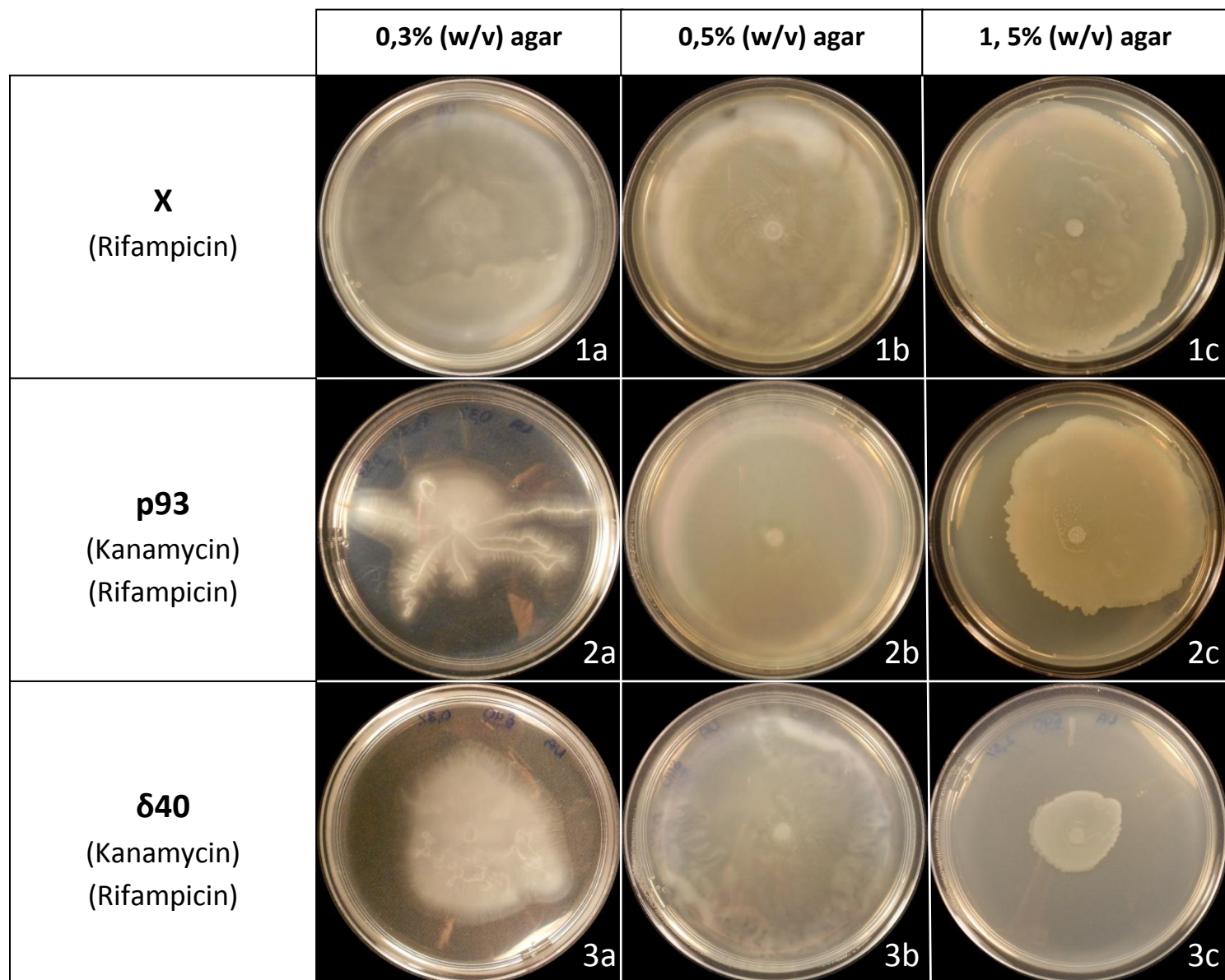
3.2.1 Επιδρώσα πρωτεΐνη που παράγεται από το T6SS

Οι επαναλαμβανόμενες PAAR αλληλουχίες της Rhs πρωτεΐνης στο τέλος του συμπλέγματος των T6SS γονιδίων, έχει αποδειχθεί με πρόσφατες μελέτες ότι αποτελεί βασικό συστατικό του τύπου VI εκκριτικού μηχανισμού. Το σύμπλοκο των Hcp-VgrG πρωτεϊνών όταν ενώνεται με την Rhs πρωτεΐνη, που φέρει τις επαναλαμβανόμενες PAAR αλληλουχίες, ολοκληρώνει την αιχμηρή ακίδα του εκκριτικού συστήματος, που μπορεί να προκαλέσει διάτρηση του κυττάρου- στόχου και τελικά το θάνατό του.



Μεταφράζοντας τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του Rhs γονιδίου το οποίο βρίσκεται στο τέλος του βασικού συμπλέγματος γονιδίων που κωδικοποιεί το T6SS, διαπιστώθηκε ότι φέρει την αμινοξική αλληλουχία PAAR (Προλίνη- Αλανίνη- Αλανίνη- Αργινίνη). Σε συνδυασμό με τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες Hcp (TssD) και VgrG (TssI), δημιουργούν ένα σύμπλοκο τριών πρωτεϊνών ικανό να δράσει ως η τοξίνη (απαραίτητη επιδρώσα πρωτεΐνη), που παράγεται από το T6SS.

3.3 Ομαδική και κολυμβητική κινητικότητα των βακτηριακών στελεχών X, p93 και δ40 σε στερεό θρεπτικό μέσο NA 0,3% (w/v), 0,5% (w/v) και 1,5% (w/v) περιεκτικότητας σε άγαρ

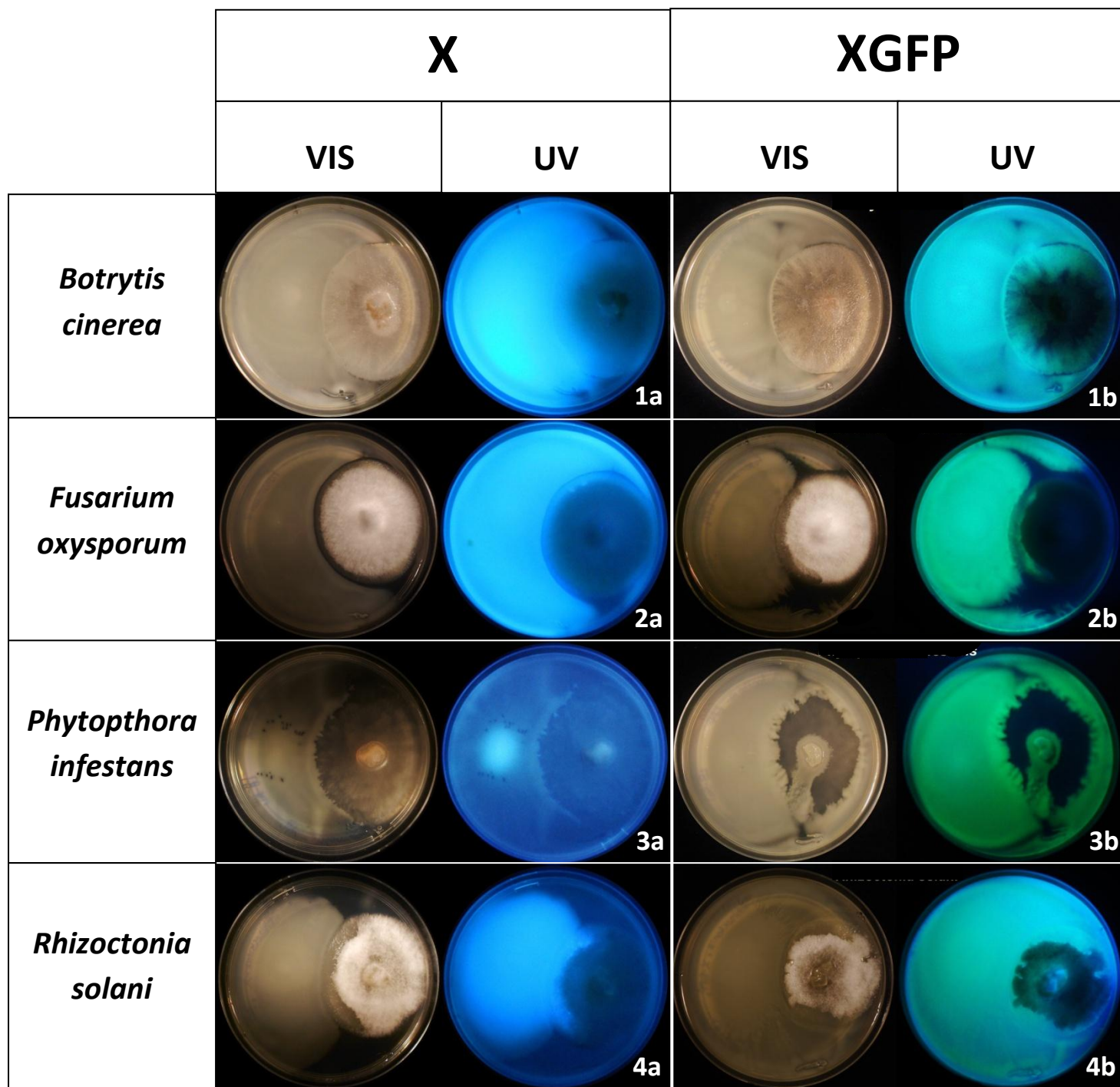


Εικόνα 20: Κολυμβητική κινητικότητα (Swimming motility)(1a,2a,3a) και ομαδική κινητικότητα (Swarming motility) (1b,2b,3b,1c,2c,3c) των βακτηριακών στελεχών *Pseudomonas fluorescens* X, P93 και δ40 σε θρεπτικό μέσο NA, περιεκτικότητας σε άγαρ 0,3%, 0,5% και 1,5% (w/v). Η λήψη των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε περίπου 19 ώρες μετά το spotting.

Στην **εικόνα 20** παρατηρείται ότι τα βακτήρια *Pseudomonas fluorescens* X, p93 και δ40 εμφανίζουν έντονη κολυμβητική και κινητική κινητικότητα σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο ανάπτυξης NA, τα οποία έχουν στερεοποιηθεί με άγαρ περιεκτικότητας 0,3% (1a, 2a, 3a), 0,5% (1b, 2b, 3b) και 1,5% (3a, 3b, 3c)(w/v). Τα

βακτηριακά στελέχη p93 και δ40 παρουσίασαν διαφοροποιημένο φαινότυπο κολυμβητικής κινητικότητας σε σχέση με το αγρίου τύπου, κάνοντας εμφανή την κίνηση των κυττάρων επί της ημιστερεής επιφάνειας (**2a,3a**). Στα τρυβλία που ήταν στερεοποιημένα με άγαρ 0,5% (w/v) (**1b, 2b, 3b**) και τα τρία βακτηριακά στελέχη εμφάνισαν παρόμοιο φαινότυπο ομαδικής κινητικότητας. Τέλος, το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens* Χ παρουσίασε μεγαλύτερη εξάπλωση στα τρυβλία που είχαν στερεοποιηθεί με άγαρ 1,5% (w/v) (1c), σε σχέση με τα βακτηριακά στελέχη p93 και δ40 όπου εμφάνισαν μικρότερο εμβαδόν εξάπλωσης (**2c,3c**).

3.4 Μελέτη της ανταγωνιστικότητας των βακτηριακών στελεχών X και XGFP εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans* και *Rhizoctonia solani*



Εικόνα 21: Ομαδική κινητικότητα (Swarming motility) των βακτηριακών στελεχών *Pseudomonas fluorescens* X (1a, 2a, 3a και 4a) και XGFP (1b, 2b, 3b και 4b) εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans* και *Rhizoctonia solani*. Η ανάπτυξή τους έγινε σε θρεπτικό μέσο NA, περιεκτικότητας σε άγαρ 0,5% (w/v). Η λήψη των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε περίπου 19 ώρες μετά τον εμβολιασμό, υπό την έκθεση σε ορατή και υπεριώδη ακτινοβολία.

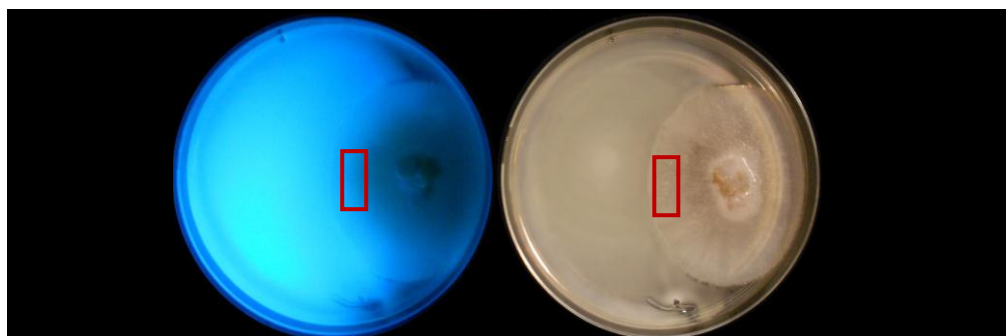
Στην **εικόνα 21** παρατηρείται ο συμβολή της ομαδικής κινητικότητας των βακτηριακών στελεχών *Pseudomonas fluorescens* X και XGFP, εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans* και *Rhizoctonia solani*. Τόσο το βακτηριακό στέλεχος X όσο και το XGFP παρουσιάζουν ευρεία εξάπλωση στο τρυβλίο με αποτέλεσμα, είτε την πλήρη κάλυψη των μυκήτων και καταστροφή των μυκηλιακών τους υφών (**1a** και **1b**), είτε τη μερική εισχώρηση των βακτηρίων εντός των μυκήτων καταστρέφοντας τις μυκηλιακές του υφές σε εκείνο το σημείο (**3a**, **3b**, **4a** και **4b**), είτε την εισχώρηση του βακτηρίου εντός του μύκητα, δημιουργώντας ταυτόχρονα μια έντονη διάφανη ζώνη (ζώνη παρεμπόδισης) (**2a** και **2b**).

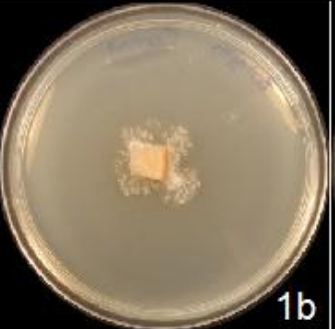
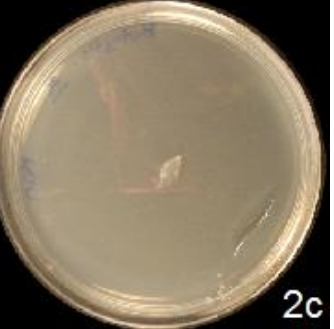
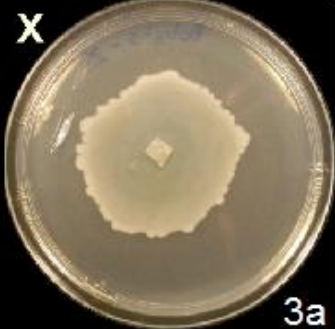
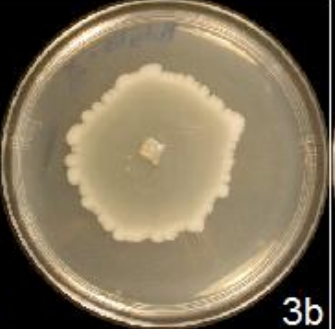
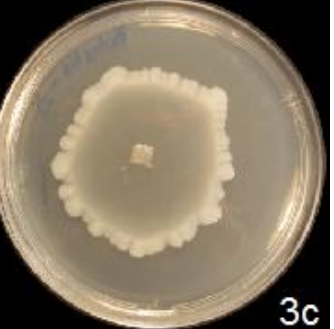
3.5 Μελέτη της ανταγωνιστικότητας των βακτηριακών στελεχών *Pseudomonas fluorescens* X, p93 και δ40 εναντίον φυτοπαθογόνων μυκήτων

Η μελέτη της συμβολής της ομαδικής κινητικότητας των βακτηριακών στελεχών X, p93 και δ40 έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans* και *Rhizoctonia solani*, πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία Petri, με θρεπτικό υπόστρωμα NA, τα οποία είχαν στερεοποιηθεί με άγαρ περιεκτικότητας 0,5% (w/v). Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της ανταγωνιστικότητας των βακτηριακών στελεχών εναντίον της ζωτικότητας των φυτοπαθογόνων μυκήτων, λήφθηκε κομμάτι από το τμήμα του μύκητα που είχε καλυφθεί πλήρως από το εκάστοτε βακτηριακό στέλεχος και ανακαλλιεργήθηκε στο κατάλληλο μέσο ανάπτυξης. Τα κοινά τμήματα του μύκητα με το βακτήριο ανακαλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο NA, στερεοποιημένα με άγαρ 0,5%, με και χωρίς την παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού. Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν 19 ώρες μετά την ανακαλλιέργεια και για συνολικό χρονικό διάστημα των 5 ημερών.

3.5.1 *Botrytis cinerea* και *Pseudomonas fluorescens* X

Botrytis cinerea

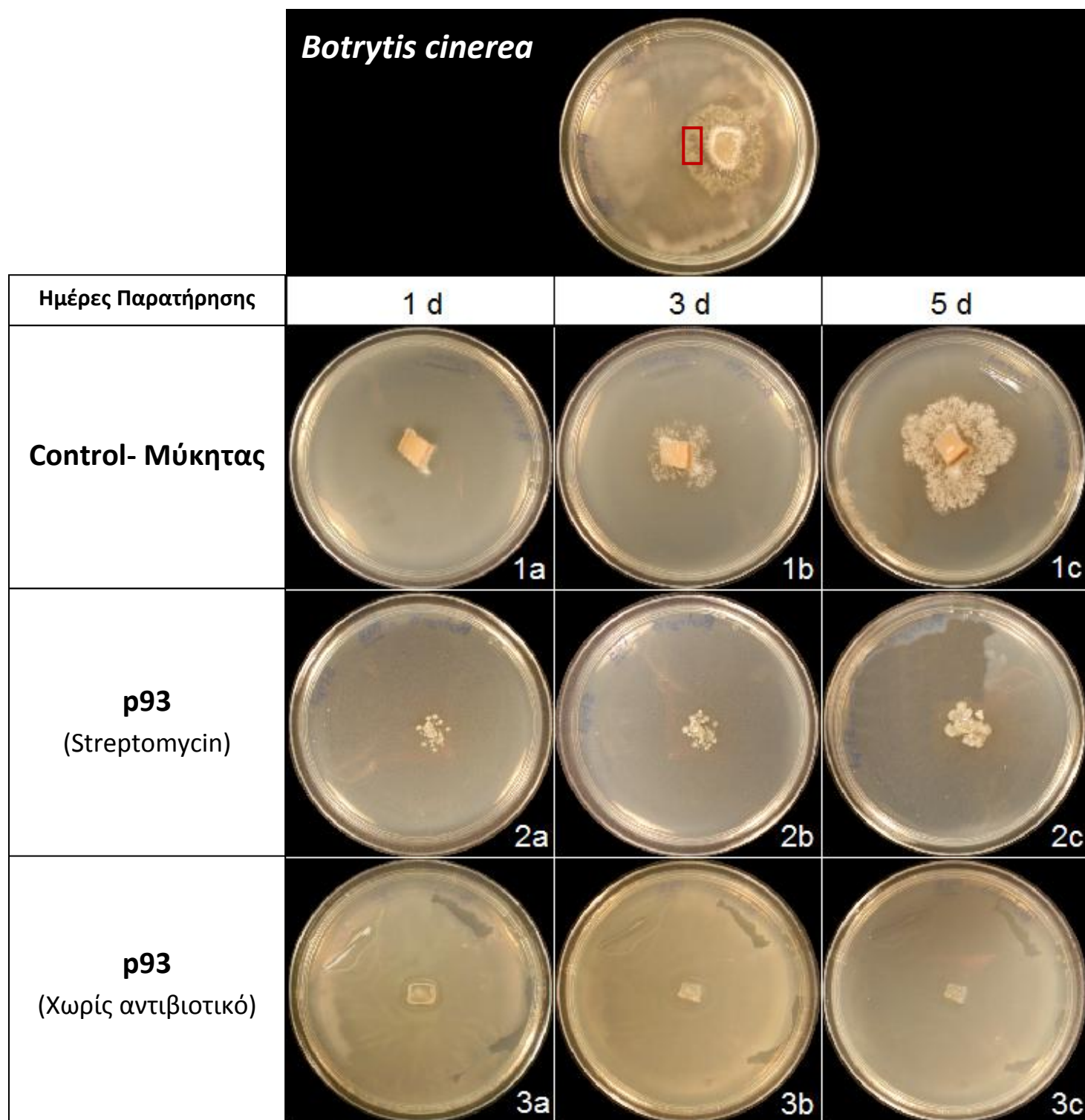


Ημέρες Παρατήρησης	1 d	3 d	5 d
Control- Μύκητας	 1a	 1b	 1c
X (Kanamycin)	 2a	 2b	 2c
X (Χωρίς αντιβιοτικό)	 3a	 3b	 3c

Εικόνα 22: Ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* X έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης NA στερεοποιημένο με άγαρ περιεκτικότητας 0,5% (w/v). Απομόνωση τμήματος του μυκηλίου που είχε καλυφθεί πλήρως από το βακτηριακό στέλεχος X (κόκκινο τμήμα) και ανακαλλιέργεια του σε τρυβλία με αντιβιοτικό Kanamycin (**2a,2b,2c**) και σε τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό (**3a,3b,3c**). Ταυτόχρονη ανάπτυξη μύκητα-control για σύγκριση (**1a,1b,1c**). Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 5 ημερών.

Στην **εικόνα 22** παρατηρείται η επίδραση της ανταγωνιστικότητας του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* X, έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea*. Στα τρυβλία όπου είχε γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Kanamycin, για τη θανάτωση του *Ps.fl.X*, ούτε το βακτήριο αλλά ούτε και ο μύκητας κατάφεραν να αναπτυχθούν κατά το χρονικό διάστημα των 5 ημερών (**2a, 2b, 2c**). Αντίθετα στα τρυβλία όπου δεν είχε γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Kanamycin, μόνο το βακτήριο κατάφερε να επιβιώσει, έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα (**3a, 3b, 3c**). Σε κάθε περίπτωση υπήρχε ανάπτυξη υγιούς μύκητα σε θρεπτικό μέσο ΝΑ, προκειμένου να γίνει άμεση σύγκριση της επίδρασης του βακτηρίου στη ζωτικότητα του μύκητα (**1a, 1b, 1c**).

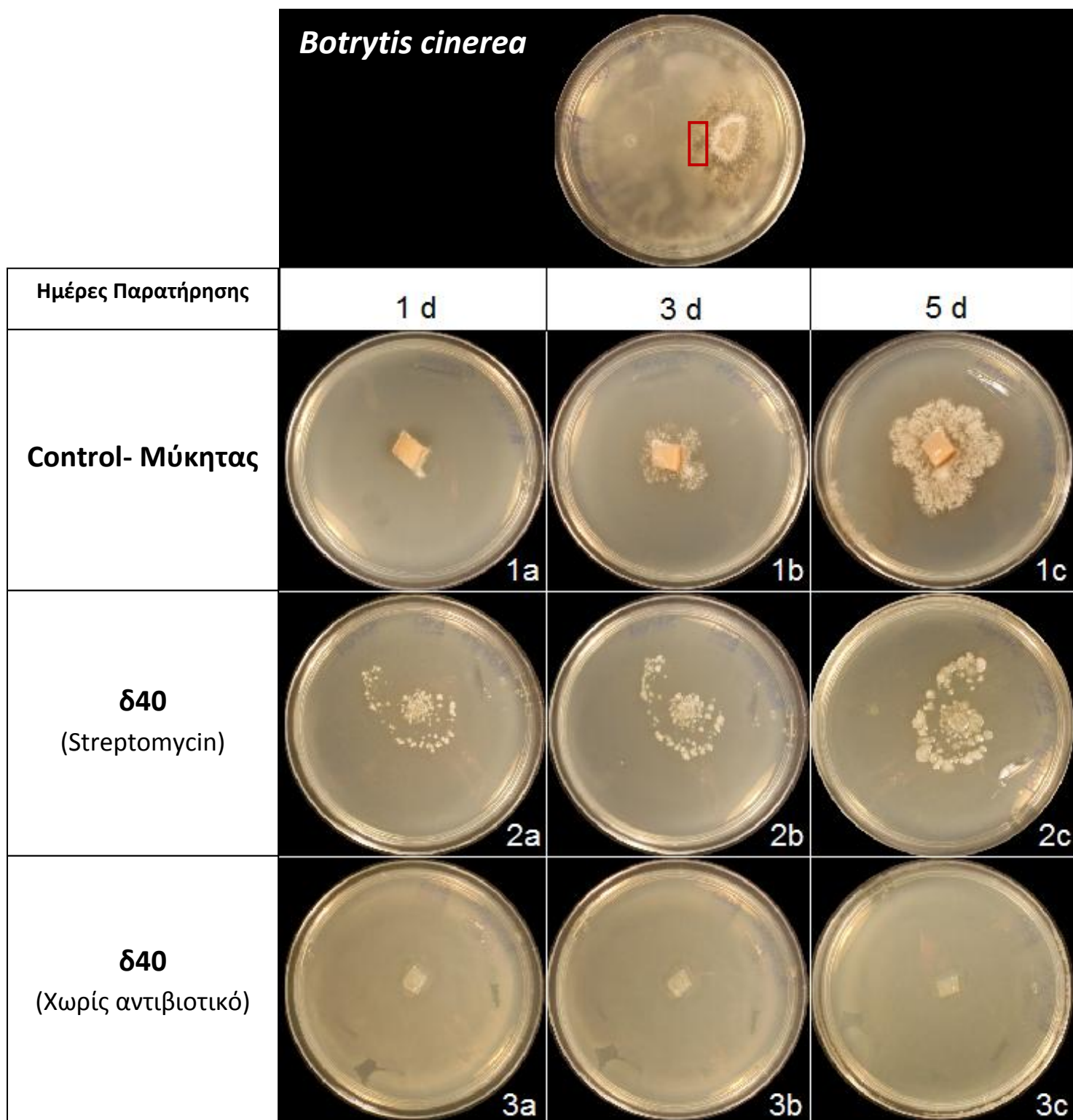
3.5.2 *Botrytis cinerea* και *Pseudomonas fluorescens* p93



Εικόνα 23: Ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* p93 έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ΝΑ στερεοποιημένο με άγαρ περιεκτικότητας 0,5% (w/v). Απομόνωση τμήματος του μυκηλίου που είχε καλυφθεί πλήρως από το βακτηριακό στέλεχος p93 (κόκκινο τμήμα) και ανακαλλιέργεια του σε τρυβλία με αντιβιοτικό Καναμυκίνη (**2a,2b,2c**) και σε τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό (**3a,3b,3c**). Ταυτόχρονη ανάπτυξη μύκητα-control (**1a,1b,1c**). Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 5 ημερών.

Στην **εικόνα 23** παρατηρείται η επίδραση της ανταγωνιστικότητας του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* p93, έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea*. Στα τρυβλία όπου είχε γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Streptomycin, για τη θανάτωση του *Ps.fl.* p93, ο μύκητας δεν κατάφερε να αναπτυχθεί κατά το χρονικό διάστημα των 5 ημερών. Αντιθέτως, τα κύτταρα του βακτηρίου κατάφεραν τόσο να επιβιώσουν αλλά και να πολλαπλασιαστούν, (**2a, 2b, 2c**) . Στα τρυβλία όπου δεν είχε γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Streptomycin, μόνο το βακτήριο κατάφερε να επιβιώσει έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα (**3a, 3b, 3c**), με την πλήρη εξάπλωση του ως τα τοιχώματα του τρυβλίου, από την πρώτη κιόλας ημέρα παρατήρησης. Σε κάθε περίπτωση υπήρχε ανάπτυξη υγιούς μύκητα σε θρεπτικό μέσο NA, προκειμένου να γίνει άμεση σύγκριση της επίδρασης του βακτηρίου στη ζωτικότητα του μύκητα (**1a, 1b, 1c**).

3.5.3 *Botrytis cinerea* και *Pseudomonas fluorescens* δ40

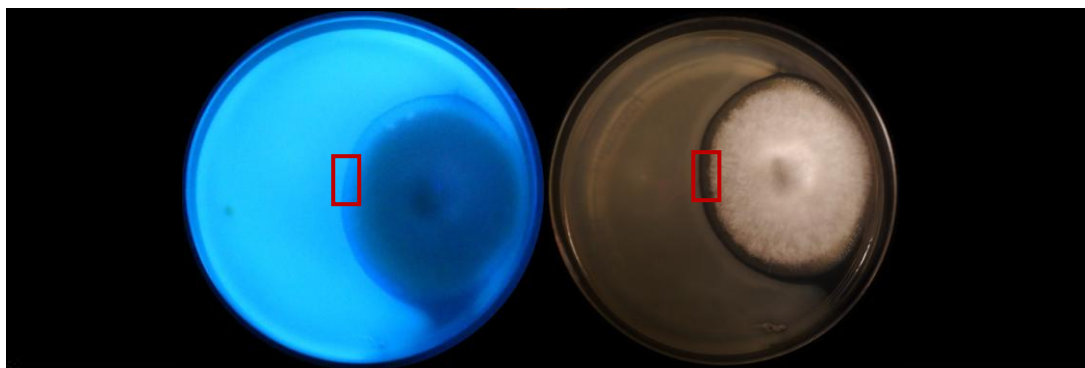


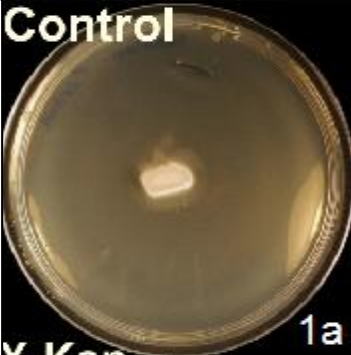
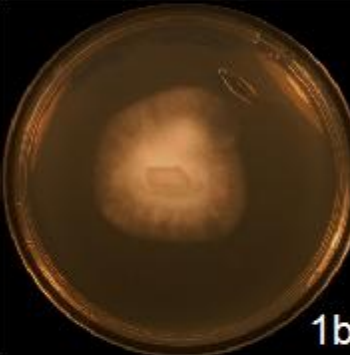
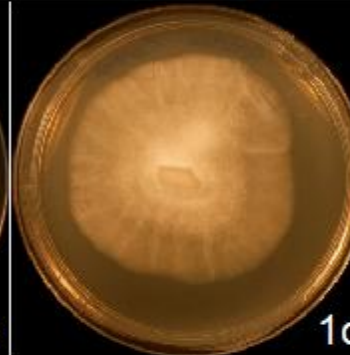
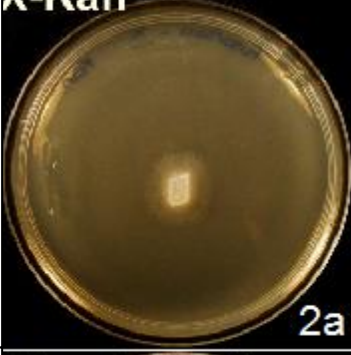
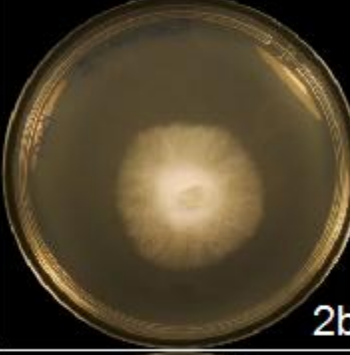
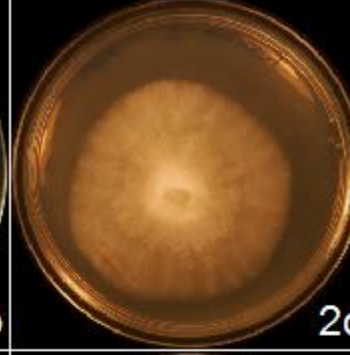
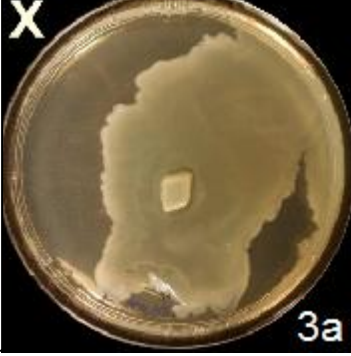
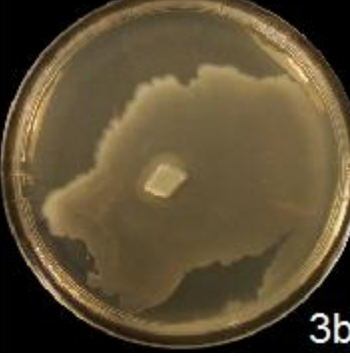
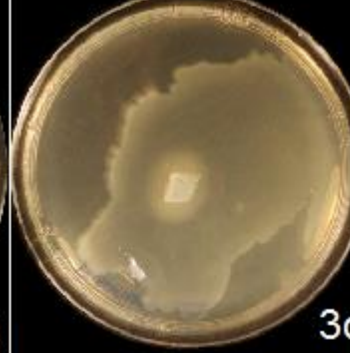
Εικόνα 24: Ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* δ40 έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ΝΑ στερεοποιημένο με άγαρ περιεκτικότητας 0,5% (w/v). Απομόνωση τμήματος του μυκηλίου που είχε καλυφθεί πλήρως από το βακτηριακό στέλεχος δ40 (κόκκινο τμήμα) και ανακαλλιέργεια του σε τρυβλία με αντιβιοτικό Kanamycin (**2a,2b,2c**) και σε τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό (**3a,3b,3c**). Ταυτόχρονη ανάπτυξη μύκητα-control (**1a,1b,1c**). Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 5 ημερών.

Στην **εικόνα 24** η ανταγωνιστικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* δ40, έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Botrytis cinerea* είναι επίσης αξιοσημείωτη. Στα τρυβλία όπου είχε γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Streptomycin, για τη θανάτωση του *Ps.fl.* δ40, ο μύκητας δεν κατάφερε να αναπτυχθεί κατά το χρονικό διάστημα των 5 ημερών, ενώ κύτταρα του βακτηρίου κατάφεραν να επιβιώσουν αλλά και να πολλαπλασιαστούν, (**2a, 2b, 2c**) . Στα τρυβλία όπου δεν είχε γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Streptomycin, μόνο το βακτήριο κατάφερε να επιβιώσει, έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα (**3a, 3b, 3c**), με την πλήρη εξάπλωση του ως τα τοιχώματα του τρυβλίου, από την πρώτη κιόλας ημέρα παρατήρησης. Σε κάθε περίπτωση υπήρχε ανάπτυξη υγιούς μύκητα σε θρεπτικό μέσο NA, προκειμένου να γίνει άμεση σύγκριση της επίδρασης του βακτηρίου στη ζωτικότητα του μύκητα (**1a, 1b, 1c**).

3.5.4 *Fusarium oxysporum* και *Pseudomonas fluorescens* X

Fusarium oxysporum

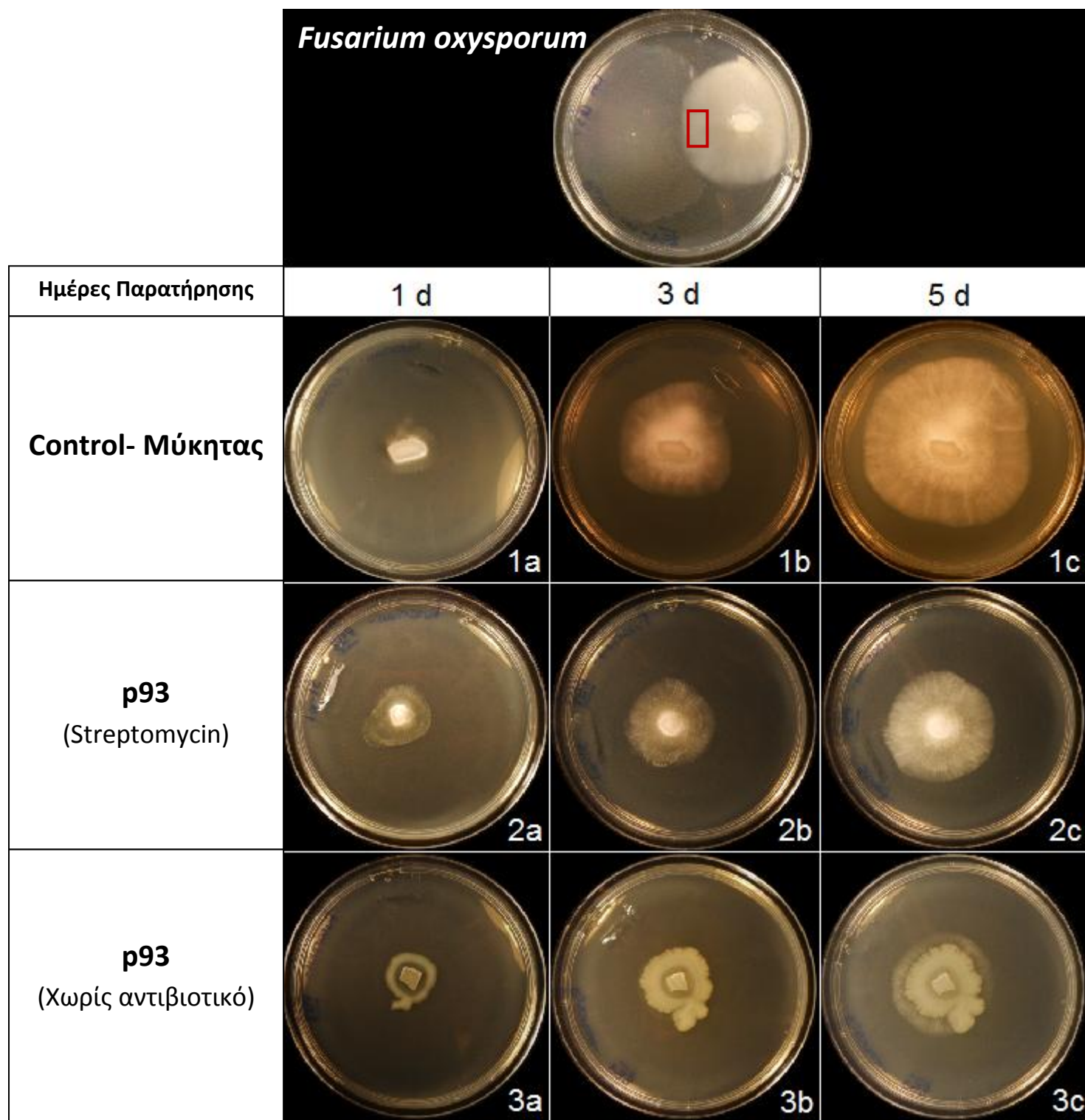


Ημέρες Παρατήρησης	1 d	3 d	5 d
Control- Μύκητας	Control  1a	 1b	 1c
X (Kanamycin)	X-Kan  2a	 2b	 2c
X (Χωρίς αντιβιοτικό)	X  3a	 3b	 3c

Εικόνα 25: Ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* X έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ΝΑ στερεοποιημένο με άγαρ περιεκτικότητας 0,5% (w/v). Απομόνωση τμήματος του μυκηλίου που είχε καλυφθεί πλήρως από το βακτηριακό στέλεχος X (κόκκινο τμήμα) και ανακαλλιέργεια του σε τρυβλία με αντιβιοτικό Kanamycin (**2a,2b,2c**) και σε τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό (**3a,3b,3c**). Ταυτόχρονη ανάπτυξη μύκητα-control (**1a,1b,1c**). Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 5 ημερών.

Στην **εικόνα 25** παρατηρείται η επίδραση της ομαδικής κινητικότητας του *Pseudomonas fluorescens* Χ εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum*. Στα τρυβλία όπου είχε γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Kanamycin, παρατηρείται ο θάνατος του βακτηρίου, όπως ήταν αναμενόμενο, αλλά ταυτόχρονα η ανάπτυξη του μύκητα (**2a, 2b, 2c**). Σε σύγκριση με τον μύκητα- control στα τρυβλία (**1a, 1b, 1c**) παρατηρείται ότι η ανάπτυξη του μύκητα κινείται στα ίδια επίπεδα, με και χωρίς την επίδραση του βιολογικού παράγοντα. Αντιθέτως στα τρυβλία όπου δεν έχει γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού, παρατηρείται πλήρης αναχαίτιση της ανάπτυξης του μύκητα, με ευρεία εξάπλωση του βακτηρίου στο μέσο ανάπτυξης (**3a, 3b, 3c**).

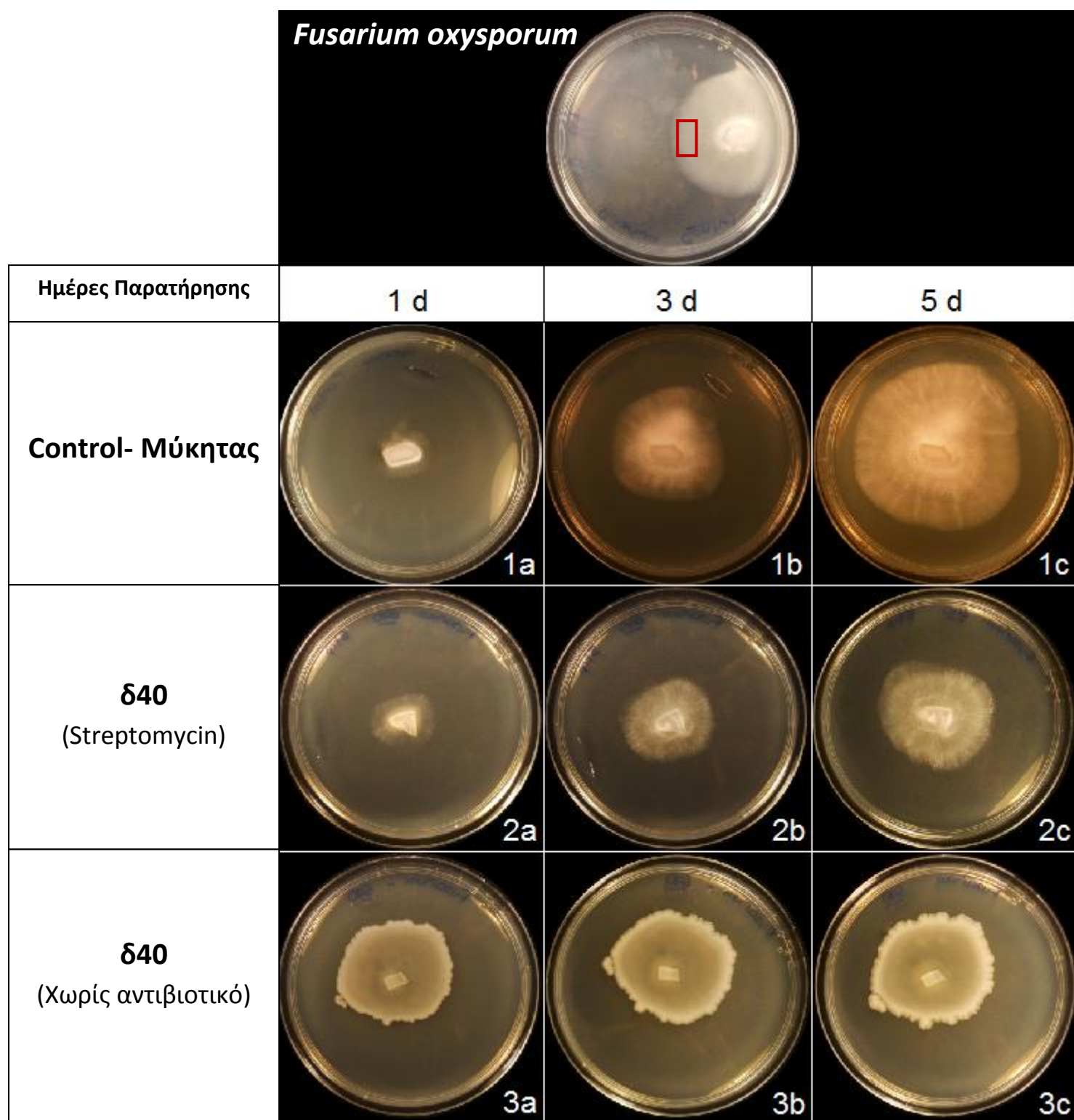
3.5.5 *Fusarium oxysporum* και *Pseudomonas fluorescens* p93



Εικόνα 26: Ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* p93 έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ΝΑ στερεοποιημένο με άγαρ περιεκτικότητας 0,5% (w/v). Απομόνωση τμήματος του μυκηλίου που είχε καλυφθεί πλήρως από το βακτηριακό στέλεχος p93 (κόκκινο τμήμα) και ανακαλλιέργεια του σε τρυβλία με αντιβιοτικό Kanamycin (**2a,2b,2c**) και σε τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό (**3a,3b,3c**). Ταυτόχρονη ανάπτυξη μύκητα-control (**1a,1b,1c**). Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 5 ημερών.

Η δράση του *Pseudomonas fluorescens* p93 εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* (**Εικόνα 26**), είναι παρόμοια με εκείνη του βακτηριακού στελέχους Χ εναντίον του ίδιου μύκητα. Στα τρυβλία όπου έχει γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Streptomycin στο μέσο ανάπτυξης, παρατηρείται η καταστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου, όπως ήταν αναμενόμενο. Την ίδια στιγμή ο μύκητας κατάφερε να επιβιώσει από την επίδραση του βακτηρίου, ανακτώντας πλήρως τη ζωτικότητα του (**2a, 2b, 2c**). Συγκρίνοντας την εξάπλωση του μύκητα υπό την επίδραση του βιολογικού παράγοντα με εκείνη του μύκητα-control (**1a, 1b, 1c**), παρατηρείται ότι είναι σαφώς μικρότερη κατά τις ίδιες μέρες παρατήρησης. Τέλος, στα τρυβλία όπου δεν έχει γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Streptomycin, η επίδραση της ομαδικής κινητικότητας του *Ps.fl.* p93 στη ζωτικότητα του *F.oxysporum* είναι άμεση κατά τις 3 πρώτες μέρες της παρατήρησης (**3a, 3b, 3c**), ωστόσο την ημέρα 5 παρατηρείται ανάκτηση της ζωτικότητας του *F.oxysporum*, με μερική ανάπτυξη των μυκηλιακών υφών.

3.5.6 *Fusarium oxysporum* και *Pseudomonas fluorescens* δ40

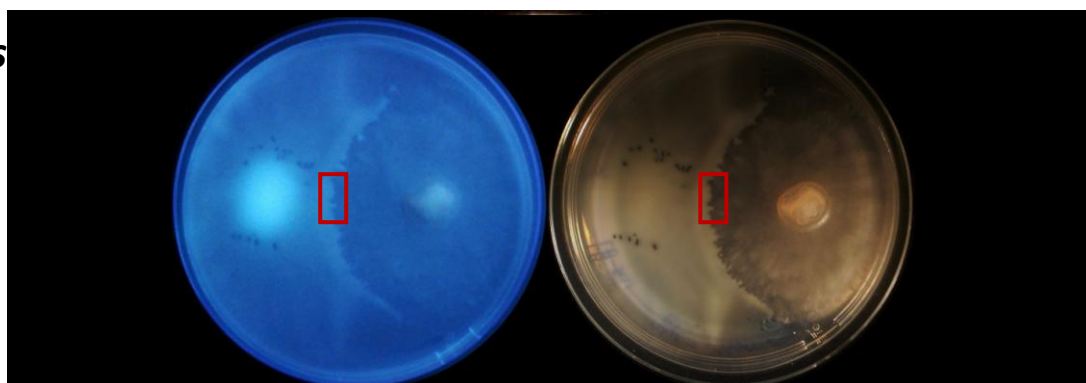


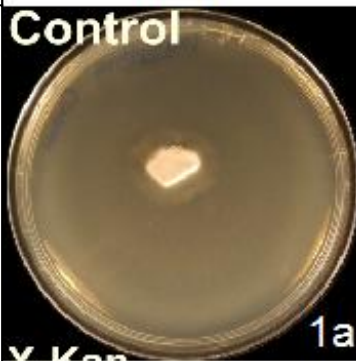
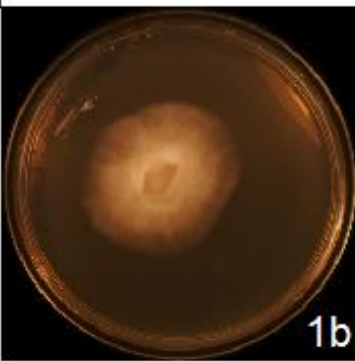
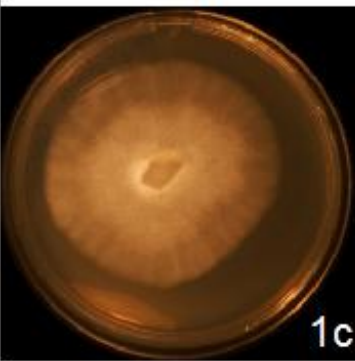
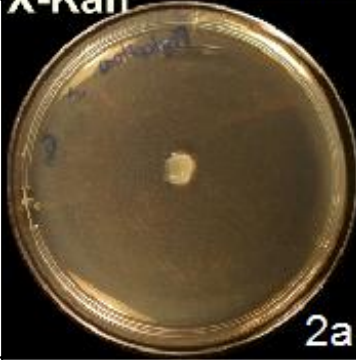
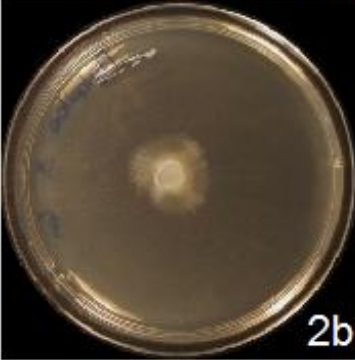
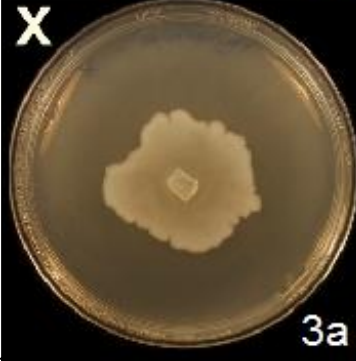
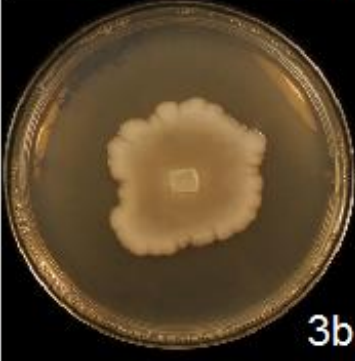
Εικόνα 27: Ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* δ40 έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ΝΑ στερεοποιημένο με άγαρ περιεκτικότητας 0,5% (w/v). Απομόνωση τμήματος του μυκηλίου που είχε καλυφθεί πλήρως από το βακτηριακό στέλεχος δ40 (κόκκινο τμήμα) και ανακαλλιέργεια του σε τρυβλία με αντιβιοτικό Kanamycin (**2a,2b,2c**) και σε τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό (**3a,3b,3c**). Ταυτόχρονη ανάπτυξη μύκητα-control (**1a,1b,1c**). Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 5 ημερών.

Στην **εικόνα 27** παρατηρείται η άμεση επίδραση του *Pseudomonas fluorescens* δ40 στην ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum*. Στα τρυβλία όπου έχει γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Streptomycin έχει υπάρξει πλήρης θανάτωση του βακτηριακού στελέχους, ωστόσο όχι και του μύκητα (**2a, 2b, 2c**). Αντίθετα ο μύκητας έχει ανακτήσει τη ζωτικότητα του, ωστόσο σε μικρότερο βαθμό σε σύγκριση με την εξάπλωση του μύκητα- control στα τρυβλία χωρίς την επίδραση του βιολογικού παράγοντα (**1a, 1b, 1c**). Το βακτήριο ωστόσο αναχαιτίζει πλήρως την ανάπτυξη του μύκητα κατά την ταυτόχρονη ανάπτυξη και των δύο στο ίδιο τρυβλίο, παρατηρώντας την ευρεία εξάπλωση του βακτηρίου στο τρυβλίο (**3a, 3b, 3c**).

3.5.7 *Phytophthora infestans* και *Pseudomonas fluorescens* X

Phytophthora infestans

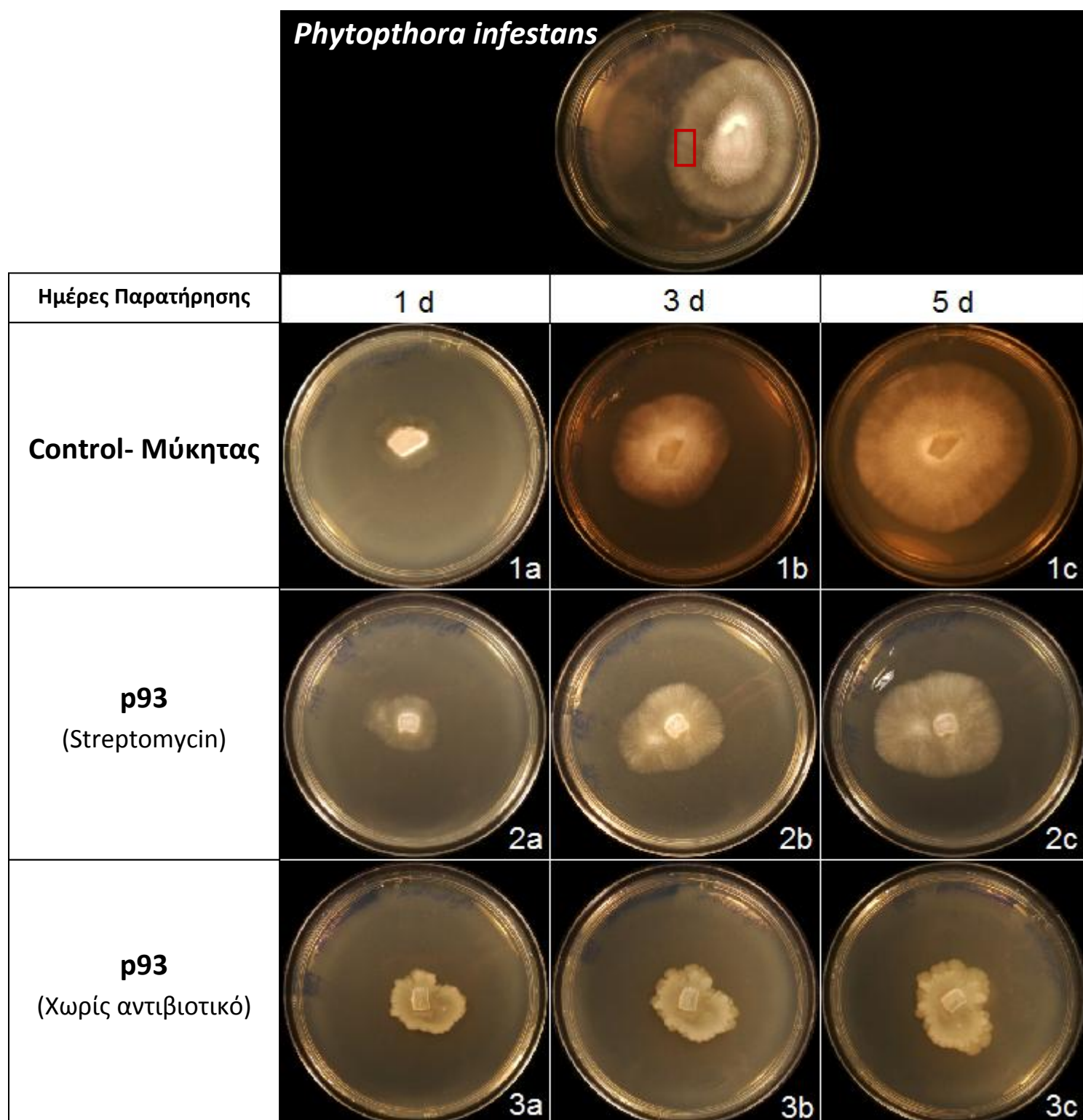


Ημέρες Παρατήρησης	1 d	3 d	5 d
Control- Μύκητας	 1a	 1b	 1c
X (Kanamycin)	 2a	 2b	 2c
X (Χωρίς αντιβιοτικό)	 3a	 3b	 3c

Εικόνα 28: Ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* X έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Phytophthora infestans* σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης NA στερεοποιημένο με άγαρ περιεκτικότητας 0,5% (w/v). Απομόνωση τμήματος του μυκηλίου που είχε καλυφθεί πλήρως από το βακτηριακό στέλεχος X (κόκκινο τμήμα) και ανακαλλιέργεια του σε τρυβλία με αντιβιοτικό Kanamycin (**2a,2b,2c**) και σε τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό (**3a,3b,3c**). Ταυτόχρονη ανάπτυξη μύκητα-control (**1a,1b,1c**). Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 5 ημερών.

Στην **εικόνα 28** παρατηρείται η άμεση επίδραση του *Pseudomonas fluorescens* Χ στην ανάπτυξη του μύκητα *Phytophthora infestans*. Στα τρυβλία όπου έχει γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Kanamycin, παρατηρείται μόνο η εξάπλωση του μύκητα στο μέσο ανάπτυξης και όχι του βακτηρίου (**2a, 2b, 2c**). Ωστόσο σε σύγκριση με την εξάπλωση του μύκητα- control στα τρυβλία χωρίς την επίδραση του βιολογικού παράγοντα (**1a, 1b, 1c**), ο μύκητας εξαπλώνεται σε μικρότερο βαθμό. Το βακτήριο ωστόσο αναχαιτίζει πλήρως τον μύκητα κατά την ταυτόχρονη ανάπτυξη και των δύο στο ίδιο τρυβλίο, με την πλήρη εξάπλωση του βακτηρίου στο μέσο ανάπτυξης (**3a, 3b, 3c**).

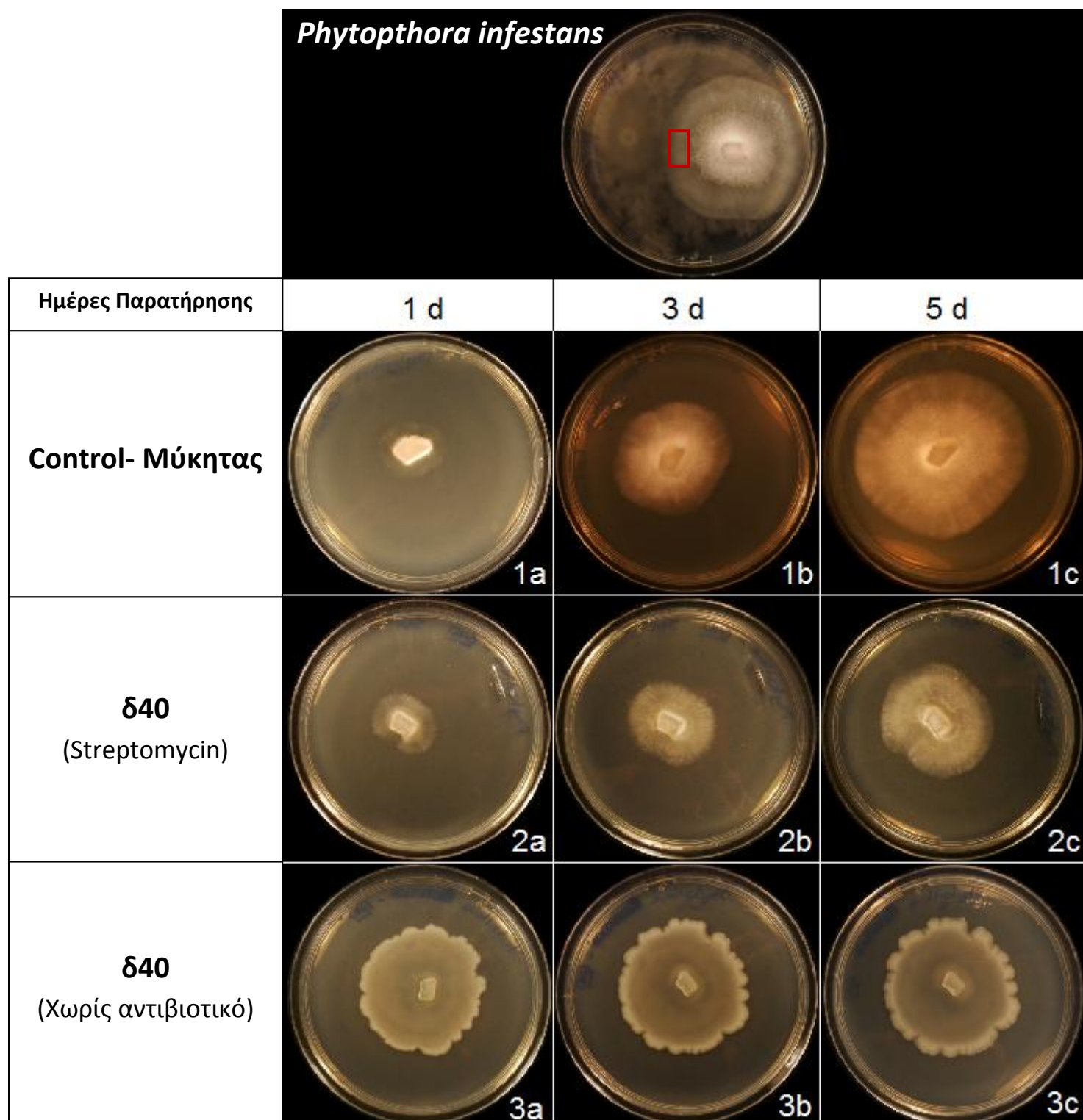
3.5.8 *Phytophthora infestans* και *Pseudomonas fluorescens* p93



Εικόνα 29: Ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* p93 έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Phytophthora infestans* σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ΝΑ στερεοποιημένο με άγαρ περιεκτικότητας 0,5% (w/v). Απομόνωση τμήματος του μυκηλίου που είχε καλυφθεί πλήρως από το βακτηριακό στέλεχος p93 (κόκκινο τμήμα) και ανακαλλιέργεια του σε τρυβλία με αντιβιοτικό Kanamycin (**2a,2b,2c**) και σε τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό (**3a,3b,3c**). Ταυτόχρονη ανάπτυξη μύκητα-control (**1a,1b,1c**). Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 5 ημερών.

Στην **εικόνα 29** παρατηρείται η επίδραση της ομαδικής κινητικότητας του *Pseudomonas fluorescens* p93 εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Phytophthora infestans*. Στα τρυβλία όπου είχε γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Streptomycin, παρατηρείται η καταστολή της ανάπτυξης του βακτηρίου, όπως ήταν αναμενόμενο, με ταυτόχρονη ωστόσο ανάπτυξη του μύκητα (**2a, 2b, 2c**). Σε σύγκριση με τον μύκητα- control στα τρυβλία **1a, 1b** και **1c**, όπου δεν έχουμε την επίδραση του βιολογικού παράγοντα παρατηρείται ότι η ανάπτυξη του μύκητα είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τα τρυβλία **2a, 2b** και **2c**. Αντιθέτως στα τρυβλία όπου δεν έχει γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού, παρατηρείται πλήρης αναχαίτιση της ανάπτυξης του μύκητα, με μόνη εξάπλωση στο μέσο ανάπτυξης εκείνη του βακτηρίου (**3a, 3b, 3c**).

3.5.9 *Phytophthora infestans* και *Pseudomonas fluorescens* δ40

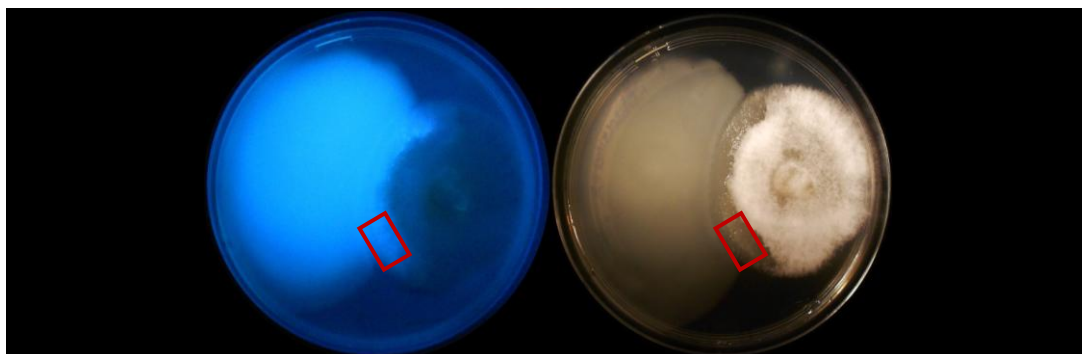


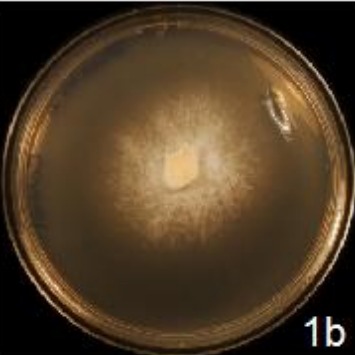
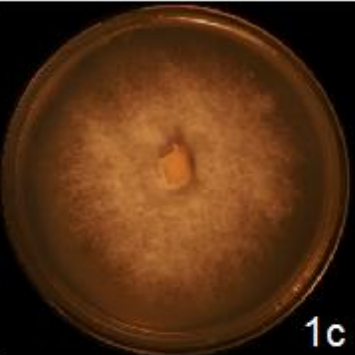
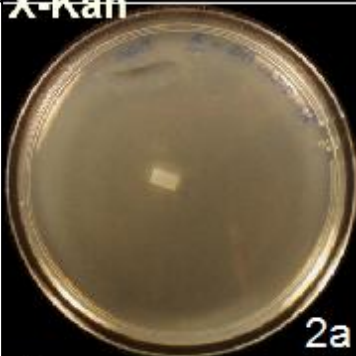
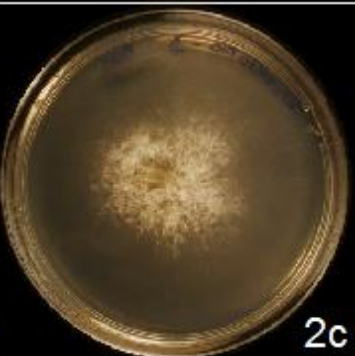
Εικόνα 30: Ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* δ40 έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Phytophthora infestans* σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ΝΑ στερεοποιημένο με άγαρ περιεκτικότητας 0,5% (w/v). Απομόνωση τμήματος του μυκηλίου που είχε καλυφθεί πλήρως από το βακτηριακό στέλεχος δ40 (κόκκινο τμήμα) και ανακαλλιέργεια του σε τρυβλία με αντιβιοτικό Kanamycin (**2a,2b,2c**) και σε τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό (**3a,3b,3c**). Ταυτόχρονη ανάπτυξη μύκητα-control (**1a,1b,1c**). Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 5 ημερών.

Στην **εικόνα 30** παρατηρείται η άμεση επίδραση του *Pseudomonas fluorescens* δ40 στην ανάπτυξη του μύκητα *Phytophthora infestans*. Στα τρυβλία όπου έχει γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Streptomycin, παρατηρείται μόνο η εξάπλωση του μύκητα στο μέσο ανάπτυξης και όχι του βακτηρίου (**2a, 2b, 2c**). Ωστόσο σε σύγκριση με την εξάπλωση του μύκητα- control στα τρυβλία χωρίς την επίδραση του βιολογικού παράγοντα (**1a, 1b, 1c**), ο μύκητας εξαπλώνεται σε μικρότερο βαθμό στο μέσο ανάπτυξης. Το βακτήριο ωστόσο αναχαιτίζει πλήρως την ανάπτυξη του μύκητα κατά την ταυτόχρονη ανάπτυξη και των δύο στο ίδιο τρυβλίο, με την πλήρη εξάπλωση του βακτηρίου στο μέσο ανάπτυξης και τη συνεχή ανάπτυξή του κατά τις 5 ημέρες παρατήρησής (**3a, 3b, 3c**).

3.5.10 *Rhizoctonia solani* και *Pseudomonas fluorescens* X

Rhizoctonia solani

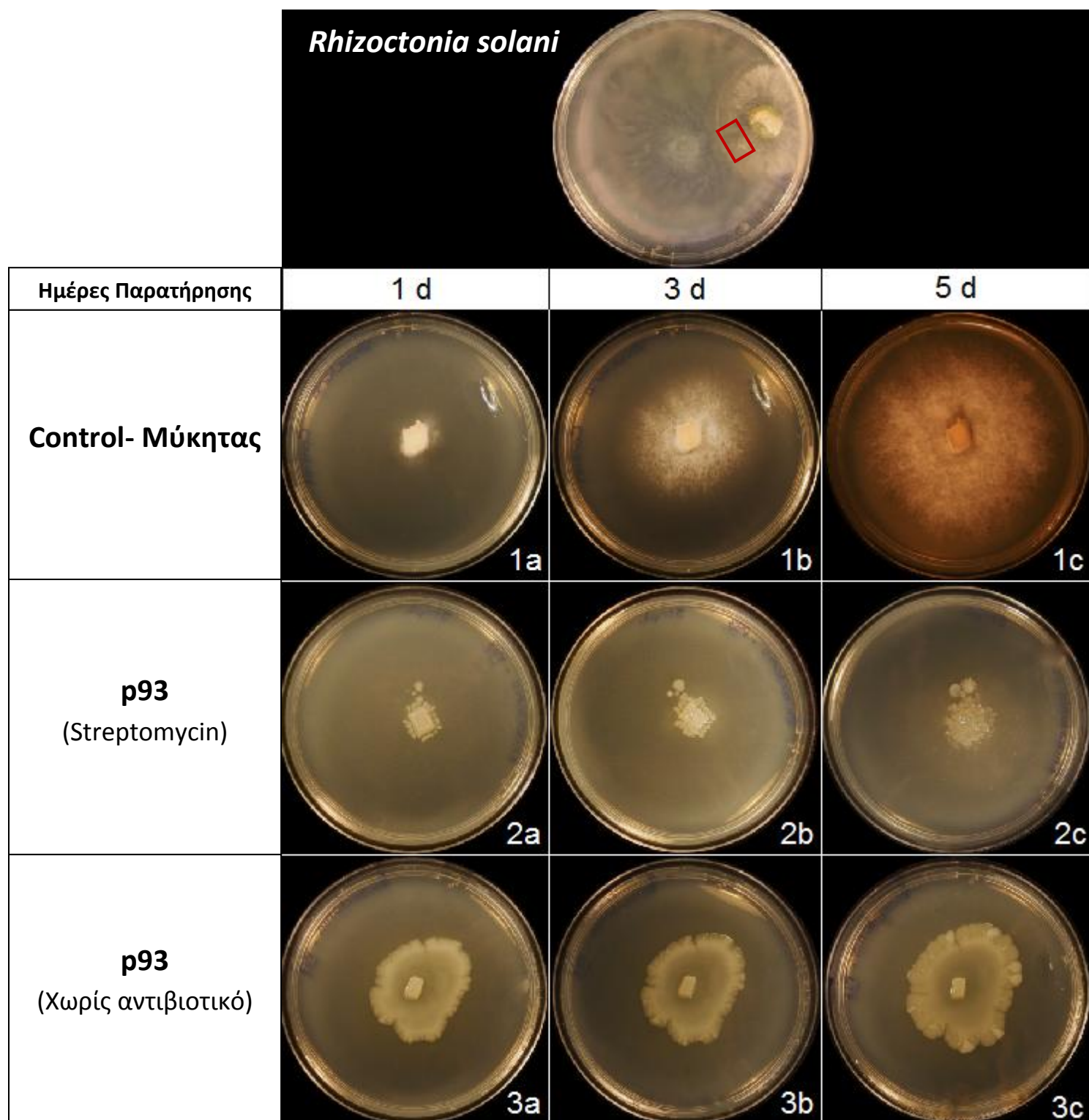


Ημέρες Παρατήρησης	1 d	3 d	5 d
Control- Μύκητας	 1a	 1b	 1c
X-Kan	 2a	 2b	 2c
X (Kanamycin)	 3a	 3b	 3c

Εικόνα 31: Ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* X έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ΝΑ στερεοποιημένο με άγαρ περιεκτικότητας 0,5% (w/v). Απομόνωση τμήματος του μυκηλίου που είχε καλυφθεί πλήρως από το βακτηριακό στέλεχος X (κόκκινο τμήμα) και ανακαλλιέργεια του σε τρυβλία με αντιβιοτικό Kanamycin (**2a,2b,2c**) και σε τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό (**3a,3b,3c**). Ταυτόχρονη ανάπτυξη μύκητα-control (**1a,1b,1c**). Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 5 ημερών.

Στην **εικόνα 31** έγινε η παρατήρηση της δράσης του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas fluorescens* Χ εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*. Το *Pseudomonas fluorescens* Χ καταστέλλει πλήρως την ανάπτυξη του μύκητα, όπως παρατηρήθηκε κατά την ανακαλλιέργειά του κοινού τμήματος του βακτηρίου και του μύκητα, στα τρυβλία χωρίς την προσθήκη του αντιβιοτικού Kanamycin (**3a, 3b, 3c**). Στα τρυβλία όπου έχει γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Kanamycin, δεν υπάρχει ανάπτυξη του βακτηρίου, όπως ήταν αναμενόμενο, αλλά μόνο η ανάπτυξη του μύκητα (**2a, 2b, 2c**). Ωστόσο η επίδραση της δράσης του βακτηρίου στη ζωτικότητα του είναι εμφανής, παρουσιάζοντας μικρότερη εξάπλωση σε σύγκριση με την ανάπτυξη του μύκητα- control, κατά τις ίδιες ημέρες παρατήρησης (**1a, 1b, 1c**).

3.5.11 *Rhizoctonia solani* και *Pseudomonas fluorescens* p93

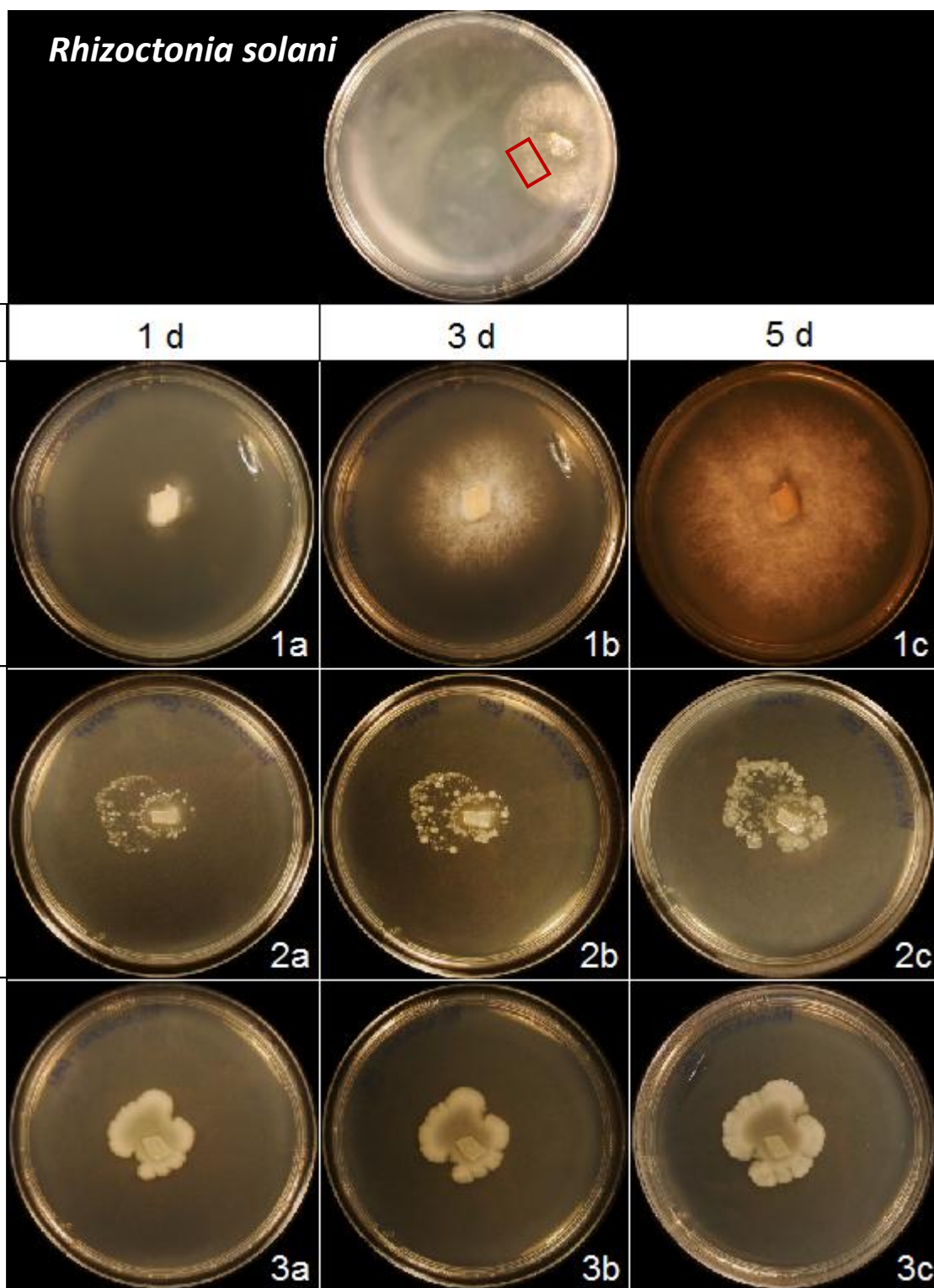


Εικόνα 32: Ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* p93 έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ΝΑ στερεοποιημένο με άγαρ περιεκτικότητας 0,5% (w/v). Απομόνωση τμήματος του μυκηλίου που είχε καλυφθεί πλήρως από το βακτηριακό στέλεχος p93 (κόκκινο τμήμα) και ανακαλλιέργεια του σε τρυβλία με αντιβιοτικό Kanamycin (**2a,2b,2c**) και σε τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό (**3a,3b,3c**). Ταυτόχρονη ανάπτυξη μύκητα-control (**1a,1b,1c**). Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 5 ημερών.

Η δράση του *Pseudomonas fluorescens* p93 εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* (**Εικόνα 32**), είναι παρόμοια με εκείνη του βακτηριακού στελέχους X εναντίον του ίδιου μύκητα. Στα τρυβλία όπου στερούνται το αντιβιοτικό Streptomycin, η επίδραση της ομαδικής κινητικότητας του *Ps.fl.* p93 στη ζωτικότητα του *Rhizoctonia solani* είναι εμφανής, καθ' όλες τις μέρες της παρατήρησης (**3a, 3b, 3c**), με πλήρη αναχαίτιση της ανάπτυξης του μύκητα.

Στα τρυβλία όπου έχει γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Streptomycin στο μέσο ανάπτυξης, δεν παρατηρείται η πλήρης αναχαίτιση της ανάπτυξης του βακτηρίου, όπως θα ήταν αναμενόμενο, ενώ την ίδια στιγμή ο μύκητας κατά την ημέρα παρατήρησης 3 και 5 κατάφερε, ανακτήσει τη ζωτικότητα του και να επιβιώσει από την επίδραση του βακτηρίου (**2a, 2b, 2c**). Συγκρίνοντας την εξάπλωση του μύκητα υπό την επίδραση του βιολογικού παράγοντα με εκείνη του μύκητα-control (**1a, 1b, 1c**), παρατηρείται ότι είναι σαφώς μικρότερης εμβέλειας, κατά τις ίδιες μέρες παρατήρησης.

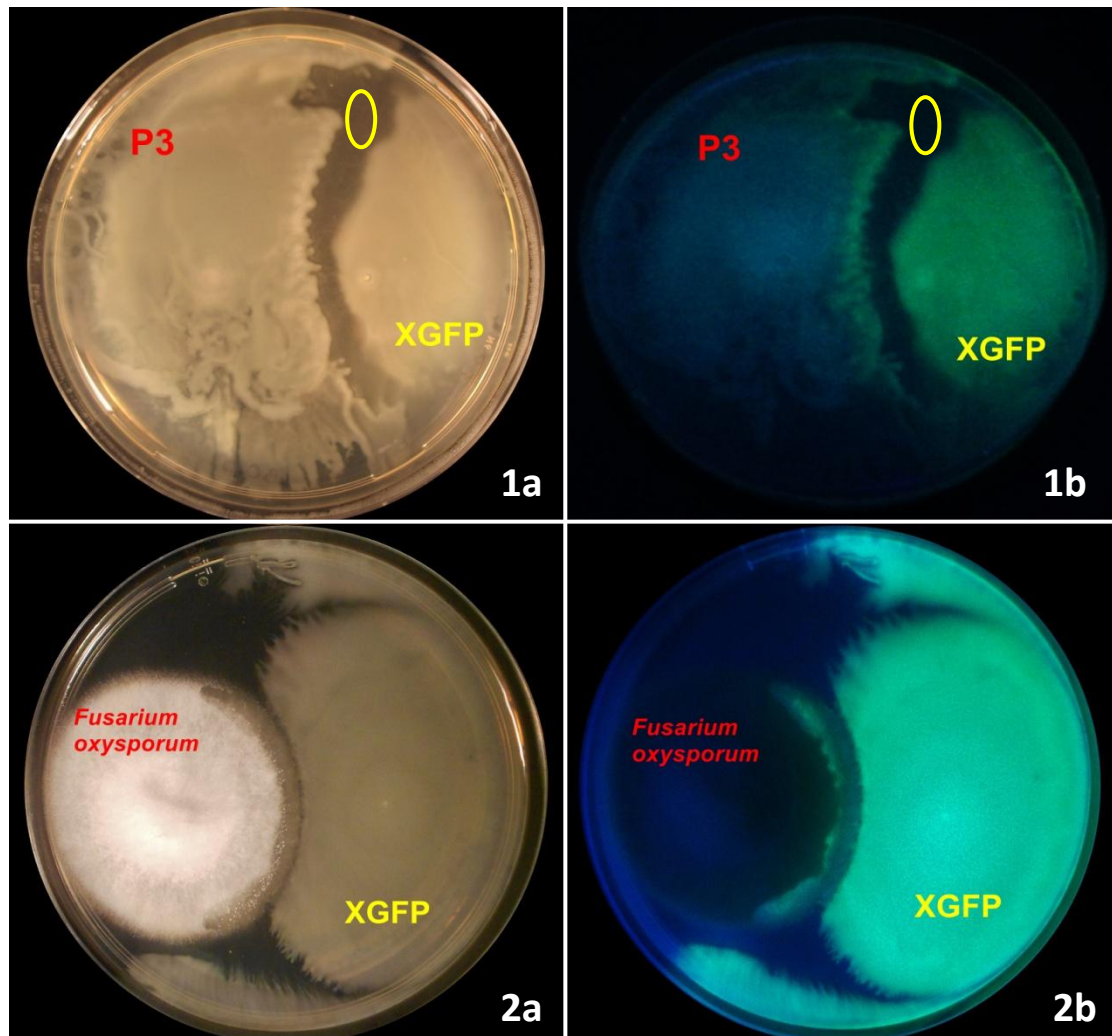
3.5.12 *Rhizoctonia solani* και *Pseudomonas fluorescens* δ40



Εικόνα 33: Ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* δ40 έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani* σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης ΝΑ στερεοποιημένο με άγαρ περιεκτικότητας 0,5% (w/v). Απομόνωση τμήματος του μυκηλίου που είχε καλυφθεί πλήρως από το βακτηριακό στέλεχος δ40 (κόκκινο τμήμα) και ανακαλλιέργεια του σε τρυβλία με αντιβιοτικό Kanamycin (**2a,2b,2c**) και σε τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό (**3a,3b,3c**). Ταυτόχρονη ανάπτυξη μύκητα-control (**1a,1b,1c**). Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 5 ημερών.

Στην **εικόνα 33** παρατηρείται η επίδραση της δράσης του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas fluorescens* δ40 εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Rhizoctonia solani*. Το βακτηριακό στέλεχος δ40 κατάφερε να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα κατά τη διάρκεια της ταυτόχρονης ανάπτυξης και των δύο στα τρυβλία όπου δεν είχε γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Streptomycin (**3a**, **3b**, **3c**). Κατά την ανάπτυξη αυτών σε θρεπτικό μέσο όπου είχε γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Streptomycin, παρατηρήθηκε η πλήρης αναχαίτιση του παθογόνου μύκητα, ενώ το βακτηριακό στέλεχος κατάφερε να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί παρά την προσθήκη του αντιβιοτικού (**2a**, **2b**, **2c**).

3.6 Επίδραση της ανταγωνιστικότητας του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas fluorescens* XGFP εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* και εναντίον του βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas fluorescens* P3



Εικόνα 34: Ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* XGFP έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης NA στερεοποιημένο με άγαρ περιεκτικότητας 0,5% (w/v), υπό την έκθεση σε ορατή και υπεριώδη ακτινοβολία(2a,2b). Ομαδική κινητικότητα του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens* XGFP έναντι του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas sp.* P3 σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης NA στερεοποιημένο με άγαρ περιεκτικότητας 0,5% (w/v), υπό την έκθεση σε ορατή και υπεριώδη ακτινοβολία (1a,1b).

Στην **εικόνα 34** παρατηρείται η αναχαίτιση της εξάπλωσης τόσο του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum* όσο και του βακτηρίου *Pseudomonas sp.* P3. Από την έντονη εξάπλωση του *Pseudomonas fluorescens* XGFP εναντίον του P3 βακτηριακού στελέχους, είναι ξεκάθαρη η δημιουργία της διάφανης ζώνης (Dienes Line), που αποτελεί σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και τα νεκρά κύτταρά των P3 και XGFP, κατά με το πέρασμα του XGFP βακτηριακού στελέχους εντός του (1a,

1b). Λαμβάνοντας κομμάτι από το τμήμα της διάφανης ζώνης που δημιουργήθηκε μεταξύ των δύο βακτηρίων και αναπτύσσοντάς το σε θρεπτικό μέσο ΝΑ στερεοποιημένο με άγαρ 0,5%, τίποτα δεν κατάφερε να αναπτυχθεί, επιβεβαιώνοντας ότι τελικά αποτελείται από νεκρά κύτταρα. Αντίστοιχη ζώνη (Inhibition Zone) παρατηρείται και εναντίον του μύκητα *Fusarium oxysporum* κατά την εξάπλωση του βακτηρίου, καταστρέφοντας τις μυκηλιακές υφές (**2a, 2b**).

4.0 Συζήτηση

Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, έχουν μελετηθεί εκτενώς για την δράση τους εναντίον πλήθους φυτοπαθογόνων μυκήτων (Bakker et al., 2007; Raaijmakers et al., 2010; Van de Mortel et al., 2002). Παρουσιάζουν έναν ευρύ αριθμό μηχανισμών προκειμένου να καταστείλουν τη δράση αυτών των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών, είτε άμεσα, είτε έμμεσα. Η εμφάνιση ομαδικής κινητικότητας, σε συνδυασμό με την παραγωγή επιφανειοδραστικών ουσιών με αντιβιοτική δράση, αποτελούν πολύ σημαντικούς μηχανισμούς προκειμένου να αναχαιτίσουν πλήρως την ανάπτυξη αυτών των μικροοργανισμών. Τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, σε μεγαλύτερο βαθμό βιοσυνθέτουν και εκκρίνουν ως αποτελεσματικές επιφανειοδραστικές ουσίες τα λιποπεπτίδια, όπως είναι η αμφισίνη, η βισκοσίνη, η τολασίνη, η συρινγκομυκίνη, η μασσετολίδη και η αρθροφακτίνη (Raaijmakers et al., 2010; Van de Mortel et al., 2002; Nybroe και Sorensen, 2004; Raaijmakers et al., 2006; Roongsawang et al., 2003). Η βιοσύνθεση των κυκλικών λιποπεπτιδίων πραγματοποιείται σε μεγάλο βαθμό από τις μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθάσες (NRPS).

Στο παρόν πείραμα, μετά την μερική αλληλούχηση του γονιδιώματος του *Pseudomonas fluorescens* X και ύστερα από την πραγματοποίηση της κατάλληλης βιοπληροφορικής μελέτης και των απαιτούμενων μοριακών τεχνικών, διαπιστώθηκε ότι το βακτήριο φέρει τα γονίδια που κωδικοποιούν για την παραγωγή του κυκλικού λιποπεπτιδίου massetolide A. Το massetolide A συντίθεται μέσω τριών μη ριβοσωμικών πεπτιδικών συνθετασών (NRPS), συνολικού μεγέθους περίπου 30 kb, τα *massA*, *massB* και *massC* αντίστοιχα. Μέσω της μηχανής αναζήτησης BLAST της βάσης δεδομένων NCBI, βρέθηκε ότι τα γονίδια *massA*, *massB* και *massC* του *Pseudomonas fluorescens* X, παρουσιάζουν ομολογία κατά 94%, 95% και 95% με τα αντίστοιχα γονίδια για την βιοσύνθεση του κυκλικού λιποπεπτιδίου massetolide A του *Pseudomonas fluorescens* SS101. Όπως και στο SS101, έτσι και στο X, το *massA* γονίδιο δεν συνδέεται φυσικά με τα *massB* και *massC* γονίδια, αλλά προηγείται αυτών, σε άγνωστη μέχρι στιγμής απόσταση. Μέσω της ίδιας διαδικασίας βρέθηκαν και τα ORFs που βρίσκονται εκατέρωθεν των *massA*, *massB* και *massC*, υποδηλώνοντας εξαιτίας της υψηλής ομολογίας τους με τα

αντίστοιχα ORFs του SS101, ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο στην έκκριση του κυκλικού λιποπεπτιδίου massetolide A.

Αρχικά, τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής μελέτης απέδειξαν ότι το *Pseudomonas fluorescens* X, όσο και τα μεταλλαγμένα στελέχη του p93 και δ40, εμφανίζουν αξιόλογο φαινότυπο κολυμβητικής και ομαδικής κινητικότητας, σε στερεό και ημιστερεό μέσο εξάπλωσης. Ύστερα από *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα βακτήρια *Pseudomonas fluorescens* X, p93 και δ40, μελετήθηκε η επίδραση της ομαδικής κινητικότητας αυτών, σε συνδυασμό με την ενδεχόμενη έκκριση του κυκλικού λιποπεπτιδίου massetolide A, στην ανάπτυξη και ζωτικότητα πλήθους φυτοπαθογόνων μυκήτων.

Η μελέτη της συμβολής της ομαδικής κινητικότητας των βακτηριακών στελεχών *P. fluorescens* X, p93 και δ40 έναντι των φυτοπαθογόνων μυκήτων *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans* και *Rhizoctonia solani*, έφερε αξιοσημείωτα αποτελέσματα. Τόσο το αγρίου τύπου βακτηριακό στέλεχος όσο και τα μεταλλαγμένα, κατάφεραν να καταστείλουν πλήρως την ανάπτυξη και εξάπλωση του μύκητα *Botrytis cinerea*, τόσο στα τρυβλία όπου είχε γίνει η εφαρμογή του κατάλληλου αντιβιοτικού όσο και στα τρυβλία χωρίς αντιβιοτικό. Σε κάθε περίπτωση, από το κοινό τμήμα του μύκητα και του βακτηρίου που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία χωρίς το αντιβιοτικό, μόνο το βακτήριο κατάφερε να εξαπλωθεί, υπερσχύοντας η ανάπτυξή του έναντι του μύκητα. Αντίθετα στα τρυβλία όπου είχε γίνει η προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού για τη θανάτωση του βακτηρίου, κανένας από τους δύο οργανισμούς δεν κατάφερε να επιβιώσει, επιβεβαιώνοντας την καταλυτική δράση των βακτηρίων στην βιωσιμότητα του φυτοπαθογόνου στελέχους.

Εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα η δράση των βακτηριακών στελεχών παρουσίασαν διαφορετικό αποτέλεσμα. Και στις τρεις περιπτώσεις, στα τρυβλία όπου είχε γίνει η προσθήκη του αντίστοιχου αντιβιοτικού, παρατηρήσαμε αρκετά έντονη την ανάπτυξη του μύκητα με την εξάπλωσή του στο τρυβλίο, να κινείται σχεδόν στα ίδια επίπεδα με του μύκητα- control. Φυσικά στα τρυβλία όπου δεν είχε γίνει η εφαρμογή του αντιβιοτικού, τα βακτηριακά στελέχη X και δ40 κατάφεραν να επικρατήσουν πλήρως έναντι του φυτοπαθογόνου μύκητα και μόνο έναντι του

p93, κατά την πέμπτη μέρα παρατήρησης, είδαμε μια μικρή ανάκτηση της ζωτικότητας του μύκητα.

Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Phytophthora infestans*, με τη μόνη διαφορά ότι ο μύκητας δεν κατάφερε να ανακτήσει τη ζωτικότητά του σε καμία από τις περιπτώσεις.

Τελευταίος μύκητας που μελετήθηκε ήταν ο *Rhizoctonia solani*. Σε όλα τα τρυβλία όπου δεν είχε γίνει η προσθήκη του αντίστοιχου αντιβιοτικού, καθ' ένα από τα βακτηριακά στελέχη κατάφεραν να επιβιώσουν και να επικρατήσουν εναντίον του μύκητα. Στο τρυβλίο όπου είχε γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού Kanamycin και εναντίον του *Pseudomonas fluorescens* X, ο μύκητας κατάφερε να αναπτυχθεί, παρουσιάζοντας ωστόσο εμφανώς μικρότερη εξάπλωση συγκριτικά με το μύκητα-control. Τα βακτηριακά στελέχη p93 και δ40 κατάφεραν να καταστείλουν πλήρως την ανάπτυξη του μύκητα σε όλες τις περιπτώσεις παρουσιάζοντας μάλιστα ελάχιστη ανάπτυξη ακόμη και στα τρυβλία όπου είχε γίνει η προσθήκη του αντιβιοτικού.

Η αναχαίτιση των μυκήτων *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans* και *Rhizoctonia solani* μπορεί να θεωρηθεί ότι πραγματοποιείται από τα βακτηριακά στελέχη X, p93 και δ40 είτε άμεσα, είτε έμμεσα. Άμεσα πραγματοποιείται παρουσιάζοντας έντονο φαινότυπο ομαδικής κινητικότητας που φτάνει στο σημείο να περικυκλώνει, να εισέρχεται και να καλύπτει τους φυτοπαθογόνους μύκητες, αναστέλλοντας πλήρως την ανάπτυξή τους. Έμμεσος τρόπος παρεμπόδισης μπορεί να θεωρηθεί η έκκριση επιφανειοδραστικών χημικών ενώσεων, που εμφανίζουν έντονες αντιμικροβιακές ιδιότητες. Ωστόσο μπορεί να εμφανίσει τους δυο μηχανισμούς, ως συνδυασμό και των δύο. Συμπεραίνουμε επομένως ότι οι μεταλλάξεις που προέκυψαν από την Tn5 μεταλλαξιγένεση στο γονιδίωμα του *Pseudomonas fluorescens* X, δεν επηρέασαν ιδιαίτερα το φαινότυπο της κολυμβητικής και ομαδικής κινητικότητας των μεταλλαγμένων στελεχών p93 και δ40, αλλά ούτε και την ανταγωνιστικότητά τους με τους φυτοπαθογόνους μύκητες που μελετήθηκαν.

Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση της ομαδικής κινητικότητας του *Pseudomonas fluorescens* XGFP εναντίον του φυτοπαθογόνου βακτηριακού στελέχους *Pseudomonas* sp. P3. Προκειμένου να γίνει καλύτερη παρατήρηση της

θέσης των δύο βακτηρίων ανά πάσα στιγμή χρησιμοποιήθηκε το τεχνητά φθορίζον βακτηριακό στέλεχος XGFP. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πολύ καθαρά η ικανότητα του βακτηρίου να εισέρχεται εντός του φυτοπαθογόνου βακτηρίου, σχηματίζοντας κατά τη διέλευσή του μια διάφανη ζώνη (Dienes Line), η οποία αποτελεί τα νεκρά κύτταρα τόσο του P3 όσο και του XGFP βακτηριακού στελέχους. Έχοντας χρησιμοποιήσει το τεχνητό φθορίζον βακτηριακό στέλεχος εναντίον του φυτοπαθογόνου μύκητα *Fusarium oxysporum*, παρατηρήσαμε πολύ έντονα τον παρόμοιο φαινότυπο του βακτηρίου εναντίον και των δύο μικροοργανισμών, σχηματίζοντας εξίσου μια διάφανη περιοριστική ζώνη και εναντίον του μύκητα. Τα βακτήρια έχουν αναπτύξει πλήθος μηχανισμών προκειμένου να μεταφέρουν τις πρωτεΐνες τους στον εξωκυττάριο χώρο και μέσω αυτών των μηχανισμών να καταστέλλουν την ανάπτυξη των ανταγωνιστικών κυττάρων. Το T6SS αποτελεί το πιο πρόσφατο μελετώμενο εκκριτικό σύστημα, εμφανίζεται στα περισσότερα Gram⁻ βακτήρια και μπορεί να δράσει εναντίον ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών κυττάρων με την άμεση μεταφορά των πρωτεϊνών- τοξινών εντός των κυττάρων στόχων (Hachani *et.al.*, 2016; Hood *et.al.*, 2010; Russell *et.al.*, 2013; Jiang *et.al.*, 2014).

Από τη βιοπληροφορική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο γονιδίωμα του *Pseudomonas fluorescens* X, διαπιστώθηκε ότι φέρει τόσο τα 13 βασικά συντηρημένα δομικά γονίδια που εμπλέκονται άμεσα στο εκκριτικό σύστημα τύπου VI (TssA-TssM), όσο και τα γονίδια εκατέρωθεν αυτών. Δημιουργώντας τη γονιδιακή κατασκευή του T6SS του X βακτηριακού στελέχους, αλλά και των συγγενικών βακτηρίων *Pseudomonas* sp. WCS374, *Pseudomonas fluorescens* A506, *Pseudomonas* sp. CFT9 και *Pseudomonas fluorescens* FH5, αποδείχθηκε μεγάλη ομοιότητα των T6SS γονιδίων μεταξύ των βακτηρίων, όσο αφορά τη σειρά, τον προσανατολισμό αλλά και το ποσοστό ομολογίας μεταξύ τους (>96%). Τόσο ο μηχανισμός δράσης όσο και η δομή των πρωτεϊνών του T6SS μοιάζει πολύ με εκείνον του ανεστραμμένου T4 βακτηριοφάγου ιού. Επομένως μέσω των TssB και TssC γονιδίων που ευθύνονται για τη συστολή ενός ελύτρου, οδηγεί στην εκτίναξη μιας δομής διάτρησης, η οποία περιλαμβάνει ένα σωλήνα στοιβαγμένων εξαμερών Hcp πρωτεϊνών (TssD) και ολοκληρώνεται με τη τριμερή πρωτεΐνη VgrG (TssI) που μοιάζει με ακίδα, με κατεύθυνση προς το κύτταρο στόχο (Shneider *et.al.* 2013;

Cianfanelli *et.al.*, 2016). Όπως έχει αποδειχθεί και σε πρόσφατες μελέτες, η τριμερής VgrG πρωτεΐνη ενισχύεται με τις PAAR επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες των πρωτεϊνών που βρίσκονται στο τέλος της κατασκευής του T6SS. Οι αλληλουχίες αυτές ενώνονται στο τέλος της VgrG πρωτεΐνης ολοκληρώνοντας την αιχμηρή ακίδα διάτρησης. Η Rhs πρωτεΐνη του *Pseudomonas fluorescens* X, φέρει αυτή την επαναλαμβανόμενη PAAR αλληλουχία, καθιστώντας τη σε συνδυασμό με το σύμπλοκο της Hrc- VgrG πρωτεΐνης, την ικανή επιδρώσα πρωτεΐνη που παράγεται από το T6SS του *Pseudomonas fluorescens* X.

5.0 Βιβλιογραφία

- Abrusci, P., McDowell, M. A., Lea, S. M., & Johnson, S. (2014). Building a secreting nanomachine: a structural overview of the T3SS. *Current opinion in structural biology*, 25, 111-117.
- Akeda, Y., & Galán, J. E. (2005). Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*, 437(7060), 911-915.
- Akopyan, K., Edgren, T., Wang-Edgren, H., Rosqvist, R., Fahlgren, A., Wolf-Watz, H., & Fallman, M. (2011). Translocation of surface-localized effectors in type III secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(4), 1639-1644.
- Albers, S. V., Szabó, Z., & Driessen, A. J. (2006). Protein secretion in the Archaea: multiple paths towards a unique cell surface. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7), 537-547.
- Aldridge, P., & Hughes, K. T. (2002). Regulation of flagellar assembly. *Current opinion in microbiology*, 5(2), 160-165.
- Angot, A., Vergunst, A., Genin, S., & Peeters, N. (2007). Exploitation of eukaryotic ubiquitin signaling pathways by effectors translocated by bacterial type III and type IV secretion systems. *PLoS Pathog*, 3(1), e3.
- Aschtgen, M. S., Bernard, C. S., De Bentzmann, S., Lloubes, R., & Cascales, E. (2008). SciN is an outer membrane lipoprotein required for type VI secretion in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 190(22), 7523-7531.
- Aschtgen, M. S., Thomas, M. S., & Cascales, E. (2010). Anchoring the type VI secretion system to the peptidoglycan: TssL, TagL, TagP... what else?. *Virulence*, 1(6), 535-540.
- Atmakuri, K., Cascales, E., & Christie, P. J. (2004). Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Molecular microbiology*, 54(5), 1199-1211.
- Babić, A., Lindner, A. B., Vulić, M., Stewart, E. J., & Radman, M. (2008). Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science*, 319(5869), 1533-1536.
- Backert, S., & Meyer, T. F. (2006). Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Current opinion in microbiology*, 9(2), 207-217.
- Bahme, J. B., & Schroth, M. N. (1987). Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato. *Phytopathology*, 77(7), 1093-1100.
- Bardy, S. L., Ng, S. Y., & Jarrell, K. F. (2003). Prokaryotic motility structures. *Microbiology*, 149(2), 295-304.
- Basler, Á., Pilhofer, M., Henderson, G. P., Jensen, G. J., & Mekalanos, J. J. (2012). Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature*, 483(7388), 182-186.
- Berks, B. C. (1996). A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?. *Molecular microbiology*, 22(3), 393-404.
- Berks, B. C., Palmer, T., & Sargent, F. (2005). Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Current opinion in microbiology*, 8(2), 174-181.
- Bernstein, H. D. (2007). Are bacterial 'autotransporters' really transporters?. *Trends in microbiology*, 15(10), 441-447.
- Berti, A. D., Greve, N. J., Christensen, Q. H., & Thomas, M. G. (2007). Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Journal of bacteriology*, 189(17), 6312-6323.

- Bingle, L. E., Bailey, C. M., & Pallen, M. J. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. *Current opinion in microbiology*, 11(1), 3-8.
- Blondel, C. J., Jiménez, J. C., Contreras, I., & Santiviago, C. A. (2009). Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in Salmonella serotypes. *BMC genomics*, 10(1), 1.
- Bönemann, G., Pietrosiuk, A., Diemand, A., Zentgraf, H., & Mogk, A. (2009). Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. *The EMBO journal*, 28(4), 315-325.
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., & Attree, I. (2009). Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources?. *BMC genomics*, 10(1), 1.
- Birck, C., Malfois, M., Svergun, D., & Samama, J. P. (2002). Insights into signal transduction revealed by the low resolution structure of the FixJ response regulator. *Journal of molecular biology*, 321(3), 447-457.
- Bruin, O. M., Ludu, J. S., & Nano, F. E. (2007). The Francisella pathogenicity island protein IgIA localizes to the bacterial cytoplasm and is needed for intracellular growth. *BMC microbiology*, 7(1), 1.
- Burkinshaw, B. J., & Strynadka, N. C. (2014). Assembly and structure of the T3SS. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1649-1663.
- Büttner, D. (2012). Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant-and animal-pathogenic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 262-310.
- Carrillo, C., Teruel, J. A., Aranda, F. J., & Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1611(1), 91-97.
- Cascales, E., & Cambillau, C. (2012). Structural biology of type VI secretion systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 367(1592), 1102-1111.
- Cascales, E., & Christie, P. J. (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 1(2), 137-149.
- Chaddock, A. M., Mant, A., Karnauchov, I., Brink, S., Herrmann, R. G., Klösgen, R. B., & Robinson, C. (1995). A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the delta pH-dependent thylakoidal protein translocase. *The EMBO journal*, 14(12), 2715.
- Chang, C. Y., Hobley, L., Till, R., Capeness, M., Kanna, M., Burt, W., ... & Sockett, R. E. (2011). The Bdellovibrio bacteriovorus twin-arginine transport system has roles in predatory and prey-independent growth. *Microbiology*, 157(11), 3079-3093.
- Chang, J. H., & Kim, Y. G. (2015). Crystal structure of the bacterial type VI secretion system component TssL from Vibrio cholerae. *Journal of Microbiology*, 53(1), 32-37.
- Chatzi, K. E., Sardis, M. F., Karamanou, S., & Economou, A. (2013). Breaking on through to the other side: protein export through the bacterial Sec system. *Biochemical Journal*, 449(1), 25-37.
- Christie, P. J., & Cascales, E. (2005). Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Molecular membrane biology*, 22(1-2), 51-61.
- Costa, T. R., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., & Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*, 13(6), 343-359.

- Cotter, S. E., Surana, N. K., & Geme, J. W. S. (2005). Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. *Trends in microbiology*, 13(5), 199-205.
- Cianciotto, N. P. (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends in microbiology*, 13(12), 581-588.
- Cianfanelli, F. R., Monlezun, L., & Coulthurst, S. J. (2016). Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. *Trends in microbiology*, 24(1), 51-62.
- Cornelis, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology*, 4(11), 811-825.
- Coulthurst, S. J. (2013). The Type VI secretion system—a widespread and versatile cell targeting system. *Research in microbiology*, 164(6), 640-654.
- Cronin, D., Moënné-Loccoz, Y., Fenton, A., Dunne, C., Dowling, D. N., & O'Gara, F. (1997). Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2, 4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiology Ecology*, 23(2), 95-106.
- Dautin, N., & Bernstein, H. D. (2007). Protein Secretion in Gram-Negative Bacteria via the Autotransporter Pathway*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 89-112.
- De Bruijn, I., de Kock, M. J., Yang, M., de Waard, P., van Beek, T. A., & Raaijmakers, J. M. (2007). Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Molecular microbiology*, 63(2), 417-428.
- De Bruijn, I., De Kock, M. J. D., De Waard, P., Van Beek, T. A., & Raaijmakers, J. M. (2008). Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of bacteriology*, 190(8), 2777-2789.
- De Bruijn, I., & Raaijmakers, J. M. (2009). Diversity and functional analysis of LuxR-type transcriptional regulators of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and environmental microbiology*, 75(14), 4753-4761.
- Decoin, V., Barbey, C., Bergeau, D., Latour, X., Feuilloley, M. G., Orange, N., & Merieau, A. (2014). A type VI secretion system is involved in *Pseudomonas fluorescens* bacterial competition. *PloS one*, 9(2), e89411.
- De Keyzer, J., Van Der Does, C., & Driessen, A. J. M. (2003). The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(10), 2034-2052.
- Delepelaire, P. (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1694(1), 149-161.
- De Maayer, P., Venter, S. N., Kamber, T., Duffy, B., Coutinho, T. A., & Smits, T. H. (2011). Comparative genomics of the type VI secretion systems of *Pantoea* and *Erwinia* species reveals the presence of putative effector islands that may be translocated by the VgrG and Hcp proteins. *BMC genomics*, 12(1), 1.
- De Souza, J. T., Arnould, C., Deulvot, C., Lemanceau, P., Gianinazzi-Pearson, V., & Raaijmakers, J. M. (2003). Effect of 2, 4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathology*, 93(8), 966-975.
- De Souza, J. T., de Boer, M., de Waard, P., van Beek, T. A., & Raaijmakers, J. M. (2003). Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 7161-7172.

- Desvaux, M., Hébraud, M., Talon, R., & Henderson, I. R. (2009). Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. *Trends in microbiology*, 17(4), 139-145.
- Ding, Z., & Christie, P. J. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* twin-arginine-dependent translocation is important for virulence, flagellation, and chemotaxis but not type IV secretion. *Journal of bacteriology*, 185(3), 760-771.
- Dubern, J. F., & Bloemberg, G. V. (2006). Influence of environmental conditions on putisolvins I and II production in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. *FEMS microbiology letters*, 263(2), 169-175.
- Dubern, J. F., Coppoolse, E. R., Stiekema, W. J., & Bloemberg, G. V. (2008). Genetic and functional characterization of the gene cluster directing the biosynthesis of putisolvin I and II in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. *Microbiology*, 154(7), 2070-2083.
- Duffy, B. K., & Défago, G. (2000). Controlling Instability in *gacS-gacA* Regulatory Genes during Inoculant Production of *Pseudomonas fluorescens* Biocontrol Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3142-3150.
- Durand, E., Zoued, A., Logger, L., Péhau-Arnaudet, G., Aschtgen, M. S., Spinelli, S., ... & Cambillau, C. (2015). Biogenesis and structure of a type VI secretion membrane core complex. *Nature*.
- Durand, E., Zoued, A., Spinelli, S., Watson, P. J., Aschtgen, M. S., Journet, L., ... & Cascales, E. (2012). Structural characterization and oligomerization of the TssL protein, a component shared by bacterial type VI and type IVb secretion systems. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 14157-14168.
- Economou, A., Christie, P. J., Fernandez, R. C., Palmer, T., Plano, G. V., & Pugsley, A. P. (2006). Secretion by numbers: protein traffic in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 62(2), 308-319.
- Edgren, T., Forsberg, Å., Rosqvist, R., & Wolf-Watz, H. (2012). Type III secretion in *Yersinia*: injectisome or not?. *PLoS Pathog*, 8(5), e1002669.
- Felisberto-Rodrigues, C., Durand, E., Aschtgen, M. S., Blangy, S., Ortiz-Lombardia, M., Douzi, B., ... & Cascales, E. (2011). Towards a structural comprehension of bacterial type VI secretion systems: characterization of the TssJ-TssM complex of an *Escherichia coli* pathovar. *PLoS Pathog*, 7(11), e1002386.
- Filloux, A., Hachani, A., & Bleves, S. (2008). The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, 154(6), 1570-1583.
- Finking, R., & Marahiel, M. A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides 1. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58, 453-488.
- Fritsch, M. J., Trunk, K., Diniz, J. A., Guo, M., Trost, M., & Coulthurst, S. J. (2013). Proteomic identification of novel secreted antibacterial toxins of the *Serratia marcescens* type VI secretion system. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(10), 2735-2749.
- Fronzes, R., Christie, P. J., & Waksman, G. (2009). The structural biology of type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 7(10), 703-714.
- Fuqua, C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annual Reviews in Microbiology*, 50(1), 727-751.
- Gabel, C. V., & Berg, H. C. (2003). The speed of the flagellar rotary motor of *Escherichia coli* varies linearly with protonmotive force. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15), 8748-8751.

- Gardan, L., Bella, P., Meyer, J. M., Christen, R., Rott, P., Achouak, W., & Samson, R. (2002). *Pseudomonas salomonii* sp. nov., pathogenic on garlic, and *Pseudomonas palleroniana* sp. nov., isolated from rice. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(6), 2065-2074.
- Garza, A. G., Harris-Haller, L. W., Stoeber, R. A., & Manson, M. D. (1995). Motility protein interactions in the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(6), 1970-1974.
- Georgakopoulos, D. G., Fiddaman, P., Leifert, C., & Malathrakis, N. E. (2002). Biological control of cucumber and sugar beet damping-off caused by *Pythium ultimum* with bacterial and fungal antagonists. *Journal of applied microbiology*, 92(6), 1078-1086.
- Gerard, J., Lloyd, R., Barsby, T., Haden, P., Kelly, M. T., & Andersen, R. J. (1997). Massetolides AH, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two pseudomonads isolated from marine habitats. *Journal of natural products*, 60(3), 223-229.
- Gerlach, R. G., & Hensel, M. (2007). Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(6), 401-415.
- Gewolb, J. (2002). Working outside the protein-synthesis rules. *Science*, 295(5563), 2205-2207.
- Gorla, P., Pandey, J. P., Parthasarathy, S., Merrick, M., & Siddavattam, D. (2009). Organophosphate hydrolase in *Brevundimonas diminuta* is targeted to the periplasmic face of the inner membrane by the twin arginine translocation pathway. *Journal of bacteriology*, 191(20), 6292-6299.
- Gouridis, G., Karamanou, S., Gelis, I., Kalodimos, C. G., & Economou, A. (2009). Signal peptides are allosteric activators of the protein translocase. *Nature*, 462(7271), 363-367.
- Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M., & Dangl, J. L. (2006). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 425-449.
- Green, E. R., & Meccas, J. (2016). Bacterial Secretion Systems—An overview. *Microbiology spectrum*, 4(1).
- Gross, H., & Loper, J. E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural product reports*, 26(11), 1408-1446.
- Gross, H., Stockwell, V. O., Henkels, M. D., Nowak-Thompson, B., Loper, J. E., & Gerwick, W. H. (2007). The genomisotopic approach: a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters. *Chemistry & biology*, 14(1), 53-63.
- Haas, D., & Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 117-153.
- Haas, D., & Défago, G. (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307-319.
- Imker, H. J., Krahn, D., Clerc, J., Kaiser, M., & Walsh, C. T. (2010). N-acylation during glidobactin biosynthesis by the tridomain nonribosomal peptide synthetase module GlbF. *Chemistry & biology*, 17(10), 1077-1083.
- Hachani, A., Wood, T. E., & Filloux, A. (2016). Type VI secretion and anti-host effectors. *Current opinion in microbiology*, 29, 81-93.

- Håkansson, S., Bergman, T. H. O. M. A. S., Vanooteghem, J. C., Cornelis, G., & Wolf-Watz, H. (1993). YopB and YopD constitute a novel class of Yersinia Yop proteins. *Infection and immunity*, 61(1), 71-80.
- Håkansson, S., Schesser, K., Persson, C., Galyov, E. E., Rosqvist, R., Homble, F., & Wolf-Watz, H. (1996). The YopB protein of Yersinia pseudotuberculosis is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *The EMBO Journal*, 15(21), 5812.
- Ham, H., Sreelatha, A., & Orth, K. (2011). Manipulation of host membranes by bacterial effectors. *Nature Reviews Microbiology*, 9(9).
- Hamilton, H. L., & Dillard, J. P. (2006). Natural transformation of Neisseria gonorrhoeae: from DNA donation to homologous recombination. *Molecular microbiology*, 59(2), 376-385.
- Harrigan, W. F. (1998). Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. *International Journal of Food Science & Technology*, 33(2), 194-195.
- Hartl, F. U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J. P., & Wickner, W. (1990). The binding cascade of SecB to SecA to SecYE mediates preprotein targeting to the E. coli plasma membrane. *Cell*, 63(2), 269-279.
- Hassett, D. J., Woodruff, W. A., Wozniak, D. J., Vasil, M. L., Cohen, M. S., & Ohman, D. E. (1993). Cloning and characterization of the Pseudomonas aeruginosa sodA and sodB genes encoding manganese-and iron-cofactored superoxide dismutase: demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria. *Journal of bacteriology*, 175(23), 7658-7665.
- Hegde, R. S., & Bernstein, H. D. (2006). The surprising complexity of signal sequences. *Trends in biochemical sciences*, 31(10), 563-571.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., & Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68(4), 692-744.
- Henrichsen, J. (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological reviews*, 36(4), 478.
- Hobbs, M., & Mattick, J. S. (1993). Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. *Molecular microbiology*, 10(2), 233-243.
- Holmström, A., Olsson, J., Cherepanov, P., Maier, E., Nordfelth, R., Pettersson, J., ... & Forsberg, Å. (2001). LcrV is a channel size-determining component of the Yop effector translocon of Yersinia. *Molecular microbiology*, 39(3), 620-632.
- Hood, R. D., Singh, P., Hsu, F., Güvener, T., Carl, M. A., Trinidad, R. R., ... & Li, M. (2010). A type VI secretion system of Pseudomonas aeruginosa targets a toxin to bacteria. *Cell host & microbe*, 7(1), 25-37.
- Hubber, A. M., Sullivan, J. T., & Ronson, C. W. (2007). Symbiosis-induced cascade regulation of the Mesorhizobium loti R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Molecular plant-microbe interactions*, 20(3), 255-261.
- Isberg, R. R., O'Connor, T. J., & Heidtman, M. (2009). The Legionella pneumophila replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 13-24.

- Ize, B., Porcelli, I., Lucchini, S., Hinton, J. C., Berks, B. C., & Palmer, T. (2004). Novel phenotypes of *Escherichia coli* tat mutants revealed by global gene expression and phenotypic analysis. *Journal of Biological Chemistry*.
- Jacob-Dubuisson, F., Fernandez, R., & Coutte, L. (2004). Protein secretion through autotransporter and two-partner pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1694(1), 235-257.
- Jiang, F., Waterfield, N. R., Yang, J., Yang, G., & Jin, Q. (2014). A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells. *Cell host & microbe*, 15(5), 600-610.
- Kanamaru, S. (2009). Structural similarity of tailed phages and pathogenic bacterial secretion systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11), 4067-4068.
- Kang, H., & Gross, D. C. (2005). Characterization of a resistance-nodulation-cell division transporter system associated with the syr-syp genomic island of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 5056-5065.
- Kanonenberg, K., Schwarz, C. K., & Schmitt, L. (2013). Type I secretion systems—a story of appendices. *Research in microbiology*, 164(6), 596-604.
- Kapitein, N., & Mogk, A. (2013). Deadly syringes: type VI secretion system activities in pathogenicity and interbacterial competition. *Current opinion in microbiology*, 16(1), 52-58.
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 634-644.
- Kearns, D. B., & Losick, R. (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 49(3), 581-590.
- Keel, C., Défago, G., Gange, A. C., & Brown, V. K. (1997). Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. *Multitrophic interactions in terrestrial systems*, 27-46.
- Kim, Y. K., & McCarter, L. L. (2000). Analysis of the polar flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of bacteriology*, 182(13), 3693-3704.
- Kraas, F. I., Helmetag, V., Wittmann, M., Strieker, M., & Marahiel, M. A. (2010). Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chemistry & biology*, 17(8), 872-880.
- Krehenbrink, M., & Downie, J. A. (2008). Identification of protein secretion systems and novel secreted proteins in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *BMC genomics*, 9(1), 1.
- Kremmydas, G. F., Tampakaki, A. P., & Georgakopoulos, D. G. (2013). Characterization of the biocontrol activity of *Pseudomonas fluorescens* strain X reveals novel genes regulated by glucose. *PloS one*, 8(4), e61808.
- Kruijt, M., Tran, H., & Raaijmakers, J. M. (2009). Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *Journal of applied microbiology*, 107(2), 546-556.
- Kohli, R. M., Walsh, C. T., & Burkart, M. D. (2002). Biomimetic synthesis and optimization of cyclic peptide antibiotics. *Nature*, 418(6898), 658-661.
- Kojima, S., & Blair, D. F. (2001). Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry*, 40(43), 13041-13050.
- Korotkov, K. V., Gonen, T., & Hol, W. G. (2011). Secretins: dynamic channels for protein transport across membranes. *Trends in biochemical sciences*, 36(8), 433-443.

- Korotkov, K. V., Sandkvist, M., & Hol, W. G. (2012). The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature Reviews Microbiology*, 10(5), 336-351.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., ... & Aizawa, S. I. (1998). Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. *Science*, 280(5363), 602-605.
- Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Pickford, R., Derrick, J. P., Lamers, G. E., Thomas-Oates, J. E., ... & Bloemberg, G. V. (2004). Characterization of two Pseudomonas putida lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Molecular microbiology*, 51(1), 97-113.
- Kutsukake, K., Ohya, Y., & Iino, T. (1990). Transcriptional analysis of the flagellar regulon of Salmonella typhimurium. *Journal of bacteriology*, 172(2), 741-747.
- Lambert-Buisine, C., Willery, E., Loch, C., & Jacob-Dubuisson, F. (1998). N-terminal characterization of the Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin. *Molecular microbiology*, 28(6), 1283-1293.
- Lavander, M., Ericsson, S. K., Bröms, J. E., & Forsberg, Å. (2006). The twin arginine translocation system is essential for virulence of Yersinia pseudotuberculosis. *Infection and immunity*, 74(3), 1768-1776.
- Laycock, M. V., Hildebrand, P. D., Thibault, P., Walter, J. A., & Wright, J. L. (1991). Viscosin, a potent peptidolipid biosurfactant and phytopathogenic mediator produced by a pectolytic strain of Pseudomonas fluorescens. *Journal of agricultural and food chemistry*, 39(3), 483-489.
- Lecher, J., Schwarz, C. K., Stoldt, M., Smits, S. H., Willbold, D., & Schmitt, L. (2012). An RTX transporter tethers its unfolded substrate during secretion via a unique N-terminal domain. *Structure*, 20(10), 1778-1787.
- Lee, M., Jun, S. Y., Yoon, B. Y., Song, S., Lee, K., & Ha, N. C. (2012). Membrane fusion proteins of type I secretion system and tripartite efflux pumps share a binding motif for TolC in gram-negative bacteria. *PloS one*, 7(7), e40460.
- Leiman, P. G., Basler, M., Ramagopal, U. A., Bonanno, J. B., Sauder, J. M., Pukatzki, S., ... & Mekalanos, J. J. (2009). Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11), 4154-4159.
- Letoffe, S., Delepelaire, P., & Wandersman, C. (1996). Protein secretion in gram-negative bacteria: assembly of the three components of ABC protein-mediated exporters is ordered and promoted by substrate binding. *The EMBO journal*, 15(21), 5804.
- Létoffé, S., Heuck, G., Delepelaire, P., Lange, N., & Wandersman, C. (2009). Bacteria capture iron from heme by keeping tetrapyrrole skeleton intact. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28), 11719-11724.
- Li, W., Rokni-Zadeh, H., De Vleeschouwer, M., Ghequire, M. G., Sinnaeve, D., Xie, G. L., ... & De Mot, R. (2013). The antimicrobial compound xantholysin defines a new group of Pseudomonas cyclic lipopeptides. *PloS one*, 8(5), e62946.
- Lindsay, W. L. (1979). *Chemical equilibria in soils*. John Wiley and Sons Ltd..
- Linhartová, I., Bumba, L., Mašín, J., Basler, M., Osička, R., Kamanová, J., ... & Morová, J. (2010). RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS microbiology reviews*, 34(6), 1076-1112.
- Luirink, J., & Sinning, I. (2004). SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1694(1), 17-35.

- Loper, J. E. (1988). Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum*.
- Lossi, N. S., Dajani, R., Freemont, P., & Filloux, A. (2011). Structure–function analysis of HsiF, a gp25-like component of the type VI secretion system, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 157(12), 3292-3305.
- Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 289-314.
- McCann, J. R., & Geme III, J. W. S. (2014). The HMW1C-like glycosyltransferases—an enzyme family with a sweet tooth for simple sugars. *PLoS Pathog*, 10(4), e1003977.
- McDonough, J. A., McCann, J. R., Tekippe, E. M., Silverman, J. S., Rigel, N. W., & Braunstein, M. (2008). Identification of functional Tat signal sequences in *Mycobacterium tuberculosis* proteins. *Journal of bacteriology*, 190(19), 6428-6438.
- Meloni, S., Rey, L., Sidler, S., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., & Palacios, J. M. (2003). The twin-arginine translocation (Tat) system is essential for *Rhizobium*–legume symbiosis. *Molecular microbiology*, 48(5), 1195-1207.
- Meng, G., Surana, N. K., St Geme, J. W., & Waksman, G. (2006). Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *The EMBO journal*, 25(11), 2297-2304.
- Meyer, M., & Kircher, M. (2010). Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harb Protoc*, 2010(6), t5448.
- Meyer, J. A., & Abdallah, M. A. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Microbiology*, 107(2), 319-328.
- Mickael, C. S., Lam, P. K. S., Berberov, E. M., Allan, B., Potter, A. A., & Köster, W. (2010). *Salmonella enterica* serovar Enteritidis tatB and tatC mutants are impaired in Caco-2 cell invasion in vitro and show reduced systemic spread in chickens. *Infection and immunity*, 78(8), 3493-3505.
- Mignot, T. (2007). The elusive engine in *Myxococcus xanthus* gliding motility. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(21), 2733-2745.
- Müller, M. (2005). Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. *Research in microbiology*, 156(2), 131-136.
- Müller, M., & Bernd Klösgen, R. (2005). The Tat pathway in bacteria and chloroplasts (review). *Molecular membrane biology*, 22(1-2), 113-121.
- Müller, M., Koch, H. G., Beck, K., & Schafer, U. (2000). Protein traffic in bacteria: multiple routes from the ribosome to and across the membrane. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 66, 107-157.
- Mogensen, J. E., & Otzen, D. E. (2005). Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Molecular microbiology*, 57(2), 326-346.
- Mota, L. J., & Cornelis, G. R. (2005). The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Annals of medicine*, 37(4), 234-249.
- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., ... & Walz, T. (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, 312(5779), 1526-1530.
- Nijeholt, J. A. L., & Driessen, A. J. (2012). The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 367(1592), 1016-1028.
- Nybroe, O., & Sørensen, J. (2004). Production of cyclic lipopeptides by fluorescent pseudomonads. In *Pseudomonas* (pp. 147-172). Springer US.

- Ochsner, U. A., Snyder, A., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (2002). Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 8312-8317.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, 16(3), 115-125.
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N. C., & Dalbey, R. E. (2002). Signal peptidases. *Chemical reviews*, 102(12), 4549-4580.
- Pal, K. K., & Gardener, B. M. (2006). Biological control of plant pathogens. *The plant health instructor*, 2, 1117-1142.
- Palmer, T., & Berks, B. C. (2012). The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nature Reviews Microbiology*, 10(7), 483-496.
- Papanikou, E., Karamanou, S., & Economou, A. (2007). Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), 839-851.
- Patel, R., Smith, S. M., & Robinson, C. (2014). Protein transport by the bacterial Tat pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1620-1628.
- Paulsen, I. T., Press, C. M., Ravel, J., Kobayashi, D. Y., Myers, G. S., Mavrodi, D. V., ... & Dodson, R. J. (2005). Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature biotechnology*, 23(7), 873-878.
- Pell, L. G., Kanelis, V., Donaldson, L. W., Howell, P. L., & Davidson, A. R. (2009). The phage λ major tail protein structure reveals a common evolution for long-tailed phages and the type VI bacterial secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11), 4160-4165.
- Pickering, B. S., & Oresnik, I. J. (2010). The twin arginine transport system appears to be essential for viability in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*, 192(19), 5173-5180.
- Picking, W. L., Nishioka, H., Hearn, P. D., Baxter, M. A., Harrington, A. T., Blocker, A., & Picking, W. D. (2005). IpaD of *Shigella flexneri* is independently required for regulation of Ipa protein secretion and efficient insertion of IpaB and IpaC into host membranes. *Infection and immunity*, 73(3), 1432-1440.
- Pierson III, L. S., & Pierson, E. A. (2010). Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 86(6), 1659-1670.
- Pimenta, A. L., Young, J., Holland, I. B., & Blight, M. A. (1999). Antibody analysis of the localisation, expression and stability of HlyD, the MFP component of the *E. coli* haemolysin translocator. *Molecular and General Genetics MGG*, 261(1), 122-132.
- Pop, O., Martin, U., Abel, C., & Müller, J. P. (2002). The twin-arginine signal peptide of PhoD and the TatAd/Cd proteins of *Bacillus subtilis* form an autonomous Tat translocation system. *Journal of Biological Chemistry*, 277(5), 3268-3273.
- Pradel, N., Ye, C., Livrelli, V., Xu, J., Joly, B., & Wu, L. F. (2003). Contribution of the twin arginine translocation system to the virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Infection and immunity*, 71(9), 4908-4916.
- Price, S. B., Cowan, C., Perry, R. D., & Straley, S. C. (1991). The *Yersinia pestis* V antigen is a regulatory protein necessary for Ca²⁺ (+)-dependent growth and maximal expression of low-Ca²⁺ response virulence genes. *Journal of bacteriology*, 173(8), 2649-2657.
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D., & Mekalanos, J. J. (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), 15508-15513.

- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., ... & Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1528-1533.
- Pukatzki, S., McAuley, S. B., & Miyata, S. T. (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Current opinion in microbiology*, 12(1), 11-17.
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS microbiology reviews*, 34(6), 1037-1062.
- Raaijmakers, J. M., Vlami, M., & De Souza, J. T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 537-547.
- Raaijmakers, J. M., & Mazzola, M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*, 50, 403-424.
- Randall, L. L., & Hardy, S. J. S. (2002). SecB, one small chaperone in the complex milieu of the cell. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(10), 1617-1623.
- Rao, V. A., Shepherd, S. M., English, G., Coulthurst, S. J., & Hunter, W. N. (2011). The structure of *Serratia marcescens* Lip, a membrane-bound component of the type VI secretion system. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67(12), 1065-1072.
- Rashid, M. H., & Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4885-4890.
- Rêgo, A. T., Chandran, V., & Waksman, G. (2010). Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Biochemical Journal*, 425(3), 475-488.
- Robinson, C., & Bolhuis, A. (2004). Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1694(1), 135-147.
- Robb, C. S., Assmus, M., Nano, F. E., & Boraston, A. B. (2013). Structure of the T6SS lipoprotein TssJ1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(6), 607-610.
- Robb, C. S., Nano, F. E., & Boraston, A. B. (2012). The structure of the conserved type six secretion protein TssL (DotU) from *Francisella novicida*. *Journal of molecular biology*, 419(5), 277-283.
- Rossier, O., & Cianciotto, N. P. (2005). The *Legionella pneumophila* tatB gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection. *Infection and immunity*, 73(4), 2020-2032.
- Russell, A. B., LeRoux, M., Hathazi, K., Agnello, D. M., Ishikawa, T., Wiggins, P. A., ... & Mougous, J. D. (2013). Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature*, 496(7446), 508-512.
- Saier Jr, M. H. (2006). Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *The Journal of membrane biology*, 214(1-2), 75-90.
- Saint-Joanis, B., Demangel, C., Jackson, M., Brodin, P., Marsollier, L., Boshoff, H., & Cole, S. T. (2006). Inactivation of Rv2525c, a substrate of the twin arginine translocation (Tat)

- system of *Mycobacterium tuberculosis*, increases β -lactam susceptibility and virulence. *Journal of bacteriology*, 188(18), 6669-6679.
- Sauvonnet, N., Vignon, G., Pugsley, A. P., & Gounon, P. (2000). Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. *The EMBO journal*, 19(10), 2221-2228.
- Schnider-Keel, U., Seematter, A., Maurhofer, M., Blumer, C., Duffy, B., Gigot-Bonnefoy, C., ... & Keel, C. (2000). Autoinduction of 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *Journal of bacteriology*, 182(5), 1215-1225.
- Schwarz, S., West, T. E., Boyer, F., Chiang, W. C., Carl, M. A., Hood, R. D., ... & Mougous, J. D. (2010). Burkholderia type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions. *PLoS Pathog*, 6(8), e1001068.
- Senesi, S., Celandroni, F., Salvetti, S., Beecher, D. J., Wong, A. C., & Ghelardi, E. (2002). Swarming motility in *Bacillus cereus* and characterization of a *fliY* mutant impaired in swarm cell differentiation. *Microbiology*, 148(6), 1785-1794.
- Shevchik, V. E., Robert-Baudouy, J., & Condemine, G. (1997). Specific interaction between OutD, an *Erwinia chrysanthemi* outer membrane protein of the general secretory pathway, and secreted proteins. *The EMBO Journal*, 16(11), 3007-3016.
- Shneider, M. M., Buth, S. A., Ho, B. T., Basler, M., Mekalanos, J. J., & Leiman, P. G. (2013).
- Sijbrandi, R., Urbanus, M. L., Corinne, M., Bernstein, H. D., Oudega, B., Otto, B. R., & Luirink, J. (2003). Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4654-4659.
- Silverman, J. M., Brunet, Y. R., Cascales, E., & Mougous, J. D. (2012). Structure and regulation of the type VI secretion system. *Annual review of microbiology*, 66, 453.
- Sinnaeve, D., Michaux, C., Vandenkerckhove, J., Peys, E., Borremans, F. A., Sas, B., ... & Martins, J. C. (2009). Structure and X-ray conformation of pseudodesmins A and B, two new cyclic lipodepsipeptides from *Pseudomonas* bacteria. *Tetrahedron*, 65(21), 4173-4181.
- Songer, J. G. (1997). Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends in microbiology*, 5(4), 156-161.
- Spanò, S., & Galán, J. E. (2013). A novel anti-microbial function for a familiar Rab GTPase. *Small GTPases*, 4(4), 252-254.
- Stanley, N. R., Findlay, K., Berks, B. C., & Palmer, T. (2001). *Escherichia coli* strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope. *Journal of Bacteriology*, 183(1), 139-144.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, 56(4), 845-857.
- Stevenson, L. G., Strisovsky, K., Clemmer, K. M., Bhatt, S., Freeman, M., & Rather, P. N. (2007). Rhomboid protease AarA mediates quorum-sensing in *Providencia stuartii* by activating TatA of the twin-arginine translocase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), 1003-1008.
- Surana, N. K., Cutter, D., Barenkamp, S. J., & Geme, J. W. S. (2004). The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter contains an unusually short trimeric translocator domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 14679-14685.
- Symmons, M. F., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., & Koronakis, V. (2009). The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(17), 7173-7178.

- Tambong, J. T., & Höfte, M. (2001). Phenazines are involved in biocontrol of *Pythium myriotylum* on cocoyam by *Pseudomonas aeruginosa* PNA1. *European Journal of Plant Pathology*, 107(5), 511-521.
- Thomas, S., Holland, I. B., & Schmitt, L. (2014). The type 1 secretion pathway—the hemolysin system and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1629-1641.
- Tosi, T., Pflug, A., Discola, K. F., Neves, D., & Dessen, A. (2013). Structural basis of eukaryotic cell targeting by type III secretion system (T3SS) effectors. *Research in microbiology*, 164(6), 605-619.
- Tseng, T. T., Tyler, B. M., & Setubal, J. C. (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC microbiology*, 9(Suppl 1), S2.
- Van de Mortel, J. E., Tran, H., Govers, F., & Raaijmakers, J. M. (2009). Cellular responses of the late blight pathogen *Phytophthora infestans* to cyclic lipopeptide surfactants and their dependence on G proteins. *Applied and environmental microbiology*, 75(15), 4950-4957.
- Van Dijk, K., & Nelson, E. B. (2000). Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. *Applied and environmental microbiology*, 66(12), 5340-5347.
- Vidaver, A. K., & Lambrecht, P. A. (2004). Bacteria as plant pathogens. *The plant health Instructor*.
- Wadhams, G. H., & Armitage, J. P. (2004). Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(12), 1024-1037.
- Weatherspoon-Griffin, N., Zhao, G., Kong, W., Kong, Y., Andrews-Polymenis, H., McClelland, M., & Shi, Y. (2011). The CpxR/CpxA two-component system up-regulates two Tat-dependent peptidoglycan amidases to confer bacterial resistance to antimicrobial peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 286(7), 5529-5539.
- Wirthner, P., Haas, D., & Dfago, G. (1992). Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol. *Mol Plant Microbe Interact*, 5, 413Lodewyckx.
- Zheng, J., & Leung, K. Y. (2007). Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. *Molecular microbiology*, 66(5), 1192-1206.
- Zheng, J., Ho, B., & Mekalanos, J. J. (2011). Genetic analysis of anti-amoebae and anti-bacterial activities of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae*. *PloS one*, 6(8), e23876.