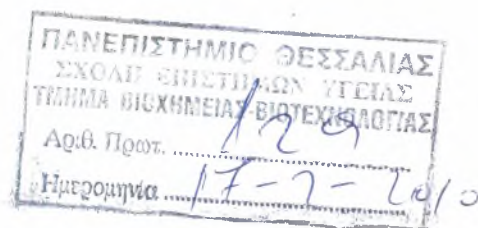
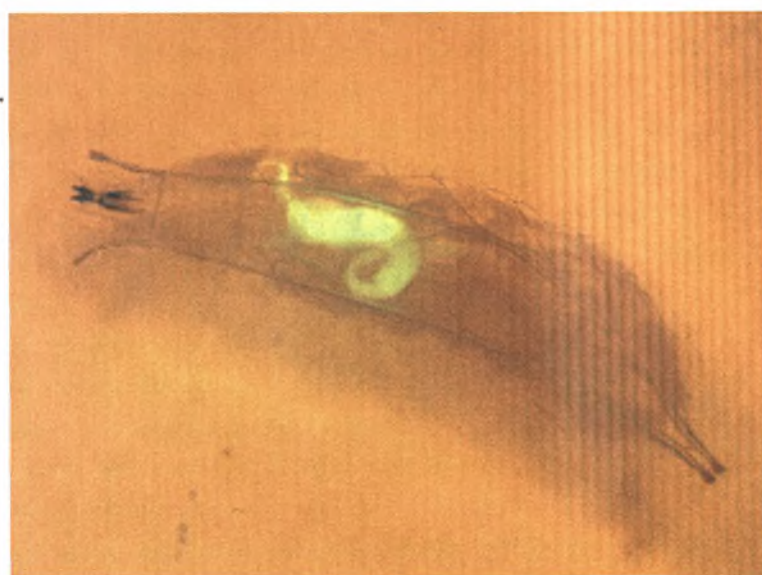


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



**ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΟΥ ΥΔΡΟΚΥΑΝΙΟΥ ΣΤΗΝ
ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ
ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA***



ΝΙΚΟΛΟΥΛΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2010



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8153/1

Ημερ. Εισ.: 20-04-2010

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2010

ΝΙΚ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087098

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΟΥ ΥΔΡΟΚΥΑΝΙΟΥ ΣΤΗΝ
ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ
ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA***

Επιβλέπων καθηγητής: Μόσιαλος Δημήτρης

Τριμελής Επιτροπή: Μόσιαλος Δημήτρης
Οροτα Οηγα - μέσω
Καρπούζας Δημήτρης



ΝΙΚΟΛΟΥΛΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

Onya OPOTA, PhD
EPFL, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne
School of Life Sciences, Global Health Institute, Station 15
CH-1015 Lausanne, Switzerland
Phone: +41 21 693 18 33, +41 21 693 18 18
Fax: +41 21 693 17 90

Secretariat of the Department of Biochemistry and Biotechnology,
University of Thessaly”

To whom it may concern

Here by, I would like to mention that I certify that I agree that Katerina NIKOLOULI deposits to you the report of her diploma project in order to be examined by the committee of the university.

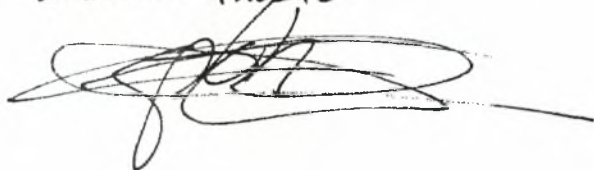
I have been one of the supervisors of the diploma project that Katerina achieved in our laboratory. I consider that Katerina has reached the level of knowledge and skill that correspond to the diploma for which she applies.

Because of the language barrier I was unfortunately unable to correct the manuscript of Katerina. Nevertheless as the other supervisors on whom I have an entire confidence gave their certificate to Katerina, I also join my certificate for the deposit of the report.

Best regards

Onya OPOTA

Lausanne 13.02.10



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Μόσιαλος Δημήτρης – Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. Onya Oropo – Μεταδιδακτορικός Ερευνητής του Ecole Polytechnique Federale de Lausanne
3. Καρπούζας Δημήτρης - Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών Μικροοργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του λέκτορος κ. Μόσιαλου Δημήτρη, καθώς και στο εργαστήριο του καθηγητή Bruno Lemaître του Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, υπό την επίβλεψη του ερευνητή Onya Oropo.

Αισθάνομαι υποχρεωμένη να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μόσιαλο Δημήτρη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας μου. Η επιστημονική του κατάρτιση, οι συμβουλές του και η υπομονή του με βοήθησαν να ολοκληρώσω όλες τις πειραματικές διαδικασίες. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για όλες τις ευκαιρίες που μου έδωσε, καθώς και για την αδιάκοπη καθοδήγησή του, που υπήρξαν καταλυτικοί παράγοντες για την άψογη συνεργασία μας και μου έδωσαν όλα τα απαραίτητα εφόδια για να συνεχίσω. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Onya Oropo, ερευνητή του Ecole Polytechnique Federale de Lausanne για την πολύτιμη βοήθειά του και την συνεργασία μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *PSEUDOMONAS*
- 1.2 *PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA*
- 1.3 ΔΟΜΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ
- 1.4 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ
- 1.5 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΗΣ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ΣΤΙΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ
- 1.6 ΣΚΟΠΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 2.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ
- 2.2 ΣΤΕΛΕΧΗ *Drosophila melanogaster*
- 2.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗ
- 2.4 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ *PeΔhcnB*
- 2.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ HCN ΣΤΟ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑ
- 2.6 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ
- 2.7 ΜΕΛΕΤΗ ΡΥΘΜΟΥ ΑΥΞΗΣΗΣ
- 2.8 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΠΛΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ
- 2.9 ΦΥΣΙΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΠΡΟΝΥΜΦΩΝ
- 2.10 ΦΥΣΙΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ *DROSOPHILA*
- 2.11 ΣΗΠΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ
- 2.12 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΞΥ *Pe* ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 3.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ *PeΔhcnB*
- 3.2 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ *ΔhcnB*
- 3.3 ΜΕΛΕΤΗ ΡΥΘΜΟΥ ΑΥΞΗΣΗΣ
- 3.4 ΦΥΣΙΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΠΡΟΝΥΜΦΩΝ
- 3.5 ΦΥΣΙΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ
- 3.6 ΣΗΠΤΙΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ
- 3.7 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΞΥ *Pe* ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Pseudomonas entomophila* ανακαλύφθηκε πρόσφατα και μέχρι τώρα είναι το μόνο γνωστό μέλος του γένους *Pseudomonas* που μπορεί να μολύνει με φυσικό τρόπο την *Drosophila melanogaster* και να την οδηγήσει σε θάνατο. Η *Pseudomonas entomophila* έχει την ικανότητα να επάγει συστηματική ανοσολογική απόκριση στο πεπτικό σύστημα της *Drosophila melanogaster*, μετά από κατάποσή της. Σε αντίθεση με άλλα βακτήρια, η *Pseudomonas entomophila* αποτελεί παθογόνο όχι μόνο για τα ενήλικα άτομα της *Drosophila melanogaster*, αλλά και για τις προνύμφες, ενώ η παραμονή της στο έντερο των προνυμφών οδηγεί σε μαζική καταστροφή των κυττάρων του.

Έρευνες έχουν δείξει πως η μολυσματικότητα της *Pseudomonas entomophila* είναι πολυπαραγοντική, με μια ξεκάθαρη διαφοροποίηση μεταξύ των παραγόντων που επάγουν την ανοσολογική απόκριση και αυτών που επάγουν την παθογένεια. Οι μολυσματικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην εντομοπαθογένεια αυτού του βακτηρίου είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Ένας από αυτούς τους παράγοντες είναι και το υδροκυάνιο (HCN), που παράγεται από την *Pseudomonas entomophila*. Το υδροκυάνιο είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης, που εμπλέκεται στην παθογένεια των βακτηριακών στελεχών που το παράγουν. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συμβολή του υδροκυανίου στην παθογένεια που εμφανίζει η *Pseudomonas entomophila* στην *Drosophila melanogaster*. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν βιολογικές δοκιμές στις οποίες χρησιμοποιήσαμε τον άγριο τύπο της *Pseudomonas entomophila*, καθώς και το μετάλλαγμα *PeΔhcnB*, το οποίο δεν είχε την ικανότητα παραγωγής υδροκυανίου. Τα αποτελέσματα της έρευνας δεν κατέδειξαν έναν κρίσιμο ρόλο του υδροκυανίου στην εντομοπαθογένεια της *Pseudomonas entomophila*, υποδηλώνοντας πως οι υπόλοιποι μολυσματικοί παράγοντες μπορεί να υπερκαλύπτουν την απώλεια του υδροκυανίου.

ABSTRACT

Pseudomonas entomophila is a recently characterized bacterial species and to date is the only known pseudomonad that is able to infect naturally *Drosophila melanogaster* and induce lethality. *Pseudomonas entomophila* has the capacity to induce the systemic immune response in the gut of *Drosophila melanogaster* after ingestion. In contrast to other bacterial species, *Pseudomonas entomophila* is highly pathogenic to both *Drosophila* larvae and adults and its persistence in the gut of larvae leads to a massive destruction of its cells.

Previous studies have demonstrated that *Pseudomonas entomophila* virulence is multifactorial with a clear differentiation between factors that trigger the immune response and those that promote pathogenicity. The virulence factors that contribute to entomopathogenicity exerted by this species are largely unknown. One of these factors is hydrogen cyanide (HCN), produced by *Pseudomonas entomophila*. Hydrogen cyanide is considered to be a secondary metabolite, implicated in the pathogenicity of the bacterial producers. In this study we investigated the role of cyanogenesis in *Pseudomonas entomophila* entomopathogenic properties against *Drosophila melanogaster*. More precisely, we performed biological assays in which we used the wild type *Pseudomonas entomophila* and the mutant *PeΔhcnB*, which was impaired in hydrogen cyanide production. The results of our study did not demonstrate a crucial role of hydrogen cyanide in *Pseudomonas entomophila* entomopathogenicity, indicating that the rest virulence factors could mask the loss of hydrogen cyanide.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *PSEUDOMONAS*

Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* είναι γνωστά στην επιστημονική κοινότητα ήδη από τον 19^ο αιώνα, με πιο γνωστό το παθογόνο για τον άνθρωπο *Pseudomonas aeruginosa*. Μέχρι τώρα έχουν περιγραφεί πάνω από 230 είδη που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas*, πολλά από τα οποία περιλαμβάνουν και υποείδη.

Οι ψευδομονάδες αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα Gram (-) αερόβιων, ετεροτροφικών βακτηρίων και μπορούν να εντοπιστούν στο έδαφος, το νερό καθώς και στη ριζόσφαιρα πολλών φυτών. Από μορφολογικής άποψης είναι ευθύγραμμοι ή ελαφρά κεκαμμένοι βάκιλλοι με πολικά μαστίγια. Έχουν πολύ απλές διατροφικές ανάγκες και αναπτύσσονται χημειοοργανοτροφικά σε ουδέτερο pH και σε μεσόφιλο εύρος θερμοκρασιών. Χαρακτηριστικό του μεταβολισμού τους είναι πως χρησιμοποιούν την οδό Entner-Doudoroff για τον καταβολισμό της γλυκόζης.

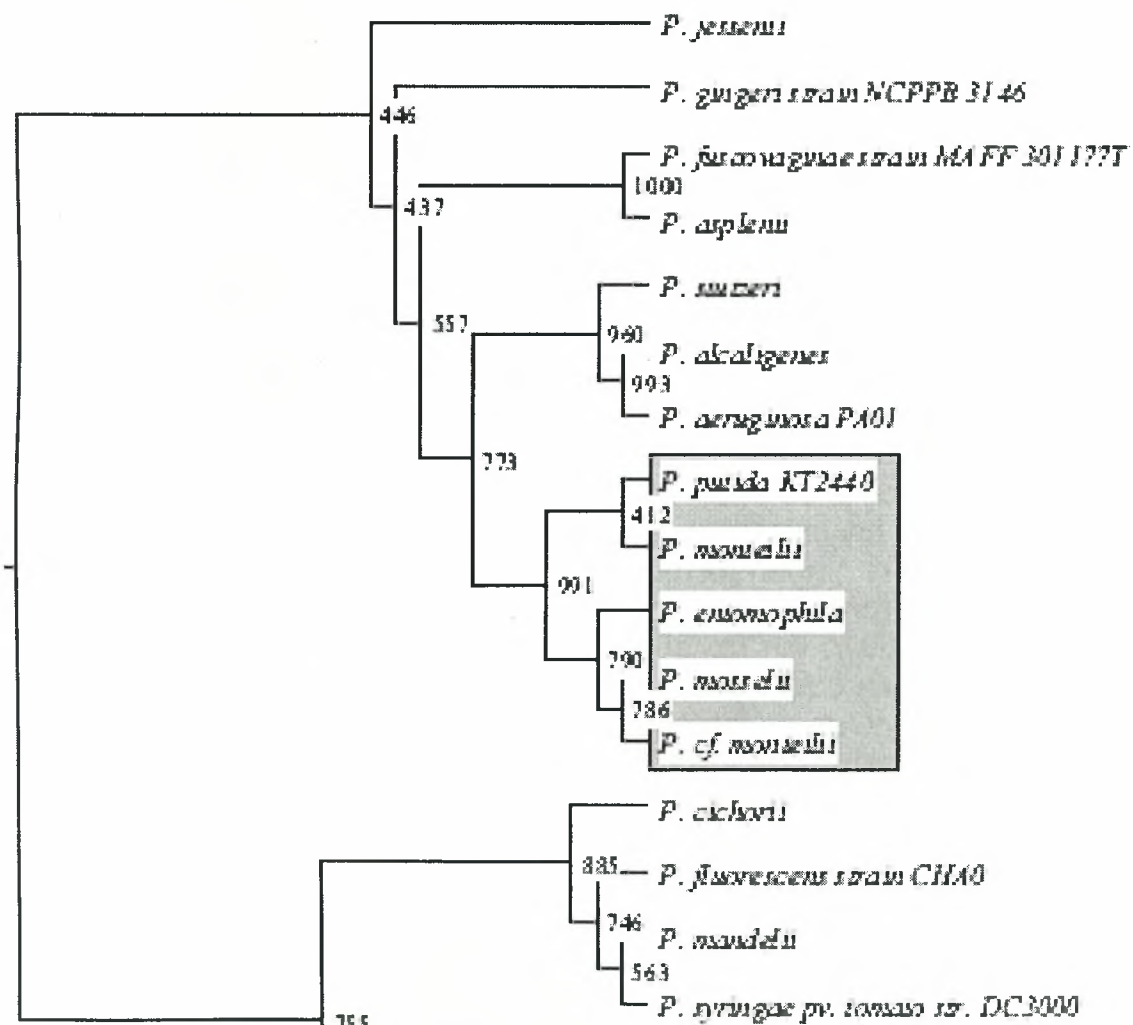
Κύρια χαρακτηριστικά ταυτοποίησής τους είναι η απουσία παραγωγής αερίου από γλυκόζη, καθώς και η θετική δοκιμή οξειδάσης, τα αποτελέσματα των οποίων βοηθούν στη διάκριση των ψευδομονάδων από τα εντερικά βακτήρια.

1.2 *PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA*

Το βακτήριο *Pseudomonas entomophila* (*Pe*) απομονώθηκε το 2001 στη Γουαδελούπη από ένα θηλυκό άτομο *Drosophila melanogaster*. Σύγκριση του 16S rRNA της *P. entomophila* με τις 16S rRNA αλληλουχίες που υπάρχουν μέχρι στιγμής στη βάση δεδομένων, έδειξε ότι η *P. entomophila* ανήκει στο γένος *Pseudomonas* και έχει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με την *Pseudomonas putida* (Vodovar et al., 2005). Παρουσιάζει όλα τα γενικά χαρακτηριστικά των ψευδομονάδων, που περιγράφηκαν παραπάνω, και επιπλέον είναι μέχρι στιγμής το μοναδικό γνωστό στέλεχος που εμφανίζει παθογένεια στην *Drosophila melanogaster*, παρόλο που δεν έχει εκκριτικό σύστημα τύπου III (Vodovar et al., 2006; Papagiannoulis et al., 2009).

Ο μεταβολισμός της *P. entomophila* στηρίζεται στο μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης, στο μονοπάτι Entner-Doudoroff, στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων, καθώς και σε ένα μη ολοκληρωμένο (λόγω της απουσίας της 6-φωσφοφρουκτοκινάσης) Embden-Meyerhof-Parnas μονοπάτι. Το γονιδίωμά της κωδικοποιεί επίσης για λιπάσες, πρωτεάσες και υδρολάσες που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση πολυμερών που απαντώνται στο έδαφος.

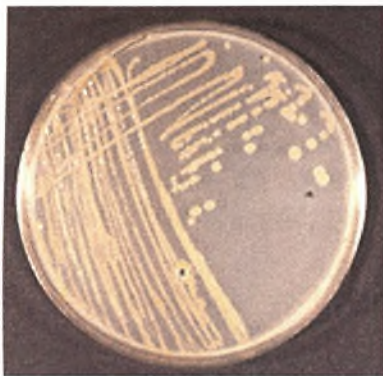
Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει επικεντρωθεί στην *P. entomophila* εξαιτίας της ικανότητάς της να μολύνει δια στόματος την *Drosophila melanogaster* και να προκαλεί το θάνατο τόσο στα ενήλικα άτομα, όσο και στις προνύμφες (Vodovar et al., 2005). Αν και μέχρι σήμερα δεν είναι σαφής ο ακριβής τρόπος με τον οποίο σκοτώνει, καθώς και το εύρος των ειδών των εντόμων που μπορεί να προσβάλει, έχει ελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον ως νέο είδος και όλα δείχνουν ότι θα αποτελέσει αντικείμενο πιο εντατικής έρευνας.



ΕΙΚΟΝΑ 1: Φυλογενετικό δέντρο που δείχνει τη συγγενική σχέση της *P. entomophila* με την *P. putida* (Vodovar et al., 2005)



α)



β)

ΕΙΚΟΝΑ 2: Στη εικόνα 1α φαίνεται η *P. entomophila* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και στην 1β έχουμε μια στερεή καλλιέργεια *P. entomophila*. (Hagedorn, 2008, Environmental Microbiology)

Βακτήρια που εμφανίζουν εντομοπαθογένεια έχουν μελετηθεί από πολύ νωρίς, κυρίως ως προς τις στρατηγικές που έχουν αναπτύξει για να αλληλεπιδρούν με τα έντομα και να τα οδηγούν σε θάνατο. Πολλά γονιδιακά προϊόντα που παρήχθησαν από αυτά τα βακτήρια ή ακόμα και τα ίδια τα βακτήρια έχουν χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία εντομοκτόνων με στόχο την αντιμετώπιση εντόμων που είτε καταστρέφουν τις γεωργικές καλλιέργειες, είτε αποτελούν φορείς ασθενειών για ζωικούς οργανισμούς και τον άνθρωπο. Ωστόσο ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα παραμένει η ανθεκτικότητα που αναπτύσσουν τα έντομα και εν συνεχεία η αναποτελεσματικότητα αυτών των εντομοκτόνων να σκοτώσουν. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανθεκτικότητα που αναπτύσσουν τα έντομα στις δ-ενδοτοξίνες του βακτηρίου *Bacillus thuringiensis*, όταν γίνεται χρήση του με μεγάλη συχνότητα στις γεωργικές καλλιέργειες. Σημαντικές είναι και οι επιπτώσεις που είναι πιθανό να προκαλέσουν αυτά τα εντομοκτόνα και σε έντομα, που δεν προκαλούν βλάβες, αλλά αντιθέτως μπορεί να δρουν σαν επικονιαστές των φυτών. Πρόβλημα θα μπορούσε να αποτελέσει επίσης και πιθανή διείσδυση αυτών των εντομοκτόνων στην τροφική

αλυσίδα, γεγονός που θα είχε σοβαρές επιπτώσεις σε πληθώρα φυτικών και ζωικών οργανισμών, αλλά και στον άνθρωπο.

Η ικανότητα λοιπόν της *P. entomophila* να μολύνει δια του στόματος και να σκοτώνει την *Drosophila melanogaster*, καθώς και τις προνύμφες από αρκετά είδη εντόμων (Vodovar et al., 2005), την καθιστά ένα πολλά υποσχόμενο μοντέλο για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων ξενιστή-παθογόνου, καθώς και για την ανάπτυξη τεχνικών βιοελέγχου των παρασιτικών εντόμων.

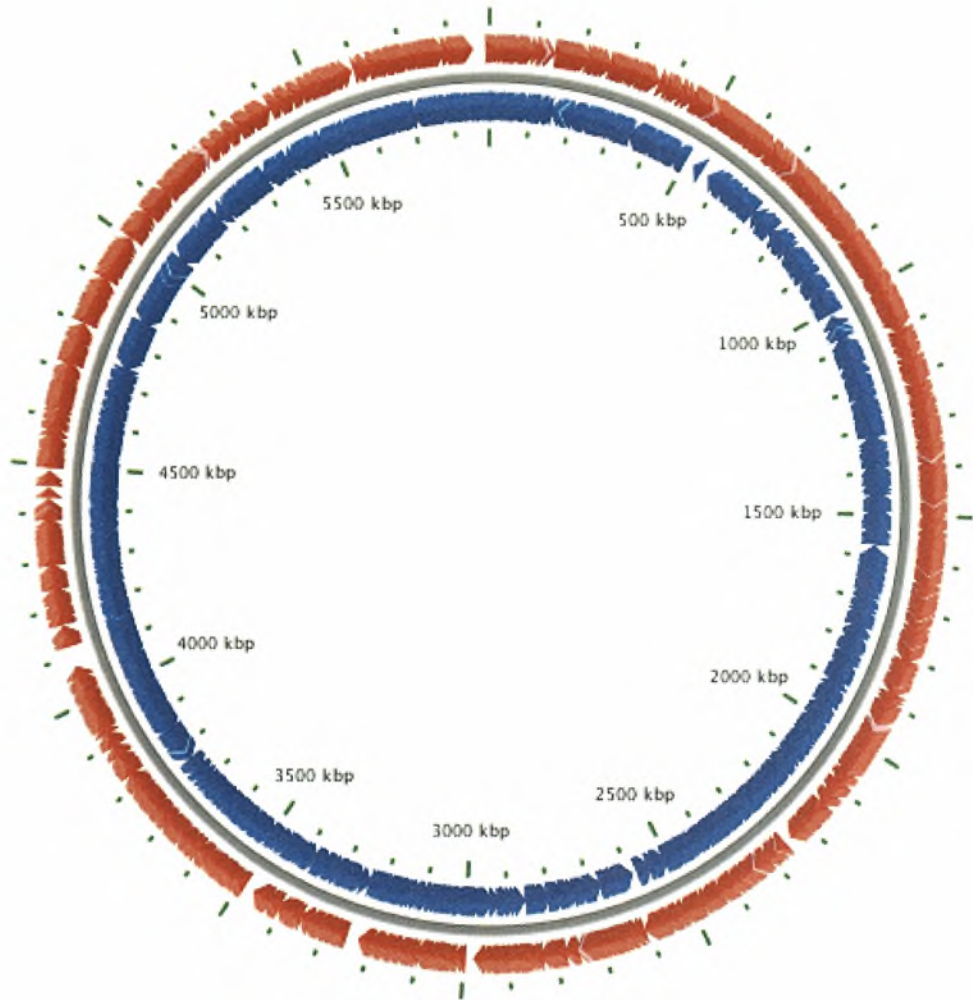
1.3 ΔΟΜΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Η πλήρης αλληλούχηση του γονιδιώματος της *P. entomophila* ολοκληρώθηκε το 2006 (Vodovar N. et al., 2006) και αποκαλύφθηκε πως αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα 5.888.780 νουκλεοτιδίων. Ανάμεσα στις 5.169 κωδικεύουσες αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν, έχουν αποδοθεί συγκεκριμένες λειτουργίες σε ένα ποσοστό 67%, δηλαδή σε περίπου 3.466 γονίδια.

Η σύγκριση των γονιδιωμάτων των 5 αντιπροσωπευτικών ειδών *Pseudomonas* με το πρόγραμμα BLAST αποκάλυψε πως το πυρηνικό γονιδίωμα του γένους αποτελείται από 2.065 γονίδια. Με βάση αυτή την ανάλυση ταυτοποιήθηκαν 1.002 γονίδια μοναδικά στο γονιδίωμα της *P. entomophila* (Vodovar N. et al., 2006).

Επιπλέον, η σύγκριση των γονιδιωμάτων κατέδειξε πως η *P. entomophila* έχει τουλάχιστον 3.630 γονίδια που έχουν ορθόλογά τους στην *P. putida* (Vodovar N. et al., 2006), γεγονός που επιβεβαιώνει την στενή συγγενική τους σχέση και παράλληλα δικαιολογεί την ικανότητα της *P. entomophila* να αναπτύσσεται στο έδαφος και να προσαρμόζει τις μεταβολικές της ιδιότητες.

Pseudomonas entomophila L48, complete genome



Accession: NC_008027

Topology: circular; Length: 5,888,780 bp; Genes: 5,241

ΕΙΚΟΝΑ 3: Το πλήρες γονιδίωμα της *P. entomophila*

1.4 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Για τον χαρακτηρισμό ενός βακτηρίου ως εντομοπαθογόνου είναι απαραίτητο να πληρούνται κάποιες προϋποθέσεις. Αρχικά θα πρέπει το βακτήριο να βρίσκεται στο ίδιο ενδιαίτημα με το έντομο, καθώς επίσης να έχει και τη δυνατότητα να παραμένει στο εσωτερικό του εντόμου. Επιπλέον, ένα εντομοπαθογόνο βακτήριο θα πρέπει να είναι ικανό να «διαφεύγει» από την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή του και φυσικά μετά την μόλυνση να έχει τη δυνατότητα να δημιουργεί αποικίες στους ιστούς του εντόμου και/ή να του δημιουργεί βλάβες μέσω της παραγωγής τοξινών.

Η *P. entomophila* είναι ένα εντομοπαθογόνο βακτήριο που έχει τη δυνατότητα να μολύνει με φυσικό τρόπο την *Drosophila*, μετά από κατάποσή της (Vodovar N. et al., 2005), σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες στις οποίες τα βακτήρια έπρεπε να εισαχθούν απευθείας στη σωματική κοιλότητα του εντόμου, παρακάμπτοντας έτσι τα αρχικά βήματα της φυσικής μόλυνσης.

Χαρακτηριστικό της *P. entomophila* είναι πως έχει τη δυνατότητα να μολύνει και τα ενήλικα άτομα, αλλά και τις προνύμφες της *Drosophila*. Πιο συγκεκριμένα, RT-qPCR ανάλυση του συνολικού mRNA της *Drosophila*, που ακολούθησε μετά την φυσική μόλυνση με *P. entomophila*, αποκάλυψε την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs), όπως η Διπερισίνη και η Δροσομυσίνη, στο έντερο των ενήλικων ατόμων, αλλά και των προνυμφών. Επιπλέον, παρατηρήθηκε έκφραση των AMPs στην τραχεία, καθώς και στο πρόσθιο τμήμα του μεσεντέριου, ενώ μέσω γονιδίων αναφοράς εντοπίστηκαν AMPs και στο λιπαρό σώμα των προνυμφών (Vodovar N. et al., 2005). Από τα παραπάνω αποτελέσματα έγινε φανερό πως η *P. entomophila* είναι ικανή να προκαλέσει και συστηματική, αλλά και τοπική ανοσοαπόκριση όταν μολύνει την *Drosophila*. Με τη χρήση φθορίζουσας *P. entomophila*, που μπορούσε να εκφράζει την GFP πρωτεΐνη, έγινε φανερό πως το βακτήριο έχει την ικανότητα να παραμένει στο εμπρόσθιο τμήμα του μεσεντέριου 6 ώρες μετά την μόλυνση προνυμφών (Vodovar N. et al., 2005).



ΕΙΚΟΝΑ 4: *P. entomophila* σημασμένη με GFP, που εντοπίζεται στο έντερο των προνυμφών (Vodovar N. et al., 2005)

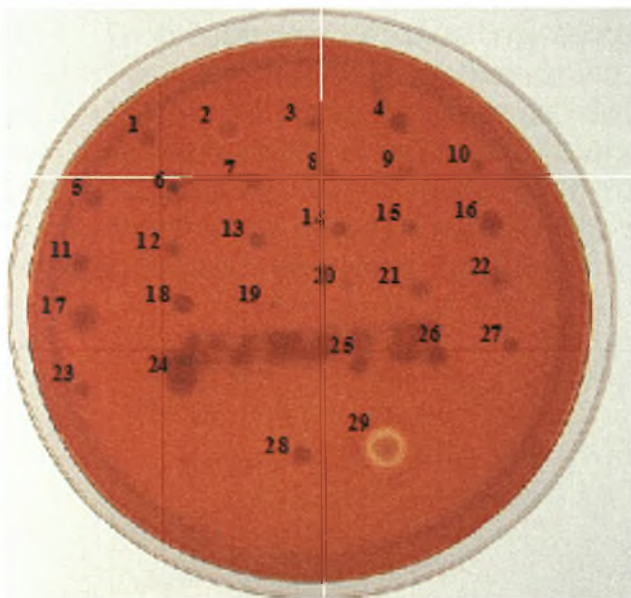
Η μόλυνση της *Drosophila* από την *P. entomophila* έχει σαν επακόλουθο την έκφραση γονιδίων, που πιθανόν ευθύνονται για τις αλλαγές που παρατηρούνται στη φυσιολογία του εντέρου. Αξίζει να σημειωθεί πως η έκφραση αυτών των γονιδίων επάγεται μόνο στην περίπτωση μόλυνσης από *P. entomophila* και μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, αναστολείς πρωτεασών σερίνης, πρωτεΐνες απάντησης σε stress, καθώς και γονίδια που συμμετέχουν στο JAK/STAT και στο JNK μονοπάτι (Vodovar N. et al., 2005).

Παρά το γεγονός ότι έχουν χαρακτηριστεί πολλοί μολυσματικοί παράγοντες μέχρι σήμερα, δεν είναι ακόμη γνωστός ο μηχανισμός που η *P. entomophila* σκοτώνει τα έντομα. Η μολυσματικότητα της *P. entomophila* είναι πολυπαραγοντική, με μια ξεκάθαρη διαφοροποίηση ανάμεσα στους παράγοντες που επάγουν την ανοσοαπόκριση και σε αυτούς που προωθούν την παθογένεια. Ανάλυση του γονιδιώματος έχει δείξει πως η *P. entomophila* παράγει τοξίνες, πρωτεΐνες μολυσματικότητας, καθώς και δευτερογενείς μεταβολίτες που συμμετέχουν στη διαδικασία καταστροφής των ιστών του ξενιστή. Διαφορετικοί τοξικοί παράγοντες είναι δυνατόν να δράσουν συνδυαστικά στην παθογένεια, ενώ σημαντικό χαρακτηριστικό τους είναι πως δίνουν τη δυνατότητα στον παθογόνο μικροοργανισμό να επιβιώσει μέσα στο περιβάλλον του ξενιστή. Έτσι η *P. entomophila* έχει την ικανότητα, λόγω των παραγόντων μολυσματικότητας που εκφράζει να «διαφεύγει» από την ανοσοαπόκριση της *Drosophila* και να μπορεί έτσι να παραμένει στο έντερό της.

Στο γονιδίωμα της *P. entomophila* αποκαλύφθηκε η ύπαρξη 3 γονιδίων, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες τοξινών (Vodovar N. et al., 2006). Αυτές οι TccC-type τοξίνες (PSEEN2485, PSEEN2697, PSEEN2788) έχουν εντοπιστεί επίσης και σε άλλα εντομοπαθογόνα βακτήρια όπως το *Photorhabdus luminescens* και το *Serratia entomophila*.

Οι βακτηριακές αιμολυσίνες είναι εξοτοξίνες, που έχουν σαν στόχο τις μεμβράνες των κυττάρων του αίματος και προκαλούν ρήξεις στα κύτταρα, με ένα μηχανισμό που δεν είναι ακόμα απόλυτα κατανοητός. Η *P. entomophila* παρουσιάζει έντονη αιμολυτική δραστηριότητα, που πιθανότατα εμπλέκεται στην παθογένεια της *Drosophila*. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί πως η RTX πρωτεΐνη (PSEEN3925), καθώς και ένας αριθμός λιπασών συμβάλλουν στην αιμολυτική δραστηριότητα της *P. entomophila* (Vodovar N. et al., 2006).

Οι πρωτεάσες αποτελούν μια άλλη σημαντική ομάδα εκκρινόμενων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην μολυσματικότητα των βακτηρίων. Η *P. entomophila* κωδικοποιεί για 3 πρωτεάσες σερίνης, καθώς και για μια αλκαλική πρωτεάση, την AprA, η οποία παίζει ρόλο κλειδί στην μολυσματικότητα. Η AprA είναι μια εκκρινόμενη μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου 51kDa, που ρόλος της είναι η αποικοδόμηση των αντιμικροβιακών πεπτιδίων της *Drosophila*. Με αυτό τον τρόπο προσφέρει προστασία στην *P. entomophila*, η οποία διαφεύγει έτσι από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Liehl P. et al, 2006).



ΕΙΚΟΝΑ 5: Αιμολυτική δραστηριότητα της *P. entomophila* (νούμερο 29) (Onya Orotu, προσωπική επικοινωνία)

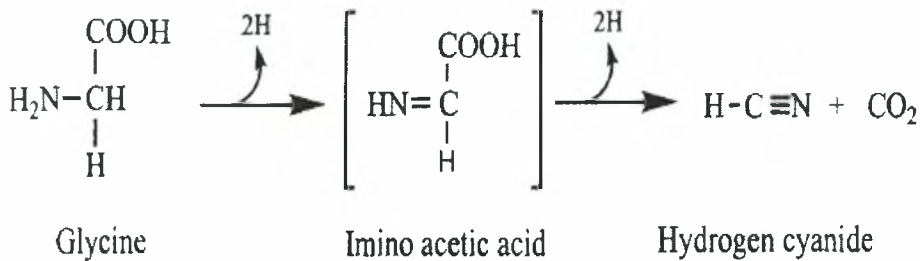
Παραγωγή υδροκυανίου

Η παραγωγή υδροκυανίου (HCN) σε βακτήρια του γένους *Pseudomonas* μελετήθηκε το 1983, όταν οι Askeland και Morrison εντόπισαν σε δείγματα νερού 5 στελέχη *P. fluorescens* και ένα στέλεχος *P. aeruginosa*, που μπορούσαν να παράγουν HCN. Ο μέγιστος βαθμός κυανογένεσης παρατηρήθηκε σε θερμοκρασίες 25-30°C και σε pH 6,6-8,9.

Το HCN είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης, ο οποίος μέχρι σήμερα δε φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στον πρωτογενή μεταβολισμό των βακτηρίων. Η δράση του εντοπίζεται στην αναπνευστική αλυσίδα, όπου δρα σαν αναστολέας της οξειδάσης του κυτοχρώματος c των ευκαρυωτικών οργανισμών. Είναι πτητική χημική ένωση με τοξική δράση και όλα τα βακτηριακά στελέχη που το παράγουν, το εκκρίνουν στο περιβάλλον τους. Αυτά τα βακτηριακά στελέχη έχουν επιπλέον και μηχανισμούς που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα και τους προστατεύουν από την τοξική δράση του HCN. Βασικό μηχανισμό αυτοπροστασίας αποτελεί η μη-ευαίσθητη οξειδάση του υδροκυανίου(CIO). Η έκφραση και παραγωγή αυτής της οξειδάσης επιτρέπει στα βακτήρια να αναπτύσσονται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων υδροκυανίου (Zlosnik et al., 2006; Cooper et al., 2003). Έτσι παρά το γεγονός ότι οι τελικές οξειδάσες αναστέλλονται από το υδροκυανίο, η CIO δίνει τη δυνατότητα ανάπτυξης παρουσία του υδροκυανίου, χωρίς να παρεμποδίζεται η αναπνευστική αλυσίδα. Σημαντικό στοιχείο της αυτοπροστασίας των βακτηρίων αποτελεί και το ένζυμο ροδανάση. Η ροδανάση έχει τη δυνατότητα να αποτοξικοποιεί το υδροκυανίο, μετατρέποντάς το σε θειοκυανικό ιόν.

Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση παραγωγής του HCN είναι η συνθάση του HCN. Πρόκειται για ένα μεμβρανικό φλαβοένζυμο, το οποίο χρησιμοποιεί σαν υπόστρωμα την γλυκίνη και μέσω οξειδωτικής αποκαρβοξυλίωσης την μετατρέπει σε HCN και CO₂ (Castric et al., 1977). Η συνθάση του HCN είναι πολύ ασταθής και ευαίσθητη στο οξυγόνο και γι' αυτό το λόγο έχει καθαριστεί μόνο μερικώς (Blumer and Haas,2000).

HCN synthase (HcnABC)



ΕΙΚΟΝΑ 6: Αντίδραση μετατροπής της γλυκίνης σε HCN και CO₂, μέσω της συνθάσης του HCN. (Blumer and Haas, 2000)

Η συνθάση του HCN κωδικοποιείται από μια ομάδα 3 γονιδίων, τα *hcnABC*, τα οποία σχηματίζουν ένα οπερόνιο. Έρευνες έχουν δείξει πως τα *hcnABC* γονίδια παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες με γονίδια που κωδικοποιούν για οξειδάσες των αμινοξέων. Ο συσχετισμός της HCN συνθάσης με την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Knowles and Bunch, 1986) μπορεί να εξηγηθεί από τις αμινοξικές αλληλουχίες των HcnB και HcnC, που περιέχουν δύο υποθετικά διαμεμβρανικά τμήματα. Η τοπολογία της συνθάσης του υδροκυανίου θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε το HCN, που είναι νουκλεόφιλο μόριο και ισχυρός χηλικός παράγοντας, να απελευθερώνεται στον περιπλασματικό χώρο και όχι μέσα στο κυτταρόπλασμα, όπου θα μπορούσε να έχει ανεπιθύμητα τοξικά αποτελέσματα.

Η παρουσία της *hcnABC* (PSEEN5522, PSEEN5521, PSEEN5520) ομάδας γονιδίων στο γονιδίωμα της *P. entomophila* οδήγησε τους επιστήμονες στην υπόθεση πως και αυτό το είδος *Pseudomonas* παράγει HCN. Για να εξακριβωθεί η παραπάνω υπόθεση χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα το βακτήριο *P.aeruginosa* PAO1, που είναι γνωστό πως παράγει υδροκυάνιο και ως αρνητικό δείγμα το μετάλλαγμα $\Delta hcnB$ (PAO6344) της *P.aeruginosa* (Pessi and Haas 2000; Zlosnik and Williams 2004). Από τις μετρήσεις έγινε φανερό πως η *P. entomophila* παράγει υδροκυάνιο σε υγρές καλλιέργειες στην αρχή της φάσης στασιμότητας σε συγκέντρωση μέχρι $40 \mu\text{mol l}^{-1}$, δηλαδή σε επίπεδα που είναι 3 ή 4 φορές χαμηλότερα από τα επίπεδα που παράγει ο άγριος τύπος *P.aeruginosa* PAO1. Παραγωγή HCN παρατηρήθηκε επίσης και σε στερεές καλλιέργειες, στις οποίες όμως η *P. entomophila* παρήγαγε HCN σε πολύ υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις υγρές καλλιέργειες, που ήταν 3 φορές υψηλότερα από αυτά της *P.aeruginosa* PAO1 (Ryall et al., 2009).

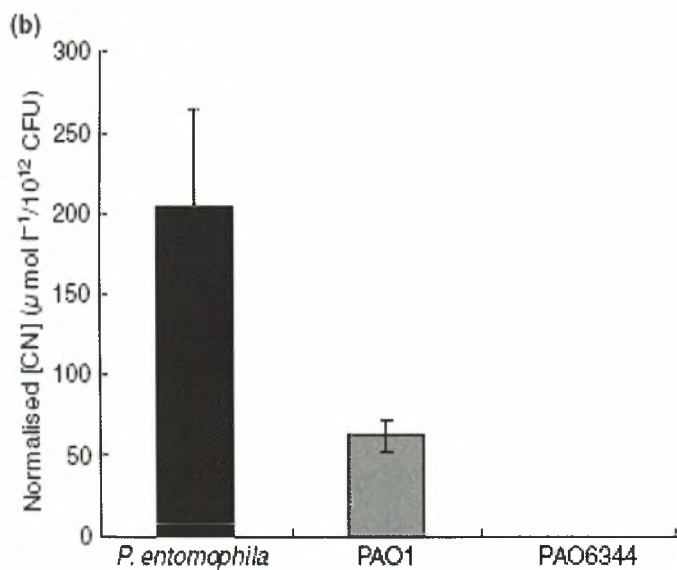
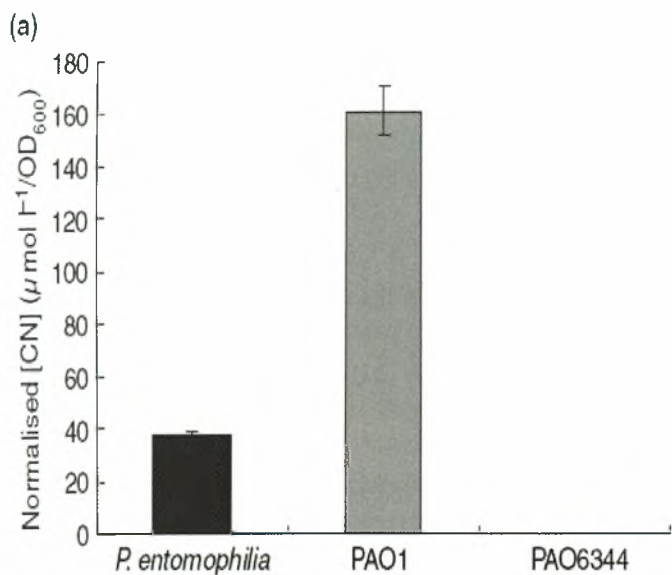


ΕΙΚΟΝΑ 7: Σχηματική αναπαράσταση των τριών γονιδίων *hcnABC* (Όνγα Όροτα, προσωπική επικοινωνία)

Table 2 Gene/gene products potentially involved in *P. entomophila*-*D. melanogaster* interaction

Gene/gene product ^{a,b,c}	Function	Ps. ^d
Adhesion		
PSEEN0141 ^a	Putative surface adhesion protein	54% PP0168 ^e
PSEEN2177 ^a	Putative filamentous hemagglutinin	51% PFL4237
PSEEN3946 ^a	Putative filamentous hemagglutinin	41% PA0041
PSEEN3161	Putative autotransporter, pertactin-like protein	63% PP3069
PSEEN4310 ^a	Putative autotransporter, pertactin-like protein	42% PSPT02225
Proteases		
<i>aprA</i> ^c	Alkaline metalloprotease	72% PSPT03332
PSEEN3027 ^b	Putative autotransporter, SSP-h1 serine protease	68% PSPT01650
PSEEN3028 ^b	Putative autotransporter, serine protease	64% PA3535
PSEEN4433 ^a	Putative subtilisin-like serine protease	Absent
Lipases		
PSEEN0709 ^b	Lysophospholipase	76% PA2540
PSEEN1065 ^b	Phospholipase C	62% PFL0888
PSEEN2195	Triacylglycerol lipase	64% Pf B52 (P21773)
PSEEN3432 ^{a,b}	Lipase class3	48% Pfo0149
Toxins		
<i>hcnABC</i> ^c	Hydrogen cyanide production	76% PA2193 (<i>hcnA</i>)
PSEEN0132/3332/3042-5 ^{a,b}	Cluster involved in lipopeptide I biosynthesis	See text ^f
PSEEN2138-56 ^{a,b}	Cluster involved in lipopeptide II biosynthesis	Absent
PSEEN2716-20 ^b	Cluster involved in lipopeptide III biosynthesis	77% Pfo2266 (2717)
PSEEN5524-36 ^{a,b}	Cluster involved in polyketide biosynthesis	Absent
PSEEN0701 ^{a,b}	Protein related to TccC-type insecticidal toxin	Absent ^f
PSEEN0702 ^{a,b}	Protein related to TccC-type insecticidal toxin	Absent ^f
PSEEN1172 ^a	Protein related to TccB-type insecticidal toxin	Absent ^f
PSEEN2485 ^{a,c}	TccC-type insecticidal toxin	Absent
PSEEN2697 ^{a,b,c}	TccC-type insecticidal toxin	Absent
PSEEN2788 ^{a,b,c}	TccC-type insecticidal toxin	Absent
PSEEN3325 ^{a,b}	Putative toxin (cytolethal distending toxin B domains)	Absent
PSEEN3925-9 ^a	Putative RTX toxin and type I secretion system	Absent

ΕΙΚΟΝΑ 8: Παρουσία των *hcnABC* γονιδίων στο γένωμα της *P. entomophila*. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν για την συνθάση του HCN. (Vodovar et al., 2006)



ΕΙΚΟΝΑ 9: α) Παραγωγή HCN σε υγρές καλλιέργειες *P. entomophila*
 β) Παραγωγή HCN σε στερεές καλλιέργειες *P. entomophila*. Η παραγωγή HCN είναι πολύ μεγαλύτερη στις στερεές καλλιέργειες. (Ryall et al., 2009)

Ρύθμιση παραγωγής υδροκυανίου

Το υδροκυάνιο παράγεται στο μέγιστο βαθμό κατά τη μετάβαση από την εκθετική φάση ανάπτυξης στην φάση στασιμότητας και για την παραγωγή του απαιτείται οξυγόνο, αλλά σε περιορισμένες ποσότητες (μικροαεροφιλικές συνθήκες ~5%) (Laville et al, 1998). Στα στελέχη *P. aeruginosa* και *P. fluorescens* η παραγωγή υδροκυανίου εξαρτάται από την ANR πρωτεΐνη. Η ANR πρωτεΐνη είναι μεταγραφικός παράγοντας και ανήκει στην οικογένεια FNR. Ο υποκινητής των *hcnABC* γονιδίων περιέχει μια FNR/ ANR περιοχή στο ανοδικό του τμήμα, που είναι χαρακτηριστική των υποκινητών που ενεργοποιούνται από FNR ή ANR πρωτεΐνες.

Η ύπαρξη δύο υποθετικών ANR περιοχών ανοδικά του *hcnA* γονιδίου της *P. entomophila* οδήγησε στην υπόθεση πως μια πρωτεΐνη ομόλογη με την ANR εμπλέκεται στη ρύθμιση των *hcnABC* γονιδίων (Winteler and Haas 1996; Pessi and Haas 2000). Για να ελεγχθεί η παραπάνω υπόθεση, οι επιστήμονες μελέτησαν την επίδραση της διαθεσιμότητας του οξυγόνου στην παραγωγή υδροκυανίου από την *P. entomophila*. Χρησιμοποιώντας υγρές καλλιέργειες *P. entomophila* σε 3 διαφορετικούς όγκους, έτσι ώστε να υπάρχει και διαφορετική διαθεσιμότητα οξυγόνου, ανακάλυψαν πως η παραγωγή υδροκυανίου είναι μέγιστη όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου είναι μικρή (Ryall et al., 2009).

Δεύτερος σημαντικός ρυθμιστής της παραγωγής HCN είναι το σύστημα AlgZ/ AlgR. Ο AlgR είναι μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος προσδένεται στον υποκινητή του *hcnA* γονιδίου και ρυθμίζει θετικά την έκφρασή του, ενώ ο AlgZ είναι ένας υποθετικός αισθητήρας για το AlgR. Το AlgZ/ AlgR σύστημα ρυθμίζει την παραγωγή HCN μέσω ενός εξειδικευμένου μηχανισμού πρόσδεσης στη μεμβράνη, ο οποίος απαιτεί το συντηρημένο ασπαρτικό οξύ στη θέση 54 του AlgR (Cody et al, 2009).

Τα συστήματα που αποτελούνται από δύο ρυθμιστές είναι ευρέως διαδεδομένα στα Gram (-) βακτήρια. Αυτά τα ρυθμιστικά συστήματα βοηθούν τους μικροοργανισμούς να ανταπεξέλθουν σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, καθώς και να αποικίσουν συγκεκριμένες οικολογικές θέσεις ως απάντηση σε ερεθίσματα του περιβάλλοντός τους. Ένα τέτοιο ρυθμιστικό σύστημα αποτελεί και το GacS/GacA, όπου το GacS είναι μια κινάση που ανιχνεύει τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα και το GacA είναι ο ρυθμιστής απόκρισης στο ερέθισμα.

Για την ενεργοποίηση του συγκεκριμένου συστήματος, αρχικά απαιτείται η επίδραση ενός ερεθίσματος που θα οδηγήσει στην αυτοφωσφορυλίωση του GacS σε μια εξελικτικά συντηρημένη

ιστιδίνη. Στη συνέχεια το GacS ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης το GacA, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί ή καταστέλλει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων. Τα ερεθίσματα που μπορούν να ενεργοποιήσουν το συγκεκριμένο ρυθμιστικό σύστημα μπορεί να είναι αβιωτικά, όπως pH, θερμοκρασία, οσμωμοριακότητα, ή βιωτικά. Μερικά από τα ερεθίσματα παράγονται από τους ξενιστές των βακτηρίων, ενώ άλλα συντίθενται από τους ίδιους τους βακτηριακούς πληθυσμούς.

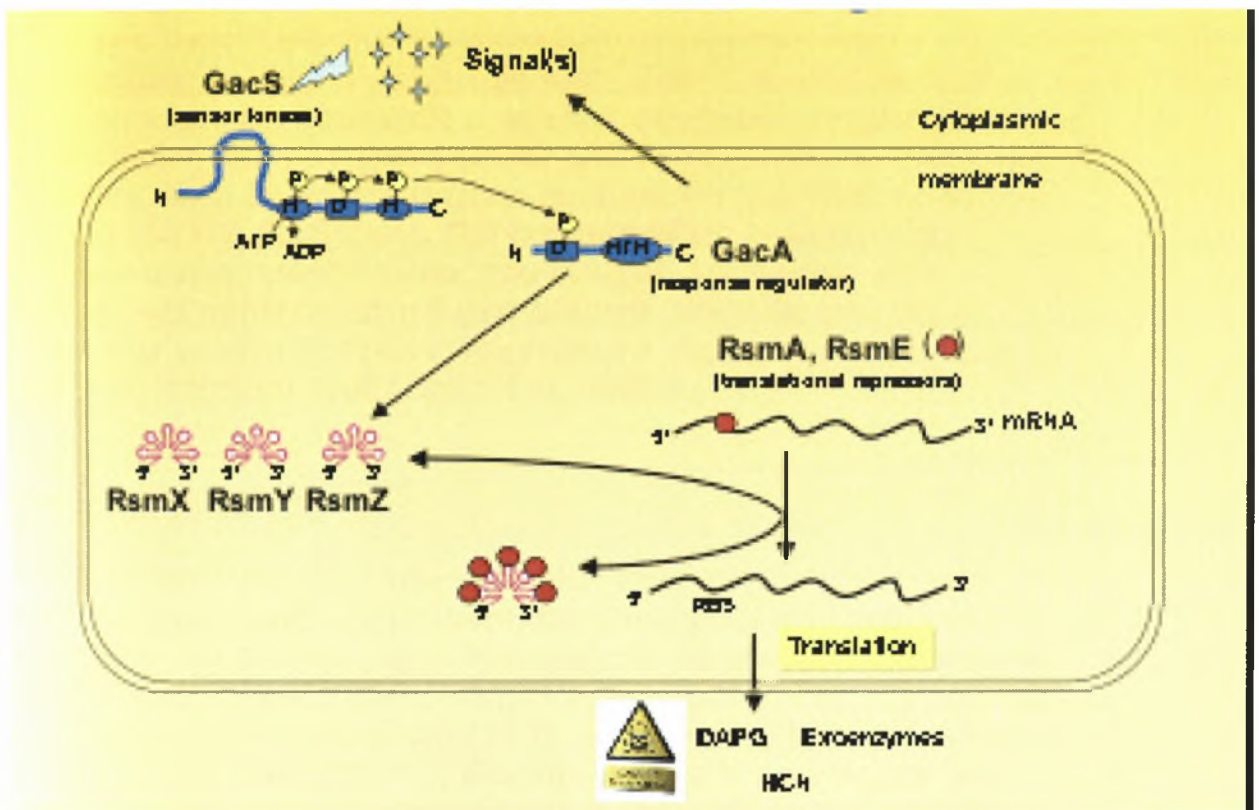
Στην *P. entomophila* η έκκριση των σηματοδοτικών μορίων που ενεργοποιούν το GacS/GacA σύστημα παρατηρείται όταν ο βακτηριακός πληθυσμός βρίσκεται σε μεγάλη πυκνότητα και στο χρονικό σημείο κατά το οποίο γίνεται η μετάβαση από την εκθετική φάση ανάπτυξης στην φάση στασιμότητας (Blumer et al. 1999). Το σύστημα αυτό παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της *P. entomophila*, καθώς ρυθμίζει την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών, όπως είναι το υδροκυάνιο, και εξωκυτταρικών ενζύμων. Ο σημαντικός του ρόλος αποδεικνύεται από το γεγονός πως μεταλλαγμένα στελέχη *gacS/gacA* της *P. entomophila* εμφανίζουν μειωμένη ή καθόλου παθογένεια στη *Drosophila*, ενώ δεν παρατηρείται καμιά παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων και υδροκυανίου (Vodovar et al., 2005).

Σε κυτταρικό επίπεδο το σύστημα GacS/GacA ρυθμίζει θετικά την σύνθεση λακτονών της N-ακυλο-ομοσερίνης, που λειτουργούν σαν αυτοεπαγωγείς του συστήματος Gac, μέσω ενός θετικού επανατροφοδοτικού ελέγχου. (Pessi and Haas 2001). Αυτά τα σηματοδοτικά μόρια παράγονται από πολλά Gram (-) βακτήρια και ελέγχουν σε μεταγραφικό επίπεδο την έκφραση των γονιδίων στόχων.

Τα γονίδια που η έκφρασή τους ρυθμίζεται από το GacS/GacA σύστημα σε μεταγραφικό επίπεδο, όπως τα *hcnABC*, φαίνεται πως ρυθμίζονται παράλληλα και από τις πρωτεΐνες RsmA και RsmE. Όταν το σύστημα GacS/GacA δεν είναι ενεργοποιημένο, τότε οι πρωτεΐνες RsmA και RsmE δρουν σαν καταστολείς των γονιδίων που κωδικοποιούν για δευτερογενείς μεταβολίτες. Στην περίπτωση όμως που ένα περιβαλλοντικό ερέθισμα επιδρά στην GacS κινάση, τότε το σύστημα ενεργοποιείται και η GacA φωσφορυλιώνεται από την GacS. Η GacA με τη σειρά της επάγει την έκφραση των γονιδίων *rsmX*, *rsmY*, *rsmZ*, τα οποία μεταγράφονται στα 3 αντίστοιχα μικρά ρυθμιστικά RNAs (sRNAs). Ρόλος των τριών αυτών sRNAs είναι να δεσμεύουν τις πρωτεΐνες RsmA και RsmE, με αποτέλεσμα να επιτρέπουν την αντιγραφή των γονιδίων του δευτερογενούς μεταβολισμού.

Λεπτομερείς αναλύσεις έχουν δείξει πως το GacA δεν αλληλεπιδρά απευθείας με τον υποκινητή των *hcnABC* γονιδίων (Blumer and Haas 2000; Blumer et al. 1999). Μια περιοχή, 11 περίπου νουκλεοτιδίων, που βρίσκεται κοντά στην περιοχή δέσμευσης του ριβοσώματος του *hcnA* γονιδίου φαίνεται πως παίζει καθοριστικό ρόλο στον έλεγχο από το GacA (Blumer et al. 1999). Η ίδια ακριβώς περιοχή εμπλέκεται και στην καταστολή από την RsmA πρωτεΐνη, παρεμποδίζοντας την δέσμευση των υπομονάδων 30S των ριβοσωμάτων στο RNA και υποδηλώνοντας έτσι ότι η RsmA μπορεί να αποτελεί καθοδικό στοιχείο του ρυθμιστικού καταρράκτη GacS/GacA.

Η RsmA είναι μια RNA-προσδεδόμενη πρωτεΐνη, που είναι συντηρημένη σε πολλά Gram (-) βακτήρια (Cui et al. 2001; Romeo 1998; Whittle et al. 1999). Μεταλλάγματα *rsmA* παρουσιάζουν αυξημένη μολυσματικότητα και παράγουν σε μεγάλες ποσότητες εξωκυτταρικά λυτικά ένζυμα. Υπερέκφραση της RsmA καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζονται από το GacS/GacA σύστημα, όπως το *hcnA* (Blumer et al. 1999).



ΕΙΚΟΝΑ 10: Σηματοδοτικό μονοπάτι του ρυθμιστικού συστήματος GacS/GacA στην *P. entomophila* (Larouge et al., 2007)

1.5 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΗΣ *DROSOPHILA MELANOGASTER* ΣΤΙΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ

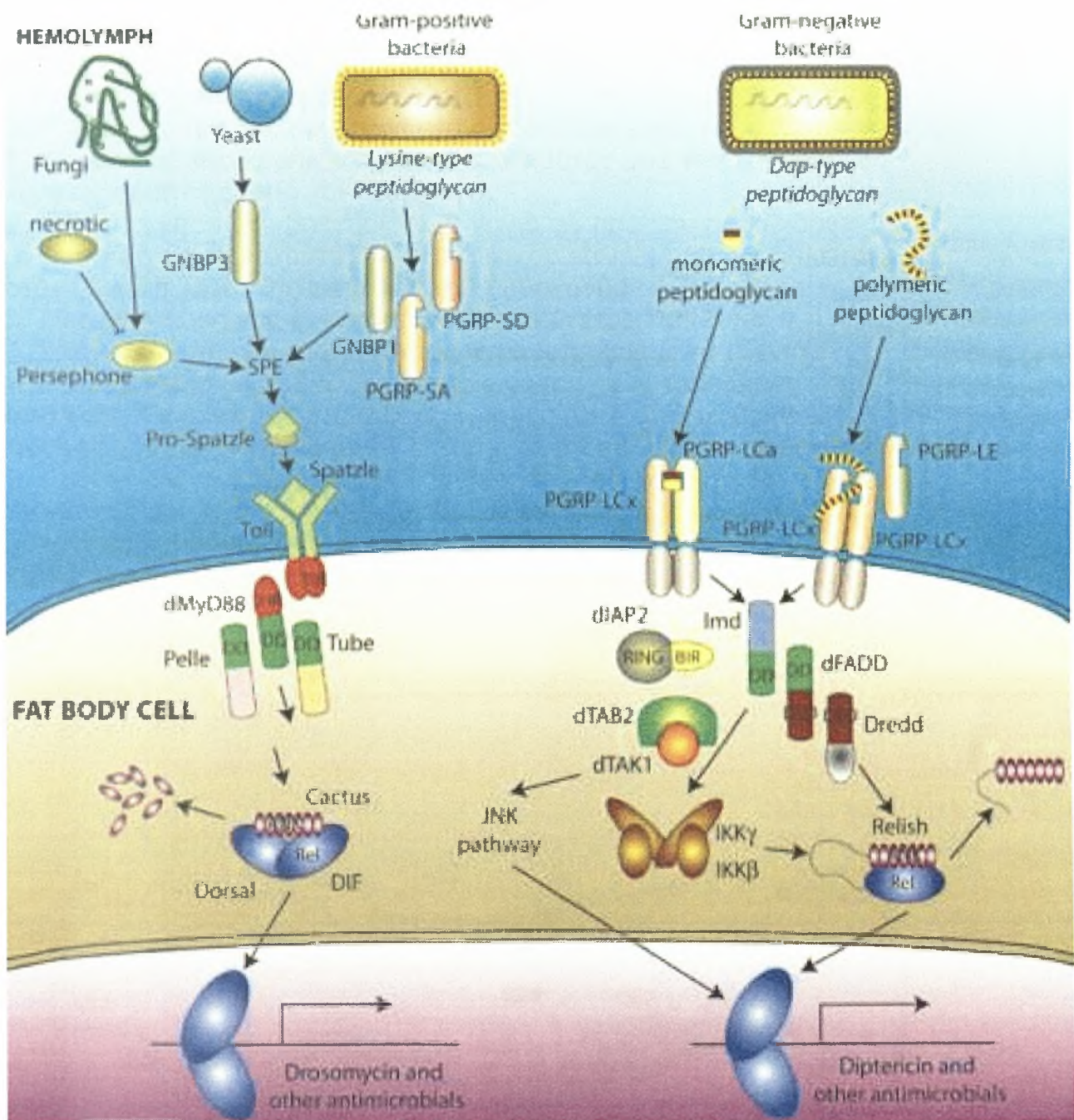
Η μύγα των φρούτων *Drosophila melanogaster* έχει πολλούς μηχανισμούς άμυνας, από τους οποίους κάποιοι είναι συντηρημένοι και σε ανώτερους οργανισμούς. Η *Drosophila melanogaster* παρουσιάζει μόνο φυσική ανοσία, δηλαδή διαθέτει μόνο έμφυτους μηχανισμούς άμυνας ενάντια στα παθογόνα. Η επίκτητη ανοσία, δηλαδή η ικανότητα παραγωγής αντισωμάτων μετά την μόλυνση από ένα παθογόνο, απουσιάζει από την *Drosophila*. Οι μηχανισμοί άμυνας περιλαμβάνουν φυσικούς φραγμούς, καθώς και την τοπική και συστηματική ανοσολογική απόκριση. Μια πρώτη κατηγορία μηχανισμών είναι τα επιθήλια του εντέρου και της τραχείας, που λειτουργούν και σαν φυσικά εμπόδια, αλλά παρουσιάζουν και τοπική ανοσοαπόκριση ενάντια στα παθογόνα με την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs) και δραστικών μορφών οξυγόνου. Μια δεύτερη κατηγορία αποτελούν τα εξειδικευμένα αιματοκύτταρα που συμμετέχουν στην φαγοκυττάρωση των παθογόνων στην αιμολέμφο. Τέλος, πολύ σημαντικό ρόλο στην ανοσοαπόκριση παίζει το λιπαρό σώμα, το οποίο συμμετέχει στην χυμική ανοσοαπόκριση και περιλαμβάνει την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων.

Από τους παραπάνω μηχανισμούς ανοσοαπόκρισης ο σημαντικότερος είναι η παραγωγή AMPs από το λιπαρό σώμα. Τα AMPs είναι μικρές, κατιονικές πρωτεΐνες στις οποίες περιλαμβάνονται η Διπερισίνη και η Αττασίνη (Imler and Bulet, 2005). Οι δύο αυτές πρωτεΐνες είναι δραστικές ενάντια σε Gram (-) βακτήρια και δρουν στο επίπεδο της μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, η Διπερισίνη εκφράζεται στο πρόσθιο μέρος του εντέρου και παρέχει έναν γρήγορο και αποτελεσματικό φραγμό, επιτρέποντας έτσι στη *Drosophila* να εξουδετερώνει ταχύτατα τα περισσότερα βακτήρια, μετά την κατάποσή τους (Liehl et al, 2006).

Μονοπάτια ρύθμισης

Η μαζική έκφραση των πεπτιδίων και πολυπεπτιδίων, που λαμβάνει χώρα μετά την μόλυνση της *Drosophila* από παθογόνα ρυθμίζεται στο επίπεδο της μεταγραφής. Η παραγωγή AMPs από το λιπαρό σώμα ρυθμίζεται από τα μονοπάτια Toll και Imd. Το μονοπάτι Toll ενεργοποιείται από Gram (+) βακτήρια και το Imd από Gram(-). Η αναγνώριση των Gram (+) βακτηρίων γίνεται από τις Lys-type πεπτιδογλυκάνες αυτών των βακτηρίων, οι οποίες προσδένονται στους υποδοχείς PGRP-SA και PGRP-SD των κυττάρων της *Drosophila*. Κατά αντιστοιχία, η αναγνώριση των Gram (-) γίνεται από την πρόσδεση των DAP-type πεπτιδογλυκανών από τους PGRP-LC υποδοχείς (Leulier et al, 2003).

Τα μονοπάτια Toll και Imd ενεργοποιούν εξειδικευμένους πυρηνικούς παράγοντες κΒ, οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν εξειδικευμένα προγράμματα μεταγραφής.



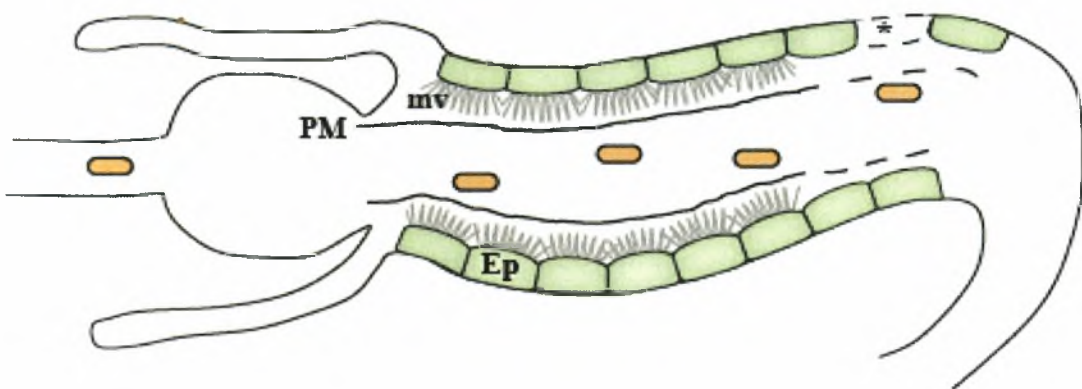
ΕΙΚΟΝΑ 11: Ρυθμιστικά μονοπάτια Toll και Imd στην *D. melanogaster* (Lemaitre and Hoffmann, 2007)

Αλληλεπίδραση *P. entomophila*- *D. melanogaster*

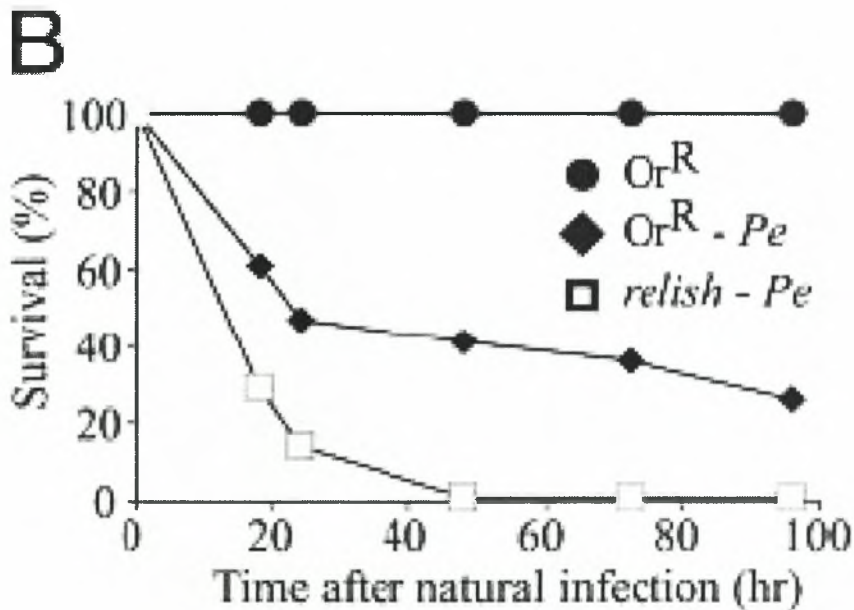
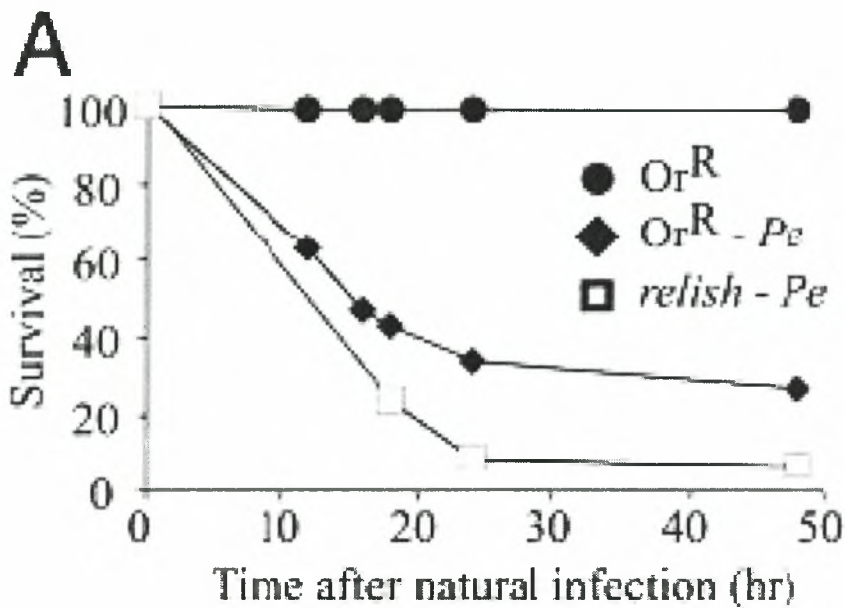
Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως η *P. entomophila* εμφανίζει μεγάλη παθογένεια στη *Drosophila*, τόσο στα ενήλικα άτομα όσο και στις προνύμφες. Συγκεκριμένα, μόλυνση από *P. entomophila* μετά από κατάποσή της επάγει θνησιμότητα στις προνύμφες μέσα στις πρώτες 24 ώρες σε ποσοστό πάνω από 70%, ενώ το υπόλοιπο 30% πεθαίνει στο στάδιο της νύμφης (Vodovar et al., 2005).

Η μόλυνση της *Drosophila* από την *P. entomophila* χωρίζεται σε 5 διακριτά στάδια, που αναφέρονται στη συνέχεια:

1. Πρόσληψη της *P. entomophila* δια στόματος από την *Drosophila* και κατάποσή της από τον οισοφάγο
2. Ενεργοποίηση στο βακτήριο των γονιδίων που του προσδίδουν ανθεκτικότητα σε καταστάσεις οξειδωτικού stress, που προκαλείται στον ξενιστή λόγω της εισβολής του παθογόνου
3. Μετανάστευση της *P. entomophila* στο έντερο του ξενιστή
4. Ενεργοποίηση της πρωτογενούς ανοσοαπόκρισης του ξενιστή με την έκκριση αντιμικροβιακών πεπτιδίων για την αντιμετώπιση της εισβολής. Έκκριση της μεταλλοπρωτεάσης AprA από το βακτήριο, ώστε να μπορέσει να διαφύγει από την ανοσοαπόκριση του ξενιστή.
5. Παθογένεια και θάνατος που προέρχεται από σημαντικές τροποποιήσεις της φυσιολογίας του μεσεντέρου. Οι τροποποιήσεις αυτές περιλαμβάνουν καταστροφή των μικρολαχνών και των κυττάρων, καθώς και αποδιοργάνωση της περιτροφικής μήτρας.



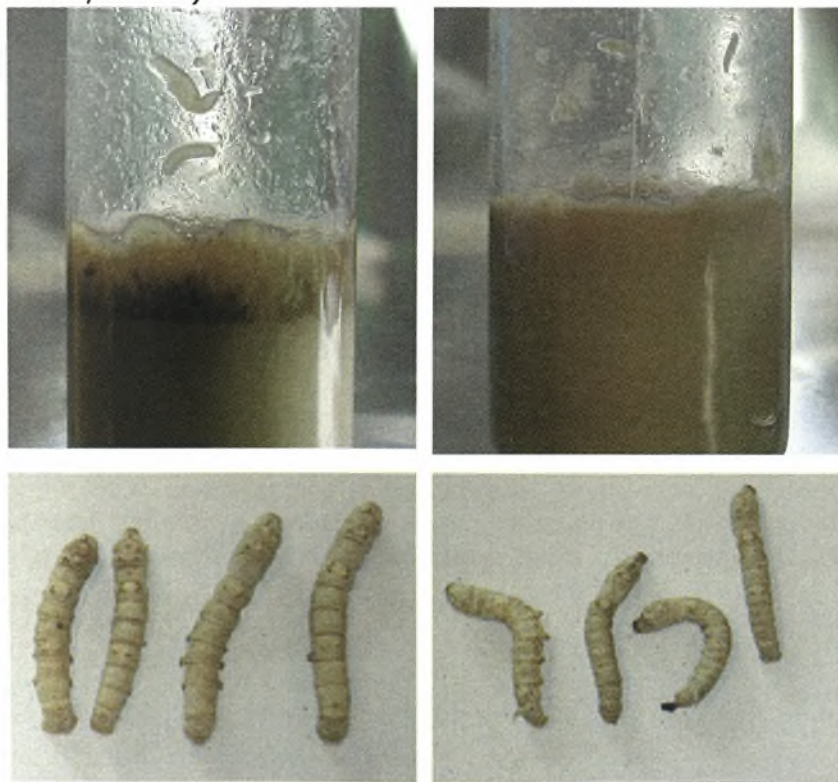
ΕΙΚΟΝΑ 12: Στάδια μόλυνσης της *D. melanogaster* από την *P. entomophila* (Vodovar et al., 2006)



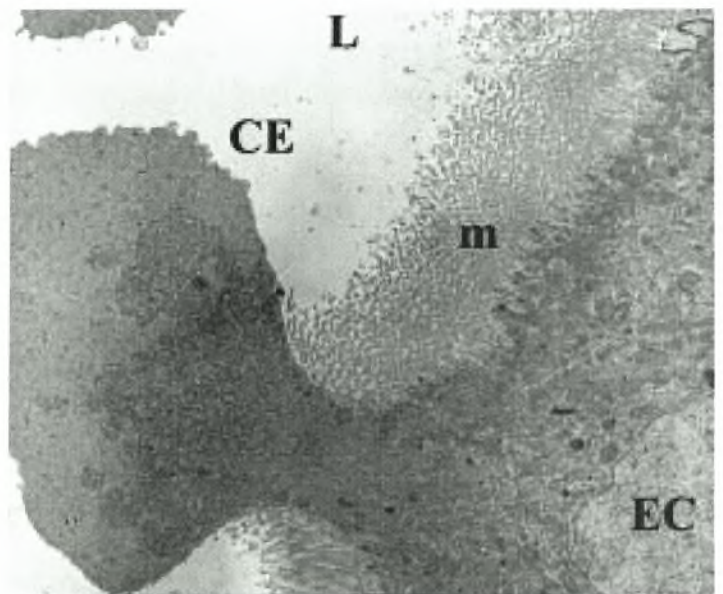
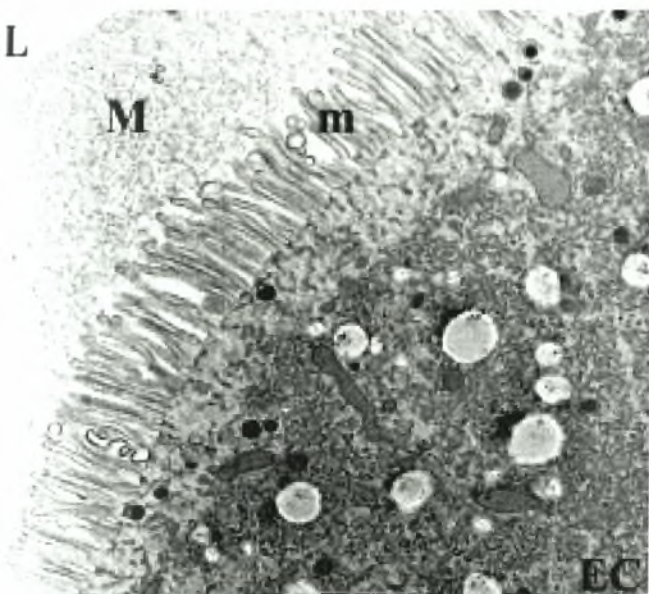
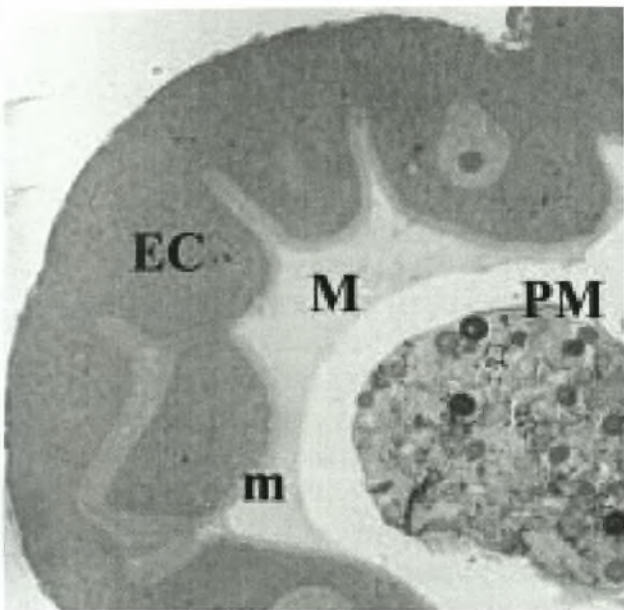
ΕΙΚΟΝΑ 13: Α) Μόλυνση προνυμφών της *D.melanogaster* με *P.entomophila*. Τα μολυσμένα στελέχη Oregon^R εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας σε σχέση με τα μη μολυσμένα. Β) Μόλυνση ενήλικων ατόμων της *D.melanogaster* με *P.entomophila*. Παρατηρούμε ότι και στα ενήλικα άτομα τα μολυσμένα στελέχη παρουσιάζουν μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας. (Vodovar et al.,2005)

Αποτελέσματα του υψηλού βαθμού παθογένειας που εμφανίζει η *P. entomophila* αποτελούν η διακοπή της πρόσληψης τροφής από τις προνύμφες, καθώς και το μικρότερο μέγεθος που παρατηρήθηκε στις μολυσμένες προνύμφες σε σχέση με τις μη μολυσμένες. Αρκετές ώρες μετά την μόλυνση εμφανίζεται μελανισμός στο έντερο των προνυμφών, απόδειξη ότι το έντερο καταστρέφεται. Ηλεκτρονικές αναλύσεις τομών του μεσεντέρου των μολυσμένων προνυμφών έδειξαν πως η μόλυνση από *P. entomophila* προκαλεί σημαντικές διαταραχές στο επιθήλιο του εντέρου. Τέτοιες διαταραχές αποτελούν η απώλεια της βλέννας, η εξωκυττάρωση του κυτταροπλάσματος και η καταστροφή των κυττάρων του επιθηλίου και των μικρολαχνών (Vodovar et al., 2005).

Για να ελεγχθεί η εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης *P. entomophila*/*Drosophila*, χρησιμοποιήθηκαν 28 στελέχη που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* και ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητά τους να μολύνουν την *Drosophila*. Από αυτά, μόνο 4 στελέχη εκτός της *P. entomophila* ήταν ικανά να επάγουν την έκφραση Διπτερισίνης (σε χαμηλά όμως επίπεδα), ενώ τα υπόλοιπα ήταν μη μολυσματικά. Ωστόσο κανένα από τα 28 στελέχη *Pseudomonas* δεν είχε την ικανότητα να σκοτώνει προνύμφες ή ενήλικα άτομα, υποδηλώνοντας πως η σχέση μεταξύ της *Drosophila* και της *P. entomophila* έχει ένα υψηλό βαθμό εξειδίκευσης (Vodovar et al., 2005).



ΕΙΚΟΝΑ 14: a,b) Διακοπή της πρόσληψης τροφής σε προνύμφες μετά την μόλυνση με *P. entomophila*. Αριστερά φαίνεται το control και δεξιά το μολυσμένο δείγμα, όπου η κατανάλωση τροφής έχει σταματήσει. (Vodovar et al., 2005) c,d) Διαφορά στο μέγεθος των προνυμφών *B. mori*. (Onya Orotu, προσωπική επικοινωνία)



ΕΙΚΟΝΑ 15: Επίδραση της *P. entomophila* στο επιθήλιο του εντέρου. Επάνω φαίνεται το επιθήλιο μιας μη μολυσμένης μύγας, που χρησιμοποιήθηκε σαν control. Στις κάτω εικόνες φαίνεται η απώλεια της βλέννας αριστερά και η εξωκυττάρωση του κυτταροπλάσματος δεξιά. (Vodovar et al., 2005)

1.6 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η συμβολή του υδροκυανίου, που παράγεται από την *P. entomophila*, στην παθογένεια του συγκεκριμένου στελέχους στην *Drosophila melanogaster*.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος άγριου τύπου, το οποίο είναι γνωστό πως μπορεί να παράγει υδροκυάνιο, καθώς και ένα μεταλλαγμένο στέλεχος $\Delta hcnB$. Στο μεταλλαγμένο αυτό στέλεχος το γονίδιο *hcnB* του οπερονίου *hcnABC* έχει διασπαστεί μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού από έναν πλασμιδιακό φορέα που έφερε επίσης το γονίδιο *hcnB*. Αυτό το στέλεχος έχει χάσει την ικανότητά του να παράγει υδροκυάνιο.

Για να μελετηθεί ο ρόλος του υδροκυανίου στην παθογένεια πραγματοποιήθηκαν βιολογικές, φαινοτυπικές και γενετικές αναλύσεις. Στόχος των αναλύσεων αυτών ήταν να εξακριβωθεί αν το υδροκυάνιο, που αποτελεί παράγοντα μολυσματικότητας σε άλλα είδη *Pseudomonas*, παίζει ρόλο στην εντομοπαθογένεια και σε ποιο βαθμό.

Τα ερωτήματα που έπρεπε να απαντηθούν βάσει αυτών των αναλύσεων ήταν τα εξής:

- 1) Έχει την ικανότητα το μετάλλαγμα $\Delta hcnB$ να προκαλεί θάνατο στη *Drosophila*, όπως ο άγριος τύπος *P. entomophila*?
- 2) Είναι τοξική η παραγωγή υδροκυανίου για την ίδια την *P. entomophila* ή για άλλα βακτήρια?
- 3) Επηρεάζει το υδροκυάνιο την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων-ανταγωνιστών της *P. entomophila*?

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Όλα τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία βρίσκονται κατηγοριοποιημένα στον Πίνακα 1. Το στέλεχος *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen) χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις μετασχηματισμού μέσω ηλεκτροδιάτρησης ως το βακτήριο-δέκτης για όλα τα πλασμίδια, ενώ το στέλεχος *Escherichia coli* S-17 χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αντιδράσεις σύζευξης με την *P. entomophila*.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
<i>Pseudomonas entomophila</i> (Pe)	Άγριος τύπος
$\Delta gacA$	Εξάλειψη του <i>gacA</i> γονιδίου της <i>Pe</i>
$\Delta hcnB$	Μετάλλαξη ένθεσης του <i>rseen5521</i> γονιδίου της <i>Pe</i> , ανθεκτικότητα σε γενταμυκίνη
$\Delta algR$	Μετάλλαξη ένθεσης του <i>algR</i> γονιδίου της <i>Pe</i>
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Εμπορικό στέλεχος (Invitrogen) για ηλεκτροδιάτρηση
<i>Escherichia coli</i> S17	Στέλεχος για σύζευξη
<i>Erwinia carotovora carotovora</i> 15	Gram αρνητικό
<i>Micrococcus luteus</i>	Gram θετικό

Για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Luria Bertani (LB). Στις περιπτώσεις όπου ήταν απαραίτητο, προσθέταμε στο LB Agar γάλα, σε τελική συγκέντρωση 1%. Το γάλα περιέχει πρωτεΐνες, οι οποίες αποικοδομούνται από τα στελέχη της *Pe*, που δεν έχουν χάσει την ενεργότητα πρωτεάσης. Τα στελέχη αυτά είναι η *Pe* αγρίου τύπου και το μετάλλαγμα $\Delta hcnB$. Για την παρασκευή του γαλακτος χρησιμοποιούμε αποβουτυρωμένο

γάλα, το οποίο αναμειγνύουμε με απιονισμένο νερό, έτσι ώστε η συγκέντρωση του γάλακτος να είναι 10%.

Χρησιμοποιήθηκε επίσης το θρεπτικό μέσο PIA (Pseudomonas Isolation Agar) στις περιπτώσεις όπου έπρεπε να γίνει η επιλογή των *Pe* στελεχών, που προέκυψαν μετά από σύζευξη.

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των καλλιέργειών προέρχονταν από ήδη υπάρχουσες αναπτυγμένες καλλιέργειες, από τις οποίες είχαν δημιουργηθεί stock γλυκερόλης, που φυλάσσονται στους -80°C. Οι καλλιέργειες της *P. entomophila* αναπτύχθηκαν στους 30°C ενώ της *Escherichia coli* στους 37°C. Τα αντιβιοτικά που προστέθηκαν στα θρεπτικά υποστρώματα, στις περιπτώσεις που η χρήση τους ήταν απαραίτητη, καθώς και οι συγκεντρώσεις τους φαίνονται στον Πίνακα 2.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ STOCK	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
<i>P. entomophila</i>	ΓΕΝΤΑΜΥΚΙΝΗ (SIGMA)	50mg/ml	25μg/ml
<i>P. entomophila</i>	ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ	15mg/ml	150μg/ml
<i>Escherichia coli</i>	G418 (SIGMA)	50mg/ml	25μg/ml
<i>Escherichia coli</i>	ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ	15mg/ml	15μg/ml

2.2 ΣΤΕΛΕΧΗ *Drosophila melanogaster*

Για την φυσική μόλυνση με βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήθηκε κυρίως το στέλεχος Oregon^R, που είναι ένας άγριος τύπος της *Drosophila melanogaster*. Χρησιμοποιήθηκε επίσης το στέλεχος Canton S, που είναι και αυτό άγριος τύπος, καθώς και το στέλεχος Relish. Η πρωτεΐνη Relish συμμετέχει στο μονοπάτι ανοσοαπόκρισης Imd. Το στέλεχος Relish είναι μετάλλαγμα στο οποίο το γονίδιο *relish* έχει απενεργοποιηθεί, με αποτέλεσμα το μονοπάτι Imd να είναι πλήρως απενεργοποιημένο.

2.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΔΙΑΤΡΗΣΗ

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση στην παρούσα εργασία ήταν *E. coli* S17 και μεταλλαγμένα στελέχη *PeΔhcnB*.

Τα βήματα της διαδικασίας φαίνονται παρακάτω:

1. Χρησιμοποιούμε κύτταρα από stock γλυκερόλης και ενοφθαλμίζουμε 10ml LB (προκαλλιέργεια). Επωάζουμε για 16 ώρες στην θερμοκρασία ανάπτυξης που απαιτεί το κάθε στέλεχος.
2. Με την προκαλλιέργεια ενοφθαλμίζουμε 490ml LB (1/50) και επωάζουμε για περίπου 3 ώρες, μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι μεταξύ 0.6-1.
3. Τοποθετούμε την καλλιέργεια σε δοχείο με πάγο και νερό και κρυώνουμε την καλλιέργεια για 15 λεπτά.
4. Μοιράζουμε την καλλιέργεια σε 2 αποστειρωμένα δοχεία και φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 3500rpm στους 4°C.
5. Αφαιρούμε το υπερκείμενο από το πρώτο δοχείο και προσθέτουμε 25ml παγωμένου νερού. Επαναδιαλύουμε πολύ καλά το ίζημα και το μεταφέρουμε σε ένα falcon. Αφαιρούμε το υπερκείμενο από το δεύτερο δοχείο και επαναδιαλύουμε πολύ καλά το ίζημα με το διάλυμα από το falcon.
6. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 3500rpm στους 4°C.
7. Προσθέτουμε ξανά 25ml παγωμένου νερού και φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 3500rpm στους 4°C.
8. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε σε 12,5ml 10% παγωμένης γλυκερόλης.
9. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στις 3500rpm στους 4°C.
10. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε σε 1ml 10% παγωμένης γλυκερόλης. Μεταφέρουμε το διάλυμα σε ένα παγωμένο erpendorf.
11. Φυγοκεντρούμε για 15 δευτερόλεπτα στις 15000rpm στους 4°C.
12. Αφαιρούμε με πιπέτα όλο το υπερκείμενο.
13. Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα σε 800μl 10% παγωμένης γλυκερόλης.
Προσθέτουμε επίσης 1ml παγωμένης καθαρής αιθανόλης και αναμιγνύουμε καλά.
14. Μοιράζουμε σε erpendorf από 50μl και τα διατηρούμε στους -80°C.

2.4 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ *PeΔhcnB*

Για να δημιουργήσουμε το μετάλλαγμα *PeΔhcnB* ή *PeIM5521* πρέπει να διασπάσουμε το γονίδιο *hcnB* (PSEEN5521) της ομάδας γονιδίων *hcnABC*, που κωδικοποιεί για την συνθάση του υδροκυανίου. (Vodovar et al., 2006). Η διάσπαση του γονιδίου θα γίνει με τη βοήθεια του πλασμιδιακού φορέα pINT χαρακτηριστικό του οποίου είναι πως δεν μπορεί να αντιγράφεται αυτόνομα στην *P. entomophila*, αλλά μόνο αν ενσωματωθεί μέσα στο βακτηριακό γονιδίωμα μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Ο φορέας pINT έχει μέγεθος περίπου 3kb και προσδίδει ανθεκτικότητα στην γενταμικίνη. Η διαδικασία της κατασκευής του μεταλλαγμένου στελέχους έγινε ως εξής:

A. Χρησιμοποιώντας stock γλυκερόλης από τους -80°C αναπτύξαμε σε LB agar στερεές καλλιέργειες του αγρίου τύπου *Pe*. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν στους 30°C.

B. Απομόνωση Βακτηριακού DNA

Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε τις αποικίες που αναπτύχθηκαν στις στερεές καλλιέργειες και κάναμε λύση των βακτηριακών κυττάρων σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

- Προσθέτουμε 20ml διαλύματος SDS-NaOH σε ένα erpendorf.
- Με τη χρήση οδοντογλυφίδας παίρνουμε μικρή ποσότητα κυττάρων από τις αποικίες της *Pe* και την τοποθετούμε μέσα στο διάλυμα SDS-NaOH, ανακινώντας καλά.
- Τοποθετούμε το erpendorf σε υδατόλουτρο για 15 λεπτά στους 95°C.
- Αφαιρούμε το erpendorf από το υδατόλουτρο και προσθέτουμε 180ml απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό.
- Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά στις 4000rpm.
- Διατήρηση στους -20 °C.

ΠΡΟΣΟΧΗ!! Μετά την φυγοκέντρηση δεν μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε άλλο erpendorf, για να αποφύγουμε ανάμειξη του βακτηριακού DNA με τις κατακρημνισμένες πρωτεΐνες.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το διάλυμα SDS-NaOH έχει την ιδιότητα να λύει τα βακτηριακά κύτταρα. Το SDS είναι ένας ιοντικός αποδιατακτικός παράγοντας, που διαλύει τα λιπιδικά συστατικά του κυτταρικού φακέλου και μετουσιώνει τις κυτταρικές πρωτεΐνες. Το NaOH κάνει το διάλυμα αλκαλικό.

Γ. Κλωνοποίηση γονιδίου

Για να κλωνοποιήσουμε το γονίδιο *hcnB* στον φορέα pINT, θα πρέπει πρώτα να ενισχύσουμε το γονίδιο με PCR. Για την ενίσχυση του γονιδίου χρησιμοποιήσαμε το γενωμικό DNA της *Pe* και δύο εκκινητές, που περιείχαν στις αλληλουχίες τους τις θέσεις αναγνώρισης για τα περιοριστικά ένζυμα XbaI και HindIII αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο IMPSEEN552101

(5'- AT**AAGCTT**CCCTGCTGGGTGGGCTGC-3'), ο οποίος περιέχει τη θέση αναγνώρισης για το ένζυμο HindIII και ο IMPSEEN552102

(5'- ATATT**TCTAGAT**CACTGGCTGAGCTGGGTGCG -3'), ο οποίος περιέχει τη θέση αναγνώρισης για το ένζυμο XbaI και ενίσχυσαν μια περιοχή 500bp του γονιδίου *hcnB*.

Για την συγκεκριμένη αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η High Fidelity (HiFi) πολυμεράση (Roche). Η συγκέντρωση της High Fidelity πολυμεράσης 3,5 unit/μl. Η συγκέντρωση stock του Buffer για την HiFi είναι 10x, ενώ η τελική του συγκέντρωση πρέπει να είναι 1x. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 100μl. Το πρωτόκολλο της αντίδρασης, καθώς και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται φαίνονται στους παρακάτω δύο πίνακες:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
HiFi Buffer (10x)	10μl
dNTPs (10mM)	2μl
DMSO	6μl
Primer IMPSEEN552101	1μl
Primer IMPSEEN552102	1μl
HiFi polymerase	0,5μl
DNA Template	1μl
ddH ₂ O	78,5μl
FINAL VOLUME	100μl

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ
94°C	5'
94°C	30''
50 °C	2'
72 °C	1'
72 °C	10'

Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε **22 κύκλους**, ενώ μετά το τελευταίο βήμα, η αντίδραση διατηρείται στους 4 °C.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η HiFi polymerase είναι μια «αργή», αλλά ακριβής πολυμεράση, η οποία δεν κάνει πολλά λάθη κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης. Γι' αυτό το λόγο η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 22 κύκλους, έτσι ώστε να μην της δοθεί ο χρόνος να κάνει λάθη.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το γονιδίωμα της *Pe* είναι πλούσιο σε GC νουκλεοτίδια. Η χρήση του DMSO βοηθά στην αποδιάταξη των κλώνων του DNA.

Δ. Καθαρισμός προϊόντος

Μετά την ενίσχυση του γονιδίου *hcnB*, ακολούθησε καθαρισμός του προϊόντος της PCR με το QIAPREP PCR PURIFICATION KIT (QIAGEN). Για τον καθαρισμό ακολουθούμε τις οδηγίες που παρέχονται από τον κατασκευαστή.

Ε. Ποσοτικοποίηση

Μετά τον καθαρισμό του δείγματος, ακολούθησε η ποσοτικοποίησή του. Για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα ND-1000 V3.5.2 και το φασματοφωτόμετρο ND-1000 της εταιρείας NanoDrop.

Η διαδικασία στηρίζεται στην μέτρηση της απορρόφησης μιας μικρής ποσότητας δείγματος (1,5μl) στα 260 nm. Ο λόγος της απορρόφησης στα 260 nm και στα 280 nm χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί η καθαρότητα του DNA του δείγματος. Αν ο λόγος είναι περίπου ~1,8 τότε το DNA θεωρείται αρκετά καθαρό. Αν ο λόγος είναι χαμηλότερος από 1,8, τότε υποδηλώνεται η ύπαρξη πρωτεϊνών ή άλλων επιμολύνσεων.

Το αποτέλεσμα για το ενισχυμένο κομμάτι του *hcnB* γονιδίου ήταν 18,3ng/μl.

ΣΤ. Αντίδραση πέψης

Το επόμενο βήμα ήταν η πέψη του PCR προϊόντος, αλλά και του πλασμιδίου ρINT με τα περιοριστικά ένζυμα HindIII και XbaI. Το ένζυμο HindIII (Biolabs Inc.) αναγνωρίζει την αλληλουχία A/AGCTT και η συγκέντρωσή του είναι 20units/μl. Η θερμοκρασία επώασής του είναι στους 37 °C και εμφανίζει τη μέγιστη ενεργότητα του στο buffer 2 της ίδιας εταιρείας.

Το ένζυμο XbaI (Biolabs Inc.) αναγνωρίζει την αλληλουχία T/CTAGA και η συγκέντρωσή του είναι 20units/μl. Η θερμοκρασία επώασής του είναι στους 37 °C και εμφανίζει τη μέγιστη ενεργότητά του στα buffer 2 και 4 της ίδιας εταιρείας.

Για να πραγματοποιήσουμε την διπλή πέψη θα χρησιμοποιήσουμε το buffer 2 της Biolabs Inc. Το buffer 2 είναι 10x συμπυκνωμένο και πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε τελική συγκέντρωση 1x.

Από το πρωτόκολλο της εταιρείας γνωρίζουμε πως πρέπει να χρησιμοποιήσουμε 5 units ενζύμου για 1μg DNA.

Η συγκέντρωση του pINT είναι 71,3ng/μl και του PCR προϊόντος είναι 18,3ng/μl, όπως αναφέραμε και παραπάνω.

Η συγκέντρωση stock του BSA (Biolabs Inc.) είναι 10mg/ml και πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε τελική συγκέντρωση 10x.

Ο τελικός όγκος της διπλής πέψης για τον pINT είναι 60μl, ενώ για το PCR προϊόν είναι 50μl.

- Τα πρωτόκολλα των διπλών πέψεων του πλασμιδίου και του PCR προϊόντος φαίνονται στους παρακάτω πίνακες:

ΠΕΨΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ pINT

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
Buffer 2	6μl
BSA(100x)	6μl
HindIII (20U/μl)	0,5μl
XbaI (20U/μl)	0,5μl
Πλασμίδιο pINT	28,5μl
ddH ₂ O	15,7μl
FINAL VOLUME	60μl

ΠΕΨΗ ΤΟΥ *hcnB* PCR ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
Buffer 2	5μl
BSA(100x)	0,5μl
HindIII (20U/μl)	0,15μl
XbaI (20U/μl)	0,15μl
<i>hcnB</i> PCR ΠΡΟΪΟΝ	28,5μl
ddH ₂ O	18,5μl
FINAL VOLUME	50μl

ΠΡΟΣΟΧΗ!! Μετά την προσθήκη όλων των αντιδραστηρίων, πρέπει να γίνει καλό vortex των δειγμάτων και spin down για μερικά δευτερόλεπτα.

- Τα δείγματα επωάζονται για 2 ώρες στους 37 °C.
- Μετά το πέρας των 2 ωρών προσθέτουμε 0,5μl φωσφατάση CIP (Biolabs Inc.) **ΜΟΝΟ** στη διπλή πέψη του πλασμιδίου. Η φωσφατάση θα αφαιρέσει τις ομάδες -P από τις άκρες του πλασμιδίου. Με αυτή την αντίδραση αποφωσφορυλίωσης διασφαλίζουμε ότι το πλασμίδιο δεν θα ξαναγίνει κυκλικό. Μετά την προσθήκη της φωσφατάσης αφήνουμε το δείγμα για 1 ώρα στους 37 °C

και τελικά κάνουμε μια τελευταία επώαση του δείγματος στους 70 °C για 10 λεπτά για να απενεργοποιήσουμε τα ένζυμα.

- Την επώαση των 10 λεπτών στους 70 °C την εφαρμόζουμε και για τη διπλή πέψη του *hcnB* PCR προϊόντος, μετά το πέρας των 2 ωρών.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το BSA (bovine serum albumin) ενισχύει την ενεργότητα των ενζύμων. Ουσιαστικά, η προσθήκη αυτής της πρωτεΐνης σταθεροποιεί τα ένζυμα και εξισορροπεί τα όποια αρνητικά αποτελέσματα, που προέρχονται από αλληλεπιδράσεις των ενζύμων με στερεές επιφάνειες ή με την επιφάνεια μεταξύ αέρα και υγρού.

Z. Μετά τις διπλές πέψεις, ακολούθησε καθαρισμός των δειγμάτων με το QIAPREP PCR PURIFICATION KIT (QIAGEN) και ποσοτικοποίησή τους. Από την ποσοτικοποίηση προέκυψε συγκέντρωση DNA 6,3 ng/μl για το *hcnB* PCR προϊόν και 7,6 ng/μl για το πλασμίδιο.

H. Αντίδραση Δεσμώσης

Το επόμενο βήμα ήταν η σύνδεση (ligation) του κομμένου πλασμιδίου pINT και του κομμένου *hcnB* προϊόντος. Για το ligation χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA λιγάση (INVITROGEN). Η T4 DNA λιγάση καταλύει την ένωση των δύο κλώνων του DNA μεταξύ της 5-φωσφορικής και της 3-υδροξυλικής ομάδας των άκρων του ενθέματος και του φορέα. Έχει ενεργότητα 100 units και συγκέντρωση stock 1unit/μl.

Ο λόγος του ενθέματος προς τον φορέα πρέπει να είναι για την συγκεκριμένη αντίδραση 3:1. Για να υπολογίσουμε την ποσότητα του ενθέματος που πρέπει να χρησιμοποιήσουμε, εφαρμόζουμε την παρακάτω εξίσωση:

$$\{\text{ng φορέα} \times \text{μέγεθος ενθέματος (kb)}\} / \text{μέγεθος φορέα(kb)} \times \text{λόγος ενθέματος/φορέα} = \text{ng ενθέματος}$$

Σε αυτή την αντίδραση θα χρησιμοποιήσουμε 100ng του πλασμιδιακού φορέα pINT, ο οποίος έχει μέγεθος περίπου 3kb. Άρα θα χρησιμοποιήσουμε περίπου 139,5ng ενθέματος. Το buffer της αντίδρασης είναι 5x συμπυκνωμένο και πρέπει να αραιωθεί ώστε να είναι 1x.

Το πρωτόκολλο της αντίδρασης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
Ligase buffer (5x)	8,95 μl
<i>hcnB</i> ένθεμα	22,1 μl
pINT φορέας	13,2 μl
T4 DNA Ligase	0,5 μl
FINAL VOLUME	44,75 μl

- Χρησιμοποιούμε επίσης autoligation control , το οποίο περιέχει όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια, **ΕΚΤΟΣ** από το ένθεμα.
- Επωάζουμε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά το τέλος της επώασης, κάνουμε μια αντίδραση πέψης για να επιβεβαιώσουμε την αντίδραση δεσμάσης. Χρησιμοποιούμε το ζεύγος ενζύμων BamHI-HindIII, αντί του ζεύγους XbaI-HindIII, που χρησιμοποιήσαμε παραπάνω. Η αλλαγή αυτή γίνεται γιατί μετά την αντίδραση δεσμάσης κάποιες βάσεις του DNA μεθυλιώνονται, με αποτέλεσμα το XbaI να μην αναγνωρίζει τις περιοριστικές του θέσεις. Το BamHI αναγνωρίζει την αλληλουχία G/GATCC. Στη συγκεκριμένη πέψη χρησιμοποιήσαμε 5μl δείγματος σε τελικό όγκο 10μl.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
Buffer 2	1 μl
BSA(100x)	1 μl
HindIII (20U/μl)	0,5 μl
BamHI (20U/μl)	0,5 μl
pINT- <i>hcnB</i>	5 μl
ddH2O	2 μl
FINAL VOLUME	10 μl

Θ. Μετασχηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

Αφού επιβεβαιώσαμε ότι το ένθεμα βρίσκεται πράγματι μέσα στον φορέα pINT, προχωρήσαμε στον μετασχηματισμό κυττάρων *E.coli* S17 μέσω ηλεκτροδιάτρησης.

- Πριν την έναρξη της διαδικασίας τοποθετούμε τις κυψελίδες της ηλεκτροδιάτρησης στους -20°C για 10 λεπτά.
- Αφήνουμε τα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα να ξεπαγώσουν μέσα σε πάγο.

- Αραιώνουμε το δείγμα μας, χρησιμοποιώντας 2 μl από το construct pINT- *hcnB* και προσθέτοντας σε αυτά 5μl ddH₂O.
- Προσθέτουμε τα 7μl του δείγματος στα 50μl των δεκτικών κυττάρων *E.coli* S17 (χωρίς ανάμειξη). Παίρνουμε όλη την ποσότητα και την τοποθετούμε στην κυψελίδα, την οποία έχουμε φροντίσει να καθαρίσουμε από την υγρασία. Χρησιμοποιούμε επίσης και ένα αρνητικό control, το οποίο περιέχει μόνο βακτηριακά κύτταρα!
- Κάνουμε την ηλεκτροδιάτρηση στα 1800V.
- Αμέσως μετά την ηλεκτροδιάτρηση, προσθέτουμε 1ml φρέσκο LB μέσα στην κυψελίδα. Το βήμα αυτό πρέπει να γίνει πολύ γρήγορα, γιατί σε αυτό το σημείο χάνονται πολλά βακτηριακά κύτταρα, λόγω του shock στο οποίο τα υποβάλλουμε.
- Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε ένα eppendorf και τα επωάζουμε για 1 ώρα στους 37 °C (σε επωαστήρα χωρίς ανακίνηση).
- Μετά την επώαση, επιστρώνουμε 20μl και 200μl από τα μετασχηματισμένα κύτταρα σε τρυβλία Petri που περιέχουν στερεό θρεπτικό μέσο. Το στερεό θρεπτικό μέσο αποτελείται από LB agar στο οποίο έχουμε προσθέσει το αντιβιοτικό G418.
- Επωάζουμε τις καλλιέργειες στους 37 °C.

I. Σύζευξη βακτηριακών στελεχών

Ένα από τα βασικότερα βήματα στη διαδικασία διάσπασης ενός γονιδίου με ομόλογο ανασυνδυασμό είναι το στάδιο της σύζευξης των δύο διαφορετικών βακτηριακών στελεχών. Η σύζευξη είναι ένας μηχανισμός οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων. Κατά τη σύζευξη, το στέλεχος-δότης σχηματίζει μια «γέφυρα» με το στέλεχος-δέκτη, μέσω της οποίας γίνεται η μεταφορά του πλασμιδίου.

Στην προκειμένη περίπτωση η σύζευξη θα γίνει μεταξύ του αγρίου τύπου της *Pe* (δέκτης) και του μετασχηματισμένου με pINT- *hcnB E.coli* S17(δότης).

Για τη σύζευξη χρησιμοποιήσαμε LB agar, χωρίς να προσθέσουμε αντιβιοτικό.

- Από μια στερεή καλλιέργεια *Pe* παίρνουμε μια αποικία και επιστρώνουμε σε ένα τρυβλίο Petri, δημιουργώντας μερικές πυκνές οριζόντιες ραβδώσεις στο 1/2 του τρυβλίου.
- Στη συνέχεια παίρνουμε μια αποικία από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* S17 και δημιουργούμε ραβδώσεις κάθετα σε αυτές που είχαμε δημιουργήσει με την *Pe*, περιστρέφοντας το τρυβλίο κατά 90°. Χρησιμοποιούμε

συνολικά 3 αποικίες *E.coli* S17, δημιουργώντας ραβδώσεις πάνω σε αυτές της *Pe*.

ΠΡΟΣΟΧΗ!! Οι ραβδώσεις των 3 αποικιών *E.coli* S17 δεν πρέπει να αλληλεπικαλύπτονται μεταξύ τους!

Σαν αρνητικό control χρησιμοποιούμε μόνο αγρίου τύπου *Pe*.

- Επωάζουμε την καλλιέργεια στους 30°C για 24 ώρες.
- Την επόμενη μέρα συλλέγουμε όλα τα βακτήρια από το τρυβλίο με μια οδοντογλυφίδα και τα επαναδιαλύουμε σε 500μl φρέσκο LB. Από αυτά τα 500μl, επιστρώνουμε 50 μl και 200 μl σε τρυβλία με PIA (Pseudomonas Isolation Agar) και Γενταμικίνη.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Με το θρεπτικό μέσο PIA θα έχουμε ανάπτυξη μόνο των κυττάρων *Pe*, ενώ με το αντιβιοτικό θα καταφέρουμε να κάνουμε την επιλογή μόνο των κυττάρων που φέρουν ενσωματωμένο τον φορέα.

- Επωάζουμε τις καλλιέργειες στους 30°C για 24 ώρες.

ΙΑ. Επιβεβαίωση Μεταλλάνυματος

Το τελικό βήμα της διαδικασίας είναι ο έλεγχος των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία με PIA/Γενταμικίνη. Ο έλεγχος των αποικιών έγινε με goTaq PCR. Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήσαμε ήταν ο IMPSEEN552101, ο οποίος είναι ειδικός για το *hcnB* γονίδιο και ο spEXG202, ο οποίος είναι ειδικός για τον φορέα pINT. Η αλληλουχία του spEXG202 είναι 5' -TCATTCTGCTAACCAAGG-3'.

Η goTaq πολυμεράση (PROMEGA) έχει συγκέντρωση stock 5 units/μl. Για την αντίδραση χρησιμοποιούμε το Green goTaq Buffer, που είναι συμπυκνωμένο 5x, σε τελική συγκέντρωση 1x.

Το πρωτόκολλο, καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στους παρακάτω πίνακες:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
goTaq Buffer (5x)	4μl
dNTPs	0,4 μl
DMSO	1,5 μl
IMPSEEN552101	0,2 μl
spEXG202	0,2 μl
GoTaq polymerase	0,2 μl
ddH ₂ O	13,5 μl
FINAL VOLUME	20μl

- Μετά την προσθήκη του mix στα PCR tubes, παίρνουμε με μια οδοντογλυφίδα μια μικρή ποσότητα κυττάρων και τα τοποθετούμε μέσα στο mix, ανακινώντας καλά για μερικά δευτερόλεπτα.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ
94°C	5'
94°C	30''
50 °C	1'
72 °C	1'
72 °C	10'

- Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε **25 κύκλους**, ενώ μετά το τελευταίο βήμα, διατηρείται στους 4 °C.

2.5 ΜΕΤΡΗΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ HCN ΣΤΟ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑ

Για να προσδιοριστεί ότι το μεταλλαγμένο στέλεχος *PeΔhcnB* όντως δεν παράγει υδροκυάνιο, χρησιμοποιήθηκε το Merckoquant kit (Merck).

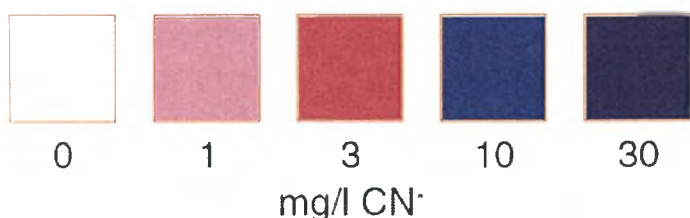
Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για τη μέτρηση μόνο ελεύθερων ιόντων υδροκυανίου (CN⁻). Τα ιόντα υδροκυανίου CN⁻ αντιδρούν με ένα χλωριούχο παράγοντα για να σχηματίσουν κυανιούχο χλωρίδιο, το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με 1,3-διμεθυλοβαρβιτουρικό οξύ, παρουσία πυριδίνης, για να σχηματίσει μια ιώδη χρωστική (αντίδραση του Koepig). Με αυτή τη μέθοδο η συγκέντρωση του υδροκυανίου μετράται ημιποσοτικά, μέσω σύγκρισης του χρώματος που εμφανίζεται στις ταινίες του kit με μια χρωματική κλίμακα.

Η διαδικασία μέτρησης του υδροκυανίου έγινε ακολουθώντας τα βήματα που φαίνονται παρακάτω:

1. Χρησιμοποιώντας stock γλυκερόλης από τους -80°C αναπτύξαμε σε LB agar στερεές καλλιέργειες των στελεχών *P. entomophila (Pe)*, *PeΔhcnB*, *PeΔgac*, *PeΔAlgR* και *Erwinia carotovora carotovora 15 (Ecc15)*. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν για 24 ώρες στους 30°C.
2. Μετά το πέρας των 24 ωρών, χρησιμοποιήσαμε 12,5ml LB broth σε falcons των 50ml και τα ενοφθαλμίσαμε με μια αποικία από την κάθε στερεή καλλιέργεια, δημιουργώντας έτσι τις αντίστοιχες υγρές καλλιέργειες των παραπάνω στελεχών. Οι υγρές αυτές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν για 8 ώρες στους 30°C.

3. Μετά τις 8 ώρες χρησιμοποιήσαμε φλάσκες των 1000ml στις οποίες βάλαμε 200ml LB broth και τις ενοφθαλμίσαμε με τις υγρές καλλιέργειες των 12,5ml. Στη συνέχεια αφήσαμε τις υγρές αυτές καλλιέργειες να αναπτυχθούν για 24 ώρες.
4. Φυγοκεντρήσαμε τις καλλιέργειες για 20 λεπτά στις 4000rpm και μεταφέραμε το υπερκείμενο σε καινούργια falcons.
 - Αρχικά κάναμε μια αραιώση 1:10 σε τελικό όγκο 10ml για να μετρήσουμε την οπτική πυκνότητα στα 600nm (OD600).
 - Το pH των δειγμάτων έπρεπε να είναι μεταξύ 6 και 7. Χρησιμοποιώντας το ηλεκτρόδιο μέτρησης ιόντων προσδιορίσαμε το pH των δειγμάτων και όπου ήταν απαραίτητο προσθέσαμε 3-4 σταγόνες HCl 1M για να το μειώσουμε κάτω από το 7.
 - Πριν από την έναρξη της διαδικασίας πλένουμε πολύ καλά το ειδικό φιαλίδιο με απιονισμένο νερό.
 - Προσθέτουμε 5ml από το πρώτο δείγμα στο φιαλίδιο και ανακινούμε καλά.
 - Αδειάζουμε τα πρώτα 5ml και προσθέτουμε άλλα 5ml από το ίδιο δείγμα. Με τον ειδικό δοσομετρητή προσθέτουμε μια δόση από το αντιδραστήριο CN-1 και ανακατεύουμε πολύ καλά, μέχρι να διαλυθεί πλήρως.
 - Στη συνέχεια προσθέτουμε 5 σταγόνες από το αντιδραστήριο CN-2 και ανακινούμε γρήγορα.
 - Βυθίζουμε αμέσως την ειδική ταινία μέσα στο δείγμα και την αφήνουμε για 30 δευτερόλεπτα ακριβώς.
 - Αφαιρούμε την ταινία, την στεγνώνουμε πάνω σε απορροφητικό χαρτί και μέσα σε 10 δευτερόλεπτα προσδιορίζουμε σε ποιο από τα πεδία της χρωματικής κλίμακας ταιριάζει καλύτερα το χρωματικό αποτέλεσμα του δείγματος.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ 2 ΦΟΡΕΣ.



ΕΙΚΟΝΑ 16: Χρωματική κλίμακα του Cyanide Test, σύμφωνα με την οποία εκτιμάται ημιοσοτικά η ύπαρξη ιόντων CN⁻ σε ένα δείγμα.

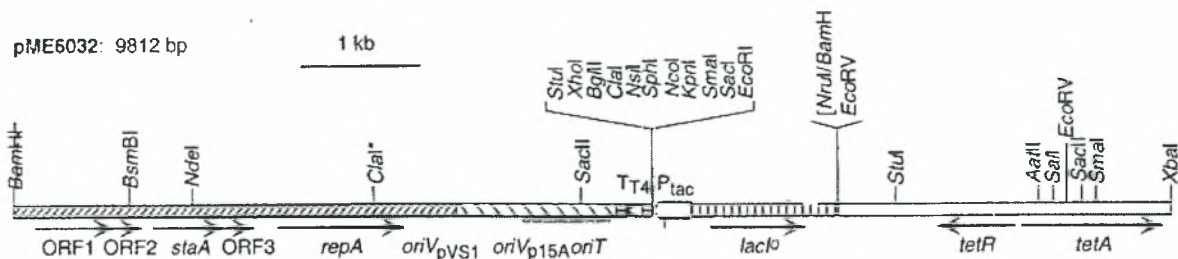
2.6 ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η συμπληρωματικότητα είναι μια δοκιμασία που χρησιμοποιείται για να εξακριβωθεί αν μπορεί να επανέλθει ο αρχικός φαινότυπος ενός μεταλλαγμένου βακτηριακού στελέχους, ο οποίος έχει χαθεί μέσω στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης. Αν επανέλθει ο φαινότυπος του άγριου τύπου, τότε θα ξέρουμε πως η μετάλλαξη έγινε στον σωστό γονιδιακό τόπο, ενώ θα μπορέσουμε επίσης να βγάλουμε συμπεράσματα για την πρωτεΐνη που κωδικοποιεί ο συγκεκριμένος γονιδιακός τόπος. Η συμπληρωματικότητα χρησιμοποιείται μόνο για μεταλλάξεις γονιδίων, που κωδικεύουν πρωτεΐνες οι οποίες είναι δυνατόν να διαχυθούν στο κυτταρόπλασμα. Δεν γίνεται να συμπληρωθούν μεταλλάξεις που βρίσκονται σε ρυθμιστικές θέσεις (π.χ. υποκινητές).

Στην παρούσα εργασία η συμπλήρωση του φαινοτύπου εφαρμόζεται για το μετάλλαγμα *PeΔhcnB*, τη δημιουργία του οποίου περιγράψαμε πιο πάνω.

Τα βήματα των δύο διαδικασιών είναι σε μεγάλο βαθμό ίδια. Στη συνέχεια αναφέρουμε την πορεία της διαδικασίας συνοπτικά, επισημαίνοντας όπου χρειάζεται τις διαφορές:

- 1) Ενίσχυση του γονιδίου *hcnB* με High Fidelity PCR από γενωμικό DNA *Pe*. Οι εκκινητές περιείχαν στις αλληλουχίες τους τις θέσεις αναγνώρισης για τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και KpnI. Πιο συγκεκριμένα, οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ο IMPSEEN5521c1 (5' -ATAT**GAATTC**GGAGACCGAGGTCAATCG-3'), ο οποίος περιέχει τη θέση αναγνώρισης για το ένζυμο EcoRI και ο IMPSEEN5521c2 (5' - AT**GGTACC**GATGATGATGTCGTAATG-3'), ο οποίος περιέχει τη θέση αναγνώρισης για το ένζυμο KpnI. Εφαρμόστηκε το ίδιο πρωτόκολλο για την High Fidelity PCR.
- 2) Ακολούθησε καθαρισμός του PCR προϊόντος και ποσοτικοποίησή του, από την οποία προέκυψε πως η ποσότητα του DNA ήταν 28,6 ng/μl.
- 3) Για την κλωνοποίηση του γονιδίου αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pME6032. Ο pME6032 έχει μέγεθος 9kb και προσδίδει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη. Ο pME6032 προέρχεται από την εισαγωγή του τμήματος pJF118EH στον φορέα pME6031.
Η ποσότητα DNA του pME6032 ήταν 17,9 ng/μl. Οι διπλές πέψεις έγιναν με τα ένζυμα EcoRI και KpnI (Roche), τα οποία εμφανίζουν τη μέγιστη ενεργότητά τους στο buffer 1.



NruI-EcoRI fragment of pJF118EH into [*BamHI*]-*EcoRI* pME6031

ΕΙΚΟΝΑ 17: Ο πλασμιδιακός χάρτης του pME6032 με τις θέσεις περιορισμού του. (Heeb et al., 2002)

Το πρωτόκολλο πέψης για τον φορέα pME6032 είναι υπολογισμένο για 1μg DNA και τελικό όγκο 65μl :

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
Buffer 1	6,5μl
BSA(100x)	0,65μl
EcoRI (20U/μl)	0,27μl
KpnI (20U/μl)	0,5μl
pME6032	55,8μl
ddH ₂ O	1,28μl
FINAL VOLUME	65μl

- Το πρωτόκολλο πέψης του ενθέματος διατηρείται όπως στην παράγραφο **2.4**.

4) Μετά τον καθαρισμό και την ποσοτικοποίηση των πέψεων είχαμε 3,2 ng/μl για τον pME6032 και 19,7ng/μl για το ένθεμα.

5) Επειδή η περιεκτικότητα του pME6032 ήταν αρκετά χαμηλή, υπολογίσαμε το πρωτόκολλο της αντίδρασης δεσμάσης για 50ng φορέα και τελικό όγκο αντίδρασης 25μl.

Το πρωτόκολλο της αντίδρασης φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ
Ligase buffer (5x)	5 μl
hcnB ένθεμα	0,5 μl
pME6032 φορέας	15,625 μl
T4 DNA Ligase	0,5 μl
ddH ₂ O	3,375 μl
FINAL VOLUME	25 μl

- Χρησιμοποιούμε επίσης αρνητικό control, το οποίο περιέχει όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια, **ΕΚΤΟΣ** από το ένθεμα.

6) Το επόμενο βήμα είναι ο μετασχηματισμός κυττάρων *E.coli* DH10B (Invitrogen) με τον μετασχηματισμένο φορέα pME6032-*hcnB*. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο για να πάρουμε το μετασχηματισμένο πλασμίδιο σε πολλά αντίγραφα, μετά την ανάπτυξη των αποικιών. ΠΑΡΑΛΛΗΛΑ, μετασχηματίσαμε και κύτταρα *E.coli* S17, για να τα χρησιμοποιήσουμε αργότερα για την σύζευξη.

Ακολουθούμε το πρωτόκολλο της ηλεκτροδιάτρησης όπως περιγράφηκε στην παράγραφο **2.4**, αλλά μετά την επώαση της μίας ώρας, επιστρώνουμε 5μl και 100μl καλλιέργειας σε τρυβλία με LB agar και τετρακυκλίνη.

7) Για να ελέγξουμε τις αποικίες που προέκυψαν από τον μετασχηματισμό των κυττάρων, εφαρμόζουμε goTaq PCR σε 10 από αυτές. Οι εκκινήτες που χρησιμοποιούμε είναι οι IMPSEEN5521c1 και IMPSEEN5521c2. Ως θετικό control χρησιμοποιούμε μια αποικία αγρίου τύπου *Pe* και ως αρνητικό control PCR MIX, χωρίς DNA.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Πριν την προσθήκη της αποικίας στο PCR MIX, ενοφθαλμίσαμε με την ίδια αποικία 3ml LB, για την ανάπτυξη υγρών καλλιεργειών.

8) Χρησιμοποιήσαμε τις 3 θετικές αποικίες για να κάνουμε απομόνωση πλασμιδίου. Η απομόνωση του πλασμιδίου έγινε με το kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Για την απομόνωση ακολουθούμε τις οδηγίες του κατασκευαστή.

9) Μετά την απομόνωση των πλασμιδίων από τα 3 δείγματα, ακολούθησε ποσοτικοποίησή τους από την οποία πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα.

ΔΕΙΓΜΑ 1	19,4 ng/μl
ΔΕΙΓΜΑ 2	19,6 ng/μl
ΔΕΙΓΜΑ 3	27,5 ng/μl

10) Τα απομονωμένα πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν για αλληλούχηση. Με την αλληλούχηση μπορέσαμε να επιβεβαιώσουμε πως μέσα στον φορέα βρίσκεται όλη η αλληλουχία που κλωνοποιήσαμε.

Το ένθεμα έχει αρκετά μεγάλο μέγεθος. Για να μπορέσουμε να αλληλουχήσουμε ολόκληρη την αλληλουχία, προσθέτουμε μόνο έναν εκκινητή κάθε φορά στο mix. Έτσι στο τέλος θα έχουμε ενισχύσει ολόκληρη την αλληλουχία, έχοντας ξεκινήσει από τα δύο άκρα των εκκινητών.

Το πρωτόκολλο αλληλούχησης είναι το παρακάτω:

10ng DNA για κάθε kb μετασχηματισμένου φορέα
Εκκινητής σε τελική συγκέντρωση 2μM
Big Dye Terminator 2,5μl
ddH ₂ O

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης πρέπει να είναι 10μl.

- Στην παρούσα εργασία το μέγεθος του φορέα με το ένθεμα είναι περίπου 10 kb. Άρα σύμφωνα με το πρωτόκολλο θα χρησιμοποιήσουμε 100ng. Υπολογίζουμε την ποσότητα που πρέπει να προσθέσουμε, σύμφωνα με το αποτέλεσμα της ποσοτικοποίησης για κάθε δείγμα.
- Η συγκέντρωση stock των εκκινητών είναι 100μM. Κάνουμε μια αραιώση 1:50 για να πετύχουμε τελική συγκέντρωση 2μM. Για την αραιώση χρησιμοποιούμε ddH₂O.
- Τέλος, υπολογίζουμε την ποσότητα του ddH₂O, που πρέπει να προσθέσουμε, έτσι ώστε να έχουμε τελικό όγκο 10μl.

11) Το τελικό κομμάτι της διαδικασίας συμπληρωματικότητας ήταν η σύζευξη του μεταλλαγμένου στελέχους *PeΔhcnB* και των μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* S17. Για τη σύζευξη χρησιμοποιήσαμε LB agar, χωρίς να προσθέσουμε αντιβιοτικό.

- Ακολουθούμε το πρωτόκολλο σύζευξης που περιγράψαμε στην παράγραφο **2.4**
- Την επόμενη μέρα συλλέγουμε όλα τα βακτήρια από το τρυβλίο με μια οδοντογλυφίδα και τα επαναδιαλύουμε σε 500μl φρέσκο LB. Από αυτά τα 500μl, επιστρώνουμε 50 μl και 200 μl σε τρυβλία με PIA (*Pseudomonas* Isolation Agar) και τετρακυκλίνη.
- Επωάζουμε τις καλλιέργειες στους 30 °C για 24 ώρες.

12) Απομονώνουμε τις αποικίες που αναπτύχθηκαν και επιβεβαιώνουμε με goTaq PCR την ύπαρξη του πλασμιδίου, αλλά και του ενθέματος στα μετασχηματισμένα κύτταρα.

- Με τις θετικές αποικίες ενοφθαλμίζουμε 12,5ml LB και αφήνουμε να αναπτυχθούν στους 30 °C για 8 ώρες.
- Ενοφθαλμίζουμε με τις προκαλλιέργειες 200ml LB και αφήνουμε να αναπτυχθούν στους 30 °C για 24ώρες.

- Χρησιμοποιούμε το Merckoquant Cyanide Test και προσδιορίζουμε τον φαινότυπο του συμπληρωμένου μεταλλάγματος.

2.7 ΜΕΛΕΤΗ ΡΥΘΜΟΥ ΑΥΞΗΣΗΣ

Για την μελέτη του ρυθμού αύξησης χρησιμοποιήσαμε τα βακτηριακά στελέχη *Pe* αγρίου τύπου, *PeΔhcnB* και *PeΔgac*.

Πρωτόκολλο

- Χρησιμοποιούμε κύτταρα των στελεχών *Pe*, *PeΔhcnB* και *PeΔgac* από stock γλυκερόλης και ενοφθαλμίζουμε 10ml LB. Κάνουμε **2 υνρές καλλιέργειες** για το κάθε στέλεχος. Τις επωάζουμε στους 30°C για 16 ώρες.
- Κάνουμε αραιώση των καλλιιεργειών 1:10 σε τελικό όγκο 10ml και χρησιμοποιούμε νερό. Μετράμε την οπτική απορρόφηση των καλλιιεργειών στα 600nm (OD600).
- Προσαρμόζουμε όλες τις καλλιιεργειες, έτσι ώστε να έχουν όλες οπτική απορρόφηση OD600=0,01. Πραγματοποιούμε τις κατάλληλες αραιώσεις σε τελικό όγκο 100ml και σε θρεπτικό μέσο LB.
- Από αυτά τα 100ml, παίρνουμε 50ml και τα προσθέτουμε σε κωνική φιάλη των 500ml. Επωάζουμε τις καλλιιεργειες στους 30°C.
Διατηρούμε τα υπόλοιπα 50ml στους -4°C.
- Για την πρώτη μέτρηση της διαδικασίας, κάνουμε αραιώση 1:10, προσθέτοντας 1ml από την κάθε καλλιιεργεια σε 9ml απιονισμένο νερό. Κάνουμε πολύ καλό vortex και μετράμε την απορρόφηση στα 600nm. Σαν τυφλό χρησιμοποιούμε απιονισμένο νερό. Επαναλαμβάνουμε το ίδιο για όλες τις καλλιιεργειες.
- Παίρνουμε μετρήσεις κάθε 2-3 ώρες, κάνοντας την ίδια αραιώση κάθε φορά. Σημειώνουμε πάντα το χρονικό σημείο στο οποίο γίνεται η μέτρηση, δηλαδή πόσες ώρες έχουν περάσει από την έναρξη της επώασης των καλλιιεργειών.
- Για να μην υπάρξει μεγάλο χρονικό κενό στις μετρήσεις μας, χρησιμοποιούμε και τα άλλα 50ml των καλλιιεργειών. Ξεκινάμε την επώασή τους αμέσως μετά την τελευταία μέτρηση της πρώτης ομάδας. Με αυτό τον τρόπο θα μπορέσουμε την επόμενη μέρα να έχουμε και τις μετρήσεις των χρονικών σημείων, που σε αντίθετη περίπτωση θα χάναμε κατά τη διάρκεια της νύχτας.
- Παίρνουμε μετρήσεις για 3 ημέρες.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΥΜΕ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ 4 ΦΟΡΕΣ

2.8 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΠΛΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΩΝ

Για την δημιουργία των διπλών μεταλλαγμάτων, αρχικά χρησιμοποιήσαμε τα στελέχη *Pe3174* και *PeaprA*. Η πρωτεΐνη 3174 είναι μια άγνωστη πρωτεΐνη που έχει εντοπιστεί στο υπερκείμενο των καλλιεργειών της *Pe*. Το μετάλλαγμα *Pe3174* έχει δημιουργηθεί με απαλοιφή του γονιδίου 3174 από το γονιδίωμα της *Pe* και έχει βρεθεί πως εμφανίζει μειωμένη παθογένεια στην *Drosophila*. Η πρωτεΐνη *AprA* είναι μια πρωτεάση, που προσδίδει στην *Pe* την ικανότητα να επιβιώνει μέσα στο πεπτικό σύστημα της *Drosophila*. Το μετάλλαγμα *PeaprA* έχει δημιουργηθεί με εισαγωγή του τρανσποζονίου *Tn5* μέσα στο *aprA* γονίδιο. Τα δύο αυτά μεταλλάγματα παράγουν κανονικά υδροκυάνιο, όπως και η αγρίου τύπου *Pe*. Στόχος μας ήταν να χρησιμοποιήσουμε τα στελέχη *Pe3174* και *PeaprA* και να τους εισάγουμε μια δεύτερη μετάλλαξη, έτσι ώστε να μην παράγουν υδροκυάνιο. Για να το καταφέρουμε αυτό χρησιμοποιήσαμε τον μετασχηματισμένο φορέα *pINT-hcnB*, ο οποίος ενσωματώθηκε μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού στο γονιδίωμα των δύο αυτών μεταλλαγμάτων.

Η πορεία της δημιουργίας των διπλών μεταλλαγμάτων φαίνεται παρακάτω:

1. Μετασχηματίζουμε με ηλεκτροδιάτρηση κύτταρα *E. coli* S17 με τον φορέα *pINT-5521*. Ακολουθούμε το κλασικό πρωτόκολλο της ηλεκτροδιάτρησης, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο **2.4** και μετά την επώαση της μιας ώρας στους 37°C, επιστρώνουμε 50μl και 200μl σε θρεπτικό μέσο LB agar με αντιβιοτικό G418. Επωάζουμε τις στερεές καλλιέργειες στους 37°C για 16-24 ώρες.
2. Από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν εφαρμόζουμε *goTaq* PCR σε 5 από αυτές, για να διαπιστώσουμε πως είναι όντως μετασχηματισμένες με τον φορέα *pINT-5521*. Ακολουθούμε το κλασικό πρωτόκολλο της *goTaq* PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινήτες *IMPSEEN552101*, που είναι ειδικός για το γονίδιο *hcnB* και *spEXG202*, που είναι ειδικός για τον φορέα *pINT*.

ΠΡΟΣΟΧΗ!! Πριν προσθέσουμε την αποικία στο PCR mix, ενοφθαλμίζουμε μια φορά με την οδοντογλυφίδα στερεό θρεπτικό μέσο LB agar με αντιβιοτικό G418. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο, γιατί έτσι δεν θα χάσουμε τις θετικές αποικίες και επιπλέον θα βεβαιωθούμε πως είναι ικανές να αναπτύσσονται παρουσία αντιβιοτικού.

3. Τα αποτελέσματα της *goTaq* PCR έδειξαν πως όλες οι αποικίες είναι θετικές. Το επόμενο βήμα είναι η σύζευξη, που θα γίνει μεταξύ των μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* S17(*pINT*-

5521) ως δότη και των δεκτών *Pe3174* και *Peapra*. Η επίστρωση των κυττάρων γίνεται σε τρυβλία με LB agar. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 30°C.

4. Την επόμενη μέρα συλλέγουμε τα κύτταρα και τα επαναδιαλύουμε σε 500μl LB. Επιστρώνουμε 50μl και 200μl σε θρεπτικό μέσο ΡΙΑ με αντιβιοτικό Γενταμικίνη. Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 30°C.
5. Ελέγχουμε τις αποικίες που αναπτύχθηκαν με goTaq PCR, χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές όπως και παραπάνω. Κρατάμε 2 αποικίες από το κάθε διπλό μετάλλαγμα!

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Από τις θετικές αποικίες κάνουμε και υγρές καλλιέργειες, που θα τις χρησιμοποιήσουμε για να κάνουμε stock γλυκερόλης των κυττάρων, τα οποία θα διατηρήσουμε στους -80°C.

2.9 ΦΥΣΙΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΠΡΟΝΥΜΦΩΝ

Τα στελέχη που χρησιμοποιήσαμε για την φυσική μόλυνση των προνυμφών της *Drosophila melanogaster* ήταν τα εξής: αγρίου τύπου *Pe*, *PeΔgac*, *PeΔhcnB*.

Για την φυσική μόλυνση χρησιμοποιήσαμε βακτηριακά ιζήματα των δειγμάτων, που παρασκευάστηκαν με τον τρόπο που περιγράψαμε παραπάνω. Ωστόσο, η διαφορά στη συγκεκριμένη διαδικασία είναι πως προσαρμόσαμε την οπτική πυκνότητα των ιζημάτων σε 100, 50 και 10.

Προετοιμασία προνυμφών

- Σε erpendorfs των 2ml προσθέτουμε 400μl πολτοποιημένης μπανάνας.
- Προσθέτουμε σε κάθε erpendorf 200μl βακτηριακού ιζήματος. Αναμειγνύουμε πολύ καλά με vortex!!
- Προσθέτουμε περίπου 100 προνύμφες σε κάθε erpendorf και αναμειγνύουμε πολύ καλά με vortex!!
- Κλείνουμε τα erpendorfs με ένα πορώδες πώμα και τα τοποθετούμε για μισή ώρα στους 29°C.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η θερμοκρασία των 29°C είναι η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των προνυμφών, στην οποία καταναλώνουν την μεγαλύτερη ποσότητα τροφής.

- Στη συνέχεια τοποθετούμε όλο το περιεχόμενο των erpendorfs σε tubes με θρεπτικό μέσο ανάπτυξης της *Drosophila* και τα επωάζουμε στους 29°C.

- Αξιολογούμε την τοξικότητα 24 και 48 ώρες μετά την μόλυνση.



ΕΙΚΟΝΑ 18: Φυσική μόλυνση προνυμφών σε erppendorf με πολτοποιημένη μπανάνα. (Onya Oreta, προσωπική επικοινωνία)

2.10 ΦΥΣΙΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ *DROSOPHILA*

Το πρωτόκολλο της φυσικής μόλυνσης έγινε σύμφωνα με τη μελέτη των Vodovar et al., 2005. Τα στελέχη που χρησιμοποιήσαμε για την φυσική μόλυνση των ενήλικων ατόμων *Drosophila melanogaster* ήταν τα εξής: αγρίου τύπου *Pe*, *PeΔgac*, *PeΔhcnB*, *PeΔ3174*, *PeΔAprA*, καθώς και τα διπλά μεταλλάγματα *PeΔ3174-5521a*, *PeΔ3174-5521b*, *PeΔAprA-5521a*, *PeΔAprA-5521b*.

Πρωτόκολλο

- Αρχικά κάνουμε υγρές καλλιέργειες των παραπάνω στελεχών, χρησιμοποιώντας κύτταρα από στερεές καλλιέργειες, που έχουν αναπτυχθεί σε τρυβλία με LB agar και γάλα. Ενοφθαλμίζουμε με μια θετική αποικία 12,5ml LB σε falcon των 50ml. Επωάζουμε τις υγρές καλλιέργειες για 8 ώρες στους 30°C σε επωαστήρα με ανακίνηση στις 200 στροφές ανά λεπτό.
- Χρησιμοποιούμε τις προκαλλιέργειες και ενοφθαλμίζουμε 200ml LB σε κωνική φιάλη των 1000ml. Επωάζουμε τις καλλιέργειες για 21 ώρες στους 30°C σε επωαστήρα με ανακίνηση στις 200 στροφές ανά λεπτό.
- Ακολουθούμε το πρωτόκολλο δημιουργίας βακτηριακού ιζήματος, όπως φαίνεται παρακάτω:
 - 1) Μεταφέρουμε τις καλλιέργειες σε αποστειρωμένα δοχεία και φυγοκεντρούμε για 20 λεπτά στις 4000rpm στους 4°C.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Δεν δουλεύουμε τα δείγματα σε αποστειρωμένες συνθήκες, γιατί το βακτηριακό ίζημα είναι αρκετά συμπυκνωμένο και δεν υπάρχει ο φόβος επιμολύνσεων.

2) Βάζουμε αμέσως τις καλλιέργειες σε πάγο.

Αφαιρούμε το υπερκείμενο, αφήνοντας μόνο μια ελάχιστη ποσότητα. Με αυτή την ποσότητα, επαναδιαλύουμε το ίζημα, έχοντας πάντα τις καλλιέργειες μέσα σε πάγο. Μετά την επαναδιάλυση, μεταφέρουμε το ίζημα σε falcons.

3) Μετράμε την οπτική πυκνότητα των ιζημάτων. Πριν την μέτρηση κάνουμε μια αραιώση 1:1000. Συγκεκριμένα, προσθέτουμε 5ml ιζήματος σε 5ml απιονισμένου νερού. Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται στα 600nm.

4) Προσαρμόζουμε την οπτική απορρόφηση όλων των δειγμάτων στο 100, κάνοντας τις κατάλληλες αραιώσεις σε τελικό όγκο 5ml LB.

ΠΡΟΣΟΧΗ!! Διατηρούμε συνεχώς τα δείγματα μέσα σε πάγο, για να αποφύγουμε την λύση των κυττάρων!!

- Συλλέγουμε θηλυκά άτομα μυγών από stock του στελέχους Oregon^R. Υπολογίζουμε 45 θηλυκά άτομα για κάθε δείγμα.
- Μετά τη συλλογή των θηλυκών ατόμων, τα ενώνουμε όλα μαζί, ώστε να αναμειχθούν ομοιογενώς. Τοποθετούμε από 15 μύγες σε άδεια tubes και τα βάζουμε για 2 ώρες στους 29 °C.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η απώλεια τροφής για 2 ώρες στην βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους, θα έχει σαν αποτέλεσμα οι μύγες να καταναλώσουν μεγαλύτερη ποσότητα τροφής κατά την μόλυνση, άρα και περισσότερα βακτήρια.

- Σε tubes με θρεπτικό μέσο τοποθετούμε ένα δίσκο Whatman, ίδιας διαμέτρου με το tube. Χρησιμοποιούμε 3 tubes για κάθε βακτηριακό δείγμα.
- Τοποθετούμε 150μl από το βακτηριακό ίζημα, οπτικής πυκνότητας 100. Προσέχουμε ώστε το υγρό να καλύψει όλη την επιφάνεια του δίσκου Whatman. Τοποθετούμε επίσης 150μl LB σε 3 tubes, που θα χρησιμεύσουν σαν το αρνητικό control της διαδικασίας.
- Αφήνουμε να στεγνώσουν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφέρουμε 15 μύγες σε κάθε tube.
- Τοποθετούμε τα tubes στους 29 °C.
- Μετά από 2 ώρες ελέγχουμε αν υπάρχουν νεκρά άτομα και αν υπάρχουν, τα αφαιρούμε από το αρχικό σύνολο.

- Στη συνέχεια μετράμε τα νεκρά άτομα κάθε 24 ώρες για 5-6 ημέρες.
ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ 4 ΦΟΡΕΣ.

Natural infection



Filter paper
+ bacteria

ΕΙΚΟΝΑ 19: Φυσική μόλυνση ενήλικων ατόμων

2.11 ΣΗΠΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ

Η σηπτική μέθοδος μόλυνσης της *Drosophila* αποτελεί μια άμεση μέθοδο εισαγωγής βακτηρίων. Για την μόλυνση χρησιμοποιείται βακτηριακό ίζημα του στελέχους. Αφού προσαρμόσουμε το βακτηριακό ίζημα στις οπτικές πυκνότητες 100, 20 και 2, απομονώνουμε μια μικρή ποσότητα. Βυθίζουμε την ειδική βελόνα μέσα στο βακτηριακό ίζημα και στη συνέχεια ενίουμε στιγμιαία τη βελόνα στο θώρακα της *Drosophila*. Τοποθετούμε 20 μολυσμένες μύγες σε tube με το ειδικό θρεπτικό μέσο και επωάζουμε στους 29°C. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία για όλες τις οπτικές πυκνότητες. Μετράμε τα νεκρά άτομα κάθε 3 ώρες.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ 3 ΦΟΡΕΣ.



ΕΙΚΟΝΑ 20: Σηπτική μέθοδος μόλυνσης ενήλικων ατόμων

2.12 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΞΥ *Pe* ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Στη συγκεκριμένη διαδικασία αναπτύξαμε καλλιέργειες, που περιείχαν δύο διαφορετικά στελέχη. Η μελέτη του ανταγωνισμού έγινε με δύο διαφορετικά πρωτόκολλα, τα οποία θα παρουσιαστούν αναλυτικά παρακάτω. Στο πρώτο πρωτόκολλο όλες τις καλλιέργειες προσαρμόστηκαν στην ίδια οπτική πυκνότητα $OD=0,1$. Στο δεύτερο πρωτόκολλο όλες οι καλλιέργειες προσαρμόστηκαν έτσι ώστε να περιέχουν τον ίδιο αρχικό αριθμό βακτηριακών κυττάρων ($5 \cdot 10^6$). Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: *Pe* αγρίου τύπου, *PeΔhcnB*, *PeΔgac*, *Micrococcus luteus*, *Erwinia carotovora carotovora 15 (Ecc15)*, *Escherichia coli*.

Τα είδη *Micrococcus luteus*, *Erwinia carotovora carotovora 15*, *Escherichia coli* δεν έχουν ενεργότητα πρωτεάσης, με αποτέλεσμα να μην αποικοδομούν τις πρωτεΐνες του γάλακτος.

Πρωτόκολλο 1

1. Ενοφθαλμίζουμε 10ml LB με μια αποικία με καθένα από τα παραπάνω βακτηριακά στελέχη. Επωάζουμε όλες τις υγρές καλλιέργειες στους 30°C στις 200 στροφές ανά λεπτό, εκτός από την *Escherichia coli*, που επωάζεται στους 37°C για 16 ώρες.
2. Μετράμε την οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών. Για την μέτρηση κάνουμε αρχικά μια αραιώση 1:10, προσθέτοντας 1ml από κάθε καλλιέργεια σε 9ml απιονισμένο νερό. Κάνουμε καλό vortex και μετράμε την οπτική πυκνότητα στα 600nm.
3. Όλες οι οπτικές πυκνότητες πρέπει να προσαρμοστούν στην τιμή 0,2. Για να γίνει αυτό, κάνουμε τις κατάλληλες αραιώσεις με θρεπτικό μέσο LB και τελικό όγκο 20ml. Αυτές θα είναι οι

προκαλλιέργειες που θα χρησιμοποιήσουμε στη συνέχεια για να σχηματίσουμε τις καλλιέργειες control, καθώς και τις συγκαλλιέργειες.

4. Καλλιέργειες control: Σε ένα falcon των 50ml προσθέτουμε 5ml LB και 5ml από τις προκαλλιέργειες που ετοιμάσαμε. Με αυτή την αραιώση θα σχηματίσουμε καλλιέργειες control με οπτική πυκνότητα 0,1.
5. Συγκαλλιέργειες: Για να σχηματίσουμε τις συγκαλλιέργειες δημιουργούμε τους παρακάτω συνδυασμούς:

	<i>Pe</i>	<i>PeΔhcnB</i>	<i>PeΔgac</i>
<i>Ecc15</i>	*	*	*
<i>M.luteus</i>	*	*	*
<i>E.coli</i>	*	*	*

Σε ένα falcon των 50ml προσθέτουμε 5ml από τις προκαλλιέργειες του κάθε συνδυασμού ώστε να έχουν οπτική πυκνότητα 0,1.

6. Επωάζουμε για 24 ώρες όλες τις καλλιέργειες control και τις συγκαλλιέργειες στους 30°C στις 200 στροφές ανά λεπτό, εκτός από την καλλιέργεια control της *Escherichia coli*, που επωάζεται στους 37°C.
7. Κάνουμε αραιώσεις των καλλιεργειών control και των συγκαλλιεργειών 1:1000, 1:10.000, 1:100.000, 1:1.000.000, 1:10.000.000.
8. Χρησιμοποιούμε τις αραιώσεις 1:100.000, 1:1.000.000, 1:10.000.000 και επιστρώνουμε 50μl από τις καλλιέργειες σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB agar και 50μl από τις συγκαλλιέργειες σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB agar και γάλα.
9. Επωάζουμε όλες τις καλλιέργειες στους 30°C για 24 ώρες.

ΠΡΟΣΟΧΗ!! Οι καλλιέργειες με *Micrococcus luteus* επωάζονται για 48 ώρες, εξαιτίας του αργού ρυθμού ανάπτυξής του.

10. Μετράμε όλες τις αποικίες, όταν αναπτυχθούν. Στις συγκαλλιέργειες, η διαφορά των δύο στελεχών είναι η ικανότητα ή μη της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών του γάλακτος. Για τον υπολογισμό των cfus (colony forming units) ανά ml χρησιμοποιούμε την εξίσωση: **Cfu/ml= (number of colonies*dilution factor)/volume of dilution for spreading**

Πρωτόκολλο 2

Για να δημιουργήσουμε καλλιέργειες που θα έχουν τον ίδιο αρχικό αριθμό κυττάρων, θα πρέπει αρχικά να γνωρίζουμε πόσα κύτταρα αντιστοιχούν σε μια συγκεκριμένη οπτική πυκνότητα. Για να το διαπιστώσουμε αυτό ακολουθούμε αρχικά τα βήματα 1 και 2 του Πρωτοκόλλου 1 και στη συνέχεια προσαρμόζουμε τις οπτικές πυκνότητες όλων των καλλιεργειών στην τιμή 0,02.

- Το επόμενο βήμα είναι να αραιώσουμε αυτές τις καλλιέργειες 1:1000, 1:10.000 και 1:100.000. Από τις αραιώσεις των καλλιεργειών επιστρώνουμε 50μl σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB agar. Επωάζουμε για 24 ώρες στους 30°C, εκτός από την καλλιέργεια της *Escherichia coli*, που επωάζεται στους 37°C.
- Καταμετρούμε τις αποικίες όλων των στελεχών και υπολογίζουμε τα cfus (colony forming units) ανά ml.
- Για τον υπολογισμό χρησιμοποιούμε την εξίσωση: **Cfu/ml = (number of colonies * dilution factor) / volume of dilution for spreading**
- Με αυτό τον τρόπο γνωρίζουμε πλέον πόσα Cfu/ml αντιστοιχούν στην οπτική πυκνότητα 0,02.

Για να δημιουργήσουμε καλλιέργειες και συγκαλλιέργειες που θα ξεκινούν όλες με τον ίδιο αριθμό βακτηριακών κυττάρων, δηλαδή $5 \cdot 10^6$ Cfu/ml, κάνουμε αρχικά τα βήματα 1 και 2 του Πρωτοκόλλου 1.

3. Μετά την ανάπτυξη των καλλιεργειών και την μέτρηση της οπτικής τους πυκνότητας, προσαρμόζουμε τις οπτικές πυκνότητες στην τιμή 0,02 και τελικό όγκο 20ml. Αυτές θα είναι οι προκαλλιέργειες που θα χρησιμοποιήσουμε στη συνέχεια για να σχηματίσουμε τις καλλιέργειες control, καθώς και τις συγκαλλιέργειες.
4. Καλλιέργειες control: Υπολογίζουμε τον όγκο που πρέπει να πάρουμε από τις προκαλλιέργειες έτσι ώστε να έχουμε αρχικό αριθμό κυττάρων $5 \cdot 10^6$ Cfu/ml και τελικό όγκο 10ml.
5. Συγκαλλιέργειες: Σε ένα falcon των 50ml προσθέτουμε τους όγκους που υπολογίσαμε στο βήμα 4 του κάθε συνδυασμού και συμπληρώνουμε με LB μέχρι να φτάσουμε τελικό όγκο 10ml.
6. Επωάζουμε για 24 ώρες όλες τις καλλιέργειες control και τις συγκαλλιέργειες στους 30°C στις 200 στροφές ανά λεπτό, εκτός από την καλλιέργεια control της *Escherichia coli*, που επωάζεται στους 37°C.
7. Κάνουμε αραιώσεις των καλλιεργειών control και των συγκαλλιεργειών 1:1000, 1:10.000, 1:100.000, 1:1.000.000, 1:10.000.000.
8. Χρησιμοποιούμε τις αραιώσεις 1:100.000, 1:1.000.000, 1:10.000.000 και επιστρώνουμε 50μl από τις καλλιέργειες σε

τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB agar και 50μl από τις συγκαλλιέργειες σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB agar και γάλα.

9. Επωάζουμε όλες τις καλλιέργειες στους 30°C για 24 ώρες.

10. Μετράμε όλες τις αποικίες, όταν αναπτυχθούν. Στις συγκαλλιέργειες, η διαφορά των δύο στελεχών είναι η ικανότητα ή μη της αποικοδόμησης των πρωτεϊνών του γάλακτος. Για τον υπολογισμό των cfus (colony forming units) ανά ml χρησιμοποιούμε την εξίσωση: **Cfu/ml = (number of colonies * dilution factor) / volume of dilution for spreading**

Χρησιμοποιήσαμε το δεύτερο πρωτόκολλο για να αναπτύξουμε συγκαλλιέργειες της *Erwinia carotovora carotovora 15* και της *E. coli* με τα υπερκείμενα των καλλιεργείων *Pe* αγρίου τύπου, *PeΔhcnB*, *PeΔgac*.

- Αρχικά αναπτύξαμε υγρές καλλιέργειες των στελεχών *Pe* αγρίου τύπου, *PeΔhcnB*, *PeΔgac* για 16 ώρες.
- Τις φυγοκεντρήσαμε για 20 λεπτά στις 4.000rpm.
- Για να είμαστε σίγουροι πως δεν θα υπάρχουν κύτταρα στο υπερκείμενο, φιλτράρουμε τα υπερκείμενα με ειδικά φίλτρα διαμέτρου 0,22μm.
- Στη συνέχεια αναπτύσσουμε συγκαλλιέργειες με τα υπερκείμενα των στελεχών και με αρχικό αριθμό κυττάρων $5 \cdot 10^6$ Cfu/ml των *Erwinia carotovora carotovora 15* και *E. coli*.
- Στη συνέχεια ακολουθήσαμε τα βήματα 6,7,8,9 και 10 του πρωτοκόλλου 2.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: ΤΟ ΚΑΘΕ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΘΗΚΕ 3 ΦΟΡΕΣ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

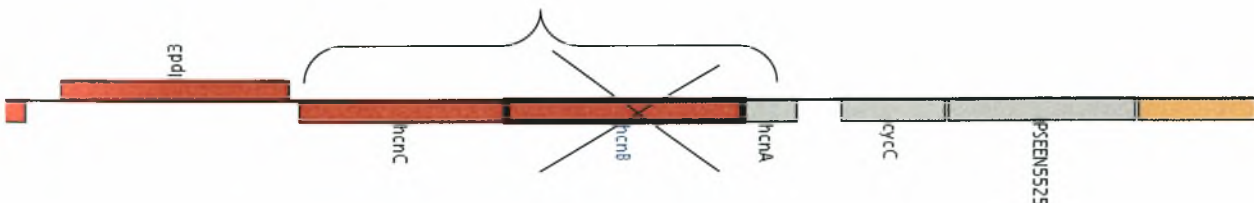
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ *PeΔhcnB*

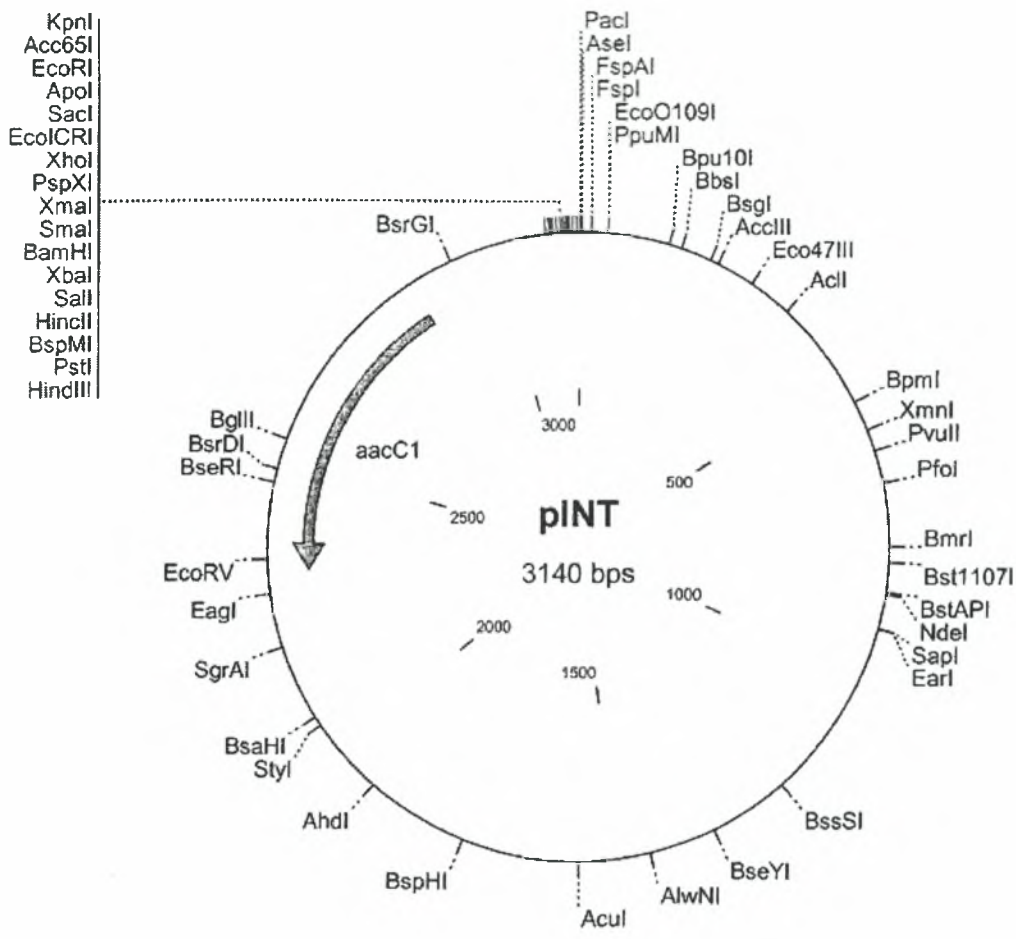
Η *Pe* έχει την ικανότητα να παράγει υδροκυάνιο. Για να μελετήσουμε το ρόλο του υδροκυανίου στην εντομοπαθογένεια της *Drosophila*, αρχικά δημιουργήσαμε ένα στέλεχος που έφερε μετάλλαξη στο γονίδιο *hcnB* (PSEEN5521). Το μετάλλαγμα *ΔhcnB* δημιουργήθηκε με διάσπαση του γονιδίου *hcnB*. Στόχος μας ήταν να διασπάσουμε το ένα από τα τρία γονίδια της ομάδας *hcnABC*, που είναι υπεύθυνα για την συνθάση του υδροκυανίου στην *Pe*. Με αυτό τον τρόπο θέλαμε να δημιουργήσουμε ένα στέλεχος *Pe*, το οποίο να μην παράγει υδροκυάνιο, για να μπορέσουμε να μελετήσουμε τον ρόλο του στην εντομοπαθογένεια της *Pe*.

Η διάσπαση του γονιδίου έγινε με τη χρήση του φορέα *pINT*. Στον φορέα αυτό κλωνοποιήσαμε ένα τμήμα ~500bp του γονιδίου *hcnB*. Χαρακτηριστικό αυτό του φορέα είναι πως δεν μπορεί να αντιγραφεί αυτόνομα μέσα σε κύτταρα *Pe*, παρά μόνο αν ενσωματωθεί μέσα στο γένωμα της *Pe* μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Έτσι λοιπόν ενσωματώθηκε μέσα στο γένωμα και το γονίδιο διασπάστηκε, οδηγώντας στη δημιουργία του στελέχους *PeΔhcnB*.

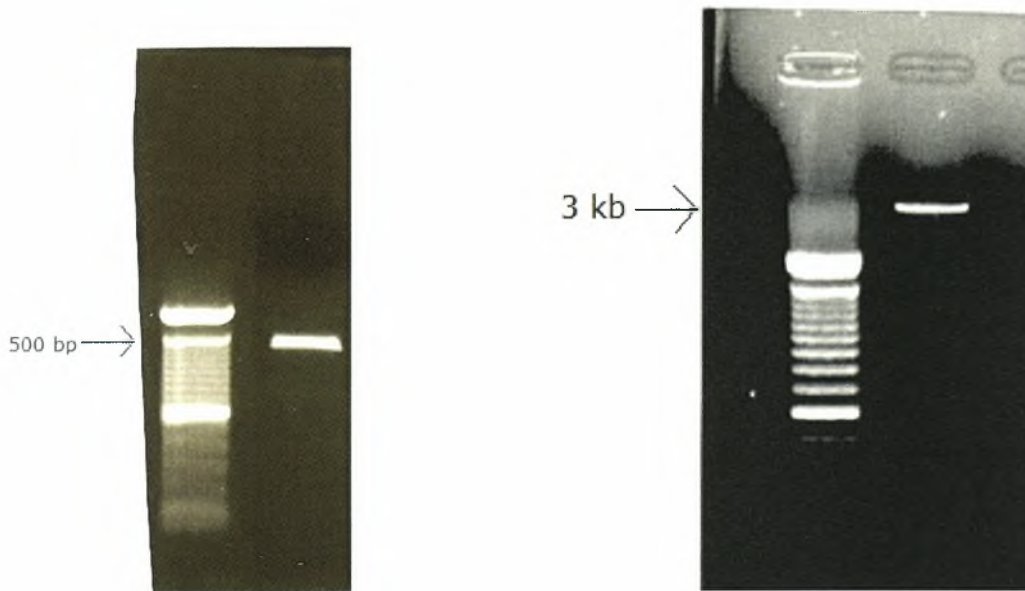
Locus involved in cyanide synthase



ΕΙΚΟΝΑ 21: Διάσπαση του *hcnB* γονιδίου για τη δημιουργία του μεταλλαγμένου στελέχους *PeΔhcnB*



ΕΙΚΟΝΑ 22: Ο φορέας pINT, που χρησιμοποιήθηκε για την διάσπαση του γονιδίου *hcnB* της *Pe*.



ΕΙΚΟΝΑ 23: Αριστερά φαίνεται το τμήμα των ~500bp, που χρησιμοποιήσαμε για την κλωνοποίηση. Δεξιά φαίνεται ο φορέας pINT, με μοριακό βάρος 3kb.

3.2 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΑΤΟΣ *ΔhcnB*

Για να εξακριβώσουμε ότι το μετάλλαγμα *ΔhcnB* δεν παράγει υδροκυάνιο και άρα έχει το σωστό φαινότυπο, εφαρμόσαμε δύο διαφορετικές μεθόδους. Με την πρώτη μέθοδο επιβεβαιώσαμε με goTaq PCR πως ο ομόλογος ανασυνδυασμός έγινε σωστά και άρα ο μετασχηματισμένος φορέας pINT-*hcnB* έχει εισαχθεί στο γονιδίωμα της *Pe*. Για την goTaq PCR χρησιμοποιήσαμε έναν εκκινητή ειδικό για το *hcnB* γονίδιο, τον IMPSEEN552101 και έναν εκκινητή ειδικό για το πλασμίδιο pINT, τον srEXG202. Με αυτούς τους δύο εκκινητές μπορούσαμε να είμαστε σίγουροι πως αν τελικά παίρναμε προϊόν από αυτή την PCR, τότε σίγουρα θα είχαμε και τον φορέα, αλλά και το γονίδιο μέσα στο γονιδίωμα της *Pe*. Για αυτή την αντίδραση PCR ελέγξαμε 5 αποικίες μετασχηματισμένων κυττάρων *Pe* και πήραμε προϊόντα και από τις πέντε. Τα αποτελέσματα της PCR φαίνονται στην εικόνα 24.



ΕΙΚΟΝΑ 24: Τα προϊόντα της PCR, που επιβεβαίωσαν πως τα μετασχηματισμένα κύτταρα περιέχουν και το φορέα και το γονίδιο.

Η δεύτερη μέθοδος που ακολουθήσαμε ήταν η επιβεβαίωση του φαινοτύπου του μεταλλάγματος *ΔhcnB* με το Merckoquant Cyanide Test (Merck). Το συγκεκριμένο kit μετράει τα ελεύθερα ιόντα CN⁻, δίνοντας μια ημιποσοτική τιμή του υδροκυανίου που παράγεται.

Το υδροκυάνιο παράγεται στο τέλος της εκθετικής και στην αρχή της φάσης στασιμότητας. Για αυτό το λόγο οι καλλιέργειες που χρησιμοποιήσαμε για τις μετρήσεις αναπτύχθηκαν για 24 ώρες. Το υδροκυάνιο που παράγεται από την *Pe* εκκρίνεται από τα βακτηριακά κύτταρα και άρα εντοπίζεται στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης. Οι μετρήσεις γίνανε στα υπερκείμενα των καλλιεργειών.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 1, το μετάλλαγμα *ΔhcnB* δεν παράγει υδροκυάνιο. Για τις μετρήσεις αυτές χρησιμοποιήσαμε σαν θετικό control την *Pe* αγρίου τύπου και σαν αρνητικό control το στέλεχος *Erwinia carotovora carotovora* 15, που είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο, που δεν παράγει υδροκυάνιο.

Είναι γνωστό πως η παραγωγή υδροκυανίου ρυθμίζεται από το σύστημα GacS/GacA, καθώς και από τον μεταγραφικό παράγοντα AlgR. Χρησιμοποιήσαμε μεταλλάγματα των δύο ρυθμιστών για να διαπιστώσουμε αν έχουν την ικανότητα να παράγουν υδροκυάνιο. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 1, το μετάλλαγμα *PeΔgacA* δεν παράγει υδροκυάνιο, ενώ το μετάλλαγμα *PeΔAlgR* συνεχίζει να παράγει. Για να αποκτήσουμε μια πιο ξεκάθαρη εικόνα για τον ρόλο του AlgR στη ρύθμιση της παραγωγής υδροκυανίου, θα πρέπει να χρησιμοποιήσουμε μια ποσοτική μέθοδο ανάλυσης, που θα είναι πιο ακριβής στις μετρήσεις της. Με τον τρόπο αυτό θα μπορούσαμε να εντοπίσουμε, αν υπάρχει και σε τι βαθμό, διαφορά μεταξύ του υδροκυανίου που παράγει ο άγριος τύπος *Pe* και το μετάλλαγμα *PeΔAlgR*.

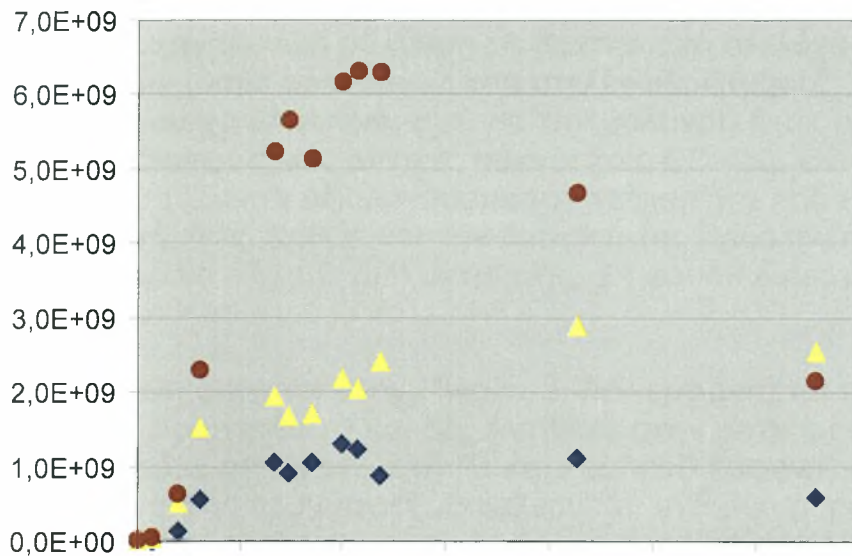
ΠΙΝΑΚΑΣ 1

ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	CN⁻ (mg/l)
<i>Pe</i>	10~30
<i>Ecc15</i>	0
<i>PeΔhcnB</i>	0
<i>PeΔgac</i>	0~1
<i>PeΔAlgR</i>	10~30

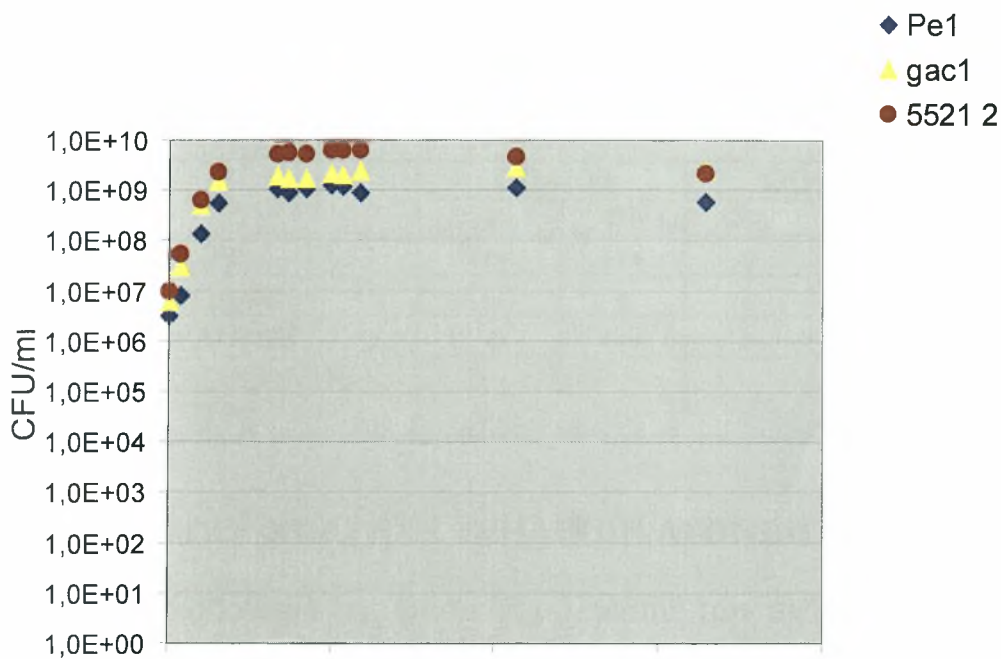
3.3 ΜΕΛΕΤΗ ΡΥΘΜΟΥ ΑΥΞΗΣΗΣ

Η μικροβιακή αύξηση αντιπροσωπεύει την αύξηση στον αριθμό των μικροβιακών κυττάρων. Ο ρυθμός αύξησης είναι η μεταβολή του αριθμού των κυττάρων ή της κυτταρικής μάζας ανά μονάδα χρόνου. Κατά τον κύκλο διαίρεσης, όλα τα δομικά στοιχεία του κυττάρου διπλασιάζονται. Το διάστημα κατά το οποίο σχηματίζονται δύο κύτταρα από ένα προϋπάρχον ονομάζεται γενεά και ο χρόνος που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί αυτό ονομάζεται χρόνος γενεάς. Ο χρόνος γενεάς δεδομένου οργανισμού εξαρτάται ως κάποιιο βαθμό από το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται και από τις συνθήκες καλλιέργειας που εφαρμόζονται. Οι καλλιέργειες στις οποίες η αύξηση συντελείται σε θρεπτικό μέσο δεδομένου όγκου που συνεχώς μεταβάλλεται από τη δράση των αναπτυσσόμενων οργανισμών μέχρι να είναι πλέον ακατάλληλο για αύξηση λέγονται κλειστές καλλιέργειες.

Για τη μελέτη του ρυθμού αύξησης χρησιμοποιήσαμε τα βακτηριακά στελέχη *Pe* αγρίου τύπου, *PeΔhcnB* και *PeΔgac*. Οι οπτικές πυκνότητες που πήραμε από τις μετρήσεις των 3 ημερών μετατράπηκαν σε cfu/ml. Τα αποτελέσματα φαίνονται στις εικόνες 25 και 26. Η εικόνα 26 αντιπροσωπεύει τη λογαριθμική έκφραση της εικόνας 25. Στην εικόνα 25 φαίνεται πως το μετάλλαγμα *PeΔhcnB* φτάνει πιο γρήγορα σε υψηλότερες κυτταρικές συγκεντρώσεις σε σχέση με τον άγριο τύπο. Ωστόσο στην εικόνα 26, η λογαριθμική μελέτη δε φανερώνει μεγάλη διαφορά στο ρυθμό αύξησης των τριών στελεχών. Μπορούμε να υποθέσουμε πως η διαφορά στον αριθμό των κυττάρων ίσως οφείλεται στο υψηλότερο μεταβολικό φορτίο που φέρει η αγρίου τύπου *Pe* σε σχέση με την *PeΔhcnB*. Ο άγριος τύπος παράγει την οξειδάση CIO που είναι ανθεκτική στο υδροκυάνιο, αλλά και το ένζυμο ροδανάση, το οποίο αποτοξικοποιεί το υδροκυάνιο και προστατεύει έτσι το βακτήριο. Το μετάλλαγμα *PeΔhcnB*, που δεν μπορεί να συνθέσει υδροκυάνιο, δεν είναι «αναγκασμένο» να συνθέσει τις δύο παραπάνω πρωτεΐνες. Κατά συνέπεια δεν έχει ανάγκη να καταναλώσει περισσότερους τροφικούς πόρους κι έτσι μπορεί να αναπτυχθεί και να φτάσει σε υψηλότερες κυτταρικές συγκεντρώσεις.



ΕΙΚΟΝΑ 25: Μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης των στελεχών *Pe*, *PeΔhcnB* και *PeΔgac*.



ΕΙΚΟΝΑ 26: Λογαριθμική μελέτη του ρυθμού ανάπτυξης των στελεχών *Pe*, *PeΔhcnB* και *PeΔgac*.

3.4 ΦΥΣΙΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΠΡΟΝΥΜΦΩΝ

Για την φυσική μόλυνση με βακτηριακά στελέχη χρησιμοποιήσαμε προνύμφες του στελέχους Oregon^R. Τα βακτηριακά ιζήματα που χρησιμοποιήσαμε για την μόλυνση ήταν προσαρμοσμένα σε τρεις διαφορετικές οπτικές πυκνότητες OD=10, OD=50, OD=100. Μετά την μόλυνση αξιολογήσαμε την τοξικότητα που εμφανίστηκε στις προνύμφες, καθώς και την διακοπή της πρόσληψης τροφής. Συγκεκριμένα πήραμε δύο μετρήσεις, 24 και 48 ώρες μετά την μόλυνση.

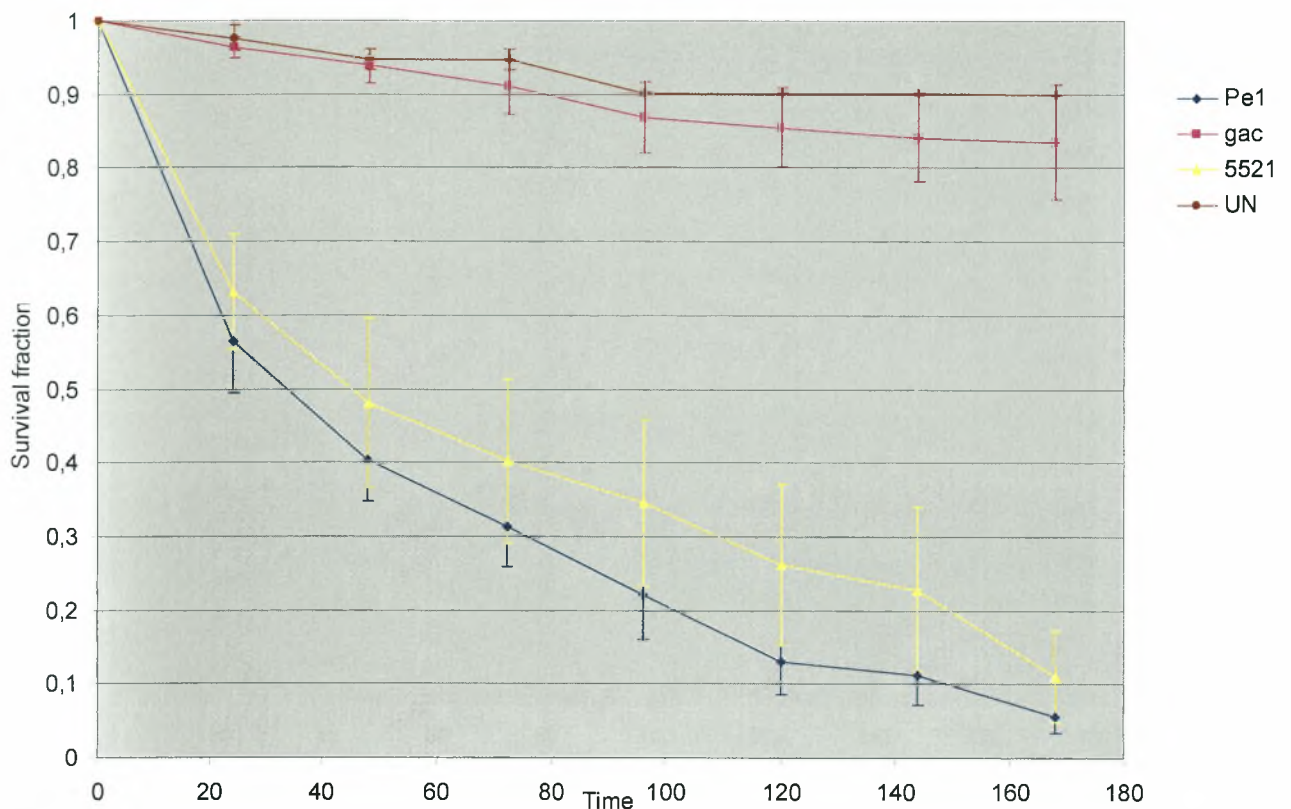
Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, δεν εμφανίζεται τοξικότητα στις οπτικές πυκνότητες 10 και 50. Αντίθετα στην οπτική πυκνότητα 100 παρατηρούμε ότι τα στελέχη *Pe* και *PeΔhcnB* εμφανίζουν την ίδια τοξικότητα στις προνύμφες. Επιπλέον και στα δύο παρατηρείται διακοπή της πρόσληψης τροφής ήδη από τις 24 ώρες. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα πως το υδροκυάνιο δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στην παθογένεια που εμφανίζει η *Pe* στις προνύμφες της *Drosophila*.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

	OD=100		OD=50		OD=10	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
<i>Pe</i>	+++	+++	0	0	0	0
<i>PeΔgac</i>	+	+	0	0	0	0
<i>PeΔHcnB</i>	+++	+++	0	0	0	0
ΑΡΝΗΤΙΚΟ CONTROL (LB)	0	0	0	0	0	0

3.5 ΦΥΣΙΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

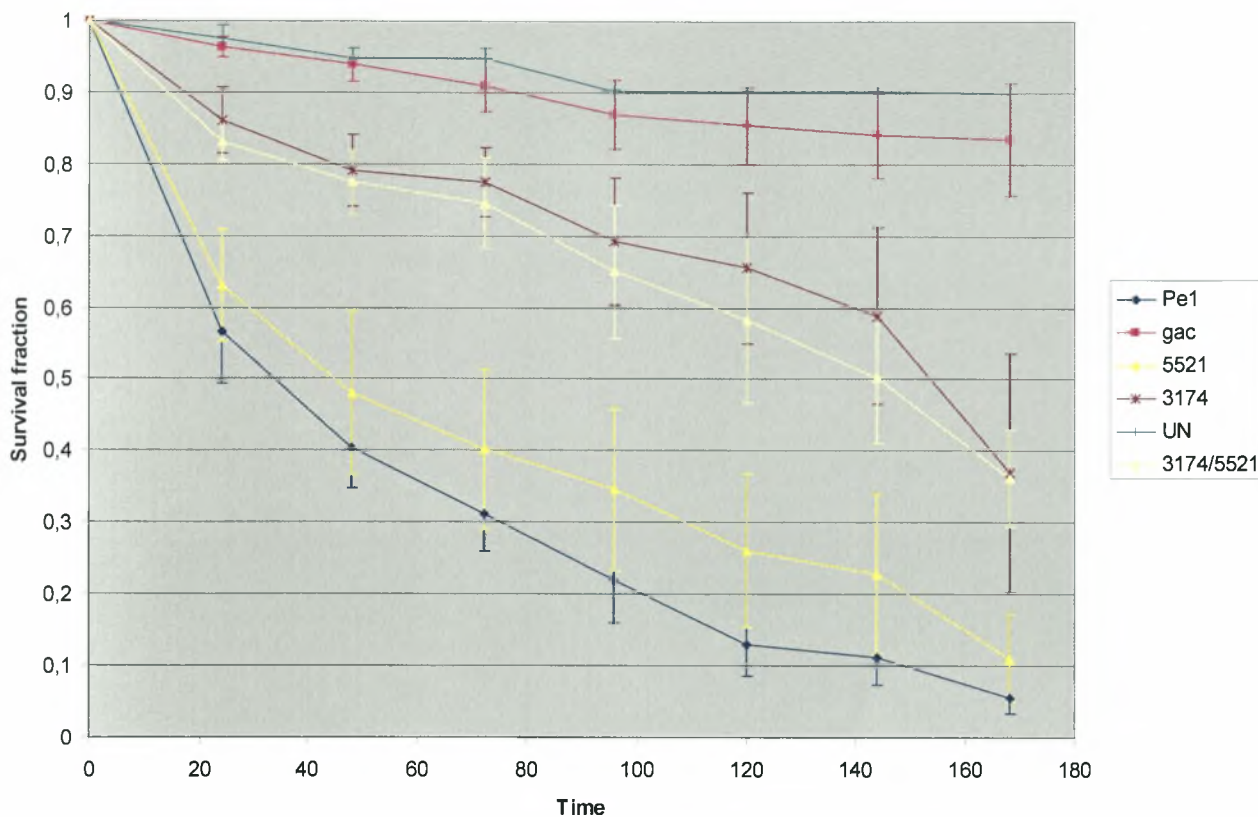
Η διαδικασία της φυσικής μόλυνσης των ενήλικων ατόμων της *Drosophila* έγινε για να διαπιστώσουμε τον ρόλο το υδροκυανίου στην παθογένεια της *Pe*. Αρχικά λοιπόν χρησιμοποιήσαμε το μετάλλαγμα *PeΔhcnB* και συγκρίναμε το ποσοστό παθογένειας που εμφανίζει σε σχέση με τον άγριο τύπο. Για το μετάλλαγμα *PeΔhcnB* γνωρίζουμε ήδη πως δεν παράγει υδροκυάνιο, μετά την δοκιμασία μέτρησης με το Merckoquant Cyanide Test (Merck). Όπως φαίνεται από την εικόνα 27, το μετάλλαγμα *PeΔhcnB* και ο άγριος τύπος *Pe* δεν εμφανίζουν κάποια σημαντική διαφορά στο ποσοστό παθογένειας. Τα δύο στελέχη φαίνεται πως σκοτώνουν το ίδιο ποσοστό ενήλικων ατόμων στο ίδιο χρονικό διάστημα.



ΕΙΚΟΝΑ 27: Η αγρίου τύπου *Pe* και το μετάλλαγμα σκοτώνουν το ίδιο ποσοστό *D.melanogaster*

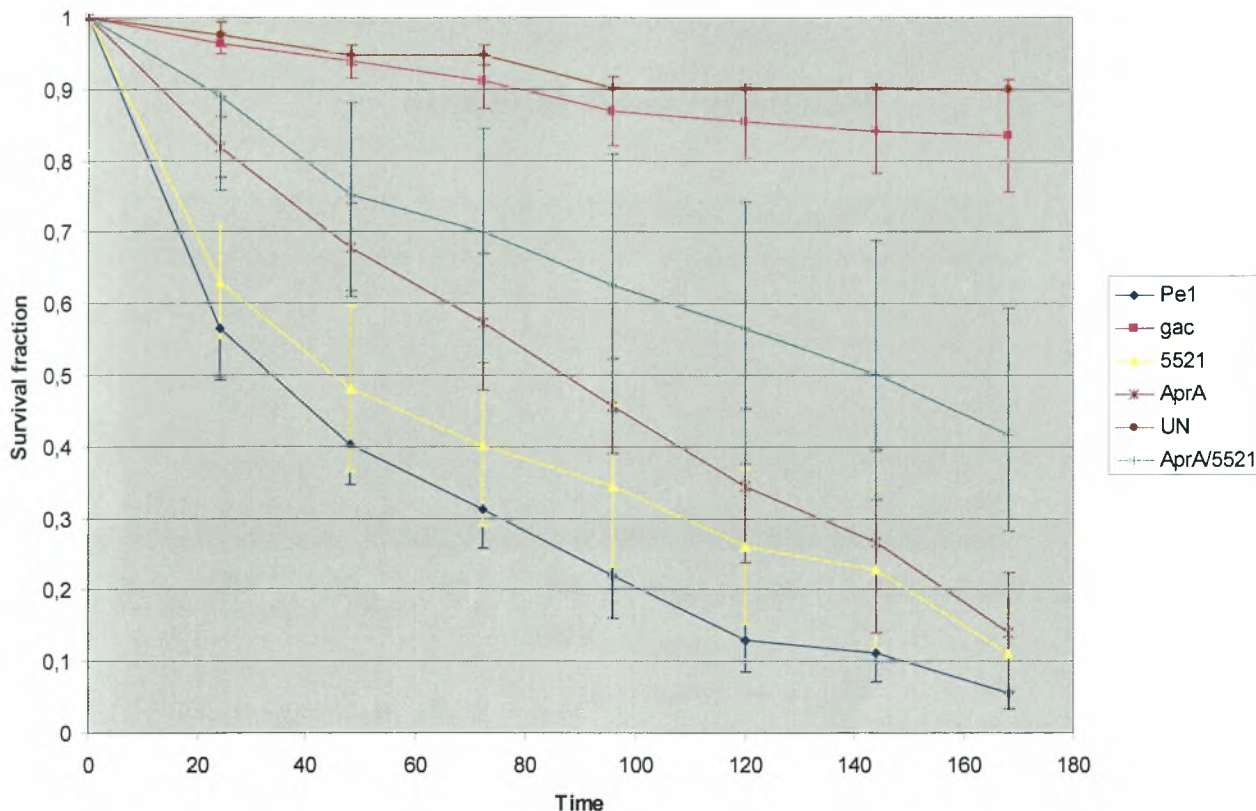
Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε τα μεταλλάγματα *Pe3174* και *PeaprA*, τα οποία είναι αποδεδειγμένο πως εμφανίζουν χαμηλότερη παθογένεια στη *Drosophila* σε σχέση με την αγρίου τύπου *Pe*. Με βάση αυτά τα απλά μεταλλάγματα δημιουργήσαμε τα διπλά μεταλλάγματα *Pe3174/5521* και *Pe aprA/5521*. Αν το υδροκυάνιο έπαιζε κάποιο ρόλο στην παθογένεια, τότε θα υπήρχε διαφορά ανάμεσα στα απλά μεταλλάγματα και στα διπλά, που θα συμπεραίναμε ότι οφείλεται στην έλλειψη υδροκυανίου.

Παρατηρώντας την εικόνα 28, όπου έχουμε τα αποτελέσματα της μόλυνσης με το απλό μετάλλαγμα *Pe3174* και το διπλό μετάλλαγμα *Pe3174/5521*, δεν υπάρχει διαφορά στο ποσοστό παθογένειας. Συγκεκριμένα βλέπουμε πως και τα δύο στελέχη εμφανίζουν την ίδια παθογένεια και στο ίδιο χρονικό διάστημα.



ΕΙΚΟΝΑ 28: Το διπλό μετάλλαγμα *Pe3174/5521* εμφανίζει την ίδια παθογένεια με το απλό μετάλλαγμα *Pe3174*

Στην εικόνα 29, έχουμε τα αποτελέσματα της μόλυνσης με το απλό μετάλλαγμα *PeΔaprA* και το διπλό μετάλλαγμα *PeΔaprA/5521*. Σε αυτό το διάγραμμα το *PeΔaprA/5521*, φαίνεται πως εμφανίζει ένα ενδιαφέροντα φαινόμενο. Συγκεκριμένα εμφανίζει μειωμένη παθογένεια, σκοτώνει δηλαδή μικρότερο ποσοστό ατόμων στο ίδιο χρονικό διάστημα σε σχέση με το μετάλλαγμα *PeΔaprA*. Για να είμαστε σίγουροι όμως πως η διαφορά που βλέπουμε αντιπροσωπεύει όντως μειωμένη παθογένεια, θα πρέπει να γίνει μια στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

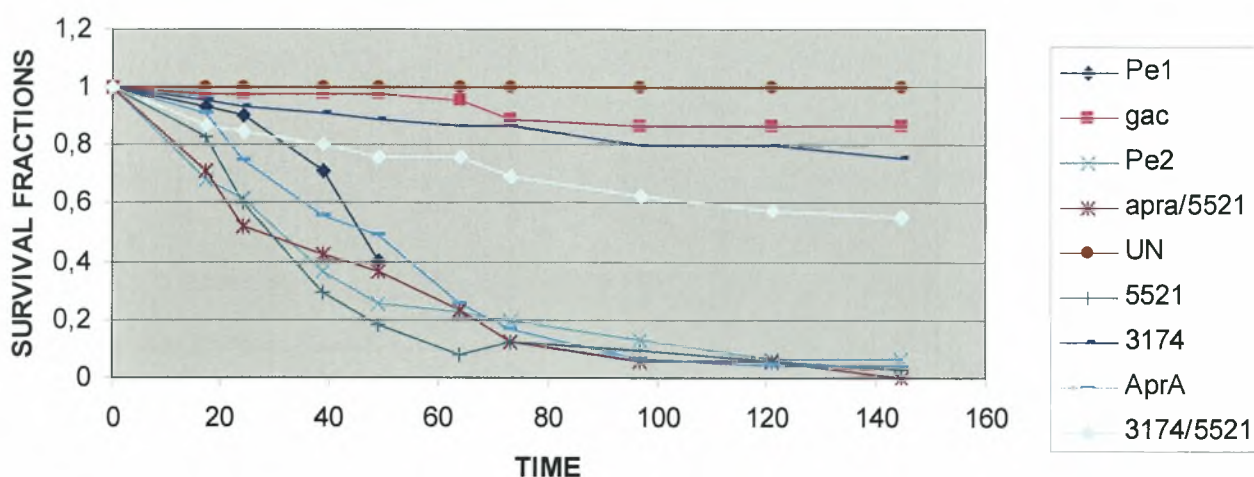


ΕΙΚΟΝΑ 29: Το διπλό μετάλλαγμα *PeΔapra/5521* εμφανίζει μικρότερη παθογένεια σε σχέση με το μετάλλαγμα *PeΔapra*

Εκτός από το αγρίου τύπου στέλεχος Oregon^R, χρησιμοποιήσαμε και το αγρίου τύπου στέλεχος CantonS. Το στέλεχος αυτό έχει παρατηρηθεί πως είναι πιο ευαίσθητο στην μόλυνση από *Pe*, δηλαδή τα ενήλικα άτομα πεθαίνουν πιο γρήγορα και σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα σε σχέση με τα Oregon^R. Για την μόλυνση χρησιμοποιήσαμε όλα τα διαθέσιμα μεταλλάγματα, απλά και διπλά, για να διαπιστώσουμε αν υπάρχει διαφορά στην παθογένεια στο πιο ευαίσθητο αυτό είδος.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 30, δεν υπάρχει κάποια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ του αγρίου τύπου και των μεταλλαγμάτων. Όλα τα στελέχη φαίνεται πως εμφανίζουν την ίδια ή παρόμοια παθογένεια, με αποτέλεσμα να μην μπορούμε να εξαγάγουμε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα για το αν το υδροκυάνιο παίζει τελικά κάποιο ρόλο στην εντομοπαθογένεια. Ωστόσο η συγκεκριμένη δοκιμασία έγινε μόνο μια φορά κι έτσι δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για τα αποτελέσματα του διαγράμματος. Είναι απαραίτητο να γίνουν επαναλήψεις της διαδικασίας με το είδος CantonS.

SURVIVAL ASSAY (CANTON)

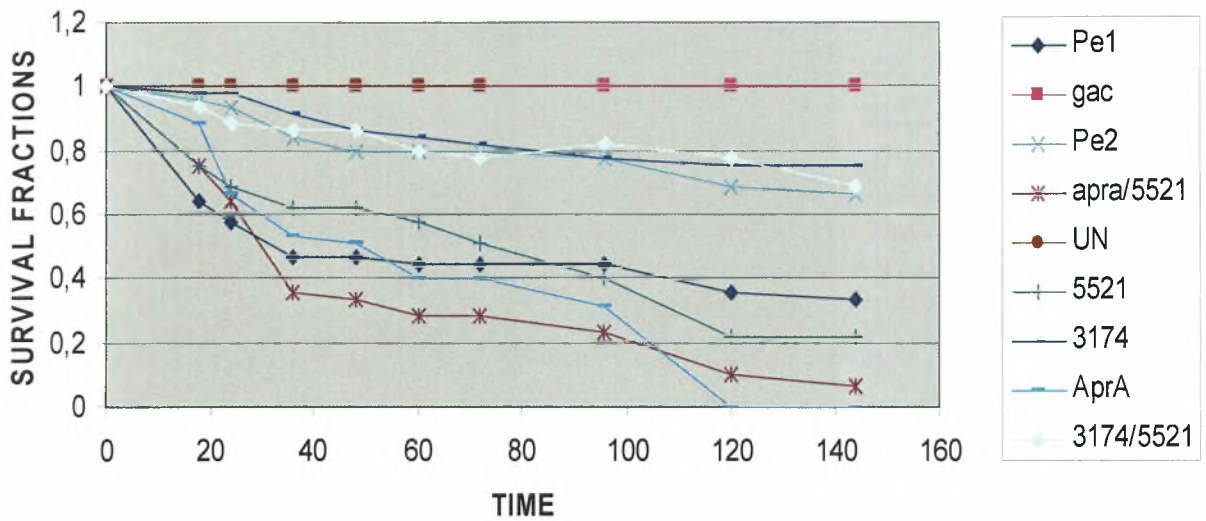


ΕΙΚΟΝΑ 30: Μόλυνση των CantonS με τα μεταλλάγματα της *Pe*

Το τελευταίο είδος *Drosophila* που χρησιμοποιήσαμε ήταν το Relish. Το είδος αυτό είναι ένα μετάλλαγμα, στο οποίο το μονοπάτι ανοσοαπόκρισης *Imd* είναι απενεργοποιημένο. Το *Imd* μονοπάτι ενεργοποιείται κατά τη μόλυνση της *Drosophila* από Gram αρνητικά βακτήρια και η απενεργοποίηση του μονοπατιού γίνεται με διάσπαση του γονιδίου *relish*, που παίζει βασικό ρόλο στον καταρράκτη. Χρησιμοποιήσαμε όλα τα διαθέσιμα μεταλλάγματα και για αυτή τη μόλυνση.

Από την εικόνα 31, δεν προκύπτει κάποιος ρόλος του υδροκυανίου στην παθογένεια των *Pe* στελεχών στις Relish μύγες. Το παράδοξο που παρατηρούμε στη συγκεκριμένη διαδικασία είναι πως κάποια μεταλλαγμένα στελέχη σκοτώνουν περισσότερο και από την αγρίου τύπου *Pe*. Ωστόσο δεν μπορούμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα από αυτή τη διαδικασία, διότι πραγματοποιήθηκε μόνο μια φορά. Για να έχουμε αξιόπιστα συμπεράσματα θα πρέπει να ακολουθήσουν επαναλήψεις της ίδιας διαδικασίας.

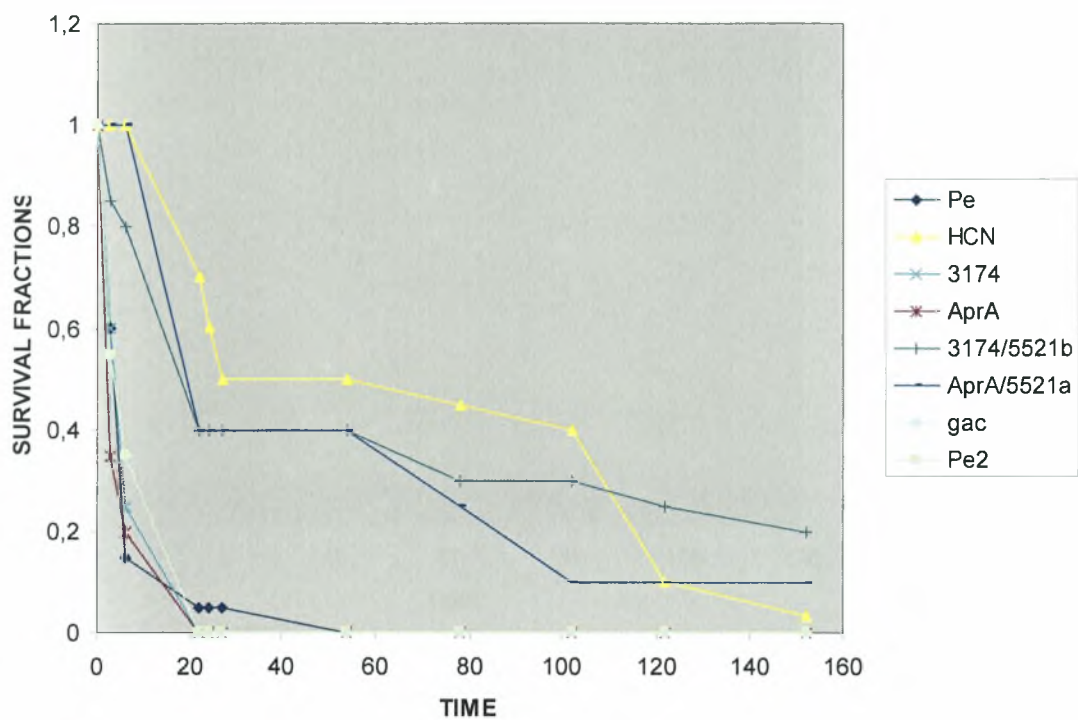
SURVIVAL ASSAY RELISH



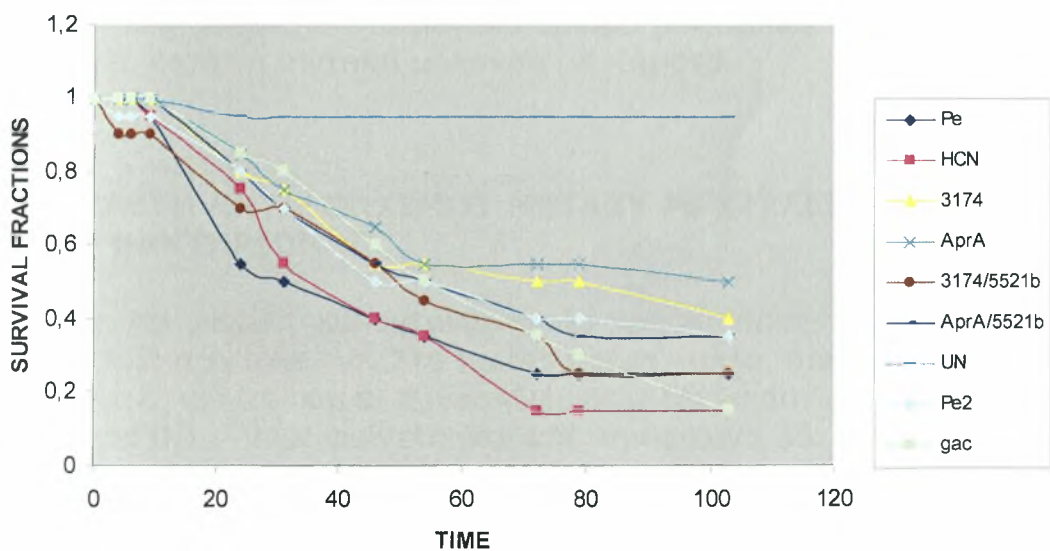
ΕΙΚΟΝΑ 31: Μόλυνση των Relish με όλα τα μεταλλάγματα της *Pe*

3.6 ΣΗΠΤΙΚΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΕΝΗΛΙΚΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

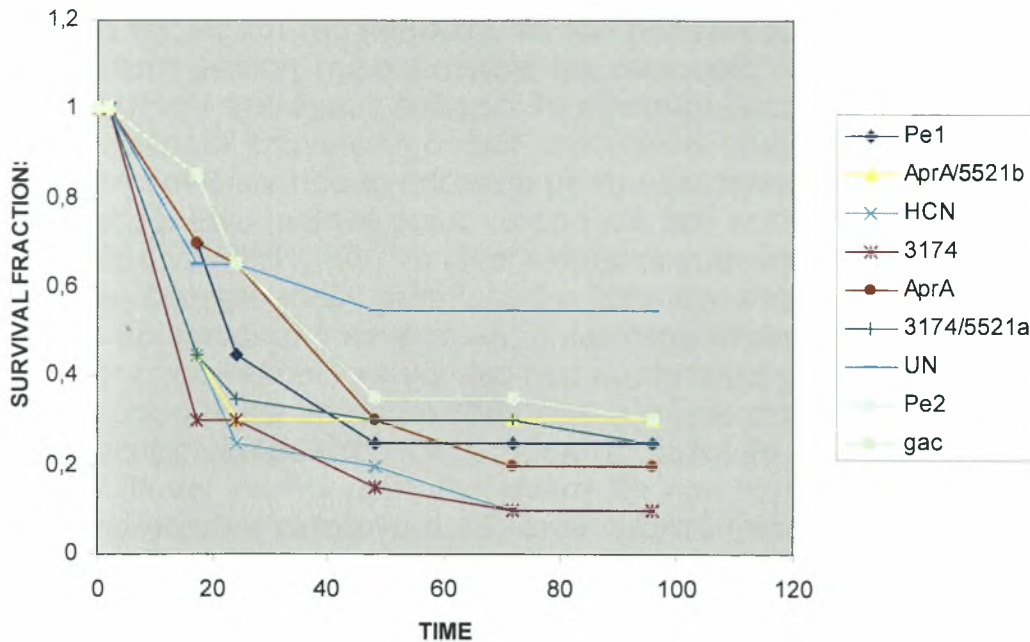
Η διαδικασία της σηπτικής μόλυνσης έγινε μόνο μια φορά για την κάθε οπτική πυκνότητα. Χρησιμοποιήσαμε όλα τα μεταλλάγματα, απλά και διπλά, στις οπτικές πυκνότητες 100,20 και 2. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για οπτική πυκνότητα 100 φαίνονται στην εικόνα 32. Παρατηρούμε ότι ο άγριος τύπος *Pe* σκοτώνει μεγάλο αριθμό μυγών και σε αρκετά σύντομο χρονικό διάστημα. Παρατηρούμε επίσης πως όλα τα στελέχη εμφανίζουν σχεδόν τον ίδιο ρυθμό με τον οποίο σκοτώνουν τις μύγες. Τα ίδια αποτελέσματα προκύπτουν και από τις άλλες δύο οπτικές πυκνότητες, όπως παρατηρούμε στις εικόνες 33 και 34. Όλα τα βακτηριακά στελέχη φαίνεται πως σκοτώνουν τις μύγες με τον ίδιο ρυθμό.



ΕΙΚΟΝΑ 32: Ποσοστό παθογένειας των μεταλλαγμάτων σε OD=100 μετά από σηπτική μόλυνση ενήλικων ατόμων.



ΕΙΚΟΝΑ 33: Ποσοστό παθογένειας των μεταλλαγμάτων σε OD=20 μετά από σηπτική μόλυνση ενήλικων ατόμων.



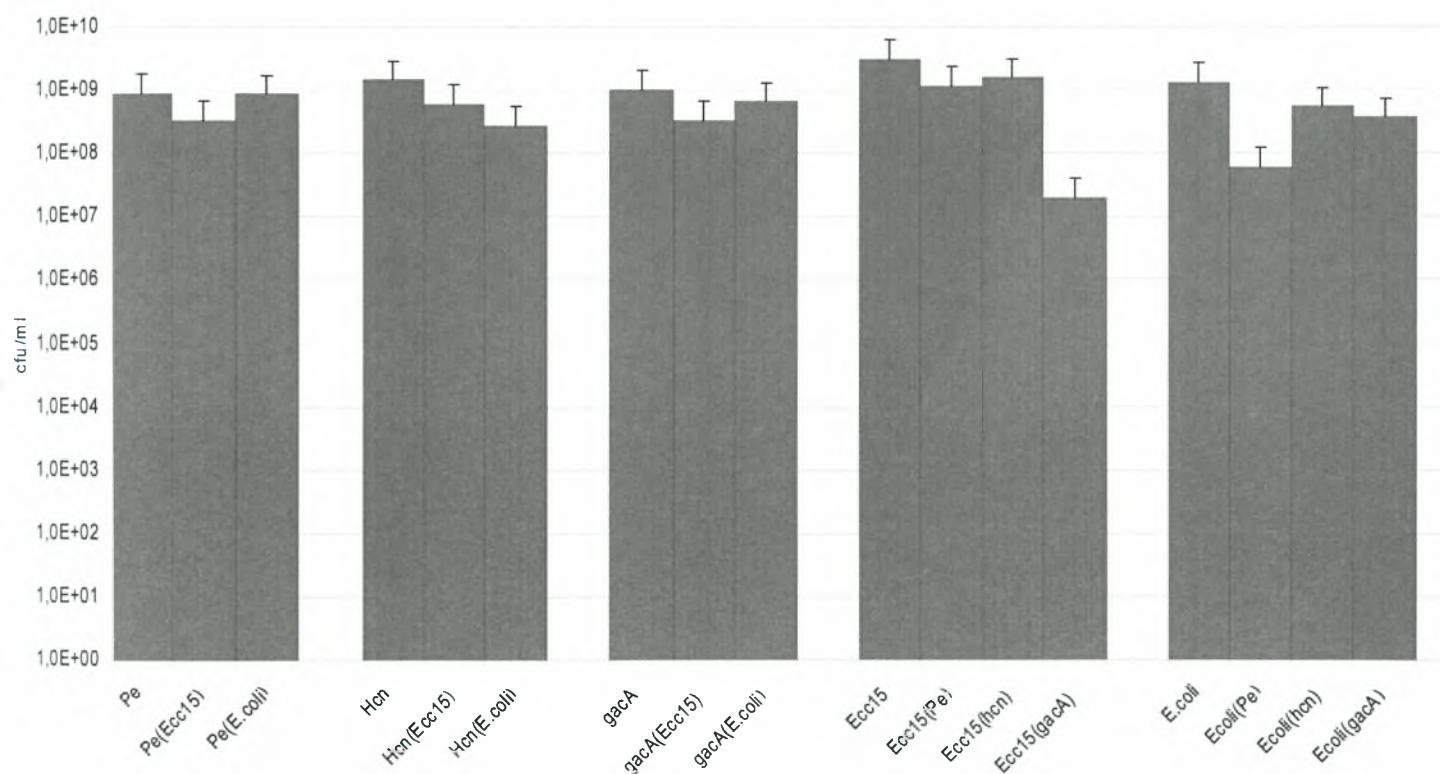
ΕΙΚΟΝΑ 34: Ποσοστό παθογένειας των μεταλλαγμάτων σε OD=2 μετά από σηπτική μόλυνση ενήλικων ατόμων.

Για να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα, θα πρέπει να επαναλάβουμε τη διαδικασία περισσότερες φορές για την κάθε οπτική πυκνότητα. Επιπλέον η σηπτική μόλυνση θα πρέπει να γίνει με τη χρήση μόνο των υπερκειμένων των καλλιεργειών. Με αυτό τον τρόπο θα είμαστε σίγουροι πως ο μεγάλος και γρήγορος ρυθμός θανάτων δεν οφείλεται στο μεγάλο αριθμό βακτηρίων που ενίουμε στις μύγες κατά τη σηπτική μόλυνση με ιζήματα.

3.7 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΞΥ *Pe* ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Για την μελέτη του ανταγωνισμού χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικά πρωτόκολλα. Στο πρώτο πρωτόκολλο, όλες οι καλλιέργειες control και οι συγκαλλιέργειες ξεκίνησαν με την οπτική πυκνότητα 0,1. Όπως φαίνεται και από την εικόνα 35, η ανάπτυξη της *Pe* και των δύο μεταλλαγμάτων της (*PeΔgac* και *PeΔhcnB*) φαίνεται πως δεν επηρεάζεται από τα βακτήρια *Erwinia carotovora carotovora* 15 και *E. coli*. Όσον αφορά την *E. coli*, φαίνεται πως η ανάπτυξή του επηρεάζεται από την *Pe*, σύμφωνα με την μείωση που παρατηρούμε. Αντίθετα, τα δύο μεταλλάγματα δε φαίνεται να έχουν κάποια επίδραση στην ανάπτυξη της *E. coli*. Από τα παραπάνω μπορούμε να συμπεράνουμε πως η *Pe* μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη της *E. coli*, αλλά αυτή η σχέση δε φαίνεται να επηρεάζεται ή να εξαρτάται από το υδροκυάνιο.

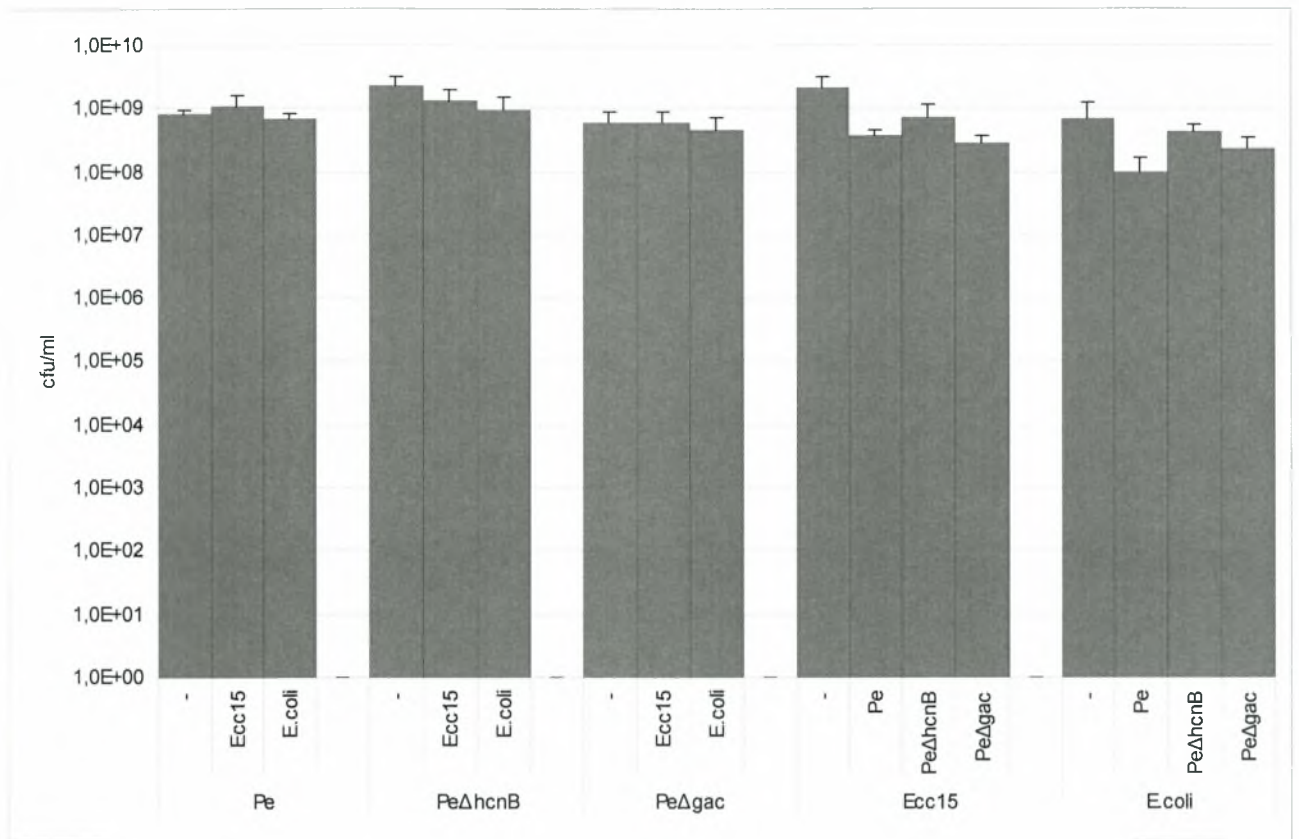
Η *Erwinia carotovora carotovora* 15 αναπτύσσεται κανονικά παρουσία της *Pe* και της *PeΔhcnB*, αν και παρατηρούμε μια αξιοσημείωτη μείωση της ανάπτυξης της παρουσία του μεταλλαγμένου στελέχους *PeΔgac*. Το σύστημα *GacA/GacS* έχει όπως αναφέραμε επαγωγική δράση, αφού είναι υπεύθυνο για την παραγωγή γονιδίων που σχετίζονται με τον δευτερογενή μεταβολισμό. Είναι πιθανό όμως να δρα και σαν καταστολέας για μια άλλη ομάδα γονιδίων, που να είναι επίσης υπεύθυνη για την παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών. Έτσι όταν το *GacA/GacS* σύστημα βρίσκεται υπό καταστολή, όπως στην περίπτωση του μεταλλάγματος *PeΔgac*, τα γονίδια που κατέστρεψε μπορούν πλέον να μεταγραφούν και να παραχθούν έτσι οι «άγνωστοι» δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι μεταβολίτες αυτοί θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνοι για την μειωμένη ανάπτυξη που παρατηρούμε στην *Erwinia carotovora carotovora* 15, όταν αναπτύσσεται σε συγκαλλιέργεια με το μετάλλαγμα *PeΔgac*.



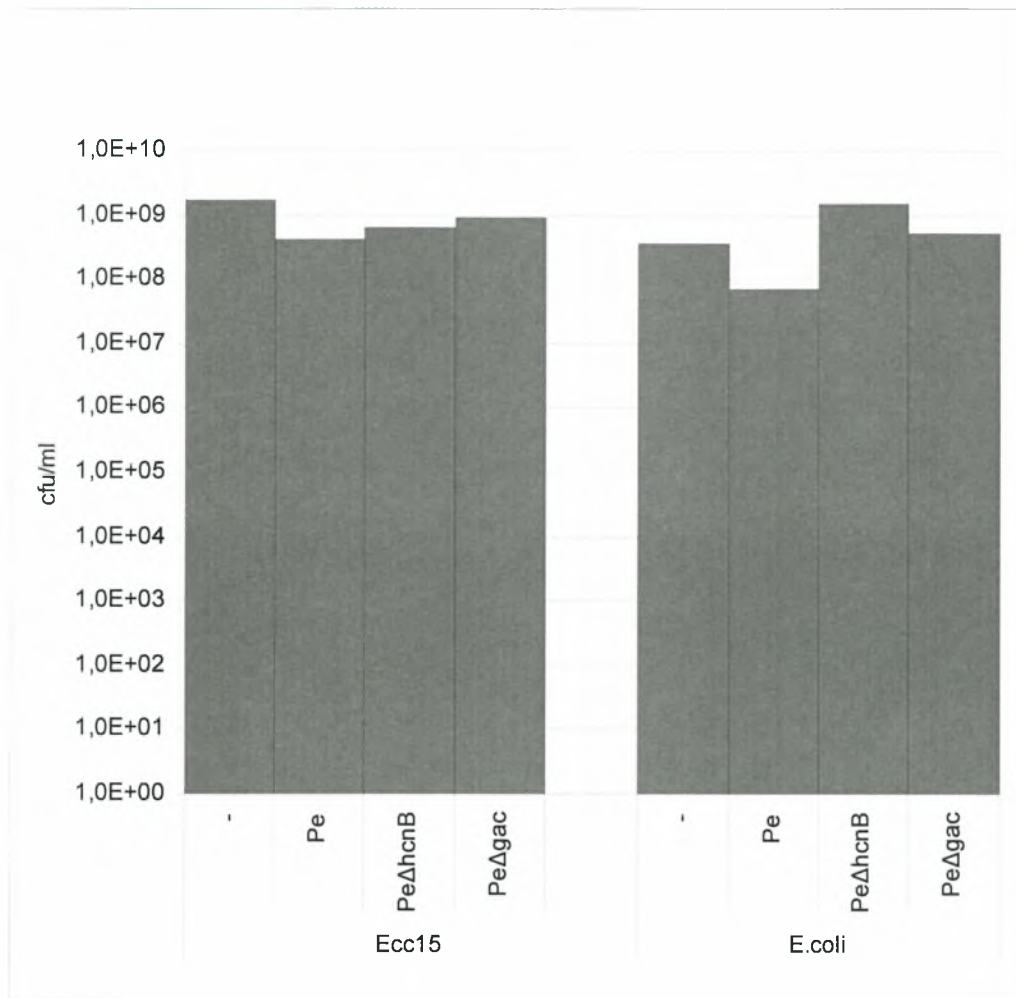
ΕΙΚΟΝΑ 35: Μελέτη του ανταγωνισμού μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου 1. Η *Pe* επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη της *E. coli*, αλλά αυτή η αλληλεπίδραση δε φαίνεται να εξαρτάται από το υδροκυάνιο.

Στο δεύτερο πρωτόκολλο, όλες οι καλλιέργειες control και οι συγκαλλιέργειες ξεκίνησαν με τον ίδιο αριθμό κυττάρων, δηλαδή $5 \cdot 10^6$ cfu/ml. Η μέτρηση των cfu/ml έγινε δύο φορές μετά από 24 και 48 ώρες. Στην εικόνα 36 φαίνεται η μέτρηση μετά από 24 ώρες. Η ανάπτυξη της *E. coli* επηρεάζεται από την παρουσία της *Pe*, αλλά όχι από την παρουσία των άλλων στελεχών. Η μείωση που παρουσιάζεται στην ανάπτυξη της *E. coli* δεν εξαρτάται από το υδροκυάνιο, αφού στη συγκαλλιέργεια της *E. coli* με το μετάλλαγμα *PeΔhcnB* δεν παρατηρείται μείωση της ανάπτυξης. Η ανάπτυξη της *Erwinia carotovora carotovora 15* είναι μειωμένη όταν αναπτύσσεται με *Pe* άγριου τύπου ή με το μετάλλαγμα *PeΔgac*. Ωστόσο η ανάπτυξη της δεν επηρεάζεται κατά την παρουσία του μεταλλάγματος *PeΔhcnB*. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως η *Pe* έχει την ικανότητα να αναστέλλει την ανάπτυξη της *Erwinia carotovora carotovora 15*, αλλά αυτή η ικανότητα δεν εξαρτάται από το υδροκυάνιο.

Στη συνέχεια πήραμε μια μέτρηση 48 ώρες μετά την επώαση των στερεών καλλιεργειών. Στην εικόνα 37 φαίνονται τα αποτελέσματα της μέτρησης. Και εδώ παρατηρούμε πως η ανάπτυξη της *Erwinia carotovora carotovora 15* και της *E. coli* αναστέλλονται από την παρουσία της *Pe*. Ωστόσο δεν φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά, όταν αναπτύσσονται παρουσία των δύο μεταλλαγμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να επαληθευτούν με περισσότερες μετρήσεις.



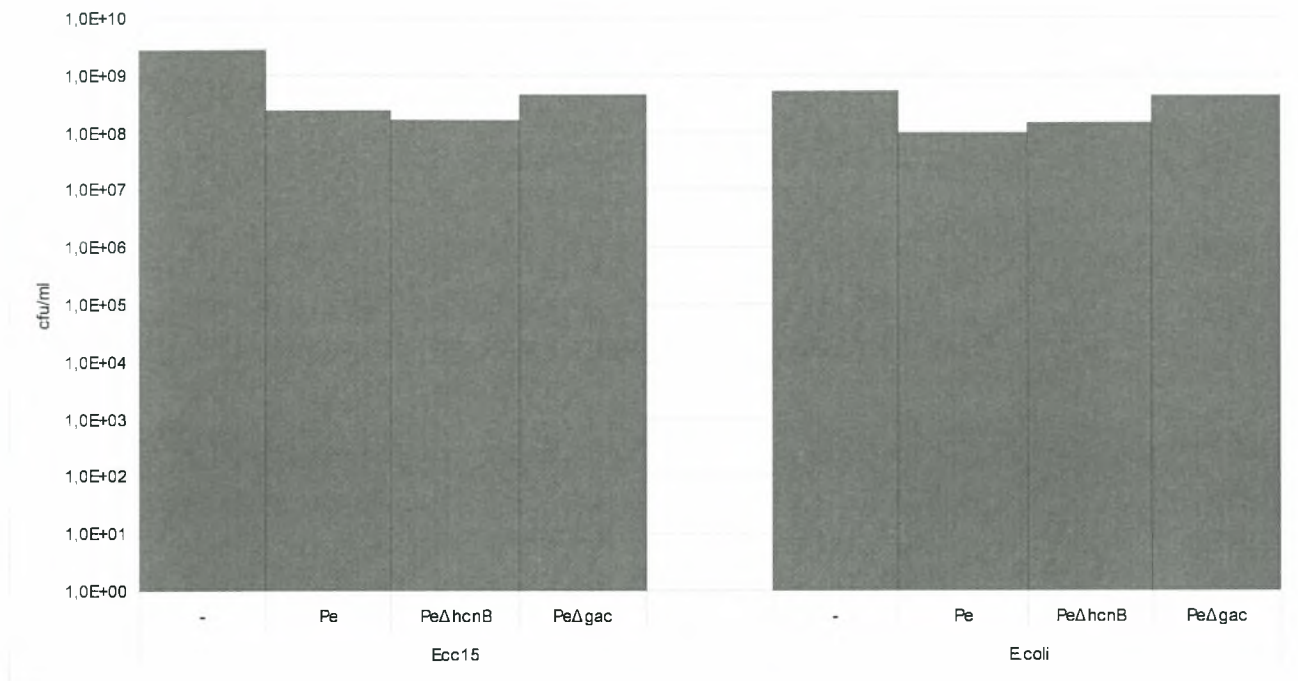
ΕΙΚΟΝΑ 36: Μελέτη του ανταγωνισμού μετά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου 2. Η *Pe* επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη της *E. coli*, αλλά όχι και της *Ecc15*.



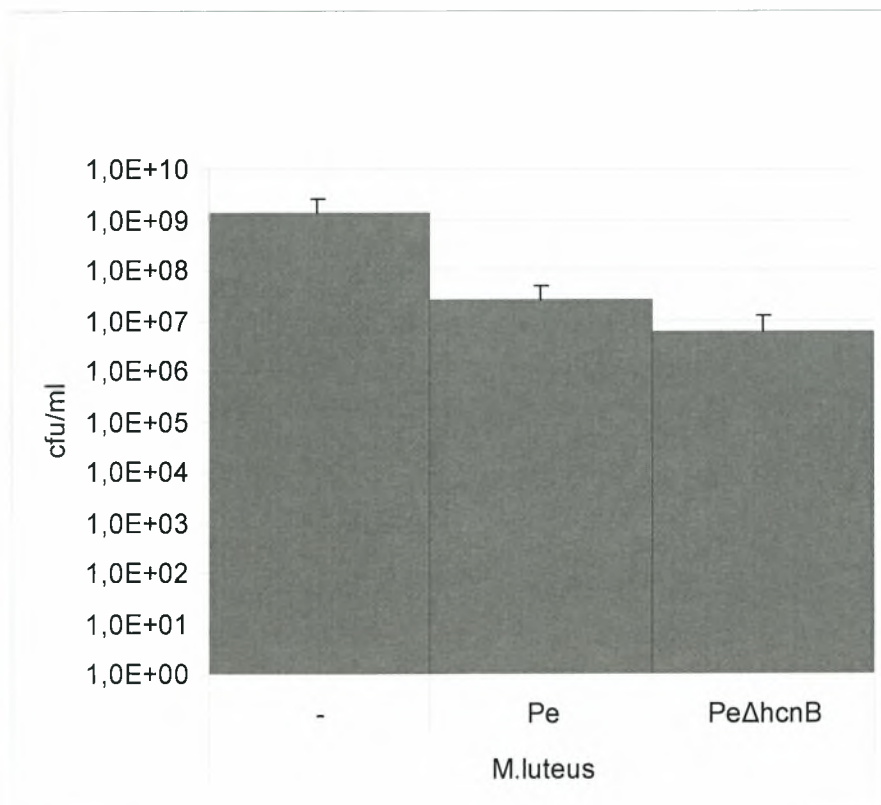
ΕΙΚΟΝΑ 37: Μέτρηση των αποικιών μετά από επώαση 48 ωρών.

Η ανάπτυξη των στελεχών *Erwinia carotovora carotovora 15* και *E. coli* μελετήθηκε και σε συγκαλλιέργειες με τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών *Pe*, *PeΔgac* και *PeΔhcnB*. Όπως φαίνεται στην εικόνα 38, η ανάπτυξη τους επηρεάζεται και παρουσία των υπερκειμένων. Η δοκιμασία με τα υπερκείμενα έγινε μόνο μια φορά και γι' αυτό πρέπει να επαναληφθεί για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα.

Η τελευταία δοκιμασία ανταγωνισμού έγινε για τη μελέτη της ανάπτυξης του Gram θετικού βακτηρίου *Micrococcus luteus*. Η δοκιμασία αυτή έγινε δύο φορές μόνο με το πρώτο πρωτόκολλο, όπου όλες οι καλλιέργειες ξεκίνησαν με την ίδια οπτική πυκνότητα 0,1. Η ανάπτυξη του *Micrococcus luteus* μελετήθηκε παρουσία των στελεχών *Pe* και *PeΔhcnB*. Στην εικόνα 39 βλέπουμε ότι η *Pe* ανταγωνίζεται σημαντικά την ανάπτυξη του *M. luteus*, αλλά το υδροκυάνιο δε φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο σε αυτό τον ανταγωνισμό. Η διαδικασία είναι απαραίτητο να επαναληφθεί, εφαρμόζοντας και το δεύτερο πρωτόκολλο, δηλαδή να ξεκινούν όλες οι καλλιέργειες με $5 \cdot 10^6$ cfu/ml.



ΕΙΚΟΝΑ 38: Μελέτη ανταγωνισμού παρουσία υπερκειμένων. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε μόνο μια φορά.



ΕΙΚΟΝΑ 39: Η Pe επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη του *M. luteus*. Η πρώτη στήλη αντιπροσωπεύει την ανάπτυξη του *M. luteus* σε καλλιέργεια control, ενώ οι υπόλοιπες δύο είναι οι συγκαλλιέργειες του *M. luteus*.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η *P. entomophila* είναι το μόνο βακτηριακό στέλεχος του γένους *Pseudomonas*, που είναι αποδεδειγμένο ότι εμφανίζει παθογένεια στην *Drosophila melanogaster*. Η *P. entomophila*, όπως αποδείχτηκε το 2009 από τους Ryall et al., έχει την ικανότητα να παράγει υδροκυάνιο. Το υδροκυάνιο αποτελεί δευτερογενή μεταβολίτη, που παράγεται κατά τη μετάβαση από την εκθετική φάση στη φάση στασιμότητας. Η παραγωγή του υδροκυανίου απαιτεί μικροαεροφιλικές συνθήκες, γι' αυτό και η παραγωγή του είναι μεγαλύτερη στις στερεές καλλιέργειες της *P. entomophila* σε σχέση με τις υγρές.

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε για να μελετηθεί η συμβολή του υδροκυανίου, που παράγεται από την *P. entomophila*, στην εντομοπαθογένεια του συγκεκριμένου βακτηριακού στελέχους και πιο ειδικά, στην *D. melanogaster*. Από την βιβλιογραφία γνωρίζουμε πως το είδος *P. fluorescens*, που έχει επίσης την ικανότητα να παράγει υδροκυάνιο ως προϊόν του δευτερογενούς μεταβολισμού, έχει βρεθεί πως επηρεάζει την ανάπτυξη κάποιων πρωτόζωων. Τα πρωτόζωα είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, που παίζουν σημαντικό ρόλο στον κύκλο του αζώτου (N) και του άνθρακα (C) στο έδαφος και επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη των βακτηριακών κοινοτήτων. Για να μπορέσουν τα βακτήρια να ανταγωνιστούν τα πρωτόζωα στο ίδιο ενδιαίτημα, παράγουν τοξικούς μεταβολίτες. Το υδροκυάνιο που παράγει η *P. fluorescens* είναι ένας από αυτούς, αφού έχει αποδειχθεί πως συμμετέχει στην αναστολή της ανάπτυξης κάποιων πρωτόζωων. Μεταλλάγματα της *P. fluorescens* που δεν είχαν την ικανότητα να συνθέτουν υδροκυάνιο, έχαναν επίσης και την ικανότητά τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη των πρωτόζωων, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να αναπτυχθούν οι ίδιοι οι βακτηριακοί πληθυσμοί (Valverde et al., 2006).

Το 2001 οι Gallagher και Manoil αποκάλυψαν πως το στέλεχος *P. aeruginosa* PAO1 μπορεί να προκαλέσει παράλυση και να σκοτώσει τον νηματώδη *Caenorhabditis elegans*. Το υδροκυάνιο που παρήγαγε η *P. aeruginosa* PAO1 ήταν ο υπεύθυνος τοξικός παράγοντας, που προκαλούσε την παράλυση στον *Caenorhabditis elegans*, μέσω αναστολής της κυτοχρωμικής οξειδάσης.

Πρόσφατες μελέτες πάνω στην *P. fluorescens* (Devi and Kothamasi, 2009) αποκάλυψαν ένα σημαντικό ρόλο του υδροκυανίου στην παθογένεια αυτού του στελέχους. Συγκεκριμένα, το υδροκυάνιο που παράγει η *P. fluorescens* μπορούσε να αναστείλει την οξειδάση του κυτοχρώματος c της αναπνευστικής αλυσίδας των τερμιτών *Odontotermes*. Έτσι η *P. fluorescens* μπορούσε να σκοτώσει τους τερμίτες μέσω δηλητηρίασης με το υδροκυάνιο, χωρίς να χρειάζεται να τους μολύνει μέσω φυσικής μόλυνσης.

Η μελέτη του ρόλου του υδροκυανίου στην παθογένεια της *D. melanogaster* έκρινε αρχικά απαραίτητη τη δημιουργία ενός μεταλλαγμένου στελέχους *P. entomophila*, το οποίο να μην έχει την ικανότητα παραγωγής υδροκυανίου. Ήταν ήδη γνωστό από το 2006 από τη μελέτη των Vodovar et al., πως στο γένος *Pseudomonas* υπάρχει ένα οπερόνιο αποτελούμενο από τρία γονίδια, που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή υδροκυανίου. Τα γονίδια αυτά, γνωστά και ως *hcnABC*, κωδικοποιούν για την συνθάση του υδροκυανίου. Αρχικός μας στόχος ήταν να απενεργοποιήσουμε το γονίδιο *hcnB* και στη συνέχεια να μελετήσουμε την παθογένεια του μεταλλάγματος.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε για την δημιουργία του μεταλλάγματος ήταν διάσπαση του γονιδίου μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο μεταλλαξιγένεσης μας έδωσε τη δυνατότητα να διασπάσουμε το γονίδιο *hcnB* με τη χρήση του φορέα rINT. Για να επιβεβαιώσουμε τον φαινότυπο του μεταλλάγματος *PeΔhcnB* χρειάστηκε να χρησιμοποιήσουμε το Merckoquant Cyanide Test (Merck), το οποίο μετρά ιόντα CN⁻, δίνοντας μια ημιποσοτική εκτίμηση. Πράγματι, ο φαινότυπος του μεταλλάγματος επιβεβαιώθηκε, αφού η μέτρηση με το kit δεν ανίχνευσε ιόντα CN⁻.

Έχοντας πλέον στην κατοχή μας το μεταλλαγμένο στέλεχος *PeΔhcnB*, αλλά και τον άγριο τύπο *P. entomophila* πραγματοποιήσαμε διάφορες βιολογικές, αλλά και μοριακές δοκιμές για να μελετήσουμε το ρόλο του υδροκυανίου ως τοξικού παράγοντα.

Το πρώτο ερώτημα που θέσαμε ήταν αν το υδροκυάνιο μπορεί να αποτελέσει ανασταλτικό παράγοντα αύξησης για την ίδια την *P. entomophila* που το παράγει. Από την σύγκριση του άγριου τύπου και του μεταλλαγμένου στελέχους ανιχνεύουμε κάποια διαφορά όσον αφορά το μέγεθος *PeΔhcnB*, αφού φαίνεται πως μπορεί να φτάσει σε υψηλότερες κυτταρικές συγκεντρώσεις σε σχέση με τον άγριο τύπο, στο ίδιο χρονικό σημείο. Η διαφορά αυτή πιθανότατα οφείλεται στο διαφορετικό μεταβολικό φορτίο που φέρει το μεταλλαγμένο στέλεχος σε σχέση με τον άγριο τύπο. Ο άγριος τύπος

που συνθέτει υδροκυάνιο πρέπει παράλληλα να παράγει και τις πρωτεΐνες ροδανάση και οξειδάση μη-ευαίσθητη στο υδροκυάνιο (CIO). Η παραγωγή αυτών των δύο επιπρόσθετων πρωτεϊνών απαιτεί και την κατανάλωση περισσότερης ενέργειας από το βακτήριο. Αντίθετα οι δυο αυτές πρωτεΐνες δεν είναι απαραίτητες για το *PeDhcnB*, αφού δεν συνθέτει υδροκυάνιο.

Για να προσδιορίσουμε την μολυσματικότητα του μεταλλάγματος *PeDhcnB* στη *Drosophila* χρησιμοποιήσαμε εκτός από το παραπάνω μεταλλαγμένο στέλεχος και τα στελέχη *Pe3174/5521* και *PeaprA/5521*. Οι δοκιμασίες έγιναν τόσο σε προνύμφες, όσο και σε ενήλικα άτομα. Η εικόνα που έχουμε για τις προνύμφες δεν είναι ξεκάθαρη, αφού η *Pe* και η *PeDhcnB* εμφανίζουν την ίδια τοξικότητα. Μελλοντικές επαναλήψεις της διαδικασίας με τη χρήση μόνο των υπερκειμένων των βακτηριακών καλλιεργειών, ίσως δώσουν μια πιο σαφή και ξεκάθαρη εικόνα για το ρόλο του υδροκυανίου.

Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμών που εφαρμόστηκαν στα ενήλικα άτομα *Drosophila* δείχνουν πως ο ρόλος του υδροκυανίου ίσως δεν είναι τόσο κρίσιμος στη διαδικασία της μολυσματικότητας της *P.entomophila* στα έντομα. Η διαφορά μεταξύ *Pe* και *PeDhcnB*, αν υπάρχει, θα πρέπει να διερευνηθεί με περισσότερες επαναλήψεις των βιολογικών δοκιμών, αλλά και με στατιστικές αναλύσεις, που θα μπορέσουν να ανιχνεύσουν αν το υδροκυάνιο αποτελεί βασικό παράγοντα μόλυνσης. Όσον αφορά τα διπλά μεταλλάγματα, αξίζει να σημειωθεί η διαφορά που παρατηρήθηκε μεταξύ του *PeDaprA*, που είναι γνωστό πως έχει μειωμένη ικανότητα μόλυνσης, και του *PeDaprA/5521*. Παρόλα αυτά για να είμαστε σίγουροι πως η διαφορά που βλέπουμε είναι πραγματική και όχι αποτέλεσμα τυχαίων πειραματικών λαθών, θα πρέπει να επαναλάβουμε τη διαδικασία με το συγκεκριμένο διπλό μετάλλαγμα και να κάνουμε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Η τελευταία δοκιμασία περιελάμβανε πιθανούς ανταγωνιστές της *P.entomophila*. Η ταυτόχρονη ανάπτυξη της *P.entomophila* με την *Erwinia carotovora carotovora 15 (Ecc15)* έδειξε πως η *Ecc15* δεν επηρεάζεται από την παρουσία της *Pe*. Η ανάπτυξή της παραμένει στα ίδια επίπεδα με αυτά που εμφανίζει όταν αναπτύσσεται μόνη της σε υγρό θρεπτικό μέσο. Αποτελέσματα όμως που αξίζει να σημειωθούν είναι αυτά που προέκυψαν από την ταυτόχρονη ανάπτυξη της *P.entomophila* με την *E. coli* και το *M. luteus*, αντίστοιχα. Η *P.entomophila* προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης των δύο άλλων βακτηριακών στελεχών, η οποία όμως δεν φαίνεται να εξαρτάται από το υδροκυάνιο. Η μεγαλύτερη

αναστολή ανάπτυξης παρατηρείται ωστόσο στην ταυτόχρονη ανάπτυξη της *P.entomophila* με το στέλεχος *M. luteus*.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει πως ο ρόλος του υδροκυανίου δε φαίνεται να είναι τόσο κρίσιμος για την παθογένεια που εμφανίζει η *P.entomophila* στην *D.melanogaster*. Είναι ευρέως αποδεκτό πως η μολυσματικότητα της *P.entomophila* είναι πολυπαραγοντική. Δε γνωρίζουμε όμως ακόμα σε ποιο βαθμό και σε τι ποσοστό συμμετέχει ο κάθε παράγοντας τοξικότητας. Έτσι είναι πιθανό όταν «αφαιρούμε» έναν από τους παράγοντες, που στην προκειμένη περίπτωση είναι το υδροκυάνιο, οι υπόλοιποι παράγοντες να είναι αρκετοί για να προκαλέσουν τον ίδιο βαθμό παθογένειας, όπως και ο άγριος τύπος. Με άλλα λόγια το υδροκυάνιο μπορεί να συμμετέχει στην εντομοπαθογένεια, αλλά όχι σε βαθμό που να το καθιστά απαραίτητο για την παραμονή και τον πολλαπλασιασμό της *P.entomophila* μέσα στο έντομο. Περαιτέρω αναλύσεις είναι δυνατό να αποκαλύψουν τη συμμετοχή και τον ακριβή ρόλο του υδροκυανίου στην εντομοπαθογένεια.

Το υδροκυάνιο αποτελεί ένα σημαντικό τοξικό παράγοντα, που βοηθά τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* να ανταπεξέλθουν στο περιβάλλον που αποικίζουν κάθε φορά. Η σύνθεσή του προσφέρει ένα σπουδαίο πλεονέκτημα στους μικροοργανισμούς, αφού μπορούν να το χρησιμοποιήσουν για να ανταγωνιστούν τους άρπαγες που υπάρχουν στο ίδιο περιβάλλον ή για να μολύνουν ξενιστές που θα τους «χρησιμοποιήσουν» για να μπορέσουν να επιβιώσουν. Η μελέτη του λοιπόν μπορεί να αποκαλύψει τις ιδιότητες των μικροοργανισμών που το συνθέτουν, καθώς και τη συμβολή του στην παθογένεια που εμφανίζουν τα συγκεκριμένα βακτήρια σε διάφορους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Altier C, Suyemoto M, Ruiz AI, Burnham KD, Maurer R.(2000) Characterization of two novel regulatory genes affecting Salmonella invasion gene expression. Mol Microbiol **35**:635-646
- Askeland R. and Morrison S., (1983) Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Env Microbiol **45**: 1802- 1807
- Blumer C, Heeb S, Pessi G, Haas D.(1999) Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. PNAS **96**: 14073-8.
- Blumer C. and Dieter Haas, (2000) Mechanism, regulation and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. Arch. Microbiol **173**: 170-177
- Bode HB, (2009). Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. Curr Opin Chem Biol **13**: 224-230
- Broderick KE, Chan A, Balasubramanian M, Feala J, Reed SL, Panda M, Sharma VS, Pilz RB, Bigby TD, Boss GR, (2008) Cyanide produced by human isolates of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to lethality in *Drosophila melanogaster*, JID **197**
- Carterson AJ, Morici LA, Jackson DW, Frisk A, Lizewski SE, Jupiter R, Simpson K, Kunz DA, Davis SH, Schurr JR, Hassett DJ, Schurr MJ, (2004) The transcriptional regulator AlgR controls cyanide production in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol **186**: 6837-6844
- Castric P.A, (1977) Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. J Bacteriol **130**:826-831
- Castric P. A., Ebert R.F., Castric K.F, (1979) The relationship between growth phase and cyanogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Curr. Microbiol **2**: 287-292
- Cody WL, Pritchett CL, Jones AK, Carterson AJ, Jackson D, Frisk A, Wolfgang MC, Schurr MJ.(2009) *Pseudomonas aeruginosa* AlgR controls cyanide production in an AlgZ-dependent manner. J Bacteriol **191**: 2993-3002.
- Cooper M, Tavankar GR, Williams HD.(2003) Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa*.Microbiol, **149**: 1275-84
- Devi KK and Kothamasi D, 2009. *Pseudomonas fluorescens* CHA0 can kill subterranean termite *Odontotermes obesus* by

- inhibiting cytochrome c oxidase of the termite respiratory chain. *FEMS Microbiol Lett.* **300**: 195-200
- Gallagher L. and Manoil C., (2001) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *J Bacteriol* **183**: 6207-6214
 - Gooderham WJ and Hancock RE, (2009) Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 279-294
 - Imler JL., Bulet P., (2005) Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem. Immunol. Allergy* **86**: 1-21
 - Jousset A., Lara E., Wall L., Valverde C., (2006) Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Appl Env Microbiol* **72**:7083-7090
 - Knowles CJ, Bunch AW, (1986) Microbial cyanide metabolism. *Adv. Microb. Physiol* **27**: 73-111
 - Lapouge K., Schubert M., Frederic HT., Haas DA., (2008) Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behavior. *Molecular Microbiol* **67**: 241-53
 - Laville J, Blumer C, Von Schroetter C, Gaia V, Défago G, Keel C, Haas D, (1998) Characterization of the *hcnABC* gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol* **180**: 3187-96.
 - Lemaitre B, Hoffmann J (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Ann Rev Immunol* **25**: 697-743.
 - Leulier F., Parquet C., Pili-Floury S., Ryu JH., Caroff M., (2003) The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat. Immunol* **4**: 478-484
 - Liehl P., Blight M., Vodovar N., Boccard F., Lemaitre B., (2006) Prevalence of local immune response against oral infection in a *Drosophila/Pseudomonas* infection model. *PLoS Pathog* **2**: 551-561
 - Papagiannoulis A., Mathiopoulos K.D., Mossialos D., (2009) Molecular detection of the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* using PCR, *Lett in Appl Microbiol*
 - Pessi G. and Haas D., (2000) Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhIR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**:6940-6949

- Pessi G, Haas D.(2001). Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. FEMS Microbiol Lett **200**: 73-8.
- Ryall B., Mitchell H., Mossialos D., Williams H.D, (2009) Cyanogenesis by the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila*, Lett Appl Microbiol **49**: 131-135
- Vodovar N., Vinals M., Liehl P., Basset A., Degrouard J., Spellman P., Boccard F., Lemaitre B., (2005) *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. PNAS **102**: 11414-11419
- Vodovar N., Vallenet D., Cruveiller S., Rouy Z., Barbe V., Acosta C., Cattolico L., Jubin C., Lajus A., Segurens B., Vacherie B., Wincker P., Weissenbach J., Lemaitre B., Medigue C., Boccard F., (2006) Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. Nat Biotechnol **24**: 673-679
- Whittle G, Bloomfield GA, Katz ME, Cheetham BF.(1999) The site-specific integration of genetic elements may modulate thermostable protease production, a virulence factor in *Dichelobacter nodosus*, the causative agent of ovine footrot. Microbiol **145**: 2845-55.
- Winteler HV, Haas D,.(1996) The homologous regulators ANR of *Pseudomonas aeruginosa* and FNR of *Escherichia coli* have overlapping but distinct specificities for anaerobically inducible promoters. Microbiol **142**: 685-93.
- Zlosnik JE and Williams HD, (2004). Methods for assaying cyanide in bacterial culture supernatant. Lett Appl Microbiol **38**: 360-365
- Zlosnik J., Tanvankar G., Bundy J., Mossialos D., O'Toole R., Williams H.D, (2006) Investigation of the physiological relationship between the cyanide-insensitive oxidase and cyanide production in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol **152**: 1407-1415