

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ -
ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ»



“Συμβολή των γονιδίων *retS* και *ladS* στη ρύθμιση της
εντομοπαθογένειας της *Pseudomonas entomophila*”



Κουτσού Ιωάννα

Λάρισα 2014

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

“Συμβολή των γονιδίων *retS* και *ladS* στη ρύθμιση της
εντομοπαθογένειας της *Pseudomonas entomophila*”

"Contribution of *retS* and *ladS* genes in regulation of
entomopathogenicity of *Pseudomonas entomophila*"

ΚΟΥΤΣΟΥ ΙΩΑΝΝΑ

Μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής :

Μόσιαλος Δημήτριος : Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας
Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μαρκουλάτος Παναγιώτης : Καθηγητής Εφαρμοσμένης
Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του τμήματος Βιοχημείας
& Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Καρπούζας Δημήτριος : Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής
Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΛΑΡΙΣΑ 2014

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα επίκουρο καθηγητή κύριο Μόσιαλο Δημήτριο, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, που με εμπιστεύτηκε για μία ακόμη φορά και μου ανάθεσε την παρούσα διπλωματική εργασία, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την βοήθεια και την καθοδήγησή του, τις πολύτιμες συμβουλές του τόσο στην εκτέλεση του πειράματος όσο και στη σύνταξη της συγγραφής του.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κύριο Μαρκουλάτο Παναγιώτη, καθηγητή του Π.Θ. και κύριο Καρπούζα Δημήτριο, επίκουρο Καθηγητή του Π.Θ.

Δεν θα μπορούσα να ξεχάσω το προσωπικό του εργαστηρίου ιολογίας και μικροβιολογίας, για την βοήθειά τους στην υλοποίηση του πειράματος και ιδιαίτερες ευχαριστίες στην Νικολούλη Κατερίνα, που δεν θα τα είχα καταφέρει χωρίς την πολύτιμη βοήθειά της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τους γονείς μου αλλά και την αδερφή μου, για την αμέριστη ψυχολογική, ηθική και οικονομική τους στήριξη σε ολόκληρη την πορεία μου ως φοιτήτρια και θα ήθελα να τους αφιερώσω ολόψυχα αυτήν την εργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
Abstract.....	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Βακτήρια του γένους <i>Pseudomonas</i>	8
1.2. <i>Pseudomonas entomophila</i>	12
1.3. Δομή του γονιδιώματος.....	15
1.4. Παθογένεια.....	18
1.5. Τα γονίδια <i>retS</i> & <i>ladS</i>	26
1.6. Μόλυνση της <i>Drosophila melanogaster</i> από την <i>P. entomophila</i>	32
1.7. Σκοπός της εργασίας.....	34
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
2.1. Βακτηριακά στελέχη και καλλιέργεια μικροοργανισμών.....	35
2.2. Προετοιμασία κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση.....	36
2.3. Δημιουργία των μεταλλαγμάτων <i>PeΔretS</i> και <i>PeΔladS</i>	37
2.3.1. Ενίσχυση των γονιδίων PSEEN4801 (<i>LadS</i>) και PSEEN4865 (<i>RetS</i>) της <i>P. entomophila</i> με ExTaq PCR (TAKARA).....	37
2.3.2. Κλωνοποίηση του PCR προϊόντος με p-GEM T-easy Cloning kit και επιβεβαίωση θετικών κλώνων με PCR.....	39
2.3.3. Απομόνωση των ενθεμάτων από τους θετικούς κλώνους με πέψη και πέψη του πλασμιδίου pINT.....	40
2.3.4. Αντίδραση δεσμάσης (ligation) και μετασχηματισμός.....	42
2.3.5. Επιβεβαίωση θετικού δείγματος με PCR και πέψη.....	43
2.3.6. Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. coli</i> S17 και επιβεβαίωση με PCR.....	44
2.3.7. Σύζευξη κυττάρων <i>E. coli</i> S17 και <i>Pseudomonas entomophila</i> wt.....	45
2.3.8. Επιβεβαίωση των <i>PeΔretS</i> και <i>PeΔladS</i> mutants με PCR.....	45
2.4. Δοκιμασία πρωτεάσης.....	48
2.5. Δοκιμασία σχηματισμού βιοφίλμ.....	49
2.6. Μόλυνση ενήλικων ατόμων <i>Drosophila melanogaster</i> (Βιοδοκιμές).....	50
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	54
3.1. Δημιουργία των μεταλλαγμάτων <i>PeΔretS</i> και <i>PeΔladS</i>	54
3.1.1. Ενίσχυση των γονιδίων PSEEN4801 (<i>LadS</i>) και PSEEN4865 (<i>RetS</i>) της <i>P. entomophila</i> με ExTaq PCR (TAKARA).....	54

3.1.2. Κλωνοποίηση του PCR προϊόντος με p-GEM T-easy Cloning kit και επιβεβαίωση θετικών κλώνων με PCR.....	54
3.1.3. . Απομόνωση των ενθεμάτων από τους θετικούς κλώνους με πέψη και πέψη του πλασμιδίου pINT.....	56
3.1.4. Επιβεβαίωση θετικού δείγματος με PCR και πέψη (δείγματα της αντίδρασης δεσμάσης μεταξύ pINT και γονιδίων μετά από μετασχηματισμό).....	57
3.1.5. Μετασχηματισμός κυττάρων <i>E. coli</i> S17 και επιβεβαίωση με PCR.....	58
3.1.6. Επιβεβαίωση των των <i>PeΔretS</i> και <i>PeΔladS</i> mutants με PCR (μετά τη σύζευξη).....	59
3.2. Δοκιμασία πρωτεάσης.....	59
3.3. Δοκιμασία σχηματισμού βιοφίλμ.....	62
3.4. Μόλυνση ενήλικων ατόμων <i>Drosophila melanogaster</i> (Βιοδοκιμές).....	65
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	67
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το βακτήριο *Pseudomonas entomophila* είναι ένα προσφάτως ανακαλυφθέν βακτήριο του εδάφους και μέχρι στιγμής, είναι το μόνο βακτήριο που ανήκει στο γένος *Pseudomonas* και βρέθηκε ότι μπορεί να μολύνει με φυσικό τρόπο τη *Drosophila melanogaster* αλλά και άλλα έντομα, οδηγώντας τα στο θάνατο. Η από του στόματος κατάποση του βακτηρίου από τον κύριο ξενιστή του, δηλαδή τη *Drosophila*, έχει σαν συνέπεια την επαγωγή συστηματικής ανοσολογικής απόκρισης στο πεπτικό σύστημα του εντόμου. Το ενδιαφέρον που παρουσιάζει το συγκεκριμένο βακτήριο είναι ότι δεν μολύνει μόνο τα ενήλικα άτομα της *Drosophila melanogaster* αλλά και τις προνύμφες, προκαλώντας μαζική καταστροφή των κυττάρων του εντέρου.

Οι μολυσματικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην εντομοπαθογένειά της είναι ποικίλοι ενώ οι μηχανισμοί δράσης τους πολύπλοκοι και σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστοι. Το βασικότερο σύστημα που ελέγχει την παθογένεια είναι το σύστημα *gacS/gacA*, το οποίο ρυθμίζεται και από δύο γονίδια – διακόπτες, τα *retS* και *ladS*. Τα δύο αυτά γονίδια, φαίνεται πως παίζουν ρόλο, όχι μόνο στην μολυσματικότητα αλλά και σε μια σειρά από άλλες διεργασίες, όπως η πρωτεόλυση και ο μακροχρόνιος αποικισμός. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η συμβολή των γονιδίων αυτών στη ρύθμιση της εντομοπαθογένειας που εμφανίζει η *Pseudomonas entomophila* στην *Drosophila melanogaster*, αλλά και σε ποιο βαθμό επηρεάζουν την πρωτεολυτική ικανότητα του βακτηρίου και την ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ.

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από δοκιμές στις οποίες χρησιμοποιήθηκε η αγρίου τύπου *Pseudomonas entomophila*, καθώς και τα μεταλλάγματα $\Delta retS$ και $\Delta ladS$, τα οποία είχαν χάσει την ικανότητα να εκφράζουν τα δύο αυτά γονίδια. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τα δύο αυτά γονίδια όντως εμπλέκονται ενεργά στις διεργασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω, έχοντας μάλιστα αντίθετους ρόλους, με το ένα να λειτουργεί επαγωγικά και το άλλο ανασταλτικά, σε καθεμιά από αυτές.

Abstract

Pseudomonas entomophila is a newly discovered soil bacterium and so far, the only bacterium belonging to *Pseudomonas* that it can infect naturally *Drosophila melanogaster* and other insects, leading to death. The oral ingestion of the bacterium from its main host, ie *Drosophila*, results in the induction of a systemic immune response in the digestive tract of the insect. The interesting fact about this bacterium is that not only infects adults of *Drosophila melanogaster*, but larvae as well, causing mass destruction of the intestinal cells.

The virulence factors which contribute in entomopathogenicity are varied, and the mechanisms of action complex and rather unclear. The main system controlling pathogenesis is the two-component regulatory system *gacS/gacA*, which is regulated by two genes - switches, *retS* and *ladS*. These two genes seem to play a role not only in infectivity but also in a series of other processes, such as proteolysis and persistent colonization. In the present study, we investigated the contribution of these genes in regulating entomopathogenicity demonstrated by *Pseudomonas entomophila* in *Drosophila melanogaster* and to what extent this affects the proteolytic ability of this bacterium and its ability to form biofilms.

More specifically, a series of tests were performed that used the wild type *Pseudomonas entomophila*, as well as the mutants strains $\Delta retS$ and $\Delta ladS$, which had lost the ability to express these two genes. The results showed that these two genes are indeed involved actively in the processes mentioned above, having even opposing roles, with the one operating inductive and the other inhibitory, in each of them.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βακτήρια του γένους *Pseudomonas*

Η ψευδομονάδα είναι ένα γένος Gram-αρνητικών αερόβιων γάμμα-πρωτεοβακτηρίων, που ανήκει στην οικογένεια *Pseudomonadaceae* και περιέχει 191 πλήρως αναγνωρισμένα είδη (Euzéby J.P., 1997). Τα μέλη του γένους επιδεικνύουν μεγάλη μεταβολική ποικιλότητα, και ως εκ τούτου είναι σε θέση να αποικίσουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων (Madigan M, 2005). Η ευκολία της καλλιέργειας *in vitro* και η διαθεσιμότητα ενός αυξανόμενου αριθμού αλληλουχημένων γονιδιωμάτων του γένους *Pseudomonas* έχει κάνει το γένος αυτό έναν εξαιρετικό αντικείμενο επιστημονικής έρευνας. Τα καλύτερα μελετημένα είδη περιλαμβάνουν την *P. aeruginosa* στο πλαίσιο του ρόλου της ως ευκαιριακό ανθρώπινο παθογόνο, το φυτο-παθογόνο *P. syringae*, το βακτήριο του εδάφους *P. putida*, και το βακτήριο που προωθεί την ανάπτυξη των φυτών *P. fluorescens*.

Λόγω της ευρείας εξάπλωσής τους στο νερό και στους σπόρους των φυτών, όπως δικοτυλήδονα, οι ψευδομονάδες παρατηρήθηκαν νωρίς στην ιστορία της μικροβιολογίας. Η γενική ονομασία *Pseudomonas* που δόθηκε στους οργανισμούς αυτούς ορίστηκε με ασαφή κριτήρια από τον Walter Migula το 1894 και το 1900 ως γένος Gram-αρνητικών, ραβδοειδούς σχήματος και με πολικά μαστίγια βακτηρίων και συγκρίθηκε με κάποια σποριωτικά είδη. Η τελευταία δήλωση αργότερα αποδείχθηκε εσφαλμένη και οφείλεται στη λανθασμένη διαθλαστική ικανότητα των κόκκων αποθεματικών υλικών. Παρά την ασαφή περιγραφή, το είδος *Pseudomonas pyocyanea*, αποδείχθηκε το κοντινότερο στην περιγραφή (Palleroni N.J, 2010).



Pseudomonas fluorescens

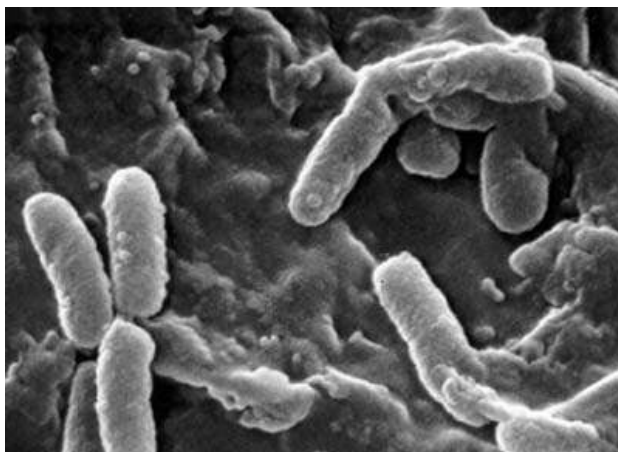
Όπως τα περισσότερα γένη βακτηριών, ο τελευταίος κοινός πρόγονος του γένους *Pseudomonas* έζησε εκατοντάδες εκατομμύρια χρόνια πριν. Είχαν αρχικά ταξινομηθεί στα τέλη του 19ου αιώνα, όταν εντοπίστηκαν για πρώτη φορά από τον Walter Migula. Η ετυμολογία του ονόματος δεν είχε καθοριστεί κατά τη χρονική στιγμή και εμφανίστηκε για πρώτη φορά στην 7η έκδοση του εγχειριδίου του Bergey (η κύρια αρχή της βακτηριακής ονοματολογίας) ως το ελληνικό *pseudes* (ψευδής) και *campe-* (μονάς / μονάδα) " μια ενιαία μονάδα ", το οποίο μπορεί να σημαίνει ψευδή μονάδα. Στη συνέχεια, ο όρος «μονάδα» χρησιμοποιήθηκε στην πρώιμη ιστορία της μικροβιολογίας για να υποδηλώσει μονοκύτταρους οργανισμούς. Σύντομα, άλλα είδη που ταιριάζουν κάπως στην αρχική περιγραφή του Migula και είχαν απομονωθεί από πολλά φυσικά υποστρώματα, είχαν λάβει το συνθετικό - *monas*. Ωστόσο, πολλά στελέχη έχουν έκτοτε αναταξινομηθεί, με βάση πιο πρόσφατες μεθοδολογίες και τη χρήση προσεγγίσεων που περιλαμβάνουν μελέτες των συντηρητικών μακρομορίων (Cornelis P, 2008).

Άλλα χαρακτηριστικά που τείνουν να συνδέονται με τα είδη *Pseudomonas* (με ορισμένες εξαιρέσεις), περιλαμβάνουν την έκκριση πυοβερδίνης, ενός φθορίζοντος κίτρινο-πράσινου σιδηροφόρου υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου. Ορισμένα είδη *Pseudomonas* μπορούν επίσης να παράγουν πρόσθετους τύπους χρωστικών, όπως πυοκυανίνης από *Pseudomonas aeruginosa* και θείοκινολομπακτίνης από *Pseudomonas fluorescens*. Είδη *Pseudomonas* επίσης δίνουν ένα θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμασία οξειδάσης και καταλάσης (Matthijs S, 2007).

Όλα τα είδη και τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* είναι Gram-αρνητικά ραβδία και έχουν ιστορικά χαρακτηριστεί ως αυστηρά αερόβιοι μικροοργανισμοί. Εξαιρέσεις σε αυτή την ταξινόμηση έχουν πρόσφατα ανακαλυφθεί σε βιοφίλμ ψευδομονάδων (Hassett D, 2002). Ένας

σημαντικός αριθμός των κυττάρων μπορούν να παράγουν εξωπολυσακχαρίτες που σχετίζονται με το σχηματισμό βιοφίλμ. Έκκριση εξωπολυσακχαρίτη όπως αλγινικό καθιστά δύσκολο για ψευδομονάδες να φαγοκυτταρώνονται από τα λευκά κύτταρα του αίματος των θηλαστικών. Παραγωγή εξωπολυσακχαρίτη συμβάλλει επίσης στον επιφανειακό σχηματισμό βιοφίλμ, πράγμα που δυσκολεύει την απομάκρυνσή τους από τις επιφάνειες παρασκευής τροφίμων. Η ανάπτυξη των ψευδομονάδων σε χαλασμένα τρόφιμα μπορεί να δημιουργήσει μια "φρουτώδη" οσμή.

Οι ψευδομονάδες έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν μια ποικιλία θρεπτικών συστατικών. Σε συνδυασμό με την ικανότητα να σχηματίζουν βιοφίλμ, είναι, ως εκ τούτου σε θέση να επιβιώσουν σε μια ποικιλία από απροσδόκητα ενδιαιτήματα. Μια απλή πηγή άνθρακα, όπως υπολείμματα σαπουνιού, είναι το κατάλληλο μέρος για να ευδοκιμήσουν. Άλλα απίθανα μέρη όπου έχουν βρεθεί περιλαμβάνουν αντισηπτικά, όπως ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου, και εμφιαλωμένο μεταλλικό νερό (Ryan KJ, 2004).



Pseudomonas aeruginosa

Όντας Gram-αρνητικά βακτήρια, τα περισσότερα στελέχη *Pseudomonas* είναι φυσικά ανθεκτικά στην πενικιλίνη και την πλειονότητα των σχετικών αντιβιοτικών βήτα-λακτάμης, αλλά ένας αριθμός είναι ευαίσθητα στην πιπερακιλλίνη, ιμιπενέμη, τικαρκιλλίνη ή σιπροφλοξασίνη. Αμινογλυκοζίδες όπως τομπραμυκίνη, γενταμυκίνη, αμικασίνη είναι άλλες επιλογές για θεραπεία.

Αυτή η ικανότητα να ευδοκιμούν σε σκληρές συνθήκες είναι αποτέλεσμα του σκληρού κυτταρικού τους τοιχώματος που περιέχει

πορίνες. Η αντοχή τους σε περισσότερα αντιβιοτικά αποδίδεται σε αντλίες εκροής, οι οποίες αντλούν έξω κάποια αντιβιοτικά πριν αυτά είναι σε θέση να δράσουν.

Η *Pseudomonas aeruginosa* αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως ένα αναδυόμενο ευκαιριακά παθογόνο κλινικής σημασίας. Ένα από τα πιο ανησυχητικά χαρακτηριστικά της *P. aeruginosa* είναι η χαμηλή ευαισθησία της σε αντιβιοτικά. Αυτή η χαμηλή ευαισθησία οφείλεται σε μια συντονισμένη δράση των αντλιών εκροής που κωδικοποιούνται στο χρωμόσωμα στελεχών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (π.χ. mexAB-OPRM, mexXY, κ.λπ.) καθώς και στη χαμηλή διαπερατότητα των βακτηριακών κυτταρικών φακέλων. Εκτός από την ενδογενή ανθεκτικότητα, η *P. aeruginosa* μπορεί εύκολα να αποκτήσει αντίσταση, είτε με μετάλλαξη σε γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ή από την οριζόντια μεταφορά γονιδίων. Ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε πολλά φάρμακα από την *P. aeruginosa*, απαιτεί πολλές διαφορετικές γενετικές εκδηλώσεις που περιλαμβάνουν την απόκτηση διαφορετικών μεταλλάξεων ή/και οριζόντια μεταφορά γονιδίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά. Ορισμένες πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει την φαινοτυπική αντοχή που σχετίζεται με το σχηματισμό βιοφίλμ ή την εμφάνιση παραλλαγών σε μικρές αποικίες και είναι σημαντικές στην απόκριση των πληθυσμών *P. aeruginosa* σε αγωγή με αντιβιοτικά (Van Eldere J, 2003).

Στα λοιμώδη είδη περιλαμβάνονται τα *P. aeruginosa*, *P. oryzihabitans*, και *P. plecoglossicida*. Η *P. aeruginosa* ευδοκιμεί σε νοσοκομειακά περιβάλλοντα και είναι ένα ιδιαίτερο πρόβλημα σε αυτό το περιβάλλον, δεδομένου ότι είναι η δεύτερη πιο κοινή λοίμωξη σε νοσοκομειακούς ασθενείς (νοσοκομειακές λοιμώξεις). Αυτή η παθογένεση μπορεί εν μέρει να οφείλεται στις πρωτεΐνες που εκκρίνονται από την *P. aeruginosa*. Το βακτήριο διαθέτει ένα ευρύ φάσμα συστημάτων έκκρισης, τα οποία εξάγουν πολυάριθμες πρωτεΐνες σχετικές με την παθογένεση των κλινικών στελεχών (Hardie, 2009).

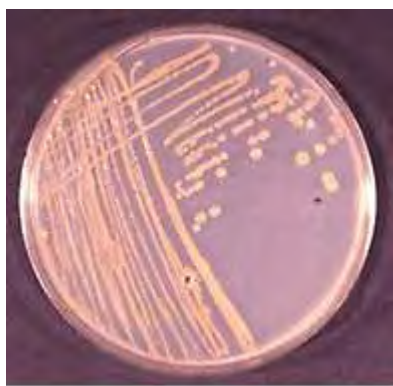
Η *P. syringae* είναι ένα παραγωγικό παθογόνο των φυτών. Υπάρχουν πάνω από 50 διαφορετικά στελέχη, πολλά από τα οποία επιδεικνύουν υψηλό βαθμό εξειδίκευσης φυτού-ξενιστή. Υπάρχουν πολλά άλλα είδη *Pseudomonas* που μπορεί να λειτουργήσουν ως παθογόνα φυτών, ιδίως όλα τα άλλα μέλη της υποομάδας *P. syringae*, αλλά η *P. syringae* είναι η πιο διαδεδομένη και καλύτερα μελετημένη. Αν και δεν είναι αυστηρά ένα παθογόνο των φυτών, η *P. tolaasii* μπορεί

να είναι ένα σημαντικό αγροτικό πρόβλημα, καθώς μπορεί να προκαλέσει βακτηριακή κηλίδα των καλλιεργούμενων μανιταριών (Brodey CL, 1991).

Ως αποτέλεσμα της μεταβολικής ποικιλομορφίας τους, την ικανότητα να αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες και την πανταχού παρούσα φύση, πολλά βακτήρια του γένους *Pseudomonas* μπορεί να προκαλέσουν αλλοίωση των τροφίμων. Ξεχωριστά παραδείγματα περιλαμβάνουν αλλοίωση γαλακτοκομικών από την *P. fragi* (Pereira, 1957), μούχλα στα αυγά που προκαλείται από *P. taetrolens* και *P. mudicolens* (Levine, 1932) και η *P. lundensis*, η οποία προκαλεί αλλοίωση του γάλακτος, του τυριού, του κρέατος και το ψαριού (Gennari, 1992).

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 και επιπλέον, είναι μέχρι στιγμής το μοναδικό γνωστό είδος που εμφανίζει παθογένεια στην *Drosophila melanogaster*, παρόλο που δεν έχει εκκριτικό σύστημα τύπου III (Vodovar et al., 2006, Papagiannoulis et al., 2009).



Pseudomonas entomophila

Η *Pseudomonas entomophila* είναι ένα Gram-αρνητικό βακτήριο που φέρει μαστίγια. Κάποιες από τις δομικές πρωτεΐνες του εκφράζονται από τρία γονίδια, PSEEN0141, PSEEN2177 και PSEEN3946 εμπλέκονται στην προσκόλληση στις επιφάνειες του ξενιστή και στην προώθηση του αποικισμού. Ο μεταβολισμός του περιλαμβάνει το μονοπάτι φωσφορικής πεντόζης, την οδό Entner-Doudoroff, τον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος και μία μη-ολοκληρωμένη οδό Embden-Meyerhof-Parnas λόγω της απουσίας της 6-φωσφοφρουκτοκινάσης. Το γονιδίωμα του κωδικοποιεί για υδρολυτικές δραστηριότητες, λιπάσες, πρωτεάσες, ένα σύνολο 19 μη χαρακτηρισμένων υδρολασών που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση των πολυμερών που βρίσκονται μέσα στο έδαφος. Το γονιδίωμα αυτού του βακτηρίου κωδικοποιεί επίσης για μια συνθάση υδροκυανίου (HCN).

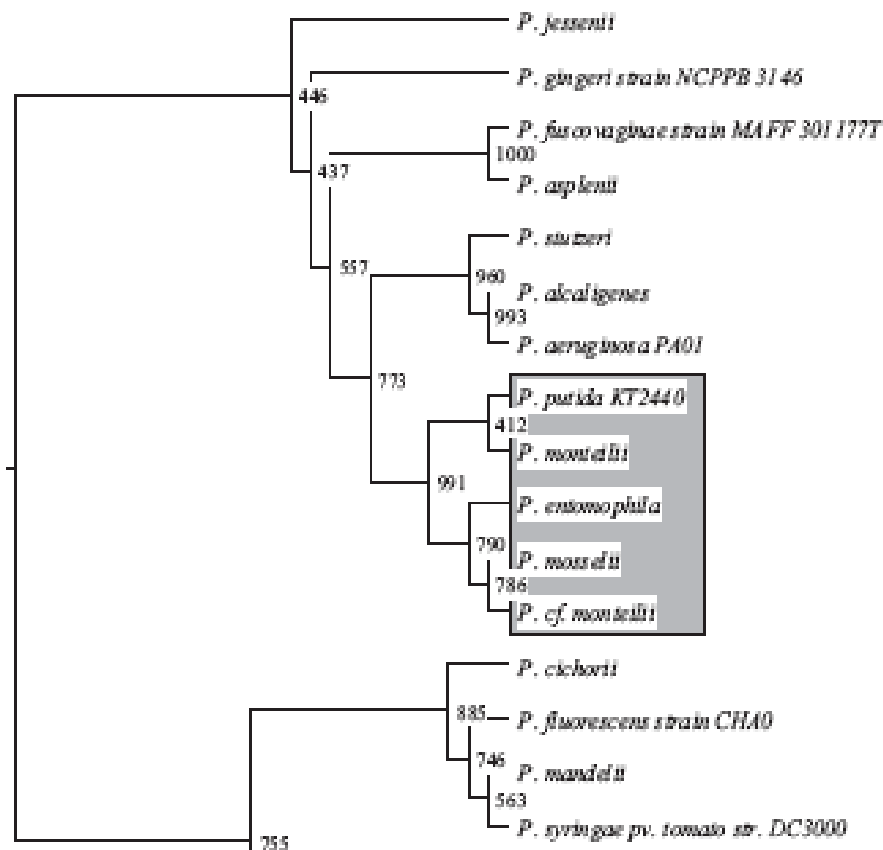
Το βακτήριο βρίσκεται σε ποικίλα περιβάλλοντα, όπως το έδαφος, το νερό, τη ριζόσφαιρα, και διαθέτει παθογόνο αλληλεπίδραση με τη *Drosophila melanogaster*. Η *D. melanogaster* διατηρεί ένα εχθρικό περιβάλλον για τα μικρόβια με την έκκριση αντιμικροβιακών παραγόντων, όπως λυσοζύμες και άλλα πεπτικά ένζυμα. Ωστόσο, το γονιδίωμα της *P. entomophila* περιέχει τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν καταλάσες, δύο δισμουτάσες υπεροξειδίου και υδροϋπεροξειδίου, τρεις αναγωγάσες και έντεκα γλουταθειόνη-δ-τρανσφεράσες, οι οποίες εμπλέκονται στην αντίσταση εναντίον αυτού του οξειδωτικού στρες που παράγεται από τη *D. melanogaster* με σκοπό να εμποδίσει τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων στον εντερικό σωλήνα (Vodovar et al., 2006).

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). Η χαρακτηριστική παθογένεια της *P. entomophila* σε έντομα, σε συνδυασμό με τη μη-παθογένειά της στα φυτά, υποδηλώνει μεγάλες δυνατότητες για τη δημιουργία ενός βιολογικού εντομοκτόνου στη γεωργία. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να στοχεύει αυστηρά μόνο έντομα ενώ είναι αβλαβής για τη ζωή των φυτών. Επίσης, το πλήρες γονιδίωμα της αποτελεί ένα είδος προτύπου για περαιτέρω μελέτες σε παθογόνες ιδιότητες και αλληλεπιδράσεις ξενιστή-παθογόνου (Vodovar et al., 2006).

DNA base composition, DNA-DNA hybridisation relatedness values and gene sequence similarities between *Pseudomonas entomophila* L48^T sp. nov. and closely related *Pseudomonas* species.

Bacterial strains	G+C content (mol%)	Reassociation (%) with labelled DNA from			Gene sequence similarities (%) with respect to strain L48 ^T	
		<i>P. entomophila</i> L48 ^T	<i>P. mosselii</i> ATCC BAA-99 ^T	<i>P. putida</i> IAM 1236 ^T	16S rRNA	MLSA
<i>P. entomophila</i> L48 ^T	60	100	48	51	100	100
<i>P. cremoricolorata</i> DSM 17059 ^T	62	18	32	28	98.7	91.2
<i>P. fulva</i> IAM 1529 ^T	60	18	35	35	98.3	91.0
<i>P. monteilii</i> ATCC 700476 ^T	61	23	45	46	99.7	93.2
<i>P. mosselii</i> ATCC BAA-99 ^T	63	27	100	23	99.8	95.5
<i>P. parafulva</i> DSM 17004 ^T	60	26	39	38	98.8	91.6
<i>P. plecoglossicida</i> ATCC 700383 ^T	63	27	39	45	99.7	94.2
<i>P. putida</i> IAM 1236 ^T	62	26	42	100	98.5	92.5
<i>P. taiwanensis</i> DSM 21245 ^T	63	36	51	48	99.7	93.0

Σύνθεση βάσεων DNA, τιμές συγγένειας DNA-DNA υβριδισμού και ομοιότητες γονιδιακής αλληλουχίας μεταξύ της *Pseudomonas entomophila* L48^T και στενά συναφή είδη ψευδομονάδας (Mulet et al., 2012).



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

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 (Νικολούλη, 2010).

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 (Νικολούλη, 2010).

1.3 Δομή του γονιδιώματος

Η πλήρης αλληλούχηση του γονιδιώματος της *P. entomophila* ολοκληρώθηκε το 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.

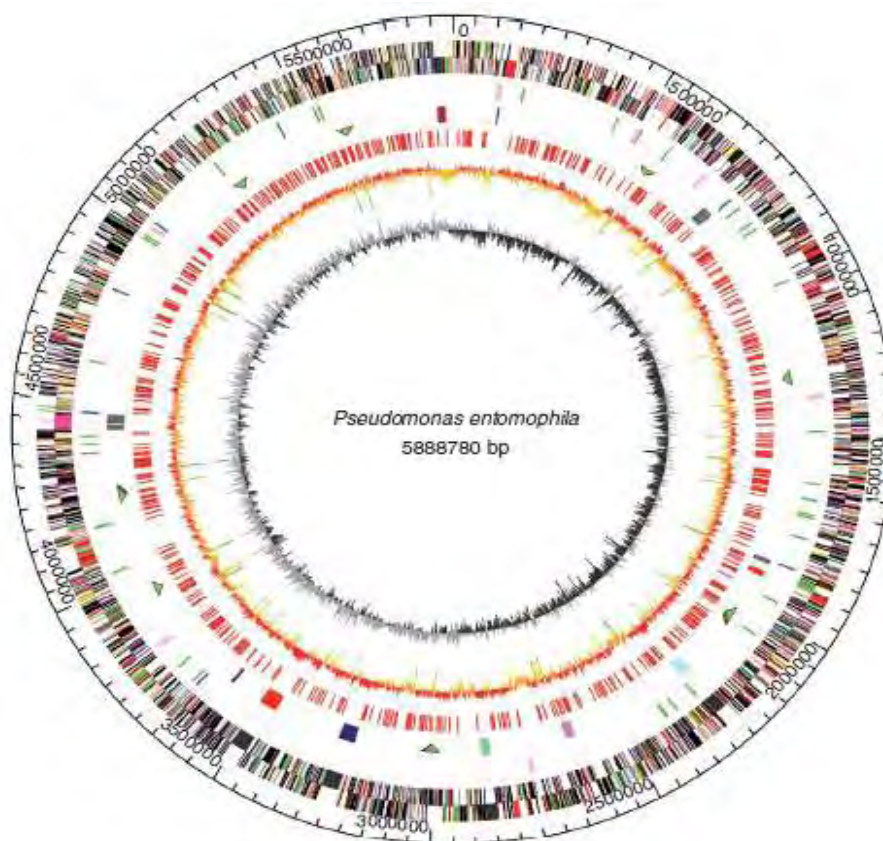
Η σύγκριση των γονιδιωμάτων των 5 αντιπροσωπευτικών ειδών *Pseudomonas* με το πρόγραμμα BLAST αποκάλυψε πως το πυρηνικό γονιδίωμα του γένους αποτελείται από 2.065 γονίδια. Με βάση αυτή την ανάλυση ταυτοποιήθηκαν 1.002 γονίδια μοναδικά στο γονιδίωμα της *P. entomophila*.

General features	<i>Pe</i>	<i>Pp</i>	<i>Pf</i>	<i>Pa</i>	<i>Pst</i>
Size (Mb)	5.9	6.2	7.1	6.3	6.4
GC (%)	64.2	61.6	63.3	66.6	58.4
Nb CDS	5169	5420	6144	5570	5615
Coding (%)	89.1	87.7	88.8	89	86.8
rRNA operon	7	7	5	4	5
tRNA	78	74	71	63	63
Protein with predicted function (%)	67.1	65.8	62.2	54.2	61.0
Proteins without predicted function					
Conserved hypothetical proteins (%)	25.3	19.1	32.5	13.8	17.0
Hypothetical proteins (%)	7.5	15.1	5.3	31.9	22.0

Γενικά χαρακτηριστικά των γονιδιωμάτων των αντιπροσωπευτικών ειδών *Pseudomonas*, *Pe*: *P. entomophila*, *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pp*: *Pseudomonas putida*, *Pf*: *Pseudomonas fluorescens*, *Pst*: *Pseudomonas syringae* (Vodovar 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*, 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.

Πράγματι, 50 γονίδια της *P. entomophila* που υπάρχουν σε άλλα είδη *Pseudomonas* αλλά απουσιάζουν από την *P. putida* ανήκουν σε λειτουργικές κατηγορίες, τόσο ποικίλες όσο τα 34 γονίδια της *P. putida* που υπάρχουν σε άλλα είδη *Pseudomonas*, αλλά απουσιάζουν από την *P. entomophila*. Σύγκριση των χρωμοσωμικών δομών της *P. entomophila* και της *P. putida* και ανάλυση με γραφική παράσταση παρόμοιων περιοχών των δύο στελεχών αποκάλυψε συχνές γενετικές αναστροφές, κάτι που παρατηρείται και σε άλλα βακτηριακά γένη (Vodovar et al., 2006).



Κυκλική αναπαράσταση του γονιδιώματος της *P. entomophila*. Η εξωτερική κλίμακα δείχνει συντεταγμένες σε ζεύγη βάσεων (bp). Οι κύκλοι 1 και 2 (από έξω προς τα μέσα) δείχνουν τις προβλεπόμενες κωδικεύουσες περιοχές που μεταγράφονται δεξιόστροφα και αριστερόστροφα, αντίστοιχα. Οι ακολουθίες κωδικοποίησης χρωματίζονται σε κατηγορίες, σύμφωνα με το ρόλο τους: σομόν: βιοσύνθεση αμινοξέων, γαλάζιο: βιοσύνθεση συμπαραγόντων-προσθετικών ομάδων και φορέων, ανοιχτό πράσινο: περίβλημα των κυττάρων, κόκκινο: κυτταρικές διεργασίες, καφέ: κεντρικός ενδιάμεσος μεταβολισμός, κίτρινο: μεταβολισμός DNA, πράσινο: μεταβολισμός της ενέργειας, μοβ: μεταβολισμός λιπαρών οξέων και φωσφολιπιδίων, βιολετί: κινητικές και εξωχρωμοσωμικές λειτουργίες, ροζ: πρωτεϊνική σύνθεση, πορτοκαλί: πουρίνες, πυριμιδίνες, νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια, ναυτικό μπλε: ρυθμιστικές λειτουργίες και μεταγωγή σήματος, πράσινο lime: βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, γκρι: μεταγραφή, βάσκας: μεταφορικές και δεσμευτικές πρωτεΐνες, μαύρο: άγνωστης λειτουργίας και υποθετικές πρωτεΐνες. Ο κύκλος 3 δείχνει rRNA γονίδια σε σομόν, tRNA γονίδια σε πράσινο και διάφορα γονίδια RNA σε μπλε χρώμα. Ο κύκλος 4 δείχνει γονίδια μεταθετάσης, υποτιθέμενα γονίδια προφάγων και συστάδες γονιδίων που κωδικοποιούν δευτερογενείς μεταβολίτες συμβολισμένα με χρωματιστά σύμβολα ως εξής: πράσινες αιχμές βελών: Αντιμεταθετάσες, γκρι: υποθετικά προφάγων, κόκκινο: σύνθεση pyoverdine, γαλάζιο: σύμπλεγμα που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση λιποπεπτιδίων II, βιολετί: acinetobactin-like σύνθεση σηδιοφορών, πράσινο ανοιχτό: σύμπλεγμα που εμπλέκεται στην βιοσύνθεση λιποπεπτιδίων III, ναυτικό μπλε: μονάδες και απομονωμένα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση λιποπεπτιδίων I, ροζ: παραγωγή υδροκυανίου, καφέ: σύνθεση πολυκετιδίων. Ο κύκλος 5 δείχνει την κατανομή των REPs. Αυτές οι επαναλήψεις είναι διάσπαρτες σε όλο το γονιδίωμα και βρέθηκαν είτε ως μεμονωμένα στοιχεία, σε ζεύγη ή σε συστάδες, μέχρι έξι στοιχεία σε εναλλασσόμενο προσανατολισμό. Ο

κύκλος 6 δείχνει G+ C σε σχέση με την μέση τιμή G+ C σε ένα παράθυρο 1000 βάσεων. Ο κύκλος 7 δείχνει παραποίηση GC σε ένα παράθυρο 1000 βάσεων (Vodovar et al., 2006).

1.4 Παθογένεια

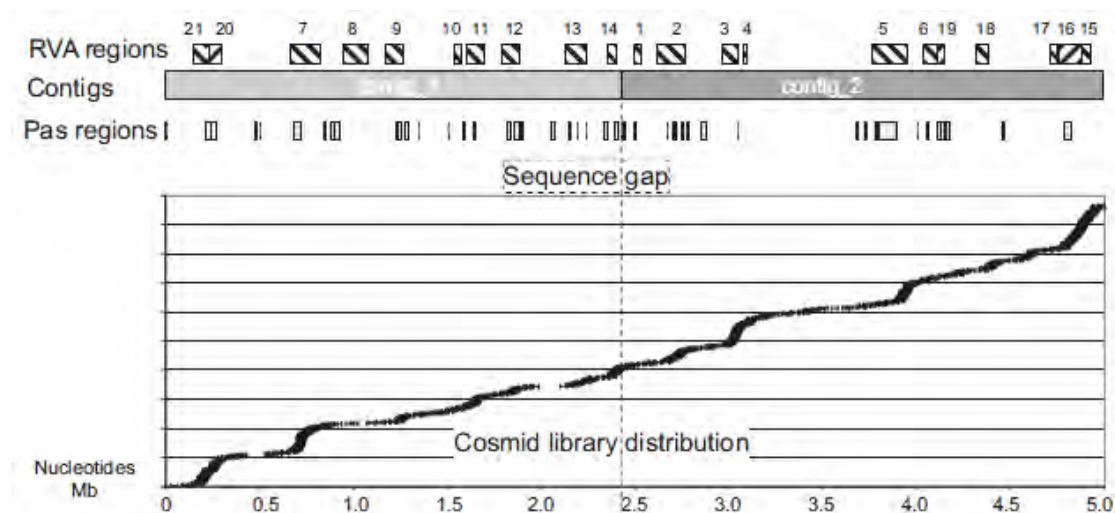
Για τον χαρακτηρισμό ενός βακτηρίου ως εντομοπαθογόνου είναι απαραίτητο να πληρούνται κάποιες προϋποθέσεις. Αρχικά θα πρέπει το βακτήριο να βρίσκεται στο ίδιο ενδιαίτημα με το έντομο, καθώς επίσης να έχει και τη δυνατότητα να παραμένει στο εσωτερικό του εντόμου. Επιπλέον, ένα εντομοπαθογόνο βακτήριο 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 αυξανόμενη ταχύτητα με την οποία τα γονιδιώματα των βακτηρίων μπορεί να αλληλουχηθούν, παράγει ένα συνεχώς επεκτεινόμενο κενό γνώσης μεταξύ των στοιχείων της ακολουθίας και τη λειτουργική περιγραφή της. Στην περίπτωση των παθογόνων βακτηρίων, η ταυτοποίηση των παραγόντων της λοιμογόνου δύναμής τους συνήθως βασίζεται στο γενετικό knock-out και επίδειξη της μολυσματικότητας γίνεται σε ένα κατάλληλο εξασθενημένο ζωικό μοντέλο. Αυτή η προσέγγιση δεν είναι μόνο χρονοβόρα και δαπανηρή, αλλά επίσης, στην περίπτωση της χρήσης των σπονδυλωτών ως μοντέλα, είναι ηθικά αμφιλεγόμενη. Μια καινοτόμος μελέτη αποδεικνύει τη δύναμη της χρήσης μιας τεχνικής για την ταυτοποίηση των γονιδίων μολυσματικότητας χρησιμοποιώντας τρία μοντέλα λοίμωξης ασπόνδυλων και μακροφάγα θηλαστικών σε καλλιέργεια ιστών, που συλλογικά ονομάζεται Rapid Virulence Annotation (RVA).

Η χρησιμότητα του RVA βασίζεται σε ομοιότητες μεταξύ των ανοσοαποκρίσεων των σπονδυλωτών και των ασπόνδυλων. Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα των εντόμων και θηλαστικών έχει πολλά κοινά χαρακτηριστικά, τόσο μηχανιστικά όσο και γενετικά. Επιπλέον, μεγάλο μέρος του βασικού κυτταρικού μηχανισμού και τα μονοπάτια που τα παθογόνα βακτήρια μπορεί να ανατρέψουν κατά τη διάρκεια της λοίμωξης είναι επίσης καλά συντηρημένα μεταξύ των οργανισμών, παρουσιάζοντας κοινούς στόχους. Αυτό υποδηλώνει ότι οι μηχανισμοί

της λοιμογόνου δύναμης που χρησιμοποιούνται από τους παθογόνους μικροοργανισμούς των θηλαστικών μπορούν να λειτουργήσουν εναντίον των ασπόνδυλων και το αντίστροφο.

Στη μελέτη, εφαρμόστηκε RVA στο αναδυόμενο ανθρώπινο παθογόνο *Photorhabdus asymbiotica* χρησιμοποιώντας δοκιμασίες "αύξης της τοξικότητας" (gain of toxicity) σε ανασυνδυασμένους κλώνους *Escherichia coli*. Περιγράφηκε μια πληθώρα πιθανών τρόπων μολυσματικότητας και αποδόθηκε βιολογική λειτουργία σε διάφορα υποθετικά γενωμικά νησιά, τα οποία μπορούν στη συνέχεια περαιτέρω να χαρακτηριστούν με χρήση συμβατικών μοριακών τεχνικών. Η εφαρμογή RVA σε γονιδιώματα άλλων παθογόνων υπόσχεται να αποδώσει βιολογική λειτουργία σε διαφορετικά μη χαρακτηρισμένα γονίδια μολυσματικότητας, συμπεριλαμβανομένου και της *P. entomophila* (Waterfield, 2008).



Λειτουργικός γονιδιωματικός χάρτης RVA για το *P. asymbiotica*. Τα επάνω κουτιά στην πρώτη σειρά αντιπροσωπεύουν τις περιοχές RVA. Στη συνέχεια, εμφανίζονται τα δύο μεγάλα θραύσματα της *P. asymbiotica* (contigs) της αλληλουχίας του γονιδιώματος που βρίσκεται σε εξέλιξη στο RVA project. Οι "Pas" περιοχές περιέχουν γονίδια που δεν αναγνωρίζουν ομόλογα στο *P. luminescens* TT01. Το κατώτερο πάνελ αντιπροσωπεύει τις πραγματικές γονιδιωματικές θέσεις των κοσμιδίων από τη βιβλιοθήκη που αναλύθηκαν με οθόνη RVA. Η διακεκομμένη γραμμή παριστά ένα διάκενο αλληλουχίας, ωστόσο, η διάταξη και ο προσανατολισμός των δύο μεγάλων contigs επιβεβαιώνεται από την σωστή ευθυγράμμιση των άκρων της αλληλουχίας πέντε κοσμιδίων σε όλη αυτή περιοχή (Waterfield, 2008).

Η *P. entomophila* είναι ένα εντομοπαθογόνο βακτήριο που έχει τη δυνατότητα να μολύνει με φυσικό τρόπο την *Drosophila*, μετά από κατάποσή της, 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. 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).

Εκτός από τη *Drosophila*, το βακτήριο είναι ικανό να μολύνει και τη *Galleria mellonella*, μία από τα πιο κοινά είδη νυχτοπεταλούδας. Τα αποτελέσματα έρευνας, αποκάλυψαν ότι η *P. entomophila* είναι εξαιρετικά παθογόνα εναντίον του συγκεκριμένου είδους νυχτοπεταλούδας, με θνησιμότητα που αγγίζει το $43 \pm 7\%$ 48 ώρες μετά τη μόλυνση με το βακτήριο, φτάνοντας μέχρι και $95 \pm 5\%$ 72 h μετά τη μόλυνση (Fedhila, 2009).



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.

Παρά το γεγονός ότι έχουν χαρακτηριστεί πολλοί μολυσματικοί παράγοντες μέχρι σήμερα, δεν είναι ακόμη γνωστοί όλοι οι μηχανισμοί 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 (Vodovar N. et al., 2005).

Ανάλυση μιας ομάδας γονιδίων βιοσύνθεσης υποδεικνύει τη βιοσύνθεση παραγώγων της πυοβερδίνης που συναντάται τυπικά σε φθορίζουσες ψευδομονάδες καθώς και σιδηροφόρων που εμφανίζουν ομοιότητα με το σιδηροφόρο acinetobactin του βακτηρίου *Acinetobacter baumannii*. Επιπροσθέτως, στο γονιδίωμα της *P. entomophila* έχουν εντοπιστεί μια ποικιλία διαφορετικών λιποπεπτιδίων και ενός πολυκετιδίου, μόρια που συμβάλλουν στην ικανότητα του βακτηρίου να παρασιτεί σε έντομα (Bode, 2009).

Στην κατηγορία των δευτερογενών μεταβολιτών αναφέρεται και η ταυτοποίηση μιας νέας τοξίνης σχηματισμού πόρων (PFT), που ονομάζεται μοναλυσίνη (PSEEN3174) και η οποία συμβάλλει στην λοιμογόνο δύναμη της *P. entomophila* κατά της *Drosophila*. Τα στοιχεία δείχνουν ότι η μοναλυσίνη απαιτεί N - τελική σχάση για να καταστεί

πλήρως δραστική, σχηματίζει ολιγομερή *in vitro* και επάγει το σχηματισμό πόρων σε τεχνητές μεμβράνες λιπιδίων. Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της διαμεμβρανικής περιοχής υποδηλώνει ότι είναι μια PFT τύπου βήτα (β). Η έκφραση της μοναλυσίνης ρυθμίζεται τόσο από το σύστημα δύο συστατικών *gacS/gacA* και του ρυθμιστή PVF, όσο και από δύο συστήματα σηματοδότησης που ελέγχουν την παθογένεια της *P. entomophila*. Επιπλέον, η AprA, μία μεταλλοπρωτεάση που εκκρίνεται από την *P. entomophila*, μπορεί να προκαλέσει την ταχεία διάσπαση της προ- μοναλυσίνης στην ενεργό της μορφή. Μειωμένος κυτταρικός θάνατος παρατηρείται μετά από μόλυνση με ένα μετάλλαγμα με ανεπάρκεια παραγωγής μοναλυσίνης και δείχνει ότι η μοναλυσίνη παίζει ρόλο στην ικανότητα της *P. entomophila* να επάγει βλάβες εντερικών κυττάρων, η οποία συνάδει με τις δραστηριότητές της ως PFT. Η μελέτη, σε συνδυασμό με την καθιερωμένη δράση του *Bacillus thuringiensis* μέσω των τοξινών Cry, υποδηλώνει ότι η παραγωγή της PFT είναι μια κοινή στρατηγική των εντομοπαθογόνων βακτηρίων να διαταράζουν την ομοιόσταση του εντέρου των εντόμων (Opota, 2011).

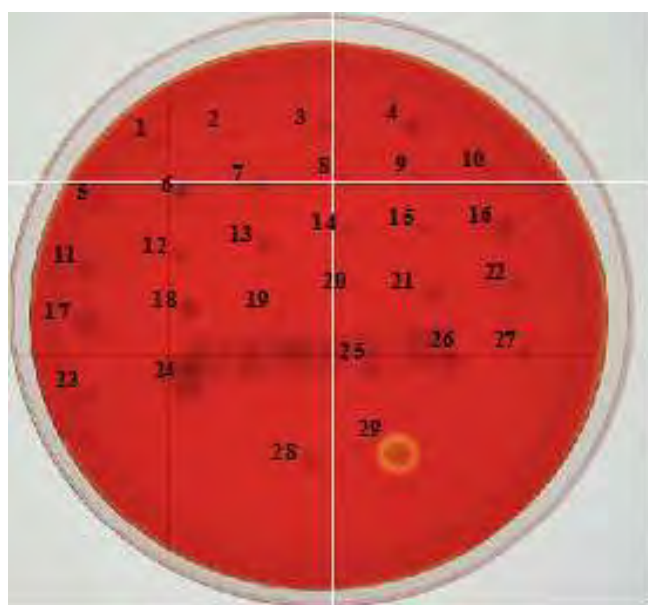
Στο γονιδίωμα της *P. entomophila* αποκαλύφθηκε η ύπαρξη 3 γονιδίων, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες τοξινών. Αυτές οι TccC-type τοξίνες (PSEEN2485, PSEEN2697, PSEEN2788) έχουν εντοπιστεί επίσης και σε άλλα εντομοπαθογόνα βακτήρια όπως το *Photorhabdus luminescens* και το *Serratia entomophila*.

Οι βακτηριακές αιμολυσίνες είναι εξωτοξίνες, 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).

Η αιμολυτική αυτή δραστηριότητα φαίνεται πως συνδέεται με την παραγωγή ενός νέου κυκλικού λιποπεπτιδίου που περιέχει 14 αμινοξέα και ένα 3-C₁₀OH λιπαρό οξύ, καλούμενο entolysin. Τρεις μη-ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες (ETLA, EtlB, EtlC) προσδιορίστηκαν ως υπεύθυνες για τη βιοσύνθεση της entolysin. Δύο επιπλέον συστατικά (EtlR, MACAB) είναι απαραίτητα για την παραγωγή και την έκκριση της τοξίνης. Το σύστημα δύο συστατικών της *P.*

entomophila GacS/GacA ρυθμίζει την παραγωγή της entolysin και έχει αποδειχθεί ότι η λειτουργία της απαιτεί δύο μικρά RNAs και δύο RsmA-like πρωτεΐνες (Vallet-Gely, 2009).

Και η μοναλυσίνη εμφανίζει έντονη αιμολυτική και κυτταροτοξική δράση. Όταν εγχύθηκε σε κοιλότητες του σώματος, σε εμβρυονικά αιμοκύτταρα της *Drosophila* και σε κύτταρα λεπιδόπτερων, η μοναλυσίνη συμπεριφέρθηκε ως μια τυπική βακτηριακή τοξίνη, εκφράζοντας κυτταροτοξικότητα, αιμόλυση και οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση (Opota, 2011).



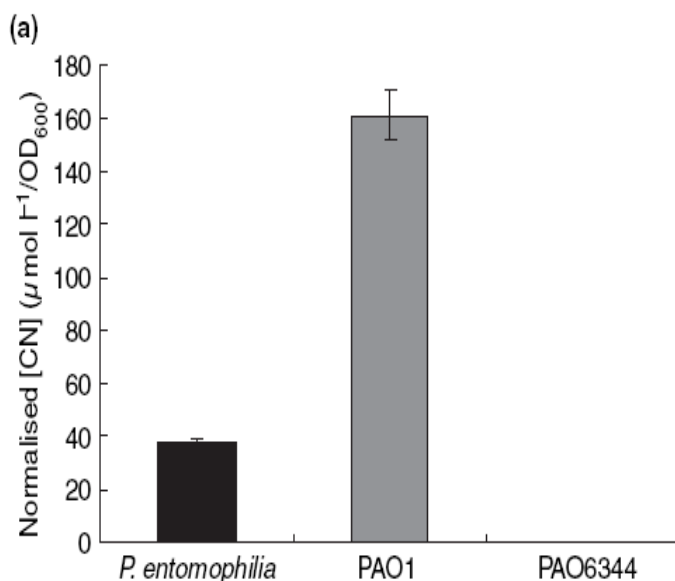
Αιμολυτική δραστηριότητα της *P.*

entomophila (νούμερο 29), (Νικολούλη, 2010).

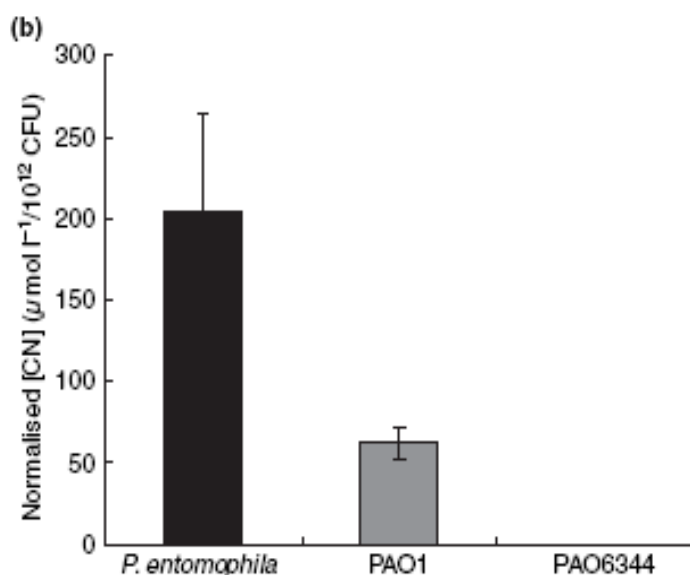
Οι πρωτεάσες αποτελούν μια άλλη σημαντική ομάδα εκκρινόμενων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην μολυσματικότητα των βακτηρίων. Η *P. entomophila* κωδικοποιεί για 3 πρωτεάσες σερίνης, καθώς και για μια αλκαλική πρωτεάση, την AprA, η οποία παίζει ρόλο κλειδί στην μολυσματικότητα. Η AprA είναι μια εκκρινόμενη 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).

Η παρουσία ομάδας γονιδίων της συνθάσης HCN (PSEEN5522, PSEEN5521, PSEEN5520) στο γονιδίωμα της *P. entomophila* οδήγησε τους επιστήμονες στην υπόθεση πως και αυτό το είδος *Pseudomonas*,

όπως τα *P. fluorescens* και ένα στέλεχος *P.aeruginosa*, 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).



Παραγωγή HCN σε υγρές καλλιέργειες *P. entomophila* (Ryall et al., 2009).



Παραγωγή HCN σε στερεές καλλιέργειες *P. entomophila*. Η παραγωγή HCN είναι πολύ μεγαλύτερη στις στερεές καλλιέργειες (Ryall et al., 2009).

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).

Ωστόσο, 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. Δηλαδή, ο ρόλος του υδροκυανίου δε φαίνεται να είναι τόσο κρίσιμος για την παθογένεια που εμφανίζει η *P. entomophila* στην *D. melanogaster* (Νικολούλη, 2010).

1.5 Τα γονίδια *retS* & *ladS*

Τα ρυθμιστικά συστήματα που αποτελούνται από δύο στοιχεία (two-component regulatory systems) 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.

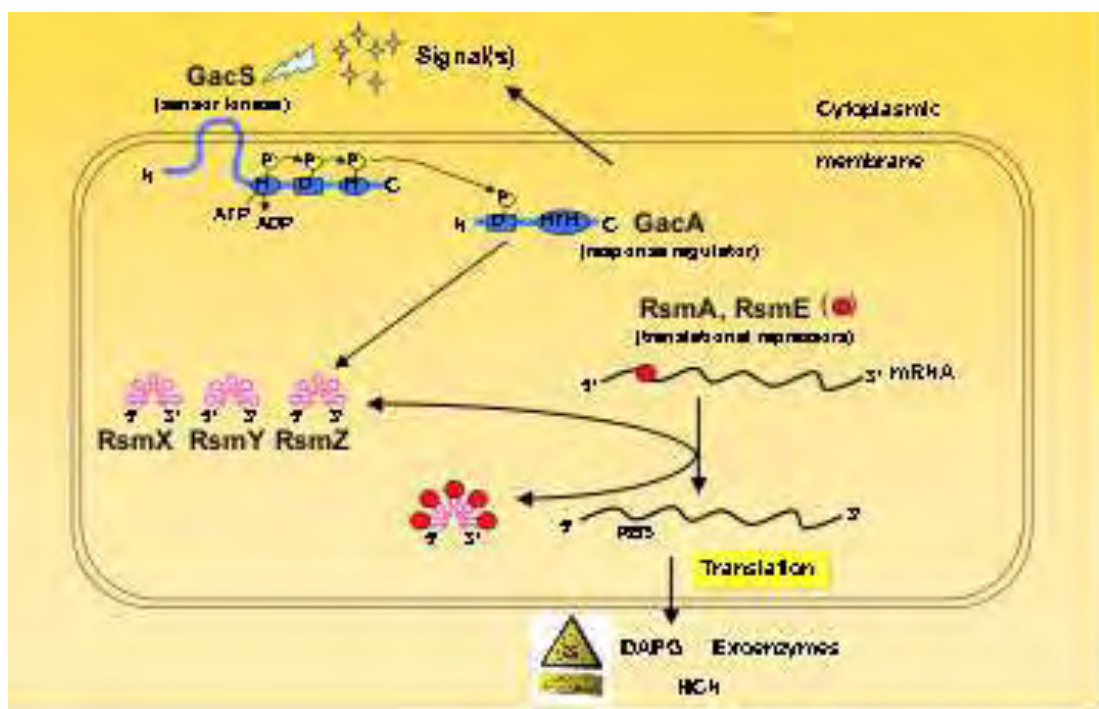
Για την ενεργοποίηση του συγκεκριμένου συστήματος, αρχικά απαιτείται η επίδραση ενός σήματος που θα οδηγήσει στην αυτοφωσφορυλίωση του GacS σε μια εξελικτικά συντηρημένη ιστιδίνη. Στη συνέχεια το GacS ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης το GacA, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί ή καταστέλλει την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων. Τα σήματα 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 (Νικολούλη, 2010).

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, 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 (Νικολούλη, 2010).

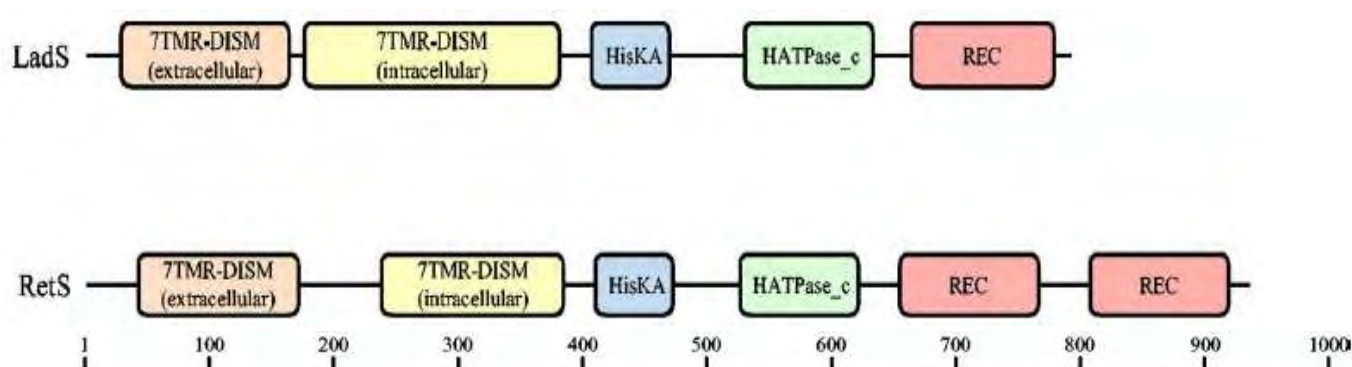
Η RsmA είναι μια RNA-προσδεδεμένη πρωτεΐνη, που είναι συντηρημένη σε πολλά Gram (-) βακτήρια (Whittle et al. 1999). Μεταλλάγματα *rsmA* παρουσιάζουν αυξημένη μολυσματικότητα και παράγουν σε μεγάλες ποσότητες εξωκυτταρικά λυτικά ένζυμα. Υπερέκφραση της RsmA καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων που ρυθμίζονται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



Σηματοδοτικό μονοπάτι του ρυθμιστικού συστήματος GacS/GacA στην *P. entomophila* (Lapouge et al., 2007)

Η δραστηριότητα του συστήματος δύο συστατικών GacS/GacA ρυθμίζεται αντιστρόφως από δύο επιπρόσθετους αισθητήρες, τους RetS και LadS. Ο RetS αναστέλλει τη δραστηριότητα του GacS σχηματίζοντας ανενεργά ετεροδιμερή και αυτό προωθεί την κινητικότητα και την κυτταροτοξικότητα. Αντιστρόφως, ο LadS ενεργοποιεί την δραστηριότητα του GacS/GacA καταρράκτη διαμέσου ενός άγνωστου μηχανισμού και αυτό καταστέλλει την κυτταροτοξικότητα ενώ επάγει τον σχηματισμό βιοφίλμ (Mikkelsen, 2011).

Οι RetS (PSEEN4865) και LadS (PSEEN4801) είναι και οι δύο ορφανοί υβριδικόι υποδοχείς που διαμορφώνουν την δραστηριότητα του συστήματος GacS/GacA, το οποίο ελέγχει τα επίπεδα των sRNAs, RsmY και RsmZ. Ενώ ο RetS επηρεάζει αρνητικά το ρυθμιστικό μονοπάτι με άμεση αναστολή του GacS αισθητήρα, ο LadS έχει τα αντίθετα αποτελέσματα και ενεργοποιεί την έκφραση των *rsmY* και *rsmZ* γονιδίων μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού. Ενώ τα επίπεδα των RsmY και RsmZ είναι υψηλά, ο μετα-μεταγραφικός ρυθμιστής RsmA αποχωρίζεται από τα μετάγραφα στόχους του και επιτρέπει τη μετάφραση (Moscoso, 2011).

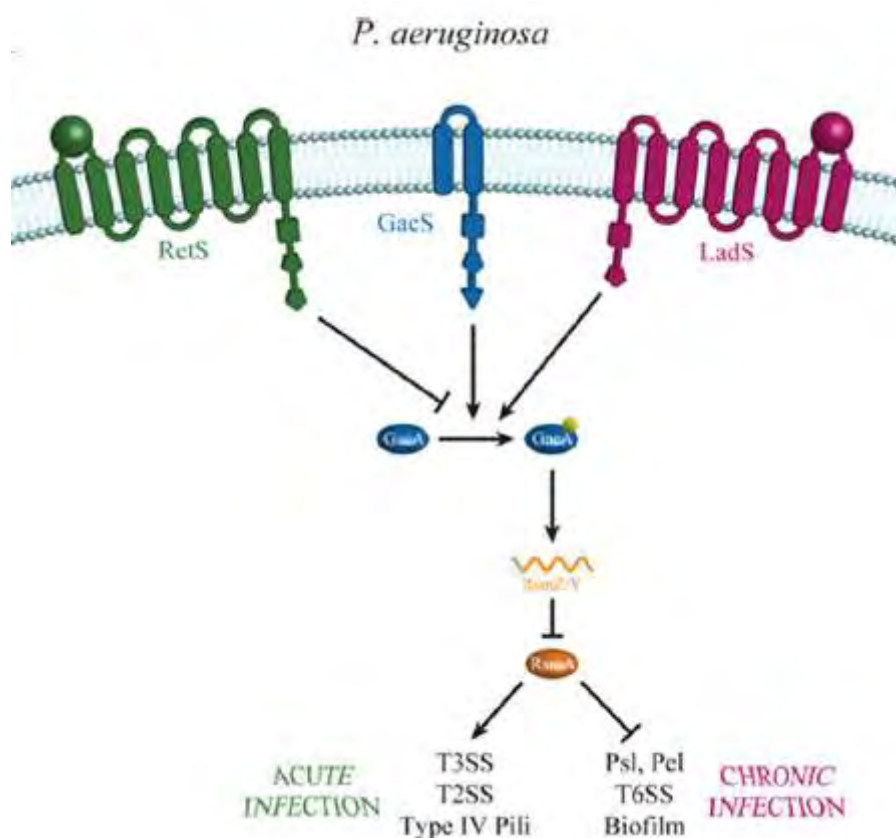


Οργάνωση των επικρατειών των πρωτεϊνών RetS και LadS της *P. aeruginosa* PAO1. Η LadS πρωτεΐνη αποτελείται από 795 αμινοξέα που σχηματίζουν μια επικράτεια κινάσης ιστιδίνης (HisKA), μια επικράτεια HATPase C, μια επικράτεια δείκτη ρυθμιστή απόκρισης (REC) και έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα (7TMR-DISM). Η RetS πρωτεΐνη αποτελείται από 942 αμινοξέα, με μια αρχιτεκτονική που προσομοιάζει αυτή του LadS, με ένα επιπλέον τμήμα REC. Η κλίμακα υποδεικνύει το πρωτεϊνικό μήκος σε αριθμούς των καταλοίπων αμινοξέων (Records & Gross, 2010).

Μελέτες με μικροσυστοιχίες υπέδειξαν τα RetS και LadS ως καθολικούς ρυθμιστές που μεσολαβούν ως διακόπτες, μεταξύ της έκφρασης γονιδίων που είναι απαραίτητα για οξεία μόλυνση (εκκριτικό σύστημα τύπου III) και αυτών που απαιτούνται για μακροχρόνιο αποικισμό (σχηματισμός βιοφίλμ, εκκριτικό σύστημα τύπου VI). Αυτές οι μελέτες επίσης αποκάλυψαν ότι η σηματοδότηση μέσω αυτών των δύο γονιδίων συγκλίνουν στον κύριο ρυθμιστή μολυσματικότητας GacA, επηρεάζοντας τα επίπεδα των μικρών ρυθμιστικών RNAs RsmY και RsmZ, τα οποία τελικώς διαμορφώνουν την γονιδιακή έκφραση με την πρόσδεσή τους στην RsmA. Το ρεγουλόνιο RsmA περιλαμβάνει πάνω

από 500 γονίδια και πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η RsmA έχει την ευελιξία να ασκήσει μετα-μεταφραστική ρύθμιση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων διαμέσου απευθείας σύνδεση στο mRNA τους.

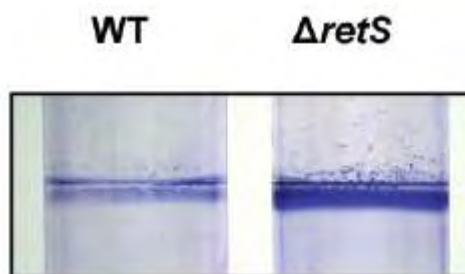
Τα γονίδια RetS και LadS της *P. aeruginosa* ελέγχουν την έκφραση ενός μεγάλου εύρους μολυσματικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που εμπλέκονται στην κινητικότητα και την παραγωγή εξωπολυσακχαριτών που σχετίζονται με τον σχηματισμό βιοφίλμ Pel και Psl. Εκκριτικά συστήματα βρίσκονται επίσης στο στόχαστρο της ρύθμισης από τα RetS και LadS γονίδια. Αυτά περιλαμβάνουν το εκκριτικό σύστημα τύπου II, υπεύθυνο για την έκκριση ποικίλων τοξινών και ενζύμων του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος, το εκκριτικό σύστημα τύπου III, το οποίο μεταφέρει μολυσματικούς παράγοντες απευθείας μέσα στα κύτταρα του ξενιστή διαμέσου μιας δομής που μοιάζει με σύριγγα και το εκκριτικό σύστημα τύπου VI, που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και από τότε έχει εμπλακεί στην μολυσματικότητα πολλών βακτηρίων (Records & Gross, 2010).



Μοντέλο των γονιδίων RetS και LadS στην *P. aeruginosa*. Τα γονίδια αμοιβαίως ελέγχουν την έκφραση μολυσματικών παραγόντων, και αυτή η ρύθμιση διαμορφώνεται από το δίκτυο GacS/GacA. Το RetS αλληλεπιδρά απευθείας με το GacS, διαμορφώνοντας την φωσφορυλίωσή του και ως εκ τούτου, επηρεάζοντας τον ρυθμό φωσφομεταφοράς του με τον

συγγενικό του ρυθμιστή απόκρισης GacA. Ο φωσφορυλιωμένος GacA ενεργοποιεί τη μεταγραφή των μικρών RNAs RsmY και RsmZ, τα οποία έχουν υψηλή συγγένεια με τον RsmA. Ο RsmA, όταν είναι προσδεδεμένος σε mRNA, είναι ανίκανος να καταστείλει την έκφραση των γονιδίων του εκκριτικού συστήματος τύπου VI, ή άλλους παράγοντες που εμπλέκονται στις χρόνιες μολύνσεις, όπως ο EPS και γονίδια σχηματισμού βιοφίλμ. Ο ελεύθερος RsmA, ρυθμίζει θετικά το εκκριτικό σύστημα τύπου III, το οποίο είναι υψηλά ενεργοποιημένο κατά τη διάρκεια της οξείας μόλυνσης από την *P. aeruginosa*. Τα LadS και RetS ενισχύουν και καταστέλλουν αντίστοιχα τη φωσφορυλίωση του GacA (Records & Gross, 2010).

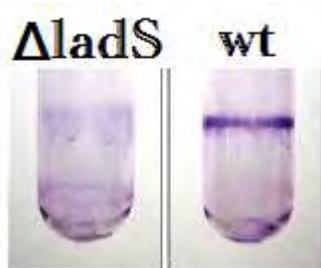
Στην *P. aeruginosa*, το μετάλλαγμα RetS είναι γνωστό ότι οδηγεί στην υπερπαραγωγή εξωπολυσακχαριτών και εμφανίζει έναν hyperbiofilm φαινότυπο, δηλαδή αυξημένο σχηματισμό βιοφίλμ, όπως φαίνεται ύστερα από χρώση με τη χρωστική crystal violet. Επίσης, έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα θηλαστικών εξαιτίας της αρνητικής επίδρασης αυτού του μεταλλάγματος στα εκκριτικά συστήματα τύπου II & III. Από την άλλη, ρυθμίζει θετικά την απόκριση του εκκριτικού συστήματος τύπου VI (Moscato, 2011). Αποσιώπηση του RetS επηρεάζει, ακόμη, την κινητικότητα και την παραγωγή βλέννας, όπου στην πρώτη περίπτωση λειτουργεί αρνητικά ενώ στη δεύτερη επαγωγικά (Records & Gross, 2010).



Σχηματισμός βιοφίλμ σε στατικές συνθήκες ανάπτυξης, ορατό με χρωστική κρυσταλλικό ιώδες (Moscato, 2011).

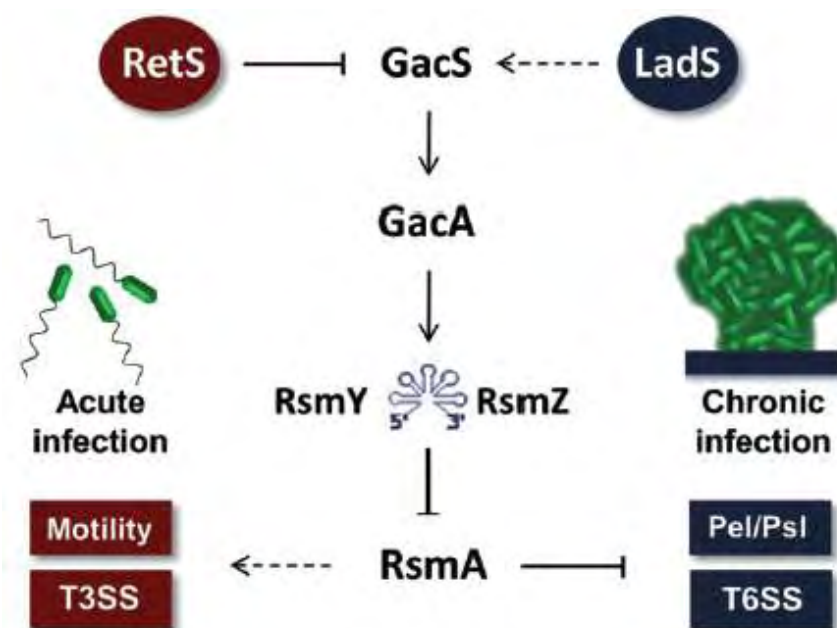
Από την άλλη πλευρά, το μετάλλαγμα LadS στην *P. aeruginosa*, οδηγεί σε καταστολή του σχηματισμού βιοφίλμ, καθώς το στέλεχος που προέκυψε φάνηκε ανίκανο να σχηματίσει βιοφίλμ εξαιτίας της αρνητικής ρύθμισης γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση εξωπολυσακχαριτών και πρωτεϊνών προσκόλλησης. Η επαγωγική επίδραση του μεταλλάγματος στο εκκριτικό σύστημα τύπου III, οδήγησε σε ιδιαίτερα αυξημένη κυτταροτοξικότητα (Mikkelsen, 2011). Η κινητικότητα ήταν ιδιαίτερα αυξημένη, έως και 1,8 cm σε σχέση με

αποικίες αγρίου τύπου, αλλά η παραγωγή βλέννας ήταν ελαφρώς μικρότερη σε σχέση με το wild type (Records & Gross, 2010).



Σχηματισμός βιοφίλμ σε στατικές συνθήκες ανάπτυξης, ορατό με χρωστική κρυσταλλικό ιώδες (Mikkelsen, 2011).

Παρ' όλο που τα γονίδια RetS και LadS φαίνεται να εμφανίζονται αυστηρά και μόνο σε βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, συμπεριλαμβανομένου φυσικά και της *P. entomophila*, συστήματα που ομοιάζουν με το GacS/GacA έχουν αναγνωριστεί σε αρκετά άλλα βακτήρια. Διάφορα ομόλογα του RsmA έχουν αναγνωριστεί στην *E. coli* (UvrY, BarA, CsrA) και στην *Salmonella enterica* (SirA, BarA, CsrA) και κάποια από αυτά εμπλέκονται σε διακόπτες κινητικότητας/ευαισθησίας. Στην *E. coli*, το γονίδιο CsrA καταστέλλει μια ομάδα γονιδίων που παίρνουν μέρος στην παραγωγή πολυσακχαριτών και ρυθμίζει θετικά την έκφραση γονιδίων του μαστιγίου. Στην *S. enterica*, το CsrA ρυθμίζει θετικά τον σχηματισμό βιοφίλμ ενώ αρνητικά τον σχηματισμό ινιδίων (Moscoso, 2011).



Σχηματική αναπαράσταση του ρυθμιστικού συστήματος «διακόπτη», των γονιδίων RetS & LadS στην *P. aeruginosa* (Moscoso, 2011).

1.6 Μόλυνση της *Drosophila melanogaster* από την *P. entomophila*

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 (Νικολούλη, 2010).

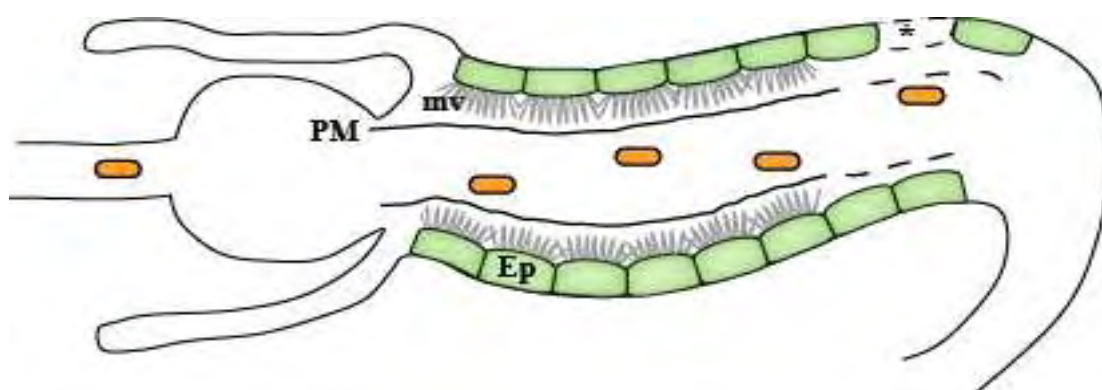
Από τους παραπάνω μηχανισμούς ανοσοαπόκρισης ο σημαντικότερος είναι η παραγωγή AMPs από το λιπαρό σώμα. Τα AMPs είναι μικρές, κατιονικές πρωτεΐνες στις οποίες περιλαμβάνονται η Διπερισίνη και η Αττασίνη (Imler and Bulet, 2005). Οι δύο αυτές πρωτεΐνες είναι δραστικές ενάντια σε Gram (-) βακτήρια και δρουν 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).

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.

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 ArgA 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 (Vodovar et al., 2005).



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

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).

1.7 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η συμβολή των γονιδίων *retS* και *ladS*, που βρίσκονται στο γονιδίωμα της *P. entomophila*, στην παθογένεια του συγκεκριμένου στελέχους στην *Drosophila melanogaster*. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος αγρίου τύπου, το οποίο είναι γνωστό πως εμφανίζει έντονη εντομοπαθογένεια, καθώς και μεταλλαγμένα στελέχη $\Delta retS$ και $\Delta ladS$. Στα μεταλλαγμένα στελέχη, τα γονίδια *retS* και *ladS* έχουν διασπαστεί μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού από έναν πλασμιδιακό φορέα που έφερε επίσης τμήματα των συγκεκριμένων γονιδίων. Για να μελετηθεί ο ρόλος των δύο αυτών γονιδίων στην παθογένεια του βακτηρίου, πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από βιοδοκιμές (μόλυνση μέσω κατάποσης) πάνω στον κύριο ξενιστή του βακτηρίου, τη *Drosophila*.

Ακόμη, η μελέτη επεκτάθηκε και στην πρωτεολυτική ικανότητα που εμφανίζει το στέλεχος του αγρίου τύπου αλλά και στην ικανότητά του να σχηματίζει βιοφίλμ. Συγκρίθηκε η ικανότητα των μεταλλαγμάτων να σχηματίσουν βιοφίλμ, πάντα σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου, καθώς και η πρωτεολυτική τους δύναμη.

Στόχος των αναλύσεων αυτών ήταν να εξακριβωθεί αν τα δύο αυτά γονίδια παίζουν ρόλο στην εντομοπαθογένεια, στην πρωτεολυτική δράση και στον σχηματισμό βιοφίλμ και σε ποιο βαθμό. Τα ερωτήματα που προέκυψαν και που έπρεπε να απαντηθούν, ύστερα από τις ανωτέρω αναλύσεις, ήταν τα εξής:

- ✓ Έχουν την ικανότητα τα μεταλλάγματα $\Delta retS$ και $\Delta ladS$ να προκαλούν θάνατο στη *Drosophila*, όπως ο άγριος τύπος *P. entomophila*?
- ✓ Μπορούν τα συγκεκριμένα μεταλλάγματα να σχηματίσουν βιοφίλμ όπως και ο άγριος τύπος?
- ✓ Έχουν τα μεταλλάγματα την ίδια πρωτεολυτική δραστηριότητα με το στέλεχος του αγρίου τύπου?

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βακτηριακά στελέχη και καλλιέργεια μικροοργανισμών

Όλα τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία βρίσκονται στον Πίνακα 1. Το στέλεχος *Escherichia coli* JM109 (επεξεργασμένα με χλωριούχο ρουβίδιο) χρησιμοποιήθηκε ως το βακτήριο-δέκτης για όλα τα πλασμίδια, ενώ το στέλεχος *Escherichia coli* S-17 χρησιμοποιήθηκε για μετασχηματισμό με ηλεκτροδιάτρηση και στην σύζευξη με την *P. entomophila*.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
<i>Pseudomonas entomophila</i> (Pe)	Άγριος τύπος
$\Delta retS$	Αποσιώπηση του <i>retS</i> γονιδίου της <i>Pe</i> μέσω διάσπασης, ανθεκτικότητα σε γενταμυκίνη
$\Delta ladS$	Αποσιώπηση του <i>ladS</i> γονιδίου της <i>Pe</i> μέσω διάσπασης, ανθεκτικότητα σε γενταμυκίνη
<i>Escherichia coli</i> JM109	Εμπορικό στέλεχος (pGEM- T-easy Cloning kit)
<i>Escherichia coli</i> S17	Στέλεχος για σύζευξη

Για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Luria Bertani (LB) και στην δοκιμή πρωτεάσης το PCA (Plate Count Agar). Στις περιπτώσεις όπου ήταν απαραίτητο, προστέθηκε στο PCA γάλα, σε τελική συγκέντρωση 1,5%. 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 τα μεταλλάγματα $\Delta retS$ και $\Delta ladS$. Για την παρασκευή του γάλακτος χρησιμοποιήθηκε αποβουτυρωμένο γάλα, το οποίο αναμείχθηκε με απιονισμένο νερό, έτσι ώστε η συγκέντρωση του γάλακτος να είναι 10%.

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των καλλιεργειών 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	ANTIBIOTΙΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ STOCK	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
<i>P. entomophila</i>	ΓΕΝΤΑΜΥΚΙΝΗ (SIGMA)	40mg/ml	25μg/ml
<i>Escherichia coli</i>	ΓΕΝΤΑΜΥΚΙΝΗ (SIGMA)	40mg/ml	25μg/ml
<i>Escherichia coli</i>	ΑΜΠΙΚΙΛΛΙΝΗ	100mg/ml	100μg/ml

2.2 Προετοιμασία κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση

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

Τα βήματα της διαδικασίας φαίνονται παρακάτω:

1. Χρησιμοποιούνται κύτταρα από stock γλυκερόλης και ενοφθαλμίζονται 10ml LB (προκαλλιέργεια). Επώάζονται για 16 ώρες στην θερμοκρασία ανάπτυξης που απαιτεί το στέλεχος.
2. Με την προκαλλιέργεια ενοφθαλμίζονται 490ml LB (1/50) και επώάζονται για περίπου 3 ώρες, μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να είναι μεταξύ 0.6-1.
3. Η καλλιέργεια τοποθετείται σε δοχείο με πάγο και νερό και παραμένει για 15 λεπτά.
4. Η καλλιέργεια μοιράζεται σε 2 αποστειρωμένα δοχεία και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 3500rpm στους 4°C.
5. Αφαιρείται το υπερκείμενο από το πρώτο δοχείο και προστίθενται 25ml παγωμένου νερού. Επαναδιαλύεται πολύ καλά το ίζημα και μεταφέρεται σε ένα falcon. Αφαιρείται το υπερκείμενο από το δεύτερο δοχείο και επαναδιαλύεται πολύ καλά το ίζημα με το διάλυμα από το falcon.
6. Φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 3500rpm στους 4°C.
7. Προστίθενται ξανά 25ml παγωμένου νερού και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 3500rpm στους 4°C.

8. Αφαιρείται το υπερκείμενο και επαναδιαλύεται σε 12,5ml 10% παγωμένης γλυκερόλης.
9. Φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 3500rpm στους 4°C.
10. Αφαιρείται το υπερκείμενο και επαναδιαλύεται σε 1ml 10% παγωμένης γλυκερόλης. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ένα παγωμένο erpendorf.
11. Φυγοκεντρείται για 15 δευτερόλεπτα στις 15000rpm στους 4°C.
12. Αφαιρείται με πιπέτα όλο το υπερκείμενο.
13. Επαναδιαλύονται τα κύτταρα σε 800μl 10% παγωμένης γλυκερόλης.
14. Μοιράζονται σε erpendorf από 50μl και τα διατηρούνται στους -80°C.

2.3 Δημιουργία των μεταλλαγμάτων *PeΔretS* και *PeΔladS*

Για να δημιουργήσουμε τα μεταλλάγματα *PeΔretS* και *PeΔladS* πρέπει να διασπάσουμε τα αντίστοιχα γονίδια στην *P. entomophila* του αγρίου τύπου, τα οποία είναι γνωστό ότι κωδικοποιούν για δύο αισθητήρες-διακόπτες, που ελέγχουν το σύστημα GacS/GacA. Η διάσπαση των γονιδίων έγινε 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 γενταμυκίνη. Η διαδικασία της κατασκευής των μεταλλαγμένων στελεχών έγινε ως εξής:

2.3.1 Ενίσχυση των γονιδίων PSEEN4801 (LadS) και PSEEN4865 (RestS) της *P. entomophila* με ExTaq PCR (TAKARA)

Για την ενίσχυση των γονιδίων PSEEN4801 και PSEEN4865 χρησιμοποιήθηκε ως DNA-μήτρα το χρωμοσωμικό DNA της *P.*

entomophila. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι: PSEEN4865F, PSEEN4865R, PSEEN4801F και PSEEN4801R.

- PSEEN4865F: Έχει συγκέντρωση 25,1μM και η αλληλουχία του είναι:
5'- GCCTGAGTATGTTGCTGGTC-3'
- PSEEN4865R: Έχει συγκέντρωση 24,1μM και η αλληλουχία του είναι:
5'- CTTGTTGCTGGAGAGGAAGT -3'
- **ANAMENOMENO ΠΡΟΪΟΝ: 848bp**
- PSEEN4801F: Έχει συγκέντρωση 10,5μM και η αλληλουχία του είναι:
5'- CCAGGACGAGGTGTTGAA-3'
- PSEEN4801R: Έχει συγκέντρωση 14,2μM και η αλληλουχία του είναι:
5'- CAGGCGATGATGAACCAG -3'
- **ANAMENOMENO ΠΡΟΪΟΝ: 837bp**

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Buffer ExTaq	10x	1x
dNTPs	2.5mM	250 μM
PSEEN4865F	25,1μM	0,5μM
PSEEN4865R	24,1μM	0,5μM
PSEEN4801F	10,5μM	0,5μM
PSEEN4801R	14,2μM	0,5μM
MgCl ₂	25mM	2mM
Taq pol (GENEON)	5u/μl	1unit

- Πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές αντιδράσεις PCR, μία για κάθε γονίδιο και συνεπώς, δύο διαφορετικά MasterMix. Ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης ήταν 25μl, ενώ χρησιμοποιήθηκαν αποικίες της *P. entomophila* ως πηγή χρωμοσωμικού DNA (Colony PCR).

ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

95°C	→	5min	
94°C	→	20sec	} 25 cycles
56°C	→	20sec	
72 °C	→	1min	
72 °C	→	10min	

- Ηλεκτροφόρηση 6μl από την κάθε PCR αντίδραση.
- Χρήση του PCR clean-up kit (Macherey-Nagel).
- Elution στα 30μl.

2.3.2 Κλωνοποίηση του PCR προϊόντος με p-GEM T-easy Cloning kit και επιβεβαίωση θετικών κλώνων με PCR

- Χρησιμοποιήθηκαν 2μl από το PCR προϊόν και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του p-GEM T-easy Cloning kit, ώστε τα δύο ενθέματα να ενσωματωθούν στον φορέα p-GEM T-easy.
 - Το ligation αφέθηκε στους 4°C για 16 ώρες.
 - Μετασχηματίστηκαν κύτταρα *E. coli* JM109 (επεξεργασμένα με χλωριούχο ρουβίδιο).
 - Τελικά έγινε επίστρωση 100μl σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο LB, αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml, IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.5mM και X-Gal σε τελική συγκέντρωση 80μg/ml.
 - Μετά την επώαση των 24h στους 37°C, ελέγχεται αν υπάρχουν λευκές αποικίες με τους άνωθεν εκκινητές, οι οποίες και συλλέγονται.
- ❖ Ο μετασχηματισμός των κυττάρων *E. coli* JM109 έγινε με τη μέθοδο του heat-shock, σύμφωνα με το εξής πρωτόκολλο:

- ✓ Τα κύτταρα ξεπαγώνουν από τους -80°C και σε κάθε aliquot προστίθενται 5μl από το ligation.
- ✓ Ήπιο πιπετάρισμα 3-4 φορές και επώαση 20min στον πάγο.
- ✓ Heat-shock στους 42°C για 50sec ακριβώς και στη συνέχεια, 2 min στον πάγο.
- ✓ Προστίθενται 900μl LB Broth.
- ✓ Επώαση 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση.
- ✓ Επίστρωση στα τρυβλία.

Αφού έγινε η συλλογή των λευκών αποικιών, πραγματοποιήθηκε Colony PCR για να επιβεβαιωθεί αν τα κύτταρα *E. coli* JM109 έχουν όντως προσλάβει τον μετασχηματισμένο φορέα. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν ίδιες με αυτές που περιγράφονται παραπάνω.

2.3.3 Απομόνωση των ενθεμάτων από τους θετικούς κλώνους με πέψη και πέψη του πλασμιδίου pINT

- Πραγματοποιούνται υγρές καλλιέργειες 2 θετικών δειγμάτων, ένα για κάθε γονίδιο, σε LB broth, που περιέχουν αμπικιλίνη 100μg/ml.
- Απομόνωση του πλασμιδίου από τις υγρές καλλιέργειες των θετικών δειγμάτων, με το Nucleospin Plasmid Kit (high copy plasmid DNA extraction), Macherey-Nagel. Έκλουση σε τελικό όγκο 50μl. Τα πλασμίδια αυτά, όπως προαναφέρθηκε, αποτελούνται από: τον φορέα p-GEM T-easy και μέρος του γονιδίου RetS, τον φορέα p-GEM T-easy και μέρος του γονιδίου LadS.
- Η απομόνωση του ενθέματος από το πλασμίδιο έγινε με πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μl)
construct	10
buffer H	2
EcoRI (TAKARA)	1
ddH ₂ O	7

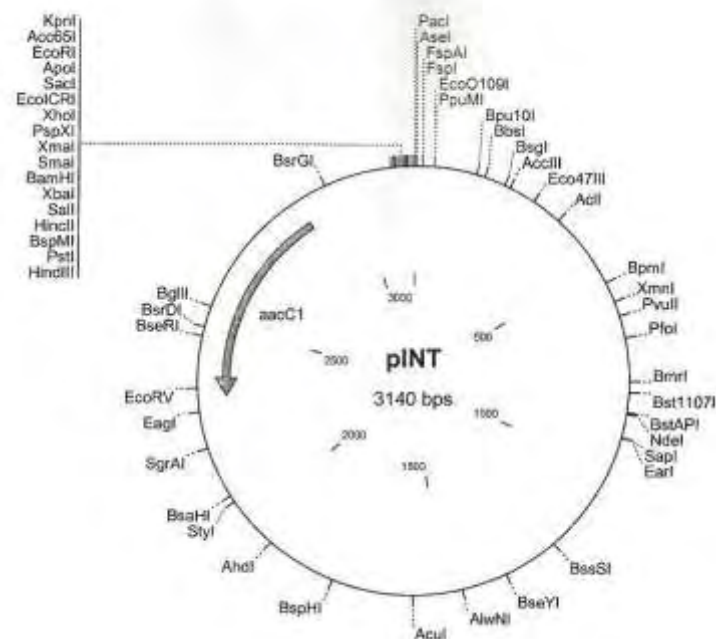
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	20
----------------------	-----------

- Η αντίδραση πέψης επωάζεται για 3h στους 37°C και στη συνέχεια όλη η ποσότητά τους ηλεκτροφορείται σε gel αγαρόζης.
- Με τη χρήση του Gel Clean up Kit, (Macherey-Nagel) απομονώνονται οι ζώνες που αντιστοιχούν στα ενθέματα. Η έκλουση γίνεται στα 30μl.

Το πλασμίδιο pINT έχει μέγεθος 3140bp και περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην γενταμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 25μg/ml. Περιέχει θέσεις αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού EcoRI. Πραγματοποιήθηκε πέψη του πλασμιδίου pINT. Με αυτόν τον τρόπο, δημιουργούνται συμπληρωματικά άκρα, μεταξύ του πλασμιδίου pINT και των δύο ενθεμάτων, εφόσον έχουν κοπεί από το ίδιο ένζυμο περιορισμού, έτσι ώστε να ενσωματωθούν τα ενθέματα στον φορέα pINT μέσω συμπληρωματικών άκρων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ(μl)
pINT vector	10
buffer H	2
EcoRI (TAKARA)	1
ddH ₂ O	7μl
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	20

- Η αντίδραση πέψης επωάζεται για 3h στους 37°C.
- Μετά το πέρας της επώασης, η αντίδραση “καθαρίζεται” με το Nucleospin Extract II Kit, Macherey-Nagel. Η έκλουση γίνεται στα 30μl.



Ο χάρτης περιορισμού του πλασμιδίου pINT.

2.3.4 Αντίδραση δεσμάσης (ligation) και μετασχηματισμός

- Η αντίδραση δεσμάσης έγινε σε τελικό όγκο 10μl και χρησιμοποιήθηκε η T4 ligase (PROMEGA).

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (μl)
pINT vector	1
insert	6
buffer	1
T4 ligase (PROMEGA)	1
ddH ₂ O	1
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	10

- Η επώαση έγινε στους 4°C για 24h.

- Για τον μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα *E. coli* JM109 (επεξεργασμένα με χλωριούχο ρουβίδιο). Σε 200μl κυττάρων προστέθηκαν 5 μl από την αντίδραση δεσμάσης.
- Μετά το heat shock, τα κύτταρα επωάστηκαν για 1h στους 37°C και στη συνέχεια έγινε επίστρωση 100μl σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB agar και γενταμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 25μg/ml. Η υπόλοιπη καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 1 λεπτό και στη συνέχεια τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 100μl φρέσκο LB broth και επιστρώθηκαν σε τρυβλίο με θρεπτικό μέσο LB agar και γενταμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 25μg/ml. Οι στερεές καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37°C για 24h.

2.3.5 Επιβεβαίωση θετικού δείγματος με PCR και πέψη

- Επιλέγονται 12 τυχαίες αποικίες από τις στερεές καλλιέργειες, 6 για κάθε γονίδιο, και ελέγχονται με PCR. Οι συνθήκες της αντίδρασης περιγράφονται παραπάνω.
- Πραγματοποιούνται υγρές καλλιέργειες των θετικών δειγμάτων και επωάζονται στους 37°C.
- Γίνεται απομόνωση του πλασμιδίου από τις υγρές καλλιέργειες με το Nucleospin Plasmid Kit, Macherey-Nagel. Έκλουση σε τελικό όγκο 50μl.
- Στη συνέχεια γίνεται πέψη με EcoRI σε τελικό όγκο 20μl. Ηλεκτροφορείται όλη η ποσότητα της πέψης.
- Αποθηκεύονται οι θετικές αποικίες σε stock γλυκερόλης, σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:
 - ✓ Υγρό θρεπτικό μέσο LB Broth τοποθετήθηκε σε μικρά φιαλίδια (vials). Μοιράστηκε η ποσότητα των 5 ml στο κάθε vial όπου αποστειρώθηκε και έπειτα μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες οι πρόσφατα ανεπτυγμένες αποικίες των βακτηρίων
 - ✓ Οι υγρές καλλιέργειες επωάστηκαν στους 30 °C για 24 ώρες
 - ✓ Έπειτα, σε αποστειρωμένα erppendorf μεταφέρθηκε η ποσότητα των 1,5 ml από το κάθε γυάλινο φιαλίδιο και έγινε φυγοκέντρωση στις 12000rpm για 3 λεπτά

- ✓ Στη συνέχεια, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1 ml από φρέσκο LB Broth και έγινε vortex
- ✓ Έγινε μεταφορά σε cryovials και έπειτα προσθήκη γλυκερόλης 300-350 ml (τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 15-20%) και πραγματοποιήθηκε πολύ καλό vortex
- ✓ Τα cryovials παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και στη συνέχεια διατηρήθηκαν στους -80°C , όπου και παρέμειναν σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

2.3.6 Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* S17 και επιβεβαίωση με PCR

- Απομόνωση του construct pINT-4865 και construct pINT-4801 από τα μετασχηματισμένα JM109 κύτταρα.
- Μετασχηματισμός με το construct των κυττάρων *E. coli* S17 με ηλεκτροδιάτρηση.
- Γίνεται η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων σε θρεπτικό μέσο LB agar με γενταμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 25μg/ml. Οι στερεές καλλιέργειες επωάστηκαν στους 37°C για 24h.
- Οι θετικοί κλώνοι επιβεβαιώθηκαν με PCR (όπως Παράγραφος 2.3.2)

❖ Ηλεκτροδιάτρηση:

- ✓ Τοποθετούνται οι κυψελίδες για 10min στους -20°C .
- ✓ Τα κύτταρα αφήνονται να ξεπαγώσουν μέσα σε πάγο.
- ✓ Χρησιμοποιούνται 2μl από το κάθε construct και προσθέτονται στα κύτταρα. Έπειτα, μεταφέρονται στις κυψελίδες.
- ✓ Οι κυψελίδες τοποθετούνται στο μηχάνημα και πραγματοποιείται η ηλεκτροδιάτρηση.
- ✓ Μετά, προστίθενται 600μl φρέσκου LB.
- ✓ Επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση.

2.3.7 Σύζευξη κυττάρων *E. coli* S17 και *Pseudomonas entomophila* wt

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.

- Από μια στερεή καλλιέργεια *Pe* διαλέγεται μια αποικία και επιστρώνεται σε ένα τρυβλίο Petri, δημιουργώντας μερικές πυκνές οριζόντιες ραβδώσεις στο ½ του τρυβλίου.
 - Στη συνέχεια διαλέγεται μια αποικία από τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* S17 και δημιουργούνται ραβδώσεις κάθετα σε αυτές που είχαν δημιουργηθεί με την *Pe*, περιστρέφοντας το τρυβλίο κατά 90°.
 - Επώζεται η καλλιέργεια στους 30 °C για 24 ώρες.
 - Την επόμενη μέρα συλλέγονται όλα τα βακτήρια από το τρυβλίο με μια οδοντογλυφίδα και επαναδιαλύονται σε 500μl φρέσκο LB. Από αυτά τα 500μl, επιστρώνονται 100 μl σε τρυβλία με LB agar και γενταμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 25μg/ml και αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Επώζονται οι καλλιέργειες στους 30 °C για 24 ώρες.
- ❖ Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές, μία για κάθε ένα από τα γονίδια (*retS* & *ladS*).

2.3.8 Επιβεβαίωση των *PeΔretS* και *PeΔladS* mutants με PCR

Όπως προαναφέρθηκε, τα μεταλλάγματα δημιουργήθηκαν με διάσπαση των δυο αυτών γονιδίων μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός, γίνεται μεταξύ του ανασυνδυασμένου φορέα pINT και του γονιδίου που περιέχει, δηλαδή, μέσω της δομής pINT-RetS και pINT-LadS και του αντίστοιχου γονιδίου στο γονιδίωμα της

Pseudomonas entomophila αγρίου τύπου. Αυτό σημαίνει πως ο ανασυνδυασμένος φορέας pINT-RetS θα ενσωματωθεί στο γονίδιο RetS που βρίσκεται στο γονιδίωμα του βακτηρίου του αγρίου τύπου, με αποτέλεσμα να «σπάσει» το γονίδιο και να το απενεργοποιήσει. Το αντίστοιχο θα συμβεί και στο γονίδιο LadS.

Στη συγκεκριμένη επιβεβαίωση με PCR, χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικοί εκκινητές και άρα, 4 διαφορετικές αντιδράσεις PCR. Οι 2 από αυτούς υβριδίζονται στα αντίστοιχα γονίδια ενώ οι άλλοι δύο υβριδίζονται στο πλασμίδιο pINT. Αυτό συμβαίνει διότι κατά τον ομόλογο ανασυνδυασμό και την ενσωμάτωση των δομών pINT-RetS και pINT-LadS, δεν είναι γνωστός ο προσανατολισμός με τον οποίο εισάγονται στα αντίστοιχα γονίδια του αγρίου τύπου, με σκοπό να τα διασπάσουν. Γι' αυτό και χρησιμοποιούνται 2 εκκινητές για τον φορέα, ένας forward και ένας reverse, αλλά και για να σιγουρευτούμε ότι όντως ενσωματώθηκε ολόκληρος ο ανασυνδυασμένος φορέας στο γονίδιο και το έσπασε. Οι εκκινητές που «πιάνουν» στα γονίδια, είναι για επιβεβαίωση ότι, μετά τη σύζευξη, η ενσωμάτωση του pINT έγινε στο σωστό γονίδιο και ότι στη συλλογή των κλώνων περιλαμβάνονται μόνο κύτταρα *P. entomophila* και όχι κύτταρα *E. coli* S17, τα οποία είναι πιθανόν να επέζησαν και να αναπτύχθηκαν στα τρυβλία.

- Επιβεβαίωση των θετικών κλώνων των *PeΔretS* και *PeΔladS* μεταλλαγμάτων με colony PCR (Kapa Taq).
- Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν υβριδίζονται στα γονίδια αριστερά και δεξιά των γονιδίων PSEEN4865 και PSEEN4801 (Lad-RS και Ret-FS) και στο πλασμίδιο pINT (pINTR και pINTF).

Lad-RS: Έχει συγκέντρωση 26,1μM και η αλληλουχία του είναι:
5'- TGTCGCTGATGGTAATGCTC-3'

Ret-FS: Έχει συγκέντρωση 21,5μM και η αλληλουχία του είναι:
5'- ACATCTACCTGCGGTTGGTC-3'

pINTF: Έχει συγκέντρωση 34,6μM και η αλληλουχία του είναι:
5'- CTGCGTTCGGTCAAGGTTC-3'

pINTR: Έχει συγκέντρωση 13,1μM και η αλληλουχία του είναι:
5'- ACCGATGAAACGAGAGAGGA-3'

- **ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ: περίπου 1400bp**

ΑΝΤΙΑΠΑΣΤΗΡΙΑ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Buffer Kapa	5x	1x
dNTPs	25mM	250 µM
Lad-RS	26,1µM	0,5µM
pINTF	34,6µM	0,5µM
MgCl ₂	25mM	2mM
Taq pol (Kapa)	5u/µl	1unit

ΑΝΤΙΑΠΑΣΤΗΡΙΑ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Buffer Kapa	5x	1x
dNTPs	25mM	250 µM
Lad-RS	26,1µM	0,5µM
pINTR	13,1µM	0,5µM
MgCl ₂	25mM	2mM
Taq pol (Kapa)	5u/µl	1unit

ΑΝΤΙΑΠΑΣΤΗΡΙΑ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Buffer Kapa	5x	1x
dNTPs	25mM	250 µM
Ret-FS	21,5µM	0,5µM
pINTF	34,6µM	0,5µM

MgCl ₂	25mM	2mM
Taq pol (Kapa)	5u/μl	1unit

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Buffer Kapa	5x	1x
dNTPs	25mM	250 μM
Ret-FS	21,5μM	0,5μM
pINTR	13,1μM	0,5μM
MgCl ₂	25mM	2mM
Taq pol (Kapa)	5u/μl	1unit

- Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25μl.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

95°C	→	5min	
95°C	→	20sec	} 25 cycles
56°C	→	20sec	
72 °C	→	2min	
72 °C	→	10min	

- Οι θετικοί κλώνοι αποθηκεύονται σε stock γλυκερόλης.

2.4 Δοκιμασία πρωτεάσης

Είναι γνωστό ότι η *P. entomophila* εμφανίζει πρωτεολυτική ικανότητα, παράγει δηλαδή πρωτεάσες, ένζυμα που διασπούν τις

πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένου και τις πρωτεΐνες του γάλακτος. Σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο περιέχει ημιαποβουτυρωμένο γάλα, οι αποικίες της *P. entomophila* εμφανίζουν περιμετρικά μια ζώνη πρωτεόλυσης. Στη συγκεκριμένη δοκιμή, μετρήθηκε εάν και κατά πόσο τα μεταλλάγματα έχουν την ικανότητα πρωτεόλυσης που έχει το βακτήριο αγρίου τύπου.

- Ημιαποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη διαλύθηκε σε απιονισμένο νερό σε ποσοστό 10%.
- Από το άνωθεν διάλυμα, παρήχθησαν τρυβλία με PCA (Plate Count Agar). Τα τρυβλία είχαν περιεκτικότητα σε γάλα 1,5%.
- Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν 1,5 μl από τους θετικούς κλώνους των μεταλλαγμάτων που επιβεβαιώθηκαν και συλλέχθηκαν (παράγραφος 2.3.8).
- Σε ένα τρυβλίο τοποθετήθηκαν 1,5 μl σε αρκετή απόσταση μεταξύ τους, με τη μορφή μεμονωμένης σταγόνας, έτσι ώστε να διακρίνονται ξεκάθαρα οι διαφορετικές αποικίες, οι οποίες ήταν συνολικά 4 ανά τρυβλίο.
- Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30 °C για 16-18 ώρες.
- Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 2 τρυβλία για κάθε δείγμα (τα 2 μεταλλάγματα και το βακτήριο αγρίου τύπου), δηλαδή 8 αποικίες για το καθένα.
- Πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις του πειράματος.
- Μετρήθηκαν οι ζώνες πρωτεόλυσης κάθε αποικίας σε cm.

Προσοχή: Το διάλυμα γάλακτος αποστειρώθηκε μόνο 15min γιατί σε περισσότερη ώρα, αλλοιώνονται οι πρωτεΐνες του γάλακτος.

2.5 Δοκιμασία σχηματισμού βιοφίλμ

- Πραγματοποιούνται υγρές καλλιέργειες σε LB των θετικών κλώνων της παραγράφου 2.3.8 καθώς και της *P. entomophila* αγρίου τύπου. Επωάζονται στους 30°C για 24 ώρες.
- Γίνεται αραίωση των καλλιεργειών 1:10.

- Φωτομετρείται η αραιωμένη καλλιέργεια στα 600nm (για τυφλό χρησιμοποιείται σκέτο LB).
- Γίνεται επιπλέον προσαρμογή (αραίωση ή συμπύκνωση), όπου χρειάζεται, με σκοπό η κάθε καλλιέργεια να έχει OD ~ 0,3.
- Σε ένα microtiter plate, προστίθενται 200μl LB και 5μl της καλλιέργειας σε κάθε ένα απ' τα πηγαδάκια.
- Το microtiter plate φωτομετρείται στα 600nm και οι μετρήσεις ορίζονται ως t0.
- Το plate επωάζεται για 48 ώρες στους 30⁰C.
- Φωτομετρείται στα 600nm και οι μετρήσεις ορίζονται ως t48.
- Απορρίπτεται το περιεχόμενο του plate και σε κάθε πηγαδάκι προστίθενται 200μl της χρωστικής κρυσταλλικό ιώδες.
- Το plate αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5min.
- Ξεπλένεται 7-8 φορές με απιονισμένο νερό.
- Στεγνώνει σε θερμοκρασία δωματίου overnight.
- Για να ξεβαφτεί, προσθέτονται σε κάθε πηγαδάκι 200μl ενός μίγματος αιθανόλης και ακετόνης, σε αναλογία 1:1.
- Μεταφέρονται 20μl από το κάθε πηγαδάκι σε καινούργιο microtiter plate, και προστίθενται 180μl του μίγματος αιθανόλης-ακετόνης 1:1.
- Το καινούργιο plate φωτομετρείται στα 520nm και οι μετρήσεις ορίζονται ως t'.
- Πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.
- Έγιναν 2 επαναλήψεις του πειράματος.

❖ Οι φωτομετρήσεις των microtiter plates έγιναν με το πρόγραμμα Gen5.

2.6 Μόλυνση ενήλικων ατόμων *Drosophila melanogaster* (Βιοδοκιμές)

Στη διαδικασία των βιοδοκιμών, χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματόζωα οι μύγες των φρούτων, *Drosophila melanogaster*, οι οποίες αποτελούν τον βασικό ξενιστή της *P. entomophila*. Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Canton S, που είναι ένας άγριος τύπος της

Drosophila melanogaster. Τα πειραματόζωα, καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους, παρέμεναν σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας. Η τροφή που τους παρέχονταν ήταν η εξής:

ΣΥΝΤΑΓΗ ΤΡΟΦΗΣ ΓΙΑ DROSOPHILA (ΓΙΑ ~ 10 TUBES)

ΑΓΑΡ		ΣΙΡΟΠΙ		ΚΑΛΑΜΠΟΚΑΛΕΥΡΟ		ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟ ΟΞΥ	ΜΑΓΙΑ
Άγαρ	Νερό βρύσης	Ζάχαρη	Νερό βρύσης	Καλαμποκάλευρο	Νερό βρύσης		
1gr	62.5ml	1.8gr	12ml	7.5gr	25ml	0.3ml	1/4 κύβος νωπή

Προσθέτονται σε μια κατσαρόλα το άγαρ, η ζάχαρη και το αντίστοιχό τους νερό. Αφήνεται σε δυνατή φωτιά να πάρει μια βράση. Σε μια άλλη κατσαρόλα ανακατεύονται το αλεύρι, το προπιονικό οξύ και το αντίστοιχο νερό. Η μαγιά λιώνεται σε πολύ λίγο νερό (να είναι αρκετά πηχτό) και προστίθεται στο αλεύρι. Μόλις το μείγμα με το άγαρ βράσει, προστίθεται στο μείγμα του αλευριού και ανακατεύεται γρήγορα να μην σβολιάσει. Προστίθεται και λίγο επιπλέον νερό. Πριν αρχίσει να πήζει, μοιράζεται σε tubes (περίπου στο 1/3) και αφήνεται να πήξουν. Τέλος, προστίθενται ελάχιστοι κόκκοι ξηρής μαγιάς σε κάθε tube, αφού έχουν πήξει πρώτα.

- ❖ Το προπιονικό οξύ, παράγεται από τα σαπισμένα φρούτα, και, μαζί με τη μαγιά, προσελκύουν τις μύγες στο σημείο όπου υπάρχει τροφή.
- ❖ Χρησιμοποιείται νερό βρύσης και όχι απιονισμένο, γιατί στο πρώτο, υπάρχουν τα απαραίτητα μεταλλικά ιόντα που χρειάζονται για την ανάπτυξη των ζώντων οργανισμών.

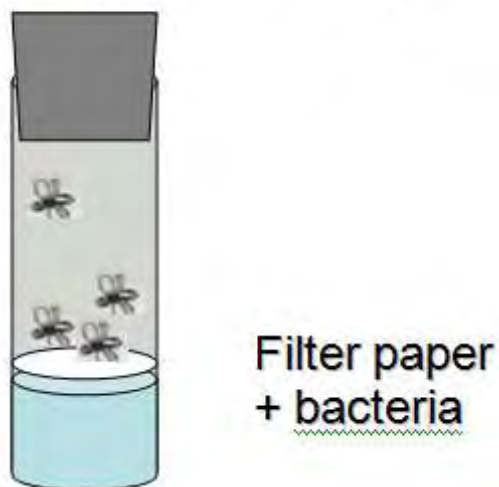
Η μόλυνση των πειραματόζωων έγινε με την εξής διαδικασία:

- Πραγματοποιήθηκαν στερεές καλλιέργειες των δύο μεταλλαγμάτων και του βακτηρίου αγρίου τύπου, σε θρεπτικό υπόστρωμα PCA με 1,5% ημιαποβουτηρωμένο γάλα. Επώστηκαν στους 30⁰C για 24 ώρες.
- Έγιναν υγρές καλλιέργειες, 2 για κάθε κλώνο (συνολικά 6). Επώστηκαν στους 30⁰C για 24 ώρες.
- Έγιναν υγρές καλλιέργειες των 200ml LB, μία για κάθε κλώνο, και σε αυτές προστέθηκαν και τα δύο vials των υγρών καλλιεργείων της προηγούμενης μέρας. Επώστηκαν στους 30⁰C για 24 ώρες.
- Τοποθετούνται 4 φιαλίδια τύπου falcon για κάθε υγρή καλλιέργεια των 200ml στο ψυγείο, για να πιάσουν θερμοκρασία (συνολικά 12).
- Μοιράζονται τα 200ml κάθε καλλιέργειας στα 4 falcon, από 50ml στο καθένα.
- Φυγοκεντρούνται για 20min, στους 4⁰C, σε 4000rpm έτσι ώστε να δημιουργηθεί βακτηριακό ίζημα. **ΠΡΟΣΟΧΗ:** Τα δείγματα δουλεύονται πάντα σε πάγο για να αποφευχθεί η λύση των κυττάρων. Δεν χρειάζεται οι συνθήκες να είναι αποστειρωμένες γιατί το βακτηριακό ίζημα είναι αρκετά συμπυκνωμένο και δεν υπάρχει ο φόβος επιμολύνσεων.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο του ενός από τα 4 falcon, ενός δείγματος, και προστίθενται σε αυτό 300μl LB. Γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος με τη βοήθεια μιας πιπέτας.
- Απορρίπτεται και το υπερκείμενο του δεύτερου falcon και σε αυτό, προστίθεται το επαναδιαλυμένο ίζημα του πρώτου. Επαναλαμβάνεται η διάλυση του ιζήματος και σε αυτό το falcon. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και στα υπόλοιπα falcon, των υπόλοιπων δειγμάτων.
- Από αυτά τα συμπυκνωμένα και επαναδιαλυμένα πλέον falcon, μεταφέρονται 5μl σε 5ml απιονισμένου νερού (αραίωση 1:1000). Γίνεται vortex και μεταφέρονται σε κυψελίδες όπου και φωτομετρούνται στα 600nm.
- Χρησιμοποιούνται τα falcon των οποίων η οπτική απορρόφηση είναι πιο κοντά στα 0,2 ή γίνονται προσαρμογές (αραίωση-συμπύκνωση) όπου χρειάζεται.
- Συλλέγονται μόνο τα αρσενικά άτομα μυγών από το stock του στελέχους Canton S και τοποθετούνται σε tubes χωρίς τροφή (30 άτομα για κάθε δείγμα, 10 άτομα σε κάθε tube). Διατηρούνται για 2 ώρες στους 29⁰C. **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.

- Παρασκευάζεται θρεπτικό μέσο για τις μύγες χρησιμοποιώντας ζάχαρη 5%, άγαρ 2,4% και νερό βρύσης 100ml. Λιώνεται καλά στο φούρνο μικροκυμάτων. Μοιράζεται σε tubes (περίπου 10) και αφήνονται να στεγνώσουν καλά. **ΠΡΟΣΟΧΗ:** Πρέπει να γίνεται συνεχής έλεγχος κατά το λιώσιμο γιατί το μείγμα αφρίζει έντονα όταν θερμαίνεται.
- Αφού στεγνώσουν, τοποθετούνται μέσα σε αυτά ένας δίσκος Whatman, ίδιας διαμέτρου με το tube (χρησιμοποιούνται 3 tubes για κάθε δείγμα).
- Τοποθετούνται μέσα στα tubes 200μl από το ίζημα με OD 0,2 (κάθε δείγματος), με προσοχή ώστε το υγρό να καλύψει όλη την επιφάνεια του δίσκου Whatman.
- Στεγνώνουν για 10min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφέρονται 10 μύγες σε κάθε tube και ελέγχονται αν υπάρχουν νεκρά άτομα, τα οποία και αφαιρούνται από το αρχικό σύνολο.
- Τοποθετούνται στους 29⁰C και μετρούνται τα νεκρά άτομα, κάθε 24 ώρες για 8-9 μέρες.
- Η διαδικασία επαναλήφθηκε 1 ακόμη φορά.
 - ❖ Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκαν tubes με μύγες, τα οποία είχαν εμποτιστεί με σκέτο LB.

Natural infection



Φυσική μόλυνση ενήλικων ατόμων.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Δημιουργία των μεταλλαγμάτων *PeΔretS* και *PeΔladS*

3.1.1 Ενίσχυση των γονιδίων PSEEN4801 (LadS) και PSEEN4865 (RetS) της *P. entomophila* με ExTaq PCR (TAKARA)



Ηλεκτροφόρηση 6μl από την PCR αντίδραση. Ζώνες περίπου στα 850bp.

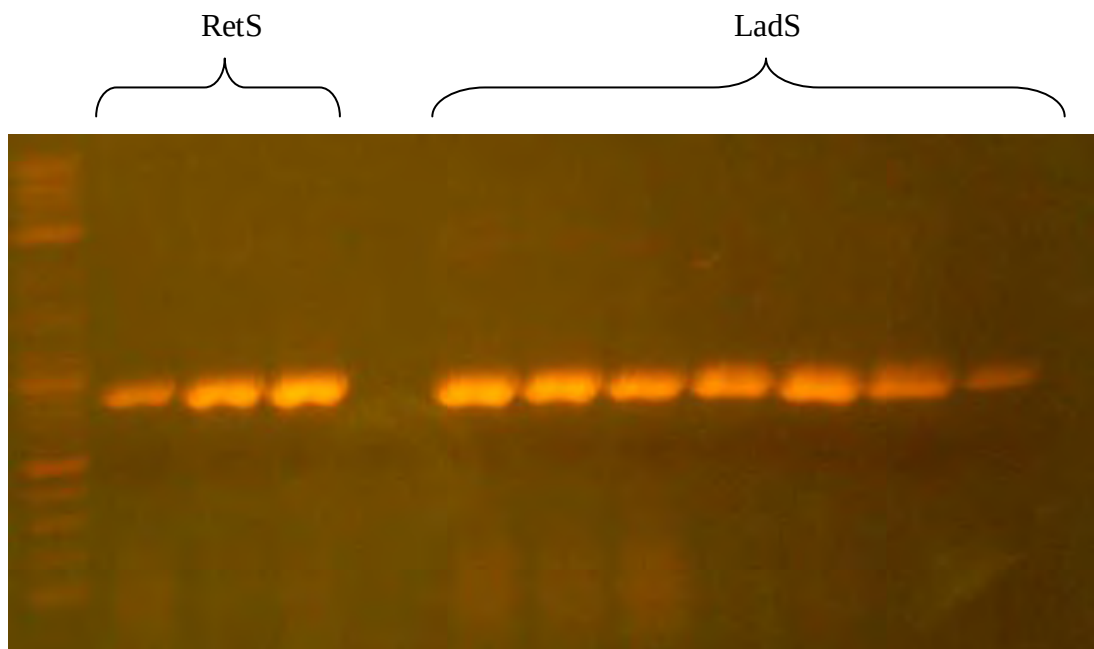
3.1.2 Κλωνοποίηση του PCR προϊόντος με p-GEM T-easy Cloning kit και επιβεβαίωση θετικών κλώνων με PCR

Μετά την κλωνοποίηση με τη μέθοδο heat shock, τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν και το υπόστρωμα X-gal, το οποίο είναι ένα άχρωμο ανάλογο της λακτόζης. Αυτό, αναγνωρίζεται από το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση, διασπάται και απελευθερώνει ένα μπλε χρώμα. Με αυτό τον τρόπο, ανιχνεύονται οι αποικίες που έχουν λάβει έναν ανασυνδυασμένο φορέα και ξεχωρίζονται από αυτές που δεν τον

έχουν προσλάβει. Αυτές που φέρουν τον ανασυνδυασμένο φορέα έχουν λευκό χρώμα.

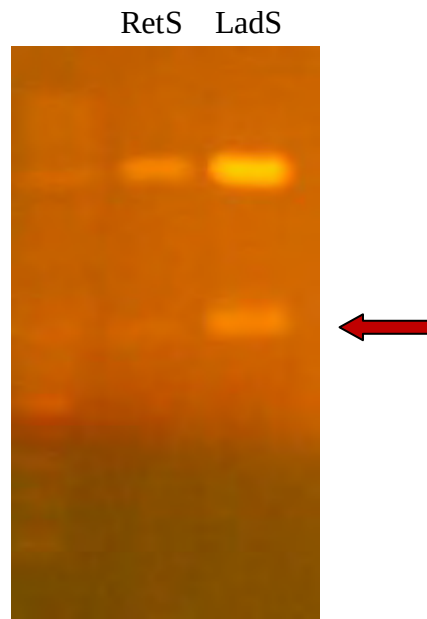


Τρυβλίο με το υπόστρωμα X-gal. Οι αποικίες που συλλέγονται για επιβεβαίωση με PCR είναι μόνο οι λευκές.

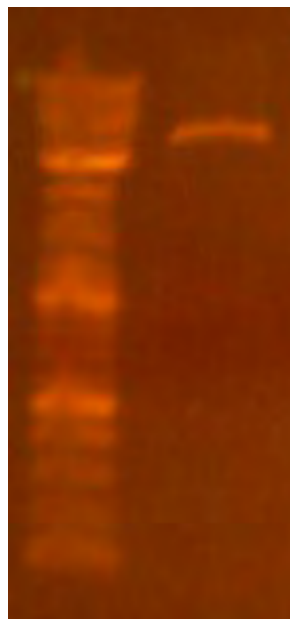


Όλες οι αποικίες που ελέγχθηκαν βγήκαν θετικές. Προϊόντα περίπου στις 850bp. Ηλεκτροφόρηση 6μl. Οι αποικίες περιέχουν τον φορέα pGEM – T-easy και τα αντίστοιχα τμήματα των γονιδίων RetS & LadS.

3.1.3 Απομόνωση μέσω πέψης των ενθεμάτων από θετικούς κλώνους και πέψη του πλασμιδίου pINT



Πέψη των δειγμάτων με EcoRI. Ηλεκτροφόρηση ολόκληρης της ποσότητας της πέψης (20μl). Προϊόντα περίπου στις 850bp.

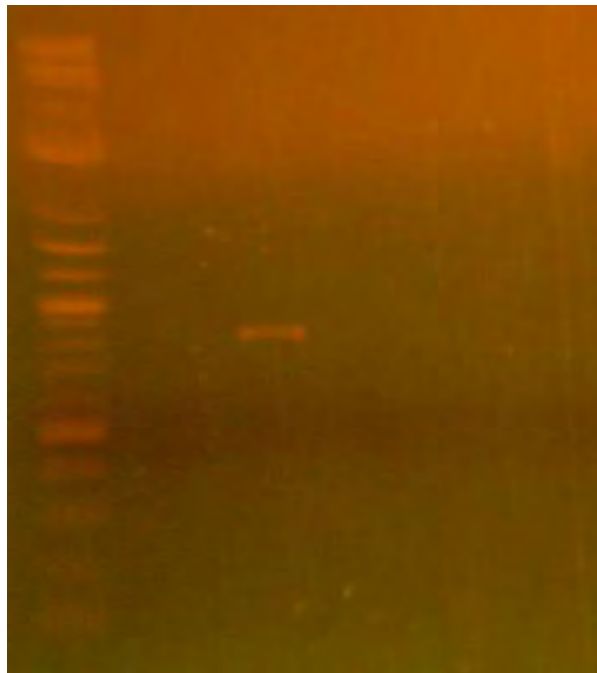


Πέψη του πλασμιδίου pINT.

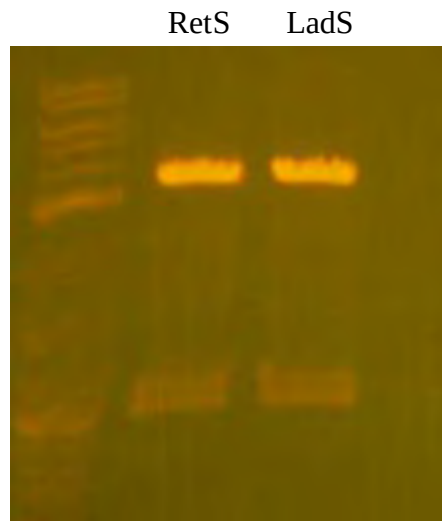
3.1.4 Επιβεβαίωση θετικού δείγματος με PCR και πέψη (δείγματα της αντίδρασης δεσμάσης μεταξύ pINT και γονιδίων μετά από μετασχηματισμό του βακτηριακού στελέχους JM109)



Από τις 6 αποικίες που ελέγχθηκαν για το γονίδιο LadS, οι 2 μόνο βγήκαν θετικές, είχαν προσλάβει δηλαδή τον ανασυνδυασμένο φορέα pINT με το ένθεμα LadS.

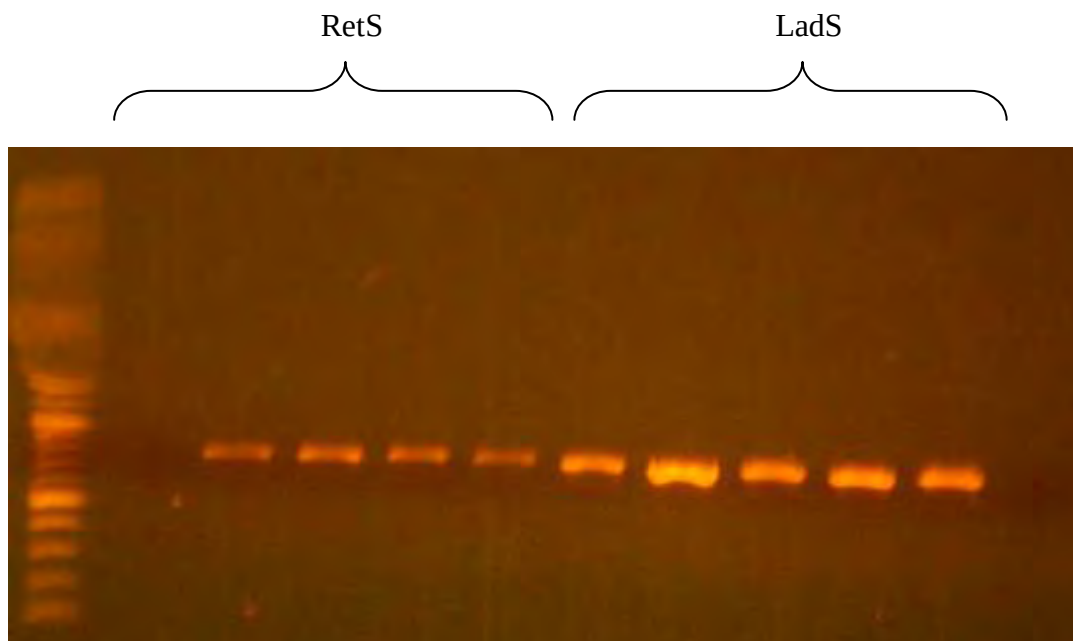


Από τις 6 αποικίες που ελέγχθηκαν για το γονίδιο RetS, η 1 μόνο βγήκε θετική, είχε προσλάβει δηλαδή τον ανασυνδυασμένο φορέα pINT με το ένθεμα RetS.



Πέψη των construct pINT-RetS και pINT-LadS. Τα προϊόντα στις 850bp.

3.1.5 Μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* S17 και επιβεβαίωση με PCR

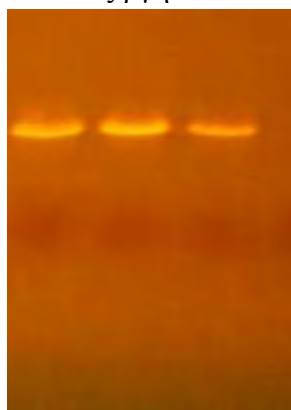


Από τις 5 αποικίες που ελέγχθηκαν για κάθε γονίδιο, μόνο μία στο RetS δεν έδωσε θετικό αποτέλεσμα. Ηλεκτροφόρηση στα 6μl. Τα κύτταρα *E. coli* S17 περιέχουν τα construct pINT-RetS και pINT-LadS.

3.1.6 Επιβεβαίωση των *PeΔretS* και *PeΔladS* mutants με PCR (μετά τη σύζευξη)



Από τις 2 PCR αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν για το γονίδιο RetS, θετικό αποτέλεσμα έδωσε αυτή με τους εκκινητές Ret-FS και pINTR. Ελέγχθηκαν 6 αποικίες για κάθε αντίδραση και θετικές βγήκαν οι 3.



Από τις 2 PCR αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν για το γονίδιο LadS, θετικό αποτέλεσμα έδωσε αυτή με τους εκκινητές Lad-RS και pINTR. Ελέγχθηκαν 6 αποικίες για κάθε αντίδραση και θετικές βγήκαν οι 3.

Από την αντίδραση φαίνεται πως και τα δυο construct εισήχθησαν στα αντίστοιχά τους γονίδια με τον ίδιο προσανατολισμό καθώς, αποτέλεσμα έδωσε μόνο ο reverse εκκινητής του pINT και όχι ο forward.

3.2 Δοκιμασία πρωτεάσης

Για να γίνει σύγκριση μεταξύ των μεταλλαγμάτων και του αγρίου τύπου, μετρήθηκε η ακτίνα της ζώνης πρωτεόλυσης σε cm, σε κάθε μια από τις αποικίες. Στον παρακάτω πίνακα, φαίνονται συνολικά οι 8

αποικίες, των οποίων οι ζώνες πρωτεόλυσης μετρήθηκαν, για κάθε ένα από τα δείγματα και οι ακτίνες τους σε εκατοστά.

	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>P. entomophila</i> wild type	0,3cm	0,3cm	0,3cm	0,3cm	0,2cm	0,2cm	0,2cm	0,2cm
RetS	0,2cm	0,2cm	0,2cm	0,2cm	0,2cm	0,2cm	0,2cm	0,2cm
LadS	0,4cm	0,4cm	0,4cm	0,4cm	0,4cm	0,3cm	0,3cm	0,3cm

Από αυτές τις μετρήσεις, προέκυψε ο μέσος όρος $\{\bar{x}\}$ και η τυπική απόκλιση $\{S\}$.

P. entomophila wild type: $\bar{x} = 0,25 \text{ cm} \pm 0,05$

Μετάλλαγμα RetS: $\bar{x} = 0,2 \text{ cm} \pm 0,00$

Μετάλλαγμα LadS: $\bar{x} = 0,36 \text{ cm} \pm 0,05$

Για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, έγιναν 2 επιπλέον επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα των επαναλήψεων ήταν τα εξής:

1^η επανάληψη

P. entomophila wild type: $\bar{x} = 0,17 \text{ cm} \pm 0,04$

Μετάλλαγμα RetS: $\bar{x} = 0,15 \text{ cm} \pm 0,06$

Μετάλλαγμα LadS: $\bar{x} = 0,25 \text{ cm} \pm 0,06$

2^η επανάληψη

P. entomophila wild type: $\bar{x} = 0,29 \text{ cm} \pm 0,05$

Μετάλλαγμα RetS: $\bar{x} = 0,25 \text{ cm} \pm 0,08$

Μετάλλαγμα LadS: $\bar{x} = 0,32 \text{ cm} \pm 0,06$

Από το πρότυπο των ζωνών πρωτεόλυσης, φαίνεται πως το μετάλλαγμα RetS εμφανίζει μια ελαφρώς μειωμένη πρωτεολυτική ικανότητα σε σχέση με το βακτήριο του αγρίου τύπου, ενώ το μετάλλαγμα LadS μια ελαφρώς πιο αυξημένη πρωτεολυτική ικανότητα.



Τρυβλίο με 4 αποικίες *P. entomophila* wild type. Γύρω από κάθε αποικία φαίνεται η ζώνη πρωτεόλυσης.



Τρυβλίο με 4 αποικίες του μεταλλάγματος *retS* και οι ζώνες πρωτεόλυσης.



Τρυβλίο με 4 αποικίες του μεταλλάγματος *ladS* και οι ζώνες πρωτεόλυσης, εμφανώς πιο μεγάλες σε σχέση με αυτές του αγρίου τύπου.

3.3 Δοκιμασία σχηματισμού βιοφίλμ

Στην δοκιμή σχηματισμού βιοφίλμ, μετρήθηκαν συνολικά 8 υγρές καλλιέργειες για κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα των φωτομετρήσεων σε κάθε στάδιο επώασης και χρώσης ήταν τα εξής:

t0 (600nm)

	P. ent. wild type	RetS	LadS
1	0,047	0,045	0,046
2	0,046	0,049	0,045
3	0,049	0,048	0,048
4	0,055	0,05	0,05
5	0,048	0,047	0,046
6	0,049	0,047	0,047
7	0,049	0,048	0,047
8	0,046	0,046	0,048

t₄₈ (600nm)

	P. ent. wild type	RetS	LadS
1	1,171	1,055	1,121
2	1,329	1,258	1,369
3	1,311	1,288	1,309
4	1,303	1,289	1,342
5	1,406	1,295	1,31
6	1,318	1,268	1,308
7	1,328	1,272	1,282
8	1,126	1,109	1,287

t' (520nm)

	P. ent. wild type	RetS	LadS
1	0,066	0,068	0,071
2	0,054	0,066	0,053
3	0,05	0,056	0,045
4	0,048	0,055	0,048
5	0,05	0,055	0,048
6	0,049	0,051	0,05
7	0,048	0,049	0,048
8	0,054	0,062	0,053

Για να γίνει ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων, χρησιμοποιήθηκε ο εξής τύπος:

$$\frac{t'}{t_{48} - t_0}$$

Χρήση αυτού του τύπου έγινε και για τις 8 αποικίες κάθε δείγματος και υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση.

P. entomophila wild type: $\bar{x} = 0,04 \pm 0,009$

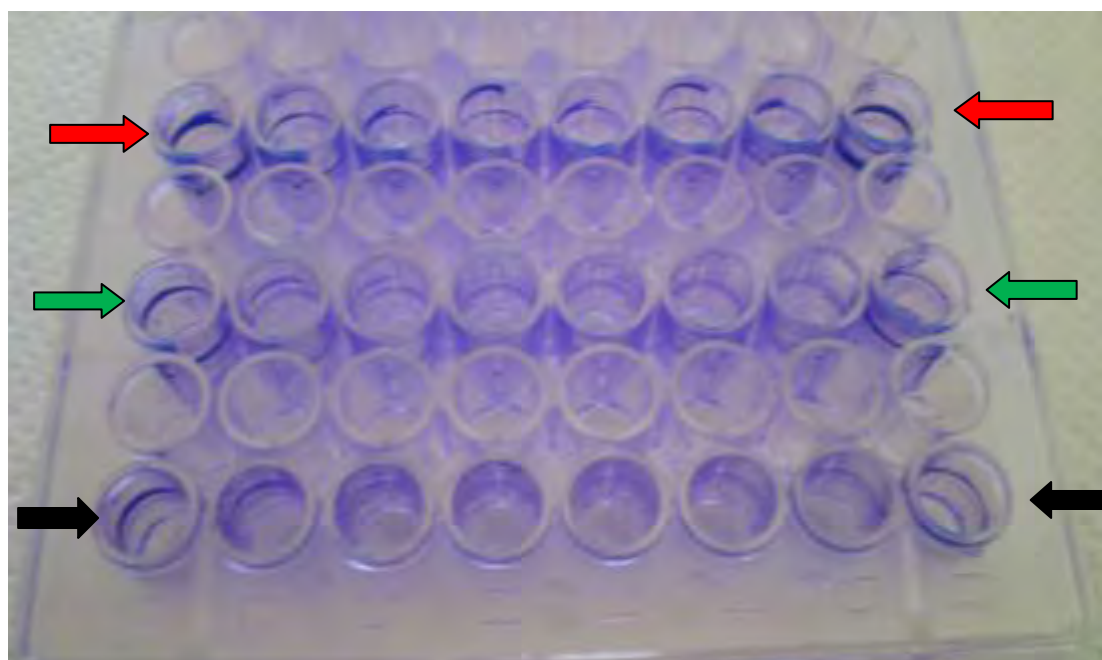
Μετάλλαγμα RetS: $\bar{x} = 0,05 \pm 0,012$

Μετάλλαγμα LadS: $\bar{x} = 0,04 \pm 0,011$

Εάν υποθέσουμε πως το βακτήριο αγρίου τύπου θεωρείται το 100%, τότε το μεταλλάγμα LadS, το οποίο είναι ίδιο με του αγρίου τύπου, βρίσκεται επίσης στο 100% της παραγωγής βιοφίλμ, ενώ το μεταλλάγμα RetS βρίσκεται στο 125%, δηλαδή η παραγωγή βιοφίλμ είναι αυξημένη κατά 25%.

Οι μετρήσεις αυτές προκύπτουν όταν διαιρείται ο μέσος όρος του κάθε μεταλλάγματος προς τον μέσο όρο του control, όπου ως control θεωρείται το βακτήριο του αγρίου τύπου.

Για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, έγιναν 2 επιπλέον επαναλήψεις, τα αποτελέσματα των οποίων συμφωνούσαν απόλυτα με τα ανωτέρω αποτελέσματα. Αυτό σημαίνει πως το μεταλλάγμα RetS σχηματίζει περισσότερο βιοφίλμ σε σχέση με το βακτήριο αγρίου τύπου, ενώ το μεταλλάγμα LadS εμφανίζει ίδιο πρότυπο σχηματισμού βιοφίλμ με αυτό του wild type.



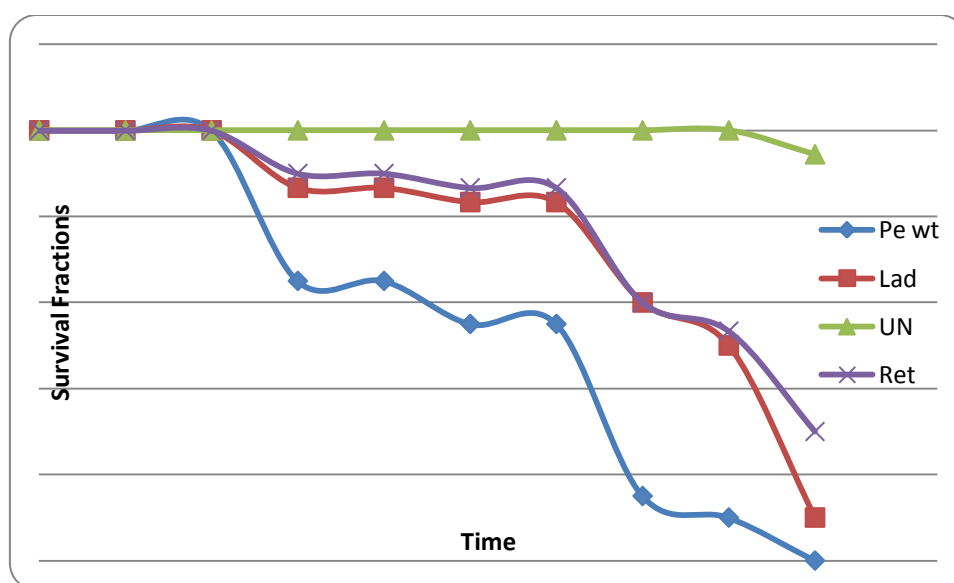
Εικόνα του microtiter plate μετά τη χρώση των βακτηρίων με τη χρωστική κρυσταλλικό ιώδες. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τα 8 πηγαδάκια (οριζόντια) των αποικιών του μεταλλάγματος retS. Τα πράσινα βέλη δείχνουν τα 8 πηγαδάκια (οριζόντια) των αποικιών του μεταλλάγματος lads. Τα μαύρα βέλη δείχνουν τα 8 πηγαδάκια (οριζόντια) των αποικιών του βακτηρίου wild type.

3.4 Μόλυνση ενήλικων ατόμων *Drosophila melanogaster* (βιοδοκιμές)

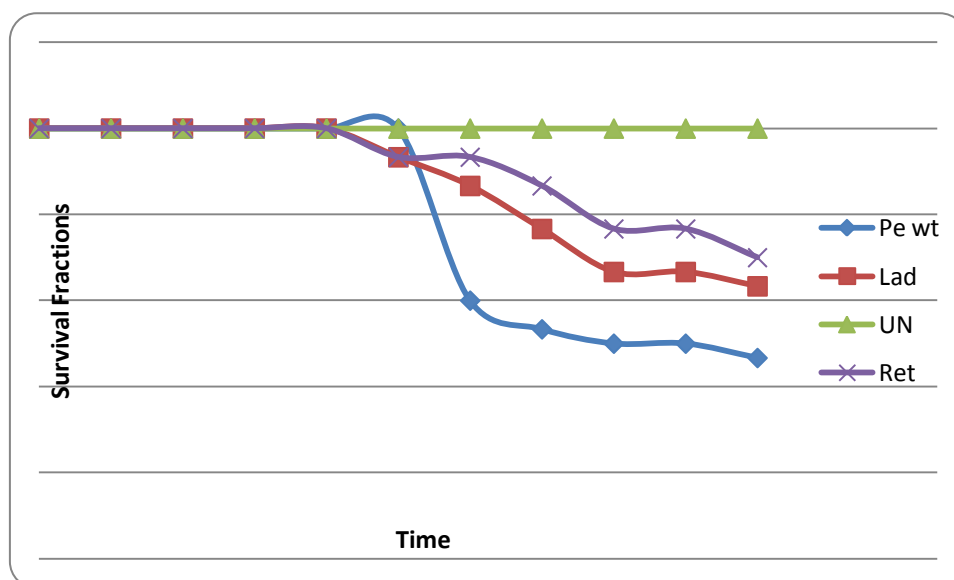
Στον παρακάτω πίνακα, φαίνεται ο αριθμός των πεθαμένων μυγών καθενός από τα δείγματα, σε συνάρτηση με το χρόνο. Η μέτρηση των πεθαμένων μυγών πραγματοποιήθηκε ανά 24ωρο. Οι μετρήσεις ολοκληρώθηκαν σε 9-10 μέρες.

Χρόνος (t)	Wild type	RetS	LadS	Negative control
0	0	0	0	3
24	0	0	0	3
48	0	0	0	3
72	13	3	4	3
96	13	3	4	3
120	17	4	5	3
144	17	4	5	3
168	27	12	10	3
192	28	14	12	3
216	30	21	24	5

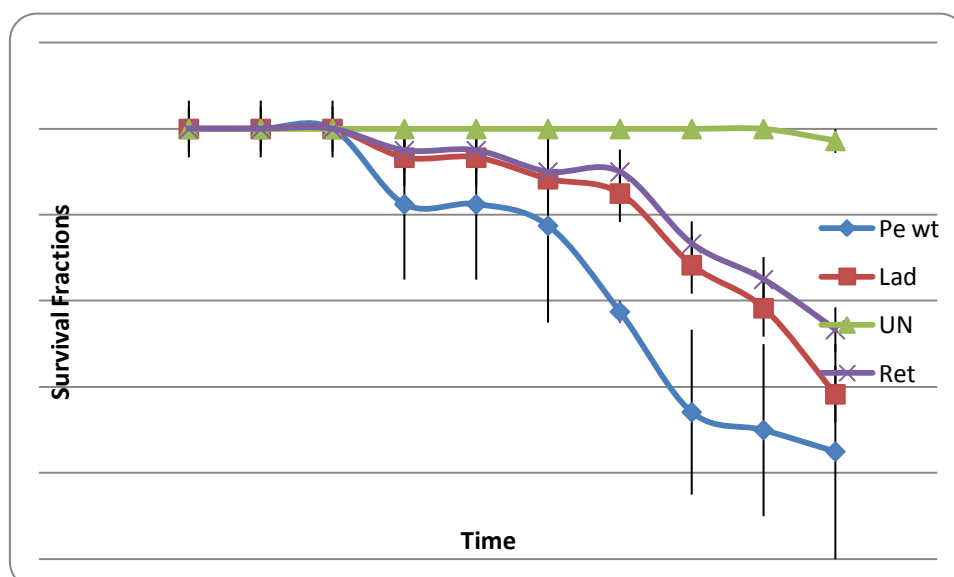
Τα στοιχεία του παραπάνω πίνακα, παριστάνονται διαγραμματικά στο παρακάτω σχήμα:



Τα αποτελέσματα της επαναληπτικής δοκιμής αναπαρίστανται στο ακόλουθο διάγραμμα:



Και στις δυο περιπτώσεις, μεγαλύτερη θνησιμότητα παρουσιάζει το βακτήριο αγρίου τύπου, ακολουθούμενο από το $\Delta ladS$ και το $\Delta retS$, το οποίο και παρουσίασε τη μικρότερη θνησιμότητα. Στο τελευταίο διάγραμμα, φαίνονται συγκριτικά, ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων των δύο άνωθεν διαγραμμάτων:



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η *P. entomophila* είναι αποδεδειγμένα ένα βακτήριο που εμφανίζει έντονη εντομοπαθογένεια, όχι μόνο στη *Drosophila melanogaster*, η οποία αποτελεί και τον κύριο ξενιστή της, αλλά και σε άλλα έντομα όπως τα *Galleria mellonella*, *Bombyx mori* και *Anopheles gambiae* (Opota, 2011). Κάποια από αυτά τα έντομα προκαλούν μεγάλες καταστροφές στις καλλιέργειες οδηγώντας τους αγρότες να καταφύγουν σε χημικά εντομοκτόνα για την καταπολέμησή τους.

Οι τρόποι που χρησιμοποιεί το βακτήριο για να εκφράσει την παθογόνο δράση του είναι πολλοί αν και οι μηχανισμοί που επιστρατεύει δεν είναι πλήρως κατανοητοί. Στους μολυσματικούς παράγοντες περιλαμβάνονται τοξίνες (εξωτοξίνες και αιμολυσίνες), δευτερογενείς μεταβολίτες αλλά και πρωτεΐνες μολυσματικότητας όπως πρωτεάσες (Vodovar et al, 2006). Όλα αυτά τα μόρια έχουν ως στόχο να καταστρέψουν τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου των εντόμων, να διαταράξουν την ομοιόσταση του γαστρεντερικού τους συστήματος και να οδηγήσουν εντέλει στην διακοπή πρόσληψης τροφής και στο θάνατο (Vodovar et al, 2005).

Στην εντομοπαθογένεια του βακτηρίου, κεντρικό ρόλο παίζει το σύστημα δύο στοιχείων GacS/GacA, το οποίο ρυθμίζεται από δύο γονίδια – διακόπτες, τα *retS* και *ladS*. Το πρώτο φαίνεται πως, στην *P. aeruginosa*, προάγει την κινητικότητα, την οξεία μολυσματικότητα αλλά δεν ευνοεί τον μακροχρόνιο αποικισμό, ενώ το δεύτερο προάγει τη χρόνια μολυσματικότητα και τον σχηματισμό βιοφίλμ. Σε κάθε περίπτωση, τα δύο αυτά γονίδια εμπλέκονται ενεργά στην παθογονική δραστηριότητα της *P. aeruginosa* έχοντας αντίθετους ρόλους· όπου το ένα προωθεί, το άλλο εμποδίζει (Moscoso, 2011 – Records & Gross, 2010).

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε για να διευκρινιστεί σε ποιο βαθμό εμπλέκονται τα δύο αυτά γονίδια – διακόπτες στην εντομοπαθογένεια του βακτηρίου *P. entomophila*, χρησιμοποιώντας ως ξενιστή την *Drosophila melanogaster*. Ακόμη, η μελέτη επεκτάθηκε στο να ανιχνευτεί κατά πόσο τα γονίδια αυτά συμβάλλουν στην πρωτεολυτική ικανότητα που εμφανίζει το βακτήριο αλλά και στην ικανότητά του να σχηματίζει βιοφίλμ. Οι παραπάνω στόχοι,

επιτεύχθηκαν με τη δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών της *P. entomophila*, στα οποία έχει επέλθει διάσπαση των γονιδίων *retS* και *ladS*, μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού από έναν πλασμιδιακό φορέα που έφερε επίσης τμήματα των συγκεκριμένων γονιδίων. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο μεταλλαξιγένεσης έδωσε τη δυνατότητα να διασπαστούν τα γονίδια *retS* και *ladS* με τη χρήση του φορέα pINT. Δημιουργήθηκαν δύο μεταλλαγμένοι κλώνοι $\Delta retS$ και $\Delta ladS$.

Αφού έγινε η επιβεβαίωση των μεταλλαγμάτων με PCR και πέψη, και έχοντας πλέον στην κατοχή μας τα μεταλλαγμένα στελέχη, πραγματοποιήθηκαν μια σειρά από δοκιμές, για να ανακαλύψουμε τη συνεισφορά των γονιδίων στις τρεις αυτές σημαντικές πτυχές της διαβίωσης του βακτηρίου.

Στη δοκιμή πρωτεολυτικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα PCA και ημιαποβουτηρωμένο γάλα και μετρήθηκε η ζώνη πρωτεόλυσης σε αποικίες των μεταλλαγμένων στελεχών αλλά και σε στέλεχος αγρίου τύπου για να πραγματοποιηθεί μεταξύ τους σύγκριση. Στη δοκιμή παραγωγής βιοφίλμ μετρήθηκε η απορρόφηση σε καλλιέργειες των μεταλλαγμάτων και του αγρίου τύπου, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων και συγκρίθηκαν τα ποσοστά σχηματισμού βιοφίλμ. Όσον αφορά τις βιοδοκιμές, δηλαδή τη μόλυνση ενήλικων ατόμων *Drosophila melanogaster*, οι μύγες μολύνθηκαν με τη μέθοδο της από του στόματος κατάποσης (φυσική μόλυνση) καθενός από τους τρεις κλώνους (μεταλλάγματα και άγριος τύπος) και μετρήθηκε ο αριθμός των πεθαμένων ατόμων κάθε 24 ώρες για 9 περίπου μέρες.

Τα αποτελέσματα της πρώτης δοκιμής, δηλαδή της πρωτεόλυσης, έδειξαν μια αυξημένη πρωτεολυτική ικανότητα στο μετάλλαγμα *ladS*, σε σχέση με αυτήν του αγρίου τύπου, ενώ η ζώνη πρωτεόλυσης του μεταλλάγματος *retS* ήταν ελαφρώς μειωμένη, πάντα σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Αυτό γίνεται φανερό μετά από τις μετρήσεις της ακτίνας πρωτεόλυσης, σε όλες τις αποικίες που συμπεριλήφθηκαν στο πείραμα. Ο μέσος όρος των ακτινών, μετρημένος σε εκατοστά, για το στέλεχος wild type ήταν 0,25 cm, για το $\Delta ladS$ 0,36 cm και για το $\Delta retS$ 0,2 cm. Την υπόθεση αυτή ενισχύουν και οι επαναλήψεις της δοκιμής, τα αποτελέσματα των οποίων δίνουν προβάδισμα στην πρωτεολυτική δράση του $\Delta ladS$ με 0,25 cm και 0,32 cm, έναντι του αγρίου τύπου με 0,17 cm και 0,29 cm αντίστοιχα. Πράγματι, το $\Delta retS$ έχει μικρότερη ικανότητα

πρωτεόλυσης και οι επαναλήψεις δείχνουν 0,15 cm και 0,25 cm, σε αντιστοιχία με τα παραπάνω αποτελέσματα επαναλήψεων. Τα αποτελέσματα αυτά, υποδηλώνουν, ότι το γονίδιο *ladS*, μετριάζει την παραγωγή πρωτεασών όταν εκφράζεται κανονικά στο βακτήριο, ενώ απουσία αυτού του γονιδίου, η παραγωγή πρωτεασών αυξάνεται και οδηγεί σε αυξημένη πρωτεόλυση, κάτι που ενισχύει την άποψη ότι στο γονίδιο *retS* συμβαίνει το ακριβώς αντίθετο.

Στη δοκιμασία σχηματισμού βιοφίλμ, τα αποτελέσματα έδωσαν αυτή τη φορά προβάδισμα στο $\Delta retS$, το οποίο φαίνεται πως σχηματίζει περισσότερο βιοφίλμ σε σύγκριση με το στέλεχος αγρίου τύπου, κατά 25%. Το $\Delta ladS$ από την άλλη, εμφάνισε ίδιο πρότυπο παραγωγής βιοφίλμ με αυτό του αγρίου τύπου. Αυτές οι μετρήσεις, επιβεβαιώνονται από τις επαναλήψεις, που συμφωνούν απόλυτα με τα ανωτέρω, συμφωνώντας με την υπόθεση ότι αποσιώπηση του γονιδίου *retS*, οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού παραγωγής βιοφίλμ. Κάτι τέτοιο είναι λογικό, καθώς, όπως προαναφέρθηκε (Moscoso, 2011 – Records & Gross, 2010), το γονίδιο *retS*, όταν εκφράζεται φυσιολογικά στο βακτήριο, δεν ευνοεί το σχηματισμό βιοφίλμ. Κατά συνέπεια, διάσπασή του, οδηγεί στο αντίθετο αποτέλεσμα. Το *ladS* μετάλλαγμα έπρεπε να εμφανίσει σημαντική μείωση της δημιουργίας βιοφίλμ, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε.

Τέλος, η μελέτη ολοκληρώθηκε με τη μέτρηση της παθογονικότητας των μεταλλαγμένων στελεχών. Από τις 30 μύγες που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά για κάθε στέλεχος, οι μετρήσεις έδειξαν ότι μετά από 9 μέρες, είχαν αποβιώσει όλες στο στέλεχος αγρίου τύπου, 21 άτομα απεβίωσαν στο $\Delta retS$ και 24 άτομα στο $\Delta ladS$. Η επανάληψη φανερώνει παρόμοια αποτελέσματα, με 16 άτομα να έχουν αποβιώσει στο αγρίου τύπου βακτήριο, 9 στο $\Delta retS$ και 11 στο $\Delta ladS$. Το πρότυπο που συναντάται εδώ, δείχνει πως το $\Delta ladS$ εμφανίζει μια ελαφρώς πιο αυξημένη θνησιμότητα σε σχέση με το άλλο μετάλλαγμα, αλλά κανένα από τα δύο μεταλλάγματα δεν υπερβαίνει τα ποσοστά θνησιμότητας του στελέχους αγρίου τύπου, γεγονός που υποδηλώνει ότι όντως τα δύο αυτά γονίδια επηρεάζουν την εντομοπαθογένεια της *P. entomophila*, δίνοντας ένα πλεονέκτημα στο βακτήριο του αγρίου τύπου, το οποίο και εμφανίζει την μεγαλύτερη παθογένεια από όλα τα υπό εξέταση στελέχη. Το γεγονός ότι το $\Delta retS$ εμφανίζει τη μικρότερη θνησιμότητα, εξηγείται και από τα αποτελέσματα μελέτης (Moscoso, 2011), που υποστηρίζουν ότι το γονίδιο *retS* προάγει την οξεία μολυσματικότητα. Απουσία του

συγκεκριμένου γονιδίου μειώνει την οξεία μολυσματικότητα, και αυτό επιβεβαιώνει το γεγονός ότι το γονίδιο *ladS* προάγει τη χρόνια μολυσματικότητα.

Τα γονίδια *retS* και *ladS* αποτελούν δύο από τους πιο σημαντικούς ρυθμιστές του συστήματος δύο συστατικών *gacS/gacA*, ένα σύστημα που παίζει κυρίαρχο ρόλο στην εντομοπαθογένεια πολλών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου και της *P. entomophila*. Η συμβολή τους δεν περιορίζεται μόνο στην εναλλαγή μεταξύ χρόνιας και οξείας μόλυνσης, αλλά εμπλέκονται και σε μια σειρά από άλλες κρίσιμες διεργασίες των βακτηρίων όπως ο μακροχρόνιος αποικισμός, η κινητικότητα και η πρωτεολυτική ικανότητα. Η περαιτέρω λοιπόν μελέτη τους, θα συμβάλλει στην ανακάλυψη του ακριβή μηχανισμού δράσης τους και ενδεχομένως να οδηγήσει, μελλοντικά, στην πιθανή χρήση αυτών των βακτηρίων, ως βιολογικά εντομοκτόνα, συμμετέχοντας στη λύση ενός πολύ σημαντικού προβλήματος, που είναι η καταστροφή των αγροτικών καλλιεργειών από τα έντομα. Αυτή η καταστροφή αφ' ενός μεν ευνοεί τη χρήση επικίνδυνων για την υγεία χημικών εντομοκτόνων και αφ' ενός δε, προκαλεί ένα σοβαρό πλήγμα στην παγκόσμια αγροτική οικονομία.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) 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. *Proc Natl Acad Sci USA*. PNAS **96**: 14073-8.
- 2) Bode Helge, «Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites», *Current Opinion in Chemical Biology* **13**, 11-60, 2009
- 3) Brodey CL, Rainey PB, Tester M, Johnstone K (1991). "Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin". *Molecular Plant–Microbe Interaction* **1** (4): 407–11.
- 4) Cornelis P (editor) (2008). *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*(1st ed.). Syst. Bacteriol **30**, 225-420 Caister Academic Press.
- 5) Euzéby, J.P. [^ Pseudomonas entry](#) in [LPSN](#) (1997). "[List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet](#)", Laboratoire de Bactériologie, Ecole Nationale Vétérinaire **31**, 1252–1259.
- 6) Fedhila a, C. Buisson b, O. Dussurget c, P. Serror d, I.J. Glomski e,1 , P. Liehl f, D. Lereclus b, 5 C. Nielsen-LeRoux b,*, «Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*», *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, 24-29, 2009
- 7) Gennari, M, and Dragotto, F (1992 Apr). "A study of the incidence of different fluorescent *Pseudomonas* species and biovars in the microflora of fresh and spoiled meat and fish, raw milk, cheese, soil and water". *J Appl Bacteriol* **72** (4): 281–8.
- 8) Hassett D, Cuppoletti J, Trapnell B, Lyman S, Rowe J, Yoon S, Hilliard G, Parvatiyar K, Kamani M, Wozniak D, Hwang S, McDermott T, Ochsner U (2002). "Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets". *Adv Drug Deliv Rev* **54** (11): 1425–1443.

- 9) Hardie (2009). "The Secreted Proteins of *Pseudomonas aeruginosa*: Their Export Machineries, and How They Contribute to Pathogenesis". *Bacterial Secreted Proteins: Secretory Mechanisms and Role in Pathogenesis*. **51**, p. 4-42 Caister Academic Press.
- 10) Imler JL., Bulet P., (2005) Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem. Immunol. Allergy* **86**: 1-21
- 11) 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
- 12) Levine, M, and Anderson, DQ (1932 Apr). "Two New Species of Bacteria Causing Mustiness in Eggs". *J Bacteriol* **23** (4): 337–47.
- 13) Liehl P., Blight M., Vodovar N., Boccard F., Lemaître B., (2006) Prevalence of local immune response against oral infection in a *Drosophila/Pseudomonas* infection model. *PLoS Pathog* **2**: 551-561
- 14) Madigan M; Martinko J (editors). (2005). *Brock Biology of Microorganisms* **11**, 177-188 Prentice Hall.
- 15) Matthijs S, Tehrani KA, Laus G, Jackson RW, Cooper RM, Cornelis P (2007). "Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-Pythium activity". *Environ. Microbiol.* **9** (2): 425–434.
- 16) Mikkelsen Helga, Rachel McMullan, Alain Filloux, «The *Pseudomonas aeruginosa* Reference Strain PA14 Displays Increased Virulence Due to a Mutation in lads», Division of Cell and Molecular Biology, *Plos one*: **12**, 602-609, 2011.
- 17) Moscoso Joana A., Helga Mikkelsen,¹ Stephan Heeb,² Paul Williams² and Alain Filloux, «The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches Type III and Type VI secretion via c-di-GMP signaling», *Environmental Microbiology* (2011) **13**(12), 3128–3138
- 18) Mulet Magdalena, Margarita Gomila, Bruno Lemaître, Jorge Lalucat, Elena Garcva-Valdis, «Taxonomic characterisation of *Pseudomonas* strain L48 and formal proposal of *Pseudomonas entomophila* sp. Nov», *Systematic and Applied Microbiology* **13**, 1219–1227, 2012.
- 19) Onya Opota^{1*}, Isabelle Vallet-Ge´ ly², Renaud Vincentelli³, Christine Kellenberger³, Ioan Iacovache¹, Manuel Rodrigo Gonzalez¹, Alain Roussel³, Franc,oise-Gisou van der Goot¹, Bruno Lemaître^{1*}, "Monalysin, a Novel β -Pore-Forming Toxin from the *Drosophila* Pathogen *Pseudomonas entomophila*, Contributes to Host Intestinal Damage and Lethality», 2011, *Plos pathogens* **79**, 910–921.

- 20) Palleroni, N. J. (2010). "The *Pseudomonas* Story". *Environmental Microbiology* **12** (6): 1377–1383.
- 21) Papagiannoulis A., Mathiopoulos K.D., Mossialos D., (2009) Molecular detection of the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila* using PCR, Lett in Appl Microbiol **50** p. 241–245.
- 22) Pereira, JN, and Morgan, ME (1957 Dec). "Nutrition and physiology of *Pseudomonas fragi*". *J Bacteriol* **74** (6): 710–3.
- 23) 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 RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**:6940-6949
- 24) 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.
- 25) Records Angela R. and Dennis C. Gross*, Sensor Kinases RetS and LadS Regulate *Pseudomonas syringae* Type VI Secretion and Virulence Factors_, *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* **192**, July 2010, p. 3584–3596.
- 26) Ryall B., Mitchell H., Mossialos D., Williams H.D, (2009) Cyanogenesis by the entomopathogenic bacterium *Pseudomonas entomophila*, Lett Appl Microbiol **49**: 131-135
- 27) Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004), Sherris "Plague and Other Bacterial Zoonotic Diseases" *Medical Microbiology* **126** 481–491 (4th ed.). McGraw Hill.
- 28) Vallet-Gely Isabelle , Alexey Novikov , Luis Augusto , Peter Liehl , Gérard Bolbach ,Maria Péchy-Tarr4, Pierre Cosson5, Christoph Keel 4, Martine Caroff and Bruno Lemaître, «Hemolytic activity of *Pseudomonas entomophila*, a versatile soil bacterium, is linked to cyclic lipopeptide production», *Appl. Environ. Microbiol.* **64** doi:10.1128/AEM.02112-09, 2009
- 29) Van Eldere J (February 2003). "[Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections](#)". *J. Antimicrob. Chemother.* **51** (2): 347–352.
- 30) 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., Lemaître B., Medigue C., Boccard F., (2006) Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat Biotechnol* **24**: 673-679

- 31) 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
- 32) Waterfield Nicholas R., Maria Sanchez-Contreras, Ioannis Eleftherianos, Andrea Dowling§, Guowei Yang, Paul Wilkinson, Julian Parkhill, Nicholas Thomson, Stuart E. Reynolds, Helge B. Bode_, Steven Dorus, and Richard H. ffrench-Constant, «Rapid Virulence Annotation (RVA): Identification of virulence factors using a bacterial genome library and multiple invertebrate hosts», Edited by Frederick M. Ausubel, *PNAS Microbiology*, **15967–15972** MA, 2008
- 33) 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.
- 34) 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

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Νικολούλη Αικατερίνη, Διπλωματική Εργασία, ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΟΥ ΥΔΡΟΚΥΑΝΙΟΥ ΣΤΗΝ ΕΝΤΟΜΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA*, Λάρισα 2010

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

- <http://www.jgi.doe.gov/>
- <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=286&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>