



Основан в 2006 году

Выходит 1 раз в год

# Т Р У Д Ы

**Белорусского государственного  
университета**

**Серия. Физиологические, биохимические  
и молекулярные основы  
функционирования биосистем**

Научный журнал

Том 2

Минск  
2007

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.21

### **ВЛИЯНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ КОПИЙ ГЕНА *DSPF ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA* НА ТРАНСЛОКАЦИЮ БЕЛКОВ DSPE-СУА И AVRPTO-СУА В КЛЕТКИ РАСТЕНИЙ И РАЗВИТИЕ РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ**

Л.Н. Валентович, О.И. Губич, Е.А. Николайчик

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

Система секреции третьего типа (ССТТ) используется патогенными и симбиотическими грамотрицательными бактериями для доставки белковых факторов вирулентности в клетки эукариотического организма-хозяина [1]. Транспортируемые в цитоплазму клеток хозяина белки, называемые обычно эффекторами, изменяют клеточный метаболизм, способствуя быстрой колонизации патогеном организма хозяина. К эффекторам фитопатогенных бактерий относятся Avr- и Dsp-белки (avirulence и disease specific protein) – обе группы эффекторов являются фактически факторами вирулентности, однако Avr-белки могут узнаваться соответствующими R-белками (R-resistance – "устойчивость") резистентных растений, в результате чего активизируется иммунная система, ответом которой чаще всего является локальная гибель клеток – реакция гиперчувствительности (РГ). Создаётся механический барьер для распространения инфекции по растению, в том числе системно – по проводящим путям, и болезнь не развивается [2].

Около двух десятков белков, составляющих ССТТ, локализованы преимущественно в цитоплазматической бактериальной мембране, однако несколько белков располагаются за ее пределами. Это прежде всего секретин внешней мембраны бактерии и внеклеточные компоненты, из которых сформирован контролирующий контакт с клеткой хозяина пилус, а также канал транслоказы в мембране эукариотической клетки. Кроме того, в цитоплазме бактерии локализованы специализированные секреторные шапероны, необходимые для транспорта многих (но далеко не всех) эффекторов в цитоплазму эукариотической клетки [3].

Отличительной особенностью шаперонов ССТТ является их высокая субстратспецифичность. В отличие от "стандартных" шаперонов, шаперон ССТТ способен взаимодействовать, как правило, только с одним, реже несколькими (не больше двух-трех) субстратами [3]. В связи с такой высокой специфичностью не удивительно, что различные

шапероны ССТТ редко обладают сходными аминокислотными последовательностями. Тем не менее, для этих белков все же можно выделить ряд общих свойств. Это кислые ( $pI < 5,5$ ) белки с небольшим молекулярным весом ( $< 15$  кДа), предположительно имеющие амфипатическую  $\alpha$ -спираль вблизи С-конца. Ген, кодирующий шаперон, обычно расположен вблизи гена, кодирующего его субстрат. Все шапероны ССТТ были разделены на несколько классов: шапероны I класса ( $\sim 130$  аминокислотных остатков (а.о.)) связываются или с одним (IA), или с несколькими эффекторами (IB); II класса ( $\sim 160$  а.о.) связываются с транслокаторами, которые осуществляют перенос эффекторов через мембрану эукариотической клетки. Интересным представляется расположение генов этих шаперонов относительно генов их субстратов: смежное для IA и рассредоточенное для IB [3].

Несмотря на очевидность участия секреторных шаперонов в транспорте многих субстратов ССТТ, истинная роль этих белков в работе транспортной системы не выяснена. Предполагается, что шапероны могут стабилизировать свои субстраты, препятствовать их преждевременному фолдингу, направлять связанный белок к секреторному аппарату и т.д., однако уже опубликовано достаточно работ, ставящих эти предположения под сомнение. Так, для многих эффекторов показана высокая стабильность и без соответствующего шаперона [4], имеются данные, опровергающие участие шаперонов ССТТ в фолдинге своих субстратов [5], а делеция гена соответствующего шаперона не всегда препятствует распознаванию эффектора секреторным аппаратом [6, 7].

Секреторные шапероны были описаны для многих патогенов млекопитающих (*Yersinia spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.*) [3]. Секреторные шапероны фитопатогенных бактерий изучены гораздо хуже. Для белка DspA (DspE) *E. amylovora* ранее был описан секреторный шаперон, DspB (DspF), ген которого расположен непосредственно за *dspA (dspE)* [8, 9]. Известно, что DspB необходим для секреции DspA, или для контроля внутриклеточной стабильности DspA [3, 4]. Что касается регуляции *dspB*, то помимо общего HrpL-зависимого промотора, который обеспечивает экспрессию генов локуса *dspAB* в *hrp*-индуцированной среде, *dspB* имеет и собственный промотор, который отвечает за конститутивную базальную экспрессию DspB. Предполагается, что благодаря этому в клетке постоянно присутствует шаперон, который с началом активной экспрессии DspA связывает синтезирующийся эффектор [10].

У бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Eca*) к настоящему времени обнаружен только один ген, кодирующий эффекторный Avr-белок, – *dspE* [11]. Белковый продукт следующего гена в геноме шотландского штамма *Eca* SCRI1043 [12] имеет значительную гомологию с DspB (DspF) *Erwinia amylovora* (45%), а также с белком AvrF *Pseudomonas syringae* (39%) и поэтому может являться секреторным шапероном для белка DspE.

Настоящая работа имела целью исследование роли этого гена в транспорте эффекторных белков системой секреции III типа бактерий *Eca* в клетки растений.

### Объекты и методы исследования.

Использованные в работе штаммы бактерий и плазмиды приведены в табл. 1. Бактерии выращивались в полноценной питательной среде (LB) при 37 °С (*E. coli*) и 28 °С (*Eca*). Все штаммы *Eca* являются производными изолированного в Беларуси штамма дикого типа 3-2.

Таблица 1 – Штаммы и плазмиды

Штаммы	Характеристика	Источник/ссылка
<i>Escherichia coli</i>		
XL-1 Blue	F <sup>+</sup> ::Tn10 <i>proA+B+ lacZΔM15/ recA1 endA1 gyrA96</i>	Коллекция кафедры микробиологии БГУ
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>		
JN42	3-2 Rif <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Tn9	Коллекция кафедры микробиологии БГУ
VKE	JN42 <i>dspE</i> ::pJP5603	[11]
HW1	JN42 <i>dspF</i> ::Ω <sup>Sp/Sm</sup>	[13]
<b>Плазмиды</b>		
pK18	Km <sup>r</sup> <i>lacZα oriV<sub>ColE1</sub></i>	[14]
pFLAG-CTC	P <sub>tac</sub> -RBS-MCS-FLAG <i>lacI<sup>r</sup> Ap<sup>r</sup> oriV<sub>ColE1</sub></i>	Sigma
pJQ200KS	Gm <sup>r</sup> <i>lacZα sacB mob oriV<sub>p15A</sub></i>	[15]
pLA15	pFLAG-CTC:: <i>hrpW</i>	[16]
pVL40FM	pFLAG-CTC с фрагментом <i>dspE</i> от начала гена и до <i>SalI</i> -сайта размером 3.2 т.н.п. под контролем <i>tac</i> -промотора	[13]
pUC18	Ap <sup>r</sup> <i>lacZα oriV<sub>ColE1</sub></i>	[17]
pUC19	Ap <sup>r</sup> <i>lacZα oriV<sub>ColE1</sub></i>	[17]
pUT/mini-Tn5Sm	репликон R6K, <i>mob</i> , Ap <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> (Ω <sup>Sp/Sm</sup> )	[18]
pZH416	pUC19:: <i>dspE<sub>1-435-cyaA</sub></i>	[11]
pZH432	pUC18:: <i>avrPto-cyaA</i>	[13]
pZH449	Gm <sup>r</sup> <i>lacZα mob oriV<sub>p15A</sub></i>	Получена в этой работе
pVLX1	pUC18 со вставкой <i>XbaI</i> фрагмента хромосомной ДНК штамма HW1, содержащего Ω <sup>Sp/Sm</sup> и 23 т.н.п. фрагмент <i>hrp</i> -кластера.	Получена в этой работе
pKXK	pK18 со вставкой <i>KpnI</i> -фрагмента pVLX1, содержащего Ω <sup>Sp/Sm</sup> и 8 т.н.п. фрагмент <i>hrp</i> -кластера.	Получена в этой работе
pKKS	pKXK с делецией <i>SalI</i> – фрагмента с Ω <sup>Sp/Sm</sup>	Получена в этой работе
pASS	pUC18 с <i>Eco147I</i> -фрагментом pKKS (~650 н.п.), содержащим ген <i>dspF</i>	Получена в этой работе
pVL41	pZH449 с 655 н.п. <i>SacI-XbaI</i> фрагментом pASS, содержащим ген <i>dspF</i> под контролем <i>lac</i> -промотора	Получена в этой работе

Коммерческие препараты антибиотиков использовались в концентрациях (мкг/мл): ампициллин 25; рифампицин 25, стрептомицин 20, канамицин 15.

Ферментативные реакции с ДНК и электротрансформация клеток *E. coli* и *Eca* выполнялись в соответствии со стандартными протоколами [19]. В работе использовались ферментные препараты производства MBI Fermentas и New England Biolabs. Определение

нуклеотидной последовательности проводилось с помощью набора *CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit* производства MBI Fermentas.

Низкокопийный мобилизуемый вектор pZH449 получен делецией ~1.8 т.н.п. *ClaI-HindIII* фрагмента плазмиды pJQ200KS, содержащего ген *sacB*.

Для конструирования pVLX1, хромосомная ДНК штамма HW1 была рестрицирована *XbaI* и залигирована в pUC18, после чего продуктами лигазной реакции были трансформированы клетки *E. coli* XL-1 Blue. На среде со стрептомицином были отобраны клоны, несущие кассету  $\Omega^{Sp/Sm}$  и 23 т.н.п. фрагмент *hrp*-кластера. С помощью рестриктазы *KpnI* из плазмиды pVLX1 был вырезан фрагмент ДНК содержащий  $\Omega^{Sp/Sm}$  и 8 т.н.п. фрагмент *hrp*-кластера и вставлен в плазмиду pK18. Из полученной плазмиды pKXK с помощью рестриктазы *SalI* был удален фрагмент с  $\Omega^{Sp/Sm}$  (pKKS). Далее фрагмент pKKS, содержащий ген *dspF*, был вырезан рестриктазой *Eco147I* и вставлен в плазмиду pUC18. Из полученной плазмиды, pASS, рестриктазами *SacI* и *XbaI* был вырезан фрагмент ДНК (655 н.п.), и вставлен в вектор pZH449. Вставка содержит под контролем *lac*-промотора 19 н.п. конца рамки считывания гена *dspE*, 35 н.п. межгенного участка, кодирующую последовательность гена *dspF* - 423 н.п. и 178 н.п. после стоп-кодона *dspF*. Полученная конструкция (pVL41) должна обеспечивать экспрессию нативного белка DspF.

Проверку РГ-индуцирующей способности штаммов *Eca* и измерение аденилатциклазной активности проводили по описанным ранее методикам [11]. В этих экспериментах использовали двухмесячные растения *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1.

При анализе последовательности ДНК были использованы программы:

- **BLASTN 2.2.17** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) [20];

- **BLASTX 2.2.17** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) [20].

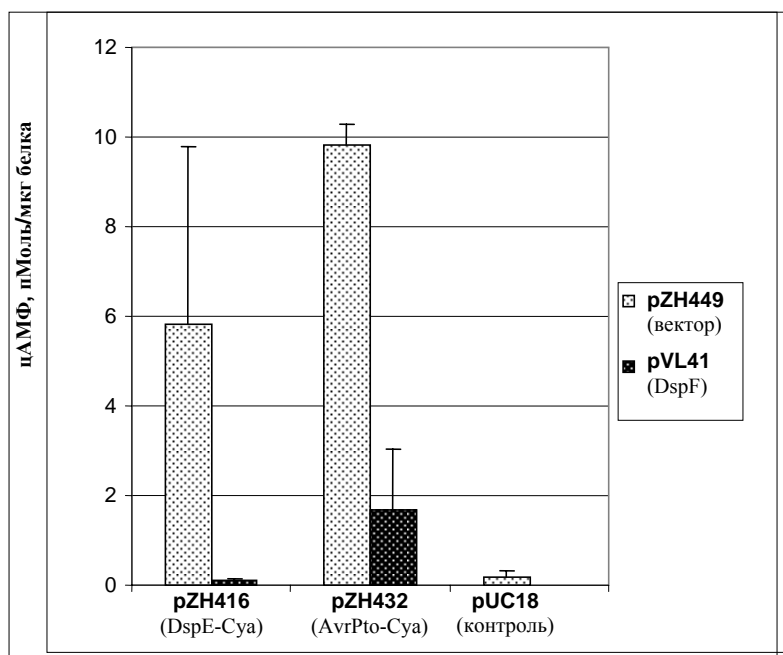
При анализе последовательности белков была использована программа ProtParam с сервера ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) [21].

### **Результаты и обсуждение.**

В нашей лаборатории проводились исследования транслокации в клетки растений химерных эффекторов ССТТ с карбоксиконцевым аденилатциклазным доменом (Cya) [5; 13], причём гены химерных субстратов находились на высококопийных плаزمидках без соответствующих секреторных шаперонов, поэтому можно было ожидать серьёзной диспропорции количеств секреторного субстрата и шаперона, что в соответствии с литературными данными [10] могло привести к внутриклеточной нестабильности химерных эффекторов или к их неэффективной секреции. Для исключения такой возможности (и потенциального повышения эффективности транслокации химерных эффекторов в клетки

растений) мы попробовали увеличить количество соответствующего секреторного шаперона в клетках *Eca*, продуцирующих большие количества химерного эффектора.

В нашей работе мы использовали хорошо изученный гетерологичный эффектор ССТТ AvrPto бактерий *Pseudomonas syringae* [22], и эффектор DspE штамма *Eca* 3-2 [11]. Из этих двух белков секреторный шаперон описан только для последнего у родственной бактерии *E. amylovora* [8]. В геноме штамма *Eca* SCRI1043 ген такого шаперона (гомолога DspB) аннотирован как *dspF* [12]. Соответствующий ген был клонирован нами из штамма *Eca* 3-2 в векторе на основе репликона p15A под контролем *lac*-промотора, что дало возможность совместить в одной клетке плазмиды, кодирующие шаперон DspF (pVL41) и химерный эффектор (DspE-Cya или AvrPto-Cya) и приблизить количество шаперона к количеству субстрата. Однако присутствие плазмиды pVL41 в клетке вызвало эффект, полностью противоположный нашим ожиданиям. Как показано на рисунке 1, введение в клетки, продуцирующие химерные эффекторы, плазмиды с геном *dspF* полностью блокировало транслокацию DspE-Cya и приблизительно в пять раз снижало эффективность транслокации AvrPto-Cya.

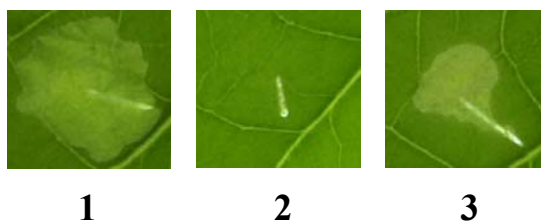


**Рисунок 1** – Влияние сверхэкспрессии белка DspF на транслокацию в клетки *N. tabacum* химерных эффекторов DspE-Cya и AvrPto-Cya из клеток штамма *Eca* JN42. Клетки *Eca* JN42 содержали плазмиду, кодирующую химерный эффектор DspE-Cya (pZH416) или AvrPto-Cya (pZH432), совместно с еще одной плазмидой, кодирующей белок DspF (pVL41) или вектором pZH449, на основе которого создана pVL41. В качестве контроля использованы не продуцирующие дополнительной аденилатциклазы клетки *Eca* JN42 с плазмидой pUC18 (исходным вектором для создания pZH416 и pZH432). Приведены средние значения четырех измерений с 95%-ным доверительным интервалом.

В полном соответствии с этими данными введение плазмиды pVL41 в клетки штамма *Eca* JN42 полностью блокировало его способность индуцировать РГ у растений *N. tabacum*.

Как показано на рисунке 2, эффект от введения этой плазмиды оказался даже большим, чем от инактивации гена *dspE*, кодирующего по нашим данным [11] основной для этих растений индуктор РГ. Исходя из этого можно предположить, что отсутствовала не только транслокация эффектора DspE в клетки растений бактериями *Eca* с дополнительными копиями *dspF*, но и какого-то минорного эффектора (или эффекторов), что вполне согласуется с полученными нами ранее результатами [11].

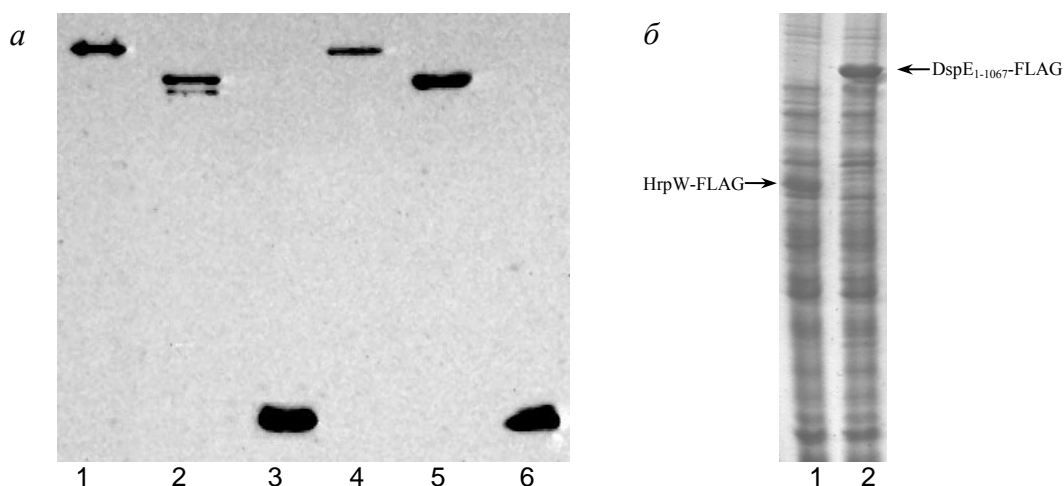
Такие данные по крайней мере частично противоречат сложившимся представлениям о роли секреторных шаперонов в работе ССТГ.



**Рисунок 2** – Индукция реакции гиперчувствительности в листьях *N. tabacum* суспензиями клеток штамма *Eca* JN42 с рZH449 (1), *Eca* JN42 с рVL41 (2) и *Eca* VKE – *dspE*–штамм (3). Введения изначального вектора рZH449 в клетки *Eca* JN42 не препятствует развитию РГ – фото 1, в отличие от этого же вектора но с 1020 н.п. вставкой, несущий ген *dspF* под контролем *lac*-промотора – фото 2.

Следует также отметить, что введение в клетки *Eca* JN42 эффективных векторов экспрессии с клонированными в них производными гена *dspE* позволяло получить, как показано на рисунке 3, большое количество соответствующих белковых продуктов. Поскольку в этих клетках сохранялся исходный уровень синтеза секреторного шаперона, вряд ли можно говорить о том, что функция DspF сводится к поддержанию стабильности DspE.

Предположение о том, что введение плазмиды рVL41 каким-то образом нарушает синтез эффекторных белков, не подтвердилось – никакой разницы с помощью иммуноблоттинга показать не удалось (данные не приведены).



**Рисунок 3** – Экспрессия химерных субстратов ССТГ в клетках бактерий.

а – Иммуноблоттинг химер DspE<sub>1-1630</sub>-FLAG (дорожки 1 и 4), DspE<sub>1-1067</sub>-FLAG (дорожки 2 и 5) и DspE<sub>1-145</sub>-FLAG (дорожки 3 и 6), экспрессированных в клетках *Eca* JN42 (дорожки 1-3) и *E. coli* XL-1 Blue (дорожки 4-6).

б – ДСН-ПААГ электрофорез белков клеток *Eca* JN42 с плазмидами pLA15 (дорожка 1) и pVL40FM (дорожка 2). Химерные белки индуцированы 0.2 моль/л ИПТГ в течение 4 часов. Окраска Кумасси G250.

Таким образом, полученные нами данные позволяют предположить, что роль секреторного шаперона DspF *Eca* заключается в предотвращении преждевременной транслокации DspE в клетки растений, а не в поддержании нативной конформации или в обеспечении стабильности эффектора до секреции. В отличие от *dsp*-кластера *E. amylovora*, межгенный участок между *dspE* и *dspF* у *Eca* вдвое короче (35 н.п. вместо 62 н.п.), и перед кодирующей последовательностью *dspF* у *Eca* не удалось найти никакой промоторной последовательности (рис. 4), что свидетельствует в пользу сопряженной экспрессии генов *dspE* и *dspF*, осуществляемой с общего HrpL-зависимого промотора, расположенного перед *dspE*. следовательно DspF не может синтезироваться раньше DspE.

	10	20	30	40	50	60	
	-----+-----+-----+-----+-----+-----						
Eam	TAATGAGCATGTTGTTGCCCCTTCACACAACCGACGAGATAAATTACGCAATAAGGAGCGAGATTGATG						67
Eca JN42	TAAT---CGT-----AAATAAC--ATGCGGTGATTA-----AAGGAGAACAG--GATG						41
Eca SCRI1043	TAAT---GT-----AAACAAA--ATGCTGTGATTA-----AAGGAGAACAG--GATG						40

**Рисунок 4** – Сравнение межгенных областей *Eca* SCRI1043, *Eca* JN42 и *Erwinia amylovora* (Eam). Отмеченный жирным TAA-кодон является последним кодоном гена *dspE*, ATG-кодон – начало гена *dspF*. Серым цветом отмечен  $\sigma^{70}$  промотор.

Анализ предполагаемого белкового продукта гена *dspF* показал следующие отличия от «классических» секреторных шаперонов: размер несколько больше – 140 а.о. вместо ~130 а.о. (молекулярный вес более 15 кДа – 15,55 кДа); pI>5,5 (5,75) – эти отличия могут указывать на то, что исследуемый белок может выполнять функции, отличные от шаперонных. Однако нельзя исключать возможного влияния небольших фрагментов ДНК до и после гена *dspF* в плазмиде pVL41, которые мы в последующей работе собираемся удалить.



## Выводы.

Важнейшая роль субстратспецифических секреторных шаперонов в транспорте белков посредством ССТТ подтверждается нашими данными о влиянии сверхэкспрессии шаперона DspF на транслокацию эффекторов DspE и AvrPto. Продукция повышенных количеств DspF в клетках *Eca* полностью блокировала их способность индуцировать РГ у растений *N. tabacum*. В соответствии с нашими данными о том, что DspE является основным индуктором РГ, транслокация этого эффектора в клетки растений бактериями *Eca* с дополнительными копиями *dspF* была полностью блокирована. Такие данные частично противоречат сложившимся представлениям о роли секреторных шаперонов в работе ССТТ, которым в литературе приписываются в основном две функции – стабилизация секретируемых белков внутри бактериальной клетки и "направление" их к секреторному аппарату (во втором случае шаперон может рассматриваться как дополнительный секреторный сигнал) [3]. Полученные нами данные позволяют высказать гипотезу о том, что, по крайней мере, одной из функций этого секреторного шаперона является предотвращение преждевременной транслокации DspE в клетки растений.

## Литература

1. Hueck, C. J. Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants / Christoph J. Hueck // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1998. – Vol. 62. – P. 379 - 433.
2. Klement, Z. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf / Z. Klement, G. L. Farkas, L. Lovrekovich // Phytopathology. – 1964. Vol. 54. – P. 474-477.
3. Parsot, C. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems / C. Parsot, C. Hamiaux, A.L. Page // Curr Opin Microbiol. – 2003. – Vol. 6. – P. 7-14.
4. Kenny, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir Receptor Molecule Does Not Undergo Full Modification When Introduced into Host Cells by EPEC-Independent Mechanisms / Brendan Kenny, Jonathan Warawa // Infect Immun. – 2001. Vol. 69, № 3. – P. 1444-1453.
5. *Yersinia enterocolitica* type III secretion: evidence for the ability to transport proteins that are folded prior to secretion / G. Wilharm [et al.] // BMC Microbiol. – 2004. - Vol. 4. – P. 27.
6. Schesser, K. Delineation and mutational analysis of the *Yersinia pseudotuberculosis* YopE domains which mediate translocation across bacterial and eukaryotic cellular membranes / K. Schesser, E. Frithz-Lindstein, H. Wolf-Watz // Journal of Bacteriology. – 1996. – Vol. 178. – P. 7227-7233.

7. Crawford, J.A. The N-terminus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir mediates transport across bacterial and eukaryotic cell membranes / J.A Crawford, J.B. Kaper // *Molecular Microbiology*. – 2002. – Vol. 46. – P. 855-868.
8. DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. / S. Gaudriault [et al.] // *Mol Microbiol*. – 1997. – Vol. 26, № 5. – P. 1057-1069.
9. Homology and functional similarity of an hrp-linked pathogenicity locus, *dspEF*, of *Erwinia amylovora* and the avirulence locus *avrE* of *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato* / A. J. Bogdanove [et al.] // *PNAS*. – 1998. – Vol. 95. – P. 1325-1330.
10. Gaudriault, S. The DspB/F protein of *Erwinia amylovora* is a type III secretion chaperone ensuring efficient intrabacterial production of the Hrp-secreted DspA/E pathogenicity factor / S. Gaudriault, J.P. Paulin, M.A. Barny // *Mol Plant Pathol*. – 2002. – Vol. 3. – P. 313-320.
11. Транслокация белка DspE фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в клетки *Nicotiana tabacum* и его необходимость для индукции реакции гиперчувствительности / Е.А. Николайчик [и др.] // Докл. НАН Б. – 2005. – Т. 49, № 5. – С. 81-85.
12. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors / K.S. Bell [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2004. – Vol. 101, № 30. – P. 11105-11110.
13. Анализ роли внеклеточных компонентов системы секреции III типа *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в транслокации белковых факторов вирулентности бактерий в клетки растений / Е.А. Николайчик [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2007. – Т. №. – С. 185-198
14. Pridmore, R.D. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker / R.D. Pridmore // *Gene*. – 1987. – Vol. 56, № 2-3. – P. 309-312.
15. Quandt, J. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria / J. Quandt, M.F. Hynes // *Gene*. – 1993. - Vol. 127. – P. 15-21.
16. Лагоненко, А.Л. Характеристика харпина HrpW бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* / А.Л. Лагоненко, Е.А. Николайчик, А.Н. Евтушенков // Докл. НАН Б. – 2006. – Т. 50, № 1. – С. 70-73.
17. Norrander, J. Construction of improved M13 vectors using oligonucleotide-directed mutagenesis / J. Norrander, T. Kempe, J. Messing // *Gene*. – 1983. – Vol. 26. – P. 101-106.

18. Mini Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative Eubacteria / V. de Lorenzo [et al.] // J Bacteriol. – 1990. – Vol. 172. – P. 6568 -6572.
19. Current protocols in molecular biology / edit. board: Ausubel, F.M. [et al.]. – New York, Wiley-Interscience Press, 1992.
20. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S. F. Altschul [et al.] // Nucleic Acids Res. – 1997. – Vol. 25 – P. 3389-3402.
21. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server / M.R. Wilkins [et al.] // Methods Mol Biol. – 1999. – Vol. 112. – P. 531-552.
22. The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the Pto resistance gene / P. C. Ronald [et al.] // J Bacteriol. – 1992. – Vol.174. – P. 1604 - 1611.

INFLUENCE OF ADDITIONAL COPIES OF THE *DSPF* GENE OF *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA* ON TRANSLOCATION OF THE DSPE-CYA AND AVRPTO-CYA PROTEINS INTO PLANT CELLS AND ON THE DEVELOPMENT OF THE HYPERSENSITIVE REACTION

L. N. Valentovich, O. I. Gubich, Y. A. Nikolaichik

*Belarusian State University, Minsk, Belarus*

The *dspF* gene of phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Eca*) codes for secretory chaperone thought to be specific for the DspE effector protein and required for translocation of DspE into plant cells via the type III secretion system of this bacterium. We have found that additional copies of *dspF* exert an unexpected effect on transport of effector proteins into plant cells. In particular, translocation into plant cells of the DspE-Cya fusion protein appeared to be completely blocked while translocation of AvrPto-Cya protein – severely reduced from *Eca* cells carrying *dspF* cloned in a relatively low copy number plasmid. In accordance with this data, induction of the hypersensitive reaction is also blocked in *Eca* cells carrying this plasmid. As we have found no effect of additional *dspF* copies on the expression or stability of effector proteins, this data allows us to suggest that additional molecules of DspF either block effector translocation by specifically binding them (as in the case of DspE-Cya) or by interfering with the work of the type III secretion system (as in the case of AvrPto-Cya).