ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ρόλος της RNA σίγησης στην αντίδραση υπερευαισθησίας επαγόμενη από ένα ζεύγος NLR

ΑΜΑΡΤΩΛΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥΛΑ Α.Μ. 933

Επιβλέπων καθηγητής: Π. Σαρρής, Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Εξεταστές: Κ. Καλαντίδης , Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Ε. Τσαγρή, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας

Ηράκλειο, Νοέμβριος 2020

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	1
ПЕРІЛНѰН	3
ABSTRACT	4
Πίνακας Συντομογραφιών	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Η αναγνώριση των PAMPs οδηγεί σε ΡΤΙ ανοσία	7
1.2 Παραγωγή τελεστών από τα παθογόνα	8
1.3 Αναγνώριση των τελεστών από πρωτεΐνες του φυτού	8
1.4 Δομή Υποδοχέων NLR	9
1.4.1 Επικράτεια NB-ARC	9
1.4.2 Επικράτεια LRR	10
1.4.3 Επικράτεια CC	11
1.4.4 Επικράτεια TIR	11
1.5 Μηχανισμός αναγνώρισης τελεστή	11
1.5.1 Μοντέλο άμεσης αλληλεπίδρασης	12
1.5.2 Μοντέλο του φύλακα/δολώματος	12
1.5.3 Μοντέλο των ενσωματωμένων επικρατειών	13
1.6. Ρύθμιση έκφρασης των NLR γονιδίων	
1.6.1. Ρύθμιση έκφρασης των NLR γονιδίων σε μεταγραφικό επίπεδο	15
1.6.2. Ρύθμιση έκφρασης των NLR γονιδίων σε μέτα-μεταγραφικό επίπεδο	15
1.7 RNA σίγηση	
1.7.1 Πρωτεΐνη Dicer	17
1.7.2 Βιογένεση φυτικών miRNAs και siRNA	17
1.7.3 Ρύθμιση έκφρασης των NLR γονιδίων μέσω RNA σίγισης	19
1.8 Ζεύγος NLR <i>Bn</i> RPR1- <i>Bn</i> RPR2	20
1.9 Σκοπός εργασίας	22
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.1 Δημιουργία νέου φυτικού υλικού	23
2.2 Εμποτισμός με Αγροβακτήρια	23
2.3 Λειοτρίβηση	23
2.4 Απομόνωση RNA από φύλλα Nicotiana benthamiana	23
2.5 Αποικοδόμηση υπολειμμάτων DNA μετά από απομόνωση RNA	
2.6 Αντίδραση Αντίστροφης Μεταγραφής	24
2.7 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	25

2.8 Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (qPCR)	
2.9 Συνεστιακή Μικροσκοπία	27
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
3.1 Συνέκφραση πρωτεϊνών <i>Bn</i> RPR1 και <i>Bn</i> RPR2	28
3.2 Ενδοκυττάριος Εντοπισμός των γονιδίων BnRPR1 και BnRPR2	29
3.3 Ποσοτικοποίηση έκφρασης των γονιδίων BnRPR1 και BnRPR2	32
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	34
5. Παράρτημα	36
5.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	36
5.2 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης	36
5.3 Καθαρισμός προϊόντος Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	36
5.4 Ligation	36
5.5 Μετασχηματισμός κυττάρων <i>Ε. coli</i>	36
5.6 Πλασμιδιακές κατασκευές	
5.7 Απομόνωση πλασμιδίου με τη χρήση Αλκαλικής λύσης	37
5.8 Διαγνωστική Πέψη Με Τη Χρήση Περιοριστικών Ενζύμων	37
Βιβλιογραφία	

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου που διαδραματίζει η RNA σίγηση στην επαγώμενη από το ζεύγος των γονιδίων ανθεκτικότητας BnRPR1/BnRPR2 αντίδραση υπερευασθησίας. Τα φυτά έχουν αναπτύξει το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημά τους, που έχει διαφοροποιηθεί βιοχημικά σε δύο μονοπάτια. Το πρώτο μονοπάτι, το οποίο ονομάζεται βασικό ανοσοποιητικό σύστημα (basal innate immune system), αναγνωρίζει και ανταποκρίνεται σε μόρια κοινά σε πολλές κατηγορίες, συμπεριλαμβανομένων των μη παθογόνων. Το δεύτερο, το οποίο αναφέρεται ως ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας (ΕΤΙ), ανταποκρίνεται σε μολυσματικούς παράγοντες που εκκρίνουν τα παθογόνα, δηλαδή τους τελεστές, οι οποίοι αναγνωρίζονται από τους NLRs. Οι NLRs είναι ενδοκυττάριοι υποδοχείς και προάγουν την εγγενή ανοσία. Η δομή τους αποτελείται από την επικράτεια LRR μια επικράτεια δέσμευσης νουκλεοτιδίων NB και μία αμινο-τελική επικράτεια. Η ρύθμιση της ομοιόστασης των γονιδίων NLRs είναι σημαντική για τη λειτουργία τους. Στα υγιή φυτά οι NLR πρωτεΐνες βρίσκονται σε χαμηλή ποσότητα ή /και βρίσκονται σε ανενεργή μορφή. Η ρύθμιση της έκφρασης των NLR μπορεί να συμβεί σε διάφορα επίπεδα. Ένας μηχανισμός ρύθμισης των NLRs, τον οποίο θα μελετήσουμε στην παρούσα εργασία, είναι αυτός της RNA σίγησης (RNA silencing). Οι ανώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν αυτόν τον ειδικό ως προς την αλληλουχία RNA μηχανισμό, ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της γονιδιακής έκφρασης, είτε σε επίπεδο μεταγραφής είτε σε μεταφραστικό επίπεδο. Σε φυτά N. benthamiana, τόσο αγρίου τύπου όσο και στα κατεσταλμένα ως προς την DCL2 (*dcl2*), την DCL4 (*dcl4*) και συγκαταστολή των DCL2 κα DCL4 (dcl2/4), θα παρατηρηθεί η αντίδραση υπερευαισθησίας αλλά και η ποσότητα έκφρασης των γονιδίων BnRPR1/BnRPR2, ύστερα από την έκφραση τους με αγροεμποτισμό. Με αυτόν τον τρόπο θα διαπιστώσουμε ποια από τις πρωτεΐνες DCL2 και DCL4 ρυθμίζει την έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων.

ABSTRACT

The aim of this study was to study the role of RNA silencing in the BnRPR1 / BnRPR2 resistance pair-induced hypersensitivity response. Plants have developed their innate immune system, which has been biochemically differentiated into two pathways. The first pathway, known as the basal innate immune system, recognizes and responds to molecules common to many categories, including non-pathogens. The second, referred to as the immune system of resistance genes (ETIs), responds to infectious agents secreted by pathogens, i.e. the operators, which are recognized by NLRs. NLRs are intracellular receptors and promote innate immunity. Their structure consists of the LRR domain, a NB nucleotide binding domain, and an amino-terminal domain. The regulation of homeostasis NLRs genes are important for their function. In healthy plants, NLR proteins are found in small amounts and / or in an inactive form. The setting of the NLR expression can occur at several levels. One mechanism for regulating NLRs, which we will study in this paper, is that of RNA silencing. Higher eukaryotic organisms have this RNA sequence mechanism, which results in the inhibition of gene expression, either at the transcriptional or translational level. In N. benthamiana plants, both wild-type and those suppressed by DCL2 (dcl2), DCL4 (dcl4) and suppression of DCL2 and DCL4 (dcl2 /4), the hypersensitivity responce and the amount of gene expression BnRPR1 /BnRPR2, after their expression by agro-infiltration will be observed. In this way we will determine which of the proteins DCL2 and DCL4 regulates the expression of the genes under study.

Πίνακας Συντομογραφιών

BnRPR1	Brassica napus RESISTANCE PAIRED RECEPTOR 1
BnRPR2	Brassica napus RESISTANCE PAIRED RECEPTOR 2
PAMPs	Pathogen- Associated Molecular Patterns
PRRs	Pattern Recognition Receptors
R	Resistance
NLR	<u>N</u> ucleotide-binding domain and <u>L</u> eucine-rich <u>R</u> epeat-containing
PTI	PAMP- Triggered Immunity
ETS	Effector- Triggered Susceptibility
ETI	Effector-Triggered Immunity
HR	Hypersensitive Response
ROS	Reactive Oxygen Species
CC	Coiled coil
TIR	Toll Interleukin-1-like receptor
LRR	Leucine Rich Repeat
NB	Nucleotide Binding
ARC	Apaf-1, Resistance CED4
E. coli	Escherichia coli
LB	Luria Browth
NEB	New England BioLabs
PCR	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
N. benthamiana	Nicotiana benthamiana
RITS	RNA-induced transcriptional silencing

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φυτά κατά τη διάρκεια της εξελικτικής τους πορείας έχουν εκτεθεί σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (Agrios G, 2005) αλλά και σε αλληλεπιδράσεις με παθογόνους οργανισμούς. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να είναι ευεργετικές για το φυτό (συμβίωση) ή ουδέτερες, αλλά και επιβλαβείς (Occhipinti, 2013). Οι παθογόνοι αυτοί οργανισμοί – μύκητες, βακτήρια και ιοί – χρησιμοποιούν διάφορους μοριακούς και βιοχημικούς μηχανισμούς προκειμένου να μολύνουν τα φυτά. Από την άλλη, τα φυτά έχουν αναπτύξει διάφορα αμυντικά συστήματα ώστε να προστατευτούν από τα παθογόνα (Agrios G, 2005). Ο ανταγωνισμός μεταξύ φυτών και παθογόνων οργανισμών καταλήγει σε συνεχείς μεταβαλλόμενους κύκλους που είναι γνωστοί ως η δυναμική «Red Queen» (Han, 2018).

Τα φυτά έχουν αναπτύξει το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημά τους, που έχει διαφοροποιηθεί βιοχημικά σε δύο μονοπάτια (Jones & Dangl, 2006). Το πρώτο μονοπάτι, το οποίο ονομάζεται βασικό ανοσοποιητικό σύστημα (basal innate immune system), αναγνωρίζει και ανταποκρίνεται σε μόρια κοινά σε πολλές κατηγορίες, συμπεριλαμβανομένων των μη παθογόνων οργανισμών. Τα μόρια αυτά ονομάζονται PAMPs (Pathogen- Associated Molecular Patterns) ή MAMPs (Microbial-Associated Molecular Patterns) (Bigeard, 2015). Το μονοπάτι αυτό ενεργοποιείται 10-30 λεπτά μετά την επαφή του φυτού με το παθογόνο (Jones & Dangl, 2006). Το δεύτερο, το οποίο αναφέρεται ως επαγόμενο ανοσοποιητικό σύστημα των γονιδίων ανθεκτικότητας (ETI), ανταποκρίνεται σε μολυσματικούς παράγοντες παθογόνου, είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω των στόχων στο ξενιστή και ενεργοποιείται 2-3 ώρες μετά την επαφή και την απελευθέρωση των PAMPs από το παθογόνο στο φυτικό κύτταρο (Jones & Dangl, 2006).

Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα των φυτών μπορεί να παρασταθεί ως ένα μοντέλο αποτελούμενο από τρεις φάσεις (Εικόνα 1.1) (Keener, 2016). Στην πρώτη φάση, τα PAMPs ή MAMPs αναγνωρίζονται από τα PRRs (Pattern Recognition Receptors), με αποτέλεσμα την ενεργοποιούμενη από PAMPs ανοσία (PAMP- Triggered Immunity, PTI) (Bigeard, 2015). Η PTI ανοσία μπορεί να σταματήσει την περαιτέρω εξάπλωση της μόλυνσης από το παθογόνο, με την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών και ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) (Keener, 2016). Στη δεύτερη φάση, τα παθογόνα που κατάφεραν να καταστείλουν το προηγούμενο στάδιο ανοσίας παράγουν τελεστές, δηλαδή εκκρινόμενες από το παθογόνο πρωτεΐνες, οι οποίοι συμβάλλουν στη μολυσματικότητα του παθογόνου. Ως αποτέλεσμα εκδηλώνεται η ευαισθησία ενεργοποιούμενη από τελεστή (Effector- Triggered Susceptibility, ETS) (Jones & Dangl, 2006). Στην τρίτη φάση, ένας δεδομένος τελεστής αναγνωρίζεται ειδικά από ένα υποδοχέα NLR (Nucleotidebinding domain and Leucine-rich Repeat), ο οποίος ξεκινά μια σειρά σηματοδοτήσεων που οδηγούν τελικά στην ανοσία που προκαλείται από τον τελεστή (Effector-Triggered Immunity, ETI) (Li Χ. , 2015). Η αναγνώριση του τελεστή από τον υποδοχέα μπορεί να είναι είτε έμμεση είτε μέσω άμεσης αναγνώρισης του τελεστή από τον εξειδικευμένο γι' αυτόν υποδοχέα, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω (Kapos, Devendrakumar, & Li, 2019). Η ΕΤΙ είναι μια επιταχυνόμενη και ενισχυμένη απόκριση ΡΤΙ, με επακόλουθο το φυτό να αποκτά ανοσία σε ασθένειες. Πολλές φορες, αυτό επιτυγχάνεται με το θάνατο των κυττάρων που έχουν μολυνθεί, και λίγων στιβάδων κυττάρων γύρω από αυτά. Το φαινόμενο αυτό, δηλαδή ο τοπικά περιορισμένος κυτταρικός θάνατος, οφείλεται σε έναν μηχανισμό του φυτού που ονομάζεται απόκριση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR) (Han, 2018). Ο μηχανισμός αυτός έχει ως στόχο την αποτροπή της εξάπλωσης της

μόλυνσης από παθογόνο. Η HR χαρακτηρίζεται από αιφνίδιο προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο στο σημείο της μόλυνσης και στην γειτονική περιοχή, λόγω των ελεύθερων ριζών που παράγονται από τα μολυσμένα κύτταρα. . Επίσης, χαρακτηρίζεται από περεταίρω ενίσχυση του κυτταρικού τοιχώματος των γειτονικών υγειών κυττάρων και την παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων όπως αμυντικές πρωτεΐνες και πεπτίδια και φυτοαλεξίνες. Τέλος, η φυσική επιλογή οδηγεί τα παθογόνα να αποφύγουν τη ΕΤΙ ανοσία είτε με διαφοροποίηση του αναγνωρισμένου τελεστή είτε με την απόκτηση νέων τελεστών, οι οποίοι θα καταστείλουν την ΕΤΙ ανοσία (Jones & Dangl, 2006).



Εικόνα 1.1: Αναπαράσταση ανοσολογικής απόκρισης του φυτού σε παθογόνα. Τα PAMPs αναγνωρίζονται από τα PRRs και αρχίζει η PTI ανοσία, κατά την οποία παράγονται από το φυτό αντιμικροβιακές ουσίες και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS). Στη συνέχεια, το παθογόνο εκκρίνει τελεστές, οι οποίοι καταστέλλουν την PTI ανοσία και ενεργοποιείται η ETS. Κάποιοι τελεστές αναγνωρίζονται από τους NLR υποδοχείς με αποτέλεσμα την ETI ανοσία (Keener, 2016).

1.1 Η αναγνώριση των PAMPs οδηγεί σε PTI ανοσία

Στην πρώτη φάση οι μεμβρανικοί υποδοχείς PRRs των φυτών αντιλαμβάνονται τα PAMPs. Ο όρος PAMPs αναφέρεται σε όλες τις ουσίες που διεγείρουν οποιοδήποτε αμυντικό μηχανισμό του φυτού (Bigeard, 2015). Τα PAMPs έχουν την ικανότητα να δρουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις και δεν έχουν μια κοινή χημική δομή. Αντιθέτως, ανήκουν σε μία ευρεία κλίμακα χημικών ενώσεων, συνήθως μικρού μοριακού βάρους, που συμπεριλαμβάνουν ολιγοσακχαρίτες, πεπτίδια, τμήματα πρωτεϊνών και λιπιδίων. Οι περισσότεροι διεγέρτες είναι συστατικά στοιχεία των κυτταρικών τοιχωμάτων των παθογόνων, όπως η γλουκάνη, η χιτίνη, τα λιποπολυσακχαρίδια και η φλαγγελίνη, η οποία είναι δομικό συστατικό του βακτηριακού μαστίγιου (Zhang, 2010).

Αποτέλεσμα της αναγνώρισης των PAMPs από τους κατάλληλους υποδοχείς και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης είναι η μετέπειτα αναγνώριση τους από πρωτεϊνικές κινάσες και στη συνέχεια ενεργοποίηση γονιδίων στο μολυσμένο φυτό (Erwig, 2017). Οι κινάσες (MAPKs) ενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης και εμπλέκονται στην ενεργοποίηση πολλαπλών αμυντικών αποκρίσεων, όπως παρουσία στρες ή βιοσύνθεση των αμυντικών ορμονών (σαλικυλικό οξύ, γιασμονικό οξύ ή αιθυλένιο), η παραγωγή δραστικών μορίων οξυγόνου (ROS), το κλείσιμο στοματικού ανοίγματος και η πάχυνση κυτταρικού τοιχώματος (Meng, 2013).

1.2 Παραγωγή τελεστών από τα παθογόνα

Στη δεύτερη φάση τα παθογόνα, τα οποία είναι προσαρμοσμένα και μπορούν να καταστείλουν την προηγούμενη ανοσία, απελευθερώνουν τελεστές (effectors), οι οποίοι συμβάλλουν στη μολυσματικότητα των παθογόνων, καθώς συχνά μιμούνται ή αναστέλλουν κυτταρικές λειτουργίες του ξενιστή (Jones & Dangl, 2006). Τα φυτοπαθογόνα βακτήρια παράγουν 15-30 τελεστές, οι οποίοι εισάγονται στα κύτταρα ξενιστή χρησιμοποιώντας συστήματα έκκρισης τύπου ΙΙΙ (TTSS) (MUTHAMILARASAN, 2013). Οι τελεστές συμβάλλουν στην μολυσματικότητα του παθογόνου με τρεις τρόπους. Μπορεί να δράσουν ως παράγοντας μεταγραφής, ενεργοποιώντας απευθείας την μεταγραφή στα κύτταρα ξενιστές ή μπορεί να στοχεύουν στη διαμόρφωση των ιστόνων ή της χρωματίνης και έτσι να οδηγούν σε αλλαγές στην χρωματινική δομή και στην συνέχεια στην μεταγραφή. Τέλος, μπορούν να δράσουν στοχεύοντας έναν μεταγραφικό παράγοντα του κυττάρουξενιστή, με αποτέλεσμα να προκληθεί η απελευθέρωση θρεπτικών ουσιών, οι οποίες είναι απαραίτητες για το παθογόνο (Feng, 2012).

1.3 Αναγνώριση των τελεστών από πρωτεΐνες του φυτού

Στην επόμενη φάση, οι τελεστές αναγνωρίζονται από ειδικά γονίδια ανθεκτικότητας (Resistance, R). Πολλά από αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες NB-LLR . Αν κάποιος τελεστής αναγνωριστεί από μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη, τότε ως αποτέλεσμα θα ακολουθήσει ανοσία ETI (Effector Triggered Immunity) (Takken & Goverse, 2012), (Ning, Liu, & Wang, 2017). Ο αναγνωρισμένος τελεστής ονομάζεται πρωτεΐνη avirulence (Avr) (Gassmann, 2005). Η ενεργοποίηση του ETI οδηγεί σε μεταγραφική αύξηση των γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα και συχνά σχετίζεται με γρήγορο και τοπικά εντοπισμένο κυτταρικό θάνατο στη θέση της μόλυνσης, γνωστό ως αντίδραση υπερευαισθησία (HR). (Betsuyaku, et al., 2018). Η ETI είναι μια ταχύτερη και ισχυρότερη εκδοχή του PTI που συχνά κορυφώνεται με το HR. Ο κυτταρικός θάνατος που παρατηρείται κατά την HR είναι αποτέλεσμα της ανθεκτικότητας και όχι η αιτία (Gassmann, 2005). Ο τύπος αυτός της ανθεκτικότητας χαρακτηρίζεται από εξειδίκευση. Αυτό σημαίνει ότι κάποιες ποικιλίες φυτών είναι ανθεκτικός προϊόν σε συγκεκριμένα στελέχη παθογόνων και στο μοριακό επίπεδο ένα γονιδιακό προϊόν του παθογόνου αναγνωρίζεται από ένα γονίδιο του ξενιστή (gene for gene hypothesis) (Jones & Dangl, 2006).

1.4 Δομή Υποδοχέων NLR

Το προϊόν του γονιδίου R μπορεί να θεωρηθεί ως υποδοχέας των πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν προϊόντα των Avr γονιδίων των παθογόνων (Ellis, Catanzariti, & Dodds, 2006). Μια κατηγορία τέτοιων υποδοχέων είναι οι υποδοχείς NLRs (<u>N</u>ucleotide-binding domain and <u>L</u>eucine-rich <u>R</u>epeat-containing ή Nod- like Receptor) (Takken & Goverse, 2012). Οι υποδοχείς αυτοί είναι ενδοκυττάριοι και προάγουν την εγγενή ανοσία στα φυτά και στα θηλαστικά (Mermigka, Amprazi, Mentzelopoulou, Amartolou, & Sarris, 2020). Τόσο στα φυτά όσο και στα θηλαστικά η δομή των υποδοχέων αποτελείται από την επικράτεια LRR(Leucine Rich Receptor), μια επικράτεια δέσμευσης νουκλεοτιδίων NB (Nucleotide Binding) και μία αμινο-τελική επικράτεια (Εικόνα 1.2).Τόσο τα φυτικά NLR όσο και αυτά των ζώων και του ανθρώπου ανιχνεύουν τα προϊόντα των παθογόνων και συμμετέχουν στην ρύθμιση της έμφυτης ανοσοαπόκρισης. Τυχόν απορρύθμιση μπορεί να προκαλέσει αυτοάνοση απόκριση, με την εκδήλωση HR. (Kadota, Shirasu, & Guerois, 2010). Οι NLRs αναγνωρίζουν τους τελεστές και αλληλοεπιδρούν με αποτέλεσμα μια αλυσίδα γεγονότων που οδηγούν σε ανοσολογική απόκριση.

Τα φυτικά NLRs μπορούν να χωριστούν σε δύο υποκατηγορίες, τα TNL (TIR NLR) και τα non-TNL (non-TIR NLR) με βάση την αμινοτελική τους επικράτειά. Τα πιο γνωστά non-TNL είναι τα CNL CC-NLR, τα οποία έχουν ως αμινοτελική επικράτεια την CC. (Cesari, Bernoux, Moncuquet, Kroj, & Dodds, 2014). Οι υποδοχείς έχουν μια κοινή αρθρωτή αρχιτεκτονική δομή. Η δομή αυτή περιλαμβάνει μία κεντρική επικράτεια δέσμευσης νουκλεοτιδίων (NB-ARC). Στα ανώτερα φυτά, η αμινοτελική επικράτεια είναι συνήθως είτε CC (coiled coil) είτε μια TIR (Toll Interleukin-1-like receptor) είτε μια RPW8 (Resistance to Powdery Mildew 8) επικράτεια. Σχεδόν πάντοτε η επαναλαμβανόμενη δομή πλούσια σε λευκίνη (LRR) είναι παρούσα στο καρβοξυτελικό άκρο, που συχνά έχει μια σύνθετη διπλή λειτουργία στην αυτοκαταστολή και στην αναγνώριση παθογόνου. Αυτοί οι τομείς λειτουργούν από κοινού ως μοριακοί διακόπτες, οι οποίοι είναι σε θέση να εναλλάσσονται μεταξύ μιας σηματοδοτικά ανενεργής κατάστασης με απουσία παθογόνου και μιας ενεργής κατάστασης με παρουσία συγκεκριμένων παθογόνων (Εικόνα 1.3) (Jones & Dangl, 2006), (Sukarta, Slootweg, & Goverse, 2016).

1.4.1 Επικράτεια NB-ARC

Η κεντρική επικράτεια NB-ARC που απαντάται στα NLRs συνεισφέρει στη δέσμευση νουκλεοτιδίων και ανήκει στην οικογένεια των ATPase. Η επικράτεια αυτή δρα ως μοριακός διακόπτης, ρυθμιζόμενος από τη δέσμευση νουκλεοτιδίων. Όταν είναι δεσμευμένο με ADP είναι απενεργοποιημένο, ενώ με ATP είναι ενεργοποιημένο (Sukarta, Slootweg, & Goverse, 2016). Αποτελείται από τέσσερις δομικές υπομονάδες. Η υπομονάδα NB είναι μια «κλασική» NTPase, η οποία τοποθετεί τις πρωτεΐνες NB-ARC στη μεγάλη ομάδα των NTPases βρόχου P. Η υπομονάδα αυτή σχηματίζει ένα παράλληλο β-φύλλο, το οποίο πλαισιώνεται από α-έλικες (Takken, Albrecht, & Tameling, 2006). Η υποεπικράτεια εμπλέκεται στην δέσμευση του ADP-ATP. Η υπομονάδα ARC (<u>A</u>paf-1, <u>R</u>esistance, <u>C</u>ED4) αποτελείται από τρεις υπομονάδες (Takken, Albrecht, & Tameling, Resistance proteins: molecular switches of plant defence, 2006). Η υπομονάδα ARC1 είναι μια ελικοειδής δέσμη που σχηματίζεται από 4 α-έλικες. Τα διατηρημένα μοτίβα της είναι μεταξύ των κύριων μοτίβων που ορίζουν την τάξη των STAND (<u>S</u>ignal <u>T</u>ransduction <u>A</u>TPases with <u>N</u>umerous <u>D</u>omains) των ATPases, στην οποία ανήκει η επικράτεια NB-ARC των NLRs των φυτών. Η τρίτη υπομονάδα, η ARC2, έχει μια έλικα που περιλαμβάνει το διατηρημένο μοτίβο MHD (Met-His-Asp). Η ιστιδίνη σε αυτό το μοτίβο αλληλεπιδρά με το β-φώσφορο του νουκλεοτιδίου (Sukarta, Slootweg, & Goverse, 2016). Η υπομονάδα αυτή συνδέεται με την επικράτεια LRR μέσω ενός μικρού συνδέτη (Meyers, Kozik, Griego, Kuang, & Michelmore, 2003). Το ARC3 έχει επίσης ελικοειδές σχήμα (Takken, Albrecht, & Tameling, 2006).

1.4.2 Επικράτεια LRR

Οι περιοχές LRR που υπάρχουν στο καρβοξυτελικό άκρο των φυτικών NLRs ορίζονται από ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο στην αλληλουχία, στην οποία υδρόφοβα κατάλοιπα (συχνά λευκίνη) εναλλάσσονται με υδρόφιλα κατάλοιπα σε σταθερό μοτίβο. Τα επαναλαμβανόμενα μοτίβα πλούσια σε λευκίνη σχηματίζουν τον υδρόφοβο πυρήνα, με τα υδρόφιλα αμινοξέα να είναι εκτεθειμένα στην επιφάνεια (Sukarta, Slootweg, & Goverse, 2016). Τα LRR στα φυτικά NLRs είναι συχνά αρκετά ακανόνιστα, με μεγάλη διακύμανση στο μήκος των μεμονωμένων επαναλήψεων και στον αριθμό επαναλήψεων. Η επανάληψη του αμινοτελικού άκρου και η θηλειά που τα συνδέει με το NB-ARC παρουσιάζουν διατηρημένα μοτίβα, που είναι συγκεκριμένα για τη σειρά NLR και απαιτούνται για τη λειτουργία του NLR (Takken & Goverse, 2012). Η δομή LRR με μια μεγάλη εκτεθειμένη και προσαρμόσιμη επιφάνεια συχνά παίζει ένα διπλό ρόλο: στην αυτοκαταστολή μέσω ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων με τα πεδία NB-ARC ή του αμινοτελικού άκρου και στην αναγνώριση ως ανιχνευτής των τελεστών των παθογόνων. Διαγραφή της επικράτειας από τη δομή των NLRs μπορεί να προκαλέσει αυτοανοσία (Sukarta, Slootwez, δαονεις, 2016).



Εικόνα 1.2: Αναπαράσταση των υποδοχέων NLR σε φυτά και ανθρώπους. Ένα κοινό χαρακτηριστικό είναι η επικράτεια LRR. Στον άνθρωπο η αμινοτελική επικράτεια δεν είναι TIR ή CC και χωρίζονται σε περισσότερες υποκατηγορίες (Kadota, Shirasu, & Guerois, 2010).



Εικόνα 1.3: Οι επικράτειες των φυτικών υποδοχέων NLR. Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούνται από τις επικράτειες CC ή TIR, NB-ARC και LRR.

CC= coiled coil, TIR= Toll Interleukin-1-like receptor, NB= Nucleotide Binding, ARC= Apaf-1, Resistance, CED4, LRR= leucine-rich repeat (*Stella Cesari, 2014*).

1.4.3 Επικράτεια CC

Στην επικράτεια αυτή πιθανόν να οφείλονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Αν και οι περιοχές CC χαρακτηρίζονται συνήθως από ένα επαναλαμβανόμενο μοτίβο επτάνουκλεοτιδίων και μια προβλεπόμενη τάση για να σχηματίσουν δομή σπειροειδούς έλικας, η αλληλουχία των αμινοξέων δεν είναι έντονα συντηρημένη. Το αρνητικά φορτισμένο μοτίβο EDVID (WLxxVRELAYDAEDVLDx) αποτελεί εξαίρεση από αυτή την έλλειψη διατήρησης και είναι παρόν στην πλειοψηφία των τομέων CC και ορίζει την υποκατηγορία CC_{EDVID}. (Sukarta, Slootweg, & Goverse, 2016).

1.4.4 Επικράτεια TIR

Η επικράτεια TIR θεωρείται ότι λειτουργεί κυρίως ως προσαρμογέας αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών. Συχνά αυτές οι αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν είτε αυτοσυσχέτιση είτε ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις με άλλες επικράτειες TIR (Kapos, Devendrakumar, & Li, 2019). Η επικράτεια αυτή υιοθετεί μια δομή, στην οποία πέντε παράλληλα β-πτυχωτά φύλλα είναι περιτριγυρισμένα από πέντε α-έλικες. Τα αμινοξέα Σερίνη και Ιστιδίνη σταθεροποιούν την επαφή μεταξύ των TIR επικρατειών. Το μοτίβο αυτό φαίνεται να είναι διατηρημένο σε πολλές TIR φυτικές επικράτειες (Sukarta, Slootweg, & Goverse, 2016).

Οι επικράτειες αυτές ενεργοποιούν τον κυτταρικό θάνατο, όταν υπερεκφράζονται ή είναι αποκομμένες από την υπόλοιπη δομή του υποδοχέα (Jones, Vance, & Dangl, 2016).

1.5 Μηχανισμός αναγνώρισης τελεστή

Έρευνες έδειξαν ότι η αναγνώριση των τελεστών από τους υποδοχείς NLRs μπορεί να γίνει με τρεις διαφορετικούς τρόπους, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.4. Το ένα μοντέλο είναι της άμεση αλληλεπίδρασης (direct interaction model), το οποίο βασίζεται στην υπόθεση γονίδιο-γονίδιο (gene for gene). Το δεύτερο μοντέλο είναι του φύλακα/δολώματος (decoy/guard model). Αυτό το μοντέλο χωρίζεται σε δύο υποκατηγορίες, ανάλογα με τον ρόλο που έχει η πρωτεΐνη που προστατεύει ο υποδοχέας. Το τελευταίο μοντέλο είναι το μοντέλο των ενσωματωμένων επικρατειών (integrated decoy model). Στο μοντέλο αυτό οι ενσωματωμένες στα NLRs επικράτειες λειτουργούν ως ανιχνευτές των τελεστών των παθογόνων (Kapos, Devendrakumar, & Li, 2019), (Jones, Vance, & Dangl, 2016).

1.5.1 Μοντέλο άμεσης αλληλεπίδρασης

Στο μοντέλο αυτό, το οποίο βασίζεται στην υπόθεση "gene for gene", ο υποδοχέας NLR αλληλοεπιδρά απευθείας με τον τελεστή του παθογόνου. Η αλληλεπίδραση αυτή του τελεστή με τον υποδοχέα γίνεται μέσω της επικράτειας LRR. Τόσο οι πρώτες τέσσερις όσο και οι τελευταίες επτά επαναλήψεις της επικράτειας LRR συμβάλλουν στην εξειδίκευση της αντίστασης, η οποία θα μπορούσε να συνδεθεί με μια άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ του LRR και των τελεστών (Kapos, Devendrakumar, & Li, 2019).

1.5.2 Μοντέλο του φύλακα/δολώματος

Στο δεύτερο μοντέλο, οι NLRs δεν αλληλοεπιδρούν με την πρωτεΐνη του παθογόνου άμεσα, αλλά ανιχνεύουν τις αλλαγές που προκαλούν οι τελεστές στις πρωτεΐνες-στόχους του φυτού (Cui, Tsuda, & Parker, 2014). Δεδομένου ότι διαφορετικοί τελεστές στοχεύουν ίδιες πρωτεΐνες-στόχους και μονοπάτια, με την έμμεση αναγνώριση μπορεί ένα μικρό εύρος υποδοχέων NLRs να προστατέψουν τα φυτά από παθογόνους μικροοργανισμούς. Αυτό εξηγεί και το γεγονός ότι στα ανώτερα φυτά δεν παρατηρείται μεγάλο εύρος υποδοχέων NLR (Jones, Vance, & Dangl, 2016). Στο μοντέλο αυτό υπάρχουν δύο υποκατηγορίες, ανάλογα με το ρόλο του μορίου που προστατεύουν τα NLRs. Το μόριο αυτό μπορεί να είναι η πραγματική πρωτεΐνη-στόχος του τελεστή ή να είναι το δόλωμα που δεσμεύει τον τελεστή και δεν τον αφήνει να αλληλοεπιδράσει με τον φυσικό στόχο του (Wang, et al., 2015). Και στις δύο περιπτώσεις, αλλαγή της δομής του μορίου αυτού από τους τελεστές επάγει την ενεργοποίηση του NLR (Kapos, Devendrakumar, & Li, 2019).

Στην πρώτη υποκατηγορία, οι υποδοχείς NLRs προστατεύουν την πραγματική φυτική πρωτεΐνη-στόχο του παθογόνου και ανιχνεύουν τυχόν αλλαγές σε αυτήν. Η πρωτεΐνη αυτή συχνά συμμετέχει στην άμυνα του φυτού ή είναι σημαντική για το φυτικό κύτταρο (Jones, Vance, & Dangl, 2016), (Kapos, Devendrakumar, & Li, 2019).

Στην δεύτερη υποκατηγορία, η προστατευμένη πρωτεΐνη προέρχεται από γονίδιο παράλογο του πραγματικού στόχου των πρωτεΐνών της μολυσματικότητας του παθογόνου. Οι πρωτεΐνες αυτές, που εκφράζονται από τα παράλογα γονίδια, έχουν εξελιχθεί για να μοιάσουν με τον πραγματικό στόχο των τελεστών, ώστε το φυτό να μπορέσει να αναγνωρίσει τον παθογόνο οργανισμό (Kapos, Devendrakumar, & Li, 2019).

Είναι δύσκολο να διαχωριστούν οι δύο αυτές υποκατηγορίες του μοντέλου καθώς δεν είναι εύκολο να διαφοροποιηθεί μια πρωτεΐνη φύλακας από μια πρωτεΐνη δόλωμα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι θα πρέπει να αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη δεν έχει καμία λειτουργία εκτός από την αναγνώριση της πρωτεΐνης μολυσματικότητας του παθογόνου (Jones, Vance, & Dangl, 2016).



Εικόνα 1.4: Αναπαράσταση των τριών μοντέλων αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης με τον τελεστή. Τα μοντέλα είναι της άμεσης αλληλεπίδρασης, το μοντέλο του φύλακα- δολώματος και το μοντέλο των ενσωματωμένων επικρατειών (Cesari, 2017).

1.5.3 Μοντέλο των ενσωματωμένων επικρατειών

Εκτός από τη χρησιμοποίηση διαφορετικών πρωτεϊνών ως δολώματα, μερικά NLRs μπορούν να δρουν τα ίδια ως δολώματα. Τέτοιοι υποδοχείς περιέχουν μια ενσωματωμένη επικράτεια, η οποία είναι ικανή να αλληλοεπιδρά με έναν τελεστή (Cesari, 2017). Στο μοντέλο αυτό οι υποδοχείς συνήθως λειτουργούν σε ζεύγη (Sarris, Duxbury, Sohn, & Jones, 2015) και σχηματίζουν ετεροδιμερή πρωτεϊνικά σύμπλοκα (Baggs, Dagdas, & Krasileva, 2017). Σε πολλά γονιδιώματα φυτών ένα δεδομένο γονίδιο NLR μπορεί να είναι στενά συνδεδεμένο και μεταγραφικά ανεξάρτητο από ένα άλλο γονίδιο NLR, το οποίο είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του πρώτου γονιδίου. Αναλύσεις του γονιδιώματος των φυτών για γονίδια NLR οδήγησαν στην ανακάλυψη πολλών ενσωματωμένων επικρατειών στις φυτικές πρωτεΐνες NLR (Jones, Vance, & Dangl, 2016). Στο μοντέλο αυτό αναγνώρισης του παθογόνου, το ένα NLR από το ζεύγος δρα ως ανιχνευτής του τελεστή, ενώ το άλλο ενεργοποιεί την ανοσολογική απόκριση, πιθανώς μέσω ανίχνευσης των αλλαγών που πραγματοποιούνται στη διαμόρφωση του άλλου υποδοχέα (Jones, Vance, & Dangl, 2016), (Baggs, Dagdas, & Krasileva, 2017).

Για παράδειγμα, στο φυτό Arabidopsis τα NLRs RPS4 και RRS1 είναι συνδεδεμένα και απαιτούνται και τα δύο για την αναγνώριση τελεστών, όπως των AvrRps4 και PopP2 (Sarris, Duxbury, Sohn, & Jones, 2015). Στο ζεύγος αυτό, το RRS1 NLR ανιχνεύει τον τελεστή. Το RRS1 φέρει μια επικράτεια WRKY στο αμινοτελικό άκρο (Jones, Vance, & Dangl, 2016). Στο φυτό Arabidopsis πολλά γονίδια WRKY εμπλέκονται στην έμφυτη ανοσία των φυτών. Αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι οι WRKY πρωτεΐνες μπορεί να είναι στόχοι των τελεστών των παθογόνων. Πράγματι, ο παράγοντας αυτός δρα ως μιμητής του φυσικού στόχου του τελεστή. Ο τελεστής PopP2 ακετυλιώνει δύο λυσίνες στο κανονικό μοτίβο δέσμευσης DNA WRKYGQK (Sarris, Duxbury, Sohn, & Jones, 2015). Διαγραφή του παράγοντα WRKY από το RRS1 NLR έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από το RPS4 άμυνας, υποδηλώνοντας ότι με απουσία του τελεστή η επικράτεια WRKY συμβάλλει στη διατήρηση του συμπλόκου σε ανενεργή κατάσταση. Παρουσία μόνο του RPS4 παρατηρείται HR, αλλά όχι τόσο έντονο όσο όταν προκαλείται λόγω μόλυνσης από παθογόνο (Ma, et al., 2018).

Ομοίως, στο ρύζι υπάρχουν τα NLRs RGA4 και RGA5 που είναι συνδεδεμένα και είναι απαραίτητα για την αναγνώριση δύο τελεστών από το παθογόνο μύκητα του ρυζιού *Magnaporthe oryzae*. Το RGA4 ενεργοποιεί έναν ανεξάρτητο από AVR κυτταρικό θάνατο ο οποίος καταστέλλεται παρουσία του RGA5, καθώς το δεύτερο δρα ως καταστολέας της διαδικασίας του κυτταρικού θανάτου. Η ρύθμιση του RGA4 από το RGA5 πραγματοποιείται με άμεση αλληλεπίδραση. Το RGA5 αναγνωρίζει και αλληλοεπιδράει με τον τελεστή με αποτέλεσμα το RGA4 να ενεργοποιείται και να επάγεται η εξαρτώμενη από το RGA4 σηματοδοτούμενη άμυνα (Césari, et al., 2014).

Ένα άλλο ζεύγος γονιδίων NLR από το ρύζι είναι το *Pikp-1* και *Pikp-2*. Το ζεύγος αυτό αναγνωρίζει ένα διαφορετικό τελεστή, τον Avr-Pik, που υπάρχει στους μύκητες σε πολλά αλληλόμορφα. Η αλληλεπίδραση του τελεστή με το Pikp-1 NLR γίνεται στην επικράτεια HMA (heavy metal associated), η οποία βρίσκεται μεταξύ της επικράτειας CC και της NB-ARC (Césari, et al., 2014).

1.6. Ρύθμιση έκφρασης των NLR γονιδίων

Η ρύθμιση της ομοιόστασης των γονιδίων NLRs είναι σημαντική για τη λειτουργία τους. Στα υγιή φυτά, τα οποία δεν έχουν μολυνθεί από κάποιο παθογόνο, οι NLR πρωτεΐνες βρίσκονται σε χαμηλή ποσότητα ή /και βρίσκονται σε ανενεργή μορφή, εξυπηρετώντας ένα βασικό ρόλο επιτήρησης (Wersch, Tian, Hoy, & Li, 2020). Η υπερέκφρασή τους μπορεί να οδηγήσει σε αυτοανοσία, ενώ η έλλειψη των κατάλληλων γονιδίων *R* μπορεί να οδηγήσει σε ευαισθησία έναντι ορισμένων παθογόνων (Li, Kapos, & Zhang, 2015), (Adachi, Derevnina, & Kamoun, 2019). Αυτά τα φυτά, εάν επιβιώσουν, τείνουν να είναι μικρά σε μέγεθος, συχνά με επιπρόσθετους μορφολογικούς φαινοτύπους, όπως συστροφή φύλλων και μακροσκοπικές βλάβες (Wersch, Tian, Hoy, & Li, 2020). Τα NLRs ρυθμίζονται σε διάφορα στάδια στα φυτά (Adachi, Derevnina, & Kamoun, 2019).



Εικόνα 1.5: Παράγοντες που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων NLR.

1.6.1. Ρύθμιση έκφρασης των NLR γονιδίων σε μεταγραφικό επίπεδο

Το πρώτο βήμα για την ρύθμιση της έκφρασης των NLR συμβαίνει σε μεταγραφικό επίπεδο (Borrelli, et al., 2018). Τα φυτά που έχουν προσβληθεί από παθογόνα εμφανίζουν μεγάλης κλίμακας αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης πολλών NLRs, συχνά με οργανο- και ιστο-ειδικό τρόπο (Wersch, Tian, Hoy, & Li, 2020).

Οι επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως η μεθυλίωση του DNA και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών, έχουν επίσης σοβαρές επιπτώσεις στην ανοσία (Adachi, Derevnina, & Kamoun, 2019). Οι τροποποιήσεις της χρωματίνης είναι και αποτέλεσμα της σίγασης των μεταθετών στοιχείων. Η σίγαση αυτή οδηγεί σε τοπικές αλλαγές της χρωματίνης, οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν την έκφραση των γειτονικών γονιδίων (Richard, Gratias, Meyers, & Geffroy, 2018). Συχνά, λιγότερη μεθυλίωση οδηγεί σε περισσότερη άμυνα, ενώ αυξημένη μεθυλίωση οδηγεί σε ευαισθησία στα φυτά (Li, Kapos, & Zhang, 2015).

Οι παράγοντες μεταγραφής έχουν σημαντικούς ρόλους στη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων NLR αναγνωρίζοντας συγκεκριμένα μοτίβα στους υποκινητές τους (Borrelli, et al., 2018). Τα σημεία δέσμευσης ορισμένων μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι WRKYs, είναι εμπλουτισμένα στους υποκινητές των NLRs, κάτι που ίσως δεν προκαλεί έκπληξη δεδομένου ότι οι παράγοντες μεταγραφής WRKY σχετίζονται με πολλές αμυντικές διαδικασίες (Mohr, et al., 2010).

1.6.2. Ρύθμιση έκφρασης των NLR γονιδίων σε μέτα-μεταγραφικό επίπεδο

Η ομοιόσταση των mRNA μπορεί να ρυθμιστεί και από το εναλλακτικό μάτισμα (Li, Kapos, & Zhang, 2015). Το εναλλακτικό μάτισμα συνίσταται στην παραγωγή εναλλακτικών μορφών των μεταγράφων από το ίδιο γονίδιο, ακολουθώντας διαφορετικά μοτίβα ματίσματος. Η διαδικασία αυτή ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά (Borrelli, et al., 2018). Μεταλλάγματα με ελαττώματα στο εναλλακτικό μάτισμα εμφανίζουν φαινότυπους ευαισθησίας. Αυτά τα εναλλακτικά αντίγραφα είναι συνήθως παρεκκλίνοντα, προκαλώντας τη δική τους αποικοδόμηση και αποτρέποντας την υπερβολική συσσώρευση πρωτεΐνης NLR στο φυτικό κύτταρο. Όταν διακόπτεται η αποικοδόμηση παρεκκλίνοντων μεταγράφων (nonsense mediated decay, NMD), τα φυτά ενδέχεται να εμφανίζουν αυτοανοσία (Wersch, Tian, Hoy, & Li, 2020).

Η αποικοδόμηση παρεκκλίνοντων μεταγράφων είναι ένας συντηρημένος μηχανισμός που αποδομεί τα παρεκκλίνοντα mRNA, τα οποία φέρουν πρόωρα κωδικόνια λήξης, αποτρέποντας έτσι τη δυνητική συσσώρευσή τους (Borrelli, et al., 2018). Τα τελευταία χρόνια, η NMD έχει αναδειχθεί ως ένας μηχανισμός που ρυθμίζει τα επίπεδα των λειτουργικών πρωτεϊνών στο κύτταρο σε διαφορετικές βιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων των αποκρίσεων σε βιοτικές καταπονήσεις. Η αναστολή της NMD προκαλεί την ενεργοποίηση των αποκρίσεων του αμυντικού συστηματος φυτού (Raxwal & Riha, 2016).

1.7 RNA σίγηση

Ένας άλλος μηχανισμός ρύθμισης των NLRs είναι μέσω της RNA σίγησης (RNA silencing) (Brodersen & Voinnet, 2006). Οι ανώτεροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί διαθέτουν έναν ειδικό ως προς την αλληλουχία RNA μηχανισμό, ο οποίος έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της γονιδιακής έκφρασης, είτε σε μεταγραφικό επίπεδο είτε σε μεταφραστικό επίπεδο, ο οποίος ονομάζεται RNA σίγαση (Mermigka, Verret, & Kalantidis, 2015), (Kos´cian´ska, Kalantidis, Wypijewski, Sadowski, & Tabler, 2005).

Οι οργανισμοί χρησιμοποιούν αυτόν τον μηχανισμό για τρεις λόγους. Πρώτον, για την δημιουργία και την διατήρηση της ετεροχρωματίνης, του επαναλαμβανόμενου DNA και των μεταθετών στοιχείων, δεύτερον, για την μετα-μεταγραφική ρύθμιση της ανάπτυξης, της απόκρισης σε καταπονήσεις και άλλων ενδογενών ρυθμιστικών λειτουργιών και τέλος για την υπεράσπιση του ίδιου του οργανισμού από τυχόν μόλυνση, η οποία μπορεί να προκληθεί από βακτήρια, μύκητες ή ιούς (Hohn & Vazquez, 2011), (Kalantidis, Tsagris, & Tabler, 2005).

Ο μηχανισμός αυτός έχει τρία βιοχημικά χαρακτηριστικά: (i) τον σχηματισμό δίκλωνου RNA (dsRNA), (ii) την αποδόμηση του dsRNA σε μικρά dsRNA μήκους 20-24 νουκλεοτιδίων με προεξέχοντα άκρα και (iii) την ανασταλτική δράση της επιλεγμένης μονόκλωνης αλυσίδας RNA (sRNA), η οποία δρα μέσα σε ένα σύμπλοκο με μερική ή πλήρη συμπληρωματικότητα με μόριο DNA ή RNA (Brodersen & Voinnet, 2006).

Ο πυρήνας της RNA σίγασης είναι ο σχηματισμός και η αναγνώριση του δίκλωνου RNA (dsRNA). Η αναγνώριση του dsRNA γίνεται από τις DICER-LIKE πρωτεΐνες (DCL), οι οποίες είναι νουκλεάσες τύπου RNase III, και από dsRNA δεσμευτικές πρωτεΐνες (DRB) (Bernstein, Caudy, Hammond, & Hannon, 2001), (Mermigka, Verret, & Kalantidis, 2015). Μετά την αναγνώρισή του, το dsRNA κόβεται σε μικρά RNA (sRNA), μήκους 20-26 νουκλεοτιδίων, με προεξέχοντα άκρα 2 νουκλεοτιδίων (Hohn & Vazquez, 2011), (Brodersen & Voinnet, 2006). Τα sRNA που σχηματίζονται προστατεύονται από την αποικοδόμηση λόγω της 2' Ο- μεθυλίωσης των ριβόζων του 3' τερματικού άκρου από την S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνο-εξαρτώμενη dsRNA μεθυλοτρανσφεράση (MTase) HUA ENHANCER1 (HEN1) (Vazquez, Legrand, & Windels, 2010). Στη συνέχεια, τα sRNA αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες Αργοναύτες (AGO) και άλλες πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται τα σύμπλοκα σίγησης επαγόμενα από RNA (RISCs). Τα σύμπλοκα RISCs περιέχουν μόνο μία από τις δύο αλυσίδες των παραγόμενων sRNA, ενώ η άλλη αλυσίδα αποδομείται (Brodersen & Voinnet, 2006).

Τα σύμπλοκα RISCs είτε εμπλέκονται στην τροποποίηση της χρωματίνης και στη συνέχεια ορίζονται ως σύμπλεγμα μεταγραφικής σίγησης που προκαλείται από RNA (RNA-induced transcriptional silencing, RITS), είτε εμπλέκονται σε αναστολή μετάφρασης και αποικοδόμηση συγκεκριμένου RNA ανάλογα με τον Αργοναύτη (Mallory & Vaucheret, 2010). Τα προϊόντα διάσπασης των RNA στόχων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγείο για την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RDR), με αποτέλεσμα να σχηματιστούν dsRNAs, τα οποία μπορούν να ξεκινήσουν ξανά τη σίγηση με αυτοκαταλυτικό και με αυτοσυντηρούμενο τρόπο (Hohn & Vazquez, 2011).

1.7.1 Πρωτεΐνη Dicer

Οι πρωτεΐνες Dicer και Dicer-like (DCL) είναι βασικά συστατικά στο μονοπάτι βιογένεσης ώριμων sRNA από μακριά δίκλωνα RNA. Οι πρωτεΐνες DCL αποτελούν μια μικρή οικογένεια πρωτεϊνών σε φυτά ,των οποίων ο χρόνος διαφοροποίησης χρονολογείται από την εμφάνιση βρύων (Liu, Feng, & Zhu, 2009).

Στο φυτό Arabidopsis thaliana αλλά και στο φυτό Nicotiana benthamiana έχουν βρεθεί τέσσερις πρωτεΐνες τύπου Dicer (DCL1 – DCL4) με διαφορετικούς ρόλους (Liu, Feng, & Zhu, 2009), (Katsarou, et al., 2019). H DCL1 δεν σχετίζεται μόνο με την παραγωγή miRNA, αλλά επίσης παίζει ρόλο στην παραγωγή sRNA από ενδογενείς ανεστραμμένες επαναλήψεις. Τα άλλα τρία DCLs είναι ένζυμα που παράγουν siRNA (Liu, Feng, & Zhu, 2009). H DCL2 δημιουργεί siRNAs από φυσικά antisense μετάγραφα και λειτουργεί στην αντίσταση κατά των ιών (Katsarou, et al., 2019). H DCL3 παράγει siRNAs, τα οποία συμβάλλουν στη τροποποίηση της χρωματίνης, με τη συμμετοχή τους στο RNA εξαρτώμενο μονοπάτι μεθυλίωσης του DNA (Katsarou, et al., 2019), (Liu, Feng, & Zhu, 2009). Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη DCL3 παράγει μεγάλου μήκους μη κώδικα RNAs (long-non coding RNAs)(Katsarou, et al., 2019). Τέλος, η DCL4 είναι το κύριο ένζυμο DCL που εμπλέκεται στην αντιική άμυνα. Συνάμα είναι υπεύθυνο για την παραγωγή siRNA και εμπλέκεται περαιτέρω σε πολλαπλές ενδογενείς διεργασίες, όπως η παραγωγή tasiRNAs, τα οποία ρυθμίζουν τις σημαντικές αναπτυξιακές διαδικασίες, την παραγωγή miRNA και, τέλος, στον τερματισμό της μεταγραφής (Katsarou, et al., 2019), (Liu, Feng, & Zhu, 2009).

Οι διάφορες πρωτεΐνες Dicer παράγουν διαφορετικού μεγέθους sRNA. Η DCL1 παράγει sRNA μήκους 21 ή 22 νουκλεοτιδίων. Η DCL2 παράγει sRNA μήκους 22 νουκλεοτιδίων και η DCL3 μήκους 24 νουκλεοτιδίων. Τέλος, η DCL4 κόβει το RNA σε μικρότερα μόρια μήκους 21 νουκλεοτιδίων (Muhammad, Zhang, Zhang, & Liang, 2019).

Στη συνέχεια, ο ένας από τους δύο κλώνους του sRNA θα συνδεθεί με τις πρωτεΐνες ARGONAUTE (AGO) στο σύμπλοκο RISC (Hutvagner & Simard, 2008). Οι πρωτεΐνες ARGONAUTE είναι καλά συντηρημένες και εκφράζονται σε ένα μεγάλο εύρος ιστών σε πολλούς οργανισμούς. Ωστόσο, ο αριθμός των πρωτεϊνών AGO που εκφράζονται σε κάθε είδος οργανισμού ποικίλει αρκετά (Mallory & Vaucheret, 2010).

1.7.2 Βιογένεση φυτικών miRNAs και siRNA

Τα sRNA διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τα miRNA και τα siRNA. Τα miRNA είναι μία ομάδα εξελικτικά διατηρημένων, μη μεταγραφόμενων RNAs, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση έκφρασης των γονιδίων. Το μήκος τους είναι 21 νουκλεοτίδια, αλλα υπαρχουν και ορισμένα με μήκος 22 και 24 νουκλεοτίδια στα φυτα (MacFarlane & Murph, 2010). Σε αντίθεση με τα miRNAs που προέρχονται από ένα πρόδρομο μετάγραφο με δομές φουρκέτας και με ατελή ζευγαρώματα βάσεων, τα siRNA προέρχονται από τέλεια ζευγαρωμένα πρόδρομα δίκλωνα RNA (dsRNA). Αυτά το πρόδρομο dsRNA προέρχονται είτε από επιπλέον antisense μεταγραφή είτε από τη δράση μιας RNA εξαρτώμενης από RNA πολυμεράσης (RDR), η οποία δημιουργεί κατω από ορισμένες συνθήκες dsRNA. Στα φυτά τα siRNA διαφορετικού μήκους παράγονται από διαφορετικές πρωτεΐνες DCL και παρουσιάζουν προτιμήσεις σύνδεσης με διαφορετικές πρωτεΐνες ARGONAUTE (Katiyar-Agarwal & Jin, 2013).

Η σύνθεση των διαφορετικών τύπων siRNAs οφείλεται στο υπόστρωμα που αναγνωρίζουν οι DCL πρωτεΐνες. Τέσσερις διαφορετικοί τύποι siRNAs είναι γνωστοί στα φυτά, τα trans-acting siRNAs (ta-siRNAs), τα natural antisense transcripts (NATs)-derived siRNAs (nat-siRNAs), τα heterochromatic siRNAs (hc-siRNAs) ή repeat-associated siRNAs (ra-siRNAs), και τα long siRNAs (lsiRNAs) (Katiyar-Agarwal & Jin, 2013).

Πιο αναλυτικά τα nat-siRNA παράγονται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες στρες στα φυτά (Katiyar-Agarwal & Jin, 2013). Παράγονται από ζεύγη γονιδίων, τα οποία μεταγράφονται από διαφορετικές αλυσίδες του διπλόκλωνου DNA (sense/antisense) για να παράγουν ένα μόριο dsRNA μέσω annealing των αλληλεπικαλυπτόμενων 3' άκρων των δύο μεμονωμένων μεταγράφων (Eamens, Wang, Smith, & Waterhouse, 2008). Συνήθως το ένα (κωδικό) μετάγραφο εκφράζεται συνεχώς, ενώ το συμπληρωματικό μετάγραφο εκφράζεται όταν το φυτό βρίσκεται σε δυσμενές περιβάλλον και υπόκειται σε στρες (Ghildiyal & Zamore, 2009). Τα dsRNA μόρια διασπώνται από την πρωτεΐνη DCL3 και δημιουργούνται natsiRNA μήκους 24 νουκλεοτιδίων. Στη συνέχεια, τα μόρια αυτά στοχεύουν τα μετάγραφα που σχηματίζονται από το γονίδιο του ζεύγους, από το οποίο σχηματίστηκαν, με αποτέλεσμα την διάσπαση των νέων μετάγραφων. Το διασπασμένο μόριο RNA μόριο με τη δράση της πρωτεΐνης DCL1 μετατρέπεται σε natsiRNA μήκους 21 νουκλεοτιδίων. Τα natsiRNA, όπως και τα tasiRNA, αξιοποιούνται ως οδηγοί για να κατευθύνουν την ειδική ως προς την αλληλουχία σίγαση των ομόλογων mRNAs, αφού πρώτα έχουν ενσωματωθεί στο σύμπλοκο RISC (Katiyar-Agarwal & Jin, 2013), (Eamens, Wang, Smith, & Waterhouse, 2008).



Εικόνα 1.5: Μονοπάτια βιοσύνθεσης ενδογενών sRNA (Katiyar-Agarwal & Jin, Role of Small RNAs in Host-Microbe Interactions, 2013).

1.7.3 Ρύθμιση έκφρασης των NLR γονιδίων μέσω RNA σίγισης

Πρόσφατα, η σίγαση RNA αναδείχθηκε ως βασικός ρυθμιστικός μηχανισμός που ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση των γονιδίων ανθεκτικότητας (Boccara, et al., 2015). Μέχρι σήμερα, η ρύθμιση των γονιδίων NLR βασιζόμενη σε miRNA, έχει ανιχνευτεί σε δικοτυλήδονα και μονοκοτυλήδονα φυτά, και σε μονοετή και πολυετή φυτά, το οποίο υποδεικνύει τον ευρύ και διατηρημένο τρόπο ρύθμισης των NLR μεταγράφων (Huang, Wang, Hu, Hamby, & Jin, 2019). Αυτό το εύρημα δείχνει τη συνάφεια αυτού του μηχανισμού στον έλεγχο της έκφρασης NLR και της ομοιόστασης και σε μια διαδικασία συν-εξέλιξης μεταξύ των γονιδίων NLR και των αντίστοιχων μικρών RNA, για την εξισορρόπηση των οφελών και του κόστους του φυτικού ανοσοποιητικού συστήματος (Huang, Wang, Hu, Hamby, & Jin, 2019).

Κατά τη μόλυνση από παθογόνο, τα 22 nt miRNA και τα phasiRNAs γενικά είναι υπορυθμιζόμενα, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση της ρύθμισης των NLR και την επακόλουθη ενεργοποίηση των ανοσοαποκρίσεων (Huang, Wang, Hu, Hamby, & Jin, 2019). Παραδείγματα αυτού του μηχανισμού υπάρχουν σε είδη φυτών, συμπεριλαμβανομένου του nat-miR6019 και miR6020 στον καπνό, τα οποία στοχεύουν και ρυθμίζουν το γονίδιο ανθεκτικότητας N για το TMV (Tobacco mosaic virus) (Li, et al., 2012), miR482 και miR2118 σε ντομάτα, που στοχεύουν σε cluster NLR (Shivaprasad, 2012) και miR472, που στοχεύει ένα σύνολο γονιδίων NLR στο *Arabidopsis*, τα οποία προκαλούν τη βιογένεση των phasiRNAs (Boccara, et al., 2015).

Το πρώτο miRNA που βρέθηκε να στοχεύει τα γονίδια NLR της *Arabidopsis* ήταν το miR472. Έκτοτε έχει γίνει περιγραφή για πολλά άλλα miRNA που εμπλέκονται στη ρύθμιση των γονιδίων NLR για τον έλεγχο της αντίστασης τόσο σε ιούς όσο και σε μύκητες (Boccara, et al., 2015).

Στο φυτό *N. benthamiana* το γονίδιο *N* τύπου TIR, το οποίο δίνει αντοχή στον ιό TMV στον καπνό, ρυθμίζεται από το σύμπλεγμα miRNA miR6019 / 6020. Συγκεκριμένα, το miR6019, μήκους 22 νουκλεοτιδίων, οδηγεί στην αποικοδόμηση των αντιγράφων του *N* γονιδίου. Η αποικοδόμηση αυτή οδηγεί στην παραγωγή phasiRNAs μετά την δράση των πρωτεϊνών RDR6 και DCL4 (Li, et al., 2012).

Ένα άλλο παράδειγμα είναι το miR9863 στο κριθάρι, το οποίο μεσολαβεί στη διάσπαση των μεταγραφών Mla1 NLR και προκαλεί phasiRNAs που καταστέλλουν την ανοσία έναντι του ωιδίου. Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από ωίδιο, ο μύκητας προκαλεί παροδική αύξηση των επιπέδων μεταγραφής του Mla1, ακολουθούμενη από παρατεταμένη επαγωγή του miR9863 και των αντίστοιχων phasiRNAs κατά την τελευταία φάση της μόλυνσης, όταν η συσσώρευση MLA1 μεταγράφων αποκαθίσταται σε σχεδόν φυσιολογικά επίπεδα (Liu, et al., 2014).

Τέλος, το ενδογενές natsiRNAATGB2 ρυθμίζει έμμεσα έναν υποδοχέα NLR. Το συγκεκριμένο sRNA επάγεται ειδικά από το παθογόνο βακτήριο *Pseudomonas syringae* (*Ps*) που φέρει τον τελεστή avrRpt2. Παράγεται από την αλληλεπικαλυπτόμενη περιοχή του γονιδίου *ATGB2* και του γονιδίου *PPRL* (Katiyar-Agarwal, et al., 2006). Ύστερα από τον σχηματισμό του natsiRNAATGB2, στοχεύει την 3΄ αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *PPRL*. Το γονίδιο αυτό είναι ένας πιθανός αρνητικός ρυθμιστής της άμυνας των φυτών και πιο συγκεκριμένα του RPS2- επαγόμενου μονοπατιού. Η επαγωγή του εξαρτάται από το R γονίδιο *RPS2* (*RESISTANT TO P. SYRINGAE 2*), το οποίο αναγνωρίζει τον τελεστή avrRpt2, καθώς και το γονίδιο *NDR1* (*Non race-specific disease resistance 1*) (Lii, 2016).

1.8 Ζεύγος NLR *Bn*RPR1- *Bn*RPR2

Το ζεύγος γονιδίων Brassica napus RESISTANCE PAIRED RECEPTOR 1(BnRPR1) και Brassica napus RESISTANCE PAIRED RECEPTOR 2 (BnRPR2) που θα μελετηθεί στην παρούσα εργασία προέρχεται από το φυτό ελαιοκράμβη (Brassica napus), της οικογένειας Brassicaceae. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτού του ζεύγους παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.7. Αρχικά, ένα από τα δύο γονίδια έχει ενσωματωμένες επικράτειες που πιθανόν να συμβάλλουν στην ανίχνευση του τελεστή. Επιπλέον, μέσα στο γονιδίωμα του φυτού, τα δύο γονίδια έχουν αντίθετη κατεύθυνση. Αυτό πιθανόν σημαίνει ότι ο εκκινητής του ενός γονιδίου είναι μέρος της αλληλουχίας του άλλου γονιδίου. Τέλος, τα δύο γονίδια έχουν μια περιοχή αλληλοεπικάλυψης. Αυτό υποδηλώνει ότι το ένα γονίδιο επηρεάζει την έκφραση του άλλου γονιδίου.



Εικόνα 1.7: Αναπαράσταση του ζεύγους γονιδίων στο γονιδίωμα του φυτού Brassica napus.

Το γονίδιο *BnRPR2* περιέχει τις χαρακτηριστικές για τα NLR επικράτειες (Εικόνα 1.8). Το ίδιο ισχύει και για το γονίδιο *BnRPR1*, το οποίο όμως διαθέτει και δύο επιπλέον επικράτειες (Εικόνα 1.9). Αυτές είναι η B3 και η TFSII επικράτεια. Η B3 επικράτεια είναι μια DNA-binding επικράτεια, καλά διατηρημένη, η οποία συναντάται αποκλειστικά σε μεταγραφικούς παράγοντες στα ανώτερα φυτά. Η πρωτεΐνη αποτελείται από 100-120 αμινοξέα. Η δευτεροταγής δομή της αποτελείται από επτά β-φύλλα και δύο α-έλικες (Si-Bei Li, 2016). Η επικράτεια αυτή αλληλοεπιδρά με την μεγάλη αύλακα του DNA και ειδικότερα δεσμεύεται στο μοτίβο CATGCA *in vitro* (Wang, et al., 2018). Η δράση της επικράτειας αυτής σχετίζεται με την ανάπτυξη και την ωρίμανση του σπόρου, καθώς σχετίζεται με το μονοπάτι σήμανσης των ορμονών, όπως η αυξίνη , η γιβεριλίνη, το αμπσισικό οξύ και το μπρασινοστεροειδές (Romanel, Schrago, Counago, Russo, & Alves-Ferreira, 2009).

Η δεύτερη επικράτεια απαντάται στο αμινοτελικό άκρο του μεταγραφικού παράγοντα επιμήκυνσης ΙΙ (TFSII). Η επιμήκυνση της αλυσίδας RNA από την RNA πολυμεράση ΙΙ (RNA Poll II) είναι μια πολύπλοκη και ρυθμιζόμενη διαδικασία η οποία είναι συντονισμένη με την τοποθέτηση καλύμματος στο 5' άκρο, το μάτισμα και την τοποθέτηση πολύ-Α ουράς σε πρόδρομα μετάγραφα. Πολυάριθμοι παράγοντες επιμήκυνσης έχουν ταυτοποιηθεί. Ένας τέτοιος παράγοντας είναι και ο TFSII. Ο παράγοντας αυτός βοηθάει την πολυμεράση να παρακάμψει συγκεκριμένα εμπόδια που συναντάει στην επιμήκυνση κατά τη διάρκεια της μεταγραφής ενός γονιδίου (Wind & Reines, 2000).



Εικόνα 1.8: Αναπαράσταση των επικρατειών της πρωτεΐνης BnRPR2.



Εικόνα 1.9: Αναπαράσταση των επικρατειών της πρωτεΐνης BnRPR1.

Από πειράματα confocal που έχουν πραγματοποιηθεί στην προπτυχιακή εργασία που πραγματοποίησα στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Μικροβιολογίας (Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης) έχει παρατηρηθεί ότι όταν το γονίδιο BnRPR1 εκφράζεται μόνο του, τότε η πρωτεΐνη εντοπίζεται διάχυτη στον πυρήνα, ενώ όταν εκφράζεται μόνο το γονίδιο BnRPR2 εντοπίζεται στον πυρηνίσκο. Με την συνέκφραση των δύο γονιδίων, οι πρωτεΐνες εντοπίζονται σε συγκεκριμένα σημεία του πυρήνα. Αυτό δείχνει ότι η παρουσία της μιας πρωτεΐνης επηρεάζει την περιοχή που εντοπίζεται η άλλη πρωτεΐνη. Επιπλέον η συνέκφραση των δύο γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση τους. Από τα περάματα αγροεμποτισμού που πραγματοποιήθηκαν σε φυτά N. benthamiana και N. tabacum παρατηρήθηκε μετά από 48 ώρες η εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας χωρίς την παρουσία κάποιου τελεστή, ο οποίος θα μπορούσε να την επάξει. Τα γονίδια των υποδοχέων NLRs εκφράστηκαν με διαφορετικούς επιτόπους. Από πειράματα αγροεμποτισμού που έχουν πραγματοποιηθεί, διαπιστώθηκε ότι το φαινόμενο της υπερευαισθησίας δεν ήταν εξαιτίας των επιτόπων, αλλά λόγω της υπερέκφρασης και συνέκφρασης του ζεύγους NLR γονιδίων (Αμαρτωλού Α. 2019, Πτυχιακή εργασία). Παράλληλα, σε προκαταρκτικά πειράματα (Μέρμηγκα, αδημοσίευτα δεδομένα) βρέθηκε ότι το ζεύγος αυτών των γονιδίων δεν επάγει αντίδραση υπερευαισθησίας σε διαγονιδιακές σειρές dcl2/4 N. benthamiana που είναι κατεσταλμένα ως προς τα γονίδια DCL2 και DCL4 (Katsarou, et al., 2019), (Dadami, et al., 2013).

1.9 Σκοπός εργασίας

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η μελέτη των πιθανών αιτιών για τις οποίες η συνέκφραση των γονιδίων BnRPR1 και BnRPR2 δεν οδήγησε σε αντίδραση υπερευαισθησίας στη σειρά καταστολής dcl2/4 του φυτού N. benthamiana. Για το σκοπό αυτό έγινε προσπάθεια να δοθεί απάντηση στα παρακάτω ερωτήματα:

- 1. Εκφράζονται τα γονίδια στην σειρά dcl2/4;
- 2. Τα επίπεδα έκφρασης είναι παραπλήσια με αυτά του αγρίου τύπου;
- 3. Ο υποκυττάριος εντοπισμός είναι ίδιος με αυτόν που απαντάται σε φυτά αγρίου τύπου;
- 4. Η απουσία αντίδρασης υπερευαισθησίας οφείλεται στην καταστολή της *DCL2*, της *DCL4* ή στην ταυτόχρονη καταστολή και των δύο;

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δημιουργία νέου φυτικού υλικού

Για τη δημιουργία νέων φυτών θα χρησιμοποιηθεί ένα μείγμα αποτελούμενο από χώμα, τύρφη και περλίτη σε αναλογία 2:1:0,5, αντίστοιχα, καθώς και πλήρες λίπασμα (12-12-7) (Nitrophoska, EurochemAgro). Μετά την καλή ανάμιξη προστίθεται το μείγμα σε γλάστρες. Στη συνέχεια, το χώμα βρέχεται και από πάνω καλύπτεται με μία στρώση από το πλούσιο χώμα. Τέλος, ρίχνονται οι σπόροι των Ν. benthamiana και Ν. tabacum. Οι γλάστρες σκεπάζονται από πάνω με ζελατίνη για να διατηρηθεί η απαιτούμενη υγρασία. Όταν οι σπόροι αρχίσουν να βλαστάνουν, το σκέπασμα αφαιρείται και τα φυτά ποτίζονται, όποτε είναι απαραίτητο.

2.2 Εμποτισμός με Αγροβακτήρια

Για την πραγματοποίηση του αγροεμποτισμού, τη προηγούμενη μέρα γίνεται επώαση καλλιέργειας βακτηρίων 5-10ml LB με τα κατάλληλα αντιβιοτικά στους 28°C για 16-20 ώρες με ανακίνηση 200-250rpm. Την επόμενη μέρα γίνεται φυγοκέντρηση στα 210g για 10 λεπτά σε 40°C. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκείμενου, διατήρηση και επαναδιάλυση του ιζήματος σε διπλάσιο όγκο 10mM MgCl2 (stock 1M). Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται. Ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρηση στα 210g για 10 λεπτά, απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 500μl διαλύματος 10mM MgCl2 και 10mM MES (stock 1M). Προσθήκη 900μl διαλύματος MgCl2- MES και 100μl από το δείγμα σε κυψελίδα για μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας στα 600nm. Προστίθεται ποσότητα καλλιέργειας ώστε η τελική οπτική πυκνότητα να είναι 0,4 για κάθε δείγμα και τελικό όγκο 1,5ml. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη διαλύματος MgCl2- MES μέχρι τον τελικό όγκο. Με τη χρήση βελόνας προκαλείται μικρή γρατζουνιά στο κάτω μέρος του φύλλου. Με σύριγγα 5ml, χωρίς βελόνα, πραγματοποιείται διήθηση του δείγματος στο εσωτερικό του φύλλου και στη συνέχεια μαρκάρεται η περιοχή όπου εισήλθε το δείγμα. Ακολουθεί πότισμα του φυτού και τοποθέτηση του σε περιβάλλον με ιδανικές γι' αυτό συνθήκες. Ύστερα από μέρες παρατηρείται η φθορίζουσα σημασμένη πρωτεΐνη με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας ή γίνεται συγκομιδή φύλλων για απομόνωση RNA.

2.3 Λειοτρίβηση

Για τη διαδικασία της λειοτρίβησης, αρχικά τοποθετούνται μέσα σε υγρό άζωτο η σπάτουλα, το eppendorf και το φύλλο από το φυτό. Στη συνέχεια για να παγώσει το γουδί ρίχνεται μέσα του υγρό άζωτο. Τοποθετείται μέσα στο γουδί το φύλλο και με ήρεμες κινήσεις γίνεται το σπάσιμο του φύλλου σε μικρότερα κομμάτια. Μόλις εξατμιστεί το υγρό άζωτο από το γουδί, ασκείται μεγαλύτερη δύναμη στο δείγμα έως ότου να γίνει πούδρα. Μέχρι το τέλος της διαδικασίας προσθέτουμε άζωτο ξανά αν είναι απαραίτητο ώστε το δείγμα να παραμείνει σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία. Το δείγμα μεταφέρεται από το γουδί στο eppendorf με τη βοήθεια της σπάτουλας.

2.4 Απομόνωση RNA από φύλλα Nicotiana benthamiana

Για τη διαδικασία της απομόνωσης RNA από φύλλα *N. Benthamiana* τοποθετούνται, αρχικά, 100mg από το δείγμα σε νέα eppendorfs παγωμένα σε υγρό άζωτο. Προστίθενται 1ml Trizol για την καταστροφή των RNases και το δείγμα ομογενοποιείται με έντονη ανακίνηση. Επωάζεται για

5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φυγοκεντρείται στα 12.400xg για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα στερεά υπολείμματα του ιστού καθιζάνουν και το υπερκείμενο (1ml) μεταφέρεται σε νέο eppendorf, προστίθενται 200μl χλωροφόρμιου και ομογενοποιείται με έντονη ανακίνηση. Η πρόσθεση του χλωροφορμίου δημιουργεί δυο φάσεις στο υγρό, μια οργανική και μια υδάτινη. Στη συνέχεια επωάζεται για 5-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρείται στα 12.400xg για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η πάνω φάση (700μl) μεταφέρεται, προστίθενται 500μl ισοπροπανόλης, επωάζεται στους -80°C και φυγοκεντρείται στα 12.400xg για 10 λεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθενται 500μl 75% αιθανόλης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12.400xg για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και τοποθετείται στον αέρα για 5 λεπτά μέχρι τη πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης. Τέλος, προστίθενται 40μl καθαρό και απιονισμένο νερό για τη επαναδιάλυση του ιζήματος.

Σύσταση Trizol: 38% Ουδέτερη φαινόλη με pH=7,0 38 %, 0.8Μ Θειοκυανική γουανιδίνη, 0.4Μ Θειοκυανικό αμμώνιο, 0.1Μ Οξικό Νάτριο pH=5,0 και 5% Γλυκερόλη.

2.5 Αποικοδόμηση υπολειμμάτων DNA μετά από απομόνωση RNA

Για την αντίδραση αυτή, σε τελικό όγκο 100μl, χρησιμοποιείται το ένζυμο DNasel από την εταιρία NEB και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Τα συστατικά που χρειάζονται για την αντίδραση παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.

Συστατικό	Αντίδραση 100μΙ	Τελική Συγκέντρωση
Buffer DNasel (stock 10x NEB)	10µl	1x
Ένζυμο DNase (stock 2 units/μl NEB)	3μΙ	6 units
Δείγμα	ποικίλει	
Καθαρό και απιονισμένο νερό	μέχρι τα 100μΙ	

Πίνακας 2.1: Συστατικά για την αντίδραση καταστροφής υπολοιμάτων DNA μετά από απομόνωση RNA.

Γίνεται επώαση στους 37°C για 30 λεπτά και στη συνέχεια προσθήκη 1μl 5mM EDTA (stock 0.5M), με σκοπό την διακοπή της δράσης του ενζύμου DNase. Τέλος, θερμαίνεται το δείγμα στους 75°C για 10 λεπτά.

2.6 Αντίδραση Αντίστροφης Μεταγραφής

Για την πραγματοποίηση αντίδρασης με τελικό όγκο τα 20 μl, χρησιμοποιείται το ένζυμο SuperScript™ II RT από την εταιρία Invitrogen και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Τα συστατικά που χρειάζονται για την αντίδραση παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.

Συστατικό	Αντίδραση 20μΙ	Τελική Συγκέντρωση
Oligo(dT) (stock 500 μg/ml)	1µl	41,7 μg/ml
dNTPs (stock 10mM)	1µl	0,2mM
Δείγμα	Ποικίλει	
Καθαρό και απιονισμένο νερό	Μέχρι τα 12μΙ	

Πίνακας 2.2: Συστατικά για την αντίδραση Αντίστροφης Μεταγραφής.

Το δείγμα θερμαίνεται στους 65°C για 5 λεπτά, με σκοπό το άνοιγμα της δευτεροταγούς δομής του RNA, και στη συνέχεια επωάζεται για 2 λεπτά στο πάγο, για τη διατήρηση της ανοικτής δομής. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση και προσθήκη των υπόλοιπων συστατικών.

Συστατικό	Αντίδραση 20μΙ	Τελική Συγκέντρωση
5x First- Strand Buffer (stock 5x Invitrogen)	4µl	1x
DTT (stock 0,1M Invitrogen)	2μΙ	
Καθαρό και απιονισμένο νερό	1µl	

Πίνακας 2.3: Συνέχεια Πίνακα 2.2.

Το δείγμα επωάζεται στους 42°C για 2 λεπτά. Προστίθεται 1μΙ από το ένζυμο SuperScript[™] ΙΙ RT (stock 200units/μl Invitrogen) και αναμιγνύεται προσεκτικά. Αρχικά, επωάζεται στους 42°C για 50 λεπτά και τέλος στους 70°C για 15 λεπτά για απενεργοποίηση του ενζύμου, ώστε να χάσει την ενεργότητά του.

2.7 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Για την πραγματοποίηση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Taq DNA Polymerase της Minotech και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή.

Τα συστατικά της αντίδρασης καθώς και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφονται στους Πίνακες 2.4 και 2.5, αντίστοιχα.

Συστατικό	Αντίδραση 25μΙ	Τελική Συγκέντρωση
Καθαρό και απιονισμένο νερό	μέχρι τα 25μΙ	
Phusion HF Buffer (stock 10X NEB)	2,5µl	1x
dNTPs (stock 10mM)	0,5µl	200μΜ
Κατάλληλος Εκκινητής (stock 10μΜ)	0,5µl	0,5μΜ
Δείγμα	ποικίλει	≤ 500ng
Ένζυμο Phusion DNA Polymerase (stock 5 units/μl NEB)	0,2µl	1 units

Πίνακας 2.4: Συστατικά για την αντίδραση Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	94	2 λεπτά
Αποδιάταξη	94	45 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός	45-68	30 δευτερόλεπτα
Επιμήκυνση	72	1 λεπτό / kb
Τελική Επιμήκυνση	72	10 λεπτά
Αναμονή	12	

Πίνακας 2.5: Πρωτόκολλο για την αντίδραση. Τα στάδια Αποδιάταξη, Υβριδισμός και Επιμήκυνση επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους.

2.8 Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (qPCR)

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης αυτής ακολουθούνται οι οδηγίες για το πρωτόκολλο KA-PASYBRFASTQ PCRMasterMix (2x) Kit που δίνονται από το κατασκευαστή (KAPABIOSYSTEMS). Η αντίδραση διεξάγονταν στο μηχάνημα CFX ConnectTM Real-Time PCR (BioRad) ενώ η ανάλυση έγινε σύμφωνα με (Pfaffl M., 2001), (Pfaffl, Horgan, & Dempfle, 2002).

Τα συστατικά της αντίδρασης καθώς και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφονται στον Πίνακα 2.6 και Πίνακα 2.7.

Συστατικό	Αντίδραση 10μΙ	Τελική Συγκέντρωση
Καθαρό και απιονισμένο νερό	μέχρι τα 10μΙ	
KAPA SYBR FAST Qpcr Master Mix (2x)	5µl	1x
Universal		
Κατάλληλος Εκκινητής (stock 10μΜ)	0,2µl	200nM
Δείγμα	ποικίλει	≤ 20ng

Πίνακας 2.6: Συστατικά για την αντίδραση Ποσοτικής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης

Στάδιο	Θερμοκρασία (ºC)	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	94	2 λεπτά
Αποδιάταξη	94	15 δευτερόλεπτα
Υβριδισμός, Επιμήκυνση και διάβασμα φθορισμού	60	≥20 δευτερόλεπτα
Αναμονή	12	

Πίνακας 2.7: Πρωτόκολλο για την αντίδραση. Τα στάδια Αποδιάταξη, Υβριδισμός και Επιμήκυνση επαναλαμβάνονται για 35 κύκλους.

2.9 Συνεστιακή Μικροσκοπία

Για την συνεστιακή μικροσκοπία, τομές φύλλων, στα οποία είχε γίνει αγροεμποτισμός για την έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων, τοποθετηθήκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες και ο φθορισμός μελετήθηκε στο μικροσκόπιο Leica SP8. Για τη διέγερση της YFP και της mCHERRY χρησιμοποιήθηκε μήκος κύματος 514 και 561nm, αντίστοιχα. Η εκπομπή της YFP καταγράφηκε στα 520-560nm και της mCHERRY 600-650nm.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Συνέκφραση πρωτεϊνών BnRPR1 και BnRPR2

Αρχικά, σε φυτά N. benthamiana, τόσο αγρίου τύπου όσο και στα κατεσταλμένα ως προς την DCL2 (dcl2), την DCL4 (dcl4) και συγκαταστολή των DCL2 κα DCL4 (dcl2/4), έγινε συνέκφραση των BnRPR1 (BnRPR1: YFP) και του BnRPR2(BnRPR2: mCHERRY) με αγροεμποτισμό. Παράλληλα, στο ίδιο φύλλο σε άλλα σημεία του, έγινε εμποτισμός του τελεστή XopQ του παθογόνου βακτηρίου Xanthomonas euvesicatoria και της GFP. Το πρώτο χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί HR όταν εκφράζεται μόνο του, και το δεύτερο ως αρνητικό, μιας και δεν προκαλεί HR όταν εκφράζεται. Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν σε χρονικό διάστημα έξι ημερών και θεωρήθηκαν ως επιτυχή μόνο όταν ο θετικός και αρνητικός μάρτυρας είχαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Τα πειράματα για την καταγραφή της αντίδρασης υπερευαισθησίας πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές.



Εικόνα 3.1: : Αποτελέσματα εμποτισμού αγροβακτηρίων σε φυτό *N. benthamiana* αγρίου τύπου, dcl2, dcl4 και dcl2/4 μετά από πέντε ημέρες. Η συνέκφραση BnRPR1:YFP και BnRPR2:mCHERRY οδηγεί σε αντίδραση υπερευαισθησίας στα φυτά αγρίου τύπου, dcl2, dcl4, καθώς και η έκφραση του XopQ. Η έκφραση του GFP δεν οδηγεί σε αντίδραση υπερευαισθησίας. Στα φυτά dcl2/4 δεν παρατηρούμε αντίδραση υπερευαισθησίας σε κανένα από τα σημεία που πραγματοποιήθηκε εμποτισμός, παρα μόνο χλώρωση.

3.2 Ενδοκυττάριος Εντοπισμός των γονιδίων BnRPR1 και BnRPR2

Για να μελετηθεί αν αλλάζει ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των πρωτεϊνών BnRPR1 και BnRPR2 στις διαγονιδιακές σειρές σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου, τα υπό μελέτη γονίδια σημασμένα με τον κατάλληλο φθοροφόρο επίτοπο, εκφράστηκαν με αγροεμποτισμό στις παραπάνω σειρές. Δύο μέρες μετά την έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων πραγματοποιήθηκε συνεστιακή μικροσκοπία σε τομές φύλλων. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε τρεις φορές, έτσι ώστε να ελεγχθεί η επαναληψημότητα του αποτελέσματος. Η πρωτεΐνη BnRPR1 είναι ενωμένη με τον επίτοπο YFP (φαίνεται κίτρινο) και η πρωτεΐνη BnRPR2 με τον επίτοπο mCHERRY (φαίνεται κόκκινο). Στα φυτά αγρίου τύπου παρατηρήθηκε ότι όταν συνεκφράζονται τα δυο γονίδια, οι δύο πρωτεΐνες εντοπίζονται μαζί σε συγκεκριμένα σημεία στον πυρήνα, όπως έχει δειχθεί και σε προηγούμενα πειράματα (Αμαρτωλού Α., 2019, πτυχιακή εργασία). Όσον αφορά στα φυτά, τα οποία είναι κατεσταλμένα ως προς τα γονίδια *DCL2* και *DCL4* φυτά, και εκεί παρατηρήθηκε ότι τα δυο γονίδια όταν συνεκφράζονται εντοπίζονται συγκεντρωμένα σε περιοχές του πυρήνα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.2.



Εικόνα 3.2: Αποτελέσματα συνεστιακής μικροσκοπίας. Παρατηρήθηκαν φύλλα του φυτού *N. benthamiana* αγρίου τύπου και των διαγονιδιακών σειρών *dcl2, dcl4* και *dcl2/4* 48 ώρες μετά την συνέκφραση των *BnRPR1:YFP* και *BnRPR2:mCHERRY*. Και στα τέσσερα φυτά όταν συνεκφράζονται οι πρωτεΐνες BnRPR1overlap:YFP και BnRPR2:mCHERRY, εντοπίζονται στον πυρήνα.

Στα φυτά αγρίου τύπου παρατηρούμε τον αναμενόμενο φαινότυπο και στα 155 κύτταρα που παρατηρήθηκαν (155/155). Στα φυτά dcl4 παρατηρούμε μόνο φαινότυπο πανομοιότυπο με αυτόν στα φυτά αγρίου τύπου και στα 255 κύτταρα που παρατηρήθηκαν (255/255).



Εικόνα 3.3: Αποτελέσματα συνεστιακής μικροσκοπίας. Παρατηρήθηκαν φύλλα του φυτού *N. benthamiana* αγρίου τύπου και *dcl4* ύστερα από 48 ώρες. Στα φυτά αγρίου τύπου παρατηρούμε τον αναμενόμενο φαινότυπο μόνο. Στα φυτά dcl4 παρατηρούμε μόνο φαινότυπο πανομοιότυπο με αυτόν στα φυτά αγρίου τύπου.

Στα φυτά dcl2 παρατηρήθηκαν τρεις διαφορετικοί φαινότυποι, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3. Στον πρώτο φαινότυπο η πρωτεΐνη BnRPR1:YFP εντοπίζεται σε όλο το πυρήνα σε 234 κύτταρα από τα 263 που παρατηρήθηκαν (234/263), σε αντίθεση με τον δεύτερο φαινότυπο, στον οποίο η πρωτεΐνη εντοπίζεται εστιασμένη σε συγκεκριμένο σημείο του πυρήνα, πιθανώς στον πυρηνίσκο, σε 13 από τα 263 κύτταρα (13/263). Στον τρίτο φαινότυπο η πρωτεΐνη εντοπίζεται εστιασμένη σε διάφορα συσσωματώματα στον πυρήνα σε 16 από τα 263 κύτταρα (16/263).

Στα φυτά dcl2/4, από την συνεστιακή μικροσκοπία, παρατηρήθηκαν δύο διαφορετικοί φαινότυποι (Εικόνα 3.4). Στον πρώτο φαινότυπο η πρωτεΐνη BnRPR1:YFP εντοπίζεται σε όλο τον πυρήνα σε 363 από τα 366 κύτταρα (363/366), σε αντίθεση με τον δεύτερο φαινότυπο, στον οποίο η πρωτεΐνη εντοπίζεται εστιασμένη σε διάφορα συσσωματώματα στον πυρήνα σε 3 από τα 366 κύτταρα. (3/366). Είναι φανερό, ότι στην πλειοψηφία τους, οι πρωτεΐνες BnRPR1:YFP είναι διάχυτες σε ολόκληρο τον πυρήνα, ενώ μικρό ποσοστό εστιασμένες σε συσσωματώματα.



Εικόνα 3.4: Αποτελέσματα συνεστιακής μικροσκοπίας. Παρατηρήθηκαν φύλλα του φυτού *N. benthamiana dcl2* ύστερα από 48 ώρες. Στα φυτά *dcl2* παρατηρήθηκαν 3 διαφορετικοί φαινότυποι. Στον πρώτο φαινότυπο η πρωτείνη *BnRPR1:YFP* δεν είναι εστιασμένη σε ένα σημείο του πυρήνα, σε αντίθεση με τον δεύτερο, στον οποίο η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι εστιασμένη σε συγκεκριμένο σημείο του πυρήνα. Τέλος, στον τρίτο φαινότυπο η πρωτεΐνη εντοπίζεται σε συσσωματώματα στον πυρήνα.



Εικόνα 3.5: Αποτελέσματα συνεστιακής μικροσκοπίας. Παρατηρήθηκαν φύλλα του φυτού *N. benthamiana dcl2/4* ύστερα από 48 ώρες. Στα φυτά *dcl2/4* παρατηρήθηκαν 2 διαφορετικοί φαινότυποι. Το μοτίβο του πρώτου μοιάζει αρκετά με αυτό του αγρίου τύπου, αλλά σε χαμηλότερη ένταση. Στο δεύτερο φαινότυπο η πρωτεΐνη *BnRPR1:YFP* εντοπίζεται σε συσσωματώματα στον πυρήνα.

3.3 Ποσοτικοποίηση έκφρασης των γονιδίων BnRPR1 και BnRPR2

Για να μελετήσουμε αν η διαφορά που παρατηρούμε στην αντίδραση υπερευαισθησίας στα φυτά dcl2/4 οφείλεται στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BnRPR1* και *BnRPR2* πραγματοποιήθηκε η μέθοδος qPCR. Για τη πραγματοποίηση αυτού του πειράματος, σε τέσσερα φυτά από κάθε σειρά, πραγματοποιήθηκε συνέκφραση των υπό μελέτη γονιδίων. Ο ιστός αυτός χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή cDNA. Ως γονίδια αναφοράς επιλέχθηκαν το *PP2A*(Protein phosphatase 2) και η ουμπικιτίνη (*Ubi*) των οποίων τα επίπεδα παραμένουν σταθερά στις διαφορετικές σειρές, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση με το πρόγραμμα RefFinder (Xie, Xiao, & Chen, 2012). Η ακριβής ποσοτικοποίηση ενός πραγματικού γονιδίου αναφοράς επιτρέπει την ομαλοποίηση των διαφορών στην ποσότητα του ενισχυόμενου RNA ή του cDNA σε μεμονωμένα δείγματα που δημιουργούνται από: (i) διαφορετικές ποσότητες αρχικού υλικού, (ii) την ποιότητα του αρχικού υλικού και (iii) διαφορές στην παρασκευή RNA και στη σύνθεση cDNA, καθώς το γονίδιο αναφοράς εκτίθεται στα ίδια στάδια παρασκευής με το γονίδιο που μας ενδιαφέρει (Radonic, et al., 2004). Τα γονίδια αυτά ελέγχθηκαν αν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις συνθήκες που πραγματοποιούνται τα πειράματα.

Ως γονίδια στόχος χρησιμοποιήθηκαν τα *BnRPR1* και *BnRPR2*. Ως κατάσταση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το φυτό αγρίου τύπου.

Από τα αποτελέσματα της qPCR παρατηρούμε ότι τα υπό μελέτη γονίδια εκφράζονται σε όλες τις σειρές σε σχετικά χαμηλά επίπεδα (μία τάξη μεγέθους μικρότερη από τα γονίδια αναφοράς), δεδομένου ότι και τα δύο έχουν ένα ισχυρό υποκινητή (35S CaMV). Σε όλες τις σειρές εκφράζονται σε παραπλήσια επίπεδα ενώ υπάρχει μεγάλη τυπική απόκλιση στις τιμές.



	dcl2	dcl4	dcl2/4
BnRPR2	-0,598	-0,383	-0,104
BnRPR1	0,322	0,457	0,684

Εικόνα 3.6: Συνολικά αποτελέσματα Ποσοτικής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης για τα γονίδια *ubi, PP2A, BnRPR1* και *BnRPR2* για τα ανοσατασταλμένα φυτά σε σχέση με τα φυτά αγρίου τύπου.

Φυτό Γονίδιο	wt	dcl2	dcl4	dcl2/4
Ubi	23,735	22,753	21,993	22,550
PP2A	25,688	24,785	23,958	24,308
BnRPR1	27,743	27,520	27,358	27,395
BnRPR2	30,838	30,535	29,513	29,670

Είκονα 3.7: Μέσος όρος κύκλων για τα γονίδια *Ubi, PP2A, BnRPR1* και *BnRPR2* στις σειρές φυτών αγρίου τύπου, dcl2, dcl4 και dcl2/4.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου που διαδραματίζει η RNA σίγηση στην επαγώμενη από το ζεύγος των γονιδίων ανθεκτικότητας BnRPR1/BnRPR2 αντίδραση υπερευασθησίας.

Από προηγούμενα πειράματα, τα οποία πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών και Μικροβιολογίας (Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης), έχει αποδειχθεί ότι η υπερέκφραση του ζεύγους αυτού γονιδίων, σε φύλλα *Ν. benthamiana* και *Ν. tabaccum*, πυροδοτεί την εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας, χωρις την παρουσία κάποιου τελεστή.

Από τα πειράματα αγροεμποτισμού που πραγματοποιήθηκαν σε φυτά *N. benthamiana* παρατηρούμε την εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας χωρίς την παρουσία κάποιου τελεστή, στα φυτά αγρίου τύπου και στις διαγονιδιακές σειρές *dcl2* και *dcl4*.Στη διαγονιδιακή σειρά *dcl2*, η αντίδραση υπερευαισθησίας είναι περιορισμένη σε έκταση σε σχέση με αυτήν που παρατηρούμε στα φυτά αγρίου τύπου και *dcl4*. Στη διαγονιδιακή σειρά *dcl2/4* δεν παρατηρούμε την εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας, αλλά μια χλώρωση. Αυτή η αντίδραση είναι πιθανότατα αποτέλεσμα της επιρροής του αγροβακτηρίου και μόνον. Μάλιστα, στη συγκεκριμένη σειρά δεν εκδηλώθηκε HR ούτε στο σημείο, στο οποίο έγινε υπερέκφραση του τελεστή ΧορQ. Άρα στα φυτά αυτά, λόγω της συν καταστολής και των γονιδίων *DCL2* και *DCL4*, κάποιο ή κάποια από τα συστατικά , τα οποία συμμετέχουν στο μονοπάτι που οδηγεί στην αντίδραση υπερευαισθησίας απορυθμίζεται ή η αλυσίδα των σημάτων που οδηγεί στην HR έχει διακοπεί.

Από τη συνεστιακή μικροσκοπία παρατηρήθηκε ότι όταν το γονίδιο *BnRPR1* συνεκφράζεται με το γονίδιο *BnRPR2*, τότε οι πρωτεΐνες εντοπίζονται σε συγκεκριμένα σημεία του πυρήνα και στις τέσσερις σειρές φυτών. Τα σημεία αυτά μπορεί να είναι πυρηνικά σωματίδια. Σε αυτά περιλαμ-βάνονται τα σωμάτια Cajal, τα πολυμορφικά ενδοφασικά καρυοσωμικά συσσωματώματα (PIKA), τα συσσωματώματα ματίσματος, τα ινίδια περιχρωματίνης και τα κλαστοσώματα. Στις σειρές *dcl2* παρατηρούμε τρεις διαφορετικούς φαινοτύπους ως προς την έκφραση της πρωτεΐνης BnRPR1. Στον πρώτο, η πρωτεΐνη δεν είναι εστιασμένη σε ένα σημείο του πυρήνα, όπως και στα φυτά του αγρίου τύπου, στον δεύτερο είναι εστιασμένη σε συγκεκριμένο σημείο και στον τρίτο η πρωτεΐνη εντοπίζεται σε συσσωματώματα στον πυρήνα. Στην σειρά *dcl2/4* παρατηρούμε δύο διαφορετικούς φαινοτύπους βαινοτύπους BnRPR1. Το μοτίβο του πρώτου μοιάζει με αυτό του αγρίου τύπου. Στο δεύτερο φαινότυπο η πρωτεΐνη BnRPR1. ΥFP εντοπίζεται σε συσσωματώματα.

Όσον αφορά την ποσοτικοποίηση της έκφρασης, από την μέθοδο qPCR, παρατηρούμε ότι, αν και τα γονίδια *BnRPR1* και *BnRPR2* εκφράζονται κάτω από τον υποκινητή 35S CaMV, η έκφρασή τους είναι χαμηλή. Από αυτό μπορούμε να υποθέσουμε ότι στην έκφραση των γονιδίων πιθανόν να συμμετέχει η σίγηση.

Και στις τέσσερις σειρές φυτών δεν παρατηρούμε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων. Από αυτό το αποτέλεσμα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι πρωτεΐνες DCL2 και DCL4 δεν παίζουν ρόλο στη ρύθμισή των επιπέδων. Η πρωτεΐνη DCL που πιθανόν να συμμετέχει στη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης μπορεί να είναι η DCL1, η οποία είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση του nat-siRNAATGB2.

Σε μελλοντικά πειράματα, για να δούμε ποιος είναι ο ρόλος της RNA σίγησης στην επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας, θα μπορούσε να γίνει βαθιά αλληλούχιση (deep sequencing) σε φυτά αγρίου τύπου και σε φυτά dc/2/4, ώστε να βρεθούν γονίδια που να διαφοροποιούνται στους δύο γενοτύπους και να εμπλέκονται στην επαγωγή της άμυνας.

Επιπλέον, στο εργαστήριο έχουν δημιουργηθεί διαγονιδιακά φυτά *A. thaliana*, τα οποία εκφράζουν στο γονιδίωμα τους τον γενετικό τόπο των γονιδίων *BnRPR1* και *BnRPR2*. Σε αυτά τα φυτά θα μπορούσαμε να δούμε αν εκφράζονται siRNA. Με αυτό τον τρόπο θα μπορέσουμε να διαπιστώσουμε αν ο μηχανισμός της RNA σίγησης συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης των δύο αυτών γονιδίων.

Τέλος, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στην παραγωγή natsiRNA από την γονιδιακή θέση *BnRPR*, με την διασταύρωση των παραπάνω διαγονιδιακών φυτών *Arabidopsis thaliana* με φυτά, τα οποία είναι μεταλλαγμένα ως προς την RNA σίγηση.

5. Παράρτημα

5.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Για την πραγματοποίηση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο TaqDNAPolymerase της Minotech και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.

5.2 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Αρχικά, το δείγμα DNA αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη συνέχεια, προσεκτικά αποκόπτεται η επιθυμητή ζώνη. Για την απομόνωση του PCR προϊόντος ακολουθούνται οι οδηγίες που δίνονται από το κατασκευαστή (MACHEREY- NAGELNucleoSpinGelandPCRClean-up).

5.3 Καθαρισμός προϊόντος Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Για τον καθαρισμό του PCR προϊόντος ακολουθούνται οι οδηγίες που δίνονται από το κατασκευαστή (MACHEREY- NAGEL NucleoSpinGel and PCR Clean-up).

5.4 Ligation

Για την πραγματοποίηση αντίδρασης με τελικό όγκο τα 20μl, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο T4 DNA ligase της εταιρίας NEB και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Τα συστατικά καθώς και οι συγκεντρώσεις τους που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον Πίνακα 2.4.

Συστατικό	Αντίδραση 20μΙ	Τελική Συγκέντρωση
T4 DNA ligase Buffer (stock 10x NEB)	2μΙ	1x
Φορέας	ποικίλει	50ng
Δείγμα	ποικίλει	
Ένζυμο T4 DNA ligase (stock 400 units/μl NEB)	1µl	400 units
Καθαρό και απιονισμένο νερό	μέχριτα20μΙ	

Πίνακας 5.1: Συστατικά για την αντίδραση Ligation

Έγινε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (24°C) για 2 ώρες.

5.5 Μετασχηματισμός κυττάρων *Ε. coli*

Για τη πραγματοποίηση του μετασχηματισμού των κυττάρων αρχικά τοποθετούνται 100μl δεκτικών για μετασχηματισμό κυττάρων (competent cells) από τους -80°C σε πάγο, μέχρι να ξεπαγώσει. Στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλη ποσότητα πλασμιδίου ή προϊόν λιγοποίησης που θέλουμε να εισάγουμε στα κύτταρα. Τα κύτταρα επωάζονται για 30 λεπτά στον πάγο, στη συνέχεια για 90 δευτερόλεπτα στους 42°C και τέλος στον πάγο για άλλα 2λεπτά. Έπειτα προστίθεται ποσότητα LB έως το 1ml. Ακολουθεί ανακίνηση στους 37°C για 1-1,5 ώρες, φυγοκέντρηση για δύο λεπτά στα 2000xg, απόρριψη 900μl, επαναδιάλυση του ιζήματος και επίστρωσή του σε τρυβλίο με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Τα βακτήρια επωάζονται για 16 ώρες στους 37°C.

5.6 Πλασμιδιακές κατασκευές

Για την κατασκευή της εκάστοτε πλασμιδιακής κατασκευής χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pBluescript II SK(-) GG-TA cloning και το επιθυμητό γονίδιο που κλωνοποιήθηκε. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων *E.coli*, στελέχους DH10b. Οι χάρτες των πλασμιδίων παρουσιάζονται παρακάτω καθώς και διαγνωστικές πέψεις που αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2%.

5.7 Απομόνωση πλασμιδίου με τη χρήση Αλκαλικής λύσης

Για την απομόνωση πλασμιδίου με τη χρήση αλκαλικής λύσης γίνεται επώαση καλλιέργειας βακτηρίων *E. coli* 5-10ml στους 37°C για 16 ώρες με ανακίνηση 200-250rpm. Ο σωλήνας περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό και μια μοναδιαία αποικία βακτηρίου. Την επόμενη μέρα σε eppendorf 1,5ml προστίθεται αντίστοιχος όγκος καλλιέργειας και έπειτα γίνεται φυγοκέντρηση στα 11000xg για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκείμενου, διατήρηση του ιζήματος και επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας. Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 100μl παγωμένου Διαλύματος 1 (50mM γλυκόζη, 10mMEDTA, 25mMTris, pH 8,0) με έντονη ανακίνηση. Προστίθεται 200μl 0,2N NaOH και 1% SDS σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια 150μl παγωμένου Διαλύματος 3 (3ΜΚΟΑς, pH 6,0). Ακολουθεί απαλή ανακίνηση και επώαση για 3-5 λεπτά στο πάγο. Το μείγμα φυγοκεντρείται στα 12600xg για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ανακτάται το υπερκείμενο σε ένα νέο σωλήνα eppendorf. Ακολουθεί προσθήκη διπλάσιου όγκου 100% αιθανόλης για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA, φυγοκέντρηση στα 12600xg για 15-20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του υπερκείμενου. Η πελλέτα είναι το πλασμιδιακόDNA. Επόμενο βήμα είναι το ξέπλυμα του ιζήματος σε 500μl 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση στα 12600xg για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και διατηρείται το ίζημα. Τέλος το δείγμα στεγνώνεται στον αέρα για 5 λεπτά, μέχρι τη πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης, και προστίθενται 30μl καθαρό και απιονισμένο νερό για τη διάλυση του ιζήματος.

5.8 Διαγνωστική Πέψη Με Τη Χρήση Περιοριστικών Ενζύμων

Προκειμένου να ελεγχθούν τα πλασμίδια, που απομονώθηκαν από τα μετασχηματισμένα βακτήρια, πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις με τη χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων. Για αντίδραση περιοριστικής πέψης σε 20μl, χρησιμοποιείται το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο από την εταιρία Minotech και ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή.

Για την αντίδραση χρειάζονται τα συστατικά που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.9.

Συστατικό	Αντίδραση 20μΙ	Τελική Συγκέντρωση
Κατάλληλο για το ένζυμο Buffer (stock	2µl	1x
10xMinotech)		
RNaseA (stock 10 mg/ml)	0,2µl	0,2 μg/ml
Δείγμα	Ποικίλει	
Ένζυμο (stock 10 units/ml Minotech)	1μΙ	units
Καθαρό και απιονισμένο νερό	μέχρι τα 20μΙ	

Πίνακας 5.2: Συστατικά για την αντίδραση Διαγνωστικής Πέψης.

Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 2 ώρες στο υδατόλουτρο.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	Τ για Taq Pol. (°C)	T για qPCR (°C)
N.Act-Fw	5' GGAGATGATGCTCCAAGAGC 3'	56	
N.Act-Rev	5' CGATTAGCCTTTGGGTTAAGAGG 3'	56	
UBI-Fw	5' GCCGATTACAACATCCAGAAGG 3'	58	60
UBI-Rev	5'AGAGCGAGCTTAACC 3'	58	60
PP2A-Fw	5' GACCCTGATGTTGATGTTCGCT 3'	56	58
PP2A-Rev	5' GAGGGATTAAGAGAGATTTC 3'	56	58
BnPR1-Fw-2	5' TTTGGTCTCAGTCATTGGTGTCGGAGCTG 3'	57	60
BnPR1-Rev-2	5' TTTGGTCTCACTCATCAATGAGcCCATAGATTCCTA 3'	57	60
BnPR2-Fw-1	5' TTTGGTCTCAAATGATGGCTGCCGCATCTTCC 3'	57	60
BnPR2-Rev-1	5' TTTGGTCTCACCGAGGgCTCAACCAAATATAAACC 3'	57	60

Πίνακας 5.1: Αλληλουχίες εκκινητών.



Εικόνα 5.1: Χάρτης πλασμιδίου pBluescript::PP2A



Εικόνα 5.2: Αποτελέσματα διαγνωστικής πέψης για το πλασμίδιο pBluescript::PP2A σε πήκτωμα Αγαρόζης 1,2 % και τα αναμενόμενα μεγέθη τους με βάση τους πλασμιδιακούς χάρτες.



Εικόνα 5.3: Χάρτης πλασμιδίου pBluescript::UBI



Εικόνα 5.4: Αποτελέσματα διαγνωστικής πέψης για το πλασμίδιο pBluescript::UBI σε πήκτωμα Αγαρόζης 1,2 % και τα αναμενόμενα μεγέθη τους με βάση τους πλασμιδιακούς χάρτες.



Εικόνα 5.5: Χάρτης πλασμιδίου pBluescript::BnRPR1-small



Εικόνα 5.6: Αποτελέσματα διαγνωστικής πέψης για το πλασμίδιο pBluescript::BnRPR1-small σε πήκτωμα Αγαρόζης 1,2 % και τα αναμενόμενα μεγέθη τους με βάση τους πλασμιδιακούς χάρτες.



Εικόνα 5.7: Χάρτης πλασμιδίου pBluescript::BnRPR2





Σαν κατάσταση Ι αναφέρονται τα φυτά dcl2, ως κατάσταση ΙΙ τα φυτά dcl4 και ως κατάσταση ΙΙΙ τα φυτά dcl2/4. Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνες 3.10-3.13) φαίνονται τα αποτελέσματα για τα

γονίδια αναφοράς και στόχου για κάθε συνθήκη, όσον αφορά τον κύκλο στον οποίο εμφανίζεται το κάθε γονίδιο.

CP input	[reference gene]	[reference gene]	[target gene 2]	[target gene 3]
Ref. Condition		▼ *	Г	Г
WT	ubi	pp2a	BnRPR2	BnRPR1
control 1	24,21	26,08	31,79	27,45
control 2	24,21	26,08	31,79	28,11
control 3	24,27	25,34	28,82	27,63
control 4	22,25	25,25	30,95	27,78

Είκονα 5.9: Αποτελέσματα Ποσοτικής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης για τα γονίδια *ubi, PP2A, BnRPR1* και *BnRPR2*, για τα φυτά αγρίου τύπου.

CP input	[reference gene] [reference gene]		[target gene 2]	[target gene 3]
Condition I	ubi	pp2a	BnRPR2	BnRPR1
dcl2				
sample 1	23,12	24,08	29,52	26,99
sample 2	23,14	25,09	31,71	28,08
sample 3	22,62	24,59	29,41	26,81
sample 4	22,13	25,38	31,5	28,2

Είκονα 5.10: Αποτελέσματα Ποσοτικής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης για τα γονίδια *ubi, PP2A, BnRPR1* και *BnRPR2,* για τα φυτά dcl2.

CP input	[reference gene	[reference gene]	[target gene 2]	[target gene 3]
Condition II	ubi	pp2a	BnRPR2	BnRPR1
dcl4		•		
sample 1	22,52	23,98	29,51	27,70
sample 2	22,11	24,17	29,47	27,50
sample 3	22,79	24,27	29,74	27,56
sample 4	20,55	23,41	29,33	26,67

Είκονα 5.11: Αποτελέσματα Ποσοτικής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης για τα γονίδια *ubi, PP2A, BnRPR1* και *BnRPR2*, για τα φυτά dcl4.

CP input	[reference gene]	[reference gene]	[target gene 2]	[target gene 3]
Condition III	ubi	pp2a	BnRPR2	BnRPR1
dcl2/4				
sample 1	23,60	24,53	29,55	27,35
sample 2	23,00	24,33	29,51	27,57
sample 3	22,46	24,11	29,66	27,59
sample 4	21,14	24,26	29,96	27,07

Είκονα 5.12: Αποτελέσματα Ποσοτικής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης για τα γονίδια *ubi, PP2A, BnRPR1* και *BnRPR2*, για τα φυτά dcl2/4.

Βιβλιογραφία

- Adachi, H., Derevnina, L., & Kamoun, S. (2019, May). NLR singletons, pairs, and networks: evolution, assembly, and regulation of the intracellular immunoreceptor circuitry of plants. *Current Opinion in Plant Biology*, σσ. 121-131.
- Agrios G. (2005). Plant Pathology. Academic Press.
- Baggs, E., Dagdas, G., & Krasileva, K. (2017, May). NLR diversity, helpers and integrated domains: making sense of the NLR IDentity. *Current Option in Plant Biology, 38*, σσ. 59-67.
- Bernstein, E., Caudy, A., Hammond, S., & Hannon, G. (2001, January). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *NATURE*, *409*(6818), σσ. 363–366.
- Betsuyaku, S., Katou, S., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Nomura, N., & Fukuda, H. (2018, January). Salicylic Acid and Jasmonic Acid Pathways are Activated in Spatially Different Domains Around the Infection Site During Effector-Triggered Immunity in Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, *59*(2), σσ. 439–439.
- Bigeard, J. (2015, April). Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). *Molecular Plant, 8*(4), σσ. 521-539.
- Boccara, M., Sarazin, A., Thie´beauld, O., Jay, F., Voinnet, O., Navarro, L., & Colot, V. (2015, April). The Arabidopsis miR472-RDR6 Silencing Pathway Modulates PAMP- and Effector-Triggered Immunity through the Post-transcriptional Control of Disease Resistance Genes. *PLOS Pathogens, 10*(1).
- Borrelli, G., Mazzucotelli, E., Marone, D., Crosatti, C., Michelotti, V., Valè, G., & Mastrangelo,
 A. (2018, June). Regulation and Evolution of NLR Genes: A Close Interconnection for
 Plant Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), pp. 1662-1689.
- Brodersen, P., & Voinnet, O. (2006, May). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *TRENDS in Genetics*, 22(5), σσ. 268–280.
- Carbonell. (2019, May). Secondary Small Interfering RNA-Based Silencing Tools in Plants: An Update. *Frontiers in Plant Science*.
- Cesari, S. (2017). Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors. *New Phytologist*, 1, σσ. 17-24.
- Cesari, S., Bernoux, M., Moncuquet, P., Kroj, T., & Dodds, P. (2014, November). A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: the "integrated decoy" hypothesis. *Frontiers in Plant Science*, *5*.
- Césari, S., Kanzaki, H., Fujiwara, T., Bernoux, M., Chalvon, V., Kawano, c., . . . Kroj, T. (2014, July). The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. *The EMBO Journal*, *17*, pp. 1941-1959.
- Cui, H., Tsuda, K., & Parker, J. (2014, November). Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annual Review of Plant Biology, 66*(1), σσ. 487-511.

- Dadami, E., Boutla, A., Vrettos, N., Tzortzakaki, S., Karakasilioti, I., & Kalantidis, K. (2013, January). DICER-LIKE 4 But Not DICER-LIKE 2 May Have a Positive Effect on Potato Spindle Tuber Viroid Accumulation in Nicotiana benthamiana. *Molecular Plant, 6*(1), σσ. 232-234.
- Eamens, A., Wang, M.-B., Smith, N., & Waterhouse, P. (2008, June). RNA Silencing in Plants: Yesterday, Today, and Tomorrow. *Plant Physiology*, *147*(2), σσ. 456-468.
- Ellis, J., Catanzariti, A.-M., & Dodds, P. (2006, February). The problem of how fungal and oomycete avirulence proteins enter plant cells. *Trends in Plant Science*, *2*, oo. 61-63.
- Erwig, J. e. (2017, March). Chitin-induced and CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE1(CERK1) phosphorylation-dependent endocytosis of Arabidopsisthaliana LYSIN MOTIF-CONTAINING RECEPTOR-LIKEKINASE5 (LYK5). *New Phytologist*, 1, σσ. 382-396.
- Feng, F. (2012, August). Plant–bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4), σσ. 469-476.
- Gassmann, W. (2005, Octomber). Natural variation in the Arabidopsis response to the avirulence gene hopPsyA uncouples the hypersensitive response from disease resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions, 18*(10), σσ. 1054–1060.
- Ghildiyal, M., & Zamore, P. (2009, August). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics*, 10(2), σσ. 94–108.
- Guo, e. (2016, December). RNA Silencing in Plants: Mechanisms, Technologies and Applications in Horticultural Crops. *Current Genomics*.
- Han, G.-Z. (2018, December). Origin and evolution of the plant immune system. *New Phytologist*, *222*(1), σσ. 70-83.
- Hohn, T., & Vazquez, F. (2011, June). RNA silencing pathways of plants: Silencing and its suppression by plant DNA viruses. *Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(11-12), σσ. 588–600.
- Huang, C.-Y., Wang, H., Hu, P., Hamby, R., & Jin, H. (2019, August). Small RNAs Big Players in Plant-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe*, *26*(2), σσ. 173–182.
- Hutvagner, G., & Simard, M. (2008, January). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature*, *9*(1), σσ. 22-32.
- Jones, J. D. (2006, November 16). The plant immune system. Nature.
- Jones, J., & Dangl, J. (2006, November 16). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), σσ. 323-329.
- Jones, J., Vance, R., & Dangl, J. (2016, December 2). Intracellular innate immune immune surveillance devices in plants and animals. *Science*, *354*(6316), σσ. 1117-1126.
- Kadota, Y., Shirasu, K., & Guerois, R. (2010, April). NLR sensors meet at the SGT1–HSP90 crossroad. *Trends in Biochemical Sciences*, *35*(4), σσ. 199-207.
- Kadota, Y., Shirasu, K., & Guerois, R. (2010, April). NLR sensors meet at the SGT1–HSP90 crossroad. *ScienceDirect*, *35*(4), σσ. 199-207.

- Kalantidis, K., Tsagris, M., & Tabler, M. (2005, November). Spontaneous short-range silencing of a GFP transgene in Nicotiana benthamiana is possibly mediated by small quantities of siRNA that do not trigger systemic silencing. *The Plant Journal, 45*(6), σσ. 1006-1016.
- Kapos, P., Devendrakumar, K., & Li, X. (2019). Plant NLRs: From discovery to application. *Plant Science*, *279*, σσ. 3-18.
- Katiyar-Agarwal, S., & Jin, H. (2013, August). Role of Small RNAs in Host-Microbe Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, *48*(1), σσ. 225–246.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, Jr, A., Zhu, J.-K., . . . Jin, H. (2006, Octomber). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity.
 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(47), σσ. 18002–18007.
- Katsarou, K., Mitta, E., Bardani, E., Oulas, A., Dadami, E., & Kalantidis, K. (2019). DCLsuppressed Nicotiana benthamiana plants: valuable tools in research and biotechnology. *Molecular Plant Pathology*, 20(3), pp. 432-446.
- Keener, A. (2016, February). Plant Immunity. TheScientist.
- Kos´cian´ska, E., Kalantidis, K., Wypijewski, K., Sadowski, J., & Tabler, M. (2005, July). Analysis of RNA silencing in agroinfiltrated leaves of Nicotiana benthamiana and Nicotiana tabacum. *Plant Molecular Biology*, *59*(4), σσ. 647–661.
- Li, F., Pignatta, D., Bendix, C., Brunkard, J., Cohn, M., Tung, J., . . . Baker, B. (2012, January). MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109*(5), σσ. 1790–1795.
- Li, X. (2015, February). NLRs in plants. Current Opinion in Immunology, 32, oo. 114-121.
- Li, X., Kapos, P., & Zhang, Y. (2015, February). NLRs in plants. *Current Opinion in Immunology,* 32, σσ. 114-121.
- Lii, Y. (2016, August). *Investigating the Roles of Small RNAs in Plant-Bacterial Interactions*. California.
- Liu, e. (2014, April). Endogenous Small RNA Clusters in Plants. *Genomics Proteomics Bioinformatics*.
- Liu, J., Cheng, X., Liu, D., Xu, W., Wise, R., & Shen, Q.-H. (2014, December). The miR9863 Family Regulates Distinct Mla Alleles in Barley to Attenuate NLR Receptor-Triggered Disease Resistance and Cell-Death Signaling. *Plos Genetics*, *10*(12).
- Liu, Q., Feng, Y., & Zhu, Z. (2009, February). Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Functional & Integrative Genomics*, 9(3), σσ. 277–286.
- Ma, Y., Guo, H., Hu, L., Martinez, P., Moschou, P., Cevik, V., . . . Jones, J. (2018, October). Distinct modes of derepression of an Arabidopsis immune receptor complex by two different bacterial effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(41), σσ. 10218-10227.

- MacFarlane, L.-A., & Murph, P. (2010, November). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, *11*(7), σσ. 537–561.
- Mallory, A., & Vaucheret, H. (2010, December). Form, Function, and Regulation of ARGONAUTE Proteins. *The Plant Cell*, 22(12), σσ. 3879–3889.
- Mallory, A., & Vaucheret, H. (2010, December). Form, Function, and Regulation of ARGONAUTE Proteins. *The Plant Cell*, 22(12), σσ. 3879-3889.
- Meng, X. e. (2013). MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annual Review of Phytopathology*, *51*(1), σσ. 245–266.
- Mermigka, G., Amprazi, M., Mentzelopoulou, A., Amartolou, A., & Sarris, P. (2020, January). Plant and Animal Innate Immunity Complexes:Fighting Different Enemies with Similar. *Trends in Plant Science*, *25*(1), σσ. 80-91.
- Mermigka, G., Verret, F., & Kalantidis, K. (2015, August). RNA silencing movement in plants. Journal of Integrative, 58(4), σσ. 328-342.
- Meyers, B., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., & Michelmore, R. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, *15*(4), σσ. 809-834.
- Mohr, T., Mammarella, N., Hoff, T., Woffenden, B., Jelesko, J., & McDowell, J. (2010, May). The Arabidopsis Downy Mildew Resistance Gene RPP8 Is Induced by Pathogens and Salicylic Acid and Is Regulated by W Box cis Elements. *Molecular Plant-Microbe Interactions, 23*(10), σσ. 1303–1315.
- Montesano M., B. G. (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. MOLECULAR PLANT PATHOLOGY.
- Muhammad, T., Zhang, F., Zhang, Y., & Liang, Y. (2019, January). RNA Interference: A Natural Immune System of Plants to Counteract Biotic Stressors. *Cells*, *8*(1), σσ. 38-66.
- MUTHAMILARASAN, M. (2013, February). Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences*, *2*, σσ. 433-449.
- Ning, Y. e., Liu, W., & Wang, G.-L. (2017, October). Balancing Immunity and Yield in Crop Plants. *Trends in Plant Science*, 22(12), σσ. 1069–1079.
- Nürnberger T, B. F. (2002, August). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Current Opinion in Plant Biology*.
- O'Brien, e. (2018, August). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*.
- Occhipinti. (2013, July). Plant coevolution: evidences and new challenges. *Journal of Plant Interactions, 8*(3), σσ. 188-196.
- Pfaffl, M. (2001, May). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research, 29*(9), σσ. 45-49.
- Pfaffl, M., Horgan, G., & Dempfle, L. (2002, March). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), σσ. 36-45.

- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I., Landt, O., Siegert, W., & Nitsche, A. (2004, January). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *313*(4), σσ. 856-862.
- Raxwal, V., & Riha, K. (2016, September). Nonsense mediated RNA decay and evolutionary capacitance. *Gene Regulatory Mechanisms*, *1859*(12), σσ. 1538-1543.
- Rayson, e. (2012, February). A Role for Nonsense-Mediated mRNA Decay in Plants: Pathogen Responses Are Induced in Arabidopsis thaliana NMD Mutants. *Plos One*.
- Richard, M., Gratias, A., Meyers, B., & Geffroy, V. (2018, July). Molecular mechanisms that limit the costs of NLR-mediated resistance in plants. *Molecular Plant Pathology*, *19*(11), σσ. 2516–2523.
- Romanel, E., Schrago, C., Counago, R., Russo, C., & Alves-Ferreira, M. (2009, June). Evolution of the B3 DNA binding superfamily: new insights into REM family gene diversification. *PLoS One*, *4*(6).
- Sarris, P., Duxbury, Z., Sohn, K., & Jones, J. (2015, May). A Plant Immune Receptor Detects Pathogen Effectors that Target WRKY Transcription Factors. *Cell*, *5*, σσ. 1089-1100.
- Shivaprasad, e. (2012, March). A MicroRNA Superfamily Regulates Nucleotide Binding Site– Leucine-Rich Repeats and Other mRNAs. *The Plant Cell*.
- Si-Bei Li, Z.-Z. X.-G.-Z. (2016, February). A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. *Frontiers in Plant Science*.
- Stella Cesari, M. B. (2014, September). A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: the "integrated decoy" hypothesis. *Frontiers in Plant Sciene*.
- Sukarta, O., Slootweg, E., & Goverse, A. (2016). Structure-informed insights for NLR functioning in plant immunity. *Seminars in Cell & Developmental Biology, 56*, σσ. 134-149.
- Takken, F. L., & Goverse, A. (2012, August). How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Current Opinion in Plant Biology*, *15*(4), σσ. 375-384.
- Takken, F., & Goverse, A. (2012, June). How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Current Opinion in Plant Biology*, *15*(4), σσ. 375-384.
- Takken, F., Albrecht, M., & Tameling, W. (2006, August). Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, *9*(4), σσ. 383-390.
- Vazquez, F., Legrand, S., & Windels, D. (2010). The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs. *Trends in Plant Science*, *15*(6), σσ. 337–345.
- Wang, e. (2019, March). Plant microRNAs: Biogenesis, Homeostasis, and Degradation. *Frontiers in plant science*.
- Wang, G., Roux, B., Feng, F., He, C., Noel, L., & Zhou, J.-M. (2015, Sptember). The Decoy Substrate of a Pathogen Effector and a Pseudokinase Specify Pathogen-Induced Modified-Self Recognition and Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe*, 18(3), σσ. 285-295.

- Wang, Y., Zhang, T., Song, X., Zhang, J., Dang, Z., Pei, X., & Long, Y. (2018, January).
 Identification and functional analysis of two alternatively spliced transcripts of
 ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3) in linseed flax (Linum usitatissimum L.). *PLOS* ONE, 13(1).
- Wersch, S., Tian, L., Hoy, R., & Li, X. (2020, January). Plant NLRs: The Whistleblowers of Plant Immunity. *Plant Communications*, 1.
- Wind, M., & Reines, D. (2000, April). Transcription elongation factor SII. *NIH Public Access*, 22(4), σσ. 327-336.
- Xie, F., Xiao, P., & Chen, D. (2012, January). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular biology*, *80*(1), σσ. 75-84.
- Zhang, J. (2010, September). Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. *Molecular Plant, 3*(5), σσ. 783-793.