



«Αναζήτηση αλληλεπιδράσεων φυτικών NLR-ID
περιοχών με τους παράγοντες παθογένειας (effectors)
ripH1, ripG6, ripAI και ripAY του φυτοπαθογόνου
βακτηρίου *Ralstonia solanacearum*»

Μαλαματένια Δελησάββα

Master Thesis

«Μοριακή και Εφαρμοσμένη Βιολογία Φυτών - Πράσινη Βιοτεχνολογία»

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επιβλέπων Καθηγητής: Παναγιώτης Σαρρής

Ηράκλειο,

Οκτώβριος 2020.

Τίτλος Μεταπτυχιακής Εργασίας

“Αναζήτηση αλληλεπιδράσεων φυτικών NLR-ID περιοχών με τους παράγοντες παθογένειας (effectors) ripH1, ripG6, ripAI και ripAY του φυτοπαθογόνου βακτηρίου *Ralstonia solanacearum*. ”

Τριμελής Επιτροπή

Καθηγητής Παναγιώτης Σαρρής

Καθηγητής Δημήτρης Γκούμας

Καθηγήτρια Ευθυμία Τσαγρή

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Μοριακή και Εφαρμοσμένη Βιολογία Φυτών – Πράσινη Βιοτεχνολογία», στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Φυτών στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019 – 2020. Θα ήθελα σε αυτό το σημείο να ευχαριστήσω τον καθηγητή και επιβλέποντα μου κύριο Σαρρή Παναγιώτη, για την εμπιστοσύνη αλλά και την καθοδήγηση του καθ' όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Τσακίρη Δήμητρα για την άριστη συνεργασία, βοήθεια και κατανόηση της, κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Φυσικά θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου, καθώς για ακόμη μια φορά ανέχθηκαν το άγχος, την γκρίνια μου και τους προβληματισμούς μου και με βοήθησαν να τα ξεπεράσω.

~Every knowledge that is added is an addition to human power. ~

~*Quintus Horatius Flaccus.*

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	1
Φυτική άμυνα	1
Μοντέλα αναγνώρισης τελεστών από τους NLR	3
Μοντέλο άμεσης αναγνώρισης	4
Μοντέλο «Φύλακα» / Δόλωμα	4
Μοντέλο Ενσωματωμένων Επικρατειών (ID)	4
Το φυτοπαθογόνο <i>Ralstonia solanacearum</i>	5
Εκκριτικό Σύστημα Τύπου III	6
Τελεστές τύπου III	7
Σκοπός της Εργασίας	9
Υλικά και Μέθοδοι	10
Ανάπτυξη μικροοργανισμών	10
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Mini-preparations)	12
Κλωνοποίηση Golden Gate (Golden Gate Cloning)	13
Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E.coli</i>	15
Τεχνική του συστήματος δυο υβριδίων ζύμης (yeast two hybrid ή y2h)	16
Δεκτικά κύτταρα σακχαρομύκητα και μετασχηματισμός τους	17
Έλεγχος αλληλεπίδρασης (Yeast-two hybrid Assay)	19
Αποτελέσματα	20
Πλασμιδιακές κατασκευές	20
Έλεγχος Αλληλεπιδράσεων	25
Συζήτηση	30
Παράρτημα	32
Βιβλιογραφία	42

Abstract

The purpose of the dissertation is to investigate the possible interaction between ID protein regions of NLR plant immunity receptors and the *Ralstonia solanacearum* Type III effectors RipH1, RipAI, RipAY and RipG6. This phytopathogen is of high economic importance and causes quarantine diseases as it infects many crops, such as tomatoes, potatoes, eggplant, bananas, ginger, peppers, olives, tobacco, etc. NLRs are intracellular immune receptors of plants and contain a central nucleotide binding region followed by a series of leucine-rich repeats and are considered the key signaling molecules for initiating plant defense. ID (Integrated Domain/Decoy) domains are NLRs-fused regions that have been shown to overhang with pathogenic targets, and operate as baits for the pathogen. Microbial effectors are small pathogenic molecules that are secreted by the bacterium into the host cell and bind selectively to one or more proteins to disrupt their biological activity. The potential interaction between the sustain effector proteins of *Ralstonia solanacearum* RipH1 RipAI, RipAY and RipG6 and a series of ID regions of plant NLR receptors were tested through a yeast-two hybrid screening.

Finally, the potential interactions tested in this study could lead to the discovery of the effectors original molecular targets inside the host cell.

Περίληψη

Σκοπός της διπλωματικής διατριβής είναι ο έλεγχος πιθανής αλληλεπίδρασης των ID πρωτεΐνικών περιοχών, από NLR υποδοχείς της φυτικής ανοσίας, με τους παράγοντες παθογένειας (effectors) RipH1, RipAI, RipAY and RipG6 του φυτοπαθογόνου *Ralstonia solanacearum*. Το φυτοπαθογόνο αυτό είναι υψηλής οικονομικής σημασίας και προκαλεί ασθένειες καραντίνας καθώς προσβάλλει πολλές καλλιέργειες, όπως για παράδειγμα ντομάτας, πατάτας, μελιτζάνας, μπανάνας, τζίντζερ, πιπεριάς, ελιάς καπνού κ.α. Οι NLRs είναι ενδοκυττάριοι ανοσολογικοί υποδοχείς των φυτών και περιέχουν μια κεντρική περιοχή δέσμευσης νονκλεϊκών οξέων που ακολουθείται από σειρά επαναλήψεων πλούσιες σε λευκίνη και θεωρούνται τα βασικά σηματοδοτικά μόρια για την έναρξη της φυτικής άμυνας. Έχει δειχθεί ότι περιοχές ID (Integrated Domain/Decoy) που είναι συγχωνευμένες με NLRs αλληλοεπιδρούν με τους παθογόνους στόχους, και αυτό υποδεικνύει ότι δρουν ως δολώματα για τον παθογόνο οργανισμό. Οι μικροβιακοί τελεστές είναι μικρά μόρια παθογένειας τα οποία εκκρίνονται από το βακτήριο στο κύτταρο του ξενιστή και προσδένονται επιλεκτικά σε μια ή περισσότερες πρωτεΐνες, ώστε να διαταράξουν τη βιολογική του δράση. Με το σύστημα των δύο υβριδίων στο σακχαρομύκητα, ελέγχθηκε η πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ συντηρημένων τελεστών της *Ralstonia solanacearum* ripH1, ripAI, ripAY και ripG6 και μιας σειράς ID περιοχών που απαντούν σε φυτικούς NLR υποδοχείς της άμυνας. Πιθανές αλληλεπιδράσεις που προκύπτουν από την παρούσα εργασία, θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην ανακάλυψη των πραγματικών μοριακών στόχων του παθογόνου μέσα στο κύτταρο του ξενιστή, αφού αποδειχθεί ότι όντως προκύπτουν και *in planta*.

Εισαγωγή

Κάθε έμβιος οργανισμός εκτίθεται καθημερινά σε δυσμενείς αβιοτικές και βιοτικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Το ίδιο ακριβώς συμβαίνει και με τους φυτικούς οργανισμούς, οι οποίοι καλούνται να ανταπεξέλθουν έναντι ασθενειών, που προκαλούνται από παθογόνα, είτε από βακτήρια, είτε από μύκητες είτε από ιούς («εχθροί»). Εξελικτικά λοιπόν τα φυτά έχουν αναπτύξει μηχανισμούς οι οποίοι τους βοηθούν στο να εντοπίσουν και κατ' επέκταση να αντιμετωπίσουν τα παθογόνα «εχθρούς» (Ines de Ponce and Montesano 2013).

Φυτική άμυνα

Η **πρώτη** γραμμή άμυνας που συναντά οποιοσδήποτε μικροοργανισμός, είναι η «**μηχανική άμυνα**». Η «**μηχανική άμυνα**» περιλαμβάνει δομικά χαρακτηριστικά του φυτικού οργανισμού: την **εφυμενίδα και τους κηρούς, τα κυτταρικά τοιχώματα, τα στομάτια** (στρατηγική θέση εισόδου για τους μύκητες και τα βακτήρια) **και τις νευρώσεις φύλλων, την ενδοδερμίδα και τα επιφανειακά τριχίδια** (Τζάμος 2007).

Εάν κάποιο παθογόνο καταφέρει να ξεπεράσει την «μηχανική άμυνα» (**πρώτο επίπεδο**) και τελικά να εισέλθει στο φυτικό ιστό, τότε το εν λόγω παθογόνο πρόκειται να αντιμετωπίσει την έμφυτη ανοσολογική απόκριση του φυτού (**δεύτερο και τρίτο επίπεδο**).

Το **δεύτερο επίπεδο** είναι η **PTI** (PAMP-Triggered Immunity). Τα ερεθίσματα που αναγνωρίζονται κατά την PTI είναι τα PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), **δηλαδή** μοριακά μοτίβα, τα οποία είναι συντηρημένα μεταξύ των παθογόνων μικροοργανισμών, όπως είναι η χιτίνη, οι πεπτιδογλυκάνες, η μαστιγίνη κλπ. Κατά την **PTI** τα φυτικά κύτταρα αντιλαμβάνονται την μόλυνση μέσω μεμβρανικών υποδοχέων **PRRs** (Pattern Recognition Receptors) που βρίσκονται στη πλασματική μεμβράνη του φυτικού κυττάρου, και έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν PAMPs. Οι **PRRs** διακρίνονται στη γενικότερη κατηγορία υποδοχέων **RLPs** (Receptors – Like Protein) και στην υποομάδα των RLPs τους υποδοχείς **RLKs** (Receptors – Like Kinases). Οι πρώτοι περιέχουν μια εξωκυτταρική περιοχή, με επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη και μια περιοχή ενδοκυτταρικής κινάσης (Yeh et al 2016). Οι περιοχές της ενδοκυτταρικής κινάσης συμβάλλουν στη μεταφορά του σήματος για την έναρξη αποκρίσεων άμυνας (Erwing et al 2017). Οι υποδοχείς RLPs διαφέρουν στο ότι περιέχουν μικρότερο

ενδοκυτταρικό τομέα, χωρίς λειτουργία κινάσης (Erwing et al 2017). Από την αναγνώριση των PAMPs από τους PRR υποδοχείς ενεργοποιούνται σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε παραγωγή ριζών οξυγόνου, αντιμικροβιακών ουσιών, ενίσχυση κυτταρικών τοιχωμάτων και άλλες αποκρίσεις που έχουν ως σκοπό τον περιορισμό της εισβολής. Οι αποκρίσεις αυτές συνολικά ονομάζονται PTI (Zipfel et al 2014).

Το **τρίτο** επίπεδο της φυτικής ανοσίας είναι η **ETI** (Effector-Triggered Immunity). Κατά την **ETI**, ερέθισμα της ενεργοποίησης θεωρούνται οι τελεστές των παθογόνων. Αυτοί είναι πρωτεΐνες που εκκρίνονται από το παθογόνο και καταστέλλουν πτυχές του PTI, ευνοώντας την παθογένεια και οδηγώντας στο **ETS** (Effector Triggered Susceptibility). Η ETI ενεργοποιείται από την αναγνώριση των τελεστών από συγκεκριμένους ενδοκυτταρικούς υποδοχείς των φυτικών κυττάρων, που ονομάζονται NLRs (Nucleotide–binding Leucine-rich repeats Receptors). Η ETI συνήθως είναι μια πιο γρήγορη και ισχυρή απόκριση, σε σύγκριση με το PTI, που συχνά οδηγεί σε εμφάνιση αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) στο φυτό, δηλαδή την θανάτωση των μολυσμένων κυττάρων και των περιβαλλόντων αυτά, και την αποφυγή εξάπλωσης της μόλυνσης από το εκάστοτε παθογόνο (Jones and Dangl 2006). Άλλες αποκρίσεις, από την ανίχνευση των τελεστών από NLRs, είναι η εισροή Ca^{+2} , παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου, η ενεργοποίηση μονοπατιών σηματοδότησης μέσω MAP κινασών και επίσης οι ραγδαίες αλλαγές στα μεταγραφικά πρότυπα (Cesari 2017). Οι υποδοχείς **NLR** προάγουν την εγγενή ανοσία τόσο στα φυτά όσο και στα θηλαστικά με τον ίδιο τρόπο (στην παρούσα μελέτη θα αναφερθούμε μόνο στην εγγενή ανοσία που προκαλείται στα φυτά). Η δομή των NLR υποδοχέων αποτελείται από την επικράτεια LRR (Leucine-Rich Repeats), την επικράτεια δέσμευσης νουκλεϊκών οξέων NB (Nucleotide-Binding) και τέλος την αμινοτελική επικράτεια, που μπορεί να είναι CC (Coiled-coil) ή TIR (Toll-Interleukin 1-like Receptor). Η επικράτεια LRR αποτελείται από επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη και βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο των φυτικών NLRs. Ο ρόλος της είναι να ανιχνεύει τους τελεστές ενός παθογόνου, καθώς αποτελεί επικράτεια αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

Η επικράτεια δέσμευσης NB, θεωρείται «μοριακός διακόπτης» των NLR, ρυθμιζόμενος από τη δέσμευση νουκλεοτιδίων. Όταν η επικράτεια είναι συνδεδεμένη με ATP, ο υποδοχέας είναι ενεργός, ενώ όταν η επικράτεια είναι συνδεδεμένη με ADP, ο υποδοχέας είναι ανενεργός. Η αμινοτελική επικράτεια παίζει συχνά ρόλο στη μετάδοση του σήματος κατά την ανοσοαπόκριση και στην αλληλεπίδραση μεταξύ των

επικρατειών του NLR υποδοχέα για τη σταθεροποίηση της δομής του (Baggs et al 2017), (Sukarta et al 2016).

Οι πρωτεΐνες NLR λοιπόν φαίνεται να λειτουργούν σαν αισθητήρες έμμεσης ή άμεσης αναγνώρισης ειδικών πρωτεϊνών του παθογόνου (Kadota et al 2010).

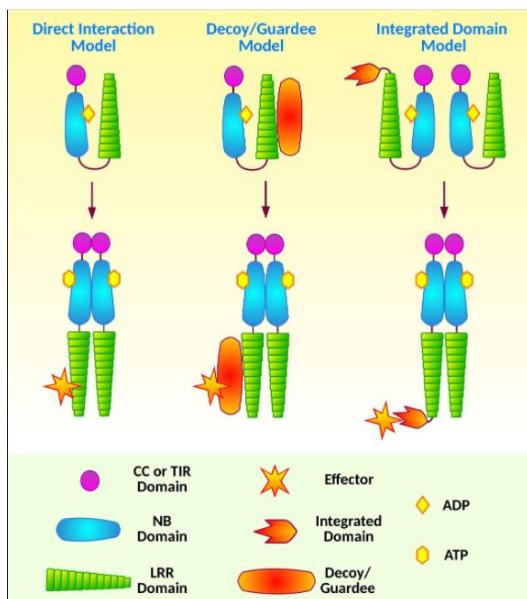
Οι NLR λειτουργούν μέσα στα φυτικά κύτταρα και «παρακολουθούν» την δραστικότητα τελεστών, ώστε να ενεργοποιήσουν την άμυνα, όπως περιγράψαμε νωρίτερα.

Πολλοί NLR φαίνεται ότι είναι συνδεδεμένοι όχι μόνο με σχέση «ένα προς ένα» αλλά και μέσω ενός περισσότερο σύνθετου δικτύου. Έχει δειχθεί ότι μερικοί NLR λειτουργούν σε ζεύγη στα οποία ειδικεύεται ένας αισθητήρας NLR για την αναγνώριση του παθογόνου, το οποίο συνδέεται με ένα βοηθό NLR, που συμμετέχει στην εκκίνηση ανοσοποιητικής σηματοδότησης (Hiroaki et al 2019).

Μοντέλα αναγνώρισης τελεστών από τους NLR

Υπάρχουν τρία μοντέλα (Εικόνα 1), που περιγράφουν την αναγνώριση των τελεστών από τους NLR υποδοχείς τα οποία είναι:

- Μοντέλο άμεσης αναγνώρισης (Direct Interaction)
- Μοντέλο «Φύλακα» / Δόλωμα (Decoy / Guardee) και
- Μοντέλο Ενσωματωμένων Επικρατειών (Integrated Domain).



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των τριών μοντέλων NLR (Kapos et al 2019).

Μοντέλο άμεσης αναγνώρισης

Σ' αυτό το μοντέλο ο υποδοχέας NLR αλληλοεπιδρά με τον τελεστή του παθογόνου άμεσα. Η επικράτεια LRR των NLR φαίνεται να έχει διττή σημασία καθώς λειτουργεί ως αισθητήρας αλλά και ως αναστολέας (Kapos et al 2019).

Μοντέλο «Φύλακα» / Δόλωμα

Στο συγκεκριμένο μοντέλο, οι NLRs φαίνεται πως δεν αλληλοεπιδρούν με την πρωτεΐνη του παθογόνου άμεσα, αλλά έχουν τη ικανότητα να ανιχνεύουν τις αλλαγές που προκαλούν οι τελεστές στις φυτικές πρωτεΐνες-στόχους τους. Όπως προαναφέρθηκε, η επικράτεια LRR φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση ενός NLR υποδοχέα με άλλες πρωτεΐνες. Επομένως, ο στόχος του τελεστή θα πρέπει να βρίσκεται παραπλήσια στην περιοχή LRR και με αυτό τον τρόπο να διευκολύνει τον έλεγχο για τυχόν παραποίησή του. Το μοντέλο αυτό έχει δύο υποκατηγορίες ανάλογα με την πρωτεΐνη που προστατεύει ο υποδοχέας (Citra et al 2016).

Στην υποκατηγορία του **μοντέλου φύλακα** οι υποδοχείς NLRs προστατεύουν την πραγματική πρωτεΐνη-στόχο του παθογόνου και εάν προκύψει αλλαγή στη διαμόρφωσή της, τότε ενεργοποιούν την ETI ανοσία. Στην υποκατηγορία του **μοντέλου δολώματος**, οι υποδοχείς προστατεύουν μια πρωτεΐνη δόλωμα, η οποία μοιάζει με την πραγματική πρωτεΐνη στόχο. Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται από παράλογα γονίδια και έχει εξελιχθεί για να μοιάζει με τον πραγματικό στόχο των τελεστών, χωρίς να έχει λειτουργικό ρόλο. Η μόνη λειτουργία της είναι να δεσμεύει τον τελεστή και να τον εμποδίζει από το να αλληλοεπιδράσει με τον φυσικό στόχο του (Jones et al 2016), (Citra et al 2016).

Μοντέλο Ενσωματωμένων Επικρατειών (ID)

Το τρίτο μοντέλο αφορά τους υποδοχείς NLR, που φέρουν μια μη τυπική επικράτεια στη δομή τους, η οποία έχει την ικανότητα να δρά ως δόλωμα και να αλληλοεπιδρά με τελεστές των παθογόνων. Οι επικράτειες τέτοιου τύπου ονομάζονται ID (Integrated Decoy/Domain), δηλαδή «ενσωματωμένα δολώματα» και αποτελούν συντηρημένες και χαρακτηριστικές περιοχές πρωτεϊνών, που στοχεύονται συχνά από τελεστές.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η επικράτεια των πρωτεϊνών της ομάδας που περιέχει το μοτίβο WRKY, που αλληλοεπιδρά με τουλάχιστον δύο τελεστές και συμβάλλει στην ενεργοποίηση της άμυνας από το ζεύγος NLR-RPR1 – RPS4 (Baggs, et al 2017).

Το συγκεκριμένο μοντέλο είναι αρκετά διαδεδομένο στους φυτικούς οργανισμούς και απαντά μέχρι τώρα κυρίως σε ζεύγη υποδοχέων NLR. Σε πολλά γονιδιώματα φυτών ένα συγκεκριμένο γονίδιο NLR μπορεί να είναι συνδεδεμένο ή και να είναι μεταγραφικά

ανεξάρτητο από ένα άλλο γονίδιο NLR, το οποίο μπορεί να είναι απαραίτητο για την λειτουργία του πρώτου γονιδίου. Το ένα NLR από το ζεύγος δρα ως ανιχνευτής του τελεστή και φαίνεται στην περίπτωση του ID μοντέλου να φέρει την ID επικράτεια, ενώ το άλλο ενεργοποιεί την ανοσολογική απόκριση, πιθανώς μέσω αλλαγών στην διαμόρφωσή του (Sarris et al 2016).

Το φυτοπαθογόνο *Ralstonia solanacearum*

Το παθογόνο *Ralstonia solanacearum* θεωρείται ένα από τα πιο καταστροφικά φυτοπαθογόνα βακτήρια. Ανήκει στα Proteobacteria, στην τάξη Betaproteobacteria και στην οικογένεια Burkholderiaceae (Prior and Fegan 2005). Έχει την ικανότητα να μεταφέρεται στο έδαφος, να εισβάλλει στα φυτά μέσω των ριζών, να φτάνει στα αγγεία του ξύλου, και να εξαπλώνεται στα υπόλοιπα μέρη του φυτού μέσω του αγγειακού συστήματος (Deslandes and Genin 2014).

Έχει ένα ευρύ φάσμα ξενιστών όπως είναι η ντομάτα, η πατάτα, η μελιτζάνα, ο καπνός, αλλά και η μπανάνα που δεν είναι σολανώδες άλλα μονοκοτυλήδονο της οικογένειας Musaceae κλπ. Επηρεάζει επίσης μέλη της οικογένειας Compositae, Leguminosae καθώς και άλλες οικογένειες φυτών (Kelman 1953). Αναπτύσσεται σε θερμά κλίματα με υγρασία, και προκαλεί βακτηριακό μαρασμό, όπου τα μαραμένα φύλλα εμφανίζουν χλωρωτικές σφηνοειδείς περιοχές, ή χλώρωση σε κάποιες περιοχές του φύλλου. Δείγμα της προσβολής είναι το λευκό υγρό που ρέει από κομμένα στελέχη. Τελική κατάσταση είναι ο μαρασμός ολόκληρου του φυτού από την προσβολή. Το εν λόγω βακτήριο μπορεί και διαχειμάζει σε τμήματα του φυτού που έχουν παραμείνει στο έδαφος, από τις καλλιεργητικές τεχνικές, είτε σε μολυσμένα φυτά είτε σε σπόρους και στο πολλαπλασιαστικό υλικό, όπως είναι για παράδειγμα οι κόνδυλοι της πατάτας. Άλλο ένα χαρακτηριστικό του παθογόνου είναι η αντοχή και η επιβίωση του σε δροσερό κλίμα. Μπορεί να υπάρχει ακόμα και σε γεωργικό εξοπλισμό. Βρίσκεται σε «λήθαργο» έως ότου οι συνθήκες γίνουν και πάλι ευνοϊκές προκειμένου να μολύνει τους ξενιστές του και να ολοκληρώσει τον βιολογικό του κύκλο (Genin and Denny 2012).

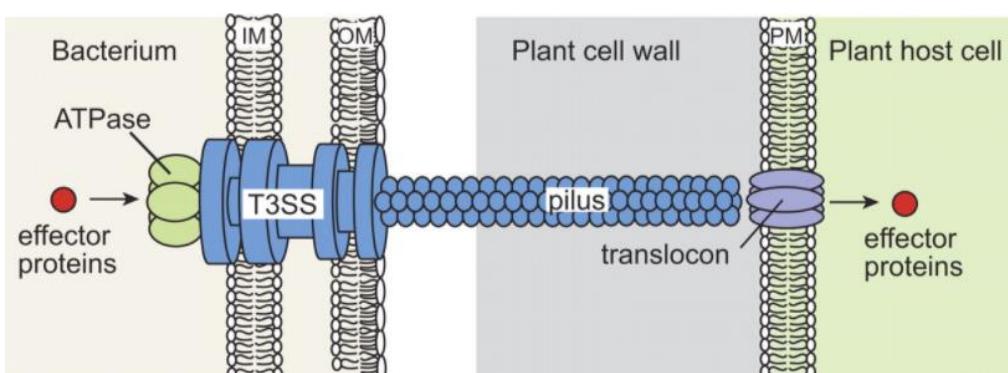
Η μόλυνση γίνεται συνήθως από πληγές που δημιουργούνται πάνω στο φυτό, είτε από γεωργικές πρακτικές (π.χ. κλάδεμα), είτε από τραυματισμό που μπορεί να προέρχεται π.χ. από ζώα (Denny 2007).

Το γονιδίωμα του παθογόνου αυτού έχει επαρκές μέγεθος να κωδικοποιεί πλήθος πρωτεΐνων που πιθανόν να σχετίζονται με την παθογένεια. Τα μεγέθη που κυμαίνονται

κύρια στελέχη που αλληλουχήθηκαν είναι για το στέλεχος GMI100 το μέγεθος είναι 5,8 Mb (Salanoubat et al 2002), για το στέλεχος CQPS-1 είναι 5,89 Mb (Liu et al 2017), για το στέλεχος CMR15 είναι 5,61, για το στέλεχος *R. syzygii* R24 είναι 5,45 κλπ (Ailloud et al 2015). Όπως προαναφέρθηκε, οι πρωτεΐνες τελεστές εγχέονται από τα παθογόνα στο φυτικό κύτταρο, ώστε να διαταράξουν τις λειτουργίες του. Το συγκεκριμένο παθογόνο φαίνεται πως στηρίζει την παθογένεια του σε σύστημα έκκρισης τύπου III (TypeIII secretion system), το οποίο χρησιμοποιεί για να εκκρίνει τελεστές πρωτεΐνες στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου (Galan et al 2014).

Εκκριτικό Σύστημα Τύπου III

Το Εκκριτικό σύστημα τύπου III (TypeIII Secretion System ή T3SS) συναντάται σε gram αρνητικά βακτήρια και είναι σύστημα μεταφοράς πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή (Εικόνα 2). Το σύστημα αυτό δημιουργείται όταν το βακτήριο έρθει σε επαφή με το ευκαρυωτικό κύτταρο και χρησιμοποιείται για τη μεταφορά τελεστών τύπου III (Type III τελεστές ή T3Es). Η ενεργοποίηση του T3SS ξεκινά όταν ένας πρωτεϊνικός υποδοχέας που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη του βακτηρίου, ανιχνεύει στοιχεία κυτταρικού τοιχώματος του ξενιστή (Khan et al 2018), (Galan et al 2014). Μία κεντρική δομή του T3SS είναι το σύμπλοκο «βελόνας», το οποίο μεσολαβεί στη διέλευση των πρωτεϊνών T3E του παθογόνου, από το κυτταρόπλασμα του παθογόνου απευθείας στο κυτταρόπλασμα του φυτικού κυττάρου (Sabbagh et al 2019), (Sang et al 2018). Το σύστημα T3SS συνδέεται με την μολυσματικότητα πολλών παθογόνων τόσο φυτικών οργανισμών όσο και ζωικών, αλλά απαντά και σε συμβιωτικά βακτήρια ευκαρυωτικών οργανισμών (Galan et al 2014).



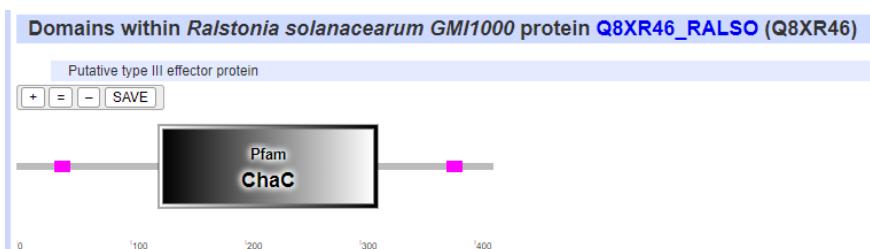
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση του T3SS σε φυτικό κύτταρο. Διακρίνεται ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η έγχυση των τελεστών στο φυτικό κύτταρο. (Οπου ΙΜ: Εσωτερική μεμβράνη του παθογόνου, ΟΜ: εξωτερική μεμβράνη του παθογόνου και ΡΜ:Πλασματική μεμβράνη του φυτικού κυττάρου) (Buttner and He 2009).

Τελεστές τύπου III

Πολλά φυτοπαθογόνα βακτήρια εκκρίνουν δεκάδες πρωτεΐνες μέσα στα φυτικά κύτταρα, οι οποίες ονομάζονται τελεστές, χρησιμοποιώντας το εκκριτικό σύστημα τύπου III (T3SS). Αυτές οι πρωτεΐνες (τύπου III-εκκρινόμενοι τελεστές, T3Es) είναι βασικοί καθοριστικοί παράγοντες της αλληλεπίδρασης μεταξύ του παθογόνου και του ξενιστή. Συμβάλλουν στην διατάραξη των φυτικών κυτταρικών διεργασιών με σκοπό την εξάπλωση της μόλυνσης. Έχει προταθεί ότι ορισμένοι τελεστές τύπου III εμφανίζουν «υψηλή εξειδίκευση» και στοχεύουν μία πρωτεΐνη. Οι περισσότεροι από αυτούς, έχει παρατηρηθεί, ότι εμφανίζουν «χαμηλή εξειδίκευση» και μπορούν να στοχεύουν πολλαπλές πρωτεΐνες στόχους. Αυτές οι πρωτεΐνες τελεστές ρυθμίζουν μια ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών, προς όφελος του παθογόνου (Khan et al 2018).

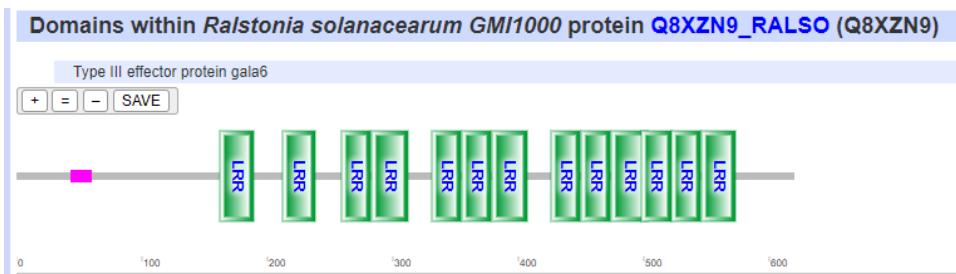
Στελέχη της *R. solanacearum* εκφράζουν περισσότερους από 70 διαφορετικούς τελεστές. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι τελεστές RipAY, RipG6, RipH1 και RipAI του στελέχους GMI1000, οι οποίοι είναι καλά συντηρημένοι μεταξύ όλων των μέχρι τώρα αλληλουχημένων στελεχών. Η έκκριση των επιλεγμένων τελεστών μέσω του T3SS έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά. Οι στόχοι των τελεστών αυτών στο φυτικό κύτταρο δεν έχουν ανακαλυφθεί, αν και για τη δράση τους υπάρχουν κάποιες πληροφορίες στη βιβλιογραφία.

Το γονίδιο **RipAY** ([Εικόνα 3](#)) T3E της *R. Solanacearum* είναι παρών σε όλα τα αλληλουχημένα στελέχη *R. Solanacearum* και έχει δράση κυκλοτρανσφεράσης του γ-γλουταμυλίου (γ -Glutamyl cyclotransferase GGCT). Η δράση του αυτή, προκαλεί την αποκοδόμηση της ρυθμιστικής οξειδοαναγωγικής γλουταθειόνης δηλαδή ενός α-αμινοξέος, το οποίο έχει εξελιχθεί σε μόριο όπου «προστατεύει» τα κύτταρα από την οξείδωση. Έχει πολλές σημαντικές λειτουργίες στον μεταβολισμό, την κατάλυση και τη μεταφορά (και πιθανώς άλλων ενώσεων γ-γλουταμυλίου) σε φυτικά κύτταρα, οδηγώντας σε καταστολή των ανοσολογικών αντιδράσεων των φυτών. Έχει αποδειχθεί ότι οι ευκαρυωτικές θειορεδοξίνες συμβάλλουν στην ενεργοποίηση της δραστηριότητας του RipAY GGCT *in vitro*. Ωστόσο, ο μηχανισμός ενεργοποίησης του RipAY με τη μεσολάβηση της θειορεδοξίνης παραμένει άγνωστος (Yali et al 2017), (Meister 1995).



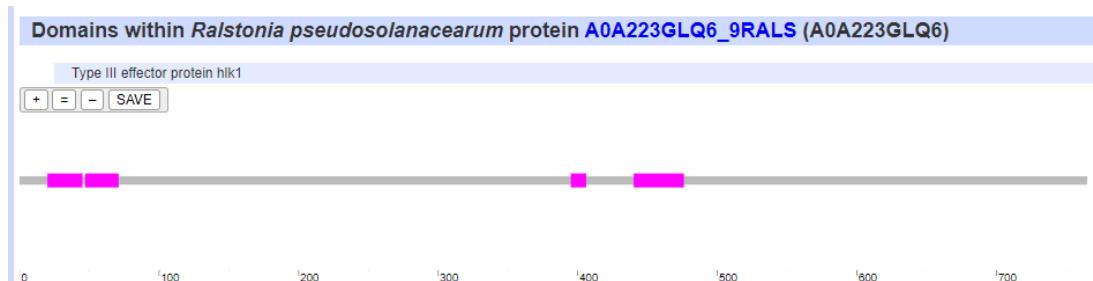
Εικόνα 3: Σχηματική πρωτεϊνική αλληλουχία του τελεστή ripAY (μέσω του προγράμματος Smart.embl-heidelberg).

Η πρωτεΐνη τελεστής **RipG6** (**Εικόνα 4**) ανήκει στην οικογένεια τελεστών GALA της *R. solanacearum* και έχει την ικανότητα να καταστέλλει την φυτική άμυνα σε τρεις διαφορετικούς φυτά ξενιστές: *A. thaliana*, *Lycopersicum esculentum* και *Solanum melongena* (Remigi et al 2011).



Εικόνα 4: Σχηματική πρωτεϊνική αλληλουχία του τελεστή ripG6 (μέσω του προγράμματος Smart.embl-heidelberg).

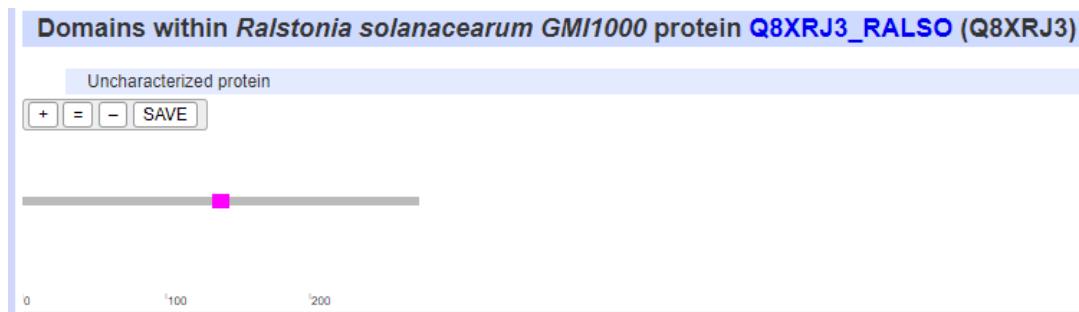
Ο **RipH1** (**Εικόνα 5**) T3E ανήκει στην οικογένεια HLK τελεστών της *R. solanacearum*, η οποία αποτελείται από τέσσερις τελεστές (RipH1–RipH4) με μέσο μέγεθος περίπου τα 600 αμινοξέα. Οι RipH ονομάζονται έτσι λόγω της παρουσίας τριών αμινοξέων σε μια συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή. Πιο συγκεκριμένα λόγω των αρχικών γραμμάτων των αμινοξέων της ιστιδίνης (Histidine), λευκίνης (Leucine) και λυσίνης (Lysine συμβολίζεται με K) (Asolkar and Ramesh 2018).



Εικόνα 5: Σχηματική πρωτεϊνική αλληλουχία του τελεστή ripH1 (μέσω του προγράμματος Smart.embl-heidelberg).

Ο **RipAI** (**Εικόνα 6**) ανήκει σε μια οικογένεια τελεστών παλιότερα είχε την ονομασία AWR (αλανίνη-τρυπτοφανη-αργινίνη) (Deslandes and Genin 2014), (Peeters et al 2013). Μια λειτουργική ανάλυση της οικογένειας AWR έδειξε ότι ορισμένοι AWR T3E προκαλούν νεκρωτικές αντιδράσεις μέσω της επαγωγής κυτταρικού θανάτου σε φυτά και είναι πρωτεΐνες απαραίτητες για πλήρη μολυσματικότητα (Peeters et al 2013).

Η οικογένεια AWR συμβάλλει σημαντικά στη βακτηριακή μολυσματικότητα και περιλαμβάνει τελεστές από διαφορετικά παθογόνα βακτήρια (Montserrat et al 2012).



Εικόνα 6: Σχηματική πρωτεϊνική αλληλουχία του τελεστή ripAI (μέσω του προγράμματος Smart.embl-heidelberg).

Σκοπός της Εργασίας

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η αναζήτηση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ τεσσάρων βακτηριακών τελεστών τύπουIII τελεστών της *Ralstonia solanacearum* και μιας σειράς ID επικρατειών (**Πίνακα 1**) από φυτικούς NLR υποδοχείς, μέσω του συστήματος δύο υβριδίων (yeast two-hybrid system) του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*.

Οι υπό μελέτη τελεστές RipAI, RipAY, RipH1 και RipG6 φαίνεται να είναι καλά συντηρημένοι ανάμεσα σε όλα τα αλληλουχημένα στελέχη του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum*, πράγμα που φανερώνει ότι πιθανότατα να έχουν κρίσιμο ρόλο στην παθογένειά του. Η συγγένεια των υπό μελέτη ID πρωτεϊνικών επικρατειών με συνήθεις στόχους διαφορετικών τελεστών σημαίνει ότι πιθανές αλληλεπιδράσεις θα μας δώσουν πληροφορίες για τους φυτικούς παράγοντες και τα «μονοπάτια» που στοχεύει το παθογόνο ώστε να προάγει τη μολυσματικότητα του, στον ξενιστή.

Πίνακας 1: ID επικράτειες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία, και οι τελεστές της *Ralstonia solanacearum* με τους οποίους ελέγχθηκε η πιθανή αλληλεπίδραση.

IDs	Origin
WRKY	<i>Arabidopsis thaliana</i> WS2
WRKY (short)	<i>Oryza sativa</i>
WRKY	<i>Hordeum vulgare</i>
Thior	<i>Vitis vinifera</i>
Thior	<i>Gossypium reimondii</i>
Kinase C	<i>Hordeum vulgare</i>
Kinase N C010	<i>Hordeum vulgare</i>
Kinase N C153	<i>Hordeum vulgare</i>
HMA	<i>Hordeum vulgare</i>

TCP	<i>Hordeum vulgare</i>
LIM	<i>Hordeum vulgare</i>
Ubox	<i>Hordeum vulgare</i>
TFSIIN	<i>Hordeum vulgare</i>
TIR	<i>Hordeum vulgare</i>
B3	<i>Hordeum vulgare</i>
CG	<i>Hordeum vulgare</i>
Exo70	<i>Hordeum vulgare</i>
HSF	<i>Hordeum vulgare</i>
PP2C-C	<i>Hordeum vulgare</i>
TRX-C	<i>Hordeum vulgare</i>
ZFBED_N_C045	<i>Hordeum vulgare</i>
ZFBED_N_C350	<i>Hordeum vulgare</i>
Effectors	Origin
ripH1	<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000
ripG6	<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000
ripAI	<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000
ripAY	<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000

Υλικά και Μέθοδοι

Ανάπτυξη μικροοργανισμών

Για την καλλιέργεια στελεχών DH10B και STELLAR του βακτηρίου *Escherichia coli* χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό LB που περιείχε το κατάλληλο εκλεκτικό αντιβιοτικό (αμπικιλίνη ή καναμυκίνη **Πίνακα 2**). Οι καλλιέργειες των βακτηρίων αναπτύχθηκαν σε επωαστήρα σε σταθερή θερμοκρασία στους 37°C για 12-14 ώρες

Πίνακας 2: Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Φορέας	Αντίσταση Αντιβιοτικού	Συγκέντρωση αντιβιοτικού
pBluescript II SK(-) Golden-Gate-compatible	Ampicillin	100µg/ml
pGADT7_rfp	Ampicillin	100µg/ml
pGBT7_rfp	Kanamycin	50 µg/ml

Για την ανάπτυξη των στελέχων PJ69-4A του σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιήσαμε πλούσιο θρεπτικό υλικό YPDA (**Πίνακα 3**) και οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε επωαστήρα σε σταθερή θερμοκρασία 28°C. Οι υγρές

καλλιέργειες του σακχαρομύκητα αναπτύχθηκαν για 14-16 ώρες, αυτές σε στερεό θρεπτικό υλικό (πιάτα Petri με άγαρ) η ανάπτυξή του πραγματοποιήθηκε σε 2-3 ημέρες. Μετασχηματισμένα κύτταρα σακχαρομύκητα αναπτύχθηκαν σε ελλιπές θρεπτικό υλικό SDC (**Πίνακα 3**), το οποίο έχει ελλείψεις σε διαφορετικά αμινοξέα, σύμφωνα με τις ανάγκες του πειράματος. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα αμινοξέων (**Πίνακα 4**) για την παρασκευή του επιθυμητού μείγματος αμινοξέων.

Πίνακας 3: Υλικά για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών για την τεχνική yeast two hybrid

Θρεπτικό	Υλικά για Παρασκευή	Ποσότητα στο lt
YPDA	Bacto-Yeast extract	10 gr
	Bacto-peptone	20 gr
	Glucose	20 gr
	Adenine	0,03 gr
	dH ₂ O	Up to 1lt
For plates 2% agar	pH 6 – 6,5 HCl 1 M	
SDC	CSM(-His-Leu-Trp-Ade)	0,55 gr
	YNB	6,7 gr
	Glucose	20 gr
	Amino Acids (stock)	1 ml / 100 ml medium
	dH ₂ O	Up to 1lt
For plates 2% agar	pH 5,6 NaOH 5N	

Πίνακας 4: Τρόπος παρασκευής stock διαλυμάτων αμινοξέων

Αμινοξέα	Παρασκευή διαλυμάτων αμινοξέων
Αδενίνη	200 mg / 50 ml (0,5 M HCl)
Ουρακίλη	20 mg / lt
Ιστιδίνη	100 mg / 50 ml dH ₂ O

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Mini-preparations)

Η απομόνωση πλασμιδίου γίνεται με τη χρήση αλκαλικής λύσης γίνεται επώαση καλλιέργειας βακτηρίων *E. coli* 5-10ml στους 37°C για 16 ώρες με ανακίνηση 200-250 rpm. Ο δοκιμαστικός σωλήνας περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό και μια μοναδιαία αποικία βακτηρίου. Έπειτα από 12-14 ώρες σε eppendorf 1,5ml προστίθεται αντίστοιχος όγκος καλλιέργειας και έπειτα γίνεται φυγοκέντρηση στα 11000 g για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Το βακτηριακό ίζημα επαναδιαλύεται σε 100μl παγωμένου Διαλύματος 1 (50 mM γλυκόζη, 10 mM EDTA, 25 mM Tris, pH 8,0) με έντονη ανακίνηση. Προστίθεται 200 μl 0,2N NaOH και 1% SDS σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια 150 μl παγωμένου Διαλύματος 3 (3M KOAc, pH 6,0). Ακολουθεί ανακίνηση και επώαση για 3-5 λεπτά στο πάγο. Το μείγμα φυγοκεντρείται στα 12000 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφέρεται το υπερκείμενο σε ένα νέο

eppendorf tube. Ακολουθεί προσθήκη διπλάσιου όγκου 100% αιθανόλης για την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA, φυγοκέντρηση στα 12000xg για 15-20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη του υπερκείμενου. Η πελλέτα είναι το πλασμιδιακό DNA. Ακολουθεί ξέπλυμα του ιζήματος σε 500 μl 70% αιθανόλης και φυγοκέντρηση στα 12000 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και διατηρείται το ίζημα. Τέλος, το δείγμα στεγνώνεται στον αέρα για 20 λεπτά, μέχρι τη πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης, και προστίθενται 30 μl απιονισμένο νερό για τη διάλυση του ιζήματος (Fritschitis et al 2003).

Κλωνοποίηση Golden Gate (Golden Gate Cloning)

Με την παρούσα τεχνική πραγματοποιήθηκε η ενσωμάτωση των γονιδίων ενδιαφέροντος της *Ralstonia solanacearum* σε φορέα έκφρασης της ζύμης, ο οποίος επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί παρακάτω για το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ο φορέας (vector) pGADT7_rfp. Ο οποίος περιέχει το γονίδιο rfp του οποίου το προϊόν RFP (Red Fluorescent Protein) προσδίδει στις αποικίες ένα ροζ/κόκκινο χρώμα εφόσον ο φορέας **δεν** έχει δεχτεί κάποιο ένθεμα. Η ένθεση του εκάστοτε τελεστή πραγματοποιείται στο γονίδιο rfp με αποτέλεσμα να μην γίνεται η έκφραση του.

Η κλωνοποίηση Golden Gate βασίζεται στην ικανότητα των περιοριστικών ενζύμων τύπου IIIS, να διασπούν έξω από την αλληλουχία αναγνώρισης. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι το BsaI, που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5' _GGTCTC_ 3' και διασπά έξω από αυτήν, όπως φαίνεται σχηματικά παρακάτω:



Με αυτόν τον τρόπο, δύο θραύσματα DNA, τα οποία πλαισιώνονται από θέσεις περιορισμού BsaI, μπορούν με τον κατάλληλο σχεδιασμό να οδηγούν σε προϊόντα πέψης περιορισμού με συμπληρωματικά μονόκλωνα άκρα 4 νουκλεοτιδίων. Η συμπληρωματικότητα αυτή επιτρέπει την κλωνοποίηση αρκετών τμημάτων DNA στη σειρά, συγχρόνως με μεγάλη αποτελεσματικότητα, (εφόσον το κάθε τμήμα διαφέρει στα 4 αυτά νουκλεοτίδια που ακολουθούν την αλληλουχία αναγνώρισης CCAGA) στο ένα άκρο τουλάχιστον. Επιπλέον, η αντίδραση πέψης μπορεί να πραγματοποιηθεί στο ίδιο

δοχείο με αυτήν της λιγοποίησης, που ακολουθεί και οι δύο αντιδράσεις να επαναληφθούν σε πολυάριθμους κύκλους. Βασική προϋπόθεση αυτής της επαναληψιμότητας είναι η απουσία ενδογενών θέσεων αναγνώρισης BsaI στα τμήματα DNA που κλωνοποιούνται. Αυτό το είδος μοριακής κλωνοποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την συναρμολόγηση οποιασδήποτε κατασκευής ενδιαφέροντος (Engler et al 2014).

Στον **Πίνακα 5** διακρίνονται τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία της αντίδρασης Golden Gate Cloning. Ο υπολογισμός των ποσοτήτων για τα ενθέματα έγινε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\frac{m}{MW} insert = \frac{m}{MW} vector \leftrightarrow \frac{m}{length (bp)} insert = \frac{m}{length (bp)} vector.$$

m= μάζα

MW= molecular weight (μοριακό βάρος)

Length= μήκος αλληλουχίας σε ζεύγη βάσεων (bp)

Insert= ένθεμα

Vector= φορέας

Η ποσότητα του φορέα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ίδια σε κάθε αντίδραση (100ng).

Πίνακας 5: Προετοιμασία της αντίδρασης μοριακής κλωνοποίησης Golden Gate Cloning, με τις κατάλληλες ποσότητες.

Solution	Ποσότητα
10x BSA buffer (NEB)	2μl
10x T4 ligase buffer (NEB)	2μl
100ng/μl pGADT7_rfp	1μl
pBSK::effector	Y
Enzyme BsaI 20u/μl (NEB)	1μl
Enzyme T4 ligase (NEB)	1μl
ddH ₂ O	up to 20μl

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μηχάνημα thermal cycler με το εξής πρωτόκολλο:

Πέψη	3 λεπτά στους 37°C]	25 ΚΥΚΛΟΙ
Λιγοποίηση	4 λεπτά στους 16°C		
Τελική Πέψη	5 λεπτά στους 37°C		

Απενεργοποίηση των ενζύμων (BsaI και λιγάσης) 5 λεπτά στους 80°C

Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E.coli*

Για τον μετασχηματισμό, μισή ποσότητα (10μl) από την αντίδραση κλωνοποίησης προστέθηκε σε δεκτικά κύτταρα *E. Coli* για την πραγματοποίηση μετασχηματισμού. Ακολούθησε θερμικό σοκ στους 42°C για ένα λεπτό και έπειτα στους 4°C για ένα λεπτό. Στη συνέχεια προστέθηκε υγρό θρεπτικό υλικό LB έως τελικό όγκο 1 ml και τα κύτταρα επωάστηκαν με ανακίνηση για 1 ώρα σε σταθερή θερμοκρασία στους 37°C. Έπειτα από φυγοκέντρηση στα 3000 RPM για 3 λεπτά και αφαίρεση του υπερκειμένου με αναστροφή του μικροσωληναρίου, έγινε επαναδιάλυση των κυττάρων με όση ποσότητα (100-150-μl) υπερκείμενου έχει απομείνει. Τελικό στάδιο ήταν καλλιέργεια σε πιάτα με στέρεο θρεπτικό υπόστρωμα LB και κατάλληλο αντιβιοτικό και επώαση σε σταθερή θερμοκρασία στους 37°C για 16 ώρες (overnight).

Τα βακτήρια με τον άδειο φορέα pGADT7_RFP στο τρυβλίο παρουσιάζονται με την μορφή κόκκινων – ροζ αποικιών και αυτό οφείλεται στο γονίδιο rfp του οποίου το προϊόν RFP (Red Fluorescent Protein) προσδίδει αυτό το χρώμα. Χαρακτηριστικό μιας επιτυχημένης κλωνοποίησης Golden Gate στο φορέα pGADT7_RFP ήταν η παρουσία λευκών αποικιών στο πιάτο. Η παρουσία μόνο κόκκινων – ροζ αποικιών υποδηλώνει ότι η ένωση του φορέα με τον ένθεμα-τελεστή δεν έχει πραγματοποιηθεί.. Η παρουσία λευκών αποικιών υποδηλώνει ότι το βακτήριο έχει προσλάβει το πλασμίδιο, (καθώς έχει καταστραφεί το γονίδιο rfp και στην θέση του πλέον υπάρχει το γονίδιο ενδιαφέροντος. Έτσι, επιλέχθηκαν λευκές αποικίες για καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό LB με αντιβιοτικό, για την απομόνωση των πλασμιδίων και έλεγχο με πέψεις με περιοριστικές ενδονούκλεάσες.

Τεχνική του συστήματος δυο υβριδίων ζύμης (yeast two hybrid ή Y2H)

Το σύστημα δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα (yeast-two hybrid ή Y2H) θεωρείται ένα αποτελεσματικό μέσο μελέτης για την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης – πρωτεΐνης (Luban and Goff 1995). Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αποκατάσταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των υπομονάδων ενός λειτουργικού μεταγραφικού παράγοντα, όταν αλληλοεπιδρούν 2 πρωτεΐνες ή πολυπεπτίδια που μαζί ενδιαφέρουν (Εικόνα 7). Αυτό οδηγεί στην ανασύσταση του μεταγραφικού παράγοντα και τελικά τη μεταγραφή ενός γονιδίου αναφοράς που συνδέεται σ' ένα συγκεκριμένο φαινότυπο. Τέτοιοι φαινότυποι είναι συνήθως ανάπτυξη σ' ένα επιλεκτικό μέσο ή αλλαγή στο χρώμα των αποικιών της ζύμης (Miller and Stagljar 2004).

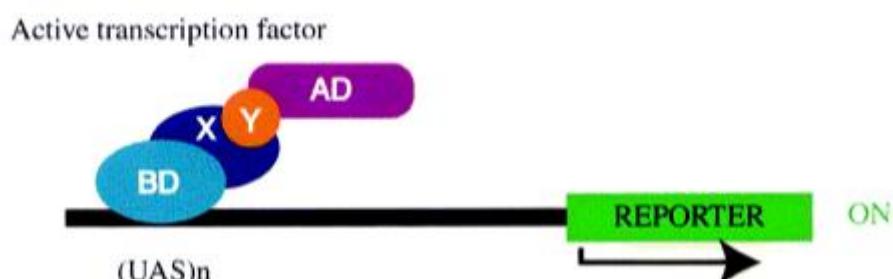
Για να πραγματοποιηθεί η τεχνική αυτή χρησιμοποιούμε δύο μέρη από τον μεταγραφικό παράγοντα GAL4, τον τομέα ενεργοποίησης (Activation Domain, AD) και τον τομέα δέσμευσης (Binding Domain, BD).

Το BD συντίκεται με μια από τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος που ονομάζεται δόλωμα (bait) και το AD με την δεύτερη πρωτεΐνη που ονομάζουμε θήραμα (prey).

Εάν το δόλωμα και το «θήραμα» (prey) αλληλοεπιδράσουν, τότε τα δύο μέρη του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 ανασυντάσσονται και κατ' επέκταση ενεργοποιείται το γονίδιο αναφοράς (Fields 1993).

Για την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος PJ69 4A, του οποίου ο γενότυπος παρουσιάζεται στον Πίνακα 6. Το σύστημα βασίζεται στο

μεταγραφικό παράγοντα GAL4 και ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το ADE2. Πριν από τα γονίδια αυτά εντοπίζονται στοιχεία υποκινητή (promoter) GAL1 και GAL2 τα οποία, ελέγχει ο μεταγραφικός παράγοντας GAL4 (Shaffer et al 2012). Ο έλεγχος της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με χρήση του γονιδίου ADE2, ως γονίδιο αναφοράς. Το γονίδιο ADE2 κωδικοποιεί την AIR-καρβοξυλάση η οποία καταλύει το στάδιο της βιοσυνθετικής οδού της πουρίνης του *Saccharomyces cerevisiae*. Από ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην επίδραση απαλοιφής της περιοχής του εκκινητή του γονιδίου στην έκφραση του ενζύμου χρησιμοποιώντας την ένωση του promoter του γονιδίου ADE2 στο γονίδιο lacZ (Gedvilaite and Sasnauskas 1994).



Εικόνα 7: Αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών σύντηξης (λόγω αλληλεπίδρασης μεταξύ X και Y). Τελικό αποτέλεσμα είναι η ανασύσταση ενός ενεργού παράγοντα μεταγραφής και η επακόλουθη μεταγραφή ενός γονιδίου αναφοράς (Stephens and Banding 2002).

Πίνακας 6: Πληροφορίες για το γενότυπο του στελέχους *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A, που χρησιμοποιήθηκε για το σύστημα δύο υβριδίων στην παρούσα εργασία. (James, Halladay, and Craig 1996).

Στέλεχος	Γενότυπος
PJ69 4A	MAT α
	gal4 Δ , gal80 Δ
	trp1-901 leu2-3 ura3-52 his3-200
	LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2
	met2::GAL7-lacZ

Δεκτικά κύτταρα σακχαρομύκητα και μετασχηματισμός τους

Πλούσιο θρεπτικό υλικό YPDA επιμολύνθηκε με μοναδιαία αποικία από το στέλεχος του ζυμομύκητα PJ694A και επωάστηκε στους 28-30°C σταθερά για περίπου 16 ώρες, έως ότου δηλαδή επέλθει ο κορεσμός. Στη συνέχεια επιμολύνθηκε φρέσκια καλλιέργεια

τελικού όγκου n*10ml, όπου n ο αριθμός των μετασχηματισμών που πρόκειται να γίνουν, με οπτική απορρόφηση O.D₆₀₀ της καλλιέργειας στο 0,2.

Το O.D₆₀₀ της καλλιέργειας πρέπει να βρίσκεται εντός του ορίου 0,5 – 0,8 κατά την φωτομέτρηση έπειτα από 3 – 3,5 h επώασης στους 28-30°C.

Αρχικά, έγινε φυγοκέντρηση για 4 λεπτά στις 3000 rpm στους 4 °C. Ακολούθησε αφαίρεση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση των κυττάρων με απιονισμένο – αποστειρωμένο νερό ίσου όγκου με αυτόν της καλλιέργειας που αρχικά φυγοκεντρήθηκε. Μετά από όμοια φυγοκέντρηση, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 1ml LiAc 0,1M (**Πίνακα7**) και μεταφέρθηκαν σε σωληνίσκο Eppendorf 1,5ml. Στη συνέχεια, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 11000 g για ένα λεπτό, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, επαναδιαλύθηκαν σε LiAc 0,1M όγκου n*100μl και ισομοιράστηκαν σεν καθαρούς σωληνίσκους Eppendorf 1,5ml. Έπειτα από γρήγορη φυγοκέντρηση για 10 secσε μέγιστη ταχύτητα (quick spin), αφαιρείται το υπερκείμενο και πάνω από τα κύτταρα τοποθετούνται 240 μl PEG 50% (**Πίνακα 7**).

Πίνακας 7: Διαλύματα και τρόπος παρασκευής τους, για την μέθοδο του μετασχηματισμού κυττάρων ζύμης (yeast transformation.)

Διαλύματα	Τρόπος παρασκευής
PEG 50%	Διάλυση 50 gr PEG 3350 σε 50 ml dH ₂ O, έπειτα αποστείρωση με φίλτρο και αποθηκεύσυμε σε θερμοκρασία δωματίου.
LiAc 1 M	Σε 10 ml dH ₂ O διαλύουμε 1,02 g LiAc, έπειτα αποστείρωση με φίλτρο και αποθηκεύσυμε σε θερμοκρασία δωματίου.
LiAc 0,1 M	Από το 1 M LiAc παίρνουμε 1 ml και το προσθέτουμε μέχρι τα 10 ml dH ₂ O

Για το μετασχηματισμό των κυττάρων του σακχαρομύκητα προστέθηκαν σε αυτά, μείγμα των πλασμιδίων με (75μl) και 36μl LiAc 1M. Το μείγμα προστέθηκε στα κύτταρα και ακολούθησε ανάδευση (vortex) για περίπου 1 λεπτό έως την ομογενοποίηση. Μετά από επώαση σε σταθερή θερμοκρασία 28°C για 25 λεπτά και επώαση σε σταθερή θερμοκρασία 42°C (θερμικό σοκ) για 25 λεπτά, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στα 11000g για 1 λεπτό, ώστε να απομακρυνθεί το υπερκείμενο. Στη

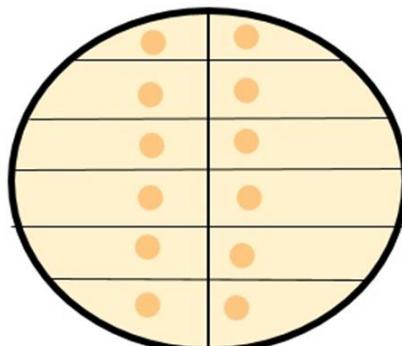
συνέχεια έγινε επαναδιάλυση των κυττάρων σε 200μl θρεπτικό SDC-LW (**Πίνακα 3**).

Τα μετασχηματισμένα κύτταρα τελικά καλλιεργήθηκαν σε πιάτα με θρεπτικό υλικό SDC-LW και αναπτύχθηκαν για 3 – 4 ημέρες σε σταθερή θερμοκρασία 28°C.

Ακολούθησε ανακαλλιέργεια (streaking) σε πιάτο με θρεπτικό SDC (-L-W), και επώαση για 3-4 ημέρες σε σταθερή θερμοκρασία 28°C, έως τον σχηματισμό μοναδιαίων αποικιών (Maple and Moller 2007).

Έλεγχος αλληλεπίδρασης (Yeast-two hybrid Assay)

Το τελικό στάδιο για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης ήταν η καλλιέργεια μοναδιαίων μετασχηματισμένων αποικιών σε εκλεκτικό για τις αντιδράσεις πιάτο, με εναπόθεση σταγόνων αποστειρωμένου απιονισμένου νερού που περιέχουν μετασχηματισμένα κύτταρα (**Εικόνα 8**). Χρησιμοποιήθηκαν δυο αποικίες από τον κάθε μετασχηματισμό, σαν τεχνική επανάληψη. Αφού πρώτα κάθε αποικία διαλύθηκε σε 10μl αποστειρωμένου dH₂O, τοποθετήθηκε σταγόνα 5μl σ' ένα κελί στο πιάτο που περιέχει αδενίνη και 5μl σε κελί του πιάτου που δεν περιέχει αδενίνη. Αφήνουμε τα πιάτα σε σταθερή θερμοκρασία στους 28°C, για 3-4 μέρες και φωτογραφίζουμε τα αποτελέσματα. Το πιάτο που περιείχε αδενίνη λειτουργεί σαν μάρτυρας και αποδεικνύει ότι η αποικία του σακχαρομύκητα που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης περιέχει τα επιθυμητά πλασμίδια (Folter and Immink 2011).

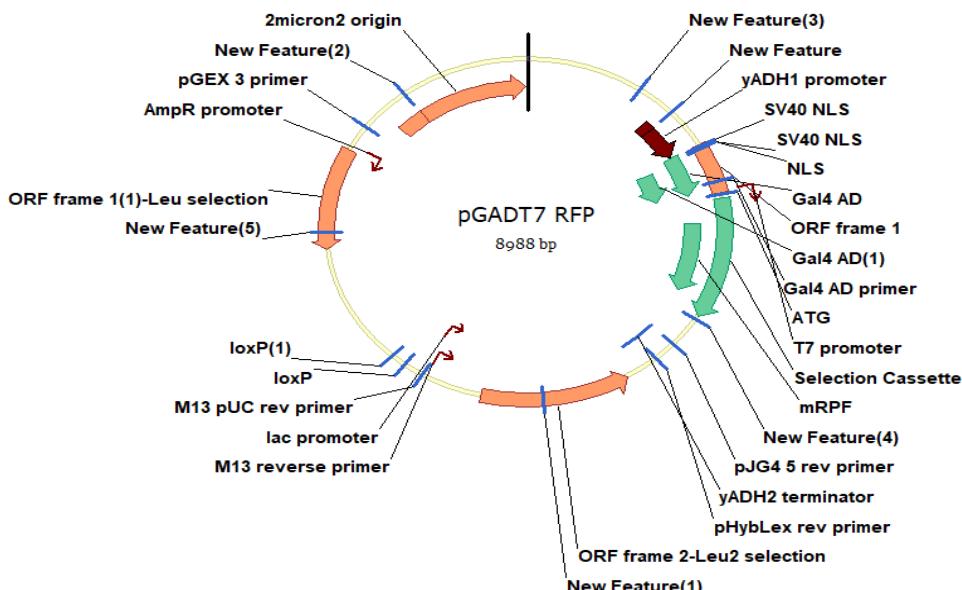


Εικόνα 8: Εικονική αναπαράσταση του τρόπου εναπόθεσης των σταγόνων των transformed cell

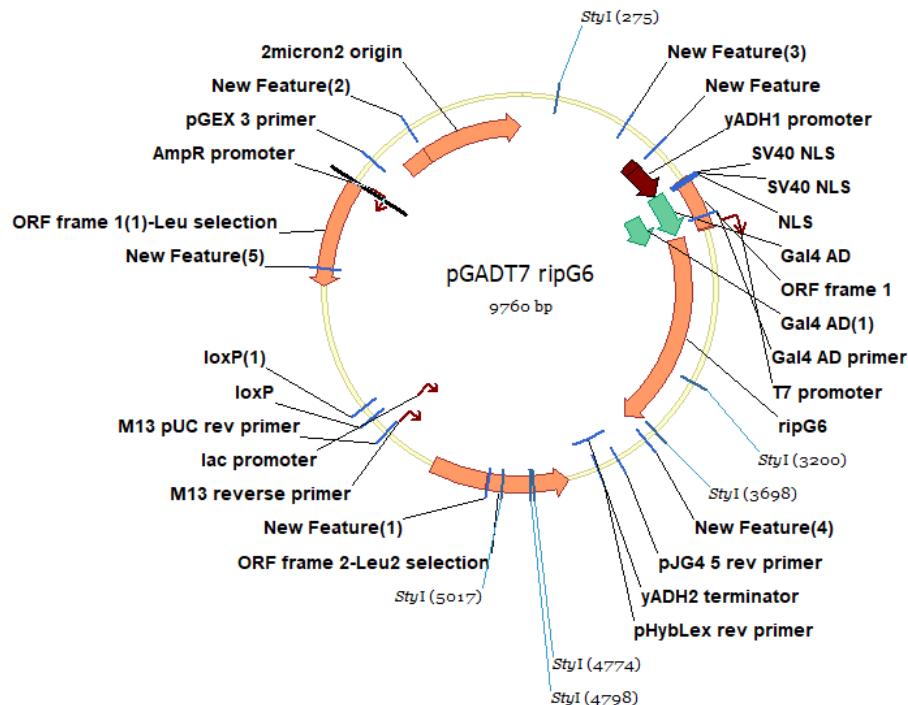
Αποτελέσματα

Πλασμιδιακές κατασκευές

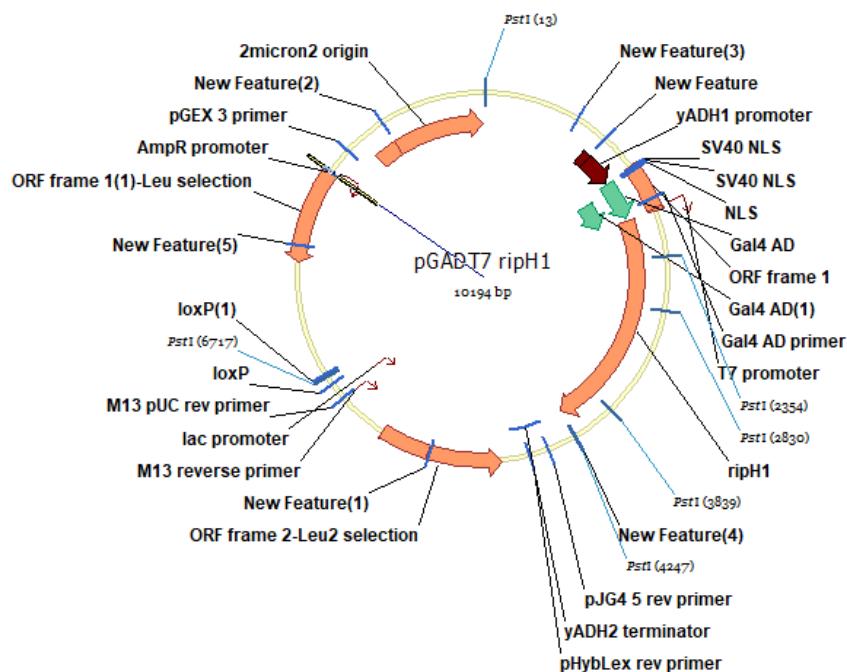
Για την τεχνική της κλωνοποίησης Golden Gate αρχικά σχεδιάστηκε *in silico* μέσω του προγράμματος Vector NTI, ο πλασμιδιακός χάρτης κάθε πλασμιδιακής κατασκευής. Με βάση τους συγκεκριμένους χάρτες σχεδιάστηκαν οι κατάλληλες πέψεις με ένζυμα περιορισμού, για τον έλεγχο των κατασκευών μετά την κλωνοποίηση. Στην [Εικόνα 9](#) έχουμε τον χάρτη με τον άδειο φορέα pGADT7_rfp ενώ στις [Εικόνα 10](#), [Εικόνα 11](#), [Εικόνα 12](#) και [Εικόνα 13](#) που ακολουθούν έχουμε τον τελικό χάρτη κάθε πλασμιδίου (γονίδιο τελεστή στον φορέα pGADT7).



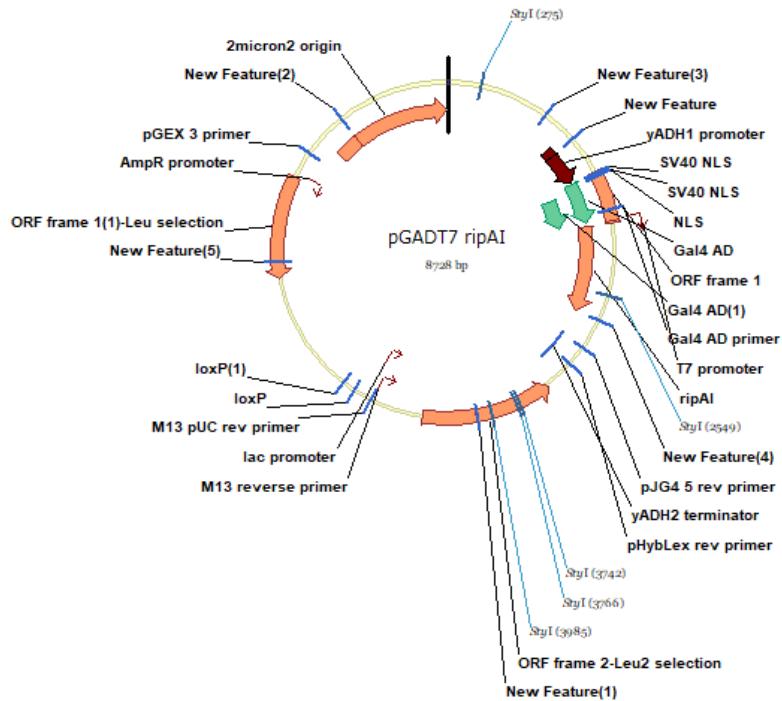
[Εικόνα 9:](#) Χάρτης του άδειου φορέα έκφρασης ζύμης pGADT7_rfp, από το πρόγραμμα Vector NTI.



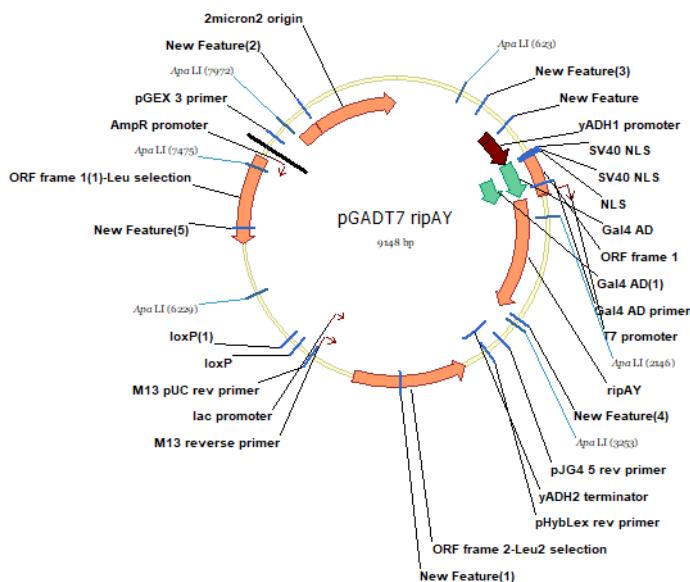
Εικόνα 10: Χάρτης του φορέα με τον τελεστή ripG6 μέσω του προγράμματος Vector NTI.



Εικόνα 11: Χάρτης του φορέα έκφρασης ζύμης με τον τελεστή ripH1 μέσω του προγράμματος Vector NTI.



Εικόνα 12: Χάρτης του φορέα έκφρασης ζύμης με τον τελεστή ripAI μέσω του προγράμματος Vector NTI.

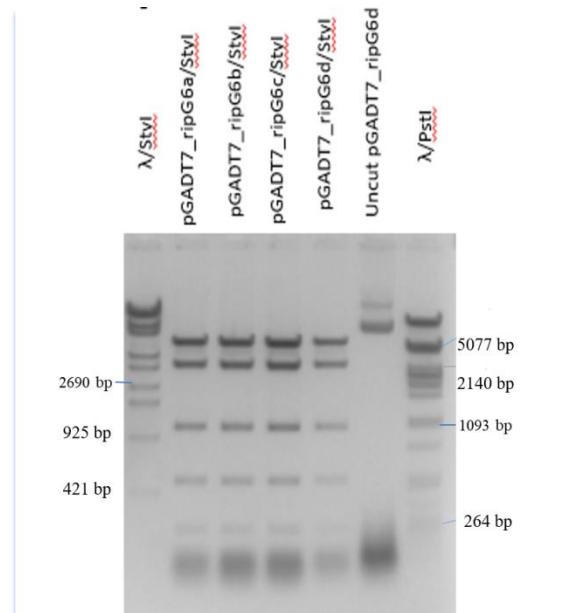


Εικόνα 13: Χάρτης του φορέα έκφρασης ζύμης με τον τελεστή ripAY μέσω του προγράμματος Vector NTI.

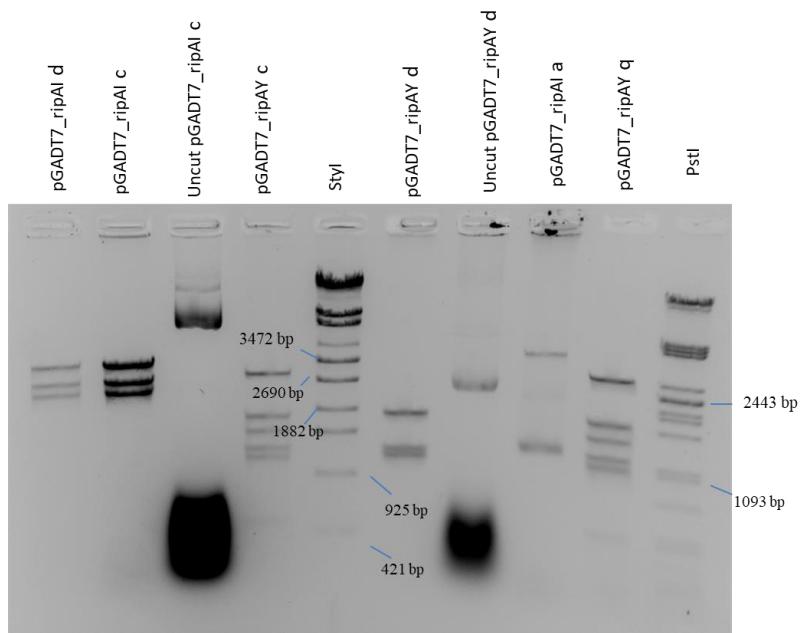
Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω:

Για το πλασμίδιο **pGADT7_ripG6** οι ζώνες που περιμέναμε μετά τις πέψεις που πραγματοποιήθηκαν με το ένζυμο StyI ήταν 5018, 2925, 1076, 498, 219, 24. Η ηλεκτροφόρηση επιβεβαίωσε την παρουσία των ζωνών που περιμέναμε και άρα του σωστού κατασκευάσματος σε όλες τις αποικίες που εξετάστηκαν, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 14.** Για το πλασμίδιο **pGADT7_ripAY** οι ζώνες που περιμέναμε μετά τις πέψεις που πραγματοποιήθηκαν με το ένζυμο ApalII ήταν 2976, 1799, 1523, 1246, 1107, 497 και για το πλασμίδιο **pGADT7_ripAI** οι ζώνες που περιμέναμε μετά τις πέψεις που πραγματοποιήθηκαν με το ένζυμο PstI ήταν 3490, 2768, 2470. Η ηλεκτροφόρηση επιβεβαίωσε την παρουσία των ζωνών που περιμέναμε σε μια από τις αποικίες που εξετάστηκαν για κάθε κατασκεύασμα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15.** Για το πλασμίδιο **pGADT7_ripH1** οι ζώνες που αναμέναμε ήταν μετά τις πέψεις που πραγματοποιήθηκαν με το ένζυμο PstI ήταν 3490, 2470, 2341, 1009, 476, 408. Η ηλεκτροφόρηση επιβεβαίωσε την παρουσία των ζωνών που περιμέναμε σε τέσσερις από τις αποικίες που εξετάστηκαν, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 16.**

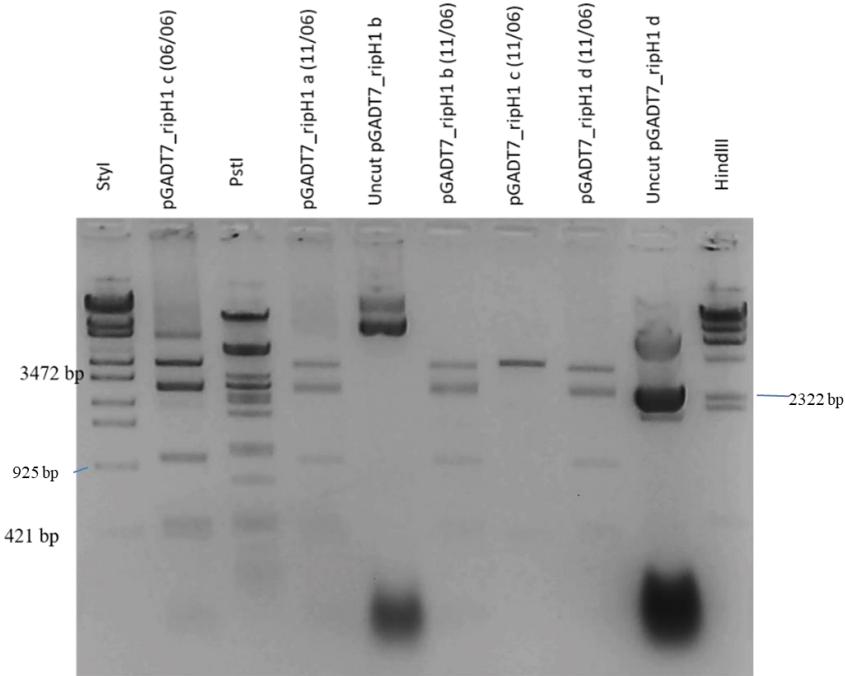
Τελικά επιλέχθηκαν οι αποικίες *E.coli* που έφεραν το επιθυμητό κατασκεύασμα για αποθήκευση του πλασμιδίου και την απομόνωσή του.



Εικόνα 14: Πήκτωμα αγαρόζης 1,2% μετά την ηλεκτροφόρηση των διαγνωστικών πέψεων με ένζυμο StyI του πλασμιδίου pGADT7_ripG6 (Η χρώση έγινε με Orange G).



Εικόνα 15: Πήκτωμα αγαρόζης 1,2% μετά την ηλεκτροφόρηση των διαγνωστικών πέψεων με ένζυμα ApalI και PstI, για τα πλασμίδια pGADT7_ripAY και pGADT7_ripAI, αντίστοιχα (Η χρώση έγινε με Orange G).

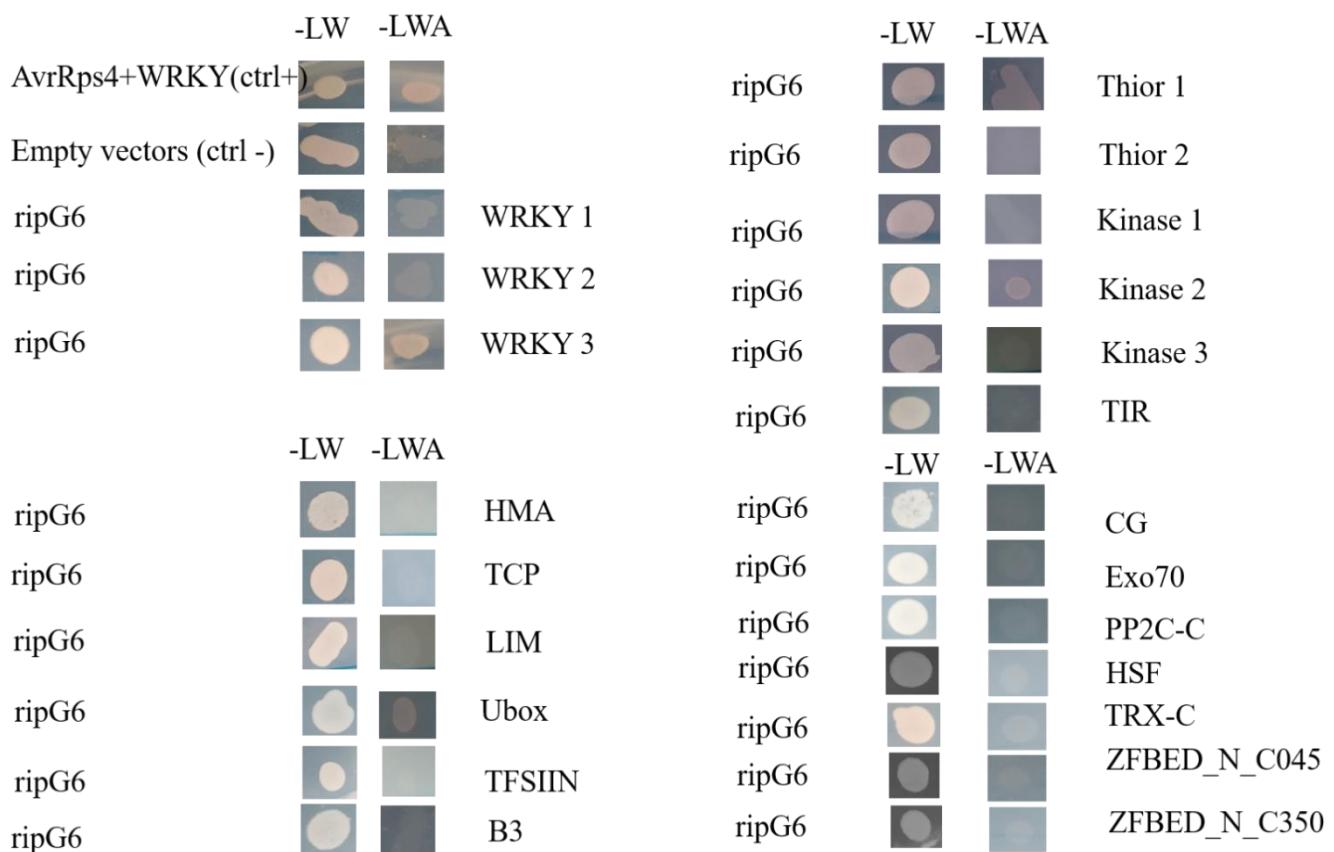


Εικόνα 16: Πήκτωμα αγαρόζης 1,2% μετά την ηλεκτροφόρηση των διαγνωστικών πέψεων με ένζυμο PstI του πλασμιδίου pGADT7_ripH1 (Η χρώση έγινε με Orange G).

(Για όλα τα παραπάνω οι μικρότερες ζώνες που περιμέναμε μετά τις πέψεις υπήρχαν, όμως ήταν εμφανείς σε πρώιμο στάδιο. Επομένως, όταν τραβήχτηκαν οι φωτογραφίες οι ζώνες αυτές είχαν χαθεί).

Έλεγχος Αλληλεπιδράσεων

Στην **Εικόνα 17** φαίνεται πως μετασχηματισμένα κύτταρα σακχαρομύκητα, που φέρουν τα πλασμίδια pGKBT7::WRKY 3 και pGADT7::RipG6, αναπτύσσονται απουσία αδενίνης. Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές και τα αποτελέσματα ήταν όμοια. Έτσι, σύμφωνα με όσα αναλύσαμε προηγουμένως για την διαδικασία του yeast two hybrid assay, εντοπίστηκε μια αλληλεπίδραση μεταξύ του τελεστή ripG6 της *Ralstonia solanacearum* με την επικράτεια WRKY ενός υποδοχέα NLR του κριθαριού (*Hordeum vulgare* ή Barley).



Εικόνα 17: Μετασχηματισμένα κύτταρα πρωτεϊνικών περιοχών NLR σε στέλεχος του ζαχαρομύκητα PJ69 4A σε αλληλεπίδραση με το πλασμίδιο pGDKT7_ripG6.

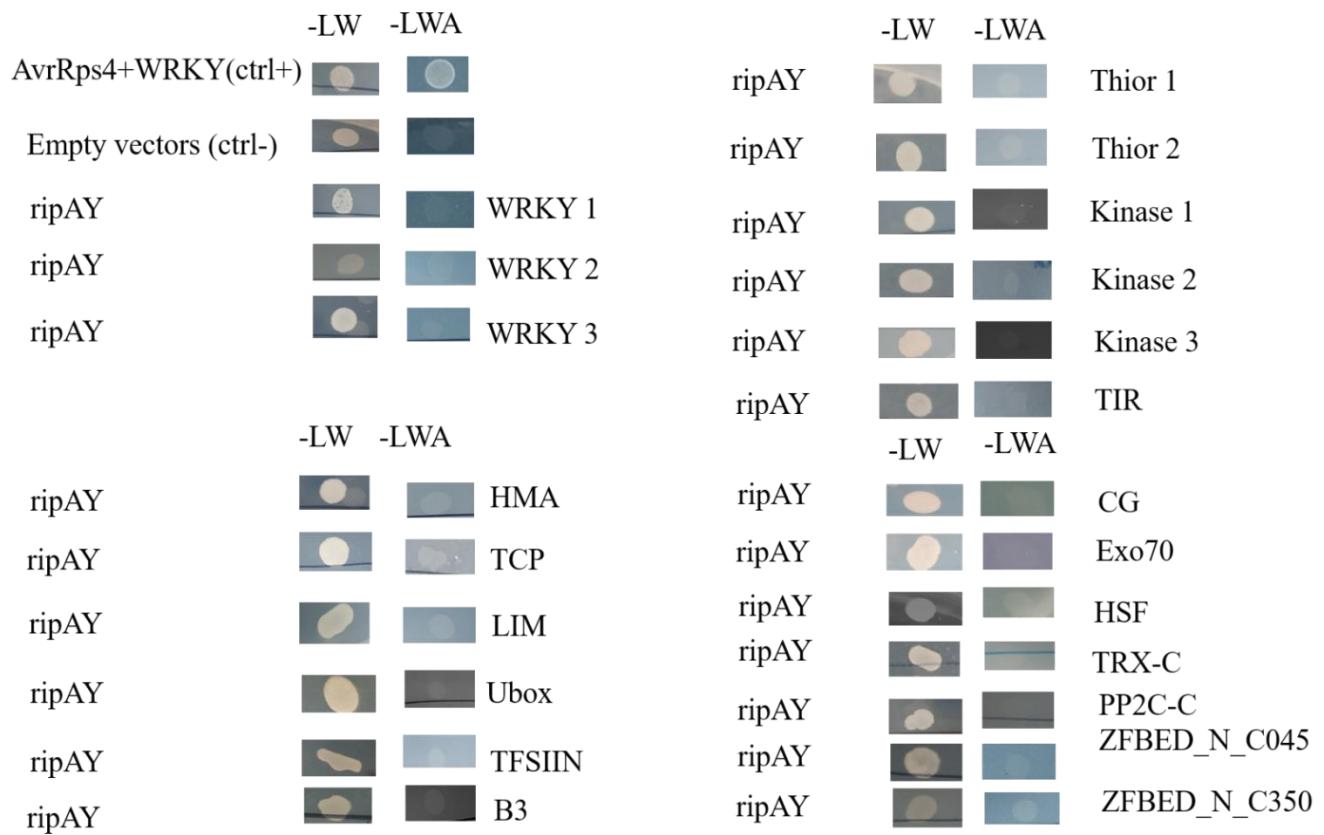
Στις Εικόνες 18, 19, και 20 που ακολουθούν παρατηρούμε τα αποτελέσματα του y2h assay για τους τελεστές ripG6, ripH1, ripAI και ripAY αντίστοιχα. Πρόκειται για ζεύγη φυτικών NLR ID περιοχών με τελεστές της *Ralstonia solanacearum* ανάμεσα στα οποία δεν βρέθηκε κάποιο ζεύγος που να αλληλοεπιδρά. Για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές.

	-LW	-LWA		-LW	-LWA	
AvrRps4+WRKY(ctrl+)						Thior 1
Empty vectors (ctrl-)						Thior 2
ripH1			WRKY 1			Kinase 1
ripH1			WRKY 2			Kinase 2
ripH1			WRKY 3			Kinase 3
	-LW	-LWA				TIR
ripH1			HMA			CG
ripH1			TCP			Exo70
ripH1			LIM			PP2C-C
ripH1			Ubox			HSF
ripH1			TFSIIN			TRX-C
ripH1			B3			ZFBED_N_C045
ripH1						ZFBED_N_C350

Εικόνα 18: Μετασχηματισμένα κύτταρα πρωτεΐνικών περιοχών NLR σε στέλεχος του ζαχαρομύκητα PJ69 4A σε αλληλεπίδραση με το πλασμίδιο pGBDKT7_ripH1.

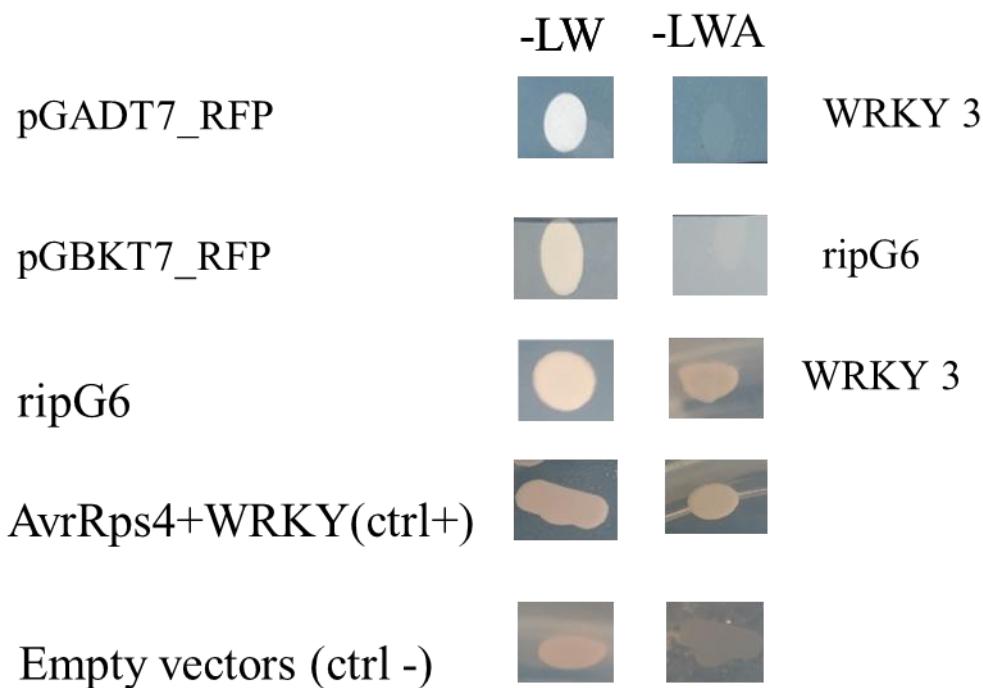
	-LW	-LWA		-LW	-LWA	
AvrRps4+WRKY(ctrl+)						Thior 1
Empty vectors (ctrl-)						Thior 2
ripAI			WRKY 1			Kinase 1
ripAI			WRKY 2			Kinase 2
ripAI			WRKY 3			Kinase 3
						TIR
	-LW	-LWA		-LW	-LWA	
ripAI			HMA			CG
ripAI			TCP			Exo70
ripAI			LIM			HSF
ripAI			Ubox			TRX-C
ripAI			TFSIIN			PP2C-C
ripAI			B3			ZFBED_N_C045
						ZFBED_N_C350

Εικόνα 19: Μετασχηματισμένα κύτταρα πρωτεΐνικών περιοχών NLR σε στέλεχος του ζαχαρομύκητα PJ69 4A σε αλληλεπίδραση με το πλασμίδιο pGBDKT7_ripAI



Εικόνα 20: Μετασχηματισμένα κύτταρα πρωτεΐνικών περιοχών NLR σε στέλεχος του ζαχαρομόκητα PJ69 4A σε αλληλεπίδραση με το πλασμίδιο pGBDKT7_ripAY.

Στην **Εικόνα 21** που ακολουθεί παρατηρούμε αποτέλεσμα πειράματος που συμπεριλήφθηκε στην παρούσα μελέτη λόγω της θετικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του τελεστή ripG6 και της πρωτεΐνης WRKY του κριθαριού. Σκοπό είχε την απόδειξη ότι η WRKY πρωτεΐνη μόνη της και ο τελεστής ripG6 μόνος του δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν την έκφραση του γονιδίου μάρτυρα, και άρα δεν υπάρχει αυτοενεργότητα (autoactivity) τους.



Εικόνα 21: Πειραματική απόδειξη ανενεργής κατάστασης τόσο της πρωτεΐνης WRKY όσο και του τελεστή ripG6 για την ενεργοποίηση έκφρασης του γονιδίου μάρτυρα.

Συζήτηση

Ολοκληρώνοντας τον έλεγχο και με τους τέσσερις τελεστές της *Ralstonia solanacearum* εντοπίσαμε αλληλοεπίδραση μεταξύ του τελεστή ripG6 και της πρωτεΐνης WRKY του κριθαριού. Τα αρνητικά αποτελέσματα δεν σημαίνουν απαραίτητα ότι δεν υπάρχει αλληλεπίδραση, όμως σε αυτήν την περίπτωση πρέπει να δώσουμε έμφαση στην πιθανή βιολογική σημασία των θετικών αποτελεσμάτων.

Οι WRKY πρωτεΐνικές περιοχές απαντούν συχνά ως φυτικές NLR – ID επικράτειες πολλών μονοκότυλων και δικότυλων φυτών (Sarris et al. 2016). Επίσης, έχει δειχθεί ότι οι WRKY περιοχές που απαντούν σε NLR υποδοχείς μπορούν να λειτουργήσουν ως πρωτεΐνες «δολώματα» και κατά συνέπεια να αναγνωρίσουν πολλούς τελεστές από διαφορετικά παθογόνα (Baggs et al 2017). Βέβαια, σύμφωνα με τα όσα προαναφέρθηκαν για το ID μοντέλο αναγνώρισης NLR-τελεστών, το γεγονός ότι ο τελεστής RipG6 φαίνεται να αλληλοεπιδρά με μια τέτοια επικράτεια θεωρείται σημαντικό εύρημα, καθώς μας προϊδεάζει για πιθανή στόχευση των WRKY πρωτεΐνών από το συγκεκριμένο τελεστή του παθογόνου.

Η οικογένεια WRKY είναι μια μεγάλη οικογένεια πρωτεΐνων, περιέχουν συντηρημένο επταπεπτίδιο WRKYGQK που ακολουθείται, από ένα μοτίβο δακτυλίου - ψευδαργύρου C2H2 (CX4-5CX22-23HXH) ή C2HC (CX7CX23–24HXC). Συνδέονται με μια συγκεκριμένη αλληλουχία promoter στο γονίδιο στόχο, γνωστό ως W-box, και μπορούν να ρυθμίσουν θετικά ή αρνητικά την έκφραση του γονιδίου στόχου (Xue et al. 2019). Οι μεταγραφικοί παράγοντες WRKY διαδραματίζουν ζωτικό ρυθμιστικό ρόλο σε διάφορες αναπτυξιακές και φυσιολογικές διεργασίες, όπως η βλάστηση των σπόρων, ο δευτερογενής μεταβολισμός, η ανάπτυξη τριχώματος, η γήρανση των φύλλων και η διαφοροποίηση των οφθαλμών και των ανθών. Επίσης, εμπλέκονται σε μια σειρά από αποκρίσεις αβιοτικού στρες όπως το κρύο, η ζέστη, η ξηρασία και η αλατότητα αλλά και βιοτικού στρες όπως για παράδειγμα οι μύκητες, τα βακτήρια, οι νηματώδεις, ιοί κ.λπ. (Singh et al 2019). Έχει δειχθεί ότι μέλη της οικογένειας WRKY μπορεί να είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές ή καταστολείς μονοπατιών που σχετίζονται με αποκρίσεις στο βιοτικό stress και συνολικά έχουν βασικό ρόλο στην ανοσία PTI και ETI. Επομένως, πολλά από τα μέλη της οικογένειας μπορούν να θεωρηθούν κοινός στόχος διαφόρων παθογόνων (Rushton et al. 2010).

Στην παρούσα εργασία λοιπόν, εντοπίστηκε αλληλεπίδραση μεταξύ του σημαντικού τελεστή της *Ralstonia solanacearum* RipG6 και μιας αλληλουχίας WRKY, που αποτελεί NLR-ID περιοχή. Η αλληλεπίδραση αυτή με τη σωστή προσέγγιση θα μπορούσε να οδηγήσει στην εύρεση ενός μοριακού μηχανισμού παθογένειας που χρησιμοποιεί το βακτήριο για να μολύνει τον ξενιστή του.

Όπως είδαμε και στα αποτελέσματα φάνηκε να υπήρχε αλληλεπίδραση και μεταξύ του ripG6 και της kinase3, του ripG6 και της Ubox, του ripG6 και της Thior1, του ripH1 και της kinase 2, του ripH1 και της C045, του ripH1 WRKY1, του ripH1 και της kinase3. Καθώς και μεταξύ του ripAI και της WRKY1 και του ripAI και της kinase3, και τέλος μεταξύ του ripAY και της TCP και του ripAY και της C350. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές ήταν ασθενείς και έπειτα από τρεις επαναλήψεις δεν είχαμε ξανά αλληλεπιδράσεις.

Πρώτο βήμα θα είναι να εντοπιστεί η φυσιολογική πρωτεΐνη, ή πρωτεΐνες WRKY, που ομοιάζουν σε επίπεδο αμινοξέων με την WRKY-NLR-ID περιοχή ενδιαφέροντος, σε έναν ξενιστή του παθογόνου (π.χ. *Solanum lycopersicum*–τομάτα), μέσω της ανάλυσης BLASTp στη βάση δεδομένων NCBI. Οι εν λόγω πιθανοί στόχοι του τελεστή θα πρέπει να κλωνοποιηθούν σε κατάλληλους πλασμιδιακούς φορείς για την περαιτέρω μελέτη τους. Η μελέτη αυτή περιλαμβάνει τον έλεγχο της αλληλοεπίδρασης του τελεστή με τις πρωτεΐνες αυτές μέσω του συστήματος δύο υβριδίων του σακχαρομύκητα, αλλά και την επιβεβαίωση της αλληλοεπίδρασης με άλλες τεχνικές όπως η συν-ανοσοκατακρήμνιση (co-Immunoprecipitation ή co-IP) ή η *in planta* BioFluorescent Complementation (BiFC). Επιπλέον δεδομένα που θα στηρίξουν την μελέτη του μηχανισμού είναι ο υποκυτταρικός εντοπισμός τόσο του τελεστή, όσο και της πρωτεΐνης-στόχου μέσα στα φυτικά κύτταρα, ο έλεγχος ενζυματικής δράσης του τελεστή, ο έλεγχος της ικανότητάς του να αναγνωρίζεται από το φυτικό ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της επαγωγής αντίδρασης υπερευαισθησίας κ.ά.

Παράρτημα

Τελεστής ripH1:

GenBank: KAF3461530.1

LOCUS KAF3461530 783 aa linear BCT 18-MAR-2020

DEFINITION RipH1-effector family protein [Ralstonia solanacearum].

ACCESSION KAF3461530

VERSION KAF3461530.1

DBLINK BioProject: PRJNA593908

BioSample: SAMN13503698

DBSOURCE accession WSNR01000001.1

KEYWORDS .

SOURCE Ralstonia solanacearum

ORGANISM Ralstonia solanacearum

Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;
Burkholderiaceae; Ralstonia.

REFERENCE 1 (residues 1 to 783)

AUTHORS Prokchorchik,M., Pandey,A., Moon,H., Kim,W., Jeon,H., Segonzac,C.,
Sohn,K.H. and Mccann,H.

TITLE Phylogenetic analysis of Korean Ralstonia solanacearum strains
reveals recombination hotspots and geographically relevant targets
for bacterial wilt resistance breeding efforts

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (residues 1 to 783)

AUTHORS Prokchorchik,M., Mccann,H. and Sohn,K.H.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (13-DEC-2019) POSTECH Biotech Center, POSTECH, 77
Cheongam-ro, Pohang 37673, Korea, Republic of

COMMENT Bacteria and source DNA available from Kee Hoon Sohn lab,
POSTECH,

77 Cheongam-ro, Nam-gu, Pohang-si, Gyeongsangbuk-do, South Korea.

```

##Genome-Assembly-Data-START##
Assembly Date      :: 2019
Assembly Method    :: Unicycler (hybrid assembly) v. 0.4.7
Genome Representation :: Full
Expected Final Version :: Yes
Genome Coverage     :: 300.0x
Sequencing Technology :: Oxford Nanopore GridION; Illumina
##Genome-Assembly-Data-END##

```

Method: conceptual translation.

FEATURES Location/Qualifiers

source	1..783
	/organism="Ralstonia solanacearum"
	/strain="Pe_1"
	/isolation_source="leaf tissue"
	/host="Capsicum annuum"
	/db_xref="taxon:305"
	/country="South Korea: Seosan"
	/collection_date="2000"
Protein	1..783
	/product="RipH1-effector family protein"
CDS	1..783
	/locus_tag="GO278_02269"
	/coded_by="complement(WSNR01000001.1:2490667..2493018)"
	/inference="ab initio prediction:Prodigal:2.6"
	/transl_table=11

ORIGIN

```

1 maggrvgara vresaqtpvs adaststs tstststs tststsaaas ppatagrqaa
61 rpaelrlglas apssrassss tgglrsrqasl paravaretp eapvdvfprt mrhvnawrav
121 aererkleal gpehkglspe remryacdai asiqtclqal aamkrqqeip pgwdvdgrea
181 ellqllivaa digvctrhet lnkladqdav fraqrsgtae aetvsgpdgp rpdtieapep
241 agatapspse haaisplsal ereptiqaw laeftscrsa ldqiirraev cgaprtvqta
301 ldtmlpnaiy dklrcsgmq alhgilaas anrfvelsrq malpdlavra dellaawhke
361 naameaavda lvvhgapdkp tqrlnpkald ghqavieaya egldrvglnl cladaadiem

```

421 ddadgvwrsm mevvhaisay kasllefset agraktqpea pqpepessea aepalsepp
481 paarpagasg gtrrkhrkpg mraagspsvpe pvsaralvpa dtrtvaqkqa dtllrcrid
541 ratvaqlgn ivelaqrlge dtrvlalsn drtrdaviaa kfiwgsvgrw fgepdrvrsa
601 kaslhagdhd rigrlnwlq alelierhma pleadmlkrp rypkakhlek llqakgiefv
661 ggpgrlppte dvnavgtlfg mriqfkplsn rdqvapwfvh lhtnrpvtaq alptlafedf
721 tavhlkttdrd knkgaqweaa mralgyteak vhraaigeal lhklfaqaak qpkrnkggvr
781 pag //

Τελεστής ripG6:

LOCUS KAF3461556 620 aa linear BCT 18-MAR-2020

DEFINITION RipG6-effector family protein [Ralstonia solanacearum].

ACCESSION KAF3461556

VERSION KAF3461556.1

DBLINK BioProject: [PRJNA593908](#)

BioSample: [SAMN13503698](#)

DBSOURCE accession [WSNR01000001.1](#)

KEYWORDS .

SOURCE Ralstonia solanacearum

ORGANISM [Ralstonia solanacearum](#)

Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;
Burkholderiaceae; Ralstonia.

REFERENCE 1 (residues 1 to 620)

AUTHORS Prokchorchik,M., Pandey,A., Moon,H., Kim,W., Jeon,H., Segonzac,C.,
Sohn,K.H. and Mccann,H.

TITLE Phylogenetic analysis of Korean Ralstonia solanacearum strains
reveals recombination hotspots and geographically relevant targets
for bacterial wilt resistance breeding efforts

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (residues 1 to 620)

AUTHORS Prokchorchik,M., Mccann,H. and Sohn,K.H.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (13-DEC-2019) POSTECH Biotech Center, POSTECH, 77

Cheongam-ro, Pohang 37673, Korea, Republic of
COMMENT Bacteria and source DNA available from Kee Hoon Sohn lab,
POSTECH,
77 Cheongam-ro, Nam-gu, Pohang-si, Gyeongsangbuk-do, South Korea.

##Genome-Assembly-Data-START##
Assembly Date :: 2019
Assembly Method :: Unicycler (hybrid assembly) v. 0.4.7
Genome Representation :: Full
Expected Final Version :: Yes
Genome Coverage :: 300.0x
Sequencing Technology :: Oxford Nanopore GridION; Illumina
##Genome-Assembly-Data-END##

Method: conceptual translation.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..620
 /organism="Ralstonia solanacearum"
 /strain="Pe_1"
 /isolation_source="leaf tissue"
 /host="Capsicum annuum"
 /db_xref="taxon:[305](#)"
 /country="South Korea: Seosan"
 /collection_date="2000"
Protein 1..620
 /product="RipG6-effector family protein"
CDS 1..620
 /locus_tag="GO278_02298"
 /coded_by="complement(WSNR01000001.1:2525601..2527463)"
 /inference="ab initio prediction:Prodigal:2.6"
 /transl_table=[11](#)

ORIGIN

1 mvsriptgnr gqgngieqsa sshateatpw lgvnlpypyghw lpssarsvvs rassllggla
61 nfrwggpsas arpapnirsa aiapaqqtlp pelwqqiatl agarprramr evslelrnas
121 ravvthltis dpamfrqlsl ypalksvrfk galtealka lpptlehlei grctgsaisa

181 eglahlaamp lkslnlNGie igvegarlla tstslasls1 mgcdigdraa talaasssiq
241 clylsvnrig rdgaqalaga plvslnlhnn eignegaral atsrltstd vsnngvgnag
301 aeafagntvl kqlslaggmi sgdgaqalad nksltldls nnrlgdagaq aladsesfvs
361 lkllgneiga dgaealar nv vlqshlnsyn pigfwgvn al graklrkldl cacaidsdga
421 salarnts1a slylgsnr1g ddgaralakn sttl1lnlsg nnihavgaqa lasndslit1
481 dlsrngigdd gtaalachpr ltslnlsrnq igstgaqqla ksatlaeldl senrigpega
541 ealarstvtl tlnvsynaig eagaralaes vsltstdarr ngigeggakv leantritgt
601 pqnpnflaed vprpdvrwrd

Τελεστής ripAI:

LOCUS CAD17989 276 aa linear BCT 27-FEB-2015

DEFINITION hypothetical protein RSp0838 [Ralstonia solanacearum GMI1000].

ACCESSION CAD17989

VERSION CAD17989.2

DBLINK BioProject: [PRJNA13](#)

BioSample: [SAMEA3138192](#)

DBSOURCE embl accession [AL646053.1](#)

KEYWORDS .

SOURCE Ralstonia solanacearum GMI1000

ORGANISM [Ralstonia solanacearum GMI1000](#)

Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;

Burkholderiaceae; Ralstonia.

REFERENCE 1 (residues 1 to 276)

AUTHORS Salanoubat,M., Genin,S., Artiguenave,F., Gouzy,J., Mangenot,S.,

Arlat,M., Billault,A., Brottier,P., Camus,J.C., Cattolico,L.,

Chandler,M., Choisne,N., Claudel-Renard,C., Cunnac,S., Demange,N.,

Gaspin,C., Lavie,M., Moisan,A., Robert,C., Saurin,W., Schiex,T.,

Siguier,P., Thebault,P., Whalen,M., Wincker,P., Levy,M.,

Weissenbach,J. and Boucher,C.A.

TITLE Genome sequence of the plant pathogen Ralstonia solanacearum

JOURNAL Nature 415 (6871), 497-502 (2002)

PUBMED [11823852](#)

REFERENCE 2 (residues 1 to 276)

AUTHORS Boucher,C.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (03-APR-2006) Genoscope and CNRS UMR-8030, 2 rue Gaston

Cremieux, CP5706, 91057 Evry Cedex, France, Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes INRA-CNRS, BP27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France, Fondation Jean Dausset-CEPH, 27 rue Juliette Dodu, 75010 Paris, France, LMGM CNRS 118 Route de Narbonne, F 31062 Toulouse Cedex 4, Genoscope and INRA URGV, 2 rue Gaston Cremieux, CP5706, 91057 Evry Cedex, France, Laboratoire de Biometrie et Intelligence Artificielle INRA, BP27, F31326 Castanet-Tolosan Cedex. Laboratoire de Genetique Cellulaire INRA, BP27, F31326 Castanet-Tolosan Cedex

COMMENT On May 11, 2006 this sequence version replaced [CAD17989.1](#).

Christian.Boucher@toulouse.inra.fr

<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/annotation/iANT/bacteria/ralsto>.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..276

/organism="Ralstonia solanacearum GMI1000"
/strain="GMI1000"
/db_xref="taxon:[267608](#)"

[Protein](#) 1..276

/product="hypothetical protein"
/function="miscellaneous; unknown"

[CDS](#) 1..276

/locus_tag="RSp0838"
/old_locus_tag="RS05357"

/coded_by="complement(AL646053.1:1058924..1059754)"
/inference="ab initio prediction:FrameD"
/transl_table=11
/db_xref="EnsemblGenomes-Gn:[RSp0838](#)"
/db_xref="EnsemblGenomes-Tr:[CAD17989](#)"
/db_xref="UniProtKB/TrEMBL:[Q8XRJ3](#)"

ORIGIN

1 mmslwryrat slcncwimqp aalaglffpa rerhtaaqpi lppraaqtgc pgnqtnpfcs
61 sflalalnrd rgemstegcl annlirspga epgpgravap hlqthtmipk riggnslpsl
121 agntpadrhg epaaaaplapt artaggqlae lntprtprqp pamdvlkrrr kpetrqlhr
181 lrkalgeisp apsspeqawa dirnamarad lagwtlpals deaairhadg sveiglisha
241 ivfnpggafr ildllspgsp yfemaghggi afvapr

Τελεστής ripAY:

LOCUS OAK89062 416 aa linear BCT 17-MAY-2016

DEFINITION type III effector protein [Ralstonia solanacearum].

ACCESSION OAK89062

VERSION OAK89062.1

DBLINK BioProject: [PRJNA286126](#)

BioSample: [SAMN03765174](#)

DBSOURCE accession [LFJP01000080.1](#)

KEYWORDS .

SOURCE Ralstonia solanacearum

ORGANISM [Ralstonia solanacearum](#)

Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales;
Burkholderiaceae; Ralstonia.

REFERENCE 1 (residues 1 to 416)

AUTHORS Weibel,J., MacIntyre,A., Tran,T. and Allen,C.

TITLE Genomic sequence of Ralstonia solanacearum strain isolated from
Osteospermum in Guatemala in 2015

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (residues 1 to 416)

AUTHORS Weibel,J., MacIntyre,A., Tran,T. and Allen,C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (08-JUN-2015) Plant Pathology, University of Wisconsin

Madison, 1630 Linden Drive Room 885, Madison, WI 53706, USA

COMMENT Annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (released 2013). Information about the Pipeline can be found here: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/

##Genome-Assembly-Data-START##

Assembly Date :: 2015

Assembly Method :: Velvet v. 1.2.10

Genome Representation :: Full

Expected Final Version :: Yes

Genome Coverage :: 139.0x

Sequencing Technology :: Illumina MiSeq

##Genome-Assembly-Data-END##

##Genome-Annotation-Data-START##

Annotation Provider :: NCBI

Annotation Date :: 06/22/2015 11:00:10

Annotation Pipeline :: NCBI Prokaryotic Genome Annotation
Pipeline

Annotation Method :: Best-placed reference protein set;
GeneMarkS+

Annotation Software revision :: 2.10

Features Annotated :: Gene; CDS; rRNA; tRNA; ncRNA;
repeat_region

Genes :: 4,969

CDS :: 4,820

Pseudo Genes	:: 90
rRNAs	:: 5 (5S, 16S, 23S)
tRNAs	:: 53
ncRNA	:: 1
Frameshifted Genes	:: 33
##Genome-Annotation-Data-END##	
FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..416
	/organism="Ralstonia solanacearum"
	/strain="UW757"
	/isolation_source="infected plant"
	/host="Osteospermum"
	/db_xref="taxon: 305 "
	/country="Guatemala"
	/collection_date="26-Dec-2014"
<u>Protein</u>	1..416
	/product="type III effector protein"
<u>Region</u>	126..>252
	/region_name="GGCT_like"
	/note="GGCT-like domains, also called AIG2-like family. Gamma-glutamyl cyclotransferase (GGCT) catalyzes the formation of pyroglutamic acid (5-oxoproline) from dipeptides containing gamma-glutamyl, and is a dimeric protein. In Homo sapiens, the protein is...; cl22886"
	/db_xref="CDD: 304619 "
<u>CDS</u>	1..416
	/locus_tag="AB851_21290"
	/coded_by="LFJP01000080.1:83069..84319"
	/inference="EXISTENCE: similar to AA sequence:RefSeq:WP_011004312.1"

/note="Derived by automated computational analysis using
gene prediction method: Protein Homology."

/transl_table=11

ORIGIN

1 meristnais ktvarsdl sn gssapprkkn gspprrahap llpladrs lt aiskpnetlg
61 srlapvpqra vhasavpsaa gnwnplsrlk peelagipet vveklgkdlh dlyedvqskg
121 lnyvpvfgyl slryknfhel gkr sqdevre gkd wv pasld nhalfv mst qyrghh qhpg
181 vvaglsqseg samdg vilkl pvgnaeella rvirrellde ndlih pvp at ppagg t glag
241 satagpatpl spkkprsn lm yssavr pvtl pngakvralv fvt npdsaks lasvfk dreg
301 vspqr laylm tstskgd lgg paidywkr fv etcetaktav ppivsqairl asdwp daftg
361 epaapddm pr qhqeawfra magaaaprrv wherkpe psp dgasaggt lg tqpkpd

Βιβλιογραφία

Adachi, Hiroaki, Lida Derevnina, and Sophien Kamoun. 2019. "NLR singletons, pairs, and networks: evolution, assembly, and regulation of the intracellular." *Current Opinion in Plant Biology*, 50: 121-131.

Ailloud Florent, Lowe Tiffany, Cellier Gilles, Roche David, Allen Caitlyn and Prior Philippe. 2015. "Comparative genomic analysis of *Ralstonia solanacearum* reveals candidate genes for hostspecificity". *BMC Genomics* 16:270.

Asolkar Trupti, and Raman Ramesh. 2018. "Identification of virulence factors and type III effectors of phylotype I, Indian *Ralstonia solanacearum* strains Rs-09-161 and Rs-10-244." *Journal of Gentics*, 97, pp:55–66.

Azevedo Cristina, Maria João Santos-Rosa, and Ken Shirasu. 2001. "The U-box protein family in plants." *Trends in Plant Science*, 6 pp: 354-358.

Baggs E., G. Dagdas , and KV Krasileva. 2017. "NLR diversity, helpers and integrated domains: making sense of the NLR IDentity." *Current Opinion in Plant Biology*, 38:59-67.

Buttner Daniela, Yang-He Sheng. 2009. " Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria". *Plant Physiology* Vol. 150, pp. 1656–1664

Cesari Stella. 2017. "Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors." *New Phytologist* 219 (1), 17-24.

Citra Octavina, Ayudhany Sukarta, Erik J. Slootweg, and Aska Goverse. 2016. "STRUCTURE-INFORMED INSIGHTS FOR NLR FUNCTIONING IN PLANT IMMUNITY." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 56:134-149.

Criekinge Wim Van, and Rudi Beyaert. 1999. "Yeast Two-Hybrid: State of the Art." *Biological Procedures Online* 2, 1–38.

Denny Tim. 2007. "Plant pathogenic *Ralstonia* species". *Plant-Associated Bacteria* pp 573-644.

Deslandes, Laurent, and Stephane Genin. 2014. "Opening the *Ralstonia solanacearum* type III effector tool box: insights into host cell subversion mechanisms." *Current Opinion in Plant Biology* 20:110-7.

Duxbury Zane, Yan Ma, Oliver J. Furzer, Sung Un Huh, Volkan Cevik, Jonathan D.G. Jones, και Panagiotis F. Sarris. 2016. «Pathogen perception by NLRs in plants and animals: Parallel worlds.» *BioEssays*38(8):769-81.

Engler Carola, Mark Youls, Ramona Gruetzner, Tim Martin Ehnert, Stefan Werner , Jonathan D.G. Jones, Nicola J. Patron, and Sylvestre Marillonnet. 2014. "A Golden Gate Modular Cloning Toolbox for Plants." *ACS Synthetic Biology* 3, 11, 839–843.

Fields, Stanley. 1993. "The Two-Hybrid System to Detect Protein-Protein Interactions." *Methods* 5 pp:116-124

Folter Stefan, and Richard G.H Immink. 2011. "Yeast Protein–Protein Interaction Assays and Screens." *Methods in Molecular Biology* 754:145-65

Fritsch, E.F, and T. Maniatis. 2003. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Galan Jorge E., Maria Lara-Tejero, Thomas C. Marlovits, and Samuel Wagner. 2014. «Bacterial Type III Secretion Systems: Specialized Nanomachines for Protein Delivery into Target Cells.» *The Annual Reviews*68:415-38.

Gedvilaite Alma and Sasnauskas Kęstutis. 1994. " Control of the expression of the ADE2 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Current Genetics* 25:475-479

Genin Stephane and Timothy P. Denny. 2012. "Pathogenomics of the Ralstonia solanacearum Species Complex". *Annual Review of Phytopathology*50:67-89.

Greenberg Jean T., Allan Guo, Daniel F. Klessig, and Frederick M. Ausubel. 1994. "Programmed Cell Death in Plants: A Pathogen-Triggered Response Activated Coordinately with Multiple Defense Functions." *Cell* 77 pp: 551-563.

Guo Deyin, Mina Liisa Rajamaki, and Jari Valkonen. 2008. "Protein–Protein Interactions: The Yeast Two-Hybrid System." *Methods in Molecular Biology*451:421-39.

Hanahan Douglas, Joel Jessee, and Fredric R. Bloom. 1991. "Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria." *Methods in Enzymology* 204:63-113.

Hurley Brenden, Rajagopal Subramaniam, David S. Guttman, and Darell Desveaux. 2014. "Proteomics of effector-triggered immunity (ETI) in plants." *Virulence*5(7): 752–760.

Hybrigenics Services " YEAST TWO-HYBRID PRINCIPLE" <https://www.hybrigenics-services.com/contents/resources/yeast-two-hybrid-principle>

Jan Erwig, Hassan Ghareeb, Michaela Kopischke, Ronja Hacke, Alexandra Matei, Elena Petutschnig, Volker Lipka. 2017. "Chitin-induced and CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE1 (CERK1) phosphorylation-dependent endocytosis of *Arabidopsis thaliana* LYSIN MOTIF-CONTAINING RECEPTOR-LIKE KINASE5 (LYK5)." *New Phytologist* 215 pp: 382-396.

James Philip, Halladay John and Craig Elizabeth A. 1996. " Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast". *Genetics* (144):1425–36

Jie Zhang, and Zhou Jian-Min. 2010. "Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures." *Molecular Plant*3(5):783-93.

Jonathan D. G. Jones, Russell E. Vance, Jeffery L. Dangl. 2016. «Intracellular innate immune.» *Science*354(6316).

Jonathan D.GJones, and Jeffery L. Dangl. 2006. "The plant immune system." *Nature*444, pages323–329.

Kadota Yasuhiro, Ken Shirasu, and Raphael Guerois. 2010. "NLR sensors meet at the SGT1–HSP90 crossroad." *Trends in Biochemical Sciences*35(4):199-207.

Kapos Paul, Karen Thulasi Devendrakumar, and Xin Li. 2019. "Plant NLRs: From Discovery to Application." *Plant Science* 279:3-18.

Kelman A. 1953 " The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*". North Carolina Agricultural Experiment Station

Kerppola Tom K. 2006. " Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells" *Nat Protoc* 1, 1278–1286

Khan Madiha, Derek Seto, Rajagopal Subramaniam, and Darrell Desveaux. 2018. "Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets." *The Plant Journal* 93(4):651-663.

Leon Ines de Ponce and Marcos Montesano. 2013. "Activation of Defense Mechanisms against Pathogens in Mosses and Flowering Plants ." *International Journal of Molecular Sciences* 14(2): 3178–3200.

Lehti-Shiu, Melissa D., and Shin Han Shiu. 2012. "Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily." *Philosophical Transactions B* 367(1602):2619-39.

Liu Ying, Tang Yuanman, Qin Xiyun, Yang Liang, Jiang Gaofei, Li Shili, and Ding Wei. 2017. " Genome Sequencing of Ralstonia solanacearum CQPS-1, a Phylotype I Strain Collected from a Highland Area with Continuous Cropping of Tobacco". *Frontiers in Microbiology* 8: 974

Luban Jeremy, and Stephen P. Goff. 1995. "The yeast two-hybrid system for studying protein—protein interactions." *Current Opinion in Biotechnology* 6(1):59-64.

Maple Jodi, and Simon G. Moller. 2007. "Yeast Two-Hybrid Screening." *Circadian Rhythms. Methods in Molecular Biology* 362 pp: 207-223.

Masters Shane C. 2004. "Co-Immunoprecipitation from Transfected Cells". *Methods In Molecular Biology* 337-350.

Meister Alton. 1995. " Glutathione Metabolism". *Methods in enzymology*. Vol. 251 pp: 3-7

Mount David W. 2004. " Using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)" *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*, 2nd edition

Nürnberg Thorsten and Frederic Brunner. 2002. "Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns." *Current Opinion in Plant Biology* 5(4):318-24.

Nuruzzaman Mohammed, Akhter Most Sharon, Kouji Satoh, Turki Al-Shammary, Takumi Shimizu, Takahide Sasaya, Toshihiro Omura, and Shoshi Kikuchi. 2012. "The thioredoxin gene family in rice: Genome-wide identification and expression profiling

under different biotic and abiotic treatments." Biochemical and Biophysical Research Communications 423 pp: 417-423.

Peeters Nemo, Sébastien Carrère, Maria Anisimova, Laure Plener, Anne Claire Cazalé, and Stephane Genin. 2013. "Repertoire, unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the Ralstonia solanacearum species complex." BMC Genomics 14, 859.

Prior P., Fegan M. 2005. "Recent developments in the phylogeny and classification of ralstonia solanacearum". Acta Horticulturae pp:127-136

Remigi Philippe , Maria Anisimova, Alice Guidot, Stéphane Genin, και Nemo Peeters. 2011. «Functional diversification of the GALA type III effector family contributes to Ralstonia solanacearum adaptation on different plant hosts.» The New Phytologist 192(4): 976–987.

Sabbagh Cyrus Raja Rubenstein , Sébastien Carrere, Fabien Lonjon, Fabienne Vailleau, Alberto P. Macho, Stephane Genin, and Nemo Peeters. 2019. "Pangenomic type III effector database of the plant pathogenic Ralstonia spp." PeerJ 7:e7346.

Salanoubat M., Genin S., Artiguenave F., Gouzy J., Mangenot S., Arlat M., Billault A., Brottier P., Camus J. C., Cattolico L., Chandler M., Choisne N., Claudel-Renard C., Cunnac S., Demange N., Gaspin C., Lavie M., Moisan A., Robert C., Saurin W., Schiex T., Siguier P., ThéAbault P., Whalen M., Wincker P., Levy M., Weissenbach J., Boucher C.A. 2002. " Genome sequence of the plant pathogen Ralstonia solanacearum". Nature 415(6871):497-502.

Sang Yuying , Yaru Wang, Hong Ni, Anne Claire Cazalé, Yi Min She, Nemo Peeters, and Alberto P. Macho. 2018. "The Ralstonia solanacearum type III effector RipAY targets plant redox regulators to suppress immune responses." Molecular Plant Pathology 19(1): 129–142.

Sarris Panagiotis, Volkan Cevik, Gulay Dagdas, Jonathan D.G Jones, and Ksenia V. Krasileva. 2016. "Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens." BMC Biology 14:8.

Shaffer Hally Anne , Michael Kenneth Rood, Badar Kashlan, Eileen I-ling Chang , Donald Francis Doyle, and Bahareh Azizi. 2012. "BAPJ69-4A: A yeast two-hybrid

strain for both positive and negative genetic selection." *Journal of Microbiological Methods* 91 pp: 22-29.

Singh Akshay, Pankaj Kumar Singh, Ajay Kumar Sharma, Nagendra Kumar Singh, Humira Sonah, Rupesh Deshmukh, and Tilak Raj Sharma. 2019. "Understanding the Role of the WRKY Gene Family under Stress Conditions in Pigeonpea (*Cajanus Cajan L.*)." *Plants*8(7): 214.

Montserrat Solé, Crina Popa, Oriane Mith, Kee Hoon Sohn, Jonathan D. G. Jones, Laurent Deslandes, and Marc Valls. 2012. "The awr Gene Family Encodes a Novel Class of *Ralstonia solanacearum* Type III Effectors Displaying Virulence and Avirulence Activities." *Molecular Plant-Microbe Interactions* vol. 25, No. 7, 2012, pp. 941–953.

Stephens David J. and Banting George.2002. " The Use of Yeast Two-Hybrid Screens in Studies of Protein:Protein Interactions Involved in Trafficking". *Traffic*, 1: 763–768

Sukarta Octavina C A, Slootweg Erik J, GoverseAska. 2016. «Structure-informed insights for NLR functioning in plant immunity.» *Seminars in Cell & Developmental Biology*56:134-149.

Tanaka Seiji. 2019. "An efficient method for the isolation of interaction-null/impaired mutants using the yeast two-hybrid technique." *Genes to Cell*24:781–788.

Villano Clizia, Salvatore Esposito, Vincenzo D'Amelia, Rafaële Garramone, Daniela Alioto, Astolfo Zoina, Riccardo Aversano, and Domenico Carputo. 2020. "WRKY genes family study reveals tissue-specific and stress-responsive TFs in wild potato species." *Scientific Reports*10:7196.

Wei Yali, Sang Yuying and Macho Alberto P. 2017. " The *Ralstonia solanacearum* Type III Effector RipAY Is Phosphorylated in Plant Cells to Modulate Its Enzymatic Activity". *Frontiers in Plant Science* 8: 1899.

Xue Chaoling, Hongtai Li, Zhiguo Liu, Lili Wang, Yitong Zhao, Ximeng Wei, Hu Fang, Mengjun Liu, and Jin Zhao. 2019. "Genome-wide analysis of the WRKY gene family and their positive responses to phytoplasma invasion in Chinese jujube." *BMC Genomics*20, 464.

Yang Liang, Shili Li, Xiyun Qin, Gaofei Jiang, Juanni Chen, Bide Li , Xiaoyuan Yao, Peibo Liang, Yong Zhang, and Wei Ding. 2017. "Exposure to Umbelliferone Reduces Ralstonia solanacearum Biofilm Formation, Transcription of Type III Secretion System Regulators and Effectors and Virulence on Tobacco." *Frontiers in Microbiology*8: 1234.

Young K. H. 1998. "Yeast Two-Hybrid: So Many Interactions, (in) So Little Time." *Biology of Reproduction*8(2):302-11.

Yu-Hung Yeh, Dario Panzeri, Yasuhiro Kadota, Yi-Chun Huang, Pin-Yao Huang, Chia-Nan Tao, Milena Roux, Hsiao-Chiao Chien, Tzu-Chuan Chin, Po-Wei Chu, Cyril Zipfel, Laurent Zimmerli. 2016. «The Arabidopsis Malectin-Like/LRR-RLK IOS1 Is Critical for BAK1-Dependent and BAK1-Independent Pattern-Triggered Immunity.» *The Plant Cell*.

Zipfel Cyril, and Giles E. D. Oldroyd. 2017. "Plant signalling in symbiosis and immunity." *Nature*543, pp:328–336.

Τζάμος, Ελευθέριος. 2007. ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ. Αθήνα: Αθ. ΣΤΑΜΟΥΛΗΣ.