

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**



**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF BIOLOGY**

Διδακτορική Διατριβή

ΚΑΡΑΝΤΕΜΙΡΗΣ ΚΩΣΤΑΣ

**ΔΡΑΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΙΓΗΣΗΣ**



ΗΡΑΚΛΕΙΟ

ΦΕΒΡΑΡΙΟΣ 2014

**ΔΡΑΣΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΟ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΣΙΓΗΣΗΣ**

ΚΑΡΑΝΤΕΜΙΡΗΣ ΚΩΣΤΑΣ

**Υποβλήθηκε ως μέρος των απαιτήσεων για τον τίτλο
του Διδάκτορα Βιολογικών Επιστημών
με έμφαση στη Μοριακή Μικροβιολογία και Βιοτεχνολογία
Φυτών
στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης**

Επιβλέπων Καθηγητής: Ν. Ι. Πανόπουλος

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Πανόπουλος Νικόλαος. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Κοκκινίδης Μιχαήλ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Τσαγρή Ευθυμία. Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Πανόπουλος Νικόλαος. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Κοκκινίδης Μιχαήλ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Τσαγρή Ευθυμία. Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Αλεξανδράκη Δέσποινα. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παν. Κρήτης
Γεωργακόπουλος Δημήτριος. Επίκουρος Καθηγητής Γεωπονικού
Παν. Αθηνών
Βερβερίδης Φίλιππος. Καθηγητής Τ.Ε.Ι. Κρήτης
Σκανδάλης Νικόλαος. Ερευνητής Γ'. Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό
Ινστιτούτο

«Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) - Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου».

**Στην οικογένεια μου και σε όσους μου
συμπαραστάθηκαν όλα αυτά τα χρόνια...**

Από τότε που κουράστηκα να ψάχνω, έμαθα να βρίσκω. Και από τότε
που ο άνεμος μού εναντιώθηκε, έμαθα να σαλπάρω με όλους τους
ανέμους (**Φ. Νίτσε**).

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περιεχόμενα

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ	1
UNIVERSITY OF CRETE.....	1
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
ABSTRACT.....	13
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
Μηχανισμός RNA silencing	15
1.1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά.....	15
1.1.2 Στάδια του μηχανισμού RNA silencing και κατηγορίες μικρών RNAs.	16
1.1.2 Μηχανισμοί δράσης (καταστολέων) suppressors της RNA σίγησης.	25
1.2 Αλληλεπίδραση RNA σίγησης και Φυτοπαθογόνων.....	31
1.2.1 Αλληλεπίδραση RNA σίγησης και Φυτικών Ιών.	31
1.2.2. Αλληλεπίδραση RNA σίγησης και Φυτοπαθογόνων Βακτηρίων.....	35
1.2.3 Αλληλεπίδραση RNA σίγησης και Φυτοπαθογόνων Μυκήτων και Οομυκήτων.	42
1.3 Ανοσία μέσω αναγνώρισης "αποτυπώματος" και ανθεκτικότητα που διαμεσολαβείτε από R-γονίδια.....	44
1.4. Κυτταρικός Θάνατος και Αντίδραση Υπερευαισθησίας	47
1.4.1 Κατηγορίες κυτταρικού θανάτου στα ζώα. Στα ζωικά κύτταρα έκτος από τον αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο	47
1.4.2 Κατηγορίες κυτταρικού θανάτου στα φυτά	47
1.4.3 Αντίδραση Υπερευαισθησίας.	52
1.4.4 Επαγωγείς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.....	52
1.4.5 Επίκτητη Συστημική Ανθεκτικότητα.	54
1.5 Μονοπάτια σηματοδότησης στην βασική άμυνα και την αντίδραση Υπερευαισθησίας.....	56
1.5.1 Συμμετοχή MAP κινασών.	56
1.5.2 Αυξίνη και απόκριση στα Φυτοπαθογόνα.	60
1.6 Εκκρινόμενες βακτηριακές πρωτεΐνες στην αναστολή του κυτταρικού θανάτου και της βασικής άμυνας.	62
1.6.1 Εισαγωγή.	62
1.6.2 Βιοχημικές ενεργότητες βακτηριακών πρωτεϊνών-τελεστών τύπου III και αναστολή του κυτταρικού θανάτου.	63
1.6.3 Αναστολή του επαγόμενου από MAP κινάσες κυτταρικού θανάτου.	66

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1.6.4 Εκκρινόμενες βακτηριακές πρωτεΐνες και PAMPs.	67
1.7 Υπερ-Οικογένεια Πρωτεϊνών-τελεστών HopF	69
1.7.1 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ομολόγων.....	69
1.7.2 Οικογένεια HopF1/HopF2/HopF3 και αντίδραση υπεραισθησίας	70
1.7.3 Οικογένεια HopF1/ HopF2/ HopF3 και φλαγγελίνη.	70
1.7.4 Ενζυμική Ενεργότητα ριβοσυλτρανσφεράσης.	71
1.7.5 Μηχανισμός λειτουργίας άλλων ADP-ribosyltransferases.....	73
1.8 Υπερ-Οικογένεια Πρωτεΐνης HopAB2.....	75
1.8.1 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ομολόγων.....	75
1.8.2 Δομικές Περιοχές HopAB2.	75
1.8.3 Καταστολή μονοπατιού των PAMP και κυτταρικού θανάτου.	78
1.8.4 Στοχευμένη μεταλλαξιγένεση του HopAB2.....	81
1.8.5 Συμμετοχή του HopAB2 στην καταστολή του μηχανισμού της σίγησης.	83
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	86
2.1 Κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία	86
2.2 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	96
2.3 Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία:	98
2.4 Διαγονιδιακές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία:	100
2.5 Μικρής κλίμακας απομόνωση βακτηριακού γενωμικού DNA.....	100
2.6 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA από στελέχη Pseudomonas.....	101
2.7 Απομόνωση συνολικού DNA από φυτικό ιστό.	102
2.8 Απομόνωση συνολικού DNA από φυτικό ιστό	103
2.9 Απομόνωση DNA από ιστό	103
2.10 Απομόνωση DNA από πλούσιο σε πολυσακχαρίτες ιστό	104
2.11 Ενίσχυση συνολικού γενωμικού DNA από βακτήρια ή φυτικό ιστό με την χρήση phi polymerase.....	104
2.12 Προετοιμασία κυττάρων XI1-blue MRF για μόλυνση με φάγο	105
2.13 Μετατροπή φαγικής σε cDNA βιβλιοθήκη	105
2.14 Απομόνωση φαγικού DNA.....	106
2.15 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction).....	106
2.18 Απομόνωση DNA από αγαρόζη	109
2.19 Ηλεκτροέκλυση.....	110
2.20 Σύνδεση (ligation) τμημάτων DNA.....	110
2.21 Κλωνοποίηση με την χρήση ομόλογου (Landy, 1989) ανασυνδυασμού (Αντίδραση BP).	110
2.22 Κλωνοποίηση με την χρήση ομόλογου (Landy, 1989) ανασυνδυασμού (Αντίδραση LR).	111

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

2.23 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i>	111
2.24 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων	112
2.25 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	112
2.27 Τόπο-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγενεση που διευκολύνεται από επιλογή με DpnI για το μεθυλιωμένο και ημι-μεθυλιωμένο DNA (QuikChange, Agilent Technologies Genomics).	114
2.28 Τόπο-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγενεση με αλλαγμένη θέση ενζύμου περιορισμού (.....)	115
2.29 Δημιουργία ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών σε αντιβιοτικά.....	117
2.30 Γενετική τροποποίηση <i>Agrobacterium</i>	117
2.31 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA από αγροβακτήριο ...	119
2.32 Αγροένχυση (Agroinfiltration)	121
MS.....	121
2.33 Απομόνωση ολικού RNA από ιστό (Carpenter & Simon, 1998).Σε	122
2.34 Ταυτόχρονη απομόνωση DNA, RNA και πρωτεϊνών από φυτικό ιστό	123
2.35 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων	127
2.36 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης	127
2.37 Ανάλυση Northern	127
2.38 In vitro μεταγραφή.....	128
2.39 Σήμανση DNA (.....)	129
2.40 Σήμανση με την μέθοδο του HOT-PCR	130
2.41 Υβριδοποίηση μεμβράνης (Green & Sambrook, 2012).....	131
2.42 Έκπλυση μεμβράνης (Sambrook et al., 1989).	131
2.43 Αποϋβριδοποίηση μεμβράνης.....	132
2.44 Ανίχνευση siRNAs μετά από ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυ-ακρυλαμίδης	132
2.45 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες.....	133
Αποτελέσματα.....	135
3.1 Ρόλος της RNA σίγησης στην αντίδραση υπερευαισθησίας (HR).....	135
3.1.1 RNA σίγηση και αντίδραση υπερευαισθησίας από <i>P. savastanoi</i>	135
3.1.2 Ρόλος της σίγησης σε HR επαγόμενη από χρωματογραφικά καθαρισμένη HrpZ.....	139
3.2 Επίδραση πρωτεϊνών-τελεστών από ψευδομονάδες στην RNA σίγηση.	145
3.2.1 Καταστολή RNA σίγησης από πρωτεΐνες-τελεστές ψευδομονάδας.....	145
3.2.1.2 Επίδραση εκκρινόμενων πρωτεϊνών υπεροικογένειας AvrRps4-HopK1 στην RNA σίγηση	179
3.2.2 Ενίσχυση RNA σίγησης από εκκρινόμενες πρωτεΐνες ψευδομονάδας	181
3.2.2.1 Επίδραση εκκρινόμενων πρωτεϊνών HopAO1, HopC1, AvrPto, pthG στην RNA σίγηση	182

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

3.2.2.2 Ρόλος της δραστηριότητας E3 λιγάσης της ουβικιτίνης στη δράση της πρωτεΐνης-τελεστή HopAB2 και ομολόγων της στην RNA σίγηση	184
3.3 Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στον επαγόμενο από HopAB2 κυτταρικό θάνατο	195
3.4 Υπερευαισθησία στην εκδήλωση νεκρώσεων στην διαγονιδιακή σειρά sde1IR	196
3.5 Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στον επαγόμενο από NorT κυτταρικό θάνατο	198
3.6 Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στην αποτροπή της HR από βακτηριακούς τελεστές σε υψηλές θερμοκρασίες.....	201
3.7 Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στον επαγόμενο από p19 κυτταρικό θάνατο	204
3.8 Εύρεση νέων ανι παραγόντων από ιούς.....	205
3.9 Αποσαφήνιση σχετικά με τον ρόλο των ιικών αναστολέων σίγησης στην επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας.	206
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	209
4.1 Αναστολή της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) της <i>P. syringae</i> από <i>P. savastanoi</i>	209
4.2 Ρόλος της σίγησης σε HR επαγομένη από την πρωτεΐνη HrpZ.....	211
4.3 Ρόλος της RNA σίγησης σε HR επαγομένη από τον τελεστή HopA1 (HopPsyA)	213
4.4 Επίδραση πρωτεϊνών-τελεστών από <i>Pseudomonas</i> στην RNA σίγηση.	214
4.4.1 Καταστολή RNA σίγησης από πρωτεΐνες-τελεστές Ψευδομονάδων.	215
4.4.2 Ενίσχυση RNA σίγησης από πρωτεΐνες-τελεστές στελεχών <i>Pseudomonas</i>	229
4.5 Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στον κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από p19, HopAB2 και NorT.....	235
4.6 Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στην αποτροπή της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε υψηλές θερμοκρασίες.....	237
4.7 Εύρεση νέων ανι παραγόντων από ιούς.....	237
4.8 Ρόλος των ιικών αναστολέων σίγησης στην επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας.	239
4.9 Υπόθεση εργασίας για τον ρόλο της σίγησης στις αλληλεπιδράσεις φυτοπαθογόνων με ξενιστές.	239
Βιβλιογραφία	242

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Φυτών υπό την επίβλεψη του Ομότιμου Καθηγητή Ν. Πανόπουλου. Ολοκληρώνοντας αυτόν τον κύκλο σπουδών θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρα. Πανόπουλο για την αρμονική και καρποφόρα συνεργασία μας, για την ευκαιρία που μου έδωσε, για τις πάντα χρήσιμες και καίριες υποδείξεις του και για την εμπιστοσύνη με την οποία με περιέβαλε. Από την θέση αυτή θα ήθελα να κάνω ιδιαίτερη αναφορά στον Καθηγητή Μ. Κοκκινίδη που βοήθησε ουσιαστικά στο τελευταίο και πιο επίπονο στάδιο αυτής της προσπάθειας. Οι υποδείξεις του πάνω στην δομή του HorAB2 ήταν πολύτιμες και βοήθησαν να ξεδιαλύνουμε ένα «μυστήριο» που μας βασάνιζε για χρόνια. Ευχαριστώ την κ. Τσαγρή για την παραχώρηση χώρου στο εργαστήριο της για την υλοποίηση μέρους των πειραμάτων της διατριβής και για τις πολύωρες συζητήσεις μας. Τα πειράματα αυτά δεν θα ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθούν χωρίς την υλική συμπαράσταση από το εργαστήριο του Κρίτωνα Καλαντίδη ο οποίος κάλυψε μεγάλο μέρος των αναλωσίμων στο πρώτο στάδιο της εργασίας και για αυτό τον ευχαριστώ. Ιδιαίτερη αναφορά πρέπει να γίνει στις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις του Martin Tabler, του οποίου το όραμα και ο τρόπος σκέψης θα είναι πολύτιμος οδηγός στα μελλοντικά μου βήματα, αν και δεν είναι πια κοντά μας. Θα είμαι παντοτινά υπόχρεος στην κ. Ρουμπελάκη-Αγγελάκη Καλλιόπη, η οποία στάθηκε πολύτιμος συμπαραστάτης στα πρώτα βήματα των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Η συνεισφορά της και οι γνώσεις που απομύζησα κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο της ήταν ανεκτίμητες. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής (και ιδιαίτερα αυτούς που δεν ανέφερα παραπάνω όπως την Καθηγήτρια Δέσποινα Αλεξανδράκη, τον Επίκουρο Καθηγητή Γεωργακόπουλο Δημήτρη, τον καθηγητή στα ΤΕΙ Κρήτης Βερβερίδη Φίλιππο και τον Ερευνητή στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο Ν. Σκανδάλη) για την συνεργασία, την υπομονή και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Αυτή η προσπάθεια μπορεί να μην είχε ποτέ ολοκληρωθεί χωρίς την αρωγή πολλών ανθρώπων. Ευχαριστώ τον Π. Σαρρή για τον ατελείωτο χρόνο που σπαταλήσαμε μαζί στον πάγκο αλλά και για τις ποικίλες πλασμιδιακές κατασκευές που μου παραχώρησε. Τον Νίκο Σκανδάλη και την Σπυριδούλα Χαρόβα που ήταν δίπλα μου όποτε τους χρειάστηκα. Την Σπυριδούλα Χαρόβα εκτός όλων των άλλων και για την πρωτεΐνη HrpZ που μου παραχώρησε. Τον Νίκο Σκανδάλη και για την συμβολή του στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Τον Mohamed Abdelhalem και τον Χρήστο Κοτάκη για την βοήθεια και την συμπαράσταση τους στην πιο δύσκολη περίοδο της δουλειάς. Τα παρελθόντα και παρόντα

μέλη του εργαστηρίου του Dr Κρίτωνα Καλαντίδη που ήταν ανέκαθεν το στήριγμα μου. Την Τζωρτζακάκη Σεργία, τον Νίκο Βρεττό, τον Θανάση Δαλακούρα, τον Τάσο Αλεξιάδη, την Έλενα Νταντάμη, τον Γιάννη Βλατάκη, την Νάντια Κατσαρού, την Ρίτα Μέρμηγκα, Την Νικολέτα Κρυσβρυσανάκη, την Αραμπατζή Παναγιώτα, την Edytka Koscianska, την Victoria Tisza και όλα τα υπόλοιπα μέλη που με τις εποικοδομητικές συζητήσεις, τις τεχνικές τους γνώσεις και την σε προσωπικό επίπεδο συμπαράσταση τους στάθηκαν φίλοι και συνεργάτες. Τον Γιώργο Παπαδάκη και τον Αχιλλέα Τσώρτο για την ηθική τους συμπαράσταση και τις τεχνικές συμβουλές τους. Η σύντομη αλλά ουσιαστική συνεργασία μου με τον Γιάννη Παπανικολάου στάθηκε η πιο υπεραστική των πρώτων χρόνων της εργαστηριακής μου παρουσίας. Ο κατάλογος είναι ατελείωτος και ζητώ συγνώμη αν κάποιος παραλήφθηκε.

Θα ήθελα να κάνω ιδιαίτερη αναφορά στους ανθρώπους των οποίων είχα έμμεσα την επίβλεψη: τον Άρη Μοσχονά, τον Αντώνη Ταταράκη και τον Γιάννη Κωνσταντινίδη, τον Σωτήρη Ζερβέα, τον Κώστα Σταματάκη, τον Νίκο Κατσαβό για την δημιουργική συνεργασία μας. Ευχαριστώ τον Μαυράκη Στέλιο για την άψογη φροντίδα που παρείχε στα φυτά μου.

Κάποιοι άνθρωποι δεν συμμετείχαν άμεσα στην προσπάθεια μου αλλά με βοήθησαν στα πρώτα δειλά μου βήματα ως μεταπτυχιακός φοιτητής όπως ο Γιάννης Δελλής, ο Κώστας Πασχαλίδης, ο Δημήτρης Γιακουμάκης, ο Νικόλας Πριμικίριος.

Τόσοι πολλοί άνθρωποι σε κάποια φάση συμμετέχουν με τον ένα ή τον άλλο τρόπο στην ολοκλήρωση μιας προσπάθειας! Τους ευχαριστώ όλους για την συνεισφορά τους στην επίλυση καθημερινών τεχνικών προβλημάτων. Χωρίς την στήριξη τους θα είχα προ καιρού εγκαταλείψει την προσπάθεια μου. Τους ευχαριστώ όλους και τους υπόσχομαι ότι θα συνεχίσω να προσπαθώ να τους το ανταποδώσω στο μέλλον. Όλοι ξέρουν πόσο έχουν προσφέρει στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.....

Τέλος, θα ήθελα ξεχωριστά να ευχαριστήσω τους Σαρρή Παναγιώτη (για τους κλώνους HorAB1ΔN-term, HorK1_{DC3001}, HorAO1, HorC1 καθώς και τα στελέχη *P. savastanoi* 2480, *P. savastanoi* 2480), Gregory Martin (για ποικίλους κλώνους με ακρωτηριασμένες κατασκευές του avrPtoB και σημειακές μεταλλαγές της ίδιας πρωτεΐνης καθώς και κλώνους με ομόλογα του avrPtoB), Jeff Dangl [για έναν από τους κλώνους του AvrRps4 (AvrRps4/pTA7002)], Cristian Staehelin (για τον κλώνο του NopT), Allan Colmer και James Alfano [για τα στελέχη *P. fluorescens* 55 (pHIR11), *P. fluorescens* 55 (pLN18), *P. fluorescens* 55 (pCPP2071)], David Baulcombe (για τον κλώνο mGFP4 και τα διαγονιδιακά φυτά 16c και sde1R), Jozsef Burgyan (για τους κλώνους p19 και sigma3 και για τα διαγονιδιακά φυτά p19), Andrew Maule (για τον κλώνο p38), Shou Wei Ding (για τον κλώνο p69), Carmen-Simon Mateo (για τον κλώνο Hc-Pro), Vicki Vance (για τα διαγονιδιακά φυτά U6B), Xuemei

Chen (για τον κλώνο RDR6), Daniel Klessig (για τον κλώνο SIPK), John Rathjen (για τον κλώνο ανιΡτοΒ σε φορέα pTFS40) και τα μέλη των εργαστηρίων Tabler, Τσαγρή, Καλαντίδη, Πανόπουλου για τους πλασμιδιακούς φορείς που μου παραχώρησαν.

Η εργασία αυτή υποστηρίχτηκε οικονομικά από μια υποτροφία για διδακτορική έρευνα του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών και από μια υποτροφία για διδακτορική έρευνα του προγράμματος «εκπαίδευση και δια βίου μάθηση» του ΕΣΠΑ 2007-2013 (Ηράκλειτος II Πανεπιστημίου Κρήτης, ΚΑ 3396).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Πολλά είδη φυτοπαθογόνων βακτηρίων ενχύουν ρεπερτόρια πρωτεϊνών-τελεστών (T3SS effectors, T3SEs, τελεστές, διεγέρτες) μέσω εξειδικευμένου συστήματος έκκρισης πρωτεϊνών (Συστημά Έκκρισης πρωτεϊνών Τυπου III, Type Three Secretion Systems, [T3SS]). Οι πρωτεΐνες αυτές αναγνωρίζονται από υποδοχείς του φυτού οι οποίοι κωδικοούνται απο τα ονομαζόμενα R-γονίδια (resistance genes). Η αναγνώριση «λειτουργικά αντίστοιχων» πρωτεϊνών-τελεστών και υποδοχέων πυροδοτεί την εκδήλωση μιας μορφής ανοσίας (ανοσία επαγωμενη απο πρωτεΐνες-τελεστές, Effector-Triggered Immunity, ETI). Η ανοσία αυτή περιορίζει την ανάπτυξη βιότροφων παθογόνων, συχνά με την πρόκληση μιας μορφής προγραμματισμένου τοπικού κυτταρικού θανάτου που ονομάζεται αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR). Όταν η αναγνώριση αυτή δεν συμβαίνει, οι πρωτεΐνες-τελεστές προάγουν τη βακτηριακή παθογένεια παρεμβαίνοντας σε συγκεκριμένες φυσιολογικές διεργασίες ή σηματοδοτικά μονοπάτια που τελικά καταστέλλουν μηχανισμούς άμυνας των φυτών. Η RNA σίγηση (αποσιώπηση) γονιδίων (RNA interference, RNAi) είναι ένας μηχανισμός κατασταλτικού ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης στον οποίο δίκλινα μόρια RNA μετατρέπονται σε ολιγονουκλεοτίδια μήκους 21-25 nt (siRNAs). Η RNA σίγηση είναι μια συντηρημένη ρυθμιστική διαδικασία που έχει εξελιχθεί ως μηχανισμός άμυνας στα φυτά και τα ζώα. Πολλά φυτοπαθογόνα βακτήρια καταστέλλουν τις άμυνες του ξενιστή που προκαλούνται από μια ποικιλία μικρών RNAs (miRNAs, nat-siRNAs, lsiRNAs κλπ)

Στην παρούσα διατριβή αναλύεται η αλληλεπίδραση μεταξύ RNA σίγησης, κυτταρικού θανάτου και πρωτεϊνών τελεστών και καταδεικνύεται η παρεμβολή της RNAί-ως αρνητικού ρυθμιστή του κυτταρικού θανάτου που επάγεται στα φυτά από διάφορους διεγέρτες όπως: α) ένα διεγέρτη (HrpZ) που παρέχεται στο φυτό σε καθαρισμένη μορφή σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις, β) πρωτεΐνες- διεγέρτες που παραγονται στα βακτηριακά κύτταρα και ενχύονται μέσω T3SS στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή, γ) πρωτεΐνες- διεγέρτες που παρέχονται μέσω αγροένχυσης (agroinfiltration) και εκφράζονται ενδογενώς στα φυτικά κύτταρα. Σε ορισμένες τουλάχιστον περιπτώσεις που εξετάστηκαν, η ρύθμιση κυτταρικού θανάτου στα φυτά μέσω RNA σίγησης εξαρτάται από τη θερμοκρασία.

Πολλοί φυτοπαθογόνοι ιοί, μύκητες, βακτήρια και ωομύκητες κωδικοποιούν πρωτεΐνες καταστολής της RNA σίγησης. Τα αποτελέσματά μας παρέχουν περαιτέρω αποδείξεις ότι οι T3SS πρωτεΐνες-τελεστές μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα φυτικά siRNA μονοπάτια, με στόχο όχι μόνο με την καταστολή αλλά και την ενίσχυση της RNA σίγησης. Στην παρούσα διατριβή, παρέχουμε αποδείξεις ότι παροδική έκφραση διαφορετικών μελών μιας υπεροικογένειας (HopF) πρωτεϊνών-τελεστών από

φυτοπαθογόνα στελέχη *Pseudomonas* στην διαγονιδιακή σειρά *Nicotiana benthamiana* 16c [η οποία υπερεκφράζει μία πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP)], κατέστειλε την γονιδιακή σίγηση που ενεργοποιείται μετα-μεταγραφικά από αγροένχυση μιας κασέτας που υπερεκφράζει GFP, ενώ άλλα μέλη της ίδιας υπεροικογένειας ενισχύουν τη γονιδιακή σίγηση. Χρησιμοποιώντας τμηματικές ελλείψεις αυτών των πρωτεϊνών τελεστών, ταυτοποιήθηκαν διακριτές αμινοτελικές και καρβοξυτελικές περιοχές που είναι επαρκείς τόσο για την καταστολή της RNA σίγησης όσο και για την αναστολή του θανάτου των φυτικών κυττάρων. Στοχευμένη μεταλλαξιγένεση αποκάλυψε κρίσιμα καταλοιπα συντηρημένων μοτίβων ορισμένων πρωτεϊνών τελεστών που απαιτούνται για καταστολή RNA σίγησης στην *N. benthamiana* και αναστολή κυτταρικού θανάτου τόσο σε *N. benthamiana* όσο και *Nicotiana tabacum*.

Επιπλέον, προσδιορίσαμε ότι η ενεργότητα E3 λιγάσης ουβικιτίνης του HopAB2 είναι επαρκής τόσο για ενίσχυση σίγησης όσο και αναστολή κυτταρικού θανάτου στα φυτά. Τοπο-κατευθυνόμενες μεταλλαγές υποκατάστασης συντηρημένων αμινοξέων στην πλήρους μήκους πρωτεΐνης HopAB2 που έχουν να αποτελέσει ήπια μείωση ενεργότητας E3 λιγάσης συμβάλλουν επίσης στον φαινότυπο της ενίσχυσης RNA σίγησης από το HopAB2.

Η ανάλυσή μας επεκτείνει το φάσμα των γνωστών καταστολέων (και ενισχυτών) σίγησης πρωτεϊνών από παθοτύπους του είδους *P. syringae* και παρέχει ενδείξεις για το ρόλο της καταστολής (και ενίσχυσης) της RNA σίγησης στις αλληλεπιδράσεις παθογόνων-ξενιστών. Επιπλέον, αποκαλύψαμε κρίσιμες παραμέτρους για την αναστολή του κυτταρικού θανάτου από υπεροικογένειες πρωτεϊνών-τελεστών.

ABSTRACT

Many plant pathogenic bacteria inject compositionally and functionally diverse repertoires of effector proteins into the plant cell interior through Type Three Secretion Systems (T3SSs). Plant Resistance (R) genes mediate recognition of effectors and induce Effector-Triggered Immunity. R gene mediated resistance is often expressed as localized programmed cell death (Hypersensitive Response, HR) accompanied by accumulation of antimicrobial metabolites, restricting the proliferation of biotrophic pathogens. Effector proteins promote bacterial virulence by manipulating specific physiological processes or signaling pathways to subvert host immunity and suppress plant defenses (Pattern-Triggered Immunity [PTI] and Effector-Triggered Immunity [ETI]). RNA interference (RNAi) is an immunity mechanism in which double-stranded RNAs are processed into 21-25 nt short interfering RNAs (siRNAs). RNA interference is a conserved regulatory process that has evolved as a defense mechanism in plants and animals. Plant pathogenic bacteria encounter host defenses mediated by a variety of small RNAs (miRNAs, nat-siRNAs, lsiRNAs etc).

Here, we show that RNA interference is a novel negative regulator of necrosis induced by various elicitors of HR: a) Harpin (HrpZ), a protein elicitor supplied to the plant in **purified form** at relatively high concentrations, b) effector proteins injected through T3SS into the host cell cytosol, c) effectors produced endogenously in the plant cells following agrodelivery of effector-coding genes. At least in some cases, regulation of plant cell death by RNA interference is temperature-dependent.

Plant pathogenic viruses, bacteria fungi and oomycetes encode suppressor proteins of RNA interference. Our results provide further evidence that bacterial T3S-secreted effector proteins may manipulate the plant siRNA pathways not only by suppressing but also by enhancing silencing efficiency. We provide evidence that transient expression of different members of an effector superfamily (HopF) from phytopathogenic *Pseudomonas syringae* in transgenic *Nicotiana benthamiana* line 16c over-expressing a green fluorescent protein (GFP), suppressed sense-post-transcriptional gene silencing (s-PGTS) triggered by agroinfiltration of a GFP-over expressing cassette while other members of the same superfamily enhanced gene silencing. Using truncated versions of these effector proteins, we identified distinct N- and C-terminal domains that are sufficient for both silencing suppression and inhibition of plant cell death. Through targeted mutagenesis we further identified clustered residues in conserved motifs of some effector proteins that are required for silencing suppression in *N. benthamiana* and cell death inhibition in both *N. benthamiana* and *Nicotiana tabacum*.

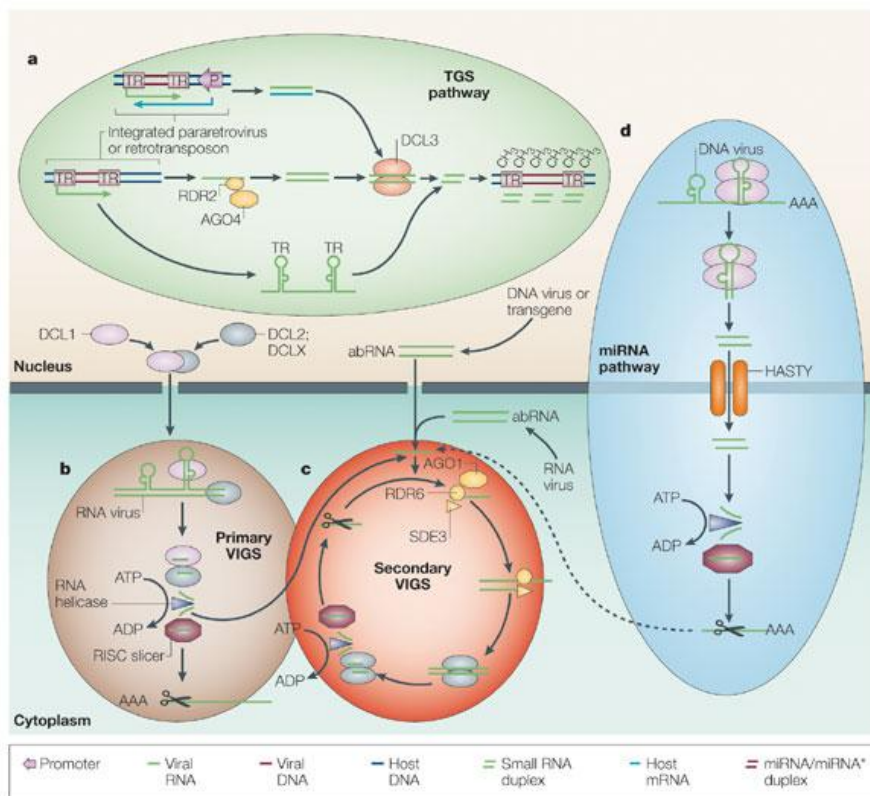
ABSTRACT

Finally, we provide evidence that the E3 ubiquitin ligase domain of HopAB2 is sufficient for both silencing enhancement and inhibition of plant cell death. Site-directed substitutions in the full-length HopAB2 protein which mildly reduce its E3-ligase activity also contribute to the HopAB2 silencing enhancement phenotype.

Our analysis extends the range of known suppressor (and enhancer) proteins from *P. syringae* and provides clues about the role of silencing suppression (and enhancement) in plant-microbe interactions. Furthermore, it uncovers critical parameters for cell death inhibition by members of effector protein superfamilies. The interplay between gene silencing, plant cell death and effector proteins is discussed.

Μηχανισμός RNA silencing

1.1.1 Γενικά Χαρακτηριστικά. Ο μηχανισμός της μεταμεταγραφικής αποσιώπησης (σίγησης) γονιδίων (RNA silencing) είναι ένας μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων ο οποίος περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια : την **ανίχνευση δίκλωνων μορίων RNA** από διάφορες πηγές, την μετατροπή τους σε **μικρότερα δίκλιωνα μόρια RNA** συνήθως **21-26 nt** και την χρησιμοποίηση των μορίων αυτών σαν **υποστρώματα από πρωτεΐνες “Slicer”** με τελικό αποτέλεσμα την ενδονουκλεόλυση των μεγαλύτερων αυτών μορίων RNA ή την αναστολή της μετάφρασης τους.



Εικόνα 1. Ο μηχανισμός της RNA σίγησης στα φυτά (Voinnet, 2005).

Στα φυτά, η RNA σίγηση παράγει ένα σήμα που μεταδίδεται από ένα αρχικό κύτταρο σε γειτονικά (**cell to cell movement**) μέσω των καναλιών που ονομάζονται πλασμοδέσματα. Τα πλασμοδέσματα επιτρέπουν την άμεση μοριακή επικοινωνία μεταξύ

γειτονικών φυτικών κύτταρων. Η RNA σίγηση μεταδίδεται επίσης συστηματικά (**systemic movement**) σε μεγάλες αποστάσεις μέσω του φλοιώματος (το οποίο μεταθέτει μεταβολίτες και μεγαλύτερα μόρια και σύμπλοκα). Η διασπορά της σίγησης είναι εξαρτώμενη από αλληλουχία και το μεταφερόμενο «σήμα» συμπεριλαμβάνει ένα τουλάχιστον συστατικό RNA.

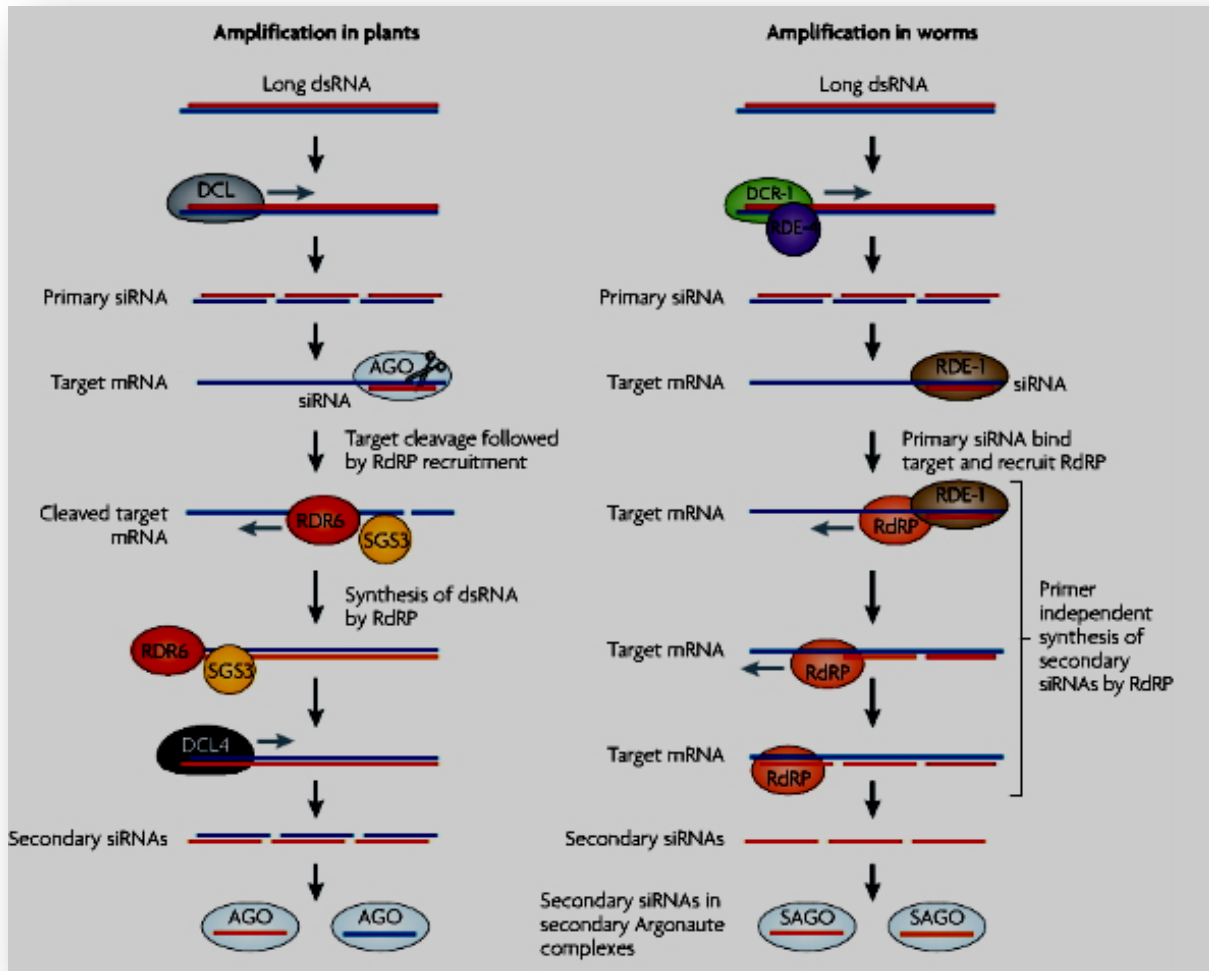
1.1.2 Στάδια του μηχανισμού RNA silencing και κατηγορίες μικρών RNAs.

1.1.2.1 Ο ρόλος των RNA εξαρτώμενων RNA πολυμερασών (RdRPs). Το πρώτο στάδιο του μηχανισμού της μεταμεταγραφικής αποσιώπησης γονιδίων συνίσταται στην ανίχνευση δίκλωνων μορίων RNA. Τα δίκλινα RNA μόρια μπορεί να προέρχονται από **διάφορες πηγές:**

- 1) από μόρια RNA με εκτεταμένες περιοχές συμπληρωματικότητας [π.χ. miRNAs, (Llave et al., 2002)]
- 2) μέσω της δράσης RdRps δηλαδή **RNA-directed RNA polymerases** (Dalmay et al., 2000),
- 3) από μεταγραφή μορίων RNA τύπου ανεστραμμένων επαναλήψεων (Smith et al., 2000),
- 4) από ταυτόχρονη μεταγραφή θετικής και αρνητικής πολικότητας RNA (Waterhouse et al., 1998),
- 5) από μεταγραφή αντίστροφης (αντικωδικής, antisense) πολικότητας RNA (Borsani et al., 2005) κ.α.

Οι **RNA-directed RNA polymerases** είναι ενζυμα που συμμετέχουν στην δημιουργία συμπληρωματικών RNA αλυσίδων (Schiebel et al., 1998; Wassenegger & Krczal, 2006). Κατ' επέκταση συμμετέχουν στο πρώτο στάδιο του μηχανισμού δημιουργίας δευτερογενών siRNAs. **Δευτερογενή siRNAs** είναι τα siRNAs που αντιστοιχούν σε αλληλουχίες εκτός των πρωτογενών περιοχών στόχου σε ένα μετάγραφο (Moissiard et al., 2007). Το φαινόμενο της παραγωγής δευτερογενών siRNAs ονομάζεται μεταβατικότητα (**transitivity**).

Στο γονιδίωμα της *Arabidopsis* έχουν καταμετρηθεί έξι RdRPs (RDR1-6) αν και κάποιες από αυτές φαίνεται να είναι ψευδογονίδια. Η RDR1 (κατά κύριο λόγο), η RDR6, και, σε μικρότερο βαθμό, η RDR2 έχουν εμπλακεί στο στάδιο της ενισχύσεως της συσσώρευσης ιϊκών siRNA (vsRNA). Τα siRNA που παράγονται από την δράση των RdRPs μερικές φορές αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο όγκο των συνολικών αντιϊκών siRNA (Garcia-Ruiz et al., 2010). Ο κύριος ρόλος της RDR2 είναι η ρύθμιση της *de novo* DNA μεθυλίωσης (Chan et al., 2004). Η RDR2 απαιτείται για την **υποδοχή των σημάτων σίγησης** που μεταφέρονται σε μακρές αποστάσεις βλαστό των φυτών, αλλά όχι και για την μετάδοση του σήματος



Εικόνα 2. Μηχανισμός παραγωγής δευτερογενών siRNA (Ghildiyal & Zamore, 2009).

σίγησης από το υποκείμενο στο εμβόλιο σε εμβολιαζόμενα φυτά (Dupoyer et al., 2007; Smith et al., 2007). Πειράματα εμβολιασμού αποκάλυψαν επίσης ότι η RDR6 είναι απαραίτητη σε κύτταρα που λαμβάνουν το σήμα σίγησης. Πιθανώς η RDR6 να αποτελεί τμήμα ενός συστήματος ενισχύσεως της σίγησης (Brosnan et al., 2007; Schwach et al., 2005). Η RDR6 απαιτείται και για την παραγωγή των trans-acting siRNAs (βλ. και παρακάτω) στην *Arabidopsis* (Peragine et al., 2004). Μεταλλάξεις στο γονίδιο RDR2 δεν επηρεάζουν την παραγωγή του σιναίου για κοντινή διασπορά της RNA σίγησης (cell-to-cell movement). Εμπλέκουν όμως τον παράγοντα αυτό στην **υποδοχή** ή/και λειτουργική ολοκλήρωση των μεταφερόμενων (κινητών) siRNAs στα κύτταρα του αποδέκτη (Brosnan & Voinnet, 2011).

1.1.2.2 Ο ρόλος των Dicers. Οι πρωτεΐνες **Dicers** (Qi et al., 2005) είναι ενδονουκλεάσες τύπου RNase III οι οποίες μετατρέπουν δίκλινα RNA σε μικρότερα δίκλινα μόρια RNA 21-26 nt (siRNAs). Στην *Arabidopsis* έχουν χαρακτηριστεί συνολικά

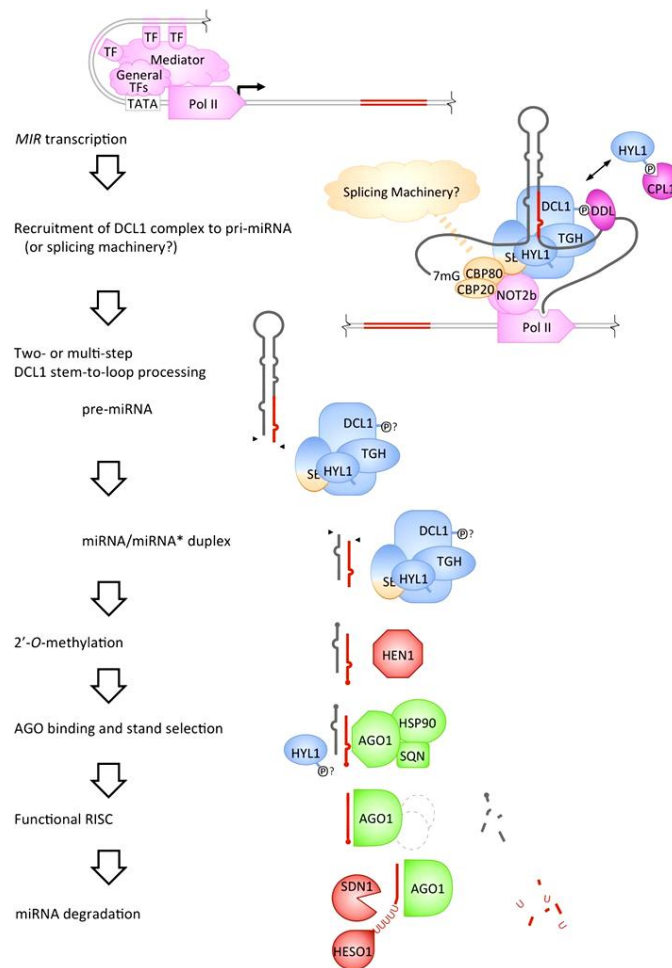
τέσσερις **Dicers**. Η **DCL1** παράγει τα sRNAs συνήθως 21nt που χαρακτηρίζονται σαν microRNAs (miRNAs). Η **DCL2** παράγει 22-nt siRNAs από δίκλινα ιϊκά RNA και διαγονίδια. Η **DCL3** παράγει siRNAs που προέρχονται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του γενώματος (repetitive sequences), siRNAs από μεταθετά στοιχεία και την υποκατηγορία των 24 nt siRNA από διαγονίδια. Τα προϊόντα δράσης της μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στην ετεροχρωματίνη. Χρησιμοποιεί σαν υποστρώματα πρόδρομα dsRNAs που προέρχονται από τη συντονισμένη δράση της DNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης IV (POL IV) και της RDR2. Τέλος, η **DCL4** παράγει 21-nt trans-acting siRNAs (tasiRNAs) από τα μη-κωδικοποιούντα μετάγραφα TAS γονιδίων. Τα tasiRNAs προέρχονται από TAS μετάγραφα μετά την ενδονουκλεολυτική τους διάσπαση παρουσία miRNA και έχουν μετατραπεί σε dsRNAs μετά από μεσολάβηση RDR6. Τα tasiRNAs δρουν μέσω των πρωτεϊνών AGO1 ή AGO7 και ελέγχουν την ανταπόκριση σε ορμόνες και την πολικότητα των φύλλων. Η DCL4 παράγει επίσης siRNAs από ιούς και διαγονίδια (Deleris et al., 2006; Liu et al., 2009). Η **μεταβατικότητα** (transitivity) μπορεί να ξεκινήσει με μικρές ποσότητες DCL4-εξαρτώμενων 21 νουκλεοτιδίων (nt) μήκους siRNAs, ενώ τα εξαρτώμενα από DCL3 24-nt siRNA φαίνεται να είναι περιττά για αυτή τη διαδικασία (Moissiard et al., 2007).

1.1.2.3 Χαρακτηριστικά των siRNAs. Τα siRNA είναι δίκλινα RNA μόρια που παράγονται από τη δράση των πρωτεϊνών Dicers και συνίστανται σε δύο συμπληρωματικές αλυσίδες 21 με 24-26 νουκλεοτιδίων. Κάθε αλυσίδα έχει ένα φωσφορικό στο 5'-άκρο και υδροξυλομάδα στο 3'-άκρο. Το δίκλινο μόριο έχει τέτοια δομή ώστε να αφήνει δύο νουκλεοτίδια ελεύθερα στα 3'- άκρα (2-nt overhangs). Η αλυσίδα που κατευθύνει την σίγηση αλληλουχιών με συμπληρωματικότητα με αυτήν ονομάζεται οδηγός (guide). Η συμπληρωματική αλυσίδα, η οποία τελικά καταστρέφεται, ονομάζεται παροδική ή επιβάτης (passenger). Οι σχετικές θερμοδυναμικές σταθερότητες των 5'-άκρων από τους δύο κλώνους του siRNA στο δίκλινο μόριο καθορίζουν ποια από τις δυο θα χρησιμοποιηθεί σαν οδηγός. Στα φυτά, τόσο τα miRNAs όσο και τα siRNA είναι μεθυλιωμένα στο άκρο. Η τροποποίηση αυτή είναι ζωτικής σημασίας για τη σταθερότητα τους. Η μεθυλίωση είναι αποτέλεσμα της δράσης ενός ενζύμου που ονομάζεται HEN1. Στα φυτά, ανεστραμμένες επαναλήψεις, διαγονίδια, δίκλινα ιϊκά μόρια ή συνέκφραση θετικής και αρνητικής πολικότητας ενδογενών μεταγράφων παράγουν τρία μεγέθη των siRNAs: 21, 22 και 24 νουκλεοτίδια. Οι δυο πρώτες κατηγορίες συμμετέχουν στην μεταμεταγραφική σίγηση γονιδίων (post-transcriptional gene silencing, PTGS) και η τρίτη στην μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίων (transcriptional gene silencing, TGS). Η TGS συνοδεύεται από μεθυλίωση του DNA και τροποποίηση της δομής χρωματίνης ενώ η PTGS συνοδεύεται από

διάσπαση RNA ή αναστολή της μετάφρασής (που οδηγεί σε μετά-μεταγραφική αδρανοποίηση των γονιδίων).

1.1.2.4. Χαρακτηριστικά των miRNAs. Τα microRNAs (miRNAs) αποτελούν μια κατηγορία μικρών RNAs μεγέθους 20-25 νουκλεοτιδίων. Τα miRNAs δεν κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Παράγονται από μια περιοχή εν μέρει διπλής έλικας ενός ατελώς συμπληρωματικού προδρόμου RNA. Ρυθμίζουν την έκφραση των mRNAs μέσω της συμπληρωματικότητας τους με θέσεις-στόχους. Η δράση των μικρών RNA μορίων δεν επιβάλλει πάντα την αποικοδόμηση του μεταγράφου. Εναλλακτικά προκαλεί την **αναστολή της μετάφρασης του** (Brodersen et al., 2008).

Τα mRNAs-στόχοι των miRNAs κωδικοποιούν συχνά μεταγραφικούς παράγοντες που απαιτούνται για την ανάπτυξη των φυτών, καθώς επίσης και ένζυμα που εμπλέκονται σε διάφορες μεταβολικές λειτουργίες και ορμονικά μονοπάτια. Τα miRNAs ρυθμίζουν συλλογικά την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού mRNAs είτε προωθώντας **αποσταθεροποίηση του mRNA** (Llave et al., 2002) ή την **καταστολή της μετάφρασης του** (Brodersen et al., 2008), ή και τα δύο.



Εικόνα 3. Μηχανισμός βιογένεσης και δράσης miRNAs (Rogers & Chen, 2013).

Ως εκ τούτου, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των μεταγραφωσμάτων και των πρωτεϊνών των ευκαρυωτικών οργανισμών. Τυπικά, τα miRNAs παράγονται από μεγαλύτερα πρωτογενή μετάγραφα που περιέχουν μία ή περισσότερες δομές φουρκέτας. Το τελικό στάδιο της ωρίμανσης τους γίνεται από τις πρωτεΐνες Dicer στο κυτταρόπλασμα. Τέλος, τα ώριμα miRNAs φορτώνονται σε σύμπλοκα που περιέχουν τις πρωτεΐνες που ονομάζονται Argonaute.

Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί πολλές αποκλίσεις από αυτό τον κανόνα. Υπάρχουν υποκατηγορίες miRNAs οι οποίες ανταποκρίνονται εν μέρει μόνο τον κλασικό ορισμό ενός miRNA. Προέρχονται από **εναλλακτικές οδούς βιογένεσης**, παρέχοντας έτσι ένα επιπλέον επίπεδο πολυπλοκότητας στην miRNA-εξαρτώμενη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Υπάρχουν διάφορες εναλλακτικές διαδικασίες βιογένεσης. Έτσι διακρίνουμε τα προερχόμενα από τα μονοπάτια Mirtron, snoRNA, shRNA, tRNA, από την tRNase Z-εξαρτώμενη οδό, από miRNAs που προέρχεται μια τερματική φουρκέτα ενός endo-siRNA πρόδρομου (Miyoshi et al., 2010).

1.1.2.5 Άλλες κατηγορίες μικρών RNAs. Πιο πρόσφατα, ο όρος **scanning sRNA (scanRNA)** έχει χρησιμοποιηθεί για να αναφερθεί σε μικρά RNAs που επιτρέπουν την εξάλειψη DNA σε πρωτόζωα. Τα αλληλεπιδρώντα με QDE-2 μικρά RNAs (**qiRNAs**) και τα μικρά RNA ονομαζόμενα **Double stranded Breaks siRNAs (DSB siRNAs, diRNAs)** αναφέρονται σε μικρά RNAs που προκαλούν τομές στο DNA διπλής έλικας (DSB) και συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA στη *Neurospora* και την *Arabidopsis*, αντίστοιχα.

Τα **endoIR-siRNAs** προέρχονται από μονόκλινα πρόδρομα με δομή φουρκέτας που μεταγράφονται από διαφορετικούς γενετικούς τόπους που βρέθηκαν σε όλο το γονιδίωμα της *Arabidopsis*. Αυτές οι ανεστραμμένες επαναλήψεις διαφέρουν από τα γονίδια MIR όσον αφορά τη δομή και το μέγεθος της φουρκέτας. Πράγματι, η ενδογενής φουρκέτα είναι πολύ μεγαλύτερη από τη χαρακτηριστική φουρκέτα των πρόδρομων miRNAs. Οι δομές αυτές δεν πληρούν τα κριτήρια για να ταξινομηθούν τα προϊόντα τους ως miRNAs. Όπως τα pri-miRNAs, τα endoIR-siRNA προέρχονται από πρόδρομα μόρια RNA που διπλώνονται για να σχηματίσουν μόρια με τέλεια ή σχεδόν τέλεια φουρκέτα με διπλόκλινη περιοχή. Η συμπληρωματικότητα αυτή πιθανόν τα καθιστά πιο κατάλληλα υποστρώματα για τις πρωτεΐνες DCL2, DCL3 και DCL4 αντί για την DCL1 (Martínez de Alba et al., 2013).

Σε ένα υποσύνολο γενετικών τόπων, η **μεθυλίωση του DNA απαιτεί ειδικής κατηγορίας 21-22 nt siRNAs**. Αυτή η εναλλακτική οδός TGS είναι ανεξάρτητη από τα στοιχεία RdDM (RDR2, AGO4), αλλά εξαρτάται από συστατικά της κλασικής PTGS οδού

(όπως RDR6 και AGO2). Επιπλέον, αυτό το μεσολαβούμενο από 21-22 nt μονοπάτι μεθυλίωσης του DNA απαιτεί την πρωτεΐνη **NERD**. Η τελευταία είναι ένα μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών με επαναλήψεις καταλοίπων GW. Οι επαναλήψεις αυτές γενικά είναι μοριακά αγκίστρια για την πρόσδεση σε άλλες πρωτεΐνες. Η NERD πιστεύεται ότι συνδέεται με μεθυλίωση ιστόνης H3K9 στην γονιδιωματική περιοχή-στόχο. Η μεθυλίωση του DNA πραγματοποιείται μέσω της αλληλεπίδρασής της NERD με την AGO2 η οποία δεσμεύει τα siRNAs 21-22-nt (Pontier et al., 2012).

1.1.2.6 Μονοπάτια βιοσύνθεσης κατηγοριών μικρών RNAs ανεξάρτητα από Dicer. Σήμερα, είναι γνωστό ότι υπάρχουν και μονοπάτια βιοσύνθεσης κατηγοριών μικρών RNAs τα οποία δεν εξαρτώνται από την δράση πρωτεϊνών Dicer. Τέτοια μονοπάτια

δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα και στα φυτά. Ενδεικτικά αναφέρονται κάποιες κατηγορίες:

a. **piRNAs.** Τα piRNAs είναι μια κατηγορία μικρών RNAs μεγέθους συνήθως 24-30 nt. Πήραν την ονομασία τους λόγω της αλληλεπίδρασης με PIWI πρωτεΐνες. Είναι μια διακριτή κατηγορία των μικρών RNAs που σχηματίζουν το piRNA-induced silencing complex (piRISC) στην γαμετική σειρά πολλών ειδών ζώων. Το piRISC προστατεύει την ακεραιότητα του γονιδιώματος από τον πολλαπλασιασμό «γενωμικών παράσιτων» (μεταθετών στοιχείων) με αποσιώπηση τους. Η έκφρασή τους είναι περιορισμένη στις γονάδες (Siomi et al., 2011).

Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το μονοπάτι παραγωγής piRNAs είναι ανεξάρτητο από τις πρωτεΐνες Dicer (Houwing et al., 2007).

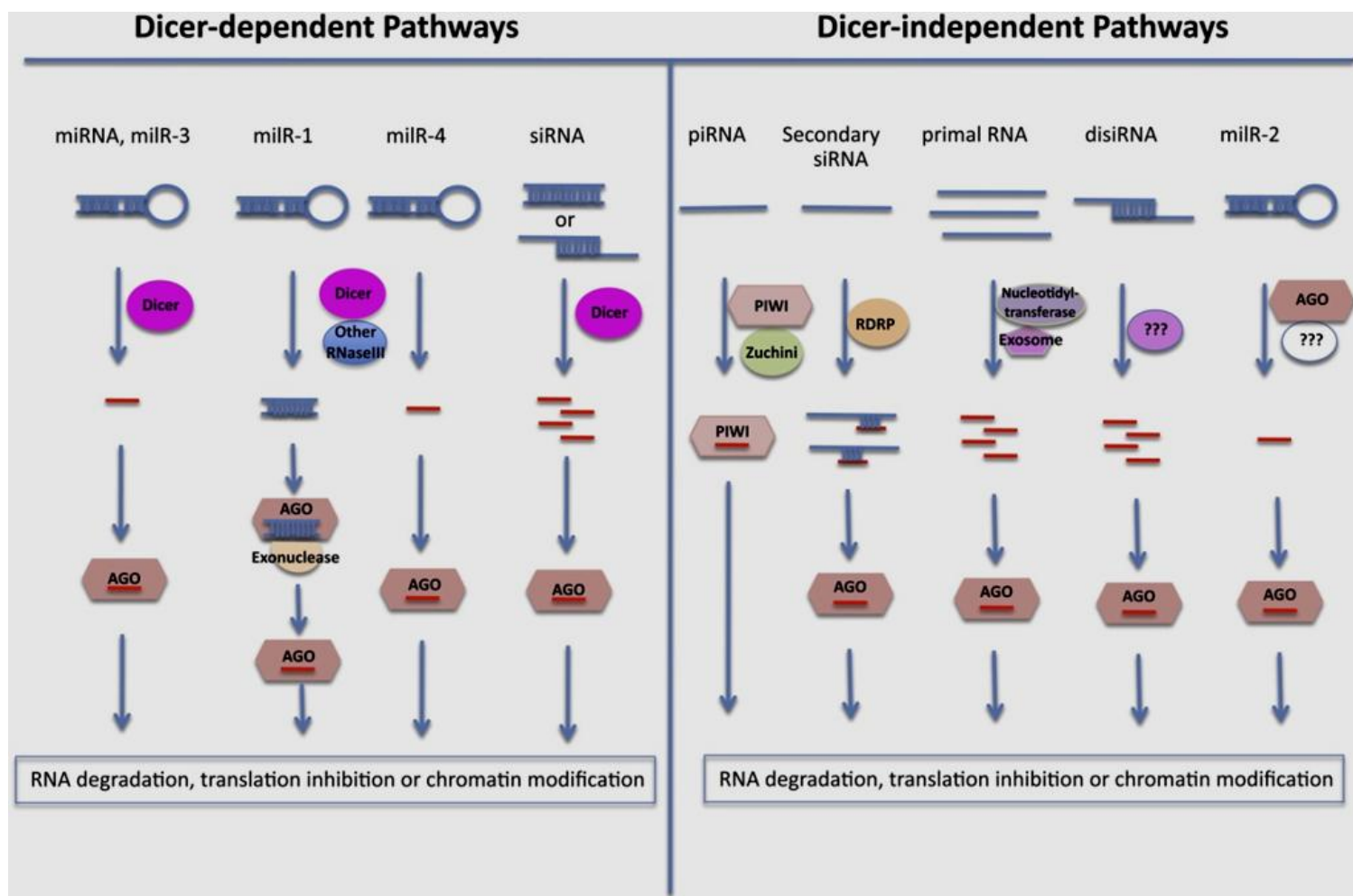
b. **Telomere specific small RNAs (tel-sRNAs).** Τα tel-sRNAs αρχικά απομονώθηκαν σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού. Έχουν μήκος 24 νουκλεοτίδια, είναι ανεξάρτητα από τις πρωτεΐνες Dicer και είναι 2'-Ο-μεθυλιωμένα στο 3'-άκρο. Υπόκεινται σε επιγενετική ρύθμιση, είναι ετεροχρωματινικής προέλευσης και παρόμοια με τα pi-RNAs (Cao et al., 2009).

c. **priRNAs** (primal small RNAs). Τα priRNAs είναι μια ξεχωριστή κατηγορία μικρών μορίων RNA που βιοσυντίθενται ελλείψει RNA- dependent RNA polymerase complex (RDRC) και Dicer αλλά αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη ago1 στον σχιζοσακχαρομύκητα. Τα priRNAs αποτελούν προϊόντα αποδόμησης άφθονων μεταγράφων. Δεσμεύονται με ago1 και στοχεύουν συμπληρωματικά μεταγράφα που προκύπτουν από την αμφίδρομη μεταγραφή DNA επαναλήψεων (Halic & Moazed, 2010).

d. **Dicer-independent small interfering RNAs (disiRNAs).** Τα disiRNAs αρχικά απομονώθηκαν στον νηματώδη μύκητα *Neurospora*. Τα disiRNAs προέρχονται από γενετικούς τόπους που παράγουν επικαλυπτόμενα θετικής και αρνητικής πολικότητας μεταγράφα. Δεν απαιτούν τα γνωστά RNAi σύμπλοκα για την παραγωγή τους (Lee et al., 2010).

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

e. Κάποια miRNA-like small RNAs (**miRNAs**) στον νηματώδη μύκητα *Neurospora* (Lee et al., 2010) κ.α.



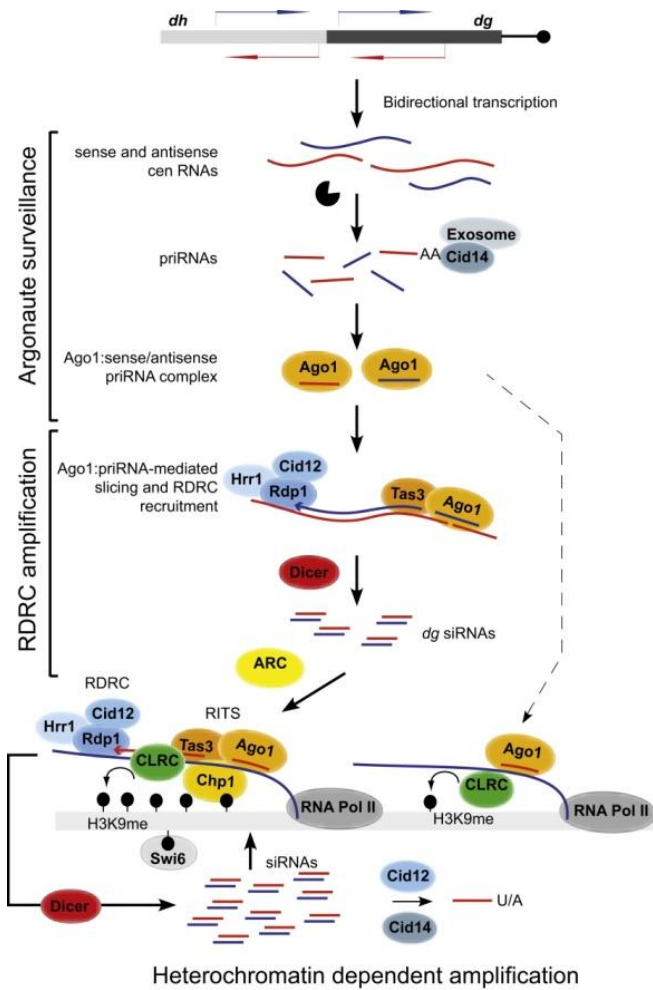
Εικόνα 4. Μονοπάτια βιοσύνθεσης μικρών RNAs εξαρτώμενα και ανεξάρτητα από πρωτεΐνες Dicer (Jin & Zhu, 2010).

1.1.2.7 Ο ρόλος των AGOs. Τα μικρά RNAs χρησιμοποιούνται σαν υποστρώματα από πρωτεΐνες “Slicer”, οι οποίες ανιχνεύουν μεγαλύτερα μόρια RNA με συμπληρωματικότητα με τα μικρά RNAs. Η αναγνώριση οδηγεί στην ενδονουκλεόλυση των μεγαλύτερων αυτών μορίων RNA. Σαν “Slicers” έχουν ταυτοποιηθεί πρωτεΐνες της οικογένειας AGO (Baumberger, 2005 #77). Ο όρος **RISC (RNA-induced silencing complex)** αναφέρεται σε ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από μια AGO πρωτεΐνη, ένα sRNA και άλλους βοηθητικούς πρωτεϊνικούς παράγοντες (Csorba et al., 2010; Lakatos et al., 2006). Στα φυτά, η φόρτωση των siRNAs σε ένα συγκεκριμένο σύμπλοκο AGO υπαγορεύεται κατά προτίμηση (αλλά όχι αποκλειστικά) από τα 5' τερματικά νουκλεοτίδια τους.

Στην *Arabidopsis*, η οικογένεια των AGO γονιδίων μετρά δέκα μέλη. Τα περισσότερα miRNAs και τα εξαρτώμενα από DCL4 21-nt siRNAs φορτώνονται κυρίως στο AGO1. Το τελευταίο καθοδηγεί μετά-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (PTGS) των mRNA στόχων. Γενικά, φυτικά miRNAs και 21-nt siRNAs (τα οποία παράγονται από τις πρωτεΐνες DCL1 και DCL4 αντίστοιχα) μπορούν να ενσωματωθούν σε πρωτεΐνες AGO1, AGO2, AGO7 ή AGO10. (Mallory & Vaucheret, 2010)

Επίσης, έχει δειχθεί ότι τόσο η AGO1 όσο και η AGO7 λειτουργούν για να εξασφαλίσουν την αποτελεσματική κάθαρση των ιικών RNA. Το AGO7 φαίνεται να λειτουργεί ως ένα υποκατάστατο slicer όταν το AGO1 απουσιάζει (Qu et al., 2008). Τα εξαρτώμενα από DCL3 24-nt siRNAs ενσωματώνονται σε AGO4, AGO6 ή AGO9. Μετά την ενσωμάτωσή τους ενεργούν ως επί το πλείστον στο να κατευθύνουν μεθυλίωση της κυτοσίνης και αναπροσαρμογές της χρωματίνης σε ενδογενείς τόπους. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται μεταθετά και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες με μια διαδικασία που είναι γνωστή ως RNA κατευθυνόμενη DNA μεθυλίωση (RdDM).

1.1.2.8. Ο ρόλος των RNA Πολυμερασών IV και V στην RdDM. Η RNA πολυμεράση IV (Pol IV) εκκινεί την RNA -κατευθυνόμενη DNA μεθυλίωση (RdDM) παράγοντας μετάγραφα τα οποία στη συνέχεια αντιγράφονται σε δίκλωνο RNA (dsRNA) από την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 2 (RDR2). Η Pol IV και η RDR2 αλληλεπιδρούν φυσικά *in vivo*. Η DICER3 (DCL3) διασπά το dsRNA σε δίκλινα siRNAs 24 - νουκλεοτιδίων που μεθυλιώνονται στα 3'-άκρα από την πρωτεΐνη HEN1. Η οδηγός αλυσίδα του διπλόκλωνου siRNA αλληλεπιδρά με Argonaute 4 (AGO4) για να σχηματίσουν ένα σύμπλοκο RISC. Ανεξάρτητα από την βιογένεση του siRNA, η μετάγραφή από την Pol V επικουρείται από το συγκρότημα DDR που περιλαμβάνει την DRD1 (DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1), την DMS3 DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3) και την RDM1 (REQUIRED FOR DNA METHYLATION 1) και την DMS4. Στη συνέχεια, η AGO4 δεσμεύει μετάγραφα της Pol V μέσω σχηματισμού ζευγών βάσεων με το siRNA. Η πρωτεΐνη RDM1 του συγκροτήματος DDR δεσμεύει και την AGO4 και την *de novo* μεθυλτρανσφεράση κυτοσίνης DRM2 (DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2). Με τον τρόπο αυτό γεφυρώνει το χάσμα ανάμεσα στις δυο προσελκύοντας την DRM2 σε περιοχές που μεταγράφει η Pol V. Το σύνολο των βημάτων καταλήγει σε μεθυλίωση του DNA. Παράλληλα, λαμβάνουν χώρα τροποποιήσεις των ιστονών που προκύπτουν από την οδό RdDM και περιλαμβάνουν την αφαίρεση των τροποποιήσεων που σχετίζονται με ενεργή χρωματίνη (απακετυλίωση ιστονών, απομεθυλίωση H3K4) και την αντικατάστασή τους με τροποποιήσεις χαρακτηριστικές της ανενεργής χρωματίνης (μεθυλίωση H3K9 και H3K27) διευκολύνοντας έτσι την μεταγραφική σίγηση.



Εικόνα 5. Αριστερά: RNA-κατευθυνόμενη DNA μεθυλίωση (RdDM) στον σχιζοσακχαρομύκητα (Halic & Moazed, 2010). Δεξιά: RNA -κατευθυνόμενη DNA μεθυλίωση (RdDM) στα φυτά (Haag & Pikaard, 2011).

1.1.2.9 Μικρής και μεγάλης κλίμακας διασπορά της RNA σίγησης. Πρώιμες μελέτες της PTGS απέδειξαν (Himber et al., 2003) ότι η RNA σίγηση είναι σε θέση να εξαπλωθεί σε περίπου 10-15 κύτταρα μακριά από όπου ξεκίνησε (cell-to-cell movement). Το σήμα είναι μόρια RNA που μεταφέρονται από κύτταρο σε κύτταρο μέσω πλασμοδεσμάτων. Για την παραγωγή του σήματος είναι απαραίτητες οι πρωτεΐνες DCL4 και AGO1 ενώ οι DCL3 και AGO4 χρειάζονται για την υποδοχή του σήματος (Dupoyet et al., 2005). Αντίθετα, στην υποδοχή του σήματος στα γειτονικά κύτταρα απαιτούνται μια

πυρηνική RDR με ρόλο στην μεθυλίωση του DNA, μια πρωτεΐνη με μοτίβο SNF2 που σχετίζεται με αναπροσαρμογή χρωματίνης και η μεγαλύτερη υπομονάδα της RNA πολυμεράση-IV (Dunoyer et al., 2007; Smith et al., 2007). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι το σύμπλοκο POL IV (NRPD1)-RDR2-DCL3-AGO4 (που σχετίζεται επίσης με DNA μεθυλίωση) απαιτείται για την υποδοχή του σήματος. Η υποδοχή του διασυστηματικού σήματος (δηλαδή του σήματος που διασπείρεται σε μεγάλες αποστάσεις μέσω του φλοιώματος) είναι επίσης εξαρτώμενη από τους ίδιους γενετικούς παράγοντες, δηλαδή το σύμπλοκο POL IV (NRPD1)-RDR2-DCL3-AGO4 (Brosnan et al., 2007; Dunoyer et al., 2007; Smith et al., 2007).

1.1.2 Μηχανισμοί δράσης (καταστολέων) suppressors της RNA σίγησης.

1.1.2. 1 Πρόσδεση σε small RNAs (small RNAs Binding). Η πρωτεΐνη **P19** [του ιού *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV)] αναστέλλει την RNA σίγηση μέσω της δέσμευσης small RNAs. Με τον σχηματισμό P19-siRNA συμπλόκων μειώνεται η ποσότητα των ελεύθερων siRNA σε κύτταρα, καθιστώντας έτσι τα siRNAs απροσπέλαστα για το RISC (Lakatos et al., 2004). Η πρωτεΐνη **P21** (Beet yellows closterovirus), ο **P15** (Peanut clump reclinivirus), ο **{gamma} B** (Barley stripe mosaic hordeivirus), ο **HC-Pro** (Tobacco etch potyvirus), όπως η P19, προσδέονται σε ds-sRNAs και η πρόσδεση αυτή είναι εξαρτώμενη από το μήκος του ds-RNA. Αντίθετα, η πρωτεΐνη **CP** (Turnip crinkle carmovirus) προσδέεται όχι μόνο σε small RNAs αλλά και σε δίκλινα μόρια μεγαλύτερου μεγέθους (Merai et al., 2006). Η πρωτεΐνη **P21** (Beet yellow virus) δεσμεύει small RNAs μόρια δημιουργώντας μια οκταμερική δομή δακτυλίου που δεσμεύει sRNAs (Ye & Patel, 2005). Η πρωτεΐνη **NS1** (του influenza A virus), αν και προέρχεται από ζωικό ιό, έχει την δυνατότητα να προσδέει small RNAs εάν εκφραστεί σε φυτά (Bucher et al., 2004). Καταστολείς που έχουν την δυνατότητα να προσδέονται σε siRNA έχουν την δυνατότητα να προσδέονται και σε miRNAs (miRNA binding). Μάλιστα, πολλές αναπτυξιακές ανωμαλίες που αποτελούν συμπτώματα ιών έχουν αποδοθεί σε αυτή την ικανότητα (Charman et al., 2004; Dunoyer et al., 2004; Kasschau et al., 2003). Τόσο η **P21** όσο και η **P19** (αλλά όχι η P1/HC-Pro) μπορούν να δημιουργούν σύμπλοκα (Charman et al., 2004) με miRNA/miRNA* (ο αστερίσκος αναφέρεται στην συμπληρωματική αλυσίδα της αλληλουχίας οδηγού). Αντίθετα, η **AC4** (του ACMV) έχει την δυνατότητα να δεσμεύει μονόκλινα miRNAs και small RNAs [Πρόσδεση σε ss miRNA (ss miRNA binding)] αλλά όχι και τα δίκλινα RNA πρόδρομα τους δηλ. δίκλινα miRNAs και small RNAs (Chepallan et al., 2005). Οι πρωτεΐνες **P15** (του PCV), **P25** (του Potato virus X) και **P38** (του TCV) δεν επηρεάζουν τον μεταβολισμό των miRNAs. Όμως, οι **Hc-Pro** [του Turnip

mosaic virus (TuMV)] και **P19** [του Tomato bushy stunt virus (TBSV)] μπορούν να δημιουργήσουν σύμπλοκα με miRNAs (Dunoyer et al, 2004). Σύμπλοκα με miRNA/miRNA* και με δίκλινα siRNAs μπορούν να συν-ανοσοκατακρυστωθούν και με την πρωτεΐνη αντιγραφής ενός *tobamovirus* όπως ο ιός του μωσαϊκού του καπνού (Kurihara et al., 2007).

1.1.2.2 Αλληλεπιδράσεις με 3'-overhangs. Η δέσμευση του **P19** σε miRNA/miRNA* δίκλινα συνδέεται με ενισχυμένη συσσώρευση miRNAs με διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα. Αυτό είναι συμβατό με την υπόθεση ότι τα miRNAs έχουν μικρότερο μέγεθος λόγω απαλοιφής των 3'-overhangs (Dunoyer et al., 2004). Τα δεδομένα αυτά για τα miRNA επιβεβαιώνονται και από άλλες ομάδες και επεκτείνονται και στην περίπτωση small RNAs που προέρχονται από υποκινητές διαγονιδιακών γενετικών τόπων (Papp et al., 2003).

1.1.2.3 Τροποποίηση του 3'-άκρου siRNAs (Alteration of 3'-end siRNAs modifications). Ένα μεγάλο μέρος όλων των small RNAs στον καπνό έχουν τροποποιηθεί. Η τροποποίηση εμφανίζεται στη 2-υδροξυλομάδα της τερματικής ριβόζης και μειώνει σημαντικά την αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης των τροποποιημένων αυτών small RNAs. Η έκφραση του καταστολέα **Hc-Pro** έχει σαν αποτέλεσμα μία αξιοσημείωτη μείωση στην τερματική τροποποίηση των ιογενών siRNAs, αλλά δεν επηρεάζει σημαντικά την τροποποίηση των ενδογενών miRNAs και των 24-nt siRNAs (Ebhardt et al., 2005).

1.1.2.4. Αλλαγές στα πρότυπα μεθυλίωσης miRNA (miRNA methylation) Η ρεπλικάση του TMV δημιουργεί παρεμβολές στην μεσολαβούμενη από την HEN1 μεθυλίωση των siRNA και miRNA (Vogler et al., 2007). Διάφοροι άλλοι ιογενείς καταστολείς της RNA σίγησης, όπως οι **P1/Hc-Pro**, **p21** και **p19** έχουν παρόμοια δράση (Yu et al., 2006). Η εξαρτώμενη από HEN1 μεθυλίωση στο 3'-τελικό νουκλεοτίδιο είναι ένα κρίσιμο βήμα για την σταθερότητα των microRNAs (miRNAs).

1.1.2.5 Πρόσδεση σε dsRNA (dsRNA binding). Όπως παρατέθηκε προηγουμένως, η πρόσδεση πολλών καταστολέων σε δίκλινο RNA εξαρτάται από το μέγεθος του (εκλεκτική πρόσδεση σε sRNAs). Υπάρχουν όμως και καταστολείς οι οποίοι προσδέονται σε δίκλινο RNA ανεξαρτήτως μεγέθους. Μπορούν δηλαδή να προσδεθούν και σε μεγαλύτερου μεγέθους RNA μόρια. Τέτοια περίπτωση είναι η **P14** από Potato latent Aureusvirus (Mérari et al., 2005) ή η **CP** του Turnip crinkle carmovirus (Merai et al., 2006) ή η **p21** από Beet yellow closterovirus (Ye & Patel, 2005). Ανάλογα παραδείγματα έχουμε και για καταστολείς από ιούς που προσβάλλουν ζώα όπως η **B2** από Nodamura virus (NoV, ή η **B2** από Flock House virus (FHV, Chao et al., 2005).

1.1.2.6 Παρεμπόδιση της συγκρότησης του RISC (inhibition of RISC formation). Οι καταστολείς **p19**, **p21** και **Hc-Pro** παρεμποδίζουν την επαγόμενη από siRNA

συναρμολόγηση του συμπλόκου RISC παρακωλύοντας το πρώτο στάδιο του σχηματισμού του. Κανένας από τους καταστολείς αυτούς δεν επηρεάζει την δραστικότητα των προσυναρμολογημένων RISC συμπλόκων (Lakatos et al., 2006).

1.1.2.7 Παρεμβολή στην δράση Dicers (Interfering with Dicers) π.χ. Η **P38** που κωδικοποιείται από τον ιό TCV καταστέλλει την DCL4. Η αναστολή της DCL4 από έναν ιϊκό καταστολέα αποκαλύπτει την δευτερεύουσα αντιϊκή δράση της DCL2 (Deleris et al., 2006).

1.1.2.8 Δημιουργία συμπλόκων με ένζυμα μηχανισμού RNA silencing (Protein-Protein Interactions with RNA silencing enzymes). Η πρωτεΐνη **2b** του ιού CMV αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη Argonaute1 (ago1) *in vitro* και *in vivo*. Αυτή η αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα κυρίως στην επιφάνεια του μοτίβου PAZ και μέρος του μοτίβου PIWI της **AGO1**. Συνεπώς με αυτή την αλληλεπίδραση, η 2b αναστέλλει ειδικά την ενδονουκλεολυτική ενεργότητα από ago1 στο σύμπλοκο RISC. Με τον τρόπο αυτό η 2b επιτυγχάνει αναστολή miRNA μονοπατιών, εξασθένιση της RNA σίγησης και την καταστολή της άμυνας του ξενιστή. Η ago1 είναι υπεύθυνη για την αξιοποίηση των προερχόμενων από ιό siRNAs *in vivo*. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η ago1 είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην άμυνα ενάντια σε μόλυνση από τον ιό CMV (Zhang et al., 2006). Η πρωτεΐνη **V2** του ιού tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV) αλληλεπιδρά άμεσα με την πρωτεΐνη SISGS3 από τομάτα, ομόλογη της πρωτεΐνης SGS3 (AtSGS3) της *Arabidopsis* (Glick et al., 2008). Η SGS3 συμμετέχει στα εξαρτώμενα από την RDR6 μονοπάτια βιογένεσης siRNA σε φυτά και αλληλεπιδρά με την RDR6, με την οποία και συνεντοπίζεται σε διακριτά κυτταροπλασματικά διαμερίσματα. Είναι ενδιαφέρον ότι τα διαμερίσματα που περιέχουν SGS3 και RDR6 (ονομάζονται SGS3/RDR6-bodies) είναι διαφορετικά από αυτά που επεξεργάζονται mRNAs για φυσιολογική αποικοδόμηση (Kumakura et al., 2009). Έκφραση της πρωτεΐνης **P6** από τον ιό Cauliflower mosaic virus (CaMV) στην *Arabidopsis* είναι γενετικά ισοδύναμη με αδρανοποίηση της DRB4, μιας πυρηνικής πρωτεΐνης που διευκολύνει τη δραστικότητα της DCL4. Η πρωτεΐνη P6 συν-ανοσοκατακρυσμίζεται με την DRB4 σε φυτικά κύτταρα μολυσμένα με CaMV (Haas et al., 2008).

1.1.2.9 Αποικοδόμηση ένζυμων του μηχανισμού RNA σίγησης (ago degradation). Η αποικοδόμηση αυτή μπορεί να είναι ή να μην είναι κατευθυνόμενη από 26S πρωτεάσωμα (proteasome). Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη **P0** από *potyviruses* αλληλεπιδρά με τη βοήθεια ενός διατηρημένου μοτίβου F-box με τα ορθόλογα της πρωτεΐνης S-phase kinase-related protein 1 (SKP1) της *A. thaliana*. Η SKP1 είναι ένα μέλος της οικογένειας SCF E3 λιγασών ουβικιτίνης (Pazhouhandeh et al., 2006). Η πρωτεΐνη P0 επίσης αλληλεπιδρά φυσικά με ago1. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, οι Bortolamiol et al. (2007) πρότειναν ότι η P0 χρησιμοποιεί σαν εργαλείο το μηχανισμό των E3 λιγασών ουβικιτίνης για να ρυθμίζει

την γονιδιακή σίγηση μέσω αποσταθεροποίησης της ago1. Ωστόσο, η στοχευμένη καταστολή των AGOs δεν είναι ευαίσθητη στην αναστολή του πρωτεασώματος, υποδηλώνοντας ίσως ότι το πρωτεάσωμα δεν εμπλέκεται (Baumberger et al., 2007). Η P0 αποτρέπει την συγκρότηση του RISC μέσω αλληλεπίδρασης της με ένα από τα πρωτεϊνικά συστατικά του. Αναστέλλει έτσι το σχηματισμό siRNA/miRNA-RISC, και τελικά, οδηγεί σε αποσταθεροποίηση και αποικοδόμηση του ago1 (Csorba et al., 2010).

1.1.2.10 Αλληλεπιδράσεις με σχετιζόμενες με καλμοδουλίνη πρωτεΐνες. (Interaction with calmodulin-related proteins). Χρησιμοποιώντας το σύστημα δύο υβριδίων του ζυμομύκητα εντοπίστηκε μια calmodulin-related protein (που ονομάζεται RGS-Cam) που αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη **HC-Pro**. Η πρωτεΐνη RGS-Cam όπως και η πρωτεΐνη HC-Pro μόνη της, καταστέλλει την RNA σίγηση (Anandalakshmi et al., 2000).

1.1.2.11 Επαγωγή γονιδίων ξενιστή (Transactivation of host genes). Η πρωτεΐνη **AC2** από τον ιό MYMV σχετίζεται με εξασθένιση της RNA σίγησης τοπικά και την παρεμπόδιση της εξάπλωσης του συστηματικού σήματος. Πολλοί υποκινητές κλωνοποιημένοι από την *Arabidopsis* επάγονται έντονα από την πρωτεΐνη AC2. Η AC2 επάγει συστατικά του μεταγραφώματος του φυτού, όπως ανιχνεύεται με μικροσυστοιχίες Affymetrix (Trinks et al., 2005).

1.1.2.12 Επαγωγή αρνητικών ρυθμιστών των γονιδίων που σχετίζονται με την σίγηση. Το miR168 είναι αρνητικός ρυθμιστής του mRNA της πρωτεΐνης ago1 το οποίο φέρει θέση πρόσδεσης του miR168. Επαγωγή της έκφρασης miR168 προκαλείται από την **P19** από Tombusvirus. Η απουσία της P19 έχει ως αποτέλεσμα την μη επαγωγή του miR168 και συνοδεύεται με την αυξημένη συσσώρευση της πρωτεΐνης ago1 (Várallyay et al., 2010).

1.1.2.13 Δράση ιικών RNAsών III (viral RNases III as silencing suppressors). Οι ειδικές ενδονουκλεάσες για δίκλωνο RNA (dsRNA) που ανήκουν στις κλάσεις 3 και 2 των RNase III μετατρέπουν πρόδρομα dsRNA σε siRNA ή microRNA. Ωστόσο, μια RNase III κλάσης 1 από τον ιό Sweet potato chlorotic stunt closterovirus (SPCSV) εμπλέκεται στην καταστολή της RNA σίγησης. Η εν λόγω RNaseIII έχει ειδική δραστηριότητα dsRNA-ενδονουκλεάσης και δρα συνεργιστικά με μια άλλη πρωτεΐνη (P22) που κωδικοποιείται από τον SPCSV για την καταστολή της RNA σίγησης (Kreuze et al., 2005).

1.1.2.14 Πρωτεΐνες μιμητές (protein mimicry). Η πρωτεΐνη **P38** δρα ως ένα ομοδιμερές ή πολλαπλάσια αυτού. Μιμείται πρωτεΐνες ξενιστή που περιέχουν μοτίβα γλυκίνης/ τρυπτοφάνης (GW). Οι πρωτεΐνες αυτές απαιτούνται κανονικά για συναρμολόγηση και λειτουργία του RISC σε διαφορετικούς οργανισμούς. Ο P38 έχει επίσης μοτίβα GW που δεσμεύουν άμεσα και εκλεκτικά την ago1 στην *Arabidopsis* (Azevedo et al., 2010). Η πρωτεΐνη **P1** από τον ιό Sweet potato mild mottle ipomovirus (SPMMV) αναστέλλει

την προγραμματισμένη από si/miRNA-δραστηριότητα του συμπλόκου RISC. Η αναστολή της δραστηριότητας του RISC συμβαίνει με σύνδεση P1 σε υψηλού μοριακού βάρους RISC. Η P1 στοχεύει την Argonaute1 (ago1), καταλυτική μονάδα του RISC. Η δραστηριότητα καταστολέα εντοπίζεται στο N-τερματικό ήμισυ του P1. Στην περιοχή αυτή υπάρχουν τρία μοτίβα WG/GW που μοιάζουν με θέσεις πρόσδεσης στο AGO και είναι απολύτως απαραίτητα για πρόσδεση και καταστολή της λειτουργίας του ago1. Σε αντίθεση με άλλους ιογενείς καταστολείς σίγησης που έχουν αναλυθεί μέχρι στιγμής, η P1 αναστέλλει τόσο υφιστάμενα όσο και de novo σχηματιζόμενα RISC σύμπλοκα που περιέχουν ago1 πρωτεΐνες (Giner et al., 2010).

1.1.2.15 Τα ιϊκά RNAs ως καταστολείς σίγησης. Μέχρι τώρα ασχοληθήκαμε με ιϊκές πρωτεΐνες που δρουν σαν καταστολείς σίγησης. Σαν καταστολείς σίγησης όμως μπορούν να δράσουν και ιϊκά RNAs. Για παράδειγμα, ιϊκά RNAs που σχετίζεται με ανθρώπινους αδενοϊούς (adenovirus) όπως τα VA RNAI and VA RNAII λειτουργούν ως καταστολείς της RNAi παρεμποδίζοντας τη δραστηριότητα Dicer. Τα RNAs αυτά δρουν ως ανταγωνιστικά υποστρώματα για Dicer (την οποία δεσμεύουν) και παρεμποδίζουν την πρόσβαση της στα κανονικά της υποστρώματα (Andersson et al., 2005). Ανάλογες περιπτώσεις έχουμε και στα φυτά όπως στην περίπτωση του Red clover necrotic mosaic dianthovirus (RCNMV). Και εδώ τα RNA ενδιάμεσα του διπλασιασμού του ιού απομακρύνουν από τον μηχανισμό του RNAi ενζυμα όπως οι Dicer (Takeda et al., 2005).

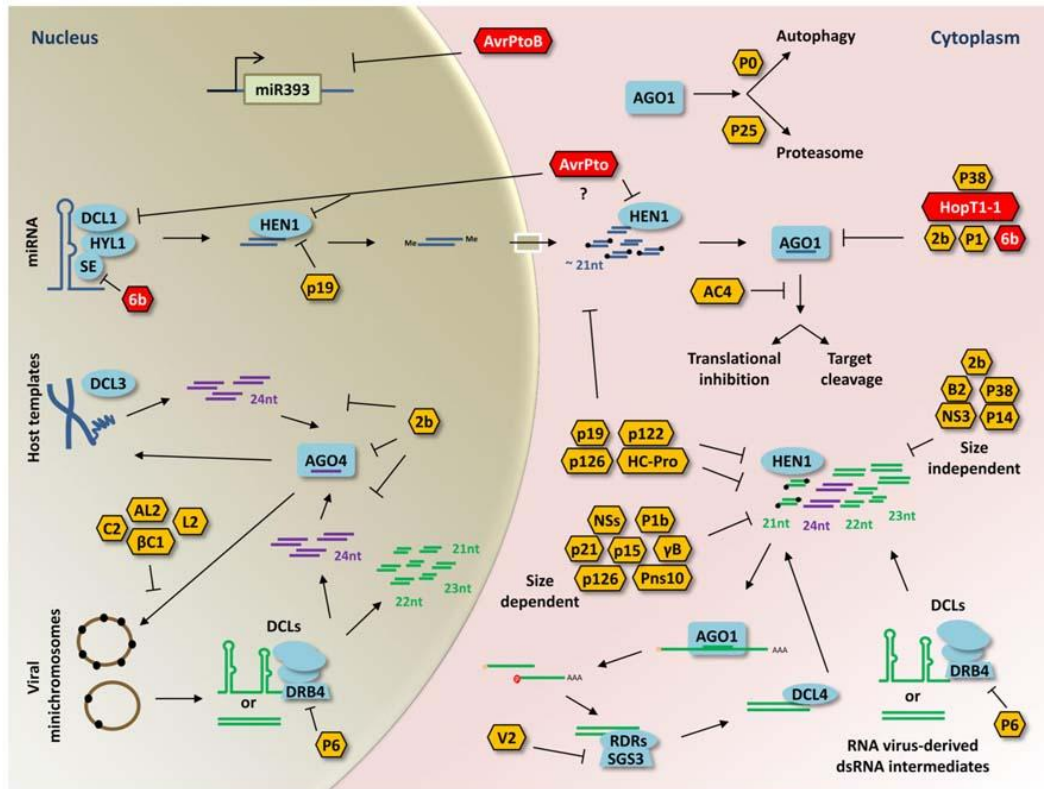
Οι καταστολείς έχουν την δυνατότητα να επηρεάζουν ποικιλοτρόπως το σύνολο των μηχανισμών που συνδέονται με RNA σίγηση. Μερικά παραδείγματα αναφέρονται παρακάτω.

1.1.2.16 Ρόλος Καταστολέων στην Μεταβατικότητα (Suppressors AND transitivity). Οι πρωτεΐνες **P19**, **P38**, και **Hc-Pro** καταστέλλουν την κατευθυνόμενη από RDR6 μεταβατική (transitive) RNA σίγηση, ενώ οι **P15** και **P25** δεν παρεμβαίνουν σε αυτή τη διαδικασία (Moissiard et al., 2007). Επίσης, η πρωτεΐνη **2b** του CMV αναστέλλει την παραγωγή εξαρτώμενων από RDR1 ιικών siRNAs (Diaz-Pendon et al., 2007).

1.1.2.17 Ρόλος Καταστολέων στην συστηματική σίγηση (Suppressors and systemic silencing). Η δυνατότητα διαγονιδιακών φυτών (που υπερεκφράζουν ανεστραμμένες επαναλήψεις ή εκφράζουν σιγημένα γονίδια μονής πολικότητας) να μπορούν να στείλουν ένα σήμα συστηματική σίγησης δεν αλλοιώνεται ανιχνεύσιμα από την πρωτεΐνη **HC-Pro** (Mallory et al., 2003). Ο **P0** δεν εμποδίζει το συστηματικό σήμα της σίγησης υποδεικνύοντας ότι το σηματοδοτικό μόριο είναι εξαρτώμενο από AGO πρωτεΐνες (Baumberger et al., 2007).

1.1.2.18 Ρόλος Καταστολέων στην RdDM (Suppressors AND methylation). Η πρωτεΐνη **p69** (από τον ιό turnip yellow mosaic tymovirus)) αναστέλλει την PTGS και DNA

Μεθυλίωση που επάγεται από θετικής πολικότητας διαγονίδια. Επίσης καταστέλλει το μονοπάτι των siRNA, αλλά προωθεί το μονοπάτι των miRNA στο *A. thaliana*. Η καταστολή του μονοπατιού siRNA από την P69 είναι σε στάδιο πριν την αναγνώριση του dsRNA (Chen et al., 2004a).



Εικόνα 6. Ενδοκυτταρικοί στόχοι καταστολών RNA σίγησης. Επιχειρείται αντιπαραβολή με γνωστούς στοχους εκκρινόμενων βακτηριακών πρωτεϊνών (Pelaez & Sanchez, 2013).

1.1.2.19 Καταστολείς και νέκρωση. Η πρωτεΐνη-καταστολέας RNA σίγησης **P19** του TBSV (*tombusvirus*) πυροδοτεί **HR** ή **HR-like νέκρωση** σε ορισμένα είδη *Nicotiana* (Angel & Schoelz, 2013) και πιο συγκεκριμένα στα sections *Sylvestres* (*N. sylvestris*), *Nicotiana* (*N. tabacum*), και *Alatae* (*N. bonariensis*). Η ταχεία αυτή νέκρωση θεωρείται ως HR απόκριση του φυτού και συνδέεται με γονίδια ανθεκτικότητας και την απόκτηση άμυνας του φυτού που περιορίζει την εξάπλωση του ιού (Angel et al., 2011). Αντίθετα, η συστημική νέκρωση θεωρείται σύμπτωμα του ιού. Τα είδη *Nicotiana* που εκδηλώνουν συστημική νέκρωση μετά από μόλυνση με ολόκληρο τον ιό, ανταποκρίθηκαν στην αγροένχυση της *tombusvirus* P19 με μια πολύ αδύναμη και καθυστερημένη νέκρωση. Για παράδειγμα, αγροένχυση της TBSV P19 έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας **καθυστερημένης νέκρωσης** στη *N. benthamiana*, η ανάπτυξη της οποίας γίνεται εμφανής 10 μέρες αργότερα (dpi). Η ανάπτυξη

αυτών των νεκρωτικών συμπτωμάτων ενισχύεται από ορισμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Angel et al., 2011).

Εκτός από τον P19 και άλλες προσδεδεμένες σε RNA πρωτεΐνες έχουν εμπλακεί στον κυτταρικό θάνατο. Για παράδειγμα, η RNA-binding protein CaRBP1 από την πιπεριά (*Capsicum annuum*) είναι απαραίτητη για HR και σηματοδότηση άμυνας στο κυτταρόπλασμα (Lee et al., 2012). Η CaRBP1 περιέχει ένα μοτίβο αναγνώρισης RNA και εμφανίζει in vitro ικανότητα δέσμωσης RNA. Παροδική έκφραση CaRBP1 στην πιπεριά προκαλεί κυτταρικό θάνατο .

1.1.2.20 Ενδογενείς καταστολείς του RNA silencing. Συνήθως ως καταστολείς σίγησης έχουν χαρακτηριστεί πρωτεΐνες παθογόνων. Δεν προέρχονται όμως όλοι οι γνωστοί αναστολείς από κυτταρικά παράσιτα. Στην *Arabidopsis* οι πρωτεΐνες **FIERY1**, **XRN2**, και **XRN3** έχουν χαρακτηριστεί ως ενδογενείς καταστολείς του RNA silencing (Gy et al., 2007). Η FIERY1 είναι μια nucleotidase/phosphatase (FRY1) ενώ οι άλλες δυο εξωριβονουκλεάσες. Παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζει ένας αναστολέας της RNase L που ονομάζεται **AtRLI2** (Sarmiento et al., 2006). Επιπλέον, μια calmodulin-related protein (που ονομάζεται **RGS-Cam**) καταστέλλει την RNA σίγηση και επίσης θεωρείται ενδογενής καταστολέας σίγησης (Anandalakshmi et al., 2000).

1.1.2.21 Ενίσχυση Σίγησης. Ενισχυτές της RNA σίγησης είχαν χαρακτηριστεί και παλιότερα όπως το άφθονο φυτικό ένζυμο **μεθυλεστεράση πηκτίνης**. Η ενίσχυση της σίγησης στην περίπτωση αυτή συνοδεύεται από μετεγκατάσταση της πρωτεΐνης DCL1 από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα και ενεργοποίηση της βιογένεσης siRNAs και miRNAs (Dorokhov et al., 2006).

1.2 Αλληλεπίδραση RNA σίγησης και Φυτοπαθογόνων.

1.2.1 Αλληλεπίδραση RNA σίγησης και Φυτικών Ιων.

1.2.1.1 "Extreme Resistance" (ER). Ορισμένα είδη του γένους *Nicotiana* είναι σε θέση να ανιχνεύουν και, στη συνέχεια, να ανταγωνίζονται την επίδραση της πρωτεΐνης P19 ενεργοποιώντας ένα εξαιρετικά ισχυρό μηχανισμό απόκρισης που προστατεύει τους ιστούς έναντι του ιού Tomato bushy stunt virus (Sansregret et al., 2013). Η απόκριση αυτή είναι εξαρτώμενη από σαλικυλικό και αιθυλένιο. Συμβαίνει χωρίς μικροσκοπικό κυτταρικό θάνατο, παρέχοντας ένα παράδειγμα "**extreme resistance**" (ER). Η ικανότητα του P19 να δεσμεύει sRNA (η οποία είναι απαραίτητη για την λειτουργία του), είναι επίσης απαραίτητη

για την επαγωγή ER. Ο μηχανισμός άμυνας του φυτού αναγνωρίζει την ύπαρξη συμπλόκου P19-sRNA και ενεργοποιεί μηχανισμούς απόκρισης.

Η "extreme resistance" (ER) είναι ένα παράδειγμα ανθεκτικότητας για την οποία δεν είναι απαραίτητος ο κυτταρικός θάνατος. Υπερέκφραση R-γονιδίων όπως το RCY1 (προσδίδει αντίσταση σε CMV (Y) στην *A. thaliana* οικότυπος C24) έχει την δυνατότητα να επάγει σε τέτοιο βαθμό τα υπόλοιπα μονοπάτια απόκρισης του ξενιστή ώστε να μην είναι απαραίτητη και η εκδήλωση HR (Sekine et al., 2008).

1.2.1.2 Εμφάνιση χλωρωτικών, νεκρωτικών και μωσαϊκών συμπτωμάτων. Ο μηχανισμός της σίγησης έχει ενοχοποιηθεί για συμμετοχή στους μηχανισμούς που καταλήγουν στην εμφάνιση χλωρωτικών, νεκρωτικών και μωσαϊκών συμπτωμάτων. Ένα συνηθισμένο σύμπτωμα μετά από ιϊκή μόλυνση σε φυτά είναι ο **σχηματισμός χλωρωτικών κηλίδων** στα φύλλα. Χλωρωτικές και υγιείς περιοχές συνυπάρχουν στο ίδιο φύλλο. Έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα του ιού στον χλωρωτικό ιστό είναι υψηλά, ενώ είναι χαμηλά σε υγιή ιστό. Επιπλέον, η παρουσία των siRNAs περιορίζεται στα χλωρωτικά σημεία και τα όρια μεταξύ των υγιών και μολυσμένων ιστών. Αυτά τα αποτελέσματα συνιστούν ισχυρή ένδειξη ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ της αύξησης του ιού και της RNA σίγησης παίζει ένα ρόλο στο σχηματισμό των προτύπων μόλυνσης στα φύλλα (Groenenboom & Hogeweg, 2008).

Η συμμετοχή της RNA σίγησης στην ανάπτυξη **συμπτωμάτων μωσαϊκού** έχει σαν στόχο τον περιορισμό της εξάπλωσης του παθογόνου. Για παράδειγμα, η RNA σίγηση εναντίον του ToMV εντοπίζεται στα κύτταρα που βρίσκονται στο περιθώριο των **"dark green areas"** περιορίζοντας την επέκτασή τους και την μετατροπή τους σε "yellow-green areas". Με τον τρόπο αυτό καθορίζει το πρότυπο του μωσαϊκού που δημιουργείται (Hirai et al., 2008).

Η πρωτεΐνη p19 του TBSV έχει ρόλο στην επέκταση των **"local lesions"** στον ανθεκτικό ξενιστή *Vigna unguiculata* (Turina et al., 2003). Ως "local lesions" χαρακτηρίζουμε το φαινόμενο κατά το οποίο ο ιός μετά τον πολλαπλασιασμό σε αρκετά κύτταρα γύρω από το σημείο εισόδου δεν συνεχίζει την εξάπλωση του και παραμένει σε μια τοπική κηλίδα (Loebenstein & Akad, 2006).

1.2.1.3 Το φαινόμενο της ανάκαμψης (Recovery). Το φαινόμενο της ανάκαμψης (Recovery) των φυτών από τα συμπτώματα που προκαλούνται από ιούς συχνά έχει σχετιστεί με RNA σίγηση (Ratcliff et al., 1997). Σε μολυσμένα από περονίριο *Nicotiana* sp. υπάρχουν σοβαρά ιογενή συμπτώματα στο φύλλο που ξεκίνησε η μόλυνση και στα πρώτα συστηματικά φύλλα. Ωστόσο, τα νεώτερα φύλλα που αναπτύσσονται μετά από την συστηματική μόλυνση είναι ασυμπτωματικά και περιέχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις του ιού από ό, τι

τα συμπτωματικά φύλλα. Πειράματα μόλυνσης νεαρότερων ασυμπτωματικών φύλλων με στελέχη *perovirus* συγγενικά με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην πρώτη μόλυνση αποδεικνύει ότι η ανθεκτικότητα είναι συνάρτηση του βαθμού ομολογίας του RNA μεταξύ του στελέχους που χρησιμοποιήθηκε στην πρώτη μόλυνση και του στελέχους που χρησιμοποιήθηκε στην δεύτερη (Ratcliff et al., 1997). Το φαινόμενο κατά το οποίο η ανοχή ή αντίσταση ενός φυτού σε ένα στέλεχος του ιού προκαλείται από προηγούμενη συστηματική μόλυνση με ένα άλλο στέλεχος ονομάζεται διασταυρούμενη προστασία (**Cross-protection**) (Gal-On & Shibolet, 2006). Μπορεί να συνοδεύεται από ανάκαμψη (Recovery), μπορεί και όχι (όπως στην περίπτωση των *potexviruses*). Σε κάθε περίπτωση το φαινόμενο είναι μεσολαβούμενο από RNA και λειτουργικά ισοδύναμο με μετά-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση (Ratcliff et al., 1999).

Σε ένα διαφορετικό πειραματικό σύστημα, στα πρώτα στάδια της μόλυνσης που προκαλείται από ToRSV παρατηρούμε ένα νεκρωτικό φαινότυπο σε *N. benthamiana* (τυπικά χαρακτηριστικά μιας αντίδρασης υπερευαισθησίας). Ταυτόχρονα, ενεργοποιείται ο μηχανισμός της RNA σίγησης κατά τη διάρκεια μόλυνσης ToRSV (όπως αποδεικνύεται από την παρουσία ToRSV- προερχόμενων siRNAs). Παραδόξως, η εξαφάνιση των συμπτωμάτων (Recovery) δεν συνοδεύεται από την ανάλογη μείωση των επιπέδων του ιϊκού RNA. Αν και RNA σίγηση είναι ενεργή κατά τη διάρκεια της ανάκαμψης, η μείωση του τίτλου του ιού δεν απαιτείται για την έναρξη αυτού του φαινοτύπου (Jovel et al., 2007). Πιθανόν siRNAs που προέρχονται από τον ιό στοχεύουν κάποιον/κάποιους από τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή. Εναλλακτικά, ο ρόλος της σίγησης πιθανόν να σχετίζεται με ρύθμιση γονιδίων απόκρισης του φυτού παρά με την αποικοδόμηση των ιϊκών RNAs.

Σε διαγονιδιακές σειρές που υπερεκφράζουν τον καταστολέα της RNA σίγησης P1-HC-Pro ενισχύθηκε ο περιορισμός της μόλυνσης από τον ιό. Σε διαγονιδιακές σειρές με καταστολή έκφρασης RDR6 επιδεινώθηκε η νεκρωτική αντίδραση (HR) αλλά δεν επηρεάστηκε η συστηματική εξάπλωση του ιού (Jovel et al., 2011). Γενικά, η συστηματική αντίδραση σε αυτό το σύστημα είναι μέτρια, γεγονός που υποδηλώνει αναποτελεσματική επαγωγή ή εξάπλωση της RNA σίγησης και της **SAR**.

1.2.1.4 Το φαινόμενο του συνεργισμού. Το φαινόμενο του **συνεργισμού** στην περίπτωση των ιών (Pruss et al., 1997) αφορά ιογενείς ασθένειες των ανώτερων φυτών που προκαλούνται από την αλληλεπίδραση δύο ανεξάρτητων ιών στον ίδιο ξενιστή. Χαρακτηρίζονται από δραματική αύξηση της δριμύτητας των συμπτωμάτων και την αυξημένη συσσώρευση του ενός από τους δυο ιούς σε σχέση με μονή μόλυνση με τον ίδιο ιό. Σε συνεργισμό *potyvirus* με ιό της πατάτας X (PVX) ή ιό μωσαϊκού του αγγουριού (CMV) ή ιό του μωσαϊκού του καπνού (TMV) παρατηρείται αυξημένη παθογένεια και συσσώρευση

των PVX και CMV ή TMV αντίστοιχα. Ο συνεργισμός διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη HC-Pro του rotovirus. Ο HC-Pro είναι ένας από τους πλέον χαρακτηρισμένους ιικούς αναστολείς σίγησης (Mallory et al., 2001). Η ιδιότητα του ως καταστολέα είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την διαμεσολάβηση συνεργιστικών φαινομένων.

Η συνεργική αλληλεπίδραση του ιού της πατάτας X (PVX) με *rotoviruses* που φέρουν τον καταστολέα σίγησης HC-Pro οδηγεί σε αυξημένα συμπτώματα που προωθούν συστημική νέκρωση (SN) σε *Nicotiana benthamiana*. Συστημική νέκρωση παρατηρείται και στην περίπτωση μόλυνσης με ανασυνδυασμένο ιό PVX που εκφράζει HC-Pro. Έχει αποδειχθεί (Pacheco et al., 2012) ότι η συστημική νέκρωση που προκαλείται από ανασυνδυασμένο ιό PVX που εκφράζει HC-Pro είναι μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Με τα πειράματα αυτά αποδεικνύεται επίσης ότι η έκφραση HC-Pro «υποβόηθα» την πυροδότηση νεκρώσεων σε αλληλεπιδράσεις ιών με φυτικούς ξενιστές.

1.2.1.5 Αναπτυξιακές δυσαρμονίες. Γενικά, ο βασικός τρόπος με τον οποίο οι ιοί συμμετέχουν στην πρόκληση των συμπτωμάτων σε φυτά είναι μέσω των καταστολέων σίγησης που κωδικεύουν στα γονιδιώματά τους. Οι καταστολείς αυτοί αλληλεπιδρούν με τα **miRNAs**. Πολλά miRNAs ρυθμίζουν αναπτυξιακούς μηχανισμούς των κυττάρων. Αναπτυξιακές δυσαρμονίες που συγκαταλέγονται στα συμπτώματα των ιών μπορούν να αποδοθούν σε αυτό το φαινόμενο (Kasschau et al., 2003).

Εναλλακτικά, ορισμένα από τα ιϊκά siRNAs έχουν συμπληρωματική **ομολογία με μετάγραφα του ξενιστή** και, ως εκ τούτου, έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν αποσιώπηση των αντιστοίχων γονιδίων του ξενιστή. siRNAs με υψηλά επίπεδα αντίστροφης συμπληρωματικότητας προς ένα γονίδιο του ξενιστή θα μπορούσαν να επάγουν την αποικοδόμηση mRNA του ξενιστή, ενώ με μερική συμπληρωματικότητα θα μπορούσε να επάγει μεταγραφική αναστολή. siRNAs που έχουν υψηλή συμπληρωματικότητα με υποκινητές θα μπορούσαν να προκαλέσουν μεθυλίωση του υποκινητή μέσω της οδού RdDM. Αυτό δυνητικά μπορεί να οδηγήσει σε μεταγραφική απενεργοποίηση/σίγηση του γονιδίου του ξενιστή.

Τα έντονα συμπτώματα χλώρωσης σε φυτά καπνού που έχουν μολυνθεί **με τον ιϊκό δορυφόρο CMV Y-sat** οφείλονται στην αποσιώπηση βιοσυνθετικών γονιδίων της χλωροφύλλης. Η αποσιώπηση κατευθύνεται από sRNAs προερχόμενα από το Y-sat. Το γονιδίωμα του Y-sat (369 nt) έχει μια περιοχή 22 nt με αλληλουχία συμπληρωματική με το mRNA βιοσυνθετικών γονιδίων της χλωροφύλλης (Shimura et al., 2011; Smith et al., 2011). Επιπλέον, siRNAs που προέρχονται από το Cg στέλεχος του TMV (**TMV - Cg**) έχει πρόσφατα δειχθεί (Qi et al., 2009) ότι στοχεύουν τουλάχιστον δύο γονίδια του ξενιστή (CPSF30, TRAP). Ένας αριθμός των siRNA που προέρχονται από **CaMV** έχουν σχεδόν τέλεια

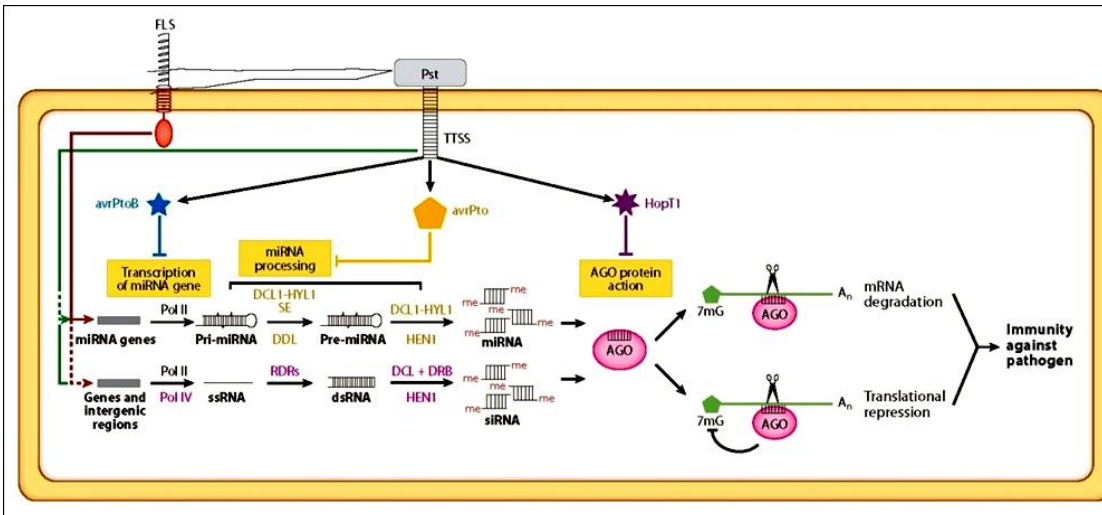
συμπληρωματικότητα με μετάγραφα στην *Arabidopsis*. Επομένως, έχουν τη δυνατότητα να κατευθύνουν αποσιώπηση αυτών των γονιδίων σε μολυσμένα φυτά (Moissiard & Voinnet, 2006).

1.2.2. Αλληλεπίδραση RNA σίγησης και Φυτοπαθογόνων Βακτηρίων.

1.2.2.1 RNA σίγηση και παθογόνα στελέχη αγροβακτηρίου. Αρχικά πειράματα χρησιμοποιώντας παθογόνα στελέχη αγροβακτηρίου (Dunoyer et al., 2006) υπέδειξαν αλληλεπίδραση του μηχανισμού της σίγησης με την φυτοπαθογένεια βακτηρίων.

Συγκεκριμένα, η μεταφορά του T-DNA από το αγροβακτήριο στο φυτό συνοδεύεται από ύπαρξη siRNA μορίων που αντιστοιχούν σε τμήματα του T-DNA. Διαγονιδιακά φυτά που υπερεκφράζουν ιικούς αναστολείς RNA σίγησης (πρωτεΐνες που έχουν την δυνατότητα να καταστέλλουν τον μηχανισμό της σίγησης) είναι πιο ευπαθή στην μόλυνση με αγροβακτήριο. Αντίστοιχα αποτελέσματα υπήρχαν και σε πειράματα με μεταλλάγματα γονιδίων που καταστέλλουν την έκφραση ενζύμων του μηχανισμού της σίγησης. Συμπερασματικά, η φυσιολογική απόκριση του φυτού είναι η επαγωγή του μηχανισμού της σίγησης για την αποτροπή της έκφρασης των γονιδίων του T-DNA. Το αγροβακτήριο όμως έχει μηχανισμούς για την αναστολή της σίγησης αυτής και την προώθηση της μολυσματικότητας του. Σε πλήρη συνάφεια με τα προηγούμενα, η επαγωγή καλλογένεσης από παθογόνο αγροβακτήριο συνοδεύεται με επανενεργοποίηση σιγημένων διαγονιδίων του φυτού. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην καταστολή από το αγροβακτήριο του μηχανισμού της σίγησης (Dunoyer et al., 2006).

1.2.2.2 RNA σίγηση, μολύνσεις από *Pseudomonas syringae* και miRNAs. Η ύπαρξη αλληλεπίδρασης, μεταξύ του μηχανισμού της σίγησης και την δράση των miRNAs άρχισε να αποσαφηνίζεται με την παρατήρηση ότι επίδραση φλαγγελίνης από *Pseudomonas syringae* έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή ενός miRNA (**miR-393**) σε μεταγραφικό επίπεδο (Navarro et al., 2006). Η φλαγγελίνη είναι δομική πρωτεΐνη του βακτηριακού μαστιγίου που αναγνωρίζεται από τον ξενιστή ως «αποτύπωμα παθογόνου» (Pathogen-associated Molecular Pattern PAMP) και οδηγεί στην επαγωγή μηχανισμών βασικής άμυνας (basal defense). Το miR-393 καταστέλλει μετάγραφα που σχετίζονται με την απόκριση στην **αυξίνη**. Η καταστολή του μηχανισμού της απόκρισης σε αυξίνη επάγει μηχανισμούς ανθεκτικότητας σε παθογόνες ψευδομονάδες. Αντίθετα, η επαγωγή του μηχανισμού της απόκρισης σε αυξίνη έχει σαν αποτέλεσμα την υποβοήθηση της μόλυνσης (Chen et al., 2007). Η επαγωγή αυτή μπορεί να συμβεί π.χ. μέσω δράσης εκκρινόμενων από το βακτήριο στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου πρωτεϊνών (type III **effectors**) που προάγουν τη μολυσματικότητα.



Εικόνα 7. Εκκρινόμενες βακτηριακές πρωτεΐνες που στοχεύουν στάδια του μηχανισμού βιογένεσης ή δράσης miRNAs (Katiyar-Agarwal & Jin, 2010).

Πιο αναλυτικά, μόλυνση φυτών *A. thaliana* με *Pseudomonas syringae pv. tomato* (Pst) προκαλεί συσσώρευση του miR393. Το miR393 φορτώνεται σε **Argonaute 1 (ago1)** για να σιγήσει τον υποδοχέα μεταφοράς αυξίνης **TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE (TIR1)**. Η αυξίνη σηματοδοτεί μονοπάτια που ρυθμίζουν αρνητικά μηχανισμούς της βασικής άμυνας των φυτών σε προσβολή από παθογόνα. Διάφοροι τελεστές του Pst εγχύονται σε κύτταρα του ξενιστή μέσω του συστήματος έκκρισης τύπου III (T3SS) και ορισμένοι από αυτούς παρεμποδίζουν την σίγηση σε διαφορετικά στάδια (Navarro et al., 2008)). Παράλληλα, επάγεται το **Ago2** και φορτώνεται με miR393* (Zhang et al., 2011c). Το miR393 με την σειρά του σιγεί το mRNA της **MEMBRIN 12** μια SNARE πρωτεΐνης που ελέγχει μέρος της εκκριτικής οδού μέσω του cis Golgi σε φυτά. Αποσιώπηση του mRNA της MEMB12 προκαλεί μια αλλαγή στην οδό έκκρισης που ευνοεί την εξωκυττάρωση της σχετιζόμενης με άμυνα πρωτεΐνης **PATHOGENESIS-RELATED 1 (PR1)**.

Η μολυσματικότητα του στελέχους Pst DC3000 στο μοντέλο φυτό *A. thaliana* περιορίζεται χωρίς επαγωγή κυτταρικού θανάτου (Ανθεκτικότητα μη-ξενιστή τύπου I, non-host resistance type I). Το ίδιο συμβαίνει και με μόλυνση με *Pseudomonas syringe pv. phaseolicola* NPS3121. Τα στελέχη αυτά εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα πολλαπλασιασμού σε μεταλλάγματα *A. thaliana* που μπλοκάρουν τον μηχανισμό της βιογένεσης των miRNA (Navarro et al., 2008).

Συμπερασματικά, άθικτος μηχανισμός βιοσύνθεσης miRNA στα φυτά σχετίζεται με την επαγωγή ανθεκτικότητας σε βακτηριακή μόλυνση. Από την άλλη πλευρά, η Pst έχει αναπτύξει μηχανισμούς καταστολής του μονοπατιού των miRNAs μέσω κάποιων από τις

εκκρινόμενες από το τύπου III εκκριτικού μονοπατιού πρωτεΐνες που ενχύει στο φυτικό κύτταρο (Navarro et al., 2008). Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται βακτηριακοί καταστολείς σίγησης κατά αντιστοιχία με τους ιϊκούς καταστολείς της σίγησης. Δρουν είτε επηρεάζοντας σε μεταγραφικό επίπεδο την έκφραση miRNAs όπως το miR-393 είτε στοχεύοντας πρωτεΐνες που σχετίζονται με την βιογένεση των ώριμων miRNAs.

Πέρα του mi393, έχουν πιστοποιηθεί διάφορες ομάδες miRNAs ρυθμιζόμενων από μόλυνση με βακτήρια. Πολλά από αυτά στοχεύουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε μονοπάτια βιοσύνθεσης φυτικών **Ορμονών** (αυξίνης, αμψισιακού οξέος, και ιασμονικού οξέος) ή σε σηματοδότηση από αυτές (Zhang et al., 2011b).

Παράλληλα επίδραση με μη παθογόνο μετάλλαγμα του Pst (DC3000hrcC) έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή και άλλων miRNAs (**miRNA-160 και miRNA-167**) που σχετίζονται με αρνητική ρύθμιση στην απόκριση με **αυξίνη** (Fahlgren et al., 2007). Το μη παθογόνο στέλεχος σε αυτή τη περίπτωση έχει προκύψει από μεταλλαγή στον εκκριτικό μηχανισμό Τύπου III που σχετίζεται με την μεταφορά από το βακτήριο στο φυτικό κύτταρο των προαναφερθέντων βακτηριακών πρωτεϊνών-τελετών (effectors).

Στην τομάτα (*Solanum lycopersicum*) έχουν περιγραφεί μικρά RNA που σχετίζονται με την απόκριση σε παθογόνα όπως τα **miR482 και miR2118**. Τα μέλη αυτής της υποοικογένειας έχουν μεταβλητή αλληλουχία και αφθονία σε διάφορα είδη , αλλά όλες οι παραλλαγές στοχεύουν την κωδική αλληλουχία για το μοτίβο P-loop στις αλληλουχίες mRNA των πρωτεϊνών αντίστασης σε παθογόνα με μοτίβο NBS (θέση προσδέσεως νουκλεοτιδίου, nucleotide binding motif) και μοτίβα πλούσια σε επαναλήψεις λευκίνης (LRR). Το miR482 στοχεύει mRNA για **NBS-LRR** πρωτεΐνες αντοχής σε ασθένεια. Η στόχευση προκαλεί αποικοδόμηση των αντίστοιχων mRNA και παραγωγή δευτερογενών siRNAs κατά τρόπο που εξαρτάται από την **RDR6** . Τουλάχιστον ένα από αυτά τα δευτερεύοντα siRNAs στοχεύει mRNAs μιας άλλης πρωτεΐνης που επίσης σχετίζεται με την άμυνα . Η δράση του miR482 καταστέλλεται σε φυτά μολυσμένα με ιούς ή βακτήρια. Έτσι, η έκφραση των mRNAs που στοχεύονται από το miR482 είναι αυξημένη. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει την επαγόμενη έκφραση των NBS-LRR πρωτεϊνών παρουσία παθογόνου και συμβάλλει σε ένα νέο επίπεδο προστασίας από προσβολή από παθογόνα (Shivaprasad et al., 2012) .

Αρκετά miRNAs (μεταξύ αυτών τα **miR169, mir396, mir157, mir167**) φαίνεται να υπερεκφράζονται σε ιστούς στους οποίους έχει γίνει επαγωγή HR μετά από επίδραση πρωτεΐνης HrpN (harpin) της *E. amylovora* (Boccardo et al., 2007). Αντίθετα, το **miRNA164** έχει προταθεί σαν παράγοντας αντιγήρανσης (anti-senescence) σε *A. thaliana* (Kim et al., 2009). Έχει ρόλο στον εξαρτώμενο από ηλικία κυτταρικό θάνατο (Age-Dependent Cell

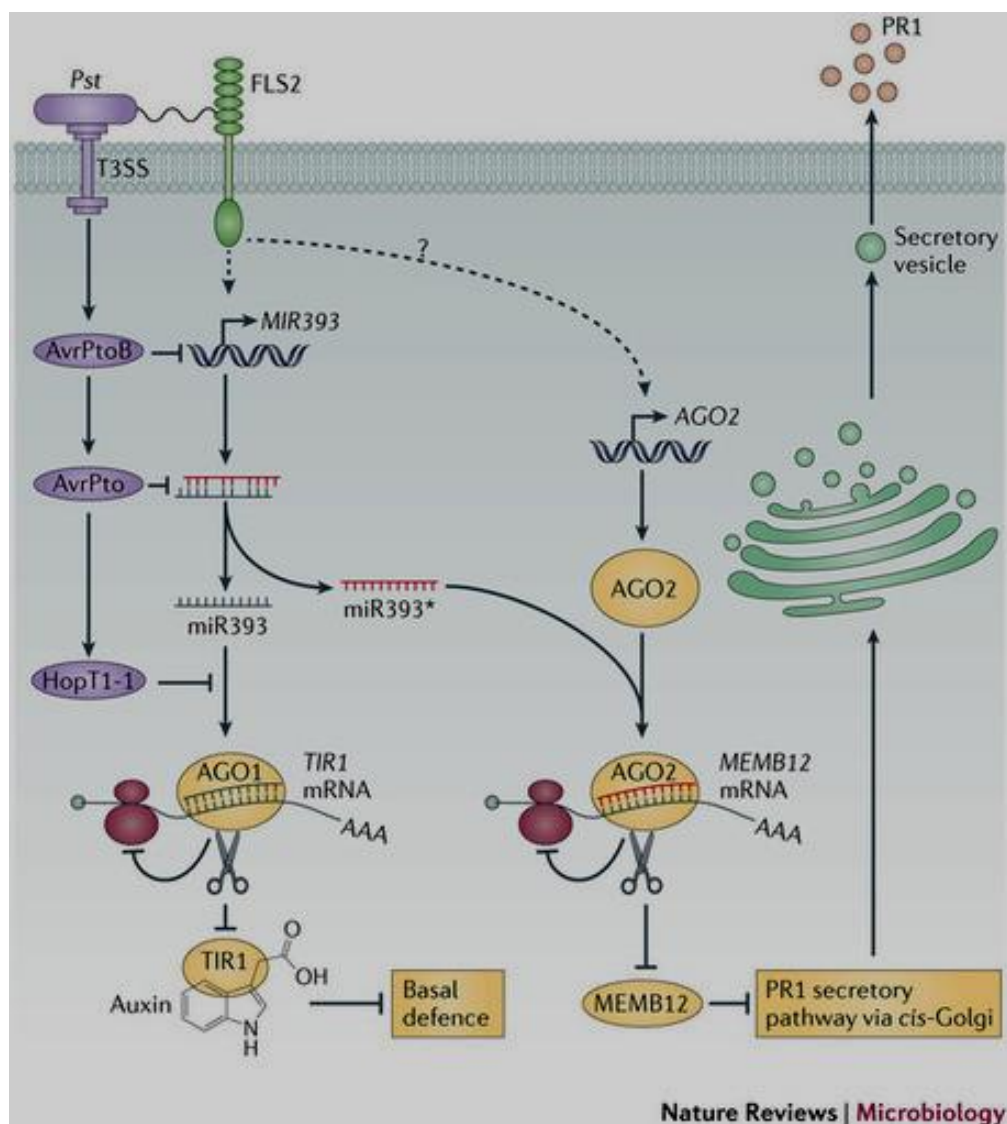
Death). Ρυθμίζει αρνητικά την πρωτεΐνη ORE1 (οικογένεια NAC). Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένας θετικός ρυθμιστής κυτταρικού θανάτου.

1.2.2.3 Ρόλος των ago's σε μολύνσεις από *Pseudomonas syringae*. Σε πλήρη συνάφεια με τα προηγούμενα, μεταλλάγματα γονιδίων που κωδικεύουν ένζυμα του μηχανισμού της σίγησης (όπως το **ago4**) εμφανίζουν μεγαλύτερη ευπάθεια σε φυτοπαθογόνα βακτήρια και είναι ελλειμματικά στον μηχανισμό ανθεκτικότητας (Agorio & Vera, 2007).

Από την άλλη πλευρά, η πρωτεΐνη **Ago2** της *Arabidopsis* επάγεται μετά από μόλυνση από το βακτηριακό παθογόνο *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Περαιτέρω γενετική ανάλυση την λειτουργία του Ago2 στην αντιβακτηριακή ανοσία. Το small RNA miR393b* προσδέεται στο Ago2. Το small RNA miR393b* στοχεύει σε μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο Golgi (MEMB12-δες και παραπάνω).

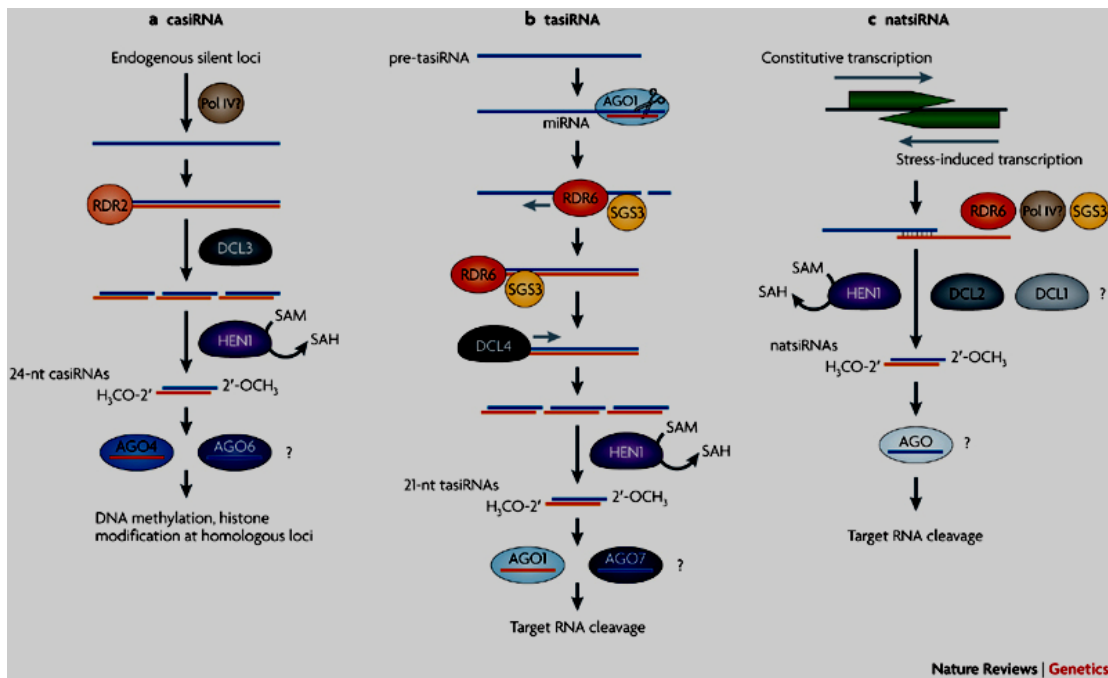
Η λειτουργία του Ago2 στην αντιβακτηριακή άμυνα βασίζεται στην δέσμευση του στο miR393b*. Με τον τρόπο αυτό το miR393b* ρυθμίζει την εξωκύτωση των αντιμικροβιακών PR πρωτεϊνών μέσω του Golgi (Zhang et al., 2011c). Τα miR393 /miR393* αντιπροσωπεύουν ένα παράδειγμα ενός ζεύγους miRNA*/miRNA που εμπλέκεται στην ανοσία με δύο διακριτά Ago's: το miR393* προσδέεται στο Ago2 (Zhang et al., 2011c) και το miR393 προσδέεται στο **ago1** (Navarro et al., 2008).

1.2.2.4 RNA σίγηση, μολύνσεις από *Pseudomonas syringae* και nat-siRNAs/IsiRNAs. Βακτηριακές πρωτεΐνες εκκρινόμενες μέσω του τύπου III εκκριτικού συστήματος έχουν την δυνατότητα να επάγουν την έκφραση κάποιων μελών μιας άλλης κατηγορίας ενδογενών siRNAs στην *Arabidopsis*. Τέτοια περίπτωση είναι η επαγωγή **nat-siRNAs** (όπως το nat-siRNA ATGB2) από πρωτεΐνες-τελεστές όπως η AvrRpt2. Η βιογένεση των nat-siRNAs είναι διαδικασία εξαρτώμενη από ένζυμα του μηχανισμού της σίγησης. Στην επαγωγή τους μεσολαβούν πρωτεΐνες άμυνας του φυτού δηλαδή φυτικές πρωτεΐνες που μέσω των οποίων γίνεται ο περιορισμός του φυτοπαθογόνου. Ο περιορισμός αυτός εκδηλώνεται μέσω της επαγωγής τοπικού κυτταρικού θανάτου γύρω από το σημείο της μόλυνσης (αντίδρασης υπερευαισθησίας, HR). Τα nat-siRNAs αυτής της κατηγορίας καταστέλλουν αρνητικούς ρυθμιστές του μονοπατιού απόκρισης μέσω προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Άρα, και στην περίπτωση αυτή, η επαγωγή του nat-siRNA ATGB2 είναι μέρος της απόκρισης του φυτού για τον περιορισμό του φυτοπαθογόνου μέσω αντίδρασης υπερευαισθησίας (Katiyar-Agarwal et al., 2006).

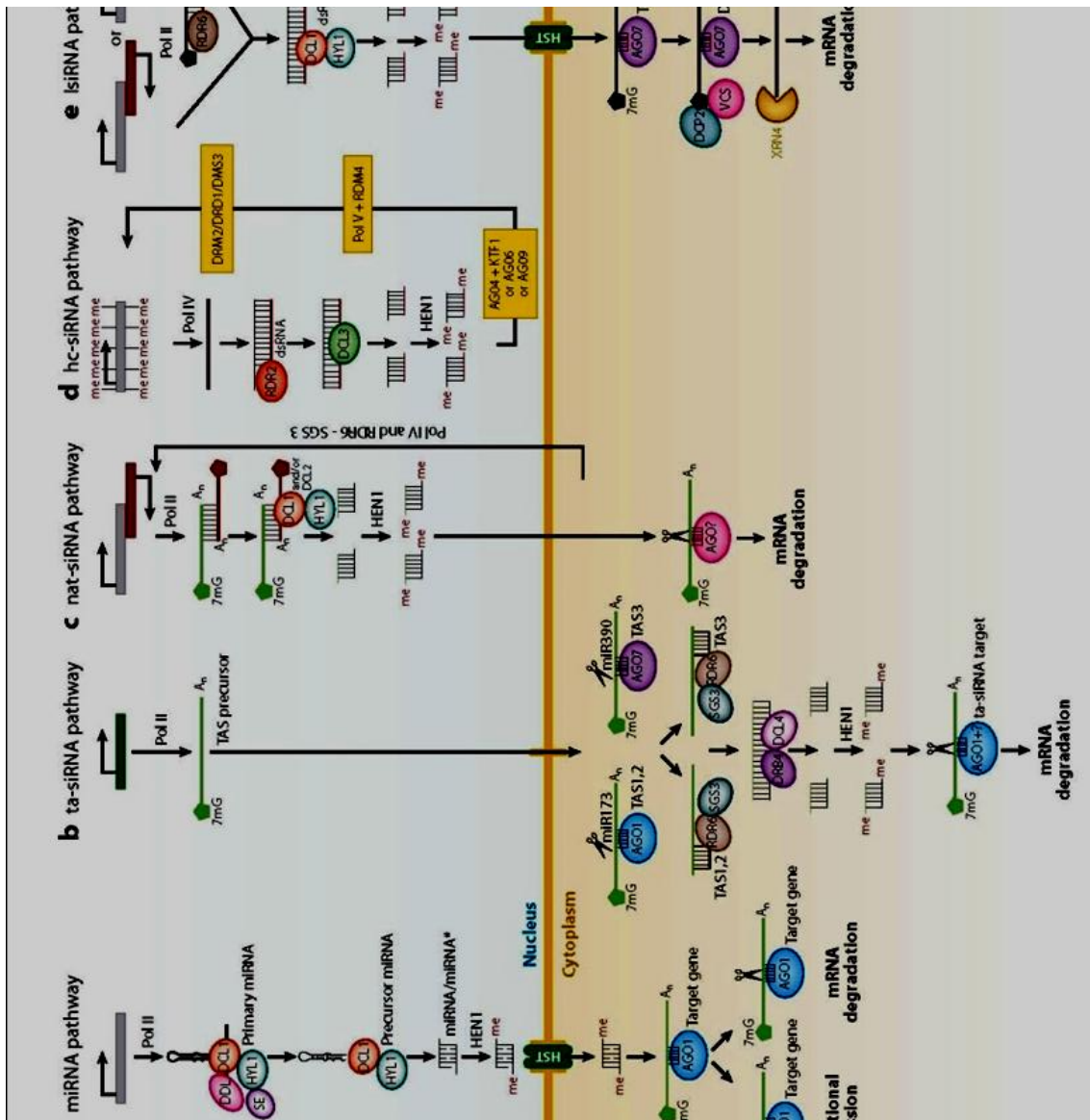


Εικόνα 8. Ρόλος των ago's σε μολύνσεις από *Pseudomonas syringae* (Pumplin & Voinnet, 2013).

Μολυσματικά στελέχη (virulent strains) φυτοπαθογόνων στελεχών *Pseudomonas* που φέρουν (επιπρόσθετα του οπλοστασίου των πρωτεϊνών-τελεστών Τύπου III που διαθέτουν) την εκκρινόμενη μέσω του Τύπου III καναλιού πρωτεΐνη **AvrRpt2** έχουν την δυνατότητα να επάγουν μια άλλη κατηγορία siRNA μορίων μεγέθους 30-40 νουκλεοτιδίων που ονομάζονται **IsiRNAs**. Το βιογενετικό μονοπάτι των IsiRNAs είναι διακριτό από τα υπόλοιπα μονοπάτια siRNA/miRNA μορίων. Τα IsiRNAs ρυθμίζουν την έκφραση μεταγράφων που είναι επικαλυπτόμενα με το RNA που τα παράγει αλλά με αντίθετη πολικότητα (αν και αυτό δεν είναι πάντα ο κανόνας). Τα IsiRNAs συνεισφέρουν στην άμυνα του φυτού και την αντίσταση σε φυτοπαθογόνα στοχεύοντας αρνητικούς ρυθμιστές της άμυνας του φυτού. Ο μηχανισμός δράσης των IsiRNAs μπορεί να περιλαμβάνει **αναστολή μετάφρασης** και όχι ενδονουκλεολυτική τομή μεταγράφου (Katiyar-Agarwal et al., 2007).



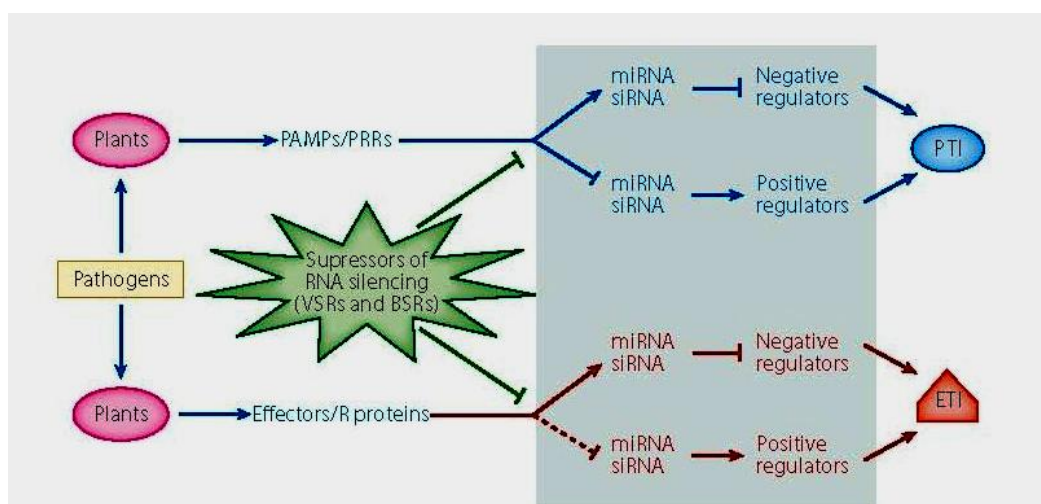
Εικόνα 9. Κατηγορίες ενδογενών siRNAs στα φυτά (Ghildiyal & Zamore, 2009). Τα ενζυμα που είναι απαραίτητα για την βιογένεση της κάθε κατηγορίας φαίνονται στην εικόνα. Τα Natural antisense transcripts (NAT) είναι ενδογενή μετάγραφα που περιέχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές μεταξύ τους και έχουν τη δυνατότητα να συν-ρυθμίζονται είτε θετικά είτε αρνητικά. Με βάση την βιογένεση τους, τα NATs κατηγοριοποιούνται σε δύο υποομάδες: α) τα cis-NATs που μεταγράφονται από αντίθετους κλώνους DNA από την ίδια γονιδιωματική περιοχή β) τα trans-NATs που μεταγράφονται από διαφορετικές θέσεις του γονιδιώματος. Τα cis-NATs έχουν συνήθως τέλεια συμπληρωματικότητα και κάθε αρνητικής πολικότητας RNA ταιριάζει με ένα μόνο μετάγραφο από τον ίδιο γενετικό τόπο. Τα trans-NATs έχουν μερική συμπληρωματικότητα και σε κάθε αρνητικής πολικότητας RNA ταιριάζουν RNA από διαφορετικές γονιδιωματικές περιοχές (Zhang et al., 2012) (Zhang et al., 2013). Στο ρύζι είχαν καταγραφεί και κάποια "miRNAs" η βιογένεση των οποίων ήταν εξαρτώμενη από DCL1 και τα οποία προέρχονταν από cis-NATs (Lu et al., 2008). Τα cis-acting siRNAs (casRNAs) προέρχονται από τανσοζόνια, επαναλαμβανόμενα στοιχεία και tandem repeats (όπως 5S γονίδια ριβοσωματικού RNA). Αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος των endo-siRNAs. Τα casRNAs προάγουν τον σχηματισμό ετεροχρωματίνης με μεθυλίωση του DNA και την τροποποίηση των ιστονών στους γενετικούς τόπους από τους οποίους προέρχονται (Chan et al., 2004). Τα trans-acting siRNAs (ta-siRNAs) είναι ενδογενή siRNAs που κατευθύνουν την αποικοδόμηση ενδογενών μεταγράφων. Η διαδικασία ξεκινάει από την κατευθυνόμενη από ένα miRNA διάσπαση ενός πρωτογενούς μεταγράφου. Τα θραύσματα στη συνέχεια μετασχηματίζονται σε μικρά siRNAs με τη διαδοχική δράση των SGS3, RDR6 και DCL4. Η SGS3 σταθεροποιεί το θραύσμα, η RDR6 παράγει ένα συμπληρωματικό σκέλος και η DCL4 διασπά το προκύπτον δίκλωνο μόριο σε μικρά siRNAs, αρχίζοντας από το άκρο με τη θέση διάσπασης από το miR173 και προχωρώντας σε προσαιξήσεις 21-nt από το σημείο αυτό. Στην διαδικασία αυτή δεν συμμετέχει το DCL3-εξαρτώμενο μονοπάτι που παράγει 24 nt siRNAs (Yoshikawa et al., 2005).



Εικόνα 10. (προηγούμενη σελίδα) Συγκριτική παρουσίαση μονοπατιών βιογένεσης μικρών RNAs στα φυτά (Katiyar-Agarwal & Jin, 2010). Παρουσιάζονται τα μονοπάτια βιογένεσης των **nat-siRNAs** και **IsiRNAs** κατά αντιπαράθεση με τα μονοπάτια βιογένεσης άλλων κατηγοριών μικρών RNAs που είναι εκτενεστέρα μελετημένα.

1.2.2.5 RNA σίγηση, Μολύνσεις από *Pseudomonas syringae* και RdDM. Επίσης, το πεπτίδιο **flg22** (συντηρημένο τμήμα της μαστιγιακής δομικής πρωτεΐνης βακτηρίων) καταστέλλει την **μεθυλίωση** σε στόχους RdDM σε φύλλα *Arabidopsis*. Η απομεθυλίωση των στόχων RdDM συνδέεται με την καταστολή ενός υποσυνόλου γενετικών παραγόντων που σχετίζονται με την μεθυλίωση. Το ROS1 ρυθμίζει αρνητικά την RdDM. Η πρωτεΐνη αυτή διευκολύνει την επαγωγή της απομεθυλίωσης του γενετικού τόπου AtSN1 μετά από επίδραση με το πεπτίδιο flg22. Η απομεθυλίωση του DNA περιορίζει τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων σε φύλλα *Arabidopsis* και συνδέεται με ενεργοποίηση της εξαρτώμενης από

σαλικυλικό οξύ άμυνας (SAR). Το RMG1 είναι μια πρωτεΐνη NB-LRR με μοτίβο υποδοχέα Toll/interleukin-1 (TIR) στο αμινοτελικό άκρο. Το RMG1 είναι ένα γονίδιο ανοχής στην ασθένεια το οποίο στοχεύει η ROS1-εξαρτημένη DNA απομεθυλίωση (Yu et al., 2013). Οι διαπιστώσεις αυτές ευθυγραμμίζονται με παλιότερες παρατηρήσεις για τον ρόλο της μεθυλίωσης στη μόλυνση με *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Πιο συγκεκριμένα, η *Arabidopsis* εμφανίζει **υπομεθυλίωση** του κεντρομερικού DNA και κυτταρολογικές μεταβολές ετεροχρωματίνης μετά την προσβολή από το εν λόγω βακτήριο (Pavet et al., 2006).



Εικόνα 11. Μοντέλο για την επίδραση ιικών και βακτηριακών καταστολέων σίγησης στην άμυνα του φυτού (Katiyar-Agarwal & Jin, 2010).

1.2.3 Αλληλεπίδραση RNA σίγησης και Φυτοπαθογόνων Μυκήτων και Οομυκήτων.

Γενετικά τροποποιημένα φυτά με ελλειμματικό μηχανισμό RNA silencing εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία στο μύκητα *Verticillium dahliae* (Ellendorff et al., 2009). Τα ίδια φυτά δεν εμφανίζουν αυξημένη ευαισθησία προς άλλες μυκητολογικές προσβολές (από *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina*, *Fusarium oxysporum*), ούτε τροποποιημένη ευαισθησία σε αβιοτικές καταπονήσεις.

Το γονίδιο NRPD2 κωδικοποιεί την δεύτερη μεγαλύτερη υπομονάδα της ειδικής για τα φυτά **RNA πολυμεράσης IV και V** (Pol IV και V Pol). Η RNA πολυμεράση V είναι ζωτικής σημασίας για την πορεία RdDM. Φυτά ελλειμματικά σε NRPD2 παρουσίασαν αύξηση της ευαισθησίας σε προσβολές από νεκρότροφους παθογόνους μύκητες όπως οι *Botrytis cinerea* και *Plectosphaerella cucumerina* αλλά και με το βακτήριο *Pseudomonas syringae*

pn. tomato DC3000. Μελέτες και σε άλλες μεταλλάξεις που επηρεάζουν διαφορετικά στάδια της οδού RdDM (όπως μεταλλάξεις *nprp1*, *ago4*, *drd1*, *rdr2* και *drm1drm2*) έχουν τον ίδιο φαινότυπο με τις μεταλλάξεις *nprp2* (Lopez et al., 2011). Είναι ενδιαφέρον ότι η απόκριση στο **σαλικυλικό** οξύ (SA) είναι ενισχυμένη σε φυτά με ελαττωματική NRPD2. Το αντίστροφο συμβαίνει για την απόκριση στο **ιασμονικό** οξύ (JA).

Οι ηγονοϊσμοί είναι ιϊκά παράσιτα μυκήτων των ειδών *Cryphonectria*. Ο ηγονοϊσμος 1 (CHV1) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη τύπου παπαΐνης (P29) που μοιράζεται ομοιότητες με τον ιϊκό καταστολέα της RNA σίγησης HC-Pro. Η p29 από ηγονοϊσμο CHV1-EP71 μπορεί να καταστείλει την RNA σίγηση στο φυσικό ξενιστή δηλαδή το μύκητα *Cryphonectria parasitica* (Segers et al., 2006).

Το σύμπλεγμα των παραλόγων R γονιδίων **RPP5** προσδίδει ανθεκτικότητα σε στελέχη του παθογόνου μύκητα *Hyaloperonospora parasitica* και μολυσματικά στελέχη του βακτηρίου *Pseudomonas syringae*. Έχουν διαπιστωθεί αρνητικής πολικότητας μετάγραφα επικαλυπτόμενα με τους γενετικούς τόπους RPP4, SNC1, και At4g16900 του συμπλέγματος RPP5. Παράλληλα, τα επίπεδα έκφρασης του SNC1 εμφανίζονται αυξημένα σε φυτά ελλειμματικά ως προς τα ενζυμα του μηχανισμού της RNA σίγησης (Yi & Richards, 2007).

Χρησιμοποιώντας το σύστημα της παροδικής συνέκφρασης μέσω Αγροβακτηρίου (Hamilton et al., 2002) δηλαδή το ίδιο πειραματικό σύστημα με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, σαρώθηκαν 59 **RXLR** τελεστές από *Phytophthora sojae* (από τους περίπου 400 προβλεπόμενες τελεστές με δομική περιοχή RXLR). Διαπιστώθηκε ότι δυο (PsAvh18 και PsAvh146) **καταστέλλουν την RNA σίγηση** (Qiao et al., 2013). Ανάλυση αλληλουχίας έδειξε την παρουσία ενός υποθετικού διμερούς σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) σε μια από τις δύο. Σημειακές μεταλλαγές στο NLS που καταργούν τον πυρηνικό εντοπισμό οδηγούσαν σε μεγάλο βαθμό την πρωτεΐνη να χάσει την ικανότητα να καταστέλλει σίγηση του RNA. In vitro αναλύσεις έδειξαν επίσης ότι οι δυο πρωτεΐνες δεν δεσμεύουν μονόκλινα ή δίκλινα 21-nt μικρά RNAs.

Οι περισσότεροι από τους χαρακτηρισμένους παράγοντες παθογένειας είναι πρωτεΐνες. Πρόσφατα αποκαλύφθηκε ότι (εκτός από τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες τελεστές) μπορεί να **μεταφερθεί και RNA από παθογόνο σε ξενιστή** (Weiberg et al., 2013). Η έρευνα πραγματοποιήθηκε στο *Botrytis cinerea*, έναν νεκρότροφο παθογόνο μύκητα. Υπάρχουν περισσότερα από 800 sRNAs του μύκητα που επάγονται όταν ο *Botrytis* μολύνει φυτικά κύτταρα. Από αυτά, 73 είχαν προβλεφθεί από την ακολουθία ότι μπορούν να στοχεύσουν mRNAs του ξενιστή (συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων που έχουν ένα ρόλο στην απόκριση του φυτού). Τα μικρά RNA των μυκήτων είναι πιθανό να προέρχονται από μακριά πρόδρομα RNA και ωριμάζουν προτού μετατοπιστούν εντός του φυτικού κύτταρου.

Το αντίστροφο έχει επίσης παρατηρηθεί. Συσσώρευση διπλόκλωνου ή αρνητικής πολικότητας (αντινοσηματικού) RNA για μετάγραφα του μύκητα *Blumeria graminis* στο εσωτερικό κυττάρων κριθαριού (*Hordeum vulgare*) και το σιταριού (*Triticum aestivum*) επηρεάζει την ανάπτυξη του μύκητα. Ο μύκητας θα μπορούσε να διασωθεί από το σίγηση των γονιδίων από την παροδική έκφραση ενός συνθετικού γονιδίου που ήταν ανθεκτικό σε RNA σίγηση (RNAi) λόγω σιωπηλών σημειακών μεταλλάξεων. Τα αποτελέσματα δείχνουν την κυκλοφορία των μορίων RNA από φυτά ξενιστές σε *B. graminis* και μπορούν να οδηγήσουν σε μια στρατηγική προστασίας των καλλιεργειών έναντι παθογόνων μυκήτων με βάση την τεχνολογία RNAi (Nowara et al., 2010).

Αντίθετα, εκτοπική έκφραση αλληλουχιών dsRNA στο φυτό ξενιστή δεν είναι επαρκής για να οδηγήσει σε αποσιώπηση των ομόλογων γονιδίων ωμοκυκλήτων, ούτε μειώνει την ικανότητα αποικισμού των φυτών από αυτούς. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους λόγους. Πιθανόν, π.χ. , τα δίκλινα RNAs μεταφέρονται σαν μακριά δίκλινα μόρια και μετατρέπονται σε μικρά RNAs στο εσωτερικό του παθογόνου. Έτσι, μόνο τα παθογόνα που έχουν μηχανισμό RNAi μπορούν να γίνουν στόχος αποσιώπησης γονιδίων με αυτό το τρόπο (Zhang et al., 2011a).

1.3 Ανοσία μέσω αναγνώρισης "αποτυπώματος" και ανθεκτικότητα που διαμεσολαβείτε από R-γονίδια.

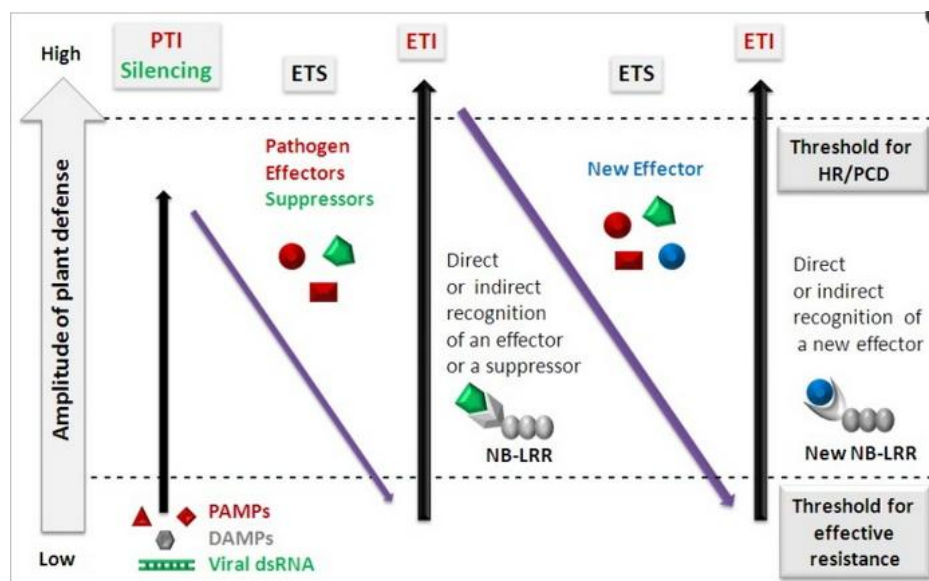
Στην παρούσα διατριβή ακολουθούμε έναν **τροποποιημένο** μοντέλο Ζιγκ-ζαγκ. Το συγκεκριμένο μοντέλο Ζιγκ-ζαγκ επιχειρεί να εξηγήσει τους εξελικτικούς μηχανισμούς τόσο της φυσικής ανοσίας όσο και της RNA σίγησης. Η τροποποίηση που ακολουθούμε καλύπτει τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών έναντι και των ιολογικών και των μη ιολογικών παθογόνων (Jones & Dangl, 2006; Zvereva & Pooggin, 2012).

Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, το απόλυτο εύρος της αντίστασης σε ασθένεια ή της επιδεκτικότητας ισούται με το αποτέλεσμα **PTI + RNA silencing- ETS + ETI** .

Ως **PTI (Pattern-Triggered Immunity)** ορίζεται η ανοσία μέσω αναγνώρισης "αποτυπώματος" από ποικίλους υποδοχείς αναγνώρισης . Τέτοια "αποτυπώματα" μπορεί να είναι:

- α) **pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)** δηλαδή συντηρημένα μοτίβα που **προέρχονται από τα ίδια τα παθογόνα**
- β) **danger-associated molecular patterns (DAMPs)** δηλαδή **ενδογενή μόρια** που παράγονται στα πρώτα στάδια της μόλυνσης και "ευαισθητοποιούν" τους αμυντικούς μηχανισμούς για την ενίσχυση (amplification) της απόκρισης.

Στην περίπτωση ιογενών μολύνσεων ως "εξωγενή αποτυπώματα" θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν π.χ. το **δίκλωνο ιικό RNA** ή τα **sRNAs** ιικής προέλευσης κ.τ.λ.



Εικόνα 12. Το μοντέλο Ζιγκ-ζαγκ για τους εξελικτικούς μηχανισμούς της φυσικής ανοσίας και της RNA σίγησης. Βασίζεται στην άμυνα των φυτών τόσο έναντι των ιογενών όσο και των μη ιογενών παθογόνων. Από (Zvereva & Rooggin, 2012) το οποίο τροποποιεί το (Jones & Dangl, 2006).

Ως **ETI (Effector-Triggered Immunity)** εννοούμε την αντίσταση που διαμεσολαβείται από R-γονίδια. Συνίσταται στην ενδοκυτταρική αναγνώριση των πρωτεϊνών τελεστών, γεγονός που οδηγεί επαγωγή σηματοδότησης. Η ETI είναι μια ταχεία και υψηλής έντασης απόκριση και θεωρείται ότι είναι μια ενισχυμένη εκδοχή του PTI. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια στην ETI συχνά οδηγούν σε **αντίδραση υπερευαισθησίας (HR)** και τον **προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (PCD)** που τοπικά περιορίζει το παθογόνο και αναστέλλει επιπλέον εξάπλωσή του.

Ως **ETS (effector-triggered susceptibility)** χαρακτηρίζουμε την ευπάθεια που συνοδεύει την προσβολή από παθογόνα. Στηρίζεται στην τροποποίηση μέσω των πρωτεϊνών τελεστών των μηχανισμών απόκρισης προς όφελος του παθογόνου. Σε πρώτη φάση, τα φυτά ανιχνεύουν το παθογόνο μέσω PAMPs και DAMPs. Στην αναγνώριση μεσολαβούν υποδοχείς αναγνώρισης μοριακών προτύπων (PRRs) για να εκδηλώσουν PTI. Στην περίπτωση των ιικών παθογόνων, τα φυτά ανιχνεύουν επιπροσθέτως ιογενή δίκλινα RNA (dsRNA) που μπορούν να προκαλέσουν RNA σίγηση.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε δεύτερη φάση, τα επιτυχημένα ιογενή και μη ιογενή παθογόνα μεταφέρουν **Τελεστές (effectors) / καταστολείς (suppressors)** που παρεμβαίνουν και μπλοκάρουν την ΡΤΙ και την RNA σίγηση. Σαν αποτέλεσμα έχουμε ευαισθησία στην μόλυνση με παθογόνο (ETS).

Στην επομένη φάση, ένας (και συχνά περισσότεροι) τελεστής ή καταστολέας αναγνωρίζεται άμεσα ή συνηθέστερα έμμεσα από μια R-πρωτεΐνη ενεργοποιώντας ETI. Η ETI είναι μια ενισχυμένη εκδοχή του ΡΤΙ που συχνά περνά ένα κατώτατο κατώφλι για την επαγωγή της υπερευαισθησίας ανταπόκριση (HR) και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (PCD).

Στη τέταρτη φάση, έχουμε εξελικτική επιλογή παθογόνων που έχουν απολέσει ή/και τροποποιήσει τους Τελεστές (effectors)/καταστολείς (suppressors) που αναγνωρίζονται. Επιπρόσθετα έχουμε οριζόντια μεταφορά ή εξέλιξη νέων τελεστών που μπορούν να βοηθήσουν το παθογόνο να καταστείλει ETI. Ένα νέο NB-LRR αλληλόμορφο εξελίσσεται στη συνέχεια και επιλέγεται ώστε να μπορεί να αναγνωρίσει τον νεοαποκτηθέντα τελεστή με αποτέλεσμα και πάλι την ETI.

Πρόκειται δηλαδή για μια αέναη συνεξέλιξης παθογόνων-ξενιστών όπου στόχος των παθογόνων είναι να μπλοκάρουν με ποικίλους τρόπους τους μηχανισμούς αντίστασης του φυτού. Στόχος του φυτού από την άλλη πλευρά είναι η εξέλιξη αλληλομόρφων για την πιο αποτελεσματική αναγνώριση των παθογόνων. Αυτό που συμβαίνει στην πράξη είναι ότι π.χ. ένα βακτήριο ενχύει δεκάδες τελεστές. Συνήθως το φυτό έχει εξελιχθεί για να αναγνωρίζει όσο το δυνατόν περισσότερους (το οποίο όμως είναι πάλι ένα υποσύνολο). Βέβαια αρκεί να αναγνωρίζει έστω ένα. Η αναγνώριση των "σεσημασμένων" τελεστών οδηγεί σε παράλληλα μονοπάτια σηματοδότησης HR. Εάν το σύνολο των τελεστών μπορεί να παρεμποδίσει το σύνολο των μονοπατιών σηματοδότησης HR έχουμε ευπάθεια στο παθογόνο. Διαφορετικά παρατηρούμε ανθεκτικότητα.

Προηγουμένως αναφέρθηκε ότι Η ETI είναι μια **ενισχυμένη εκδοχή** του ΡΤΙ που συχνά συνοδεύεται από HR. Έχουν καταγραφεί διάφορες περιπτώσεις όπου η **ETI δεν συνοδεύεται από HR**. Ο τελεστής HopPsyA από το βακτήριο *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 προσδιορίζεται ως παράγοντας «αμολυσματικότητας» (avirulence, Avr) στην *Arabidopsis*. Όμως, ενεργοποιεί την ανθεκτικότητα απουσία μακροσκοπικής HR. Ένας γενετικός τόπος που ονομάζεται **HED1** κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που μπλοκάρει εκλεκτικά το σηματοδοτικό μονοπάτι HR χωρίς να μπλοκάρει την εκδήλωση ανθεκτικότητας στο σύνολο. Αυτός ο μηχανισμός μπορεί να εξηγήσει ορισμένες περιπτώσεις στην *Arabidopsis* που αφορούν αντοχή τύπου I σε «ετερόλογο» ξενιστή (non-host resistance type I) (Gassmann, 2005). Ενδιάμεσες καταστάσεις μπορεί να παρατηρηθούν κατά τις οποίες η

ανθεκτικότητα μπορεί να συνοδεύεται από χλωρωτικά αλλά **όχι και νεκρωτικά συμπτώματα** (Cole et al., 2001).

Γενικά, οι αντιδράσεις μη-ξενιστή (non-host) διακρίνονται σε δυο κατηγορίες. Τις τύπου I αντιδράσεις μη-ξενιστή που δεν συνοδεύονται από κυτταρικό θάνατο και στους τύπου II αντιδράσεις μη-ξενιστή που συνοδεύονται από κυτταρικό θάνατο (Mysore & Ryu, 2004).

1.4. Κυτταρικός Θάνατος και Αντίδραση Υπερευαισθησίας

1.4.1 Κατηγορίες κυτταρικού θανάτου στα ζώα. Στα ζωικά κύτταρα **έκτος από τον αυτοφαγικό κυτταρικό θάνατο** (autophagic cell death) διακρίνουμε άλλες δυο κύριες κατηγορίες κυτταρικού θανάτου (van Doorn, 2011).

1) **Νέκρωση.** Σαν νέκρωση κατατάσσουμε κάθε είδους κυτταρικό θάνατο ο οποίος χαρακτηρίζεται από έλλειψη αποπτωτικών ή αυτοφαγικών χαρακτηριστικών. Βασικά χαρακτηριστικά του είναι η διόγκωση των διαφόρων οργανιδίων, η πρόωμη ρήξη της πλασματικής μεμβράνης και η απώλεια του ενδοκυτταρικού περιεχόμενου. Συνοδεύεται από μιτοχονδριακές αλλαγές όπως η αποσύνδεση της αναπνοής, η παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS), παραγωγή δραστικών ειδών αζώτου (reactive nitrogen species-RNS), η πτώση των επίπεδων ATP και η αύξηση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακή μεμβράνης. Στις λυσοσωματικές εκδηλώσεις συγκαταλέγονται η παραγωγή ROS, η διαπερατότητα της λυσοσωματικής μεμβράνης και η απελευθέρωση των δραστικών πρωτεασών καθεψίνης (cathepsin proteases) στο κυτταρόπλασμα.

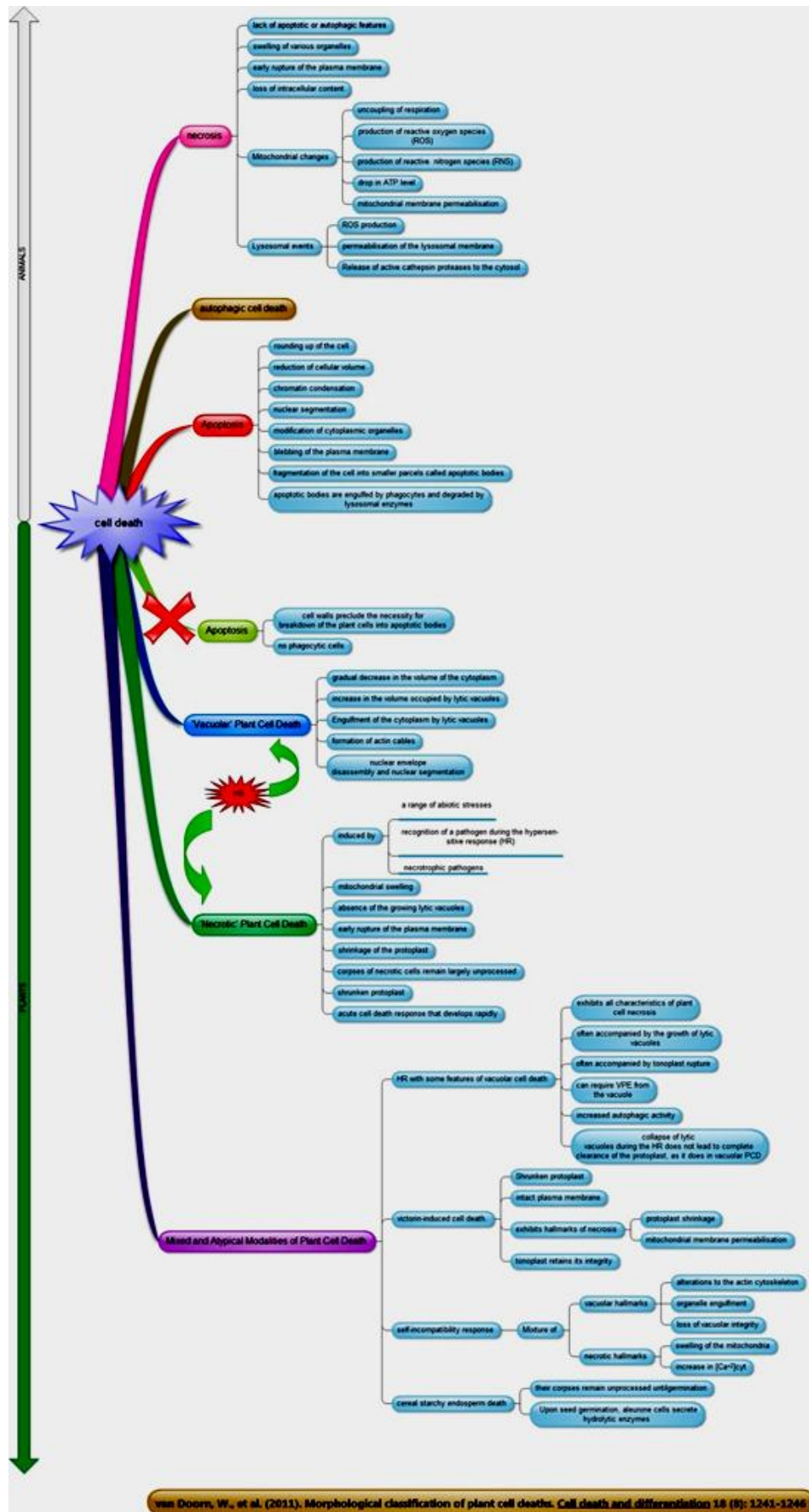
2) **Απόπτωση.** Μορφολογικά χαρακτηριστικά της είναι η στρογγυλοποίηση του κυττάρου, η μείωση του κυτταρικού όγκου, η συμπύκνωση χρωματίνης, ο κατακερματισμός του πυρήνα, η τροποποίηση των κυτταροπλασματικών οργανιδίων, η διόγκωση της πλασματικής μεμβράνης, ο κατακερματισμός του κυττάρου σε μικρότερες δομές που ονομάζονται αποπτωτικά σωματίδια. Τα αποπτωτικά σωματίδια "καταπίνονται" από τα φαγοκύτταρα και υποβαθμίζονται με την δράση λυσοσωμικών ενζύμων.

1.4.2 Κατηγορίες κυτταρικού θανάτου στα φυτά. Στα φυτικά συστήματα δεν υπάρχει ένας γενικά αποδεκτός τρόπος ταξινόμησης των διαφόρων ειδών κυτταρικού θανάτου. Μια διαπίστωση που γίνεται όλο και περισσότερο αποδεκτή τα τελευταία χρόνια

είναι ότι στα φυτά **δεν υπάρχει μηχανισμός αντίστοιχος με τον απόπτωτικο τύπο κυτταρικού θανάτου των ζώων**. Η ύπαρξη στα φυτά κυτταρικών τοιχωμάτων αποκλείει την αναγκαιότητα για κατάτμηση των φυτικών κυττάρων σε αποπτωτικά σώματα. Επίσης δεν έχουν αναφερθεί φαγοκύτταρα (phagocytic cells) σε φυτικά συστήματα.

Οι παλιότερες ταξινομήσεις χώλαιναν διότι προσπαθούσαν απλά να αντιστοιχίσουν κάθε τύπο κυτταρικού θανάτου με κάποιον αντίστοιχο στα ζωικά συστήματα. Μια τέτοια ένα προς ένα αντιστοιχία δεν είναι δυνατή καθώς οι διάφοροι τύποι κυτταρικού θανάτου στα φυτά έχουν τις δικές τους ιδιαιτερότητες. Μια πρόσφατη ταξινόμηση (van Doorn, 2011) προσπαθεί να κατατάξει εξαρχής τους κυτταρικούς θανάτους στα φυτά αποφεύγοντας τις αγκυλώσεις του παρελθόντος. Διακρίνονται τρεις βασικές κατηγορίες:

1) **Κυτταρικός θάνατος εξαρτώμενος από χυμοτόπια ('Vacuolar' Plant Cell Death)**. Χαρακτηρίζεται από σταδιακή μείωση του όγκου του κυτταροπλάσματος, αύξηση στον όγκο που καταλαμβάνεται από λυτικά χυμοτόπια (lytic vacuoles), εγκόλπωση του κυτταροπλάσματος σε λυτικά χυμοτόπια, σχηματισμό "καλωδίων" ακτίνης, αποσυναρμολόγηση πυρηνικού φακέλου και κατακερματισμό του πυρήνα. Σε άλλες ταξινομήσεις αναφέρεται και ως **Αυτολυτικός Προγραμματισμένος Κυτταρικός Θάνατος** [Autolytic Programmed Cell Death (PCD)] και του αποδίδονται χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτοφαγία σε ζωικά κύτταρα και κύτταρα σακχαρομύκητα (van Doorn, 2011). Για τον λόγο αυτό παλιότερα χαρακτηριζόταν (Reape et al., 2008) **αυτοφαγικός θάνατος των κυττάρων** (autophagic cell death). Αυτοφαγικό PCD (autophagic PCD) παρατηρούμε για παράδειγμα στην **γήρανση** (senescence, Love et al., 2008) είτε αναφερόμαστε σε γήρανση των φύλλων (leaf senescence) είτε γήρανση πέταλων (petal senescence), στην **διαφοροποίηση των αγγειακών στοιχείων σε ξύλο** (differentiation of vascular elements in wood), στην **σμίλευση σχήματος φύλλου** (leaf shape sculpting), στην **απόρριψη αναπαραγωγικών οργάνων** (floral organ abortion) και ίσως στην τελική **διαφοροποίηση του ενδοσπερμίου** κατά την ωρίμανση των σπόρων (terminal differentiation of the endosperm during seed maturation) και στον σχηματισμό αερενχύματος (**aerenchyma**) μεταξύ άλλων (Hofius et al., 2007).



van Doorn, W., et al. (2013). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell death and differentiation* 18 (8): 1241-1246

Εικόνα 13. Κατηγορίες κυτταρικού θανάτου σε φυτικά και ζωικά συστήματα.

2) "**Νεκρωτικός**" **Κυτταρικός Θάνατος** που επάγεται από μια σειρά από αβιοτικές καταπονήσεις, την αναγνώριση του παθογόνου κατά τη διάρκεια της **αντίδρασης Υπερευαισθησίας (HR)** ή από **νεκρότροφα παθογόνα**. Συχνά οι παραπάνω καταστάσεις αν και έχουν όλα τα χαρακτηριστικά νέκρωσης, παρουσιάζουν και κάποια επιπλέον χαρακτηριστικά της πρώτης κατηγορίας. Στην τελευταία περίπτωση κατατάσσονται σε μια τρίτη κατηγορία (Μεικτά-Μη Τυπικά Χαρακτηριστικά) που περιγράφεται παρακάτω. Η νέκρωση χαρακτηρίζεται από διόγκωση των μιτοχονδρίων, απουσία λυτικών χυμοτοπίων, πρόωμη ρήξη της πλασματικής μεμβράνης, συρρίκνωση του πρωτοπλάστη, οξεία αντίδραση του θανάτου των κυττάρων (acute cell death response) που αναπτύσσεται με ταχείς ρυθμούς. Τα πτώματα των νεκρωτικών κυττάρων παραμένουν σε μεγάλο βαθμό μη επεξεργασμένα.

Ο νεκρωτικός θάνατος κύτταρων (necrotic cell death) αναγνωρίζεται σαν μια διακριτή κατηγορία κυτταρικού θανάτου (Reape et al., 2008) αλλά όχι σαν μια κατηγορία **προγραμματισμένου** κυτταρικού θανάτου σε διάφορες ταξινομήσεις (Hofius et al., 2007; Love et al., 2008; van Doorn, 2011).

3) **Κυτταρικός Θάνατος με μεικτά ή/και μη τυπικά χαρακτηριστικά (Mixed and Atypical Modalities of Plant Cell Death).**

3α) Πολλές μορφές **αντίδρασης Υπερευαισθησίας (HR)** εμφανίζουν και μερικά χαρακτηριστικά του εξαρτώμενου από χυμοτόπια κυτταρικού θανάτου. Μια πρώτη διαπίστωση είναι ότι καταρχήν εμφανίζουν όλα τα χαρακτηριστικά της κυτταρικής νέκρωσης. Όμως, συχνά συνοδεύονται από την εμφάνιση των λυτικών χυμοτοπίων και ρήξη του τονοπλάστη (tonoplast), μπορεί να απαιτούν πρωτεΐνες VPE από το χυμοτόπιο (vacuole) και εμφανίζουν αυξημένη αυτοφαγική δραστηριότητα. Η κατάρρευση των λυτικών χυμοτοπίων (lytic vacuoles) κατά τη διάρκεια της HR δεν οδηγεί σε πλήρη κάθαρση του πρωτοπλάσματος, όπως συμβαίνει στον εξαρτώμενο από χυμοτόπια κυτταρικό θάνατο.

3β) Επαγόμενος από **βικτορίνη** κυτταρικός θάνατος (**victorin-induced cell death**). Χαρακτηρίζεται από συρρίκνωση πρωτοπλαστών, ανέπαφη πλασματική μεμβράνη ενώ εμφανίζει χαρακτηριστικά της νέκρωσης όπως μορφολογικές αλλαγές στον πρωτοπλάστη και διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης (mitochondrial membrane permeabilisation). Ο τονοπλάστης διατηρεί την ακεραιότητά του.

3γ) **Απόκριση αυτο-ασυμβατότητας (self-incompatibility response)**. Αποτελεί μείγμα εξαρτώμενου από χυμοτόπια κυτταρικού θανάτου (τροποποιήσεις του κυτταροσκελετού

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

της ακτίνης, εγκόλπωση οργανιδίων, απώλεια της ακεραιότητας χυμοτοπίων) και νεκρωτικών χαρακτηριστικών (διόγκωση των μιτοχονδρίων, αύξηση του κυτταροπλασματικού Ca^{+2}).

3δ) θάνατος ενδοσπερμίου αμυλούχων δημητριακών (cereal starchy endosperm death). Τα πτώματά των κυττάρων δεν υφίστανται επεξεργασία μέχρι τη βλάστηση. Μετά την βλάστηση των σπόρων, τα αλευρώδη κύτταρα (aleurone cells) εκκρίνουν υδρολυτικά ένζυμα.

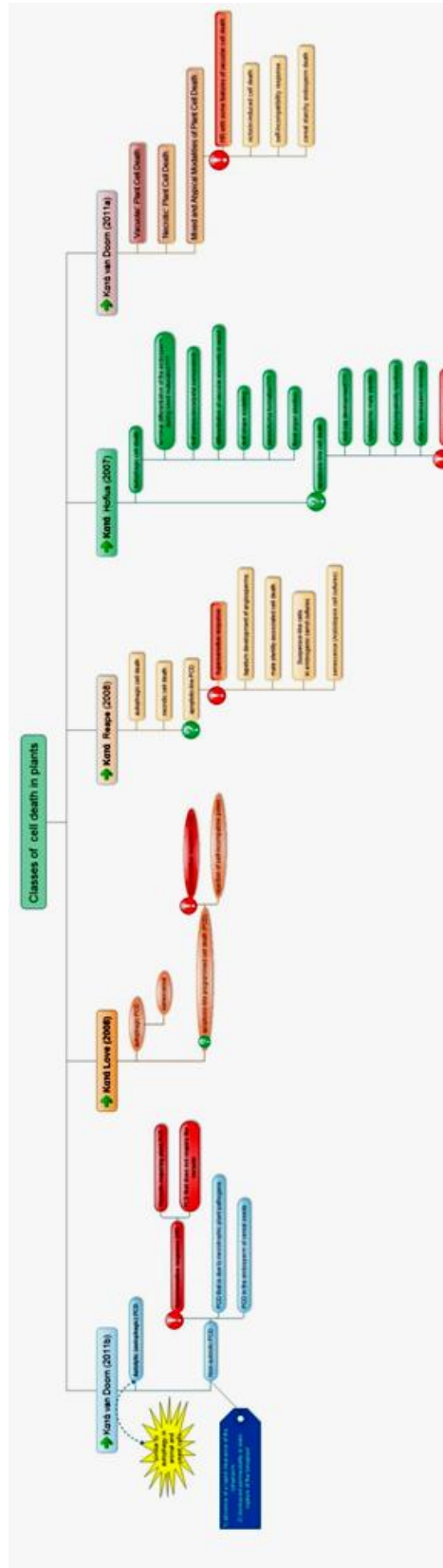
Σε παλιότερες ταξινομήσεις κάποιες υποκατηγορίες του μεικτού-μη τυπικού θανάτου είχαν ταξινομηθεί σαν προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που μοιάζει με απόπτωση (**apoptosis-like programmed cell death**). Έτσι, οι Love και συνεργάτες (2008) ενέτασαν σε αυτήν την κατηγορία την απόκριση υπερευαισθησίας (HR) και την απόρριψη της αυτο-ασύμβατης γύρης (self-incompatibility). Οι Reape και συνεργάτες (2008) εντάσσουν στην κατηγορία προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος που μοιάζει με απόπτωση (apoptosis-like programmed cell death) έκτος από την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR), την ανάπτυξη τάπητα των αγγειοσπέρμων (tapetum development), τον κυτταρικό θάνατο που σχετίζεται με ανδρική στειρότητα (male sterility-associated), τον θάνατο σε καλλιέργειες εμβρυακών κυττάρων καρότου (embrogenic carrot cultures) και κάποιες κατηγορίες γήρανσης (senescence) όπως σε καλλιέργειες κυττάρων Arabidopsis. Οι Hofius και συνεργάτες (2007) ταξινομούν ως κυτταρικό θάνατο που μοιάζει με απόπτωση την ανάπτυξη καλύμματος ρίζας (root cap development), την κυτταροπλασματική αρσενική στειρότητα (cytoplasmic male sterility), τις αντιδράσεις αυτο-ασυμβατότητας (self-incompatibility reactions), την αφαίρεση αμυλούχου ενδοσπέρμιο (starchy endosperm removal) και την αντίδραση υπερευαισθησίας (HR). Οι van Doorn και συνεργάτες (2011b) ταξινομούν συλλογικά όλες τις μορφές προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που δεν σχετίζονται με αυτοφαγία ως μη- αυτολυτικός PCD με κύρια χαρακτηριστικά την απουσία ταχείας κάθαρσης του κυτταροπλάσματος και την αυξημένη διαπερατότητα ή ακόμα και θραύση του τονοπλάστη. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει διάφορες μορφές κυτταρικού θανάτου. Ανάμεσα τους η αντίδραση υπερευαισθησίας (HR), η PCD που οφείλεται σε νεκρότροφα (necrotrophic) παθογόνα των φυτών και η PCD στο ενδοσπέρμιο των σπόρων σιτηρών (endosperm of cereal seeds). Ειδικά για την αντίδραση υπερευαισθησίας διακρίνουν δυο κατηγορίες: α) την PCD που απαιτεί κενοτόπιο (Vacuole) και β) τον κυτταρικό θάνατο που δεν απαιτεί κενοτόπιο.

1.4.3 Αντίδραση Υπερευαισθησίας. Η αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive Response, HR) είναι μια μορφή κυτταρικού θανάτου στα φυτά. Έχει όλα τα χαρακτηριστικά **νέκρωσης** αλλά τις περισσότερες φορές εμφανίζει και μερικά χαρακτηριστικά του εξαρτώμενου από χυμοτόπια κυτταρικού θανάτου (van Doorn et al., 2011). Για τον λόγο αυτό (όταν έχει **μεικτά** χαρακτηριστικά) στις περισσότερες ταξινομήσεις κατατάσσεται στις μορφές προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Programmed Cell Death, PCD).

Αρχικά είχαν διαπιστωθεί κάποιες ομοιότητες της αντίδρασης υπερευαισθησίας με τον αποπτωτικού τύπου (apoptosis-like cell death) κυτταρικό θάνατο στα ζωικά συστήματα (Reare et al., 2008). Νεότερες όμως ταξινομήσεις την κατατάσσουν στις **μεικτές-μη τυπικές εκδηλώσεις κυτταρικού θανάτου** (van Doorn, 2011). Ειδικά για την αντίδραση υπερευαισθησίας, οι van Doorn και συνεργάτες (2011b) διακρίνουν δυο κατηγορίες : α) την PCD που απαιτεί χυμοτόπιο (Vacuole) και β) τον κυτταρικό θάνατο που δεν απαιτεί το χυμοτόπιο. Εντάσσεται σε μια ευρύτερη κατηγορία που συλλογικά ονομάζεται μη-αυτολυτικός προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος

Η αντίδραση υπερευαισθησίας χαρακτηρίζεται από γρήγορη νέκρωση των περιοχών γύρω από το σημείο επαφής με το φυτοπαθογόνο. Σαν αποτέλεσμα έχουμε την παρεμπόδιση της εξάπλωσης του φυτοπαθογόνου αυτού (Hofius et al., 2007).

1.4.4 Επαγωγείς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Σαν **επαγωγείς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου** έχουν ενοχοποιηθεί διάφορες εκκρινόμενες πρωτεΐνες φυτοπαθογόνων που χαρακτηρίζονται συλλογικά σαν παράγοντες «αμολυσματικότητας» (avirulence factor, **avr**). Είχαν αρχικά χαρακτηριστεί από την ικανότητα να επάγουν κυτταρικό θάνατο σε ανθεκτικές ποικιλίες του ξενιστή (**ασύμβατες αλληλεπιδράσεις** παθογόνου-ξενιστή). Στην περίπτωση αυτή, ο ξενιστής είχε ένα γονίδιο ανθεκτικότητας (R-gene) με την ικανότητα να αναγνωρίζει άμεσα ή έμμεσα την παρουσία του **avr** (Huynh et al., 1989).



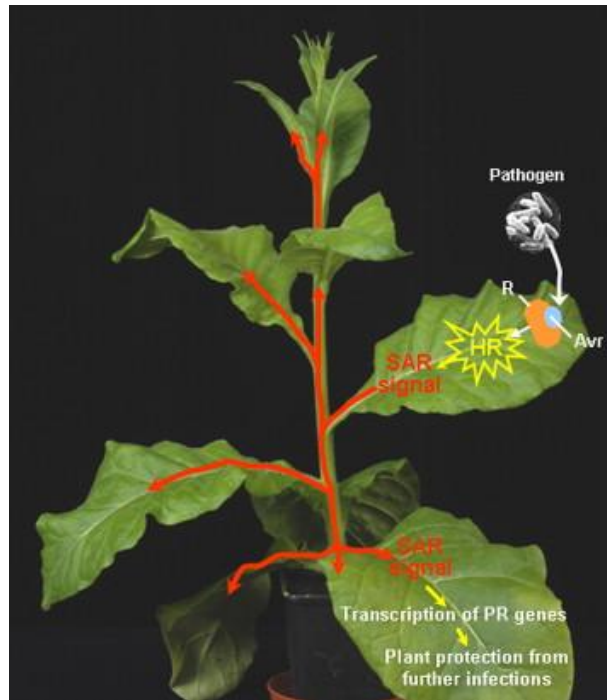
Εικόνα 14. (προηγούμενη σελίδα) Ταξινομήσεις κυτταρικών θανάτων στα φυτά.

Οι **χαρπίνες** είναι μια άλλη κατηγορία επαγωγέων κυτταρικού θανάτου. Πρόκειται για όξινες, θερμοανθεκτικές, πλούσιες σε κατάλοιπα γλυκίνης και ευαίσθητες στην πρωτεόλυση πρωτεΐνες (Wei et al., 1992). Οι χαρπίνες (σε αντίθεση με άλλες κατηγορίες πρωτεϊνικών επαγωγέων HR) έχουν την δυνατότητα να επάγουν HR παρεχόμενες εξωγενώς στα φυτά σε βιοχημικά καθαρισμένη μορφή. Ο υποδοχέας που σηματοδοτεί την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου σε αυτή την περίπτωση δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένος (Lee et al., 2001). Η σηματοδότηση στην περίπτωση των χαρπινών περιλαμβάνει μονοπάτι **MAP κινασών** [μονοπάτι SIPK σε κυτταροκαλλιέργειες καπνού (Lee et al., 2001)] και του ορθόλογου της SIPK (AtMAP6) στην *Arabidopsis* (Desikan et al., 2001).

Επιπλέον, η χαρπίνη (He et al., 2007) κατατάσσεται σε μια κατηγορία επαγωγέων της βασικής άμυνας του φυτού (PAMP-Triggered Immunity, PTI). Τέλος, η χαρπίνη σε ορισμένες περιπτώσεις επάγει ανθεκτικότητα (Dong et al., 1999) μέσω του μονοπατιού της επίκτητης συστηματικής ανθεκτικότητας (Systemic Acquired Resistance –SAR).

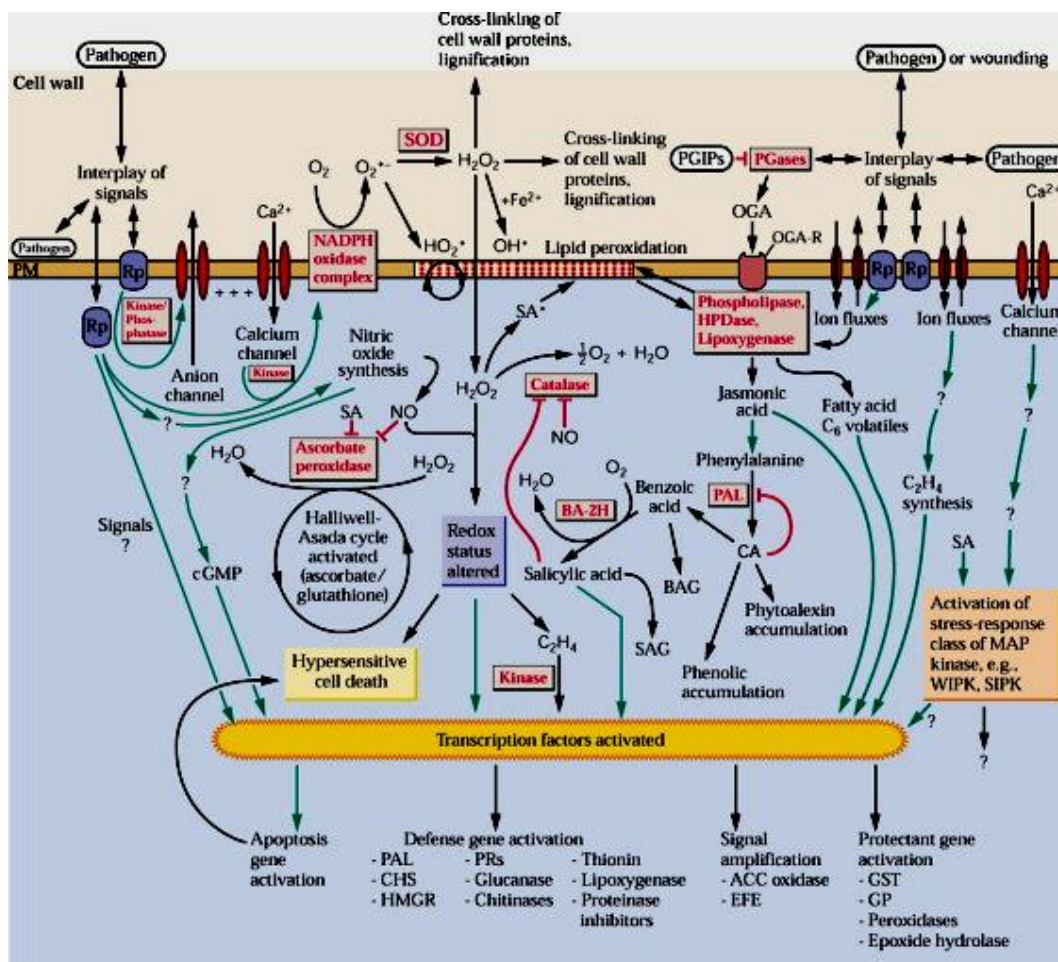
Υπάρχουν και **μη πρωτεϊνικής φύσεως** επαγωγείς HR. Π.χ., τα συριγγολίδια είναι μικρού μοριακού βάρους επαγωγείς HR τα οποία παράγονται ενζυματικά από την πρωτεΐνη AvrD (έναν παράγοντα ατοξικότητας της *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* και *P. syringae* pv. *glycinea*). Σε κάποιες περιπτώσεις PAMPs όπως η φλαγγελίνη έχουν την ικανότητα να επάγουν και κυτταρικό θάνατο σε καπνό (Takeuchi et al., 2003) και στο ρύζι (Zipfel, 2008).

1.4.5 Επίκτητη Συστημική Ανθεκτικότητα. Η επίκτητη συστηματική ανθεκτικότητα (Systemic Acquired Resistance –SAR) χαρακτηρίζεται από διασυστηματική επαγομένη ανθεκτικότητα, σε μακρινούς από τη μόλυνση ιστούς/όργανα του φυτού, σε παθογόνα στα όποια κανονικά ο ξενιστής είναι ευπαθής. Αρχικά προηγείται μόλυνση με παθογόνο που προκαλεί τοπική νέκρωση σε κάποιο φύλλο (αν και αυτό δεν είναι απαραίτητο στην περίπτωση μολύνσεων από ιούς). Στην συνέχεια μέσω κατάλληλης σηματοδότησης επάγεται ανθεκτικότητα στους υπόλοιπους μη μολυσμένους ιστούς (Kiefer & Slusarenko, 2003). Η SAR στους μεταδίδεται σε μακρινούς ιστούς του φυτού μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης που διαμεσολαβεί το σαλικυλικό οξύ.



Εικόνα 15. Επίκτητη Συστημική Ανθεκτικότητα (Hofius et al., 2007).

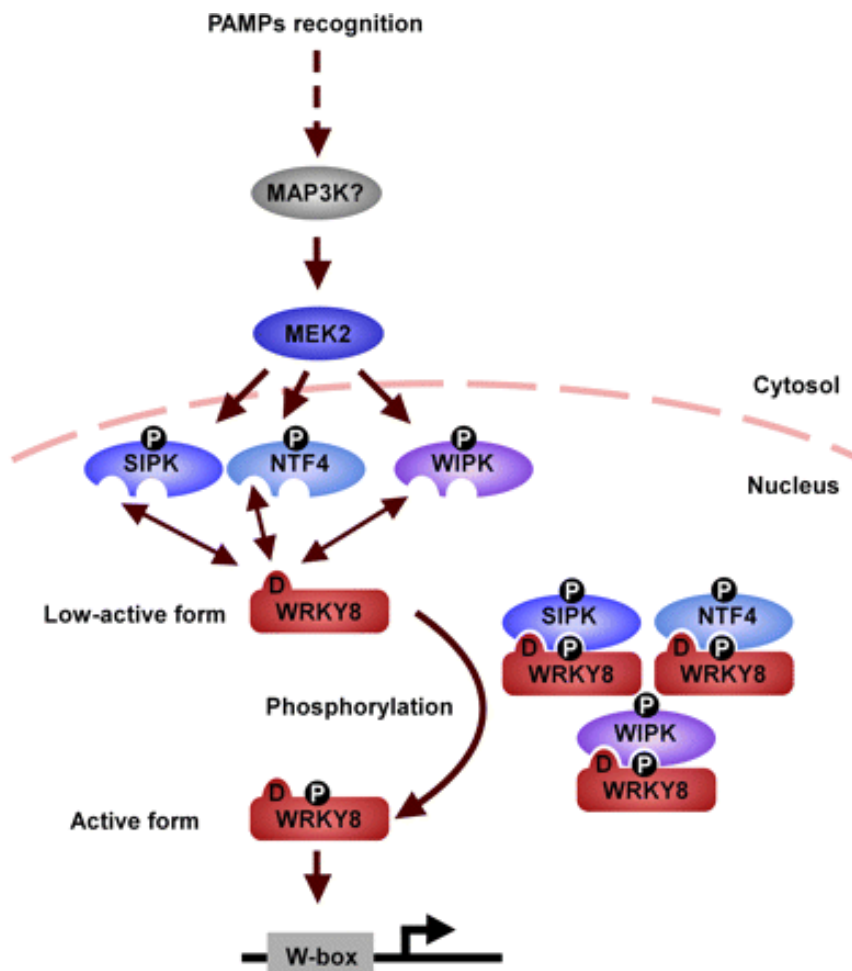
1.5 Μονοπάτια σηματοδότησης στην βασική άμυνα και την αντίδραση Υπερευαισθησίας.



Εικόνα 16. Μονοπάτια σηματοδότησης στην βασική άμυνα και την αντίδραση Υπερευαισθησίας (Hofius et al., 2007).

1.5.1 Συμμετοχή MAP κινασών. Αναφορικά με την συμμετοχή MAP κινασών στο μονοπάτι σηματοδότησης από R γονίδια, το πιο μελετημένο σύστημα αυτή την στιγμή είναι η σηματοδότηση από την εκκρινόμενη πρωτεΐνη HorAB2. Με χρήση τεχνολογίας επαγόμενης από ιό σίγησης (Virus Induced Gene Silencing, VIGS) αποδείχθηκε ότι σε φυτά ντομάτας (*Solanum lycopersicum*) συμμετέχουν τουλάχιστον δυο σηματοδοτικά μονοπάτια MAP κινασών (**WIPK και NTF6**). Αντίστοιχα συμμετέχουν και οι MAPKK που τις ενεργοποιούν (**NtMEK2 και NtMEK1** αντίστοιχα (Ekengren et al., 2003)). Ακολούθως, με βιοχημικά πειράματα αποδείχθηκε ότι μετά την έκφραση HorAB2 ενεργοποιούνται δυο MAP κινάσες, η **WIPK (LeMPK3)** και **SIPK (LeMPK2)** αλλά όχι η **NTF4 (LeMPK1)**. Οι κινάσες αυτές ενεργοποιούνται από τις MAPKK **LeMKK2 και LeMKK4**. Η παροδική υπερέκφραση των

LeMKK2 και **LeMKK4** (χωρίς μετάλλαξη για συνεχή ενεργοποίηση) έχει σαν φαινότυπο τον κυτταρικό θάνατο στην ντομάτα και στην περίπτωση της **LeMKK4** και στη *N. benthamiana* (Pedley & Martin, 2004).



Εικόνα 17. Μονοπάτια MAP κινασών (απλουστευτικό).

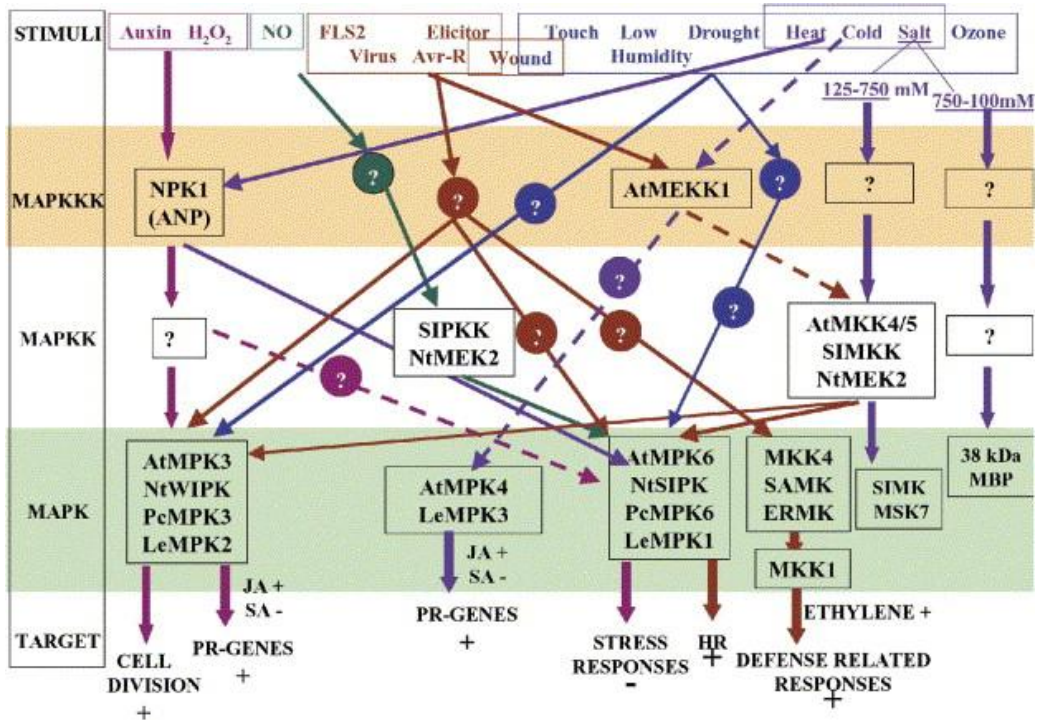
Μια ΜΡΚΚΚ (**LeMRKKKα**) αποδείχθηκε (del Pozo et al., 2004) ότι αποτελεί μέρος μονοπατιού MAP κινασών που ρυθμίζουν θετικά τόσο την αντίδραση υπερευαισθησίας όσο και τον κυτταρικό θάνατο σε περιπτώσεις νεκρότροφων παθογόνων. Υπερέκφραση (παροδική) της πρωτεΐνης αυτής (ή της μετάλλαξης της για συνεχή ενεργοποίηση) έχουν σαν φαινότυπο κυτταρικό θάνατο. Σε φυτά *N. benthamiana* τα ίδια δυο σηματοδοτικά μονοπάτια που αποκαλύφθηκαν στην ντομάτα είναι αυτά που ρυθμίζονται από την LeMRKKKα (del Pozo et al., 2004). Η μόνη διαφορά ανάμεσα στους δυο οργανισμούς είναι ότι σε φυτά *N. benthamiana* δεν βρέθηκε επίδραση στην πρωτεΐνη WIPK αλλά στην αλληλεπιδρώσα της SIPK (Liu et al., 2000). Οι κινάσες WIPK και SIPK συνήθως (αλλά όχι πάντα) συμμετέχουν στο ίδιο μονοπάτι (Liu et al., 2003).

Σε αντίθεση με τα μονοπάτια MAP κινασών που εμπλέκονται στη σηματοδότηση από τις πρωτεΐνες Pto και Cf-4, στις περιπτώσεις των μονοπατιών που εμπλέκονται τα γονίδια ανθεκτικότητας N, Bs2 και Rx συμμετέχει μια άλλη MRKKK [**NPK1**, (Jin et al., 2002)]. Αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα την ύπαρξη διαφορετικών μονοπατιών ανάλογα με το γονίδιο ανθεκτικότητας. Η σηματοδότηση από το γονίδιο N στον καπνό εμπλέκει το ίδιο μονοπάτι **NtMEK2/SIPK/WIPK** (Jin et al., 2003) αλλά και αυτό του **NtMEK1/NTF6** (Liu et al., 2004). Επιπλέον, και στις δυο περιπτώσεις, η σηματοδότηση από MAP κινάσες συμβαίνει πριν από την συμμετοχή των μιτοχονδρίων στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Takabatake et al., 2007). Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παροδική έκφραση της πρωτεΐνης HopAB2 αναστέλλει την έκφραση της SIPK στην σηματοδότηση κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από φλαγγελίνη (από *P. tabaci*) και MAP κινάσες σε *N. benthamiana* (Hann & Rathjen, 2007). Παροδική υπερέκφραση της **SIPK/ LeMPK2** (αλλά όχι της WIPK/LeMPK3) έχει σαν φαινότυπο κυτταρικό θάνατο (Zhang & Liu, 2001) δυο μέρες μετά την αagroένχυση. Παρόμοιο φαινότυπο έχει και η υπερέκφραση μεταλλαγμένης (ώστε να μην χρειάζεται φωσφορυλίωση για ενεργοποίηση αλλά να είναι συνεχώς ενεργοποιημένη) **NtMEK2** (Yang et al., 2001).

Παρόμοιο φαινότυπο έχει και η υπερέκφραση των **LeMCK2** και **LeMCK4** (Pedley & Martin, 2004), η υπερέκφραση της **Ntf4** (MAP κινάση, επίσης στόχος της NtMEK2, (Ren et al., 2006)), η υπερέκφραση της **NbMCK1** (επίσης στόχος της SIPK/ LeMPK2 που συμμετέχει σε «non-host» resistance και απόκριση σε INF1, (Takahashi et al., 2007)) αλλά και η υπερέκφραση της **LeMRKKKa** (del Pozo et al., 2004). Κοινό χαρακτηριστικό των προαναφερθέντων πειραματικών συστημάτων είναι ο εύκολος στην παρατήρηση φαινότυπος. Αυτό, τα καθίστα ελκυστικά εργαλεία στις μελέτες των MAP κινασών.

Επίσης, παροδική συν-υπερέκφραση συνεχώς ενεργοποιημένης **NtMEK2** με τη φωσφατάση MAP κινασών **NtMKP1** έχει σαν αποτέλεσμα την αντιστροφή του κυτταρικού θανάτου (Katou et al., 2005).

Αντίθετα στην περίπτωση της απόκρισης μέσω αντίδρασης υπερευαισθησίας από **Cf-4/Avr4** και **Cf9/Avr9** εκτός από τα μονοπάτια **WIPK/LeMPK3** και **SIPK/LeMPK2** (Rivas et al., 2002; Romeis et al., 1999), φαίνεται να συμμετέχει και αυτό του **NTF4 /LeMPK1** (Stulemeijer et al., 2007). Το μονοπάτι **WIPK/LeMPK3** φαίνεται να έχει πολλαπλό ρόλο στην απόκριση σε διάφορα φυτοπαθογόνα (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, αλλά και διεγέρτες (elicitors) από μύκητες (Mayrose et al., 2004).

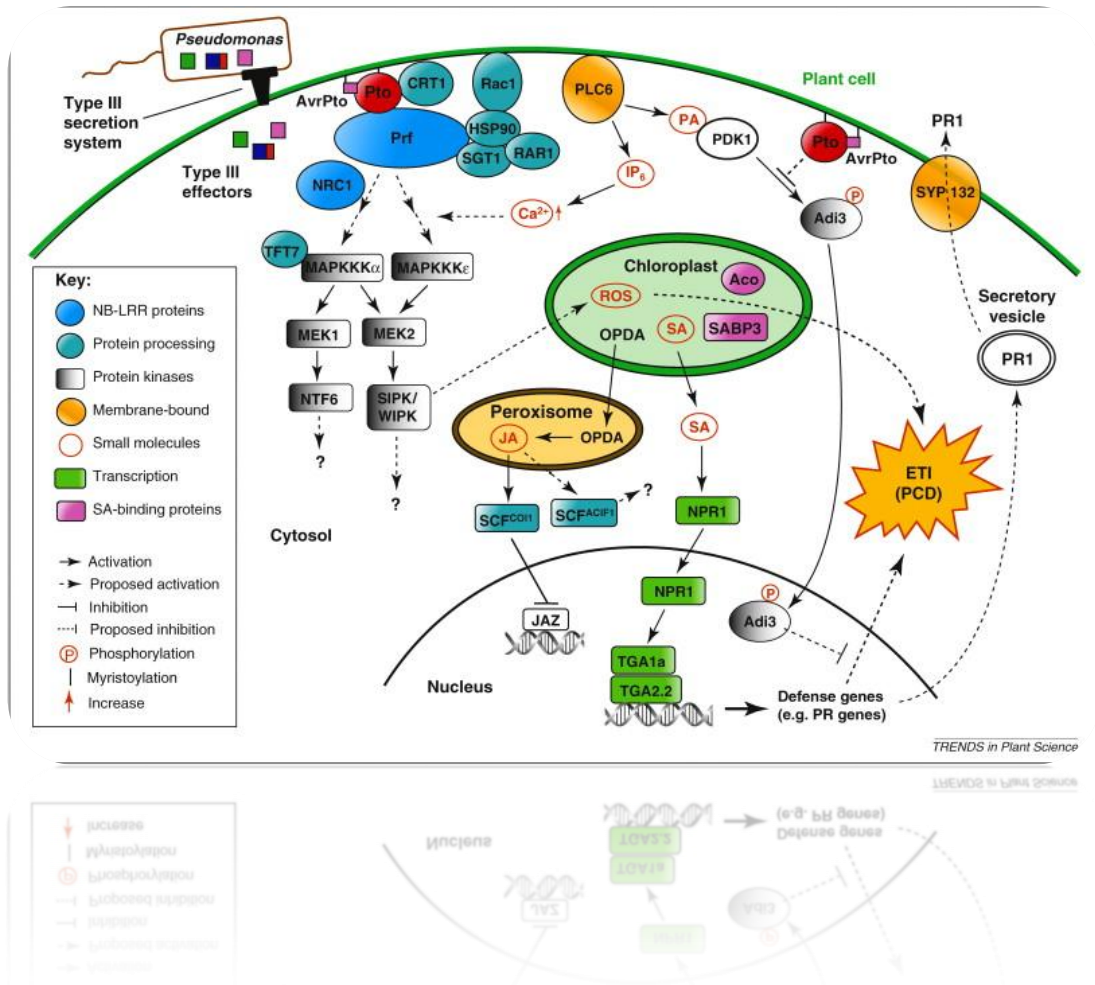


Εικόνα 18. Μονοπάτια MAP κινασών (Mishra et al., 2006). Κάθε τετράγωνο περιλαμβάνει μια πρωτεΐνη και τα γνωστά ορθόλογα της από τα υπόλοιπα φυτικά είδη (Le: τομάτα (*Lycopersicon esculentum*), At: *Arabidopsis thaliana* Nt: καπνός (*Nicotiana tabacum*). Pc: *Petroselinum crispum*).

Το μονοπάτι **NtMEK2/StMEK1**, **SIPK/StMPK1** και **WIPK** φαίνεται να είναι επίσης υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα στο μύκητα *Phytophthora infestans* (Yamamoto et al., 2006). Η **SIPK/ LeMPK2** (και η ορθόλογη της **AtMPK6**) μαζί με την **AtMPK4** (Desikan et al., 2001)) φαίνεται να συμμετέχει και στην σηματοδότηση κυτταρικού θανάτου από τη **χαρπίνη** της *P. syringae* pv. *phaseolicola*) η οποία απαιτείται και για την έκφραση PR πρωτεϊνών (Lee et al., 2001).

Η μεσολάβηση των μονοπατιών αυτών έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση WRKY μεταγραφικών παραγόντων και γονιδίων απόκρισης (Kim & Zhang, 2004).

Η ενεργοποίηση των MAP κινασών αναστέλλεται σε **υψηλές θερμοκρασίες** (32 °C) που αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο/HR προκαλούμενο από ιούς (Zhang & Klessig, 1998). Αντίθετα σε φυτά με μειωμένη έκφραση της NbRDR6 (αν και είναι πιο ευαίσθητα σε όλους τους ιούς), η επίδραση της RNA σίγησης είναι πιο έντονη σε υψηλότερες θερμοκρασίες ανάπτυξης. Το φαινόμενο είναι αντιστρεπτό από ιικούς αναστολείς της σίγησης (Qu et al., 2005). Τα συμπεράσματα αυτά έρχονται σε συνάφεια με προηγούμενες παρατηρήσεις ότι η χαμηλή θερμοκρασία αναστέλλει RNA σίγηση μέσω έλεγχου της παραγωγής siRNA (Szittyta et al., 2003).

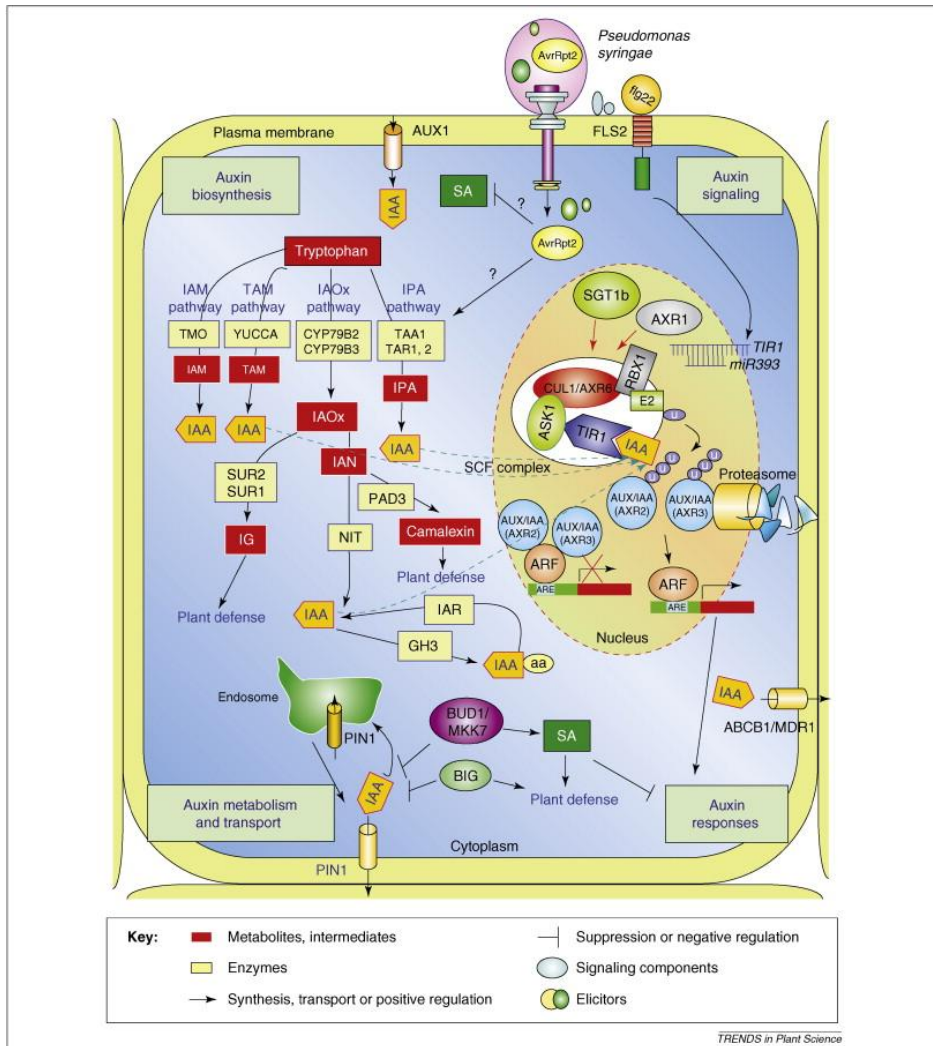


Εικόνα 19. Ο ρόλος της σηματοδότησης των MAP κινασών σε σχέση με τα υπόλοιπα σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την άμυνα του φυτού (Oh & Martin, 2011).

1.5.2 Αυξίνη και απόκριση στα Φυτοπαθογόνα. Όπως αναλύθηκε σε άλλο σημείο του κειμένου, υπάρχει αλληλεπίδραση του μηχανισμού της σίγησης με την ανθεκτικότητα σε ψευδομονάδες. Η αλληλεπίδραση αυτή σχετίζεται και με την ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση σε ορμόνες όπως η αυξίνη.

Γενικά ο μηχανισμός της απόκρισης σε φυτοπαθογόνα και ο μηχανισμός της απόκρισης στην αυξίνη μοιράζονται μια κοινή πρωτεΐνη (**SGT1**). Η SGT1 σχετίζεται με την επαγωγή γονιδίων απόκρισης σε αυξίνη και βρίσκεται στο ίδιο σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες **TIR1**. Οι πρωτεΐνες TIR1 σχετίζονται με την απόκριση σε φυτοπαθογόνα μέσω επαγόμενης από R-γονίδια αντίδρασης υπερευαισθησίας (Austin et al., 2002), (Azevedo et al., 2002), (Peart et al., 2002) και με την αντίδραση μη-ξενιστή (Peart et al., 2002). Τα μετάγραφα των πρωτεϊνών TIR1 ρυθμίζονται από το (επαγόμενο από φλαγγελίνη φυτοπαθογόνων) miRNA393.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



Εικόνα 20. Σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με απόκριση στην αυξίνη (Kazan & Manners, 2009).

Και στις δυο περιπτώσεις (απόκριση σε αυξίνη και επαγωγή ανθεκτικότητας), ο μηχανισμός δράσης του SGT1 είναι ο ίδιος και συνίσταται στην συμπεκουϊτινιλίωση και αποσταθεροποίηση αρνητικών ρυθμιστών (Azevedo et al., 2002). Από την άλλη πλευρά, εκκρινόμενες πρωτεΐνες-τελεστές της *Pseudomonas syringae* αλληλεπιδρούν σε ποικίλα επίπεδα με την ισορροπία των ορμονών στο φυτικό κύτταρο.

Υπερέκφραση του R-γονιδίου RPS4 στον καπνό έχει σαν αποτέλεσμα την μίμηση της επαγωγής του σηματοδοτικού μονοπατιού αντίδρασης υπερευαισθησίας απουσία του αντίστοιχου *avr* γονιδίου (*AvrRps4*). Η επαγωγή αυτή απαιτεί SGT1 αλλά και τις αλληλεπιδρώσες με αυτό πρωτεΐνες **EDS1** και **Hsp90** (Zhang et al., 2004). Ομοίως, η επαγόμενη από την αλληλεπίδραση *avrRpt2-RPS2* (Takahashi et al., 2003) και *avrPphB-RPS5* (Holt et al., 2005) αντίδραση υπερευαισθησίας είναι εξαρτώμενη από SGT1 και των αλληλεπιδρώντων με αυτή πρωτεϊνών **RAR1/HSp90**. Ομοίως, ο μηχανισμός επαγωγής

αντίδρασης υπερευαισθησίας από τον τελεστή *HopQ1-1*¹ στην *N. benthamiana* είναι εξαρτώμενος από SGT1.

Από την άλλη πλευρά, κάποιες εκκρινόμενες βακτηριακές πρωτεΐνες (όπως η *AnrPtoB*) εκμεταλλεύονται το μονοπάτι του SGT1 (και των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών του) για την καταστολή της βασικής άμυνας του φυτού (Hann & Rathjen, 2007).

Ο επαγόμενος από SGT1 προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (αντίδραση υπερευαισθησίας) καταστέλλεται από μια σειρά εκκρινόμενων βακτηριακών πρωτεϊνών. Στην παρούσα μελέτη θα παρουσιαστούν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι κάποιες από αυτές σχετίζονται επίσης με τροποποίηση της απόκρισης σε σίγηση.

Η σχέση μολυσματικότητας στελεχών *Pseudomonas syringae* με την αυξίνη είναι πολυεπίπεδη. Πολλά στελέχη/παθότυποι του είδους *P. syringae* έχουν την δυνατότητα να παράγουν τα ίδια **αυξίνη** (Glickmann et al., 1998), η οποία υποβοηθά την μολυσματικότητα τους. Επίσης, μόλυνση από *Pseudomonas syringae* επάγει μηχανισμούς του φυτού που αυξάνουν τα επίπεδα **ενδογενώς παραγόμενης αυξίνης**, που συνεισφέρει στην ανάπτυξη μόλυνσης (Chen et al., 2007).

Ένας από τους δευτερεύοντες στόχους της παρούσας διατριβής ήταν η αποσαφήνιση των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην φυτική ορμόνη αυξίνη και του μηχανισμού της σίγησης. Το πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η επαγωγή αντίδρασης υπερευαισθησίας από φυτοπαθογόνα στελέχη του γένους *Pseudomonas*. Μάλιστα καθώς οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες της *Pseudomonas syringae* υποβοηθούνται από τα ενδογενή επίπεδα αυξίνης και τροποποιούν τον μηχανισμό της σίγησης, η μελέτη τους δίνει την ευκαιρία να στοχεύσουμε και να μελετήσουμε τον μηχανισμό της αλληλεπίδρασης ορμονών και σίγησης. Καθώς αντίστοιχα θέματα στο παρακλάδι των miRNAs έχουν πρόσφατα καλυφθεί από άλλους (Navarro et al., 2008), επιλέχθηκε αντί για το παρακλάδι των miRNAs να μελετηθεί αυτό των siRNAs.

1.6 Εκκρινόμενες βακτηριακές πρωτεΐνες στην αναστολή του κυτταρικού θανάτου και της βασικής άμυνας.

1.6.1 Εισαγωγή. Οι περισσότεροι βακτηριακοί παράγοντες «αμολυσματικότητας» (πρωτεΐνες που κωδικεύονται από γονίδια *avr*) μεταφέρονται στον ενδοκυτταρικό χώρο του φυτικού κυττάρου μέσω των εξειδικευμένων **Εκκριτικών Συστημάτων** Τύπου III (TTSS, Type Three Secretion System) (Gopalan et al., 1996). Αρχικά χαρακτηρίστηκαν με βάση τον

¹ Απαλοιφή του *HopQ1-1* καθιστά την *N. benthamiana* ευπαθή στη *Pseudomonas syringae* *pv tomato* DC3000. Το φυσικού τύπου στέλεχος δεν είναι παθογόνο σε αυτό το φυτό.

αρνητικό τους ρόλο στην εκδήλωση της βακτηριακής παθογένειας (Staskawitz et al., 1984). Η επικρατής άποψη όμως είναι ότι οι πρωτεΐνες αυτές προάγουν τον παρασιτισμό του βακτηρίου σε φυτά που δεν διαθέτουν λειτουργικά αντίστοιχα γονίδια R (resistance genes). Στοχεύουν τα μονοπάτια που σχετίζονται με την βασική άμυνα των φυτών (basal defense) και την «πυροδότηση» (επαγωγή) προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου όταν τα φυτά διαθέτουν αντίστοιχα R γονίδια (Block et al., 2008), (da Cunha et al., 2007), (Zhou & Chai, 2008). Κάποιες από τις πρωτεΐνες αυτές [στη βιβλιογραφία αναφέρονται είτε ως «πρωτεΐνες Avr» είτε ως «πρωτεΐνες-τελεστές τύπου III» (Type III effectors)] αναγνωρίζονται από τους μηχανισμούς άμυνας του φυτού άμεσα ή συνηθεστέρα έμμεσα για την επαγωγή μηχανισμών άμυνας που συλλογικά ονομάζονται effector-triggered immunity (ETI) (Bent & Mackey, 2007).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών-τελεστών που συμμετέχουν στην **καταστολή του κυτταρικού θανάτου** είναι οι **HopPtoD2** (Espinosa et al., 2003), **HopPtoN** (López-Solanilla et al., 2004), **AvrPphC** (Tsiamis et al., 2000), **HopPtoG**, **HopPtoE**, **AvrPtoE**, **AvrPtoB**, **AvrPtoF**, **AvrPpiB1** (Jamir et al., 2004). Από την άλλη πλευρά, μια σειρά βακτηριακών εκκρινόμενων πρωτεϊνών συμμετέχουν στην **καταστολή της βασικής άμυνας** του φυτού όπως **AvrPtoB**, **AvrRpt2**, **AvrRpm1** (Kim et al., 2005) ενώ η AvrPphE δεν την καταστέλλει), **HopG1**, **HopC1**, **AvrPto**, **AvrPtoF**, **HopM1**, **AvrE** (Oh & Collmer, 2005). Στην καταστολή της βασικής άμυνας του φυτού δεν είναι γνωστό αν μεσολαβεί το γονίδιο SGT1. Είναι γνωστό μόνο (Shang et al., 2006) ότι το **AvrB** αναστέλλει την αλληλεπιδρούσα με SGT1 πρωτεΐνη **RAR1**, η οποία χρειάζεται για την μεσολαβούμενη από SGT1 καταστολή της βασικής άμυνας.

1.6.2 Βιοχημικές ενεργότητες βακτηριακών πρωτεϊνών-τελεστών τύπου III και αναστολή του κυτταρικού θανάτου. Με δεδομένη την σημασία της αντίδρασης υπερευαισθησίας στον περιορισμό των φυτοπαθόνων, δεν είναι τυχαίο ότι μια πλειάδα εκκρινόμενων βακτηριακών πρωτεϊνών έχει προσαρμοστεί στην αναστολή του κυτταρικού θανάτου. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν ποικίλες βιοχημικά χαρακτηρισμένες ενεργότητες όπως π.χ.

- ☞ **πρωτεάση κυστεΐνης [AvrRpt2** (Axtell et al., 2003), **HopX1** (Nimchuk et al., 2007)],
- ☞ **φωσφατάση τυροσίνης HopAO1** (James et al., 2003, Espinosa et al., 2003)],
- ☞ **ακετυλτρανσφεράση σερινών/θρεονινών** (Mukherjee et al., 2006) και **πρωτεάση κυστεϊνών** μορίων ουμπικουΐτινης (Orth, 2000) όπως η **HopZ3**,
- ☞ **προσδενόμενες σε RNA πρωτεΐνες** όπως η **HopU1** (Fu et al., 2007) που κωδικεύεται στο ίδιο οπερόνιο με την HopF2.

Η πρωτεΐνη **AvrRpt2** έχει την ικανότητα να αναστέλλει την σηματοδότηση κυτταρικού θανάτου σε ασύμβατες αλληλεπιδράσεις που ελέγχονται από τα γονιδιακά ζεύγη *avrRpm1/RPM1* (Chen et al., 2000, Ritter & Dangl, 1996) και *AvrRpt2/RPS2* (Ritter & Dangl, 1996). Απαλοιφή του **HopU1** έχει σαν αποτέλεσμα την μετατροπή μιας συμβατής αντίδρασης σε ασύμβατη και συνοδεύεται από εκδήλωση κυτταρικού θανάτου (Fu et al., 2007). Τα σηματοδοτικά μονοπάτια των **AvrPto**, **HopAA1**, **HopAE1** αλλά και του **HopM1** (όταν αναγνωρίζονται σαν *avr*) είναι στόχος αναστολής για μια ακόμα εκκρινόμενη πρωτεΐνη- αναστολέα κυτταρικού θανάτου [**HopZ3**, Vinatzer et al., 2006]. Σε μια σάρωση υποψηφίων πρωτεϊνών για αναστολή κυτταρικού θανάτου επαγόμενου από **HopPsyA** (Jamir et al., 2004) ανασταλτικό χαρακτήρα εκδήλωσαν πρωτεΐνες όπως η **HopD1** (ομόλογη της HopAO1 χωρίς ενεργότητα φωσφατάσης (Espinoso et al., 2003)), **HopX1**, **HopK1** (ομόλογη της *AvrRps4* με διαφορετικές καρβοξυτελικές ουρές, (Petnicki-Ocwieja et al., 2002), HopE1, HopAM1-2)². Αντίθετα η χαρακτηρισμένη σαν αναστολέας πρωτεΐνη HopU1 (Fu et al., 2007) δεν είχε ανασταλτικό χαρακτήρα σε αυτή την περίπτωση (Jamir et al., 2004).

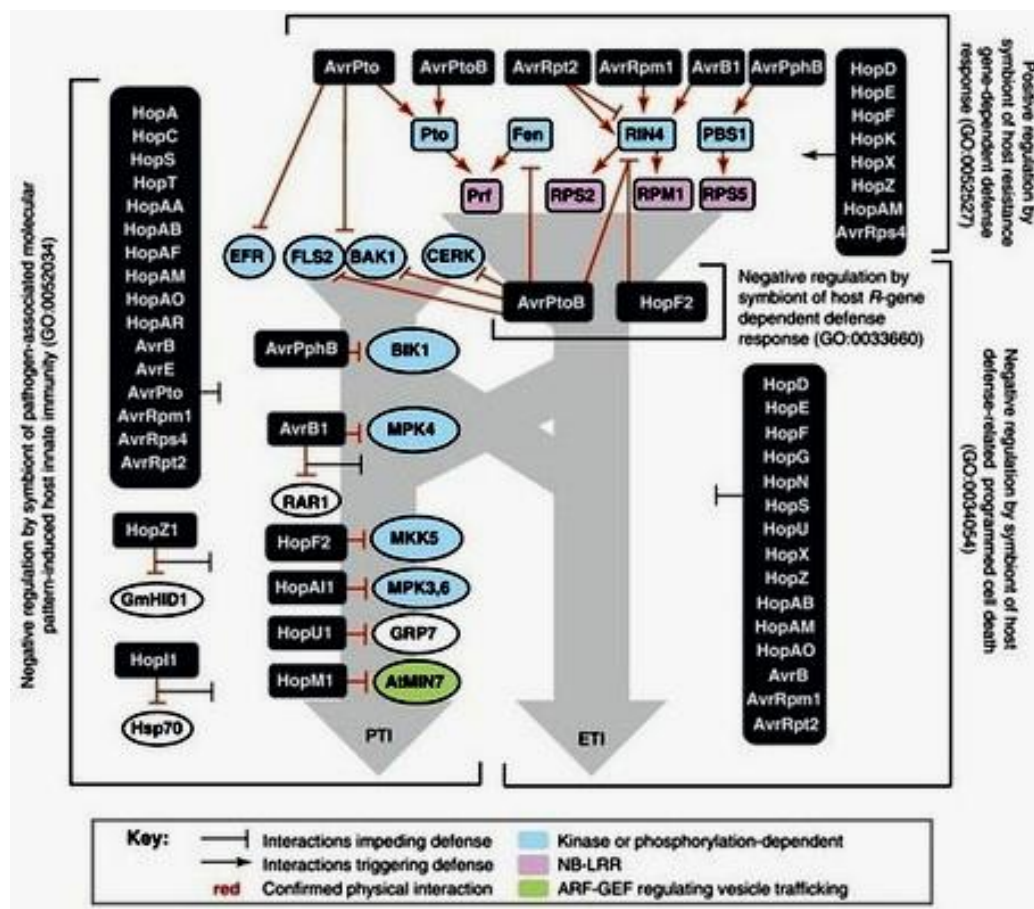
Η **AvrPto** (από *P. syringae* pv. *tomato* ή *P. syringae* pv. *tabaci*, (Kang et al., 2004)) ή η φωσφατάση τυροσίνης **HopAO1** έχουν ενοχοποιηθεί σαν πρωτεΐνες που αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο με την απόκριση μη ξενιστή τύπου II (που συνοδεύεται από αντίδραση υπεραισθησίας).

Παρόλα αυτά, δεν έδειξαν παρόμοιο φαινότυπο στο προηγούμενο σύστημα (HopPhyA). Μάλιστα, δεν έδειξαν παρόμοιο φαινότυπο ούτε όταν ελέγχθηκαν με κάποιες μεμονωμένες πρωτεΐνες επαγωγής κυτταρικού θανάτου [π.χ. από *AvrRpt2* (Hauck et al., 2003), *AvrRpm1*, *AvrB* στην περίπτωση του *AvrPto*. Αναφορικά με την αντίδραση μη ξενιστή τύπου II χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αλληλεπίδραση *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 και *N. benthamiana*. Οι Wei et al. (2007) έδειξαν ότι στην περίπτωση αυτή δυνητικά τουλάχιστον 6 εκκρινόμενες πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα επαγωγής κυτταρικού θανάτου (*AvrE1*, *HopK1*, *HopM1*, *HopQ1-1*, *HopT1-1*, *HopAA1-1* και ίσως οι *HopV1* και *HopX1*). Παρόλα αυτά, μόνο η απάλειψη του **HopQ1-1** έχει την ικανότητα να μετατρέψει το συγκεκριμένο βακτήριο σε παθογόνο για τον ξενιστή αυτό. Η σηματοδότηση κυτταρικού θανάτου από τις υπόλοιπες πέντε πρωτεΐνες παρεμποδίζεται από την δράση άλλων

² Αντίθετα, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες HopC1 (Πρωτεάση κυστεΐνης), HopH1, HopL1, HopO1-1, HopAF1, HopB1, HopG1, HopAD1, HopT1-1 αν και ελεγχτήκαν στο ίδιο σύστημα δεν παρουσίασαν αναστολή κυτταρικού θανάτου.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

αναστολέων κυτταρικού θανάτου –εκκρινόμενων πρωτεϊνών του βακτηρίου. Οι αναστολείς αυτοί είναι άγνωστοι μέχρι στιγμής αλλά το πιθανότερο είναι ότι είναι κάποιες από τις υπόλοιπες χαρακτηρισμένες εκκρινόμενες πρωτεΐνες του *P. syringae* pv. *tomato* DC3000.



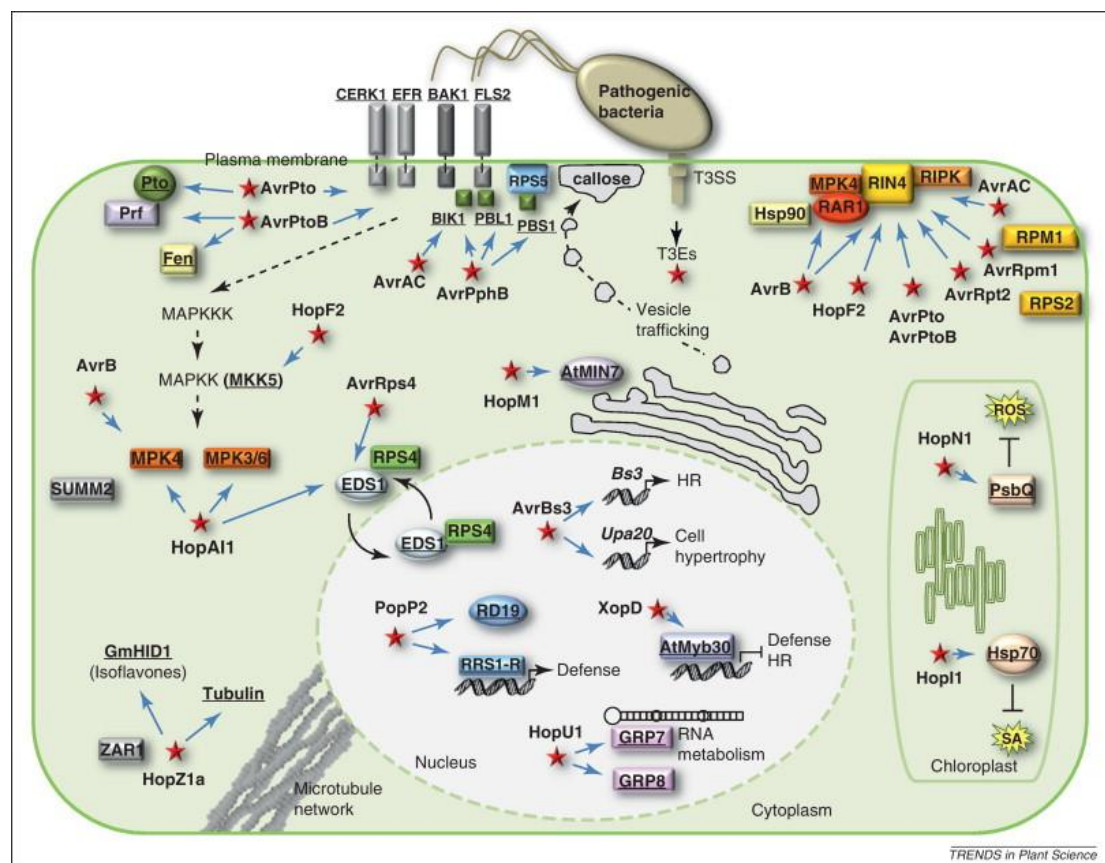
Εικόνα 21. Αναστολή βασικής άμυνας και αντίδρασης υπεραισθησίας από εκκρινόμενες πρωτεΐνες *Pseudomonas syringae* (Lindeberg et al., 2012).

Επιπλέον, η *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B εάν δεν περιέχει ένα ενδογενές πλασμίδιο (pAV511)³ δεν είναι παθογόνος σε φασολιά (*Phaseolus vulgaris*) και η αλληλεπίδραση τους συνοδεύεται από αντίδραση υπερευαισθησίας. Το πλασμίδιο pAV511 κωδικοποιεί ανάμεσα στα άλλα και εκκρινόμενες πρωτεΐνες-αναστολείς κυτταρικού

³ Το στέλεχος *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B χωρίς το pAV511 που έχει προκύψει με εργαστηριακές τεχνικές ονομάζεται RW60.

θανάτου (Jackson et al., 1999), (Tsiamis et al., 2000)⁴. Ανάμεσα σε αυτές είναι και η HopAB1, ομόλογη της HopAB2 (Jackson et al., 1999).

Αντίθετα **κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από μύκητες** έχει βρεθεί να αναστέλλει η **AvrRpm1** (Mackey et al., 2002) αλλά όχι η AvrRpt2 (Chen et al., 2004b).



Εικόνα 22. Οι περισσότερες εκκρινόμενες πρωτεΐνες-τελεστές μοιράζονται κοινούς στόχους. Συνήθως πρόκειται για κεντρικούς διακόπτες του μηχανισμού απόκρισης (Deslandes & Rivas, 2012).

1.6.3 Αναστολή του επαγόμενου από MAP κινάσες κυτταρικού θανάτου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι περιπτώσεις αναστολής του κυτταρικού θανάτου για τις οποίες είναι γνωστό το σημείο του σηματοδοτικού μονοπατιού το οποίο στοχεύουν. Μια τέτοια περίπτωση είναι η αναστολή του επαγόμενου από MAP κινάσες κυτταρικού θανάτου.

⁴ Βέβαια το φυτό έχει προσαρμοστεί ώστε ανάλογα με την ποικιλία να αναγνωρίζει εκκριτικές πρωτεΐνες του πλασμιδίου αυτού ως avr παράγοντες (Jackson et al., 1999, Tsiamis et al., 2000)

Στην περίπτωση αυτή ανασταλτικό ρόλο έχει βρεθεί μέχρι τώρα να διαδραματίζουν οι πρωτεΐνες **AvrPto** (Hann & Rathjen, 2007), **HopAB2** (Hann & Rathjen, 2007) αλλά και η **HopAO1** (Espinosa et al., 2003)] ενώ η AvrRps4 δεν φαίνεται να συμμετάσχει (Hann & Rathjen, 2007).

1.6.4 Εκκρινόμενες βακτηριακές πρωτεΐνες και PAMPs. Η **βασική άμυνα του φυτού (PAMP-Triggered Immunity, PTI)** χαρακτηρίζεται από την αναγνώριση συστηρημένων τμημάτων βακτηριακών μορίων (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) από υποδοχείς του φυτού (Zipfel, 2008).

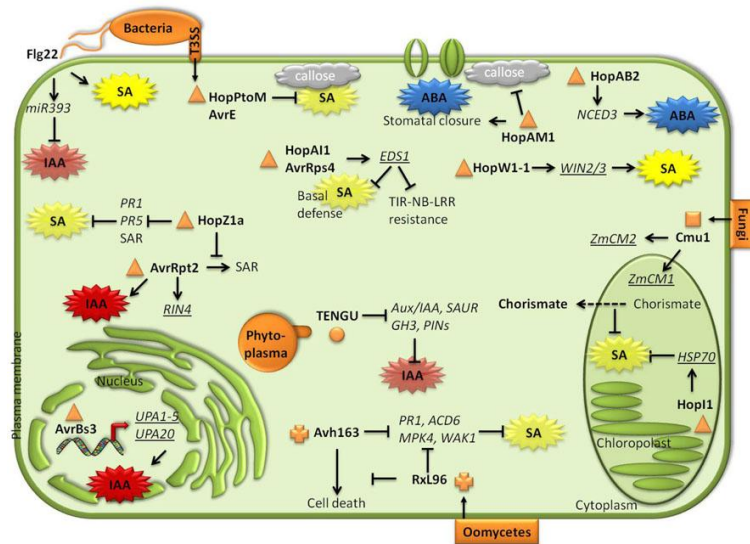
Το γονίδιο BAK1 παράγει σύμπλοκο με το FLS2 και άλλους υποδοχείς PAMP και είναι ενδοκυτταρικός στόχος των εκκρινόμενων πρωτεϊνών **AvrPto και HopAB2** (Shan et al., 2008)⁵. Στην περίπτωση της επαγόμενης από PAMP άμυνας (Heese et al., 2007), μεταλλάγματα του γονιδίου BAK1 παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα ενεργοποιημένων AtMEK3 (ορθόλογη της WIPK) και AtMEK6 (ορθόλογη της SIPK της *N. tabacum*).

Η επαγωγή του FRK1 είναι εξαρτώμενη από MAP κινάσες. Χρησιμοποιώντας σαν πειραματικό σύστημα (για την αποσαφήνιση του ρόλου των MAP κινασών στην βασική άμυνα) την επώαση πρωτοπλαστών *Arabidopsis* με φλαγγελίνη και την επαγωγή του γονιδίου FRK1, οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες AvrPto και HopAB2 (αλλά όχι η ομόλογη της HopAB1) βρέθηκε να έχουν ανασταλτικό ρόλο στην σηματοδότηση MAP κινασών στην βασική άμυνα. Η πρωτεΐνη AvrRps4 δεν φαίνεται να συμμετέχει (He et al., 2006)⁶.

⁵ Πρόσφατες βιβλιογραφικές αναφορές υποστηρίζουν ότι οι μοριακοί στόχοι του AvrPto στην μεσολαβούμενη από PAMP άμυνα είναι και οι ίδιοι οι υποδοχείς-κινάσες των PAMP FLS2 και EFR (Xiang et al., 2008). Η πρόσδεση με Pto ανταγωνίζεται πρόσδεση με FLS2 και EFR. Αυτό, ίσως υποδηλώνει ότι η άμυνα μέσω PAMP και μέσω αντίδρασης υπερευαισθησίας αν και έχουν κοινό στόχο δρουν ανταγωνιστικά. Όταν η μια (σηματοδότηση PAMP) έχει επαρκή αποτελέσματα η άλλη (αντίδρασης υπερευαισθησία) δυνητικά δεν χρειάζεται. Η HopAB2 προσδένεται σε FLS2 και BAK1. Η E3 λιγάση ουμπικουϊτίνης του HopAB2 είναι απαραίτητη για την αποικοδόμηση του FLS2 (Göhre et al., 2008). Η δράση του HopAB2 αναφορικά με την καταστολή του μονοπατιού των PAMP και της συμμετοχής των MAP κινασών σε αυτό προσομοιάζει την δράση ενδογενών E3 λιγασών ουμπικουϊτίνης (Trujillo et al., 2008). Οι μοριακοί στόχοι των τελευταίων όμως δεν είναι γνωστοί.

⁶ Μηδενική επίδραση έχουν και οι πρωτεΐνες AvrRpt2 και HopE1.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πρωτεΐνη **HopAO1** (φωσφατάση τυροσίνης) αν και είχε βρεθεί ότι έχει επίδραση στον επαγόμενο από MAP κινάσες κυτταρικό θάνατο (Espinosa et al., 2003) δεν φαίνεται να έχει ρόλο σε αυτό το σύστημα. Μάλιστα σε κάποιες περιπτώσεις φαίνεται ότι ακόμα και ενεργοποιεί τις MAP κινάσες κατά την βασική άμυνα (Underwood et al., 2007). Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι η πρωτεΐνη **HopAI1** [λύαση φωσφοθρεονίνης, (Li et al., 2007)] δεν βρέθηκε να έχει επίδραση σε αυτό το σύστημα (He et al., 2006) αν και έχει καταδειχτεί από άλλες ομάδες (Zhang et al., 2007) ότι αναστέλλει το σηματοδοτικό μονοπάτι των PAMP από MAP κινάσες. Ακόμα και άλλες υποψήφιες πρωτεΐνες όπως η **AvrBsT** [πιθανολογούμενη ακετυλτρανσφεράση σερινών/θρεονινών, (Mukherjee et al., 2006)] δεν είχαν επίδραση σε αυτό το σύστημα. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως, ότι τα αντικρουόμενα αποτελέσματα της εργασίας αυτής αναφορικά με τον ρόλο πολλών Type III-εκκρινόμενων πρωτεϊνών στην βασική άμυνα (ανεξαρτήτως του ρόλου τους στο μονοπάτι των MAP κινασών) σε σχέση με το σύνολο των βιβλιογραφικών αναφορών δημιουργεί κάποια ερωτήματα αναφορικά με την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και κατά πόσο οι πρωτοπλάστες αναπαριστούν πιστά την κατάσταση που συναντάται στην φύση. Κατά αναλογία με τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες φυτοπαθογόνων, διάφορες πρωτεΐνες από ζωοπαθογόνα βακτήρια με Εκκριτικό Σύστημα Τύπου III αλληλεπιδρούν με το μονοπάτι των MAP κινασών. Σαν παραδείγματα αναφέρονται η **OspF** (λύαση φωσφοθρεονίνης, ομόλογη του HopAI1) από *Salmonella* (Li et al., 2007), η **YopJ** (ακετυλτρανσφεράση σερινών/θρεονινών) από *Yersinia pestis* (Mukherjee et al., 2006) και η ομόλογη της YopA από *Vibrio*, η **SptP** (φωσφατάση τυροσίνης) από *Salmonella* (Lin et al., 2003) και η (αλληλεπιδρώσα με την κινάση σερίνης/ θρεονίνης PNK1) **SppH1** από *Salmonella* (Haraga & Miller, 2006). Για την φωσφατάση **YopH** από *Yersinia pestis* (Shao, 2008) και την κινάση **YopO/YrkA** (Prehna et al., 2006) δεν έχει αναφερθεί συμμετοχή στο μονοπάτι των MAP κινασών.



Εικόνα 23. Πρωτεΐνες τελεστές που στοχεύουν μονοπάτια βιοσύνθεσης ή απόκρισης σε ορμόνες (Denancé et al., 2013).

1.7 Υπερ-Οικογένεια Πρωτεϊνών-τελεστών HopF

1.7.1 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ομολόγων. Το **HopF1** (AvrPphF) είναι μια πρωτεΐνη-τελεστής τύπου III από το βακτήριο *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B, παθογόνου σε ποικιλίες φασολιάς. Σε συμβατές αλληλεπιδράσεις παθογόνου- ξενιστή συμπεριφέρεται σαν παράγοντας μολυσματικότητας (Tsiamis et al., 2000). Σε ασύμβατες αλληλεπιδράσεις, έκκριση της στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου οδηγεί στην πυροδότηση αντίδρασης υπερευαισθησίας. Το γονίδιο εντοπίζεται σε μια «νησίδα παθογένειας» (**pathogenicity island**) του μεγάλου πλασμιδίου της *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B. Επειδή υπάρχει εξελικτική πίεση για αποφυγή αντίδρασης υπερευαισθησίας στους ασύμβατους ξενιστές (Rivas et al., 2005), σε κάποια στελέχη (όπως το αλληλουχημένο στέλεχος *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A) παρατηρείται μια έλλειψη στη χρωμοσωμική περιοχή που γειτνιάζει με το γονίδιο αλλά το στέλεχος αυτο φέρει ένα φυλογενετικά απομακρυσμένο χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενο ομόλογο (HopF3). Μεταφορά στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων μέσω του T3SS έχει πειραματικά καταδειχτεί για την ομόλογη πρωτεΐνη **HopF2** (AvrPtoF, HopPtoF) από *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (HopF2_{DC3000}, Shan et al., 2004). Η HopF2 εντοπίζεται υποκυτταρικά στην πλασματική μεμβράνη των φυτικών κυττάρων. Υπεύθυνο για αυτή την στόχευση είναι ένα σινιάλο μυριστοϋλίωσης. Το σινιάλο αυτό είναι απαραίτητο και για την δράση του HopF2_{DC3000} σαν παράγοντα μολυσματικότητας αλλά και για την αναγνώριση του στα πλαίσια της εκδήλωσης αντίδρασης υπερευαισθησίας (Robert-Seilaniantz et al., 2006).

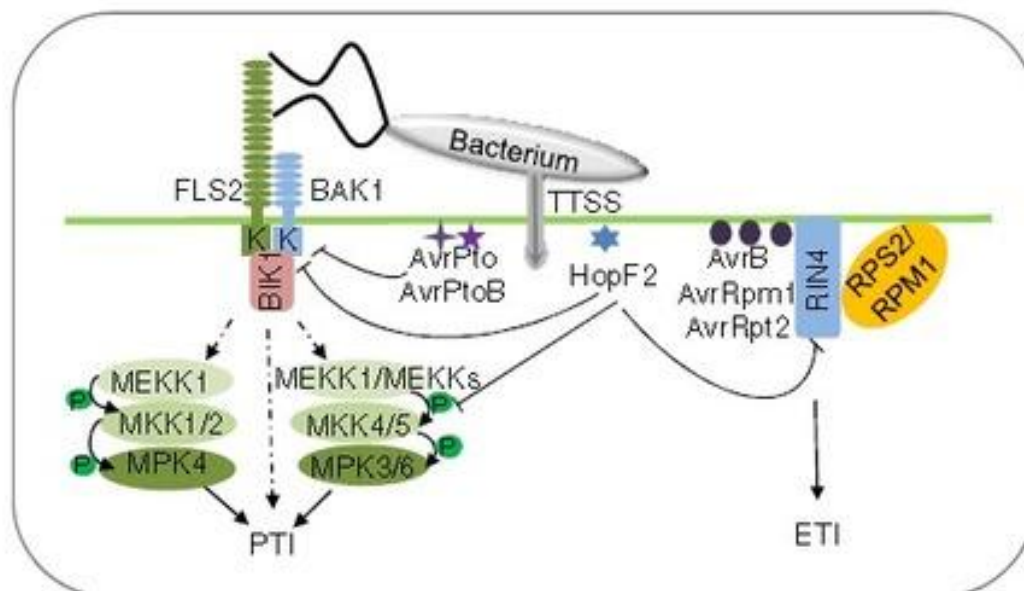
1.7.2 Οικογένεια HopF1/HopF2/HopF3 και αντίδραση υπερευαισθησίας. Η αντίδραση υπερευαισθησίας του *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B σε *P. vulgaris* cv. Tendergreen⁷ μεσολαβείται από ένα άγνωστο μέχρι στιγμής χρωμοσωμικά κωδικοποιούμενο ανρ γονίδιο. Το HopF1 (AvrPphF) έχει την δυνατότητα να καταστείλει την αντίδραση αυτή. Στελέχη που έχουν απολέσει το μεγάλο πλασμίδιο της *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B (RW60) προκαλούν HR στην ποικιλία αυτή (λόγω του άγνωστου *avr*). Παρουσία HopF1 όμως μετατρέπονται σε παθογόνα και μπλοκάρουν την HR (Tsiamis et al., 2000). Το ομόλογο HopF2_{DC3000} έχει την δυνατότητα να μπλοκάρει την HR που προκαλείται από HopPsyA σε φύλλα καπνού και *Arabidopsis* (Jamir et al., 2004) και μάλιστα αυτή η καταστολή συμβαίνει στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου. Μεταλλάγματα στελεχών με απαλοιφή του HopF2_{DC3000} έχουν αυξημένη ικανότητα να προκαλούν αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά μη-ξενιστές (non-host).

Μάλιστα, ο μηχανισμός δράσης του ως προς την καταστολή του κυτταρικού θανάτου εμφανίζεται συντηρημένος καθώς έχει την δυνατότητα να αναστείλει κυτταρικό θάνατο και στο ζυμομύκητα όταν προκαλείται από το προ-αποπτωτικό γονίδιο **Bax**. Από την άλλη πλευρά, η πρωτεΐνη AvrB2 (AvrPphC) είναι αρνητικός ρυθμιστής της πυροδότησης αντίδρασης υπερευαισθησίας από HopF2. Συν-ύπαρξη του AvrB2 (**AvrPphC**) με HopF2 είναι ικανή να μετατρέψει μια ασύμβατη αλληλεπίδραση με τον ξενιστή λόγω παρουσίας του HopF2 σε συμβατή και να αναστείλει τον κυτταρικό θάνατο από HopF2 (Tsiamis et al., 2000).

1.7.3 Οικογένεια HopF1/ HopF2/ HopF3 και φλαγγελίνη. Σε αλληλεπιδράσεις παθογόνου-ξενιστή στις οποίες μεσολαβεί η φλαγγελίνη (μια PAMP) επάγεται μεταγραφικά το γονίδιο **NHO1**. Αυτό με την σειρά του επάγει μηχανισμούς αντίστασης με τελικό αποτέλεσμα τον περιορισμό του παθογόνου. Τα παραπάνω συμβαίνουν και σε αντιδράσεις ετερόλογες αλληλεπιδράσεις (non-host) τύπου I (που δεν συνοδεύονται από κυτταρικό θάνατο) και σε τύπου II (που συνοδεύονται από κυτταρικό θάνατο). Έκφραση HopF2_{DC3000} έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει την επαγόμενη από φλαγγελίνη (από *P. syringae* pv tomato DC3000) ενεργοποίηση του NHO1 (Li et al., 2005). Η επαγόμενη βασική άμυνα που προκαλείται από την αναγνώριση φλαγγελίνης (από *P. syringae* pv tomato DC3000) καταστέλλεται από την HopF2_{DC3000} (Oh & Collmer, 2005). Η εκδήλωση βασικής άμυνας στην περίπτωση αυτή συνοδεύεται από κλείσιμο αγγείων. Η παρουσία HopF2_{DC3000} έχει την δυνατότητα να αντιστρέψει αυτό το αποτέλεσμα. Το HopF2_{DC3000} έχει την δυνατότητα να παρεμποδίζει την έκφραση των **PR γονιδίων** (Jamir et al., 2004), αλλά δεν επάγει τα

⁷ Η ποικιλία αυτή δεν έχει το R γονίδιο που αναγνωρίζει άμεσα ή έμμεσα το AvrPphF.

αποκρινόμενα στο ιασμονικό γονίδια (He et al., 2004). Πρόσφατα χαρακτηρίστηκαν ενδοκυτταρικοί στόχοι του HopF2_{DC3000} που σχετίζονται με την απόκριση σε φλαγγελίνη όπως κάποιες MAP κινάσες (Wang et al., 2010) και η πρωτεΐνη BIK1 που σχετίζεται με αλληλεπιδράσεις με υποδοχείς φλαγγελίνης (Zhou et al., 2014)



Εικόνα 24. Γνωστοί ενδοκυτταρικοί στόχοι της πρωτεΐνης HopF2_{DC3000} (από Zhou et al., 2014).

1.7.4 Ενζυμική Ενεργότητα ριβосуλτρασφεράσης. Η λύση της δομής του HopF1 (AvrPphF) από *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B αποκάλυψε δομική ομολογία με μια οικογένεια **ADP-ribosyltransferases**. Όμως αρχικά οι βιοχημικές δοκιμές απέτυχαν να αποδείξουν ενεργότητα ADP-ribosyltransferase στο HopF1 (Singer et al., 2004). Στην συνέχεια και με την χρήση διαφορετικών βιοδοκιμών κατέστη δυνατή η επαλήθευση της ικανότητας του HopF2 να μεταφέρει ADP-ριβόζη σε αμινοξικά κατάλοιπα κάποιων πρωτεϊνών όπως η MKK5 (Wang et al., 2010). Άλλες ερευνητικές ομάδες (Wilton et al., 2010) απέτυχαν να επαληθεύσουν την παρατήρηση αυτή στο δικό τους σύστημα.

Τα κατάλοιπα **R72 (R71), S90 (S89), H97 (H96), E98 (E97), D174 (D175)** του HopF1 θεωρούνται κρίσιμα για την ενεργότητα ADP-ribosyltransferase (μέσα σε παρένθεση η αντιστοιχία με τα κατάλοιπα του HopF2). Μεταλλαγές στα κατάλοιπα **R72** ή **D174** εξαλείφουν εντελώς την ικανότητα του HopF1 να δρα σαν παράγοντας παθογένειας. Και οι υπόλοιπες μεταλλαγές έχουν επίδραση αν και ηπιότερη (Singer et al., 2004).

Το HopF2 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση γονιδίων (όπως του FRK1) που επάγονται από PAMP (Wang et al., 2010). Τα καταλοιπα **G2** του HopF1 (Wu et al., 2011) και τα καταλοιπα **R71, S89, H96, E97, D175** του HopF2 (Wang et al., 2010) σχετίζονται με την ικανότητα των HopF1 /HopF2 να καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν

στην απόκριση από PAMP. Τέτοια περίπτωση είναι η καταστολή από τα HopF1 /HopF2 της επαγωγής του γονιδίου FRK1 από flag-22. Το κατάλοιπο **G2** του HopF1 χρειάζεται και για την καταστολή της φωσφορυλίωσης του BIK1 (Wu et al., 2011). Η φωσφορυλίωση του BIK1 είναι επίσης επαγόμενη από το πεπτίδιο flag-22.

Από την άλλη πλευρά, το HopF2 αναστέλλει την δραστηριότητα MAP κινασών σε φυτά (Wang et al., 2010). Η έκφραση HopF1 (και HopF2) συνοδεύεται από σημαντικά μειωμένη δραστηριότητα MPK3, MPK6 και MPK4 σε πρωτοπλάστες *Arabidopsis* (Wang et al., 2010; Wu et al., 2011). Τα καταλοιπα **R72** και **D174** (αλλά όχι το **H97**) θεωρούνται απαραίτητα για την καταστολή της ενεργοποίησης των MAP κινασών (Wu et al., 2011). Το HopF2 αλληλεπιδρά με τις MKK3, MKK4, MKK5, MKK6, και MKK10 (και τις απενεργοποιεί), αλλά όχι με την MKK9 (Wang et al., 2010). Τα καταλοιπα **R71** και **D175** θεωρούνται κρίσιμα για την αλληλεπίδραση του HopF2 με την MKK5 (Wang et al., 2010; Wu et al., 2011).

Η ενεργότητα ADP-ριβοζυλοτρανσφεράσης του HopF2 ριβοζυλιώνει το κατάλοιπο Arg313 της MKK5 και μπλοκάρει την δραστηριότητα κινάσης της (Wang et al., 2010). Από την άλλη πλευρά, σημειακές μεταλλαγές στα καταλοιπα **R71** και **D175** του HopF2 μπλοκάρουν την ADP-ριβοσυλίωση του MKK5 (Wang et al., 2010) και μεταλλαγές στο **D175** του HopF2 την ADP-ριβοσυλίωση της πρωτεΐνης RIN4 της *Arabidopsis* (Wilton et al., 2010).

Το HopF2 αναστέλλει την μεσολαβούμενη από AvrRpt2 αποδόμηση της RIN4 in vivo και in vitro (Wilton et al., 2010). Η αποικοδόμηση αυτή είναι δυνατή λόγω της φυσικής αλληλεπίδρασης των HopF2 και RIN4. Τα καταλοιπα **G2**, **R72** και **D174** του HopF1 σχετίζονται με την αναστολή της (μεσολαβούμενης από AvrRpt2) αποικοδόμησης του RIN4 (Wilton et al., 2010). Τα ίδια καταλοιπα σχετίζονται και με την αναστολή της (επαγόμενης από AvrRpt2) HR (Wilton et al., 2010). Γενικά, τα ποιο κρίσιμα καταλοιπα στην δράση ως ενισχυτές μολυσματικότητας (virulence function) των HopF1 /HopF2 αλλά και στην επαγωγή απόκρισης από PAMP είναι **G2, R72** αλλά όχι τα **S90**, **H97**, **E98** του HopF1 και το **D175** του HopF2 (Singer et al., 2004; Wang et al., 2010; Wilton et al., 2010).

Νεότερα πειραματικά δεδομένα απέδειξαν ότι μια οικογένεια 2'-tRNA-phosphotransferases μοιράζεται την ίδια δομή στο ενεργό κέντρο με τις ADP-ribosyltransferases (Kato-Murayama et al., 2005). Οι 2'-tRNA-phosphotransferases είναι NAD-εξαρτώμενα ένζυμα, τα οποία (μέσω ενός κάπως πολύπλοκου μηχανισμού) απομακρύνουν μια 2-φωσφορική ομάδα (2-phosphate group) από ένα ενδιάμεσο της ωρίμανσης του tRNA.

Βιοπληροφορική ανάλυση, λαμβάνοντας υπόψη και δομές οι οποίες δεν είχαν λυθεί ακόμα όταν λύθηκε η δομή του HopF1, αποκάλυψε ότι το HopF1 παρουσιάζει τη

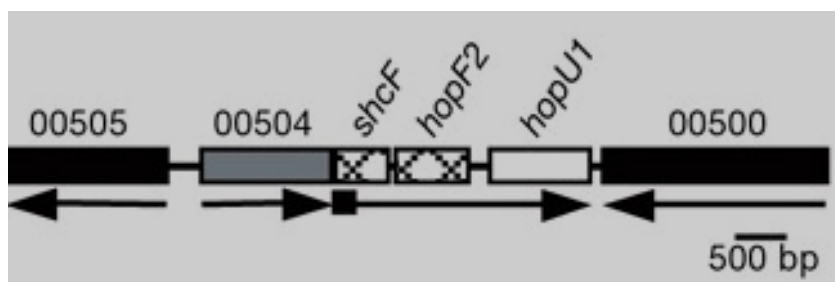
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

μεγαλύτερη δομική ομολογία με 2'-tRNA- phosphotransferases από όλες τις οικογένειες που έχουν όμοια δομή ενεργού κέντρου με ADP-ribosyltransferases.

ADP-ribosyltransferase			
peptide	+ NAD ⁺ <=>	N-(ADP-D-ribosyl)peptide	+ nicotinamide
2'-tRNA- phosphotransferase			
2'-phospho-[ligated tRNA] + NAD ⁺ <=> mature tRNA + ADP-ribose 1,2-phosphate + nicotinamide + H ₂ O			

Με δεδομένο ότι το 5'-άκρο των siRNA είναι φωσφοριλιωμένο, ο τρόπος αποφωσφορυλίωσης τους θα μπορούσε να προσομοιάζει αυτόν του tRNA. Μάλιστα ,με δεδομένο ότι το 5'-end των siRNA είναι απαραίτητο για λειτουργικότητα, ενώ το ομόλογο HopF2_{DC3000} έχει ιδιότητες ενισχυτή σίγησης (Sarris et al., 2011), μια ενδιαφέρουσα αλλά ριψοκίνδυνη υπόθεση είναι ο συσχετισμός μιας πιθανής ενεργότητας που να συνδέει την ενεργότητα 2'-tRNA- phosphotransferase με το σιγητικό φαινότυπο.

1.7.5 Μηχανισμός λειτουργίας άλλων ADP-ribosyltransferases. Εναλλακτικά, το HopF2 μπορεί να έχει παρόμοια λειτουργία με τον τελεστή HopU1. Το οπερόνιο στο οποίο κωδικεύεται το HopF2_{DC3000} έχει τρία ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια (αντί για δυο όπως συμβαίνει σε άλλα στελέχη της *P. syringae*). Το πρώτο κωδικοποιεί για την σαπερόνη, το δεύτερο για το HopF2 και το τρίτο για το HopU1.



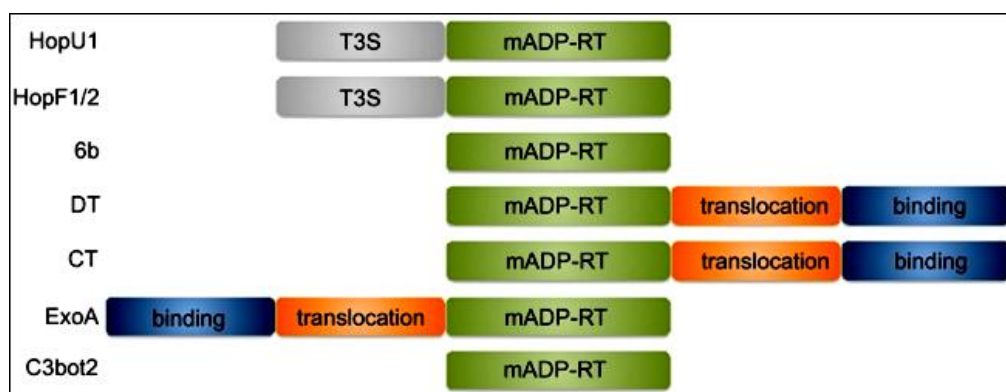
Εικόνα 25. Το οπερόνιο του HopF2_{DC3000} (Fu et al., 2007).

Το HopU1 είναι μια ADP-ribosyltransferase. Τα υποστρώματα του HopU1 σε *A. thaliana* είναι προσδεδεμένες σε RNA πρωτεΐνες που διαθέτουν μοτίβα αναγνώρισης RNA [RNA-recognition motifs (RRMs)].

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η προσδεδεμένη σε RNA πρωτεΐνη GRP7 της *Arabidopsis* (AtGRP7) είναι ένα υπόστρωμα του HopU1. Για την ADP-ριβοσυλίωση του GRP7 από HopU1 απαιτούνται δύο κατάλοιπα αργινίνης εντός της αλληλουχίας RRM. Αυτό υποδηλώνει ότι αυτή η τροποποίηση μπορεί να παρεμποδίζει την ικανότητα του GRP7 να δεσμεύει το RNA (Fu et al., 2007). Ενεργότητα ADP-ribosyltransferase εμφανίζουν και άλλες οικογένειες πρωτεϊνών-τελεστών της *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 όπως οι HopO1-1/HopO1-2 (Fu et al., 2007). Μια άλλη περίπτωση ADP-ribosyltransferase που στοχεύει ενζυμα του μεταβολισμού του RNA είναι η 6b του αγροβακτηρίου.

Η πρωτεΐνη **6b του Ti -πλασμιδίου** του *Agrobacterium tumefaciens* (T-DNA) αλληλεπιδρά με πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες του ξενιστή που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των φυτικών κυττάρων κατά την ογκογένεση. Ανάμεσα σε αυτές που στοχεύει άμεσα είναι η SERRATE και η Ago1. Το SERRATE και το ago1 είναι δυο ενζυμα που σχετίζονται με την βιοσύνθεση των miRNAs. Η 6b αντιπροσωπεύει μια νέα οικογένεια τοξινών. Τα αμινοξέα Tyr66, Thr93, και Tyr153 της 6b θεωρούνται τα καταλυτικά κατάλοιπα της ενεργότητας ADP-ριβοζυλίωσης. Για την ριβοσυλίωση είναι απαραίτητοι ενδογενείς παράγοντες του φυτού όπως το ARF (ADP ribosylation factor). Συμπερασματικά, το 6b ρυθμίζει την ανάπτυξη των φυτικών κυττάρων μέσω διαταραχής της βιοσύνθεσης miRNA. Δηλαδή μέσω ριβοζυλίωσης ενζύμων του μονοπατιού βιοσύνθεσης miRNA (Wang et al., 2011).



Εικόνα 26. Οικογένειες ADP- ριβοσυλτρανσφερασών παθογόνων (Wirthmueller & Banfield, 2012).

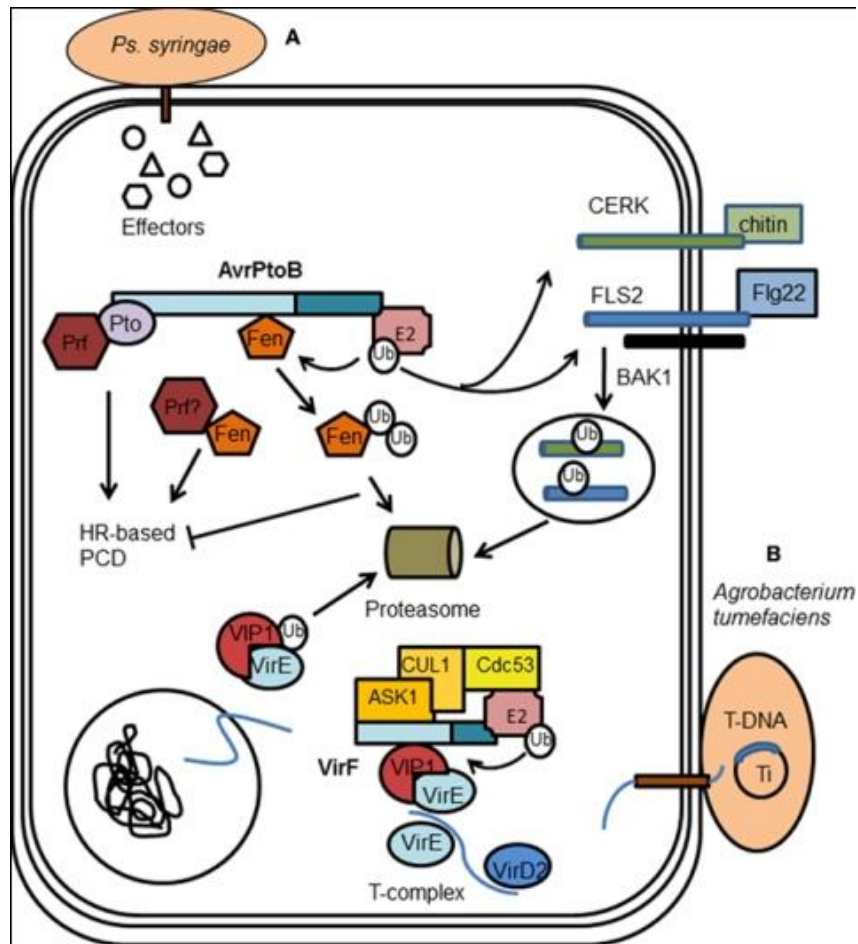
Οι ADP-ριβοσυλτρανσφεράσες είναι μια οικογένεια ενζύμων που διασπών NAD + και συνδέουν ομοιοπολικά το ADP-ribose σε πρωτεΐνες-στοχους. Οι ADP-ριβοσυλτρανσφεράσες αναγνωρίζονται ως σημαντικοί παράγοντες λοιμογόνου δύναμης των βακτηρίων που μολύνουν τα θηλαστικά. Η **τοξίνη χολέρας**, η **τοξίνη κοκκύτη**, και η

τοξίνη της διφθερίτιδας είναι τρία από τα πιο γνωστά παραδείγματα ADP-ριβουσυλτρανσφερασών (Wirthmueller & Banfield, 2012).

1.8 Υπερ-Οικογένεια Πρωτεΐνης HopAB2

1.8.1 Απομόνωση και χαρακτηρισμός ομολόγων. Η πρωτεΐνη HopAB2 (AnvrtoB) από *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 ανακαλύφθηκε σε μια σάρωση με την χρήση του συστήματος των δυο υβριδίων εξαιτίας της ικανότητας της για εξειδικευμένη πρόσδεση στην πρωτεΐνη-υποδοχέα Pto της τομάτας (Kim et al., 2002). Η ικανότητα μεταφοράς της στο εσωτερικό φυτικών κυττάρων επιβεβαιώθηκε πειραματικά, όπως επιβεβαιώθηκε και η ικανότητα πυροδότησης αντίδρασης υπερευαισθησίας σε γονότυπους τομάτας παρουσία Pto. Η πρωτεΐνη HopAB2 είναι μέλος της υπεροικογένειας που περιλαμβάνει και την HopAB1 (VirPphA). Η HopAB1 κωδικούεται σε μια νησίδα παθογένειας του μεγάλου πλασμιδίου της *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B (race 7). Η πρωτεΐνη αυτή είναι η πρώτη εκκρινόμενη από T3SS που αρχικά απομονώθηκε όχι σαν παράγοντας αμολυσματικότητας (*avr*) αλλά λόγω της ικανότητας της να αυξάνει την παθογόνο ισχύ σε ορισμένους (ευπαθείς) γονότυπους φασολιάς. Μόνο αργότερα χαρακτηρίστηκε και σαν *avr* γονίδιο σε διαφορετικού γονότυπου ξενιστή (Jackson et al., 1999). Η πρωτεΐνη αυτή καταστέλλει μια αντίδραση υπερευαισθησίας που προκαλείται από ένα άγνωστο *avr* γονίδιο σε συμβατές αλληλεπιδράσεις. Εξαιτίας αυτού έχει χαρακτηριστεί σαν αναστολέας κυτταρικού θανάτου (Jackson et al., 1999). Ομοίως, η ομόλογη πρωτεΐνη HopAB2_{DC3000} καταστέλλει την HR που προκαλείται από μια ποικιλία εκκρινόμενων παραγόντων και άλλων πρωτεϊνών με ικανότητα επαγωγής κυτταρικού θανάτου στα φυτά ή αποπτωτικού θανάτου στον σακχαρομύκητα (Abramovitch et al., 2003).

1.8.2 Δομικές Περιοχές HopAB2. Αρχικά πειράματα της ερευνητικής ομάδας του Gregory Martin είχαν αποκαλύψει το μοτίβο GINP ως την περιοχή πρόσδεσης με το Pto. Πιο ενδελεχή πειράματα όμως απέδειξαν ότι το συγκεκριμένο μοτίβο έχει σχέση με την σταθερότητα της δομής της πρωτεΐνης. Η κατάρρευση της δομής οδηγεί σε αδυναμία πρόσδεσης.



Εικόνα 27. Δομικές Περιοχές HopAB2 (Perrett et al., 2011).

Η πρωτεΐνη HopAB2_{DC3000} απαρτίζεται:

- α) από μια περιοχή αλληλεπίδρασης με Pto στο αμινοτελικό άκρο,
- β) μια κεντρική περιοχή με ικανότητα πρόσδεσης με την πρωτεΐνη Fen (Rsb φαινότυπος) και
- γ) μια καρβοξυτελική περιοχή με ικανότητα αναστολής του κυτταρικού θανάτου (Abramovitch et al., 2003). Τα ομόλογα HopAB1 και HopAB2 αλληλεπιδρούν με ουμπικουϊτίνη (Abramovitch et al., 2006) και ουμπικουϊτινιλιώνονται in vitro. Ειδικά για το δεύτερο, έχει επιπλέον πιστοποιηθεί ότι διαθέτει in vitro ενεργότητα E3 λιγάσης ουμπικουϊτίνης. Η ενεργότητα αυτή εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης και είναι υπεύθυνη για τις αντιαποπτωτικές της ιδιότητες (Abramovitch et al., 2006). Πράγματι (Janjusevic et al., 2006), η κρυσταλλογραφική δομή αυτής της περιοχής έχει δομική ομοιότητα με E3 λιγάσες. Η περιοχή πρόσδεσης E2 ενζύμων απαραίτητων για την

ενεργότητα είναι επίσης συντηρημένη. Τα ενδογενή E2 φυτικά ένζυμα που αλληλεπιδρούν με την HopAB2 δεν είναι όμως γνωστά.

Η ενεργότητα E3 λιγάσης είναι υπεύθυνη για την ουμπικουϊτινιλίωση της αλληλεπιδρώσας (μέσω Rsb) με την HopAB2 πρωτεΐνης Fen της τομάτας. Η ουμπικουϊτινιλίωση οδηγεί σε εξαρτώμενη από πρωτεάσωμα αποικοδόμηση της Fen (Rosebrock et al., 2007)⁸.

Η αποικοδόμηση του Fen οδηγεί στην διακοπή της έμμεσης αλληλεπίδρασης του HopAB με την πρωτεΐνη Prf (και οι δυο αλληλεπιδρούν με Fen) με τελικό αποτέλεσμα την μη μετάδοση του σήματος επαγωγής κυτταρικού θανάτου. Αντίθετα, η ομόλογη με Fen πρωτεΐνη Pto έχει την ικανότητα φωσφορλίωσης και συνεπακόλουθης απενεργοποίησης της E3 λιγάσης (Ntoukakis et al., 2009).

Με τον τρόπο αυτό, εξουδετερώνεται η πιθανότητα ουμπικουϊτινιλίωσης του υποδοχέα Pto (και του υποδοχέα Fen αν συνυπάρχει με Pto). Πρόσφατες βιβλιογραφικές αναφορές υποστηρίζουν ότι επιπλέον μοριακοί στόχοι του τελεστή HopAB2 στην μεσολαβούμενη από PAMP άμυνα είναι και ο ίδιος ο υποδοχέας-κινάση των PAMP FLS2 και η (αλληλεπιδρώσα με FLS2) BAK1⁹. Η E3 λιγάση ουμπικουϊτίνης του HopAB2 είναι απαραίτητη για την αποικοδόμηση του FLS2 (Göhre et al., 2008)¹⁰. Η πρωτεΐνη HopAB2 προσδένεται άμεσα στην FLS2 και η ουμπικουϊτινιλίωση στοχεύει την επικράτεια κινάσης της FLS2. Η πρωτεΐνη BAK1 επίσης προσδένεται άμεσα στην HopAB2. Ο τρόπος πρόσδεσης της είναι διακριτός από τον τρόπο πρόσδεσης σε Pto (Shan et al., 2008) αν και η περιοχή πρόσδεσης σε BAK1 και Fen ίσως επικαλύπτονται. Η HopAB2 (όπως και η AnrPto) προσδένεται και διασπάει το σύμπλοκο FLS2/BAK1 (που σχηματίζεται μετά την αναγνώριση φλαγγελίνης) και παρεμποδίζει την επιμέρους αλληλεπίδραση BAK και FLS2. Επειδή η BAK1

⁸ Αντίθετα, η πρωτεΐνη Pto δεν είναι στόχος ουμπικουϊτινιλίωσης και πρωτεασωμικής αποικοδόμησης (Rosebrock et al., 2007).

⁹ Η πρωτεΐνη BAK1 δημιουργεί ένα επαγόμενο από φλαγγελίνη σύμπλοκο με την FLS2. Είναι απαραίτητη για την μεταβίβαση του σήματος της επαγωγής βασικής άμυνας-απόκρισης λόγω PAMP και μάλιστα απαιτείται σε πολλά από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ξεκινούν από την αναγνώριση της φλαγγελίνης (Heese et al., 2007).

¹⁰ Κατά αντιστοιχία, η AnrPto προσδένεται στους υποδοχείς-κινάσες των PAMP FLS2 και EFR (Xiang et al. 2008). Η πρόσδεση με αυτές ανταγωνίζεται την πρόσδεση με Pto, γεγονός που ίσως υποδηλώνει ότι η άμυνα μέσω PAMP και μέσω αντίδρασης υπερευαισθησίας αν και έχουν κοινό στόχο δρουν ανταγωνιστικά. Όταν η μια έχει επαρκή αποτελέσματα (σηματοδότηση PAMP) η άλλη δυνητικά δεν χρειάζεται.

συμμετέχει σε διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, η αλληλεπίδραση της με την HopAB2 έχει την ικανότητα να αναστείλει τόσο την σηματοδότηση μέσω PAMP όσο και παρακλάδια που σχετίζονται με την επαγωγή κυτταρικού θανάτου (Shan et al., 2008).

1.8.3 Καταστολή μονοπατιού των PAMP και κυτταρικού θανάτου. Η δράση του τελεστή HopAB2 αναφορικά με την καταστολή του μονοπατιού των PAMP και της συμμετοχής των MAP κινασών σε αυτό προσομοιάζει την δράση ενδογενών E3 λιγασών ουμπικουϊτίνης (Trujillo et al., 2008) αν και δεν είναι γνωστοί οι μοριακοί στόχοι των τελευταίων.

Η HopAB2 έχει γενικότερες αντι-αποπτωτικές ικανότητες (π.χ. καταστολή της επαγόμενης από Bax νέκρωσης, από κάποια άλλα R-γονίδια ή σε ετερόλογα συστήματα όπως του σακχαρομύκητα) που δεν αποδίδονται στους στόχους που αναφέραμε παραπάνω. Αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχουν και άλλοι στόχοι ουμπικουϊτινιλίωσης του HopAB2 και μάλιστα δρουν σε σημεία κλειδιά των μηχανισμών απόπτωσης.

Το αμινοτελικό τμήμα του HopAB2 έχει και ενεργότητα ανρ αλλά και ικανότητα αύξησης της παθογονικότητας στο τμήμα της εκλεκτικής πρόσδεσης με Pto (αα 121-200)¹¹. Με εξαίρεση ένα κρίσιμο κατάλοιπο (F173), οι μεταλλαγές που σχετίζονται με την αναγνώριση με Pto δεν επηρεάζουν την μολυσματικότητα. Άρα, οι δυο ενεργότητες δεν επικαλύπτονται (Xiao et al., 2007b).

Βέβαια, σε επικράτειες της πρωτεΐνης εκτός των επιφανειών πρόσδεσης στο Pto [επικράτεια 1: 176-181 αα, επικράτεια 2: 156-163 αα,¹²], η ικανότητα επαγωγής αντίδρασης υπερευαισθησίας και η μολυσματικότητα μπορεί να είναι αλληλοσυνδεδεμένες (Xiao et al., 2007b).

¹¹ Η λυμένη δομή της περιοχής αλληλεπίδρασης των HopAB2 και Pto αλλά και του συμπλόκου AnrPto/Pto αποκάλυψε ότι οι πρωτεΐνες HopAB2 και AnrPto μοιράζονται την μια από τις δυο επιφάνειες αλληλεπίδρασης. Αυτό συμβαίνει αν και α) η πρωτοταγής δομή των δυο πρωτεϊνών στην περιοχή αυτή είναι εντελώς διαφορετική και β) η τεταρτοταγής δομή της περιοχής αλληλεπίδρασης του HopAB2 είναι εντελώς διαφορετική από ότι του AnrPto. Στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης Pto-AnrPto, η δημιουργία του συμπλόκου οδηγεί στην απεμπλοκή ενός ανασταλτικού αποτελέσματος στην πρωτεΐνη Pto με αποτέλεσμα την ικανότητα του τελευταίου να ενεργοποιεί την Prf. Στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης HopAB2 με το Pto, η διαμόρφωση του HopAB2 παραμένει αμετάβλητη μετά την πρόσδεση με την Pto (Dong et al., 2009).

¹² Η αρίθμηση αντιστοιχεί στην HopAB2 από την *P. syringae* pv. *tomato* DC3000.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη αυτή φωσφορυλιώνεται στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου από μια συντηρημένη ενδογενή (ανεξάρτητη από Pto/Prf) κινάση στο κατάλοιπο Ser258 (Xiao et al., 2007a). Η φωσφορυλίωση αυτή είναι απαραίτητη για την ενίσχυση και των δυο ιδιοτήτων. Σημειακές μεταλλαγές που απαλείφουν το κατάλοιπο αυτό (S258A) οδηγούν σε απώλεια μολυσματικότητας αλλά και ικανότητας αναγνώρισης από το R γονίδιο. Στην περίπτωση που έχουμε μια συνεχώς ενεργοποιημένη πρωτεΐνη ακόμα και απουσία κινάσης (S258D) τα αποτελέσματα είναι αντίστροφα.

Ποικίλες αναφορές έχουν συσχετίσει την παρουσία HopAB2 με ενίσχυση της βακτηριακής μολυσματικότητας (Abramovitch et al., 2003; He et al., 2006; de Torres et al., 2006; Vinatzer et al., 2006). Επιπλέον, η πρωτεΐνη HopAB2_{DC3000} έχει την δυνατότητα να μπλοκάρει την HR που προκαλείται από την HopPsyA σε φύλλα καπνού και *Arabidopsis* (Jamir et al., 2004) στο εσωτερικό του φυτικού κυττάρου. Ομοίως με την HopF2_{DC3000}, μεταλλάγματα στελεχών με απαλοιφή HopAB2_{DC3000} έχουν αυξημένη ικανότητα να προκαλούν αντίδραση υπερισθησίας σε φυτά μη-ξενιστές (non-host HR).

Η πρωτεΐνη HopAB2 δεν έχει επίδραση στην αναστολή κυτταρικού θανάτου από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγονται από τους τελεστές AvrRpm1/ AvrRpt2/ AvrB/ AvrRps4 (de Torres et al., 2006)¹³. Αναστέλλει όμως τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από τον τελεστή AvrPto (Abramovitch et al., 2003). Ο ομόλογος τελεστής της *P. syringae* pv. *syringae* B728α έχει βρεθεί ότι αναστέλλει το μονοπάτι κυτταρικού θανάτου και από άλλους τελεστές εκκρινόμενους μέσω του καναλιού τύπου III [HopAA1, HopAE1, αλλά όχι από την HopM1 (Vinatzer et al., 2006)]. Η HopAB2 (Hann & Rathjen, 2007) έχει επίδραση στην απόκριση μη ξενιστή τύπου II (από *P. syringae* pv. *tabaci* και *P. syringae* pv. *tomato* DC3000)¹⁴. Η πρωτεΐνη HopAB2 (όπως και η AvrPto αλλά όχι η AvrRps4) έχει την δυνατότητα να αναστείλει την νέκρωση στις περιπτώσεις που η φλαγγελίνη (από την *P. syringae* pv. *tabaci*) δρα σαν επαγωγέας κυτταρικού θανάτου στα πλαίσια της αντίδρασης μη-ξενιστή (Hann & Rathjen, 2007). Η αναστολή συνοδεύεται από μείωση των επιπέδων ROS αλλά και της σηματοδότησης από Ca⁺⁺.

¹³ Ομοίως, σε πρωτοπλάστες *Arabidopsis* (He et al. 2006), ο κυτταρικός θάνατος που επάγεται από AvrRpm1/AvrRpt2/AvrB δεν είναι αντιστρεπτός. Ο αντίλογος βέβαια είναι ότι οι συνθήκες στους πρωτοπλάστες δεν προσομοιάζουν τις αντίστοιχες συνθήκες *in vivo* ή *in planta*.

¹⁴ Παρόμοιο φαινότυπο εμφανίζουν επίσης η HopU1 (Fu et al. 2007) αλλά και η πρωτεάση κυστεΐνης HopN1 (Lopez-Solanilla et al. 2004).

Σε αυτόν τον μεσολαβούμενο από MAP κινάσες κυτταρικό θάνατο σε *N. benthamiana* από φλαγγελίνη (από *P. tabaci*), παροδική έκφραση της HopAB2 αναστέλλει την έκφραση της SIPK και τον συνακόλουθο επαγόμενο από την υπερέκφραση της κυτταρικό θάνατο (Hann & Rathjen, 2007).

Φαίνεται ότι οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες έχουν προσαρμοστεί να αναγνωρίζουν κεντρικά και συντηρημένα κομμάτια του μονοπατιού σηματοδότησης. Κάποιες από αυτές (ανάμεσα τους και η HopAB2) έχουν την ικανότητα να καταστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από την ετερόλογη έκφραση στα φυτά ζωικών πρωτεϊνών (π.χ. Bax) σχετιζόμενων με τον κυτταρικό θάνατο (Abramovitch et al., 2003). Επιπλέον έχουν την ικανότητα να αναστείλουν τον κυτταρικό θάνατο σε ετερόλογα συστήματα όπως αυτά του σακχαρομύκητα (Abramovitch et al., 2003). Παρουσία HopAB2 επάγεται η παραγωγή αιθυλενίου και τα σχετικά με απόκριση σε αιθυλένιο γονίδια στα πλαίσια της εκδήλωσης αντίδρασης υπερευαισθησίας (Cohn & Martin, 2005). Στην περίπτωση αυτή η παραγωγή αιθυλενίου και η επαγωγή των αντιστοιχων γονιδίων εξαρτάται από το αμινοτελικό άκρο (αα 1-307) της πρωτεΐνης (Xiao et al., 2007a).

Η πρωτεΐνη HopAB2 έχει την ικανότητα να αναστέλλει και τύπου I αντιδράσεις μη ξενιστή (που δεν συνοδεύονται από κυτταρικό θάνατο). Από την άλλη πλευρά, αναστέλλει τους επαγόμενους από PAMPs μηχανισμούς βασικής άμυνας (de Torres et al., 2006) με παρεμπόδιση της σχετικής σηματοδότησης (He et al., 2006)¹⁵. Ανάμεσα στα άλλα, η έκφραση HopAB2_{DC3000} έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει την επαγόμενη από φλαγγελίνη από *P. syringae* pv *tomato* DC3000 ενεργοποίηση του NHO1. Το NHO1 επάγει μηχανισμούς αντίστασης με τελικό αποτέλεσμα τον περιορισμό του παθογόνου (Li et al., 2005) σε αλληλεπιδράσεις παθογόνου-ξενιστή τύπου I (non-host). Σε πειράματα σε πρωτοπλάστες *Arabidopsis* (He et al., 2006), το HopAB2 έχει την δυνατότητα να παρεμποδίσει την επαγόμενη από PAMPs άμεση απόκριση βασικής άμυνας και να μειώσει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται και χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες των αποκρίσεων αυτών¹⁶. Αντίθετα το στενά συγγενικό HopAB1 δεν καταστέλλει την επαγωγή των γονιδίων-μαρτύρων αυτών. Παράλληλα, η HopAB2¹⁷ καταστέλλει τις MAP κινάσες που επάγονται μετά από απόκριση σε φλαγγελίνη στα πλαίσια της βασικής άμυνας (He et al., 2006). Είναι

¹⁵ Αν και το ομόλογο HopAB1 (VirPphA) δεν φαίνεται να έχει ιδιότητες παρεμπόδισης του σηματοδοτικού μονοπατιού της επαγωγής βασικής άμυνας (He et al. 2006).

¹⁶ Η επίδραση αυτή δεν περιορίζεται μόνο στην απόκριση σε φλαγγελίνη, αλλά σε ποικιλία άλλων PAMPs συμπεριλαμβανόμενης και της πρωτεΐνης HrpZ.

¹⁷ όχι όμως και το HopAB1 (VirPphA), (He et al., 2006).

αξιοσημείωτο ότι η παρεμπόδιση αυτή γίνεται σε πολύ πρώιμο στάδιο της σηματοδότησης πριν την εμπλοκή MAPKKK. Επιπλέον δεν εμπλέκεται η ενεργότητα E3 λιγάσης της HopAB2 στην παρεμπόδιση αυτή. Η HopAB2 εκμεταλλεύεται το μονοπάτι του SGT1 και των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών του (RAR1/EDS1) για την καταστολή της βασικής άμυνας του φυτού (Hann & Rathjen, 2007). Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η καταστολή της εναπόθεσης καλλόζης και της παραγωγής δομών papilla (de Torres et al., 2006), η παρεμπόδιση της έκφρασης PR πρωτεϊνών (Jamir et al., 2004) η καταστολή του μονοπατιού του σαλικυλικού και της έκφρασης των επαγόμενων από σαλικυλικό γονιδίων. Στην καταστολή της βασικής άμυνας του φυτού απαραίτητη είναι η κεντρική περιοχή. Η περιοχή αυτή μάλιστα σχετίζεται με την αποσιώπηση της σηματοδότησης από MAP κινάσες στα πλαίσια της επαγωγής βασικής άμυνας από PAMPs όπως η φλαγγελίνη (Xiao et al., 2007a).

Σε περιπτώσεις συμβατών αλληλεπιδράσεων η παρουσία HopAB2 έχει σαν αποτέλεσμα αύξηση των επιπέδων ABA (de Torres-Zabala et al., 2007).

Μέλη της υπεροικογένειας της HopAB2 έχουν απομονωθεί από μια ποικιλία στελεχών *P. syringae* (Lin et al., 2006). Όσα μέλη της υποοικογένειας HopAB3 (αλλά και ένα μέλος της υποοικογένειας HopAB1, αυτό από *P. syringae* pv *syringae* B728a) εξετάστηκαν έχουν ικανότητα πρόσδεσης σε Pto. Σε συμβατές αλληλεπιδράσεις, τα προαναφερόμενα ομόλογα ενισχύουν την μολυσματικότητα ενώ είναι αναστολείς του κυτταρικού θανάτου. Εξαιρεση αποτελούν αυτά που παρουσιάζουν έλλειψη στην επικράτεια E3 λιγάσης. Ομοίως, όσα μέλη της υποοικογένειας HopAB1 έχουν εξεταστεί (Jackson et al., 2002) παρουσιάζουν φαινότυπο αναστολή του κυτταρικού θανάτου και επιβάρυνση του μολυσματικού χαρακτήρα των στελεχών που τα περιέχουν.

1.8.4 Στοχευμένη μεταλλαξιγένεση του HopAB2. Στην κωδική περιοχή της HopAB2 έχει πραγματοποιηθεί εκτεταμένη μεταλλαξιγένεση. Οι πιο κρίσιμες σημειακές μεταλλαγές που σχετίζονται με την αναγνώριση της πρωτεΐνης αλλά και την ενζυμική της ενεργότητα παρουσιάζονται παρακάτω:

- ☞ Η Σημειακή μεταλλαγή F173A αποτρέπει την αλληλεπίδραση HopAB2 με Pto κινάση (Xiao et al., 2007b). Η απάλειψη του σχετίζεται τόσο με τη δράση αναστολής της μολυσματικότητας (virulence function) όσο και αμολυσματικότητας (avirulence function) (Xiao et al., 2007b). Αντίθετα, τα υπόλοιπα κρίσιμα αμινοξέα της περιοχής αλληλεπίδρασης με Pto σχετίζονται μόνο με εκδήλωση HR.
- ☞ Μεταλλαγές όπως η I181A συγκρατούν την δομή της περιοχής αλληλεπίδρασης της HopAB2 με Pto. Το I181 το επιτυγχάνει αυτό μέσω πλευρικών αλληλεπιδράσεων με πολλαπλά διάσπαρτα στην πρωτοταγή δομή του HopAB2 αμινοξέα (Dong et al., 2009).

- ☞ Σημειακή μεταλλαγή στο κατάλοιπο S258A. Σχετίζεται με αύξηση της δράσης μολυσματικότητας μέσω φωσφοριλίωσης του καταλοίπου αυτού (Χiao et al., 2007a). Στο HorAB1_{1449B} το κατάλοιπο αυτό είναι μη συντηρημένο (H258). Το πλεονέκτημα του μεταλλάγματος αυτού είναι ότι ταυτόχρονα με την μείωση της μολυσματικότητας εκμηδενίζεται και η δράση αμολυσματικότητας (avirulence) (Χiao et al., 2007a). Έτσι, μπορεί να μελετηθεί η επίδραση της έλλειψης μολυσματικότητας χωρίς τον κίνδυνο εμφάνισης HR.
- ☞ Σημειακή μεταλλαγή στο κατάλοιπο T450D το οποίο σχετίζεται με φωσφοριλίωση από Pto. Η φωσφοριλίωση από Pto έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της E3 λιγάσης. Η μεταλλαγή T450D έχει σαν αποτέλεσμα η καταστολή της E3 λιγάσης να εμφανίζεται συνεχώς ακόμα και απουσία Pto (Ntoukakis et al., 2009)).
- ☞ Σημειακή μεταλλαγή K512R που σχετίζεται (Abramovitch et al., 2006) με αλληλεπίδραση με ουμπικουϊτίνη και με τον φαινότυπο αναστολής του κυτταρικού θανάτου.
- ☞ Σημειακή μεταλλαγή K529R που σχετίζεται με αλληλεπίδραση με ουμπικουϊτίνη και με τον φαινότυπο αναστολής του κυτταρικού θανάτου (Abramovitch et al., 2006).

Αναφορικά με τις δυο τελευταίες μεταλλαγές, σημειώνεται ότι (σε αντίθεση με την F479A) πρόκειται για ήπιες μεταλλαγές που οδηγούν απλά σε μείωση της ενεργότητας E3 λιγάσης και έχουν ενδιάμεσους φαινοτύπους. Χρειάζονται πολλαπλές τέτοιες μεταλλαγές για εξ' ολοκλήρου απαλοιφή της ενεργότητας E3 λιγάσης και εμφάνιση ισχυρών νεκρωτικών φαινοτύπων.

Μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα επικράτεια για μεταλλαξιγένεση είναι η κεντρική περιοχή. Η περιοχή αυτή ταυτίζεται με την περιοχή του Rsb φαινοτύπου. Σχετίζεται ανάμεσα στα άλλα με την αναστολή του μονοπατιού των MAP κινασών (δες και προηγούμενες ενότητες). Δυστυχώς μεταλλαγές στο γνωστό GINP μοτίβο της περιοχής Rsb (Kim et al., 2002) οδηγούν σε κατάρρευση δομής ενώ δεν είναι γνωστά άλλα κρίσιμα κατάλοιπα που σχετίζονται με τις ιδιότητες της περιοχής αυτής.

Μια βασική παρατήρηση που μπορεί να γίνει είναι ότι το σύνολο των μεταλλαγών που προαναφέρθηκαν αφορούν είτε στην δράση μολυσματικότητας του HorAB2 είτε στις ιδιότητες της πρωτεΐνης που σχετίζονται και με δράση μολυσματικότητας και με πυροδότηση HR (avirulence function). Καμιά δεν σχετίζεται αποκλειστικά και μόνο με avirulence function. Κατάλοιπα που σχετίζονται με αυτή τη δράση (avirulence) είναι π.χ. τα F169 ή R170 ή H179 (Dong et al., 2009). Τα αμινοξέα αυτά σχετίζονται εκλεκτικά με

αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα Pto (Xiao et al., 2007b) και δεν είναι συντηρημένα στη αλληλουχία της HorAB1.

Αναφορικά με την HorAB1_{1449B}, σημειακή μεταλλαγή στο κατάλοιπο Y525 απαλείφει εντελώς της ενεργότητα E3 λιγάσης αλλά δεν οδηγεί σε νεκρωτικούς φαινοτύπους γιατί η HorAB1_{1449B} δεν αλληλεπιδρά με Pto και Fen (Rosebrock et al., 2007). Σε περίπτωση βέβαια που υπάρχει αναγνώριση του κυτταρικού θανάτου με εναλλακτικό μηχανισμό, η E3 λιγάση μπορεί να τον ανταγωνιστεί.

Η μοριακή βάση της μη αλληλεπίδρασης Pto-HorAB1 δεν έχει αποσαφηνιστεί. Όμως η δομή του συμπλόκου HorAB2-Pto είναι λυμένη (Dong et al., 2009). In silico ανάλυση (Karandemiris et al., unpublished observations) με την χρήση του συμπλόκου HorAB2-Pto σαν μοντέλο αποκαλύπτει ότι σε γενικές γραμμές όλα τα κρίσιμα κατάλοιπα για την σταθεροποίηση της δομής και την αλληλεπίδραση του HorAB1 με το Pto είναι συντηρημένα. Η αλληλεπίδραση όμως πιθανόν να μην είναι σταθερή λόγω της αντικατάστασης μιας αργινίνης (R170) στην αλληλουχία της HorAB1 από μια λευκίνη. Η R170 αλληλεπιδράει με την αλιφατική περιοχή του καταλοίπου της Gln-166 της πρωτεΐνης Pto. Πιθανόν η μικρότερη και μη πολική πλευρική ομάδα της λευκίνης να μην διατηρεί την αλληλεπίδραση. Επιπρόσθετα η ιστιδίνη-189 της HorAB2 έχει αντικατασταθεί από Thr στην κωδική περιοχή της HorAB1. Η H179 κάνει υδροφοβικές επαφές με τις Val-242 και Val-250 του Pto (Dong et al., 2009). Επιπλέον ένα από τα κρίσιμα κατάλοιπα της HorAB2 (F169) δεν είναι συντηρημένο στην HorAB1. Το F169 σχετίζεται εκλεκτικά με την ικανότητα πυροδότησης HR αλλά όχι με την μολυσματικότητα (Xiao et al., 2007). Το μειονέκτημα της χρήσης HorAB1 είναι ότι δεν έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά η ενεργότητα E3 λιγάσης του HorAB1. Αντίθετα, η ενεργότητα E3 λιγάσης του HorAB2 έχει καλά τεκμηριωθεί βιοχημικά (Abramovitch et al., 2006; Janjusevic et al., 2006). Το μόνο που έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά για το HorAB1 είναι η ικανότητα του να αλληλεπιδρά με ουμπικουΐτινη και να είναι στόχος ουμπικουΐτινιλίωσης (Abramovitch et al., 2006). Βέβαια, in silico ανάλυση (Karandemiris et al., unpublished observations) αποδεικνύει ότι τα κρίσιμα αμινοξέα και του καρβοξυτελικού άκρου της HorAB1 είναι συντηρημένα. Επίσης, η γενική υποθετική δομή του καρβοξυτελικού άκρου της HorAB1 προσομοιάζει την δομή E3 λιγάσης.

1.8.5 Συμμετοχή του HorAB2 στην καταστολή του μηχανισμού της σίγησης.

Αναφορικά με την συμμετοχή του HorAB2 στην καταστολή του μηχανισμού της σίγησης, πρέπει να σημειωθεί ότι η καταστολή της συσσώρευσης επαγόμενων από PAMP miRNAs

εντοπίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο¹⁸ (Navarro et al., 2008). Η καταστολή αυτή είναι εκλεκτική για τα επαγόμενα από PAMP miRNAs και δεν αφορά το σύνολο των miRNAs συμπεριλαμβανομένων και των μη επαγόμενων από συνθήκες βιοτικής καταπόνησης miRNA/tasiRNA.

Έτσι, συντήγματα υποκινητή επαγόμενων από PAMP miRNAs με GUS ως γονίδιο-δείκτη σε συνθήκες υπερέκφρασης HopAB2 δείχνουν μείωση επιπέδων GUS. Η καταστολή αυτή δεν είναι συνάρτηση της ενεργότητας E3 λιγάσης. Μεταλλάγματα με απώλεια ενεργότητας λιγάσης εμφανίζουν ελαφρά μόνο αυξημένα επίπεδα GUS. Σε αντίθεση με το τον τελεστή HopT1-1, η καταστολή αυτή δεν σχετίζεται με παρεμπόδιση της ενεργότητας Slicer του φυτικού συμπλόκου «RISC», δηλαδή με παρεμπόδιση στο επίπεδο της δράσης των πρωτεϊνών Argonaute (Ago).

¹⁸ Βέβαια ούτε στην πρώτη περίπτωση μπορεί να αποκλειστεί εντελώς το ενδεχόμενο ότι ταυτόχρονα μέρος της καταστολής μπορεί να οφείλεται και σε καταστολή μεταγραφής, ούτε στην δεύτερη ότι η καταστολή είναι αποκλειστικά σε μεταγραφικό επίπεδο.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία:

- ☞ **35S::HopF1_{1449B}** (35S::Flag-HopF1-nos terminator σε δυαδικό φορέα pPZP222). Η κωδική περιοχή **HopF1_{1449B}** ενισχύθηκε με PCR από συνολικό DNA του *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1449B με τη χρήση των εκκινητών 5'-AATGGGTAATATCTGCAATTCG-3' και 5'-CTAATCGAGGATATTGACCGGTACTTTG-3' και υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα pXSN-Flag (Chen et al., 2009). Η κασέτα έκφρασης της pXSN-Flag / **HopF1_{1449B}**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του σιιιάλου πολυαδενυλίωσης nos αποκόπηκε με πέψη με EcoRI-HindIII και κλωνοποιήθηκε στην θέση EcoRI-HindIII του δυαδικού φορέα έκφρασης pPZP222 (Hajdukiewicz et al., 1994), ώστε να προκύψει η κατασκευή **35S::HopF1_{1449B}**.
- ☞ **35S::HopF2_{DC3000}**. (35S::Flag-HopF2-nos terminator σε δυαδικό φορέα pPZP222). Η κωδική περιοχή **HopF2_{DC3000}** ενισχύθηκε με PCR από συνολικό DNA του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 με τη χρήση των εκκινητών 5'-AACCATTATGGGTAATATTTGC-3' και 5'-TCAGACCCTTTCGACCGGC-3' και υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα pXSN-Flag (Chen et al., 2009). Η κασέτα έκφρασης της pXSN-Flag / **HopF2_{DC3000}**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του σιιιάλου πολυαδενυλίωσης nos αποκόπηκε με πέψη με EcoRI-HindIII και κλωνοποιήθηκε στην θέση EcoRI-HindIII του δυαδικού φορέα έκφρασης pPZP222 (Hajdukiewicz et al., 1994), ώστε να προκύψει η κατασκευή **35S::HopF2_{DC3000}**.
- ☞ **35S::HopF3_{1448A}**. (35S::Flag-HopF3-nos terminator σε δυαδικό φορέα pPZP222). Η κωδική περιοχή **HopF3_{1448A}** ενισχύθηκε με PCR από συνολικό DNA του *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1449B με τη χρήση των εκκινητών 5'-TTCCATGGGCATATGTGCATC-3' και 5'-TTCAATCTTTTCAGCTGGCACGC-3' και υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα pXSN-Flag (Chen et al., 2009). Η κασέτα έκφρασης της pXSN-Flag / **HopF3_{1448A}**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του σιιιάλου πολυαδενυλίωσης nos αποκόπηκε με πέψη με EcoRI-HindIII και κλωνοποιήθηκε στην θέση EcoRI-HindIII του δυαδικού φορέα έκφρασης pPZP222 (Hajdukiewicz et al., 1994), ώστε να προκύψει η κατασκευή **35S::HopF3_{1448A}**.
- ☞ **HopF2_{DC3000}-pProExHTc** (Υποκινητής Trc:: ATG-6xHis-HopF2-rrnB T1/T2 σιιιάλα τερματισμού σε φορέα pProExHTc). Η κωδική περιοχή του **HopF2_{DC3000}** αποκόπηκε με πέψη με SspI-ApoI από τον φορέα pXSN-Flag / **HopF2_{DC3000}** και κλωνοποιήθηκε στην θέση NcoI(fill-in)-EcoRI του φορέα έκφρασης **pProExHTc**.

- ☞ **HopF3_{1448A}-pProExHTc** (Υποκινητής Trc::ATG-6xHis-HopF3-rrnB T1/T2 σινιάλα τερματισμού σε φορέα pProExHTc). Η κωδική περιοχή του **HopF3** αποκόπηκε με πέψη με NcoI -ApoI από τον φορέα pXSN-Flag / **HopF3** και κλωνοποιήθηκε στην θέση NcoI- EcoRI του φορέα έκφρασης **pProExHTc**.
- ☞ **35S::HopF2_{DC3001}**. Η κωδική περιοχή του **HopF2** ενισχύθηκε με PCR από συνολικό DNA του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3001 (Landgraf et al., 2006) με τη χρήση των εκκινητών 5'-AGAGGATCCCATTATGGGTAATATTTG-3' και 5'-CATCAGTTTAGTCGACCACCGAT-3', και υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα pART7 (Gleave, 1992). Η κασέτα έκφρασης της pART7/**HopF2**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του OCS αποκόπηκε με πέψη με NotI και κλωνοποιήθηκε στην θέση NotI του δυαδικού φορέα έκφρασης pART27 (Gleave, 1992), ώστε να προκύψει η κατασκευή **35S::HopF2** (Sarris et al., 2011).
- ☞ **35S::HopF1_{Pphrace7}**. Η κωδική περιοχή **HopF1_{Pph}** ενισχύθηκε με PCR από συνολικό DNA του *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* race 7 με τη χρήση των εκκινητών 5'-CATCTCGAGAACGTTTAAATGGGTAATATC-3' και 5'-GTCCGGTTGTGGGATCCGGGA-3', και υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα pART7 (Gleave, 1992). Η κασέτα έκφρασης της pART7/**HopF1_{Pph}**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του OCS αποκόπηκε με πέψη με NotI και κλωνοποιήθηκε στην θέση NotI του δυαδικού φορέα έκφρασης pART27 (Gleave, 1992), ώστε να προκύψει η κατασκευή **35S::HopF1_{Pph} race7** (Sarris et al., 2011).
- ☞ **35S::HopF1_{1449B} (Δmotifs I-II)** (35S:: HopF1 **ΔI-II**-nos terminator σε δυαδικό φορέα pPZP222). Το πλασμίδιο pXSN-Flag / **HopF1_{1449B}** ευθυγραμμίστηκε με πέψη με NcoI-StuI και τα περιοριστικά άκρα μετατράπηκαν σε τυφλά (fill-in) με την χρήση του ενζύμου Klenow (NEB). Ακλούθησε αντίδραση συγκόλλησης των τυφλών άκρων και επανακυκλοποίηση του φορέα (self-ligation). Η κασέτα έκφρασης της pXSN-Flag / **HopF1_{1449B} (Δmotifs I-II)**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του σινιάλου πολυαδενυλίωσης nos αποκόπηκε με πέψη με EcoRI-HindIII και κλωνοποιήθηκε στην θέση EcoRI-HindIII του δυαδικού φορέα έκφρασης pPZP222 (Hajdukiewicz et al., 1994).
- ☞ **35S:: HopF1_{1449B} (Δmotifs I-III)** (35S:: flag-HopF1 **ΔI-III**-nos terminator σε δυαδικό φορέα pPZP22). Η κωδική περιοχή **HopF1_{1449B} ΔI-III** ενισχύθηκε με PCR από συνολικό DNA του *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1449B με τη χρήση των εκκινητών 5'-ATTTAAGCTAGCGCTCAGTGCTCTCCG-3' και 5'-CTAATCGAGGATATTGACCGGTA CTTTG-3' και υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα pXSN-Flag (Chen et al., 2009). Η κασέτα

- έκφρασης της ρ XSN-Flag / **HopF1_{1449B}ΔI-III**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του σινιάλου πολυαδενυλίωσης nos αποκόπηκε με πέψη με EcoRI-HindIII και κλωνοποιήθηκε στην θέση EcoRI-HindIII του δυαδικού φορέα έκφρασης ρ PZP 222 (Hajdukiewicz et al., 1994).
- ☞ **35S::HopF1_{1449B} (Δmotifs III-V) [35S:: flag-HopF1_{1449B} ΔIII-V-nos terminator** σε δυαδικό φορέα ρ CXD(-G)]. Η κωδική περιοχή **HopF1_{1449B} ΔIII-V** αποκόπηκε με πέψη με NcoI-StuI από τον φορέα ρ XSN-Flag / **HopF1_{1449B}** και κλωνοποιήθηκε στην θέση NcoI- XcmI [το οποίο είχε μετατραπεί σε τυφλό άκρο με S1 nuclease (NEB)] του φορέα έκφρασης ρ SB-GFP [PCXD(-G)]για τον οποίο παρέχονται πληροφορίες παρακάτω στο κείμενο.
- ☞ **35S::HopF2_{DC3000} (Δmotifs I-III) [35S::HopF2(Δmotifs I-III)-nos** σε δυαδικό φορέα ρ PZP222]. Το πλασμίδιο ρ XSN-Flag / **HopF2_{DC3000}** ευθυγραμμίστηκε με πέψη με StyI-NheI και τα περιοριστικά άκρα μετατράπηκαν σε τυφλά (fill-in) με την χρήση του ενζύμου Klenow (NEB). Ακλούθησε αντίδραση συγκόλλησης των τυφλών άκρων και επανακυκλοποίηση του φορέα (self-ligation). Η κασέτα έκφρασης της ρ XSN-Flag / **HopF2_{DC3000}(Δmotifs I-III)**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του σινιάλου πολυαδενυλίωσης nos αποκόπηκε με πέψη με EcoRI-HindIII και κλωνοποιήθηκε στην θέση EcoRI-HindIII του δυαδικού φορέα έκφρασης ρ PZP 222 (Hajdukiewicz et al., 1994).
- ☞ **35S::HopF2_{DC3000}(Δmotifs I-II) [35S::HopF2(Δmotifs I-II)-nos terminator** σε δυαδικό φορέα ρ PZP222]. Το πλασμίδιο ρ XSN-Flag / **HopF2_{DC3000}** ευθυγραμμίστηκε με πέψη με NcoI και τα περιοριστικά άκρα μετατράπηκαν σε τυφλά (fill-in) με την χρήση του ενζύμου Klenow (NEB). Ακλούθησε αντίδραση συγκόλλησης των τυφλών άκρων και επανακυκλοποίηση του φορέα (self-ligation). Η κασέτα έκφρασης της ρ XSN-Flag / **HopF2_{DC3000}(Δmotifs I-II)**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του σινιάλου πολυαδενυλίωσης nos αποκόπηκε με πέψη με EcoRI-HindIII και κλωνοποιήθηκε στην θέση EcoRI-HindIII του δυαδικού φορέα έκφρασης ρ PZP 222 (Hajdukiewicz et al., 1994).
- ☞ **35S::HopF2_{DC3000} (Δmotifs III-V) [35S:: HopF2_{DC3000} ΔIII-V-nos terminator** σε δυαδικό φορέα ρ CXD(-G)]. Η κωδική περιοχή **HopF2_{DC3000} ΔIII-V** αποκόπηκε με πέψη με PvuII-NheI από τον φορέα ρ XSN-Flag / **HopF2_{DC3000}** και κλωνοποιήθηκε στην θέση PvuII-XbaI του φορέα έκφρασης ρ SB-GFP [PCXD(-G)]για τον οποίο παρέχονται πληροφορίες παρακάτω στο κείμενο.

- ☞ **A) 35S::Flag-HopF2_{DC3000}(G6E).** (35S::Flag-HopF2 (G6E)-nos terminator σε δυαδικό φορέα pPZP222).
- B) 35S:: Flag-HopF2_{DC3000}(R71A).** (35S::Flag-HopF2(R71A)-nos terminator σε δυαδικό φορέα pPZP222).
- Γ) 35S:: Flag-HopF2_{DC3000}(V135G).** (35S::Flag-HopF2(V135G)-nos terminator σε δυαδικό φορέα pPZP222).
- Δ) 35S::Flag-HopF2_{DC3000}(H150A).** (35S::Flag-HopF2(H150A)-nos terminator σε δυαδικό φορέα pPZP222).
- Ε) 35S:: Flag-HopF2_{DC3000}(D164A).** (35S::Flag-HopF2(D164A)-nos terminator σε δυαδικό φορέα pPZP222).
- ΣΤ) 35S:: Flag-HopF2_{DC3000}(S177A).** (35S::Flag-HopF2(S177A)-nos terminator σε δυαδικό φορέα pPZP222).
- Ζ) 35S: Flag-HopF2_{DC3000}(L193G).** (35S::Flag-HopF2(L193 G)-nos terminator σε δυαδικό φορέα pPZP222).

Οι σημειακές μεταλλαγές **G6E, R71A, V135G, H150A, D164A, S177A, L193G** κατασκευάστηκαν με τόπο-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (Braman et al., 1996) με υπόστρωμα ρXSN-Flag/**HopF2_{DC3000}** και εκκινητές α) 5'-TAATATTTGCGAAACCTCG GGCTCAC-3' β) 5'-CGAGCTTTTCGCAACGACGGATAG-3', γ) 5'-ACTGAACGGAATG ACTGG-3', δ) 5'-TATCACTCAT GGCATCATAA GCTC-3', ε) 5'-TCGAGAAAAGCTCCAGT -3', στ) 5'-GTCAGCTACAGATGCAGCGTCGGCATAGAC-3', ζ) 5'-TCTGATTGTCAC AGGTCCCAAAGGACAG-3' αντίστοιχα. Οι κασέτες έκφρασης των ρXSN-Flag/**HopF2_{DC3000}(G6E)**, ρXSN-Flag/**HopF2_{DC3000}(R71A)**, ρXSN-Flag/**HopF2_{DC3000}(V135G)**, ρXSN-Flag/**HopF2_{DC3000}(H150A)**, ρXSN-Flag/**HopF2_{DC3000}(D164A)**, ρXSN-Flag/**HopF2_{DC3000}(S177A)**, ρXSN-Flag/**HopF2_{DC3000}(L193G)** συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του σινιάλου πολυαδενυλίωσης nos υποκλωνοποιήθηκαν στον δυαδικό φορέα έκφρασης pPZP222 (Hajdukiewicz et al., 1994).

- ☞ **A) 35S:: Flag-HopF2_{DC3000}(Δmotifs I-III+G169A).** (35S::Flag-HopF2_{DC3000}(Δmotifs I-III+G169A)-nos terminator σε δυαδικό φορέα pPZP222).
- B) 35S:: Flag-HopF2_{DC3000}(Δmotifs I-III+G170A).** (35S::Flag-HopF2_{DC3000}(Δmotifs I-III+G170A)-nos terminator σε δυαδικό φορέα pPZP222).
- Γ) 35S:: Flag-HopF2_{DC3000}(Δmotifs I-III+V199G).** (35S::Flag-HopF2_{DC3000}(Δmotifs I-III+V199G)-nos terminator σε δυαδικό φορέα pPZP222).

Οι σημειακές μεταλλαγές **G169A, G170A, V199G** κατασκευάστηκαν με τόπο-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (Braman et al., 1996) με υπόστρωμα ρXSN-

Flag/ **HopF2_{DC3000}(Δmotifs I-III)** και εκκινητές α) 5'-CTCGAAAGGGCTGGCAAGG-3', β) 5'-GAAAGGGGTGCCAAGGTCT-3' γ) 5'-CCTTCGACCGGACCTTTCTGTCTCTT-3' αντίστοιχα. Οι κασέτες έκφρασης των ρXSN-Flag/ **HopF2_{DC3000}(Δmotifs I-III+G169A)**, ρXSN-Flag/ **HopF2_{DC3000}(Δmotifs I-III+G170A)**, ρXSN-Flag/ **HopF2_{DC3000}(Δmotifs I-III+V199G)** συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του σιιιάλου πολυαδενυλίωσης nos υποκλωνοποιήθηκαν στον δυαδικό φορέα έκφρασης ρPZP222 (Hajdukiewicz et al., 1994).

☞ **35S::Flag-HopF1_{1449B}(T74A)** (35S::Flag-HopF1_{1449B}(T74A)-nos terminator σε δυαδικό φορέα ρPZP222). Η σημειακή μεταλλαγή **T74A** κατασκευάστηκε με τόποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (Braman et al., 1996) με υπόστρωμα ρXSN-Flag/ **HopF1_{1449B}** και εκκινητή 5'-TATCGCACGGCCAGAGAG-3'. Η κασέτα έκφρασης της ρXSN-Flag/ **HopF1_{1449B}(T74A)**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του σιιιάλου πολυαδενυλίωσης nos υποκλωνοποιήθηκε στον δυαδικό φορέα έκφρασης ρPZP222 (Hajdukiewicz et al., 1994).

☞ **35S::HopX1_{DC3001}**. Η κωδική περιοχή HopX1 (1243 bp) ενισχύθηκε με PCR από συνολικό DNA του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3001 (Landgraf et al., 2006), με τη χρήση των εκκινητών 5'-GACATAGCTAGCTCGAGGAAAGTATTT-3' και 5'-GGCGCTTATTCTAGAC GTACGTACT-3', και υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα ρART7 (Gleave, 1992). Η κασέτα έκφρασης της ρART7/HopX1, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του OCS αποκόπηκε με πέψη με NotI και κλωνοποιήθηκε στην θέση NotI του δυαδικού φορέα έκφρασης ρART27 (Gleave, 1992), ώστε να προκύψει η κατασκευή **35S::HopX1** (Sarris et al., 2011).

☞ **35S::HopAB1_{1449B}**. Η κασέτα 35S-HopAB1 κατασκευάστηκε ως εξής: Η κωδική περιοχή της πρωτεΐνης-τελεστή HopAB1 από *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B ενισχύθηκε με PCR με το ζεύγος εκκινητών 5'-GGAGTGGAGGATCCATATGCCGGTA-3 και 5'-TTCCGCCTGCAGACCGATGCTCTC-3. Το PCR προϊόν υπέστη πέψη και συνδέθηκε στις θέσεις BamHI-PstI του φορέα ρUC-A7-Tx. Ολόκληρη η κασέτα έκφρασης ρUC-A7-Tx/HopAB1 συμπεριλαμβανομένου του υποκινητή CaMV 35S και τον τερματιστή OCS, αποκόπηκε από τα πλασμίδια με πέψη EcoRI-HindIII και υποκλωνοποιήθηκε στις συνώνυμες θέσεις του δυαδικού φορέα ρBIN-Hyg-Tx (Gatz et al., 1992; Sarris et al., 2011).

☞ **35S::HopAB1ΔN-term**. Η κωδική περιοχή (376-539 αα) του HopAB1 ενισχύθηκε με PCR από ολικό DNA του *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1302A με εκκινητές 5'-TTCCGCCTGCAGACCGATGCTCTC-3 και 5'-GCTGTAGGATCCGCGGTGATGCC-3'. Το

- PCR προϊόν υπέστη πέψη και συνδέθηκε στις θέσεις BamHI-PstI του φορέα pUC-A7-Tx. Η κασέτα έκφρασης pUC-A7-Tx/ HopAB1ΔN-term συμπεριλαμβανομένου του υποκινητή CaMV 35S και τον τερματιστή OCS, αποκόπηκε με πέψη EcoRI-HindIII και υποκλωνοποιήθηκε στις συνώνυμες θέσεις του δυαδικού φορέα pBIN-Hyg-Tx (Gatz et al., 1992; Sarris et al., 2011).
- ☞ 35S::avrPtoB σε φορέα pTFS40 (Hann & Rathjen, 2007).
 - ☞ **35S::HopAB2**. Η κωδική περιοχή του avrPtoB υποκλωνοποιήθηκε κάτω από τον έλεγχο του προαγωγέα 35S CaMV στον δυαδικό φορέα pBTEX (Kim et al., 2002).
 - ☞ **35S::HopAB2m** (35S:: HopAB2 (K529A)-nos terminator σε δυαδικό φορέα pBTEX)
Η σημειακή μεταλλαγή **K529A** κατασκευάστηκε με τόπο-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (Braman et al., 1996) με εκκινητή 5'-TTCCTCGCAGGC**GCA**CCTGAGC ATCC-3' και υποκλωνοποιήθηκε στον δυαδικό φορέα έκφρασης pBTEX.
 - ☞ **35S::HopAB2** (ΔN-term). Η ακρωτηριασμένη στο αμινοτελικό άκρο AvrPtoB κατασκευάστηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 5'-GTAATGCAGCGCCTC CCTATC-3' και 5'-TCAGGGGACTATTCTAA AAGC-3' και κλωνοποιήθηκε σε pCR2.1 (Invitrogen). Το κλωνοποιημένο ένθεμα αποκόπηκε από pCR2.1 χρησιμοποιώντας XbaI και SpeI ένζυμα και κλωνοποιήθηκε εντός της θέσης XbaI του δυαδικού φορέα pBTEX (Abramovitch et al., 2003).
 - ☞ **35S::HopAB2 (F479A)**. Η σημειακή μεταλλαγή **F479A** κατασκευάστηκε με τόπο-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο QuickChange (Agilent Technologies Genomics) με υπόστρωμα pCR2.1::AvrPtoB και εκκινητές 5'-GTGACGCACTGTCTTgcTGGCGGA GAATTGTCG-3' και 5'-CGACAATTCTCCGCCAgcAAGACAGTGCATCAC-3'. Το κλωνοποιημένο ένθεμα αποκόπηκε από pCR2.1 χρησιμοποιώντας XbaI και SpeI ένζυμα και κλωνοποιήθηκε εντός της θέσης XbaI του δυαδικού φορέα pBTEX (Janjusevic et al., 2006).
 - ☞ **35S::HopAB2 (ΔRsb+Cterm)**. Η ακρωτηριασμένη στο καρβοξυτελικό άκρο AvrPtoB κατασκευάστηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 5'-ATGGCGGGTATCAATAGAGCG-3' και 5'-TCACACCCGCAATCGTGTGCAC-3' και 5'-TCA TACATGTCTTTCAAGGGCCG-3' και κλωνοποιήθηκε σε pCR2.1 (Invitrogen). Το κλωνοποιημένο ένθεμα αποκόπηκε από pCR2.1 χρησιμοποιώντας XbaI και SpeI ένζυμα και κλωνοποιήθηκε εντός της θέσης XbaI του δυαδικού φορέα pBTEX (Abramovitch et al., 2003).
 - ☞ **A) 35S::HopAB2 (K464R-gain of function), B) 35S::HopAB2 (K546R-gain of function), Γ) (K512R-loss of function), Δ) 35S::HopAB2 (K529R-loss of function)** . Οι σημειακές

- μεταλλαγές **K464R**, **K546R**, **K512R**, **K529R** κατασκευάστηκαν με τόπο-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο QuickChange (Agilent Technologies Genomics) με υπόστρωμα pCR2.1::AvrPtoB. Τα κλωνοποιημένα ενθέματα αποκόπηκαν από pCR2.1 χρησιμοποιώντας XbaI και SpeI ένζυμα και κλωνοποιήθηκαν εντός της θέσης XbaI του δυαδικού φορέα pBTEX (Abramovitch et al., 2006).
- ☞ **35S::HopAB2 από *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326.** Το ομόλογο του avrPtoB από *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326 ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 5'-ATGGTAGGGATCAGTGGTAGAGCAG-3' και 5'-TCAAAATGCCTATGCATCAAGCC-3' και το προϊόν PCR κλωνοποιήθηκε σε pCR2.1. Θραύσμα KpnI/XbaI της κατασκευής σε pCR2.1 υποκλωνοποιήθηκε στις θέσεις KpnI/XbaI σε δυαδικό φορέα pBTEX (Lin et al., 2006).
- ☞ **35S::HopAB2 από *P. syringae* pv. *syringae* B728a.** Το ομόλογο του avrPtoB από *P. syringae* pv. *syringae* B728a ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 5'-ATGTCGGGTATCAACGGAGCAG-3' και 5'-TCAGTCAGGAACGACTCTAAAG-3' και το προϊόν PCR κλωνοποιήθηκε σε pCR2.1. Θραύσμα KpnI/XbaI της κατασκευής σε pCR2.1 υποκλωνοποιήθηκε στις θέσεις KpnI/XbaI σε δυαδικό φορέα pBTEX (Lin et al., 2006).
- ☞ **35S::AvrRps4 από *P. syringae* pv. *pisi* 151.** Η κωδική περιοχή **AvrRps4** ενισχύθηκε με PCR από συνολικό DNA του *P. syringae* pv. *pisi* 151 με τη χρήση των εκκινητών 5'-GCATTGAATTCTTTGACAAAGAGGCT-3' και 5'-GCCCTAC CCAAGCTTATTTAAAATG-3', και υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα pART7 (Gleave, 1992). Η κασέτα έκφρασης της pART7/**AvrRps4**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του OCS αποκόπηκε με πέψη με NotI και κλωνοποιήθηκε στην θέση NotI του δυαδικού φορέα έκφρασης pART27 (Gleave, 1992), ώστε να προκύψει η κατασκευή **35S::AvrRps4** (Σαρρής, Ph.D thesis).
- ☞ **35S::AvrRps4 από *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A.** Η κωδική περιοχή **AvrRps4** ενισχύθηκε με PCR από συνολικό DNA του *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A με τη χρήση των εκκινητών 5'-TCGAATTTCAACCAGTTCAGT-3' και 5'-TTATTGGTTGATTCTGCGGTC -3', και υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα PXSFlag (Chen et al., 2009). Η κασέτα έκφρασης της pXSFlag/**AvrRps4**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του σινιάλου πολυαδενυλίωσης nos αποκόπηκε με πέψη με EcoRI-HindIII και κλωνοποιήθηκε στην θέση EcoRI-HindIII του δυαδικού φορέα έκφρασης pPZP222 (Hajdukiewicz et al., 1994), ώστε να προκύψει η κατασκευή **35S::AvrRps4**.

- ☞ **35S::HopK1_{DC3001}**. Η κωδική περιοχή **HopK1_{DC3001}** ενισχύθηκε με PCR από συνολικό DNA του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3001 (Landgraf et al., 2006), με τη χρήση των εκκινητών 5'-AGAGGGATCCAATGAATCGCAT-3' και 5'-CTTTGACGCTCTAGAAAAATTCGG-3', και υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα pART7 (Gleave, 1992). Η κασέτα έκφρασης της pART7/**HopK1_{DC3001}**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του OCS αποκόπηκε με πέψη με NotI και κλωνοποιήθηκε στην θέση NotI του δυαδικού φορέα έκφρασης pART27 (Gleave, 1992), ώστε να προκύψει η κατασκευή **35S:: HopK1_{DC3001}** (Σαρρή, Ph.D thesis).
- ☞ **35S::AvrRps4** από *P. syringae* pv. *pisi* Race 3. Η κωδική περιοχή **AvrRps4** ενισχύθηκε με PCR από συνολικό DNA του *P. syringae* pv. *pisi* Race 3 με τη χρήση των εκκινητών 5'-GCATTGAATTCTTTGACAAAGAGGCT-3' και 5'-GCCCTACCCAAGCTTATTTAAATG-3', και υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα pART7 (Gleave, 1992). Η κασέτα έκφρασης της pART7/**AvrRps4** συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του OCS αποκόπηκε με πέψη με NotI και κλωνοποιήθηκε στην θέση NotI του δυαδικού φορέα έκφρασης pART27 (Gleave, 1992), ώστε να προκύψει η κατασκευή **35S::AvrRps4** (Σαρρή, Ph.D thesis).
- ☞ **AvrRps4/pTA7002**. Το γονίδιο με ένα καρβοξυ-τελικό HA-tag κλωνοποιήθηκε σε pTA7002 για επαγόμενη έκφραση AvrRps4 in planta (Mackey et al., 2003; Mackey et al., 2002).
- ☞ **35S::HopAO1**. Η κωδική περιοχή **HopAO1** ενισχύθηκε με PCR από συνολικό DNA του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3001 (Landgraf et al., 2006), με τη χρήση των εκκινητών 5'-CGTCAGCGAATTCCTCAACCGAGA-3' και 5'-GGTGAAAGCTTGCGCGAGAAACACT-3' και υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα pART7 (Gleave, 1992). Η κασέτα έκφρασης της pART7/**HopAO1**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του OCS αποκόπηκε με πέψη με NotI και κλωνοποιήθηκε στην θέση NotI του δυαδικού φορέα έκφρασης pART27 (Gleave, 1992), ώστε να προκύψει η κατασκευή **35S:: HopAO1**.
- ☞ **35S::HopC1**. Η κωδική περιοχή **HopC1** ενισχύθηκε με PCR από συνολικό DNA του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3001 (Landgraf et al., 2006), με τη χρήση των εκκινητών 5'-CTGATTTCTCGAGCATGATACGCGGCAT-3' και 5'-AAGTGAGCGGATCCTGGAGCGAGT-3' και υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα pART7 (Gleave, 1992). Η κασέτα έκφρασης της pART7/**HopC1**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του OCS αποκόπηκε με πέψη με NotI και κλωνοποιήθηκε στην θέση NotI του

- δυναμικού φορέα έκφρασης pART27 (Gleave, 1992), ώστε να προκύψει η κατασκευή **35S::HopC1**.
- ☞ **35S::AvrPto**. Η κωδική περιοχή **AvrPto** ενισχύθηκε με PCR από συνολικό DNA του *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3001 (Landgraf et al., 2006) με τη χρήση των εκκινητών 5'-CTAAAGAGGGAATTCGAATGGGAAATAT -3' και 5'-AGGC CGTGTGCGTCTAGATTATG-3', και υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα pART7 (Gleave, 1992). Η κασέτα έκφρασης της pART7/**AvrPto**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του OCS αποκόπηκε με πέψη με NotI και κλωνοποιήθηκε στην θέση NotI του δυναμικού φορέα έκφρασης pART27 (Gleave, 1992), ώστε να προκύψει η κατασκευή **35S::AvrPto** (Σαρρής, Ph.D thesis).
- ☞ **35S::PthG**. Η κωδική περιοχή **PthG** (Ezra et al., 2000) ενισχύθηκε με PCR από συνολικό DNA του *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*, με τη χρήση των εκκινητών 5'-ATATCATGTCTCGAGAATAAGCT-3' και 5'-TGCATAAGCATTCTAGAACAATCG-3', και υποκλωνοποιήθηκε σε φορέα pART7 (Gleave, 1992). Η κασέτα έκφρασης της pART7/**PthG**, συμπεριλαμβανομένου του προαγωγέα CaMV 35S και του OCS αποκόπηκε με πέψη με NotI και κλωνοποιήθηκε στην θέση NotI του δυναμικού φορέα έκφρασης pART27 (Gleave, 1992), ώστε να προκύψει η κατασκευή **35S::PthG** (Σαρρής, Ph.D thesis).
- ☞ **35S::NopT**. Ένα θραύσμα DNA που περιέχει NopT (από στέλεχος *Rhizobium* sp. strain NGR234) κλωνοποιήθηκε σε pRT104, το οποίο περιέχει υποκινητή 35SCaMV και ένα σήμα πολυαδενυλίωσης. Η κασέτα έκφρασης αποκόπηκε με HindIII και υποκλωνοποιήθηκε στο δυναμικό φορέα pCAMBIA2301 (www.cambia.org), αποδίδοντας pCAMBIA-NopT (Dai et al., 2008).
- ☞ **35S::p19**. Το θραύσμα που αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 3902 ± 4545 της γονιδιωματικής αλληλουχίας του AMCV (αλληλουχία p19 του AMCV) κλωνοποιήθηκε στις θέσεις SacI-BamHI του δυναμικού φορέα έκφρασης pBI121.1, αντικαθιστώντας την αλληλουχία της β-γλυκουρονιδάσης (Silhavy et al., 2002).
- ☞ **35S::p38**. Η πρωτεΐνη p38 του TCV κλωνοποιήθηκε σε μια κασέτα έκφρασης T-DNA κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή 35SCaMV σε ένα δυναμικό φορέα (pBIN61) που είναι παράγωγο του pBIN19 (Thomas et al., 2003).
- ☞ **35S::p69**. Η κωδικοποιητική αλληλουχία του P69 TYMV-Blue Lake (BL) κλωνοποιήθηκε σε pCambia1301 αντικαθιστώντας την αλληλουχία GUS μεταξύ του υποκινητή 35S και τερματιστή (terminator) nopaline synthase για να δώσει **35S::P69** (Chen et al., 2004a).

- ☞ **35S::Hc-Pro.** Η κωδική αλληλουχία P1/Hc-Pro του TEV ελήφθη με PCR από το πλασμίδιο pTEV7DA και υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα pBIN19 (Delgado, 2004).
- ☞ **35S::sigma3.** Το τμήμα που κωδικοποιεί την sigma3 ενισχύθηκε με PCR με εκκινητές 5'-ATGGAGTGTGCTTGCC-3' και 5'-TTAGCCAAGAATCATCGG-3' από το πλασμίδιο pBC12BI (Giantini & Shatkin, 1989) και κλωνοποιήθηκε στην θέση SmaI του pBIN61 για να προκύψει η κατασκευή **35S::sigma3** (Lichner et al., 2003).
- ☞ **35S::RDR6.** Το cDNA πλήρους μήκους του RDR6 (3.6kb) ενισχύθηκε από το ATG έως το κωδικόνιο λήξης με PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 5'-CCGGAATTCGAGAAATGGGGTCAGAGGGAAATA-3' και 5'-CCGCGGCCGCAACATAACCTT TTAGAGACGTGAGC-3'). Το προκύπτον προϊόν ενίσχυσης κλωνοποιήθηκε εντός pENTR1A και στην συνέχεια εισήχθη στο pEG201 φορέα (Cugaba & Chen, 2008).
- ☞ **PCAMBIA-SIPK:GFP.** Το ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο του SIPK: ενισχύθηκε με PCR με εκκινητές XbaI-SIPK και SIPK-BamHI. Το προϊόν PCR κλωνοποιήθηκε σε pGEM-T-Easy (Promega), αποκόπηκε με XbaI και BamHI, και συνδέθηκε σε pCAMBIA2300-smGFP (Menke et al., 2005).
- ☞ **35S::mGFP4.** Η mGFP4 είναι μια τροποποιημένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) από την μέδουσα *Aequorea victoria*. Έχει προκύψει με εναλλακτική χρήση κωδικονίων με σκοπό να καταστραφεί ένα κρυπτικό ιντρόνιο. Η mGFP4 κλωνοποιήθηκε μεταξύ της BamHI και SacI θέσης στο pBI121 αντικαθιστώντας την αλληλουχία GUS (Haseloff et al., 1997).
- ☞ **35S::mGFP5.** Η mGFP5 (Siemering et al., 1996) κλωνοποιήθηκε μεταξύ της BamHI και SacI θέσης στο **35S::mGFP4** αντικαθιστώντας την αλληλουχία mGFP4 (Ruiz et al., 1998).
- ☞ **pCAMBIA-GFP.** Η κωδική περιοχή της smGFP έχει κλωνοποιηθεί σε δυαδικό φορέα pCAMBIA2300 (Kang & Klessig, 2005).
- ☞ **pSB-GFP [PCXD(-G)].** Το πλασμίδιο PCXDG (Chen et al., 2009) ευθυγραμμίστηκε με πέψη με BamHI. Ακλούθησε αντίδραση συγκόλλησης των άκρων και επανακυκλοποίηση του φορέα (self-ligation).
- ☞ **pHIR11.** Θραύσμα 30 kb που περιέχει το hrp Cluster από *Pseudomonas syringae pv.syringae 61* σε φορέα pLAFR3 (Huang et al., 1988).
- ☞ **pLN18.** Παράγωγο του pHIR11 στο οποίο έχουν επαλειφθεί τα shcA και hopPsyA, αλλά κωδικοποιεί ένα λειτουργικό TTSS (Jamir et al., 2004).
- ☞ **pCPP2071.** Παράγωγο pHIR11 με ένθεση TnpHoA στο hopPsyA (Huang et al., 1991).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Φορείς	Περιγραφή	Πηγή ή αναφορά
ρGEMT-easy	Φορέας κλωνοποίησης με την βοήθεια της τεχνολογίας TA-κλωνοποίηση (ap ^r)	Promega
ρGXT	Τροποποιημένος ρGEM T-easy με παρεμβολή ccdB γονιδίου ανάμεσα στα T-overhangs (ap ^r)	ABRC (Chen et al., 2009)
ρXSN-Flag	Ενδιάμεσος φορέας κλωνοποίησης που περιέχει την κασέτα 35S::Flag-polylinker- nos terminator (ap ^r)	ABRC (Chen et al., 2009)
ρPZP222	Διαδικός φορέας που περιέχει την κασέτα LB-aacC1 ¹⁹ -polylinker-RB (Sp ^r)	Δώρο από τον Prof. Sablowski
ρProExHTc	Φορέας για υπερέκφραση πρωτεϊνών σε E. coli (ap ^r)	Invitrogen
ρCXDG	Διαδικός φορέας που περιέχει την κασέτα LB-Hyg ²⁰ -35S:: GFP- polylinker-terminator-RB (Km ^r)	ABRC (Chen et al., 2009)
ρCXD(-G)	Διαδικός φορέας που περιέχει την κασέτα LB-Hyg-35S:: - polylinker-terminator-RB (Km ^r)	Καραντεμίρης Κώστας

Πίνακας 1. Πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

2.2 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία:

Εκκινητής	Αλληλουχία
HopF1 FW	5'-AATGGGTAATATCTGCAATTCG-3'
HopF1 REV	5'-CTAATCGAGGATATTGACCGGTACTIONTTG-3'
HopF1 FW NheI fusion	5'-ATTTAAGCTAGCGCTCAGTGCTCTCCG-3'
HopF2 FW	5'-AACCATTATGGGTAATATTTGC-3'
HopF2 REV	5'-TCAGACCCTTTCGACCGGC-3'
HopF2_Int_FW	5'-CCAACCACACGAAGCAAG-3'
HopF3 FW	5'-TTCCATGGGCATATGTGCATC-3'
HopF3 REV	5'-TTCAATCTTTTCAGCTGGCACGC-3'
HopAB1FW	5'-GGAGTGGAGGATCCATATGCCGGGTA-3'
HopAB1REV	5'-TTCGCCCTGCAGACCGATGCTCTC-3'
HopAB1-CFW	5'-TTCGCCCTGCAGACCGATGCTCTC-3
HopAB1-CREV	5'-GCTGTAGGATCCGCGGTGATGCC-3'
HopAB2 FW	5'-GCATATGGCGGGTATCAATAG-3'
HopAB2 REV	5'-GGGACTATTCTAAAAGCATACTTG-3'
AvrPphE For	5'-GGGCCCGCACTCGAGGAACATATGAGAAT-3'
AvrPphE REV	5'-GGCGCTTATTCTAGACGTACGTACT-3'
HopK1_HopAQ1_FW	5'-TCGMATTTCAACCAGCTCAG-3'
HopK1_REV	5'-TCAGCAGTAGAGCGTGTTCG-3'
HopK_Int1_REV	5'-AGTTTGAGGCCAACACGTT-3'

¹⁹ Ανθεκτικότητα στην γκενταμικίνη στα φυτά.

²⁰ Ανθεκτικότητα στην υγρομικίνη στα φυτά.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

HopK1_Int2_REV	5'-AGCTCGTCGTCATAGCTGCC-3'
HopAQ1_REV	5'-CTGACTGCAAAAGACCCTG-3'
AvrRps4_ph_pisi_FW	5'-TCGAATTTCAACCAGTTCAGT-3'
AvrRps4_ph_pisi_HopAQ1_FW	5'-TCGAATTTCAACCAGYTCAGT-3'
AvrRps4_ph_pisi_REV	5'-TTATTGGTTGATTCTGCGGTC-3'
HopF1_T74A sense	5'-TATCGCACGGCCCAGAGAG-3'
HopF1_A150D/G151H/M152 sense	5'-CTCTCCGTGGTTACGATCATATGTCCGATCATGTAAC-3'
HopF2_G6Es	5'-TAATATTTGCGAAACCTCGGGCTCAC-3'
HopF2_R71A sense	5'-CGAGCTTTTCGCAACGACGGATAG-3'
HopF2_N134A sense	5'-TTCCATCACTGGCCGTAATGACTGG-3'
HopF2_V135G sense	5'-ACTGAACGGAATGACTGG-3'
HopF2_H150A_as (-)BclI	5'-TATCACTCAT GGCATCATAA GCTC-3'
HopF2_D164A_as	5'-TCGAGAAAAGCTCCCAGTC-3'
HopF2_G169A sense	5'-CTCGAAAGGGCTGGCAAGG-3'
HopF2_G170A sense	5'-GAAAGGGGTGCCAAGGTCT-3'
HopF2_D175A_as	5'-ACGAAGCGGCGGCATAGAC-3'
HopF2_S177A_as	5'-GTCAGCTACAGATGCAGCGTCGGCATAGAC-3'
HopF2_L193G sense	5'-TCTGATTGTACAGGTCCCAAAGGACAG-3'
HopF2_P194A sense	5'-TCACATTGGCCAAAGGAC-3'
HopF2_V199G_as	5'-CCTTTGACCGGACCTTTCTGTCCTT-3'
HopAB1_Y525A sense	5'-AAACTTGCCCAAGCCCTGGCAGACAAG -3'
HopAB2_F173A sense	5'-TTTCGCCAGCATGCCCCGAACATGC-3'
HopAB2_S258A antisense	5'-CGCGTGGCGGGGCCCTGTCGACCG-3'
HopAB2_T450D antisense	5'-CGGCCTTCGAAATGTCGCGCAGCTGACTGA-3'
HopAB2_K529A sense	5'-TTCCTCGCAGGC GCA CCTGAGCATCC-3'
HopAB2_K529A antisense	5'-GGATGCTCAGGT TGC GCCTGCGAGGAA-3'
HopAB2_E531A sense	5'-GGCAAGCCTG CAC ATCCGATGAC-3'
HopAB2_E531A antisense	5'-GTCATCGGATGT TG CAGGCTTGCC-3'
HopAB2_K529A/E531A antisense	5'-CTCTGGTCATCGGATGT GCAGGTGC GCCTGCGAGGAATTGG-3'
HopAB2_R536A sense	5'-CCGATGACC GC AGAAACGCTTA-3'
HopAB2_R536A antisense	5'-TAAGCGTTTCT GCG GTCATCGG-3'
Nt RAR1 FW	5'-AGG AAA GCA CAC AAC AGA AAA ACC-3'
Nt RAR1 REV	5'-GTG CCA TCC TTT GGT GCA TGG AGG-3'
Nt EDS1 FW	5'-GAG TAT CAG ACC AAG TGT GAT ATC CG-3'
Nt EDS1 REV	5'-GCT GAG GTG GGA GTG TTT TCC ACC-3'
p19/F	5'-CCATGGAACGAGCTATACAAGGAA-3'
p19/R	5'-GAATTC TACTCGCTTTCTTTTTCGAA-3'
CaMVpro	5'-ACTATCCTTCGCAAGACC-3'
CaMV_promoter_FW	5'-AAGCATTCTACTTCTATTGCAG-3'
19S pro	5'-TCCTAATTGAAATCCGAAG-3'
Nos pro	5'-AACCATTATTGCGCGTTC-3'
Nos pro for	5'-ATGAGCGGAGAATTAAGG-3'
Nos pro rev	5'-AGGGGAATTTATGGAACG-3'
Nos coding rev	5'-CATAACGTCTAAGCTATCGG-3'
nosTerm_REV	5'-TGATAATCATCGCAAGACCGG-3'
OcsTer	5'-CATAGATGTCGCTATAAACC-3'
nptII rev	5'-AGCCAACGCTATGTCCTG
TRVRNA1for	5'-AAAGTTGGCTACTAAGTGG

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

TRVRNA1REV	5'-GTTCAAGTCTCCACATTG-3'
Gus for	5'-GGCACTAGCGGGACTTTG -3'
Gusrev	5'-CTACCATCCGTAATAACGG-3'
mGFP4/5siRich_FW	5'-TCGTCAACAGGATCGAGC-3'
mGFP4siRich_REV	5'-GCTAGTTGAACGCTTCCATC-3'
mGFP5siRich_REV	5'-CGCCGTCTTCGATGTTGTG-3'
GDH intron for	5'-TGCTG TGGGGCTTAC TTG-3'
GDH intron rev	5'-ACAATCCCAC AATCCCAC-3'
GADPH FW	5'-CGGGATCC GGCCTTCAGAGTACCAAC-3'
GADPH REV	5'-GGAATTCCCATTTCGTTGTCATACC-3'
chlor rev	5'-ATTATACGAGCCGGAAGC-3'
pPZP222_spec_upper	5'-TGCTTAGTGATCTAATCGCTTG-3'
pPZP222_spec_lower	5'-GTAAGTCCGTCACGCAAC-3'
T3 PRIMER	5'-ATTAACCTCACTAAAGGG-3'
T7 PRIMER	5'-AATACGACTCACTATAGGG-3'
SP6 PRIMER	5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'
GEN_ED selection as	5'-GATAAATCTGGAGCCTCCAAGGGTGGGTCTCGCGG-3'
Gene_ed selection sense	5'-CCGCGAGACCCACCCTTGGAGGCTCCAGATTTATC-3'
Trans oligo SspI/EcoRV sense	5'-CTTCTTTTTTCGATATCATTGAAGCATTTATC-3'
Trans oligo SspI/EcoRV as	5'-GATAAATGCTTCAATGATATCGAAAAAGGAAG-3'
Trans oligo EcoRI/EcoRV sense_pPZP222/XSN	5'-ACTAGATCGGATATCGTAATCATGGTC-3'
Trans oligo EcoRI/EcoRV as_pPZP222/XSN	5'-CATGATTACGATATCCGATCTAGTAAC-3'
Trans oligo HindIII/SspI sense_pPZP222/XSN	5'-GGCCAGTGCCAATATTGCATGCCTGC-3'
Trans oligo HindIII/SspI as_pPZP222/XSN	5'-CAGGCATGCAATATTGGCACTGGCCG-3'
Trans Oligo Scal/BglII sense	5'-GTGACTGGTGAGATCTCAACCAAGTC-3'
Trans Oligo Scal/BglII as	5'-GACTTGGTTGAGATCTCACCAGTCAC-3'
Control MUT LacZ_stop_sense	5'-CAGGGTTTTCTCAGTCACGACG-3'
Control MUT LacZ_stop_as	5'-GGCGTTACCTAACTTAATC-3'

Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

2.3 Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία:

Στέλεχος	Χαρακτηριστικά-Γενότυπος	Πηγή ή Αναφορά
<i>E. coli</i>		
DH10B	F ⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ ⁻	Invitrogen
DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(τ _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻	Invitrogen
ER2925	ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2	NEB

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

	galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2	
<i>ccdB</i> Survival	F <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG fhuA::IS2</i>	Invitrogen
BMH 71-18 <i>mutS</i>	<i>thi, supE, Δ(lac-proAB), [mutS::Tn10], [F', proAB, lacI^qZΔM15].</i>	Promega
HB101 (pRK600)	Στέλεχος HB101 (<i>Sm^R recA thi pro leu hsdRM⁺</i>) που φέρει το βοηθό πλασμίδιο pRK600 (Cm ^R oriColE1 RK2 -mob ⁺ RK2-tra ⁺) για τριγωνικές συζεύξεις	(Pérez-Martínez et al., 2007)
HB101 (pRK2013)	Στέλεχος HB101 (<i>Sm^R recA thi pro leu hsdRM⁺</i>) που φέρει το βοηθό πλασμίδιο pRK2013 για τριγωνικές συζεύξεις	(Ditta et al., 1980)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
LBA4404 (pAL4404)	LBA4404 (Ach5 pTiACH5) Rifampicin ^R και Sm ^R στο πλασμίδιο μολυσματικότητας (από Tn904). Η περιοχή T-DNA του pTiACH5 έχει επαλειφθεί στο pAL4404	(Ooms et al., 1982)
C58C1	Παράγωγο του C58, Rifampicin ^R	(Deblaere et al., 1985)
GV2260	Παράγωγο του C58 που φέρει Ti πλασμίδιο pGV2260 (pTiB6S3DT-DNA), Rifampicin ^R	(McBride & Summerfelt, 1990)
GV3101	Παράγωγο του C58, Rifampicin ^R	(Holsters et al., 1980)
A281	<i>A. tumefaciens</i> C58 που φέρει το ογκογόνο πλασμίδιο pTiBo542 [ανακατασκευασμένο στέλεχος, παράγωγο του A136 (cured C58) που φέρει pTiBo542, υπέρ-ογκογόνο]	(Hood et al., 1986)
<i>Pseudomonas</i>		
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Μια αυθόρμητη μετάλλαξη για ανθεκτικότητα σε Ριφαμπικίνη του <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC52	(Cuppels, 1986)
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3001	Προέρχεται από το <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 και φέρει επιπλέον ελλείψεις και ανασυνδυασμούς	(Landgraf et al., 2006)
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> race 7, Ανθεκτικό στην Ριφαμπικίνη	(Taylor et al., 1996)
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1449B	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> race 6, Ανθεκτικό στην Ριφαμπικίνη	(Taylor et al., 1996)
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> NPS3121	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> race 1, Ανθεκτικό στην Ριφαμπικίνη	(Lindgren et al., 1986)
<i>P. savastanoi</i> 2480	Ανθεκτικό στην Ριφαμπικίνη	Π. Σαρρής
<i>P. savastanoi</i> 4530	Ανθεκτικό στην Ριφαμπικίνη	Π. Σαρρής
<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i> ES4326	Μια αυθόρμητη μετάλλαξη για ανθεκτικότητα σε στρεπτομυκίνη του <i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i> 4326	(Dong et al., 1991)
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a	Ανθεκτικό στην Ριφαμπικίνη στέλεχος απομονωμένο από <i>P. vulgaris</i>	(Loper & Lindow, 1987)

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

<i>P. fluorescens</i> 55 (pHIR11)	<i>P. fluorescens</i> 55 μετασηματισμένη με pHIR11 (Το pHIR11 είναι θραύσμα 30 kb που περιέχει το hrg Cluster από <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> 61 σε φορέα pLAFR3)	(Huang et al., 1988)
<i>P. fluorescens</i> 55 (pLN18)	<i>P. fluorescens</i> 55 μετασηματισμένη με pLN18 (Το pLN18 είναι ένα παράγωγο pHIR11 στο οποίο έχουν επαλειφθεί τα shcA και hopPsyA, αλλά κωδικοποιεί ένα λειτουργικό TTSS)	(van Dijk et al., 2002)
<i>P. fluorescens</i> 55 (pCPP2071)	<i>P. fluorescens</i> 55 μετασηματισμένη με pCPP2071 (Το pCPP2071 είναι παράγωγο pHIR11 με ένθεση TnpHoA στο hopPsyA)	(Huang et al., 1991)

Πίνακας 3. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

2.4 Διαγονιδιακές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία:

- ☞ **U6B.** Η σειρά αυτή είναι μια διαγονιδιακή σειρά *N. tabacum* cv. *Petit Havana 425*, η οποία υπερεκφράζει την P1/Hc-Pro αλληλουχία του ιού TEV κάτω από τον έλεγχο του CaMV35S υποκινητή (Mallory et al., 2001).
- ☞ **16c.** Διαγονιδιακή σειρά *Nicotiana benthamiana* που υπερεκφράζει το διαγονίδιο mGFP5 (Siemering et al., 1996) κάτω από τον έλεγχο του CaMV35S υποκινητή (Ruiz et al., 1998).
- ☞ **sde1IR.** Είναι φυτά *N. benthamiana* που έχουν ως φαινότυπο καταστολή της RDR6. Εκφράζουν ένα τμήμα 245 bp της κωδικής περιοχής της RDR6 (που οριοθετείται από τους εκκινητές 5'TGACGTGGCTTTTGATG3' και 5'TCTTGAATAAAGCATTGGCC3') σε μορφή αντεστραμμένης επανάληψης (Schwach et al., 2005).
- ☞ **p19.** Τα διαγονιδιακά φυτά που χρησιμοποιήσαμε υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη p19 του ιού AMCV κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή CaMV35S (Silhavy et al., 2002)

2.5 Μικρής κλίμακας απομόνωση βακτηριακού γενωμικού DNA (Wilson, 2001).

Τα βακτήρια από ένα κορεσμένο υγρό καλλιέργειας λύονται και οι πρωτεΐνες απομακρύνονται με πέψη με πρωτεΐνάση K. Τα συντρίμμια του κυτταρικού τοιχώματος, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και τα υπόλοιπα απομακρύνονται με εκλεκτική καταβύθιση με STAB, και το DNA υψηλού μοριακού βάρους ανακτάται από το προκύπτον υπερκείμενο με καθίζηση με ισοπροπανόλη.

1. 5 -ml υγρή καλλιέργεια εμβολιασμένη με το βακτηριακό στέλεχος του ενδιαφέροντος αναπτύσσονται σε συνθήκες κατάλληλες για το εν λόγω στέλεχος (δηλαδή κατάλληλο μέσο, επιλογή αντιβιοτικού, θερμοκρασία) μέχρις ότου η καλλιέργεια είναι κορεσμένη. Αυτό μπορεί να διαρκέσει αρκετές ημέρες, ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξης του βακτηρίου.

2. 1,5-4,5 ml της καλλιέργειας φυγοκεντρείται σε μικροφυγόκεντρο για 2 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 3 . Το ίζημα επαναιωρείται σε 550 μl ρυθμιστικού διαλύματος **TE** με πιπέταρισμα. Προστίθενται 30 μl 10 % **SDS** και 3 μl 20 mg/ml **πρωτεΐνάσης K** για να δώσει μια τελική συγκέντρωση 100 μg / ml πρωτεΐνάση K σε 0,5 % SDS. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 1 ώρα στους 37 ° C.
4. Προστίθεται 100 μl **5 M NaCl** με καλή ανάδευση. Ο στόχος εδώ είναι να αφαιρεθούν τα συντρίμια του κυτταρικού τοιχώματος , μετουσιωμένη πρωτεΐνη , και πολυσακχαρίτες σε σύμπλοκο με CTAB , διατηρώντας τα νουκλεϊνικά οξέα σε διάλυμα.
5. Προστίθεται 80 μl διαλύματος **CTAB / NaCl** (10% CTAB in 0.7 M NaCl) με καλή ανάδευση και επώαση 10 λεπτών στους 65 ° C.
6. Προστίθεται ίσος όγκος (0,7 έως 0,8 ml) **φαινόλης / χλωροφορμίου / ισοαμυλικής αλκοόλης** με καλή ανάδευση και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά. Αυτή η εκχύλιση απομακρύνει τα σύμπλοκα CTAB με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες.
7. Το παχύρρευστο υπερκείμενο μεταφέρεται σε ένα νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρησης , προστίθεται ίσος όγκος **χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη** και επαναλαμβάνεται το προηγούμενο στάδιο.
8. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε ένα νέο σωλήνα. Ακολουθεί προσθήκη 0,6 νοι **ισοπροπανόλη** για την καθίζηση των νουκλεϊκών οξέων (δεν υπάρχει ανάγκη να προστεθεί αλάτι δεδομένου ότι η συγκέντρωση NaCl είναι ήδη υψηλή). Ο σωλήνας ανακινείται ώπου να γίνει σαφώς ορατό το ινώδες λευκό ίζημα DNA. Σε αυτό το σημείο είναι δυνατόν να μεταφερθεί το DNA σαν νήμα (με την βοήθεια μικροπιπέτας που έχει θερμικά σφραγιστεί και καμφθεί σε μια φλόγα Bunsen) σε ένα νέο σωλήνα που περιέχει 70 % αιθανόλη. Εάν δεν σχηματίζονται νήματα, αυτό συνεπάγεται ότι το DNA έχει διάτμηση σε σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους κομμάτια. Εάν αυτό είναι αποδεκτό , (δηλαδή, εάν το DNA να πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού για ανάλυση κατά Southern), το χρωμοσωμικό DNA μπορεί να ανακτηθεί απλά με καθίζηση του ιζήματος σε μικροφυγόκεντρο .
9. Το DNA πλένεται με **70 % αιθανόλη** για την απομάκρυνση του υπολειμματικού CTAB και επαναφυγοκεντρείται 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και το ίζημα στεγνώνει σε ένα λυοφιλοποιητή .
10. Το ίζημα επαναδιαλύεται εκ νέου σε 100 λ ρυθμιστικού διαλύματος **TE**. Η διαδικασία της επαναδιάλυσης μπορεί να πάρει κάποιο χρόνο (μέχρι 1 hr), δεδομένου ότι το DNA είναι υψηλού μοριακού βάρους.

2.6 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA από στελέχη Pseudomonas (Kado & Liu, 1981; Zhao et al., 2005).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 1 . Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε υγρή καλλιέργεια overnight στους 28 ° C σε μια οπτική πυκνότητα στα 600 nm του 0,8 και συγκεντρώνονται με φυγοκέντρηση (3.000 rpm , RT, για 10 λεπτά) .
 2. Ακολουθεί ψύξη (-20 ° C) – απόψυξη.
 - 3 . Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε [5] ml ρυθμιστικού E [40 mM Tris-οξικό (pH = 7,8), 2 mM EDTA , pH 7.9] .
 - 4 . Τα κύτταρα λύνονται με την προσθήκη [10] ml [προθερμασμένου] διαλύματος λύσεως [50 mM Tris-οξικό, (pH=7,8), 3 % δωδεκυλοθειικό νάτριο , pH= 12,6] , το οποίο αναμιγνύεται με σύντομη ανάδευση.
 5. Το διάλυμα θερμαίνεται στους 65°C για 40 λεπτά σε ένα υδατόλουτρο.
 - 6 . Προστίθενται 12 ml 3M οξικού καλίου, pH = 5,2 ml [τελική συγκέντρωση 1,3 M σε οξικό κάλιο].
 7. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση σε πάγο για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση [12.000 rpm, 4°C, επί 10 λεπτά].
 - 8 . Το υπερκείμενο διηθείται διαμέσου υαλοβάμβακα και
 9. Προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης-χλωροφορμίου (1:1, vol/vol) . Το διάλυμα γαλακτωματοποιείται με ανακίνηση εν συντομία , και το γαλάκτωμα φυγοκεντρείται στις 3000 rpm για 10 λεπτά σε RT.
 10. Αποφεύγοντας το ίζημα στη μεσόφαση , η ανώτερη υδατική φάση μεταφέρεται σε έναν σωλήνα με βιδωτό πώμα και
 11. Προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου (1:1, vol/vol) . Το διάλυμα γαλακτωματοποιείται με ανακίνηση εν συντομία , και το γαλάκτωμα φυγοκεντρείται στις 3000 rpm για 10 λεπτά σε RT .
-
12. Το πλασμιδιακό DNA στο υπερκείμενο στη συνέχεια καταβυθίζεται με 0,7 vol ισοπροπανόλη (10 λεπτά επώαση στους -20 ° C/10 min φυγοκέντρηση 12.500 RPM / 4 oC), ξεπλένεται με 70 % αιθανόλη και επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα TE .

2.7 Απομόνωση συνολικού DNA από φυτικό ιστό. Η μέθοδος που περιγράφεται είναι μια τροποποίηση του γενικού πρωτοκόλλου για απομόνωση νουκλεϊκών οξέων (Dellaporta et al., 1983). Αρχικά ο ιστός παγώνεται παρουσία υγρού αζώτου και στην συνέχεια λειοτριβείται παρουσία υγρού αζώτου. Προστίθενται 10 vol/gr extraction buffer (100mM Tris/Cl, pH=8, 50 mM EDTA pH=8, 500 mM NaCl, 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη). Στην συνέχεια προστίθεται SDS –προθερμασμένο στους 65 °C- σε τελική συγκέντρωση 1, 25 % και αφού διασπαρθεί ομοιόμορφα με ανακίνηση το δείγμα επώαζεται στους 65 °C για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8000 στροφές για 10 min για την απομάκρυνση

κυτταρικών τοιχωμάτων και λοιπών κυτταρικών υπολειμμάτων. Προστίθεται στο υπερκείμενο οξικό κάλιο σε τελική συγκέντρωση 0,25M, το δείγμα ανακινείται ήπια και επωάζεται για 20 λεπτά στους 0 °C. Μετά την φυγοκέντρηση του δείγματος (10.000 rpm/15 min/4 °C), το υπερκείμενο διέρχεται από Miracloth και προστίθεται σε 0,7 vol παγωμένη ισοπροπανόλη. Αφού ανακινηθεί μέχρι ομογενοποιήσεως, επωάζεται στους -20 °C για 20 λεπτά και επαναφυγοκεντρείται (12.000 rpm/15 min/4 °C). Η πελέττα επαναδιαλύεται σε TE αφού προηγηθεί ξέπλυμα με 70 % αιθανόλη και στέγνωμα. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα RNase, το επαναιώρημα επωάζεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αφού επαναφυγοκεντρηθεί, για την απομάκρυνση του αδιάλυτου μη νουκλεϊνικού οξέος περιεχομένου του, φυλάσσεται στους -20 °C.

2.8 Απομόνωση συνολικού DNA από φυτικό ιστό (Murray & Thompson, 1980).

Ιστός παγώνεται παρουσία υγρού αζώτου και λειοτριβείται σε σκόνη με την βοήθεια γουδιού και γουδοχειριού παρουσία υγρού αζώτου. Επαναδιαλύεται σε 10 vol/gr ιστού extraction buffer [0.7 M NaCl, 1% CTAB, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, και 1% 2-mercaptoethanol]. Επωάζεται για 20-30 λεπτά στους 50-60 °C με περιοδική ήπια ανακίνηση. Κυτταρικά τοιχώματα, αποδιαταγμένες πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες απομακρύνονται μετά από επανειλημμένα extraction με χλωροφόρμιο /ισοαμυλική (24:1), ήπια ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 4000 rpm/10min/4 °C) μέχρι το υπερκείμενο να αποκτήσει διαύγεια. Προστίθεται 0,1 vol 10% CTAB, 0.7 M NaCl και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της φυγοκέντρησης στις ίδιες συνθήκες. Ένα ίζημα νουκλεϊκού οξέος-CTAB δημιουργείται όταν η συγκέντρωση του αλατιού μειωθεί από 0,7 σε 0,35 με την προσθήκη 1% CTAB, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), και 10 mM EDTA. Μετά από overnight επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, το ίζημα κατακρημνίζεται με την βοήθεια φυγοκέντρησης στις 7000 rpm/20 λεπτα/4 °C).

2.9 Απομόνωση DNA από ιστό (Fulton et al., 1995).

Σε λειοτριβημένο ιστό με γουδί και γουδοχέρι παρουσία υγρού αζώτου προστίθενται 7,5 vol/gr ιστού πρόσφατα παρασκευασμένου extraction buffer [2,5 μέρη DNA extraction buffer (0.35 M sorbitol, 100 mM Tris-base pH=7,5 and 5 mM EDTA): 2,5 μέρη Nuclei lysis buffer (0.2 M Tris-base (pH=8.0), 50 mM EDTA, pH 8.0), 2 M NaCl and 2 % CTAB): 1 μέρη sacrosyl 5%- στο buffer προστίθεται 0,3 έως 0,5 gr sodium bisulphite/100 mL buffer λίγο πριν την χρήση] και αναμειγνύεται με ήπια ανακίνηση (ήπιο vortex). Επωάζεται στους 65 °C για 30-60 λεπτά. Στην συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), το δείγμα ανακατεύεται 50-100 φορές και φυγοκεντρείται στις 3000

στροφές /15 min . Το extraction με χλωροφόρμιο επαναλαμβάνεται μέχρι το υπερκείμενο να είναι διαυγές. Στην συνέχεια προστίθενται 0,7 vol ισοπροπανόλη, το δείγμα φυγοκεντρείται άμεσα στις 12000 στροφές /15 min, η πελέττα ξεπλένεται με 70 % αιθανόλη, στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε TE με RNase.

Στην πράξη μια τροποποίηση του παραπάνω πρωτοκόλλου χρησιμοποιείται (Li et al., 2012). Συνοπτικά, μετά την λειοτριβίση του ιστού, προστίθεται 6 vol DNA extraction buffer (100 mM Tris-base and 5 mM EDTA pH=7,5, 0.35 M sorbitol, 0.4 g/100 mL buffer sodium bisulfite λίγο πριν την χρήση), το δείγμα ανακινείται με ήπιο vortex για 1 λεπτό και φυγοκεντρείται στις 7000 στροφές για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η πελέττα επαναδιαλύεται με ήπιο vortex για 1 λεπτό σε 2,5 vol DNA extraction buffer και προστίθενται 6 vol διαλύματος {0.2 M Tris-base (pH=8.0), 50 mM EDTA (pH=8.0), 2 M NaCl, 55 mM CTAB και 5 % sacrosyl}. Τα δείγματα ανακατεύονται ήπια μέχρι ομογενοποίησης και επωάζονται στους 65 °C για 30 λεπτά. Το chloroform extraction και το isopropanol precipitation πραγματοποιούνται όπως περιγράφεται αλλού (Fulton et al., 1995).

2.10 Απομόνωση DNA από πλούσιο σε πολυσακχαρίτες ιστό (Sharma et al., 2012).

Ο ιστός λειοτριβείται μέχρι τέλειας σκόνης παρουσία υγρού αζώτου και προστίθεται 5 vol/gr ιστού διάλυμα {5 M NaCl, 2% sarcosyl}. Το μίγμα αναδεύεται μέχρι ομογενοποίησης και φυγοκεντρείται στις 7000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στο υπερκείμενο προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου/ ισοαμυλικής (24:1) και μετά από ήπια ανακίνηση για 1 λεπτό φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο υπερκείμενο προστίθενται 2 vol extraction buffer (100 mM Tris-HCl (pH=8), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2% CTAB) αναμειγνύεται ήπια και επωάζεται σε 60 °C για 30 λεπτά με συνεχή ήπια ανακίνηση. Επαναλαμβάνεται το extraction με χλωροφόρμιο στις ίδιες συνθήκες επανειλημμένες φορές μέχρι διαύγειας του υπερκειμένου, στο υπερκείμενο προστίθεται 1/30 vol 3 M sodium acetate (pH=5.2) και 0,7 vol ισοπροπανόλη, το δείγμα αναμειγνύεται και φυγοκεντρείται στις 12000 στροφές για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το δείγμα επαναδιαλύεται σε TE (αφού προηγηθεί πλύσιμο με 70 % αιθανόλη και στέγνωμα) και επωάζεται παρουσία RNase για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

2.11 Ενίσχυση συνολικού γενωμικού DNA από βακτήρια ή φυτικό ιστο με την χρήση phi polymerase (Blanco & Salas, 1984).

Αποδιάταξη γενωμικού DNA σε αλκαλικές συνθήκες: Αναμειγνύονται 10 ng γενωμικού DNA σε x όγκο νερού με ίσο όγκο Denaturation solution (0,4 N KOH, 10 mM EDTA) και το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Προστίθεται όγκος

Neutralization solution (0,4 N HCl, 0,6 M Tris-HCl pH=7,5) ίσος με τον όγκο του Denaturation solution και η αντίδραση μεταφέρεται σε πάγο.

Αντίδραση Ενίσχυσης: Προστίθενται ποσότητα sample buffer (random hexamers), 0,25 mM τελική συγκέντρωση dNTPs, 1X phi29 DNA Polymerase Reaction Buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂ SO₄, 4 mM DTT, 200 µg/ml BSA pH 7.5 @ 25°C) και 1λ μείγματος ενζύμου phi polymerase. Η αντίδραση επωάζεται στους 28-30 °C για 16 ώρες ενώ το ενζυμο απενεργοποιείται στους 65 °C για 10 λεπτά.

2.12 Προετοιμασία κυττάρων X11-blue MRF για μόλυνση με φάγο (Lech & Brent, 1988). Από Stab κυττάρων X11-blue MRF πραγματοποιείται streaking σε πιάτο LB-tet. Μοναδιαίες αποικίες χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό καλλιέργειας LB μικρής κλίμακας, η οποία με την σειρά της μετά από overnight επώαση στους 37 °C χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια LB/0,2 % μαλτόζη/10 mM MgSO₄. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37 °C μέχρι η πυκνότητα των κυττάρων να είναι 10⁹ κύτταρα /ml (OD600=1). Στην συνέχεια η καλλιέργεια συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 15 λεπτά στους 4 °C και επαναδιαλύεται σε 10 mM MgSO₄ με τελική πυκνότητα κυττάρων 5 x 10⁸ κύτταρα/ml.

2.13 Μετατροπή φαγικής σε cDNA βιβλιοθήκη (Ouwkerk & Meijer, 2001). Αναμειγνύονται 1,5 x 10⁹ rfu από την φαγική βιβλιοθήκη με (100 x αντιπροσώπευση του τίτλου της βιβλιοθήκης) με 1,5 x 10¹⁰ κύτταρα X11-blue MRF (παρασκευασμένα όπως περιγράφεται στην αντίστοιχη παράγραφο και επαναδιαλυμένα σε τελική πυκνότητα 10⁹/ml). Προστίθεται 1,5 x 10¹¹ rfu ExAssist Helper phage και το μείγμα επωάζεται στους 37 °C για υποβοήθηση της πρόσδεσης του φάγου στα κύτταρα. Στην συνέχεια το μείγμα προστίθεται σε LB και επωάζεται για 2-3 h στους 37 °C με συνεχή ανακίνηση. Το μείγμα θερμαίνεται στους 70 °C για 15-20 λεπτά και τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 10000 rpm. Παράλληλα εμβολιάζεται καλλιέργεια 2x YT-Kan (100 µg/ml) με το στέλεχος SOLR και επωάζεται στους 37 °C με συνεχή ανακίνηση μέχρι η πυκνότητα της καλλιέργειας να φτάσει 8 x 10⁸ κύτταρα/ml και μεταφέρεται σε καλλιέργεια 1L 2x YT(+ Kan). Ακολουθεί επώαση στις ίδιες συνθήκες μέχρι πυκνότητας 5 x 10⁸ κύτταρα/ml. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές για 15 λεπτά στους 4 °C και η πελέττα επαναδιαλύεται σε 100ml 10 mM MgSO₄, η οποία (αφού επωαστεί χωρίς ανακίνηση για 15 λεπτά στους 37 °C) αναμειγνύεται με το 1/10 των phagemid cDNA clones από το προηγούμενο στάδιο (10¹¹ rfu), επωάζεται για 15 λεπτά στους 37 °C χωρίς ανακίνηση και χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 400ml 2x YT. Στην καλλιέργεια, αφού επωαστεί για 2 ώρες στους 30 °C με ανακίνηση απουσία αντιβιοτικού, προστίθεται

αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml και επωάζεται στις ίδιες συνθήκες overnight. Αφού συγκεντρωθεί με φυγοκέντρηση χρησιμοποιείται για την απομόνωση DNA με την μέθοδο της αλκαλικής λύσης. Το πλασμιδιακό πια DNA είναι έτοιμο για ανάλυση PCR.

2.14 Απομόνωση φαγικού DNA (Lech et al., 2001). Σε 100 ml κυττάρων ξενιστή μεγαλωμένα στους 37 °C με συνεχή ανακίνηση μέχρι πυκνότητας 6×10^8 κύτταρα/ml προστίθενται 10^9 rfu φάγου και η καλλιέργεια επωάζεται στις ίδιες συνθήκες μέχρι την λύση των κυττάρων. Στην συνέχεια προστίθενται 1 ml χλωροφορμίου και έπειτα από ανακίνηση στις ίδιες συνθήκες για 15 λεπτά –για την λύση και των εναπομεινάντων τυχόν μη λυμένων κυττάρων- η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 7000 rpm για 15 λεπτά στους 4 °C (για την απομάκρυνση κυτταρικών υπολειμμάτων). Το υπερκείμενο (αφού τιτλοδοτηθεί) χρησιμοποιείται για DNA extraction. Στο υπερκείμενο προστίθεται τελική συγκέντρωση 0,6 mM NaCl, 0,2 mM Tris/HCl pH=7,5, 20 µM EDTA, 0,4 µg/ml BSA, 40 µg/ml RNase και 12 µg/ml DNase για την απομάκρυνση του βακτηριακού RNA και DNA αντίστοιχα. Μετά από επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά στο υπερκείμενο προστίθενται τελικές συγκεντρώσεις 5 % PEG6000 και 0,5 M NaCl και η κατακρήμνιση των φαγοσωματίων επιταχύνεται με επώαση για μια ώρα στον πάγο. Το ίζημα των φαγοσωματίων συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 10 λεπτά και έπειτα από παρατεταμένο στέγνωμα επαναδιαλύεται σε διάλυμα 100 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH=7,5, 25 mM EDTA και υφίσταται dialysis έναντι 2 lt του ίδιου διαλύματος με ανακίνηση και περιστασιακή αλλαγή του buffer ανά 6 h για 5-6 φορές για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων της PEG6000. Προστίθεται SDS σε τελική συγκέντρωση 2% και έπειτα από ήπια ανακίνηση και παραμονή στους 70 °C για 20 λεπτά, οι αποδιαταγμένες από το SDS φαγικές καψιδιακές πρωτεΐνες κατακρημνίζονται με την προσθήκη ολικού καλίου pH=5,5 (τελική συγκέντρωση 1 M- το SDS με το μονοσθενές ιόν κατακρημνίζει τις πρωτεΐνες), ήπια ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 15 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο υφίσταται 3 διαδοχικά extraction με φαινόλη/φαινόλη: χλωροφόρμιο και χλωροφόρμιο και κατακρημνίζεται παρουσία ίσου όγκου ισοπροπανόλης, επώαση για μια 1 h στους -20 °C και φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές/λεπτό για 30 λεπτά στους 4 °C. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει ξέπλυμα με 70% αιθανόλη, στέγνωμα και επαναδιάλυση σε TE παρουσία RNase.

2.15 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction). (Dieffenbach & Dveksler, 2003; Innis et al., 1990; Saiki et al., 1985).

Γενικά εισαγωγικά στοιχεία. Η αντίδραση αυτή έχει ως στόχο την ενίσχυση μιας περιοχής DNA που ορίζεται από δυο εκκινητές. Το τμήμα DNA που βρίσκεται μεταξύ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

των εκκινητών αυτών μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι 10^6 φορές με την βοήθεια αλληλάλληλων επαναλήψεων ενός κύκλου αντίδρασης. Αρχή της αντίδρασης είναι ο εκλεκτικός πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA από ένα ετερογενές σύνολο μορίων.

Υλικά.

Υπόστρωμα DNA: Υπάρχει δυνατότητα χρησιμοποίησης οποιοδήποτε τύπου DNA (είτε πρόκειται για ολικό φυτικό γενωμικό DNA σε τελική ποσότητα ανά αντίδραση 50 ng, είτε για ολικό DNA από cDNA βιβλιοθήκες σε τελική ποσότητα 50-80 ng). Σε DNA-κλώνο πλασμιδιακό η ποσότητα είναι ακόμα μικρότερη. Μία τροποποίηση της μεθόδου επιτρέπει την χρησιμοποίηση υποστρώματος που προέρχεται από προϊόν αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR).

Εκκινητές: Μικρές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μήκους συνήθως 17-25 νουκλεοτιδίων που παράγονται με την χρήση χημικών μεθόδων. Παρέχονται από τον κατασκευαστή λυοφιλοποιημένοι και επαναδιαλύονται σε αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό (τελική συγκέντρωση 1 mg/ml). Η τελική τους συγκέντρωση ανά αντίδραση καθορίζεται σε 10 ng ανά εκκινητή.

Διάλυμα πολυμεράσης: Η τελική συγκέντρωση του διαλύματος περιλαμβάνει 100 mM Tris.HCl pH=8.3 και 100 mM KCl. Το πρώτο είναι ρυθμιστικό του pH της αντίδρασης ενώ το δεύτερο ευνοεί την υβριδοποίηση εκκινητή και αλληλουχίας στόχου.

BSA (Bovine Serum Albumin, τελική συγκέντρωση στο μίγμα της αντίδρασης 100 μg/μl). Είναι απαραίτητη για την σταθερότητα και κατά επέκταση την δράση της πολυμεράσης.

dNTPs: Μίγμα των τεσσάρων νουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 0.25 mM ανά αντίδραση.

MgCl₂: Τα Ιόντα Mg⁺² είναι απαραίτητα για την δράση της πολυμεράσης ενώ σε συνεργασία με τα μονοσθενή ιόντα του ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης υποβοηθούν την ουδετεροποίηση του σκελετού του DNA εκκινητών και υποστρώματος – και κατ'επέκταση μειώνουν την θερμοκρασία υβριδοποίησης και η τελική συγκέντρωσή τους στην αντίδραση κυμαίνεται από 0.7-2 mM ανά αντίδραση ανάλογα με την φύση και την εξειδίκευση της αντίδρασης. Η συνηθισμένη συγκέντρωση έχει οριστεί στο 1.5 mM.

Ταq πολυμεράση (Minotech): Θερμοανθεκτική DNA-κατευθυνόμενη DNA πολυμεράση (ποσότητα ανά αντίδραση: 0,7 units/αντίδραση)

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης κυμαίνεται από 10-50 λ

Συνθήκες Αντίδρασης.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τυπικούς θερμοανακυκλωτές με τις ακόλουθες συνθήκες:

1. Προθέρμανση του μηχανήματος στους 94-95 °C πριν την προσθήκη των δειγμάτων.
2. Αρχική αποδιάταξη DNA στους 94-95 °C για 3-5 λεπτά.
3. Αποδιάταξη στους 94-95 °C για 30-60 δευτερόλεπτα .
4. Υβριδοποίηση εκκινητή -στόχου στους 48-65 °C (ανάλογα με την θερμοκρασία τήξης του εκκινητή)²¹ για 30-60 δευτερόλεπτα.
5. Επέκταση αλληλουχίας στους 68-72 °C (ανάλογα με την φύση του ενζύμου πολυμερισμού για 45 sec-2 min ανάλογα με το μήκος της αναμενόμενης αλληλουχίας).
6. Επανάληψη των βημάτων 3-5 30-40 φορές.
7. 68-72 °C για 3-5 λεπτά με στόχο την συμπλήρωση ημιτελών αλυσίδων.

Στην περίπτωση που κρίθηκε απαραίτητο τα PCR προϊόντα κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς είτε με την αξιοποίηση της τεχνολογίας TA cloning (Holton & Graham, 1991; Marchuk et al., 1991) ή με την χρήση περιοριστικών ουρών στους εκκινητές (Kaufman & Evans, 1990).

2.16 TA-tailing για ευθυγραμμισμένους με XcmI πλασμιδιακούς φορείς.

Ποσότητα ευθυγραμμισμένου με XcmI πλασμιδιακού φορέα επώζονται με Taq πολυμεράση (1 μονάδα / μg plasmid/20 λ όγκο) χρησιμοποιώντας πρότυπες συνθήκες ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM KCl, 10 mM Tris pH=8.3, 1.5 mM MgCl₂, and 200 μg/ml BSA)) σε παρουσία 2 mM dTTP για 2 ώρες στους 72 °C.

2.17 RT-PCR (Dieffenbach & Dveksler, 2003). Η μέθοδος αυτή είναι μια παραλλαγή της κλασσικής αντίδρασης πολυμεράσης που επιτρέπει τον συνδυασμό της με την αντίστροφη μεταγραφή. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο εκλεκτικός πολλαπλασιασμός μιας αλληλουχίας που καθορίζεται από δυο εκκινητές με την χρήση RNA (ολικού ή mRNA) ως πρώτη ύλη. Η θεωρεία της αντίδρασης είναι ότι πραγματοποιείται ένα βήμα πολυμερισμού DNA χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα RNA με την δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης, ακολουθούμενο από αποικοδόμηση του RNA με την δράση της RNase H. Ακολουθεί αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της μεθόδου. Στην πρώτη η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής είναι μηχανιστικά και χωροχρονικά διαχωρισμένη από την αντίστοιχη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ενώ στην

²¹ Η θεωρητική θερμοκρασία τήξης του εκκινητη για μικρά oligονουκλεοτιδια προσδιορίζεται από τον εμπειρικό τύπο $T_m = \text{αριθμός A/Tα} \times 2 + \text{αριθμός G/C} \times 4$. Στην πράξη όμως προσδιορίζεται εμπειρικά μετά από δοκιμές σε διάφορες θερμοκρασίες.

δεύτερη το μίγμα της αντίδρασης είναι κοινό για τα δυο ένζυμα απλά η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής και του πολυμερισμού στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης συμβαίνουν διαδοχικά με αλλαγή της θερμοκρασίας (η Taq πολυμεράση έχει μικρή ενεργότητα στην θερμοκρασία δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης)

Αρχικά εκκινητές²² (oligo-dt ή τυχαία εξαμερή ή εκκινητής ειδικός για την προς ενίσχυση αλληλουχία) και RNA (η ποσότητα του RNA καθορίζεται από το ένζυμο που χρησιμοποιείται –στην περίπτωση της Omniscript reverse transcriptase/ Qiagen ή της Thermoscript reverse transcriptase- η απαιτούμενη ποσότητα είναι 2 μ g RNA) υφίστανται αποδιάταξη στους 65 °C για 5 λεπτά και ακολούθως τοποθετούνται στους 4 °C. Το μίγμα της αντίδρασης περιέχει τελική συγκέντρωση 50 mM Tris acetate (pH=8.4), 75 mM potassium acetate, 8 mM magnesium acetate, 0,5 mM dNTPs, 5mM DTT, 40 units RNase inhibitor ,15 units Reverse transcriptase (στην περίπτωση Thermoscript reverse transcriptase για την περίπτωση της σύστασης του μίγματος της Omniscript ακολουθήθηκαν οι υποδείξεις της κατασκευάστριας εταιρίας{Qiagen}). Μετά από spin στο μίγμα RNA-εκκινητών προστίθεται ο κατάλληλος όγκος από το μίγμα αντίδρασης και η αντίδραση πραγματοποιείται στους 50 °C (37 °C στην περίπτωση της Omniscript) για 1–2 ώρες. Για έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης ένας μικρός όγκος ραδιενεργού προστίθεται στην τελική ποσότητα της αντίδρασης (προαιρετικά).

2.18 Απομόνωση DNA από αγαρόζη (Sambrook et al., 1989). Βλέπουμε στο υπεριώδες την ζώνη που μας ενδιαφέρει και είναι καλά διακριτή από όλες τις υπόλοιπες. Με την βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού κόβουμε το περίγραμμα της ζώνης αυτής και την τοποθετούμε σε Eppendorf. Κόβουμε την αγαρόζη (που περιέχει DNA) σε όσο πιο λεπτές φέτες μπορούμε με την βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού. Εναλλακτικά χρησιμοποιούμε ένα υποτυπώδες πλαστικό «γουδί» -το οποίο έχουμε φροντίσει προηγουμένως να εκθέσουμε στο υπεριώδες για χρόνο αρκετό ώστε να καταστραφεί κάθε ίχνος DNA που τυχόν περιέχει- το οποίο μπορεί να εφαρμοστεί στην εσωτερική επιφάνεια του Eppendorf και να πολτοποιήσει την αγαρόζη. Βάζουμε το ομογενοποίημα σε ένα Eppendorf 0,5 ml, το οποίο και έχουμε τροποποιήσει ως εξής: στο κάτω άκρο με την βοήθεια σύριγγας ινσουλίνης ανοίγουμε μια τρυπά και προσθέτουμε -με την βοήθεια πιπέτας Παστέρ στο εσωτερικό του κάτω άκρου υαλοβάμβακα (μέχρι να καλυφθεί περίπου το 1 /3 του μήκους του Eppendorf). Προσαρμόζουμε το Eppendorf 0,5 ml στο εσωτερικό ενός 1,5 ml Eppendorf. Προσθέτουμε τις ψιλοκομμένες φέτες στο εσωτερικό του

²² Ως εκκινητές είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν είτε ολιγονουκλεοτίδια προκαθορισμένης αλληλουχίας είτε τυχαία εξαμερή.

0,5 ml Eppendorf. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 9-11.000 στροφές ανά λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Στην πράξη κατά την διάρκεια της φυγοκέντρωσης η αγαρόζη θα κατακρατηθεί στον υαλοβάμβακα ενώ το DNA θα διέλθει και θα συσσωρευτεί στο 1,5 ml Eppendorf. Επαναλαμβάνουμε την φυγοκέντρωση μέχρι να σταματήσει να συσσωρεύεται DNA στο Eppendorf. Ακολουθεί τυπικό πρωτόκολλο επεξεργασίας με φαινόλη (phenol extraction) και κατακρήμνιση με αιθανόλη παρουσία αλάτων (ethanol precipitation).

2.19 Ηλεκτροέκλυση (Zassenhaus et al., 1982). Ευδατωμένο τμήμα ημιδιαπερατής μεμβράνης (μεγέθους πόρων που αποκλείει την διέλευση νουκλεοτιδικών σκελετών πάνω από 18 nt) σφραγίζεται εκατέρωθεν ενώ στο εσωτερικό του έχουν εναποτεθεί το τμήμα της αγαρόζης σε ποσότητα TE (0,5 ml). Η κατασκευή με επίδραση πεδίου (30 λεπτά στα 100 V) επιτρέπει την απομάκρυνση του DNA από την αγαρόζη στο περιεχόμενο buffer. Αντιστροφή πόλων για 30 sec στα 100V επιτρέπει την απομάκρυνση του DNA που έχει επικαθίσει στα τοιχώματα της κατασκευής. Extraction με φαινόλη/χλωροφόρμιο επιτρέπει την απομάκρυνση του βρωμιούχου εθιδίου και τον καθαρισμό του δείγματος το οποίο συμπυκνώνεται με ethanol precipitation και επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο TE όπως περιγράφεται αλλού στο κείμενο.

2.20 Σύνδεση (ligation) τμημάτων DNA (Dugaiczky et al., 1975) (Struhl, 1985) (Struhl, 2001). DNA από φορέα απομονωμένο με την κλασσική τεχνική απομόνωσης πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση υφίσταται τεμαχισμό με τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, διαχωρίζεται σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώνεται η κατάλληλη ζώνη και υποβάλλεται σε καθαρισμό από αγαρόζη. Ομοίως τμήμα DNA προς ένθεση υφίσταται επίδραση των αντίστοιχων περιοριστικών ενδονουκλεασών απομονώνεται και καθαρίζεται από αγαρόζη. 50 ng του φορέα αναμειγνύεται με κατάλληλη ποσότητα υποψήφιου ενθέματος ώστε η αναλογία άκρων μορίων φορέα: υποψήφιου ενθέματος να είναι τουλάχιστον 1:3. Το μίγμα της αντίδρασης εκτός από τις απαιτούμενες ποσότητες DNA περιλαμβάνει ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης (30 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT and 1 mM rATP), 1 mg/ml BSA και 4 units ενζύμου T4 DNA λιγάσης (Minotech) σε τελικό όγκο 10 λ. Η αντίδραση της λιγάσης πραγματοποιείται για 2-16 h στους 16 °C (ή 4-8 °C overnight). Για blunt-end ligations επώαση 15-25 °C overnight.

2.21 Κλωνοποίηση με την χρήση ομόλογου (Landy, 1989) ανασυνδυασμού (Αντίδραση BP).

Σε ένα σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης αναμειγνύονται τα ακόλουθα συστατικά : 25 fmol προϊόν PCR και 75 ng φορέας pDONR (Invitrogen). Το Μίγμα ενζύμων (carboxy-6xHis-Intergase, IHF σε 50% γλυκερόλη) ξεπαγώνεται επί πάγου για περίπου 2 λεπτά και

ανακινείται εν συντομία δύο φορές με vortex (2 δευτερόλεπτα, κάθε φορά). Το Μίγμα ενζύμων περιέχει και ρυθμιστικό διάλυμα (1x ρυθμιστικό διάλυμα: 25 mM Tris-HCl pH=7,5, 20 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM σπερμιδίνη, 1 mg/ml BSA). Σε κάθε δείγμα προστίθεται 1 μl Μίγμα ενζύμων /5 μl τελικού όγκου αντίδρασης και ανακατεύουμε καλά με ανακίνηση. Οι αντιδράσεις επωάζονται στους 25 ° C για 1 ώρα έως overnight. Προστίθεται 0,2 mg/ml του διαλύματος πρωτεΐνάσης K σε κάθε δείγμα για τον τερματισμό της αντιδράσεως και τα δείγματα επωάζονται στους 37 ° C για 10 λεπτά. Ακολουθεί μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων.

2.22 Κλωνοποίηση με την χρήση ομόλογου (Landy, 1989) ανασυνδυασμού (Αντίδραση LR).

Σε ένα σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης αναμιγνύονται τα ακόλουθα συστατικά : 150-300 ng Entry clone και 150-300 ng Destination vector. Το Μίγμα ενζύμων (carboxy-6xHis-Intergase, carboxy-6xHis Xis, IHF σε 50% γλυκερόλη) ξεπαγώνεται επί πάγου για περίπου 2 λεπτά και ανακινείται εν συντομία δύο φορές με vortex (2 δευτερόλεπτα, κάθε φορά). Το Μίγμα ενζύμων περιέχει και ρυθμιστικό διάλυμα (1x ρυθμιστικό διάλυμα: 50 mM Tris-HCl pH=7,5, 65 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM σπερμιδίνη, 0,2 mg/ml BSA). Σε κάθε δείγμα προστίθεται 1 μl Μίγμα ενζύμων /5 μl τελικού όγκου αντίδρασης και ανακατεύουμε καλά με ανακίνηση. Οι αντιδράσεις επωάζονται στους 25 ° C για 1 ώρα έως overnight. Προστίθεται 0,2 mg/ml του διαλύματος πρωτεΐνάσης K σε κάθε δείγμα για τον τερματισμό της αντιδράσεως και τα δείγματα επωάζονται στους 37 ° C για 10 λεπτά. Ακολουθεί μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων.

2.23 Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων *E. coli*.

Η μέθοδος αυτή είναι μια τροποποίηση του κλασικού πρωτοκόλλου του Hanahan (Hanahan, 1983; Hanahan et al., 1991) με τροποποιήσεις. Με την βοήθεια αποστειρωμένης λούπας κάνουμε streaking σε πιάτο LB (με τα κατάλληλα αντιβιοτικά π.χ. τετρακυκλίνη στη περίπτωση των X11-blue, χωρίς αντιβιοτικά στην περίπτωση των JM83 ή DH5α ή M9 (6g Na₂HPO₄, 3g KH₂PO₄, 0.5g NaCl, 1g NH₄Cl, 15g Agar/l, pH=7.4 με 5N NaOH, 2 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 0,2 % Glucose) με 1 mM θειαμίνη (JM109) και επωάζουμε για 16 h στους 37 °C. Μοναδιαίες αποικίες μεταφέρονται σε υγρό θρεπτικό για καλλιέργεια μικρής κλίμακας, η οποία αφού επωαστεί overnight με συνεχή ανακίνηση χρησιμοποιείται για inoculation καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας (100 ml) με καλό αερισμό. Η καλλιέργεια επωάζεται στις ίδιες συνθήκες έως ότου η πυκνότητα της καλλιέργειας είναι 6 x 10⁸/ml με 8 x 10⁸/ml (OD₆₀₀=0,6-0,8). Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 4000rpm, για 20 min στους 4 °C αφού προηγηθεί επώαση στον πάγο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

για 20-30 min. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου η πελέττα επαναδιαλύεται με ήπιο vortex σε ice-cold διάλυμα TFBI (30mM potassium acetate, 50mM MnCl₂, 100mM KCl, 10mM CaCl₂, 15% glycerol) και επωάζεται στον πάγο για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και επαναδιάλυση σε ice-cold TFBI (10 mM MOPS, pH=7, 75mM CaCl₂, 10mM KCl, 15% glycerol), διασπορά σε aliquots και ψύξη σε υγρό άζωτο. Τα δεκτικά φυλάσσονται στους -80 °C.

2.24 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων (Hanahan et al., 1991) *E. coli* (JM83, JM109, DH5α ή XL1-Blue). Ποσότητα από το μίγμα της αντίδρασης προστίθενται σε κατάλληλη ποσότητα δεκτικών κυττάρων και επωάζεται για 20 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί θερμικό σοκ για 90 δευτερόλεπτα, επώαση σε πάγο για 2 λεπτά και επώαση στους 37 °C παρουσία θρεπτικού μη επιλεκτικού (χωρίς αντιβιοτικά) με συνεχή ανακίνηση (για 45 λεπτά-2 h). Στην συνέχεια το περιεχόμενο του θρεπτικού κατακρημνίζεται και το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων, αφού επαναδιαλυθεί σε LB με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών, χρησιμοποιείται για την επίστρωση τρυβλίων. Τα τρυβλία επωάζονται για 16 h στους 37 °C. Η επιλογή των θετικών κλώνων πραγματοποιείται είτε με μεταφορά των βακτηριών σε μεμβράνη και υβριδοποίηση με ανιχνευτή που αντιστοιχεί σε τμήμα του ενθέματος, είτε με τυχαία επιλογή κλώνων για απομόνωση DNA και ανάλυση περιοριστικών πρότυπων, είτε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με εκκινητές που εσωκλείονται ή περιβάλλουν το ένθεμα.

Τελική συγκέντρωση	
Αμπικιλίνη	50-100 µg/ml
Καναμυκίνη	50-100 µg/ml
Τετρακυκλίνη	10-15 µg/ml
Στρεπτομυκίνη	100 µg/ml
ΡΙφαμπικίνη	150 µg/ml
Καρβενικιλίνη	100 µg/ml
Στρεπτομυκίνη	25 µg/ml
Γενταμυκίνη	25 µg/ml

Πίνακας 4. Χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών.

2.25 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Birnboim & Doly, 1979). Με αποστειρωμένο στυλεό μεταφέρουμε μια βακτηριακή αποικία σε ποσότητα LB (με τις απαραίτητες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών) και επωάζουμε στους 37 °C με συνεχή ανάδευση για 16h.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Φυγοκεντρούμε το περιεχόμενο της υγρής καλλιέργειας στις 5000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά στους 4 °C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε ποσότητα διαλύματος P1 (50 mM Tris-HCl pH=8,0, 10 mM EDTA) με έντονη ανάδευση. Προσθέτουμε ίσο όγκο P2 (0,2 N NaOH, 1 % SDS) - στόχος του P2 είναι η θραύση κυττάρων-αναδεύουμε ήπια και επωάζουμε 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε ίσο όγκο P3 (3 M οξικό κάλιο pH=5,5), αναδεύουμε προσεκτικά και ήπια και επωάζουμε για 15 λεπτά στον πάγο. Το P3 προστίθεται αφ' ενός για την εξουδετέρωση του P2 και αφ' ετέρου γιατί το SDS με το άλας συνκατακρμνίζουν τις πρωτεΐνες. Φυγοκεντρούμε στις 10000 στροφές για 5-15 λεπτά ώστε να κατακαθίσουν οι πρωτεΐνες και συλλέγουμε το υπερκείμενο αφού το φιλτράρουμε με την βοήθεια υαλοβάμβακα. Προσθέτουμε 2 νοί απόλυτη παγωμένη (-20 °C) αιθανόλη (εναλλακτικά 0,8 όγκους ισοπροπανόλης) και επωάζουμε για 5-15 λεπτά στους -80 °C (ή 30 λεπτά στους -20 °C). Φυγοκεντρούμε στις 12000 στροφές ανά λεπτό για 30 λεπτά στους 4 °C, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα αιθανόλη 70 %. Αναδεύουμε, φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου (ή με λυοφιλοποίηση). Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε αποστειρωμένο νερό (>100 λ) ή TE (1 mM EDTA /10 mM Tris-HCl, pH=8) και προσθέτουμε RNase A (τελική συγκέντρωση 100 μg/μl) με επώαση για μίση ώρα στους 37 °C. Προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης, κάνουμε ένα απαλό vortexing (1-2 sec) και φυγοκεντρούμε στις 3000-8000 στροφές ανά λεπτό για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Συλλέγουμε την υδατική φάση και επαναλαμβάνουμε την διαδικασία με την φαινόλη. Εναλλακτικά χρησιμοποιούμε μίγμα φαινόλη :χλωροφόρμιο:ισοαμυλική με αναλογία όγκων 25:24:1 και συνολικού όγκου ίσου με το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης. Συλλέγουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 2 όγκους μίγματος χλωροφόρμιου:ισοαμυλικής (αναλογία όγκων 24:1), φυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες και συλλέγουμε την υδατική φάση. Προσθέτουμε 2,5 όγκους απόλυτης παγωμένης αιθανόλης, 1/10 του όγκου οξικό νάτριο 3 M (pH=5,2) και ψύχουμε στους -80 °C για 5-15 min ή 30 λεπτά στους -20 °C. Φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στους 4 °C (ψυχόμενη φυγόκεντρος) στις 12.000 στροφές ανά λεπτό, αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα αιθανόλη 70 % (παγωμένη). Φυγοκεντρούμε, απομακρύνουμε υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε το ίζημα σε αποστειρωμένο νερό (<100 λ) .

Συνήθως για μικρής κλίμακας καλλιέργειες χρησιμοποιείται μια παραλλαγή του παραπάνω πρωτοκόλλου που συνοπτικά περιλαμβάνει την επαναδιάλυση της πελλέτας σε διάλυμα Solution I (50 mM Tris-HCl pH=8,0, 10 mM EDTA παρουσία γλυκόζης), επώαση του

επανεωρήματος για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία διαλύματος Solution II (0,2 N NaOH, 1 % SDS), προσθήκη Solution III (5 M οξικό κάλιο pH=4,8), στιγμιαία έντονη ανακίνηση και επώαση στον πάγο για 5 λεπτά, φυγοκέντρηση (δυο διαδοχικές φορές) στις 14000 στροφές για 3-5 λεπτά, extraction του υπερκειμένου με ίσο φαινόλης:χλωροφορμίου και στην συνέχεια με δυο όγκους χλωροφορμίου. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει κατακρήμνιση της υδατικής φάσης με 2 vol απόλυτης αιθανόλης με επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 2 λεπτά και επαναδιάλυση της πελλέτας αφού προηγηθεί έκπλυση με 70 % αιθανόλη και στέγνωμα.

2.27 Τόπο-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγενεση που διευκολύνεται από επιλογή με DpnI για το μεθυλιωμένο και ημι-μεθυλιωμένο DNA (QuikChange, Agilent Technologies Genomics).

Η αντίδραση κάθε δείγματος περιλαμβάνει:

1 X **ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης** [10 mM KCl, 6 mM(NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM MgCl₂, 0,1% Triton[®]X-100, 10 μg/ml nuclease-free bovine serum albumin (BSA)]
10-50ng dsDNA πλασμιδιακό DNA²³

125 ng του μεταλλαξιγόνου ολιγονουκλεοτιδικού εκκινητή # 1

125 ng του συμπληρωματικού μεταλλαξιγόνου ολιγονουκλεοτιδικού εκκινητή # 2

0,25 mM μείγματος dNTPs

3% DMSO

2,5 u DNA πολυμεράσης Pfu

Παράμετροι ενίσχυσης: Αρχικό στάδιο αποδιάταξης 95°C /1 min, ακολουθούμενο από 18 κυκλους²⁴ με σταδια α) 95°C /50 seconds , β) 60°C /50 seconds, γ) 68°C/ 1 min/kb of plasmid length) και ένα τελικό στάδιο 68°C /7 min.

Μετά την ολοκλήρωση των κύκλων, τα σωληνάρια αντίδρασης τοποθετούνται σε πάγο επί 2 λεπτά για να ψυχθούν οι αντιδράσεις σε ≤ 37 ° C και προστίθενται 10 u του ενζύμου περιορισμού DpnI. Οι αντιδράσεις επωάζονται στους 37 ° C για 1-2 ώρες για να

²³ Στην δοκιμαστική αντίδραση του δείγματος χρησιμοποιούμε 10 ng πλασμιδιακού dsDNA. Εάν η αρχική αντίδραση είναι ανεπιτυχής χρησιμοποιούμε διάφορες συγκεντρώσεις πλασμιδιακού dsDNA που κυμαίνονται από 5 έως 50 ng (π.χ. , 5 , 10 , 20 , και 50 ng του πλασμιδιακού dsDNA) διατηρώντας παράλληλα σταθερή συγκέντρωση εκκινητών.

²⁴ Περισσότεροι από 18 κύκλους μπορεί να έχουν επιβλαβή αποτελέσματα για την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης.

αφομοιωθεί το γονικό (δηλαδή το μη μεταλλαγμένο) υπερελικομένο dsDNA. Ακολουθεί μετασχηματισμός της αντίδρασης σε δεκτικά κύτταρα (π.χ. DH10B), επίστρωση σε τρυβλία Petri και έλεγχος αποικιών.

2.28 Τόπο-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγενεση με αλλαγμένη θέση ενζύμου περιορισμού (Braman et al., 1996).

Φωσφοριλίωση στο 5'-άκρο εκκινητών: Σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρου προστίθενται τα ακόλουθα αντιδραστήρια: 100 μ mol ολιγονουκλεοτιδίων, 1X Ρυθμιστικό Διάλυμα Κινάσης, 1mM ATP, 100 μ g/ml BSA, 5U T4 πολυνουκλεοτιδική κινάση σε τελικό όγκο των 25 λ . Η αντίδραση επώάζεται στους 37 °C για 30-60 λεπτά. Στην συνέχεια, η αντίδραση επώάζεται στους 70 °C για 10 λεπτά για την απενεργοποίηση της T4 Πολυνουκλεοτιδικής Κινάσης. Τα προϊόντα της αντίδρασης μπορούν να αποθηκευτούν στους -20 °C ή προστίθενται απευθείας στο επόμενο στάδιο.

Αποδιάταξη σε αλκαλικές συνθήκες του πλασμιδίου προς μεταλλαξιγένεση: Αναμιγνύονται 0,25 μ mol του πλασμιδίου προς μεταλλαξιγένεση σε x όγκο νερού με ίσο όγκο Denaturation solution (0,4 N KOH, 10 mM EDTA) και το μείγμα επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Προστίθεται όγκος Neutralization solution (0,4 N HCl, 0,6 M Tris-HCl pH=7,5) ίσος με τον όγκο του Denaturation solution και η αντίδραση μεταφέρεται σε πάγο.

Το ολιγονουκλεοτίδιο επιλογής και μεταλλαξιογόνο ολιγονουκλεοτίδιο προσδένονται στο πλασμιδιακό DNA διπλής έλικος στόχου σε μια αντίδραση που περιλαμβάνει:

A) 0,25 μ mol του πλασμιδίου προς μεταλλαξιγένεση που έχει αποδιαταχθεί σε αλκαλικές συνθήκες όπως περιγράφεται στο προηγούμενο στάδιο,

B) 25 μ mol του εκκινητή επιλογής που έχει φωσφοριωθεί στο 5'-ακρο όπως περιγράφεται σε προηγούμενο στάδιο,

C) 25 μ mol του μεταλλαξιογόνο εκκινητή που έχει φωσφοριωθεί στο 5'-ακρο όπως περιγράφεται σε προηγούμενο στάδιο,

D) 1X ρυθμιστικό διάλυμα μεταλλαξιγένεσης KGB (100 mM potassium glutamate, 25 mM Tris-acetate (pH7.6), 10 mM magnesium acetate, 100 μ g/ml BSA, 0,5 mM 2-mercaptoethanol).

Τα σωληνάκια μικροφυγοκέντρου τοποθετούνται σε προθερμασμένο (στους 37 °C) υδατόλουτρο για 10 λεπτά. Ακολουθεί σύντομη φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο για τη συλλογή του συμπυκνώματος και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10-20 λεπτά προτού τοποθετηθούν σε πάγο. Σε κάθε σωληνάριο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

μικροφυγοκέντρου προστίθεται ποσότητα του μίγματος dNTPs σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Το μίγμα δεοξυνουκλεοτιδίων πρέπει να προστίθεται στην αντίδραση πριν την προσθήκη ενζύμου. Διαφορετικά, η ενεργότητα 3'-5'-εξωνουκλεάσης της φυσικής T7 DNA πολυμεράση θα εποικοδομήσει τους εκκινητές. Επιπρόσθετα προστίθενται 250 μg/ml BSA, 10 U T7 DNA polymerase ή 5U T4 DNA polymerase και ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος KGB ώστε η τελική συγκέντρωση του στην αντίδραση να εξακολουθεί να είναι 1X.

Τα σωληνάρια μικροφυγοκέντρωσης επωάζονται στους 37 °C για 1,5-2 ώρες.

Η T7 DNA πολυμεράση και η T4 DNA λιγάση αδρανοποιούνται με επώαση στους 70-75°C για 10 λεπτά (T4 DNA λιγάση)-15 λεπτά (T7 DNA πολυμεράση) και οι αντιδράσεις ψύχονται έως ότου φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Στην συνέχεια προστίθεται rATP σε τελική συγκέντρωση 1 mM, 250 μg/ml BSA και 4 U T4 DNA ligase. Τα σωληνάρια μικροφυγοκέντρωσης επωάζονται στους 25 °C για 16 ώρες. Η T4 DNA ligase αδρανοποιείται με επώαση στους 70°C για 10 λεπτά και οι αντιδράσεις ψύχονται έως ότου φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Αφού οι αντιδράσεις έχουν ψυχθεί, ακολουθεί πέψη με ένα ένζυμο περιορισμού για να εξαλειφθούν τα πλασμίδια στα οποία δεν έχει αναδιαταχθεί το ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή επιλογής. Η αντίδραση περιλαμβάνει την προσθήκη 20 U του ενζύμου περιορισμού και 100 μg/ml BSA αφού ρυθμιστεί και η κατάλληλη συγκέντρωση KGB για το ένζυμο περιορισμού²⁵. Η αντίδραση επωάζεται στους 37 °C για 1-2 ώρες. Ακολουθεί μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων mutS κατά τα γνωστά και επώαση υγρών καλλιεργειών overnight στους 37 °C²⁶.

Ακολουθεί μικρής κλίμακας απομόνωση DNA με την χρήση κολώνων Qiaprep (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και πέψη με το ίδιο (με το προηγούμενο στάδιο) ένζυμο περιορισμού του πλασμιδιακού DNA κατά τα γνωστά. Τα προϊόντα της πέψης χρησιμοποιούνται για αντίδραση μετασχηματισμού δεκτικών κυττάρων DH10B. Σε περίπτωση που απαιτείται εκ νέου εμπλουτισμός σε μεταλλαγμένο πλασμίδιο ακολουθεί και ένας επιπλέον κύκλος απομόνωσης πλασμιδιακού DNA, πέψης και μετασχηματισμού δεκτικών κυττάρων DH10B. Τελικά, τα μετασχηματισμένα βακτήρια απλώνονται σε τρυβλία Petri, τα τρυβλία Petri επωάζονται overnight στους 37 °C, λαμβάνονται μοναδιαίες αποικίες και η πιστοποίηση των θετικών σημάτων πραγματοποιείται με απομόνωση πλασμιδιακού DNA και πέψεις με ένζυμο περιορισμού.

²⁵ Προκειμένου να αποφευχθεί η αναστολή λόγω της συγκέντρωσης γλυκερόλης, η ποσότητα του ενζύμου περιορισμού δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10 % του συνολικού όγκου πέψης αντίδρασης.

²⁶ Μέρος της αντίδρασης μετασχηματισμού επιστρώνεται σε τρυβλία Petri που επωάζονται στους 37 °C overnight για την εκτίμηση της επιτυχίας της αντίδρασης.

2.29 Δημιουργία ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών σε αντιβιοτικά.

Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία ανθεκτικότητας στην Ριφαμπικίνη (Rifampicin) Αγροβακτηριακών στελεχών αγρίου τύπου. Σε 10ml υγρής βακτηριακής καλλιέργειας προσθέτουμε 5μg/ml Rifampicin και αφήνουμε σε επωαστήρα ανάδευσης περίπου 48-60 ώρες. Μετά το διάστημα αυτό παίρνουμε 5μl από την καλλιέργεια και τα προσθέτουμε σε υγρό καλλιέργειας στο οποίο έχουμε προσθέσει Rifampicin 10μg/ml (διπλάσια συγκέντρωση από προηγούμενως) και αφήνουμε για επώαση 48 ώρες. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται με συνεχή αύξηση της συγκέντρωσης της Rifampicin (15μg/ml, 20μg/ml, 30μg/ml κτλ) έως ότου φτάσουμε την συγκέντρωση της Rifampicin στην καλλιέργεια στα 80-100 μg/ml. Κατόπιν με μια βακτηριακή λούπα παίρνουμε από την βακτηριακή καλλιέργεια και απλώνουμε σε Petri με θρεπτικό και 80-90μg/ml Rifampicin. Από το Petri αυτό επιλέγουμε μοναδιαίες αποικίες τις οποίες καλλιεργούμε και διατηρούμε ως stock, σε μικροφουαλίδια με 15 % γλυκερόλη στους -80 οC.

2.30 Γενετική τροποποίηση *Agrobacterium*.

Κατά την διάρκεια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε το αγροβακτηριακό στέλεχος C58C1. Εναλλακτικά, χρησιμοποιήθηκαν και άλλα τρία διαφορετικά στελέχη *Agrobacterium*: το LBA4404 το οποίο φέρει το βοηθό πλασμίδιο pAL4404 (Streptomycin/Rifampicin resistance), το GV3101 που φέρει το βοηθό πλασμίδιο pMON (Rifampicin/Gentamycin resistance) και το GV3101 τροποποιημένο ώστε να έχει το πλασμίδιο pSoup²⁷ (Hellens et al., 2000). Το τελευταίο χρησιμοποιήθηκε για τα βασισμένα σε pGreen ανασυνδυασμένα πλασμίδια του pTV00 (Ratcliff et al., 2001). Τρεις διαφορετικές μέθοδοι γενετικού μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκαν εναλλακτικά ανά περίπτωση.

2.30.1 Τριγονική σύζευξη (Triparental mating). Ακολουθήθηκε το κλασικό πρωτόκολλο (Ditta et al., 1980; Fraley et al., 1983) με τροποποιήσεις. Από πρόσφατο streaking, εμβολιάζονται αποικίες μετασχηματισμένου με ανασυνδυασμένο δυαδικού (binary) φορέα *E. coli* (100 μg/ml Spectinomycin για τα pART27 βασιζόμενα πλασμίδια, 100 μg/ml Kanamycin για τα pGreen βασιζόμενα πλασμίδια), παράλληλα με *E. coli* μετασχηματισμένο με το βοηθητικό πλασμίδιο pRK2013²⁸ (Figurski & Helinski, 1979) ή pRK600 (Kessler et al., 1992). Ταυτόχρονα εμβολιάζεται καλλιέργεια με ένα κατάλληλο

²⁷ Rifampicin, Tetracycline resistance

²⁸ 100 μg/ml Kanamycin

στέλεχος *Agrobacterium* (150 µg/ml Rifampicin). Οι τρεις καλλιέργειες αφού αναπτυχθούν για τουλάχιστον 12 h αναμειγνύονται (50-100 λ από την καθεμία) και χρησιμοποιούνται για την δημιουργία κηλίδων (30 λ η καθεμία) πάνω σε στερεό LB απουσία αντιβιοτικών. Το τρυβλίο επωάζεται για 12 h στους 28 °C. Ποσότητα από την κηλίδα διαλύεται σε υγρό LB και χρησιμοποιείται για την επίστρωση τρυβλίου με Rifampicin (150 µg/ml) και αντιβιοτικό για το οποίο έχει γονίδιο ανθεκτικότητας ο δυαδικός (binary) φορέας. Μετά την διέλευση δυο ημερών στους 28 °C, οι ανθεκτικές αποικίες αντιπροσωπεύουν τα επιτυχή αποτελέσματα του μετασχηματισμού.

2.30.2 Ψύξη-Απόψυξη (Freeze-throw). Καλλιέργεια (overnight στους 28 °C) μικρής κλίμακας (που προήλθε από εμβολιασμό μοναδιαίας αποικίας από πρόσφατα παρασκευασμένο πιάτο από streaking) σε LB-Rifampicin στελέχους *Agrobacterium* που φέρει το απαραίτητο T_i βοηθό πλασμίδιο χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό μεγάλης κλίμακας καλλιέργειας (100 ml σε φλάσκα 1 L), η οποία αναπτύσσεται στους 28 °C με συνεχή ανάδευση μέχρι η πυκνότητα των κυττάρων να γίνει 5×10^8 - 10^9 κύτταρα/ml. Η καλλιέργεια αφού διατηρηθεί στον πάγο για 15 min, συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C και η πελέττα επαναδιαλύεται σε 1ml/10ml όγκου καλλιέργειας 20 mM CaCl₂ (ice-cold). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, επαναδιάλυση της πελέττας σε 2ml/100 ml καλλιέργειας 20 mM CaCl₂/10% γλυκερόλη, άμεση ψύξη σε υγρό άζωτο μετά από δημιουργία aliquots (σε προψυγμένα Eppendorf tubes) και διατήρηση στους -80 °C. Ποσότητα αποψυγμένων σε πάγο κυττάρων αναμειγνύεται με 1 µg πλασμιδίου και καταψύχεται ακαριαία σε υγρό άζωτο για 5 λεπτά. Ακολουθεί απόψυξη για 25 λεπτά στους 37 °C, προσθήκη ποσότητας υγρού θρεπτικού και επώαση με ανακίνηση στους 28 °C για 3-4 h. Ακολουθεί συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντρηση σε χαμηλές στροφές, επαναδιάλυση σε μικρό όγκο υγρού θρεπτικού και επίστρωση τρυβλίων θρεπτικού με τα απαραίτητα αντιβιοτικά (Tzfira et al., 1997).

2.30.3 Ηλεκτροπόρωση (electroporation). Η μέθοδος που περιγράφεται εδώ είναι σύμφωνα με υποδείξεις που περιγράφονται αλλού (Dower et al., 1988) με τις κατάλληλες τροποποιήσεις (Lu et al., 2003) και χρησιμοποιείται για την παρασκευή δεκτικών κυττάρων είτε *E. coli*, είτε *Agrobacterium*. Καλλιέργεια μικρής κλίμακας –προερχόμενη από μοναδιαία αποικία- και αναπτυγμένη στους 37 °C (overnight) με συνεχή ανακίνηση χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό καλλιέργειας 0,5 L (2 L φλάσκα). Η καλλιέργεια αναπτύσσεται μέχρι οπτικής πυκνότητας 5×10^8 κύτταρα/ml και αφού διατηρηθεί σε πάγο για 20 λεπτά, συλλέγεται με φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 15 λεπτά στους 4 °C. Η πελέττα επαναδιαλύεται σε ice-cold αποστειρωμένο νερό (2x αρχικού όγκου καλλιέργειας) και επανασυλλέγεται με φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία

της έκπλυσης με αποστειρωμένο νερό στις ίδιες συνθήκες -για την απομάκρυνση αλάτων που μπορούν να δημιουργήσουν βραχυκυκλώματα σε μετέπειτα στάδιο- και μετά την συλλογή της με φυγοκέντρηση, επαναδιαλύεται σε 10 % γλυκερόλη (1/10 αρχικού όγκου καλλιέργειας). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και επαναδιάλυση των κυττάρων σε τελική πυκνότητα 2×10^{11} κύτταρα/ml. Τα κύτταρα διασπείρονται σε προψυγμένα aliquots, καταψύχονται σε υγρό άζωτο και διατηρούνται στους $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Αποψυγμένα σε πάγο κύτταρα αναμειγνύονται με 1 μg πλασμιδιακού DNA (pg στην περίπτωση μετασηματισμού δεκτικών *E. coli* ή ποσότητα από αντίδραση συγκόλλησης άκρων) μεταφέρονται στην κατάλληλη κυψελίδα σε στείρες συνθήκες και υφίστανται μετασηματισμό στις ακόλουθες συνθήκες (2,3 KV, 25 μF, 200 Ω, Time constant= 5-5,2 ms). Στην συνέχεια μεταφέρονται σε ice-cold LB (απουσία αντιβιοτικών) και επώάζονται για 2-4 h στους $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ στο *E. coli*). Αφού συλλεγούν και συμπυκνωθούν με φυγοκέντρηση και επαναδιάλυση σε μικρότερο όγκο υγρού θρεπτικού χρησιμοποιούνται για την επίστρωση τρυβλίων με τα απαραίτητα αντιβιοτικά.

2.31 Μικρής κλίμακας απομόνωση πλασμιδιακού DNA από αγροβακτήριο (Cooley et al., 1991) κατάλληλο για πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

1. Ποσότητα πλούσιου θρεπτικού (LB, YT, ή Terrific Broth) που περιέχει το κατάλληλο αντιβιοτικό εμβολιάζεται με μια απλή αποικία μετασηματισμένων βακτηρίων. Η καλλιέργεια επώάζεται στους $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ με έντονη ανακίνηση μέχρι του σημείου κορεσμού της καλλιέργειας. **Πραγματοποιείται αραιώση 1:5 της καλλιέργειας σε φρέσκο θρεπτικό με 150 μg/ml Καρβενικιλίνη και επώαση στους $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ για 2 ώρες με στόχο να εξασθενήσουν τα κυτταρικά τοιχώματα.**

2. Το σύνολο της καλλιέργειας μεταφέρεται σε ένα σωλήνα μικροφυγοκέντρου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου σε μία μικροφυγόκεντρο. Προαιρετικά για την διευκόλυνση της θραύσης των κυττάρων μπορεί να ακολουθήσει στάδιο ψύξης-απόψυξης.

3. Το υπερκείμενο αφαιρείται με αναρρόφηση, αφήνοντας το βακτηριακό ίζημα όσο το δυνατόν πιο στεγνό.

4. Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 200 μl παγωμένου διαλύματος αλκαλικής λύσης I (50 mM glucose (MW 180), 10mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH=8) με ισχυρή περιδίνηση. **Προστίθενται 100 λ λυσοζύμης (10 mg/ml) και ακολουθεί επώαση στους $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ για μια ώρα με περιστασιακή ανάδευση.**

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5. Προστίθεται **600** ml προσφάτως παρασκευασθέντος διαλύματος Αλκαλικής λύσης II (0.2 N NaOH, 1% SDS) σε κάθε βακτηριακό εναιώρημα. Το σωληνάριο κλείνεται ερμητικά και αναμειγνύεται το περιεχόμενο αναποδογυρίζοντας το σωλήνα γρήγορα πέντε φορές.
6. Ο σωλήνας αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min, μεταφέρεται σε πάγο και προστίθεται **450** ml παγωμένου διαλύματος αλκαλικής λύσης III (5 M potassium acetate, pH=4,8). Ο σωλήνας κλείνεται και αναστρέφουμε τον σωλήνα αρκετές φορές για να ομογενοποιηθεί το παχύρρευστο βακτηριακό κυτταρόλυμα. Αποθηκεύουμε το σωλήνα σε πάγο για 3-5 λεπτά .
7. Φυγοκεντρούμε το βακτηριακό λύμα σε μέγιστη ταχύτητα (12500 rpm) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε μία μικροφυγόκεντρο. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε ένα φρέσκο σωλήνα, επαναφυγοκεντρούμε στις ίδιες συνθήκες και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε ένα φρέσκο σωλήνα.
8. Προσθέτουμε ένα ίσο όγκο φαινόλης : χλωροφορμίου . Αναμειγνύουμε τις οργανικές και υδατικές φάσεις με στροβιλισμό και κατόπιν φυγοκεντρούμε το γαλάκτωμα για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε μία μικροφυγόκεντρο . Μεταφέρουμε την υδατική άνω φάση σε ένα φρέσκο σωλήνα, προσθέτουμε ίσο όγκο χλωροφορμίου και επαναλαμβάνουμε την φυγοκέντρηση. Μεταφέρουμε την υδατική άνω φάση σε ένα φρέσκο σωλήνα.
9. Τα νουκλεϊκά οξέα καταβυθίζονται από το υπερκείμενο με την προσθήκη 2 όγκων αιθανόλης (ή 0,8 όγκων ισοπροπανόλης) σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα Αναμειγνύεται με στροβιλισμό και στη συνέχεια το μείγμα επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Τα καταβυθισθέντα νουκλεϊκά οξέα συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά στους 4 ° C σε μία μικροφυγόκεντρο .
11. Το υπερκείμενο απομακρύνεται με ήπια αναρρόφηση, όπως περιγράφεται στο βήμα 3 παραπάνω.
12. Προστίθεται 1 ml 70 % αιθανόλης στο ίζημα και ο κλειστός σωλήνας αναστρέφεται αρκετές φορές. Το DNA ανακτάται με φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά στους 4 ° C σε μία μικροφυγόκεντρο .
13. Απομακρύνει όλο το υπερκείμενο με ήπια αναρρόφηση όπως περιγράφεται στο Στάδιο 3.
14. Αφαιρούνται τυχόν σφαιρίδια αιθανόλης που σχηματίζονται στις πλευρές του σωλήνα . Ο ανοικτός σωλήνας αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου έχει εξατμιστεί η αιθανόλη (5-10 λεπτά) .
15. Τα νουκλεϊκά οξέα επαναδιαλύονται εντός 50 μl TE (pH=8,0) που περιείχε 20 μg/ml DNase-free RNase A (pancreatic RNase). Το διάλυμα του DNA αποθηκεύεται στους -20 ° C.

2.32 Αγροένχυση (Agroinfiltration) (Lu et al., 2003; Schöb et al., 1997; Wroblewski et al., 2005; Yang et al., 2000) .

Εμβολιάζονται μοναδιαίες αποικίες ανασυνδυασμένων κλώνων *Agrobacterium* σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας LB με τα απαραίτητα αντιβιοτικά (100 µg/ml στρεπτομυκίνη στην περίπτωση pART27 βασιζόμενου κλώνου, 100 µg/ml καναμυκίνη σε περίπτωση pGreen/pTVOO/pBIN19/pBINTRA6 βασιζόμενου πλασμιδίου, 150 µg/ml Ριφαμπικίνη, 12,5 µg/ml τετρακυκλίνη στην περίπτωση pSoup μετασηματισμένου στελέχους αγροβακτηρίου) με 20 µM ακετοσυριγκόνη και επωάζονται για 1,5 -3 μέρες στους 28 °C με συνεχή ανακίνηση. Στην συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύονται σε ίσο όγκο 10 mM MES pH=5,6 (σε MS, η σύσταση του MS παρατίθεται παρακάτω) με 200 µM ακετοσυριγκόνη. Αφού επωαστούν στους 28 °C για 1-3h με συνεχή ανακίνηση, επανασυλλέγονται με φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και επαναδιαλύονται σε 10 mM MgCl₂. Επαναφυγοκεντρούνται στις ίδιες συνθήκες και η διαδικασία επαναλαμβάνεται δυο ακόμη φορές. Τελικά επαναδιαλύονται σε τελική πυκνότητα 10⁸ κύτταρα/ml στην περίπτωση ανασυνδυασμένων πλασμιδίων που φέρουν μολυσματικά cDNA ιών ή σε 4 x 10⁸/κύτταρα/ml στις υπόλοιπες περιπτώσεις. Στην περίπτωση που απαιτείται από το πείραμα (όπως στην περίπτωση pTVOO/pBINTRA6) γίνεται αγροένχυση με περισσότερα από ένα στελέχη τα οποία αναμειγνύονται σε ίσες ποσότητες.

Με την βοήθεια αιχμηρού αντικειμένου δημιουργείται οπή στην κάτω επιφάνεια του φύλλου στην οποία προσαρμόζεται σύριγγα χωρίς αιχμηρό άκρο η οποία περιέχει το επαναιώρημα του *Agrobacterium* και το οποίο ενχύεται στους μεσοκυττάριους χώρους. Τα φυτά τοποθετούνται σε 16 day/8 night φωτοπερίοδο, στους 23/19 °C για δυο μέρες, συνθήκες που υποβοηθούν την μόλυνση με *Agrobacterium* πριν μεταφερθούν σε συνθήκες θερμοκηπίου.

MS (Murashige & Folke, 1962)

(pH=5,7)

1. ΜΑΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ

NH₄NO₃	82,5 mM
KNO₃	18,8 mM
CaCl₂·2H₂O	3 mM
MgSO₄·7H₂O	1,5 mM
KH₂PO₄	1,4 mM

2. Μικροστοιχεία

KI	5 μ M
H ₃ BO ₃	100 μ M
MnSO ₄ .4H ₂ O	109 μ M
ZnSO ₄ .7H ₂ O	30 μ M
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,2 μ M
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,1 μ M
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,1 μ M

3. BITAMINEΣ

Biotin	0,004 μ M
Nicotinic acid	4 μ M
Pyridoxine	2,5 μ M
Thiamine	1,5 μ M
D-Pantothenic acid	2,125 μ M
Myoinositol	5,5 μ M

- Fe Na EDFS 1,17 mM
- Σακχαρόζη 30 gr/l
- Άγαρ 7 gr/l

2.33 Απομόνωση ολικού RNA από ιστό (Carpenter & Simon, 1998). Σε ομογενοποιητή προσθέεται το δείγμα από τον ιστό (διατήρηση σε υγρό άζωτο) και κατάλληλη ποσότητα διαλύματος ομογενοποίησης (0.1 M LiCl, 100 mM Tris/HCl pH=8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS) ώστε να μην είναι ιξώδες το δείγμα και ομογενοποιείται. Στην συνέχεια προστίθεται 1/10 vol 2 M Οξικό νάτριο pH=4 και 1 vol όξινη φαινόλη²⁹ και ανακινούμε έντονα (vortex) για 10 λεπτά. Προσθέτουμε 1/5 όγκου (όπου 1 όγκος ο όγκος του δείγματος πριν από την προσθήκη όξινης φαινόλης) μίγματος χλωροφορμίου:ισοαμυλικής (24:1) και επαναλαμβάνουμε την διαδικασία της έντονα ανακίνησης (vortex) για 5 λεπτά. Επιάζουμε

²⁹ Παρασκευή Όξινης φαινόλης: Φαινόλη σε στερεή μορφή προστίθεται σε ένα πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα 50 ml και διαλύεται τοποθετώντας την για 15 λεπτά σε προθερμασμένο υδατολουτρο στους 65 ° C. Παράλληλα πραγματοποιείται αραίωση 2 M οξικό νάτριο (pH=4,0) σε τελική συγκέντρωση 50 mM και ανάδευση με το χέρι μέχρι ομογενοποίησης. Ακολουθεί προσθήκη στην φαινόλη ίσου όγκου 50 mM οξικό νάτριο, φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προσθήκη στο υποκείμενο ίσου όγκου 50 mM οξικό νάτριο pH=4, και αφού προηγηθεί ανάδευση, ήπια φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει απόρριψη υπερκευμένου αφήνοντας μόνο λίγο ώστε να καλύπτει την φαινόλη και να αποφεύγεται η οξείδωση της τελευταίας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

για 15 min στον πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές ανά λεπτό για 20 λεπτά στους 4 °C και λήψη της υπερκείμενης φάσης. Στην υπερκείμενη φάση προστίθεται 1 όγκος ουδέτερης φαινόλης και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της έντονης ανακίνησης (vortex) για 10 λεπτά ακολουθούμενη από προσθήκη 1/5 του όγκου του υπερκείμενου της φυγοκέντρησης χλωροφόρμιο: ισοαμυλική (24:1) και έντονη ανακίνηση (vortex) για 5 λεπτά. Το δείγμα επωάζεται ξανά σε πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρείται στις 13000 στροφές ανά λεπτό για 20 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο κατακρημνίζεται με προσθήκη 2.5 vol απόλυτη παγωμένη αιθανόλη (ή 1 vol ισοπροπανόλης), επώαση στους -80 °C για 30 λεπτά (είτε στην περίπτωση της ισοπροπανόλης στους 20 °C για 1-2 h) και φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στους 4 °C στις 13000 στροφές ανά λεπτό. Το ίζημα ξεπλένεται με 75% αιθανόλη και επαναλαμβάνεται η διαδικασία της φυγοκέντρησης στις ίδιες συνθήκες. Το ίζημα στεγνώνεται σε πάγο και επαναδιαλύεται σε διπλά αποστειρωμένο νερό. Προστίθεται LiCl σε τελική συγκέντρωση 2M και το δείγμα επωάζεται στους -20 °C overnight. Το ίζημα συγκεντρώνεται με φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 30 λεπτά στους 4 °C. Η πελέττα είναι εμπλουτισμένη σε mRNA και rRNA ενώ το υπερκείμενο σε μικρά RNA, tRNA και γενωμικό DNA. Η πελέττα επαναδιαλύεται σε TE και επανακατακρημνίζεται με 1/9 vol οξικό νάτριο pH=6,1 και 2 vol απόλυτη παγωμένη αιθανόλη, επώαση στους -20 °C για 1h-overnight και φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 30 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα ξεπλένεται με 70 % αιθανόλη, στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε TE. Φυλάσσεται στους -80 °C.

2.34 Ταυτόχρονη απομόνωση DNA, RNA και πρωτεϊνών από φυτικό ιστό (Chomczynski, 1993, Chomczynski & Sacchi, 1987, Kingston et al., 2001).

Η ακόλουθη μέθοδος είναι μια τροποποίηση του γενικού πρωτοκόλλου απομόνωσης RNA με Guanidine thiocyanate που περιγράφηκε προηγουμένως (Chomczynski & Sacchi, 1987).

	Διάλυμα Εκχύλισης	
Αντιδραστήρια	Τελική Συγκέντρωση	Ποσότητα ανά λίτρο
Acid Phenol	38 %	380 ml
Guanidine thiocyanate	0.8 M	118.16 g
Ammonium thiocyanate	0.4 M	76.12 g
Sodium acetate pH 5.0	0.1 M	33.4 ml of 3 M stock
Glycerol	5 %	50 ml
DEPC-Water	Adjust the final volume to 1 L	

Κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης και της λύσης του δείγματος, το Διάλυμα Εκχύλισης διατηρεί την ακεραιότητα του RNA ενώ επιφέρει διατάραξη των κυττάρων και

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

διάλυση κυτταρικών συστατικών. Η προσθήκη χλωροφορμίου που ακολουθείται από φυγοκέντρηση διαχωρίζει το διάλυμα σε μία υδατική φάση και μία οργανική φάση. Το RNA παραμένει αποκλειστικά στην υδατική φάση. Μετά την μεταφορά της υδατικής φάσης, το RNA ανακτάται με καταβύθιση με ισοπροπυλική αλκοόλη. Μετά την απομάκρυνση της υδατικής φάσης, το DNA και οι πρωτεΐνες στο δείγμα μπορούν να ανακτηθούν με διαδοχική κατακρήμνιση. Κατακρήμνιση με αιθανόλη αποδίδει DNA στην μεσόφαση, και μια επιπλέον κατακρήμνιση με ισοπροπυλική αλκοόλη αποδίδει πρωτεΐνες από την οργανική φάση.

Τα δείγματα ιστού ομογενοποιούνται σε 2 ml Διαλύματος Εκχύλισης ανά 50-100 mg ιστού και έντονη ανακίνηση (vortex) για 30 sec (x4).

ΦΑΣΗ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

- 1 . Τα ομογενοποιημένα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά στους 4 °C για να επιτραπεί η πλήρης διάσπαση των συμπλοκών νουκλεοπρωτεΐνης.
2. Ακολουθεί προσθήκη 0,5 ml χλωροφορμίου ανά 2 ml ml Διαλύματος Εκχύλισης. Οι σωλήνες ανακινούνται ζυηρά με vortex για 30 δευτερόλεπτα και επωάζονται στους 4 ° C για 5 λεπτά.
- 3 . Τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε όχι περισσότερο από 8.000 × g για 10 λεπτά στους 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρηση, το μίγμα διαχωρίζεται σε μία κατώτερη με φαινόλη-χλωροφόρμιο φάση, μία μεσόφαση, και ένα άχρωμο ανώτερη υδατική φάση. Το RNA παραμένει αποκλειστικά στην υδατική φάση.

ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ RNA

- 1 . Η υδατική φάση Μεταφέρεται σε έναν καθαρό σωλήνα, και η οργανική φάση φυλάσσεται, εάν η απομόνωση του DNA ή πρωτεΐνης είναι επιθυμητή. Στην υδατική φάση προστίθεται ίσος όγκος ουδέτερης φαινόλης, ακολουθεί vortex για 30 sec (x2), φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως και συλλογή της υδατικής φάσης.
- 2 . Το RNA Καθιζάνει από την υδατική φάση με ανάμιξη με 0,5 ml (0,8v) ισοπροπυλική αλκοόλη.
3. Τα δείγματα επωάζονται στους -20 °C για 20 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε όχι περισσότερο από 12.000 × g για 20 λεπτά στους 4 °C.
4. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και η πελέττα του RNA ξεπλένεται με 75 % αιθανόλη. Το δείγμα αναμειγνύεται με στροβιλισμό (vortex) και φυγοκέντρηση σε όχι περισσότερο από 7,500 χ g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, η πελέττα στεγνώνει από υπολείμματα αιθανόλης και το RNA επαναδιαλύεται και αποθηκεύεται στους -70 ° C.
5. Προστίθεται LiCl σε τελική συγκέντρωση 2M και το δείγμα επωάζεται στους -20 °C overnight. Το ίζημα συγκεντρώνεται με φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 30 λεπτά στους 4 °C. Η πελέττα είναι εμπλουτισμένη σε mRNA και rRNA ενώ το υπερκείμενο σε μικρά

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

RNA, tRNA και γενωμικό DNA. Η πελέττα επαναδιαλύεται σε TE και επανακατακρυμνίζεται με 1/9 vol οξικό νάτριο pH=6,1 και 2 vol απόλυτη παγωμένη αιθανόλη, επώαση στους -20 °C για 1h-overnight και φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές για 30 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα ξεπλένεται με 70 % αιθανόλη, στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε TE. Φυλάσσεται στους -80 °C.

ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΣΕ siRNAs

Το υπερκείμενο που πρόεκυψε μετά την προσθήκη LiCl (1-2 M) και φυγοκέντρηση είναι εμπλουτισμένο σε μικρά RNA, tRNA και γενωμικό DNA. Σε αυτό προστίθεται όγκος 1:10 από 3 M οξικό νάτριο και 4 όγκοι αιθανόλης 100%. Το μείγμα αναμειγνύεται επιμελώς και επωάζεται στους -20 ° C επί μία νύκτα (16 ώρες). Η ολονύκτια επώαση είναι σημαντική για τη μεγιστοποίηση ανάκτησης στην προκειμένη κατακρήμνιση . Τα siRNAs συλλέγονται με μικροφυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 30 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο συλλέγεται προσεκτικά και απορρίπτεται ενώ το ίζημα ξεπλένεται με προσθήκη 75 % κρύας αιθανόλης, επαναφυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες με προηγουμένως, το υπερκείμενο απορρίπτεται, η πελέττα στεγνώνεται και επαναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα RNase-free H₂O. Τα siRNAs φυλάσσονται στους -20° C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Μετά από πλήρη απομάκρυνση της υδατικής φάσης, όπως περιγράφεται στην ενότητα απομόνωσης του RNA, το DNA στην μεσόφαση και τη φάση φαινόλης από την αρχική ομογενοποίηση μπορεί να απομονωθεί. Μετά την καθίζηση και μιά σειρά από πλύσεις , το DNA διαλύεται σε 8 mM NaOH. Ανάλογα με την πηγή , το DNA που λαμβάνεται μπορεί να απαιτεί επιπρόσθετο καθαρισμό (π.χ. εκχύλιση με φαινόλη) πριν από άλλες εφαρμογές.

1. Το DNA κατακρημνίζεται από την μεσόφαση και οργανική φάση με προσθήκη 0,8 ml από 100% αιθανόλης ανά 2 ml Διαλύματος Εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε για την αρχική ομογενοποίηση και ανάμειξη των δειγμάτων με αναστροφή.
2. Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάζονται στους 15 έως 30 ° C για 2-3 λεπτά και το ίζημα του DNA συλλέγεται με φυγοκέντρηση σε όχι περισσότερο από 2,000 χ g για 5 λεπτά στους 2 έως 8 °C. Ακολουθεί προσεκτική απομάκρυνση της υδατικής φάσης. Το υπερκείμενο φαινόλης -αιθανόλης αποθηκεύεται για την απομόνωση της πρωτεΐνης . Το ίζημα του DNA ξεπλένεται δύο φορές σε ένα διάλυμα που περιείχε 0,1 M κιτρικό νάτριο σε 10 % αιθανόλη. Χρησιμοποιήστε 3 ml του διαλύματος ανά 2 ml Διαλύματος Εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε για την αρχική ομογενοποίηση. Σε κάθε πλύση, το ίζημα του DNA

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

επώαζεται στο διάλυμα πλύσης για 30 λεπτά στους 15 έως 30 ° C (με περιοδική ανάμιξη) και φυγοκεντρείται στα 2000 χ g για 5 λεπτά στους 2 έως 8 ° C. Μετά από αυτές τις δύο εκπλύσεις, το ίζημα του DNA εμβραπτίζεται σε 75 % αιθανόλη, επώαζεται για 10-20 λεπτά στους 15 έως 30 ° C (με περιοδική ανάμιξη), φυγοκεντρείται στις 2000 χ g για 5 λεπτά στους 2 έως 8 °C, 5 , το ίζημα του DNA στεγνώνεται για 5-10 λεπτά υπό κενό και επαναδιαλύεται σε 8 mM NaOH (Προστίθεται επαρκής ποσότητα των 8 mM NaOH για να προσεγγίσει μία συγκέντρωση DNA 0,2-0,3 μg / ml). Η χρήση ενός ήπιου αλκαλικού διαλύματος εγγυάται την πλήρη διαλυτοποίηση του ιζήματος DNA. Στο στάδιο αυτό, ωστόσο, τα παρασκευάσματα του DNA (ειδικά από ιστούς) εξακολουθούν να περιέχουν αδιάλυτα σαν γέλη συστατικά (θραύσματα μεμβρανών, κλπ.). Το αδιάλυτο υλικό αφαιρείται με φυγοκέντρηση στα 12000 χ g για 10 λεπτά και το υπερκείμενο μεταφέρεται που περιέχει DNA σε ένα νέο σωλήνα.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Οι πρωτεΐνες απομονώνονται από το υπερκείμενο με φαινόλη -αιθανόλη που ελήφθη μετά την καταβύθιση του DNA με αιθανόλη (στάδιο 2 της απομόνωσης DNA). Το προκύπτον παρασκεύασμα μπορεί να αναλυθεί για την παρουσία ειδικών πρωτεϊνών με ανάλυση Western.

1. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει κατακρήμνιση των πρωτεϊνών από το υπερκείμενο φαινόλης -αιθανόλης (κατά προσέγγιση όγκος 2,5 ml ανά 2 ml Διαλύματος Εκχύλισης) με προσθήκη 3 ml ισοπροπανόλης ανά ανά 2 ml Διαλύματος Εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε για την αρχική ομογενοποίηση.
2. Τα δείγματα επώαζονται για 10 λεπτά στους 15 έως 30 ° C , και τα ιζήματα πρωτεΐνης συλλέγονται σε 12.000 × g για 10 λεπτά στους 2 έως 8 °C. Το υπερκείμενο υγρό αφαιρείται και ξεπλένετε το ίζημα πρωτεΐνης 3 φορές σε ένα διάλυμα που περιέχει 0,3 M υδροχλωρική γουανιδίνη σε 95% αιθανόλη (Προσθήκη 6 ml διαλύματος πλύσης ανά 2 ml Διαλύματος Εκχύλισης που χρησιμοποιούνται για την αρχική ομογενοποίηση.
3. Κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου πλύσεως , το ίζημα πρωτεΐνης επώαζεται στο διάλυμα πλύσεως επί 20 λεπτά στους 15 έως 30 ° C και φυγοκεντρείται σε 7500 χ g για 5 λεπτά στους 2 έως 8 ° C. Μετά την τελική πλύση , το ίζημα πρωτεΐνης στροβιλίζεται (vortex) σε 2 ml από 100% αιθανόλη. Το ίζημα πρωτεΐνης επώαζεται σε αιθανόλη για 20 λεπτά στους 15 έως 30 ° C και φυγοκεντρείται σε 7500 χ g για 5 λεπτά στους 2 έως 8 °C.
4. το ίζημα πρωτεΐνης αφήνεται να στεγνώσει για 5-10 λεπτά υπό κενό και επαναδιαλύεται σε 1 % SDS με πιπετάρισμα. Η πλήρης διάλυση του ιζήματος πρωτεΐνης μπορεί να απαιτεί

επώαση του δείγματος στους 50 °C. Οποιοδήποτε αδιάλυτο υλικό απομακρύνεται με φυγοκέντρηση στα 10000 χ g για 10 λεπτά στους 2 έως 8 °C, και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καθαρό σωλήνα. Το δείγμα είναι έτοιμο για χρήση σε ανάλυση Western ή μπορεί να αποθηκευτεί στους -5 έως -20 °C για μελλοντική χρήση.

2.35 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων (Grossman & Colburn, 1992; Li, 1992). Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός νουκλεϊνικών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζη (Weinberger, 1993) πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x TAE (4.48 gr Tris-base, 1.141 ml οξικού οξέος και 2 ml 0.5 M EDTA pH=8/l) ή 0,5 % TBE (5,4 gr Tris-base, 2,75 gr boric acid, 2 ml 0.5 M EDTA pH=8/l) παρουσία βρωμιούχου εθιδίου τόσο στο πήκτωμα όσο και στο ρυθμιστικό διάλυμα σε τελική συγκέντρωση 100 ng/ml. Στις ίδιες συνθήκες πραγματοποιήθηκε και ο μη αποδιατακτικός διαχωρισμός των RNA.

2.36 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (Chory & Pollard, 2001). Ποσότητα 28 polyacrilamide:2 bis- polyacrilamide αραιώνεται σε 0,5 x TBE κατά τέτοιο τρόπο ώστε η τελική συγκέντρωση της πολυακρυλαμίδης να είναι η επιθυμητή και αφού αναμιχθεί με 20 λ TEMED (καταλύτης της αντίδρασης πολυμερισμού) και 0,5 % τελική συγκέντρωση APS αφήνεται να πολυμεριστεί στην συσκευή που συναρμολογείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Bio-rad).

2.37 Ανάλυση Northern (Alwine et al., 1977; Sambrook & Russell, 2006).

2.37.1 Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός και προεργασία για μεταφορά σε μεμβράνη. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ένα αποδιατακτικό πήκτωμα φορμαλδεΐδης /αγαρόζης 1,2 % (~60 V για 3-4 h). Το πήκτωμα κατεργάζεται παρουσία DEPC H₂O με ανακίνηση για 2x 30 min.

2.37.2 Μεταφορά σε μεμβράνη. Σε ένα πλαστικό δοχείο προσθέτουμε 20x SSC και πάνω στο δοχείο τοποθετούμε κάθετα μια γυάλινη επίπεδη επιφάνεια. Πάνω στην γυάλινη επίπεδη επιφάνεια τοποθετούμε μια γέφυρα από χαρτί Whatman (GE Healthcare) το οποίο έχει εμβαπτιστεί πρώτα σε 20 x SSC). Στο σημείο επαφής της γυάλινης επιφάνειας και της γέφυρας τοποθετούμε το πήκτωμα αγαρόζης και πάνω σε αυτό ένα κομμάτι μεμβράνης (Nytran) ακριβώς ίδιων διαστάσεων με το πήκτωμα. Με νυστέρι απομακρύνουμε το τμήμα της αγαρόζης που τυχόν περισσεύει σε σχέση με την μεμβράνη. Πάνω από την μεμβράνη τοποθετούμε 4 χαρτιά Whatman (τα δυο πρώτα κατά προτίμηση εμβαπτισμένα στο 2 x SSC ενώ οι διαστάσεις τους οφείλουν να ταυτίζονται με αυτές του πηκτώματος). Στις τέσσερις πλευρές της γέφυρας που γειτονεύουν με το περίγραμμα του πηκτώματος προσθέτουμε πάραφιλμ (κολλώντας το σταθερά πάνω στην γέφυρα) και πάνω από αυτό τοποθετούμε

sagan κατά τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτει τις εκτεθειμένες στην ατμόσφαιρα περιοχές του διαλύματος (ώστε να αποφεύγεται η εξάτμιση του τελευταίου). Πάνω από τα χαρτιά Whatman τοποθετούμε κοινές χαρτοπετσέτες στην κορυφή των οποίων εφαρμόζουμε ένα βάρος περίπου 1 kg. Για τον σκοπό αυτό τοποθετούμε μια γυάλινη υποδοχή στην κορυφή των χαρτοπετσετών ενώ στην υποδοχή αυτή προσαρμόζουμε το κατάλληλο βάρος. Στην πράξη αυτό που θα συμβεί είναι ότι το 20 x SSC θα περάσει από το διάλυμα στην γέφυρα και από εκεί με οσμωτικά φαινόμενα θα παρασύρει το σύνολο του DNA από το πηκτωμα στην μεμβράνη. Η μεταφορά του DNA στην μεμβράνη πραγματοποιείται overnight.

2.37.3 Μονιμοποίηση και υβριδοποίηση της μεμβράνης. Η μεμβράνη την επόμενη μέρα υφίσταται μονιμοποίηση του RNA με επίδραση υπεριώδους φωτισμού για 20 sec σε απόσταση 15 εκατοστών και παραμονή στους 80 °C για δυο ώρες. Αρχικά, η μεμβράνη τοποθετείται σε 2 x SSC και μεταφέρεται σε κύλινδρο υβριδοποίησης. Ακολουθεί προϋβριδοποίηση των μεμβρανών παρουσία 50-100 µg/ml DNA ή RNA φορέα (carrier). Προθερμασμένο στους 68 °C διάλυμα υβριδοποίησης αναμίχθηκε με κατάλληλη ποσότητα (προθερμασμένου για 5 λεπτά στους 100°C) carrier και προστέθηκε στον κύλινδρο. Η προϋβριδοποίηση διάρκεσε 2 h στους 65 °C. Η σύσταση του διαλύματος υβριδοποίησης αναφέρεται αλλού στο κείμενο.

Ακολούθως, ο ραδιοσημασμένος ανιχνευτής αποδιατάχθηκε για 5 λεπτά στους 100 °C, τοποθετήθηκε αμέσως σε πάγο και, έπειτα από μια στιγμιαία φυγοκέντρηση, αναμειχθηκε με φρέσκο διάλυμα υβριδοποίησης προθερμασμένο στους 68 °C. Το διάλυμα αυτό αντικατέστησε το προηγούμενο και η υβριδοποίηση διάρκεσε 2 h- overnight στους 65 °C. Η διαδικασία των πλυσιμάτων που ακολουθήθηκε περιγράφεται αλλού στο κείμενο. Η μεμβράνη εκτέθηκε στους -80 °C. Για τα πρωτόκολλα αποϋβριδοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν ο αναγνώστης παραπέμπεται αλλού (Brown et al., 2004)

2.38 In vitro μεταγραφή (Tabor & Boyle, 2001). Ποσότητα DNA (0,5-1 µg) αναμειγνύεται με τελική συγκέντρωση 40 mM Tris-HCl pH=8, 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 0,5 mM από κάθε ριβονουκλεοτίδιο, 4 mM σπερμιδίνη (στην περίπτωση μεταγραφής από την T7 RNA πολυμεράση) ή 40 mM Tris-HCl pH=7,9, 6 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 0,5 mM από κάθε ριβονουκλεοτίδιο, 2 mM σπερμιδίνη (στην περίπτωση μεταγραφής από την T3 RNA πολυμεράση) ή 40 mM Tris-HCl pH=7,9, 6 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 0,5 mM από κάθε ριβονουκλεοτίδιο (στην περίπτωση μεταγραφής από την SP6 RNA πολυμεράση) παρουσία ενός αναστολέα RNases (Rnasin, 100 units) και της απαραίτητης πολυμεράσης (50 units). Στην περίπτωση ραδιενεργής σήμανσης για την αποφυγή ανταγωνισμού από το υπόστρωμα, η τελική συγκέντρωση μη σημασμένου UTP είναι 10 µM ενώ η ποσότητα του

ραδιενεργού είναι 2,5 μCi $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-UTP}$. Το μείγμα επωάζεται για 1,5 -2 h στους 37 °C και προστίθεται ποσότητα DNases (RNase free) για την απομάκρυνση του υποστρώματος (επώαση για 5 min/ RT). Τα ένζυμα απομακρύνονται με extraction με φαινόλη και το υπερκείμενο αραιωμένο σε 500 λ TE διέρχεται από κολώνα Bio-gel (Bio-rad, παρασκευασμένη σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή) και συλλέγονται κλάσματα. Τα κλάσματα εκατέρωθεν του πρώτου peak αντιπροσωπεύουν το ραδιοσημασμένο προϊόν ενώ του δεύτερου τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια. Ποσότητα ραδιοσημασμένου προϊόντος κατάλληλης ειδικής ενεργότητας αναμειγνύεται με ίσο όγκο 2 x φορμαμίδης και αφού αποδιαταχθεί με βρασμό στους 100 °C για 3 λεπτά και παρουσία πάγου αποφευχθεί η επαναδιάταξη, προστίθεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος υβριδοποίησης. Στην περίπτωση μη ραδιοσημασμένου προϊόντος η κατεργασία με DNase και η κλασμάτωση παραλείπεται.

2.39 Σήμανση DNA (Kucera & Nichols, 2008) με την μέθοδο του random priming.

Ποσότητα δείγματος DNA προς σήμανση που περιέχει ποσότητα DNA ίση με 10-100 ng σε όγκο 7,5 λ αναμειγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης LS- 11,5 λ - [Το LS είναι μίγμα που περιέχει τα τυχαία εξαμερή και τα μη σημασμένα νουκλεοτίδια. Τα τυχαία εξαμερή είναι εξαμερή τυχαίας αλληλουχίας κάποια από τα οποία περιμένουμε ότι θα έχουν αλληλουχία συμπληρωματική με το DNA που έχουμε και θα δράσουν ως εκκινητές για το ένζυμο της Klenow πολυμεράσης³⁰ Σύσταση του LS :25 μέρη HEPES 1 M pH=6,5 (το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης): 25 μέρη DTM (περιέχει τα μη σημασμένα νουκλεοτίδια: 0,1 mM dGTP, 0,1 mM TTP in 250mM Tris-HCl pH=8, 25 mM MgCl_2 , 50 mM β -mercaptoethanol]: 7 μέρη OL (περιέχει τα τυχαία εξαμερή: 1mM Tris-HCl pH=7,5, 1mM EDTA, 90 units/ml random primers), 2 λ $\gamma\text{-p}^{32}\text{-dCTP}$ και $\gamma\text{-p}^{32}\text{-dATP}$, 5 units Klenow, 1 $\mu\text{g/ml}$ BSA σε συνολικό όγκο αντίδρασης: 25 μl

Διαδικασία Αρχικά το διάλυμα που περιέχει το DNA υφίσταται αποδιάταξη με βρασμό στους 95 °C. Στην συνέχεια τοποθετείται στον πάγο -για αποφυγή επαναδιάταξης του μορίου-, υφίσταται μια στιγμιαία φυγοκέντρωση και στην συνέχεια προστίθενται τα υπόλοιπα διαλύματα. Η αντίδραση της σήμανσης διαρκεί 3 h στους 37 °C

Απομάκρυνση μη ενσωματωμένων νουκλεοτιδίων μέσω διέλευσης από στήλη χρωματογραφίας και μέτρηση ειδικής ενεργότητας. Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση της σήμανσης στους 37 °C το μίγμα της αντίδρασης ρυθμίζεται σε τελικό όγκο 100 λ και διέρχεται από στήλη χρωματογραφίας διήθησης Sephadex G-50 για την απομάκρυνση των

³⁰ Η Klenow πολυμεράση είναι ένα θραύσμα της DNA πολυμεράσης I της E.coli το οποίο δεν έχει 5'=>3' εξωνουκλεολυτική δράση.

μη ενσωματωμένων ραδιοσημασμένων νουκλεοτιδίων. Ακολουθεί μέτρηση της ειδικής ενεργότητας του ανιχνευτή έπειτα από κατακρήμνιση με TCA 10 %. 1 λ του δείγματος τοποθετείται σε χαρτί Whatman με 10 mg DNA-φορέα (carrier) ώστε να κατακρημνιστούν τα μόρια DNA άνω των 50 νουκλεοτιδίων. Το χαρτί ξεπλένεται με TCA 10% για 5 min για την απομάκρυνση των ελεύθερων ραδιενεργών νουκλεοτιδίων ακολουθούμενο από ξέπλυμα με παγωμένη ακετόνη για 5 min και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Η μέτρηση των κρούσεων πραγματοποιείται σε σπινθηρομετρητή απουσία υγρού σπινθηρομέτρησης. Σε αυτές της συνθήκες η καταγραφόμενη ένδειξη εκτιμάται ότι είναι 2.5 φορές χαμηλότερη της πραγματικής.

Αλγόριθμος υπολογισμού Ειδικής ενεργότητας (Specific Activity).

Ορισμός Ειδικής ενεργότητας: Ονομάζουμε ειδική ενεργότητα την αριθμητική τιμή των κρούσεων ανά λεπτό ποσότητας ανιχνευτή ίσης με 1 γ (1 μg).

Ειδική ενεργότητα= αριθμός κρούσεων ανά λεπτό x (συνολικός όγκος αντίδρασης μετά από διέλευση από κολώνα / όγκος που χρησιμοποιήθηκε κατά την μέτρηση x (1 γ/ ποσότητα DNA που χρησιμοποιήθηκε κατά την σήμανση) x 2.5

2.40 Σήμανση με την μέθοδο του HOT-PCR (Dieffenbach & Dveksler, 2003).

Διαδικασία. Μια παραλλαγή της παραπάνω μεθόδου είναι η σήμανση σχετικά μικρών μορίων DNA (100-300 nt) παρουσία ραδιενεργού νουκλεοτιδίου. Η διαδικασία είναι μια τυπική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με τις ακόλουθες τροποποιήσεις: Η τελική συγκέντρωση των νουκλεοτιδίων -εκτός του ραδιενεργού- στο μίγμα της αντίδρασης είναι η μισή της αντίστοιχης σε κανονική αντίδραση πολυμεράσης, το μίγμα των νουκλεοτιδίων δεν περιέχει το αντίστοιχο νουκλεοτίδιο του ραδιοσημασμένου ώστε να ελαχιστοποιηθούν φαινόμενα ανταγωνισμού μεταξύ ραδιενεργού νουκλεοτιδίου και μη ραδιενεργού, ενώ προστίθεται 1 λ ραδιενεργού νουκλεοτιδίου στο τελικό μίγμα της αντίδρασης. Η απομάκρυνση των αδέσμευτων νουκλεοτιδίων από τον ραδιοσημασμένο ανιχνευτή πραγματοποιείται με διέλευση του μίγματος της αντίδρασης (ρυθμισμένου σε τελικό όγκο 100 λ) από στήλη χρωματογραφίας διέλευσης G-50. Ακολουθεί μέτρηση ειδικής ενεργότητας έπειτα από κατακρήμνιση με TCA.

Εκτίμηση επιτυχίας αντίδρασης. Σε αντίθεση με την μέθοδο των τυχαίων εξαμερών η οποία δίνει προϊόντα τυχαίων μεγεθών που προκύπτουν από τον υβριδισμό τυχαίων εξαμερών με την αλληλουχία στόχο- η αντίδραση με ραδιενεργό PCR αποδίδει ένα προϊόν τα άκρα του οποίου ορίζονται από τους χρησιμοποιούμενους εκκινητές. Για τον έλεγχο της

επιτυχίας της αντίδρασης ποσότητα ραδιοσημασμένου DNA έπειτα από την απομάκρυνση των μη ραδιοσημασμένων νουκλεοτιδίων με την χρήση στήλης χρωματογραφίας διέλευσης διαχωρίζεται ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης, κατεργάζεται για μισή ώρα σε TCA 10% με συνεχή ανακίνηση για προαγωγή της αφυδάτωσης του μορίου και αφυδατώνεται παρουσία βάρους για 2 h. Ακολουθεί έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας σε ειδικές οθόνες ενίσχυσης σήματος στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 3 h. Από το αποτέλεσμα της αυτοραδιογραφίας γίνεται εκτίμηση του μεγέθους του μορίου.

2.41 Υβριδοποίηση μεμβράνης (Green & Sambrook, 2012).

Ακολουθεί μονιμοποίηση του DNA στην μεμβράνη με έκθεση σε υπεριώδη φωτισμό για 20 sec σε απόσταση 15 εκατοστών και επώαση στους $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1.5 ώρα.

Η μεμβράνη εμποτίζεται σε 2x SSC και μεταφέρεται στην εσωτερική επιφάνεια του κυλίνδρου κατά τέτοιο τρόπο ώστε η πλευρά που έχει το DNA να μην ακουμπάει στα τοιχώματα του κυλίνδρου. Ο κύλινδρος τοποθετείται στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ παρουσία 12 ml 2x SSC στην περιστρεφόμενη βάση. Ποσότητα DNA-φορέα (carrier DNA, τελική συγκέντρωση στο διάλυμα προϋβριδοποίησης: 50-100 $\mu\text{g/ml}$) αποδιατάσσεται με βρασμό στους $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, μεταφέρεται σε πάγο, υφίσταται στιγμιαία φυγοκέντρηση και προστίθεται σε προθερμασμένο στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ διάλυμα προϋβριδοποίησης (Church hybridization buffer: 500 mM Na/phosphate buffer pH=7,2, 7% SDS, 1% BSA, 1mM EDTA ή Denharts hybridization buffer: 5x SSC, 0,02% PVP, 0,02 % ficoll, 0,02 %BSA, 1% SDS, 50 % formamide) το οποίο αντικαθιστά το 2x SSC. Συνθήκες προϋβριδοποίησης: $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 6 h. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται RNA ανιχνευτής προστίθεται 250 $\mu\text{g/ml}$ tRNA.

Η παρουσία DNA-φορέα (carrier, ολικό DNA σπέρματος σολομού ή ρέγκας θραυσματοποιημένο με υπερήχους) στο διάλυμα προϋβριδοποίησης συμβάλλει στην ελάττωση των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων ανιχνευτή και DNA μεμβράνης. Ραδιοσημασμένο DNA (με την μέθοδο του ραδιενεργού PCR ή των τυχαίων εξαμερών) αποδιατάσσεται με βρασμό στους $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, μεταφέρεται σε πάγο, και έπειτα από στιγμιαία φυγοκέντρηση, προστίθεται σε προθερμασμένο διάλυμα υβριδοποίησης- στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ - το οποίο ανανεώνει το προηγούμενο. Η υβριδοποίηση διαρκεί 16 h στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.42 Έκπλυση μεμβράνης (Sambrook et al., 1989).

Συνθήκες έκπλυσης για Southern :

1. 2x με 2x SSC για 15 λεπτά κάθε φορά στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$
2. 2x με 2x SSC/0.1% SDS -προθερμασμένου στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ - για 15 λεπτά στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$
3. 2x με 1x SSC/0.5% SDS -προθερμασμένου στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ - για 15 λεπτά στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$
4. 2x 0.5x SSC/1 % SDS -προθερμασμένου στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ - για 15 λεπτά στους $65\text{ }^{\circ}\text{C}$

Συνθήκες έκπλυσης για Northern :

1. 2x με 2x SSC για 15 λεπτά κάθε φορά στους 65 °C
2. 2x με 2x SSC/0.5% SDS -προθερμασμένου στους 65 °C- για 15 λεπτά στους 65° C
3. 2x με 0,1x SSC/0.1% SDS -προθερμασμένου στους 65 °C- για 15 λεπτά στους 65° C

Τα δυο τελευταία βήματα (ή το τελευταίο στην περίπτωση του Northern) είναι προαιρετικά και παραλείπονται στην περίπτωση της ύπαρξης εντοπισμένων σημάτων και απουσίας θορύβου υποβάθρου από μη ειδική πρόσδεση του ανιχνευτή. Η έκθεση πραγματοποιείται στους -80 °C σε ειδικά διαμορφωμένες οθόνες ενίσχυσης σήματος και διαρκεί από ώρες έως μερικές ημέρες .

2.43 Αποϋβριδοποίηση μεμβράνης (Sambrook et al., 1989). Για την απομάκρυνση του ειδικού σήματος μετά το πέρας της αυτοραδιογραφίας ακολουθείται έκπλυση με 0.4 N NaOH για 20 min ακολουθούμενη με έκπλυση με 2x SSC (15 min). Η αποϋβριδοποιημένη μεμβράνη φυλάσσεται στους 4 °C. Εναλλακτικά η μεμβράνη εμποτίζεται σε 1mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH=7,4, 0,1 % SDS και αποϋβριδοποιείται με βρασμό για 15 λεπτά.

2.44 Ανίχνευση siRNAs μετά από ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυ-ακρυλαμίδης (*Hamilton & Baulcombe, 1999*).

20-40 μg ολικού RNA αναλύονται σε 20% αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης [29:1 ακρυλαμίδη: bis, 30% ακρυλαμίδη, 7 M ουρία, 0.5 xTBE (0.5 mM Tris, 41.5 mM βορικό οξύ, 0.5 mM EDTA)] σε κάθετη ηλεκτροφόρηση. Η ουρία έχει την ιδιότητα να αποδιατάσσει τις δίκλωνες δομές των μορίων του RNA. Η ακρυλαμίδη, είναι σε κατάλληλη συγκέντρωση για την ανίχνευση μικρών μορίων RNA μήκους 21-25 νουκλεοτιδίων. Το πήκτωμα παρασκευάζεται από μείγμα μόνο και δις-ακρυλαμίδης σε αναλογία 38:2 αντίστοιχα. Η δις-ακρυλαμίδη βοηθά τον πολυμερισμό των μορίων της μόνο-ακρυλαμίδης που αποτελούν το πλέγμα του πηκτώματος. Οι πολυμεριστές APS (Ammonium persulfate) και TEMED (N'N'N'-tetramethylethylen-diamin) δημιουργούν ενεργές ρίζες (radicals) που ξεκινούν την διαδικασία πολυμερισμού.

Ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης επιτυγχάνεται σε ειδικές συσκευές (Biorad) που συναρμολογούνται σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή.

Πριν την χρήση το πήκτωμα προθερμαίνεται με σύνδεση στην ηλεκτροφορητική συσκευή, χωρίς δείγματα, σε διάλυμα TBE (0.5x) στα 45-50 mA μέχρι η θερμοκρασία να φτάσει στους 50°C. Η θέρμανση αποτρέπει την δημιουργία δευτεροταγών δομών στα μόρια RNA και την επαναδιάταξη δίκλωνων siRNAs. Η ομοιόμορφη κατανομή της θερμοκρασίας επιτυγχάνεται με την τοποθέτηση μεταλλικής πλάκας στη συσκευή. Τα

δείγματα «φορτώνονται» προθερμασμένα σε ρυθμιστικό 95% φορμαμίδη, 1mM EDTA (ethylene-diamine tetra-acetate) pH=8.0, 0.1% κυανού της βρωμοφαινόλης και 0.1% κυανού του ξυλενίου. Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης είναι 35-45 mA σε σταθερή ένταση ρεύματος, 600-800V τάση και θερμοκρασία μεταξύ 50-55 οC σε 0.5 mM TBE.

Ακολουθεί μεταφορά σε νάilon μεμβράνη (Whatman, Nytran®N, UK μέγεθος πόρων μεμβράνης 0.2 μm) μέσω συσκευής semidry (Thermo Scientific Owl HEP-1 Semi Dry Electroblothing System, Dubuque, USA) με τη βοήθεια διαλύματος 0.5 xTBE. Αρχικά το πήκτωμα ξεπλένεται με 0,5 xTBE για 10 min ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα ουρίας. Στην συνέχεια τοποθετούμε 6 φύλλα χαρτιού Whatman, εμβαπτισμένα σε 0,5x TBE, στην κάτω πλάκα της συσκευής ημι-ξηρής μεταφοράς(semi-drier). Μεταφέρουμε τη μεμβράνη εμβαπτισμένη σε 0,5 x TBE. Στην συνέχεια τοποθετούμε το πήκτωμα και πάνω σε αυτό τα 6 φύλλα χαρτιού Whatman εμβαπτισμένα σε 0,5x TBE.

Για κάθε τετραγωνικό εκατοστό του πηκτώματος εφαρμόζονται 3 mA για 25 λεπτά (όχι περισσότερο γιατί τα μικρά RNAs διαπερνούν την μεμβράνη και χάνονται) στους 4 οC. Η μονιμοποίηση του RNA στη μεμβράνη γίνεται με εφαρμογή υπεριώδους ακτινοβολίας (1200 μJ cm⁻²).

2.45 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτικές συνθήκες (Burnette, 1981; Gallagher, 2008; Gallagher, 2006; Reid & Bielecki, 1968). Ποσότητα 28 polyacrilamide:2 bis-polyacrilamide αραιώνεται σε H₂O κατά τέτοιο τρόπο ώστε η τελική συγκέντρωση της πολυακρυλαμίδης να είναι η επιθυμητή και αφού αναμιχθεί με Tris-HCl pH=8,8 σε τελική συγκέντρωση 0,375 M, 0,1 % SDS (τελική συγκέντρωση), 0,1% APS (τελική συγκέντρωση) και 20 λ TEMED προστίθεται σε όγκο ίσο με τα 2/3 του συνολικού όγκου της συσκευής η οποία συναρμολογείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Bio-rad). Στην πάνω επιφάνεια προστίθεται αλκοόλη για τον καλύτερο διαχωρισμό των δυο φάσεων. Αφού πολυμεριστεί η πηκτή (separating gel, η οποία αντιστοιχεί στο τμήμα της πηκτής που επιτρέπει τον διαχωρισμό πρωτεϊνών) και απομακρυνθεί η αλκοόλη προστίθεται το τμήμα της πηκτής χωρίς διαχωριστικές ιδιότητες αλλά με την ιδιότητα του πακεταρίσματος των πρωτεϊνών σε ενιαίο μέτωπο (stacking gel) με σύσταση (τελικές συγκεντρώσεις): 5% πολυακρυλαμίδη, 0,125 M Tris-HCl pH=6,8, 0,1 % SDS, 0,1% APS και 20 λ TEMED και αφήνεται να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα δείγματα παρουσία 0,0625 M τελικής συγκέντρωσης Tris-HCl pH=6,8, 10 % glycerol, 5% b-mercaptoethanol, SDS) υφίστανται αποδιάταξη με βρασμό στους 95 οC για 2-3 λεπτά ενώ η αποφυγή της επαναδιάταξης επιτυγχάνεται με διατήρηση στον πάγο μέχρι την στιγμή που θα φορτωθούν στην πηκτή για να ηλεκτροφορηθούν παρουσία διαλύματος

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

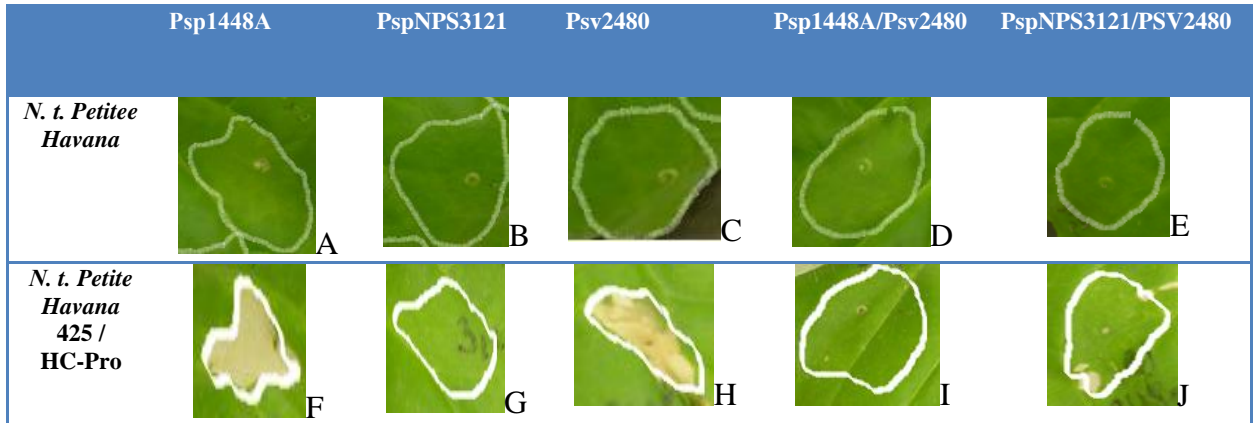
ηλεκτροφόρησης 0,025 M Tris-HCl, 0,192 M glycine pH=8,3, SDS. Η πηκτή υφίσταται επώαση για 20 λεπτά με διάλυμα 0,1 % coomassie blue με ανακίνηση, ακολουθούμενη από αποχρωματισμό με διάλυμα 50 % μεθανόλη, 10 % οξικό οξύ.

Αποτελέσματα

3.1 Ρόλος της RNA σίγησης στην αντίδραση υπερευαισθησίας (HR).

3.1.1 RNA σίγηση και αντίδραση υπερευαισθησίας από *P. savastanoi*. Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται πειράματα εγχύσεων/συνεγχύσεων αιωρημάτων στελεχών των βακτηρίων *P. syringae* pv. *phaseolicola* (*P. s. phaseolicola*, Psp), *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (*P. s. savastanoi*, Psv) σε φυτά καπνού (*Nicotiana tabacum* και *Nicotiana benthamiana*) φυσικού τύπου και διαγονιδιακές σειρές που έχουν κατεσταλμένο το μηχανισμό της RNA σίγησης. Τα εν λόγω βακτήρια δεν είναι παθογόνα στον καπνό («ασύμβατο» παθοσύστημα, «ετερόλογος» ξενιστής). Η επιλογή των βακτηρίων βασίστηκε σε προηγούμενες δημοσιεύσεις (π.χ. Robinette et al., 1990) που είχαν δείξει ότι η *P. s. savastanoi* έχει την δυνατότητα να αναστείλει ή να επιβραδύνει την εκδήλωση HR που παρατηρείται μετά από εγχύσεις *P. s. phaseolicola* και σε καπνό (*N. tabacum* cultivar Coker 319), και άλλους ετερόλογους ξενιστές. Μεταλλάγματα των *P. s. savastanoi* και *A. tumefaciens* σε γονίδια βιοσύνθεσης φυτοορμονών (ινδολοξεϊκού οξέος και κυτοκινίνης) της δεν είχαν την παραπάνω ικανότητα. Η αναστολή της HR στις παραπάνω περιπτώσεις είχε αρχικά αποδοθεί στην παραγωγή αυξίνης, και ίσως και κυτοκινίνης, από την *P. s. savastanoi* και το αγροβακτήριο. Άλλες, πιο πρόσφατες εργασίες έχουν τεκμηριώσει την άμεση και έμμεση εμπλοκή αυξινών στη ρύθμιση της απόκρισης ανθεκτικότητας φυτών σε παθογόνα μέσω του μηχανισμού της γονιδιακής σίγησης (Navarro et al., 2006, Park et al., 2007, Ding et al., 2008, Kazan and Manners, 2009, Boller and Felix, 2009; Pel and Pieterse, 2012). Επίσης είναι τώρα γνωστό ότι η εκδήλωση HR είναι αποτέλεσμα μοριακής αναγνώρισης παθογόνου-ξενιστή που διαμεσολαβείται από πρωτεΐνες τελεστές Τυπου III που εγχυουν τα φυτοπαθογόνα βακτήρια στα κύτταρα του ξενιστή, ότι κάθε βακτήριο/στέλεχος διαθέτει διαφορετικό «ρεπερτουάρ» πρωτεϊνών-τελεστών, και ότι η πλειονότητα αυτών είναι ικανοί να καταστείλουν την HR που πυροδοτείται από άλλους (π.χ. Jamir et al. 2004, Guo et al. 2009). Με βάση τα παραπάνω διερευνήθηκε η πιθανή εμπλοκή της γονιδιακής σίγησης στην εκδήλωση της HR που πυροδοτείται χρησιμοποιώντας επιλεγμένα βακτήρια και ποικιλίες/σειρές *Nicotiana tabacum* και *N. benthamiana* με λειτουργικούς και κατεσταλμένους μηχανισμούς σίγησης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



	Psp1448A	PspNPS3121	Psv2480	Psp1448A/Psv2480	PspNPS3121/PSV2480
<i>N. t. Petite Havana</i>	-	-	-	-	-
<i>N. t. Petite Havana 425 / HC-Pro</i>	+	-	+	-	-

Εικόνα 28. Εγχύσεις και συνεγχύσεις στελεχών *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (Rif^R) και NPS3121 (Rif^R) σε φυτά *N. tabacum* cv. Petite Havana φυσικού τύπου (Α-Ε) και μετασηματισμένα με τον ιικό καταστολέα σίγησης HC-Pro (F-J, βλ. κείμενο για λεπτομέρειες).

- A. Έγχυση *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (Rif^R) σε φυτά *N. tabacum* cv. Petite Havana φυσικού τύπου.
- B. Έγχυση *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 (Rif^R) σε φυτά *N. tabacum* cv. Petite Havana φυσικού τύπου.
- C. Έγχυση *P. s. savastanoi* 2480 σε φυτά *N. tabacum* cv. Petite Havana φυσικού τύπου.
- D. Συν-έγχυση *P. s. phaseolicola* 1448A με *P.s. savastanoi* 2480 σε φυτά *N. tabacum* cv. Petite Havana φυσικού τύπου.
- E. Συν-έγχυση *P. s. phaseolicola* NPS3121 με *P.s. savastanoi* 2480 σε φυτά *N. tabacum* cv. Petite Havana φυσικού τύπου.
- F. Έγχυση *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (Rif^R) σε φυτά *N. tabacum* μετασηματισμένα με τον ιικό καταστολέα σίγησης HC-Pro (Mallory et al., 2001).
- G. Έγχυση *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 (Rif^R) σε φυτά *N. tabacum* μετασηματισμένα με τον ιικό καταστολέα σίγησης HC-Pro.
- H. Έγχυση *P. s. savastanoi* 2480 σε φυτά *N. tabacum* μετασηματισμένα με τον ιικό καταστολέα σίγησης HC-Pro.
- I. Συν-έγχυση *P. s. phaseolicola* 1448A με *P.s. savastanoi* 2480 σε φυτά *N. tabacum* μετασηματισμένα με τον ιικό καταστολέα σίγησης HC-Pro.
- J. Συν-έγχυση *P. s. phaseolicola* NPS3121 με *P.s. savastanoi* 2480 σε φυτά *N. tabacum* μετασηματισμένα με τον ιικό καταστολέα σίγησης HC-Pro.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι ποικιλίες καπνού *N. tabacum* cv. *Basma* (N34/4), *N. tabacum* cv. *Xanthi* και *N. tabacum* cv. *BY4* για εγχύσεις και συνεγχύσεις των βακτηρίων με χαμηλές συγκεντρώσεις του μολύσματος (10⁷ cfu/ml. Σε καμία περίπτωση οι

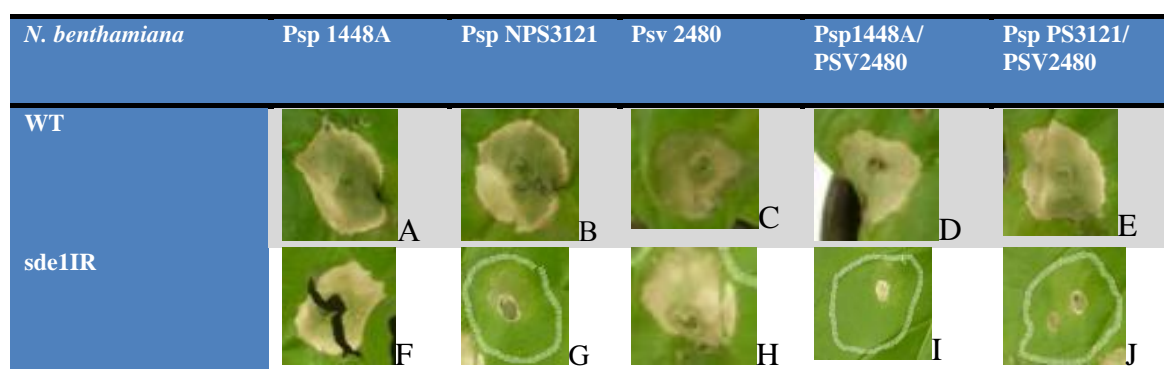
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

εγχύσεις/συνεγχύσεις των *P. s. phaseolicola* 1448^a, NPS3121, *P. s. savastanoi* 2480 ή οι συνδυασμοί των πρώτων δύο στελεχών μα το τρίτο δεν έδωσαν μακροσκοπικά ορατή HR σε ποικιλίες *N. tabacum* (Εικόνα 1-I, και data not shown) στις χαμηλές συγκεντρώσεις μολύσματος που χρησιμοποιήθηκαν. Σε σύγκριση με τα παραπάνω, στη διαγονιδιακή σειρά *N. tabacum* cv. *Petit Havana* 425 που υπερεκφράζει HC-Pro (Mallory et al., 2001) τα αποτελέσματα διαφοροποιούνται ως εξής: τα στελέχη *P. s. phaseolicola* 1448A και *P. s. savastanoi* 2480 ήταν θετικά ως προς την πρόκληση μακροσκοπικά ορατής νέκρωση τύπου HR ενώ το στέλεχος *P. s. phaseolicola* NPS3121, όπως και οι συνεγχύσεις των στελεχών *P. s. phaseolicola* 1448A και NPS3121 με *P. s. savastanoi* 2480 (Εικόνα 1-II). Από αυτά και άλλα παρόμοια πειράματα συμπεραίνεται ότι: α) η έκφραση του ιϊκού καταστολέα σίγησης HC-Pro καθιστά τα φυτά ευαίσθητα στην HR που πυροδοτούν τα στελέχη Psp1448A και Psv2480 και β) η συνέγχυση των στελεχών Psp1448A και Psv 2480 σε διαγονιδικά φυτά HC-Pro⁺ ακυρώνει τη ικανότητα έκαστου να πυροδοτεί την HR σε αυτο τον ξενιστή. Με άλλα λόγια, όταν η αντίδραση υπερευαίσθησίας είναι ασθενής (μη μακροσκοπικά ορατή), μπορεί να ενισχυθεί (γίνεται μακροσκοπικά ορατή) παρουσία ιϊκών καταστολέων σίγησης. Η ενίσχυση/επιτάχυνση αυτή είναι αντιστρεπτή με κατάλληλους συνδυασμούς στελεχών που κατα πασα πιθανότητα διαθέτουν διαφορετικές πρωτεΐνες –τελεστες, κάποιες απο τις οποίες καταστελουν την HR άλλες πυροδοτουν στο συγκεκριμένο φυτό.

Στις ποικιλίες/σειρές καπνού που χρησιμοποιήθηκαν στα παραπάνω πειράματα, η εκδήλωση HR είναι σχετικά ασθενής με την έννοια ότι δεν παρατηρείται όταν οι συγκεντρώσεις του βακτηριακού μολύσματος είναι σχετικά χαμηλές (10^7 cfu./ml). Σε αντίθεση με οτι παρατηρείται σε αγρίου (φυσικού) τύπου φυτά του *N. tabacum*, συγκεντρώσεις μολύσματος 10^7 cfu/ml Psp 1448A (Rif^R) και PspNPS3121 (Rif^R) επάγουν μακροσκοπικά ορατή HR σε αγρίου τύπου φυτά *N. benthamiana*. Το ίδιο συμβαίνει και με τα στελέχη του παθότυπου *P. s. tomato* DC3000 (PstDC3000 ή DC3001) και *P. s. savastanoi* 4530 ή *P. s. savastanoi* 2480. Μάλιστα, στη *N. benthamiana* (WT) η συν-ένχυση στελεχών *P. s. phaseolicola* και *P. s. savastanoi* δεν αναστέλλει την HR που το κάθε στέλεχος εγχυόμενο ξεχωριστά προκαλεί (Εικόνα 2I). Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, εξετάστηκε στη συνέχεια η εκδήλωση ή μη HR σε φυτά διαγονιδιακή *N. benthamiana* sde1IR. Στη διαγονιδιακή αυτή σειρά έχει κατασταλεί η έκφραση του γονιδίου της RNA πολυμεράσης RDR6, μετά από εισαγωγή ενός τμήματος 245 bp της κωδικής περιοχής του γονιδίου (που οριοθετείται από τους εκκινητές 5'TGACGTGGCTTTTGATG3' και 5'TCTTGAATAAAGCATTGGCC3') σε μορφή αντεστραμμένης επανάληψης (Schwach et al., 2005). Η RDR6 παράγει δίκλινα RNA μόρια από μονόκλινο RNA υπόστρωμα. Τα δίκλινα RNA χρησιμοποιούνται με την σειρά τους σαν υποστρώματα από Dicer-like πρωτεΐνες για την παραγωγή siRNAs. Άρα, καταστολή της

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

RDR6 σε αυτά τα φυτά έχει σαν αποτέλεσμα μείωση RNA σίγησης. Στα φυτά *N. benthamiana* *sde1IR* έγιναν ξεχωριστές και συνδυασμένες εγχύσεις με *P. s. phaseolicola* 1448A (Rif^R) ή NPS3121 (Rif^R) και με *P. s. savastanoi* 4530 ή 2480. Σε αντίθεση με ότι παρατηρείται στα αγρίου τύπου φυτά *N. benthamiana*, στα *sde1IR* φυτά συνδυασμοί *P. s. phaseolicola*. 1448A (Rif^R) και NPS3121 με *P. s. savastanoi* 4530 ή 2480 εμφανίζουν διαφοροποίηση της εκδήλωσης της HR. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στον συνδυασμό *P. s. phaseolicola* 1448A (ή NPS3121) με *P. s. savastanoi* 2480 κάθε μια από τις μονές μολύνσεις παρουσιάζει HR ενώ η διπλή μόλυνση όχι.



<i>N. benthamiana</i>	Psp 1448A	Psp NPS3121	Psv 2480	Psp1448A/ PSV2480	Psp PS3121/ PSV2480
WT	+	+	+	+	+
<i>sde1IR</i>	+	-	+	-	-

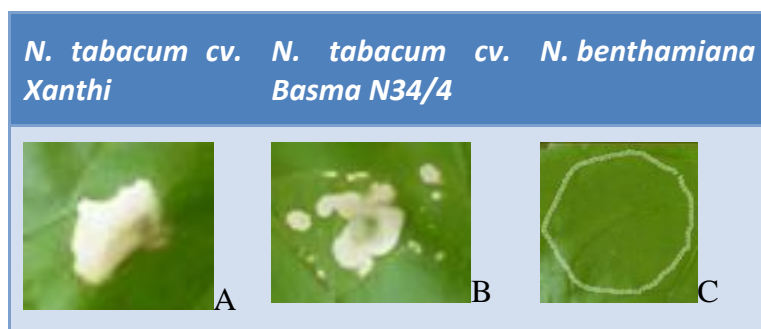
Εικόνα 29. Εγχύσεις/συνεγχύσεις στελεχών *P. s. phaseolicola* και *P. s. savastanoi* σε φυτά w.t. *N. benthamiana* και *N. benthamiana sde1IR*. Παρουσιάζονται:

- A. Έγχυση *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (Rif^R) σε φυτά wt *N. benthamiana*.
- B. Έγχυση *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 (Rif^R) σε φυτά wt *N. benthamiana*.
- C. Έγχυση *P. s. savastanoi* 2480 σε φυτά wt *N. benthamiana*.
- D. Συν-έγχυση *P. s. phaseolicola* 1448A με *P.s. savastanoi* 2480 σε φυτά wt *N. benthamiana*.
- E. Συν-έγχυση *P. s. phaseolicola* NPS3121 με *P.s. savastanoi* 2480 φυτά wt *N. benthamiana*.
- F. Έγχυση *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A (Rif^R) σε φυτά *N. benthamiana sde1IR*.
- G. Έγχυση *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 (Rif^R) σε φυτά *N. benthamiana sde1IR*.
- H. Έγχυση *P. s. savastanoi* 2480 σε φυτά *N. benthamiana sde1IR*.
- I. Συν-έγχυση *P. s. phaseolicola* 1448A με *P.s. savastanoi* 2480 σε φυτά *N. benthamiana sde1IR*.
- J. Συν-έγχυση *P. s. phaseolicola* NPS3121 με *P.s. savastanoi* 2480 σε φυτά *N. benthamiana sde1IR*.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τα παραπάνω πειράματα συνάγεται ότι, καταστολή του μηχανισμού της σίγησης μπορεί να ενισχύσει την πυροδότηση HR. Η ενίσχυση αυτή γίνεται αντιληπτή σε περιπτώσεις που πυροδότηση HR είναι ασθενής. Πιθανώτατα λαμβάνει χώρα και σε περιπτώσεις ισχυρής πυροδότησης HR αλλά δεν γίνεται αντιληπτή λόγω της ταχύτητας εκδήλωσης της τελευταίας. Πρωτεΐνες-τελεστές από *Pseudomonas* έχουν την δυνατότητα να αντιστρέψουν την υποβοήθηση HR απουσία σίγησης και σε ασθενή και σε ισχυρή πυροδότηση HR. Οι πρωτεΐνες-τελεστές έχουν εξελιχτεί ώστε να μπορούν σε κάθε περίπτωση να εκμεταλλευτούν τον μηχανισμό της σίγησης προς όφελος του παθογόνου.

3.1.2 Ρόλος της σίγησης σε HR επαγόμενη από χρωματογραφικά καθαρισμένη HrpZ. Το προηγούμενο πειραματικό σύστημα έχει αυξημένη πολυπλοκότητα καθώς στο όλο φαινόμενο φαίνεται να αλληλεπιδρούν περισσότεροι από ένας γενετικοί παράγοντες του παθοσυστηματος βακτηρίου-φυτου. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε ένα άλλο, απλούστερο σύστημα επαγωγής της HR. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφικά καθαρισμένη χαρπίνη (HrpZ_{PspH}) από το βακτήριο *P. s. phaseolicola* NPS3121. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, σε καθαρή μορφή έχει την δυνατότητα να επάγει HR (Tampakaki & Panopoulos, 2000), όπως και άλλες χαρπίνες φυτοπαθογόνων βακτηρίων (Choi et al., 2013). Αντίθετα, η πλειοψηφία των *avr* παραγόντων πυροδοτούν HR μόνο αν εκφραστούν σε κάποια ψευδομονάδα που έχει T3SS ή από κάποιο άλλο ετερόλογο σύστημα. Έτσι, η χρήση χρωματογραφικά καθαρισμένης HrpZ επιτρέπει την μελέτη ενός μόνο παράγοντα που επάγει αντίδραση υπερευαισθησίας ανεξάρτητα από την επίδραση άλλων παραγόντων. Στα πειράματα μας βρέθηκε ότι η HrpZ έχει την δυνατότητα να πυροδοτεί HR σε συγκέντρωση 2.5 μM σε φυτά καπνού *N. tabacum* cv. *Xanthi* και cv. *Basma*, αλλά όχι σε *N. benthamiana* (Εικόνα 30).



Εικόνα 30. Επίδραση καθαρισμένης HrpZ_{Psp3121} σε φυτά *N. tabacum* και *N. benthamiana*. Παρουσιάζονται ενχύσεις με καθαρισμένη πρωτεΐνη (2,5μM) σε: **A:** *N. tabacum* cv. *Xanthi*, **B:** *N. tabacum* cv. *Basma* N34/4, **C:** *N. benthamiana*. Σημείωση: στα πειράματα των Tampakaki and Panopoulos (2000), HrpZ_{PspH}-από το στέλεχος NPS3121 πυροδοτούσε τυπική HR φύλλα *N. tabacum* cv. *Xanthi*, *N. tabacum* cv. *W38* και *N. benthamiana* σε συγκέντρωση 100 μg/ml (2.8 μM). Η μη πυροδότηση HR σε *N. benthamiana* στα δικά μας πειράματα ίσως να οφείλεται στο ότι στα δικά μας πειράματα χρησιμοποιήθηκε φυτά

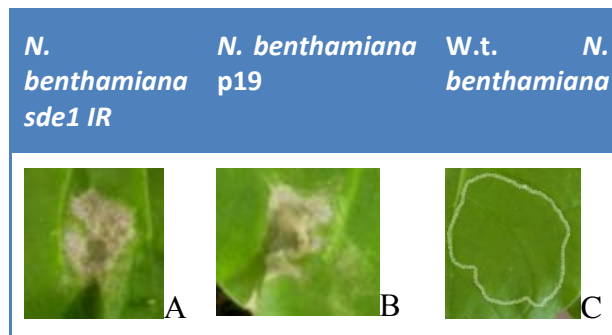
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

διαφορετικού αναπτυξιακού σταδίου τα όποια τοποθετηθήκαν σε θαλάμους με υψηλότερη θερμοκρασία μετά την ένχυση.

Με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη Ενότητα καταλήξαμε σε μια υπόθεση εργασίας. Σύμφωνα με αυτήν, υπήρχε το ενδεχόμενο η καταστολή σίγησης να αυξάνει την ευαισθησία των φυτών όσον αφορά στην επαγωγή HR από χαρπίνη (βλ. και αναλυτική διαπραγμάτευση στη συζήτηση).

Σε διαγονιδιακά φυτά που υπερεκφράζουν ιικούς καταστολείς της σίγησης ή στα οποία έχει κατασταλεί (μέσω έκφρασης ανάστροφων επαναλήψεων) η έκφραση γονιδίων του μονοπατιού βιογένεσης των siRNAs ο μηχανισμός σίγησης ή κάποια μονοπάτια του υπολειπουργούν ή είναι εντελώς αδρανή. Για την διερεύνηση αυτής της υπόθεσης χρησιμοποιήθηκαν φυτά *N. benthamiana* που υπερεκφράζουν p19 ή *N. benthamiana sde1IR* που απαλείφουν το μετάγραφο της RDR6 (βλ. προηγούμενη ενότητα). Ο p19 είναι ένας καταστολέας της σίγησης και προσδένεται σε siRNAs (Silhavy et al., 2002). Στη σειρά *N. benthamiana* P19 πρωτεΐνη p19 του ιού AMCV (African cassava mosaic virus) εκφράζεται κάτω από τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή CaMV-35S (Silhavy et al., 2002). Στα πειράματα αυτά παρατηρήθηκε ότι, σε αντίθεση με τα φυτά αγρίου τύπου ή με το αρνητικό control (ένχυση διαλύματος 10 mM MgCl₂) στα τα φυτά με καταστολή της σίγησης μέσω του p19 ή του sde1IR παρατηρείται μακροσκοπικά ορατή HR (Εικόνα 4).

Προηγούμενες μελέτες (Gopalan, 2008) είχαν δείξει ότι ένεση διαλύματος αυξίνης (50 μM) παρεμποδίζει την εκδήλωση φαινοτύπου της HR μετά από ένχυση χρωματογραφικά καθαρισμένης χαρπίνης από το βακτήριο *Pseudomonas s. syringae* 61 (HrpZ_{Pss61}) στον καπνό. Επειδή στα προηγούμενα πειράματα μας προέκυψαν ενδείξεις ότι πιθανώς υπάρχει αλληλεξάρτηση αυξινών και παρεμπόδισης της HR, ελέγξαμε την επίδραση αυξίνης στις διαγονιδιακές σειρές *N. benthamiana sde1IR* και *N. benthamiana* p19.

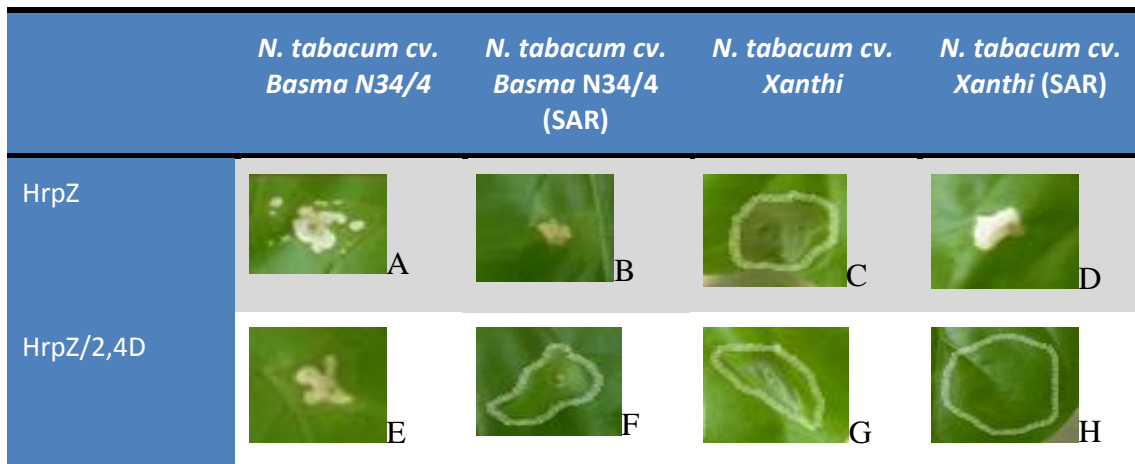


Εικόνα 31. Επανάληψη του προηγούμενου πειράματος σε φυτά *N. benthamiana* με καταστολή της σίγησης. Παρουσιάζονται ενχύσεις με καθαρισμένη HrpZ (2,5μM) σε: **A.**

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

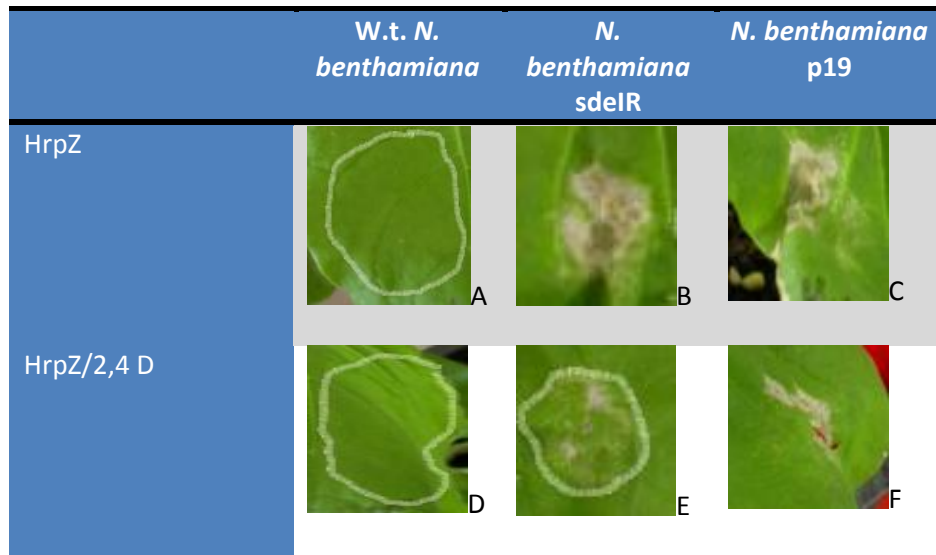
διαγονιδιακή σειρά *N. benthamiana sde1 IR* που απαλείφει το μετάγραφο RDR6, **B.** διαγονιδιακή σειρά *N. benthamiana* που υπερεκφράζει p19, **C. W.t. *N. benthamiana*.**

Παρατηρούμε ότι η συν-έγχυση αυξίνης με καθαρή χαρπίνη έχει μικρή επίδραση στην αναστροφή της HR σε φυτά με καταστολή σίγησης (*sde1IR* και p19). Η επίδραση είναι μικρή, ποικίλει από φυτό σε φυτό ενώ σε πολλά φυτά δεν είναι εύκολα ορατή. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να σημαίνει ότι δεν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ αυξίνης, σίγησης και αντίδρασης υπερευαισθησίας ή ότι συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες στην καταστολή της HR από αυξίνη που δεν είχαν γίνει αντιληπτοί στην αρχική αναφορά (Goralan, 2007). Πράγματι, με επιπλέον πειράματα δείχθηκε ότι στην πλειονότητα των περιπτώσεων η καταστολή της HR από αυξίνη (**2,4 D**) είναι πολύ εντονότερη σε φυτά στα οποία είχε επαχθεί συστηματική αντίσταση (SAR) (Εικόνα 5). Αρχικά μολύνθηκαν γρηραιότερα φύλλα με *P. syringae pv. tomato DC3000*. Η μόλυνση αναμένεται να προκαλέσει την επαγωγή συστηματικής ανθεκτικότητας σε νεότερα φύλλα στα οποία και πραγματοποιήθηκαν οι ενχύσεις HrpZ και αυξίνης. Άρα, στην καταστολή HR από χαρπίνη φαίνεται να συμμετέχει και το σαλικυλικό.



Εικόνα 32. Έλεγχος της επίδρασης αυξίνης στην αναστολή HR από HrpZ σε φυτά *N. tabacum* με επαγωγή συστηματικής ανθεκτικότητας ή όχι. Παρουσιάζονται ενχύσεις με καθαρισμένη HrpZ (2,5μM) σε: **A:** *N. tabacum* cv. *Basma N34/4*, **B:** *N. tabacum* cv. *Basma N34/4* στο οποίο είχε επαχθεί προηγουμένως SAR, **C:** *N. tabacum* cv. *Xanthi*. **D:** *N. tabacum* cv. *Xanthi* στο οποίο είχε επαχθεί προηγουμένως SAR. Επίσης παρουσιάζονται ενχύσεις με καθαρισμένη HrpZ (2,5μM) και 2,4 D (50μM) σε: **E:** *N. tabacum* cv. *Basma N34/4*, **F:** *N. tabacum* cv. *Basma N34/4* στο οποίο είχε επαχθεί προηγουμένως SAR, **G:** *N. tabacum* cv. *Xanthi*. **H:** *N. tabacum* cv. *Xanthi* στο οποίο είχε επαχθεί προηγουμένως SAR.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 33. Έλεγχος της επίδρασης αυξίνης στην αναστολή HR από HrpZ σε φυτά *N. benthamiana* με φαινότυπο καταστολή σίγησης. Παρουσιάζονται ενχύσεις με καθαρισμένη HrpZ (2,5μM) σε: **A.** W.t. *N. benthamiana*, **B.** Διαγονιδιακή σειρά *N. benthamiana* που απαλείφει το μετάγραφο RDR6, **C.** Διαγονιδιακή σειρά *N. benthamiana* που υπερεκφράζει p19. Επίσης παρουσιάζονται ενχύσεις με καθαρισμένη HrpZ (2,5μM) και 2,4 D (50μM) σε: **D.** W.t. *N. benthamiana*, **E.** Διαγονιδιακή σειρά *N. benthamiana* που απαλείφει το μετάγραφο RDR6, **F.** Διαγονιδιακή σειρά *N. benthamiana* που υπερεκφράζει p19.

3.1.3 Ρόλος της RNA σίγησης στον επαγόμενο από HopA1 (HopPsyA) κυτταρικό θάνατο.

Σαπροφυτικές ψευδομονάδες όπως η *Pseudomonas fluorescens 55* δεν διαθέτουν εκκριτικό σύστημα τύπου III αλλά ούτε και πρωτεΐνες-τελεστες που εκκρίνονται μέσω αυτού. Επομένως, δεν επάγουν αντίδραση υπερευαισθησίας. Εισαγωγή σε τέτοια στελέχη πλασμιδίων που κωδικεύουν το εν λόγω εκκριτικό σύστημα, όπως το pHIR11 η παράγωγα του (βλ. παρακάτω), τους δίνει την δυνατότητα να μεταφέρουν σε φυτικά κύτταρα πρωτεΐνες-τελεστές τυπου III προερχόμενες από φυτοπαθογόνα στελέχη Ψευδομονάδων (ετερόλογοι τελεστές). Το πλασμίδιο pHIR11 περιέχει τη γονιδιακή νησίδα *hrp/hrc* από το φυτοπαθογόνο στέλεχος *P. syringae pv. syringae 61* (Huang et al., 1988).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το στέλεχος *P. fluorescens 55* (pHIR11) έχει την δυνατότητα να επάγει αντίδραση υπερευαισθησίας σε ποικιλίες *N. tabacum*. Η ικανότητα του αυτή συσχετίστηκε με τα γονίδια *schA-hrmA* που κωδικεύουν την πρωτεΐνη-τελεστή HrmA (HopPsyA, HopA1) και την εξειδικευμένη σαπερόνη SchA που προάγει την έκκριση της μέσω του συστήματος τύπου III που κωδικεύει το ένθεμα του pHIR11 (Alfano et al., 1997, Collmer et al., 2000). Δυο τύποι μεταλλαγών στο ένθεμα του πλασμιδίου αυτού ακυρώνουν

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

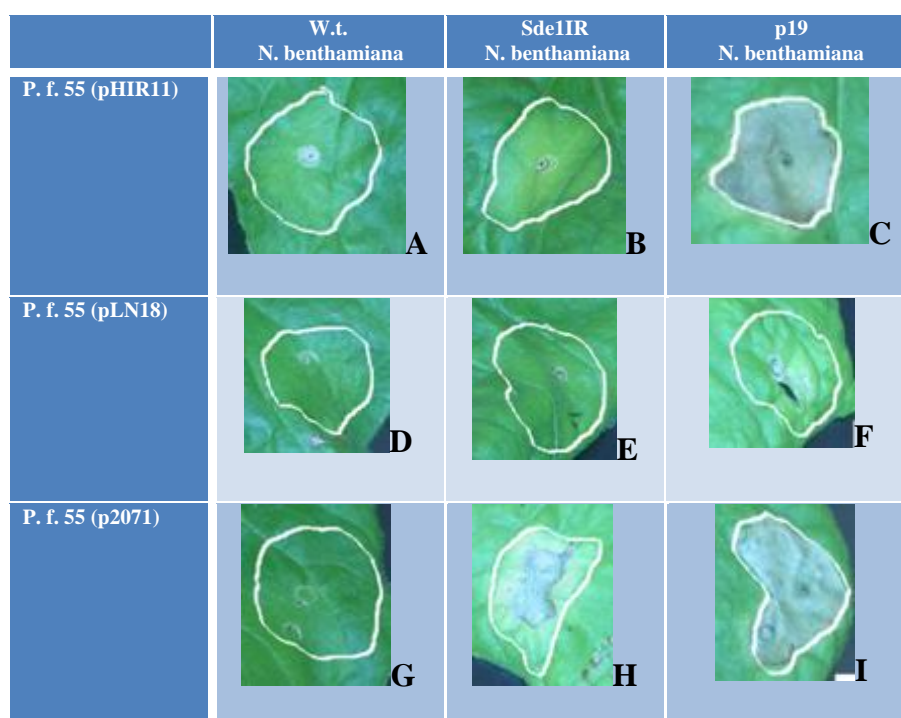
την ικανότητα του *P. fluorescens* 55 (pHIR11) να προκαλεί αντίδραση υπερευαισθησίας: α) Μεταλλαγές που απαλείφουν εξολοκλήρου την περιοχή εκατέρωθεν του *hopPsyA*, (αλλά αφήνουν άθικτο το T3SS) όπως στο πλασμίδιο pLN18 (van Dijk et al., 1999) ή β) Ένθεση του μεταθετού στοιχείου *TnPhoA* στο κωδικό πλαίσιο *HopPsyA*, όπως συμβαίνει στο παράγωγο πλασμίδιο pCPP2071 (Huang et al., 1991). Και στις δυο περιπτώσεις, η γονιδιακή νησίδα *hrp/hrc* που κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες του T3SS παραμένει άθικτη και λειτουργική όσον αφορά στην έκκριση πρωτεϊνών-τελεστών τύπου III από στέλεχη της *P. fluorescens*.

Αντίθετα από ότι παρατηρείται στις ποικιλίες καπνού, η *P. fluorescens* 55 (pHIR11) δεν επάγει αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά *N. benthamiana* (Collmer et al., 2000). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στα δικά μας πειράματα (Εικόνα 7). Όμως, σε φυτά που υπερεκφράζουν τη πρωτεΐνη p19 το στέλεχος αυτό επάγει μια χαρακτηριστική HR. Η p19 είναι ιικός αναστολέας σίγησης (βλ. και παραπάνω) και στα φυτά που τον υπερεκφράζουν, ο σιγητικός μηχανισμός είναι υπό καταστολή. Αντίθετα με το στέλεχος *P. fluorescens* 55 (pHIR11), το στέλεχος *P. fluorescens* 55 (pLN18) δεν προκαλεί HR σε *N. benthamiana* που εκφράζουν την p19 (και βέβαια ούτε η *P. fluorescens* 55 χωρίς κανένα εισαγμένο πλασμίδιο προκαλεί HR στα φυτά αυτά). Αυτό υποδηλώνει ότι αφ' ενός ο επαγωγέας της αντίδρασης υπερευαισθησίας στις παραπάνω περιπτώσεις είναι ο τελεστής *HopPsyA* και αφ' ετέρου ότι η εκδήλωση ή μη της HR στη *N. benthamiana* υπόκειται καθοριστικά στο μηχανισμό της γονιδιακής σίγησης.

Σε μολύνσεις με *P. fluorescens* 55 (pCPP2071) επίσης παρατηρήθηκε HR σε φυτά *N. benthamiana* που εκφράζουν p19. Το πλασμίδιο pCPP2071 έχει ένθεση μεταθετού στοιχείου (*TnPhoA*) στο γονίδιο *hopPsyA* στο καρβοξυτελικό άκρο του πλαισίου *HopPsyA* και όχι πλήρης απαλοιφή του τελευταίου, όπως συμβαίνει στο pLN18, και πιθανώς να παράγεται μια καρβοξυτελικά ακρωτηριασμένη πρωτεΐνη *HopPsyA*. Εάν όντως ισχύει αυτό, τα αποτελέσματα με *P. fluorescens* 55 (pLN18) ενισχύουν ακόμα περισσότερο την υπόθεση ότι ο κυτταρικός θάνατος στην περίπτωση αυτή είναι ειδικός από σηματοδότηση *HopPsyA*.

Σε αντίθεση με την κατάσταση που επικρατεί στα p19 φυτά (και την περίπτωση της *HrpZ*), τα φυτά *sde1IR* εγχυόμενα με *P. fluorescens* 55 (pHIR11) παρουσιάζουν χλωρωτικά αλλά όχι νεκρωτικά συμπτώματα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



	W.t. <i>N. benthamiana</i>	Sde1IR <i>N. benthamiana</i>	p19 <i>N. benthamiana</i>
P. f. 55 (pHIR11)	-	- (chl)	+
P. f. 55 (pLN18)	-	-	-
P. f. 55 (p2071)	-	+	+

Εικόνα 34. Ρόλος της RNA σίγησης στον επαγόμενο από HorA1 (HorPsyA) κυτταρικό θάνατο.

- A. Έγχυση P. f. 55 (pHIR11) σε φύλλα w.t. *N. benthamiana*
- B. Έγχυση P. f. 55 (pHIR11) σε φύλλα διαγονιδιακών *N. benthamiana* με καταστολή έκφρασης RDR6.
- C. Έγχυση P. f. 55 (pHIR11) σε φύλλα διαγονιδιακών *N. benthamiana* που υπερεκφράζουν p19.
- D. Έγχυση P. f. 55 (pLN18) σε φύλλα w.t. *N. benthamiana*
- E. Έγχυση P. f. 55 (pLN18) σε φύλλα διαγονιδιακών *N. benthamiana* με καταστολή έκφρασης RDR6.
- F. Έγχυση P. f. 55 (pLN18) σε φύλλα διαγονιδιακών *N. benthamiana* που υπερεκφράζουν p19.
- G. Έγχυση P. f. 55 (p2071) σε φύλλα w.t. *N. benthamiana*
- H. Έγχυση P. f. 55 (p2071) σε φύλλα διαγονιδιακών *N. benthamiana* με καταστολή έκφρασης RDR6.
- I. Έγχυση P. f. 55 (p2071) σε φύλλα διαγονιδιακών *N. benthamiana* που υπερεκφράζουν p19.

Χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα *P. fluorescens* 55 (pHIR11) έχουν χαρακτηριστεί μια σειρά από πρωτεΐνες-τελεστές οι οποίες καταστέλλουν την HR που επάγεται από το *P. fluorescens*(pHIR11) και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (PCD) που επάγεται από την πρωτεΐνη BAX στο ζυμομύκητα (Jamir et al., 2004). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε ο μετασχηματισμός *P. fluorescens* 55 (pHIR11) με πλασμίδια που κωδικεύουν επιλεγμένες πρωτεΐνες-τελεστές που έχουν γνωστούς κυτταρικούς στόχους. Τα πειράματα αυτά θα είχαν

στόχο την διερεύνηση αλληλεπίδρασης των αντιστοιχών πρωτεϊνών-τελεστών στην καταστολή της HR και στο μηχανισμό της σίγησης στα διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* sde1IR και p19.

3.2 Επίδραση πρωτεϊνών-τελεστών από ψευδομονάδες στην RNA σίγηση.

Σύμφωνα με τα προηγούμενα αποτελέσματα, εκτός από ορμόνες και άλλοι βακτηριακοί παράγοντες συμμετέχουν στην αναστολή της HR. Μάλιστα, η όλη διαδικασία πιθανότατα εξαρτάται και από τον μηχανισμό/στάδιο καταστολής της σίγησης. Θεωρήσαμε ενδιαφέρον να εξετάσουμε θα παρουσίαζε το ενδεχόμενο κάποιες βακτηριακές πρωτεΐνες-τελεστές να έχουν ανασταλτική επίδραση στην σίγηση κατά αντιστοιχία με τους ιικούς αναστολείς της σίγησης. Για να ελέγξουμε την επίδραση της κάθε πρωτεΐνης-τελεστή ξεχωριστά, χρησιμοποιήθηκε το πειραματικό σύστημα παροδικής έκφρασης μέσω αγροβακτηρίου (Hamilton et al., 2002). σε φύλλα διαγονιδιακών φυτών *N. benthamiana* 16c που υπερεκφράζουν το γονίδιο της GFP (Ruiz et al., 1998). Στο πειραματικό σύστημα αυτό συνεχύεται και αγροβακτήριο που εκφράζει την φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP μαζί με αγροβακτήριο που εκφράζει την υπό εξέταση πρωτεΐνη, μετά από τη μεταφορά των αντίστοιχων T-DNAs στα φυτικά κύτταρα. Στο σύστημα αυτό, η GFP εκφράζεται παροδικά τις πρώτες μέρες (2-3 μέρες). Στην συνέχεια τα επίπεδα της GFP μειώνονται. Η μείωση οφείλεται στην ελάττωση των επιπέδων GFP-mRNA λόγω της ενεργοποίησης του μηχανισμού της σίγησης ως απόκριση της υπερέκφρασης του GFP μέσω του αγροβακτηρίου (Voinnet et al., 2003). Όμοια συμπεριφορά ως προς την παροδική έκφραση της GFP παρουσιάζουν και τα φυτά αγρίου τύπου (Johansen & Carrington, 2001). Εάν η υπό εξέταση πρωτεΐνη παρεμποδίζει την σίγηση, τότε τα επίπεδα φθορισμού της GFP θα διατηρηθούν υψηλότερα σε σχέση με τον μάρτυρα. Αντίστροφα αποτελέσματα (προοδευτική μείωση του φθορισμού της GFP σε σχέση με μάρτυρα) αναμένονται στην περίπτωση που η υπό εξέταση πρωτεΐνη ενισχύει την σίγηση.

Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών-τελεστών που εξετάστηκαν έχει κάποια επίδραση στον μηχανισμό της σίγησης. Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά αποτελέσματα με πρωτεΐνες που έδειξαν κάποιο φαινότυπο.

3.2.1 Καταστολή RNA σίγησης από πρωτεΐνες-τελεστές ψευδομονάδας.

Δυο βακτηριακές πρωτεΐνες (AvrRps4_{P_{spi}} και HopF2_{DC3000}) εμφάνισαν φαινότυπο αναστολής σίγησης. Αντίθετα η πρωτεΐνη HopK1 δεν είχε καμία επίδραση στον μηχανισμό της σίγησης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η HopK1 έχει ομολογία με το αμινοτελικό άκρο της AnrRps4 αλλά διαφορετικό και μακρύτερο καρβοξυτελικό άκρο (Petnicki-Ocwieja et al., 2002).

3.2.1.1 Επίδραση πρωτεϊνών-τελεστών της υπερικογένειας HopF1/HopF2/HopF3 στην RNA σίγηση.

Σχετικά με το HopF2, προηγούμενα πειράματα μας (Sarris et al. 2011) είχαν δείξει ότι το HopF2_{DC3001} (από *P. syringae* pv. *tomato* DC3001) παρουσίαζε σαν φαινότυπο ενίσχυση της σίγησης στο πειραματικό μας σύστημα. Το στέλεχος *P. s. tomato* DC3001 είναι στενά συγγενικό με το *P. s. tomato* DC3000 και διαφέρει από το προγονικό του (*P. s. tomato* DC3000) σε διάφορες ελλείψεις και ανασυνδυασμούς (Landgraf et al., 2006).

Αντίθετα, το ομόλογο HopF1 από *P. syringae* pv. *phaseolicola* race 7 δεν είχε κανένα φαινότυπο ή είχε ασθενή φαινότυπο (Sarris et al., 2011). Το πειραματικό σύστημα που χρησιμοποιήσαμε στηρίζεται σε αγροεμποτισμό και παροδική συν-έκφραση τους με GFP. Επιπλέον, ανάλυση κατά Northern απέδειξε ότι η διαφορά αυτή δεν οφείλεται σε διαφορετικά επίπεδα συσσώρευσης των μεταγράφων των δυο γονιδίων. Παρόλα αυτά, λόγω έλλειψης κατάλληλων αντισωμάτων δεν ήταν δυνατόν να επαληθευτεί εάν τα επίπεδα πρωτεϊνών των δυο ομολόγων είναι συγκρίσιμα. Παράλληλα, ήταν γνωστή η ύπαρξη ενός τρίτου ομολόγου (HopF3 από *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A³¹), οι ιδιότητες του οποίου ήταν εντελώς άγνωστες (Chang et al., 2005).

3.2.1.1.1. Κλωνοποίηση ομολόγων HopF1/HopF2/HopF3 σε δυαδικό φορέα έκφρασης σε φυτά και σε φορείς υπερέκφρασης σε βακτήρια. Στο επόμενο στάδιο της εργασίας, αποφασίσθηκε η κλωνοποίηση² και επιπλέον ομολόγων στον ίδιο δυαδικό φορέα έκφρασης. Σε πρώτη φάση κοινοποιήθηκαν η HopF1 από *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B, η HopF2_{DC3000} (προερχόμενη από *P. syringae* pv. *tomato* DC3000) και η HopF3_{1448A} (προερχόμενη από *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448^A). Η επιλογή του *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 αντί του DC3001 έγινε διότι α) καθώς το τελευταίο είναι μολυσματικό στο μοντέλο φυτό *A. thaliana* έχει προταθεί σαν μοντέλο για την μελέτη των ψευδομονάδων, β) Είναι πλήρως αλληλουχημένο και γ) τα τελευταία χρόνια, η πληροφορία για τους μοριακούς μηχανισμούς της παθογένεσης των ψευδομονάδων έχει προκύψει κυρίως σε αυτό το στέλεχος (Quirino and Bent, 2003). Οι κωδικές περιοχές τους συντήχτηκαν με ένα επίτοπο

³¹ Η *P. s. pv. phaseolicola* 1448 A δεν φέρει ομόλογο HopF1 στην νησίδα παθογένειας του μεγάλου της πλασμιδίου Chang J, Urbach J, Law T, Arnold L, Hu A, Gombar S, Grant S, Ausubel F, Dangl J (2005a) A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 2549-2554. Έχει όμως στο χρωμόσωμα ένα γονίδιο που κωδικεύει μια φυλογενετικά απομακρυσμένη ομόλογη πρωτεΐνη, την HopF3.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

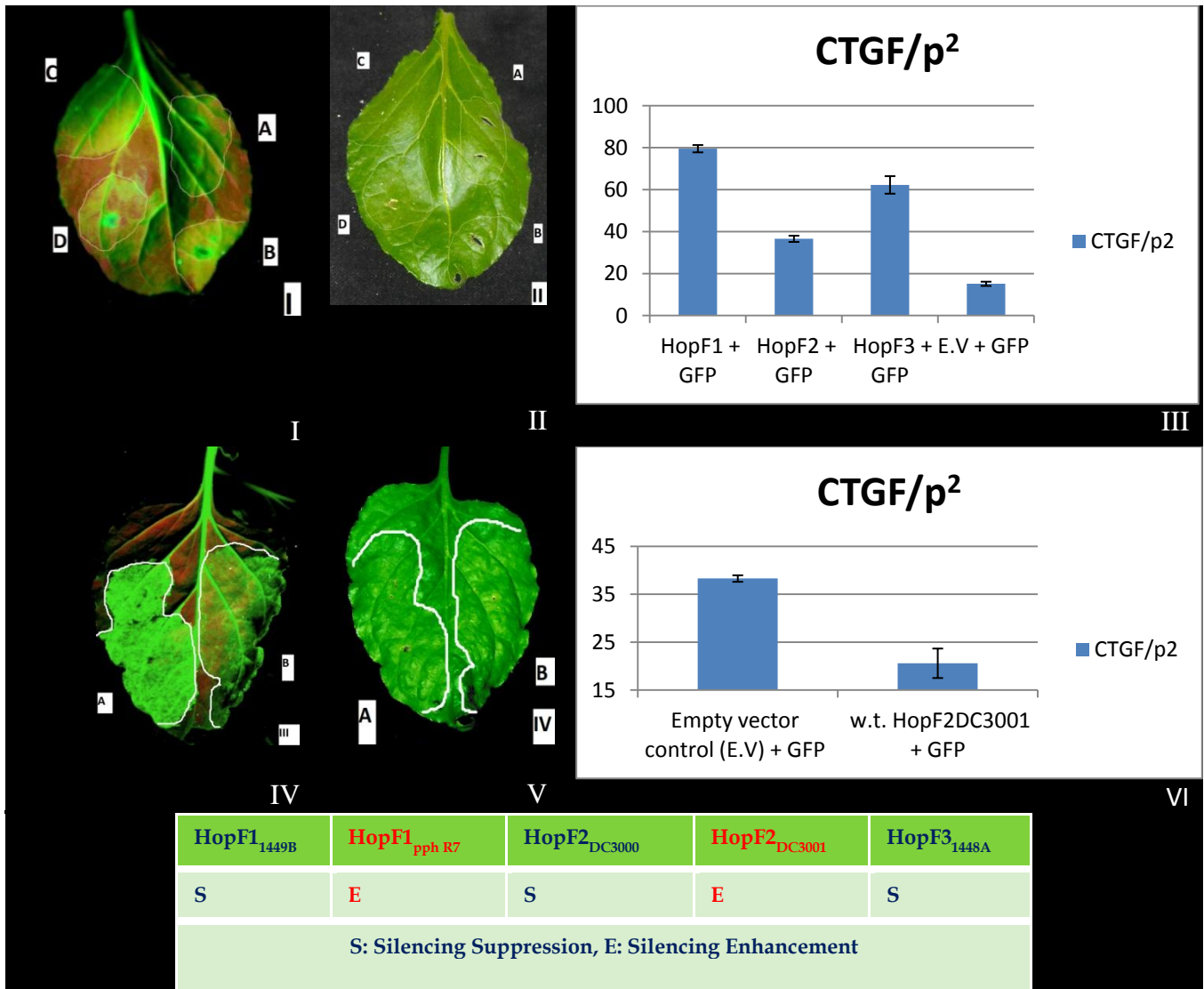
(Flag) στο αμινοτελικό άκρο και ακλούθησε επανάληψη των πειραμάτων. Η ύπαρξη ή η απουσία επιτόπου δεν επηρεάζει τα επίπεδα συσσώρευσης μεταγράφων. Παράλληλα η ύπαρξη επιτόπου δεν επηρεάζει τον φαινότυπο σίγησης όπως επαληθεύτηκε πειραματικά.

Τα τρία ομόλογα εμφανίζουν δομικές ομοιότητες με δυο κατηγορίες πρωτεϊνών: η μια είναι η οικογένεια ADP-ribosyltransferases και η άλλη η 2'-tRNA phosphotransferases που σχετίζεται με τον μεταβολισμό tRNA (Kato-Murayama et al., 2005). Το αμινοτελικό άκρο της HopF1 παρουσιάζει μεγαλύτερη δομική ομοιότητα με τις δυο αυτές οικογένειες σε σχέση με τα άλλα δυο ομόλογα. Η ομοιότητα του HopF2 στο αμινοτελικό άκρο με ADP-ribosyltransferase/2'-tRNA phosphotransferase αν και μικρότερη σε σχέση με το HopF1 είναι ορατή. Επίσης, το καρβοξυτελικό άκρο του HopF2 παρουσιάζει μακρινή δομική ομοιότητα με εξωνουκλεάσες τύπου III³² της οικογένειας της RNase T (Zuo & Deutscher, 2002). Αντίθετα, το καρβοξυτελικό άκρο της HopF1 στερείται διαφόρων καταλοίπων απαραίτητων για την δράση εξωνουκλεάσης III. Τα κατάλοιπα αυτά είναι συντηρημένα στο HopF2. Προηγούμενες μελέτες από το ίδιο εργαστήριο (Γαζή, Ph.D thesis) είχαν επιχειρήσει την υπερέκφραση και την κρυστάλλωση του HopF1 από *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B). Παράλληλα, βιοπληροφορική μελέτη (με in silico προβλέψεις δομής με βάση ομοιότητα) έχουν αποκαλύψει δομικά μοτίβα συντηρημένα αλλά και μοτίβα αποκλίνοντα μεταξύ των τριών μελών της υπεροικογένειας. Για την πειραματική επαλήθευση των παραπάνω θεωρήθηκε απαραίτητη η κλωνοποίηση των HopF2 από *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 και HopF3 από *P. s.* pv. *phaseolicola* 1448A σε φορέα έκφρασης για υπερέκφραση των πρωτεϊνών αυτών σε βακτηριακό σύστημα. Οι κωδικές περιοχές κοινοποιήθηκαν κάτω από τον έλεγχο του επαγόμενου από IPTG συνθετικού υποκινητή ptac. Σαν απώτερο στόχο είχαμε τον καθαρισμό, την κρυστάλλωση και την λύση της δομής των ομολόγων. Αρχικά πειράματα έδειξαν ότι κατά αντιστοιχία με την HopF1, είναι δυνατή η υπερέκφραση των ομολόγων σε βακτηριακό σύστημα.

³² Προσοχή! Οι πρωτεΐνες αυτές να μην συγχέονται με τις τύπου RNase III πρωτεΐνες όπως π.χ. οι Dicers.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.2.1.1.2 Καταστολή της RNA σίγησης από την πρωτεΐνη HopF2_{DC3000}



Εικόνα 35. Παροδική συν-έκφραση των διαφόρων μελών της οικογένειας εκκρινόμενων βακτηριακών πρωτεϊνών HopF και πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) σε φυτά *Nicotiana benthamiana* 16C. Η 16C είναι μια διαγονιδιακή σειρά *N. benthamiana* που υπερεκφράζει GFP. Μείγματα (1: 1) αγροβακτηρίων που φέρουν τις κασέτες έκφρασης ή πλασμίδια ελέγχου (άδειο φορέα [EV]) έχουν εγχυθεί σε φύλλα *N. benthamiana* 16C όπως περιγράφεται αλλού (Hamilton et al 2002). Τα φύλλα φωτογραφήθηκαν σε 3 ημέρες μετά την έγχυση (dpi) κάτω από υπεριώδες και το ορατό φως. Τα επίπεδα φθορισμού της GFP στις περιοχές αγωγιμότητας στην φυλλική επιφάνεια προσδιορίστηκαν ποσοτικά χρησιμοποιώντας το ImageJ. Η Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/p² προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται αλλού (Burgess et al., 2010). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν σε τουλάχιστον 5-10 ξεχωριστές φύλλα με παρόμοια αποτελέσματα. Παρουσιάζονται αγωγιμότητες σε φύλλα *N. benthamiana* 16C (3 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

I. A) w.t HopF1_{1449B} + GFP, B) w.t HopF2_{DC3000} + GFP, C) w.t HopF3_{1448A}, + GFP, D) empty vector control (E.V.) + GFP (Φωτογραφία σε φωτισμό UV).

II. A) w.t HopF1_{1449B} + GFP, B) w.t HopF2_{DC3000} + GFP, C) w.t HopF3_{1448A}, + GFP, D) empty vector control (E.V.) + GFP (Φωτογραφία σε ορατό φως).

III. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/p² για τα δείγματα που περιγράφονται στην I.

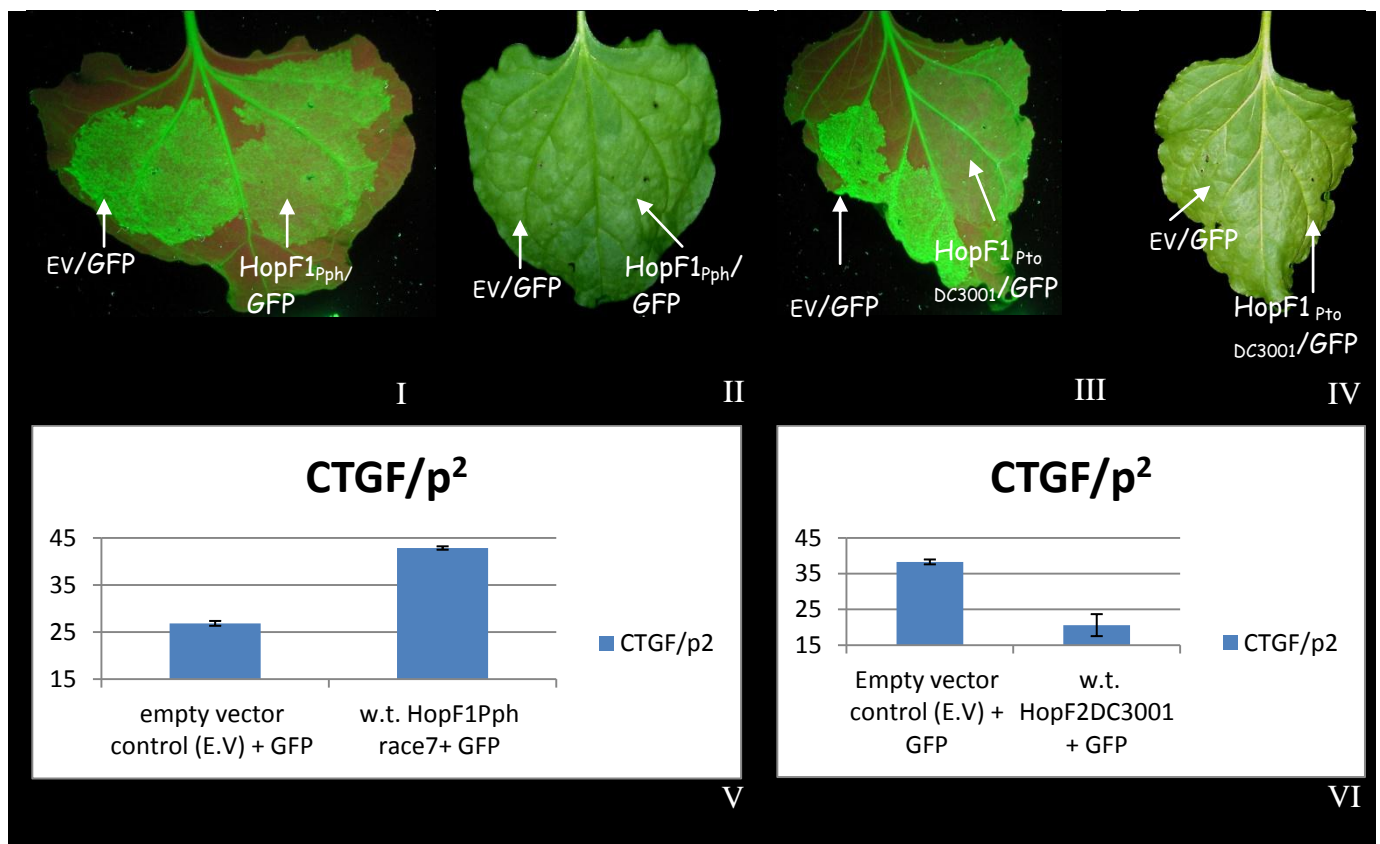
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

IV. A) empty vector control (E.V) + GFP και B) w.t. HopF2_{DC3001} + GFP (Φωτογραφία σε φωτισμό UV).

IV. A) empty vector control (E.V) + GFP και B) w.t. HopF2_{DC3001} + GFP (Φωτογραφία σε ορατό φως).

VI. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ ρ^2 για τα δείγματα που περιγράφονται στην IV.

Με την χρήση του συστήματος της παροδικής συνέκφρασης με GFP μέσω αγραοένχυσης επιβεβαιώθηκαν προηγούμενα αποτελέσματα ότι η HopF2_{DC3001} (AvrPtoF από *P. syringae* pv. *tomato* **DC3001**) δρα ως ενισχυτής της RNA σίγησης σε φυτά *N. benthamiana*. Αντίθετα, η HopF2_{DC3000} (AvrPtoF_{DC3000}) συμπεριφέρεται σαν καταστολέας της RNA σίγησης. Σε αντίθεση με τους ιικούς καταστολείς της σίγησης και το AvrRps4 (βλ. και παρακάτω), η καταστολή της σίγησης από HopF2_{DC3000} διαρκεί 2-3 μέρες. Επεκτείνοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, αποκαλύφθηκε ότι και τα άλλα δυο μέλη της οικογένειας που εξετάστηκαν (**HopF1_{1449B}**, **HopF3_{1448A}**) δρουν επίσης ως καταστολείς της σίγησης. Αντίθετα, ένα άλλο ομόλογο από HopF1 από *P. syringae* pv. *phaseolicola* race 7 είχε μικρή επίδραση στην μεταβολή των επιπέδων GFP στο σύστημα μας.



Εικόνα 36. Παροδική συν-έκφραση επιπλέον μελών της οικογένειας εκκρινόμενων βακτηριακών πρωτεϊνών HopF και πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) σε φυτά *Nicotiana benthamiana* 16C. Μείγματα (1: 1) αγραοβακτηρίων που φέρουν τις κασέτες έκφρασης ή πλασμίδια ελέγχου (άδειο φορέα [EV]) έχουν εγχυθεί σε φύλλα *N.*

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

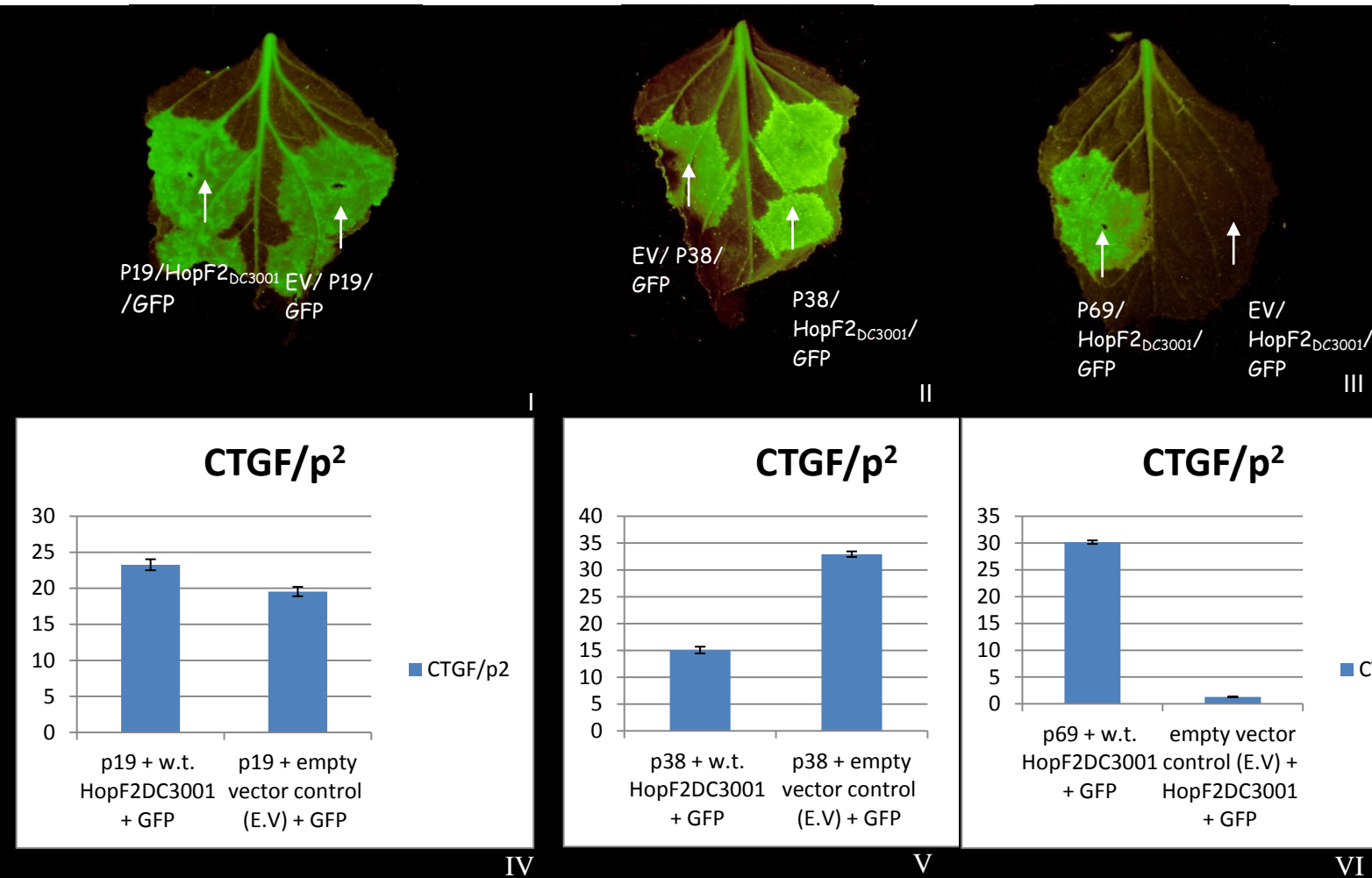
benthamiana 16C όπως περιγράφεται παραπάνω. Τα φύλλα φωτογραφήθηκαν σε 3 ημέρες μετά την έγχυση (dpi) κάτω από υπεριώδεις και το ορατό φως. Η Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ ρ^2 προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται παραπάνω. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν σε τουλάχιστον 5-10 ξεχωριστές φύλλα με παρόμοια αποτελέσματα. Τα βέλη δείχνουν τα σημεία ένχυσης. Παρουσιάζονται αγροενχύσεις σε φύλλα φυτών *N. benthamiana* 16C (3 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

- I. empty vector control (E.V) + GFP και w.t. HopF1_{pph} race7+ GFP (Φωτογραφία σε φωτισμό UV).
- II. Empty vector control (E.V) + GFP και w.t. HopF1_{pph} race7+ GFP (Φωτογραφία σε φωτισμό UV).
- III. Empty vector control (E.V) + GFP και w.t. HopF2_{DC3001} + GFP (Φωτογραφία σε φωτισμό UV).
- IV. Empty vector control (E.V) + GFP και w.t. HopF2_{DC3001} + GFP (Φωτογραφία σε ορατό φως).
- V. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ ρ^2 για τα δείγματα που περιγράφονται στην I.
- VI. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ ρ^2 για τα δείγματα που περιγράφονται στην III.

Το επόμενο ερώτημα ήταν εάν η ενίσχυση της σίγησης από **HopF2_{DC3001}** είναι αποτέλεσμα σίγησης ή κάποιου άλλου φαινομένου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ιικοί καταστολείς της σίγησης σε πειράματα συναγροένχυσης με την πρωτεΐνη HopF2_{DC3001}. Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο σύστημα της παροδικής έκφρασης GFP σε GFP υπερεκφράζοντα φυτά. Παρόμοια πειράματα με δυο άλλες πρωτεΐνες (HopX1 και HopAB1) έχουν καταγραφεί και αλλού (Sarris, Ph.D. Thesis, University of Crete, 2009.). Τα αποτελέσματα με το HopF2_{DC3001} βρίσκονται σε πλήρη αντιστοιχία με τα ήδη δημοσιευμένα. Διακρίνονται δυο περιπτώσεις. Εάν το φαινόμενο της ενίσχυσης της σίγησης είναι αποτέλεσμα σίγησης, τότε παρουσία ενός ιικού καταστολέα θα επικαλυφθεί η ενίσχυση της σίγησης. Στην περίπτωση αυτή τα επίπεδα της GFP θα επανέλθουν σε αυτά του μάρτυρα. Αντίθετα, εάν υποκρύπτεται άλλο φαινόμενο (π.χ. παρεμπόδιση έκφρασης της GFP) τότε θα εξακολουθήσουν να υπάρχουν μειωμένα επίπεδα GFP.

Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ιικοί καταστολείς α) p19 του CymRSV, ο οποίος προσδένεται σε siRNAs (Silhavy et al., 2002), β) ο p38 του TCV, ο οποίος παρεμποδίζει την DCL4 (Deleris et al., 2006). Η αναστροφή της ενίσχυσης σίγησης που προκαλεί η HopF2_{DC3001} από τους ιικούς αναστολείς αποδεικνύει την εμπλοκή μηχανισμού RNA σίγησης (εικόνα 37.I και εικόνα 37.II).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 37. Αναστολή της επαγομένης από εκκρινόμενες βακτηριακές πρωτεΐνες ενίσχυσης σίγησης από ιϊκούς καταστολείς. Αγροενχύσεις σε 16c φυτά *N. benthamiana* (3 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν :

I. p19 + w.t. HopF2_{DC3001} + GFP ή empty vector control (E.V) + GFP + p19 (Φωτογραφία σε φωτισμό UV).

II. p38 + w.t. HopF2_{DC3001} + GFP ή empty vector control (E.V) + GFP + p38 (Φωτογραφία σε φωτισμό UV).

III. p69 + w.t. HopF2_{DC3001} + GFP ή empty vector control (E.V) + GFP + HopF2_{DC3001} (Φωτογραφία σε φωτισμό UV).

IV. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/p² (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην I.

V. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/p² (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην II.

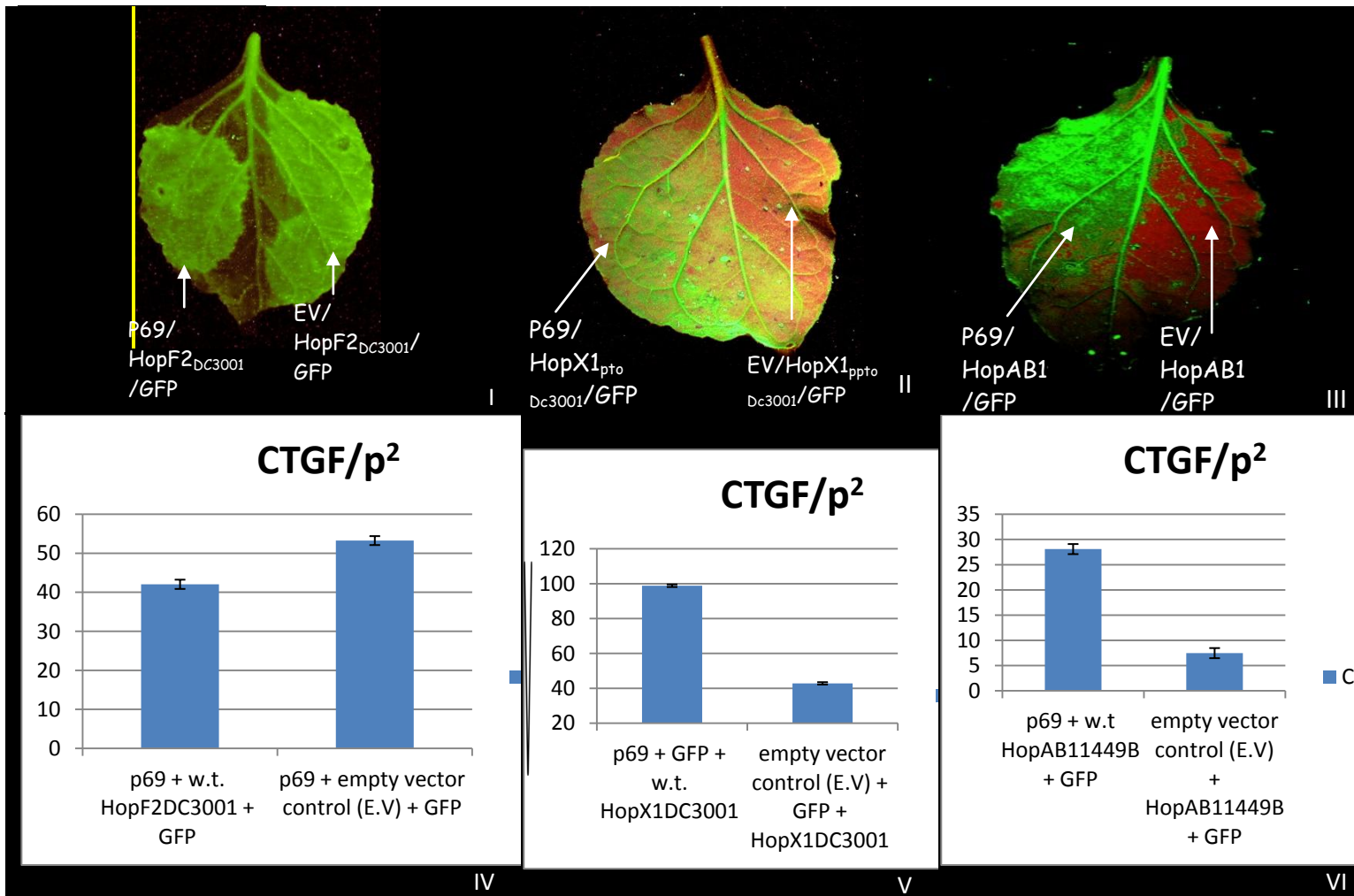
VI. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/p² (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην III.

Το σημείο της κάθε ένχυσης συμπίπτει με την αιχμή του εκάστοτε βέλους στην εικόνα.

Κάποιες πρωτεΐνες-τελεστές παρεμποδίζουν τον μηχανισμό της σίγησης σε μεταγραφικό επίπεδο (Navarro et al., 2008). Εάν η HopF2_{DC3001} ενισχύει την μεθυλίωση του υποκινητή ή της κωδικής περιοχής της GFP στο σύστημα μας, θα μπορούσαμε να

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

αντιστρέψουμε το φαινόμενο με συναγροένχυση με έναν ιικό καταστολέα της σίγησης που στοχεύει την μεθυλίωση. Ο p69 του ιού TYMV (Chen et al., 2004a) σχετίζεται με την μεθυλίωση και το συστηματικό σήμα. Έχει την δυνατότητα να καταστέλλει την RNA σίγηση ακόμα και παρουσία HopF2_{DC3001} (εικόνα 37.III). Δηλαδή, ο p69 ανατρέπει την επίδραση του HopF2_{DC3001}. Τα αποτελέσματα αυτά όμως δεν είναι συμπερασματικά διότι ο p69 έχει πλειοτροπική δράση. Μπορεί η επίδραση που έχει στο σύστημα μας να οφείλεται στην ικανότητα του να μπλοκάρει την διασπορά της σίγησης σε κοντινή απόσταση. Σε μια τέτοια περίπτωση ο πιθανός ρόλος του HopF2_{DC3001} θα ήταν η υποβοήθηση υποδοχής σημάτων σίγησης (ή η ενίσχυση της διασποράς τους). Το πείραμα επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας αντί του HopF2_{DC3001}, τις πρωτεΐνες HopAB1_{1449B} και HopX1_{DC3001} με παρόμοια αποτελέσματα.



Εικόνα 38. Αγροενχύσεις σε φύλλα *N. benthamiana* 16c (3 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν :

- I. p69 + w.t. HopF2_{DC3001} + GFP ή empty vector control (E.V) + GFP + HopF2_{DC3001} (Φωτογραφία σε φωτισμό UV),
- II. p69 + w.t. HopX1_{DC3001} + GFP ή empty vector control (E.V) + GFP + HopX1_{DC3001} (Φωτογραφία σε φωτισμό UV),
- III. p69 + w.t. HopAB1_{1449B} + GFP ή empty vector control (E.V) + GFP + HopAB1_{1449B} (Φωτογραφία σε φωτισμό UV).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

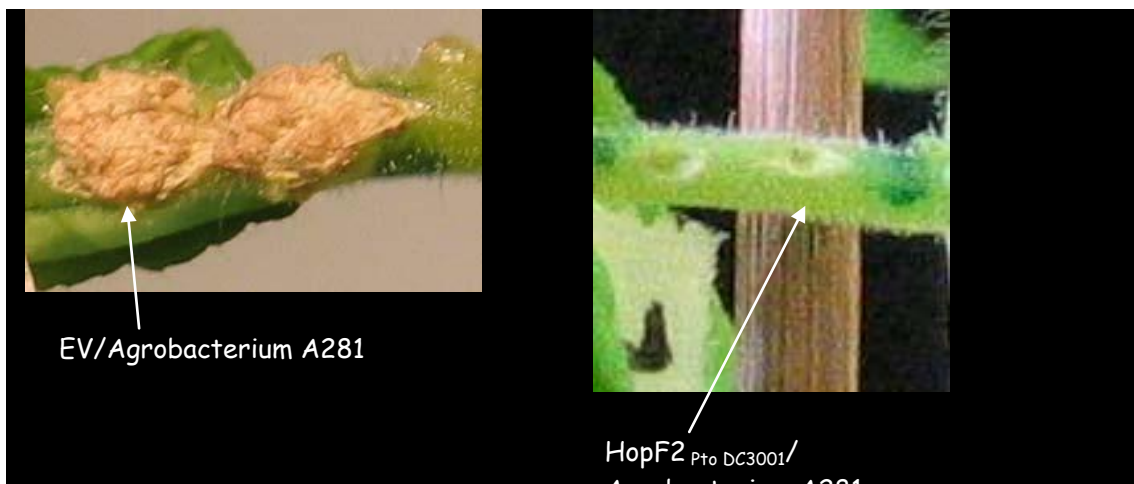
IV. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ ρ^2 (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην I.

V. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ ρ^2 (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην II.

VI. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ ρ^2 (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην III.

Το σημείο της κάθε ένχυσης συμπίπτει με την αιχμή του εκάστοτε βέλους στην εικόνα.

Φυτά *Arabidopsis thaliana* τα οποία έχουν μεταλλαγές σε ένζυμα του μηχανισμού της σίγησης εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα γένεσης κάλλων μετά από μόλυνση με ογκογόνο Αγροβακτήριο (Dunoyer et al., 2006). Αυτό υποδεικνύει ότι για την επαγωγή κάλλου χρειάζεται η αναστολή της σίγησης. Το ίδιο το αγροβακτήριο χρειάζεται να αναστέλλει τον μηχανισμό της σίγησης για να επιτύχει την καλλογένεση. Αντίθετα, φυτά τα οποία έχουν μεταλλαγές σε ένζυμα βιοσύνθεσης miRNAs έχουν μειωμένη ικανότητα καλλογένεσης. Αυτό υποδεικνύει ότι για την επαγωγή καλλογένεσης χρειάζονται κάποια miRNAs. Σε μια τέτοια περίπτωση, πρωτεΐνες που επάγουν την σίγηση εάν εκφραστούν σε ογκογόνο αγροβακτήριο θα έπρεπε να παρεμποδίζουν την καλλογένεση. Στα πειράματα που έγιναν παρατηρήθηκε ακριβώς αυτό. Οι ενισχυτές της σίγησης ανταγωνίζονται το κατασταλτικό αποτέλεσμα του αγροβακτηρίου που είναι απαραίτητο για την καλλογένεση. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε η πρωτεΐνη HopF2_{DC3001}. Χρησιμοποιήθηκε μόλυνση με δυο αγροβακτήρια. Ένα μη καλλογόνο (LBA4404) που εξέφραζε την υπό εξέταση πρωτεΐνη και ένα δεύτερο καλλογόνο (A281). Όπως περιμέναμε η ενίσχυση της σίγησης λόγω έκφρασης των πρωτεϊνών μας συνοδεύτηκε από αναστολή της καλλογένεσης. Το πείραμα επαναλήφθηκε με τα ίδια αποτελέσματα και με ένα δεύτερο καλλογόνο στέλεχος αγροβακτηρίου (*A. tumefaciens* A281) το οποίο είχε μετασηματιστεί με κάθε μια από τις υπό εξέταση πρωτεΐνες (data not shown). Αντίστοιχα αποτελέσματα αλλά με την πρωτεΐνη HopX1_{Pto DC3001} είχαν παρουσιαστεί αλλού (Sarris. Ph.D Thesis) και δεν αναφέρονται ξανά. Τα αποτελέσματα και στις δυο περιπτώσεις ήταν αντίστοιχα με τα αναμενόμενα.



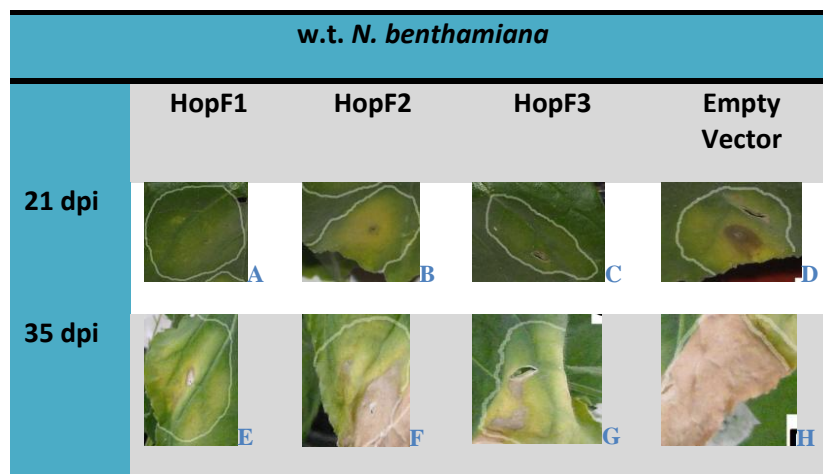
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εικόνα 39. Πειράματα καταστολής της καλλογένεσης από πρωτεΐνες που ενισχύουν τη σίγηση. Αριστερά: Μόλυνση με *Agrobacterium* A281 και LBA4404 μετασηματισμένο με E.V. Δεξιά: Μόλυνση με *Agrobacterium* A281 και LBA4404 μετασηματισμένο με κατασκευή που υπερεκφράζει HopF2_{DC3001}.

3.2.1.1.3 Ρόλος μελών οικογένειας HopF1/ HopF2/ HopF3 στην αναστολή νέκρωσης. Στην ενότητα αυτή εξετάστηκε ο ρόλος τριών ομολόγων: HopF1 από *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449A, HopF2 από *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 και HopF3 *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448B.

Αρχικά, εξετάστηκε εάν τρία ομόλογα επάγουν ταχεία νέκρωση (αντίδραση υπερευαισθησίας, HR) σε διαφορετικές ποικιλίες καπνού *N. tabacum* (cv. Xanthi ή cv. Basma) και σε διαφόρους “οικότυπους” *N. benthamiana*. Με τα πειράματα αυτά επιβεβαιώθηκε η πρόβλεψη ότι τα τρία ομόλογα δεν επάγουν HR στα συγκεκριμένα φυτά (data not shown). Πιθανή εξαίρεση είναι η ήπια χλώρωση που παρατηρείται σε φυτά *N. tabacum* cv. *Basma* μετά την αγραρέγχυση με το γονίδιο HopF2. Η χλώρωση αυτή αρχίζει να εμφανίζεται 15 ημέρες μετά την αγραρέγχυση.

Στην συνέχεια, τα τρία ομόλογα εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα να αναστέλλουν/καταστέλλουν την νέκρωση που επάγεται από πρωτεΐνες-τελεστές άλλων παθογόνων. Το πειραματικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτο της παροδικής συνέκφρασης των κωδικών περιοχών των γονιδίων τους μέσω “αγραρέγχυσης” σε διακυττάρους χώρους φύλλων του φυτού-μοντέλου *N. benthamiana* (Hamilton et al., 2002).






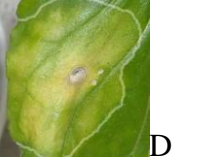







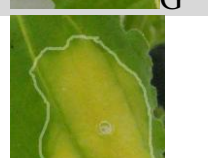
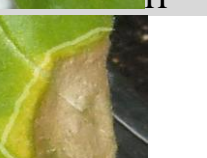

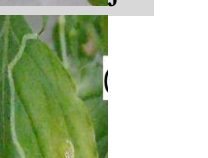





Εικόνα 40. Αναστολή κυτταρικού θανάτου που επάγεται από ταλαιπωρία του ιστού λόγω αγραρέγχυσης.

A-D. Αγραρέγχυσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* (21 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν: A) HopF1, B) HopF2, C) HopF3, D) Empty Vector.

E-H. Αγραρέγχυσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* (35 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν: E) HopF1, F) HopF2, G) HopF3, H) Empty Vector.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα πειράματα έδειξαν ότι και οι τρεις πρωτεΐνες δρουν κατασταλτικά (αναστολείς κυτταρικού θανάτου). Σαν επαγωγείς νέκρωσης χρησιμοποιήθηκαν όχι μόνο άλλες εκκρινόμενες πρωτεΐνες-τελεστές φυτοπαθογόνων ψευδομονάδων (Jamir et al., 2004) άλλα και ιϊκές πρωτεΐνες όπως η p19 (Scholthof et al., 1995). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν σε

w.t. <i>N. benthamiana</i>					
	HopAB2m (5dpi)	HopAB2m (12dpi)	NopT	p19	P19+NopT
HopF1					
HopF2					
HopF3					
EV					

	HopAB2m	NopT	p19	P19+NopT
HopF1	-	+	+	+
HopF2	+	+	+/-	-
HopF3	+	-	+	+
+: ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΝΕΚΡΩΣΗΣ, -: ΝΕΚΡΩΣΗ				

Εικόνα 41. Αναστολή κυτταρικού θανάτου που επάγεται με συνέκφραση επαγωγέων νέκρωσης από φυτοπαθογόνα, ριζόβια ή ιό.

A-E. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν: A) HopF1+ HopAB2m (5 dpi), B) HopF1+ HopAB2m (12 dpi), C) HopF1+ NopT (15 dpi), D) HopF1+ p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C"), E) HopF1 + NopT + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C").

F-J. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν: F) HopF2+ HopAB2m (5 dpi), G) HopF2+ HopAB2m (12 dpi), H) HopF2+ NopT (15 dpi), I) HopF2+ p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C"), J) HopF2 + NopT + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C").

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

K-O. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν: K) HopF3+ HopAB2m (5 dpi), L) HopF3+ HopAB2m (12 dpi), M) HopF3+ NorT (15 dpi), N) HopF3+ p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C"), O) HopF3 + NorT + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C").

P-T. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν: P) Empty Vector + HopAB2m (5 dpi), Q) Empty Vector + HopAB2m (12 dpi), R) Empty Vector + NorT (15 dpi), S) Empty Vector + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C"), T) Empty Vector + NorT + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C").

μια σειρά από "οικότυπους" της *N. benthamiana* (Goodin et al., 2008). Καταστολή της νέκρωσης εμφανίστηκε σε όλα τα συστήματα που μελετήσαμε. Αυτό υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες αυτές στοχεύουν ένα κεντρικό διακόπτη του μηχανισμού πυροδότησης κυτταρικού θανάτου. Μάλιστα, έχουν την δυνατότητα ακόμα και αναστολής κυτταρικού θανάτου που επάγεται απλά από ταλαιπωρία του ιστού λόγω αγροένχυσης. Η νέκρωση αυτή επάγεται τέσσερις εβδομάδες μετά από αγροένχυσης εργαστηριακών στελεχών του *Agrobacterium tumefaciens* σε φύλλα του ίδιου φυτού.

Η αναστολή/καταστολή της νέκρωσης που παρατηρείται στην περίπτωση της συνέκφρασης του γονιδίου HopF3 με τον επαγωγέα νέκρωσης p19 είναι παροδική σε φυτά *N. tabacum* cv. *Basma*. Αντίθετα, είναι μόνιμη στην περίπτωση συνέκφρασης των *hopF1* και *hopF2* με τον ίδιο επαγωγέα νέκρωσης. Παρόμοια συμπεριφορά (μόνιμη αναστολή με HopF1/HopF2-παροδική με HopF3) παρατηρείται και όταν σαν επαγωγέας νέκρωσης χρησιμοποιείται η ριζοβιακή πρωτεΐνη-τελεστής NorT (Dai et al., 2008) σε φυτά *N. benthamiana*. Ακολούθησαν πειράματα ταυτόχρονης επαγωγής νέκρωσης με συνέγχυση δυο επαγωγέων νέκρωσης (p19 και NorT) σε φυτά *N. benthamiana*. Στην περίπτωση αυτή, η συμπεριφορά των ομολόγων στην αναστολή νέκρωσης είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στην περίπτωση συνέγχυσης με μόνο την NorT.

Πειραματικά δεδομένα από άλλες ερευνητικές ομάδες π.χ. (Jamir et al., 2004) είχαν συσχετίσει και παλαιότερα το HopF2_{DC3000} με καταστολή νεκρωτικών φαινοτύπων. Βέβαια οι παρατηρήσεις έγιναν σε εντελώς διαφορετικά πειραματικά συστήματα και χρησιμοποιώντας διαφορετικούς τύπους πρωτεϊνών-τελεστών σαν επαγωγείς αντίδρασης υπερευαισθησίας. Στην παρούσα εργασία καταβλήθηκε προσπάθεια να επεκταθούν οι παρατηρήσεις και σε άλλες λιγότερο μελετημένες μορφές νεκρώσεων.

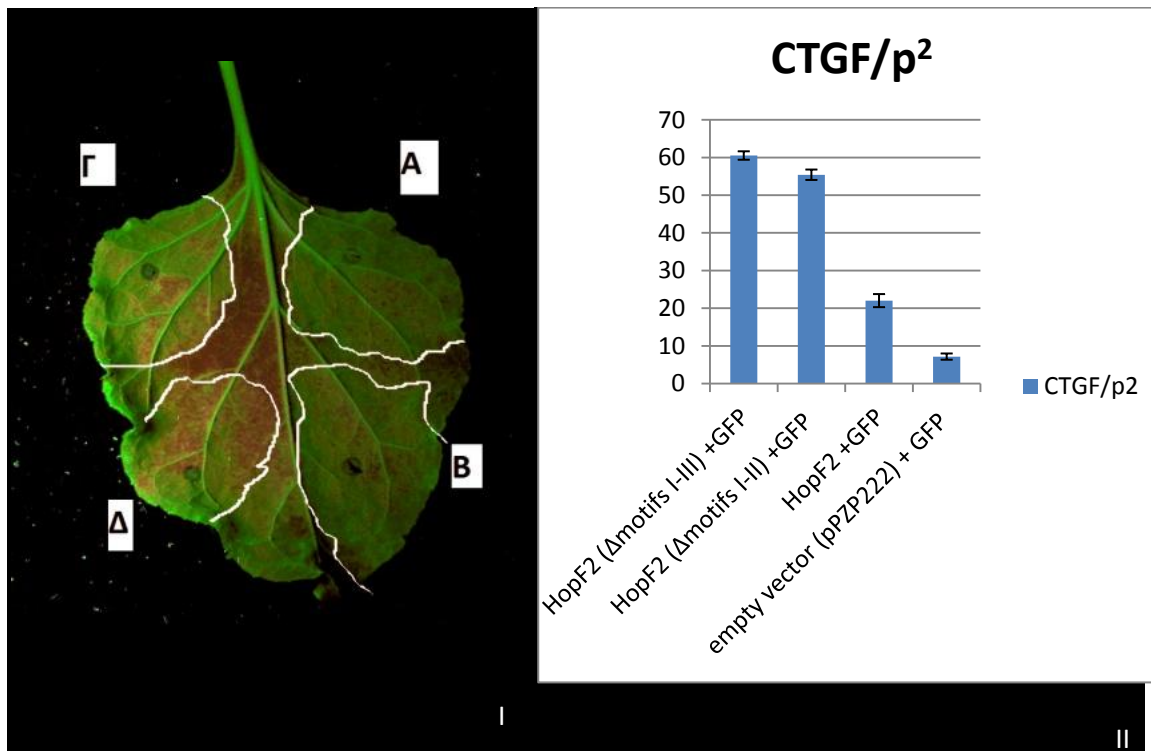
Το σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγούσε στην νέκρωση δεν ήταν επαρκώς αποσαφηνισμένο για καμιά από αυτές τις πρωτεΐνες τελεστές που χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν. Ούτε είναι αποσαφηνισμένο για κάποιον από τους επαγωγείς νέκρωσης που χρησιμοποιήθηκαν μέχρι τώρα σε αυτή την εργασία. Υπήρχε η ανάγκη για επανάληψη των πειραμάτων με ένα επαγωγέα νέκρωσης με χαρακτηρισμένα σηματοδοτικά μονοπάτια. Για

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

το λόγο αυτό επιλέχθηκε η μελέτη της επαγόμενης νέκρωσης από HopAB2 (από *P. syringae* ρν. *tomato DC3000*). Το αντίστοιχο σηματοδοτικό μονοπάτι είναι εκτενώς μελετημένο (Ekengren et al., 2003). Για την ακρίβεια χρησιμοποιήθηκε μια έλλειψη του HopAB2 με ακρωτηριασμένο το καρβοξυτελικό άκρο. Τα τρία διαφορετικά ομολόγα πρωτεϊνών-τελεστών (effectors) της οικογένειας HopF εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα να αναστέλλουν/καταστέλλουν την νέκρωση που επάγεται από την προαναφερθείσα έλλειψη. Και τα τρία έδωσαν πανομοιότυπη συμπεριφορά (αναστολή νέκρωσης).

3.2.1.1.4 Σχεδιασμός, κατασκευή και αgroεγχυση ακρωτηριασμένων (truncated) HopF1 και HopF2.

Η πρωτεΐνη HopF2 έχει πέντε συντηρημένες περιοχές-μοτίβα [Μοτίβο I: σινιάλο για έκκριση σε φυτά (Shan et al., 2004), Μοτίβο II: ενεργότητα ADP-ριβοζυλοτρανσφεράσης (Wang et al., 2010) και τρία μοτίβα (Μοτίβο III-Μοτίβο V) με άγνωστη λειτουργία].



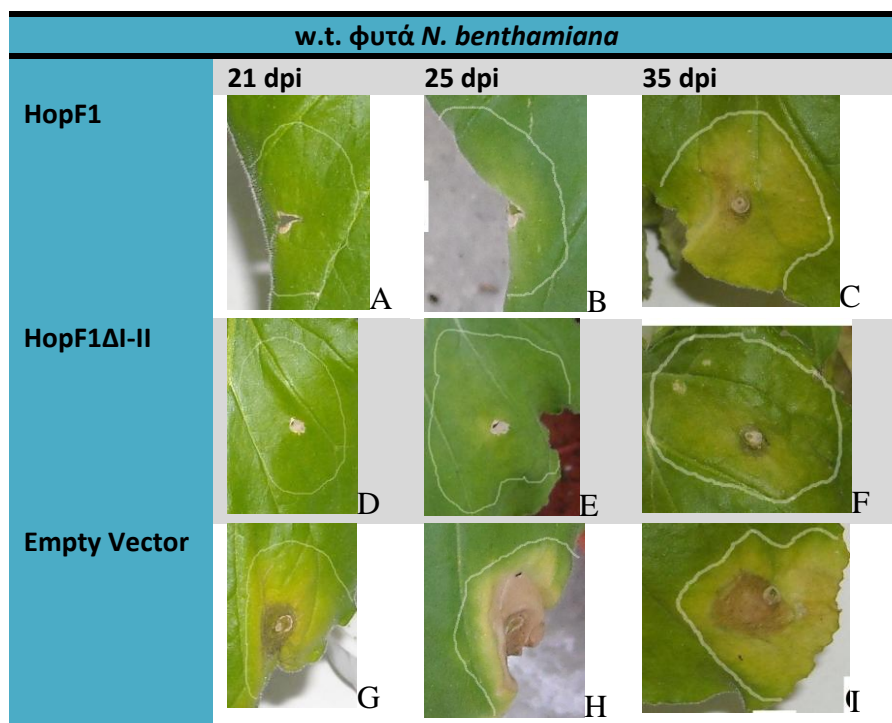
Εικόνα 42. Αgroεγχύσεις σε φύλλα *N. benthamiana* 16c (4 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

I. A) HopF2 (Δmotifs I-III) +GFP, B) HopF2 (Δmotifs I-II) +GFP, Γ) HopF2 +GFP, Δ) empty vector (pPZP222) + GFP.

II . Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/p² (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην I.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σε αυτή την ενότητα συναρμολογήθηκαν μια σειρά ακρωτηριασμένες (truncated) κατασκευές στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο των HopF1 και HopF2. Στόχος ήταν η πειραματική επιβεβαίωση της λειτουργικότητας των προβλεπόμενων δομικών περιοχών αλλά και αυτών που περιγράφονται στην προηγούμενη ενότητα. Οι κατασκευές αυτές περιέχουν εκλεκτικά κάποια τμήματα της HopF2_{DC3000} και HopF1_{1449B} κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή CaMV35S. Τα τμήματα αυτά είναι συντηγμένα όπου ήταν δυνατό με Flag επίτοπο. Έτσι, για το HopF2_{DC3000} ενδεικτικά συναρμολογήθηκαν: α) κατασκευές που απαλείφουν εκλεκτικά το μοτίβο πρόσδεσης σε NAD (HopF2ΔII) αλλά και β) ολόκληρη την περιοχή δομικής ομολογίας με ADP-ribosyltransferase/2'-tRNA phosphotransferase (HopF2ΔI-II) στο αμινοτελικό άκρο (Kato-Murayama et al., 2005).



Εικόνα 43. Αναστολή κυτταρικού θανάτου που επάγεται από ταλαιπωρία του ιστού λόγω αγγροένχυσης.

A-C. Αγγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν HopF1: A) 21 dpi, B) 25 dpi, C) 35 dpi.

D-F. Αγγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν HopF1ΔI-II: D) 21 dpi, E) 25 dpi, F) 35 dpi.

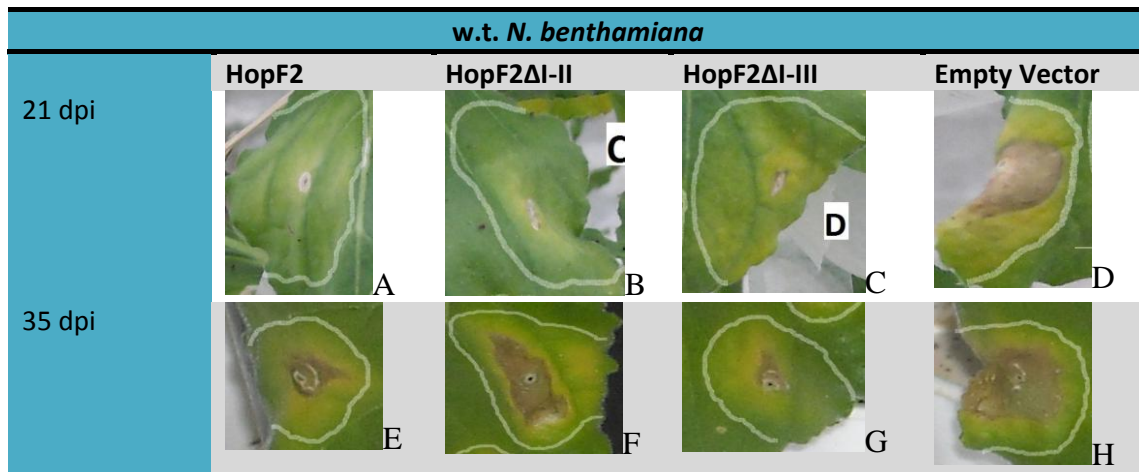
G-I. Αγγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν empty vector: G) 21 dpi, H) 25 dpi, I) 35 dpi.

Επιπλέον συναρμολογήθηκαν και κατασκευές που απαλείφουν εκτός από τα προηγούμενα και το μεγαλύτερο μέρος της περιοχής ομολογίας με ExoIII (HopF2ΔI-III). Παράλληλα, συναρμολογήθηκαν κατασκευές που περιέχουν μόνο το μοτίβο πρόσδεσης σε NAD και ολόκληρη την περιοχή δομικής ομολογίας με ADP-ribosyltransferase / 2'-tRNA

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

phosphotransferase της HopF2_{DC3000} αλλά στερούνται των μοτίβων ExoIII στο καρβοξυτελικό άκρο. Από την άλλη πλευρά συναρμολογήθηκαν αμινοτελικές ελλείψεις για το HopF1_{1449B} που διατηρούν μέρος ή ολόκληρη την περιοχή ομολογίας με την ExoIII (HopF1ΔI-II). Τελος, συναρμολογήθηκαν και καρβοξυτελικές ελλείψεις που την απαλείφουν.

Η αξιολόγηση των κατασκευών πραγματοποιήθηκε με το σύστημα της παροδικής συνέκφρασης με GFP σε φύλλα *N. benthamiana* (Hamilton et al., 2002). Με τη χρήση του συστήματος αυτού αποδείχτηκε ότι η καταστολή της σίγησης οφείλεται στα μοτίβα IV-V του HopF2_{DC3000}. Αυτή είναι η μικρότερη επικράτεια της πρωτεΐνης που μπορεί να διατηρήσει καταστολή της RNA σίγησης στο πειραματικό μας σύστημα. Καταστολή RNA σίγησης παρουσιάζουν και μεγαλύτερες επικράτειες [π.χ. HopF2 (Δmotifs I-II)] αρκεί να περιέχουν τα μοτίβα IV-V. Τα αποτελέσματα αυτά είναι επαναλήψιμα σε φύλλα διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων με ενδιαφέρουσα εξαίρεση ίσως τα πολύ νεαρά φύλλα.



Εικόνα 44. Αναστολή κυτταρικού θανάτου που επάγεται από ταλαιπωρία του ιστού λόγω αγροένχυσης.

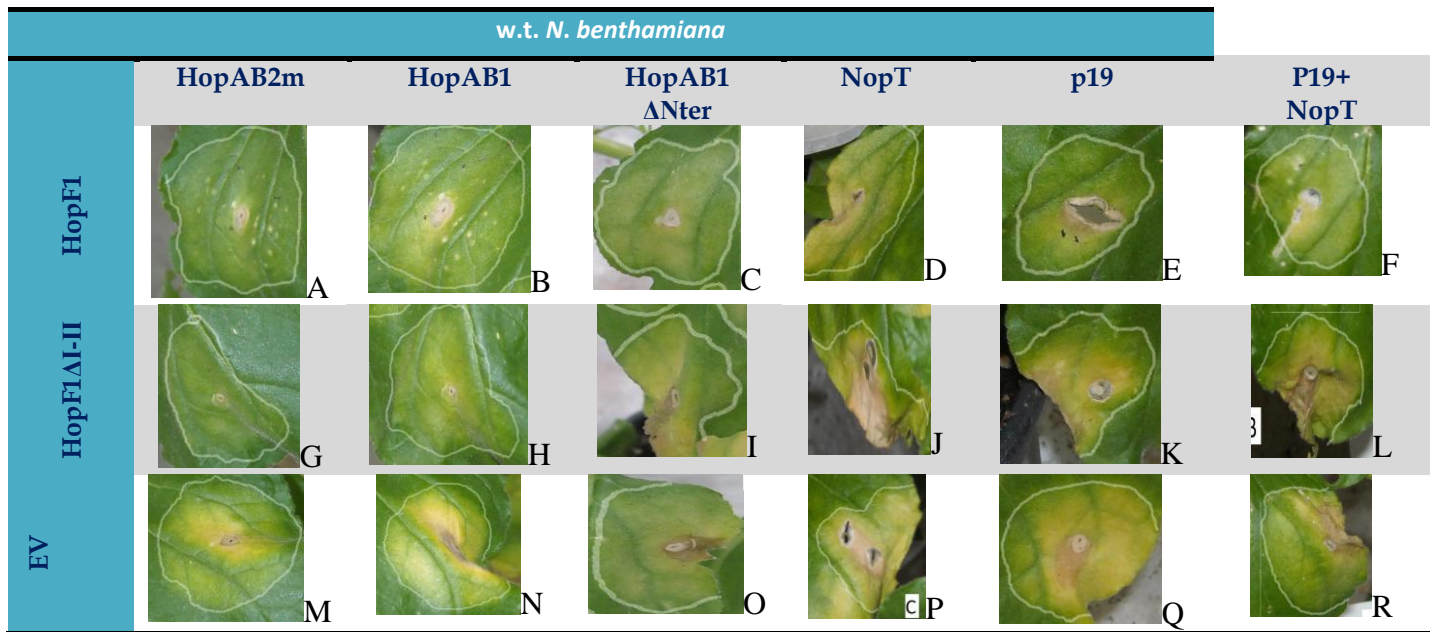
A-D. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* (21 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν A) HopF2, B) HopF2ΔI-II, C) HopF2ΔI-III. D) Empty vector.

E-H. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* (35 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν E) HopF2, F) HopF2ΔI-II, G) HopF2ΔI-III. H) Empty vector.

Οι αμινοτελικές ελλείψεις των ομολόγων HopF παρουσίασαν όμοια συμπεριφορά με τα αντίστοιχα πλήρους μήκους μετάγραφα. Οι συγκεκριμένες ελλείψεις δρουν σαν αναστολείς κυτταρικού θανάτου επαγόμενου από p19 στα ίδια πειραματικά συστήματα. Σαν εξαίρεση καταγράφεται η περίπτωση της κατασκευής Flag-HopF2ΔIII. Εδώ, η αναστολή εμφανίζεται παροδική σε ορισμένους οικότυπους της *N. benthamiana*. Παροδική επίσης εμφανίζεται η αναστολή των ελλείψεων στην επαγωγή νέκρωσης από p19 σε φυτά *N. tabacum* cv. *Basma*.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με την χρήση ελλείψεων που απαλείφουν το καρβοξυτελικό άκρο των HopF2 και HopF1 προκύπτει ότι για την αναστολή νέκρωσης στα πειράματά μας φαίνεται να οφείλεται μια κρυπτική ενεργότητα των μοτίβων IV και V. Τα αποτελέσματα επαναλήφθηκαν και σε άλλα πειραματικά συστήματα. Π.χ. χρησιμοποιήσαμε σαν επαγωγέα νέκρωσης το πλήρους μήκους HopAB1 (από *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B) ή μια έλλειψη στο καρβοξυτελικό άκρο του. Και στις δυο περιπτώσεις τα αποτελέσματα ήταν ταυτόσημα. Η ενεργότητα των μοτίβων IV και V στοχεύει ένα πολύ συντηρημένο τμήμα-κεντρικό διακόπτη του μηχανισμού



	HopAB2m	HopAB1	HopAB1ΔNter	NopT	p19	P19+NopT
HopF1	+	+	+	+	+	+
HopF1ΔI-II	+	+	-	-	-	-
+: ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΝΕΚΡΩΣΗΣ, -: ΝΕΚΡΩΣΗ						

Εικόνα 45. Αναστολή κυτταρικού θανάτου που επάγεται με συνέκφραση επαγωγέων νέκρωσης από φυτοπαθογόνα, ριζόβια ή ιό.

A-F. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν: A) HopF1+ HopAB2m (5 dpi), B) HopF1+ HopAB1 (6 dpi), C) HopF1+ HopAB1ΔN-term (12dpi), D) HopF1+ NopT (12 dpi), E) HopF1+ p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C"), F) HopF1 + NopT + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C").

G-L. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν: G) HopF1ΔI-II+ HopAB2m (5 dpi), H) HopF1ΔI-II + HopAB1 (6 dpi), I) HopF1ΔI-II + HopAB1ΔN-term (12dpi), J) HopF1ΔI-II + NopT (12 dpi), K) HopF1ΔI-II + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C"), L) HopF1ΔI-II + NopT + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C").

M-R. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν: M) Empty Vector + HopAB2m (5 dpi), N) Empty Vector + HopAB1 (6 dpi), O) Empty Vector + HopAB1ΔN-term (12dpi), P) Empty Vector + NopT (12 dpi), Q) Empty Vector + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C"), R) Empty Vector + NopT + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C").

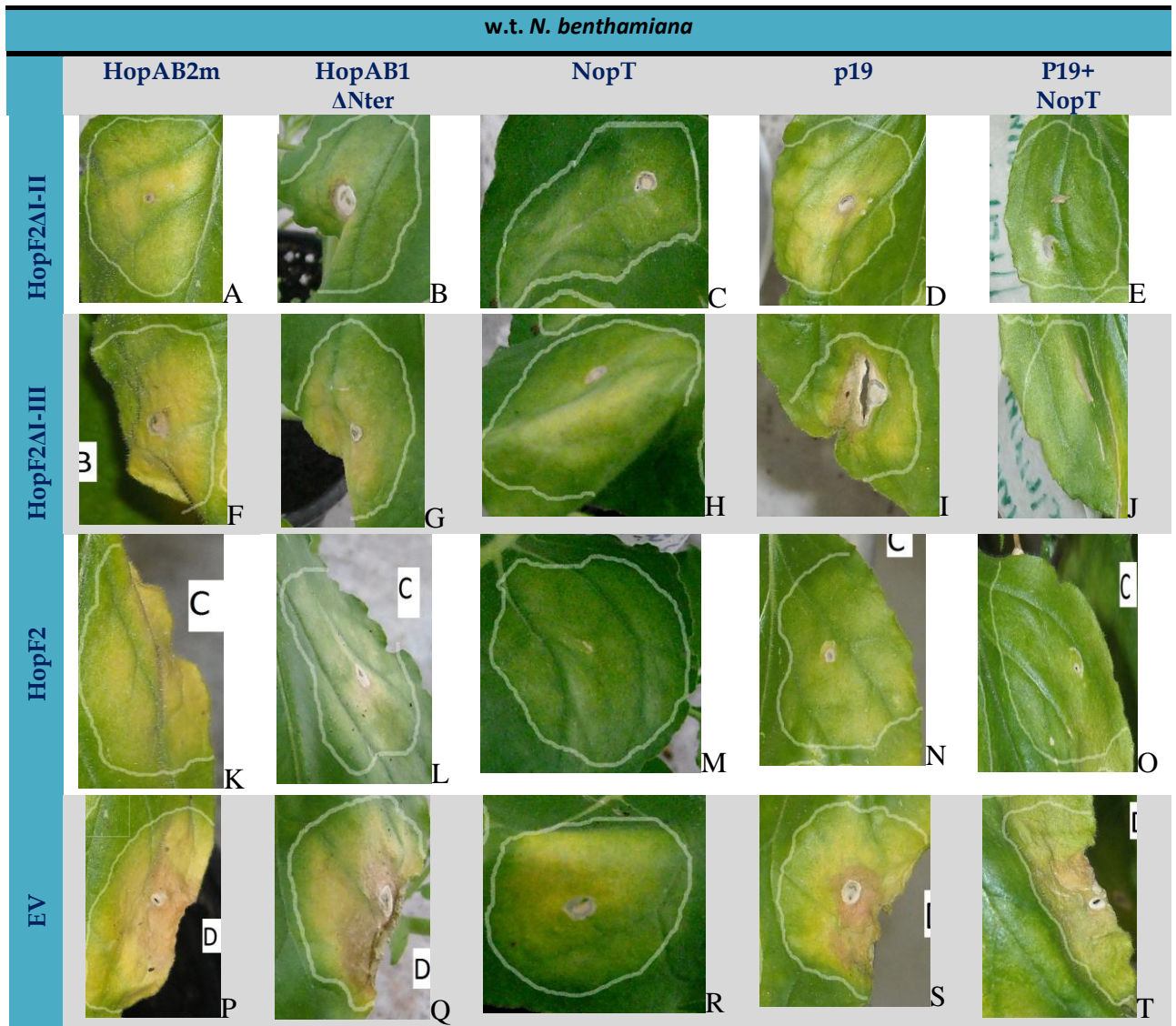
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

απόκρισης του φυτού και μάλιστα στο στάδιο της πρώιμης σηματοδότησης πριν την έναρξη της διακλάδωσης των διαφόρων μονοπατιών σίγησης. Για την αποσαφήνιση του ρολού του μοτίβου III, χρησιμοποιήθηκε σαν επαγωγέας νέκρωσης η ριζοβιακή πρωτεΐνη NorT (Dai et al., 2008). Χρησιμοποιώντας το σύστημα αυτό (και σε συνδυασμό με διπλή επαγωγή νέκρωσης με p19 και NorT) αποδείχθηκε ότι η επαγωγή νέκρωσης προκαλούμενης από NorT πραγματοποιείται από ένα διακριτό μονοπάτι. Στις περιπτώσεις όπου η καταστολή νέκρωσης από την ενεργότητα των μοτίβων IV και V είναι ισχυρή, το Μοτίβο III δεν φαίνεται να διαδραματίζει ρόλο. Η συνεργιστική του δράση με τα μοτίβα IV και V αποκαλύπτεται μόνο στις περιπτώσεις όπου η προαναφερθείσα ενεργότητα κρίνεται μερικώς ανεπαρκής. Τέτοια περίπτωση είναι η συνέκφραση με NorT. Αντίθετα, ελλείψεις που δεν περιέχουν το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης HorF2 δεν αναστέλλουν νεκρωτικούς φαινοτύπους σε φυτά *N. benthamiana* (data not shown). Όμοια συμπεριφορά έχουν και αντίστοιχες ελλείψεις των ομολόγων HorF1 /HorF3.

Τα αποτελέσματα όμως στην περίπτωση των ελλείψεων που δεν περιέχουν το καρβοξυτελικό άκρο δεν είναι συμπερασματικά καθώς α) αφενός υπάρχει δυσκολία να προσδιοριστούν επακριβώς τα όρια της κωδικής περιοχής που ευθύνεται για την ενεργότητα ADP-ribosyltransferase στο αμινοτελικό άκρο και β) αφετέρου η υποκλωνοποίηση με χρήση περιοριστικών θέσεων πάνω στην αλληλουχία της πρωτεΐνης δεν επιτρέπει πάντα να υποκλωνοποιηθούν επακριβώς τα τμήματα αυτά.

Σε άλλο σημείο του κειμένου παρουσιάζονται πειράματα για τον ρόλο της θερμοκρασίας στον κυτταρικό θάνατο. Υψηλές θερμοκρασίες (30 °C) θεωρούνται ανασταλτικές για την εκδήλωση νεκρώσεων στα προαναφερόμενα πειραματικά συστήματα. Συνέκφραση επαγωγέα νέκρωσης με κάποιο από τα ομόλογα ή τις ελλείψεις τους έχει την ίδια επίδραση ανεξαρτήτως θερμοκρασίας. Ο επαγωγέας νέκρωσης σε υψηλότερες θερμοκρασίες πυροδοτεί πιο καθυστερημένη χρονικά νέκρωση. Η νέκρωση αυτή είναι επίσης αντιστρέψιμη παρουσία των ομολόγων ή των ελλείψεων τους (όπως ακριβώς συμβαίνει σε χαμηλότερες θερμοκρασίες).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



	HopAB2m	HopAB1ΔNter	NopT	p19	P19+NopT
HopF2ΔI-II	+	+	+	+/-	+
HopF2ΔI-III	+	-	-	+/-	+
HopF2	+	+	+	+	+
+: ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΝΕΚΡΩΣΗΣ, -:ΝΕΚΡΩΣΗ					

Εικόνα 46. Αναστολή κυτταρικού θανάτου που επάγεται με συνέκφραση επαγωγών νέκρωσης από φυτοπαθογόνα, ριζόβια ή ιό.

A-E. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν: A) HopF2ΔI-II + HopAB2m (12 dpi), B) HopF2ΔI-II + HopAB1ΔN-term (12dpi), C) HopF2ΔI-II + NopT (5 dpi), D) HopF2ΔI-II + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* “Ecotype C”), E) HopF2ΔI-II + NopT + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* “Ecotype C”).

F-J. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν: F) HopF2ΔI-III + HopAB2m (12 dpi), G) HopF2ΔI-III + HopAB1ΔN-term (12dpi), H) HopF2ΔI-III + NopT (5 dpi), I)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

HopF2ΔI-III + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C"), J) HopF2ΔI-III + NopT + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C").

K-O. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν: K) HopF2 + HopAB2m (12 dpi), L) HopF2 + HopAB1ΔN-term (12dpi), M) HopF2 + NopT (5 dpi), N) HopF2 + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C"), O) HopF2 + NopT + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C").

P-T. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν: P) Empty Vector + HopAB2m (12 dpi), Q) Empty Vector + HopAB1ΔN-term (12dpi), R) Empty Vector + NopT (5 dpi), S) Empty Vector + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C"), T) Empty Vector + NopT + p19 (12 dpi, σε w.t. φυτά *N. benthamiana* "Ecotype C").

Εκτός από την θερμοκρασία και η φωτοπερίοδος φαίνεται να επηρεάζει την ταχύτητα επαγωγής κυτταρικού θανάτου. Η καταστολή νεκρώσεων από τα ομόλογα ή τις ελλείψεις τους είναι ανεξάρτητη της φωτοπεριόδου (αν και δεν έχουν γίνει αναλυτικά πειράματα ως προς αυτή την κατεύθυνση. Σαν γενικό συμπέρασμα, η καταστολή νεκρώσεων από ομόλογα ή τις ελλείψεις τους είναι ανεξάρτητη από την ταχύτητα της εκδήλωσης του νεκρωτικού φαινοτύπου.

3.2.1.1.5 Στοχευμένες σημειακές μεταλλαγές στα HopF2_{DC3000} και HopF1_{1449B} σε δυαδικό φορέα έκφρασης.

Η υπόθεση εργασίας είναι ότι υπάρχουν δυο ενεργότητες αναστολής νέκρωσης στην κωδική περιοχή των HopF2_{DC3000} και HopF1_{1449B}. Μια στο μοτίβο II όπως έχει υποδειχτεί και σε προηγούμενες εργασίες (Wilton et al., 2010) και μια δεύτερη κρυπτική στα μοτίβα IV και V που περιγράφεται για πρώτη φορά σε αυτήν την εργασία.

Για τον έλεγχο της υπόθεσης αυτής σχεδιαστήκαν και κατασκευάστηκαν μια σειρά από σημειακές μεταλλαγές. Οι σημειακές μεταλλαγές κατασκευάστηκαν σε πλασμίδιο με ένθεμα στο οποίο η πλήρους μήκους κωδική περιοχή του HopF2 είχε κλωνοποιηθεί αρχικά σε βοηθητικό φορέα που φέρει υποκινητή (promoter) για έκφραση σε φυτά και nos terminator. Η όλη κατασκευή είχε μεταφερθεί σε δυαδικό φορέα έκφρασης για μόνιμη ή παροδική υπερέκφραση σε φυτά. Ίδιες μεταλλαγές κατασκευάστηκαν και σε βοηθητικό φορέα που κωδικοποιεί για το ελάχιστο τμήμα του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης HopF2 (που περιέχει μόνο τα μοτίβα IV και V) το οποίο μπορεί να δώσει αναστολή νεκρωτικών φαινοτύπων σε φυτά *N. benthamiana*. Στην συνέχεια τα ενθέματα υποκλωνοποιήθηκαν σε δυαδικό φορέα για έκφραση σε φυτά.

Σε πρώτη φάση κατασκευάστηκαν στοχευμένες σημειακές μεταλλαγές για τις HopF1 και HopF2 με βάση τα δεδομένα από βιοπληροφορική ανάλυση (δες και προηγούμενες ενότητες). Επιλέχτηκαν κρίσιμα αμινοξέα για την πρόσδεση με συνπαράγοντα NAD (απαραίτητα για την ενεργότητα ADP-ribosyltransferase/2'-tRNA

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

phosphotransferase) και συντηρημένα αμινοξέα των HopF1 και HopF2 που σχετίζονται με υποτιθέμενη καταλυτική ενεργότητα εξωνουκλεάσης III. Στόχος ήταν ο έλεγχος των κατασκευών αυτών με το σύστημα της παροδικής συνέκφρασης με GFP σε φύλλα *N. benthamiana*.

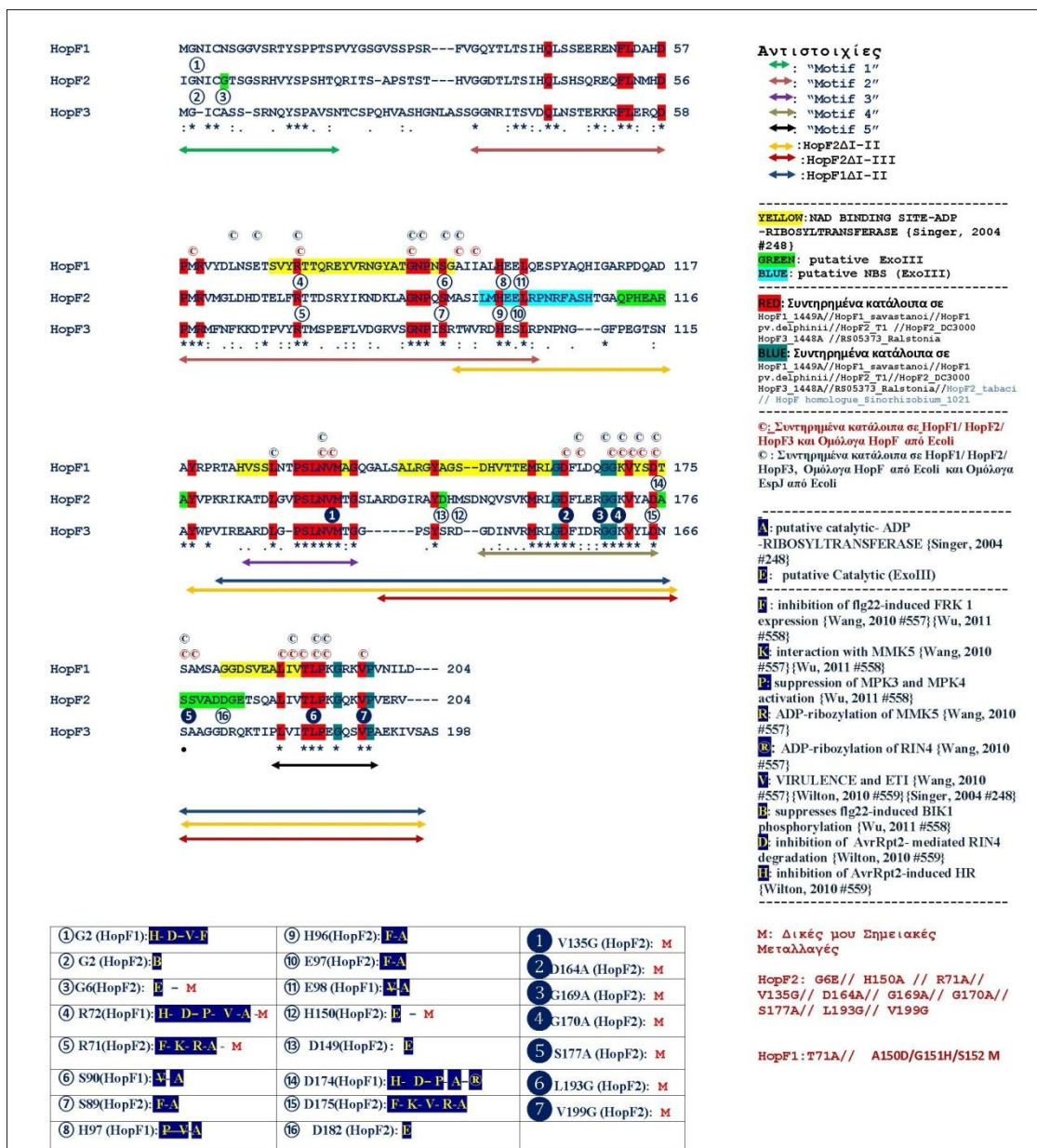
Έτσι σε πρώτη φάση, σχετικά με την ενεργότητα εξωνουκλεάσης III επιλέχθηκαν να μεταλλαχθούν τα κατάλοιπα G6 (σε E) και H150 (σε A) της HopF2_{DC3000}. Η πρώτη μεταλλαγή αποσκοπεί στην μετατροπή ενός από τα μη συντηρημένα κατάλοιπα που σχετίζονται με την ενεργότητα εξωνουκλεάσης III της HopF2_{DC3000} (G6) σε συντηρημένο (E6). Όταν λέμε συντηρημένο εννοούμε συντηρημένο στις πειραματικά τεκμηριωμένες εξωνουκλεάσεις III. Παράλληλα, καταβλήθηκε προσπάθεια να μην καταστρέφεται το σινιάλο έκκρισης της πρωτεΐνης που συνυπάρχει στην ίδια περιοχή. Από την άλλη πλευρά η δεύτερη σημειακή μεταλλαγή (H150A) έχει σαν στόχο την υποκατάσταση ενός κρίσιμου καταλοίπου για εξωνουκλεάσης III. Οι δυο αυτές σημειακές μεταλλαγές δεν έδωσαν κάποιο διαφορετικό φαινότυπο ούτε στην καταστολή της σίγησης ούτε στην καταστολή της νέκρωσης (σε σχέση με το w.t. HopF2_{DC3000}).

Στην HopF1_{1449B}, το κατάλοιπο H150 και τα γειτονικά κατάλοιπα δεν είναι συντηρημένα. Γενικά δεν υπάρχει μεγάλος βαθμός συντήρησης των κρίσιμων για ενεργότητα εξωνουκλεάσης III στην HopF1_{1449B}. Το αντίθετο συμβαίνει με την HopF2_{DC3000}. Έτσι, κατασκευάστηκε στην κωδική αλληλουχία της HopF1_{1449B} μια τριπλή μεταλλαγή (A150D/G151H/M152). Στόχος ήταν η πιθανή μετατροπή του υποθετικά ανενεργού HopF1_{1449B} σε λειτουργική εξωνουκλεάση III. Τα κατάλοιπα αυτά βρίσκονται σε μια εξωτερική περιοχή της πρωτεΐνης. Η δομή της περιοχής αυτής δεν είναι αποσαφηνισμένη στον κρύσταλλο της HopF1_{1449B}. Πιθανόν σχηματίζουν μια ευέλικτη λούπα. Σε κάθε περίπτωση και εδώ τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά.

Αναφορικά με την πρόσδεση του συνπαράγοντα NAD (και την ενεργότητα ADP-ribosyltransferase ή 2'-tRNA phosphotransferase) υπάρχουν πολλοί πιθανοί στόχοι (π.χ. P57/P58, G85/G86/G110, H113/H114/H120)³³. Τελικά όμως επιλέχθηκαν δυο κατάλοιπα για μεταλλαξιγένεση. Κατασκευάστηκε μεταλλαγή R71A στην κωδική αλληλουχία της HopF2_{DC3000} και T74A στην κωδική αλληλουχία της HopF1_{1449B}. Αμφότερα τα κατάλοιπα αυτά είναι κρίσιμα για την πρόσδεση σε NAD. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων με αυτές τις μεταλλαγές παρουσιάζεται παρακάτω.

³³ Ο πρώτος αριθμός αναφέρεται στην αρίθμηση της κωδικής περιοχής της HopF2_{DC3000}, ο δεύτερος στην αντίστοιχη αρίθμηση της HopF1_{1449A} ενώ ο τρίτος (όπου υπάρχει) στην λυμένη δομή αναφοράς της 2'-tRNA phosphotransferase (Kato-Murayama et al., 2005).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



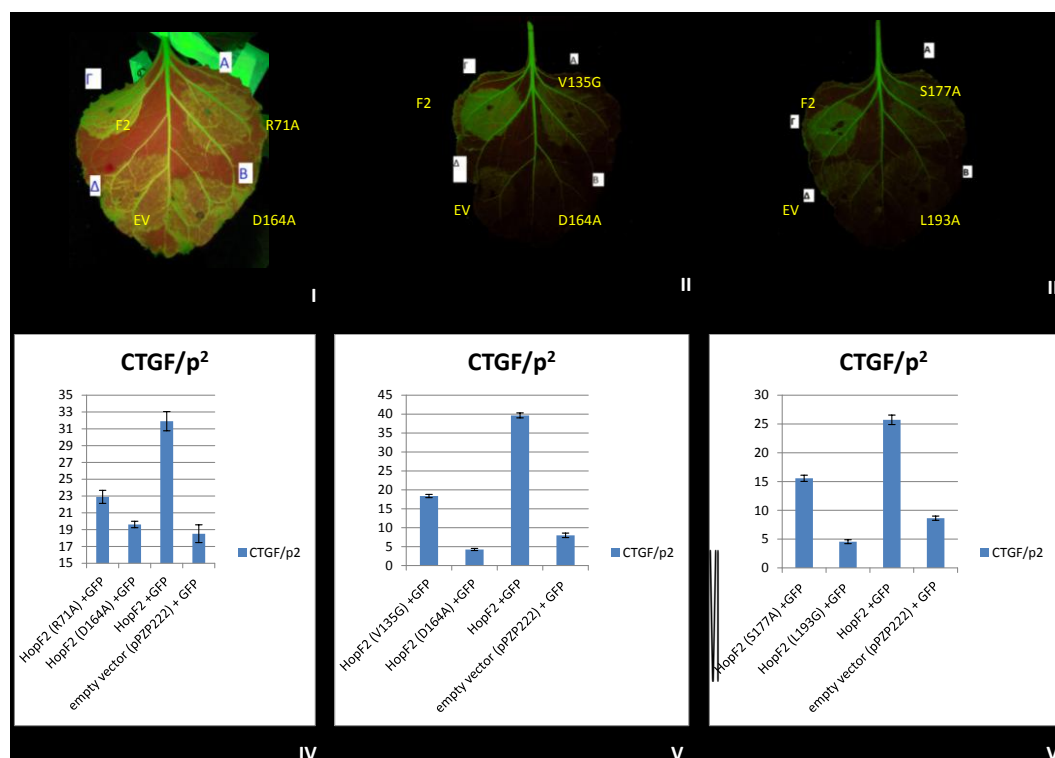
Εικόνα 47. Συστοιχίσεις ομολόγων HopF1/HopF2/HopF3. Οι συστοιχίσεις έγιναν με το πρόγραμμα ClustalW (Thompson et al., 2002).

Σε δεύτερη φάση επιλέχθηκαν συντηρημένα κατάλοιπα από τα μοτίβα που δεν έχουν συσχετιστεί μέχρι τώρα με την λειτουργικότητα της HopF2. Οι πρωτεΐνες HopF1/HopF2/ HopF3 έχουν όπως προειπώθηκε [εκτός από το σινιάλο για έκκριση σε φυτά (Shan et al., 2004) και το μοτίβο II με ενεργότητα ADP-ριβοζυλοτρανσφεράσης (Wang et al., 2010)] και τρεις συντηρημένες περιοχές-μοτίβα (Μοτίβο III-Μοτίβο V) με άγνωστη μέχρι τώρα λειτουργία.

Στην προηγούμενη ενότητα, με την χρήση ελλείψεων που απαλείφουν το καρβοξυτελικό άκρο των HopF2 και των ομολόγων κατέστη δυνατόν να δείχτεί ότι για την

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

αναστολή νέκρωσης στα πειράματα μας οφείλεται μια κρυπτική ενεργότητα των μοτίβων IV και V. Η συνεργιστική δράση του Μοτίβου III με τα Μοτίβια IV και V αποκαλύπτεται μόνο στις περιπτώσεις όπου η προαναφερθείσα ενεργότητα κρίνεται μερικώς ανεπαρκής. Στην παρούσα φάση της εργασίας επιχειρήθηκε να αποσαφηνιστεί η λειτουργία και αυτών των Μοτίβων (III, IV και V) με την κατασκευή σημειακών μεταλλαγών.



	HopF2 (R71A)	HopF2 (V135G)	HopF2 (D164A)	HopF2 (S177A)	HopF2 (L193G)	HopF2
S	-	-	-	-	-	+

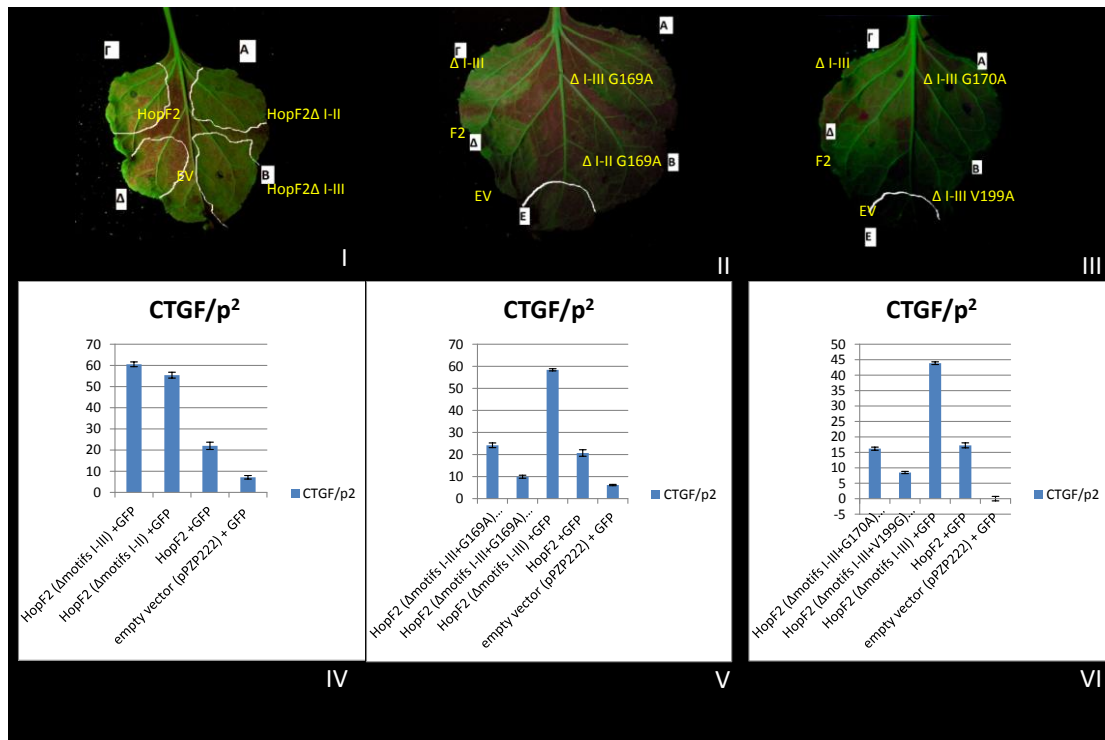
S: Silencing Suppression

Εικόνα 48. Αgroενχύσεις σε φύλλα *N. benthamiana* 16c (4 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

- I. A) HopF2 (R71A) +GFP, B) HopF2 (D164A) +GFP, Γ) HopF2 +GFP, Δ) empty vector (pPZP222) + GFP.
- II. A) HopF2 (V135G) +GFP, B) HopF2 (D164A) +GFP, Γ) HopF2 +GFP, Δ) empty vector (pPZP222) + GFP.
- III. A) HopF2 (S177A) +GFP, B) HopF2 (L193G) +GFP, Γ) HopF2 +GFP, Δ) empty vector (pPZP222) + GFP.
- IV. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ρ² (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην I.
- V. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ρ² (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην II.
- VI. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ρ² (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην III.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συνολικά (εκτός από αυτές που προαναφέρθηκαν) κατασκευάστηκαν μια σειρά από μονές σημειακές μεταλλαγές υποκατάστασης επιλεγμένων συντηρημένων αμινοξέων στα Μοτίβα III (V135G), IV (D164A, G170A, S177A) και V (L193G, V199G) στην πλήρους μήκους πρωτεΐνη HopF2_{DC3000}.



	HopF2 ΔI-II	HopF2 ΔI-III	HopF2 ΔI-III (G169A)	HopF2 ΔI-III (G170A)	HopF2 ΔI-III (V199G)	HopF2
S	+	+	-	+	+	+
S: Silencing Suppression						

Εικόνα 49. Αγροενχύσεις σε φύλλα *N. benthamiana* 16c (4 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

- I. A) HopF2 (Δmotifs I-III) +GFP, B) HopF2 (Δmotifs I-II) +GFP, Γ) HopF2 +GFP, Δ) empty vector (pZP222) + GFP.
- II. A) HopF2 (Δmotifs I-III+G169A) +GFP, B) HopF2 (Δmotifs I-III+G169A) +GFP, Γ) HopF2 (Δmotifs I-III) +GFP, Δ) HopF2 +GFP, E) empty vector (pZP222) + GFP.
- III. A) HopF2 (Δmotifs I-III+G170A) +GFP, B) HopF2 (Δmotifs I-III+V199G) +GFP, Γ) HopF2 (Δmotifs I-III) +GFP, Δ) HopF2 +GFP, E) empty vector (pZP222) + GFP.
- IV. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/p² (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην I.
- V. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/p² (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην II.
- VI. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/p² (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην III.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με αντίστοιχη μεθοδολογία κατασκευάστηκαν δυο μονές σημειακές μεταλλαγές υποκατάστασης αμινοξέων N134A και V135G σε μια κατασκευή του γονιδίου *HopF2_{DC3000}* που περιλάμβανε μόνο τα μοτίβα III-V και υποκλωνοποιήθηκαν στον ίδιο δυαδικό φορέα. Τέλος, κατασκευάστηκαν ξεχωριστές σημειακές μεταλλαγές για υποκατάσταση αμινοξέων στα μοτίβα IV (G169A, G170A, S177A) και V (L193G, V199G) σε μια κατασκευή που περιλάμβανε μόνο τα μοτίβα IV-V και ακολούθησε υποκλωνοποίηση τους σε δυαδικό φορέα κατάλληλο για πειράματα αγροέγχυσης όπως περιγράφεται στο Hamilton και συνεργάτες (2002).

Παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες δεν κατέστη δυνατόν να κατασκευαστούν στον ίδιο πλασμίδιο διπλές ή πολλαπλές μεταλλαγές που να περιλαμβάνουν π.χ. μια μεταλλαγή στο μοτίβο III και μια στο μοτίβο IV κ.ο.κ. Επιπλέον δεν κατέστη δυνατή η κατασκευή κάποιας σημειακής μεταλλαγής η οποία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν θετικός μάρτυρας όπως η D175A στο μοτίβο IV (Singer et al., 2004; Wilton et al., 2010). Η αξιολόγηση του ρόλου των μεταλλαγών αυτών έγινε χρησιμοποιώντας το σύστημα της παροδικής συνέκφρασης των κωδικών τους γονιδίων μέσω “αγροέγχυσης” σε διακυττάρια φύλλων του φυτού-μοντέλου *N. benthamiana* (Hamilton et al., 2002). Στα πειράματα που στόχευαν την αποσαφήνιση του ρόλου τους στην νέκρωση τα μεταλλάγματα αυτά συνεκφράστηκαν με πρωτεΐνες-επαγωγείς νέκρωσης. Στα πειράματα που στόχευαν την αποσαφήνιση του ρόλου τους στην RNA σίγηση συνεκφράστηκαν με την φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP.

Τέλος, κάποιες επιλεγμένες σημειακές μεταλλαγές: R71A (για το μοτίβο II), N134A (για το μοτίβο III), H150A ή G169A ή G170A ή D175A ή S177A (για το μοτίβο IV) και P194A (για το μοτίβο V) κατασκευάστηκαν σε ένα πλασμίδιο που περιλαμβάνει την πλήρους μήκους κωδική περιοχή του *HopF2* στον φορέα pProEXHTc (Invitrogen). Ο φορέας είναι κατάλληλος για υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε *E. coli*.

3.2.1.1.6 Κρίσιμα κατάλοιπα για καταστολή RNA σίγησης από *HopF2DC3000*.

Μοναδιαίες υποκαταστάσεις επιλεγμένων αμινοξέων (R71A, V135G, D164A, S177A, L193G κ.α.-βλέπε στις λεζάντες των φωτογραφιών που παρατίθενται στη συνέχεια) στην πλήρους μήκους *HopF2_{DC3000}* απαλείφουν την ικανότητα της να δρα σαν καταστολέας σίγησης. Ξεχωριστές μεταλλαγές (G170A, V199G κ.α.) σε κατασκευή που περιλαμβάνει μόνο τα μοτίβα IV-V της *HopF2DC3000* επίσης απαλείφουν την ικανότητα της να δρα σαν καταστολέας σίγησης. Συνολικά τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στην υπόθεση

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

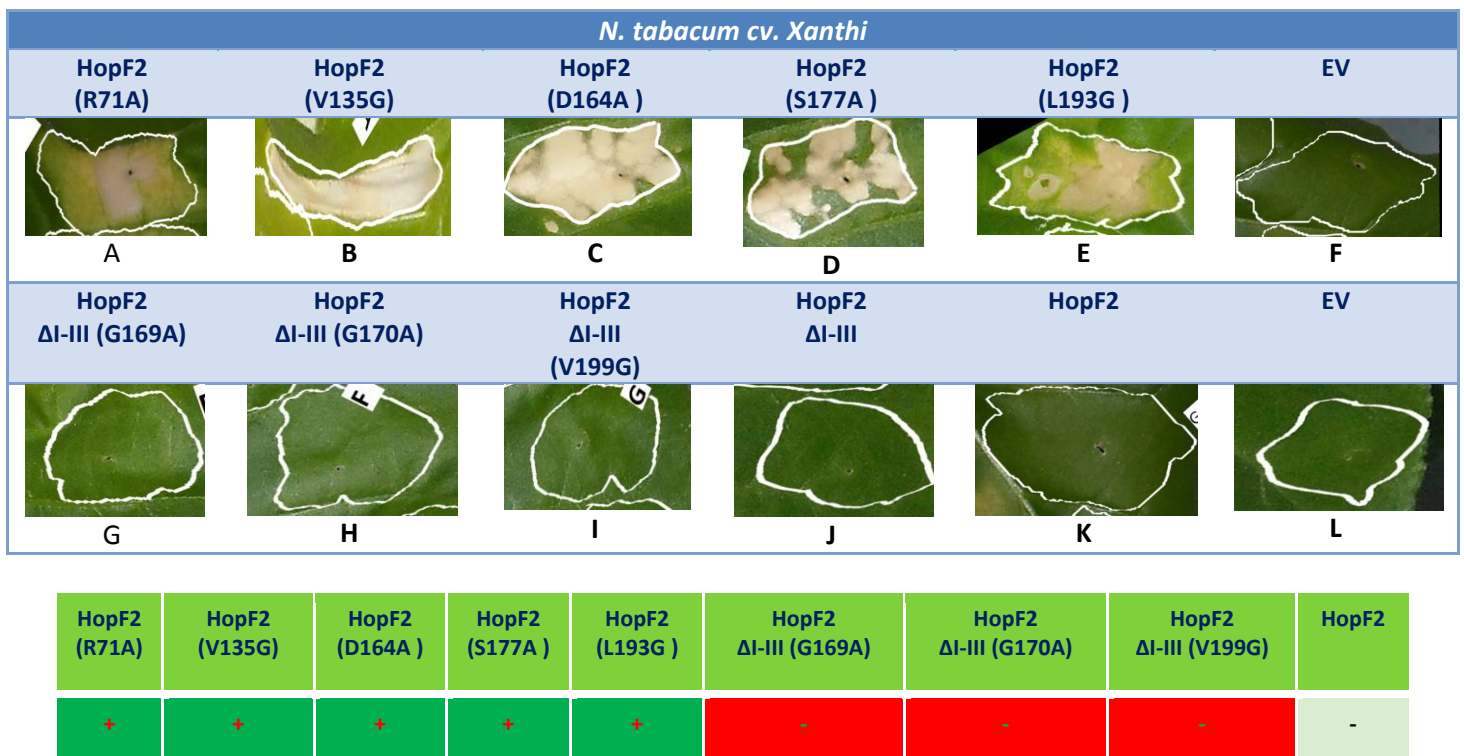
εργασίας ότι η πρωτεΐνη HopF2 ίσως να έχει τουλάχιστον δυο διακριτές ενεργότητες οι οποίες άλλοτε μπορεί να δρουν συνεργιστικά και άλλοτε ανταγωνιστικά.

3.2.1.1.7 Κρίσιμα κατάλοιπα για καταστολή νέκρωσης από HopF2DC3000. Το HopF2_{DC3000} δεν πυροδοτεί HR σε *N. tabacum* cv. *Xanthi*. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε δυο ενδεχόμενα.

- 1) Δεν υπάρχει αντίστοιχο R γονίδιο σε *N. tabacum* cv. *Xanthi*.
- 2) Υπάρχει αντίστοιχο R γονίδιο σε *N. tabacum* cv. *Xanthi*, επάγεται νέκρωση αλλά αναστέλλεται πριν γίνει μακροσκοπικά ορατή. Η καταστολή αυτή οφείλετε στην ικανότητα του ίδιου του HopF2_{DC3000} να αναστέλλει διαφόρων τύπων νεκρώσεις.

Τα δυο ενδεχόμενα θα μπορούσαν να διαχωριστούν με την χρήση σημειακών μεταλλαγών στο HopF2_{DC3000} που παρεμποδίζουν την ανασταλτική λειτουργία του ως προς την νέκρωση. Τέτοιες σημειακές μεταλλαγές παρουσιάζονται παρακάτω.

Έτσι, εάν μια σημειακή μεταλλαγή ακυρώνει την ικανότητα του HopF2_{DC3000} να αναστέλλει νέκρωση **και υπάρχει αντίστοιχο R γονίδιο**, οι νεκρώσεις θα προχωρήσουν κανονικά και θα γίνουν ορατές. Να σημειωθεί ότι δεν είναι βιβλιογραφικά γνωστό ποιο R γονίδιο εμπλέκεται σε αυτή την περίπτωση.



Εικόνα 50. Αγροενχύσεις μεταλλαγμάτων του τελεστή HopF2_{DC3000} σε *N. tabacum* cv. *Xanthi*. Οι νεκρώσεις από αγροένχυση κατασκευών που φέρουν σημειακές μεταλλαγές του HopF2_{DC3000} είναι εμφανείς μετά την δεύτερη μέρα. Οι φωτογραφίες πάρθηκαν στο τέλος της πρώτης εβδομάδας. Το HopF2/S177A έχει ασταθή συμπεριφορά και τις περισσότερες












ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

φορές δίνει νέκρωση με καθυστέρηση σε σχέση με τα υπόλοιπα. Παρουσιάζονται αγροενχύσεις με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

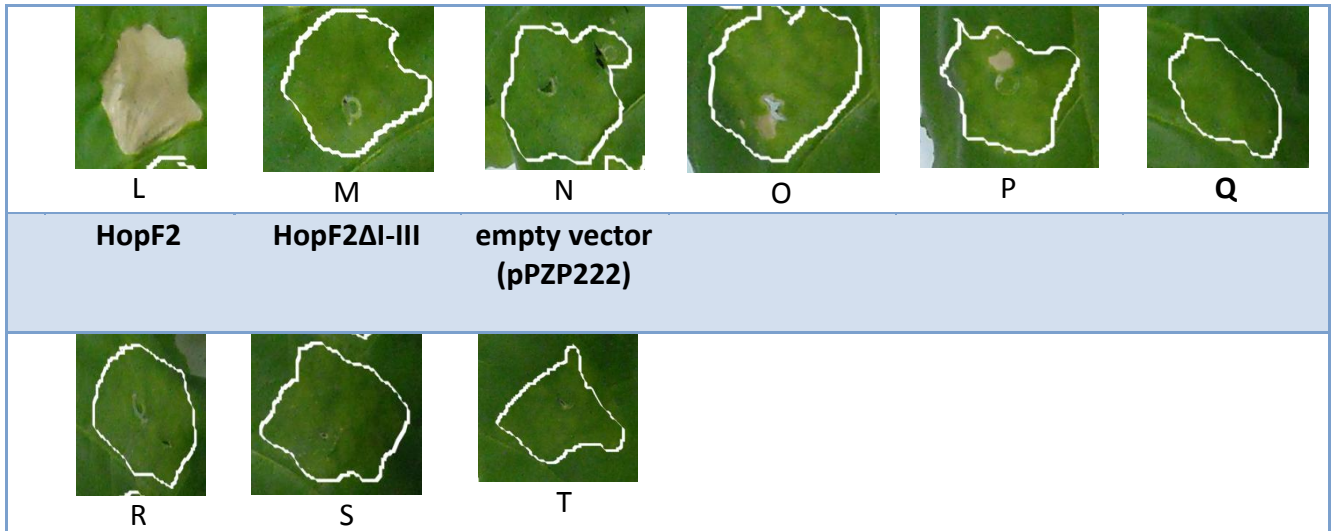
A) HopF2/R71A, B) HopF2/V135G, C) HopF2/D164A, D) HopF2/S177A, E) HopF2/L193G, F) empty vector (pPZP222), G) HopF2 (ΔI-III)/G169A, H) HopF2 (ΔI-III)/G170A, I) HopF2 (ΔI-III)/V199G, J) HopF2(ΔI-III), K) HopF2, L) empty vector (pPZP222).

3.2.1.1.8 Αποκάλυψη κρίσιμης περιοχής για αναγνώριση της HopF2DC3000 από R-γονίδιο. Παρατηρούμε ότι οι κατασκευές στις οποίες λείπει το μοτίβο II δεν δίνουν νεκρώσεις ακόμα και όταν φέρουν σημειακές μεταλλαγές για μοτίβα που εμπλέκονται στην αναστολή του κυτταρικού θανάτου. Μια πιθανότητα είναι το R γονίδιο να αναγνωρίζει το HopF2 (DC3000) μέσω του μοτίβου II του τελευταίου. Αυτό δεν είναι παράλογο διότι το μοτίβο II σχετίζεται με μια ενζυμική ενεργότητα του HopF2 (ριβοζύλ-τρανσφεράσης).

3.2.1.1.9 Ρόλος της σίγησης στην επιτάχυνση νεκρώσεων από σημειακές μεταλλαγές HopF2DC3000. Αγροένχυση των περισσότερων κατασκευών με σημειακές μεταλλαγές του HopF2_{DC3000} δεν οδηγούν σε HR του φυτικού ιστού στην περιοχή της αγροένχυσης σε *N. tabacum* cv. *Basma N34/4*. Οδηγούν όμως σε εκτεταμένη χλώρωση του ιστού. Εξάιρεση αποτελεί το HopF2 (V135G.12). Νεκρώσεις βέβαια εμφανίζονται μετά από μερικές μέρες και στην περίπτωση του HopF2/D164A.

<i>N. tabacum</i> cv. <i>Basma N34/4</i>					
HopF2 (R71A)	HopF2 (V135G.16)	HopF2 (V135G.12)	HopF2 (V135G.19)	HopF2 (V135G.20)	HopF2 (V135G.23)
					
A	B	C	D	E	F
HopF2 (L193G)	HopF2 (D164A.8)	HopF2 (D164A.16)	HopF2	empty vector	
					
G	H	I	J	K	
HopF2 (V135G.12)	HopF2 (S177A.1)	HopF2 ΔI- III(G169A.8)	HopF2 ΔI- III(G169A.25)	HopF2 ΔI-III(G170A.4)	HopF2 ΔI-III(V199G)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



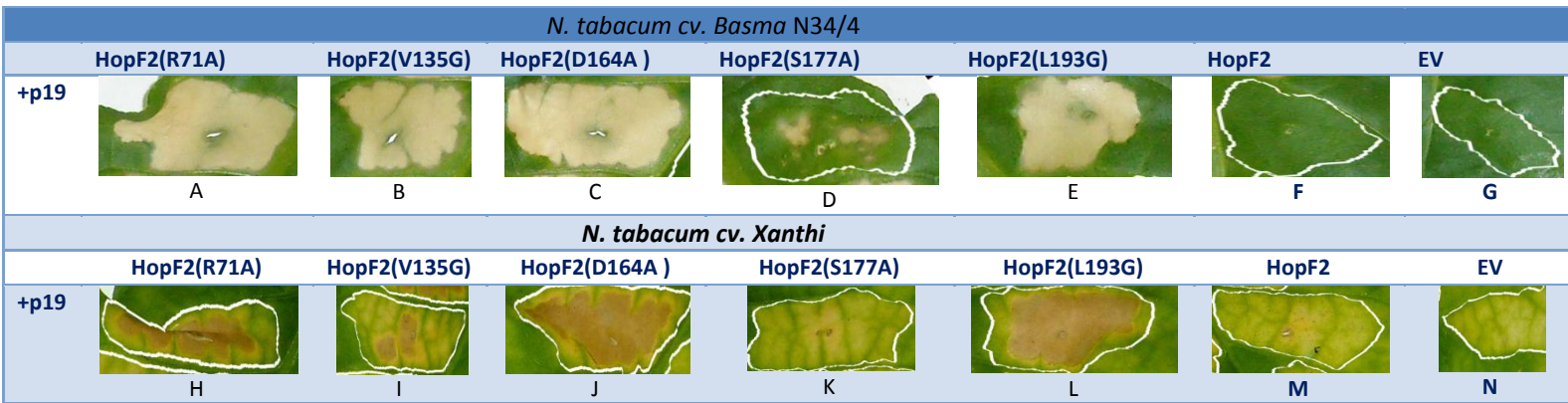
Εικόνα 51. Αγροενχύσεις σε *N. tabacum* cv. *Basma* N34/4.

Παρουσιάζονται αγροενχύσεις με κατασκευές που υπερεκφράζουν πλήρους μήκους HopF2 με σημειακές μεταλλαγές αλλά και σημειακές μεταλλαγές στην έλλειψη HopF2ΔI-III και όχι στο πλήρους μήκους HopF2: A) HopF2(R71A), B) HopF2(V135G.16), C) HopF2(V135G.12), D) HopF2(V135G.19), E) HopF2(V135G.20), F) HopF2 (V135G.23), G) HopF2 (L193G), H) HopF2(D164A.8), I) HopF2(D164A.16), J) HopF2, K) empty vector (pPZP222), L) HopF2 (V135G.12), M) HopF2 (S177A.1), N) HopF2ΔI-III(G169A.8), O) HopF2ΔI-III(G169A.25), P) HopF2ΔI-III(G170A.4), Q) HopF2ΔI-III(V199G), R) HopF2, S) HopF2ΔI-III, T) empty vector (pPZP222).

ο ιικός αναστολέας της σίγησης p19 επιταχύνει διαφόρων τύπων νεκρώσεις (δες και αντίστοιχη ενότητα). Παραπάνω παρατηρήσαμε ότι σε αντίθεση με ότι συμβαίνει σε *N. tabacum* cv *Xanthi*, οι περισσότερες σημειακές μεταλλαγές δεν δίνουν νέκρωση σε *N. tabacum* cv. *Basma* N34/4. Επιχειρήθηκε η υποβοήθηση της επαγωγής νέκρωσης λόγω συνένχυσης p19. Ο p19 δεν συμπεριφέρεται σαν παράγοντας ασυμβατότητας (avr)στην συγκεκριμένη ποικιλία. Τα αποτελέσματα ήταν θετικά όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα. Από την άλλη πλευρά, ο p19 είναι και ο ίδιος επαγωγέας νέκρωσης σε *N. tabacum* cv. *Xanthi*. Οι νεκρώσεις από τις σημειακές μεταλλαγές του HopF2 σε *N. tabacum* cv. *Xanthi* είναι σχετικά γρήγορες και δεν χρειάζονται "υποβοήθηση" από τον p19 όπως φαίνεται να συμβαίνει σε *N. tabacum* cv. *Basma*. Θεωρητικά, εάν δεν ήταν σχετικά γρήγορες θα μπορούσαμε να παρατηρήσουμε την θετική επίδραση του p19.

Αντίθετα, το πλήρους μήκους HopF2_{DC3000} δεν μπορεί να αντιστρέψει την επαγωγή κυτταρικού θανάτου που προκαλούν οι σημειακές μεταλλαγές του. Σε πειράματα συναγροένχυσης αγρίου τύπου HopF2_{DC3000} και καθεμιάς από τις σημειακές μεταλλαγές του HopF2_{DC3000}, επικρατεί ο φαινότυπος των σημειακών μεταλλαγών. Πιθανόν συνέκφραση μη λειτουργικών πρωτεϊνών (που φέρουν σημειακές μεταλλαγές) ανταγωνίζεται με την λειτουργική πλήρους μήκους πρωτεΐνη για την πρόσδεση στους ενδοκυτταρικούς στοχους του HopF2_{DC3000}. Με τον τρόπο αυτό εξασθενεί την επίδραση της λειτουργικής πρωτεΐνης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ






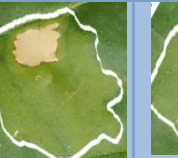
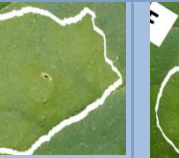




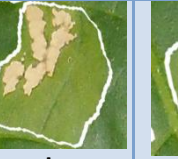
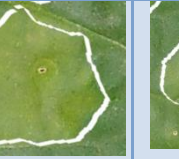








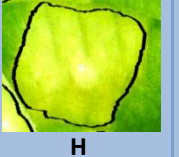

Εικόνα 52. A-G. Αγροενχύσεις σε *N. tabacum* cv. *Basma* N34/4. Παρουσιάζονται αγροενχύσεις με κατασκευές που υπερεκφράζουν : A) HopF2/R71A +p19, B) HopF2/V135G.12 +p19, C) HopF2/D164A.8 +p19, D) HopF2/S177A.1 +p19, E) HopF2/L193G +p19, F) HopF2 +p19, G) empty vector (pPZP222)+ p19.

H-O. Αγροενχύσεις σε *N. tabacum* cv. *Xanthi*. Παρουσιάζονται αγροενχύσεις με κατασκευές που υπερεκφράζουν H) HopF2/R71A +p19, I) HopF2/V135G.12 +p19, J) HopF2/D164A.18+p19, K) HopF2/S177A.1 +p19, L) HopF2/L193G +p19, M) HopF2 +p19, N) empty vector (pPZP222)+ p19.

Στον συμπληρωματικό πίνακα παρακάτω συνοψίζονται και τα αποτελέσματα από την συγκριτική μελέτη συνενχύσεων καθενός από τα μεταλλάγματα παρουσία και απουσία p19.

	HopF2(R71A)	HopF2(V135G)	HopF2(D164A)	HopF2(S177A)	HopF2(L193G)	HopF2
-p19	-	-	-	-	-	-
+p19	+	+	+	-	+	-

+: ΝΕΚΡΩΣΗ, -: ΟΧΙ ΝΕΚΡΩΣΗ

I.	+ HopF2/ D164A.18	+ HopF2/ D164A.24	+ HopF2/ S177A.1	+ HopF2/ S177A.5	+ HopF2 ΔI-III/G170A.4	+EV (pPZP222)
HopF2						
	A	B	C	D	E	F
EV (pPZP222)						
	G	H	I	J	K	L
II.	+ HopF2 ΔI-III/G169A.8	+ HopF2 ΔI-III/G169A.25	+ HopF2 ΔI-III/G170A.4	+ HopF2 ΔI-III/V199G	+empty vector (pPZP222)	
HopF2ΔI-III						
	A	B	C	D	E	
EV (pPZP222)						
	F	G	H	I	J	

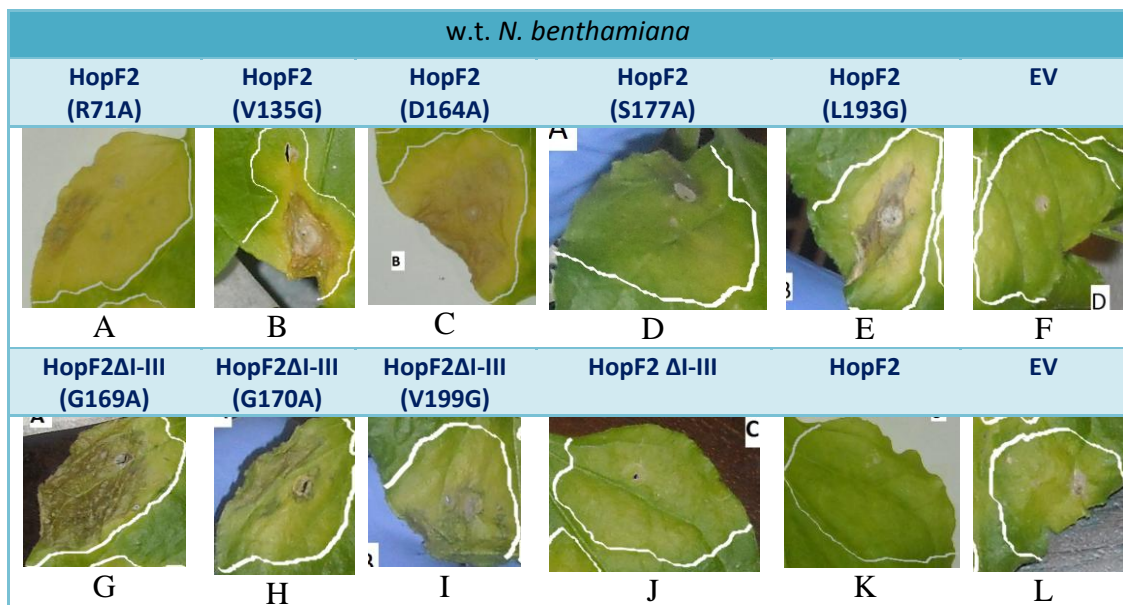
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εικόνα 53. I. Συναγροένχυση σε *N. tabacum* με το πλήρους μήκους HopF2 και κατασκευών HopF2 που φέρουν σημειακές μεταλλαγές δεν οδηγεί στην αναστολή της νέκρωσης που προκαλούν οι σημειακές μεταλλαγές. Παρουσιάζονται αγροενχύσεις με κατασκευές που υπερεκφράζουν: A) HopF2 + HopF2/D164A.18, B) HopF2+ HopF2/D164A.24, C) HopF2+ HopF2/S177A.1, D) HopF2+ HopF2/S177A.5, E) HopF2+ HopF2ΔI-III/G170A.4, F) HopF2+empty vector (EV, pPZP222), G) EV + HopF2/D164A.18, H) EV + HopF2/D164A.24, I) EV + HopF2/S177A.1, J) EV + HopF2/S177A.5, K) EV + HopF2ΔI-III/G170A.4, L) empty vector (pPZP222) + empty vector (pPZP222).

II. Επανάληψη του ίδιου πειράματος χρησιμοποιώντας αυτή την φορά σημειακές μεταλλαγές όχι στο πλήρους μήκους HopF2 αλλά στην έλλειψη HopF2ΔI-III (δεν έχει τα μοτίβα I-III). Παρουσιάζονται αγροενχύσεις με κατασκευές που υπερεκφράζουν A) HopF2ΔI-III+ HopF2ΔI-III/G169A.8, B) HopF2ΔI-III+ HopF2ΔI-III/G169A.25, C) HopF2ΔI-III+ HopF2ΔI-III/G170A.4, D) HopF2ΔI-III+ HopF2ΔI-III/V199G, E) HopF2+empty vector (pPZP222), F) empty vector (pPZP222) + HopF2ΔI-III/G169A.8, G) empty vector (pPZP222) + HopF2ΔI-III/G169A.25, H) empty vector (pPZP222) + HopF2ΔI-III/G170A.4, I) empty vector (pPZP222) + HopF2ΔI-III/V199G, J) empty vector (pPZP222) + empty vector (pPZP222).

3.2.1.1.10 Κρίσιμα κατάλοιπα του HopF2_{DC3000} για την καταστολή νεκρώσεων σε

N. benthamiana. Αντίστοιχες νεκρώσεις παρουσιάζονται και σε *N. benthamiana*. Στην περίπτωση της *N. benthamiana* όμως η εκδήλωση τους είναι πιο αργή.



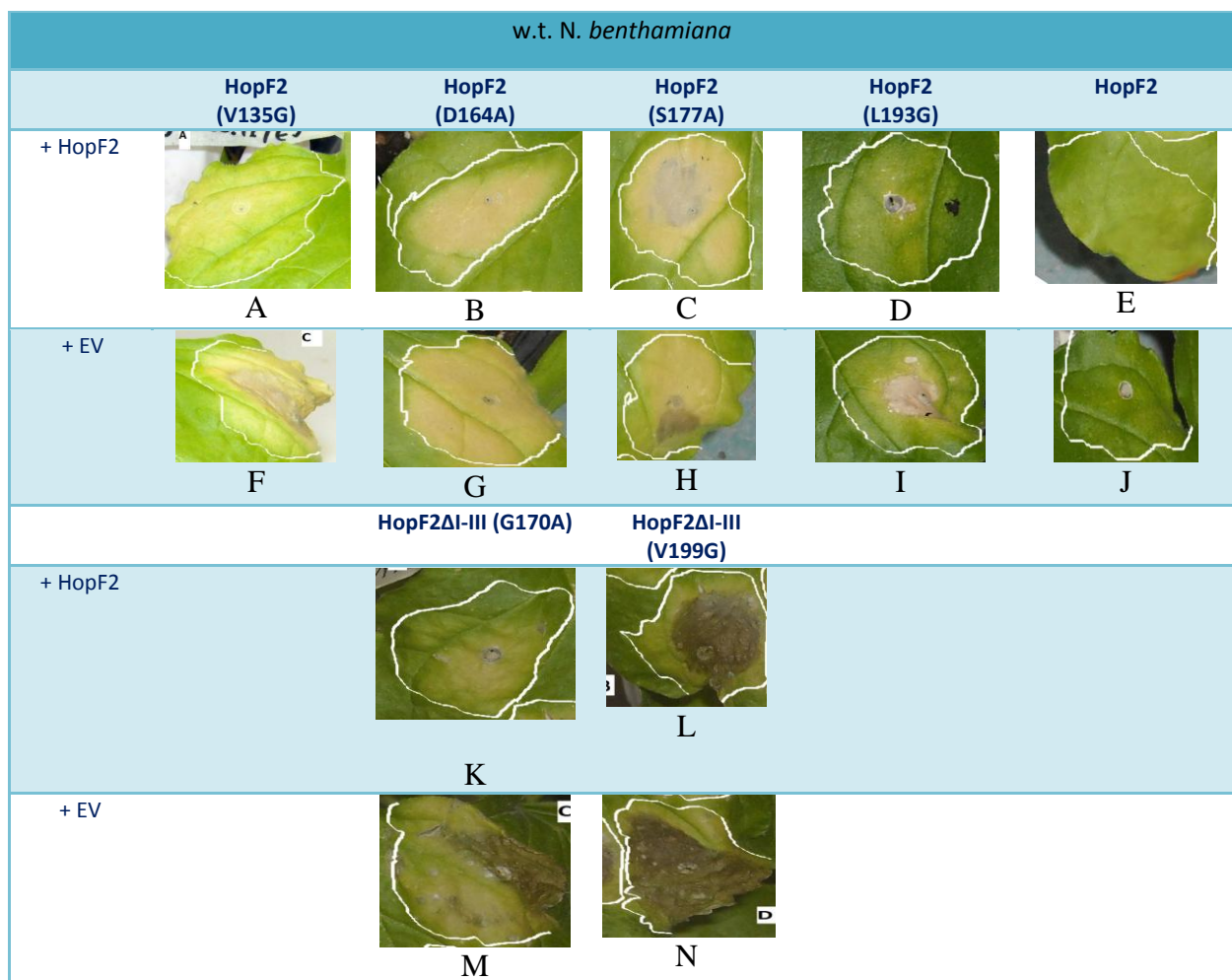
HopF2 (R71A)	HopF2 (V135G)	HopF2 (D164A)	HopF2 (S177A)	HopF2 (L193G)	HopF2ΔI-III (G169A)	HopF2ΔI-III (G170A)	HopF2ΔI-III (V199G)	HopF2
+	-	+	-	+	+	+	+	-
+ : ΝΕΚΡΩΣΗ, - : ΟΧΙ ΝΕΚΡΩΣΗ								

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εικόνα 54. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* (12 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

A) HopF2 (R71A), B) HopF2 (V135G.12), C) HopF2 (D164A), D) HopF2 (S177A.5), E) HopF2 (L193G), F) empty vector (pPZP222), G) HopF2 ΔI-III(G169A), H) HopF2 ΔI-III(G170), I) HopF2 ΔI-III(V199G), J) HopF2 ΔI-III, K) HopF2, L) empty vector (pPZP222).

Γενικά, πολλές νεκρώσεις στην *N. benthamiana* από πρωτεΐνες τελεστές φυτοπαθογόνων των αμερικανικών ειδών *Solanacheae* δεν πυροδοτούν ισχυρή νέκρωση σε *N. benthamiana*. Δυο ενδεχόμενα μπορούν να το εξηγήσουν αυτο. Το πρώτο ενδεχόμενο είναι ότι το ομόλογο του R γονιδίου στην *N. benthamiana* δεν είναι αρκετά συντηρημένο. Αυτό είναι αρκετά λογικό διότι το *Ps pv. tomato* DC3000 είναι παθογόνο της ντομάτας.



	HopF2 (V135G)	HopF2 (D164A)	HopF2 (S177A)	HopF2 (L193G)	HopF2ΔI-III (G169A)	HopF2ΔI-III (G170A)	HopF2ΔI-III (V199G)	HopF2
+ HopF2	+	-	-	+	+/-	+	-	-
+: ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΝΕΚΡΩΣΗΣ, -:ΝΕΚΡΩΣΗ								

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εικόνα 55. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* (12 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν: A) HopF2+HopF2 (V135G), B) HopF2+HopF2 (D164A), C) HopF2+HopF2 (S177A), D) HopF2+HopF2 (L193G), E) HopF2, F) Empty vector (EV) +HopF2 (V135G), G) EV +HopF2 (D164A), H) EV +HopF2 (S177A), I) EV +HopF2 (L193G), J) EV +HopF2, K) HopF2+HopF2 ΔI-III(G170A.4), L) HopF2+HopF2 ΔI-III(V199G), M) empty vector (pPZP222) + HopF2 ΔI-III(G170A.4), N) empty vector (pPZP222)+HopF2 ΔI-III(V199G).

. Η ντομάτα συνυπήρχε στην Αμερική με *N. tabacum* και υπήρχε εξελικτική πίεση στον *N. tabacum* να εξελίξει διάφορα R γονίδια για τους τελεστές της DC3000. Η *N. benthamiana* όμως είναι φυτό της Ν. Ζηλανδίας, για μακρύ χρονικό διάστημα δεν ερχόταν σε επαφή με το αντίστοιχο παθογόνο (και φυσικά με ντομάτες) και τα αντίστοιχα R γονίδια δεν είναι αντίστοιχα εξελιγμένα. Το δεύτερο ενδεχόμενο είναι οι καθυστερημένες νεκρώσεις στην *N. benthamiana* να είναι αποτέλεσμα ενός ανεξάρτητου από R γονίδιο μηχανισμού.

Οι σημειακές μεταλλαγές του HopF2_{DC3000} δίνουν χλωρωτικά συμπτώματα σε *N. benthamiana* 7-8 dpi τα οποία όμως δεν εξελίσσονται σε νεκρωτικά σε εύλογο χρονικό διάστημα. Τα χλωρωτικά συμπτώματα των σημειακών μεταλλαγών του HopF2_{DC3000} δίνουν νεκρώσεις σε *N. benthamiana*. Οι νεκρώσεις αυτές όμως είναι πολύ καθυστερημένες (> 12 dpi). Η εκδήλωση νεκρώσεων δεν εξαρτάται από την αναπτυξιακή ηλικία των φύλλων.

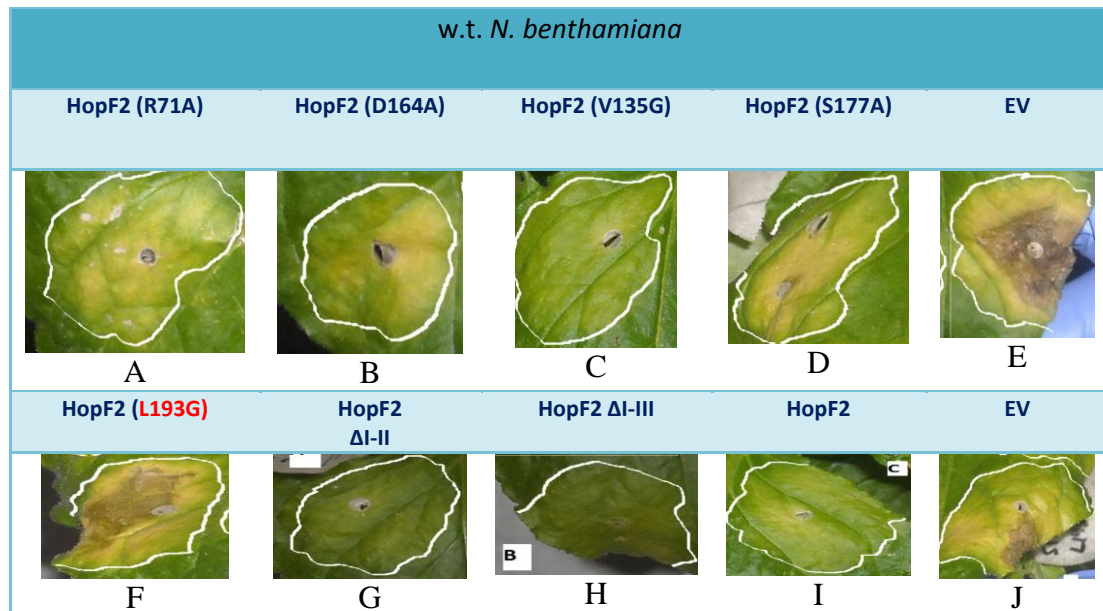
Το πλήρους μήκους HopF2_{DC3000} δεν έχει την δυνατότητα να επιβραδύνει την εκδήλωση των χλωρωτικών συμπτωμάτων και να αντιστρέψει τους καθυστερημένους νεκρωτικούς φαινοτύπους των σημειακών μεταλλαγών που προαναφέρθηκαν σε *N. benthamiana*. Εξαίρεση οι συνδυασμοί HopF2+V135, HopF2+L193, HopF2+HopF2 ΔI-III (G169A), HopF2ΔI-III+HopF2 ΔI-III (G169A), HopF2ΔI-III+HopF2 ΔI-III (G170A) ενώ το HopF2+S177 παρουσιάζει ασταθή συμπεριφορά. Οι εξαιρέσεις αυτές έρχονται σε αντίθεση με την κατάσταση σε *N. tabacum*. Η διαφοροποίηση μπορεί εύκολα να εξηγηθεί με την παραδοχή ότι η νέκρωση στην περίπτωση της *N. benthamiana* είναι αργή και όχι τόσο ισχυρή. Η ανταγωνιστική επίδραση μη λειτουργικών προτεΐνων δεν είναι κρίσιμη σε αυτό το σύστημα σε όλες τις περιπτώσεις.

3.2.1.1.11 Ρόλος κρίσιμων καταλοίπων του HopF2DC3000 στην επαγωγή αγρονέκρωσης. Σε άλλη ενότητα έχουμε αποδείξει ότι η ταχύτητα εκδήλωσης νεκρωτικών φαινοτύπων εξαρτάται από την θερμοκρασία. Έτσι ελέγξαμε την ταχύτητα εκδήλωσης νεκρωτικών φαινοτύπων των σημειακών μεταλλαγών στους 30 °C και 25 °C. Αντιπροσωπευτικές εικόνες για 25 °C παρουσιάζονται στην προηγούμενη ενότητα. Παρατηρούμε ότι οι νεκρωτικοί φαινότυποι από τις σημειακές μεταλλαγές του HopF2

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

εμφανίζονται πάντα εβδομάδες πιο γρήγορα στις ενχύσεις με κατασκευές σημειακών μεταλλαγών σε σχέση με τον empty vector (pPZP222).

Ξέρουμε όμως ότι η αγροένχυση και η συσσώρευση αγροβακτηρίων οδηγεί σε ταλαιπωρία του φυτικού ιστού στην περιοχή της αγροένχυσης. Σαν αποτέλεσμα ο φυτικός ιστός κάποια στιγμή μετά την πάροδο αρκετών ημερών/εβδομάδων νεκρώνεται ακόμα και απουσία επαγωγέα νέκρωσης. Αυτή η "νέκρωση" είναι διακριτή από την νέκρωση λόγω κάποιου επαγωγέα νέκρωσης. Διακρίνεται εύκολα λόγω του χρόνου εκδήλωσης της. Άρα ακόμα και η αγροένχυση με empty vector κάποια στιγμή θα οδηγήσει σε νέκρωση του φυτικού ιστού στην περιοχή της αγροένχυσης. Προηγουμένως είχαμε αποδείξει ότι ο HopF2 επιβραδύνει και αυτού του τύπου την νέκρωση.



HopF2 (R71A)	HopF2 (D164A)	HopF2 (V135G)	HopF2 (S177A)	HopF2 (L193G)	HopF2 ΔI-II	HopF2 ΔI-III	HopF2
-	-	-	-	+	-	-	-
+: ΝΕΚΡΩΣΗ, -: ΟΧΙ ΝΕΚΡΩΣΗ							

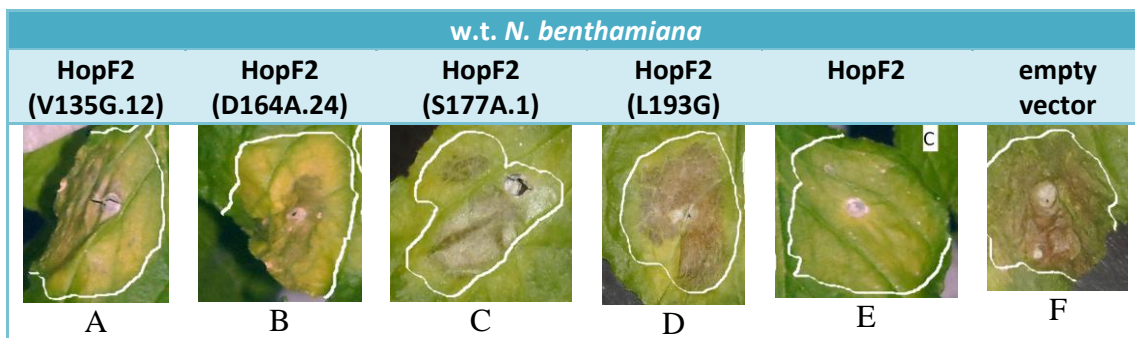
Εικόνα 56. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* (12 dpi, 30 °C) με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

A) HopF2 (R71A), B) HopF2 (D164A.18), C) HopF2 (V135G.12), D) HopF2 (S177A.1), E) empty vector (pPZP222), F) HopF2 (L193G), G) HopF2ΔI-II, H) HopF2ΔI-III, I) HopF2, J) empty vector (pPZP222).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στους 30 °C, αγροενχύσεις με κατασκευές σημειακών μεταλλαγών του HopF2 δεν οδηγούν σε νεκρώσεις τουλάχιστον μέχρι του σημείου που αρχίζει να νεκρώνεται ακόμα και ο empty vector. Οι νεκρώσεις από το σημείο αυτο και μετά ακόμα και εάν εκδηλωθούν σε καμιά περίπτωση δεν μπορούν να θεωρηθούν ότι οφείλονται στην εκάστοτε σημειακή μεταλλαγή. Εξαιρέση το HopF2 (L193G). Χαρακτηριστικά παραδείγματα παρουσιάζονται στις φωτογραφίες παρακάτω.

Ο κατασταλτικός χαρακτήρας όμως κατασκευών που υπερεκφράζουν σημειακές μεταλλαγές στην νέκρωση είναι παροδικός. Τουλάχιστον διαρκεί πολύ λιγότερο από ότι η καταστολή από το αγρίου τύπου HopF2_{DC3000}.



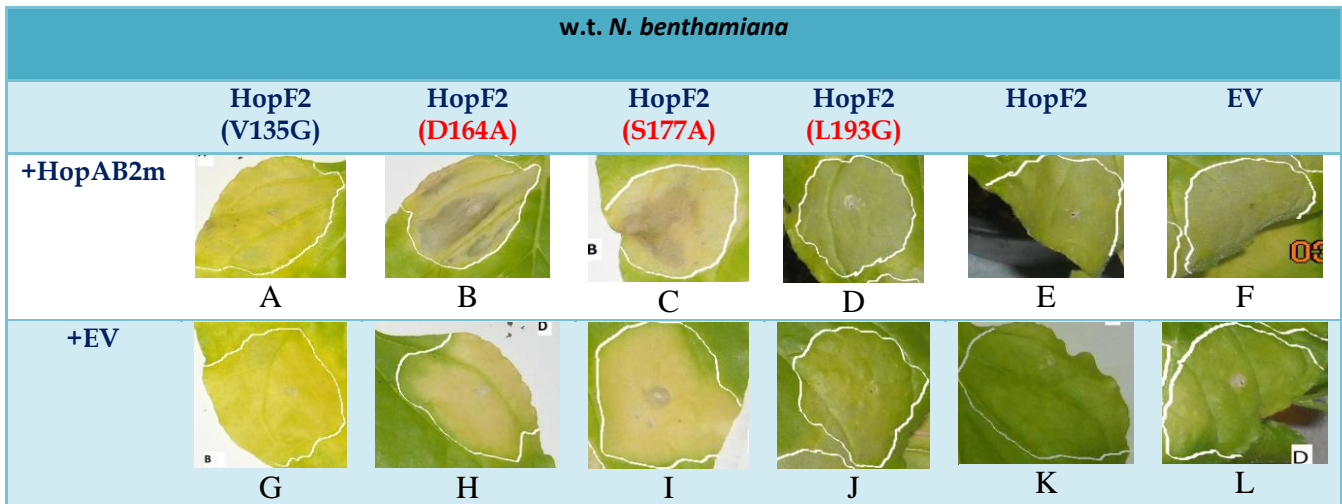
Εικόνα 57. Οι σημειακές μεταλλαγές του HopF2 δεν αναστέλλουν την νέκρωση απουσία επαγωγέα νέκρωσης που προέρχεται απλά από την ταλαιπωρία του ιστού λόγω αγροένχυσης. Αγροενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* (4 ωρι, 30 °C) με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

A) HopF2 (V135G.12), B) HopF2 (D164A.24), C) HopF2 (S177A.1), D) HopF2 (L193G), E) HopF2, F) empty vector (pPZP222).

3.2.1.1. Ρόλος κρίσιμων καταλοίπων του HopF2_{DC3000} στην επαγωγή νέκρωσης από άλλους τελεστές.

3.2.1.1.11. Ρόλος κρίσιμων καταλοίπων του HopF2_{DC3000} στην επαγωγή νέκρωσης από HopAB2m. Οι σημειακές μεταλλαγές του HopF2 (στα μοτίβα IV και V) απαλείφουν την ικανότητα του να αναστέλλει την νέκρωση από HopAB2m. Η νέκρωση από HopAB2m εμφανίζεται τουλάχιστον μια εβδομάδα πιο γρήγορα από τις νεκρώσεις των σημειακών μεταλλαγών του HopF2 ακόμα και στους 25 °C. Σε αντίθεση με τις σημειακές μεταλλαγές του HopF2 στα μοτίβα IV και V, οι σημειακές μεταλλαγές στο μοτίβο III δεν απαλείφουν την ικανότητα του να αναστέλλει την νέκρωση από HopAB2m.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



	HopF2 (V135G)	HopF2 (D164A)	HopF2 (S177A)	HopF2 (L193G)	HopF2
+HopAB2m	+	-	-	-	+
-:ΟΧΙ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΝΕΚΡΩΣΗΣ, +: ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΝΕΚΡΩΣΗΣ					

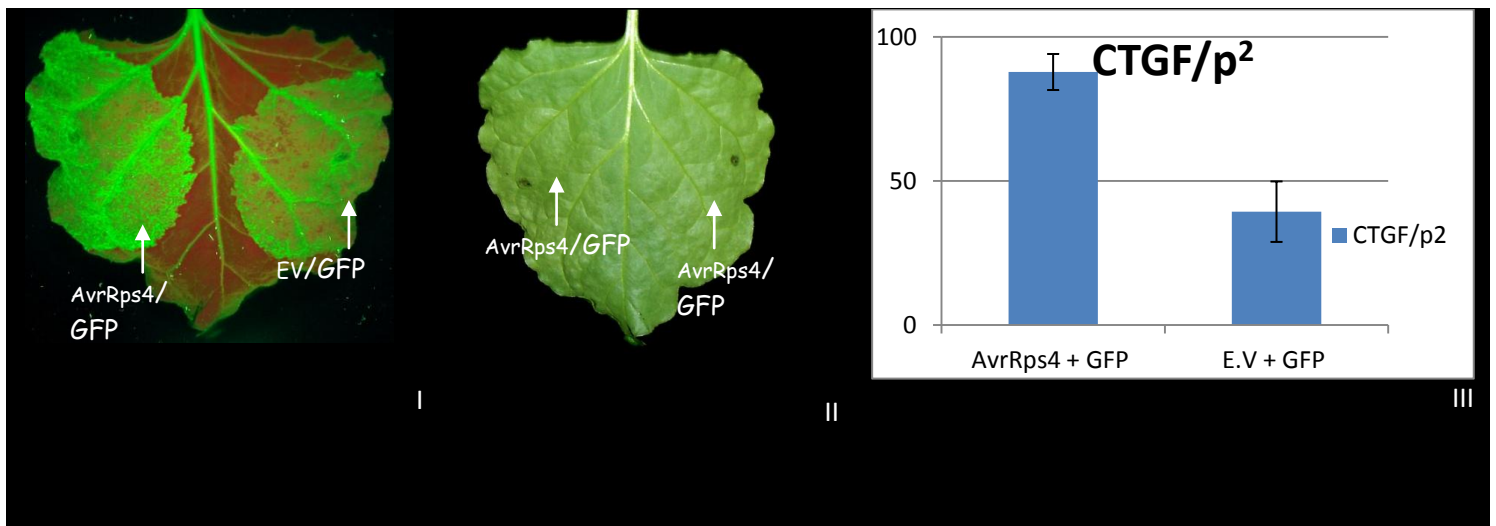
Εικόνα 58. Αgroενχύσεις σε w.t. φυτά *N. benthamiana* (6 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν: **A)** HopF2 (V135.12) + HopAB2m, **B)** HopF2 (D164A.24) + HopAB2m, **C)** HopF2 (S177A.1) + HopAB2m, **D)** HopF2 (L193G) + HopAB2m, **E)** HopF2 + HopAB2m, **F)** empty vector (pPZP222) + HopAB2m, **G)** HopF2 (V135.12) + Empty Vector (EV), **H)** HopF2 (D164A.24) + EV, **I)** HopF2 (S177A.1) + EV, **J)** HopF2 (L193G) + EV, **K)** HopF2 + EV, **L)** EV + EV.

3.2.1.1.12 Κρίσιμα κατάλοιπα για την αναστολή κυτταρικού θανάτου HopF2_{DC3000} από NorP. Προηγουμένως αναφέρθηκαν διάφορες σημειακές μεταλλαγές που χρησιμοποιήσαμε. Τα περισσότερα από τα αντίστοιχα αμινοξικά κατάλοιπα δεν είναι συντηρημένα στα ομόλογα του HopF2 από ριζόβια. Γι'αυτό είχε ενδιαφέρον να εξετάσουμε εάν οι μεταλλαγές αυτές του HopF2_{DC3000} έχουν κάποια επίδραση στην νέκρωση από κάποια ριζοβιακή πρωτεΐνη (NorP). Όπως ήταν αναμενόμενο, σχεδόν όλες δεν έχουν κάποια επίδραση διαφορετική από αυτή του wt HopF2_{DC3000} (data not shown). Πάλι όπως ήταν αναμενόμενο, οι σημειακές μεταλλαγές δεν επηρεάζουν διαφορετικά την νέκρωση από p19 σε σχέση με το wt HopF2_{DC3000} (data not shown). Άλλωστε, η χρονική στιγμή εμφάνισης νεκρώσεων (στις περιπτώσεις που σαν απαγωγέας νέκρωσης χρησιμοποιήθηκαν τα NorP και p19) προηγείται ελάχιστα σε σχέση με αυτήν των σημειακών μεταλλαγών του HopF2_{DC3000}. Το γεγονός αυτό καθιστά προβληματική την επεξεργασία οποιονδήποτε αποτελεσμάτων.

3.2.1.2 Επίδραση εκκρινόμενων πρωτεϊνών υπερικογένειας AvrRps4-HorK1 στην RNA σίγηση.

3.2.1.2.1 Καταστολή RNA σίγησης από εκκρινόμενη πρωτεΐνη AvrRps4

Με τα πειράματα με το HorF2_{DC3000} επιβεβαιώθηκε ότι το πειραματικό μας σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αποκάλυψη όχι μόνο ενισχυτών αλλά και καταστολέων της RNA σίγησης. Στο επόμενο στάδιο προσπαθήσαμε να επεκτείνουμε τα αποτελέσματα μας και σε μια δεύτερη οικογένεια πρωτεϊνών -τελεστών. Επιλέχτηκε η συγκριτική αξιολόγηση ομολόγων της οικογένειας AvrRps4-HorK1. Συνολικά ελέγχθηκαν ομόλογες πρωτεΐνες από τρία στελέχη. α) AvrRps4 από *P. syringae* pv. *pisi* 151, β) AvrRps4 από *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A γ) HorK1_{pto DC3001} (HorPtoK) από *P. syringae* pv. *tomato* DC3001. Στην πραγματικότητα ελέγχθηκαν δυο διαφορετικά ομόλογα από *P. syringae* pv. *pisi*. Το ένα από αυτά τα οποία ήταν το ομόλογο από *P. syringae* pv. *pisi* 151 και το δεύτερο από *P. syringae* pv. *pisi* Race 3. Καθένα από τα ομόλογα από τα στελέχη της *P. syringae* pv. *pisi* έδειξαν ταυτόσημη συμπεριφορά ως προς την σίγηση (data not shown).



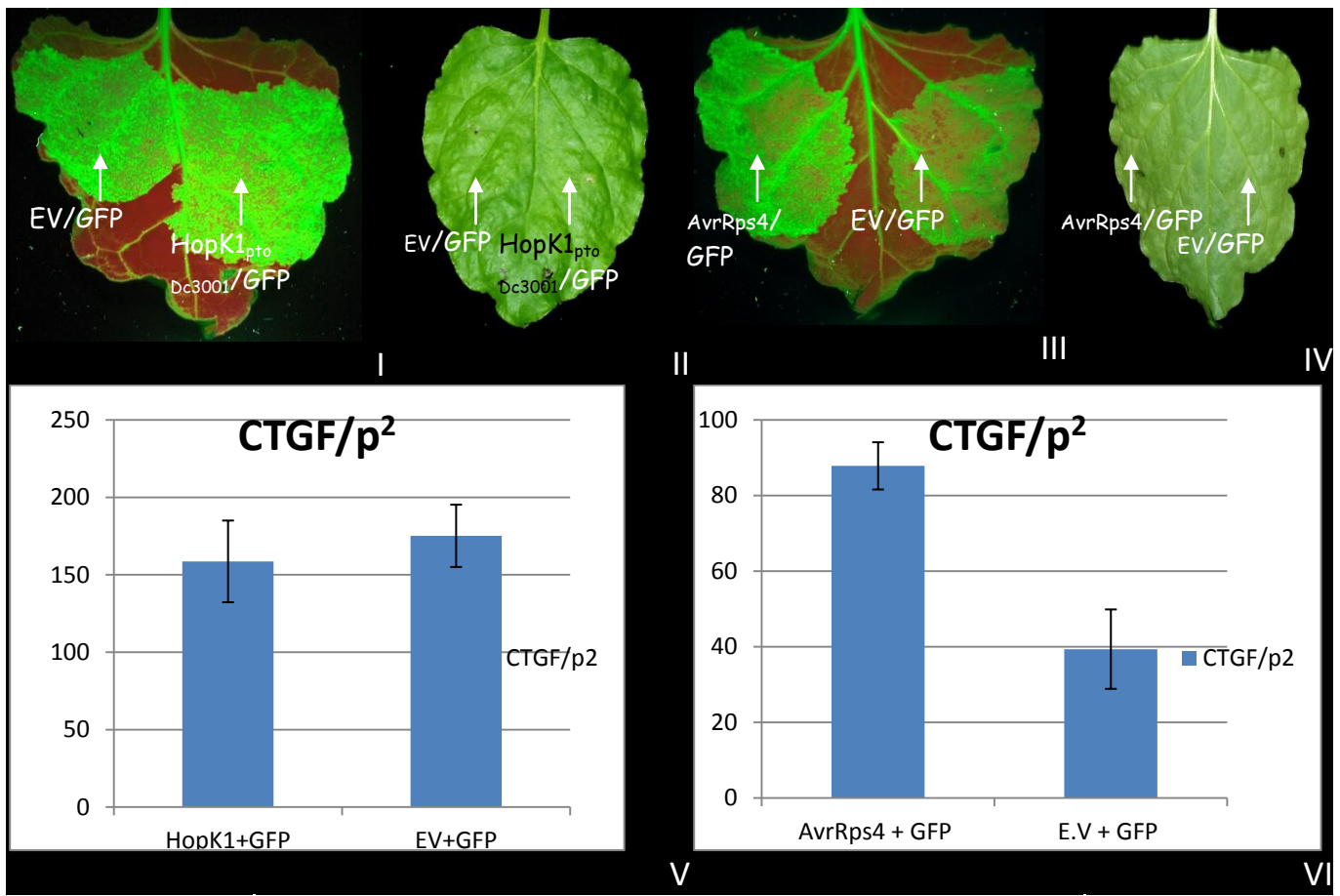
Εικόνα 59. Αγροενχύσεις σε 16ς φυτά *N. benthamiana* (3 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

- I. w.t. AvrRps4 + GFP και empty vector control (E.V) + GFP (Φωτογραφία σε φωτισμό UV).
- II. W.t. AvrRps4 + GFP και empty vector control (E.V) + GFP (Φωτογραφία σε ορατό φως).
- III. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ p² (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην I.

Το σημείο της κάθε ένχυσης συμπίπτει με την αιχμή του εκάστοτε βέλους στην εικόνα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι πρωτεΐνες αυτές εμφανίζουν δομική ομολογία αλλά συχνά η λειτουργική τους εξειδίκευση δεν είναι ταυτόσημη. Τα ομόλογα έδειξαν διαφορές τόσο στην ένταση, όσο και την ίδια την εκδήλωση του φαινομένου. Τα ομόλογα AvrRps4 και από τα τρία στελέχη συμπεριφέρονται ως καταστολείς της σίγησης. Αντίθετα, η πρωτεΐνη HopK1_{pto DC3001} δεν είχε επίδραση στο σύστημα μας σε σχέση με τον μάρτυρα. Το αμινοτελικό άκρο του HopK1_{pto DC3001} (1147 αα) έχει ομολογία με το αμινοτελικό άκρο του AvrRps4 (σύνολο 220 αα) από *P. syringae* *pn. pisi*). Επιπλέον όμως τα ομόλογα AvrRps4 στερούνται της καρβοξυτελικής ουράς του HopK1_{pto DC3001}.



	AvrRps4 _{pisi 151}	AvrRps4 _{pisiR3}	AvrRps _{41448A}	HopK1 _{DC3001}
S	+	+	+	-
S: Silencing Suppression				

Εικόνα 60. Αγροενχύσεις σε 16ς φυτά *N. benthamiana* (3 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

I. empty vector control (E.V) + GFP και w.t. HopK1_{DC3001} + GFP (Φωτογραφία σε φωτισμό UV).

II. Empty vector control (E.V) + GFP και w.t. HopK1_{DC3001} + GFP (Φωτογραφία σε ορατό φως).

III. w.t. AvrRps4 + GFP και empty vector control (E.V) + GFP (Φωτογραφία σε φωτισμό UV).

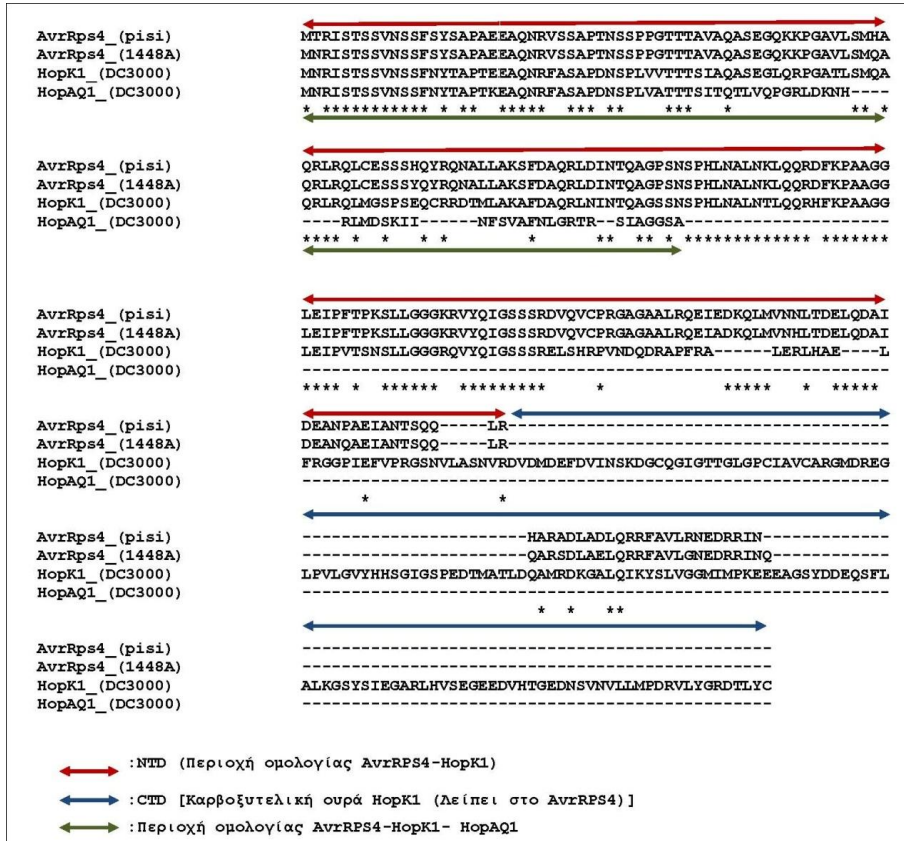
IV. w.t. AvrRps4 + GFP και empty vector control (E.V) + GFP (Φωτογραφία σε ορατό φως).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

V. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ ρ^2 (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην I.

VI. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ ρ^2 (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην III.

Το σημείο της κάθε ένχυσης συμπίπτει με την αιχμή του εκάστοτε βέλους στην εικόνα.



Εικόνα 61. Στοιχισμός των ομολόγων AvrRps4, HopK1 και HopAQ1. Η στοιχισμός έγινε με το πρόγραμμα ClustalW (Thompson et al., 2002).

Η καταστολή της RNA σίγησης από τα ομόλογα του AvrRps4 διαφέρει από την αντίστοιχη των ομολόγων HopF1/HopF2/HopF3. Στην πρώτη περίπτωση, η καταστολή εμφανίζει διάρκεια που προσομοιάζει με αυτήν των ιικών καταστολών της σίγησης. Στην δεύτερη περίπτωση μπορεί να χαρακτηριστεί παροδική.

3.2.2 Ενίσχυση RNA σίγησης από εκκρινόμενες πρωτεΐνες ψευδομονάδας.

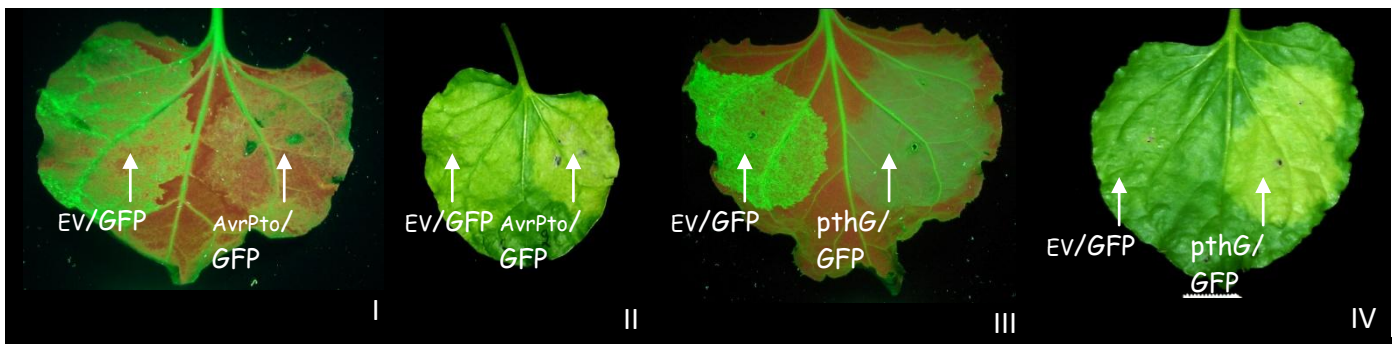
Προηγούμενα πειράματα από το ίδιο εργαστήριο (Sarris et al., 2011) απέδειξαν ότι εκκρινόμενες βακτηριακές πρωτεΐνες έχουν την δυνατότητα να προκαλέσουν ενίσχυση της RNA σίγησης. Συγκεκριμένα, (Sarris et al., 2011) ελέγχθηκαν τρεις πρωτεΐνες α) HopX1_{Pto DC3001} (AvrPtoE από *P. syringae* pv. *tomato* DC3001), β) HopF2_{Pto DC3001} (AvrPtoF από *P. syringae* pv. *tomato* DC3001), γ) HopAB_{Pph} (virPphA από *P. syringae* pv. *phaseolicola*).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

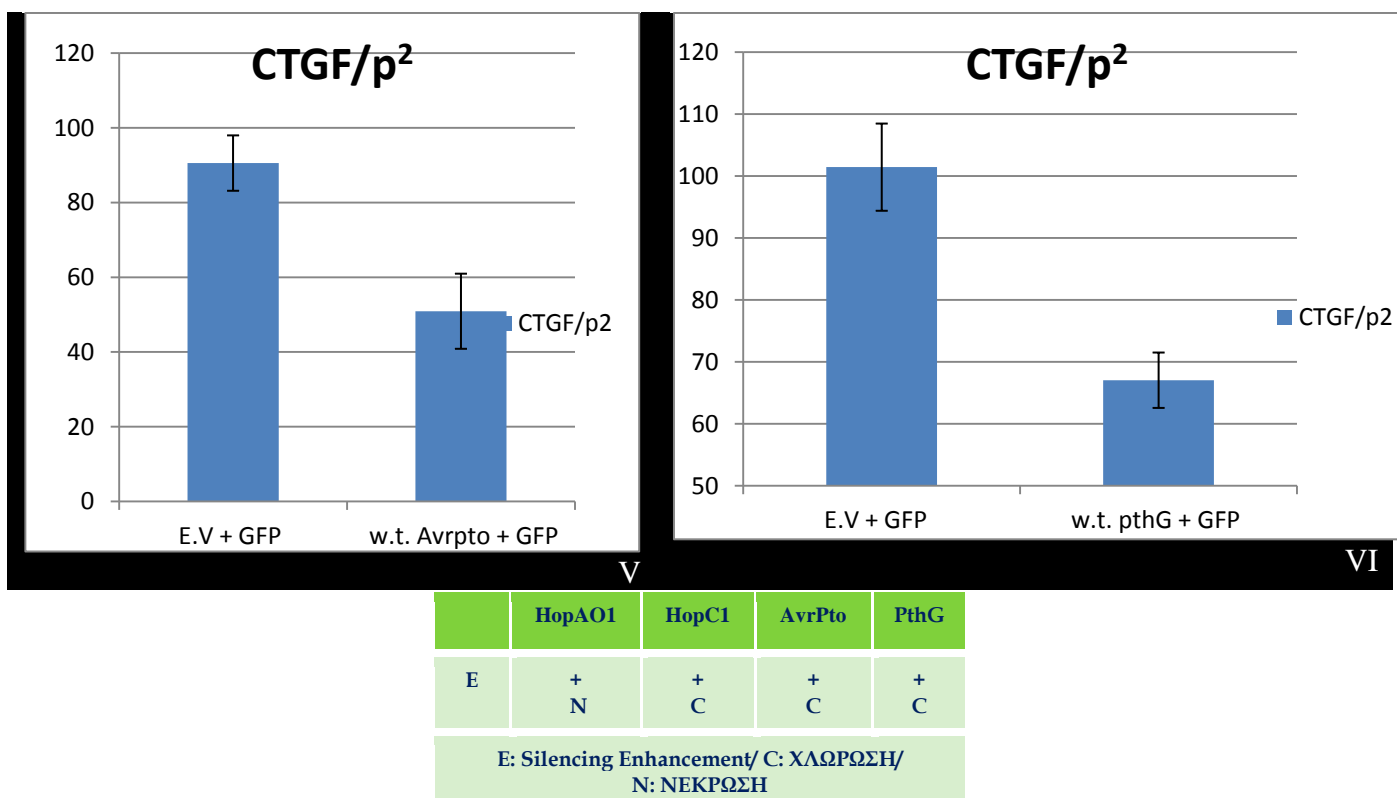
Μεταγενέστερα πειράματα απέδειξαν ότι η ενίσχυση της σίγησης είναι ένα γενικό αινόμενο που συναντάται συχνά ως χαρακτηριστικό πρωτεϊνών-τελεστών. Τουλάχιστον δυο ακόμη πρωτεΐνες-τελεστές χαρακτηρίστηκαν (Sarris, Ph.D Thesis) ως ενισχυτές της σίγησης χρησιμοποιώντας το σύστημα μας: [ORF6_{psy} (ORF6 από *P. syringae* pv. *syringae*) και PopP2 (PopP2 από *Ralstonia solanacearum*).

3.2.2.1 Επίδραση εκκρινόμενων πρωτεϊνών HopAO1, HopC1, AvrPto, pthG στην RNA σίγηση.

Η παρατήρηση ότι η ενίσχυση της σίγησης είναι ένα κοινό μοτίβο συμπεριφοράς πρωτεϊνών-τελεστών μας ώθησε να ελέγξουμε την επίδραση περισσότερων οικογενειών πρωτεϊνών τελεστών. Σε πρώτη φάση επιλέχτηκε η AvrPto_{DC3001} και HopAO1_{DC3001}. Η πρώτη είχε προηγουμένως χαρακτηριστεί ως καταστολέας του μονοπατιού των miRNAs σε *A. thaliana* (Navarro et al., 2008). Η δεύτερη είναι μια βιοχημικά χαρακτηρισμένη φωσφατάση τυροσίνης (James et al., 2003) με ρόλο στην παρεμπόδιση των μηχανισμών άμυνας. Αμφότερες ενισχύουν την σίγηση και μάλιστα σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από οποιαδήποτε άλλη πρωτεΐνη που μελετήσαμε. Παράλληλα όμως εμφάνισαν χλωρωτικά συμπτώματα στην περιοχή της αγραένχυσης (AvrPto_{DC3001}) ή ακόμα και νεκρωτικά (HopAO1_{DC3001}). Συνύπαρξη χλωρωτικών/νεκρωτικών περιοχών και ενίσχυσης σίγησης είχε παρατηρηθεί σε δυο ακόμα περιπτώσεις στο πειραματικό μας σύστημα (με τους τελεστές PthG από *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae* (Ezra et al., 2000) και HopC1_{DC3001}). Ένα βασικό ερώτημα που πρόεκυψε ήταν εάν χλωρώσεις και ενίσχυση σίγησης είναι φαινόμενα αλληλοσυνδεόμενα.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 62. Παραδείγματα με φαινότυπο ενίσχυση της σίγησης που παρουσίαζαν χλωρωτικά συμπτώματα. Αgroενχύσεις σε 16c φυτά *N. benthamiana* (3 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

- I. empty vector control (E.V) + GFP και w.t. Avrpto + GFP (Φωτογραφία σε φωτισμό UV).
 - II. Empty vector control (E.V) + GFP και w.t. AvrPto + GFP (Φωτογραφία σε ορατό φως).
 - III. Empty vector control (E.V) + GFP και w.t. pthG + GFP (Φωτογραφία σε φωτισμό UV).
 - IV. Empty vector control (E.V) + GFP και w.t. pthG + GFP (Φωτογραφία σε ορατό φως).
 - V. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ p^2 (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην II.
 - VI. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ p^2 (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην III.
- Το σημείο της κάθε ένχυσης συμπίπτει με την αιχμή του εκάστου βέλους στην εικόνα.

Παρατηρούμε ότι τουλάχιστον δυο από τις τρεις πρωτεΐνες που παρουσιάζουν έντονα συμπτώματα χλώρωσης (AvrPto και pthG) παρουσιάζουν επίσης μια πολύ έντονη ενίσχυση του μηχανισμού της σίγησης. Μια ενδιαμέση κατάσταση ανάμεσα στις δυο είναι τα πολύ ήπια και χρονικά πολύ καθυστερημένα συμπτώματα χλώρωσης του HopF2_{Pto DC3001}.

3.2.2.2 Ρόλος της δραστικότητας E3 λιγάσης της ουβικιτίνης στη δράση της πρωτεΐνης-τελεστή HopAB2 και ομολόγων της στην RNA σίγηση.

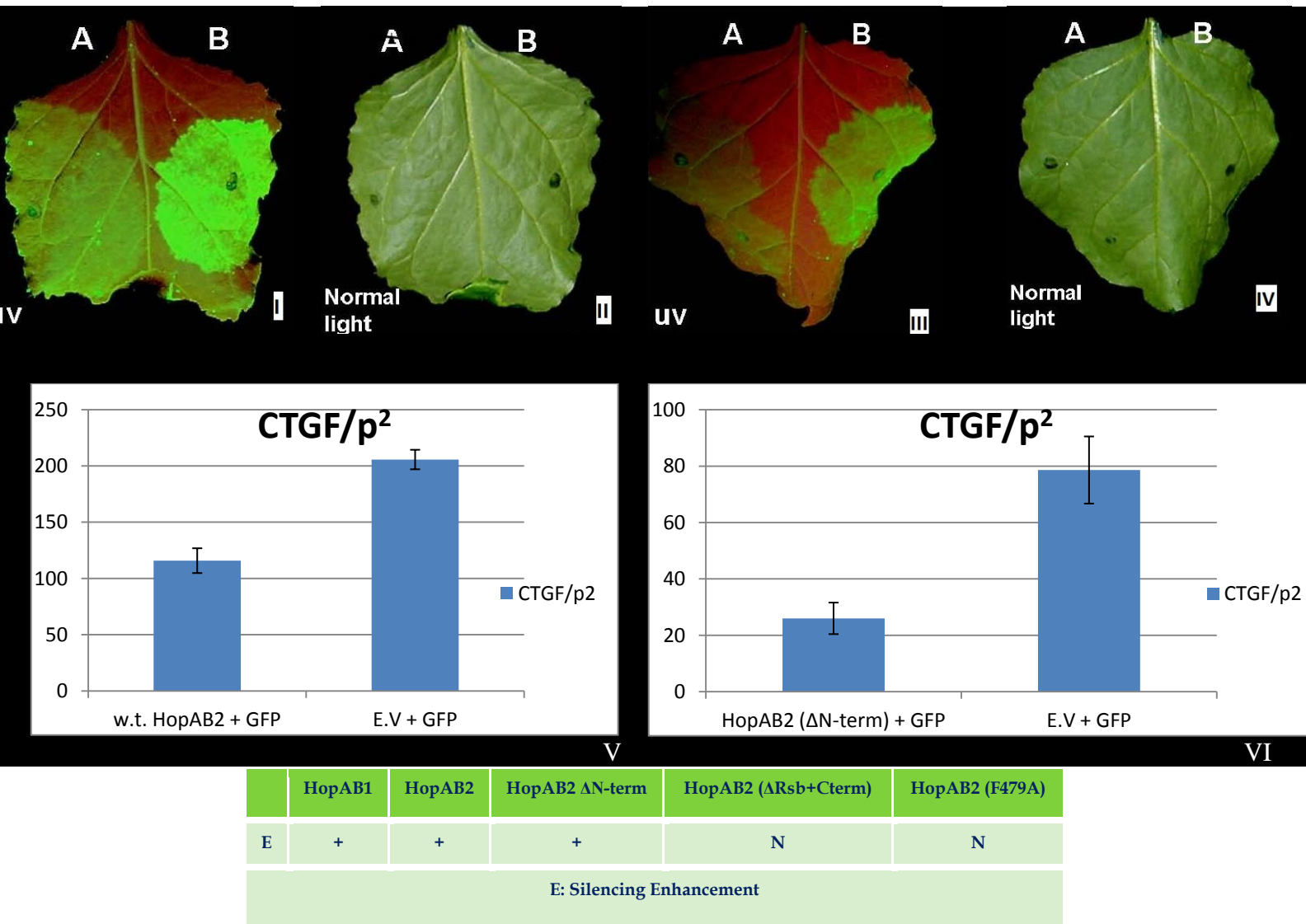
Η κωδική περιοχή της HopAB2 περιλαμβάνει: α) μια αμινοτελική επικράτεια στην οποία εντοπίζεται η περιοχή πρόσδεσης με την φυτική πρωτεΐνη-υποδοχέα Pto (Xiao et al., 2007b),

β) μια κεντρική περιοχή (Rosebrock et al., 2007) η οποία περιέχει μια περιοχή πρόσδεσης με την πρωτεΐνη Fen. Η περιοχή αυτή ονομάζεται Rsb και εμπεριέχει και το GINP μοτίβο. Το μοτίβο αυτο σχετίζεται επίσης με αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη BAK1. Είναι υπεύθυνο για την αποτροπή της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού των MAP κινασών, (Göhre et al., 2008; Shan et al., 2008b; Xiao et al., 2007a) και

γ) μια καρβοξυτελική επικράτεια με ενζυμική ενεργότητα E3 λιγάσης ουμπικουϊτίνης (Janjusevic et al., 2006). Η τελευταία ενεργότητα είναι και υπεύθυνη για την καταστολή του κυτταρικού θανάτου και αλληλεπιδρά με ουμπικουϊτίνη (Abramovitch et al., 2006).

Η πρωτεΐνη HopAB2 (από *P. syringae* pv. *tomato* DC3000) όπως και η ομόλογη της HopAB1 (από *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B) είναι ενισχυτής της RNA σίγησης. Μάλιστα, έλλειψη της πρωτεΐνης (που απαλείφει το αμινοτελικό άκρο αλλά διατηρεί το κεντρικό και το καρβοξυτελικό άκρο) διατηρεί την ικανότητα ενίσχυσης της σίγησης. Η έλλειψη αυτή περιλαμβάνει μόνο τμήμα Rsb και E3 λιγάσης ουμπικουϊτίνης και παρουσιάζει τον ίδιο φαινότυπο με το πλήρους μήκους μετάγραφο στο πειραματικό μας σύστημα. Με την χρήση αυτής της κατασκευής όμως, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η ενίσχυση της σίγησης να προκαλείται από το κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη HopAB2_{DC3000} εμφανίζει στα χέρια μας την ίδια συμπεριφορά αναφορικά με την αναστολή του κυτταρικού θανάτου με τα ήδη δημοσιευμένα αποτελέσματα (Sarris et al. 2011). Μετά την παρέλευση όμως αρκετών ημερών, το HopAB2 εμφανίζει συμπτώματα νέκρωσης και κατάρρευσης κυτταρικών δομών. Τα νεκρωτικά συμπτώματα εμφανίζονται πολύ αργότερα από την στιγμή που ολοκληρώνεται το πείραμα που σχετίζεται με την επίδραση της στην RNA σίγηση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 63. Αγροενχύσεις σε 16ς φυτά *N. benthamiana* (3 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

I. (Φωτογραφία σε φωτισμό UV) A) w.t. HopAB2 + GFP, B) empty vector control (E.V) + GFP.

II. (Φωτογραφία σε ορατό φως) A) w.t. HopAB2 + GFP, B) empty vector control (E.V) + GFP.

III. (Φωτογραφία σε φωτισμό UV) A) HopAB2 (ΔN-term) + GFP, B) empty vector control (E.V) + GFP.

IV. (Φωτογραφία σε ορατό φως) A) HopAB2 (ΔN-term) + GFP, B) empty vector control (E.V) + GFP.

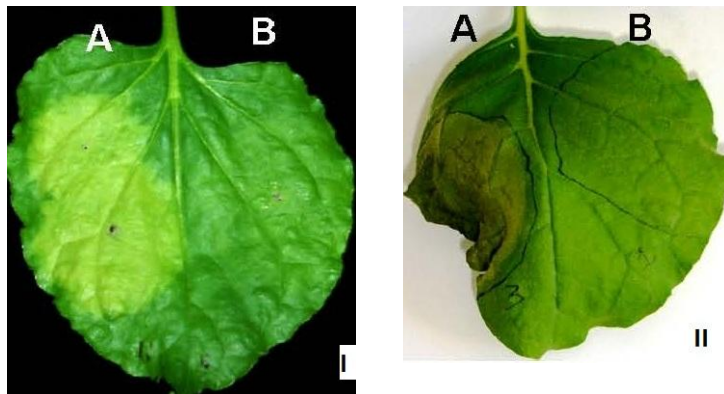
V. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ p² (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην II.

VI. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ p² (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην III.

Αγροένχυση κατασκευής που περιλαμβάνει την περιοχή αλληλεπίδρασης με Pto πυροδοτεί αντίδραση υπερευαισθησίας σε *N. benthamiana* (Abramovitch et al., 2003). Η σημειακή μεταλλαγή HopAB2_{DC3000}F479A σχετίζεται με απενεργοποίηση της E3 λιγάσης. Κατά αντιστοιχία με δημοσιευμένα αποτελέσματα (Rosebrock et al., 2007), η αγροένχυση

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

κατασκευής που εκφράζει HopAB2 με σημειακή μεταλλαγή στο F479 (F479A) οδηγεί αρχικά σε χλωρωτικό και στην συνέχεια σε νεκρωτικό φαινότυπο στο πειραματικό μας σύστημα. Η νέκρωση είναι εμφανής είτε υπερεκφράζει το πλήρους μήκους μόριο που φέρει την μεταλλαγή αυτή, είτε κατασκευή που φέρει ταυτόχρονα ακρωτηριασμό στο αμινοτελικό άκρο (περιέχει μόνο την καρβοξυτελική επικράτεια) και την σημειακή μεταλλαγή.

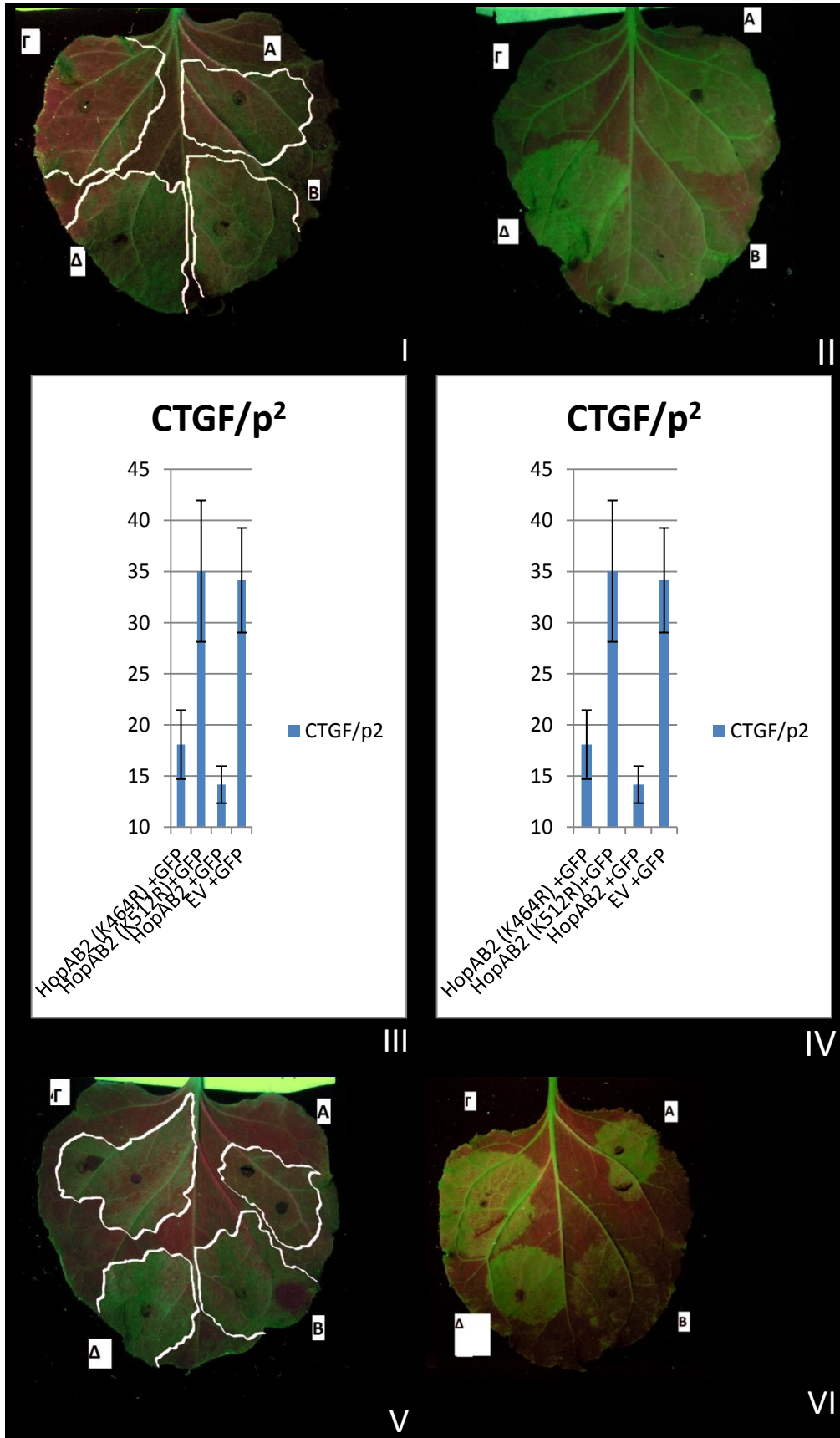


Εικόνα 64. Αγροενχύσεις σε 16c φυτά *N. benthamiana* (4 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν: **I.** A) w.t. HopAB2 (**F479A**) + GFP, B) empty vector control (E.V) + GFP. **II)** A) w.t. HopAB2 (Δ Rsb+Cterm) + GFP, B) empty vector control (E.V) + GFP.

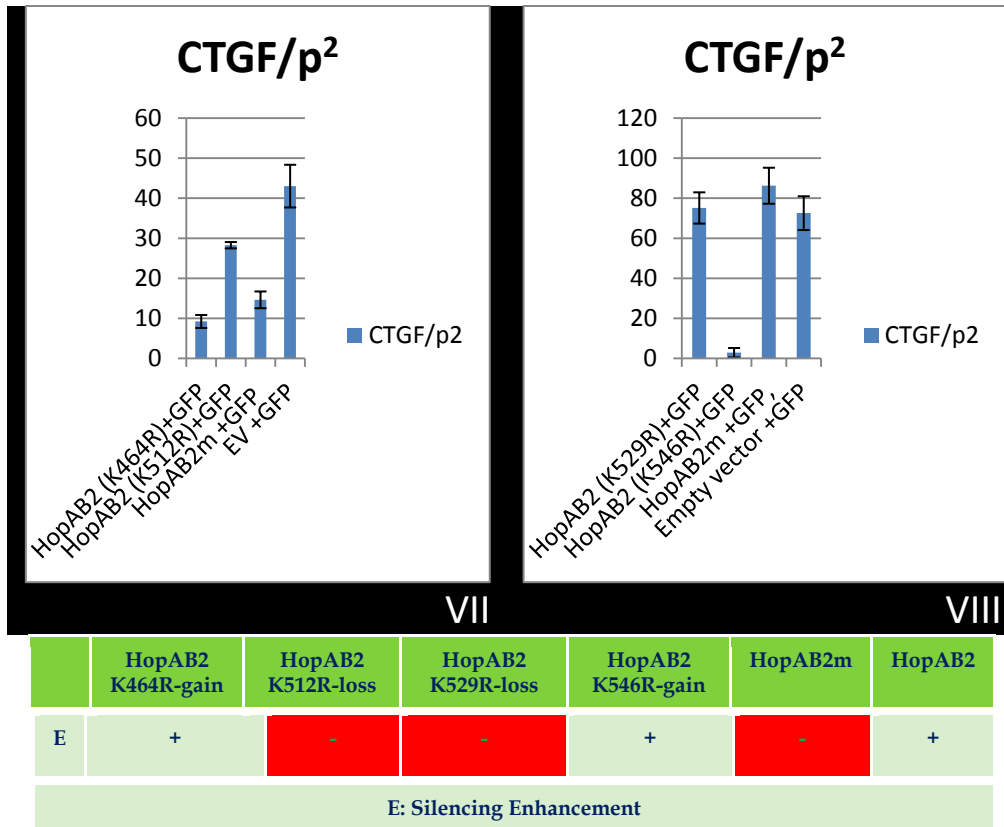
Συμπερασματικά, με τα μέχρι τώρα πειράματα δεν καταφέρνουμε να συσχετίσουμε ξεκάθαρα την ενίσχυση της σίγησης με την ενεργότητα της E3 λιγάσης για δυο λόγους: α) Η έλλειψη που διατηρεί τον φαινότυπο σίγησης περιλαμβάνει εκτός από την περιοχή της ενεργότατης E3 λιγάσης και την κεντρική επικράτεια (Rsb). β) Η σημειακή μεταλλαγή HopAB2_{DC3000}F479A που χρησιμοποιήθηκε δίνει χλώρωση και στην συνέχεια νέκρωση σε *wt N. benthamiana* φυτά.

Εναλλακτικά, είχαμε την δυνατότητα να χρησιμοποιήσουμε κατασκευές με σημειακές μεταλλαγές που επιφέρουν μερική απώλεια λειτουργίας E3 λιγάσης. Σαν μάρτυρες μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε αντίστοιχες κατασκευές με σημειακές μεταλλαγές που παρουσιάζουν αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα E3 λιγάσης σε σχέση με το αγρίου τύπου HopAB2_{DC3000} ή και ουδέτερες. Το πλεονέκτημα σε αυτήν την περίπτωση είναι ότι ο νεκρωτικός φαινότυπος από σημειακές μεταλλαγές μερικής απώλειας λειτουργίας E3 λιγάσης είναι αρκετά πιο καθυστερημένος.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

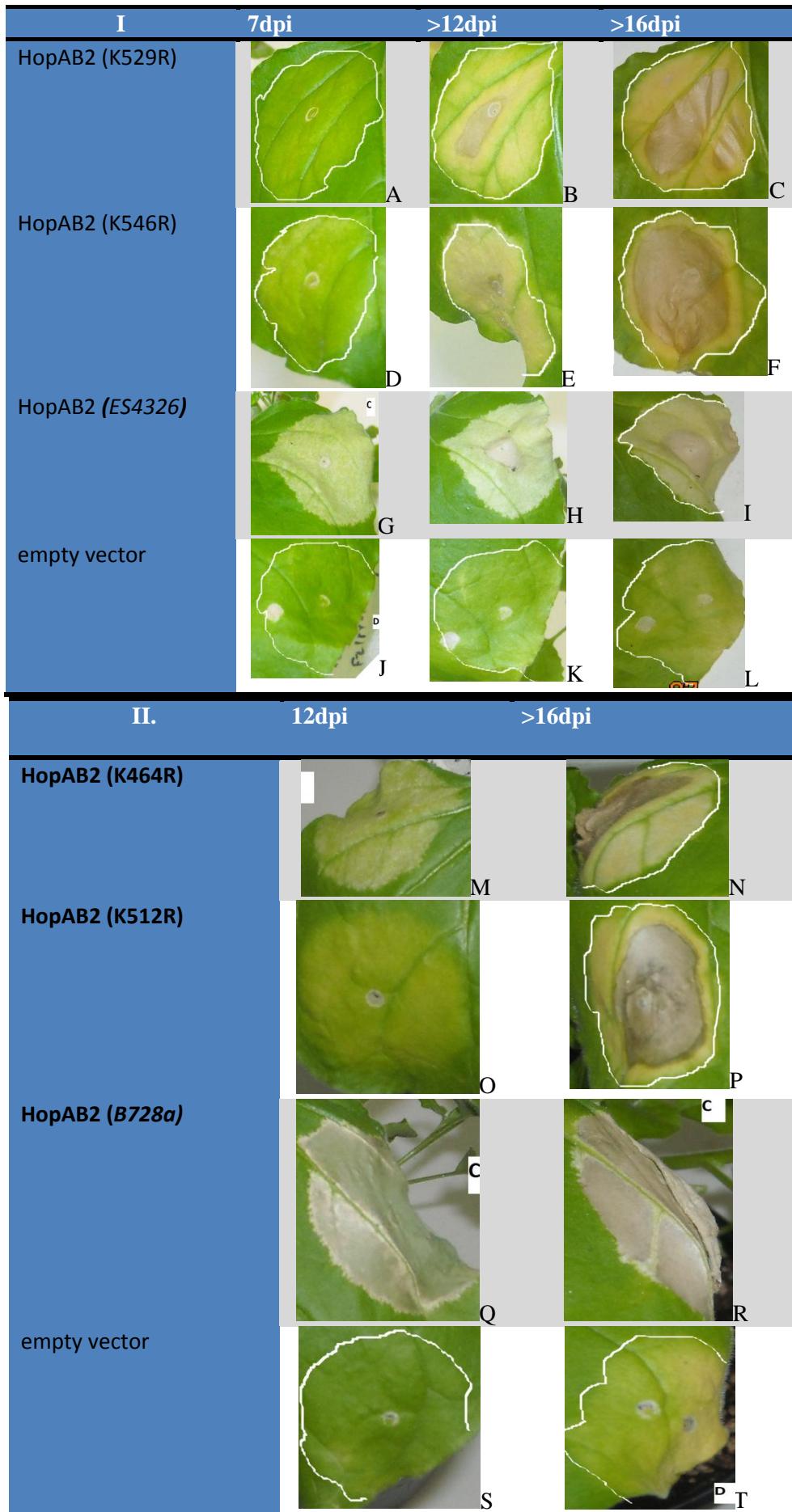


Εικόνα 65. Αγροενχύσεις σε φύλλα *N. benthamiana* 16c (3 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

- I. A) HopAB2 (K464R-gain of function) +GFP, B) HopAB2 (K512R-loss of function)+GFP, Γ) HopAB2 +GFP, Δ) Empty vector +GFP.
- II. A) HopAB2 (K529R-loss of function)+GFP, B) HopAB2 (K546R-gain of function GFP, Γ) HopAB2 +GFP, Δ) Empty vector +GFP.
- III. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ p^2 (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην I.
- IV. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ p^2 (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην II.
- V. A) HopAB2 (K464R-gain of function)+GFP, B) HopAB2 (K512R-loss of function)+GFP, Γ) HopAB2m (loss of function)+GFP, Δ) Empty vector +GFP
- VI. A) HopAB2 (K529R-loss of function)+GFP, B) HopAB2 (K546R-gain of function)+GFP, Γ) HopAB2m (loss of function) +GFP, Δ) Empty vector +GFP.
- VII. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ p^2 (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην V.
- VIII. Corrected Total GFP Fluorescence (CTGF)/ p^2 (σύμφωνα με Burgess et al., 2010) για τα δείγματα που περιγράφονται στην VI.

Έτσι, χρησιμοποιήσαμε επιπλέον μεταλλαγές υποκατάστασης επιλεγμένων αμινοξέων στην καρβοξυτελική περιοχή της πλήρους μήκους πρωτεΐνης HopAB2_{DC3000} (ευγενική προσφορά του Dr Greg Martin). Μεταξύ ήταν δυο μεταλλαγές τύπου «gain of function» (αυξημένη ενεργότητα) της E3 λιγάσης συμπικουϊτίνης στο πλήρους μήκους HopAB2 (K464R

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εικόνα 66. I. Οι σημειακές μεταλλαγές HopAB2 (K529R), HopAB2 (K546R) δεν δίνουν χλωρωτικά συμπτώματα wt φυτά *N. benthamiana* τις πρώτες μέρες μετά την αγραοένχυση. Αργότερα δίνουν χλωρώσεις (>7-10 dpi) και τελικά νεκρώσεις (>12-14 dpi). Αγραοενχύσεις σε wt φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

A-C. HopAB2 (K529R). A)7dpi, B)>12dpi, C) >16dpi.

D-F. HopAB2 (K546R). D)7dpi, E)>12dpi, F) >16dpi.

G-I. Ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326. G)7dpi, H)>12dpi, I) >16dpi.

J-L. empty vector. J)7dpi, K)>12dpi, L) >16dpi.

II. Οι σημειακές μεταλλαγές HopAB2 (K464R), HopAB2 (K512R) δεν δίνουν χλωρωτικά συμπτώματα τις πρώτες μέρες μετά την αγραοένχυση. Αργότερα δίνουν χλωρώσεις (>7-10 dpi) και τελικά νεκρώσεις (>12-14dpi). Αγραοενχύσεις σε wt φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

M-N. HopAB2 (K464R). M)12dpi, N) >16dpi.

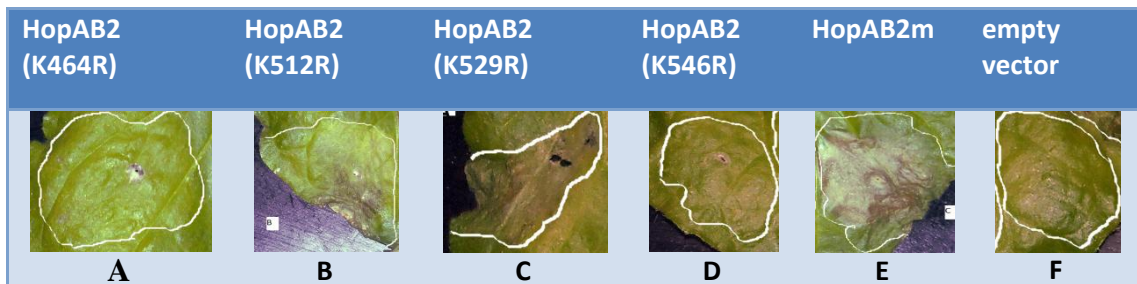
O-P. HopAB2 (K512R). O)12dpi, P) >16dpi.

Q-R. Ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *syringae* B728a, Q)12dpi, R) >16dpi.

S-T. empty vector. S)12dpi, T) >16dpi.

και K546R) και δυο μεταλλαγές τύπου «loss of function» (μειωμένη ενεργότητα) της E3 λιγάσης της ίδιας πρωτεΐνης (K512R και K529R) που περιγράφονται στο Abramovitch και συνεργάτες (2006). Με πειράματα συναγραοένχυσης με φορέα που εκφράζει την πρωτεΐνη-δείκτη GFP καταδείχτηκε ότι: α) Οι σημειακές μεταλλαγές τύπου gain of function mutants της πλήρους μήκους HopAB2DC3000 K464R και K546R έχουν τον ίδιο φαινότυπο με την φυσικού τύπου πρωτεΐνη. β) Τα «loss of function» mutants της πλήρους μήκους HopAB2DC3000 απαλείφουν την ικανότητα της πρωτεΐνης να δρα ως ενισχυτής της σίγησης. Συμπερασματικά, η ενεργότητα E3 λιγάσης του HopAB2 είναι απαραίτητη για την ενίσχυση της RNA-διαμεσολαβούμενης σίγησης.

Οι προαναφερόμενες σημειακές μεταλλαγές δεν παρουσιάζουν κανένα σημάδι χλώρωσης ή νέκρωσης κατά την διάρκεια των 4-5 ημερών που διήρκεσε το πείραμα σε φυτά 16c. Τα πρώτα μακροσκοπικά ορατά σημάδια χλώρωσης εμφανίζονται πολύ αργότερα (μετά την έβδομη- όγδοη μέρα) είτε σε αγρίου τύπου φυτά *N. benthamiana*. Ο ιστός μπορεί να χαρακτηριστεί χλωρωτικός μετά τις 10 πρώτες μέρες και νεκρωτικός μετά τις πρώτες 12-14 μέρες.



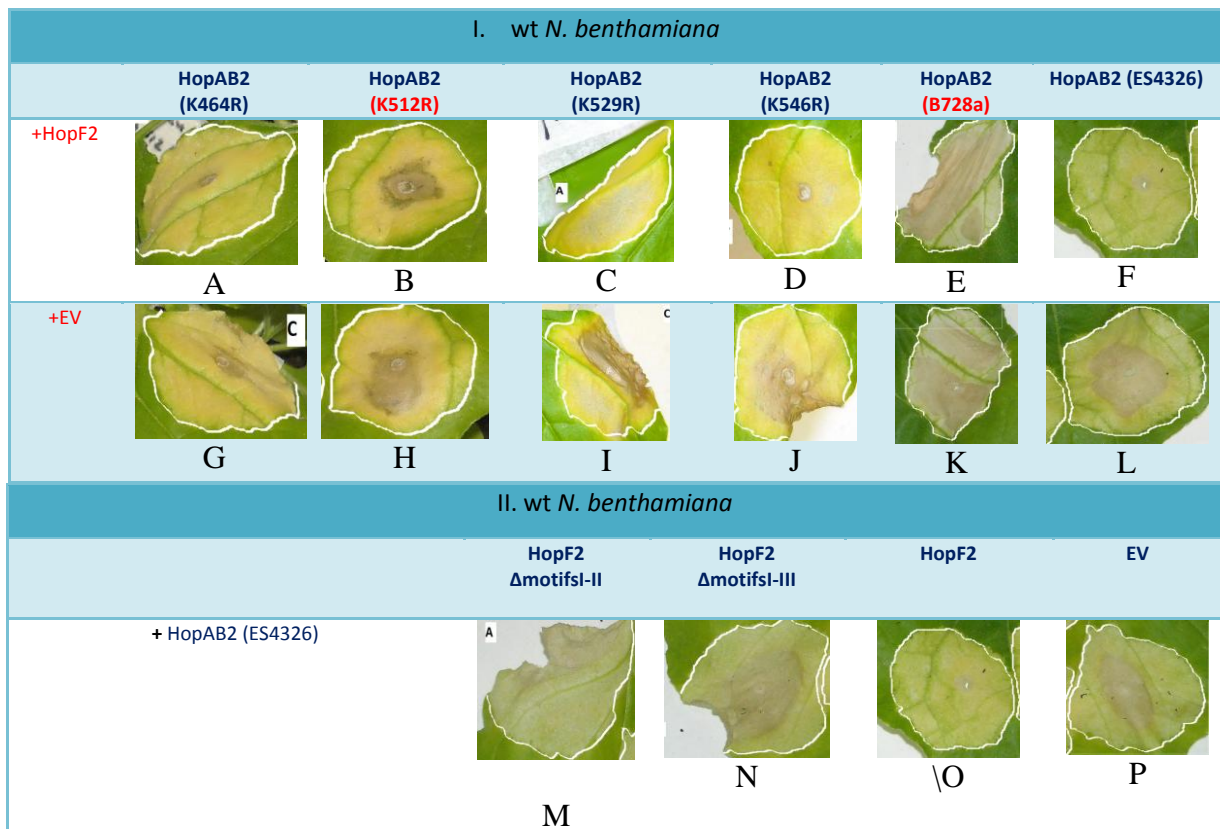
Εικόνα 67. Αγραοενχύσεις σε wt φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν: A) HopAB2 (K464R), B) HopAB2 (K512R), C) HopAB2 (K529R), D) HopAB2 (K546R), E) HopAB2m, F) empty vector.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Παρατήσαμε (αν και δεν αποτυπώνεται ξεκάθαρα στις προηγούμενες εικόνες) ότι η χλώρωση στο HopAB2 (**K546R**) πάντα εκδηλώνεται πιο αργά από ότι στο HopAB2 (K529R). Ομοίως η νέκρωση στο HopAB2 (K546R) εκδηλώνεται πιο αργά από ότι στο HopAB2 (K529R). Η χλώρωση στο HopAB2 (**K464R**) πάντα εκδηλώνεται πιο αργά από ότι στο HopAB2 (K512R) και η νέκρωση στο HopAB2 (K464R) εκδηλώνεται πιο αργά από ότι στο HopAB2 (K512R). Με μια πιο προσεκτική παρατήρηση, διαπιστώνουμε ότι αυτός είναι ο κανόνας.

Η παρακάτω εικόνα δεν δείχνει ότι το HopAB2 (**K546R**) και HopAB2 (**K464R**) δεν θα δώσει τελικά νέκρωση. Απλά δείχνει ότι η νέκρωση από HopAB2 (K529R) και HopAB2 (K512R) προηγείται του HopAB2 (**K546R**) και HopAB2 (**K464R**).

Σύμφωνα με αποτελέσματα μας που περιγράφονται σε άλλη ενότητα (εικόνα 62), τα HopAB2 (**K546R**) και HopAB2 (**K464R**) συμπεριφέρονται σαν ενισχυτές (enhancers) της σίγησης (έχουν πανομοιότυπη συμπεριφορά με αγρίου τύπου HopAB2) ενώ τα HopAB2 (K529R) και HopAB2 (K512R) έχουν μηδαμινή δυνατότητα ενίσχυσης σίγησης.



	HopAB2 (K464R)	HopAB2 (K512R)	HopAB2 (K529R)	HopAB2 (K546R)	HopAB2 (B728a)	HopAB2 (ES4326)
+HopF2	+/-	-	+	+	-	+
+: ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΝΕΚΡΩΣΗΣ, -: ΝΕΚΡΩΣΗ						

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εικόνα 68. I. Το HopF2 έχει την ικανότητα να επιβραδύνει και να αναστέλλει την νέκρωση από τις σημειακές μεταλλαγές HopAB2 (K529R), HopAB2 (K546R), HopAB2 (K464R) αλλά όχι από HopAB2 (K512R). Επίσης, το HopF2 έχει την ικανότητα να επιβραδύνει και να αναστέλλει την νέκρωση από το ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326 αλλά όχι από το ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *syringae* B728a. Αγροενχύσεις σε wt φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

A) HopF2 + HopAB2 (K464R), B) HopF2 + HopAB2 (K512R), C) HopF2 + HopAB2 (K529R), D) HopF2 + HopAB2 (K546R), E) HopF2 + HopAB2_{B728a}, F) HopF2 + Ομόλογο HopAB2_{ES4326}, G) empty vector (pPZP222) + HopAB2 (K464R), H) empty vector (pPZP222) + HopAB2 (K512R), I) empty vector (pPZP222) + HopAB2 (K529R), J) empty vector (pPZP222) + HopAB2 (K546R), K) empty vector (pPZP222) + HopAB2_{B728a}, L) empty vector (pPZP222) + Ομόλογο HopAB2_{ES4326}.

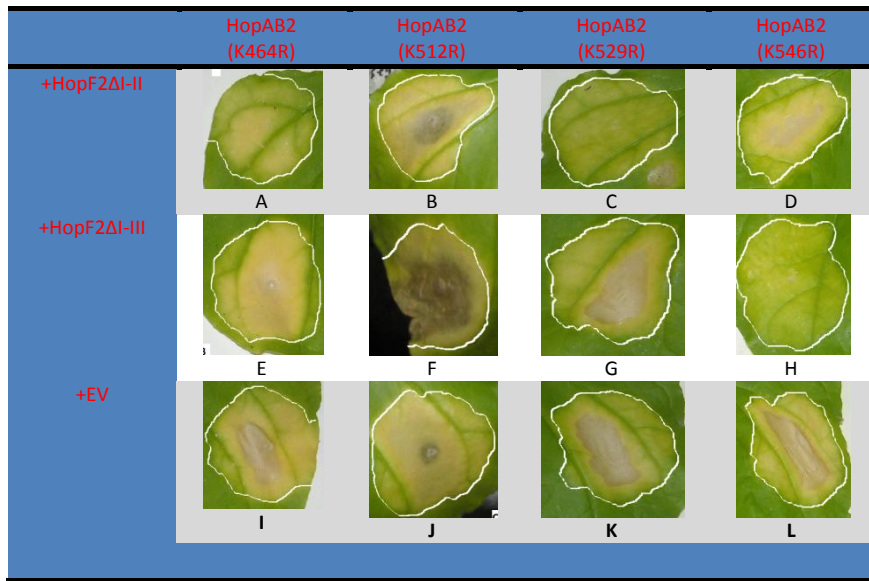
II. Το HopF2Δmotifsl-II διατηρεί την ικανότητα του πλήρους μήκους HopF2 να επιβραδύνει και να αναστέλλει την νέκρωση από HopAB2ES4326. Αγροενχύσεις σε wt φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

M) HopF2Δmotifsl-II + HopAB2_{ES4326}
N) HopF2Δmotifsl-III + HopAB2_{ES4326}
O) HopF2 + HopAB2_{ES4326}
P) empty vector (pPZP222) + HopAB2_{ES4326}

Πειράματα που περιγράφονται σε προηγούμενες ενότητες έδειξαν ότι ο τελεστής HopF2_{DC3000} έχει την δυνατότητα να αναστείλει/επιβραδύνει μια σειρά νεκρώσεων (από αγροεγχύσεις αγροβακτηρίου και από το μετάλλαγμα HopABm στη *N. benthamiana*). Στην συνέχεια επιχειρήσαμε να αποσαφηνίσουμε εάν το HopF2_{DC3000} έχει την δυνατότητα να επιβραδύνει την νέκρωση που προκαλείται από τις σημειακές μεταλλαγές του HopAB2_{DC3000} που προαναφέρθηκαν και από άλλα ομόλογα του HopAB2. Πράγματι, όπως φαίνεται στην Εικόνα 43, αυτό συμβαίνει με τα μετάλλαγματα της HopAB **K529R**, **K546R** και, **K464R**. Εξαιρεση ίσως αποτελεί η νέκρωση από HopAB2_{DC3000}(**K512R**). Επιπλέον, το HopF2 έχει την ικανότητα να επιβραδύνει και να αναστέλλει την νέκρωση από το ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326 (HopAB_{ES4326}) αλλά όχι από το ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *syringae* B728a (HopAB_{ES4326}).

Έλλειψη του HopF2 που διατηρεί τα μοτίβα III-V έχει την ίδια ικανότητα με το πλήρους μήκους HopF2 να επιβραδύνει και να αναστέλλει την νέκρωση από το ομόλογο HopAB2_{ES4326}. Η ίδια έλλειψη διατηρεί την ικανότητα του πλήρους μήκους HopF2 να επιβραδύνει και να αναστέλλει την νέκρωση από τις σημειακές μεταλλαγές HopAB2 (K529R), HopAB2 (K464R) αλλά όχι από HopAB2 (K512R). Στην περίπτωση του HopAB2 (K546R), για την επιβράδυνση και την αναστολή της νέκρωσης αρκούν τα μοτίβα IV-V της HopF2.

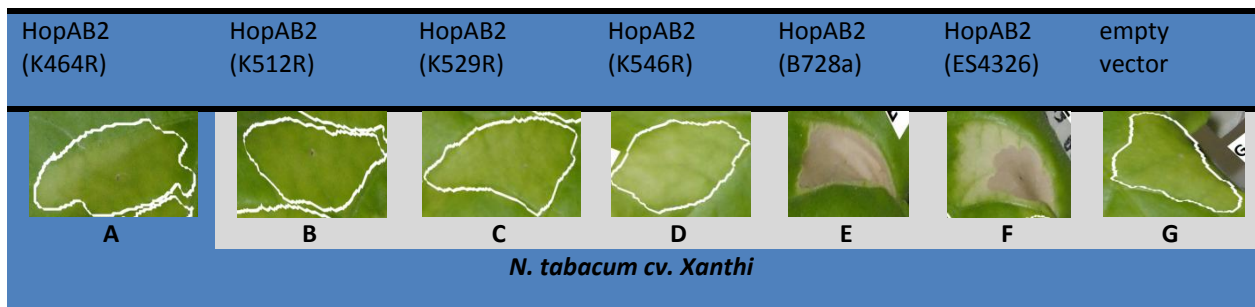
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



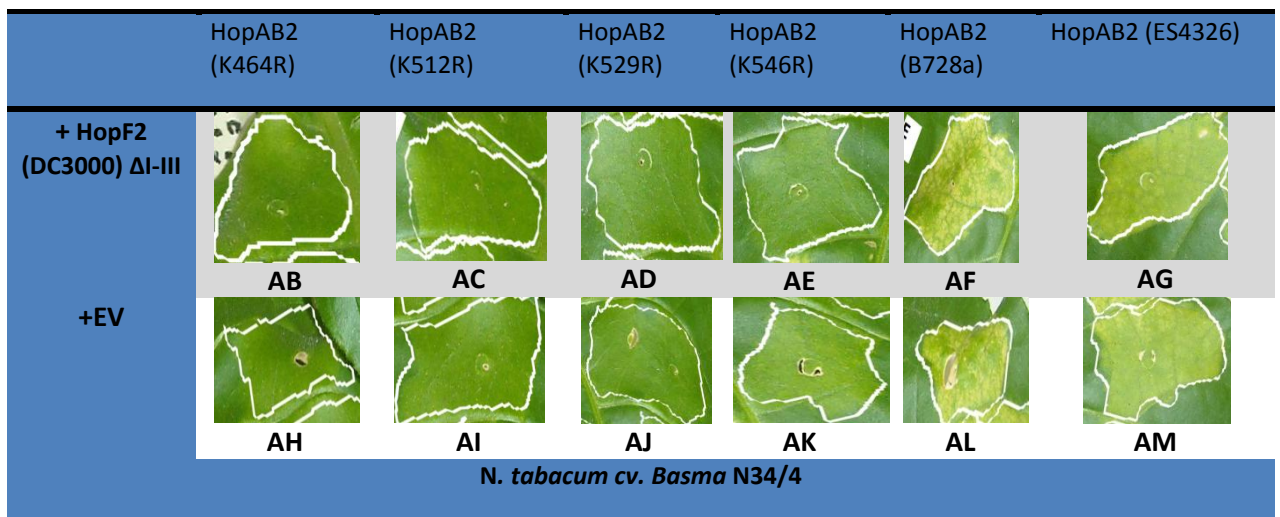
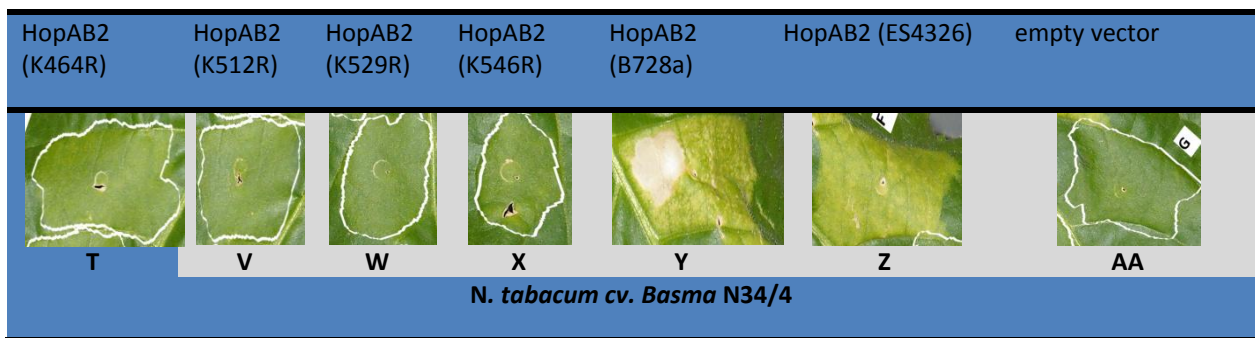
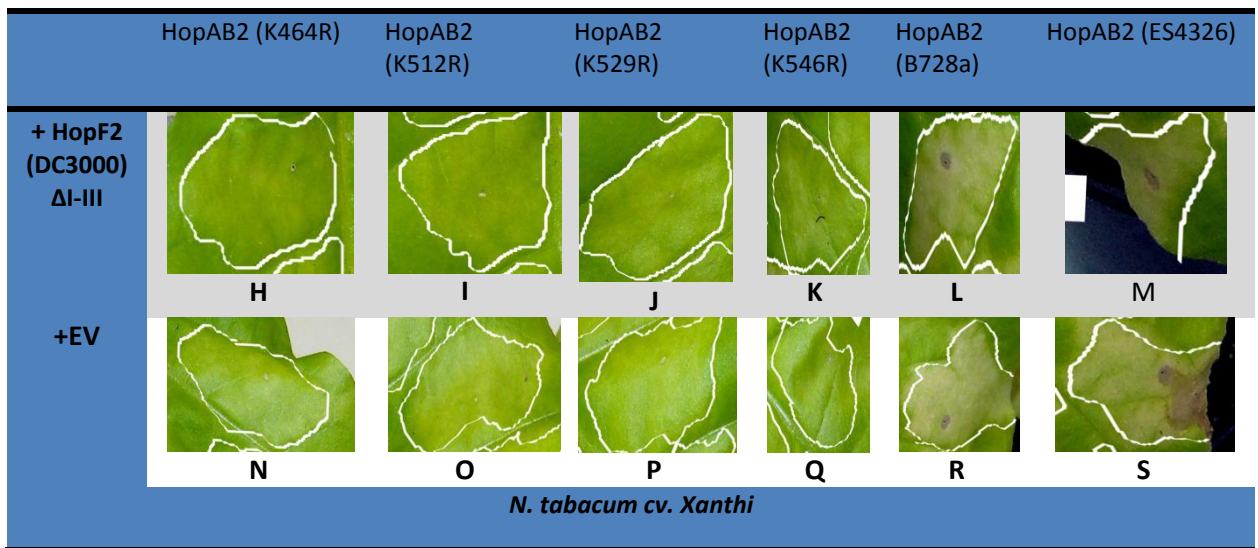
	HopAB2 (K464R)	HopAB2 (K512R)	HopAB2 (K529R)	HopAB2 (K546R)
+HopF2	+/-	-	+	+
+HopF2ΔI-II	+	-	+	+/-
+HopF2ΔI-III	+/-	-	-	+
+: ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΝΕΚΡΩΣΗΣ, -:ΝΕΚΡΩΣΗ				

Εικόνα 69. Στις περισσότερες περιπτώσεις το HopF2motifsi-II διατηρεί την ικανότητα του πλήρους μήκους HopF2 να επιβραδύνει και να αναστέλλει την νέκρωση από τις σημειακές μεταλλαγές HopAB2 (K529R), HopAB2 (K464R) αλλά όχι από HopAB2 (K512R). Ακόμα και το HopF2motifsi-III διατηρεί την ικανότητα του πλήρους μήκους HopF2 να επιβραδύνει και να αναστέλλει την νέκρωση στην περίπτωση του HopAB2 (K546R). Αγορευήσεις σε wt φυτά *N. benthamiana* με κατασκευές που υπερεκφράζουν:

A) HopF2motifsi-II + HopAB2 (K464R), B) HopF2motifsi-II + HopAB2 (K512R), C) HopF2motifsi-II + HopAB2 (K529R), D) HopF2motifsi-II + HopAB2 (K546R), E) HopF2motifsi-III + HopAB2 (K464R), F) HopF2motifsi-III + HopAB2 (K512R), G) HopF2motifsi-III + HopAB2 (K529R), H) HopF2motifsi-III + HopAB2 (K546R), I) empty vector (EV, pPZP222) + HopAB2 (K464R), J) EV + HopAB2 (K512R), K) EV + HopAB2 (K529R), L) EV + HopAB2 (K546R).



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 70. Αγροενχύσεις σε *N. tabacum cv. Xanthi* (A-S) και σε *N. tabacum cv. Basma N34/4* (T-AI).

Παρουσιάζονται αγροενχύσεις με κατασκευές που υπερεκφράζουν :

A-G. A) HopAB2 (K464R), B) HopAB2 (K512R), C) HopAB2 (K529R), D) HopAB2 (K546R), E) Ομόλογο HopAB2 από *P. syringae pv. syringae* B728a, F) Ομόλογο HopAB2 από *P. syringae pv. maculicola* ES4326, G) empty vector.

H-S. H) HopAB2 (K464R) +HopF2 (DC3000) ΔΙ-III, I) HopAB2 (K512R) +HopF2 (DC3000) ΔΙ-III, J) HopAB2 (K529R) +HopF2 (DC3000) ΔΙ-III, K) HopAB2 (K546R) +HopF2 (DC3000) ΔΙ-III, L) Ομόλογο HopAB2 από *P. syringae pv. syringae* B728a +HopF2 (DC3000) ΔΙ-III, M) Ομόλογο HopAB2 από *P. syringae pv.*

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

maculicola ES4326 +HopF2 (DC3000) ΔI-III, N) HopAB2 (K464R)+ empty vector, O) HopAB2 (K512R)+ empty vector, P) HopAB2 (K529R)+ empty vector, Q) HopAB2 (K546R)+ empty vector, R) Ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *syringae* B728a + empty vector, S) Ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326+ empty vector.

T-AA. T) HopAB2 (K464R), V) HopAB2 (K512R),W) HopAB2 (K529R), X) HopAB2 (K546R), Y) Ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *syringae* B728a, Z) Ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326, AA) empty vector.

AB-AM. AB) HopAB2 (K464R) + HopF2 (DC3000) ΔI-III, AC) HopAB2 (K512R) + HopF2 (DC3000) ΔI-III, AD) HopAB2 (K529R) + HopF2 (DC3000) ΔI-III, AE) HopAB2 (K546R) + HopF2 (DC3000) ΔI-III, AF) Ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *syringae* B728a + HopF2 (DC3000) ΔI-III, AG) Ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326 + HopF2 (DC3000) ΔI-III, AH) HopAB2 (K464R) + empty vector, AI) HopAB2 (K512R) + empty vector, AJ) HopAB2 (K529R) + empty vector, AK) HopAB2 (K546R) + empty vector, AL) Ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *syringae* B728a + empty vector, AM) Ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326+ empty vector.

Υπερέκφραση των μεταλλαγμάτων HopAB2 (K464R), HopAB2 (K512R), HopAB2 (K529R), HopAB2 (K546R) δεν οδηγεί σε πυροδότηση αντίδρασης υπερευαισθησίας σε *N. tabacum* cv. *Xanthi* ή *N. tabacum* cv. *Basma N34/4*. Σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν:

A) Αγροεγχύσεις με τα ομόλογα HopAB2_{B728a} και HopAB2_{ES4326} σε *N. tabacum* cv. *Xanthi*³⁴.

B)) Εγχύσεις με το ομόλογο HopAB2_{B728a} σε *N. tabacum* cv. *Xanthi* ή *N. tabacum* cv. *Basma N34/4*.³⁵

3.3 Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στον επαγόμενο από HopAB2 κυτταρικό θάνατο. Με στόχο να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση κυτταρικού θανάτου και μηχανισμού σίγησης υπάρχει ανάγκη για ένα πειραματικό σύστημα στο οποίο να είναι πλήρως χαρακτηρισμένη η σηματοδότηση κυτταρικού θανάτου από πρωτεΐνη-τελεστή. Για αυτό το σκοπό επιλέχθηκε η HopAB2_{DC3000} (del Pozo et al., 2004; Ekengren et al., 2003; Pedley & Martin, 2004). Η πρωτεΐνη αυτή δεν δίνει αντίδραση υπερευαισθησίας σε αγρίου τύπου φυτά *N. tabacum* cv. *Xanthi* και *N. benthamiana*. Όμως δίνει μια καθυστερημένη νέκρωση έπειτα από αρκετές μέρες. Αντίθετα, μεταλλάγματα όπως το

³⁴ Τα HopF2_{DC3000}, HopF2_{DC3000}ΔI-II, HopF2_{DC3000}ΔI-III δεν αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο από το ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *syringae* B728a και το ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326. Παρουσιάζονται ενδεικτικές φωτογραφίες με HopF2_{DC3000}ΔI-III. Όμοια συμπεριφορά είχαν και τα HopF2_{DC3000} και HopF2_{DC3000}ΔI-II.

³⁵ Τα HopF2_{DC3000}, HopF2_{DC3000}ΔI-II, HopF2_{DC3000}ΔI-III δεν αναστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο από το ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *syringae* B728a και το ομόλογο HopAB2 από *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326. Παρουσιάζονται ενδεικτικές φωτογραφίες με HopF2_{DC3000}ΔI-III. Όμοια συμπεριφορά για τα άλλα δυο (data not shown).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

HopAB2m αφ' ενός δεν καταστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο και αφ' ετέρου πυροδοτούν HR στον καπνό. Επίσης, σε φυτά *N. benthamiana*, αν και η αντίδραση είναι πολύ πιο ήπια, παρατηρούνται χλωρωτικά συμπτώματα και μια χρονικά καθυστερημένη νέκρωση. Η μεταλλαγές όπως στην HopAB2m έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια της ενζυμικής του ενεργότητας E3 λιγάσης ουμπικουϊτίνης του HopAB2, (Abramovitch et al., 2006))




Αντίθετα, μετά από παροδική έκφραση HopAB2m σε διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana* που υπερεκφράζουν p19 παρατηρούνται νεκρωτικά συμπτώματα αρκετές μέρες πριν την εκδήλωση τους σε αγρίου τύπου φυτά. Παροδική συνέκφραση p19 και HopAB2m σε w.t. *N. benthamiana* έχει το ίδιο ακριβώς αποτέλεσμα., όπως και η συνέκφραση του HopAB2m με HC-Pro. Επανάληψη του ίδιου πειράματος (παροδική έκφραση HC-Pro/ HopAB2m) σε διαγονιδιακή σειρά που εκφράζει το p19 έδειξε την ίδια δράση με αυτή που είχε η αγροέγχυση μόνο του HopAB2m. Το γεγονός αυτο υποδηλώνει ότι η ύπαρξη μόνο ενός ιϊκού αναστολέα (ανεξάρτητα αν εκφράζεται παροδικά ή μόνιμα) είναι ικανή να αναστρέψει πλήρως το φαινόμενο. Επιπλέον, ότι δεν υπάρχει συνεργιστική επίδραση των δυο αναστολέων σίγησης. Φαίνεται ότι ο HC-Pro είναι πιο ισχυρός παρεμπόδιστής της HRπου προκαλείται από την HopABm, σε σύγκριση με τον p19. Επανάληψη των ίδιων πειραμάτων με HC-Pro/Hop AB2m σε φυτά *N. tabacum cv. Xanthi* παρουσίασαν ακριβώς τα ίδια αποτελέσματα (data not shown). Πειράματα με p19 δεν είναι εφικτά καθώς η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δρα σαν *avr* γονίδιο (πυροδοτεί νέκρωση-HR) σε αυτή την ποικιλία καπνού (Scholthof et al., 1995).






3.4 Υπερευαισθησία στην εκδήλωση νεκρώσεων στην διαγονιδιακή σειρά sde1IR.

Η διαγονιδιακή σειρά *N. benthamiana sde1IR* που έχει καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *rd6*) είναι υπερευαίσθητη στην εκδήλωση νεκρώσεων σε πειράματα αγροέγχυσης του τελεστή HopABm. Η αντίδραση αυτή είναι χρονικά πολύ γρήγορη και πιο έντονη σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά. Μερικές μέρες μάλιστα μετά την τοπική εκδήλωση νέκρωσης (στο φύλλο στο οποίο πραγματοποιήθηκε αγροέγχυση), παρατηρείται σχεδόν ολικός μαρασμός των φυτών που είναι εντονότερος όσο πιο ώριμα αναπτυξιακά είναι τα φυτά. Έτσι, την δεύτερη ημέρα είναι ήδη μακροσκοπικά ορατή νέκρωση από HopAB2m σε φυτά *N. benthamiana sde1IR*. Η νέκρωση αυτή δεν επιταχύνεται από επιπλέον παροδική έκφραση p19, HC-Pro ή HopAB2. Το φαινόμενο γίνεται μακροσκοπικά ορατό πιο γρήγορα ακόμη και από τα φυτά που υπερεκφράζουν παροδικά τον p19. Την ίδια μέρα (δηλαδή την δεύτερη μετά την αγροέγχυση), τα αγρίου τύπου φυτά δεν έχουν κανένα φαινότυπο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μάλιστα στην περίπτωση αυτή, ακόμη και αagroένχυση μόνο του HopAB2 οδηγεί σε γρήγορη αντίδραση νέκρωσης σε φυτά *sde1IR*.

	HopAB2m	HopAB2m +p19	HopAB2m+ HC-Pro		
I.					W.T PLANTS
W.T PLANTS	 A	 B	 C	HopAB2m	-
				HopAB2m +p19	+
				HopAB2m+HC-Pro	+
	+: ΝΕΚΡΩΣΗ, -: ΟΧΙ ΝΕΚΡΩΣΗ				

	HopAB2m+HC-Pro	HopAB2m +p19	HopAB2m		
II.					
W.T N.b. PLANTS	 A	 B	 C		
P19 N.b. PLANTS	 D	ND	 E		
	HopAB2m+HC-Pro	HopAB2m +p19	HopAB2m		
W.T N.b. PLANTS	+	+	-		
P19 N.b. PLANTS	+	ND	+		
	+: ΝΕΚΡΩΣΗ, -: ΟΧΙ ΝΕΚΡΩΣΗ				

Εικόνα 71. Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στον επαγόμενο από HopAB2 κυτταρικό θάνατο.

I. Αgroενχύσεις σε φύλλα w.t. *N. benthamiana* (2dri). A) Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m + Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector, B) Κατασκευή που υπερεκφράζει p19 + Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m C) Κατασκευή που υπερεκφράζει HC-Pro + Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m.

II. Αgroενχύσεις σε φύλλα w.t. *N. benthamiana* (A-C, 7dri). A) Κατασκευή που υπερεκφράζει HC-Pro+ Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m, B) Κατασκευή που υπερεκφράζει p19 + Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m, C) Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m + Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector. Επίσης, αagroενχύσεις σε φύλλα διαγωνιακής σειράς *N. benthamiana* που υπερεκφράζει p19 (D-E, 7dri). D) Κατασκευή που υπερεκφράζει HC-Pro+ Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m, E) Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m + Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector.

Τέτοια δράση με μόνο HopAB2 δεν είχε σαν φαινότυπο αντίδραση νέκρωσης σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα σε κανένα άλλο πείραμα της παρούσας μελέτης. Οι

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

παρατηρήσεις αυτές ευθυγραμμίζονται με αντίστοιχα πειράματα άλλων ερευνητικών ομάδων στην *Arabidopsis*. Η PTI είναι συνεχώς ευαισθητοποιημένη στο γενετικά τροποποιημένο φυτό απώλειας λειτουργίας *rdr6* στην *Arabidopsis* (Boccardo et al., 2014).
Συνολικά τα πειράματα αυτά ενοχοποιούν την RDR6 ως εάν νέο αρνητικό ρυθμιστή της PTI.

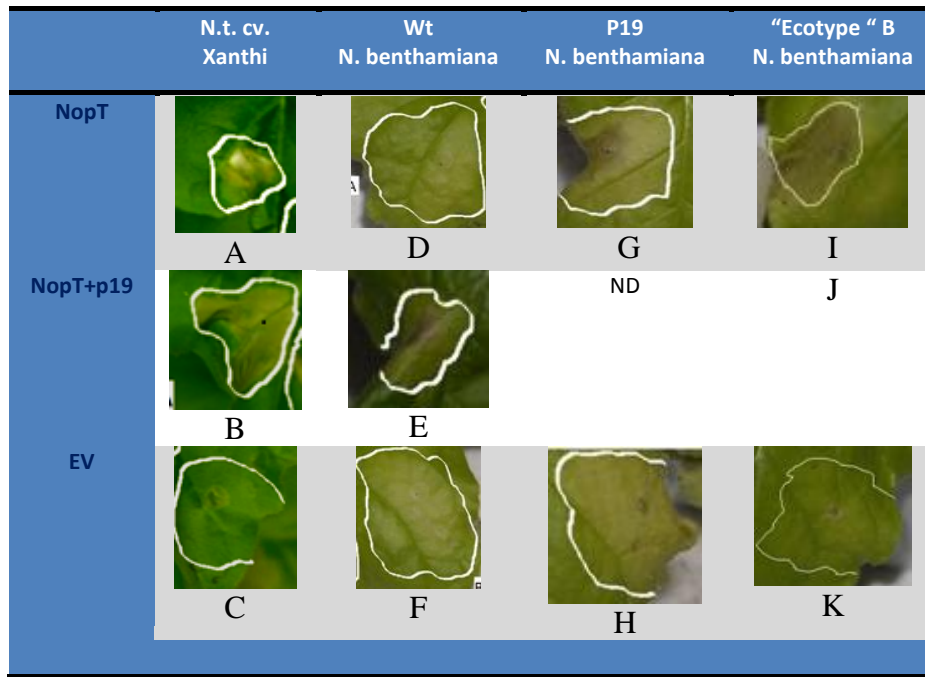
3.5 Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στον επαγόμενο από NorT κυτταρικό θάνατο.

Παράλληλα με τα παραπάνω, ελέγχθηκε η περίπτωση της NorT. Η NorT είναι μια ριζοβιακή πρωτεΐνη τελεστής (Dai et al., 2008). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εκκρίνεται μέσω του συστήματος τύπου III και έχει ρόλο στην αλληλεπίδραση ριζοβίου με το ριζικό σύστημα του φυτού. Είναι γνωστό ότι υπάρχουν διαφοροποιήσεις στον μηχανισμό της σίγησης στις ρίζες (Dunoyer et al., 2006) σε σχέση με τα φύλλα. Όμως, για τεχνικούς λόγους, τα πειράματα με την παροδική έκφραση της έγιναν σε φύλλα.

Η NorT δεν πυροδοτεί νέκρωση σε *N. tabacum* cv. Basma N34/4, πυροδοτεί πολύ ήπια και καθυστερημένη νέκρωση σε *N. tabacum* cv. *Xanthi* ενώ και η νέκρωση σε *N. benthamiana* είναι αρκετά καθυστερημένη και ήπια έως ανύπαρκτη. Όπως αναμενόταν, η συνέκφραση NorT και p19 οδήγησε σε επιτάχυνση της εκδήλωσης νεκρώσεων σε φυτά *N. tabacum* cv. *Xanthi*. Σε φυτά *N. benthamiana* όπως προαναφέρθηκε, η έκφραση NorT δεν οδήγησε στην εκδήλωση νεκρώσεων. Συνέκφραση όμως της NorT με p19 μέσω αγροέγχυσης οδήγησε στην εκδήλωση νεκρωτικών συμπτωμάτων πολύ πιο γρήγορα σε σχέση με τον μάρτυρα. Το ίδιο αποτέλεσμα είχε και η παροδική έκφραση της πρωτεΐνης NorT σε διαγονιδιακά φυτά *N. benthamiana*/ p19.

Ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον πείραμα ήταν ο έλεγχος της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε αγρίου τύπου *N. benthamiana* από συνεργαζόμενο εργαστήριο ("Ecotype B"). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη (NorT) δεν δίνει αντίδραση υπερευαισθησίας (ή δίνει πολύ καθυστερημένη νέκρωση) σε αγρίου τύπου *N. benthamiana* του εργαστηρίου μας. Αν υπερεκφραστεί όμως στο γενετικό υπόβαθρο του "Οικότυπου B" (Ecotype B) δίνει μια συγκριτικά πολύ πιο γρήγορη νέκρωση. Συναγροένχυσης με NorT σημειακών μεταλλαγμάτων του HopF2 σε φυτά *N. tabacum* επιταχύνουν τις νεκρώσεις. Η φωτογραφία πάρθηκε πριν αρχίσουν να γίνονται μακροσκοπικά ορατές οι νεκρώσεις από τις σημειακές μεταλλαγές μόνες τους.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



	N.t. cv. Xanthi	Wt N. benthamiana	P19 N. benthamiana	"Ecotype " B N. benthamiana
NopT	+/-	-	+	+
NopT+p19	++	+	ND	++
+: ΝΕΚΡΩΣΗ, -: ΟΧΙ ΝΕΚΡΩΣΗ				

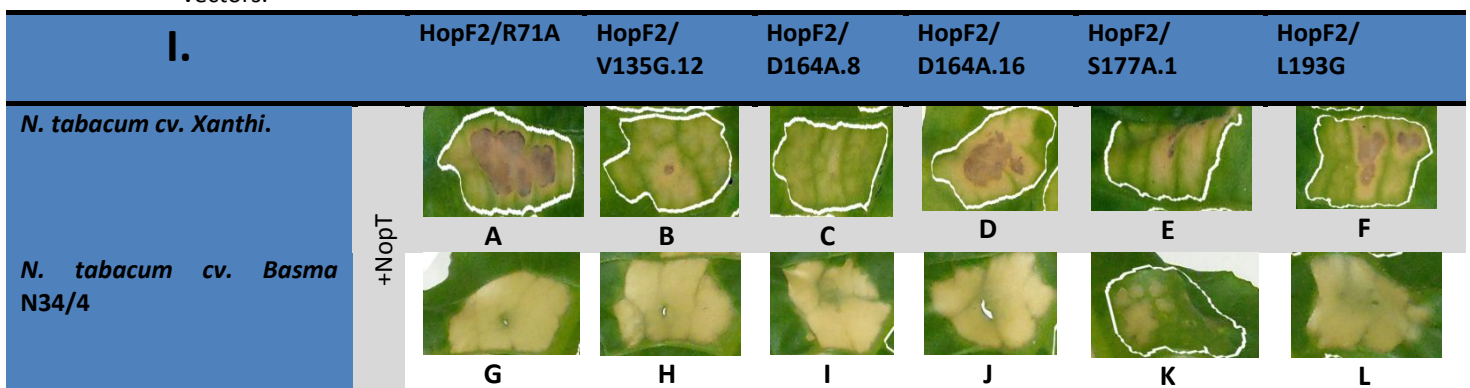
Εικόνα 72. Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στον επαγόμενο από NopT κυτταρικό θάνατο.

A-C. Αγροενχύσεις σε φύλλα w.t. *N. tabacum* cv. *Xanthi* (4dpi). A) Κατασκευή που υπερεκφράζει NopT + Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector. B) Κατασκευή που υπερεκφράζει NopT+ Κατασκευή που υπερεκφράζει p19, C) Κατασκευή που υπερεκφράζει τους αντίστοιχους empty vectors.

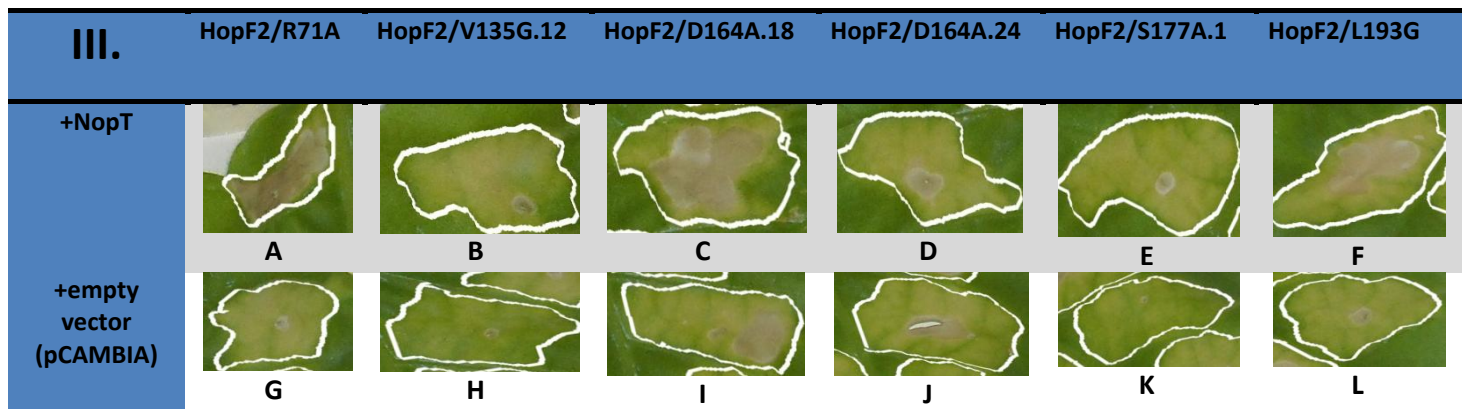
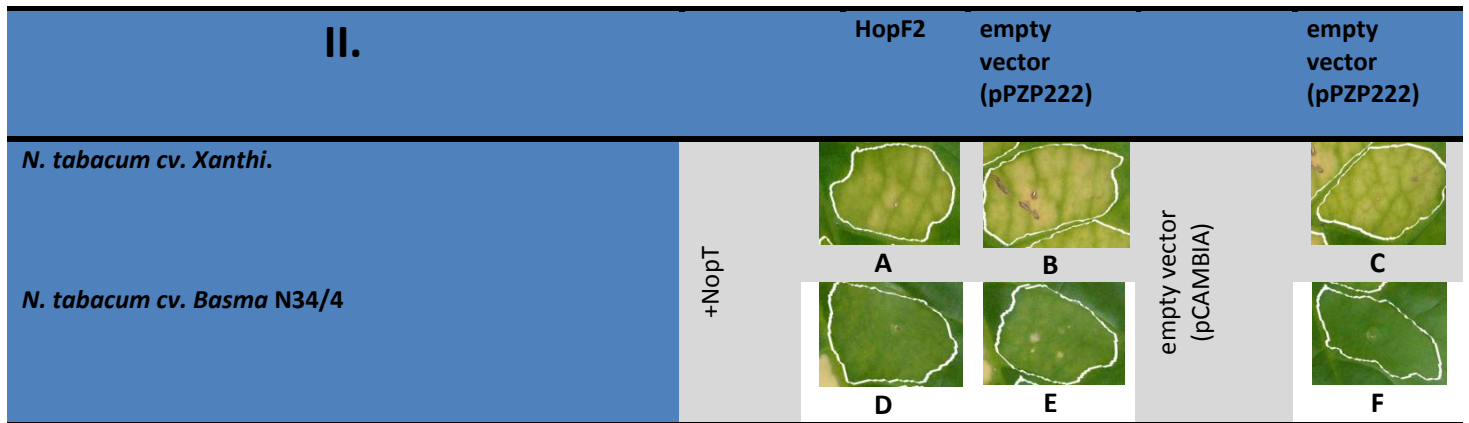
D-F. Αγροενχύσεις σε φύλλα w.t. *N. benthamiana* (8 dpi). D) Κατασκευή που υπερεκφράζει NopT + Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector, E) Κατασκευή που υπερεκφράζει NopT+ Κατασκευή που υπερεκφράζει p19, F) Κατασκευή που υπερεκφράζει τους αντίστοιχους empty vectors.

G-H. Αγροενχύσεις σε φύλλα *N. benthamiana* που υπερεκφράζουν p19 (8dpi). G) Κατασκευή που υπερεκφράζει NopT, H) Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector.

I-K. Αγροενχύσεις σε φύλλα w.t. *N. benthamiana* "Ecotype B" (10dpi). I) Κατασκευή που υπερεκφράζει NopT + Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector, J) Κατασκευή που υπερεκφράζει NopT+ Κατασκευή που υπερεκφράζει p19, K) Κατασκευή που υπερεκφράζει τους αντίστοιχους empty vectors.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



	HopF2 (R71A)	HopF2 (V135G)	HopF2 (D164A)	HopF2 (S177A)	HopF2 (L193G)	HopF2
-NopT	-	-	-	-	-	-
+NopT	+	+	+	-	+	-
+: ΝΕΚΡΩΣΗ, -: ΟΧΙ ΝΕΚΡΩΣΗ						

Εικόνα 73. Συναγροενχύσεις κατασκευών σημειακών μεταλλαγών του HopF2 με την ριζοβιακή πρωτεΐνη NopT

- I. σε *N. tabacum* cv. *Xanthi* (A-F). Να σημειωθεί ότι όπως φαίνεται και στην εικόνα η νέκρωση από το ίδιο το NopT είναι πάρα πολύ ασθενής σε *N. tabacum* cv. *Xanthi*. Παρουσιάζονται αγροενχύσεις με κατασκευές που υπερεκφράζουν: A) HopF2/R71A + NopT, B) HopF2/V135G.12 + NopT, C) HopF2/D164A.18 + NopT, D) HopF2/D164A.24 + NopT, E) HopF2/S177A.1 + NopT, F) HopF2/L193G +NopT. Επίσης, σε *N. tabacum* cv. *Basma* N34/4 (G-L). Η επίδραση της πρωτεΐνης αυτής είναι παρόμοια με p19. Το NopT δεν πυροδοτεί νέκρωση σε *N. tabacum* cv. *Basma* N34/4. Παρουσιάζονται αγροενχύσεις με κατασκευές που υπερεκφράζουν: G) HopF2/R71A + NopT, H) HopF2/V135G.12 + NopT, I) HopF2/D164A.8 + NopT, j) HopF2/D164A.16 + NopT, K) HopF2/S177A.1 + NopT, L) HopF2/L193G + NopT

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- II. σε *N. tabacum* cv. *Xanthi* (A-C). A) HopF2 + NorT, B) empty vector (pPZP222) + NorT, C) empty vector (pPZP222) + empty vector (pCAMBIA). Επίσης, σε *N. tabacum* cv. *Basma* N34/4 (D-F). D) HopF2 + NorT, E) empty vector (pPZP222) + NorT, F) empty vector (pPZP222) + empty vector (pCAMBIA),.
- III. σε *N. tabacum* cv. *Xanthi*. Παρουσιάζονται αγροενχύσεις με κατασκευές που υπερεκφράζουν: A) HopF2/R71A + NorT, B) HopF2/V135G.12 + NorT, C) HopF2/D164A.18 + NorT, D) HopF2/D164A.24 + NorT, E) HopF2/S177A.1 + NorT, F) HopF2/L193G + NorT, G) HopF2/R71A + empty vector (pCAMBIA), H) HopF2/V135G.12 + empty vector (pCAMBIA), I) HopF2/D164A.18 + empty vector (pCAMBIA), J) HopF2/D164A.24 + empty vector (pCAMBIA), K) HopF2/S177A.1 + empty vector (pCAMBIA), L) HopF2/L193G + empty vector (pCAMBIA).

Η επίδραση του NorT στην προηγούμενη εικόνα προσομοιάζει αυτή του p19. Δημιουργήθηκε το ερώτημα εάν το NorT είναι βακτηριακής αναστολέας της σίγησης. Σε συν-αγροενχύσεις με GFP όμως, τα επίπεδα έκφρασης της GFP δεν μεταβάλλονται αισθητά παρουσία NorT σε σχέση με τον μάρτυρα (data not shown). Το πειραματικό μας σύστημα όμως πάσχει από ψευδώς αρνητικά σήματα. Μπορεί να διακρίνει άψογα ισχυρούς καταστολείς σίγησης ή ενισχυτές σίγησης (με ισχυρή επίδραση ή μη). Αδυνατεί όμως να διακρίνει **ασθενείς** καταστολείς σίγησης. Η υπόθεση μένει να αποδειχτεί με την χρήση κάποιου πιο εκλεπτυσμένου συστήματος.

3.6 Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στην αποτροπή της HR από βακτηριακούς τελεστές σε υψηλές θερμοκρασίες.

Ιολογικές ασθένειες σε φυτά συχνά συσχετίζονται με χαμηλές θερμοκρασίες ενώ τα συμπτώματα μόλυνσης συχνά εξασθενούν σε ψηλές θερμοκρασίες (32°C) (heat masking) και η εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας σε μολύνσεις από ιούς αποτρέπεται (Szittyta et al., 2003). Η αποτροπή αυτή είναι αντιστρεπτή, αφού μεταφορά των φυτών σε κανονική θερμοκρασία (μετά από δυο μέρες παραμονής στην απαγορευτική θερμοκρασία) έχει σαν αποτέλεσμα την άρση της αποτροπής (Gabriëls et al., 2006). Στο μηχανισμό αποτροπής φαίνεται να εμπλέκονται MAP κινάσες. Για παράδειγμα, ο TMV πυροδοτεί αντίδραση υπερευαισθησίας διαμεσολαβούμενη από το R γονίδιο N του καπνού, που κωδικεύει μια πρωτεΐνη-υποδοχέα της κατηγορίας TIR-NB-LRR και αναγνωρίζει την καρβοξυτελική επικράτεια ελικάσης της ρεπλικάσης του TMV (126 kDa). Μεταφορά φυτών μολυσμένων με TMV στους 32 °C έχει σαν αποτέλεσμα εκτός από την αναστολή κυτταρικού θανάτου και την αναστολή της έκφρασης των κινασών SIPK και WIPK (Zhang & Klessig, 1998). Το φαινόμενο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

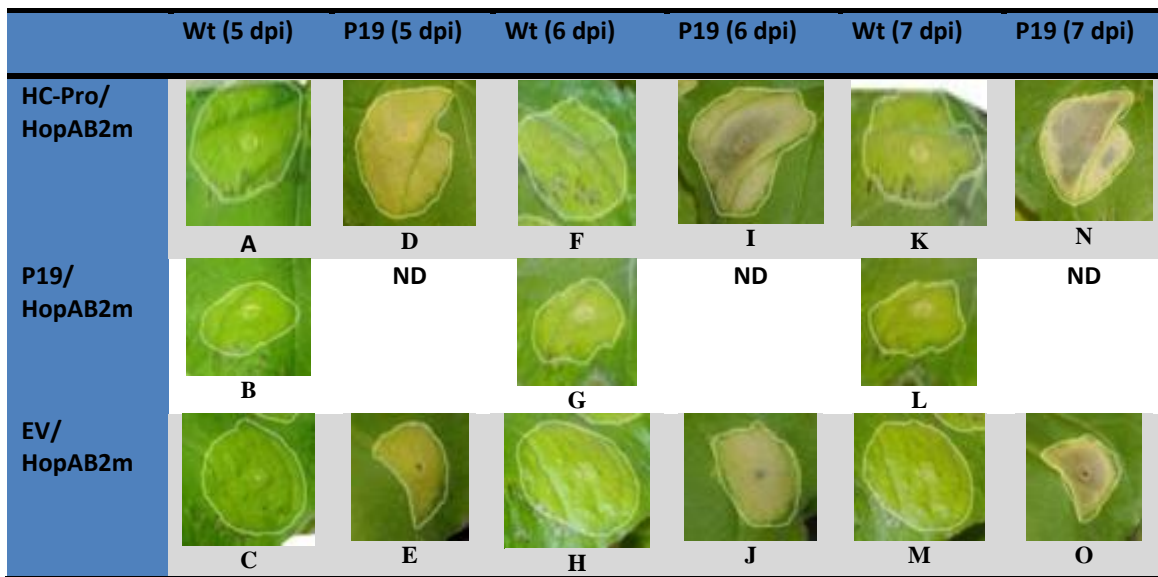
αυτό είναι αντιστρεπτό. Μεταφορά σε κανονικές θερμοκρασίες έχει σαν αποτέλεσμα την έκφραση των MAP κινασών και την επαγωγή κυτταρικού θανάτου. Από την άλλη πλευρά, η RNA σίγηση αναστέλλεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Στις συνθήκες αυτές πιθανόν ενεργοποιούνται εναλλακτικά μονοπάτια σίγησης {SósHegedus, 2005 #513}. Τα επίπεδα μικρών (21–26 νουκλεοτιδίων) siRNAs (κεντρικά μόρια των μονοπατιών άμυνας των φυτών που οφείλεται από την RNA-διαμεσολαβούμενη σίγηση) μειώνονται δραματικά σε χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ η σίγηση και τα επίπεδα των siRNAs σταδιακά αυξάνουν με την άνοδο της θερμοκρασίας (Szittyga, 2003 #529, Kalantidis et al., 2002). Φυτά με καταστολή της έκφρασης της RNA πολυμεράσης *sde1* είναι πιο επιρρεπή στην μόλυνση από ιούς ιδιαίτερα σε υψηλές θερμοκρασίες (Qu et al., 2005). Συνολικά, από τις παραπάνω δημοσιεύσεις συνάγεται ότι ο μηχανισμός της RNA σίγησης είναι πιο ενεργός σε υψηλότερες θερμοκρασίες.

Στα δικά μας πειράματα, οι νεκρώσεις από HorABm επιταχύνονται όταν γίνεται ταυτόχρονη αγροέγχυση ιϊκών αναστολέων. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται σε αγροέγχυση του HorAB2m σε διαγονιδιακά φυτά που υπερεκφράζουν ιϊκούς αναστολείς σίγησης. Ένα ενδιαφέρον ερώτημα ήταν κατά πόσο η αναστολή της HR που παρατηρείται σε υψηλές θερμοκρασίες είναι αποτέλεσμα της αυξημένης δράσης της RNA σίγησης, αρνητικού ρυθμιστή της HR.

Για να διευρύνουμε το εύρημα αυτό έγιναν αγροεγχύσεις με στελέχη που είχαν πλασμίδια έκφρασης του HorAB2m ή συνδυασμό HC_Pro/ HorAB2m ή συνδυασμό με p19/ HorAB2m σε αγρίου τύπου φυτά τα οποία και διατηρηθήκαν σε περιοριστικές για την εκδήλωση HR θερμοκρασίες. Αγροεγχύσεις με στελέχη που είχαν πλασμίδια φέροντα το HorAB2m ή συνδυασμό HC_Pro/ HorAB2m έγιναν και σε διαγονιδιακά φυτά που υπερεκφράζουν p19.

Σε αγρίου τύπου φυτά καθόλη την διάρκεια του πειράματος δεν παρατηρήθηκε εκδήλωση HR από HorAB2m (σε αντίθεση με τις κανονικές θερμοκρασίες). Αντίθετα σε p19 φυτά τα πρώτα σημάδια χλώρωσης εμφανιστήκαν την τέταρτη ημέρα ενώ μέχρι την έβδομη η εκδήλωση της HR είχε ολοκληρωθεί. Σε αγρίου τύπου φυτά η HR από το συνδυασμό HC_Pro/ HorAB2m (αλλά και p19/ HorAB2m) άρχισε να εκδηλώνεται μετά την όγδοη ημέρα, (μακροσκοπικά). Αντίθετα στα p19 φυτά ήταν ορατή από την τρίτη ημέρα με χλωρωτικά συμπτώματα και από την έκτη ημέρα με νεκρωτικά συμπτώματα. Συμπερασματικά, ο απαγορευτικός παράγοντας για την εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας σε υψηλές θερμοκρασίες είναι η αυξημένη δράση του μηχανισμού της σίγησης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



	HopAB2m	HopAB2m+HC-Pro
Wt <i>N. benthamiana</i>	-	-
P19 <i>N. benthamiana</i>	+	++
+: NEΚΡΩΣΗ, -: ΟΧΙ ΝΕΚΡΩΣΗ		

Εικόνα 74. Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στην αποτροπή της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε υψηλές θερμοκρασίες.

A-C. Αγροεγχύσεις σε φύλλα w.t. *N. benthamiana* στους (32°C, 5 dpi). A) Κατασκευή που υπερεκφράζει HC-Pro+ Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m, B) Κατασκευή που υπερεκφράζει p19 + Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m, C) Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector. + Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m.

D-E. Αγροεγχύσεις σε φύλλα *N. benthamiana* που υπερεκφράζουν p19 στους (32°C, 5 dpi). D) Κατασκευή που υπερεκφράζει HC-Pro+ Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m, E) Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector. + Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m.

F-H. Αγροεγχύσεις σε φύλλα w.t. *N. benthamiana* στους (32°C, 6 dpi). F) Κατασκευή που υπερεκφράζει HC-Pro+ Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m, G) Κατασκευή που υπερεκφράζει p19 + Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m, H) Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector. + Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m.

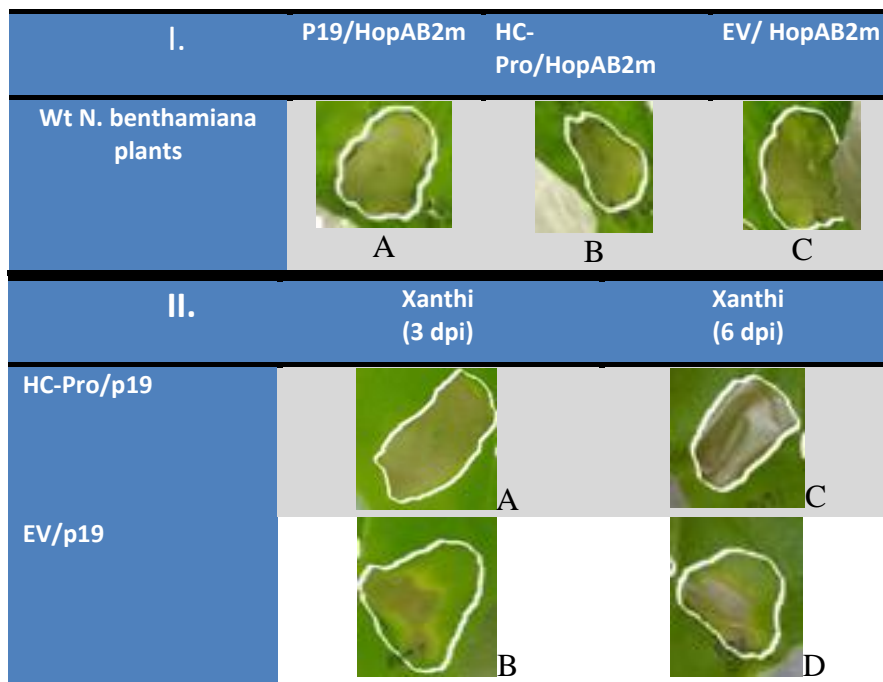
I-J. Αγροεγχύσεις σε φύλλα *N. benthamiana* που υπερεκφράζουν p19 στους (32°C, 6 dpi). I) Κατασκευή που υπερεκφράζει HC-Pro+ Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m, J) Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector. + Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m.

K-M. Αγροεγχύσεις σε φύλλα w.t. *N. benthamiana* στους (32°C, 7 dpi). K) Κατασκευή που υπερεκφράζει HC-Pro+ Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m, L) Κατασκευή που υπερεκφράζει p19 + Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m, M) Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector. + Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m.

N-O. Αγροεγχύσεις σε φύλλα *N. benthamiana* που υπερεκφράζουν p19 στους (32°C, 7 dpi). N) Κατασκευή που υπερεκφράζει HC-Pro+ Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m, O) Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector. + Κατασκευή που υπερεκφράζει HopAB2m.

3.7 Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στον επαγόμενο από p19 κυτταρικό θάνατο.

Σε φυτά *N. tabacum* συνέκφραση ιϊκών αναστολέων της σίγησης και βακτηριακών επαγωγέων κυτταρικού θανάτου έχει σαν αποτέλεσμα α) την επιτάχυνση της εκδήλωσης αντίδρασης υπερευαισθησίας αλλά και β) την εξάπλωση της σε όλη τη ζώνη αγροένχυσης. Η εξάπλωση αυτή συμβαίνει πολύ πιο γρήγορα συγκριτικά με την έκφραση μόνο της πρωτεΐνης-επαγωγέα κυτταρικού θανάτου. Έτσι, στην περίπτωση του NorT αν σημειώσει κάποιος το περίγραμμα της ζώνης αγροέγχυσης θα παρατηρήσει ότι η νεκρωτική αντίδραση αρχικά εκδηλώνεται στο κέντρο της ζώνης και σταδιακά επεκτείνεται προς την περίμετρο. Η επέκταση αυτή συμβαίνει με πολύ ταχύτερους ρυθμούς αν μαζί με την NorT συνεκφραστεί παροδικά ένας βακτηριακός αναστολέας της σίγησης (HopAB2, δεξ και παρακάτω). Κατά αντιστοιχία στην περίπτωση του p19, αυτός δρα σαν αντ παράγοντας στον καπνό (Scholthof et al., 1995) και η αντίδραση υπερευαισθησίας του σταδιακά επεκτείνεται προς την περιφέρεια. Συνέκφραση Hc-Pro και p19 σε *N. tabacum* cv. *Xanthi* έχει σαν αποτέλεσμα την επιτάχυνση της εξάπλωσης της HR προς την περιφέρεια. Αντίθετα, συνέκφραση δυο ιϊκών αναστολέων (p19 και Hc-Pro) της σίγησης με GFP δεν αυξάνει την ένταση φθορισμού GFP σε σχέση με εκείνη που παρατηρείται στις συναγροεγχύσεις καθεμίας από αυτές (p19 ή Hc-Pro) με GFP (data not shown) σε *N. benthamiana* 16C.



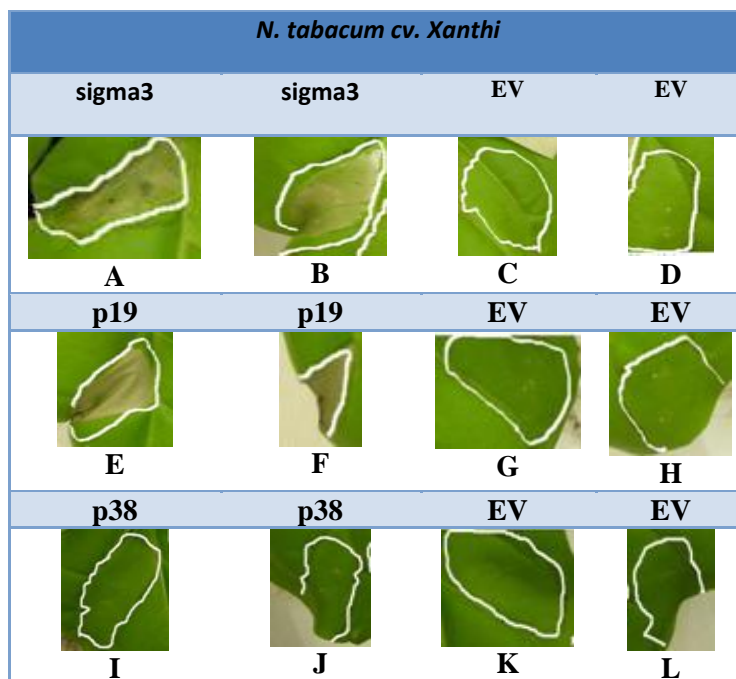
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Εικόνα 75. Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στον επαγόμενο κυτταρικό θάνατο.

- I. Αγροενχύσεις σε φύλλα w.t. *N. benthamiana* (7dri). A) Κατασκευή που υπερεκφράζει p19+ Κατασκευή που υπερεκφράζει HorAB2m, B) Κατασκευή που υπερεκφράζει HC-Pro+ Κατασκευή που υπερεκφράζει HorAB2m. C) Κατασκευή που υπερεκφράζει HorAB2m + Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector.
- II. Αγροενχύσεις σε φύλλα w.t. *N. tabacum cv. Xanthi*. A) Κατασκευή που υπερεκφράζει HC-Pro+ Κατασκευή που υπερεκφράζει p19 (3 dri), B) Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector + Κατασκευή που υπερεκφράζει p19 (3dri), C) Κατασκευή που υπερεκφράζει HC-Pro+ Κατασκευή που υπερεκφράζει p19 (6 dri), D) Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector + Κατασκευή που υπερεκφράζει p19 (6 dri).

3.8 Εύρεση νέων ανγ παραγόντων από ιούς.

Αρχικά πειράματα είχαν δείξει ότι ο p19 από *tombusviruses* δρα σαν ανγ παράγοντας στην ποικιλία καπνού *N. tabacum cv. Xanthi*. Αυτό έρχεται σε πλήρη συμφωνία με δημοσιευμένα αποτελέσματα σε άλλες ποικιλίες καπνού από άλλες ερευνητικές ομάδες (Scholthof et al., 1995). Αντίθετα ο p38 από TCV δεν δίνει αντίδραση υπερευαισθησίας στην ποικιλία αυτή. Σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, την ίδια συμπεριφορά παρουσιάζει και ο HC-Pro (*potyvirus*s). Ο p38 έχει χαρακτηριστεί σαν ανγ παράγοντας στο μοντέλο φυτό *Arabidopsis thaliana*. Οι αλληλεπιδρώσεις πρωτεΐνες με τον p38 και τα ενδιάμεσα στάδια σηματοδότησης της αντίδρασης έχουν χαρακτηριστεί (Ren et al., 2000).



Εικόνα 76. Εύρεση νέων ανγ παραγόντων από ιούς. Αγροενχύσεις σε φύλλα w.t. *N. tabacum cv. Xanthi*.

A, B) Κατασκευή που υπερεκφράζει sigma3 C, D) Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector, E, F) Κατασκευή που υπερεκφράζει p19 G, H) Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector, I, J) Κατασκευή που υπερεκφράζει p38, K, L) Κατασκευή που υπερεκφράζει empty vector.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αυτονόητα, κανένας ιϊκός αναστολέας της σίγησης ο οποίος έχει χαρακτηριστεί με το σύστημα της παροδικής συνέκφρασης σε *N. benthamiana* δεν δρα ως αντ παράγοντας σε αυτό το φυτό. Αντίθετα στα πλαίσια της παρούσας μελέτης αποκαλύφθηκε ότι ο sigma3 [S4 ORF (GenBank: K02739) από *Mammalian orthoreovirus 3* (Human reovirus serotype 3)] μπορεί να επάγει (με παροδική έκφραση σε *N. tabacum* cv. *Xanthi*) νεκρωτικά συμπτώματα παρόμοια με αυτά της τυπικής αντίδρασης υπερευαισθησίας του p19 στη *N. tabacum* cv. *Xanthi*. Ο sigma3 προέρχεται από **ζωικό ιό** και πιο συγκεκριμένα από ρεοϊούς (Lichner et al., 2003). Είχε προηγουμένως χαρακτηριστεί σαν ιϊκός αναστολέας της σίγησης σε φυτά *N. benthamiana* (Lichner et al., 2003).

Το γεγονός αυτό είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον καθώς ο ιός από τον οποίο προέρχεται δεν είναι προσαρμοσμένος εξελικτικά να μολύνει το εν λόγω φυτό. Ούτε θα περίμενε κανείς το φυτό να διαθέτει κάποιο τύπου R γονίδιο λειτουργικά αντίστοιχο με κάποια πρωτεΐνη του ιού αυτού. Τα ίδια αποτελέσματα όμως μπορούν να ειπωθούν μέσα από το πρίσμα των υπόλοιπων αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης. Ο κυτταρικός αυτός θάνατος θα μπορούσε να αποδοθεί στην αναστολή μέσω του sigma3 της ανασταλτικής δράσης της σίγησης στον κυτταρικό θάνατο.

3.9 Αποσαφήνιση σχετικά με τον ρόλο των ιϊκών αναστολέων σίγησης στην επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας.

Τα παραπάνω πειράματα παρέχουν ενδείξεις για αρνητική ρύθμιση του μηχανισμού απόκρισης με HR από τον μηχανισμό της σίγησης. Μια εναλλακτική εκδοχή θα ήταν, η ύπαρξη αναστολέων της σίγησης να προσέφερε μεγαλύτερη έκφραση των πρωτεϊνών αντ. Βέβαια μια τέτοια εκδοχή δεν θα μπορούσε να τεκμηριωθεί στην περίπτωση που παρέχεται ο επαγωγέας αντίδρασης υπερευαισθησίας σε καθαρή μορφή (π.χ. HrpZ). ούτε θα μπορούσε να τεκμηριωθεί στην περίπτωση που εκφράζεται στο εσωτερικό βακτηρίων και στην συνέχεια ενχύεται στο εσωτερικό του φυτού (π.χ. παραγωγή HrpPsyA από *P. fluorescens* 55). Συνέκφραση δυο ιϊκών αναστολέων (p19 και HC-Pro) της σίγησης με GFP δεν αυξάνει τα επίπεδα φθορισμού της GFP σε σχέση με την συνέκφραση καθεμίας από αυτές (p19 ή HC-Pro) με GFP (data not shown) σε *N. benthamiana*. Πάντως πρέπει να πραγματοποιηθούν επιπλέον πειράματα σχετικά με έκφραση μέσω αγροβακτηρίου.

Προηγούμενα πειράματα (Karademiris, unpublished observations) είχαν αποδείξει ότι επίδραση είτε HC-Pro είτε p38 είχαν την ίδια επίδραση στα επίπεδα έκφρασης της GFP παρόλο που οι δυο αναστολείς στοχεύουν διακριτά στάδια του μηχανισμού της σίγησης. Ο

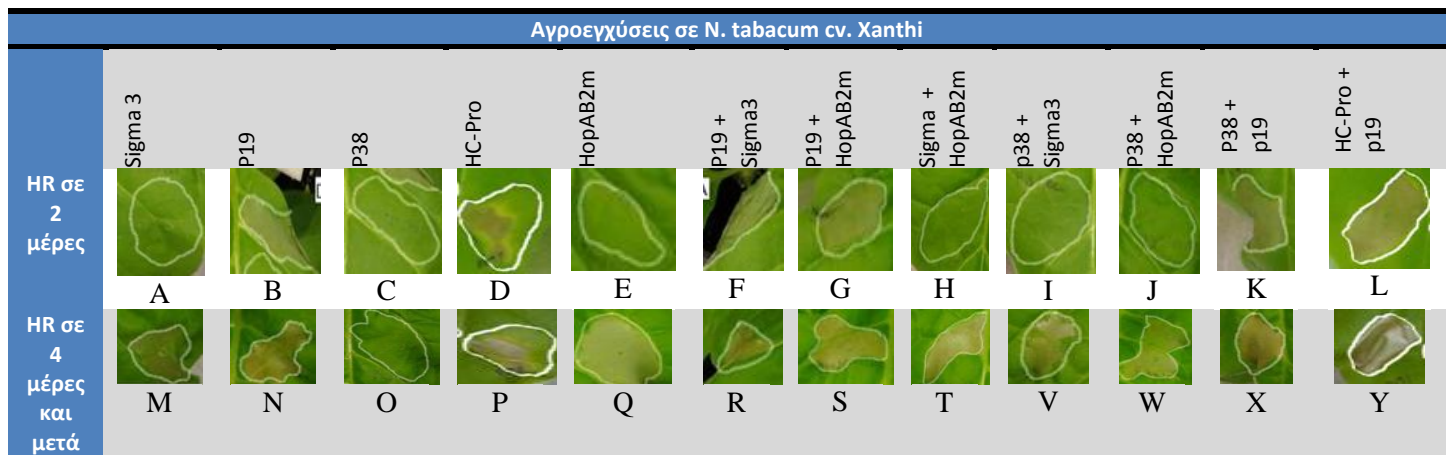
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Hc_Pro ανάμεσα στα άλλα προσδένεται σε siRNAs και αλληλεπιδρά με την λειτουργία του ago1 (Lakatos et al., 2004). Έχει πλειοτροπική δράση στον μηχανισμό σίγησης αλλά δεν προσδένεται σε μεγάλα δίκλινα RNA (Merai et al., 2006). Αντίθετα, ο p38 προσδένεται σε κυρίως σε μεγαλύτερα δίκλινα RNA (Merai et al., 2006) ενώ αλληλεπιδρά με την δράση της DCL4 (Deleris et al., 2006).

Συμπεράσματα από συνεγχύσεις ιικών καταστολέων και HopAB2m στη *N. tabacum cv. Xanthi*:

1) Η νέκρωση που παρατηρείται στις 4 μέρες μετά από συνένχυση p38/HopABm πιθανότατα προκαλείται από τον HopABm, αφού ο p38 μόνος του ΔΕΝ δίνει νέκρωση ούτε στις 2 ούτε στις 4 μέρες, ενώ ο HopABm μόνος του δίνει νέκρωση στις 4, αλλά όχι στις 2 μέρες. Επομένως, ο p38 ΔΕΝ παρεμποδίζει τη νέκρωση που πυροδοτεί ο HopABm στις 4 μέρες μετά από συνένχυση p38/HopABm.

2) Ο sigma3, δεν επιταχύνει τη νέκρωση που επάγει ο HopABm: α) καθένα ξεχωριστά δίνει



Αγροεγχύσεις σε <i>N. tabacum cv. Xanthi</i>												
	Sigma 3	P19	P38	HC-Pro	HopAB2m	P19 + Sigma3	P19 + HopAB2m	Sigma3 + HopAB2m	p38 + Sigma3	p38 + HopAB2m	P38+ p19	HC-Pro + p19
HR σε 2 μέρες	-	-	-	-/+	-	+	+	-	-	-	-	+
HR σε 4 μέρες και μετά	+	+	-	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+

Εικόνα 77. Αποσαφήνιση του ρόλου της σίγησης στην επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας. Αγροεγχύσεις σε φύλλα w.t. *N. tabacum cv. Xanthi* (2 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν: A) sigma3 + Empty vector (EV), B) p19 + EV, C) p38 + EV, D) HC-Pro + EV, E) HopAB2m + EV, F) p19 + sigma3, G) p19 + HopAB2m, H) sigma3 + HopAB2m, I) p38 + sigma3, J) p38 + HopAB2m, K) p38 + p19, L) HC-Pro + p19. Επίσης, αγροεγχύσεις σε φύλλα w.t. *N. tabacum cv. Xanthi* (4 dpi) με κατασκευές που υπερεκφράζουν: M) sigma3 + Empty vector (EV), N) p19 + EV, O) p38 + EV, P) HC-Pro + EV, Q) HopAB2m + EV, R) p19 + sigma3, S) p19 + HopAB2m, T) sigma3 + HopAB2m, V) p38 + sigma3, W) p38 + HopAB2m, X) p38 + p19, Y) HC-Pro + p19.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ορατή νέκρωση στις 4 μέρες αλλά όχι στις 2 μέρες, και β) όταν συνεχύονται, νέκρωση συμβαίνει πάλι στις 4 μέρες και όχι στις 2 μέρες!!!

3) Ο $\sigma 3$ (που κάνει νέκρωση στις 4 αλλά όχι στις 2 μέρες) δεν επηρεάζει θετικά ούτε αρνητικά μετά από συνέγχυση τη νέκρωση που προκαλεί στις 2 μέρες ο p19.

Ο HC-Pro ενισχύει την αντίδραση υπερευαισθησίας μέσω HopAB2m. Σε αντίθεση με την περίπτωση του HC-Pro, ο p38 δεν έχει καμία επίδραση ή έχει μάλλον αρνητική επίδραση. Εντελώς ανάλογα ο p38 δεν έχει επίδραση στην επιτάχυνση της HR από την $\sigma 3$ και από p19 στην περίπτωση που ως επαγωγέας χρησιμοποιηθεί μια από αυτές τις ιικές πρωτεΐνες. Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι το φαινόμενο της ενίσχυσης νεκρώσεων δεν οφείλεται απλά στην αύξηση των επιπέδων έκφρασης.

Εντελώς όμοια, οι ιικοί αναστολείς σίγησης $\sigma 3$ και p19 είναι αμφότεροι επαγωγείς HR στον καπνό (*N. tabacum cv. Xanthi*). Συνένχυση τους όμως δεν οδηγεί σε ενίσχυση της αντίδρασης υπερευαισθησίας.

Ο p19 είναι από τους πιο ισχυρούς αναστολείς σίγησης που έχουν χαρακτηριστεί. Θα αποτελούσε έκπληξη ότι ο ίδιος χρειάζεται έναν δεύτερο αναστολέα για να εκφραστεί σε υψηλά επίπεδα και να δώσει HR.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Αναστολή της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) της *P. syringae* από *P. savastanoi*.

Είναι γενικά γνωστό ότι στις «ασύμβατες» αλληλεπιδράσεις παθογόνων βακτηρίων-φυτών, χαμηλότερες συγκεντρώσεις μολύσματος (<10⁶ cells/mL) δεν οδηγούν σε μακροσκοπικά ορατή HR. Παρά ταύτα, η αντίδραση HR εκδηλώνεται σε μικροσκοπικό επίπεδο και σε αυτές τις περιπτώσεις, με μορφή διάσπαρτων νεκρών κυττάρων (π.χ. στο μεσόφυλλο του φυτού) που έρχονται σε επαφή με βακτηριακά κύτταρα (σχέση 1:1) (Turner & Novacky, 1974). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι υπάρχει ένα σκαλοπάτι συγκέντρωσης αρχικού μολύσματος βακτηρίων κάτω από το οποίο δεν είναι δυνατή εμφανής μακροσκοπικά η επαγωγή HR. Στα δικά μας πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν χαμηλές συγκεντρώσεις βακτηριακού μολύσματος (10⁷ cfu/ml) με τις οποίες η μακροσκοπική νέκρωση είναι στο όριο της ανιχνευσιμότητας. Με βάση δημοσιευμένα αποτελέσματα (Robinette & Matthysse, 1990)³⁶, η *P. syringae* pv. *phaseolicola* δίνει μακροσκοπικά ορατή HR στην ποικιλία καπνού *N. tabacum* cultivar Coker 319, και σε άλλα είδη φυτών σε υψηλές συγκεντρώσεις μολύσματος (10⁹ cfu/ml). Η παρεμπόδιση της HR αποδόθηκε στην παραγωγή IAA και πιθανώς κυτοκίνινης από το *A. tumefaciens* και την *P. savastanoi*. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι αυτή η παρεμπόδιση μπορεί να επιτρέπει την ογκογένεση παρουσία άλλων βακτηρίων τα οποία συνήθως επάγουν HR που νεκρώνει τα φυτικά κύτταρα πριν το σχηματισμό όγκων. Είναι όμως σήμερα γνωστό ότι η πλειονότητα των παθότυπων του είδους *P. syringae*, συμπεριλαμβανομένης και της *P. s. phaseolicola*, παράγουν IAA *in vitro*, αν και στις περισσότερες περιπτώσεις σε χαμηλά επίπεδα ή μόνο παρουσία τρυπτοφάνης (πρόδρομου ουσίας στο βιοσυνθετικό μονοπάτι) (Glickmann *et al.*, 1998).

³⁶ Τα πειράματα των Robinette και Matthysse (1990) είχαν δείξει ότι φυτοπαθογόνα βακτήρια όπως το *A. tumefaciens* και η *P. savastanoi* έχουν την ικανότητα να παρεμποδίζουν την εκδήλωση αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) που επάγει η *P. s. phaseolicola* σε καπνό (*N. tabacum* cv. Coker 319) και άλλα φυτά. Το *A. tumefaciens* και η *P. savastanoi* προκαλούν ογκογένεση και υπερτροφίες, αντίστοιχα, σε φυτά, αν και με εντελώς διαφορετικούς μηχανισμούς. Το πρώτο εισάγει στα φυτικά κύτταρα γονίδια βιοσύνθεσης IAA ενώ η δεύτερη παράγει υψηλές ποσότητες της αυξίνης *in vitro*, ιδιαίτερα παρουσία τρυπτοφάνης στο θρεπτικό υπόστρωμα..

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με βάση τις σημερινές γνώσεις για το ρόλο των βακτηριακών πρωτεϊνών-τελεστών και γενετικών παραγόντων του φυτού η ικανότητα παρεμπόδισης της επαγωγής HR σε διαφορετικά παθοσυστήματα χρήζει επανεξέτασης από διαφορετική σκοπιά.

Για να ελέγξουμε τον ρόλο της RNA σίγησης, έναν από τους παράγοντες από πλευράς φυτού που εικάζαμε ότι μπορεί να έχει ρόλο, χρησιμοποιήσαμε διαγονιδιακά φυτά καπνού (*N. tabacum* cv. *Petit t Havana* U-6B 425) τα οποία υπερεκφράζουν έναν ιϊκό αναστολέα της σίγησης (HC-Pro). Η υπερέκφραση του HC-Pro παρεμποδίζει την εκδήλωση της RNA-διαμεσολαβούμενης σίγησης. Τα φυτά αυτά βρέθηκαν ποιο ευαίσθητα, σε σχέση με τα φυσικού τύπου φυτά, στην επαγωγή HR από ξεχωριστές ενχύσεις *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A και *P. savastanoi* 2480. **Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι η RNA σίγηση δρα σαν αρνητικός ρυθμιστής της HR και η παρεμπόδιση της αυξάνει την ευαισθησία του φυτού στην επαγωγή HR.**

Σε συμφωνία με τα ευρήματα των Robinette & Matthysse (1990), ενώ κάθε ένα από τα χρησιμοποιούμενα στελέχη ψευδομονάδων σε ξεχωριστές ενχύσεις πυροδοτεί την HR, ο συνδυασμός τους αποτρέπει την εμφάνιση HR. Η παρεμπόδιση αυτή πιθανώς να οφείλεται εν μέρει στην παραγωγή αυξίνης από την *P. savastanoi* 2480 όπως πρότειναν οι συγγραφείς. Όμως, σίγουρα εξαρτάται και από άλλους βακτηριακούς παράγοντες, με πιο πιθανούς τις πρωτεΐνες-τελεστές τύπου III (effectors).

Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από επιπλέον παρατηρήσεις. Για παράδειγμα, η *P. savastanoi* 2480 προκαλεί HR στη διαγονιδιακή σειρά U6B της ποικιλίας *N. tabacum* cv. *Petit Havana* 425 η οποία υπερκεράζει την P1/HC-Pro, όπως και η *P. s.phaseolicola* 2448A και η *P. s.phaseolicola* NPS3121 αποτρέπει αυτή την αντίδραση. Πιθανότατα, η *P. s.phaseolicola* NPS3121 παρέχει πρωτεΐνες-τελεστές που ενώ οι ίδιοι δεν πυροδοτούν HR στη σειρά αυτή, καταστέλλουν την HR που τελεστές του συνεγχυόμενου βακτηρίου πυροδοτούν. Είναι επίσης πιθανό ορισμένες πρωτεΐνες-τελεστές (effectors) των δυο στελεχών *Pseudomonas* να δρουν συνεργιστικά στην εκδήλωση της HR σε σύστημα όπως η διαγονιδιακή σειρά UB-6 που είναι «ευαισθητοποιημένη» λόγω της καταστολής της σίγησης από την πρωτεΐνη HC-Pro.

Το γεγονός ότι σε ίδιες συγκεντρώσεις μολύσματος τα φυτά w.t *N. benthamiana* εμφανίζουν αντίδραση υπερευαισθησίας ενώ τα *N. tabacum* cv *Petit Havana* όχι μπορεί να ερμηνευτεί αν λάβουμε υπόψη ότι τα w.t *N. benthamiana* πιθανόν στερούνται ή έχουν ελαττωματική NbDCL4 (μέλος των Dicer-like πρωτεϊνών, Voinnet, personal communication) και RDR1 (Yang et al., 2004). Γενικά, η *N. benthamiana* είναι πιο ευπαθής σε ιϊκές μολύνσεις καθότι ο μηχανισμός της σίγησης εμφανίζεται λιγότερο αποτελεσματικός. Μειωμένη

αποτελεσματικότητα στην σίγηση συνεπάγεται αυξημένη ικανότητα εμφάνισης HR από βακτήρια. .

Σε κάθε περίπτωση, ο μηχανισμός της σίγησης φαίνεται να αλληλεπιδρά με βακτηριακούς παράγοντες πέραν των ορμονών για την παρεμπόδιση της HR. Έτσι, στα φυτά *N. benthamiana* *sde1IR* φυτά, ενώ μονή έγχυση *P. s.phaseolicola* ή *P. savastanoi* 2480 οδηγεί σε τυπική HR, η συνέγχυση τους οδηγεί σε παρεμπόδιση της . Σε αγρίου τύπου φυτά, η συνέγχυση *P. s. phaseolicola* και *P. savastanoi* 2480 πυροδοτεί τυπική HR. Με βάση τα προηγούμενα, στην περίπτωση των συνενχύσεων θα περιμέναμε ενίσχυση, αντί παρεμπόδιση, της HR στα *sde1IR* φυτά σε σχέση με τα αγρίου τύπου φυτά. Το παράδοξο αυτό μπορεί να ερμηνευτεί με την παραδοχή ότι οι πρωτεΐνες-τελεστές χρησιμοποιούν τα ίδια τα όπλα του ξενιστή εναντίον του. Με άλλα λόγια έχουν εξελιχτεί ώστε να χρησιμοποιούν την RNA σίγηση προς όφελος του παθογόνου και όχι προς όφελος του ξενιστή. Ο ξενιστής χρησιμοποιεί την RNA σίγηση για να περιορίσει το παθογόνο. Κάποιες πρωτεΐνες-τελεστές έχουν προσαρμοστεί να δρουν σε ένα τέτοιο περιβάλλον στο εσωτερικό του φυτού και να το χρησιμοποιούν και οι ίδιες αλλά με αντίστροφο τρόπο από ότι ωφελεί τον ξενιστή τους.

Σύμφωνα με τρέχουσες αντιλήψεις, το γεγονός ότι διάφοροι παθότυποι ψευδομονάδων έχουν τόσο δραματικές διαφορές ως προς την πρόκληση HR μπορεί να αποδοθεί σε διαφορές στο ρεπερτόριο πρωτεϊνών-τελεστών που διαθέτουν αλλά και σε λειτουργική διαφοροποίηση τελεστών-μελών της ίδιας οικογένειας από στενά συγγενικά στελέχη(Chang et al., 2005). Αυτό μας επιβάλλει να επικεντρωθούμε σε πρωτεΐνες-τελεστές, των οποίων η λειτουργικότητα ενδεχομένως διαφέρει από στέλεχος σε στέλεχος, για την συνέχεια της ανάλυσης.

Το γεγονός ότι σε διαφορετικά διαγονιδιακά φυτά (φυτά που καταστέλλουν την έκφραση RDR6 και φυτά που υπερεκφράζουν HC-Pro) που μπλοκάρουν διαφορετικά στάδια του μηχανισμού σίγησης, ίδιοι συνδυασμοί στελεχών *Pseudomonas* οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα είναι επίσης ενδεικτικό της συντήρησης του μηχανισμού αλληλεπίδρασης και ενισχύει το γεγονός ότι το φαινόμενο έχει πραγματική υπόσταση και δεν πρόκειται για πειραματικό artifact.

4.2 Ρόλος της σίγησης σε HR επαγομένη από την πρωτεΐνη HrpZ.

Το σύστημα των συνεγχύσεων έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί κάποιος να εξάγει ποικιλία υποθέσεων. Είναι όμως αρκετά πολυπαραγοντικό και πάσχει για να σχεδιαστούν επιπλέον πειράματα βασισμένα στα συμπεράσματα των προηγούμενων. Έτσι υπάρχει η

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ανάγκη χρήσης απλούστερων συστημάτων επαγωγής της HR ώστε να μελετηθεί η αλληλεπίδραση HR και σίγησης σε ένα σύστημα όπου δεν θα παρεμβάλλονται ταυτόχρονα παράγοντες που την επάγουν και παράγοντες που την καταστέλλουν. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε η επαγωγή της HR από μια χρωματογραφικά καθαρισμένη πρωτεΐνη-επαγωγέα, την HrpZ_{Psp3121} (Tamparakaki & Panopoulos, 2000) και με αυτή να μελετηθεί η επίδραση της RNA σίγησης αλλά και άλλων παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τη σίγηση (π.χ. αυξίνη) ώστε να αποσαφηνισθεί ο ρόλος τους.

Στα πειράματα συνέγχυσης στελεχών *Pseudomonas* πιθανότατα υπάρχει εκκίνηση σηματοδότησης για εκδήλωση HR αλλά η αντίδραση δεν γίνεται μακροσκοπικά ορατή λόγω αρνητικής ρύθμισης, όπως π.χ. από το μηχανισμό της σίγησης. Έτσι φαίνεται να συμβαίνει και στην περίπτωση της HrpZ. Στην περίπτωση αυτή τα οι ποικιλίες *N. tabacum* cv. *Basma* ή *N. tabacum* cv. *Xanthi* είναι πιο ευαίσθητες στην εκδήλωση HR. Αντίθετα σε φυτά *N. benthamiana*, που είναι λιγότερο ευαίσθητα στη HrpZ, μπορούμε να αποκαλύψουμε συγκαλυμμένους HR φαινοτύπους χρησιμοποιώντας διαγονιδιακές σειρές που απαλείφουν την επίδραση της σίγησης ως αρνητικού ρυθμιστή της HR (*N. benthamiana sde1IR* και *N. benthamiana p19*). Με άλλα λόγια, και εδώ υπάρχει σηματοδότηση για HR αλλά η φαινοτυπική της εκδήλωση παρεμποδίζεται μέσω αρνητικής ρύθμισης από RNA σίγηση).

Άλλες εργασίες έχουν περιγράψει την άμεση και έμμεση εμπλοκή αυξινών στη ρύθμιση της απόκρισης ανθεκτικότητας φυτών σε παθογόνα (Kazan & John, 2009). Έχει καταδειχθεί ότι οι αυξίνες επηρεάζουν αρνητικά την ανθεκτικότητα μέσω παρεμβολής τους σε μονοπάτια ορμονικής σηματοδότησης ή σε μονοπάτια σηματοδότησης της «εγγενούς ανθεκτικότητας» (Pathogen-triggered Immunity, PTI). Η τελευταία επάγεται όταν τα φυτά αντιλαμβάνονται την παρουσία παθογόνων (Robert-Seilaniantz et al., 2011a) μέσω προτύπων μοριακής αναγνώρισης βακτηρίων από φυτά (Pathogen-Associated Molecular Pattern, PAMP) (Boller & Felix, 2009) (Pel & Pieterse, 2013). Για παράδειγμα, το ολιγοπεπτίδιο flg22 (συντηρημένο πεπτίδιο της βακτηριακής φλαγγελίνης που λειτουργεί ως PAMP) επάγει την παραγωγή του miR393. Το miR393 είναι αρνητικός ρυθμιστής των επιπέδων mRNA των μεταφορέων αυξίνης TIR1 (transport inhibitor response1), AFB2 (auxin signaling F-box2), και AFB3 στην *Arabidopsis*. Άρα, η κατασταλτική δράση του πεπτιδίου flg22 στη σηματοδότηση μέσω αυξίνης οδηγεί σε αύξηση της αντοχής σε μόλυνση από βιότροφα παθογόνα όπως το *P.s. tomato* DC3000 (*PstDC3000*) και ο ωμούκυτας *Hyaloperonospora* στην *Arabidopsis* (Navarro et al., 2006; Robert-Seilaniantz et al., 2011b). Η ανθεκτικότητα που επάγει το flg22 αποδόθηκε στην επαγωγή του μονοπατιού σηματοδότησης του σαλικυλικού οξέως. Μέσω της σηματοδότησης αυτής καταστέλλεται η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την σηματοδότηση μέσω της αυξίνης. Η

αλληλεπίδραση αυξίνης και σαλικυλικού στην ορμονική σηματοδότηση και την εκδήλωση (αυξημένης) ανθεκτικότητας στο παθογόνο *P. s. tomato* DC3000 είναι γνωστή από άλλες εργασίες (π.χ. (Park et al., 2007)).

Επίδραση αυξίνης αντιστρέφει τη νέκρωση που προκαλείται από HrpZ σε συγκεκριμένα διαγονιδιακά φυτά με προβληματικό μηχανισμό RNA σίγησης. Αυτό δεν υποδεικνύει ότι η αυξίνη είναι ο καταλυτικός παράγοντας στην ανάστροφη του φαινομένου. Απλά μπορεί να δημιουργεί βέλτιστες συνθήκες για την δράση των πρωτεϊνών-τελεστών του βακτηρίου που τροποποιούν ενδογενείς παράγοντες απόκρισης. Η συνέργεια της αυξίνης μπορεί να διαδραματίσει καταλυτικό ρόλο μόνο σε περιπτώσεις όπου έχει ήδη αναπτυχθεί συστηματική απόκριση του φυτού. Αυτό υποδεικνύει ότι η όλη διαδικασία στηρίζεται στην τροποποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών και η παρουσία αυξίνης απλά δημιουργεί βέλτιστες ενδοκυτταρικές συνθήκες. Η απόκριση του φυτού σε επαγωγείς HR υποβοηθείται από παρουσία αυξίνης και εκδηλώνεται σε υψηλότερα επίπεδα ενδογενούς αυξίνης. Αλλά και φυτοπαθογόνα βακτήρια έχουν τροποποιήσει τους μολυσματικούς τους μηχανισμούς κατά τέτοιο τρόπο ώστε να λειτουργούν σε συνθήκες αντίστοιχες με τις ενδοκυτταρικές που θα συναντήσουν.

4.3 Ρόλος της RNA σίγησης σε HR επαγόμενη από τον τελεστή HopA1 (HopPsyA).

Χρησιμοποιώντας το πειραματικό σύστημα *P. fluorescens* (pHIR11)/(pLN18) αποδεικνύεται η δυναμική του μηχανισμού της σίγησης σαν αρνητικού ρυθμιστή κυτταρικού θανάτου. Επιπλέον, αποκαλύπτεται το φάσμα δράσης του που κυμαίνεται από μερική παρεμπόδιση της εκδήλωσης HR, χρονική καθυστέρηση ή/και εμφάνιση πιο ήπιας μορφής HR μέχρι την συγκάλυψη της σηματοδότησης της σε κάποιες περιπτώσεις.

Με το σύστημα αυτό, η ένχυση πρωτεΐνης-επαγωγέα κυτταρικού θανάτου γίνεται από βακτήρια μέσω του T3SS. Αντίθετα σε περιπτώσεις αγροένχυσης η πρωτεΐνη-επαγωγέας παράγεται ενδογενώς στα φυτικά κύτταρα. Στην τελευταία περίπτωση, η πιθανή παρουσία ή απουσία ενός διαγονιδιακά κωδικοποιούμενου παράγοντα θα μπορούσε να επηρεάσει τα επίπεδα έκφρασης του επαγωγέα κυτταρικού θανάτου. Αντίθετα, στην περίπτωση της HrpZ έχουμε προκαθορισμένη δόση εξωγενώς παρεχόμενης πρωτεΐνης-επαγωγέα κυτταρικού θανάτου. Συνολικά, τα αποτελέσματα μας συγκλίνουν στο ότι, πίσω από τα επιμέρους πειραματικά συστήματα πρόκλησης νεκρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν κρύβεται είτε ο ίδιος μηχανισμός ή διαφορετικοί μηχανισμοί σηματοδότησης κυτταρικού

θανάτου με ένα ή περισσότερα κοινά στάδια τα οποία υπόκεινται σε αρνητική ρύθμιση μέσω του μηχανισμού της σίγησης.

Πειραματικά δεδομένα από άλλους ερευνητές (Navarro et al., 2008) εγείρουν ερωτηματικά σχετικά με το ενδεχόμενο μείωσης πληθυσμών *P. syringae* σε αντίστοιχα διαγονιδιακά φυτά *A. thaliana* με κατεσταλμένο το μηχανισμό σίγησης, σε σύγκριση με τα αγρίου τύπου φυτά. Προκαλεί ερωτηματικά η μη συμμετοχή της RDR6 (*SDE1*) σε αυτήν την διαδικασία. Σε άλλο σημείο της διατριβής επισημάνθηκε η αυξημένη ευαισθησία της διαγονιδιακής σειράς *N. benthamiana sde1IR* στην εκδήλωση HR θανάτου. Δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η RDR6 να έχει κάποια επίδραση και στο σύστημα *P. fluorescens* (pHIR11)/(pLN18) αλλά σε διαφορετικής (ίσως μεγαλύτερης) αναπτυξιακής ηλικίας φυτά. Η RDR6 (*SDE1*) συμμετέχει σε αρχικό στάδιο του μηχανισμού (παραγωγή δίκλωνου RNA). Στο σύστημα *P. fluorescens* (pHIR11)/(pLN18) μπορεί να εμπλέκεται πρόδρομο miRNA ή γενικά παρακλάδι του μηχανισμού που δεν απαιτεί RDR6 και όχι κάποια κατηγορία μικρών RNAs που απαιτούν RDR6. Η υπόθεση αυτή αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον αν αναλογιστούμε ότι και άλλοι παράγοντες που στοχεύουν στην πρόσδεση στο δίκλωνο RNA έχουν την ίδια επίδραση με την RDR6 [για παράδειγμα οι ιικοί καταστολείς σίγησης p38 και sigma3 όπως δείξαμε με άλλο πειραματικό σύστημα (αγροεγχύσεις)].

Συμπερασματικά, στα πειραματικά συστήματα που χρησιμοποιήσαμε μέχρι αυτό το σημείο, η εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας συγκαλύπτεται από την δράση του μηχανισμού της σίγησης. Η διαφορετική αντίδραση των *sde1IR* φυτών σε χαρπίνη και HopA1 (HopPsyA) αποκάλυψε τις διαφορετικές απαιτήσεις του μονοπατιού κυτταρικού θανάτου (σε σχέση με τον μηχανισμό της σίγησης) στις δυο περιπτώσεις. Μια πλειάδα πρωτεϊνών-τελεστών έχουν ήδη ενοχοποιηθεί σαν αναστολείς HR που πυροδοτούν άλλοι τελεστές στο σύστημα αυτό (Jamir et al., 2004). Κάποιοι από αυτούς ταυτόχρονα ενισχύουν την RNA σίγηση (sense-post transcriptional gene silencing, s-PGTS; (Sarris et al., 2011). Το πειραματικό σύστημα *P. fluorescens* 55 (pHIR11) παρέχει τη δυνατότητα να αποσαφηνιστεί ο ρόλος διαφορετικών πρωτεϊνών-τελεστών στην αναστολή κυτταρικού θανάτου σε σχέση με τον μηχανισμό της σίγησης.

4.4 Επίδραση πρωτεϊνών-τελεστών από *Pseudomonas* στην RNA σίγηση.

Είχε γίνει αντιληπτό από τα προηγούμενα εδάφια ότι πλειάδα βακτηριακών παραγόντων αλληλεπιδρούν με τον μηχανισμό της σίγησης. Η φύση των αλληλεπιδράσεων αυτών παρέμενε αδιευκρίνιστη. Με στόχο την περεταίρω διερεύνηση αυτών των

αλληλεπιδράσεων εξετάστηκαν αρχικά διάφορες υποψήφιες πρωτεΐνες-τελεστές. Για να αποφευχθούν προβλήματα συνεργισμού ή ανταγωνισμού μεταξύ τους επιλέχθηκε η έκφραση τους σε ένα ετερόλογο σύστημα μέσω αγροέγχυσης). Από τις πρωτεΐνες που ελέγξαμε μάλλον η μειοψηφία δεν εμφανίζει κάποιου είδους αλληλεπίδραση με τον μηχανισμό σίγησης. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η σίγηση είναι κεντρικός διακόπτης στον μηχανισμό απόκρισης HR.

4.4.1 Καταστολή RNA σίγησης από πρωτεΐνες-τελεστές Ψευδομονάδων.

4.4.1.1 Επίδραση πρωτεϊνών-τελεστών υπεροικογένειας HopF1/HopF2/HopF3 στην RNA σίγηση.

4.4.1.1.1 Κλωνοποίηση ομολόγων HopF1/HopF2/HopF3 σε δυαδικό φορέα έκφρασης και σε φορείς για υπερέκφραση σε βακτήρια. In silico ανάλυση της υπεροικογένειας των HopF πρωτεϊνών αποκαλύπτει ότι έχουν σχετικά συντηρημένη προβλεπόμενη τεταρτοταγή δομή. Αυτό παρατηρείται ακόμα και στα πιο φυλογενετικά απομακρυσμένα μέλη παρά την όχι και τόσο εκτεταμένη πρωτοταγή ομολογία μεταξύ τους. Όμως, έχουν δραματικές διαφορές αναφορικά με τους φαινοτύπους σίγησης.

Η πρωτεΐνη HopF1_{1449B} στερείται πιστοποιημένης ενζυμικής ή άλλης ενεργότητας (Singer et al., 2004) που να μπορεί να συσχετιστεί με τους φαινοτύπους μας στην σίγηση. Επιπλέον, η HopF2_{DC3000} δεν έχει την ικανότητα να δράσει σαν ADP-ριβοζυλτρανσφεράση με υπόστρωμα την πρωτεΐνη RIN4 σε in vitro βιοδοκιμές (Wilton et al., 2010). Παρόλα αυτά, αλληλεπιδρά με τη RIN4 in vitro και in vivo και παρεμποδίζει την αποικοδόμησή της τελευταίας (Wilton et al., 2010). Αντίθετα, άλλες ερευνητικές ομάδες (Wang et al., 2010) έχουν καταδείξει πειραματικά την ενεργότητα ADP-ριβοζυλοτρανσφεράσης του HopF2_{DC3000} με υπόστρωμα τη RIN4 αλλά και με κάποιες MAP κινάσες. Τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και κρίνεται απαραίτητη η επιβεβαίωση της ενζυμικής ενεργότητας και των υπολοίπων ομολόγων με in vitro βιοδοκιμές. Τέτοιες μελέτες θα επιτρέψουν την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων σχετικά με τις αποκλίσεις μεταξύ των αλληλουχιών των ομολόγων και ειδικά για τα μοτίβα III και IV (περιοχή που σχετίζεται με τους φαινοτύπους που παρατηρήθηκαν στα πειράματά μας) και να παρέχουν ενδείξεις για τον μηχανισμό λειτουργίας της πρωτεΐνης. Για τον σκοπό αυτό επιχειρήθηκε σε πρώτη φάση η κλωνοποίηση διαφόρων ομολόγων σε φορέα για υπερέκφραση σε *E. coli*.

Η υποθετική ενεργότητα tRNA φωσφοτρανσφεράσης των HopF που αναλύεται στην αντίστοιχη ενότητα της εισαγωγής μπορεί να σχετίζεται με τον μεταβολισμό/τροποποίηση μορίων RNA, παρά το ότι δεν είναι εύκολο να εντοπιστεί στη δομή του HopF1 κάποιο

μοτίβο πρόσδεσης σε RNA. Δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα τα επίπεδα κάποιων ενδογενών μικρών RNA να μεταβάλλονται παρουσία των HopF μέσω άμεσης ή έμμεσης πρόσδεσης σε μια ενδογενή πρωτεΐνη ή μέσω καταλυτικής τροποποίησης μιας ενδογενούς πρωτεΐνης. Σε αυτό το μοντέλο, η παρουσία HopF μπορεί να επηρεάζει τη σταθερότητα ή τα επίπεδα μικρών RNA στα φυτικά κύτταρα. Τα HopF φαίνεται να έχουν μια διαφορά σε σχέση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που αναλύσαμε στο πρόσφατο παρελθόν (Sarris et al., 2011) ή στην παρούσα διατριβή ως αναστολείς της σίγησης (sPGTS). Συγκεκριμένα, όλες οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που εξετάστηκαν φαίνεται να επηρεάζουν τον μηχανισμό της σίγησης έμμεσα μέσω τροποποίησης ρυθμιστικών μηχανισμών της σίγησης. Καμιά δεν δρα στην καρδιά του ίδιου του μηχανισμού. Η μόνη πρωτεΐνη-τελεστής που έχει βιβλιογραφική τεκμηρίωση ότι εμπλέκεται άμεσα στον μηχανισμό της σίγησης είναι η HopT1-1. Η HopT1-1 έχει αποδειχθεί ότι παρεμποδίζει τη σίγηση στο στάδιο της Slicer (Navarro et al., 2008). Για τη διερεύνηση των παραπάνω υποθέσεων απαιτούνται *in planta* πειράματα για να καλυφθούν προηγούμενα κενά της ανάλυσης μας. Για τον σκοπό αυτό τα τρία ομόλογα HopF υποκλωνοποιήθηκαν σε δυαδικό φορέα.

4.4.1.1.2 Καταστολή της RNA σίγησης από την πρωτεΐνη HopF2_{DC3000}

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες HopF2_{DC3000} και HopF2_{DC3001}, μολονότι προέρχονται από πολύ συγγενικά στελέχη εμφανίζουν εκ διαμέτρου διαφορετικές ιδιότητες. Είχε επισημανθεί (Landgraf et al., 2006) ότι στελέχη *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 από διαφορετικά εργαστήρια διέφεραν σε έναν τουλάχιστον γενετικό τόπο. Θα περίμενε κάποιος ότι τα στελέχη αυτά θα ήταν ταυτόσημα καθώς προέρχονταν από το ίδιο στέλεχος που απομονώθηκε από την φύση (Cuppels, 1986). Αντίθετα, χαρακτηρίστηκαν τέσσερις τουλάχιστον διακριτές ομάδες DC300x στις οποίες και αποδόθηκαν διαφορετικά ονόματα στελέχους. Δεν προκαλεί λοιπόν έκπληξη ότι παρατηρήσαμε ιδιαιτερότητες και σε άλλους γενετικούς τόπους των δυο στελεχών. Είναι αποδεδειγμένη άλλωστε η ευπλαστότητα του γονιδιώματος της *P. syringae* pv. *tomato* [όπως π.χ. προκύπτει από την σύγκριση αλληλουχημένων γονιδιωμάτων T1 και DC3000, (Almeida et al., 2009)] που προσβάλλουν τον ίδιο ξενιστή. Άλλοι γενετικοί τόποι στελεχών του *P. syringae* επίσης εμφανίζουν γοργή εξέλιξη στην φύση (Rivas et al., 2005)³⁷ αλλά και στο εργαστήριο (Pitman

³⁷ Απαλοιφή του HopF1 από διάφορα στελέχη *P. s. phaseolicola* έχει συμβεί πολλαπλές φορές στην φύση όπως αποδεικνύεται από τις διαφορές μεγέθους των ελλείψεων, ως απόκριση στην εξελικτική πίεση για αποφυγή πρόκλησης κυτταρικού θανάτου σε διαφορετικές ποικιλίες φασολιάς (Rivas et al., 2005).

et al., 2005)³⁸. Με βάση τις ενδείξεις για διαφοροποίηση του HopF2 μεταξύ του DC3000 και DC3001, επιχειρήθηκε η κλωνοποίηση ομόλογων του HopF2 από όσο γίνεται περισσότερα διαθέσιμα στελέχη του εργαστηρίου για να εντοπιστούν και να αξιολογηθούν διαφορές και ομοιότητες αλληλουχιών που πιθανόν σχετίζονται με τους σιγητικούς φαινοτύπους.

Αν και η πειραματική μας προσέγγιση δεν αποκλείει εναλλακτικές ερμηνείες για την εξήγηση των φαινοτύπων ενίσχυσης σίγησης με την χρήση των ιικών αναστολέων σε πειράματα συν-αγροένχυσης που περιγράφηκαν παραπάνω προέκυψαν ισχυρές ενδείξεις ότι πράγματι οι φαινότυποι που καταγράφηκαν σχετίζονται με τον μηχανισμό της σίγησης. Από την πλευρά τους, τα πειράματα παρεμπόδισης της καλλογένεσης παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον από βιοτεχνολογική σκοπιά. Οι μηχανισμοί άμυνας στο αγροβακτήριο εμπλέκουν μοριακά σινιάλα, που είναι εν πολλοίς άγνωστα. Ίσως η νέκρωση που συχνά παρατηρείται σε προσπάθειες γενετικής τροποποίησης φυτών έχει κοινά χαρακτηριστικά με την τυπική HR που πυροδοτούν άλλα βακτήρια, και μεταξύ αυτών και προϊόντα της οξειδωτικής έκρηξης (Kuta & Tripathi, 2005). Επίσης, η επαγωγή κάλλου από αγροβακτήριο προϋποθέτει την εγκατάσταση μιας ισχυρά κατεσταλμένης σίγησης στην οποία παρεμποδίζεται η σύνθεση ορισμένων siRNAs (Donoyer et al 2006). Εάν η καταστολή των μηχανισμών απόκρισης του φυτού στην ογκογένεση – όντως έχουν κοινά σημεία με αυτούς που σχετίζονται με την απόκριση σε άλλα φυτοπαθογόνα βακτήρια, η αποσαφήνιση των μηχανισμών δράσης των φυτοπαθογόνων *P. syringae* στην πυροδότηση της HR αποκτά και βιοτεχνολογική σημασία, όπως στην αξιοποίηση του φαινομένου στην γενετική τροποποίηση φυτών.

4.4.1.1.3 Ρόλος μελών οικογένειας HopF1/ HopF2/ HopF3 στην αναστολή νέκρωσης.

Οι πρωτεΐνες HopF1/HopF2/HopF3 δεν πυροδοτούν αντίδραση υπεραισθησίας σε αγρίου τύπου *N. benthamiana* στο πειραματικό μας σύστημα. Το HopF2 δεν πυροδοτεί αντίδραση υπερευαισθησίας σε w.t. *N. benthamiana* ούτε μετά από ένχυση μέσω *P. fluorescens* (pLN1965)³⁹ που εκφράζει και το HopF2 (Wei et al., 2007). Σε αντίθεση με την

³⁸ Έκθεση στο εργαστήριο σε εξελικτική πίεση για αποφυγή κυτταρικού θανάτου από HopAR1 με διαδοχικές επαναμολύνσεις με στέλεχος που το περιέχει είναι ικανή να οδηγήσει σε απαλειφή του σε έξι μόνο κύκλους επαναμόλυνσης (Pitman et al., 2005).

³⁹ Το pLN1965 είναι ένα παράγωγο του pLN18 (Jamir et al., 2004) στο οποίο το οπερόνιο schA-HopA1 έχει απαλειφθεί (ΔhopA1/shcA) και έχει αντικατασταθεί με κασσέτα ανθεκτικότητας σε σπεκτινομυκίνη αντί για καναμυκίνη, όπως συμβαίνει στο pLN18 (Wei et al., 2007, Guo et al., 2009).

κατάσταση σε ποικιλίες *N. tabacum* που εξετάσαμε (*N. tabacum* cv. *Xanthi* και *N. tabacum* cv. *Basma*), το HopF2 πυροδοτεί αντίδραση υπερευαισθησίας σε *N. tabacum* W38 (Robert-Seilaniantz et al., 2006). Σε *P. vulgaris* cv. *Canadian Wonder* πυροδοτεί αντίδραση υπερευαισθησίας η οποία δεν γίνεται μακροσκοπικά ορατή διότι μπλοκάρεται από την πρωτεΐνη-τελεστή AvrPphC (Tsiamis et al., 2000).

Το HopF2 έχει την δυνατότητα να αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο που πυροδοτείται από τον τελεστή HopA1 (Jamir et al., 2004). Μάλιστα, το HopF2 χαρακτηρίζεται ως καταστολέας κατηγορίας I (Guo et al., 2009) δηλαδή τελεστής τύπου III που κατέστειλε την εξαρτώμενη από HopA1 HR στην υψηλότερη συγκέντρωση κυττάρων *P. fluorescens* (ρLN1965) που εκφράζουν και το HopA1 που εξετάστηκε (1×10^8 κύτταρα / ml). Το HopF2 μπλοκάρει τον κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από MKK5^{DD} (Wang et al., 2010), από AvrRpm1 (Guo et al., 2009) καθώς και από AvrRpt2 στην *Arabidopsis* (Wilton et al., 2010). Απαλοιφή του HopF1 από *P. syringae* pv. *phaseolicola* Race 7 μετατρέπει την συμβατή αλληλεπίδραση με *P. vulgaris* cv. *Tendergreen* σε ασύμβατη που συνοδεύεται από πυροδότηση αντίδρασης υπερευαισθησίας (Tsiamis et al., 2000).

Δεν προκαλεί έκπληξη ότι τα HopF1/ HopF2/ HopF3 συμπεριφέρονται ως καταστολείς νεκρώσεων και στο δικό μας πειραματικό σύστημα. Ίσως προξενεί εντύπωση η ικανότητα τους να καταστέλλουν βραδείες νεκρώσεις από πρωτεΐνες τελεστές ριζοβίων ή και ιών, αλλά και από αγροβακτήριο («αγρονέκρωση»). Αυτό ίσως υποδεικνύει την συντήρηση των μηχανισμών απόκρισης σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητα από την φύση του επαγωγέα νέκρωσης. Στα χρονικά πλαίσια που εξελίσσονται αυτά τα φαινόμενα η παροδική έκφραση των πρωτεϊνών HopF1/ HopF2/ HopF3 έχει πιθανότατα προ πολλού αποσβηστεί. Πιθανόν οι τελεστές αυτοί να δρουν σε κάποιον κεντρικό διακόπτη του μηχανισμού σε αρχικά στάδια απόκρισης του ξενιστή και η παρεμπόδιση του δεν είναι αντιστρέψιμη σε προχωρημένα στάδια της αγρονέκρωσης.

4.4.1.1.4 Συναρμολόγηση ακρωτηριασμένων (truncated) κατασκευών και ανταλλαγή δομικών μοτίβων των HopF1 και HopF2. Τα μονοπάτια του ματίσματος του tRNA (tRNA splicing) και της RNA σίγησης (RNA silencing) συχνά μοιράζονται πρωτεΐνες-κλειδιά. Ως αποτέλεσμα πρωτεΐνες που σχετίζονται με μάτισμα του tRNA ή έχουν κοινή ενζυμική ενεργότητα με αυτές θεωρούνται πιθανές υποψήφιας για συμμετοχή στην σίγηση. Έτσι, π.χ. η πρωτεΐνη Clp1 είναι μια RNA κινάση και φυσιολογικά είναι υπεύθυνη για την φωσφοριλίωση του 5' άκρου του εξονίου 3 κατά την διάρκεια του ματίσματος του tRNA⁴⁰.

⁴⁰ Αντίδραση απαραίτητη για την επακόλουθη συναρμολόγηση των εξονίων με την βοήθεια μιας RNA λιγάσης (Weitzer S and Martinez J, 2007).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αποκαλύφθηκε ότι συμμετέχει στην φωσφοριλίωση του 5' άκρου των siRNA (Weitzer & Martinez, 2007). Η φωσφοριλίωση είναι απαραίτητη για την ενσωμάτωση των siRNA στο RISC. Άλλωστε και ο ρόλος των ίδιων των Dicers στην RNA σίγηση άρχισε να γίνεται αντιληπτός όταν αποκαλύφθηκαν οι δομικές και λειτουργικές ομοιότητες με ένζυμο RNase III (Olmedo & Plinio, 2008) που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των rRNA-tRNA. Στην επεξεργασία των psiRNA συμμετέχει ένα ένζυμο με ενεργότητα tRNA splicing ενδονουκλεάσης (Carte et al., 2008). Τα psiRNA είναι προκαρυωτικής προέλευσης μικρά RNA μόρια που παράγονται από μικρές παλινδρομικές επαναλήψεις που ονομάζονται CRISPR (Hale et al., 2008). Η υποθετική ενεργότητα tRNA φωσφοτρανσφεράσης των HorF θα μπορούσε να εξηγήσει τον τρόπο εμπλοκής τους στο μηχανισμό της σίγησης.

In silico ανάλυση αποκάλυψε την δομική ομοιότητα επικρατειών των HorF και με επικράτειες εξωνουκλεάσης III. Η ενεργότητα εξωνουκλεάσης φαίνεται να συνυπάρχει σε ένζυμο που σχετίζονται τόσο με τον μεταβολισμό του RNA (rRNA) όσο και με την σίγηση. Π.χ. η ευκαρυωτική πρωτεΐνη Eri1 έχει μοτίβα εξωνουκλεάσης και δυνατότητες ενίσχυσης της σίγησης (Kennedy et al., 2004) όπως η HorF2. Η Eri1 συμμετέχει επίσης στο τελικό στάδιο της ωρίμανσης ενός rRNA (Ansel et al., 2008; Gabel & Runkun, 2008) αφαιρώντας 2 nt από το άκρο του. Οικογένειες εξωριβονουκλεασών έχουν ενοχοποιηθεί για αρνητική ρύθμιση των επιπέδων miRNAs και στην *Arabidopsis* (Ramachandran & Chen, 2008).

Η συνύπαρξη δυο υποθετικών δομικών περιοχών (εξωνουκλεάσης III και ADP-ribosyltransferase ή 2'-tRNA φωσφοτρανσφεράσης) που ενδεχομένως συμμετέχουν με διαφορετικό τρόπο στον μηχανισμό της σίγησης εγείρει ενδιαφέροντα ερωτήματα για τον επιμέρους ρόλο της κάθε μιας και την πιθανή αλληλεπίδραση τους (συνεργιστική ή/και ανταγωνιστική). Για τον λόγο αυτό επιβάλλεται η κατασκευή ελλείψεων στα ομόλογα που αποκλείουν μέρος ή ολόκληρη την κάθε λειτουργική περιοχή ή συντήξεις δομικών περιοχών από διαφορετικά ομόλογα. Με αυτά τα κριτήρια συναρμολογήθηκαν διάφορες κατασκευές απαλοιφής και σύντηξης επιλεγμένων επικρατειών/δομικών στοιχείων των HorF1/HorF2 που περιγράφονται στα αποτελέσματα. Οι κατασκευές αυτές μπορούν να αξιοποιηθούν για εξακριβωθεί η κάθε λειτουργικότητα της υποθετικής ενεργότητας του κάθε ομόλογου.

Το γεγονός ότι μια προκαρυωτικής προέλευσης πρωτεΐνη-τελεστής έχει ομοιότητες με ένζυμο που συμμετέχουν σε τόσο συντηρημένες διαδικασίες του ευκαρυωτικού κυττάρου εγείρει αρκετά ενδιαφέροντα εξελικτικά ερωτήματα. Π.χ. εάν η ενεργότητα της είναι κατάλοιπο ενός αρχαίου μονοπατιού βακτηριακής προέλευσης όπως η επεξεργασία των CRISPR και στην πορεία εξελίχθηκε για συμμετοχή στα αντίστοιχα ευκαρυωτικά μονοπάτια ή

εάν πρόκειται για ευκαρυωτική πρωτεΐνη που «απήχθη» και εγκλωβίστηκε σε ένα βακτηριακό σύστημα). Σε κάθε περίπτωση, οι προαναφερθείσες υποθετικές ενεργότητες μένουν να αποδειχτούν με βιοχημικά πειράματα.

Με αντίστοιχα πειράματα πρέπει να προσπαθήσουμε να συσχετίσουμε τον ρόλο των πειραματικά τεκμηριωμένων και υποθετικών ενεργοτήτων με τους σιγητικούς μας φαινοτύπους. Με μέλημα να καλυφθεί αυτός ο στόχος, συναρμολογήθηκαν διάφορες κατασκευές για τα HopF1/HopF2 που περιγράφονται στα αποτελέσματα. Οι κατασκευές αυτές απαλείφουν ολόκληρη την δομική περιοχή πρόσδεσης σε NAD ή/και επιπλέον επικράτειες των HopF1/HopF2. Ο διαφορετικός βαθμός ομολογίας με ADP-ribosyltransferase και tRNA φωσφοτρανσφεράση των HopF1/HopF2 επιβάλλει επιπλέον την συναρμολόγηση κατασκευών ανταλλαγής δομικών περιοχών ανάμεσα στα δυο μόρια. Με τον τρόπο αυτό θα εξακριβωθεί το ποσοστό της λειτουργικότητας της κάθε επιμέρους υποθετικής ενεργότητας του κάθε ομόλογου.

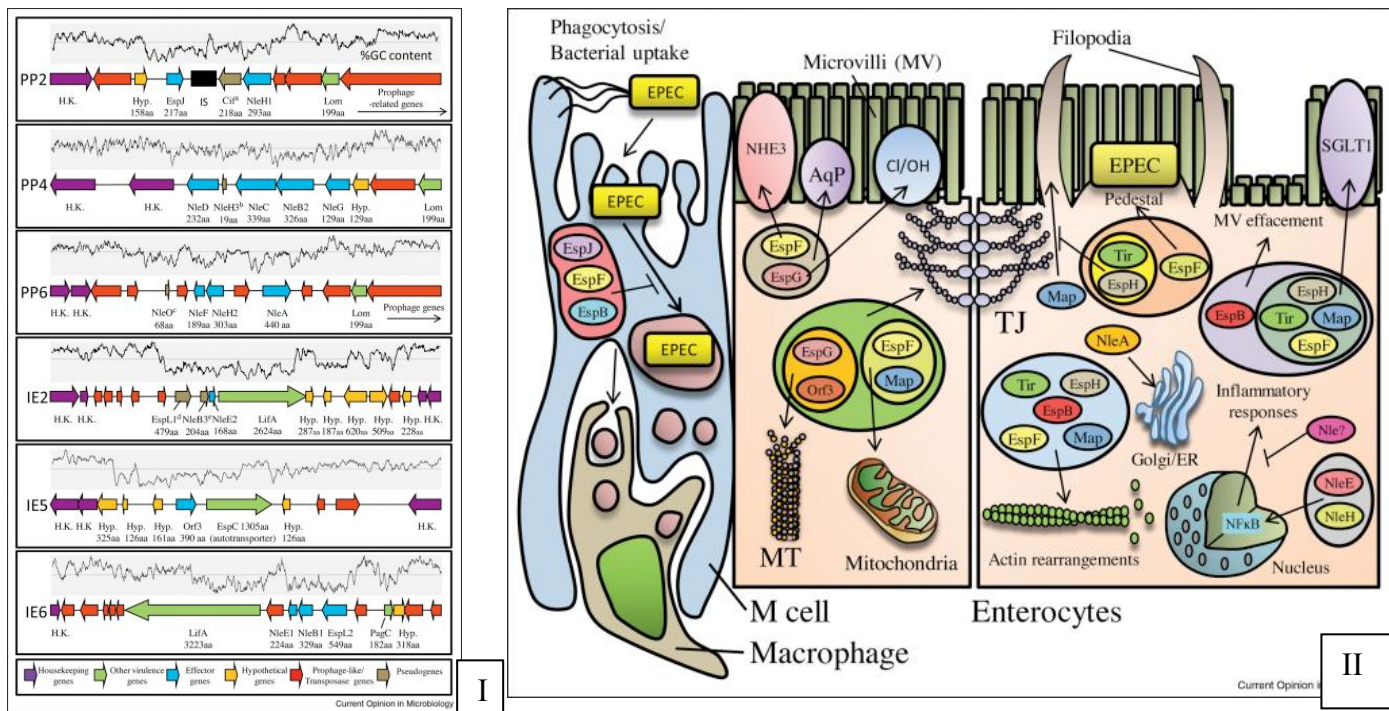
4.4.1.1.5 Στοχευμένες σημειακές μεταλλαγές στις HopF2_{DC3000} και HopF1_{1449A}

Στην παρούσα εργασία ακολουθηθήκαν δυο διαφορετικές προσεγγίσεις για την επιλογή καταλοίπων για στοχευμένη μεταλλαξιγένεση. Η πρώτη προσέγγιση αφορούσε την επιλογή συντηρημένων καταλοίπων για τα μοτίβα άγνωστης λειτουργίας. Η δεύτερη προσέγγιση αφορούσε την στόχευση καταλοίπων που σχετίζονται με πειραματικά τεκμηριωμένες ή υποθετικές ενζυμικές ενεργότητες των πρωτεϊνών.

Ομόλογα της πρωτεΐνης HopF2_{DC3000} εντοπίζονται σε πληθώρα φυτοπαθογόνων στελεχών *P. syringae* καθώς και στα συγγενικά φυτοπαθογόνα *P. savastanoi* και *Ralstonia solanacearum*. Εμφανίζονται όμως και σε φυλογενετικά απομακρυσμένα βακτήρια όπως (μεταξύ άλλων) *Shinorhizobium*, *Salmonella*, *E. coli* και *Streptococcus*. Κάποια από τα ομόλογα από ζωικά παθογόνα (*Salmonella* και *E. coli*) έχουν ονοματοδοτηθεί ως με βάση την ομολογία τους με HopF κατά αντιστοιχία με τις πρωτεΐνες τελεστές των φυτοπαθογόνων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα π.χ. τα ομόλογα από *Escherichia coli* 1.2741 (EIG83294), *Escherichia coli* M863 (EGB59962), *Escherichia coli* TW10509 (EGB69679), *Salmonella bongori* NCTC 12419 (YP_004731206) κ.α. Κάποια άλλα έχουν ονοματοδοτηθεί ως μέλη της οικογένειας EspJ πρωτεϊνών τελεστών όπως τα ομόλογα από στελέχη *Escherichia coli* RN587/1 (EFZ73081), *Escherichia coli* O127:H6 str. E2348/69 (YP_002328290), *Escherichia coli* E22 (ZP_03045580), *Escherichia coli* 3.2608 (EIH58410) κ.α.

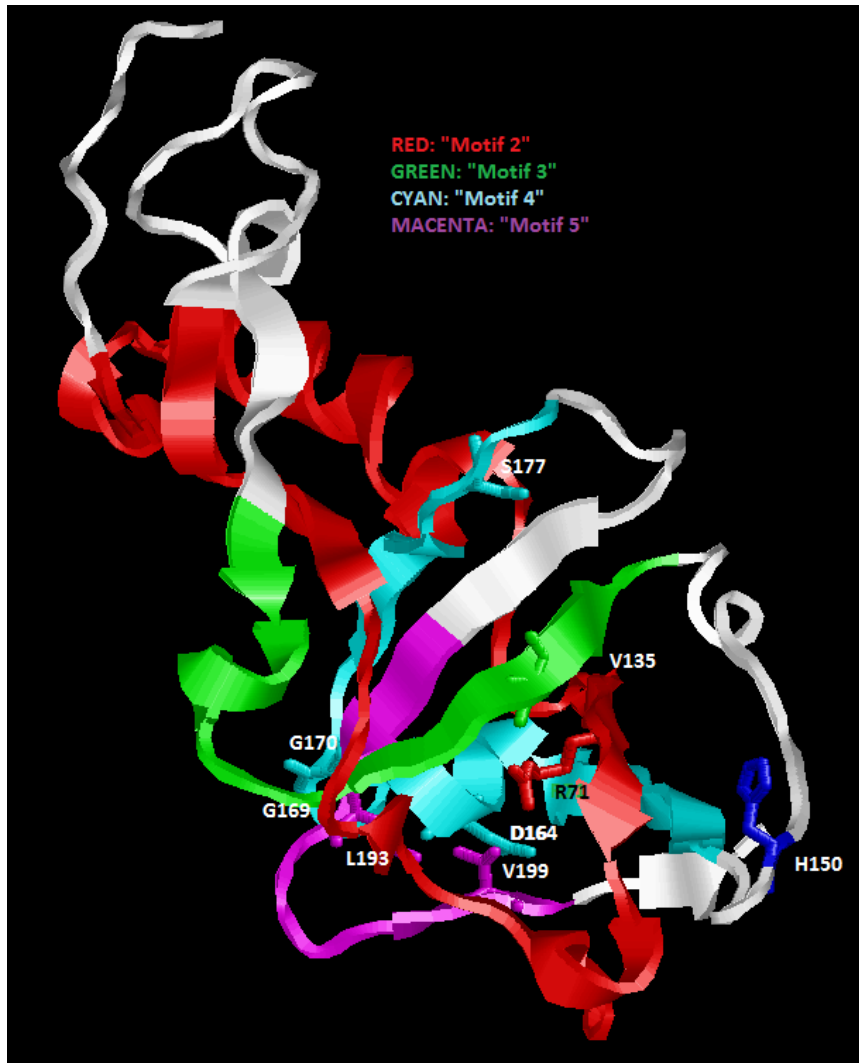
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η *EspJ* είναι μια πρωτεΐνη τελεστής από εντεροπαθογόνες *Escherichia coli* που αναστέλλει την φαγοκυττάρωση (Marchès et al., 2008). Διαδραματίζει ρόλο στην λοιμογόνο ικανότητα (virulence) των στελεχών που την φέρουν. Εντοπίζεται σε νησίδες παθογένειας κατά αντιστοιχία με γνωστές πρωτεΐνες-τελεστές σε φυτοπαθογόνα (Dean & Kenny, 2009).



Εικόνα 78. I. Νησίδες παθογένειας σε εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli* στις οποίες μεταξύ άλλων εντοπίζεται και η πρωτεΐνη τελεστής *EspJ*. II. Η *EspJ* έχει ρόλο στην παρεμπόδιση της φαγοκύτωσης (Dean & Kenny, 2009).

Σε αυτήν την φάση των πειραμάτων επιχειρήθηκε σε πρώτη φάση να εντοπιστούν συντηρημένα κατάλοιπα στην αλληλουχία της *HopF2_{DC3000}* και στις ομόλογες πρωτεΐνες από φυτοπαθογόνα. Όσα κατάλοιπα παρουσιάζονταν συντηρημένα και σε πολλές από τις ομόλογες πρωτεΐνες από *E. coli* επιλέχθηκαν σαν στόχοι για μεταλλαγμένη υποκατάσταση. Η θέση των καταλοίπων που επιλέχθηκαν πάνω στην υποθετική δομή της *HopF2_{DC3000}* παρουσιάζεται στην παρακάτω εικόνα. Πρέπει να σημειωθεί ότι από τα πέντε μοτίβα που περιγράψαμε σε προηγούμενη ενότητα μεγαλύτερο βαθμό συντήρησης με τα ομόλογα από *E. coli* εμφανίζουν τα μοτίβα IV και II και σε μικρότερο βαθμό το V.



Εικόνα 79. Επιλογή συντηρημένων καταλοίπων στα μοτίβα III, IV και V για μεταλλαξιγένεση υποκατάστασης. Παρουσιάζεται υποθετικό μοντέλο δομής της πρωτεΐνης HopF2_{DC3000} το οποίο προέκυψε από τη δημοσιευμένη (Singer et al., 2004) δομή του HopF1_{pPh} με την χρήση του προγράμματος **SWISS-MODEL** (Arnold et al., 2006)⁴¹. Στο υποθετικό μοντέλο σημειώνονται με διαφορετικά χρώματα οι συντηρημένες επικράτειες της πρωτεΐνης καθώς και τα περισσότερα από τα κατάλοιπα που επιλέχθηκαν για μεταλλαξιγένεση. Ο επιχρωματισμός των συντηρημένων περιοχών και των επιλεγμένων καταλοίπων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα **POLYVIEW-3D** (Porollo & Meller, 2007)⁴²

4.4.1.1.6 Κρίσιμα κατάλοιπα για καταστολή RNA σίγησης από HopF2DC3000.

Σε προηγούμενη εργασία μας (Sarris et al., 2011) είχαμε συσχετίσει την ενίσχυση της σίγησης από την πρωτεΐνη-τελεστή HopX1_{DC3001} με την ενεργότητα πρωτεάσης-κυστεΐνης της πρωτεΐνης αυτής. Αντίθετα, δεν έχει συσχετιστεί κάποια επικράτεια κάποιου

⁴¹ <http://beta.swissmodel.expasy.org/workspace>

⁴² <http://polyview.cchmc.org/polyview3d.html>

καταστολέα σίγησης με τον φαινότυπο καταστολής σίγησης. Στην περίπτωση του AvrPtoB (HopAB2) που καταστέλλει την μεταγραφή των πρόδρομων RNA μεταγράφων του miR393 στην *Arabidopsis*, με αξιοποίηση της σημειακής μεταλλαγής AvrPtoB(F525A) αποδείχθηκε ότι η καταστολή αυτή είναι ανεξάρτητη από την ενεργότητα E3 λιγάσης του AvrPtoB (Navarro et al., 2008). Ο AvrPto επίσης συμπεριφέρεται σαν καταστολέας της έκφρασης του miR393 σε αυτό το σύστημα. Όμως σε πειράματα παροδικής έκφρασης, η μεταλλαγή AvrPto(Y89D) αν και έχει κάποια επίδραση, δεν μεταβάλλει σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα συσσώρευσης miR393 σε σχέση με το αγρίου τύπου AvrPto(Navarro et al., 2008). Ίδια επίδραση είχε και η μεταλλαγή AvrPto(G2A). Το AvrPto(Y89D) δεν είναι σε θέση να αλληλεπιδράσει με PRRs και BAK1 σε αντίθεση με το AvrPto. Το AvrPto(G2A) είναι μεταλλαγμένο σε θέση μυριστοϋλίωσης που διαταράσσει τον εντοπισμό του AvrPto στην πλασματική μεμβράνη.

Στο δικό μας πειραματικό σύστημα καταβλήθηκε προσπάθεια να αξιολογηθούν και να αντιπροσωπεύονται συντηρημένα κατάλοιπα από όλες τις επικράτειες-μοτίβα της πρωτεΐνης HopF2_{DC3000}. Αποδείχτηκε ότι συντηρημένα κατάλοιπα από τα μοτίβα άγνωστης λειτουργίας επίσης συμμετέχουν στην εκδήλωση του φαινομένου καταστολής σίγησης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σημειακή μεταλλαγή HopF2_{DC3000}(G169A). Το κατάλοιπο G169 εντοπίζεται σε μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνες. Αντίστοιχες περιοχές σε πρωτεΐνες έχουν την δυνατότητα να αλλάξουν ποικιλοτρόπως την συνολική δομή της αλληλουχίας της πρωτεΐνης μετά από αυτές (M. Kokkinidis, personal communication). Πιθανώς η απαλοιφή του φαινοτύπου στην περίπτωση του HopF2_{DC3000}(G169A) να οφείλεται σε συνολική αναπροσαρμογή της στερεοδομής των μοτίβων IV και V. Στα κρίσιμα κατάλοιπα για την καταστολή σίγησης από HopF2_{DC3000} συγκαταλέγονται κατάλοιπα θαμμένα στο εσωτερικό της πρωτεΐνης αλλά και διάσπαρτα στην επιφάνεια της.

4.4.1.1.7 Κρίσιμα κατάλοιπα για καταστολή νέκρωσης από HopF2DC3000 σε *N. tabacum* cv. *Xanthi* και σε *N. benthamiana*.

Υπερέκφραση κατασκευής με σημειακή μεταλλαγή που μετατρέπει το κωδικόνιο έναρξης του HopF2_{DC3000} από ATA σε ATG ενισχύει την ικανότητα της πρωτεΐνης να συμπεριφέρεται σαν παράγοντας αμολυσματικότητας (avr). Αντίστροφο αποτέλεσμα έχει κατασκευή που υπερεκφράζει την σημειακή μεταλλαγή G2A (Robert-Seilaniantz et al., 2006). Το κατάλοιπο G2 σχετίζεται με σινιάλο μυριστοϋλίωσης και αγκυροβόλησης στην πλασματική μεμβράνη.

Αμινοξέα του AvrPphF ORF2 που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για την λοιμογόνο ικανότητα (virulence activity) απαιτούνται επίσης για βέλτιστη αναγνώριση του

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

τελεστή από το προϊόν του R1 γονιδίου ανθεκτικότητας στη φασολιά. Οι μεταλλάξεις R72A και D174A καταργούν την απόκριση ανθεκτικότητας (avirulence function), η S90A όχι, και οι μεταλλάξεις H97A και E98A έχουν μια ενδιάμεση επίδραση (Singer et al., 2004).

Το *P. syringae* pv. *tabaci* δεν πυροδοτεί HR σε *N. tabacum* W38 εκτός και εάν εισαχθεί σε αυτό πλασμίδιο που εκφράζει HopF2_{DC3000}. Αυτό σημαίνει ότι η ποικιλία αυτή έχει λειτουργικό γονίδιο R που αναγνωρίζει την HopF2 και πυροδοτεί την ETI. Η HR δεν είναι μακροσκοπικά ορατή (Wang et al., 2010) όταν ο μετασχηματισμός πραγματοποιηθεί με πλασμίδια που φέρουν τις σημειακές μεταλλαγές HopF2_{DC3000}(R71A) και HopF2_{DC3000}(D175A). Καταστολή της μεσολαβούμενης από AvrRpt2 HR δεν παρατηρήθηκε σε δύο ανεξάρτητες διαγονιδιακές γραμμές που εκφράζουν το μεταλλαγμένο HopF2_{Pto} (D175A) σε αντίθεση με αυτές που υπερεκφράζουν αγρίου τύπου HopF2_{Pto} (Wilton et al., 2010).

Στο δικό μας πειραματικό σύστημα αποκαλύψαμε κρίσιμα κατάλοιπα για την καταστολή νέκρωσης που επάγει το HopF2_{DC3000} από το ίδιο HopF2_{DC3000}. Παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον ότι κάποια από τα κατάλοιπα αυτά επίσης σχετίζονται με καταστολή RNA σίγησης από την ίδια πρωτεΐνη. Αυτό ευθυγραμμίζεται με παρατηρήσεις ότι κρίσιμα κατάλοιπα που σχετίζονται με την δράση του HopF2_{DC3000} ως παράγοντα μολυσματικότητας επίσης σχετίζονται με την αναγνώριση της πρωτεΐνης από τον αμυντικό μηχανισμό του φυτού μέσω του R-γονιδίου ή της σηματοδότησης ETI που αυτή η αναγνώριση δρομολογεί (Singer et al., 2004) (Wang et al., 2010). Φυσικά, όπως αποδεικνύεται συνολικά από τα πειράματά μας, πολλά κρίσιμα κατάλοιπα για την καταστολή κυτταρικού θανάτου σε αυτήν την περίπτωση είναι κοινά με αυτά που είναι κρίσιμα για την καταστολή (από το HopF2_{DC3000}) κυτταρικού θανάτου από ετερόλογες πρωτεΐνες-επαγωγείς κυτταρικού θανάτου.

Αναφορικά με την κρίσιμη περιοχή για αναγνώριση της HopF2_{DC3000} από υποθετικό R-γονίδιο θα μπορούσαμε να πούμε ότι με βάση τα πειράματά μας η κρίσιμη περιοχή μπορεί να χαρτογραφηθεί στην επικράτεια II ή στις επικράτειες II και III. Εδώ όμως πρέπει να σημειωθεί ότι κάποιες από τις σημειακές μεταλλαγές (G169A, G170A) μπορούν να οδηγήσουν σε παραπλανητικά συμπεράσματα. Όπως προειπώθηκε τέτοιες σημειακές μεταλλαγές είναι σε θέση να αλλάξουν συνολικά την στερεοδομή των μοτίβων IV και V. Είναι πιθανό, αλλαγές στην στερεοδομή των περιοχών αυτών να αποσταθεροποιούν την πρωτεΐνη (πρωτεόλυση) ή να αλλάζουν τη τρισδιάστατη δομή της καθιστώντας έτσι προβληματική την αναγνώριση από το αντίστοιχο R-γονίδιο. Είτε η αλληλεπίδραση με το προϊόν του R-γονιδίου είναι άμεση είτε (το πιθανότερο) έμμεση π.χ. αναγνώριση της μη

λειτουργικής πρωτεΐνης από κάποιο άλλο μηχανισμό του φυτού μέσω ή ανεξάρτητα του R-γονιδίου.

Επανάληψη των προηγούμενων πειραμάτων σε *N. benthamiana* αποκάλυψε ότι τα κρίσιμα κατάλοιπα για την καταστολή νέκρωσης από αγροένχυση σε *N. benthamiana* και *N. tabacum* cv. *Xanthi* είναι κοινά με ελάχιστες εξαιρέσεις. Ένα πρόβλημα με την επαγωγή νεκρώσεων σε *N. benthamiana* είναι η χρονική καθυστέρηση στην εκδήλωση της νέκρωσης. Αυτό οφείλεται στην συνεργιστική επίδραση, διαφόρων φαινομένων. Η επαγωγή νεκρώσεων μέσω αγροένχυσης είναι γενικά πιο καθυστερημένη σε σχέση με την επαγωγή νεκρώσεων μέσω ένχυσης από κάποιο στέλεχος *Pseudomonas*. Αυτός είναι γενικός περιορισμός ανεξάρτητα από το είδος του φυτού που χρησιμοποιούμε σαν πειραματικό σύστημα. Επιπλέον η *N. benthamiana*, ως φυτό της Νέας Ζηλανδίας, ίσως δεν αντιδρά ταχέως σε πρωτεϊνών τελεστές από παθογόνα Αμερικανικών ειδών *Solanaceae* λόγω απουσίας συνεξέλιξης φυτού-παθογόνου. αυτών. Σε αυτά θα πρέπει να συμπληρωθεί ότι οι θερμοκρασίες στο θερμοκήπιο στο οποίο διατηρούνται τα φυτά κατά την διάρκεια των πειραμάτων συχνά είναι υψηλότερες των βέλτιστων για την εκδήλωση νεκρώσεων, λόγω ελλιπούς συντήρησης εξοπλισμού, γεγονός που επιδεινώνεται τους καλοκαιρινούς μήνες. Όπως αναφέρεται σε άλλη ενότητα της διατριβής, αύξηση της θερμοκρασίας είναι ανασταλτική στην εκδήλωση νεκρώσεων. Σε αυτά θα πρέπει να προστεθεί και ότι συχνά χρησιμοποιούμε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση του μολύσματος αγροβακτηρίων στις βιοδοκιμές (~5 x 10⁷cfu/ml) με στόχο την ελαχιστοποίηση της ταλαιπωρίας ιστού λόγω αγροένχυσης.

4.4.1.1.8 Ρόλος της σίγησης στην εκδήλωση νεκρώσεων από σημειακές μεταλλαγές HorF2_{DC3000}.

Ο p19 έχει την ικανότητα να επιταχύνει νεκρώσεις παρουσία κάποιου επαγωγέα νέκρωσης είτε εκφράζεται παροδικά μέσω αγροβακτηρίου είτε με μόνιμη υπερέκφραση σε διαγονιδιακά φυτά όπως αναλύεται στην αντίστοιχη ενότητα του κειμένου. Δεν προκαλεί έκπληξη ότι έχει την ίδια επίδραση και στην περίπτωση που σαν επαγωγέας νέκρωσης χρησιμοποιούνται κατασκευές που υπερεκφράζουν σημειακές μεταλλαγές υποκατάστασης συντηρημένων καταλοίπων του HorF2_{DC3000}.

Σε *N. tabacum* συνέκφραση αγρίου τύπου HorF2_{DC3000} και κάποιων από τις κατασκευές που υπερεκφράζουν σημειακές μεταλλαγές του HorF2_{DC3000} έχει ίδιο φαινότυπο με υπερέκφραση μόνο των κατασκευών των σημειακών μεταλλαγών. Σε κάποιο

βαθμό αυτό είναι αναμενόμενο και υποδηλώνει ότι οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες ανταγωνίζονται την δράση της αγρίου τύπου πρωτεΐνης (γενετικά κυρίαρχες) όταν συνυπάρχουν στο ίδιο κύτταρο. Ο ανταγωνισμός αυτός θα μπορούσε να είναι για πρόσδεση στο ίδιο υπόστρωμα. Σε αυτήν την περίπτωση, η μη λειτουργική πρωτεΐνη με την πρόσδεση της στο υπόστρωμα δεν επιτρέπει στην λειτουργική πρωτεΐνη να έχει πρόσβαση στην συνολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης στόχου της. Εναλλακτικά, λειτουργική και μη λειτουργική πρωτεΐνη μπορεί να ανταγωνίζονται για φυσική αλληλεπίδραση με τις ίδιες ενδογενείς πρωτεΐνες. Δεν αποκλείεται το γεγονός σε περίπτωση που η *HopF2_{DC3000}* ομοδιμερίζεται ή ομοπολυμερίζεται, να δημιουργούνται σύμπλοκα αγρίου τύπου και μεταλλαγμένης πρωτεΐνης τα οποία να είναι μη λειτουργικά. Ανάλογη κατάσταση φαίνεται να συμβαίνει και σε w.t. *N. benthamiana*. Εδώ όμως αντίστοιχο αποτέλεσμα έχει συνέκφραση αγρίου τύπου *HopF2_{DC3000}* και κυρίως *HopF2_{DC3000}* με σημειακές μεταλλαγές στο μοτίβο IV. Σημειακές μεταλλαγές στα υπόλοιπα μοτίβα έχουν μικρή έως ανύπαρκτη επίδραση.

4.4.1.1.9 Ρόλος κρίσιμων καταλοίπων του *HopF2_{DC3000}* στην επαγωγή νέκρωσης από τους τελεστές *HopAB2m* και *NorT*.

Η πλειοψηφία των σημειακών μεταλλαγών που περιγράψαμε έχει την ικανότητα να αναστέλλει κυτταρικό θάνατο από μια άλλη πρωτεΐνη-τελεστή από *Pseudomonas* (*HopAB2m*). Δεν έχουν την δυνατότητα όμως να αναστείλουν κυτταρικό θάνατο με επαγωγή μια πρωτεΐνη από *Rhizobium* (*NorT*). Η αγρίου τύπου *HopF2_{DC3000}* αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο και στις δυο περιπτώσεις. Αυτό έως ένα βαθμό είναι κατανοητό. Είχαμε περιγράψει και σε άλλη ενότητα ότι απαλειφή των μοτίβων I-III της *HopF2_{DC3000}* **δεν επηρεάζει την ικανότητα της πρωτεΐνης να αναστείλει κυτταρικό θάνατο από *HopAB2m*** αλλά αυτο δεν ισχύει για νέκρωση που επάγεται από αγροέγχυση *NorT*. Η επαγωγή κυτταρικού θανάτου από τις δυο πρωτεΐνες (αν και είναι πιθανό να μοιράζεται συντηρημένα σηματοδοτικά μονοπάτια) εμφανίζει και διαφοροποιήσεις ανά περίπτωση.

4.4.1.1.10 Υποκατάσταση καταλοίπων που σχετίζονται με γνωστές ή υποθετικές ενζυμικές ενεργότητες της *HopF2*.

Αναφορικά με την υποθετική ενεργότητα εξωνουκλεάσης III επιχειρήθηκε η μεταλλαξιγένεση πιθανών καταλυτικών καταλοίπων. Η RNase T είναι μια εξωνουκλεάση III από *E. coli* με βιβλιογραφικά τεκμηριωμένη ενεργότητα (Zuo & Deutscher, 2002). Στην RNase T έχουν αποκαλυφθεί α) τρία μοτίβα διάσπαρτα κατά μήκος της κωδικής περιοχής

που σχετίζονται με πρόσδεση στο RNA και β) άλλα τρία που σχετίζονται με την ενεργότητα εξωνουκλεάσης. Τα μοτίβα πρόσδεσης στο RNA δεν είναι επαρκώς συντηρημένα στα ομόλογα HopF. In silico ανάλυση έχει παρουσιάσει ενδείξεις ότι υπάρχουν κάποιες δομικές περιοχές των HopF οι οποίες πιθανόν να μπορούν να συσχετιστούν με πρόσδεση σε νουκλεϊκά οξέα. Μάλιστα οι περιοχές αυτές βρίσκονται σε εξωτερικές επιφάνειες του μορίου. Στην παρούσα φάση όμως δεν έγινε προσπάθεια να γίνουν μεταλλαγές στις περιοχές αυτές. Τα μοτίβα καταλυτικής δράσης εξωνουκλεάσης από την άλλη πλευρά παρουσιάζουν μια σχετική συντήρηση στην HopF2 (γεγονός που αποδεικνύεται και από την παρατήρηση ότι κάποια κρίσιμα αμινοξέα για καταλυτική δράση είναι συντηρημένα) αλλά ο βαθμός συντήρησης τους είναι οριακός (ή δεν είναι συντηρημένα) στην HopF1 (το οποίο επίσης δεν παρουσιάζει φαινότυπο σε πειράματα σίγησης).

Με δεδομένους τους ταχείς εξελικτικούς ρυθμούς που υιοθετούν οι εκκρινόμενες T3SS, δεν αποκλείεται η HopF2 να είναι μια φυλογενετικά εκφυλισμένη εξωνουκλεάση. Με βάση αυτή την υπόθεση ακολουθήθηκαν τρεις διαφορετικές στρατηγικές. Η πρώτη αφορά την υποκατάσταση συντηρημένων καταλυτικών κατάλοιπων της HopF2 [όπως η (H150A)]. Η δεύτερη αφορά την υποκατάσταση μη συντηρημένων καταλοίπων της HopF1 με αντίστοιχα της HopF2 (όπως στην τριπλή μεταλλαγή τριπλή μεταλλαγή A150D/G151H/M152). Η τρίτη στρατηγική σχετίζεται με την στόχευση μεμονωμένων μη συντηρημένων καταλοίπων στο ομόλογο στο οποίο σε γενικές γραμμές τα υπόλοιπα κρίσιμα καταλυτικά κατάλοιπα είναι συντηρημένα (όπως το G6 του HopF2). Αρχικά πειράματα απέτυχαν να συσχετίσουν καταστολή σίγησης ή καταστολή νέκρωσης HopF2 με κάποιο από τα προαναφερθέντα κατάλοιπα. Αυτό απομακρύνει το σενάριο ότι η HopF2 είναι μια λειτουργική εξωνουκλεάση III, δεν αποκλείει όμως το ενδεχόμενο να έχει ικανότητα πρόσδεσης σε νουκλεϊκά οξέα καθώς δεν αξιολογήθηκαν σημειακές μεταλλαγές που να σχετίζονται με τα υποθετικά μοτίβα πρόσδεσης σε RNA.

Αναφορικά τώρα με την ενδεχόμενη ενεργότητα 2'-tRNA φωσφοτρανσφεράσης (Kato-Murayama et al., 2005) υπάρχει σχετική συντήρηση των μοτίβων που σχετίζονται με την ενεργότητα αυτή στα ομόλογα HopF. Αντίθετα δεν είναι αντίστοιχα συντηρημένη η περιοχή πρόσδεσης σε RNA που έχουν οι 2'-tRNA φωσφοτρανσφεράσες⁴³. Η έλλειψη συντήρησης των μοτίβων πρόσδεσης σε RNA αφήνει ανοιχτό το ενδεχόμενο έμμεσης πρόσδεσης των HopF σε siRNA μέσω άλλων πρωτεϊνών. Ενδιαφέρουσα επίσης είναι η παρατήρηση ότι ενώ

⁴³ Φυσικά, τα μοτίβα πρόσδεσης σε RNA είναι εντελώς διαφορετικά ανάμεσα στις εξωνουκλεάσες III και στις 2-tRNA φωσφοτρανσφεράσες.

τα μοτίβα εξωνουκλεάσης είναι περισσότερο συντηρημένα στην HopF2 από ότι στα άλλα δυο ομόλογα, τα μοτίβα ADP-ribosyltransferase και 2'-tRNA φωσφοτρανσφεράσης είναι περισσότερο συντηρημένα στην HopF1. Η πιο διακριτή από τις δομικές περιοχές που συνολικά απαρτίζουν την 2'-tRNA φωσφοτρανσφεράση (ή ADP-ribosyltransferase) είναι η περιοχή πρόσδεσης στον συνπαράγοντα NAD που είναι θαμμένη στο υδρόφοβο εσωτερικό των ομολόγων. Κατάλοιπα αυτής της επικράτειας χρησιμοποιήθηκαν για να σχεδιαστούν σημειακές μεταλλαγές για τα ομόλογα όπως η R71 και η T74 τα οποία θεωρούνται κρίσιμα για την πρόσδεση ή αλληλεπίδραση με τον συνπαράγοντα NAD.

4.4.1.2 Επίδραση πρωτεϊνών-τελεστών υπεροικογένειας AnvRps4-HopK1 στην RNA σίγηση.

4.4.1.2.1 Καταστολή RNA σίγησης από πρωτεΐνη-τελεστή AnvRps4

Σε αντίθεση με τους άλλους τελεστές που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή, οι πρωτεΐνες AnvRps4_{rpi}/HopF2_{DC3000} παρουσιάζουν ικανότητα καταστολής της RNA σίγησης. Η συμπεριφορά τους θα μπορούσε να ερμηνευτεί με βάση το γεγονός ότι α) είτε η έκκριση τους συνοδεύεται από επαγωγή μηχανισμών του φυτού σε μια προσπάθεια να διευκολυνθεί η πυροδότηση HR ή β) είτε ότι η δράση τους (όπως στην περίπτωση του AnvRptο) σχετίζεται πιθανόν με την ρύθμιση άλλου παρακλαδιού όπως τα miRNA (Navarro et al., 2008). Εδώ θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι, σε αντίθεση με τις περιπτώσεις που εξετάζουμε, οι ιϊκές πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον μηχανισμό της σίγησης έχουν συνήθως κατασταλτικό ρόλο (Voignet et al., 2003). Αυτό είναι λογικό αν σκεφτεί κανείς ότι η σίγηση είναι ανασταλτικός παράγοντας στην μολυσματικότητα των ιών. Αντίθετα με βάση τα πειράματά μας, η σίγηση είναι ενυσοχτική για βακτηριακή μόλυνση καθώς αποτρέπει την εκδήλωση ασύμβατων αλληλεπιδράσεων.

Στην περίπτωση των AnvRps4 και HopK1 υπάρχει υψηλή ομολογία στο αμινοτελικό άκρο τους αλλά όχι στις καρβοξυτελικές ουρές. Το HopK1 δεν καταστέλλει την s-PGTS όπως κάνει το AnvRps4. Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί είτε α) με την παραδοχή ότι το καρβοξυτελικό άκρο του AnvRps4 είναι υπεύθυνο για τον φαινότυπο καταστολής σίγησης είτε β) ότι ευθύνεται το αμινοτελικό άκρο και απλά το καρβοξυτελικό άκρο του HopK1 ασκεί αρνητική επίδραση στο αμινοτελικό άκρο του.

Ανάλογη προσέγγιση με την χρήση πρωτεϊνών τελεστών από διαφορετικά ομόλογα με διακριτές λειτουργίες είχαμε χρησιμοποιήσει παλιότερα (Sarris et al., 2011) και στην περίπτωση της ενίσχυσης της σίγησης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η περίπτωση του HopX1_{DC3001} και HopX1_{NPS3121}. Το HopX1_{NPS3121} μπορεί να θεωρηθεί ως μη λειτουργικό ομόλογο λόγω αλλαγών στο αναγνωστικό πλαίσιο και ενθέσεων ενός μεταθετού στοιχείου

στο καρβοξυτελικό άκρο. Έτσι δεν προκαλεί έκπληξη ότι δεν έχει φαινότυπο ενίσχυσης σίγησης. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο τελεστής HopX1Ea καταστέλλει HR στη *N. benthamiana* αλλά προάγει την HR σε *N. tabacum* και λειτουργεί ως παράγων αμολυσματικότητας στη μηλιά (Bocsanczy et al., 2012).

4.4.2 Ενίσχυση RNA σίγησης από πρωτεΐνες-τελεστές στελεχών *Pseudomonas*.

Ένα ενδιαφέρον συμπέρασμα που προκύπτει από τα πειράματα μας είναι ότι η εκδήλωση του φαινομένου της ενίσχυσης της σίγησης εμφανίζεται ταχύτερα σε σχέση με αυτό που θα περιμέναμε χρησιμοποιώντας π.χ. μια πρωτεΐνη με επίδραση στην σίγηση από ιό. Το γεγονός αυτό πρέπει να ερμηνευτεί λαμβάνοντας υπόψη μας ότι στην περίπτωση ασύμβατων αλληλεπιδράσεων από την στιγμή που θα έρθει ένα φυτό σε επαφή με στελέχη *Pseudomonas* μέχρι την εκδήλωση HR μεσολαβούν μόλις κάποιες ώρες. Έτσι οι πρωτεΐνες-τελεστές που τροποποιούν το φαινόμενο πρέπει να έχουν εξελιχθεί ώστε με την είσοδο τους στο φυτό να επιτελούν σχετικά ταχέως την λειτουργία τους. Αντίθετα η μόλυνση από ιό είναι μια διαδικασία που διαρκεί μέρες. Κατά αντιστοιχία οι πρωτεΐνες του ιού έχουν προσαρμοστεί στα χρονικά αυτά πλαίσια.

Σύμφωνα με τα πειράματα μας, οι πρωτεΐνες για τις οποίες υπάρχουν ενδείξεις για ενίσχυση της σίγησης θα έπρεπε να συνδέονται με καταστολή της HR. Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι κάποιες από αυτές έχουν πράγματι χαρακτηριστεί ως καταστολείς της HR (Jamir et al., 2004)⁴⁴. Η αντίδραση υπερευαισθησίας όντως καταστέλλεται από μια σειρά βακτηριακών πρωτεϊνών-τελεστών. Για κάποιες από αυτές αποδείχτηκε ότι σχετίζονται με τροποποίηση της απόκρισης σε σίγηση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα εκκρινόμενων βακτηριακών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην καταστολή του κυτταρικού θανάτου περιλαμβάνουν τις HopPtoD2 (Espinosa et al., 2003), AvrPphC (Tsiamis et al., 2000), HopPtoE, AvrPtoE, AvrPtoB, AvrPtoF (HopF2) (Jamir et al., 2004). Για τις πρωτεΐνες αυτές ή ομόλογα τους υπάρχει αλληλεπίδραση με τον μηχανισμό της σίγησης σύμφωνα με τις ενδείξεις που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία και σε προηγούμενη

⁴⁴ Πιο συγκεκριμένα, τρεις από τις έξι πρωτεΐνες για τις οποίες παρουσιάσαμε παλιότερα (Sarris et al., 2011) ενδείξεις για ενίσχυση της σίγησης (HopX1_{DC3001}, HopF2_{DC3001}, HopAB1(VirPphA) έχουν πράγματι χαρακτηριστεί ως καταστολείς της HR (Jamir et al., 2004). Οι υπόλοιπες τρεις απλά δεν έχουν ελεγχθεί κατά το παρελθόν. Η δυνατότητα να ελέγξουμε έναν ακόμα καταστολέα της HR (Espinosa et al., 2003) δηλαδή τον HopAO1_{DC3001} δεν στάθηκε δυνατή διότι ο τελευταίος παρουσίαζε εκτός από ενίσχυση σίγησης και νεκρωτικά συμπτώματα στο πειραματικό μας σύστημα.

δημοσίευση μας (Sarris et al., 2011). Από την άλλη πλευρά κάποιοι βακτηριακοί τελεστές (μεταξύ αυτών και η AvrPtoB) εκμεταλλεύονται το μονοπάτι του SGT1 και των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών του για την καταστολή της βασικής άμυνας του φυτού (Hann & Rathjen, 2007). Εκτός από το AvrPtoB (HopAB2), μία σειρά άλλων βακτηριακών εκκρινόμενων πρωτεϊνών συμμετέχουν στην καταστολή της βασικής άμυνας του φυτού. Π.χ. HopC1, AvrPto, AvrPtoF (HopF2) (Oh & Collmer, 2005) ενώ το AvrPphE δεν την καταστέλλει (Kim et al., 2005). Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν επίδραση στην RNA σίγηση στο σύστημα μας.

Πρέπει να σημειωθεί ότι με το πειραματικό σύστημα που χρησιμοποιούμε έχουμε την δυνατότητα να ελέγξουμε την επίδραση πρωτεϊνών-τελεστών μόνο σε ένα παρακλάδι του μηχανισμού (αυτό που σχετίζεται με την παραγωγή siRNAs). Θα είχε ενδιαφέρον οι πρωτεΐνες που εξετάσαμε να ελεγχθούν ως προς την εμπλοκή τους ή όχι στη σίγηση σε ένα άλλο πειραματικό σύστημα που ελέγχει την επίδραση τους σε άλλο παρακλάδι του μηχανισμού (π.χ. miRNAs). Συχνά υπάρχουν διαφορετικές απαιτήσεις για την ανάπτυξη μολυσματικότητας από τα παρακλάδια των siRNAs και των miRNAs όπως έχει αποδειχθεί σε διαφορετικές περιπτώσεις (Dupoyer et al., 2006; Navarro et al., 2008). Τέλος, ένα επιπλέον συμπέρασμα που προκύπτει από το πείραμα αυτό είναι ότι στην περίπτωση μας δεν συμμετέχει κάποιο miRNA και δεν εμπλέκεται ο μηχανισμός βιοσύνθεσης των miRNA (όπως στην περίπτωση των Navarro et al., 2008). Ο μηχανισμός βιοσύνθεσης των miRNA είναι ανεξάρτητος από RDR6. Πιθανόν στην περίπτωση μας εμπλέκεται κάποιος μηχανισμός που εξαρτάται από RDR6 όπως για παράδειγμα κάποιος μηχανισμός που σχετίζεται με την παραγωγή ενδογενών siRNAs ή IsiRNAs.

4.4.2.1 Επίδραση πρωτεϊνών-τελεστών HopAO1, HopC1, AvrPto, PthG στην RNA σίγηση.

Μια υποκατηγορία τεσσάρων πρωτεϊνών τελεστών (HopAO1, HopC1, AvrPto, PthG) που αξιολογήσαμε εμφάνιζε έντονο φαινότυπο ενίσχυσης σίγησης στο πειραματικό μας σύστημα (στην διαγονιδιακή σειρά *N. benthamiana* 16C). Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι η παροδική έκφραση των πρωτεϊνών αυτών οδηγεί σε χλωρωτικά ή νεκρωτικά συμπτώματα στην διαγονιδιακή σειρά *N. benthamiana* 16C. Τα νεκρωτικά συμπτώματα είναι έντονα κυρίως στην περίπτωση του HopAO1. Τα χλωρωτικά συμπτώματα επικαλύπτονται χρονικά μερικώς με τον φαινότυπο ενίσχυσης σίγησης. Το γεγονός αυτό πιθανόν δημιουργεί προβλήματα στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Παρατηρήσαμε ότι οι προαναφερόμενες πρωτεΐνες-τελεστές εμφάνιζαν σχετικά γρήγορα ενίσχυση σίγησης σε σχέση με άλλες στις οποίες η ενίσχυση σίγησης δεν συνοδευόταν από χλωρωτικά συμπτώματα. Εκτός από την ταχύτητα, και η ένταση του φαινομένου ενίσχυσης σίγησης

διέφερε στις δύο κατηγορίες. Οι πρωτεΐνες HopAO1, AvrPto, PthG φαίνεται να είναι ισχυρότεροι ενισχυτές σίγησης από οποιαδήποτε άλλη πρωτεΐνη-τελεστή αξιολογήσαμε στην παρούσα εργασία.

Σαν υπόθεση εργασίας προτείνουμε ότι τα δύο φαινόμενα (ενίσχυση σίγησης-χλώρωση) μπορεί να είναι αλληλένδετα. Το φυτικό κύτταρο στα πολύ πρώιμα στάδια της μόλυνσης πιθανόν προσπαθεί να ρυθμίσει αρνητικά το μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου. Η επαγωγή κυτταρικού θανάτου εάν δεν έχουν εξαντληθεί τα περιθώρια αντιμετώπισης παθογόνων με άλλους τρόπους είναι ενεργειακά ασύμφορη για τους φυτικούς οργανισμούς. Μειώνει την συνολική φωτοσυνθετική ικανότητα του οργανισμού. Η κατάσταση αντιστρέφεται σε αμέσως επόμενο στάδιο και σε περίπτωση που η PTI αποδειχθεί αναποτελεσματική στην αντιμετώπιση κάποιων παθογόνων. Σε ένα τέτοιο μοντέλο, η ενίσχυση της σίγησης είναι αρχικά ευεργετική για τον ξενιστή. Η απόκριση σε επόμενο στάδιο μπορεί να αντιστραφεί και να συνοδεύεται από νεκρωτικά συμπτώματα. Κάποιες πρωτεΐνες-τελεστές όπως αυτές που προαναφέρθηκαν εκμεταλλεύονται στο έπακρο την ασφαλιστική αυτή δικλείδα προς όφελος τους ενισχύοντας την σίγηση. Με τον τρόπο αυτό ρυθμίζουν αρνητικά τον κυτταρικό θάνατο. Σε πολύ ακραίες περιπτώσεις (όπως αυτές που μεσολαβούνται από τις πρωτεΐνες HopAO1, AvrPto, PthG), η ισχυρή ενίσχυση της σίγησης μπορεί να αναγνωρίζεται από τον ξενιστή ως βλαπτική (π.χ. προσβολή από ισχυρό παθογόνο) και να οδηγεί τελικά στην εκδήλωση αντίστροφης απόκρισης –νέκρωσης από την πλευρά του ξενιστή. Η υπόθεση αυτή όμως χρειάζεται επιπλέον πειραματική τεκμηρίωση.

Η πρωτεΐνη AvrPto έχει πρόσφατα χαρακτηριστεί ως καταστολέας του παρακλαδιού της σίγησης που σχετίζεται με τα miRNAs (Navarro et al., 2008). Η επίδραση της στο μονοπάτι των siRNAs είναι αντίστροφη με την επίδραση που έχει στο παρακλάδι των miRNAs (Navarro et al., 2008). Πρέπει όμως να λάβουμε υπόψιν ότι υπάρχουν διαφορετικές απαιτήσεις στην ρύθμιση του μονοπατιού των miRNAs και των siRNAs. Κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και στην περίπτωση του αγροβακτηρίου (Dunoyer et al., 2006). Υπάρχει αναγκαιότητα για ένα νέο πειραματικό σύστημα ώστε να αποσαφηνισθεί ο ρόλος της πρωτεΐνης αυτής.

4.4.2.2 Επίδραση πρωτεϊνών-τελεστών υπεροικογένειας HopAB2/ HopAB1 στην RNA σίγηση.

Είναι τεκμηριωμένο βιβλιογραφικά (Abramovitch et al., 2006) ότι το πλήρους μήκους HopAB2_{DC3000} δεν δίνει αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτά w.t. *N. benthamiana* εξαιτίας των αντιαποπτωτικών ιδιοτήτων της E3 λιγάσης στο καρβοξυτελικό του άκρο. Παρόλα αυτά, στο δικό μας πειραματικό σύστημα παρατηρείται εκτεταμένη

νέκρωση και κατάρρευση ιστών χρησιμοποιώντας την ίδια ακριβώς κατασκευή που χρησιμοποιήθηκε και στην δημοσίευση. Δεν πρόκειται όμως για χαρακτηριστική HR αλλά για μια κάπως χρονικά καθυστερημένη νέκρωση. Μάλιστα, οι περιοχές αλληλεπίδρασης με Pto και Fen φαίνεται να είναι λειτουργικές. Ακρωτηριασμένη κατασκευή που περιέχει μόνο την περιοχή αλληλεπίδρασης με Pto παρουσιάζει κανονικά αντίδραση υπερευαισθησίας κατά τα αναμενόμενα. Καθυστερημένη νέκρωση παρουσιάζει και ακρωτηριασμένη κατασκευή που περιέχει μεταξύ άλλων και την περιοχή αλληλεπίδρασης με Fen αλλά όχι αυτή της αλληλεπίδρασης με Pto. Μια εξήγηση του παραδόξου θα μπορούσε να θεωρηθεί η έλλειψη ενεργότητας της E3 λιγάσης. Δεν φαίνεται όμως πειστική καθώς σε άλλα πειράματα (π.χ. για ρόλο στην σίγηση), η E3 λιγάση παρουσιάζεται λειτουργική. Βέβαια, φυλογενετική ανάλυση (Goodin et al., 2008) χρησιμοποιώντας φυτά w.t. *N. benthamiana* από διαφορετικά εργαστήρια απέδειξε την ύπαρξη πολλών διαφορετικών «οικοτύπων» ή «σειρών» w.t. *N. benthamiana*. Οι «οικότυποι» αυτοί εμφανίζουν μεγαλύτερες αποκλίσεις μεταξύ τους από ότι πιστεύαμε προηγουμένως. Ο χαρακτηρισμός τους δεν έχει προχωρήσει ακόμα σε ικανοποιητικό βαθμό για να αποσαφηνισθεί ποιον ακριβώς γενότυπο χρησιμοποιεί το κάθε εργαστήριο καθώς και την έκταση των διαφόρων μεταξύ τους. Πάντως απόκλιση από δημοσιευμένες παρατηρήσεις ως προς την επαγωγή HR έχει παρατηρηθεί σε *N. benthamiana* και για άλλες πρωτεΐνες (Sarris P., Karandemiris K. and N. Panopoulos, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Το γεγονός πιθανόν αποδίδεται στις ιδιαιτερότητες του γενότυπου της w.t. *N. benthamiana* του εργαστηρίου. Συνιστάται όπου είναι δυνατόν να χρησιμοποιούνται περισσότεροι του ενός «οικότυποι» από διαφορετικά εργαστήρια και να συγκρίνονται τα αποτελέσματα μεταξύ τους.

Οι πρωτεΐνες HorAB2 και HorAB1 εμφανίζονται ως ενισχυτές της σίγησης σε πειράματα παροδικής συνέκφρασης με GFP. Μάλιστα όσο διαρκεί το πείραμα αυτό (δηλαδή μέχρι την απόσβεση της έκφρασης GFP) δεν παρατηρούνται χλωρωτικά συμπτώματα στις κηλίδες αγροένχυσης. Τα συμπτώματα αυτά όποτε εμφανίζονται είναι αρκετά μεταγενέστερα και δεν επικαλύπτονται με τον φαινότυπο στην σίγηση. Σε άλλο πειραματικό σύστημα, η HorAB2 εμφανίζεται καταστολέας της έκφρασης του mir393 σε μεταγραφικό επίπεδο (Navarro et al., 2008). Πρέπει όμως να επισημανθούν δυο βασικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα δυο πειραματικά συστήματα. Η δική μας προσέγγιση αφορά τον ρόλο της HorAB2 σε μεταμεταγραφικό επίπεδο (s- PGTS) ενώ η προσέγγιση των Navarro και συνεργατών (2008) αφορά τον ρόλο της ίδιας πρωτεΐνης σε μεταγραφικό επίπεδο. Μια δεύτερη διαφοροποίηση είναι ότι ο δικός μας στόχος είναι να αποκαλύψουμε τον ρόλο της πρωτεΐνης HorAB2 στο παρακλάδι του μηχανισμού σίγησης που σχετίζεται με

παραγωγή siRNAs και όχι στο παρακλάδι των miRNAs όπως οι Navarro και συνεργατες (2008).

4.4.2.2.1 Αξιολόγηση ακρωτηριασμένων (*truncated*) κατασκευών *HopAB2*

Σε γενικές γραμμές πρέπει να σημειωθεί ότι στα πλαίσια αυτής της δέσμης πειραμάτων έγινε αξιολόγηση ελλείψεων που περιλαμβάνουν εκλεκτικά καθεμία των βιβλιογραφικά τεκμηριωμένων δομικών περιοχών του *HopAB2*. Υπερέκφραση κατασκευών στις οποίες απαλείφεται η επικράτεια E3 λιγάσης της ουβικουιτίνης αλλά διατηρείται η επικράτεια πρόσδεσης στον φυτικό υποδοχέα Pto δεν είναι δυνατόν να αξιολογηθούν με το πειραματικό μας σύστημα καθώς συνοδεύονται από νέκρωση ιστού στην περιοχή της αγγροένχυσης (Abramovitch et al., 2003).

Συνολικά, η αξιολόγηση των ελλείψεων αποκάλυψε ότι υπεύθυνη για την ενίσχυση σίγησης στο πειραματικό μας σύστημα είναι η επικράτεια E3 λιγάσης του *HopAB2*. Παρόμοια επίδραση είχαμε υποδείξει παλιότερα και για την επικράτεια E3 λιγάσης του *HopAB1* (Sarris et al., 2011). Η συγκριτική μελέτη στενών ομολόγων προσφέρει μια ευκαιρία για την μελέτη του φαινοτύπου ενίσχυσης σίγησης με στόχο τον εντοπισμό κρίσιμων επικρατειών, ενεργοτήτων και δομικών μοτίβων. Αν συνδυαστεί και με πειράματα στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης στα κρίσιμα συντηρημένα κατάλοιπα δομικών περιοχών από διαφορετικά ομόλογα όπως τα *HopAB2_{DC3000}* και *HopAB2_{B728a}* μπορεί να επιταχύνει την όλη διαδικασία σε μεγάλο βαθμό.

4.4.2.2.2 Αξιολόγηση Στοχευμένων σημειακών μεταλλαγών για *HopAB2*.

Οι βιβλιογραφικές αναφορές που προσπαθούν να συσχετίσουν τον σιγητικό φαινότυπο με κάποια συγκεκριμένη δομική και λειτουργική επικράτεια εκκρινόμενων από T3SS πρωτεϊνών είναι ελάχιστες και σποραδικές. Αξιοσημείωτη εξαίρεση αποτελεί η απόρριψη της υπόθεσης ότι η επικράτεια E3 λιγάσης της ουμπικουιτίνης της *HopAB2* σχετίζεται με καταστολή σίγησης (Navarro et al., 2008) ενώ στο δικό μας πειραματικό σύστημα παρατηρείται το αντίθετο. Όμως, η μελέτη των Navarro et al. (2008) περιορίστηκε σε μια μόνο στοχευμένη μεταλλαγή υποκατάστασης της *HopAB2* [*HopAB2*(F525A)]. Επίσης, δεν έγινε έλεγχος για τις υπόλοιπες λειτουργικές επικράτειες της πρωτεΐνης. Σε προηγούμενες μελέτες μας είχαμε συσχετίσει την ενεργότητα πρωτεάσης κυστεΐνης του *HopX1* με την ενίσχυση της σίγησης (Sarris et al., 2011). Για την κάλυψη του βιβλιογραφικού κενού για το *HopAB2* αξιολογήθηκαν μια σειρά από μεταλλαγές που καλύπτουν την επικράτεια E3 λιγάσης της πρωτεΐνης. Μεταλλαγές όπως η *HopAB2*(F479A) που ακυρώνουν την ενεργότητα E3 λιγάσης (Janjusevic et al., 2006) οδηγούν σε νεκρωτικό φαινότυπο σε φυτά w.t. *N. benthamiana* όπου πραγματοποιείται το δικό μας assay (Hamilton et al., 2002).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αυτο επιβεβαιώνει προηγούμενα ευρήματα σε φυτά *Solanum lycopersicon* (Janjusevic et al., 2006). Αντίθετα, σε φυτά *Arabidopsis* μεταλλαξιγένεση στο κατάλοιπο HorAB2(F479A) δεν συσχετίζεται με νεκρωτικούς φαινότυπους (Navarro et al., 2008). Για να παρακαμφθεί το πρόβλημα της νέκρωσης που παρατηρείται στις δικές μας βιοδοκιμές, χρησιμοποιήθηκε μια διαφορετική προσέγγιση.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν σημειακές μεταλλαγές στην επικράτεια της E3 λιγάσης του HorAB2 με «ηπιότερο» φαινότυπο όπως η HorAB2(K512R) και HorAB2(K529R). Τα κατάλοιπα αυτά σχετίζονται με την αλληλεπίδραση HorAB2-ουμπικουϊτίνης και είναι στόχοι ουμπικουϊτινιλίωσης (Abramovitch et al., 2006). Οι μεταλλαγές K=>R επάγουν μια ήπια και αργή-καθυστερημένη HR. Έχουν σημαντικά μειωμένες αντιαποπτωτικές ικανότητες σε σχέση με την αγρίου τύπου πρωτεΐνη αλλά όχι εκμηδενισμένες όπως το HorAB2(F489A) (Abramovitch et al., 2006). Επιπλέον έχουν σημαντικά μειωμένη αλλά όχι μηδενική ενεργότητα E3 λιγάσης. Αντίθετα, η μεταλλαγή HorAB2(F489A) έχει μηδενική ενεργότητα E3 λιγάσης. Η χρήση της φωσφομμητικής μεταλλαγής HorAB2(T450D) έχει τον ίδιο φαινότυπο με την HorAB2(F479A) (Ntoukakis et al., 2009). Ενέχει λοιπόν τον σοβαρό κίνδυνο να πυροδοτήσει HR μετά από αγροεμποτισμό. Έτσι τελικά απορρίφθηκε από τον κατάλογο των προς χρήση μεταλλαγών αν και έχει μικρότερες πιθανότητες να επηρεάσει την τριτοταγή δομή του μορίου συγκριτικά με τις υποκαταστάσεις φαινυλαλανίνης σε αλανίνη της E3 λιγάσης.

Το βασικό συμπέρασμα που προκύπτει από αυτήν την δέσμη πειραμάτων είναι ότι σημειακές μεταλλαγές του HorAB2 που σχετίζονται με απώλεια λειτουργίας E3 λιγάσης και απώλεια αντιαποπτωτικών ιδιοτήτων της, σχετίζονται επίσης με αντιστροφή του φαινοτύπου ενίσχυσης της σίγησης. Ουδέτερες μεταλλαγές ή μεταλλαγές «αυξημένης λειτουργίας» διατηρούν τον φαινότυπο ενίσχυσης σίγησης.

Σε επόμενο στάδιο, χρήσιμο θα ήταν να αξιολογηθεί και η σημειακή μεταλλαγή HorAB1(Y525A) για δραστικότητα E3 λιγάσης της ομόλογης πρωτεΐνης HorAB1. Το πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης οφείλεται στο γεγονός ότι η πρωτεΐνη HorAB1 δεν προσδέεται σε Pto όποτε δεν δίνει νεκρωτικό φαινότυπο στα χρονικά πλαίσια των πειραμάτων συνέγχυσης με GFP⁴⁵.

⁴⁵ Αντίθετα, το κατάλοιπο S258 του HorAB2 είναι ένα από τα ελάχιστα κρίσιμα λειτουργικά αμινοξέα του που δεν είναι συντηρημένα στην HorAB1. Θα μπορούσε να γίνει υποκατάσταση του καταλοίπου αυτού στην HorAB2 (S258A) αλλά και αντικατάσταση του αντιστοίχου μη συντηρημένου καταλοίπου H258 στην HorAB1 με σερίνη (H258S). Η αντιστροφή υποκατάσταση στην HorAB1 δίνει την δυνατότητα συγκριτικής μελέτης των

Τα πειράματα που μέχρι τώρα έγιναν επιβεβαιώνουν την συσχέτιση μεταξύ α) ενζυμικών ενεργοτήτων που σχετίζονται με αναστολή της HR και β) αυτών που σχετίζονται με ενίσχυση της σίγησης. Έτσι, η ενεργότητα E3 λιγάσης ουμπικουϊτίνης έχει κατασταλτικό ρόλο στον κυτταρικό θάνατο. Μειωμένη ενεργότητα E3 λιγάσης θα οδηγήσει σε αντιστροφή του φαινοτύπου ενίσχυσης σίγησης και στην «επιτάχυνση» του κυτταρικού θανάτου. Σε μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη όπως η HorAB2 μπορεί να συνυπάρχουν διάφορες λειτουργίες. Η ισορροπία μεταξύ των διαφόρων αυτών λειτουργιών μπορεί να καθορίζει την τελική επίδραση της πρωτεΐνης. Από τα μέχρι τώρα πειράματα δεν υπάρχει διαχωρισμός ανάμεσα στην γνωστή ενζυμική ενεργότητα της HorAB2 και του ρόλου της στην σίγηση. Όμως είναι πιθανό και άλλες περιοχές της πρωτεΐνης να σχετίζονται με ενίσχυση της σίγησης και να έχουν ανταγωνιστικό ρόλο με την ενεργότητα της E3 λιγάσης ουμπικουϊτίνης. Η υπόθεση αυτή ευθυγραμμίζεται με τις παρατηρήσεις ότι για την καταστολή της έκφρασης κάποιων miRNA γονιδίων δεν απαιτείται η ενεργότητα της E3 λιγάσης ουμπικουϊτίνης (Navarro et al., 2008). Στην μελέτη αυτή, η ανασταλτική δράση του HorAB2 στην σίγηση σχετίζεται μόνο με καταστολή μεταγραφής miRNA. Σε αντίθεση όμως με την μελέτη αυτή (Navarro et al., 2008), στην παρούσα μελέτη αποδεικνύεται ότι έχει έναν γενικότερο ρόλο στον μηχανισμό της σίγησης. Ο ρόλος αυτός είναι ανεξάρτητος από αυτόν που είχε προηγουμένως αναφερθεί. Σε άλλα συστήματα ο HorAB2 είχε χαρακτηριστεί ως καταστολέας HR (Abramovich et al., 2003) και οι δικές μας παρατηρήσεις δείχνουν ότι έχει και μια δεύτερη λειτουργία. Οι δυο λειτουργίες σχετίζονται με την ίδια επικράτεια της πρωτεΐνης.

4.5 Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στον κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από p19, HorAB2 και NorT.

Ένα πολύ ενδιαφέρον συμπέρασμα είναι ότι χρησιμοποιώντας τρία εντελώς διαφορετικά πειραματικά συστήματα [α)παροχή καθαρής HrpZ, β) έκφραση του HorA1 (παράγοντα anr) σε βακτηριακά κύτταρα και ένχυση του και γ)παροδική έκφραση στο εσωτερικό φυτικών κυττάρων] παρατηρούμε την ίδια τάση. Δηλαδή και στις τρεις περιπτώσεις η σίγηση είναι αρνητικός ρυθμιστής του κυτταρικού θανάτου. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη ενός κοινού μηχανισμού δράσης και στις τρεις περιπτώσεις.

Επιπλέον, η επιβεβαίωση των ίδιων φαινοτύπων με διαφορετικούς επαγωγείς HR, υποδεικνύει ότι ο μηχανισμός σίγησης δεν έχει μεμονωμένη επίδραση σε κάποια “εξωτικά” συστήματα. Αντίθετα, είναι κεντρικός διακόπτης μηχανισμών επαγωγής HR από

δυο ομολόγων μόνο αναφορικά με τυχόν διαφοροποιήσεις τους σχετικά με την ένταση του φαινοτύπου σίγησης .

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

διαφορετικούς επαγωγείς. Οι παρατηρούμενες επιμέρους διαφορές δεν είναι τόσο στην φύση, όσο στην ένταση και την χρονική στιγμή της εμφάνισης του φαινοτύπου.

Πιθανόν η συμβολή της σίγησης να μην είναι ικανή να αποτρέψει την νέκρωση στις περιπτώσεις κατά τις οποίες έχουμε ήδη εκδήλωση της. Εναλλακτικά, μπορεί να έχει προηγηθεί σηματοδότηση για παρεμπόδιση της σίγησης. Στις περιπτώσεις που περιγράφονται σε αυτήν την ενότητα παράγοντες (πρωτεΐνες-τελεστές) παθογόνων την έχουν τροποποιήσει κατά τέτοιο τρόπο (με αναστολή σίγησης) ώστε να μην μπορεί να ασκήσει την επίδραση της. Είναι πιθανόν, το φυτό να έχει προσαρμοστεί έτσι ώστε να αποτρέψει την εκδήλωση νέκρωσης εκτός και εάν δεν του έχουν απομείνει εναλλακτικές λύσεις. Η αποτροπή αυτή μπορεί να μεσολαβείται από μηχανισμούς όπως της RNA σίγησης. Πιθανόν αυτή είναι και η αχίλλειος πτέρνα που χρησιμοποιούν οι ενισχυτές της σίγησης για να παρακάμψουν την άμυνα του φυτού.

Από τα πειράματα αυτά φαίνεται ότι το φυτό έχει προσαρμοστεί ώστε να μετατρέπει έναν ισχυρό παράγοντα μολυσματικότητας των ιικών παθογόνων σε ισχυρό όπλο εναντίον τους.

Το γεγονός ότι υπάρχουν παράγοντες που στο ένα σύστημα δρουν σαν αντ παράγοντες ενώ στο άλλο επιταχύνουν την HR μάλλον πρέπει να φαίνεται δικαιολογημένο. Αρκεί να αναλογιστεί κανείς ότι το φυτό έχει προσαρμοστεί ώστε ο ίδιος παράγοντας που αναγνωρίζεται ως αντ να άρει και τις επιπλέον δικλείδες ασφαλείας για την εκδήλωση του κυτταρικού θανάτου. Την ίδια επίδραση (άρση δευτερευόντων αρνητικών μηχανισμών της σηματοδότησης) θα έχει ο ίδιος παράγοντας και σε ένα άλλο ετερόλογο σύστημα. Μόνο που εδώ (επειδή δεν είναι ο ίδιος αντ παράγοντας) χρειάζεται έναν βοηθό παράγοντα για την επαγωγή της σηματοδότησης του κυτταρικού θανάτου.

Ως προς την αντίδραση νέκρωσης, ιικοί και βακτηριακοί παράγοντες με ίδια επίδραση στις σίγηση δρουν με κοινούς τρόπους στην HR. Η αποσαφήνιση αυτή, μας δίνει το πλεονέκτημα ότι οποιαδήποτε συμπεράσματα από το ένα πεδίο να είναι άμεσα αξιοποιήσιμα και στο άλλο. Ανεξάρτητα από τις επιμέρους προτιμήσεις του καθενός ως προς το πειραματικό σύστημα (ιικό ή βακτηριακό), δεν έχει τόσο σημασία η επιλογή του συστήματος που θα χρησιμοποιηθεί αλλά η επιλογή των ερωτημάτων.

Το NorT δεν είναι μόνο επαγωγέας νέκρωσης. Στην περίπτωση που το NorT δεν αναγνωρίζεται από τους μηχανισμούς απόκρισης του ξενιστή, τότε έχει παρεμφερή δράση με τον p19 στην «επιτάχυνση» καθυστερημένων νεκρώσεων. Η υπόθεση εργασίας είναι ότι το NorT είναι καταστολέας RNA σίγησης παρά την ουδέτερη απόκριση του στο πειραματικό

μας σύστημα. Το γεγονός ότι ριζοβιακές πρωτεΐνες δεν έχουν επίδραση σε αυτό το σύστημα σε καμία περίπτωση δεν υποδηλώνει ότι δεν έχουν αντίστοιχο ρόλο. Το σύστημα της παροδικής έκφρασης στα φύλλα είναι ακατάλληλο για πρωτεΐνες οι οποίες δρουν στην ρίζα. Άλλωστε το σύστημα αυτό έχει το μειονέκτημα ότι εμφανίζει πολλά **ψευδώς αρνητικά** σήματα στην περίπτωση παροδικών καταστολέων RNA σίγησης.

4.6 Ρόλος του μηχανισμού της σίγησης στην αποτροπή της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε υψηλές θερμοκρασίες.

Αρχικά πειράματα απέδειξαν την συσχέτιση του μηχανισμού της σίγησης με την αποτροπή της αντίδρασης υπερευαισθησίας που προκαλεί το HorABm σε υψηλές θερμοκρασίες. Σε υψηλές θερμοκρασίες, ο μηχανισμός της σίγησης είναι περισσότερο ενεργός (Kalantidis et al., 2002, Szittyga et al., 2003). Βέβαια για να είναι συμπερασματικά τα παραπάνω πειράματα θα πρέπει να επαναληφτούν και με την χρήση σαν μάρτυρα ενός ιικού καταστολέα της σίγησης όπως ο p38 ο οποίος δεν έχει δράση ή έχει κατασταλτική δράση στην εκδήλωση HR. Έτσι, θα απορριφτεί το ενδεχόμενο η δράση των αναστολέων να είναι απλά λόγω αυξημένης έκφρασης του HorAB2m. Εναλλακτικά, χρησιμοποιώντας το σύστημα της μεταφοράς μέσω *P. fluorescens* 55 (pLN18).

Πάντως, στον ίδιο μηχανισμό της αποτροπής HR σε υψηλές θερμοκρασίες συμμετέχουν τόσο ο μηχανισμός της σίγησης όσο και MAP κινάσες (Zhang & Klessig, 1998). Μάλιστα, το μονοπάτι των MAP κινάσων που αλληλεπιδρά με τον HorAB2 είναι από τα καλύτερα χαρακτηρισμένα. Το σύστημα αυτό μπορεί να μας δώσει την δυνατότητα να ελέγξουμε την ταυτόχρονη δράση MAP κινάσων, σίγησης και βακτηριακών πρωτεϊνών. Τελος, θα μπορούσε να έχει βιοτεχνολογικές εφαρμογές για τον αποτελεσματικότερο περιορισμό βακτηριακών μολύνσεων κατά τους καλοκαιρινούς μήνες ή σε τροπικά κλίματα.

4.7 Εύρεση νέων αντ παραγόντων από ιούς.

Διάφορες ιϊκές πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστεί αναστολείς της σίγησης χρησιμοποιώντας το σύστημα της παροδικής συνέκφρασης με GFP σε *N. benthamiana* 16c. Κάποιες από αυτές έχουν χαρακτηριστεί ταυτόχρονα σαν επαγωγείς αντίδρασης υπερευαισθησίας σε άλλα είδη φυτών. Έτσι π.χ. η περιοχή της ελικάσης του TMV (που αποτελεί τμήμα της p126) είναι υπεύθυνη για την επαγόμενη από N απόκριση σε *N. tabacum* cv. *Petit Havana* SR1 που εκφράζει το γονίδιο N (Les Erickson et al., 1999). Η ίδια η p126 (Ding et al., 2004; Kubota et al., 2003) είναι αναστολέας της σίγησης. Η πρωτεΐνη 2b του ιού TAV έχει χαρακτηριστεί ως ισχυρός αναστολέας της σίγησης σε *N. benthamiana* 16C (Lu et al., 2004). Ταυτόχρονα επάγει αντίδραση υπερευαισθησίας σε *N. tabacum* cv. *Samsun*

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

(Li et al., 1999). Ο p19 είναι αναστολέας της σίγησης (Lakatos et al., 2004) σε *N. benthamiana* 16c. Ταυτόχρονα, επάγει αντίδραση υπερευαισθησίας σε *N. tabacum* cv. *Turk* (Scholthof et al., 1995) και όπως επιβεβαιώνεται και σε αυτή την διατριβή και σε *N. tabacum* cv. *Xanthi* (όχι όμως σε *N. tabacum* cv. *Basma*). Ακόμα πιο ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι, στο φυτό *Datura stramonium*, αντίδραση υπερευαισθησίας δεν δίνει ο p19 αλλά το **RNA** της καψιδιακής πρωτεΐνης (CP) του ιού CymRSV (*Cymbidium ring spot virus*) (Szittyá & Burgyán, 2001). Στην περίπτωση αυτή δεν έχει αποσαφηνιστεί αν η ρύθμιση της αντίδρασης υπερευαισθησίας έχει γίνει μέσω μηχανισμού σίγησης. Ούτε έχει αποσαφηνιστεί αν ο p19 έχει θετική επίδραση στην όλη διαδικασία. Η προκαλούμενη από TCV (*turnip crinkle virus*) αντίδραση υπερευαισθησίας στην *Arabidopsis* σχετίζεται με την καψιδιακή πρωτεΐνη p38 του TCV (Zhao et al., 2000). Η πρωτεΐνη p38 είναι χαρακτηρισμένος αναστολέας σίγησης σε *N. benthamiana* 16c (Qu et al., 2003). Βέβαια, σε κάποιες από τις προαναφερθείσες περιπτώσεις, έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει αντίστοιχο R γονίδιο όπως το N για την ελικάση του TMV (Erickson et al., 1999) και το HRT για την p38 (Cooley et al., 2000; Ren et al., 2000). Θεωρείται βέβαιο ότι υπάρχει και στις υπόλοιπες περιπτώσεις αν και είναι ακόμα άγνωστο. Η αναστολή σίγησης που έχει ενισχυτική δράση στην εκδήλωση HR θα μπορούσε να λειτουργήσει σαν συμπληρωματικός μηχανισμός. Θα μπορούσε επιπλέον να εξηγήσει την προσαρμογή του ξενιστή ώστε *avr* γονίδια να ενισχύουν την HR που προκαλούν μέσω συμπληρωματικών μηχανισμών. Βέβαια, θα ήταν απίθανο ένα φυτό να έχει προσαρμοστεί ώστε να φέρει R γονίδια για πρωτεΐνες από ζωικούς ιούς. Ίσως, η εμφάνιση HR σε αυτή την περίπτωση να οφείλεται εξολοκλήρου στην αρνητική ρύθμιση της σίγησης. Ειδικά στην περίπτωση του p38, δεν υπάρχει θετική επίδραση στην ενίσχυση της HR αλλά μηδενική έως και ανασταλτική. Η ανασταλτική δράση του έχει παρατηρηθεί και από άλλες ομάδες (Jyoti, 2007). Έχει όμως επίσης αποδειχθεί ότι ειδικά στην περίπτωση αυτή η ικανότητα σίγησης και η επαγωγή αντίδρασης υπερευαισθησίας είναι διακριτές διαδικασίες (Choi et al., 2004).

Επιπλέον έχει αποδειχθεί (Rinne et al., 2005) ότι υπερέκφραση της πρωτεΐνης NSm (movement protein, MP) του ιού TSWV (*tomato spotted wilt virus*) είναι ικανή να αναπαράγει συμπτώματα της μόλυνσης με τον ιό. Η εκδήλωση των συμπτωμάτων αυτών είναι αποτέλεσμα της επαγωγής της βασικής άμυνας του φυτού. Η πρωτεΐνη NSs, παράγων αμολυσματικότητας (*Avr*) του TSWV είναι χαρακτηρισμένη και σαν αναστολέας της σίγησης ενώ ενισχύει και την εκδήλωση συμπτωμάτων (Bucher et al., 2003) πιθανώς αλληλεπιδρώντας με τους μηχανισμούς της βασικής άμυνας του φυτού.

4.8 Ρόλος των ιικών αναστολέων σίγησης στην επαγωγή της αντίδρασης υπερευαισθησίας.

Η επαγωγή αντίδρασης υπερευαισθησίας στην περίπτωση της καθαρισμένης Hr₂Z και πρωτεϊνών-τελεστών που παρέχονται από *Pseudomonas* δεν προϋποθέτει έκφραση πρωτεΐνης-τελεστή στο εσωτερικό των φυτικών κυττάρων. Έτσι, δεν αναμένεται η ύπαρξη αναστολέων της σίγησης να ενισχύει με κάποιο τρόπο την έκφραση τους. Αυτό θα μπορούσε να συμβαίνει στην περίπτωση την παροδικής συνέκφρασης μέσω αγροεγχύσεων. Δηλαδή, μια πρωτεΐνη που δρα ως αναστολέας σίγησης θα βοηθούσε στην αύξηση των επιπέδων παροδικής έκφρασης του επαγωγέα HR και να ενίσχυε με αυτό τον τρόπο την επαγωγή της αντίδρασης. Αν παραδεχτούμε αυτή την εκδοχή θα έπρεπε όλοι οι αναστολείς της σίγησης να ενισχύουν /επιταχύνουν την HR. Δυο αναστολείς με ίδιο βαθμό επίδρασης στον μηχανισμό σίγησης αλλά διαφορετικό μηχανισμό λειτουργίας είναι π.χ. οι Hc_Pro και p38. Χρησιμοποιώντας τους κατά αντιπαραβολή, αποδείχθηκε ότι η επίδραση τους στην επιτάχυνση της νέκρωσης δεν είναι η ίδια. Αυτό συνιστά ένδειξη αντίθετη με το ανωτέρω σενάριο. Η επίδραση των δυο αυτών αναστολέων είναι ίδια είτε σαν επαγωγέας HR χρησιμοποιηθεί βακτηριακή είτε ιική πρωτεΐνη. Αυτό υποδηλώνει ξανά τα κοινά σημεία των μηχανισμών απόκρισης στις δυο αυτές κατηγορίες επαγωγέων σίγησης.

Η μάλλον αντίστροφη δράση του p38 έρχεται σε συμφωνία με παρατηρήσεις άλλων εργαστηρίων (Jyoti, 2007). Στις εργασίες αυτές ο p38 επίσης παρουσιάζεται μάλλον σαν αναστολέας κυτταρικού θανάτου πάρα ως επιταχυντής. Παρόμοια είναι ίσως και η περίπτωση της sigma3. Η sigma3 επίσης προσδένεται σε μεγάλα δίκλινα (Lichner et al., 2003). Όμως, στην περίπτωση αυτή δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα επειδή η ίδια πρωτεΐνη είναι και επαγωγέας HR. Από την άλλη πλευρά, η επίδραση του p19 ως αναστολέα σίγησης είναι ισχυρή σε *N. benthamiana*. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με το σενάριο που θέλει να υπάρχει ανάγκη άλλης πρωτεΐνης (π.χ. HC-Pro) για την αύξηση των επιπέδων έκφρασης της και την επιτάχυνση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (περίπτωση συνέκφρασης HC-Pro και p19).

4.9 Υπόθεση εργασίας για τον ρόλο της σίγησης στις αλληλεπιδράσεις φυτοπαθογόνων με ξενιστές.

Στις περιπτώσεις που αναφέρονται παραπάνω η σίγηση είναι αρνητικός ρυθμιστής στην πυροδότηση κυτταρικού θανάτου. Η σίγηση φαίνεται ότι έχει έναν γενικότερο ρόλο στην παρεμπόδιση ή επιβράδυνση του κυτταρικού θανάτου. Ένα ενδιαφέρον ερώτημα είναι η ερμηνεία του φαινομένου αυτού. Σε συμβατές αλληλεπιδράσεις, το παθογόνο δεν επάγει αμυντικούς μηχανισμούς του φυτού εκτός της ΡΤΙ. Συχνά, σε συμβατές

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

αλληλεπιδράσεις βιότροφων παθογόνων, όπως της η *P. syringae*, με ευπαθείς ξενιστές παρατηρούνται χλωρωτικά και νεκρωτικά συμπτώματα. Τα συμπτώματα αυτά συνήθως εμφανίζονται μετά την ολοκλήρωση της περιόδου πολλαπλασιασμού του βακτηρίου (Preston, 2000). Σε κάποιες περιπτώσεις, τα συμπτώματα αυτά μπορεί να έχουν κρίσιμο ρόλο στην επιδημιολογία της ασθένειας, π.χ. στην απελευθέρωση των βακτηρίων πάνω στην επιφάνεια του φύλλου και την περαιτέρω διασπορά τους (Guttman & Greenberg, 2001). Η αντίδραση υπερευαισθησίας και η νέκρωση σε προχωρημένα στάδια βακτηριακής μόλυνσης έχουν κοινά μακροσκοπικά χαρακτηριστικά (Yao & Greenberg, 2006), μοιράζονται κοινούς μηχανισμούς σηματοδότησης (del Pozo et al., 2004) αλλά φυσικά διαφέρουν ως προς την χρονική στιγμή της εμφάνισης (Greenberg & Yao, 2004; Vinatzer et al., 2006).

Μια ενδιαφέρουσα υπόθεση είναι η σίγηση να παίζει ρόλο και στις νεκρώσεις που εξελίσσονται καθυστερημένα στις συμβατές αλληλεπιδράσεις. Εδώ ο ρόλος της σίγησης θα μπορούσε να είναι η επιβράδυνση και η εξασθένηση του κυτταρικού θανάτου μέχρι το χρονικό σημείο ώστε να είναι πλέον ευεργετική με το παθογόνο. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, η ενίσχυση (μέσω αναστολής σίγησης) μονοπατιών κυτταρικού θανάτου από πρωτεΐνες-τελεστές θα έπρεπε να είναι μια γρήγορη διαδικασία αλλά ταυτόχρονα και παροδική. Η ταχύτητα είναι απαραίτητη για να αποφευχθεί εκδήλωση της αντίδρασης υπερευαισθησίας σε αρχικό στάδιο της μόλυνσης. Η παροδικότητα είναι απαραίτητη για την εκδήλωση νέκρωσης σε μεταγενέστερο στάδιο της μόλυνσης. Πράγματι, σύμφωνα με τις παρατηρήσεις μας, η ενίσχυση της σίγησης γίνεται αντιληπτή σε πολύ πρώιμη χρονική στιγμή μετά την αγροένχυση. Από την άλλη πλευρά, η διάρκεια της δεν υπερβαίνει τις λίγες μέρες. Εξίσου παροδική είναι και η καταστολή της σίγησης από βακτηριακές πρωτεΐνες. Αυτό έρχεται σε πλήρη αντίθεση με κάποιους καταστολείς της σίγησης από ιούς στους οποίους η καταστολή σίγησης διαρκεί πολύ περισσότερο. Αυτό σε πρώτη ανάγνωση φαίνεται παράδοξο εκτός και εάν το δούμε μέσα από το πρίσμα που περιγράψαμε παραπάνω.

Το τελεολογικό μοντέλο που αναλύθηκε παραπάνω είναι συμβατό με την εμφάνιση καθυστερημένου κυτταρικού θανάτου μετά το πέρας της περιόδου ενίσχυσης της σίγησης από βακτηριακούς πρωτεΐνες-τελεστές. Εξηγεί την εμφάνιση καθυστερημένου κυτταρικού θανάτου αρκετές μέρες μετά την απόσβεση της ενίσχυσης της σίγησης από μια εκκρινόμενη βακτηριακή πρωτεΐνη-τελεστή. Μάλιστα το ίδιο μοντέλο θα μπορούσε να δικαιολογήσει την συνύπαρξη χλωρωτικών/νεκρωτικών συμπτωμάτων και ενίσχυσης σίγησης μετά από μόλυνση με εκκρινόμενη πρωτεΐνη-ενισχυτή σίγησης. Η εξήγηση

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

βρίσκεται στην αδυναμία πλήρους καταστολής κυτταρικού θανάτου μέσω ενίσχυσης σίγησης από πρωτεΐνες-τελεστές. Βέβαια σε περιπτώσεις νεκρότροφων οργανισμών (όπως π.χ. νεκρότροφων μυκήτων) η θετική ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου μέσω καταστολέων της σίγησης (suppressors) θα είχε σαφώς θετικά πλεονεκτήματα για το φυτοπαθογόνο.

Βιβλιογραφία

- Abramovitch R, Janjusevic, R., Stebbins C Eric and Gregory BMartin (2006). Type III effector AvrPtoB requires intrinsic E3 ubiquitin ligase activity to suppress plant cell death and immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2851-2856
- Abramovitch R, Kim Y-J, Chen S, Dickman M, Martin G (2003). Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *The EMBO journal* 22: 60-69
- Agorio A, Vera P (2007). ARGONAUTE4 is required for resistance to Pseudomonas syringae in Arabidopsis. *The Plant cell* 19: 3778-3790
- Almeida N, Yan S, Lindeberg M, Studholme D, Schneider D, Condon B, Liu H, Viana C, Warren A, Evans C, Kemen E, Maclean D, Angot A, Martin G, Jones J, Collmer A, Setubal J, Vinatzer B (2009). A draft genome sequence of Pseudomonas syringae pv. tomato T1 reveals a type III effector repertoire significantly divergent from that of Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000. *MPMI* 22: 52-62
- Alfano JR, Kim H-S, Delaney TP, Collmer A (1997). Evidence that the Pseudomonas syringae pv. syringae hrp-linked hrmA gene encodes an Avr-like protein that acts in an hrp-dependent manner within tobacco cells. *MPMI* 10: 580-588
- Alwine J, Kemp D, Stark G (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5350-5354
- Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, Herr J, Mau C, Mallory A, Pruss G, Bowman L, Vance V (2000). A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science (New York, NY)* 290: 142-144
- Andersson M, Haasnoot P, Xu N, Berenjian S, Berkhout B, Akusjärvi G (2005). Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *Journal of virology* 79: 9556-9565
- Angel C, Hsieh Y-C, Schoelz J (2011). Comparative analysis of the capacity of tombusvirus P22 and P19 proteins to function as avirulence determinants in Nicotiana species. *MPMI* 24: 91-99
- Angel C, Schoelz J (2013). A survey of resistance to Tomato bushy stunt virus in the genus Nicotiana reveals that the hypersensitive response is triggered by one of three different viral proteins. *MPMI* 26: 240-248
- Ansel K, Pastor W, Rath N, Lapan A, Glasmacher E, Wolf C, Smith L, Papadopoulou N, Lamperti E, Tahiliani M, Ellwart J, Shi Y, Kremmer E, Rao A, Heissmeyer V

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(2008). Mouse Eri1 interacts with the ribosome and catalyzes 5.8S rRNA processing. *Nature structural & molecular biology* **15**: 523-530

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. doi: 10.1093/bioinformatics/bti770

Austin MJ, Muskett P, Kahn K, Feys BJ, Jones JD, Parker JE (2002). Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses. *Science* **295**: 2077-2080

Axtell MJ, Chisholm ST, Dahlbeck D, Staskawicz BJ (2003). Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Molecular microbiology* **49**: 1537-1546

Azevedo C, Sadanandom A, Kitagawa K, Freialdenhoven A, Shirasu K, Schulze-Lefert P (2002). The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science*, 295(5562), 2073-2076

Azevedo J, Garcia D, Pontier D, Ohnesorge S, Yu A, Garcia S, Braun L, Bergdoll M, Hakimi M, Lagrange T, Voinnet O (2010). Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes & development* **24**: 904-915

Baumberger N, Tsai C-H, Lie M, Havecker E, Baulcombe D (2007). The Ploverovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Current biology* **17**: 1609-1614

Bent AF, Mackey D (2007). Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol* **45**: 399-436

Birnboim H, Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* **7**: 1513-1523

Blanco L, Salas M (1984). Characterization and purification of a phage phi 29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 5325-5329

Block A, Li G, Fu Z, Alfano J (2008). Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current opinion in plant biology* **11**: 396-403

Boccardo M, Sarazin A, Billoud B, Jolly V, Martienssen R, Baulcombe D, Colot V (2007). New approaches for the analysis of *Arabidopsis thaliana* small RNAs. *Biochimie* **89**: 1252-1256

Boccardo M, Sarazin A, Thiébeauld O, Jay F, Voinnet O, Navarro L, Colot V (2014) 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). e1003883

Bocsanczy A, Schneider D, DeClerck G, Cartinhour S, Beer S (2012). HopX1 in *Erwinia amylovora* functions as an avirulence protein in apple and is regulated by HrpL. *Journal of bacteriology* **194**: 553-560

- Boller T, Felix G (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology* **60**: 379-406
- Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu J-K (2005). Endogenous siRNAs Derived from a Pair of Natural cis-Antisense Transcripts Regulate Salt Tolerance in Arabidopsis. *Cell* **123**: 1279-1291
- Bortolamiol D, Pazhouhandeh M, Marrocco K, Genschik P, Ziegler-Graff V (2007). The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Current biology* **17**: 1615-1621
- Braman J, Papworth C, Greener A (1996). Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **57**: 31-44
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O (2008). Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* **320**: 1185-1190
- Brosnan C, Mitter N, Christie M, Smith N, Waterhouse P, Carroll B (2007). Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 14741-14746
- Brosnan C, Voinnet O (2011). Cell-to-cell and long-distance siRNA movement in plants: mechanisms and biological implications. *Current opinion in plant biology* **14**: 580-587
- Brown T, Mackey K, Du T (2004). Analysis of RNA by Northern and slot blot hybridization. *Current protocols in molecular Biology*. Chapter 4:Unit 4.9
- Bucher E, Hemmes H, de Haan P, Goldbach R, Prins M (2004). The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *The Journal of general virology* **85**: 983-991
- Bucher E, Sijen T, de Haan P, Goldbach R, Prins M (2003). Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *Journal of virology* **77**: 1329-1336
- Burnette W (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry* **112**: 195-203
- Burgess A, Vigneron S, Brioude E, Labbé J-C, Lorca T, Castro A (2010) Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 12564-12569

- Cao F, Li X, Hiew S, Brady H, Liu Y, Dou Y (2009). Dicer independent small RNAs associate with telomeric heterochromatin. *RNA (New York, NY)* **15**: 1274-1281
- Carpenter, C. D., & Simon, A. E. (1998). Preparation of RNA. In *Arabidopsis Protocols* (pp. 85-89). Humana Press.
- Carte J, Wang R, Li H, Terns R, Terns M (2008) Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes & development* **22**: 3489-3496
- Chan S, Zilberman D, Xie Z, Johansen L, Carrington J, Jacobsen S (2004). RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science* **303** (5662): 1336-1336.
- Chang J, Urbach J, Law T, Arnold L, Hu A, Gombar S, Grant S, Ausubel F, Dangl J (2005a). A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 2549-2554
- Chao J, Lee J, Chapados B, Debler E, Schneemann A, Williamson J (2005). Dual modes of RNA-silencing suppression by Flock House virus protein B2. *Nature structural & molecular biology* **12**: 952-957
- Chapman E, Prokhnovsky A, Gopinath K, Dolja V, Carrington J (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes & development* **18**: 1179-1186
- Chellappan P, Vanitharani R, Fauquet C (2005). MicroRNA-binding viral protein interferes with Arabidopsis development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 10381-10386
- Chen J, Li W, Xie D, Peng J, Ding S (2004). Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *The Plant cell* **16**: 1302-1313
- Chen Z, Kloek AP, Cuzick A, Moeder W, Tang D, Innes RW, Klessig DF, McDowell JM, Kunkel BN (2004). The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 functions downstream or independently of SA to promote virulence on *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **37**: 494-504
- Chen S, Songkumarn P, Liu J, Wang G-L (2009). A versatile zero background T-vector system for gene cloning and functional genomics. *Plant physiology* **150**: 1111-1121
- Chen Z, Agnew JL, Cohen JD, He P, Shan L, Sheen J, Kunkel BN (2007). *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 20131-20136

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Chen Z, Kloek A, Boch J, Katagiri F, Kunkel B (2000). The *Pseudomonas syringae* avrRpt2 gene product promotes pathogen virulence from inside plant cells. *MPMI* **13**: 1312-1321
- Choi MS, Kim W, Lee C, Oh CS. (2013). Harpins, multifunctional proteins secreted by gram-negative plant-pathogenic bacteria. *MPMI* 26 (10): 1115-22.
- Choi CW, Qu F, Ren T, Ye X, Morris TJ (2004). RNA silencing-suppressor function of Turnip crinkle virus coat protein cannot be attributed to its interaction with the Arabidopsis protein TIP. *Journal of general virology* **85**: 3415-3420
- Chomczynski P (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15 (3): 532-4.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**: 156-159
- Chory J, Pollard J (2001). Separation of small DNA fragments by conventional gel electrophoresis. *Current protocols in molecular biology*. **Chapter 2**
- Cohn J, Martin G (2005). *Pseudomonas syringae* pv. tomato type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant J.* **44**: 139-154
- Cole A, Király L, Ross K, Schoelz J (2001). Uncoupling resistance from cell death in the hypersensitive response of *Nicotiana* species to cauliflower mosaic virus infection. *MPMI* **14**: 31-41
- Collmer A, Badel JL, Charkowski AO, Deng W-L, Fouts DE, Ramos AR, Rehm AH, Anderson DM, Schneewind O, van Dijk K (2000). *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 8770-8777
- Collmer, A, Badel JL, Charkowski, AO, Deng W-L, Fouts DL, Ramos AR, Rehm AH, Anderson DM, Schneewind O, van Dijk K, and Alfano JR I 2000). *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *PNAS*. 97: 8770–8777.
- Cooley M, D'Souza M, Kado C (1991). The virC and virD operons of the *Agrobacterium* Ti plasmid are regulated by the ros chromosomal gene: analysis of the cloned ros gene. *Journal of bacteriology* **173**: 2608-2616
- Cooley M, Pathirana S, Wu H, Kachroo P, Klessig D (2000). Members of the Arabidopsis HRT/RPP8 family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *The Plant cell* **12**: 663-676
- Csorba T, Lózsa R, Hutvágner G, Burgyán J (2010). Ploverovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant J.* **62**: 463-472

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Cuppels D (1986). Generation and Characterization of Tn5 Insertion Mutations in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Applied and environmental microbiology* **51**: 323-327
- Curaba J, Chen X (2008). Biochemical activities of Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerase 6. *The Journal of biological chemistry* **283**: 3059-3066
- da Cunha L, Sreerekha M-V, Mackey D (2007). Defense suppression by virulence effectors of bacterial phytopathogens. *Current opinion in plant biology* **10**: 349-357
- Dai W-J, Zeng Y, Xie Z-P, Staehelin C (2008). Symbiosis-promoting and deleterious effects of NopT, a novel type 3 effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Journal of bacteriology* **190**: 5101-5110
- Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe D (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in Arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**: 543-553
- de Torres-Zabala M, Truman W, Bennett M, Lafforgue G, Mansfield J, Rodriguez Egea P, Bögre L, Grant M (2007). *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *The EMBO journal* **26**: 1434-1443
- de Torres M, Mansfield J, Grabov N, Brown I, Ammouneh H, Tsiamis G, Forsyth A, Robatzek S, Grant M, Boch J (2006). *Pseudomonas syringae* effector AvrPtoB suppresses basal defence in Arabidopsis. *Plant J.* **47**: 368-382
- Dean P, Kenny B (2009). The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Current opinion in microbiology* **12**: 101-109
- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic acids research* **13**: 4777-4788
- del Pozo O, Pedley K, Martin G (2004). MAPKKK α is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. *The EMBO journal* **23**: 3072-3082
- Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* **313**: 68-71
- Delgado MO (2004). Human influenza virus NS1 protein enhances viral pathogenicity and acts as an RNA silencing suppressor in plants. *Journal of General Virology* **85** (4): 993-999.
- Dellaporta SL, Jonathan W, James BH (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **4**: 19-21

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Denancé N, Sánchez-Vallet A, Goffner D, Molina A (2013). Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in plant science* **4** (155): 1-12

Desikan R, Hancock JT, Ichimura K, Shinozaki K, Neill SJ (2001). Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiology* **126**: 1579-1587

Deslandes L, Rivas S (2012). Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends in plant science* **17**: 644-655

Diaz-Pendon J, Li F, Li W-X, Ding S-W (2007). Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *The Plant cell* **19**: 2053-2063

Dieffenbach CW, Dveksler GS (2003). *PCR primer: a laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Ding XS, Liu J, Cheng N-H, Folimonov A, Hou Y-M, Bao Y, Katagi C, Carter SA, Nelson RS (2004). The Tobacco mosaic virus 126-kDa protein associated with virus replication and movement suppresses RNA silencing. *MPMI* **17**: 583-592

Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR (1980). Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**: 7347-7351

Dong H, Delaney TP, Bauer DW, Beer SV (1999). Harpin induces disease resistance in Arabidopsis through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. *Plant J.* **20**: 207-215

Dong J, Xiao F, Fan F, Gu L, Cang H, Martin G, Chai J (2009). Crystal structure of the complex between *Pseudomonas* effector AvrPtoB and the tomato Pto kinase reveals both a shared and a unique interface compared with AvrPto-Pto. *The Plant cell* **21**: 1846-1859

Dong X, Mindrinos M, Davis K, Ausubel F (1991). Induction of Arabidopsis defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains and by a cloned avirulence gene. *The Plant cell* **3**: 61-72

Dorokhov YL, Frolova OY, Skurat EV, Ivanov PA, Gasanova TV, Sheveleva AA, Ravin NV, Makinen KM, Klimyuk VI, Skryabin KG, Gleba YY, Atabekov JG (2006). A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the enhancer of RNA silencing. *FEBS letters* **580**: 3872-3878

Dower W, Miller J, Ragsdale C (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic acids research* **16**: 6127-6145

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Dugaiczky A, Boyer H, Goodman H (1975). Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *Journal of molecular biology* **96**: 171-184
- Dunoyer P, Himber C, Ruiz-Ferrer V, Alioua A, Voinnet O (2007). Intra- and intercellular RNA interference in *Arabidopsis thaliana* requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways. *Nature genetics* **39**: 848-856
- Dunoyer P, Himber C, Voinnet O (2005). DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nature genetics* **37**: 1356-1360
- Dunoyer P, Himber C, Voinnet O (2006). Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections. *Nature genetics* **38**: 258-263
- Dunoyer P, Lecellier C-H, Parizotto E, Himber C, Voinnet O (2004). Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *The Plant cell* **16**: 1235-1250
- Ebhardt H, Thi E and M. Wang (2005). Extensive 3' modification of plant small RNAs is modulated by helper component-proteinase expression. *PNAS* 102 (38): 13398–13403
- Ekgren S, Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar S, Martin G (2003). Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *Plant J.* **36**: 905-917
- Ellendorff U, Fradin EF, de Jonge R, Thomma BP (2009). RNA silencing is required for *Arabidopsis* defence against *Verticillium* wilt disease. *Journal of experimental botany* **60**: 591-602
- Erickson F, Dinesh-Kumar S, Holzberg S, Ustach C, Dutton M, Handley V, Corr C, Baker B (1999). Interactions between tobacco mosaic virus and the tobacco N gene. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **354**: 653-658
- Espinosa A, Guo M, Tam VC, Fu ZQ, Alfano JR (2003). The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Molecular microbiology* **49**: 377-387
- Ezra D, Barash I, Valinsky L, Manulis S (2000). The dual function in virulence and host range restriction of a gene isolated from the pPATH (Ehg) plasmid of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. *MPMI* **13**: 683-692
- Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangl JL, Carrington JC (2007). High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PloS one* **2**: e219

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Figurski DH, Helinski DR (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 1648-1652
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**: 4803-4807
- Fu Z, Guo M, Jeong B-r, Tian F, Elthon T, Cerny R, Staiger D, Alfano J (2007). A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* **447**: 284-288
- Fulton TM, Julapark C, Steven DT (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Molecular Biology Reporter* **13**: 207-209
- Gabel H, Ruvkun G (2008). The exonuclease ERI-1 has a conserved dual role in 5.8S rRNA processing and RNAi. *Nature structural & molecular biology* **15**: 531-533
- Gabriëls SH, Takken FL, Vossen JH, de Jong CF, Liu Q, Turk SC, Wachowski LK, Peters J, Witsenboer HM, de Wit PJ (2006). cDNA-AFLP combined with functional analysis reveals novel genes involved in the hypersensitive response. *MPMI* **19**: 567-576
- Gal-On A, Shibolet Y (2006). Cross-protection. *Natural resistance mechanisms of plants to viruses* (Loebenstein, Gad, and John Peter Carr, eds.). Springer
- Gallagher S (2008). Immunoblotting and immunodetection. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 8:Unit 8.10, doi: 10.1002/0471142735.im0810s83
- Gallagher SR (2006). One Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. *Current protocols in molecular biology*. Chapter 10: Unit 10.2 A
- Garcia-Ruiz H, Takeda A, Chapman E, Sullivan C, Fahlgren N, Brempelis K, Carrington J (2010). Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *The Plant cell* **22**: 481-496
- Gassmann W (2005). Natural variation in the Arabidopsis response to the avirulence gene hopPsyA uncouples the hypersensitive response from disease resistance. *MPMI* **18**: 1054-1060
- Gatz C, Frohberg C, Wendenburg R (1992). Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants. *Plant J.* **2**: 397-404
- Ghildiyal M, Zamore P (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature reviews Genetics* **10**: 94-108
- Giner A, Lakatos L, García-Chapa M, López-Moya J, Burgyán J (2010). Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS pathogens* **6** (7): e1000996

- Gleave A (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant molecular biology* **20**: 1203-1207
- Glick E, Zrachya A, Levy Y, Mett A, Gidoni D, Belausov E, Citovsky V, Gafni Y (2008). Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 157-161
- Glickmann E, Gardan L, Jacquet S, Hussain S, Elasri M, Petit t A, Dessaux Y (1998). Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *MPMI* **11**: 156-162
- Göhre V, Spallek T, Häweker H, Mersmann S, Mentzel T, Boller T, de Torres M, Mansfield J, Robatzek S (2008). Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Current biology* **18**: 1824-1832
- Goodin M, Zaitlin D, R Naidu (2008). *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *MPMI* 21(8): 1015–1026
- Gopalan S (2008). Reversal of an immunity associated plant cell death program by the growth regulator auxin. *BMC research notes* **1**: 126, doi:10.1186/1756-0500-1-126
- Gopalan S, Bauer D, Alfano J, Loniello A, He S, Collmer A (1996). Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plant cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. *The Plant cell* **8**: 1095-1105
- Green M, Sambrook J (2012) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York:: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Greenberg J, Yao N (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular microbiology* **6**: 201-211
- Groenenboom M, Hogeweg P (2008). RNA silencing can explain chlorotic infection patterns on plant leaves. *BMC systems biology* **2**: 105, doi:10.1186/1752-0509-2-105
- Grossman PD, Colburn JC (1992). *Capillary electrophoresis: Theory and practice*. Academic Press
- Guo M, Tian F, Wamboldt Y (2009). The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 can suppress plant immunity. *MPMI* 22 (9): 1069-1080
- Guttman D, Greenberg J (2001). Functional analysis of the type III effectors AvrRpt2 and AvrRpm1 of *Pseudomonas syringae* with the use of a single-copy genomic integration system. *MPMI* **14**: 145-155

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Gy I, Gascioli V, Laressergues D, Morel J-B, Gombert J, Proux F, Proux C, Vaucheret H, Mallory A (2007). Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. *The Plant cell* **19**: 3451-3461
- Haag J, Pikaard C (2011). Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**: 483-492
- Haas G, Azevedo J, Moissiard G, Geldreich A, Himber C, Bureau M, Fukuhara T, Keller M, Voinnet O (2008). Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *The EMBO journal* **27**: 2102-2112
- Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P (1994). The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant molecular biology* **25**: 989-994
- Hale C, Kleppe K, Terns R, Terns M (2008). Prokaryotic silencing (psi)RNAs in *Pyrococcus furiosus*. *RNA (New York, NY)* **14**: 2572-2579
- Halic M, Moazed D (2010). Dicer-independent primal RNAs trigger RNAi and heterochromatin formation. *Cell* **140**: 504-516
- Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo J* **21** (17): 4671-4679
- Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-952
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**: 557-580
- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in enzymology* **204**: 63-113
- Hann D, Rathjen J (2007). Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* **49**: 607-618
- Haraga A, Miller S (2006). A Salmonella type III secretion effector interacts with the mammalian serine/threonine protein kinase PKN1. *Cellular microbiology* **8**: 837-846
- Haseloff J, Siemering K, Prasher D, Hodge S (1997). Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 2122-2127
- Hauck P, Thilmony R, He S (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible Arabidopsis plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 8577-8582

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- He P, Chintamanani S, Chen Z, Zhu L, Kunkel B, Alfano J, Tang X, Zhou J-M (2004). Activation of a COI1-dependent pathway in Arabidopsis by *Pseudomonas syringae* type III effectors and coronatine. *Plant J.* **37**: 589-602
- He P, Shan L, Lin N-C, Martin G, Kemmerling B, Nürnberger T, Sheen J (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in Arabidopsis innate immunity. *Cell* **125**: 563-575
- He P, Shan L, Sheen J (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cellular microbiology* **9**: 1385-1396
- Heese A, Hann D, Gimenez-Ibanez S, Jones A, He K, Li J, Schroeder J, Peck S, Rathjen J (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 12217-12222
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant molecular biology* **42**: 819-832
- Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *Embo J* **22**: 4523-4533
- Hirai K, Kubota K, Mochizuki T, Tsuda S, Meshi T (2008). Antiviral RNA silencing is restricted to the marginal region of the dark green tissue in the mosaic leaves of tomato mosaic virus-infected tobacco plants. *Journal of virology* **82**: 3250-3260
- Hofius D, Tsitsigiannis D, Jones J, Mundy J (2007). Inducible cell death in plant immunity. *Seminars in cancer biology* **17**: 166-187
- Holsters M, Silva B, Van Vliet F, Genetello C, De Block M, Dhaese P, Depicker A, Inzé D, Engler G, Villarroel R (1980). The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid* **3**: 212-230
- Holt BF, Belkhadir Y, Dangl JL (2005). Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. *Science* **309**: 929-932
- Holton T, Graham M (1991). A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic acids research* **19**: 1156
- Hood E, Helmer G, Fraley R, Chilton M (1986). The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of bacteriology* **168**: 1291-1301
- Houwing S, Kamminga L, Berezikov E, Cronembold D, Girard A, van den Elst H, Filippov D, Blaser H, Raz E, Moens C, Plasterk R, Hannon G, Draper B, Ketting R (2007). A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell* **129**: 69-82

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Huang H-C, Hutcheson SW, Collmer A (1991) Characterization of the hrp cluster from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 and TnphoA tagging of genes encoding exported or membrane-spanning Hrp proteins. *MPMI* **4**: 469-476

Huang H, Schuurink R, Denny T, Atkinson M, Baker C, Yucel I, Hutcheson S, Collmer A (1988). Molecular cloning of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* gene cluster that enables *Pseudomonas fluorescens* to elicit the hypersensitive response in tobacco plants. *Journal of bacteriology* **170**: 4748-4756

Huynh T, Dahlbeck D, Staskawicz B (1989). Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. *Science (New York, NY)* **245**: 1374-1377

Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (1990). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic press

Jackson R, Athanassopoulos E, Tsiamis G, Mansfield J, Sesma A, Arnold D, Gibbon M, Murillo J, Taylor J, Vivian A (1999). Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 10875-10880

Jackson R, Mansfield J, Ammouneh H, Dutton L, Wharton B, Ortiz-Barredo A, Arnold D, Tsiamis G, Sesma A, Butcher D, Boch J, Kim Y, Martin G, Tegli S, Murillo J, Vivian A (2002). Location and activity of members of a family of virPphA homologues in pathovars of *Pseudomonas syringae* and *P. savastanoi*. *Molecular plant pathology* **3**: 205-216

James RB, Norton MM, James CC, Syed Z, Baker CJ, Steven WH (2003). A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 modulates plant defence response to infection. *Molecular Microbiology* **49** (2): 389-400.

Jamir Y, Ming G, Hye-Sook O, Petnicki-Ocwieja T, Chen S, Tang X, Dickman MB, Collmer A, R Alfano J (2004). Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J.* **37**

Janjusevic R, Abramovitch RB, Martin GB, Stebbins CE (2006). A Bacterial Inhibitor of Host Programmed Cell Death Defenses Is an E3 Ubiquitin Ligase. *Science* **311** (5758): 222-226

Jin H, Axtell M, Dahlbeck D, Ekwenna O, Zhang S, Staskawicz B, Baker B (2002). NPK1, an MEKK1-like mitogen-activated protein kinase kinase kinase, regulates innate immunity and development in plants. *Developmental cell* **3**: 291-297

Jin H, Liu Y, Yang K, Kim C, Baker B (2003). Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *Plant J.* **33**: 719-731

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Jin H, Zhu JK (2010). How many ways are there to generate small RNAs? *Molecular cell* **38**: 775-777
- Johansen LK, Carrington JC (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant physiology* **126**: 930-938
- Jones J, Dangl J (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329
- Jovel J, Walker M, Sanfaçon H (2007). Recovery of *Nicotiana benthamiana* plants from a necrotic response induced by a nepovirus is associated with RNA silencing but not with reduced virus titer. *Journal of virology* **81**: 12285-12297
- Jovel J, Walker M, Sanfaçon H (2011). Salicylic acid-dependent restriction of Tomato ringspot virus spread in tobacco is accompanied by a hypersensitive response, local RNA silencing, and moderate systemic resistance. *MPMI* **24**: 706-718
- Jyoti J (2007). Turnip crinkle virus Coat Protein Suppresses the Hypersensitive Response in Plants. *Worcester Polytechnic Institute*
- Kado C, Liu S (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of bacteriology* **145**: 1365-1373
- Kalantidis, K., Psaradakis, S., Tabler, M., & Tsagris, M. (2002). The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *MPMI*, *15* (8): 826-833.
- Kang H-G, Klessig D (2005). Salicylic acid-inducible Arabidopsis CK2-like activity phosphorylates TGA2. *Plant molecular biology* **57**: 541-557
- Kang L, Tang X, Mysore K (2004). Pseudomonas type III effector AvrPto suppresses the programmed cell death induced by two nonhost pathogens in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *MPMI* *17* (12): 1328-1336
- Kasschau K, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman K, Krizan A., & Carrington, J. C. (2003). P1/HC-Pro, a Viral Suppressor of RNA Silencing, Interferes with *Arabidopsis* Development and miRNA Function. *Developmental cell* *4* (2): 205-217
- Katiyar-Agarwal S, Gao S, Vivian-Smith A, Jin H (2007). A novel class of bacteria-induced small RNAs in *Arabidopsis*. *Genes & development* **21**: 3123-3134
- Katiyar-Agarwal S, Jin H (2010). Role of small RNAs in host-microbe interactions. *Annual review of phytopathology* **48**: 225-246
- Katiyar-Agarwal S, Morgan R, Dahlbeck D, Borsani O, Villegas A, Jr., Zhu JK, Staskawicz BJ, Jin H (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 18002-18007

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Kato-Murayama M, Bessho Y, Shirouzu M, Yokoyama S (2005). Crystal structure of the RNA 2'-phosphotransferase from *Aeropyrum pernix* K1. *Journal of molecular biology* **348**: 295-305
- Katou S, Karita E, Yamakawa H, Seo S, Mitsuhara I, Kuchitsu K, Ohashi Y (2005). Catalytic activation of the plant MAPK phosphatase NtMKP1 by its physiological substrate salicylic acid-induced protein kinase but not by calmodulins. *The Journal of biological chemistry* **280**: 39569-39581
- Kaufman D, Evans G (1990). Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *BioTechniques* **9** (3): 304-306
- Kazan K, Manners J (2009) Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in plant science* **14**: 373-382
- Kennedy S, Wang D, Ruvkun G (2004). A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature* **427**: 645-649
- Kessler B, de Lorenzo V, Timmis K (1992). A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Molecular & general genetics* **233**: 293-301
- Kiefer I, Slusarenko A (2003). The pattern of systemic acquired resistance induction within the *Arabidopsis* rosette in relation to the pattern of translocation. *Plant physiology* **132**: 840-847
- Kim C, Zhang S (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant J.* **38**: 142-151
- Kim JH, Woo HR, Kim J, Lim PO, Lee IC, Choi SH, Hwang D, Nam HG (2009). Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in *Arabidopsis*. *Science* **323**: 1053-1057
- Kim M, da Cunha L, McFall A, Belkhadir Y, DebRoy S, Dangl J, Mackey D (2005). Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell* **121**: 749-759
- Kim Y, Lin N, Martin G (2002) Two Distinct *Pseudomonas* Effector Proteins Interact with the Pto Kinase and Activate Plant Immunity. *Cell* **109** (5): 589-598
- Kingston R, Chomczynski P, Sacchi N (2001). Guanidine methods for total RNA preparation. *Current protocols in molecular biology*. Chapter 4: Unit 4.2
- Kreuze J, Savenkov E, Cuellar W, Li X, Valkonen J (2005). Viral class 1 RNase III involved in suppression of RNA silencing. *Journal of virology* **79**: 7227-7238
- Kubota K, Tsuda S, Tamai A, Meshi T (2003). Tomato Mosaic Virus Replication Protein Suppresses Virus-Targeted Posttranscriptional Gene Silencing. *Journal of virology* **77** (20): 11016-11026

Kucera R, Nichols N (2008). DNA-dependent DNA polymerases. *Current protocols in molecular biology*. **Chapter 3**

Kumakura N, Takeda A, Fujioka Y, Motose H, Takano R, Watanabe Y (2009). SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS letters* **583**: 1261-1266

Kurihara Y, Inaba N, Kutsuna N, Takeda A, Tagami Y, Watanabe Y (2007). Binding of tobamovirus replication protein with small RNA duplexes. *The Journal of general virology* **88**: 2347-2352

Kuta DD, Tripathi L (2005). Agrobacterium-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against Agrobacterium-mediated DNA transfer. *African Journal of Biotechnology* **4**: 752-757

Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja VV, Calvino LF, Lopez-Moya JJ, Burgyan J (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *Embo J* **25**: 2768-2780

Lakatos L, Szittyta G, Silhavy D, Burgyan J (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *Embo J* **23**: 876-884

Landgraf A, Weingart H, Tsiamis G, Boch J (2006). Different versions of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 exist due to the activity of an effector transposon. *Molecular plant pathology* **7**: 355-364

Landy A (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual review of biochemistry* **58**: 913-949

Lech K, Brent R (1988.) Plating lambda phage to generate plaques. *Current protocols in molecular biology*. Chapter 1: Unit 1.11

Lech K, Reddy K, Sherman L (2001). Preparing lambda DNA from phage lysates. *Current protocols in molecular biology*. Chapter 1: Unit 1.13

Lee DH, Kim DS, Hwang BK (2012). The pepper RNA-binding protein CaRBP1 functions in hypersensitive cell death and defense signaling in the cytoplasm. *Plant J*. **72**: 235-248

Lee HC, Li L, Gu W, Xue Z, Crosthwaite SK, Pertsemlidis A, Lewis ZA, Freitag M, Selker EU, Mello CC, Liu Y (2010). Diverse pathways generate microRNA-like RNAs and Dicer-independent small interfering RNAs in fungi. *Molecular cell* **38**: 803-814

Lee J, Klessig D, Nürnberger T (2001). A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *The Plant cell* **13**: 1079-1093

Les Erickson F, Holzberg S, Calderon-Urrea A, Handley V, Axtell M, Corr C, Baker B (1999). The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *Plant J.* **18**: 67-75

Li H, Jinhua L, John KH, Jau-Tay W, Jean HG (2012). A rapid and high yielding DNA miniprep for cotton (*Gossypium* spp.). *Plant Molecular Biology Reporter* **19**: 183a–183e

Li H, Lucy A, Guo H, Li W, Ji L, Wong S, Ding S (1999). Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *The EMBO journal* **18**: 2683-2691

Li H, Xu H, Zhou Y, Zhang J, Long C, Li S, Chen S, Zhou J-M, Shao F (2007). The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science (New York, NY)* **315**: 1000-1003

Li SFY (1992). *Capillary electrophoresis: principles, practice and applications*. Elsevier

Li X, Lin H, Zhang W, Zou Y, Zhang J, Tang X, Zhou J-M (2005). Flagellin induces innate immunity in nonhost interactions that is suppressed by *Pseudomonas syringae* effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 12990-12995

Lichner Z, Silhavy D, Burgyán J (2003). Double-stranded RNA-binding proteins could suppress RNA interference-mediated antiviral defences. *The Journal of general virology* **84**: 975-980

Lin N-C, Abramovitch R, Kim Y, Martin G (2006). Diverse AvrPtoB homologs from several *Pseudomonas syringae* pathovars elicit Pto-dependent resistance and have similar virulence activities. *Applied and environmental microbiology* **72**: 702-712

Lin S, Le T, Cowen D (2003). SptP, a *Salmonella typhimurium* type III-secreted protein, inhibits the mitogen-activated protein kinase pathway by inhibiting Raf activation. *Cellular microbiology* **5**: 267-275

Lindeberg M, Cunnac S, Collmer A (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends in microbiology* **20**: 199-208

Lindgren P, Peet R, Panopoulos N (1986). Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *Journal of bacteriology* **168**: 512-522

Liu Q, Feng Y, Zhu Z (2009). Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Functional & integrative genomics* **9**: 277-286

Liu Y, Jin H, Yang K, Kim C, Baker B (2003). Interaction between two mitogen-activated protein kinases during tobacco defense signaling. *Plant J.* **34**: 149-160

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar S (2004). Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* **38**: 800-809
- Liu Y, Zhang S, Klessig D (2000). Molecular cloning and characterization of a tobacco MAP kinase kinase that interacts with SIPK. *MPMI* **13**: 118-124
- Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* **297**: 2053-2056
- Loebenstein G, Akad F (2006). The local lesion response. *Natural Resistance Mechanisms of Plants to viruses* (Loebenstein, Gad, and John Peter Carr, eds.). Springer
- Loper JE, Lindow SE (1987). Lack of evidence for the in situ fluorescent pigment production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean leaf surfaces. *Phytopathology* **77**: 1449-1454
- López-Solanilla E, Philip AB, Anna RS, Alan Collmer (2004). HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Molecular Microbiology* **54** (2): 353-365
- Lopez A, Ramirez V, Garcia-Andrade J, Flors V, Vera P (2011). The RNA silencing enzyme RNA polymerase v is required for plant immunity. *PLoS genetics* **7**: e1002434
- Love A, Milner J, Sadanandom A (2008). Timing is everything: regulatory overlap in plant cell death. *Trends in plant science* **13**: 589-595
- Lu C, Jeong DH, Kulkarni K, Pillay M, Nobuta K, German R, Thatcher SR, Maher C, Zhang L, Ware D, Liu B, Cao X, Meyers BC, Green PJ (2008). Genome-wide analysis for discovery of rice microRNAs reveals natural antisense microRNAs (nat-miRNAs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 4951-4956
- Lu R, Folimonov A, Shintaku M, Li W-X, Falk B, Dawson W, Ding S-W (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 15742-15747
- Lu R, Martin-Hernandez A, Peart J, Malcuit I, Baulcombe D (2003). Virus-induced gene silencing in plants. *Methods (San Diego, Calif)* **30**: 296-303
- Mackey D, Belkhadir Y, Alonso J, Ecker J, Dangl J (2003). Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**: 379-389
- Mackey D, Holt B, Wiig A, Dangl J (2002). RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108** (6): 743-754

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Mallory A, Mlotshwa S, Bowman L, Vance V (2003). The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus. *Plant J.* **35**: 82-92

Mallory A, Vaucheret H (2010). Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *The Plant cell* **22**: 3879-3889

Mallory AC, Ely L, Smith TH, Marathe R, Anandalakshmi R, Fagard M, Vaucheret H, Pruss G, Bowman L, Vance VB (2001). HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *The Plant cell* **13**: 571-583.

Marchès O, Covarelli V, Dahan S, Cougoule C, Bhatta P, Frankel G, Caron E (2008). EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli inhibits opsonophagocytosis. *Cellular microbiology* **10**: 1104-1115

Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins F (1991). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic acids research* **19**: 1154

Martínez de Alba A, Elvira-Matlot E, Vaucheret H (2013). Gene silencing in plants: A diversity of pathways. *Biochimica et biophysica acta* **1829** (12): 1300-1308

Mayrose M, Bonshtien A, Sessa G (2004). LeMPK3 is a mitogen-activated protein kinase with dual specificity induced during tomato defense and wounding responses. *The Journal of biological chemistry* **279**: 14819-14827

McBride K, Summerfelt K (1990). Improved binary vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant molecular biology* **14**: 269-276

Menke F, Kang H, Chen Z (2005). Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. *MPMI* **18** (10): 1027-1034 \

Merai Z, Kerényi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D (2006). Double-Stranded RNA Binding May Be a General Plant RNA Viral Strategy To Suppress RNA Silencing. *J Virol* **80**: 5747-5756

Mérai Z, Kerényi Z, Molnár A, Barta E, Válóczy A, Bisztray G, Havelda Z, Burgyán J, Silhavy D (2005). Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *Journal of virology* **79**: 7217-7226

Mishra N, Tuteja R, Tuteja N (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of biochemistry and biophysics* **452**: 55-68

Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H (2010). Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Molecular genetics and genomics* **284**: 95-103

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Moissiard G, Parizotto E, Himber C, Voinnet O (2007). Transitivity in Arabidopsis can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA (New York, NY)* **13**: 1268-1278

Moissiard G, Voinnet O (2006). RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four Arabidopsis Dicer-like proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 19593-19598

Mukherjee S, Keitany G, Li Y, Wang Y, Ball H, Goldsmith E, Orth K (2006). Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science (New York, NY)* **312**: 1211-1214

Murashige T, Folke S (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497

Murray M, Thompson W (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research* **8**: 4321-4325

Mysore K, Ryu C-M (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in plant science* **9**: 97-104

Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**: 436-439

Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY, Voinnet O (2008). Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* **321**: 964-967

Nimchuk, Z. L., Fisher, E. J., Desveaux, D., Chang, J. H., & Dangl, J. L. (2007). The HopX (AvrPphE) family of Pseudomonas syringae type III effectors require a catalytic triad and a novel N-terminal domain for function. *MPMI* **20** (4): 346-357

Nowara D, Gay A, Lacomme C, Shaw J, Ridout C, Douchkov D, Hensel G, Kumlehn J, Schweizer P (2010). HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen Blumeria graminis. *The Plant cell* **22**: 3130-3141

Ntoukakis V, Mucyn T, Gimenez-Ibanez S, Chapman H, Gutierrez J, Balmuth A, Jones A, Rathjen J (2009). Host inhibition of a bacterial virulence effector triggers immunity to infection. *Science (New York, NY)* **324**: 784-787

Oh C-S, Martin G (2011). Effector-triggered immunity mediated by the Pto kinase. *Trends in plant science* **16**: 132-140

Oh H-S, Collmer A (2005). Basal resistance against bacteria in Nicotiana benthamiana leaves is accompanied by reduced vascular staining and suppressed by multiple Pseudomonas syringae type III secretion system effector proteins. *Plant J.* **44**: 348-359

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Olmedo G, Plinio G (2008). Processing precursors with RNase III in plants. *Plant Science* **175** (6): 741-746
- Ooms G, Hooykaas P, Van Veen R, Van Beelen P, Regensburg-Tuink T, Schilperoort R (1982). Octopine Ti-plasmid deletion mutants of agrobacterium tumefaciens with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid* **7**: 15-29
- Orth K, Xu, Z., Mudgett, M. B., Bao, Z. Q., Palmer, L. E., Bliska, J. B & Dixon, J. E (2000). Disruption of Signaling by Yersinia Effector YopJ, a Ubiquitin-Like Protein Protease. *Science* **290** (5496): 1594-1597
- Ouwerkerk P, Meijer A (2001). Yeast one-hybrid screening for DNA-protein interactions. *Current protocols in molecular biology*. Chapter 12: Unit 12.12
- Pacheco R, García-Marcos A, Manzano A, de Lacoba M, Camañes G, García-Agustín P, Díaz-Ruiz J, Tenllado F (2012). Comparative analysis of transcriptomic and hormonal responses to compatible and incompatible plant-virus interactions that lead to cell death. *MPMI* **25**: 709-723
- Papp, I., Mette, M. F., Aufsatz, W., Daxinger, L., Schauer, S. E., Ray, A & Matzke, A. J. (2003). Evidence for Nuclear Processing of Plant Micro RNA and Short Interfering RNA Precursors. *PLANT PHYSIOLOGY* **132** (3): 1382-1390
- Park J-E, Park J-Y, Kim Y-S, Staswick P, Jeon J, Yun J, Kim S-Y, Kim J, Lee Y-H, Park C-M (2007). GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry* **282**: 10036-10046
- Pavet V, Quintero C, Cecchini NM, Rosa AL, Alvarez ME (2006). Arabidopsis displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of heterochromatin upon attack by pseudomonas syringae. *MPMI* **19**: 577-587
- Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, Lechner E, Berry B, Brault V, Hemmer O, Kretsch T, Richards K, Genschik P, Ziegler-Graff V (2006). F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 1994-1999
- Peart JR, Lu R, Sadanandom A, Malcuit I, Moffett P, Brice DC, Schauer L, Jaggard DA, Xiao S, Coleman MJ (2002). Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 10865-10869
- Pedley K, Martin G (2004). Identification of MAPKs and their possible MAPK kinase activators involved in the Pto-mediated defense response of tomato. *The Journal of biological chemistry* **279**: 49229-49235
- Pel M, Pieterse C (2013). Microbial recognition and evasion of host immunity. *Journal of experimental botany* **64**: 1237-1248

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Pelaez P, Sanchez F (2013). Small RNAs in plant defense responses during viral and bacterial interactions: similarities and differences. *Frontiers in plant science* **4**: 343, doi:10.3389/fpls.2013.00343
- Peragine A, Yoshikawa M, Wu G, Albrecht H, Poethig R (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & development* **18**: 2368-2379
- Perrett, C. A., Lin, D. Y. W., & Zhou, D. (2011). Interactions of bacterial proteins with host eukaryotic ubiquitin pathways. *Frontiers in microbiology* **2** (143):1-18
- Pérez-Martínez I, Rodríguez-Moreno L, Matas I, Ramos C (2007). Strain selection and improvement of gene transfer for genetic manipulation of *Pseudomonas savastanoi* isolated from olive knots. *Research in microbiology* **158**: 60-69
- Petnicki-Ocwieja T, Schneider D, Tam V, Chancey S, Shan L, Jamir Y, Schechter L, Janes M, Buell C, Tang X, Collmer A, Alfano J (2002). Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 7652-7657
- Pitman A, Jackson R, Mansfield J, Kaitell V, Thwaites R, Arnold D (2005). Exposure to host resistance mechanisms drives evolution of bacterial virulence in plants. *Current biology* **15**: 2230-2235
- Pontier D, Picart C, Roudier F, Garcia D, Lahmy S, Azevedo J, Alart E, Laudíé M, Karlowski W, Cooke R, Colot V, Voinnet O, Lagrange T (2012). NERD, a plant-specific GW protein, defines an additional RNAi-dependent chromatin-based pathway in Arabidopsis. *Molecular cell* **48**: 121-132
- Porollo A, Meller J (2007). Versatile annotation and publication quality visualization of protein complexes using POLYVIEW-3D. *BMC bioinformatics* **8**: 316, doi:10.1186/1471-2105-8-316
- Prehna G, Ivanov M, Bliska J, Stebbins C (2006). *Yersinia* virulence depends on mimicry of host Rho-family nucleotide dissociation inhibitors. *Cell* **126**: 869-880
- Preston G (2000). *Pseudomonas syringae* pv. tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Molecular plant pathology* **1**: 263-275
- Pruss G, Ge X, Shi X, Carrington J, Bowman Vance V (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *The Plant cell* **9**: 859-868
- Pumplin N, Voinnet O (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nat Rev Micro* **11**: 745-760
- Qi X, Bao F, Xie Z (2009). Small RNA deep sequencing reveals role for Arabidopsis thaliana RNA-dependent RNA polymerases in viral siRNA biogenesis. *PLoS One*, **4** (3): e4971

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Qi Y, Denli AM, Hannon GJ (2005). Biochemical Specialization within *Arabidopsis* RNA Silencing Pathways. *Molecular cell* **19**: 421-428
- Qiao Y, Liu L, Xiong Q, Flores C, Wong J, Shi J, Wang X, Liu X, Xiang Q, Jiang S, Zhang F, Wang Y, Judelson HS, Chen X, Ma W (2013). Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors. *Nature genetics* **45**: 330-333
- Qu F, Ren T, Morris T (2003). The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *Journal of virology* **77**: 511-522
- Qu F, Ye X, Hou G, Sato S, Clemente T, Morris T (2005). RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of virology* **79**: 15209-15217
- Qu F, Ye X, Morris T (2008). Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 14732-14737
- Ramachandran V, Chen X (2008). Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science (New York, NY)* **321**: 1490-1492
- Ratcliff, MacFarlane, Baulcombe (1999). Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *The Plant cell* **11**: 1207-1216
- Ratcliff F, Harrison B, Baulcombe D (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science (New York, NY)* **276**: 1558-1560
- Ratcliff F, Martin-Hernandez A, Baulcombe D (2001). Technical Advance. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* **25**: 237-245
- Reape T, Molony E, McCabe P (2008). Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of experimental botany* **59**: 435-444
- Reid M, Bielecki R (1968). A simple apparatus for vertical flat-sheet polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical biochemistry* **22**: 374-381
- Ren D, Yang K-Y, Li G-J, Liu Y, Zhang S (2006). Activation of Ntf4, a tobacco mitogen-activated protein kinase, during plant defense response and its involvement in hypersensitive response-like cell death. *Plant physiology* **141**: 1482-1493
- Ren T, Qu F, Morris T (2000). HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *The Plant cell* **12**: 1917-1926
- Rinne P, van den Boogaard R, Mensink M, Kopperud C, Kormelink R, Goldbach R, van der Schoot C (2005). Tobacco plants respond to the constitutive expression of the tospovirus movement protein NS(M) with a heat-reversible sealing of plasmodesmata that impairs development. *Plant J.* **43**: 688-707

- Ritter C, Dangl J (1996). Interference between Two Specific Pathogen Recognition Events Mediated by Distinct Plant Disease Resistance Genes. *The Plant cell* **8**: 251-257
- Rivas L, Mansfield J, Tsiamis G, Jackson R, Murillo J (2005). Changes in race-specific virulence in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* are associated with a chimeric transposable element and rare deletion events in a plasmid-borne pathogenicity island. *Applied and environmental microbiology* **71**: 3778-3785
- Rivas S, Mucyn T, van den Burg H, Vervoort J, Jones J (2002). An approximately 400 kDa membrane-associated complex that contains one molecule of the resistance protein Cf-4. *Plant J.* **29**: 783-796
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones J (2011a). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual review of phytopathology* **49**: 317-343
- Robert-Seilaniantz A, MacLean D, Jikumaru Y, Hill L, Yamaguchi S, Kamiya Y, Jones J (2011b). The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. *Plant J.* **67**: 218-231
- Robert-Seilaniantz A, Shan L, Zhou J-M, Tang X (2006). The *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III effector HopF2 has a putative myristoylation site required for its avirulence and virulence functions. *MPMI* **19**: 130-138
- Robinette D, Matthysse A (1990). Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Journal of bacteriology* **172**: 5742-5749
- Rogers K, Chen X (2013). Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *The Plant cell* **25**: 2383-2399
- Romeis T, Piedras P, Zhang S, Klessig D, Hirt H, Jones J (1999). Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *The Plant cell* **11**: 273-287
- Rosebrock T, Zeng L, Brady J, Abramovitch R, Xiao F, Martin G (2007). A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature* **448**: 370-374
- Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant cell* **10**: 937-946
- Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H, Arnheim N (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, NY)* **230**: 1350-1354
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.*, Vol. 2: Cold spring harbor laboratory press New York.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Sambrook J, Russell D (2006). Northern hybridization. *CSH protocols*
- Sansregret R, Dufour V, Langlois M, Daayf F, Dunoyer P, Voinnet O, Bouarab K (2013). Extreme resistance as a host counter-counter defense against viral suppression of RNA silencing. *PLoS pathogens* **9**: e1003435
- Sarmiento C, Nigul L, Kazantseva J, Buschmann M, Truve E (2006). AtRLI2 is an endogenous suppressor of RNA silencing. *Plant molecular biology* **61**: 153-163
- Sarris P, Gao S, Karademiris K, Jin H, Kalantidis K, Panopoulos N (2011). Phyto-bacterial type III effectors HopX1, HopAB1 and HopF2 enhance sense-post-transcriptional gene silencing independently of plant R gene-effector recognition. *MPMI* **24**: 907-917
- Schiebel W, Pélissier T, Riedel L, Thalmeir S, Schiebel R, Kempe D, Lottspeich F, Sängler H, Wassenegger M (1998). Isolation of an RNA-directed RNA polymerase-specific cDNA clone from tomato. *The Plant cell* **10**: 2087-2101
- Schöb H, Kunz C, Meins F (1997). Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Molecular & general genetics* **256**: 581-585
- Scholthof H, Scholthof K, Jackson A (1995). Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a potato virus X vector. *The Plant cell* **7**: 1157-1172
- Schwach F, Vaistij FE, Jones L, Baulcombe DC (2005). An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiology* **138**: 1842-1852
- Segers G, van Wezel R, Zhang X, Hong Y, Nuss D (2006). Hypovirus papain-like protease p29 suppresses RNA silencing in the natural fungal host and in a heterologous plant system. *Eukaryotic cell* **5**: 896-904
- Sekine K-T, Kawakami S, Hase S, Kubota M, Ichinose Y, Shah J, Kang H-G, Klessig D, Takahashi H (2008). High level expression of a virus resistance gene, RCY1, confers extreme resistance to Cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *MPMI* **21**: 1398-1407
- Shan L, He P, Li J, Heese A, Peck S, Nürnberger T, Martin G, Sheen J (2008). Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell host & microbe* **4**: 17-27
- Shan L, Oh H-s, Chen J, Guo M, Zhou J, Alfano J, Collmer A, Jia X, Tang X (2004). The HopPtoF locus of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 encodes a type III chaperone and a cognate effector. *MPMI* **17**: 447-455
- Shang Y, Li X, Cui H, He P, Thilmony R, Chintamanani S, Zwiesler-Vollick J, Gopalan S, Tang X, Zhou JM (2006). RAR1, a central player in plant immunity, is

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

targeted by *Pseudomonas syringae* effector AvrB. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103** (50): 19200-19205

Shao F (2008). Biochemical functions of *Yersinia* type III effectors. *Current opinion in microbiology* **11**: 21-29

Sharma AD, Prabhjot Kaur G, Prabhjeet S (2012). DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Molecular Biology Reporter* **20** (4): 415-415

Shimura H, Pantaleo V, Ishihara T, Myojo N, Inaba J-i, Sueda K, Burgyán J, Masuta C (2011). A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS pathogens* **7** (5): e1002021

Shivaprasad PV, Chen HM, Patel K, Bond DM, Santos BA, Baulcombe DC (2012). A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *The Plant cell* **24**: 859-874

Siemering K, Golbik R, Sever R, Haseloff J (1996). Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current biology* **6**: 1653-1663

Silhavy D, Molnár A, Lucioli A, Szittyá G, Hornyik C, Tavazza M, Burgyán J (2002a). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *The EMBO Journal* **21**: 3070-3080

Singer A, Desveaux D, Betts L, Chang J, Nimchuk Z, Grant S, Dangl J, Sondek J (2004). Crystal structures of the type III effector protein AvrPphF and its chaperone reveal residues required for plant pathogenesis. *Structure* **12**: 1669-1681

Siomi M, Sato K, Pezic D, Aravin A (2011). PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nature reviews Molecular cell biology* **12**: 246-258

Smith L, Pontes O, Searle I, Yelina N, Yousafzai F, Herr A, Pikaard C, Baulcombe D (2007). An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **19**: 1507-1521

Smith N, Eamens A, Wang M-B (2011). Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS pathogens* **7** (5): e1002022

Smith N, Singh S, Wang M, Stoutjesdijk P, Green A, Waterhouse P (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**: 319-320

Struhl K (1985). A rapid method for creating recombinant DNA molecules. *Biotechniques* **3**: 425

Struhl K (2001) Subcloning of DNA fragments. *Current protocols in molecular biology*. Chapter 3: Unit 3.16

Stulemeijer I, Stratmann J, Joosten M (2007). Tomato mitogen-activated protein kinases LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 are activated during the Cf-4/Avr4-

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

induced hypersensitive response and have distinct phosphorylation specificities. *Plant physiology* **144**: 1481-1494

Sullivan C, Ganem D (2005). A virus-encoded inhibitor that blocks RNA interference in mammalian cells. *Journal of virology* **79** (12): 7371-7379

Szittyá G, Burgyán J (2001). Cymbidium ringspot tombusvirus coat protein coding sequence acts as an avirulent RNA. *Journal of virology* **75**: 2411-2420

Szittyá G, Silhavy D, Molnar A, Havelda Z, Lovas A, Lakatos L, Banfalvi Z, Burgyan J (2003). Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *Embo J* **22**: 633-640.

Tabor S, Boyle A (2001). Enzymatic labeling of nucleic acids. *Current protocols in immunology*. Chapter 10: Unit 10.10

Takabatake R, Ando Y, Seo S, Katou S, Tsuda S, Ohashi Y, Mitsuhara I (2007). MAP kinases function downstream of HSP90 and upstream of mitochondria in TMV resistance gene N-mediated hypersensitive cell death. *Plant & cell physiology* **48**: 498-510

Takahashi A, Casais C, Ichimura K, Shirasu K (2003). HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 11777-11782

Takahashi Y, Nasir K, Ito A, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Fujisawa S, Kamoun S, Terauchi R (2007). A high-throughput screen of cell-death-inducing factors in *Nicotiana benthamiana* identifies a novel MAPKK that mediates INF1-induced cell death signaling and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii*. *Plant J.* **49**: 1030-1040

Takeda A, Tsukuda M, Mizumoto H, Okamoto K, Kaido M, Mise K, Okuno T (2005). A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *The EMBO journal* **24**: 3147-3157

Takeuchi K, Taguchi F, Inagaki Y, Toyoda K, Shiraishi, T, & Ichinose, Y (2003) Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in host specificity. *Journal of bacteriology* **185** (22): 6658-6665

Tampakaki AP, Panopoulos NJ (2000). Elicitation of hypersensitive cell death by extracellularly targeted HrpZPsph produced in planta. *MPMI* **13**: 1366-1374

Taylor, J. D., Teverson, D. M., Allen, D. J., & Pastor-Corrales, M. A. (1996). Identification and origin of races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from Africa and other bean growing areas. *Plant Pathology* **45** (3): 469-478

Thomas C, Leh V, Lederer C, Maule A (2003). Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* **306**: 33-41

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Thompson J, Gibson T, Higgins D (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics*. Chapter 2: Unit 2.3

Trinks D, Rajeswaran R, Shivaprasad P, Akbergenov R, Oakeley E, Veluthambi K, Hohn T, Pooggin M (2005). Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *Journal of virology* **79**: 2517-2527

Trujillo M, Ichimura K, Casais C, Shirasu K (2008). Negative regulation of PAMP-triggered immunity by an E3 ubiquitin ligase triplet in Arabidopsis. *Current biology* **18**: 1396-1401

Tsiamis G, Mansfield J, Hockenull R, Jackson R, Sesma A, Athanassopoulos E, Bennett M, Stevens C, Vivian A, Taylor J, Murillo J (2000). Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to avrPphF in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, the cause of bean halo-blight disease. *The EMBO journal* **19**: 3204-3214

Turina M, Omarov R, Murphy J, Bazaldua-Hernandez C, Desvoyes B, Scholthof H (2003). A newly identified role for Tomato bushy stunt virus P19 in short distance spread. *Molecular plant pathology* **4**: 67-72

Turner JG, Novacky A (1974). The quantitative relation between plant and bacterial cells involved in the hypersensitive reaction. *Phytopathology* **64**: 885-890

Tzfira T, Jensen CS, Wang W, Zuker A, Vinocur B, Altman A, Vainstein A (1997). Transgenic *Populus tremula*: a step-by-step protocol for its *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Molecular Biology Reporter* **15**: 219-235

Underwood W, Zhang S, He S (2007). The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **52**: 658-672

van Dijk K, Fouts DE, Rehm AH, Hill AR, Collmer A, Alfano JR (1999). The Avr (effector) proteins HrmA (HopPsyA) and AvrPto are secreted in culture from *Pseudomonas syringae* pathovars via the Hrp (type III) protein secretion system in a temperature- and pH-sensitive manner. *Journal of bacteriology* **181**: 4790-4797

van Dijk K, Tam V, Records A, Petnicki-Ocwieja T, Alfano J (2002). The ShcA protein is a molecular chaperone that assists in the secretion of the HopPsyA effector from the type III (Hrp) protein secretion system of *Pseudomonas syringae*. *Molecular microbiology* **44**: 1469-1481

van Doorn W (2011). Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *Journal of experimental botany* **62**: 4749-4761

van Doorn W, Beers E, Dangl J, Franklin-Tong V, Gallois P, Hara-Nishimura I, Jones A, Kawai-Yamada M, Lam E, Mundy J, Mur L, Petersen M, Smertenko A, Taliansky M, Van Breusegem F, Wolpert T, Woltering E, Zhitovovsky B, Bozhkov P (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell death and differentiation* **18**: 1241-1246

- Várallyay E, Válóczy A, Agyi A, Burgyán J, Havelda Z (2010). Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *The EMBO journal* **29**: 3507-3519
- Vinatzer B, Teitzel G, Lee M-W, Jelenska J, Hotton S, Fairfax K, Jenrette J, Greenberg J (2006). The type III effector repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and its role in survival and disease on host and non-host plants. *Molecular microbiology* **62**: 26-44
- Vogler H, Akbergenov R, Shivaprasad P, Dang V, Fasler M, Kwon M-O, Zhanybekova S, Hohn T, Heinlein M (2007). Modification of small RNAs associated with suppression of RNA silencing by tobamovirus replicase protein. *Journal of virology* **81**: 10379-10388
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* **33** (5): 949-956
- Voinnet, O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics* **6** (3): 206-220.
- Wang M, Soyano T, Machida S, Yang J-Y, Jung C, Chua N-H, Yuan Y (2011). Molecular insights into plant cell proliferation disturbance by *Agrobacterium* protein 6b. *Genes & development* **25**: 64-76
- Wang Y, Li J, Hou S, Wang X, Li Y, Ren D, Chen S, Tang X, Zhou J-M (2010). A *Pseudomonas syringae* ADP-ribosyltransferase inhibits Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases. *The Plant cell* **22**: 2033-2044
- Wassenegger M, Krczal G (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends in plant science* **11**: 142-151
- Waterhouse PM, Graham MW, Wang M-B (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 13959-13964
- Wei C-F, Kvitko B, Shimizu R, Crabill E, Alfano J, Lin N-C, Martin G, Huang H-C, Collmer A (2007). A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* **51**: 32-46
- Wei Z, Laby R, Zumoff C, Bauer D, He S, Collmer A, Beer S (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* **257**: 85-88
- Weiberg A, Wang M, Lin FM, Zhao H, Zhang Z, Kaloshian I, Huang HD, Jin H (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* **342**: 118-123
- Weinberger R (1993) *Practical capillary electrophoresis*. Academic Press

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Weitzer S, Martinez J (2007). The human RNA kinase hClp1 is active on 3' transfer RNA exons and short interfering RNAs. *Nature* **447**: 222-226
- Wilson K (2001). Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current protocols in molecular biology*. . Chapter 2: Unit 2.4
- Wilton M, Subramaniam R, Elmore J, Felsensteiner C, Coaker G, Desveaux D (2010). The type III effector HopF2Pto targets Arabidopsis RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 2349-2354
- Wirthmueller L, Banfield M (2012). mADP-RTs: versatile virulence factors from bacterial pathogens of plants and mammals. *Frontiers in plant science* **3**: 142, doi: 10.3389/fpls.2012.00142
- Wroblewski T, Tomczak A, Michelmore R (2005). Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant biotechnology journal* **3**: 259-273
- Wu S, Lu D, Kabbage M, Wei H-L, Swingle B, Records A, Dickman M, He P, Shan L (2011). Bacterial effector HopF2 suppresses arabidopsis innate immunity at the plasma membrane. *MPMI* **24**: 585-593
- Xiang T, Zong N, Zou Y, Wu Y, Zhang J, Xing W, Li Y, Tang X, Zhu L, Chai J, Zhou J-M (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current biology* **18**: 74-80
- Xiao F, Giavalisco P, Martin G (2007a). *Pseudomonas syringae* type III effector AvrPtoB is phosphorylated in plant cells on serine 258, promoting its virulence activity. *The Journal of biological chemistry* **282**: 30737-30744
- Xiao F, He P, Abramovitch R, Dawson J, Nicholson L, Sheen J, Martin G (2007b). The N-terminal region of *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB elicits Pto-dependent immunity and has two distinct virulence determinants. *Plant J.* **52**: 595-614
- Yamamizo C, Kuchimura K, Kobayashi A, Katou S, Kawakita K, Jones J, Doke N, Yoshioka H (2006). Rewiring mitogen-activated protein kinase cascade by positive feedback confers potato blight resistance. *Plant physiology* **140**: 681-692
- Yang, S. J., Carter, S. A., Cole, A. B., Cheng, N. H., & Nelson, R. S. (2004). A natural variant of a host RNA-dependent RNA polymerase is associated with increased susceptibility to viruses by *Nicotiana benthamiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101* (16): 6297-6302.
- Yang K, Liu Y, Zhang S (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 741-746
- Yang Y, Li R, Qi M (2000). In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J.* *22* (6): 543-551

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Yao N, Greenberg J (2006). Arabidopsis ACCELERATED CELL DEATH2 modulates programmed cell death. *The Plant cell* **18**: 397-411
- Ye K, Patel D (2005). RNA silencing suppressor p21 of Beet yellows virus forms an RNA binding octameric ring structure. *Structure* (*)* **13**: 1375-1384
- Yi H, Richards EJ (2007). A cluster of disease resistance genes in Arabidopsis is coordinately regulated by transcriptional activation and RNA silencing. *The Plant cell* **19**: 2929-2939
- Yoshikawa M, Peragine A, Park M, Poethig R (2005). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & development* **19**: 2164-2175
- Yu A, Lepere G, Jay F, Wang J, Bapaume L, Wang Y, Abraham AL, Penterman J, Fischer RL, Voinnet O, Navarro L (2013). Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in Arabidopsis antibacterial defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 2389-2394
- Yu B, Chapman E, Yang Z, Carrington J, Chen X (2006). Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with microRNA methylation in Arabidopsis. *FEBS letters* **580**: 3117-3120
- Zassenhaus HP, Butow RA, Hannon YP (1982). Rapid electroelution of nucleic acids from agarose and acrylamide gels. *Analytical biochemistry* **125**: 125-130
- Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L, Chai J, Chen S, Tang X, Zhou J-M (2007). A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell host & microbe* **1**: 175-185
- Zhang M, Wang Q, Xu K, Meng Y, Quan J, Shan W (2011a). Production of dsRNA sequences in the host plant is not sufficient to initiate gene silencing in the colonizing oomycete pathogen *Phytophthora parasitica*. *PloS one* **6**: e28114
- Zhang S, Klessig D (1998). Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 7433-7438
- Zhang S, Liu Y (2001). Activation of salicylic acid-induced protein kinase, a mitogen-activated protein kinase, induces multiple defense responses in tobacco. *The Plant cell* **13**: 1877-1889
- Zhang W, Gao S, Zhou X, Chellappan P, Chen Z, Zhou X, Zhang X, Fromuth N, Coutino G, Coffey M, Jin H (2011b). Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. *Plant molecular biology* **75**: 93-105
- Zhang X, Lii Y, Wu Z, Polishko A, Zhang H, Chinnusamy V, Lonardi S, Zhu JK, Liu R, Jin H (2013). Mechanisms of small RNA generation from cis-NATs in response to environmental and developmental cues. *Molecular plant* **6**: 704-715

- Zhang X, Xia J, Lii YE, Barrera-Figueroa BE, Zhou X, Gao S, Lu L, Niu D, Chen Z, Leung C, Wong T, Zhang H, Guo J, Li Y, Liu R, Liang W, Zhu JK, Zhang W, Jin H (2012). Genome-wide analysis of plant nat-siRNAs reveals insights into their distribution, biogenesis and function. *Genome biology* **13**: R20
- Zhang X, Yuan Y-R, Pei Y, Lin S-S, Tuschl T, Patel D, Chua N-H (2006). Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & development* **20**: 3255-3268
- Zhang X, Zhao H, Gao S, Wang WC, Katiyar-Agarwal S, Huang HD, Raikhel N, Jin H (2011c). Arabidopsis Argonaute 2 regulates innate immunity via miRNA393(*)-mediated silencing of a Golgi-localized SNARE gene, MEMB12. *Molecular cell* **42**: 356-366
- Zhang Y, Dorey S, Swiderski M, Jones J (2004). Expression of RPS4 in tobacco induces an AvrRps4-independent HR that requires EDS1, SGT1 and HSP90. *Plant J.* **40**: 213-224
- Zhao Y, DelGrosso L, Yigit E, Dempsey D, Klessig D, Wobbe K (2000). The amino terminus of the coat protein of Turnip crinkle virus is the AVR factor recognized by resistant arabidopsis. *MPMI* **13**: 1015-1018
- Zhao Y, Ma Z, Sundin G (2005). Comparative genomic analysis of the pPT23A plasmid family of Pseudomonas syringae. *Journal of bacteriology* **187**: 2113-2126
- Zhou J-M, Chai J (2008). Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses. *Current opinion in microbiology* **11**: 179-185
- Zhou, J., Wu, S., Chen, X., Liu, C., Sheen, J., Shan, L., & He, P. (2014). The Pseudomonas syringae effector HopF2 suppresses Arabidopsis immunity by targeting BAK1. *Plant J.* **77** (2): 235-245
- Zipfel C (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current opinion in immunology* **20**: 10-16
- Zuo Y, Deutscher M (2002). Mechanism of action of RNase T. I. Identification of residues required for catalysis, substrate binding, and dimerization. *The Journal of biological chemistry* **277**: 50155-50159
- Zvereva A, Pooggin M (2012). Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. *Viruses* **4**: 2578-2597

Phytobacterial Type III Effectors HopX1, HopAB1 and HopF2 Enhance Sense-Post-Transcriptional Gene Silencing Independently of Plant R Gene-Effector Recognition

Panagiotis F. Sarris,^{1,2} Shang Gao,³ Konstantinos Karademiris,² Hailing Jin,³ Kriton Kalantidis,^{1,2} and Nickolas J. Panopoulos^{1,2}

¹Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology, Hellas, PO Box 1527, Heraklion 71110, Crete, Greece; ²Department of Biology, University of Crete, 71409 Heraklion, Greece; ³Department of Plant Pathology and Microbiology, Center for Plant Cell Biology and Institute for Integrative Genome Biology, University of California, Riverside 92521, U.S.A.

Submitted 16 January 2011. Accepted 23 March 2011.

Plant- and animal-pathogenic bacteria deploy a variable arsenal of type III effector proteins (T3EP) to manipulate host defense. Specific biochemical functions and molecular or subcellular targets have been demonstrated or proposed for a growing number of T3EP but remain unknown for the majority of them. Here, we show that transient expression of genes coding certain bacterial T3EP (HopAB1, HopX1, and HopF2), which did not elicit hypersensitive response (HR) in transgenic green fluorescent protein (GFP) *Nicotiana benthamiana* 16C line, enhanced the sense post-transcriptional gene silencing (S-PTGS) triggered by agrodelivery of a GFP-expressing cassette and the silencing enhancement could be blocked by two well-known viral silencing suppressors. Further analysis using genetic truncations and site-directed mutations showed that the receptor recognition domains of HopAB1 and HopX1 are not involved in enhancing silencing. Our studies provide new evidence that phytobacterial pathogen T3EP manipulate the plant small interfering RNA pathways by enhancing silencing efficiency in the absence of effector-triggered immunity signaling and suggest that phytopathogenic bacterial effectors affect host RNA silencing in yet other ways than previously described.

Plants have evolved a number of efficient defense responses, both passive and active, against microbial and viral pathogens which, in turn, deploy appropriate strategies to overcome the various levels of plant defense (Chisholm et al. 2006; Gohre and Robatzek 2008; Jones and Dangl 2006; Voinnet 2001). An emerging consensus view is that pathogens deploy type III effector proteins (T3EP) as a main mechanism to suppress active defense of their hosts. One branch of active defense is triggered by the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by host cell transmembrane proteins that function as pattern recognition receptors (PRR) which, in turn, activate PAMP-triggered immunity (PTI). In compatible plant–bacte-

rium interactions, where disease develops, pathogens both avoid recognition by host resistance (*R*) genes and actively suppress PTI. Accumulating evidence suggests that bacterial pathogens accomplish this by delivering selected sets of proteins, termed T3EP, often directly to the plant cell interior via the type III secretion system (T3SS). Another branch of active defense, called effector-triggered immunity (ETI), is triggered in incompatible interactions, where disease does not develop, as a result of the functional recognition between bacterial avirulence (*avr*) genes and plant *R* genes (“gene-for-gene” systems) (Flor 1947). This form of defense is often expressed as rapid localized necrosis of cells contacting the pathogen or those in their immediate vicinity (hypersensitive response [HR]) (Chisholm et al. 2006; Dangl and Jones 2001; Jones and Dangl 2006; Nicaise et al. 2009; Tampakaki et al. 2010).

Accumulating evidence suggests that some nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NBS-LRR) receptors coded by *R* genes may detect Avr proteins in different ways: some by direct binding, others as complexes with host proteins, and others via their modification of host proteins (Ellis et al. 2007; Jones and Dangl 2006; Wulff et al. 2009). Avr proteins of bacterial pathogens constitute a subset of T3EP and the manifestation of the bacterial avirulence phenotype requires a functional T3SS (Chisholm et al. 2006). Importantly, in the absence of *R*–*avr* recognition, Avr proteins often promote virulence. Thus, these T3EP function as “double agents” in plant–microbe interactions, acting as virulence factors in one host genotype and as avirulence factors in another (Alfano and Collmer 2004; Tsiamis et al. 2000). It is also becoming increasingly apparent that the majority of phytobacterial T3EP can suppress either PTI triggered by various PAMPs, ETI triggered by other effectors, or both (Abramovitch and Martin 2005; Abramovitch et al. 2003; Espinosa and Alfano 2004; Guo et al. 2009; Huang et al. 1988; Mudgett 2005; Nomura et al. 2005), and some inhibit cell-wall-based defense response such as callose deposition (Hauck et al. 2003).

RNA silencing is an important mechanism of gene regulation mediated by small RNAs in plants and other eukaryotes and is implemented via small interfering (si)RNAs of different origins and modes of biogenesis. Recent studies showed that this mechanism is also involved in the manipulation of plant immune responses by bacterial pathogens (Katiyar-Agarwal and Jin 2010). For example, Dunoyer and colleagues (2006)

Corresponding author: N. J. Panopoulos; Telephone: +30 2810 394369, Fax: +30 2810 394408; E-mail: panopoul@imb.forth.gr

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that six supplementary figures, one supplementary table, and supplementary data analysis are published online. Also, Figure 7 appears in color online.

showed that siRNAs corresponding to T-DNA oncogenes initially accumulate in *Agrobacterium tumefaciens*-infected tissues and that loss-of-function RNA-dependent RNA polymerase 6 (*rdr6*) mutants of *Arabidopsis thaliana* are hypersusceptible to *A. tumefaciens* tumorigenesis. They suggested that successful infection relies on a potent antisilencing state established in tumors, whereby siRNA synthesis is specifically inhibited. This inhibition has only modest side effects on the micro (mi)RNA pathway, shown to be essential for disease development. Katiyar-Agarwal and associates (2006) reported that an endogenous “natural” siRNA (nat-siRNAATGB2) is specifically induced in *Arabidopsis thaliana* during the incompatible interaction with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 carrying *avr* gene (T3EP) *avrRpt2*, which specifies gene-for-gene resistance in RPS2 hosts. The authors concluded that the small RNA pathway components, RDR6 and HYL1, a double-stranded RNA binding protein that interacts with DCL1, are required for RPS2-mediated resistance (Katiyar-Agarwal et al. 2006). This nat-siRNA seems to contribute to RPS2-mediated race-specific incompatibility (disease resistance) by repressing the pentatricopeptide repeats protein-coding gene, a putative negative regulator of the RPS2 resistance pathway (Katiyar-Agarwal et al. 2006). Navarro and colleagues (2006) reported the induction of a plant miRNA, miR393, by a bacterial flagellin-derived peptide, the elicitor flg22. This miRNA targets messenger RNAs for the F-box auxin receptor TIR1 and its close paralogs, AFB2 and AFB3, and downregulates auxin responses which, in turn, restricts *P. syringae* pv. *tomato* growth in planta. In further studies, Katiyar-Agarwal and associates (2007) also identified another class of small RNAs, long siRNAs (lsiRNAs) in *Arabidopsis thaliana* which are 30 to 40 nucleotides long and seem to be induced by pathogen infection. One of them, AtlsiRNA-1, is specifically induced in incompatible *P. syringae* pv. *tomato* interactions mediated by the *avrRpt2* gene. Fahlgren and associates (2007) also reported the differential regulation of several mature miRNAs, including miR393, in response to Pto DC3000 *hrcC*⁻ mutant and flg22. Finally, Navarro and colleagues (2008) reported that HopAB2 and other *P. syringae* effectors suppress transcriptional activation, biogenesis, stability, or activity of some PAMP-responsive miRNAs. The HopAB2 effector suppresses miR393a and miR393b transcription independently of its E3-ligase activity, as is also the case for HopAB2-mediated suppression of the PAMP (flg22)-responsive basal defense marker gene FRK1 (He et al. 2006). The authors proposed that phytopathogenic bacteria, like plant viruses, have evolved mechanisms to suppress RNA silencing in order to cause disease.

Except in the study by Navarro and associates (2008), in the other experimental systems with *Pseudomonas* effectors, R-gene-specific effector recognition was operative (via the *RPS2-avrRpt2* gene pair), thus mirroring “incompatible” pathosystem settings. Therefore, a role for silencing in compatible *Pseudomonas* spp.–plant interactions, where ETI signaling is not expected to be operational, remains an open question.

In a routine screening of proven and putative bacterial T3EP from various plant-pathogenic bacterial strains for HR-inducing ability in a *Nicotiana benthamiana* green fluorescent protein (GFP)-expressing line (16C), we identified several T3EP that interfered with GFP silencing triggered by transient coexpression of the *gfp* gene. These T3EP do not trigger the HR in this host and are able to suppress this reaction when it is triggered by other effectors on tobacco and *Arabidopsis*, as well as the programmed cell death (PCD) in plants and yeast (Jamir et al. 2004). In this report, we present evidence that these T3EP enhance the activity of specific RNA silencing pathways when delivered by transient expression. Furthermore, we propose the use of silencing assays in functional genomics of phyto-

rial effectors and as an additional means for assigning cellular roles to T3EP, which will be especially useful for those with no other known or suggested biochemical, molecular, or cellular function.

RESULTS

HopAB1, HopAB2, HopX1, and HopF2 T3EP enhance GFP silencing.

In preliminary experiments, we examined whether the effectors that did not trigger HR in our model host *N. benthamiana* line 16C (HopAB1, HopX1, HopF2, and HopAB2, also known as VirPphA, AvrPphE, AvrPphF, and AvrPtoB, respectively) and the corresponding 35S::effector cassettes were biologically functional by carrying out HR assays on common bean gene-for-gene differentials or on nonhost plants as appropriate for each effector (Flor 1947; Jackson et al. 1999; Tsiamis et al. 2000) (data not shown) and by Northern analysis of RNA extracts from *N. benthamiana* 16C leaf tissue with effector-specific probes following agroinfiltration (Supplementary Fig. S5). The HopX1 and HopAB1 effectors elicited HR-like necrosis on common bean, as did the HopF2 and HopAB1 on several nonhost plants, when delivered by the *Agrobacterium* system.

The phenotypes of these effectors in *N. benthamiana* 16C leaves were as follows. The first three effectors did not elicit HR-like necrosis or other macroscopic reactions by this delivery method, except for progressive chlorosis or senescence of the infiltrated area after the 10th day postagroinfiltration (data not shown). The HopAB2 effector elicited progressive tissue collapse starting at day 4 after agroinfiltration. The nature and basis of this reaction is not obvious. HopAB1 and HopAB2 share 55% sequence identity and have similar domain structure but differ in several respects (Supplementary Fig. S4; also discussed below). It is not known which of these differences are responsible for the tissue collapse elicited by HopAB2, as opposed to HopAB1, in agroinfiltrated *N. benthamiana* 16C leaves.

Based on these experiments, the HopAB1, HopX1, and HopF2 effectors were subsequently examined for their ability or inability to affect the silencing mechanism on *N. benthamiana* 16C, a transgenic line expressing the mGFP5-ER protein constitutively (Ruiz et al. 1998), which is commonly used as an indicator plant for silencing assays (Voinnet et al. 2000). Sense post-transcriptional gene silencing (S-PTGS) was induced by transient expression of the *gfp* gene via agro-delivery of a 35S::GFP cassette. Effector delivery was accomplished by infiltration of 1:1 mixtures of agrobacteria (prepared just before infiltration), with one strain carrying the 35S::GFP and the other the 35S::T3EP constructs on binary vectors, as described by Voinnet and associates (2000) and Guo and Ding (2002). Agroinfiltrated leaves were examined daily for any visible effect of various T3EP on the GFP fluorescence intensity under UV light and differences between T3EP-treated and control panels were scored. For verification, the experiments were repeated at least 10 times in different *N. benthamiana* 16C and wild-type (WT) plants and the results were highly reproducible. Normally, in *N. benthamiana* 16C transient GFP overexpression following agroinfiltration leads initially to strong GFP fluorescence in the agroinfiltrated areas, followed by gradual decrease to baseline levels over a period of several days, due to the triggering of the silencing process following transient GFP overexpression (Ruiz et al. 1998). In our experiments, GFP fluorescence of the effector-treated areas was strongly reduced compared with the empty vector controls, beginning at 3 to 4 days postinoculation (dpi), and differences were maximized by 6 dpi. This was observed with HopX1 and HopAB1 (from *P.*

syringae pv. *tomato* DC3001 and *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B, respectively) but not with HopX1m, a naturally occurring variant of the HopX1 T3EP family found in *P. syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121 (Peet et al. 1986) that carries an *IS5* insertion at the 3' of its open reading frame that renders it nonfunctional in HR assays on resistant bean plants (Inoue and Takikawa 1999). With HopAB2, a reduction of GFP fluorescence compared with the empty vector controls was also observed at day 3 dpi (Supplementary Fig. S2) but the tissue collapse ensuing on the following day made GFP fluorescence assays at later days potentially unreliable.

T3EP affect positively GFP-specific siRNA accumulation.

The reduction in the GFP fluorescence following coinfiltration of agrobacteria carrying *35S::effector gene* and *35S::gfp* cassettes (Fig. 1) was accompanied by changes in GFP-specific mRNA and siRNA levels as determined by Northern analysis (Fig. 2I, II, and III). Specifically, in HopX1- and HopAB1-treated leaf panels, the GFP mRNA levels were reduced to approximately one-third of those detected in the empty vector control, and GFP-specific siRNA levels (measured by densitometric analysis of the specific Northern bands) were increased approximately threefold (Fig. 2I). No changes in GFP fluorescence, GFP mRNA, or GFP siRNA levels were seen in panels treated with the *hopX1m* allele (Fig. 2III). Similar results to HopX1 and HopAB1 were obtained with the HopF2 effector from *P. syringae* pv. *tomato* DC3001 (Supplementary Fig. S1). Based on these results, HopX1, HopAB1, and HopF2 appear to function as enhancers of GFP silencing under conditions in which the effectors do not trigger the HR.

Two viral RNA silencing suppressors reverse the T3EP enhancement effect.

To confirm that the phenomenon observed is silencing dependent, we performed coinfiltration and overlap-infiltration assays with agrobacteria carrying expression cassettes for two well-known viral silencing-suppressor proteins, plus agrobacteria carrying HopX1 and HopAB1 expression cassettes. Expression cassettes carrying the *Turnip crinkle virus* (TCV) silencing suppressor p38 (viral coat protein) (Thomas et al. 2003) and the *Cymbidium ringspot tobravirus* (CymRSV) silencing suppressor p19 (Havelda et al. 2003) cloned in appropriate binary vectors behind a *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter were introduced in *A. tumefaciens*. Selected areas of *N. benthamiana* 16C leaf panels were infiltrated with binary mixtures of *A. tumefaciens* strains (1:1 ratio, prepared just before infiltration), with one strain carrying the *35S::GFP* and the other the *35S::T3EP* constructs. Adjacent areas were infiltrated with 1:1 mixtures of agrobacteria carrying binary plasmids with either the GFP or the viral silencing suppressor 35S cassettes, such that the infiltrated areas partially overlapped (Chakravarthy et al. 2009; Oh and Collmer 2005). Infiltrated leaves were phenotypically screened and photographed under UV light at 6 dpi to observe the effect of the viral silencing suppressors on the T3EP-induced *gfp* silencing enhancement effect (Fig. 3). In contrast to the silencing enhancement seen with the T3EP, a strong suppression of GFP silencing was observed in the overlapping portion of the infiltrated areas (Fig. 3). Northern analysis of the GFP mRNAs and GFP siRNAs showed that this suppression was reflected in the GFP mRNA and siRNA levels (i.e., overaccumulation of GFP mRNAs and absence of GFP siRNAs in the

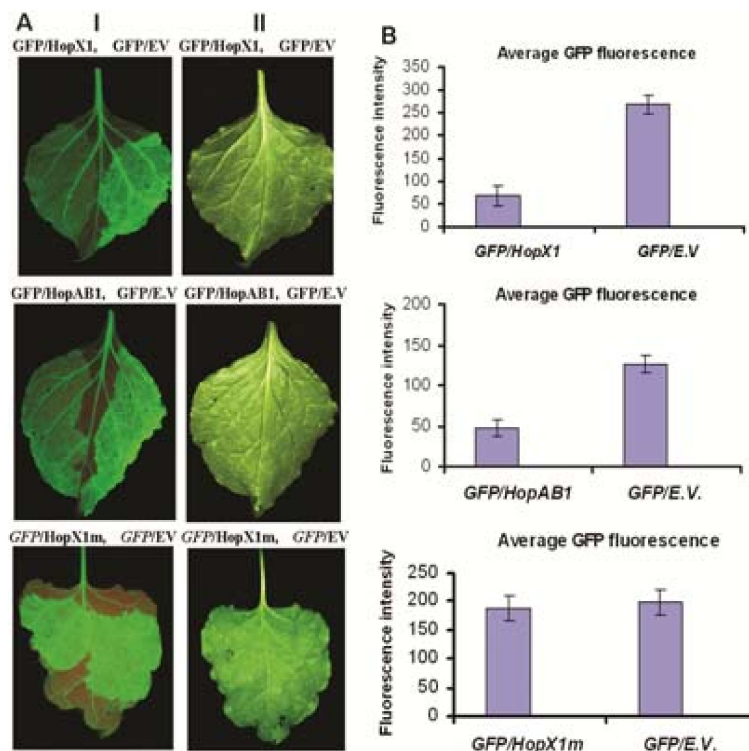


Fig. 1. Effect of transient expression of *hopX1*, *hopAB1*, and *hopX1m* on green fluorescent protein (GFP) silencing in *Nicotiana benthamiana* 16C plants. **A**, GFP fluorescence assay. Mixtures (1:1) of agrobacteria carrying the expression cassettes or control plasmids (empty vector [EV]) indicated above the images were infiltrated in *N. benthamiana* 16C leaves photographed at 6 days postinoculation (dpi) under UV (A-I) and visible (A-II). Agroinfiltration was carried out as described (Hamilton et al. 2002). GFP fluorescence was monitored 4 and 6 dpi with a hand-held long-wavelength UV lamp. Plants were photographed with a NIKON COOLPIX 990 digital camera, under UV (A-I) and normal light (A-II) and pictures were processed using Adobe Photoshop CS2. **B**, Densitometric quantification of GFP fluorescence in infiltrated leaf areas, using the *ImageJ* program (developed at the United States National Institutes of Health). Fluorescence intensity values were determined after subtracting background fluorescence of noninfiltrated areas on the same leaf. Experiments were repeated at least 10 times on separate plants.

presence of the two viral silencing suppressors) (Fig. 2I and II). The blocking effect of the viral suppressors on the GFP siRNA accumulation is a strong indication that the GFP silencing-enhancement phenotype induced by HopX1 and HopAB1 is silencing dependent. Overaccumulation of *hopAB1*, *hopX1*, and *hopX1m* mRNAs was also observed in the presence of the viral silencing suppressors.

The 376- to 539-residue C-terminal region of HopAB1 is sufficient for silencing-enhancement activity.

The absence of HR necrosis manifestation in the *N. benthamiana* 16C system implies that functional *R-avr* recognition is not required for the enhancement of GFP silencing and GFP siRNA accumulation. Nevertheless, many T3EP are multifunctional proteins, endowed with both virulence and avirulence functions which, presumably, are implemented via functional interactions with different host proteins. Accordingly, we sought to further examine the specific effector domains or functionalities responsible for the silencing enhancement phenomenon. HopAB1 was first identified as a virulence factor coded in a large *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1449B (race 7) plasmid and belongs to a gene family whose founding member is HopAB2 from *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. HopAB2 is a well-characterized, multifunctional effector with three distinct domains, each with different assigned functions: the N-terminal domain (residues 1 to 307), a central domain (Rsb, residues 308 to 387), and a C-terminal domain (residues 387 to 553) (Abramovitch and Martin 2005; Abramovitch et al. 2003; Xiao et al. 2007). The N-terminal domain interacts with the Pto kinase, a plant resistance protein, to activate Pto- or Prf-dependent immunity against *P. syringae* pv. *tomato* in resistant (*Pto*) tomato genotypes and promote ethylene-associated virulence

in susceptible (*pto*) tomato lines by interacting with an unknown protein (Xiao et al. 2007). The Rsb domain interacts with the Fen kinase (fenthion sensitivity) protein and these interactions are responsible for activating the plant immune response on certain tomato cultivars (Abramovitch et al. 2003; Janjusevic et al. 2006). The region comprising the Rsb plus the C-terminal domain (residues 308 to 553) is sufficient to suppress HR-based PCD. Deletion of the C-terminal domain allows the amino-terminal two-domain region of HopAB2 (HopAB2₁₋₃₈₇) to be detected by certain tomato cultivars, leading to immunity-associated PCD. The final 44 residues of the protein are necessary for both Pto- and Fen-mediated HR-based PCD in tomato (Abramovitch et al. 2003). The C-terminal shares three-dimensional structural homology with RING-finger/U-box E3 Ub ligases (eukaryotic E3 ubiquitin ligases), exhibits E3 ligase activity in vitro (Janjusevic et al. 2006), and ubiquitinates the Fen protein, promoting its degradation in a proteasome-dependent manner and leading to disease susceptibility in Fen-expressing tomato lines (Rosebrock et al. 2007).

We sought to identify specific domains of HopAB2 involved in the putative silencing phenotype in the *N. benthamiana* 16C line, taking advantage of functionally characterized mutants of this effector, recording GFP fluorescence measurements at 3 dpi. One of the mutants tested ($\Delta 4$) retains the Rsb and ubiquitin E3 ligase domains (Abramovitch et al. 2003) while the other, F489A, carries a site-directed substitution (F489A) in the full-length HopAB2 protein which strongly reduces its E3-ligase activity toward Fen (Janjusevic et al. 2006). Expression cassettes of these mutants cloned in the binary vector pBTEX in the *Agrobacterium* sp. strain GV2260 were tested on *N. benthamiana* 16C leaves. With the F489A mutant, GFP fluorescence differences were unreliable or impossible to record,

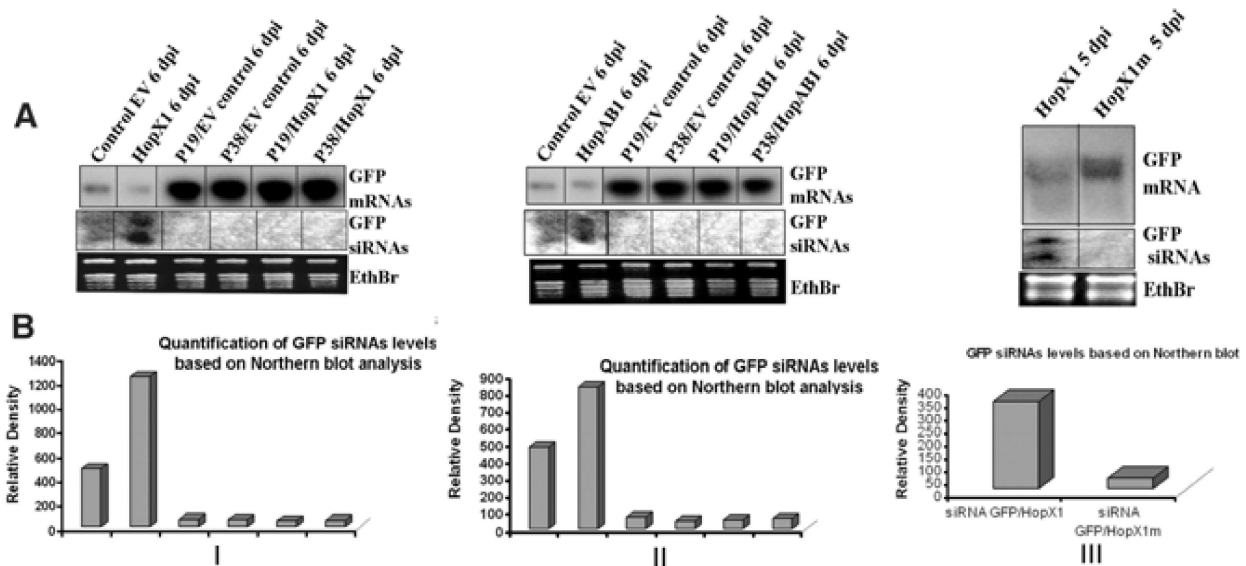


Fig. 2. Transient expression of *hopX1*, *hopAB1* enhances the RNA-mediated green fluorescent protein (GFP) silencing, in contrast to the nonfunctional *hopX1* allele (*hopX1m*) from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* NPS3121. Mixtures of agrobacteria (1:1) carrying the effector or viral protein expression cassettes or empty vector (EV) control plasmids indicated above the lanes were infiltrated in *Nicotiana benthamiana* 16C leaves. **I-A**, GFP mRNA and small interfering (si)RNA levels at 6 days postinoculation (dpi) in agroinfiltrated tissues are indicated above the images. A strong decrease of GFP mRNA and an increase of siRNA accumulation relative to the control are observed in the presence of *hopX1* at 6 dpi, indicating enhancement of the GFP silencing by HopX1. Expression of viral suppressors P19 and P38 alone relieves silencing and *hopX1* does not counteract this effect; GFP mRNA and siRNA levels in agroinfiltrated tissues are indicated above the images. **I-B**, Quantification (using the ImageJ program) of siRNA levels. In the presence of *hopX1*, the GFP siRNA level is increased approximately threefold compared with the empty vector control. **II-A**, GFP mRNA and siRNA levels at 6 dpi in agroinfiltrated tissues, as are indicated above the images. At 6 dpi, a decrease of GFP mRNA (below the control) and an increase of siRNA accumulation (above the control) was observed with *hopAB1*, indicating enhancement of GFP silencing. Expression of viral suppressors P19 and P38 alone or together with *hopAB1* strongly increased GFP mRNA while strongly decreasing GFP siRNA levels. **II-B**, Quantification (using the ImageJ program) of siRNA levels. In the presence of *hopAB1*, the GFP siRNA level is increased approximately twofold compared with the empty vector control. **III-A**, GFP mRNA and siRNA levels in agroinfiltrated tissues as indicated below the images. GFP siRNAs appear at 5 to 6 dpi. Strong GFP siRNA accumulation is seen in leaves treated with *hopX1* but not in those treated with *hopX1m*. **III-B**, Quantification of siRNA levels in *hopX1*- and *hopX1m*-treated leaves.

because the agroinfiltrated areas developed chlorosis and were completely white under UV illumination by 3 dpi, followed by progressive tissue collapse at later days. With the $\Delta 4$ mutant, just like the WT HopAB2, GFP fluorescence clearly showed a silencing enhancement phenotype at 3 dpi compared with the empty vector control (later measurements were not recorded due to collapse of the agroinfiltrated tissue at 4 dpi, a phenotype that may be attributed to interaction of the Rsb domain present in this mutant with a hypothetical Fen homologue in *N. benthamiana*). The N-terminal domain of HopAB2 ($\Delta 7$ mutant; Abramovitch et al. 2003) elicited strong tissue collapse by 3 dpi, which made the GFP fluorescence assay unreliable.

To overcome the progressive tissue collapse seen with the HopAB2 mutants, we took advantage of the similar domain structure of HopAB1 and HopAB2. We constructed a plant expression cassette (35S::AB1_CTD) expressing the C-terminal portion of HopAB1 (HopAB1₃₇₆₋₅₃₉) corresponding to the E3-ubiquitin ligase domain (residues 388 to 553) and lacking the regions corresponding to the N-terminal (Pto-interacting) and central (Rsb, Fen interacting) domains of HopAB2. The E3 Ub ligase regions of HopAB1 and HopAB2 are highly homologous (80% similarity, 64% identity), with only two single-residue relative deletions (T470 and P440 in the former are absent in the latter). This construct did not elicit any visible symptoms in line 16C during the 8- to 10-day observation period and retained the strong silencing-enhancement phenotype of the full-length HopAB1 protein (Fig. 4).

Silencing enhancement by HopX1 is independent of its R2-mediated defense triggering function.

According to Nimchuk and colleagues (2007), the HopX1 protein carries a putative catalytic triad strikingly homologous to the conserved catalytic triad domain of eukaryotic peptide-N-glycosidases and a novel conserved N-terminal domain. Both the catalytic triad and the N-terminal domain are required for the gene-for-gene specific interaction of *hopX1* with the R2 gene on resistant bean cultivars and the triggering of a cell-death response on *Arabidopsis* (Nimchuk et al. 2007). A site-direct mutation in the catalytic triad (C182A) and a triple alanine substitution in the N-terminal conserved domain, corresponding to residues R122, N124, and D126, abolish the R2-mediated defense response as well as the induction of the cell-death response on *Arabidopsis* spp. (Nimchuk et al. 2007). We tested these HopX1 mutants for their ability to affect GFP silencing in *N. benthamiana* 16C. None of the mutations had any significant effect on the ability of the HopX1 to enhance RNA silencing in our experiments (Fig. 5). This finding indicates that the silencing-enhancement activity of HopX1 is independent of its R2 recognition ability.

T3EP affect positively the lsiRNA and nat-siRNA accumulation levels.

Two studies (Katiyar-Agarwal et al. 2006, 2007) showed that an endogenous nat-siRNA, nat-siRNAATGB2 (ASRP 1957), and a novel class of small RNAs named lsiRNAs, 30 to 40 nucleotides long, sharing many common features with known siRNAs, are both specifically induced by the bacterial pathogen *P. syringae* carrying the *avrRpt2* gene. We studied the effect of HopAB1 and its truncation mutant retaining only the C-terminal domain, HopAB2 and its $\Delta 4$ (Rsb + C-terminal E3 ubiquitin ligase domain) and F489A mutant, HopX1 and its catalytic triad (C182A) and triple alanine substitution mutants on the endogenous lsiRNA and nat-siRNA accumulation in the *efr-1 Arabidopsis* Col-0 plants. The *efr* mutant sustained efficient transient transformation by *Agrobacterium* strains because it carried a mutation in EFR, the PAMP (bacterial EF-Tu)-recognition receptor, a receptor-like kinase which largely attenuates the

PAMP-triggered immunity of agroinfiltration (Zipfel et al. 2006) and, like the WT Col-0, does not develop necrosis with HopX1, HopAB1, or HopAB2. *Agrobacterium* strains carrying the 35S::*hopAB1*, 35S::*hopX1*, and 35S::*hopAB2* were examined here, along with *Agrobacterium* strains carrying the T3EP 35::*avrRpt2* as an HR-triggering control for comparison following the methods described by Katiyar-Agarwal and associates (2006, 2007). We observed that HopAB1 and HopX1 could weakly induce both nat-siRNAATGB2 and AtlsiRNA-1 at 4 dpi (Fig. 6). The fold accumulation for lsi- and nat-siRNA levels compared with the empty vector controls was similar to what was seen for the GFP siRNA accumulation (Fig. 2). Likewise, *Agrobacterium* strains carrying the 35S::*hopAB2*, 35S::*hopAB2*-F489A (E3 ubiquitin ligase) mutant, 35S::*hopAB2*- $\Delta 4$ mutant, and 35S::*hopAB2*- $\Delta 7$ mutant were examined. Surprisingly, the HopAB2-F489A mutant could still weakly induce both nat-siRNAATGB2 and AtlsiRNA-1 (Supplementary Fig. S6), although the induction levels were much weaker than those by HopAB1 (Fig. 6) compared with the empty vector controls. These results show that HopX1, HopAB1, and HopAB2 affect positively the lsi- and nat-siRNA accumulation in *efr-1 Arabidopsis* without triggering the HR and that the actual accumulation of these siRNAs remained considerably lower than what is observed in the incompatible RPS2-AvrRpt2-mediated *P. syringae* pv. *tomato*-*Arabidopsis* interaction. We did not see a clear effect of HopF2 on the accumulation of lsi- and nat-siRNA (data not shown).

Crown gall callus suppression by HopX1.

Based on the findings of Dunoyer and associates (2006), we reasoned that it might be possible to interfere with crown gall formation by oncogenic agrobacteria by expressing T3EP that enhance silencing at grown gall infection sites. To test this hypothesis, we introduced the binary pART27-35S::*hopX1* vector into the oncogenic *A. tumefaciens* A281 (Hood et al. 1986). Inoculations were carried out using this strain as well as *A. tumefaciens* A281 with and without pART27 (empty vector [EV]) as controls (Fig. 7A and C, respectively). Four representative leaf petioles were inoculated with each strain and all experiments were repeated at least four times, with similar results. Tumor development was scored and photographed 28 dpi. Typical crown gall tumors were observed in all WT T-DNA and EV treatments (Fig. 7). In contrast, no tumors developed in 85% of the petioles inoculated with the *A. tumefaciens* A281 carrying the 35S::*hopX1* expression cassette (Fig. 7B). A mild necrosis was observed in the epidermis around the inoculation area with the agrobacteria carrying 35S::*hopX1*. The same functional assay conducted with HopF2 and tumor formation gave 65 to 75% reduction of gall formation in tomato petioles (data not shown). The results suggest that transfer or expression of the 35S::*effector* cassettes carried on the binary T-DNA vector in the infected cells may interfere with the establishment of the antisilencing state proposed to be essential for crown gall development (Dunoyer et al. 2006).

DISCUSSION

Our studies provide new evidence that phyto-bacterial pathogen T3EP manipulate the plant siRNA pathways. By choosing effectors that do not elicit HR or other macroscopic symptoms in *N. benthamiana* 16C, we investigated their effects on RNA silencing pathways in the absence of ETI signaling or necrotic reactions elicited by effector-receptor functional recognition. Such effects were simply and conveniently monitored as changes in GFP fluorescence in agroinfiltrated leaves at appropriate time points along with appropriate controls and were confirmed at the molecular level by the detection of GFP-specific

siRNA levels in agroinfiltrated *N. benthamiana* 16C leaf tissue. The HopX1, HopAB1/AB2, and HopF2 effectors gave the strongest enhancement of S-PTGS in the *N. benthamiana* line 16C among several effectors that were surveyed and, for this reason, they were studied in some detail. In addition to increasing GFP siRNAs, these T3EP positively affected nat-siRNA and lsiRNA levels in noncollapsed agroinfiltrated leaves of *efr Arabidopsis thaliana*. However, the induction of nat-siRNA and lsiRNA was very weak compared with what is seen in HR-inducing experimental settings (Fig. 6) (Katiyar-Agarwal et al. 2006, 2007). The accelerated quenching of GFP fluorescence cannot be attributed to tissue collapse caused by the effector in the agroinfiltrated tissue. However, it is conceivable that high intracellular effector accumulation levels generally attained by agroinfiltration (Twyman et al. 2003) may cause other types of stress in the cells or may set in motion events that are not manifested as phenotypic or molecular-level responses studied thus far. Although the exact mechanism of effector involvement in silencing requires further study, the enhancement effects seen in the absence of ETI signaling points to a potential role of silencing in compatible *Pseudomonas* spp.–plant interactions.

The involvement of various gene-silencing pathways in the context of *P. syringae*–plant interactions has been documented in several studies and the subject was recently reviewed (Katiyar-Agarwal and Jin 2010). For example, several *Arabidopsis* endogenous siRNAs are induced by *P. syringae* pv. *tomato* carrying a T3EP (AvrRpt2) originating from the heterologous pathogen *P. syringae* pv. *pisi* (Katiyar-Agarwal et al. 2006, 2007). This effector is recognized by the cognate coiled-coil NBS-LRR R gene receptor RPS2, triggering ETI in the form of HR. In their study, effector delivery was via the native *Pseudomonas* T3SS. In the study by Navarro and associates (2008), T3EP derived from *P. syringae* pv. *tomato* DC3000

suppressed miR393a and miR393b RNA transcription, accumulation, and function in *Arabidopsis* following agrodelivery. Our findings extend these studies, by demonstrating the ability of *P. syringae* T3EP HopX1, HopAB1/AB2, and HopF2 to enhance the siRNA accumulation levels in another model plant, *N. benthamiana*, following agrodelivery.

The fact that silencing enhancement by the T3EP studied was seen in the absence of any macroscopically visible effect (other than on GFP fluorescence) in the *N. benthamiana* 16C leaves suggests that this activity is not related to functional effector-host R receptor recognition necessary for HR-PCD or ETI signaling. In an effort to further separate the plant receptor-recognition function from silencing enhancement, we used genetic truncations or site-directed mutants of the effectors investigated in this study. With the HopAB1, the C-terminal domain alone and the Rsb+C-terminal domains, respectively, were fully capable of GFP silencing enhancement. However, this ability could not be linked to or separated from the protein's E3 ubiquitinating ligase activity per se.

Dunoyer and colleagues (2006) showed that knockout mutants of *A. thaliana* affected in genes coding for protein components of the silencing machinery (*rdr6* loss-of-function plants), as well as transgenic plants expressing the p38 viral silencing suppressor, were hypersusceptible to crown gall tumor formation by WT agrobacteria. In earlier studies, Escobar and associates (2001, 2002) obtained broad-spectrum crown gall resistance in *Arabidopsis thaliana* and tomato (*Lycopersicon esculentum*) and English (Persian) walnut (*Juglans regia*) through the induction of PTGS by expressing self-complementary constructs designed to initiate PTGS for T-DNA genes (*iaaM* and *ipt*). Accordingly, we hypothesized that the T3EP capable of silencing enhancement might impart crown gall resistance in plants. We found that the presence of the 35S::

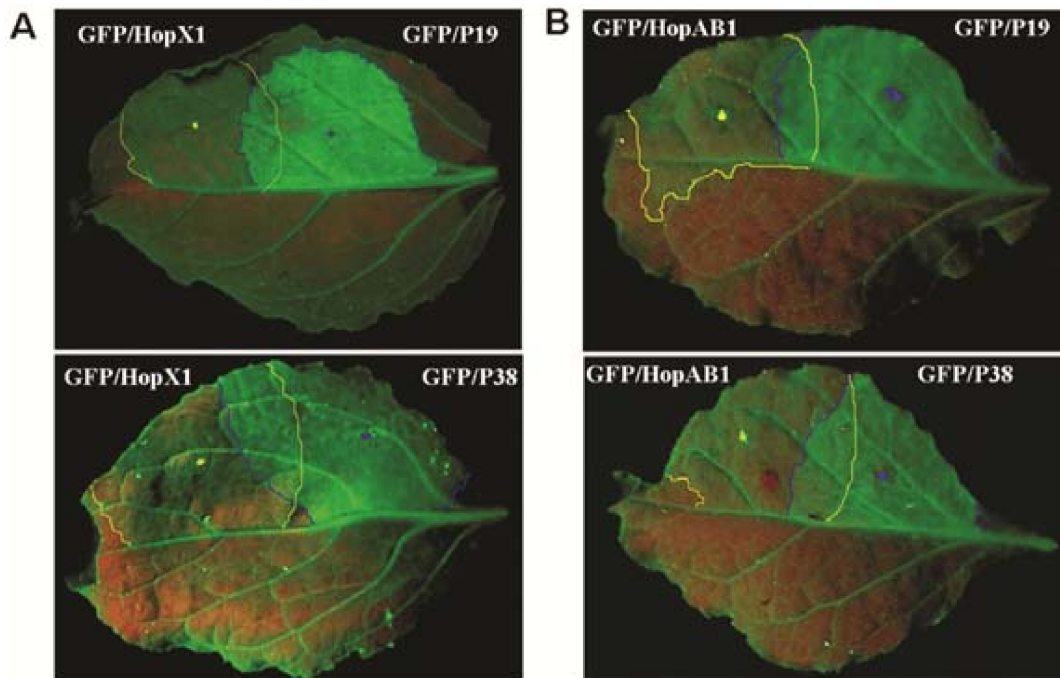


Fig. 3. Overlap infiltration assay (Chakravarthy et al. 2009; Oh and Collmer 2005) with agrobacteria carrying expression cassettes for hopX1 or hopAB1 and for viral silencing suppressor P19 or P38. Mixtures (1:1) of agrobacteria carrying separate expression cassettes for green fluorescent protein (GFP), type III effector proteins (HopX1 or HopAB1), and the viral silencing suppressors P19 or P38, each under the *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter, were infiltrated in *Nicotiana benthamiana* 16C leaves in combinations indicated above the images and photographed 6 days postinoculation. The type III effector silencing enhancer phenotype on green fluorescent protein (GFP) accumulation is fully reversed (strong fluorescence in the overlapping co-infiltration area) by both viral suppressors. **A**, *N. benthamiana* 16C leaves infiltrated with 1:1 mixtures of agrobacteria containing 35S::GFP/35S::hopX1, and 35S::GFP/35S::P19 or 35S::GFP/35S::P38. **B**, Leaves infiltrated with 1:1 mixtures of agrobacteria containing 35S::GFP/35S::hopAB1 and 35S::GFP/35S::P19 or 35S::GFP/35S::P38. Experiments were repeated at least eight times on separate *N. benthamiana* 16C plants with similar results.

hopX1 and *35S::hopF2* plant expression cassettes in WT *A. tumefaciens* A281 resulted in suppression of crown gall formation in the *N. benthamiana* and tomato petiole coinoculation assay. Crown gall callus suppression was also seen in stable *N. benthamiana* transformants expressing the *35S::hopX1* cassette (N. Skandalis, A. Papanikolaou, P. F. Sarris, and N. J. Panopoulos, unpublished data). In a recent study, Ellendorff and associates (2009) showed that RNA-dependent gene silencing plays an active role in the defense of plants toward the fungal pathogen *Verticillium dahliae*, which colonizes the conducting vessels of the plant root system. They suggested that *V. dahliae* depends on an active PTGS to successfully colonize the host and incite vascular disease.

Our studies raise several other questions or themes for further investigation. First, does effector-mediated silencing enhancement occur at sufficiently early stages of *Pseudomonas* spp.–plant interactions to promote virulence? Agroinfiltration assays take several days to give full expression of the transiently expressed transgenes and, in our experiments, the differences in the GFP fluorescence between effector-treated and control leaves were first observed at 3 dpi. This timing would appear to be sufficiently early for effector-enhanced silencing to play a role in productive pathogenesis. We carried out inoculations of

N. benthamiana with *P. syringae* pv. *syringae* B728a (5×10^5 CFU/ml) cassettes, both simultaneously and 24 h postinfiltration with agrobacteria carrying the HopX1, HopAB1, and HopF2 plant expression cassettes. These experiments did not produce conclusive results. However, recent studies (Guo et al 2009; Wilton et al 2010) showed that HopF2-expressing transgenic *Arabidopsis* supports higher populations of the compatible pathogen *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 at 4 and 3 dpi, respectively. Furthermore, expression of HopF2 in transgenic *Arabidopsis* plants compromised immunity to a necrotrophic fungal pathogen, *Botrytis cinerea*, as well as nonhost immunity to *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Wu et al. 2011). Finally, host defense suppression function has also been previously reported for HopAB1/2 (Jackson et al. 1999; de Torres et al. 2006) and HopX1 (Guo et al. 2009; Jamir et al. 2004). Second, how do these T3EP engage the plant-silencing machinery in molecular terms and how does this influence the expression of genes involved in the suppression of the host defense mechanisms? Our experiments do not directly address this question. Third, how widespread are silencing-enhancing effectors in phyto-bacterial genomes, and do these pathogens rely on silencing enhancement as part of their virulence strategy? Bioinformatic searches in wholly or partially sequenced phyto-bacterial ge-

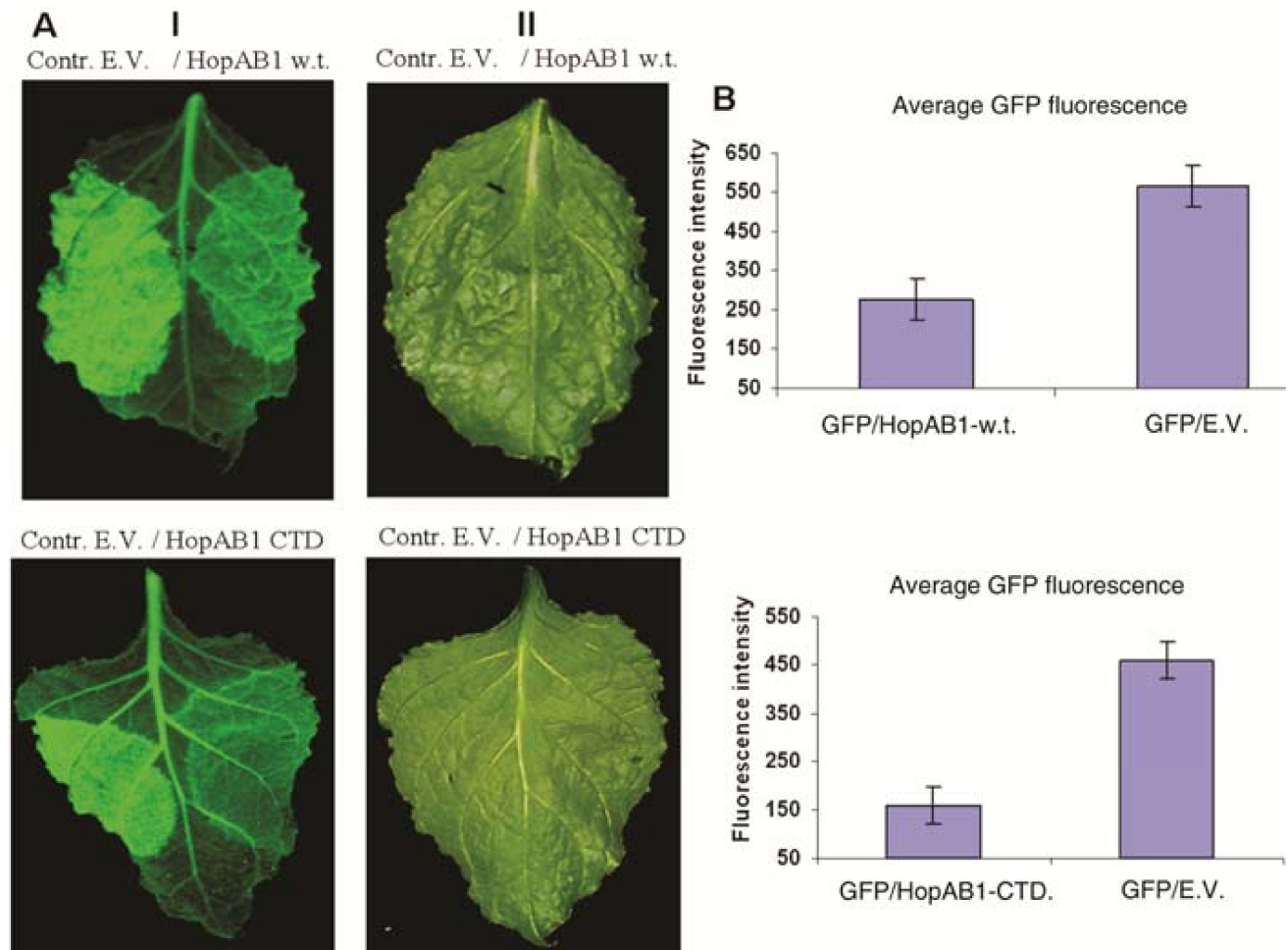


Fig. 4. Effect of transiently expressed *hopAB1* wild type (w.t.) and *hopAB1*-CTD (*HopAB1*₃₇₆₋₅₃₉) on green fluorescent protein (GFP) silencing in *Nicotiana benthamiana* 16C plants. *hopAB1* w.t. and the *hopAB1*-CTD have been cloned under the transcription regulation of the *35S Cauliflower mosaic virus* promoter in the pBin-Hyg-Tx vector. **A**, GFP fluorescence assay. Mixtures (1:1) of agrobacteria carrying the expression constructs indicated above the images were infiltrated in *N. benthamiana* 16C leaves photographed at 5 days postinoculation (dpi) under UV (A-I) and visible (A-II) light. Agroinfiltration was carried out as described (Hamilton et al. 2002). GFP fluorescence was monitored 4, 5, and 6 dpi with a handheld long-wavelength UV lamp. **B**, Densitometric quantification of GFP fluorescence in infiltrated areas of leaves. Experiments were repeated at least 10 times on separate plants with similar results.

nomes reveal the presence of multiple T3EP with homology to silencing enhancement-active T3E proteins studied here; for example, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A possess both HpAB1 and HopF2 (as well as HopX1 but with a point mutation of unknown phenotypic significance). Finally, because the T3SS mediates many pathogenic, symbiotic, and commensal gram-negative prokaryote–eukaryote interactions, it would be interesting to investigate whether bacteria possessing a T3SS engage the RNA-silencing pathways in the general context of their interorganismal associations.

The identification of T3EP from plant-pathogenic bacteria has been based on a number of criteria: avirulence function

tests (ability to restrict host range or to elicit HR on appropriate indicator plants), comparative genomic and bioinformatic analysis (homology to known effectors, linkage to T3SS genes or putative chaperones, T3SS-like regulation, T3SS secretion signals, or other characteristic motifs), T3SS-dependent secretion or translocation assays, and other *in vivo* genetic screens (Fujikawa et al. 2006; Grant et al. 2006; Nomura et al. 2006; Oh and Collmer, 2005). GFP fluorescence on *N. benthamiana* 16C and, perhaps, on other appropriate indicator plants can be easily scored; therefore, they might be considered as additional provisional candidate assays for possible effector function, if they are validated further.

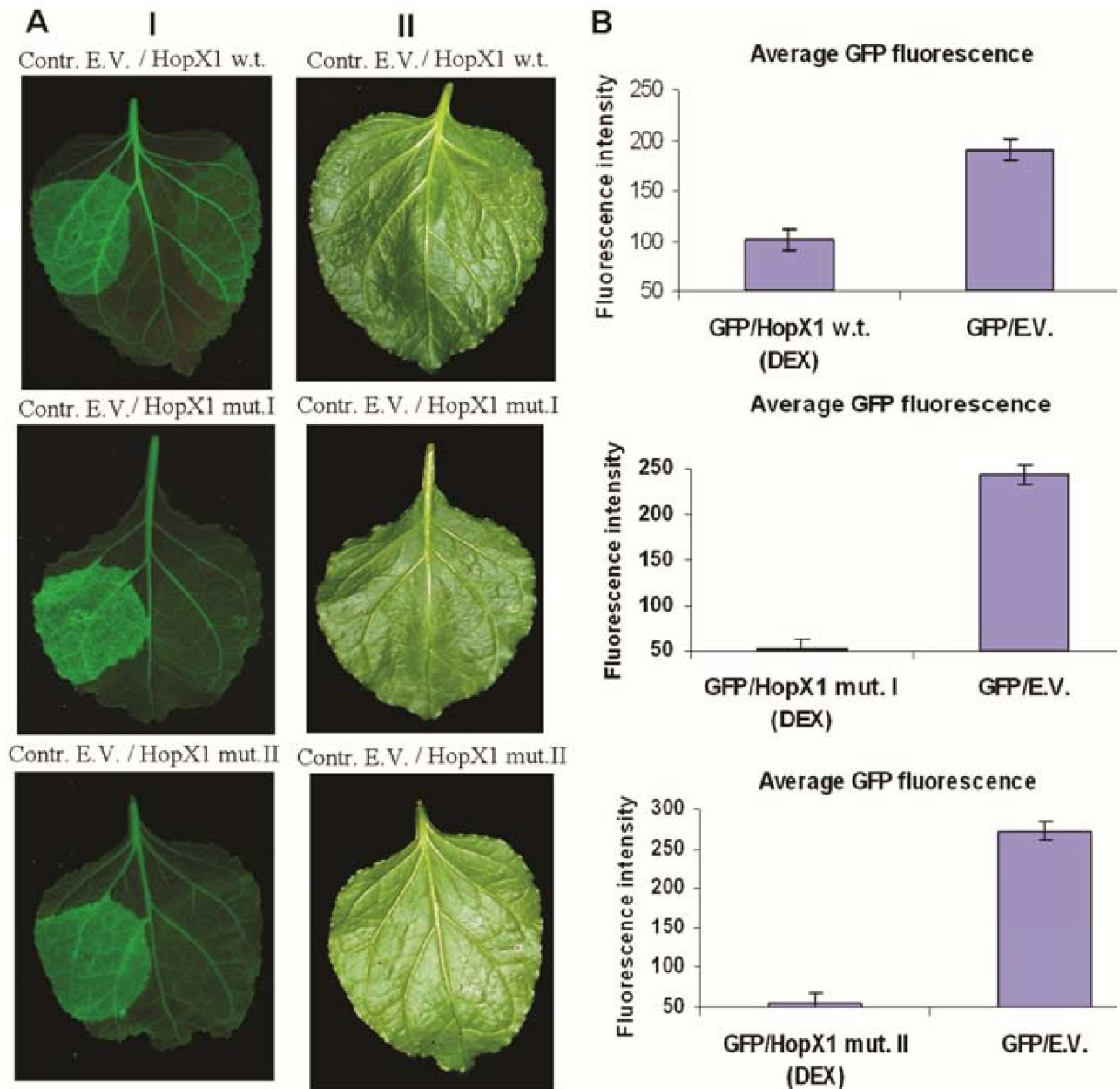


Fig. 5. Effect of transiently expressed *hopX1* wild type (w.t.), *hopX1* mutant 1 (N-terminal domain), and *hopX1* mutant 2 (catalytic triad) alleles on green fluorescent protein (GFP) silencing in *Nicotiana benthamiana* 16C plants. *hopX1* w.t. and the two mutants have been cloned under the transcription regulation of a dexamethasone (DEX)-inducible promoter in the pTA7002 vector. **A**, GFP fluorescence assay. Mixtures (1:1) of agrobacteria carrying the expression constructs indicated above the images were infiltrated in *N. benthamiana* 16C leaves photographed at 6 days postinoculation (dpi) under UV (A-I) and visible (A-II) light. Agroinfiltration was carried out as described (Hamilton et al. 2002). GFP fluorescence was monitored 4 and 6 dpi with a handheld long-wavelength UV lamp. **B**, Densitometric quantification of GFP fluorescence in infiltrated areas of leaves. Experiments were repeated at least 10 times on separate plants with similar results.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials.

N. benthamiana line 16C and WT *N. benthamiana* plants were grown in a glasshouse under controlled light and temperature. *N. benthamiana* 16C was kindly donated by D. Baulcombe, the Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, Norwich, U.K. The *Arabidopsis thaliana efr-1* seed, as well as the *Arabidopsis thaliana* ecotype *Col-0* seed, were donated by C. Zipfel (Zipfel et al. 2006).

Bacterial strains and vector construction.

All T-DNA constructs were cloned in binary vectors and were introduced into *A. tumefaciens* C58C1 by electroporation as described (Nagel et al. 1990). The virulent *A. tumefaciens* A281 strain was used for the agrosuppression assays (Kamoun et al. 2003). Dexamethasone inducible constructs for HopX1 WT and HopX1 mutants is described by Nimchuk and associates (2007). Other plant transformation vectors used in this study for effector delivery were constructed by cloning separate polymerase chain reaction products, with restriction sites added to the appropriate primers, into the vector polylinker (Supplementary Table S1) downstream from the CaMV 35S promoter. These vectors were

pART27/*hopX1* (effector gene obtained from *P. syringae* pv. *tomato* DC3001) (Landgraf et al. 2006), pART27/*hopX1m*, pBin-Hyg-Tx/*hopAB1*, pBin-A7-Tx/*hopAB1*-CTD, pBin-A7-Tx/*hopAB1*-NTD, and pART27/*hopF2* (Supplementary Data).

Agrobacterium transient expression assays in *N. benthamiana*.

A. tumefaciens C58C1 strains carrying the binary vector constructs were grown and prepared for transient expression as described by Koscianska and associates (2005) and Kalantidis and associates (2006). For monitoring the expression or silencing of GFP, a handheld 100-W long-wavelength UV lamp (B1000AP; Ultraviolet Products) was used, and a Nikon COOLPIX 990 digital camera was used for photography. Leaf RNA extractions were performed in samples flash-frozen and ground in a porcelain mortar under liquid nitrogen. For the GFP co-agroinfiltration assays, the pBIN-35S::*mgfp5*-ER construct (J. Haselhof, MRC Cambridge) was transferred to *A. tumefaciens* C58C1 by triparental mating using *Escherichia coli* HB101 (pRK2013) as the conjugation helper (Bevan 1984). For silencing-suppression assays, two viral silencing suppressors were used: the TCV silencing suppressor p38 (viral coat protein) cloned in the *Agrobacterium* vector pBin61 (Thomas et al. 2003) and the CymRSV silencing suppressor p19 cloned in the *Agrobacterium* vector pBI 121.1 (Havelda et al. 2003).

Agrobacterium-mediated transient expression in *Arabidopsis thaliana*.

Agrobacterium-mediated transient transformation was performed in the *Arabidopsis thaliana efr* mutant as previously described (Zipfel et al. 2006). Briefly, 4-week-old *efr* mutants were syringe-infiltrated with *A. tumefaciens* C58C1 strain carrying T3EP cDNAs driven by the 35S promoter. The same strain carrying the empty vector, including the 35S promoter, was used as a negative control. *Agrobacterium* were grown for 2 days at 28°C and resuspended in an *Agrobacterium* induction medium containing acetosyringone at 50 µg/ml as described (Koscianska et al. 2005). The bacteria were then left in the dark with mild shaking (room temperature) for 5 to 7 h in induction medium and further resuspended into MES (0.1 g/liter)/MgCl₂ (10 mM) to an optical density at 600 nm of 0.4 before syringe infiltration. Samples were collected at 4 days postinfiltration.

mRNA and small RNA gels and Northern blot analysis.

Small RNA and mRNA gels and blot analyses were done as described (Kalantidis et al. 2006; Koscianska et al. 2005), using *m-gfp4*-ER or an effector gene-derived random priming

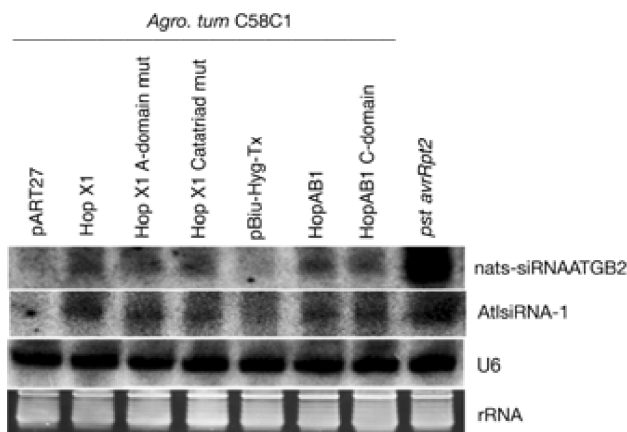


Fig. 6. Effect of transient expression of cassettes for hopAB1, HopAB1-C terminal domain (residues 376-539), HopX1, and HopX1-A domain and catalytic triad mutants and HopAB1-C terminal domain (residues 376 to 539) on the IsRNA and nat-siRNA accumulation in agroinfiltrated *efr-1 Arabidopsis* plants. For these experiments, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 carrying the *avrRpt2* gene was used as a positive technical control for comparison.

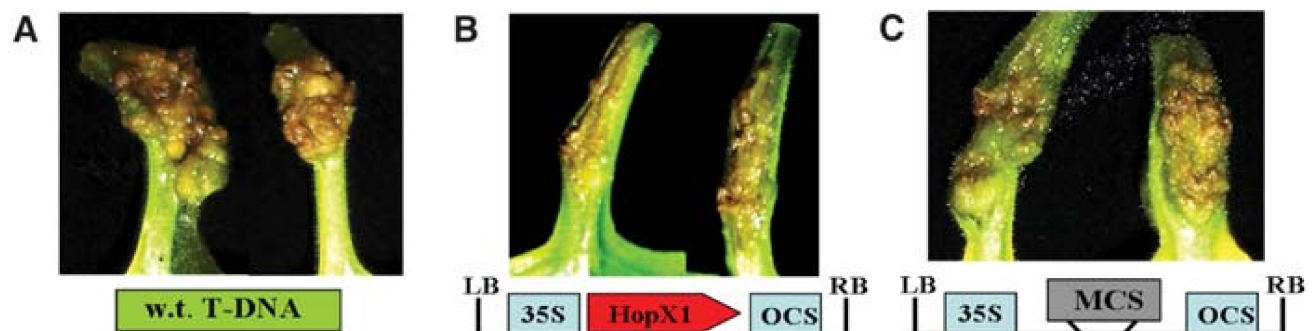


Fig. 7. Inhibition of crown gall tumor development in petioles of *Nicotiana benthamiana*. Petioles of wild-type (w.t.) *N. benthamiana* leaves were photographed 28 days after inoculation with: **A**, *Agrobacterium tumefaciens* A281 (*A. tumefaciens* C58C1 [pTiBo542], induces crown gall tumors); **B**, *A. tumefaciens* A281 carrying the 35S::*hopX1* cassette; and **C**, *A. tumefaciens* A281 carrying pART27 (empty vector [EV]) used as negative control. The relevant elements of the T-DNAs are schematically drawn below the photographs. 35S refers to the *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter and OCS refers to the octopine synthase gene transcription terminator region. Four petioles were inoculated for each treatment and all experiments were repeated at least four times. Crown gall tumors were observed in all **A**, w.t. Ti and **C**, EV treatments. In contrast, no gall formation was observed in 80% of the petioles inoculated with *A. tumefaciens* A281 carrying the 35S::*hopX1* expression cassette.

radiolabeled probe. Total RNA was extracted from pooled leaf samples of three different plants, ground in liquid nitrogen using a Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Northern analysis of low molecular weight RNAs was performed with 50 to 60 µg of total RNA, measured in a NanoDrop instrument (Thermo Scientific NanoDrop 1000 Spectrophotometer) as described (Akbergenov et al. 2006). Ethidium bromide staining and visualization of total RNA bands in agarose RNA gels was used to monitor the loading of RNA samples.

Agrobacterium dexamethasone-inducible transient expression assays.

Transient transformation assays were performed, as previously described, using 30 µM dexamethasone (Nimchuk et al. 2007). *N. benthamiana* 16C plants were scored for phenotypes 20 and 48 h postinduction.

Callus agrosuppression assay.

A binary vector carrying 35S::hopX1 was introduced into a WT *A. tumefaciens* A281 (a C58C1 derivative carrying the WT Ti plasmid pTiBo542) which induces crown gall tumors (Hood et al. 1986). WT *N. benthamiana* plants (approximately 5 weeks old) were used for the agrosuppression assay, as described (Kamoun et al. 2003). Plants were cultured and maintained in a greenhouse under controlled temperature and light conditions. Inoculations were performed on the upper (younger) five leaves by dipping a wooden sterile toothpick into a bacterial colony and wounding the leaves twice along the petiole. Symptoms were scored daily and typically started to develop within 12 dpi. All experiments were repeated at least four times, and a minimum of three plants were used per experiment.

Image analysis.

Image and pixel analyses for GFP density, siRNAs, and mRNA quantification were performed with ImageJ 1.37v (developed at the United States National Institutes of Health and available online). Photography and densitometry details are given in the captions of Figures 1 and 7.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. Haseloff for the mGFP4 plasmid, D. Baulcombe for the *N. benthamiana* 16C line, J. Burgan for the p19 plasmid, A. Maulea for the p38 plasmid, J. Dangl for dexamethasone-inducible *hopX1* plasmids, J. Mansfield for the *P. syringae* pv. *tomato* DC3001 strain, D. Cuppels for the *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 strain, G. Martin for the WT *avrPtoB*, Δ4, NTD, and F489A mutants, and P. Moschou for his help with the use of radioactive materials. This research was supported in part by Secretariat for Research and Technology grants 05NON-EU-170 and PENED875-03ED to N. Panopoulos, ESPA 09FR17 to K. Kalantidis, and National Institutes of Health grant R01 GM093008 and a National Science Foundation Career Award MCB-0642843 to H. Jin.

LITERATURE CITED

Abramovitch, R. B., and Martin, G. B. 2005. AvrPtoB: A bacterial type III effector that both elicits and suppresses programmed cell death associated with plant immunity. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett.* 245:1-8.

Abramovitch, R. B., Kim, Y. J., Chen, S., Dickman, M. B., and Martin, G. B. 2003. *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 22:60-69.

Akbergenov, R., Si-Ammour, A., Blevins, T., Amin, I., Kutter, C., Vanderschuren, H., Zhang, P., Gruissem, W., Meins, F., Jr., Hohn, T., and Pooggin, M. M. 2006. Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucleic Acids Res.* 34:462-471.

Alfano, J. R., and Collmer, A. 2004. Type III secretion system effector

proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:385-414.

Bevan, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12:8711-8721.

Chakravarthy, S., Velásquez, A. C., and Martin, G. B. 2009. Assay for pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity (PTI) in plants. *JoVE* 31. doi:10.3791/1442. Published online.

Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B. J. 2006. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124:803-814.

Dangl, J. L., and Jones, J. D. G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833.

Dunoyer, P., Himber, C., and Voinnet, O. 2006. Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent *Agrobacterium tumefaciens* infections. *Nat. Genet.* 38:258-263.

Ellendorff, U., Fradin, E. F., de Jonge, R., and Thomma, B. P. H. J. 2009. RNA silencing is required for *Arabidopsis* defense against *Verticillium* wilt disease. *J. Exp. Bot.* 60:591-602.

Ellis, J. G., Dodds, P. N., and Lawrence, G. J. 2007. Flax rust resistance gene specificity is based on direct resistance-avirulence protein interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:289-306.

Escobar, M. A., Civerolo, E. L., Summerfelt, K. R., and Dandekar, A. M. 2001. RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98:13437-13442.

Escobar, M. A., Leslie, C. A., McGranahan, G. H., and Dandekar, A. M. 2002. Silencing crown gall disease in walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Sci.* 163:591-597.

Espinosa, A., and Alfano, J. R. 2004. Disabling surveillance: Bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cell. Microbiol.* 6:1027-1040.

Fahlgren, N., Howell, M. D., Kasschau, K. D., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Cumbie, J. S., Givan, S. A., Law, T. F., Grant, S. R., Dangl, J. L., Carrington, J. C. 2007. High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: Evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS ONE* 2:e219. doi:10.1371/journal.pone.0000219. Published online.

Flor, H. H. 1947. Inheritance of reaction to rust in flax. *J. Agric. Res.* 74:241-262.

Fujikawa, T., Yamashita, T., and Tsuyumu, S. J. 2006. Hypersensitive response suppression by type III effectors of plant pathogenic bacteria. *Gen. Plant Pathol.* 72:176-179.

Gohre, V., and Robatzek, S. 2008. Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:189-215.

Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M., and Dangl, J. L. 2006. Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:425-449.

Guo, H. S., and Ding, S. W. 2002. A viral protein inhibits the long range signalling activity of the gene silencing signal. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 21:398-307.

Guo, M., Tian, F., Wamboldt, Y., and Alfano J. R. 2009. The majority of the Type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 can suppress plant immunity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:1069-1080.

Hamilton, A. J., Voinnet, O., Chappell, L., and Baulcombe, D. C. 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 21:4671-4679.

Hauk, P., Thilmony, R., and He, S. Y. 2003. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:8577-8582.

Havelda, Z., Hornyik, C., Crescenzi, A., and Burgan, J. 2003. In situ characterization of Cymbidium Ringspot Tombusvirus infection-induced posttranscriptional gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J. Virol.* 77:6082-6086.

He, P., Shan, L., Lin, N.-C., Martin, G. B., Kemmerling, B., Nürnberger, T., and Sheen, J. 2006. Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* 125:563-575.

Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T., and Chilton, M. D. 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168:1291-1201.

Huang, H.-C., Shuurink, R., Denny, T. P., Atkinson, M. M., Baker, C. J., Yucel, I., Hutcheson, S. W., and Collmer, A. 1988. Molecular cloning of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* gene cluster that enables *Pseudomonas fluorescens* to elicit the hypersensitive response in tobacco plants. *J. Bacteriol.* 179:4748-4756.

Inoue, Y., and Takikawa, Y. 1999. Investigation of repeating sequences in *hrpL* neighboring region of *Pseudomonas syringae* strains. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 65:100-109.

- Jackson, R. W., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Mansfield, J. W., Sesma, A., Arnold, D. L., Gibbon, M. J., Murillo, J., Taylor, J. D., and Vivian, A. 1999. Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:10875-10880.
- Jamir, Y., Guo, M., Oh, H.-S., Petnicki-Ocwieja, T., Chen, S., Tang, X., Dickman, M. B., Collmer, A., and Alfano, J. R. 2004. Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. Plant J. 37:554-565.
- Janjusevic, R., Abramovitch, R. B., Martin, G. B., and Stebbins, C. E. 2006. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. Science 311:222-226.
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. Nature 444:323-329.
- Kalantidis, K., Tsagris, M., and Tabler, M. 2006. 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. Plant J. 45:1006-1016.
- Kamoun, S., Hamada, W., and Huitema, E. 2003. Agrosuppression: A bioassay for the hypersensitive response suited to high-throughput screening. Mol. Plant-Microbe Interact. 16:7-13.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Jr., Zhu, J.-K., Staskawicz, B. J., and Jin, H. 2006. A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103:18002-18007.
- Katiyar-Agarwal, S., Gao, S., Vivian-Smith, A., and Jin, H. 2007. A novel class of bacteria-induced small RNAs in *Arabidopsis*. Genes Dev. 21:3123-3134.
- Katiyar-Agarwal, S., and Jin, H. 2010. Role of small RNAs in host-microbe interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 48:225-246.
- Koscianska, E., Kalantidis, K., Wypijewski, K., Sadowski, J., and Tabler, M. 2005. Analysis of RNA silencing in agroinfiltrated leaves of *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*. Plant. Mol. Biol. 59:647-661.
- Landgraf, A., Wingart, H., Tsiamis, G., and Boch, J. 2006. Different versions of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 exist due to the activity of an effector transposon. Mol. Plant Pathol. 7:355-364.
- Mudgett, M. B. 2005. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 56:509-531.
- Nagel, R., Elliot, A., Masel, A., Birch, R. G., and Manners, J. M. 1990. Electroporation of binary Ti plasmid vector into *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett. 67:325-328.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., and Jones, J. D. G. 2006. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. Science 312:436-439.
- Navarro, L., Jay, F., Nomura, K., He, S. Y., and Voinnet, O. 2008. Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. Science 321:964-967.
- Nicaise, V., Roux, M., and Zipfel, C. 2009. Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: Pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. Plant Physiol. 150:1638-1647.
- Nimchuk, L. Z., Fisher, E. J., Desveaux, D., Chang, J. H., and Dangl, J. L. 2007. The HopX (AvrPphE) Family of *Pseudomonas syringae* type III Effectors require a catalytic triad and a novel N-terminal domain for function. Mol. Plant-Microbe Interact. 20:346-357.
- Nomura, K., Melotto, M., and He, S. Y. 2005. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. Curr. Opin. Plant Biol. 8:361-368.
- Nomura, K., DebRoy, S., Lee, Y. H., Pumplin, N., Jones, J., and He, S. Y. 2006. A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. Science 313:220-223.
- Oh, S. H., and Collmer, A. 2005. Basal resistance against bacteria in *Nicotiana benthamiana* leaves is accompanied by reduced vascular staining and suppressed by multiple *Pseudomonas syringae* type III secretion system effector proteins. Plant J. 44:348-359.
- Peet, R. C., Lindgren, P. B., Willis, D. K., and Panopoulos, N. J. 1986. Identification and cloning of genes involved in phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. J. Bacteriol. 166:1096-1105.
- Rosebrock, T. R., Zeng, L., Brady, J. J., Abramovitch, R. B., Xiao, F., and Martin, G. B. 2007. A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. Nature 448:370-374.
- Ruiz, M. T., Voinnet, O., and Baulcombe, D. C. 1998. Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. Plant Cell 10:937-946.
- Tampakaki, A. P., Skandalis, N., Gazi, A. D., Sarris, P. F., Bastaki, M. N., Charova, S. N., Kokkinidis, M., and Panopoulos, N. J. 2010. Playing the harp: Evolution of our understanding of the bacterial *hrp* genes. Annu. Rev. Phytopathol. 48:347-370.
- Thomas, L. C., Leh, V., Lederer, C., and Maulea, A. J. 2003. Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. Virology 306:33-41.
- Tsiamis, G., Mansfield, J. W., Hockenull, R., Jackson, R. W., Sesma, A., Athanassopoulos, E., Bennett, M. A., Stevens, C., Vivian, A., Taylor, J. D., and Murillo, J. 2000. Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to avrPphF in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J. 19:3204-3214.
- Twyman, R. M., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., and Fischer, R. 2003. Molecular farming in plants: Host systems and expression technology. Trends Biotechnol. 21:570-578.
- Voinnet, O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. Trends Genet. 17:449-459.
- Voinnet, O., Lederer, C., and Baulcombe, D. C. 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. Cell 103:157-167.
- Wilton, M., Subramaniam, R., Elmore, J., Felsensteiner, C., Coaker, G., and Desveaux, D. 2010. The type III effector HopF2_{no} targets Arabidopsis RIN4 protein to promote *Pseudomonas syringae* virulence. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107:2349-2354.
- Wu, S., Lu, D., Kabbage, M., Wei, H. L., Swingle, B., Records, A. R., Dickman, M. B., He, P., and Shan, L. 2011. Bacterial effector HopF2 suppresses *Arabidopsis* innate immunity at the plasma membrane. Mol. Plant-Microbe Interact. 24:585-593.
- Wulff, B. B., Chakrabarti A., and Jones, D. A. 2009. Recognition specificity and evolution in the tomato-*Cladosporium fulvum* pathosystem. Mol. Plant-Microbe Interact. 22:1191-1202.
- Xiao, F., Ping He, P., Abramovitch, R. B., Dawson, J. E., Nicholson, L. K., Sheen, J., and Martin, G. B. 2007. The N-terminal region of *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB elicits Pto-dependent immunity and has two distinct virulence determinants. Plant J. 52:595-614.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D. G., Boller, T., and Felix, G. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. Cell 125:749-760.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCE

United States National Institutes of Health Image J webpage: rsb.info.nih.gov/ij

Erratum published online on February 6, 2012

The authors also acknowledge that K. Konstantinos is supported by a scholarship from the Greek State and the ESR-EU and ESPA (Heraclitus II, KA 3396). They thank the M. Tsagris labs for sharing chemicals and equipment and S. Zerveas, K. Nikos, and S. Kostas for technical assistance.