ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΕΣΩ ΔΟΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΚΩΤΣΑΡΙΔΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2022

Διερεύνηση μολυσματικών πρωτεϊνών φυτικών παθογόνων μέσω δομικών και λειτουργικών προσεγγίσεων

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΚΩΤΣΑΡΙΔΗΣ

Επιβλέπων: Επίκουρος Καθηγητής Παναγιώτης Σαρρής

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Παναγιώτης Σαρρής Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Κρίτων Καλαντίδης Καθηγήτης Πανεπιστημίου Κρήτης

Παναγιώτης Μόσχου Αναπληρωτή Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Επταμελής Εξεταστική επιτροπή:

Παναγιώτης Σαρρής Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Κρίτων Καλαντίδης Καθηγήτης Πανεπιστημίου Κρήτης

Παναγιώτης Μόσχου Αναπληρωτή Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης

Κυριάκος Κοτζαμπάσης Καθηγήτης Πανεπιστημίου Κρήτης

Δημήτριος Χατζηνικολάου Αναπληρωτή Καθηγητής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Εμμανουήλ Τραντάς Επίκουρος Καθηγητής Ελληνικού Μεσογειακού Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιωάννης Παυλίδης Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτη

Στην οικογένεια μου και

στις ''Ντίνες'' στη ζωή μου

What a man does for pay is of little significance. What he is, as a sensitive instrument responsive to the world's beauty, is everything!

H. P. Lovecraft

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Αλληεπιδράσεων Μικροβίου Ξενιστή, όπως επίσης και στο εργαστήριο Κρυσταλλογραφίας στο Πανεπιστήμιο Κρήτης και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Έρευνας (χρηματοδότηση ΕΡΕΥΝΩ-ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ με κωδικό έργου ΤΙΕDΚ-01878), υπό την επίβλεψη του Επίκουρου καθηγητή Παναγιώτη Σαρρή και της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής που αποτελούνταν από τον Καθηγητή Κρίτων Καλαντίδη και Παναγιώτη Μόσχου. Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής έκρινε η επταμελής επιτροπή που αποτελούνταν από την τριμελή επιτροπή και τους Καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση, Αναπληρωτή Καθηγητή Δημήτρη Χατζηνικολάου, Επίκουρο Καθηγητή Εμμανουήλ Τραντά και Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Παυλίδη.

Σε αυτό το σημείο, και ολοκληρώνοντας την παρούσα διδακτορική διατριβή, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου επίκουρο καθηγητή Παναγιώτη Σαρρή, για τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφερε στο θέμα της ερευνητικής μου εργασίας και όχι μόνο, και για την τέλεια συνεργασία μας, όπως επίσης και τον καθηγητή Μιχάλη Κοκκινίδη και την κα. Αρχοντία Κοτσιφάκη, για την υπέροχη φιλοξενία και τις ερευνητικές συμβουλές και διδαχές. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω, τα άλλα δύο μέλη της τριμελής μου επιτροπής καθηγητή Κρίτων Καλαντίδη και αναπληρωτή καθηγητή Παναγιώτη Μόσχου, για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην παρούσα εργασία και για το γεγονός πως ήταν πάντα στο πλευρό μου όταν τους χρειαζόμουνα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς μου επιτροπής για την άμεση απόκριση και τον χρόνο που αφιέρωσαν στην παρούσα εργασία. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, τον Δρ. Αναστάσιο Περράκη και Δρ. Patrick Celie, για την άψογη φιλοξενία κατά τη διάρκεια της τρίμηνης παραμονής μου στο Ινστιτούτο Καρκίνου της Ολλανδίας.

Συνεχίζοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη που βρίσκονται ή πέρασαν από τα εργαστήρια που διεκπεραιώθηκε η παρούσα διατριβή, αλλά συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Δρ. Γλυκερία Μέρμιγκα, Δρ. Βασιλική Μιχαλοπούλου και κα. Δήμητρα Τσακίρη, η συνεργασία μου με τις οποίες ήταν άψογη και ειδικότερα για τις συμβουλές τους και τις συζητήσεις ψυχολογικής υποστήριξης σε όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα εκείνα, τα οποία δεν δουλεύαμε μαζί, αλλά ήταν στο πλευρό μου και ακολουθούσαν την πορεία μου, εμψυχώνοντας και συμβουλεύοντας με και κάνοντας τον χρόνο μου ευχάριστο: τους Θανάση Ρογδάκη, Βασίλη Παπαδογιάννη, Δέσποινα Χαρού, Σπύρο Χαυλή, Αθανασία Παπουτσή, Βασιλική Μεθενίτη, Άννα Καραγεωργιάδου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, την κοπέλα μου Κωνσταντίνα Κωτσιοπούλου, τους συγκατοίκους μου Γιάννη Ράλλη και Ειρήνη Γρατσία. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους Δρ. Νίκων Βασιλάκος και Δρ. Δέσποινα Μπερή, οι οποίοι με την διδασκαλία και τις συμβουλές τους με προετοίμασαν για τις ανάγκες και απαιτήσεις της διδακτορικής μου διατριβής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μοριακές αλληλεπιδράσεις φυτών-μικροβίων είναι ένα σημαντικό ερευνητικό πεδίο, η κατανόηση του οποίου μπορεί να οδηγήσει τόσο στο σγεδιασμό πιο επιτυχημένων νέων στρατηγικών για μια βιώσιμη παραγωγή τροφίμων, όσο και στην κατανόηση των βασικών βιολογικών μηχανισμών που καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις αυτές σε μοριακό επίπεδο. Ωστόσο, η δομική προσέγγιση των μοριακών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, μεταξύ ενός παθογόνου και των στόχων του στον ξενιστή, δεν έχει μελετηθεί σε μεγάλος βάθος από την επιστημονική κοινότητα. Η σημαντική πρόοδος που έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια λόγω της ραγδαίας ανάπτυξης προγραμμάτων τεχνητής νοημοσύνης, τα οποία είναι ικανά να προβλέπουν την τριτοταγή δομή μιας πρωτεΐνης και ως αποτέλεσμα, την περαιτέρω εμβάθυνση και δημιουργία υποθέσεων σχετικά με τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών, μπορεί να βοηθήσει αλλάζοντας δραματικά τους τρόπους προσέγγισης και μελέτης στο πεδίο αυτό.

Ο γενικότερος συλλογισμός και πειραματικός σχεδιασμός της παρούσας διατριβής παρουσιάζεται στο πρώτο Κεφάλαιο: «Εισαγωγή», όπου περιγράφεται η βασική θεωρία για τη συντήρηση των πρωτεϊνικών δομών των τελεστών που έχουν όμοιες λειτουργίες εντός του κυττάρου του ξενιστή, ενώ γίνεται μια πρώτη εφαρμογή των προγραμμάτων υπολογισμού τριτοταγούς δομής πρωτεϊνών, και συσχέτισης της με τη λειτουργία πιθανών μολυσματικών πρωτεϊνικών παραγόντων και την ικανότητα τους να επάγουν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο από δύο στελέχη (Temecula1, CoDiRo) και ένα υποείδος (Sandyi Ann-1) του φυτικού παθογόνου καραντίνας *Xylella fastidiosa*.

Επιπροσθέτως, στην παρούσα διδακτορική διατριβή, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις δομικές αναλύσεις και λειτουργικούς χαρακτηρισμούς των τελεστών του εκκριτικού συστήματος τύπου-ΙΙΙ (type III secretion system – T3SS), XopP και RipE1 των παθογόνων Xanthomonas campestris pv. campestris και Ralstonia solanacearum αντίστοιχα, ως προς την επίδραση τους στην υπομονάδα Exo70B1 του συμπλόκου εξωκύττωσης του φυτού ξενιστή Arabidopsis thaliana. Ο τελεστής XopP, όπως προκύπτει από τις in vivo και in vitro αναλύσεις, παρουσιάζει λειτουργία κινάσης, ενώ ο τελεστής RipE1, ο οποίος είχε προηγουμένως

1

χαρακτηρισθεί ως πρωτεάση κυστεΐνης, έχει την ικανότητα να διασπά την πρωτεΐνη Exo70B1 in vitro.

Συνολικά, η παρούσα διατριβή συνδυάζει έναν αριθμό τεχνικών και μεθόδων από διάφορους τομείς της επιστήμης της βιολογίας (βιοπληροφορική, τεχνικές μοριακής βιολογίας, τεχνικές δομικής βιολογία, δοκιμασίες βιοφυσικής/βιοχημείας) και παρουσιάζει έναν πειραματικό σχεδιασμό για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό πρωτεϊνικών μορίων.

Λέξεις κλειδιά: Σύμπλοκο εξωκύττωσης, υπομονάδα Exo70B1, τελεστές εκκριτικού συστήματος 3, λειτουργικός χαρακτηρισμός, *in silico* υπολογισμός τριτοταγής δομή

ABSTRACT

Plant-microbe molecular interactions is an important research field, the understanding of which can lead to the design of more successful new strategies for sustainable food production. The scientific community has considered the structural approach of protein-protein interactions between a pathogen and its host targets to a limited extent. However, significant progress has been made in this area due to the rapid development of artificial intelligence programs capable of predicting the tertiary structure of a protein and, as a result, further deepening and generating hypotheses on the functional characterization of proteins.

The general reasoning and experimental design of this thesis is presented in Chapter One: Introduction, where the basic theory for the conservation of the protein structures of effectors having similar functions within the host cell is described. A first application of the tertiary structure calculation and correlation programs to the function of potential infectious protein factors and their ability to induce programmed cell death by two strains (Temecula1, CoDiRo) and a subspecies (Sandyi Ann-1) of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*.

In addition, this PhD thesis presents the results from the structural analyses and functional characterizations of the type 3 secretion system effectors XopP and RipE1 of the pathogens *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Ralstonia solanacearum* respectively, in the subunit Exo70B1 of the exocytosis complex of the plant host *Arabidopsis thaliana*. The XopP effector, as deduced from in vivo and in vitro analyses, exhibits kinase function, whereas the RipE1 effector, previously characterized as a cysteine protease, has the ability to cleave the Exo70B1 protein in vitro.

Overall, this thesis combines a number of techniques and methods from different areas of biological science (bioinformatics, molecular biology techniques, structural biology techniques, biophysics/biochemistry assays) and presents an experimental design for the functional characterization of protein molecules.

Keywords: Exocyst complex, Exo70B1 subunit, type 3 secretion system effectors, functional characterization, *in silico* prediction of tertiary structure

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	9
1.1 Φυτικά παθογόνα και εξέλιξη της παθογένειας	10
1.1.1 Φυτικά παθογόνα του γένους Xanthomonas	10
1.1.2 Το βακτηριακό φυτοπαθογόνο Xylella fastidiosa	13
1.1.3 Το βακτηριακό παθογόνο Ralstonia solanacearum	14
1.2 Ο μηχανισμός εκκριτικού συστήματος τύπου ΙΙΙ και πρωτεΐνες τελεστές	16
1.2.1 Κοινά δομικά στοιχεία και μοτίβα τελεστών σύμφωνα με τις χαρακτηρισμένες	
λειτουργίες τους	19
1.2.1.1 Κινάσες	19
1.2.1.2 ADP-ριβοσυλτρανσφεράσες	19
1.2.1.3 Εστεράσες	20
1.2.1.4 Πρωτεάσες κυστεΐνης	20
1.2.1.5 Τελεστές με ικανότητα δέσμευσης DNA	21
1.2.1.6 Ακετυλοτρανσφεράσες της πρωτεϊνικής οικογένειας YopJ	21
1.2.1.7 Λιγάσες Ε3-ουβικουιτίνης	22
1.3 Μέθοδοι και προγράμματα δομικής βιολογίας	23
1.3.1 Εφαρμογή προγραμμάτων υπολογισμού τριτοταγής δομής σε πιθανούς	
πρωτεϊνικούς μολυσμαντικούς παράγοντες του παθογόνου καραντίνας Xylella fastio	diosa
1.4.Το συμμετικό σύστριμα των φυτικών οργαγισμών	25
1.4 Το αμοντικό σοστημά των φοτικών οργανισμών	27
	50
	32
1.5.2 Ρόλος των υπομονασών του συμπλοκού εξωκυττώσης στην επιλογή του φορτι των κυστιδίων και στη διαδικασία σύντηξης τους στην μεμβράνη	.00
1.5.3 Στόχευση των πρωτεϊνών Εχο70 από τελεστές φυτικών παθονόνων	35
1.6 Σκοπός της παρούσας εργασίας	36
2. Υλικά και Μέθοδοι	37
2.1 Μέθοδοι μοριακής βιολογίας	38
2.1.1 Εξαγωνή ολικού ωυτικού RNA	
2.1.2 Avtígrogon ustavogoń (reverse transcription RT)	39
21.3 Ανάπτυξη βακτηριακών καλλεονειών και καθαρισμός πλασιμδίων	30
2.1.5 Αλκαλική λύση	40
$2.15 \Pi_{0}$	-1 0 л1
2.1.6 Alustleut autiliagen toluusoiten (PCP)	41 /1
2.1.0 Anotion if a riopart nonoperally (FCN)	
217 Autilogen Iwane	л- л-7

2.1.8 Ανεξάρτη από αντίδραση πολυμεράσης κλωνοποίηση Ligation Independent Cloning (LIC)	3 18
2.1.9 Προετοιμασία χημικά δεκτικών κυττάρων: μέθοδος χλωριούχου ρουβιδίου (RbCl)	19
2.1.10 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>Ε. coli</i>	50
2.2 Μέθοδοι έκφρασης και απομόνωσης/καθαρισμού πρωτεϊνών	51
2.2.1 Έκφραση πρωτεϊνών	51
2.2.1.1 E.coli	51
2.2.1.2. Κύτταρα εντόμων	52
2.2.2 Εκχύλιση πρωτεϊνών από φύλλα φυτικών οργανισμών	53
2.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακριλαμιδίου (SDS-PAGE)	53
2.2.4 Καθαρισμός/Απομόνωση με χρωματογραφία συγγένειας στήλης νικελίου	55
2.2.5 Μέθοδος διαπίδυσης	55
2.2.6 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης	56
2.3 Βιοφυσικές αναλύσεις ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών	57
2.3.1 Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western immunoblot)	57
2.3.2 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης	57
2.3.3 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης	57
2.3.4 Φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης (DSF) ανεξαρτήτου χρώσης πρωτεϊνών (nanoDSF)	58
2.3.5 Κυκλικός διγρωισμός	59
2.4 Τεχνικές δομικής βιολογίας	50
2.4.1 Σκέδαση ακτινών-Χ σε μικρές γωνίες (Small-angle X-ray scattering, SAXS)	50
2.4.2 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών και πειράματα σάρωσης συνθηκών	51
2.5 Τεχνικές γαρακτηρισμού ενζυμικής λειτουργίας πρωτεϊνών	54
2.5.1 In vitro πειραματική δοκιμασία κινάσης	54
2.5.2 In vitro πειραματική δοκιμασία πρωτεόλυσης	55
2.5.3 Φασματομετρία μάζας (Mass spectrometry, MS)	55
2.6 Προγράμματα βιοπληροφορικής ανάλυσης	57
 Αποτελέσματα	59
3.1 Έκφραση και καθαρισμός των πρωτεΐνών XccXopP, AtExo70B1, AtCPK5 και RsRipE1.	71
3.1.1.1 Ετερόλονη έκφραση και βελτιστοποίηση έκφρασης του τελεστή ΧορΡ	71
3.1.1.2 Καθαρισμός του τελεστή ΧορΡ με στήλη χρωματογοαφίας συγγένειας	74
3.1.1.3 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης για περαιτέρω καθαρισμό του τελεστή Χορ	P
3.1.1.4 Το πρωτεϊνικό μόριο ΧορΡ ₁₀₀ αυτό-οργανώνεται σε ινίδια	טי 77

3.1.2.1 Ετερόλογη έκφραση της φυτική πρωτεΐνης Εχο70B1 και καθαρισμός με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας78
3.1.2.2 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης για περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης Exo70B1
3.1.3. Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός του τελεστή RipE1
3.1.4. Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός της κινάσης CPK5
3.2 Προσδιορισμός τριτοταγής δομής μέσω πειραμάτων δομικής βιολογίας
3.2.1 Σκέδαση ακτινών σε μικρές γωνίες (SAXS) για τον τελεστή XopP83
3.2.2 Κρυστάλλωση του τελεστή ΧορΡ και της πρωτεϊνης Εχο70Β1
3.2.2.1 Συλλογή δεδομένων περίθλασης από κρυστάλλους
3.2.3 <i>In silico</i> Πρόβλεψη τριτοταγής δομής πρωτεϊνών μέσω AlphaFold88
3.2.3.1 Ο τελεστής ΧορΡ 89
3.2.3.2 Ο τελεστής RipE190
3.2.3.3 Η πρωτεϊνη Exo70B191
3.3 Διερευνώντας την αλληλεπίδραση του τελεστή ΧορΡ και του φυτικού πρωτεϊνικού του στόχου Εχο70B1
3.3.1 Δοκιμή χρωματογραφίας μοριακής διήθησης για την <i>in vitro</i> αλληλεπίδραση ΧοpP- Exo70B1
3.3.2 Έλεγχος της θερμικής σταθερότητας των πρωτεϊνών ΧοpP, Εxo70B1 και του συμπλόκου ΧοpP-Exo70B1 μέσω φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης
3.3.2 Φάσματα κυκλικού διχρωισμού για τις πρωτεΐνες ΧοpP, Εxo70B1 και του συμπλόκου ΧopP-Exo70B195
3.3 Χαρακτηρισμός λειτουργίας των τελεστών ΧορΡ και RipE1 στον πρωτεϊνικό τους στόχο Exo70B1
3.3.1.1 <i>In silico</i> σύγκριση τριτοταγής δομής του τελεστή ΧοpP με βάσεις δεδομένων . 97
3.3.1.2 Ανίχνευση φωσφορυλιωμένων αμινοξέων της πρωτεΐνης Εχο70B1 σε διαγονιδιακά φυτά <i>Arabidopsis thaliana</i> 98
3.3.1.3 Ο τελεστής ΧορΡ φωσφορυλιώνει <i>in vitro</i> την πρωτεΐνη Εxo70B1
3.3.1.4 Ο τελεστής ΧορΡ προστατεύει την πρωτεΐνη Εχο70Β1 από τη φωσφορυλίωση της CPK5
3.3.2 Ο τελεστής RipE1 έχει πρωτεολυτική δράση στον πρωτεϊνικό του στόχο Exo70B1 104
4. Συμπεράσματα-Συζήτηση
4.1 Οι πρωτεΐνες ΧορΡ και Εχο70Β1 δημιουργούν πρωτεϊνικούς πληθυσμούς στο πρωτεϊνικό τους διάλυμα
4.2 Οι <i>in silico</i> υπολογισμένες τριτοταγείς δομές των τελεστών XopP και RipE1 υποδεικνύουν ενζυμικές λειτουργίες κινάσης και πρωτεάσης αντίστοιχα
 4.3 Ο τελεστής ΧορΡ αλληλεπιδρά με την πρωτεϊνική υπομονάδα Exo70B1 με μεγάλη θερμική σταθερότητα in vitro

4.4 Ο τελεστής XopP φωσφορυλιώνει <i>in vivo</i> και <i>in vitro</i> την πρωτεΐνη Exo70B1 ενώ την προστατεύει από την φωσφορυλίωση της κινάσης CPK5	113
4.5 Ο τελεστής RipE1 πρωτεολύει την πρωτεΐνη Exo70B1 <i>in vitro</i> στην περιοχή του ενδιάμεσου βρόχου	114
4.6 Σύνοψη – Μελλοντικοί στόχοι	115
5. Βιβλιογραφία	117
6. Δημοσιεύσεις	135
Παράρτημα Α. Συνθήκες Κρυστάλλωσης πρωτεϊνών	141
Παράρτημα Β. Αποτελέσματα του προγράμματος DALI	152
Παράρτημα Γ. Αποτελέσματα Φασματομετρίας Μάζας	153

1. Εισαγωγή

1.1 Φυτικά παθογόνα και εξέλιξη της παθογένειας

Ο κύκλος της ζωής είναι μία βασική έννοια στη εξελικτική βιολογία, καθώς καταγράφει όλα τα γεγονότα που συμβαίνουν σε έναν οργανισμό από τη γέννηση μέχρι και τον θάνατο του. Κατά τη διάρκεια αυτή όλοι οι οργανισμοί αξιοποιούν πόρους του περιβάλλοντος τους και τους διανέμουν σε τέσσερις ξέχωρες διαδικασίες: ανάπτυξη, επιβίωση, διασπορά και αναπαραγωγή (May *et al.*, 2020). Η χρονική αλλά και ποιοτική κατανομή των πόρων στις διαδικασίες αυτές αποτελεί χαρακτηριστική ιδιότητα για τον εκάστοτε οργανισμό. Συγκεκριμένα για τα παθογόνα, οι διαδικασίες αυτές μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο κατηγορίες: εκείνα που αφορούν την επιδημική φάση, δηλαδή κατά τη διάρκεια μόλυνσης ενός ξενιστή, και εκείνα που αφορούν την φάση επιβίωσης, δηλαδή όταν τα παθογόνα βρίσκονται εκτός του ξενιστή τους (Ouest *et al.*, 2011). Μπορεί να προκύψουν εναλλαγές μεταξύ αυτών των δύο φάσεων, που οδηγούν σε συνέπειες στην ικανότητα μόλυνσης, στην εξέλιξη και στην ειδογένεση.

Η κατανόηση της μολυσματικής ικανότητας ενός παθογόνου αποτελεί κλειδί και απώτερο στόχο της μικροβιακής παθολογίας. Η εξέλιξη της παθογένειας μπορεί να καθορίσει φαινόμενα όπως: α) την εμφάνιση ή την επανεμφάνιση παθογόνων, β) την προσαρμογή σε νέο ξενιστή και γ) την απόκτηση ικανότητας να ξεπεράσει την άμυνα ενός ξενιστή (Pariaud *et al.*, 2009), κ.α. Επίσης, η εξέλιξη της παθογένειας, μπορεί να ρυθμίσει τον ρόλο των παθογόνων στη διαμόρφωση της σύνθεσης των οικοσυστημάτων και των δυναμικών σχέσεων που την διέπουν (Tollenaere, Susi and Laine, 2016). Επιστήμονες στον κλάδο της φυτοπαθολογίας, έχουν αφιερώσει μεγάλη προσπάθεια στην κατανόηση της εξέλιξης της μολυσματικής ικανότητας των φυτοπαθογόνων, λόγω του ότι αυτή σχετίζεται και με την ανθεκτικότητα των φυτών στο βιοτικό στρες (Barrett *et al.*, 2008).

1.1.1 Φυτικά παθογόνα του γένους Xanthomonas

Τα βακτήρια του γένους Xanthomonas είναι κατά Gram αρνητικά, γ-πρωτεοβακτήρια και μπορούν να μολύνουν πάνω από 400 διαφορετικούς ξενιστές συμπεριλαμβανομένων των: ρύζι, σιτάρι, ντομάτα, πιπεριά, λάχανο, μανιόκα,

μπανάνα, φασόλι και έναν μεγάλο αριθμό εσπεριδοειδών (Ryan et al., 2011). Τα τελευταία χρόνια, προσπάθειες ομαδοποίησης των ειδών του γένους Xanthomonas προκειμένου των σχεδιασμό στρατηγικών αντιμετώπισης τους, οδήγησαν σε αλλαγές στην ονομασία τους με βάση: a) τα φαινοτυπικά προφίλ τους, β) τεχνικές μοριακής βιολογίας και γ) την αλληλούχηση όλου του γονιδιώματος τους (Tang et al., 2021). Συγκεκριμένα για το είδος Xanthomonas campestris, το οποίο προκαλεί μια ποικιλία φυτικών ασθενειών με σοβαρές οικονομικές επιπτώσεις, έχει προταθεί να ομαδοποιηθεί σε τρεις παθοτύπους: τον παθότυπο campestris, ο οποίος προκαλεί την ασθένεια της μαύρης σήψης στα σταυρανθή φυτά (Εικόνα 1.1), τον παθότυπο raphani που προκαλεί βακτηριακές κηλίδες σε σταυρανθή φυτά και σε κάποια σολανοειδή και τον παθότυπο incanae, το οποίο προκαλεί την βακτηρίωση σε διακοσμητικά φυτά του γένους Brassica (Tang et al., 2021).



Εικόνα 1.1 Ασθένεια μαύρης σήψης, που προκαλείται από το παθογόνο *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* από το σε σταυρανθή φυτά (Vicente and Holub, 2013)

Η πρώτη αλληλούχηση ολικού γονιδιώματος δημοσιεύτηκε το 2002 από το στέλεχος Xanthomonas campestris pv. campestris ATCC33913 και αποτελούνταν από ένα κυκλικό χρωμόσωμα συνολικού μεγέθους 5.076 Mbp με απουσία πλασμιδίων (Silva et al., 2002). Έρευνες σε παθότυπους του είδους Xanthomonas campestris και συγκεκριμένα στον οργανισμό μοντέλο Xanthomonas campestris pv. campestris, έχουν βοηθήσει αρκετά την κατανόηση του πεδίου των μοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυτού και παθογόνων, ενώ μία εκτενέστερη λειτουργική ανάλυση του γονιδιώματος οδήγησε στη διασαφήνιση των μηχανισμών, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για μία επιτυχημένη μόλυνση του ξενιστή. Επίσης, έχει μελετηθεί σε βάθος η προσαρμογή του παθογόνου στο περιβάλλον (Ryan et al., 2011). Στους μηχανισμούς παθογένειας περιλαμβάνονται: 1) η παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων (όπως πρωτεάσες και μαννανάσες) και πολυσακχαριτών, 2) η ενεργοποίηση σηματοδότησης (diffusible signal factors, DSF) για την επικοινωνία μεταξύ των παθογόνων και πρωτεΐνες του εκκριτικού συστήματος ΙΙ (Type II secretion system, T2SS), 3) η ενεργοποίηση του εκκριτικού συστήματος ΙΙΙ (T3SS), 4) η ενεργοποίηση του εκκριτικού συστήματος IV (T4SS), 5) η ενεργοποίηση του εκκριτικού συστήματος VI (T6SS), 6) η εμπλοκή μικρών RNAs, και 7) η παραγωγή πρωτεϊνών ρυθμιστών όπως οι Rpf, HrpG, HrpX, HpaR, Clp, Zur, FhrR and RsmA. Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί πως, δεν έχει δειχθεί η άμεση επίδραση στην μολυσματικότητα του παθογόνου για όλα τα παραπάνω εκκριτικά συστήματα και παράγοντες, αλλά επηρεάζουν την ικανότητα/ποσοστό επιτυχημένης μόλυνσης του βακτηρίου (Szczesny et al., 2010; Potnis et al., 2011; Weiberg and Jin, 2015; Sgro et al., 2019; Schmidtke et al., 2020).

Συγκεκριμένα, τα παθογόνα του γένους Xanthomonas, χρησιμοποιούν το T3SS, το οποίο κωδικοποιείται από τη γονιδιακή νησίδα παθογένειας hrp (hypersensitive response and pathogenicity), για την μεταφορά πρωτεϊνών-τελεστών (Type 3 secreted effectors, T3SE). Οι πρωτεΐνες τελεστές των παθογόνων του γένους Xanthomonas ονομάζονται Xops (Xanthomonas outer proteins), εκτός των AvrBs1, AvrBs2 και AvrBs3 που έχουν συσχετιστεί με τους μη μολυσματικούς φαινοτύπους (White et al., 2009). Σήμερα, 53 οικογένειες τελεστών Χορ έγουν ταυτοποιηθεί, ενώ οι τελεστές αυτοί έχουν ονομαστεί αλφαβητικά από τον ΧορΑ μέχρι τον ΧορΑΒ. Πρέπει να σημειωθεί πως, ύστερα από βιοπληροφορικές αναλύσεις, οι τελεστές XopP, XopAL1 and XopF1, θεωρείται ότι αποτελούν το βασικό effectorome (core effectorome) του γένους, αφού συναντώνται σε όλα σχεδόν τα παθογόνα στελέχη του γένους Xanthomonas (Schmidtke et al., 2020). Ο κυρίως ρόλος των τελεστών είναι η καταστολή της άμυνας του φυτού-ξενιστή αλληλεπιδρώντας με πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε διάφορους κυτταρικούς μηγανισμούς, εξελίσσοντας την μόλυνση στον ξενιστή (Bonas, 2009). Τέλος, η ανταλλαγή γονιδιακών περιοχών που κωδικοποιούν τελεστές, μέσω ανασυνδυασμού ή μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (horizontal gene transfer, HGT), έχει συμβάλλει στη δομή του πληθυσμού

των παθογόνων και στη ποικιλομορφία των παθοσυστημάτων του γένους *Xanthomonas* (Timilsina *et al.*, 2019).

1.1.2 Το βακτηριακό φυτοπαθογόνο Xylella fastidiosa

Στην οικογένεια Xanthomonadaceae ανήκουν επίσης και τα παθογόνα του γένους Xylella. Τα στελέχη του είδους Xylella fastidiosa είναι αερόβια βακτήρια, αρνητικά κατά Gram και μεταδίδονται αποκλειστικά από έντομα τα οποία τρέφονται με τους χυμούς του ξυλώματος των φυτων-ξενιστών, με την πλειοψηφία τους να ανήκει στην οικογένεια Cicadellidae και Cercopidae (Id, Disalvo and Id, 2021). Στους ξενιστές των συγκεκριμένων παθογόνων περιλαμβάνονται, 655 είδη σε 88 οικογένειες φυτών (Εικόνα 1.3). Το παθογόνο μπορεί να βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση στους ξενιστές για μεγάλο χρονικό διάστημα, ενώ τα συμπτώματα των μολύνσεων παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία (Fritschi, Lin and Walker, 2007; Valencia, 2016):

- α) μαρασμός και ξήρανση των κλαδιών,
- β) χλώρωση των φύλλων,
- γ) νανισμός ή έλλειψη ανάπτυξης των φυτών,
- δ) μικρότερα μεσογονάτια διαστήματα στους βλαστούς,
- ε) ζαρωμένοι καρποί,
- στ) πρόωρη αποκοπή καρπών.



Εικόνα 1.3 Συμπτώματα μαρασμού και ξήρανσης κλαδιών από μόλυνση με *Xylella fastidiosa* σε **Α.** Ελιά, **Β.** Αμπέλι (Wallingford, 2008)

Ο κύκλος ζωής του παθογόνου X. fastidiosa, σχετίζεται κυρίως με την αλληλεπίδραση του είτε με μη ζωντανούς ιστούς στο ξύλωμα του φυτού-ξενιστή ή στο μπροστινό έντερο του εντόμου φορέα (Roper et al., 2007). Για την μετακίνηση του το βακτήριο χρησιμοποιεί την πύλη τύπου ΙV και στην συνέχεια τον μηχανισμό της πύλης τύπου Ι για τη δημιουργία βιοφίλμ (Alonso G. Perez-Donoso, Qiang Sun, M. Caroline Roper and Bruce Kirkpatrick, 2010). Επιπλέον, τα συγκεκριμένα παθογόνα παράγουν ένζυμα ικανά να διασπάσουν το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, όπως επίσης πολυγαλακτουρονάση και μία ποικιλία ενδογλυκανασών, τα οποία επιτρέπουν στο παθογόνο να ξεπεράσει τα εμπόδια/φράγματα του ξυλώματος και να επεκταθεί συστημικά σε άλλα αγγεία του φυτού (Gouran et al., 2016). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, πως το παθογόνο αυτό, δεν βασίζεται σε μηχανισμούς όπως το T3SS για να παρακάμψει την άμυνα του ξενιστή. Ένας από τους μηγανισμούς που έχει αναπτύξει για τον σκοπό αυτό, είναι η κάλυψη της εξωτερικής του μεμβράνης με πλούσιο σε ραμνόζη αντιγόνο Ο. Η κατανόηση όλων των μηχανισμών παθογένειας του βακτηρίου X. fastidiosa θα καταστήσουν εφικτή τη δημιουργία νέων στρατηγικών για την αντιμετώπιση του (Rapicavoli et al., 2018), (Sertedakis et al., 2021).

1.1.3 Το βακτηριακό παθογόνο Ralstonia solanacearum

Το βακτηριακό παθογόνο Ralstonia solanacearum είναι ένα αερόβιο, αρνητικό κατά Gram βακτήριο και αποτελεί ένα από τα πιο οικονομικώς σημαντικά παθογόνα (Εικόνα 1.2A), έχοντας ένα μεγάλο εύρος ξενιστών (250 είδη σε πάνω από 50 οικογένειες φυτών). Επιπρόσθετα, η *R. solanacearum* είναι ένα παθογόνο καραντίνας (Álvarez, López and Biosca, 2019). Τα παραπάνω είχαν ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη μελέτη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού (Caldwell, Kim and Iyerpascuzzi, 2017).

Το συνολικό μέγεθος του γονιδιώματος του εκτιμήθηκε ανάμεσα στα είναι 5,5 με 6 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων (Mbp), από τα οποία τα 3,5 Mbp αντιστοιχούν σε χρωμοσωμικό DNA ενώ τα 2 Mbp αντιστοιχούν σε πλασμιδιακό (Guarischi-sousa *et al.*, 2016).

Το παθογόνο *R. solanacearum* εισέρχεται στο φυτό ξενιστή μέσω τραυμάτων. Τα τραύματα αυτά, μπορεί να είναι φυσικών αιτιών, για παράδειγμα ύστερα από την

αποκοπή των άνθεων ή των καρπών τους, ή μη φυσικών αιτιών όπως για παράδειγμα από φυτοφάγα έντομα. Το παθογόνο κατευθύνεται χημειοτακτικά, προς τα σημεία μόλυνσης όπου συσσωρεύονται εκκρίσεις που προκαλούν την ενεργοποίηση της κίνησης των μαστίγιων του (Caldwell, Kim and Iyer-pascuzzi, 2017). Στην συνέχεια, το παθογόνου πολλαπλασιάζεται και κινείται διασυστημικά στον ξενιστή, προτού εκδηλωθούν τα αρχικά συμπτώματα του μαρασμού (Εικόνα 1.2B). Σε αντίθεση με άλλα παθογόνα, το συγκεκριμένο παθογόνο χρειάζεται μόνο ένα σημείο εισόδου για να μπορέσει να μολύνει επιτυχημένα τον ξενιστή (Peeters *et al.*, 2013).



Εικόνα 1.2 Α. Καλλιέργεια του παθογόνου καραντίνας *Rastonia solanacearum* (Zheng *et al.*, 2019), **Β.** Συμπτώματα μαρασμού ύστερα από μόλυνση με το παθογόνο (Φωτογραφία από Πανεπιστήμιο Wisconsin- Madison)

Όπως και στην περίπτωση των παθογόνων του γένους Xanthomonas, έτσι και τα παθογόνα του R. solanacearum περιέχουν στο γονιδίωμα τους γονιδιακές νησίδες που κωδικοποιούν και για τους έξι τύπους εκκριτικών συστημάτων που απαιτούνται για να παρακάμψουν την άμυνα του ξενιστή τους. Οι T3S πρωτεΐνες τελεστές του παθογόνου Ralstonia παρουσιάζονται με την ονομασία Rip (Ralstonia injected proteins) (Coll and Valls, 2013). Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 74 Rip πρωτεΐνες τελεστές, ενώ για τις περισσότερες δεν έχει χαρακτηρισθεί η λειτουργία τους μέσα στο κύτταρο του ξενιστή. Περίπου οι μισές πρωτεΐνες T3S είναι συντηρημένες στα στελέχη του Ralstonia sp., ενώ το 30% των τελεστών έχει

τους τους TAL τελεστές της *Ralstonia*, η ομοιότητα των οποίων με τους TAL τελεστές των παθογόνων του γένους *Xanthomonas*, προδίδει όμοια λειτουργία ενεργοποίησης γονιδίων κατά τη διάρκεια μόλυνσης του ξενιστή, δηλαδή λειτουργία μεταγραφικών παραγόντων (Guarischi-sousa *et al.*, 2016).

1.2 Ο μηχανισμός εκκριτικού συστήματος τύπου ΙΙΙ και πρωτεΐνες τελεστές

Κάποια βακτηριακά παθογόνα έχουν την ικανότητα να εγχέουν πρωτεΐνες τελεστές απευθείας στα κύτταρα του ξενιστή προκειμένου να παρακάμψουν την άμυνα του και πολλαπλασιαστούν. Αυτοί βακτηριακοί παράγοντες παθογένειας να 01 ελευθερώνονται μέσω διαφορετικών τύπων εκκριτικών συστημάτων, σύγχρονες μελέτες των οποίων τους κατηγοριοποιούν σε 11 ξεχωριστούς τύπους (Type I secretion system - Type XI secretion system) (Hayes, Aoki and Low, 2010; Lasica et al., 2017; Grossman et al., 2021; Rivera-Calzada et al., 2021; Wittmers et al., 2022). Πρωτεΐνες παθογένειας μεταφέρονται επίσης και από κυστίδια, τα οποία είναι ικανά να μεταφέρουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών από το βακτηριακό περίπλασμα στο εξωκυττάριο περιβάλλον (Costa et al., 2015).

Η μολυσματική ικανότητα πολλών βακτηριακών παθογόνων βασίζεται σε σημαντικό βαθμό στο T3SS. Το τελευταίο μεταφέρει πρωτεΐνες σε ευκαρυωτικά κύτταρα, οι οποίες αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες του ξενιστή που εμπλέκονται σε έναν μεγάλο αριθμό κυτταρικών μηχανισμών (Daniela, 2016). Το συγκεκριμένο σύστημα έχει ανιχνευθεί σε πολλά αρνητικά κατά Gram, όχι μόνο σε βακτήρια με ικανότητα μόλυνσης του ξενιστή, αλλά και σε πολλά συμβιωτικά βακτήρια, όπως τα βακτήρια του γένους *Rhizobium*, γεγονός που υποδηλώνει ότι το T3SS δεν συνδέεται μόνο με την παθογένεια, δηλαδή η παρουσία του σε κάποια είδη βακτηρίων δεν τα καθιστά αυτομάτως και παθογόνα (Troisfontaines and Cornelis, 2022). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, πως ομάδες γονιδίων του T3SS φυτικών παθογόνων παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με ομάδες γονιδίων παθογόνων των θηλαστικών όπως το *Vibrio parahaemolyticus*, στελέχη του είδους *Pantoea* sp. και στο είδος *Burkholderia* Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα του μηχανισμού T3SS, τα οποία δημιουργούνται κατά τη διεπαφή του βακτηριακού παθογόνου και του κυττάρου του φυτού ξενιστή, σχηματίζουν ένα κανάλι για τη μεταφορά των τελεστών (Εικόνα 1.4) (Büttner, 2012). Οι τελεστές, προκειμένου να μεταφερθούν εντός του κυττάρου το ξενιστή, έχουν σήματα εξόδου/σινιάλα έκκρισης στο αμινοτελικό τους άκρο, τα οποία δεν έχουν συγκεκριμένη αμινοξική σύσταση και δομική διάταξη (Miletic et al., 2021). Η έλλειψη μιας ισχυρής δομικής διάταξης διευκολύνει την αλληλεπίδραση μεταξύ των τελεστών και άλλων πρωτεϊνικών στοιχείων του T3SS, όπως για παράδειγμα οι πρωτεΐνες οδηγοί, ώστε να περάσουν επιτυχώς μέσω του μηχανισμού του εκκριτικού συστήματος στο κύτταρο του ξενιστή (Bernard et al., 2002; LeBlanc et al., 2021). Η πολύ σημαντική συμβολή των πρωτεϊνών που συνθέτουν το κανάλι του T3SS, όπως και εκείνων που δημιουργούν τους πόρους στην μεμβράνη των κυττάρων του ξενιστή, έχει σαν αποτέλεσμα την χρονική ιεραρχία της έκφρασης των πρωτεϊνών του T3SS που ελέγχουν τις παραπάνω δύο διαδικασίες (Vanengelenburg and Palmer, 2008; Troisfontaines and Cornelis, 2022). Έρευνες έχουν δείξει, πως αυτή η ιεραρχία στη μετάφραση των γονιδίων του T3SS, επηρεάζει και τις πρωτεΐνες τελεστές στις οποίες παρουσιάζεται ανταγωνισμός στις ευκαρυωτικές πρωτεΐνες στόχους τους. Τέλος, η χρονική διαφορά στη μετάφραση των τελεστών, πιθανότατα συμβάλλει και στο να μην υπερφορτωθεί το κανάλι του εκκριτικού συστήματος κατά τη μεταφορά τους (LeBlanc et al., 2021; Miletic et al., 2021).



Εικόνα 1.4 Σχηματική αναπαράσταση του εκκριτικού συστήματος 3.

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση της ενδοκυτταρικής δράσης των τελεστών τους στους πρωτεϊνικούς τους στόχους μέσα στα κύτταρα του ξενιστή. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πιο κοινές λειτουργίες βακτηριακών τελεστών, όπως επίσης και τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά και μοτίβα που περιλαμβάνουν (Kotsaridis, Tsakiri and Sarris, 2022). 1.2.1 Κοινά δομικά στοιχεία και μοτίβα τελεστών σύμφωνα με τις χαρακτηρισμένες λειτουργίες τους.

1.2.1.1 Κινάσες

Οι κινάσες είναι ευέλικτα με υψηλή δυναμική ένζυμα, τα οποία μεταπίπτουν από ενεργή σε ανενεργή κατάσταση και μεταφέρουν φωσφορικές ομάδες σε συγκεκριμένα αμινοξέα στα υποστρώματα στόχους (Taylor and Kornev, 2011). Η δομή του ενεργού κέντρου των κινασών αποτελείται από δύο διακριτές περιοχές: την αμινοτελική περιοχή, η οποία παίρνει στερεοδομική διάταξη β-πτυχωτών αλυσίδων πέντε κλώνων και την καρβοξυτελική, που αποτελείται κυρίως από α-έλικες και βρόγους. Οι δύο περιοχές συνδέονται από τον ρυθμιστικό και τον καταλυτικό βρόγο, οι οποίοι συνδέονται με μόρια ATP για να επιτύχουν την τελική κατάσταση (Kornev et al., 2006). Η πρώτη τρισδιάστατη δομή βακτηριακής κινάσης που δημοσιεύτηκε το 1991, ήταν η πρωτεΐνη AvrB (Εικόνα 1.5A) του βακτηριακού παθογόνου Pseudomonas syringae, η οποία αποτελείται από περιοχές α-ελίκων που διαχωρίζονται από δομές β-πτυχωτών αλυσίδων (Lee et al., 2004). Ένα ακόμα παράδειγμα είναι ο τελεστής HopBF1 που παίρνει πιο απλουστευμένη δομή κινασών (Εικόνα 1.5B), του παθογόνου Ewingella americana το οποίο έχει την ικανότητα να μολύνει τον άνθρωπο και ομόλογα του οποίου παρουσιάζονται στα φυτοπαθογόνα Ralstonia solanacearum Kai Pseudomonas syringae (Lopez et al., 2019).

1.2.1.2 ADP-ριβοσυλτρανσφεράσες

Αυτή η ευρέως διαδεδομένη οικογένεια τελεστών, διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη μολυσματική ικανότητα των παθογόνων, καθώς μεταφέρουν ομάδες ADPριβόζης από μόρια NAD⁺ σε αμινοξέα αργινίνης, θρεονίνης, κυστεΐνης, ασπαραγίνης και γλουταμίνης του πρωτεϊνικού στόχου τους. Το καταλυτικό κέντρο των βακτηριακών τοξινών αυτού του τύπου, είναι συντηρημένο στην τριτοταγή δομή του, αλλά δεν παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα στην αμινοξική του αλληλουχία (Cohen and Chang, 2018). Η διαχωρισμένη περιοχή β-πτυχωτών αλυσίδων, η οποία περιέχει τρεις κλώνους στο κάθε μισό της, είναι αυτή στην οποία αποδίδεται η ικανότητα δέσμευσης NAD⁺. Συγκεκριμένα, δύο μοτίβα τριών αμινοξέων είναι αυτά που ελέγχουν τη δέσμευση με το υπόστρωμα και τον υποκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών αυτών. Τα μοτίβα αυτά είναι ιστιδίνη-τυροσίνη-γλουταμικό οξύ και αργινίνη-σερίνη-γλουταμικό οξύ (Cohen and Chang, 2018). Οι δομές των τελεστών ΧορΑΙ (Εικόνα 1.5Γ) και HopUI (Εικόνα 1.5Δ) των παθογόνων Xanthomonas axonopodis pv. citri και Pseudomonas syringae pv. tomato αντίστοιχα, αποτελούν επίσης γαρακτηριστικά παραδείγματα ως προς την εξέλιξη της λειτουργίας και τη προσαρμογή των βακτηριακών τελεστών (Jeong et al., 2011; Liu et al., 2019). HopUI παρουσιάζει την κλασική δομή ADP-Παρόλο που 0 των ριβοσυλτρανσφερασών, ο ΧορΑΙ χρησιμοποιεί έναν εναλλακτικό τρόπο διπλώματος, αλληλοεπιδρώντας και χρησιμοποιώντας το συντηρημένο αμινοξύ αργινίνης του αμινοτελικού του άκρου.

1.2.1.3 Εστεράσες

Αυτές οι πρωτεΐνες δρουν ως υδρολάσες και διασπούν τους εστέρες σε οξέα και αλκοόλες (Montella, Schama and Valle, 2012). Η δομή της πρωτεΐνης EreC του βακτηρίου *Eschericia coli* παρουσιάζει τον διαχωρισμό του μορίου σε δύο διακριτές περιοχές. Η μεγαλύτερη περιοχή αποτελείται από μία συνεχόμενη δομή β-πτυχωτών αλυσίδων οκτώ κλώνων που περικλείονται από α-έλικες και βρόχους, ενώ η μικρότερη περιλαμβάνει τέσσερις α-έλικες (Martinez *et al*, 1992). Ο τελεστής HopBA1 (Εικόνα 1.5E) του *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, παρουσιάζει μία περιοχή σχεδόν πανομοιότυπη, με παντελή απουσία της μικρότερης περιοχής.

1.2.1.4 Πρωτεάσες κυστεΐνης

Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός της πρώτης πρωτεάσης κυστεΐνης από τον οργανισμό *Carica papaya*, αποτέλεσε το πρώτο βήμα ως προς την αναγνώριση και χαρακτηρισμό επόμενων πρωτεϊνών με παρόμοια λειτουργία, δημιουργώντας μία πολύ μεγάλη πρωτεϊνική οικογένεια (McGrath, 1999). Οι τρεις α-έλικες στο αμινοτελικό άκρο, δρουν σαν καταστολέας στο υπόλοιπο πρωτεϊνικό μόριο, το οποίο αποτελείται από εκτεταμένες περιοχές β-πτυχωτών αλυσίδων οι οποίες περικλείονται από α-έλικες (Verma, Dixit and Pandey, 2016). Αυτό συμβαίνει στο πρώιμο μόριο των πρωτεϊνης, για την αποφυγή μίας συνεχόμενης δράσης του ενζύμου,

υποκυτταρικά (Rawat *et al.*, 2021). Η λύση της δομής του τελεστή AvrRpt2 (Εικόνα 1.5ΣΤ) του βακτηρίου *Erwinia amylovora* υποδεικνύει τη συντήρηση των περιοχών μεταξύ πρωτεϊνών, οι οποίοι προέρχονται από εξελικτικά απομακρυσμένους οργανισμούς, παρόλο την χαμηλή ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία τους (Bartho *et al.*, 2019).

1.2.1.5 Τελεστές με ικανότητα δέσμευσης DNA

Η πρωτεϊνική δομή τύπου φουρκέτας από α-έλικες συναντάται σε πολλές πρωτεΐνες μιας ποικιλίας λειτουργιών, και είναι συντηρημένη στους τελεστές με ικανότητα δέσμευσης DNA (Du and Gai, 2006). Η συγκεκριμένη δομή εμπεριέχει δύο συνδεδεμένες αντιπαράλληλες α-έλικες. Μία από τις οικογένειες με την συγκεκριμένη λειτουργία, ονομάζονται TALEs (transcription activator-like effectors) και έχει βρεθεί ότι δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες (Iwabuchi et al., 2019). Η δομή των τελεστών dHax3 (Εικόνα 1.5Z) και PthXo1 (Εικόνα 1.5H) από τα παθογόνα Xanthomonas campestris pv. armoraciae και Xanthomonas oryzae αντιστοίχως, έδειξε πως ο πυρήνας της δομής τους αποτελείται από επαναλήψεις δύο αμινοξέων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση και πρόσδεση νουκλεοτιδίων (Deng et al., 2012; Mak, 2012). Μερικά παραδείγματα για τις πιο συχνές επαναλήψεις αμινοξέων είναι: ιστιδίνη-ασπαρτικό οξύ για την αναγνώριση κυτοσίνης, ασπαραγίνη-γλυκίνη για την αναγνώριση θυμίνης, και ασπαραγίνη-ισολευκίνη για την αναγνώριση αδενίνης (Kay and Bonas, 2009). Πρέπει να αναφερθεί, πως η δομή του τελεστή AvrRps4 (Εικόνα 1.5 Θ) του παθογόνου Pseudomonas syringae pv. pisi, παρόλο που δεν έχει αποδειχτεί η ικανότητα δέσμευσής του με DNA, αποτελείται από τις παραπάνω επαναλήψεις και έχει την ικανότητα να προσδένεται σε περιοχές δέσμευσης DNA άλλων πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα των μεταγραφικών παραγόντων τύπου WRKY (Mukhi et al., 2021).

1.2.1.6 Ακετυλοτρανσφεράσες της πρωτεϊνικής οικογένειας YopJ

Η πρωτεϊνική οικογένεια YopJ (Yersinia outer proteins) συναντάται σε έναν μεγάλο αριθμό βακτηριακών παθογόνων όπως για παράδειγμα Xanthomonas campestris, Pseudomonas syringae και Salmonella enterica, κ.α. Παρόλο που οι τελεστές αυτής

της οικογένειας έχει αποδειχτεί πως έχουν λειτουργία ακετυλοτρασφεράσης, πολλές μελέτες παρουσιάζουν πως έχουν επίσης και λειτουργία πρωτεάσης (Ka-Wai Ma, 2016)Η δομή του τελεστή HopZ1a (Εικόνα 1.5Ι) του παθογόνου *Pseudomonas syringae* έδειξε την ύπαρξη δύο διακριτών κοντινών περιοχών. Το καταλυτικό κέντρο της πρωτεάσης το οποίο έχει τη δομή β-πτυχωτών αλυσίδων τύπου ''sandwich'', τέσσερις α-έλικες από τη μία πλευρά τους και μία ρυθμιστική περιοχή πλευρικά (Z. M. Zhang *et al.*, 2016). Η μεταγενέστερα λυμένη δομή του τελεστή PopP2 (Εικόνα 1.5K) *Ralstonia solanacearum* επαλήθευσε τη διατήρηση της συγκεκριμένης τριτοταγής δομής στις πρωτεΐνες αυτής της οικογένειας (Z. M. Zhang *et al.*, 2016).

1.2.1.7 Λιγάσες Ε3-ουβικουιτίνης

Ο μηχανισμός της ουβικιτινίωσης, ο οποίος ρυθμίζεται από την προσθήκη μορίων ουβικουιτίνης μεγέθους 76 αμινοξέων στον πρωτεϊνικό στόχο του ενζύμου, είναι συντηρημένος σε διάφορες διαδικασίες του κυττάρων του ξενιστή, μία εκ των οποίων είναι και η άμυνα κατά βακτηριακών παθογόνων. Για τον λόγο αυτό, πολλοί τελεστές του T3SS, μιμούνται την συγκεκριμένη λειτουργία (Ashida and Sasakawa, 2017). Οι τριτοταγείς δομές του αμινοτελικού (Εικόνα 1.5Λ) και καρβοξυτελικού άκρου (Εικόνα 1.5M) του XopL του παθογόνου Xanthomonas campestris χαρακτήρισαν μία καινούργια ομάδα Ε3-λιγασών. Σε εκπροσώπους αυτής της ομάδας, το αμινοτελικό άκρο αποτελείται από δέκα κλώνους β-πτυχωτών αλυσίδων σε μορφή εννέα επαναλήψεων, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο περιέχει δύο διακριτές περιοχές α-ελίκων και ονομάστηκε XL-box (Singer et al., 2013). Ο τελεστής XopL χαρακτηρίστηκε ως Ε3-λιγάση λόγω της ικανότητας του να αλληλοεπιδρά με έναν αριθμό φυτικών Ε2 ενζύμων σύζευξης ουβικουιτίνης (Singer et al., 2013). Επιπροσθέτως, το καρβοξυτελικό τμήμα του τελεστή AvrPtoB (Εικόνα 1.5N) του παθογόνου Pseudomonas syringae παίρνοντας την σφαιρική δομή τετράκλωνης β-πτυχωτής αλυσίδας απέναντι από δύο α-έλικες, παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τις ευκαρυωτικές Ring-finger και U-box πρωτεΐνες (Janjusevic, 2014).



Εικόνα 1.5 Παρουσίαση της δομής τύπων βακτηριακών τελεστών με διαφορετικές λειτουργίες, <u>Κινάσες</u>: **Α.** ΑνrB (1NH1), **B.** HopBF1 (6PWD), <u>ADPριβοσυλτρανσφεράσες</u>: **Γ.** ΧορΑΙ (6KLY) **Δ.** HopUI (3U0J), <u>Εστεράσες</u>: **Ε.** HopBA1 (5T09), <u>Πρωτεάσες κυστεΐνης</u>: **ΣΤ.** AvrRpt2 (6HQZ), <u>Τελεστές με ικανότητα</u> <u>δέσμευσης DNA</u>: **Ζ.** dHax3 (3V6T) **Η.** PthXo1 (3UGM) **Θ.** AvrRps4 (4B6X), <u>Ακετυλοτρανσφεράσες</u>: **Ι.** HopZ1a (5KLQ) **Κ.** PopP2 (7F3N), <u>Λιγάσες E3ουβικουιτίνης</u>: **Λ.** ΧορL αμινοτελικό τμήμα (4FCG) **Μ.** ΧορL καρβοζυτελικό τμήμα (4FC9) **Ν.** AvrPtoB καρβοζυτελικό τμήμα (2FD4). Οι κωδικοί PDB είναι σε παρένθεση. Αμιντελικό μπλε χρώμα – Καρβοζυτελικό κόκκινο χρώμα.

1.3 Μέθοδοι και προγράμματα δομικής βιολογίας

Η ανάπτυξη υπολογιστικών μεθόδων για την πρόβλεψη και απεικόνιση της τριτοταγούς δομής των υπό μελέτη πρωτεϊνών, βασίστηκε σε δύο συμπληρωματικά μονοπάτια, τα οποία επικεντρώνονται είτε στις βιοφυσικές αλληλεπιδράσεις των μορίων ή στην εξέλιξη των πρωτεϊνικών μορίων. Παρόλο που τα προγράμματα που βασίζονται στις βιοφυσικές αλληλεπιδράσεις των μορίων και ενσωματώνουν τις θερμοδυναμικές και κινητικές προσομοιώσεις για την επίλυση της δομής των πρωτεϊνών, δεν ήταν ικανά να δώσουν ακριβή αποτελέσματα (Sippl, 1990; Brini, E., Simmerling, C. & Dill, 2020), τα τελευταία χρόνια τα προγράμματα που βασίζονται στην βιοπληροφορική ανάλυση της εξελικτικής πορείας των πρωτεϊνών και κατά επέκταση στην ομολογία με ήδη λυμένες δομές και στην εξελικτική συσχέτιση μεταξύ τους, έχουν καταφέρει πολύ μεγάλη πρόοδο (Weigt *et al.*, 2009). Τα

προγράμματα αυτά έχουν επωφεληθεί πολύ από: α) την σταθερή αύξηση των πειραματικά αποκτημένων πρωτεϊνικών δομών που εναποτίθενται στην τράπεζα δεδομένων PDB (Protein Data Bank) ('Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data wwPDB consortium', 2019), β) την πιο αποτελεσματική αλληλούχηση των γονιδιωμάτων των οργανισμών και γ) την ραγδαία ανάπτυξη της μηχανικής μάθησης για τον συσχετισμό των προηγούμενων δύο (Thompson, Yeates and Rodriguez, 2020).

Η κατανόηση της λειτουργίας των δισεκατομμυρίων γνωστών πρωτεϊνών, οι οποίες συμμετέχουν στους κυτταρικούς μηγανισμούς των οργανισμών, όπως επίσης και η συσχέτιση τους με τις συντηρημένες δομές/περιοχές τους, είναι από τους βασικούς στόγους της δομικής βιολογίας (Steinegger, Mirdita and Söding, 2019). Οι περιορισμοί, όμως, και τα μειονεκτήματα των κλασικών μεθόδων της τελευταίας, όπως η κρυσταλλογραφία (Jaskolski, Dauter and Wlodawer, 2014), ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) (Wüthrich, 2001) και η κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία (cryogenic electron microscopy, cryo-EM) (Bai, Mcmullan and Scheres, 2014), οι οποίοι μπορούν να διαπιστωθούν τόσο από τον αριθμό των δομών που έχουν αποκτηθεί μέχρι σήμερα (περίπου 100.000) όσο και από τον χρόνο που απαιτείται (από μήνες έως χρόνια), για την λύση ενός πρωτεϊνικού μορίου, είχαν σαν αποτέλεσμα τη ανάπτυξη προγραμμάτων τεχνητής νοημοσύνης για την πρόβλεψη της δομής ενός πρωτεϊνικού μορίου (Thompson, Yeates and Rodriguez, 2020). Ένα από αυτά τα προγράμματα είναι το AlphaFold (Jumper et al., 2021), η ικανότητα του οποίου να προβλέπει πρωτεϊνικές δομές είναι εξαιρετικά ακριβής σε βαθμό που ξεπερνάει τα αποτελέσματα κάποιον κλασικών μεθόδων όπως για παράδειγμα τα αποτελέσματα της ανάλυσης NMR (Fowler and Williamson, 2022). Επιπροσθέτως, καθώς πολλές πρωτεΐνες χρειάζονται συγκεκριμένους συμπαράγοντες για να μπορέσουν να πάρουν την τελική τους αναδίπλωση ή ακόμα συναντώνται αποκλειστικά ως διμερή ή πολυμερή γίνονται επιπλέον προσπάθειες για τη δημιουργία νέων αλγόριθμων που εντάσσονται στο πεδίο της υπολογιστικής νοημοσύνης και οι οποίοι θα εμπλουτίσουν ήδη υπάρχοντα προγράμματα όπως το Alphafill (Hekkelman et al., 2021).

1.3.1 Εφαρμογή προγραμμάτων υπολογισμού τριτοταγής δομής σε πιθανούς πρωτεϊνικούς μολυσματικούς παράγοντες του παθογόνου καραντίνας *Xylella fastidiosa*

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων KEGG, και αναζητήθηκαν ομόλογα διαφόρων γνωστών γονιδίων του εκκριτικού συστήματος τύπου ΙΙ των παθογόνων μικροοργανισμών, που θα μπορούσαν δυνητικά να υπάρχουν σε διάφορα αλληλουχημένα γονιδιώματα στελεχών του βακτηριακού παθογόνου Xylella fastidiosa (Sertedakis et al., 2021). Η διαδικασία αυτή οδήγησε στην επιλογή 19 υποθετικών γονιδίων που σχετίζονται με το T2SS του παθογόνου. Η γονιδιακή εξέλιξη είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει μηχανισμούς όπως διπλασιασμοί γονιδίων και οριζόντια γονιδιακή μεταφορά, οι οποίες οδήγησαν στην υπόθεση ότι οι πρωτεΐνες που δεν έχουν υψηλή ομολογία στην πρωτοταγή αλληλουγία τους, μπορεί να έχουν υψηλή ομοιότητα στην τριτογενή αναδίπλωσή τους και επιπλέον να έχουν την ίδια λειτουργία στην μολυσματικότητα των παθογόνων (de Guillen et al., 2015). Με βάση την παραπάνω υπόθεση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό i-TASSER, το οποίο είναι προγενέστερο του AlphaFold και οι πρωτεΐνες μελετήθηκαν σύμφωνα με την αμινοξική ομολογία τους, αλλά και βάση της πιθανής/προβλεπόμενης δομικής ομολογίας τους με άλλες πρωτεΐνες στις βάσεις δεδομένων (Roy, Kucukural and Zhang, 2010).

Από τη βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων, από τα τότε διαθέσιμα γονιδιώματα των στελεχών Temecula1, CoDiRO και Sandyi Ann-1, προέκυψαν 19 γονίδια εκ των οποίων τα εννέα μπορούσαν να επάγουν φαινότυπο κυτταρικού θανάτου με τη μέθοδο του αγροεμποτισμού σε ποικιλίες φυτών του γένους *Nicotiana* (Πίνακας 1.1, Εικόνα 1.6). Τα προϊόντα των γονιδίων αυτών οργανώνονται σε τρεις κατηγορίες (Sertedakis *et al.*, 2021). Οι τρεις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια με κωδικούς: PD_0956, RA12_05570 και D934_07885, έχουν υψηλή δομική ομολογία με υδρολάσες. Οι υδρολάσες αποτελούν μια μεγάλη διακριτή κατηγορία ενζύμων που περιλαμβάνει ένζυμα τα οποία δρουν ως βιοχημικοί καταλύτες χρησιμοποιώντας μόρια νερού για να διασπάσουν χημικούς δεσμούς (Simon and Cravatt, 2011). Η ικανότητά τους να προκαλούν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο θα μπορούσε να θεωρηθεί γεγονός αναγνώρισης PAMPs ή ακόμα και DAMPs (Damage-associated molecular patterns) (βλέπε Κεφάλαιο 1.4) (Hou *et al.*, 2019). Μια άλλη ομάδα πρωτεϊνών, που σχηματίζεται, είναι αυτή των γονιδίων με κωδικούς: PD_1703, RA12_01530 και D934_08750, οι οποίες εμφανίζουν ομοιότητες με την LipA πρωτεΐνη, ένα ένζυμο αποδόμησης κυτταρικού τοιχώματος που παρουσιάζεται σε πολλά μικροβιακά παθογόνα του γένους *Xanthomonas* (Nascimento *et al.*, 2016). Η πρωτεΐνη LipA είναι γνωστό ότι προκαλεί ανοσολογική αποκρίσεις στο ρύζι και πρόσφατα ευρήματα δείχνουν την πιθανή εμπλοκή της με την σχετιζόμενη με το τοίχωμα του ρυζιού κινάση WAKL21.2 (Jha, Rajeshwari and Sonti, 2007). Η δομική ανάλυση στις τρεις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια με κωδικούς: PD_0915, D934_09265, και D934_09300, αποκάλυψε ότι αυτή η ομάδα αποτελείται από πρωτεΐνες με αμινοξική και πιθανή δομική ομολογία με zonula occludens τοξίνες (Zot). Η πρωτεΐνη Zot περιγράφηκε για πρώτη φορά στον μικροοργανισμό *Vibrio cholera*, και εμπλέκεται στην αύξηση της διαπερατότητας του εντερικού φραγμού. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες Zot αναγνωρίστηκαν αργότερα σε διάφορα άλλα παθογόνα (Pérez-reytor *et al.*, 2018).

Από την παραπάνω υπόθεση και επαλήθευση των δεδομένων βιοπληροφορικής ανάλυσης για το κατά πόσο πιθανές πρωτεΐνες παθογένειας, οι οποίες ομοιάζουν στην τριτοταγή δομή των πρωτεΐνικών τους μορίων με ήδη μελετημένες πρωτεΐνες παθογόνων, μπορούν να επάγουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε φυτάμη ξενιστές του γένους *Nicotiana*, αποδεικνύεται πως τα προγράμματα τα οποία είναι ικανά να προβλέψουν και να συγκρίνουν πρωτεΐνικές δομές μεταξύ τους, αποτελούν ένα πολύτιμο εργαλείο για τον πειραματικό σχεδιασμό ως προς την κατεύθυνση της πρόβλεψης του χαρακτηρισμού των πρωτεϊνών παθογένειας.

προκαλέδαν φαινότυπο κυτταρικού θανάτου σε φυτά του γενούς <i>Niconana</i> .					
Αμινοξική	Περιγραφή	Δομική	Περιγραφή		
ομολογία		ομολογία			
3WY8	Υδρολάση/ Πρωτεάση σερίνης	1Z8G	Υδρολάση		
3WY8	Υδρολάση/ Πρωτεάση σερίνης	3WY8	Υδρολάση/ Πρωτεάση σερίνης		
2R2A	Τοξίνη τύπου Zot	2DHR	Υδρολάση/Μεταλλοτρ ανσφεράση		
3H2K	Υδρολάση/	3H2K	Υδρολάση/		
	Αμινοξική ομολογία 3WY8 3WY8 2R2A 3H2K	Αμινοξική Περιγραφή ομολογία Βρολάση/ 3WY8 Υδρολάση/ βWY8 Υδρολάση/	Αμινοξική Περιγραφή Δομική ομολογία ομολογία ομολογία 3WY8 Υδρολάση/ 1Z8G Πρωτεάση σερίνης 3WY8 3WY8 Υδρολάση/ 3WY8 128G Πρωτεάση σερίνης 3WY8 Υδρολάση/ 3WY8 3WY8 Υδρολάση/ 3WY8 3WY8 Υδρολάση/ 3WY8 128G Πρωτεάση σερίνης 3WY8 3WY8 Υδρολάση/ 3WY8 128G Πρωτεάση σερίνης 3WY8 128G Πρωτεάση σερίνης 3WY8 3W2A Τοξίνη τύπου Zot 2DHR 3H2K Υδρολάση/ 3H2K		

Πίνακας 1.1 Λίστα γονιδίων στελεχών του βακτηρίου *Xylella fastidiosa*που προκάλεσαν φαινότυπο κυτταρικού θανάτου σε φυτά του γένους *Nicotiana*.

		Εστεράση (LinA)		Εστεράση (LinA)
D934_07885	3WY8	Υδρολάση/	1Z8G	Υδρολάση
		Πρωτεάση σερίνης		
D934_09300	2R2A	Τοξίνη τύπου Zot	2R2A	Τοξίνη τύπου Zot
D934_09265	2R2A	Τοξίνη τύπου Zot	4WWO	Τρανσφεράση
RA12_01530	3H2K	Υδρολάση/	3H2K	Υδρολάση/
		Εστεράση (LipA)		Εστεράση (LipA)
		(LipA)		(LipA)
RA12_05570	3WY8	Υδρολάση/Πρωτεάση σερίνης	1Z8G	Υδρολάση



Εικόνα 1.6 Απεικόνιση πρωτεϊνών του παθογόνου Xylella fastidiosa, οι οποίες προκάλεσαν κυτταρικό θάνατο. **Α-Β** LipA εστεράσες, **Γ-ΣΤ** Υδρολάσες, **Ζ-Θ** τοξίνες τύπου Zot.

1.4 Το αμυντικό σύστημα των φυτικών οργανισμών

Η ανοσία των φυτικών οργανισμών διαχωρίζεται πολύ χαρακτηριστικά σε δύο βασικές γραμμές άμυνας (Li *et al.*, 2020). Στην πρώτη, ο ξενιστής χρησιμοποιεί διαμεμβρανικούς υποδοχείς αναγνώρισης μοτίβων (pattern recognition receptors, PRRs) (Ziv *et al.*, 2018), οι οποίοι είναι ικανοί να αναγνωρίσουν τα εξελικτικά συντηρημένα μικροβιακά/παθογονικά μοριακά μοτίβα (microbial/pathogen molecular patterns MAMPs/PAMPs) (Meng and Zhang, 2013). Για παράδειγμα ο διαμεμβρανικός υποδοχέας άμυνας, FLS2, μπορεί και ενεργοποιήσει την άμυνα στο φυτό μοντέλο Arabidopsis thaliana, επάγοντας την μεταγραφή ενός αριθμού γονιδίων, κατόπιν της αναγνώρισης μιας περιοχής 22 αμινοξέων στο μαστίγιο των βακτηριακών παθογόνων (flagellin peptide 22, flg22) (Nu *et al.*, 2007). Επίσης, ένα ακόμη χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο διαμεμβρανικός υποδοχέα άμυνας, EFR, ο οποίος αναγνωρίζει τον βακτηριακό παράγοντα επιμήκυνσης Tu (elongation factor Tu, EF-Tu) (Schoonbeek *et al.*, 2015),(Thomma, Nu and Joosten, 2011).

Η δεύτερη γραμμή άμυνας, τοποθετείται χωρικά αποκλειστικά ενδοκυτταρικά και βασίζεται στις πρωτεΐνες NB-LRR ή NLR, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια ανθεκτικότητας (Resistance genes, R genes) (Monteiro and Nishimura, 2018). Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες πήραν το όνομα τους από τις χαρακτηριστικές περιοχές δέσμευσης νουκλεοτιδίων (Nucleotide-binding site, NB) και τις περιοχές πεπτιδικών επαναλήψεων πλούσιες σε λευκίνη (leucine-rich repeats, LRRs) και χωρίζονται σε τρεις μεγάλες ομάδες ανάλογα με την αμινοτελική τους περιοχή: α) Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-NLRs, β) Coiled-coil (CC)-NLRs και γ) RPW8-like-NLRs (Resistance to powdery Mildew 8) (Boutrot and Zipfel, 2017; Mermigka and Sarris, 2019; Marchal et al., 2022). Μία υποκατηγορία αυτών των πρωτεϊνών, οι οποία περιέχει μία επιπλέον περιοχή που τις βοηθάει να αναγνωρίζουν τους τελεστές των παθογόνων άμεσα ή έμμεσα, είναι και η NLR-IDs (NLR with integrated domain(s)) (Sarris et al., 2016). Οι ενσωματωμένες αυτές περιοχές, ομοιάζουν με τους πρωτεϊνικούς στόχους των τελεστών μέσα στο κύτταρο του ξενιστή, βοηθώντας έτσι την αναγνώριση των τελευταίων αποδοτικότερα (Kroj et al., 2016). Η ανθεκτικότητα των φυτών, οι οποία βασίζεται στους NB-LRRs είναι αποτελεσματική εναντίον βιοτροφικών και ημιβιοτροφικών βακτηρίων, καθώς οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ή αλλιώς την αντίδραση υπερευαισθησίας (Hypersensitive reaction, HR) (Balint-Kurti, 2019).

Η συνεχής συνεξέλιξη μεταξύ των φυτών και των παθογόνων απεικονίζεται πολύ επιτυχημένα στην παρακάτω εικόνα. Τα PAMPs/MAMPs αναγνωρίζονται από τους PRRs και οδηγούν στην επαγόμενη από PAMPs ανοσία (PTI - PAMP triggered immunity) (Thomma, Nu and Joosten, 2011). Στη συνέχεια, τα βακτηριακά παθογόνα χρησιμοποιούν τελεστές οι οποίοι μπορούν και παρεμποδίζουν το PTI,

αλληλεπιδρώντας με τις σηματοδοτικές πρωτεΐνες του μηχανισμού. Εν συνεχεία, οι τελεστές αυτοί αναγνωρίζονται από τις NLR πρωτεΐνες έχοντας σαν αποτέλεσμα την επαγόμενη μέσω τελεστών ανοσία (effector triggered immunity - ETI) και τελικά σε HR (Chisholm *et al.*, 2006). Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι, οι μηχανισμοί άμυνας του ξενιστή και οι μηχανισμοί παθογένειας των μικροβίων, βρίσκονται σε ένα συνεχόμενο αγώνα εξέλιξης μεταξύ ξενιστών και παθογόνων, καθώς μέσω της φυσικής επιλογής τα παθογόνα μεταβάλλουν τους ήδη υπάρχοντες τελεστές για να μην μπορούν να αναγνωρίζονται από NLR πρωτεΐνες ή αποκτούν νέα γονίδια μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (horizontal gene transfer, HGT) ή γονιδιακού ανασυνδυασμού, ενώ από τη μεριά τους οι ξενιστές, αποκτούν εκ νέου *R* γονίδια, μέσω διπλασιασμού γονιδίων ή συσσώρευση μεταλλάξεων σε ήδη υπάρχοντα γονίδια (Εικόνα 1.7) (Qi and Innes, 2013).



Εικόνα 1.7. Σχηματική αναπαράσταση της συνεξέλιξης του αμυντικού συστήματος των φυτών και των παθογονικών τελεστών. Προσαρμοσμένο από (Jones and Dangl, 2006). PAMPS: Pathogen Molecular Patterns, PTI: PAMP Triggered Immunity, ETS: Effector Triggered Susceptibility, ETI: Effector Triggered Immunity.

Πρόσφατα η ενίσχυση της ανθεκτικότητας των φυτών εναντίον των παθογόνων, αποδείχτηκε πως είναι αποτέλεσμα της συνεργασίας μεταξύ ΡΤΙ και ΕΤΙ. Το ΡΤΙ μπορεί να παρεμποδίσει την επίθεση των παθογόνων βακτηρίων περιορίζοντας τα διαθέσιμα προς τα παθογόνα συστατικά, καταστέλλοντας του βακτηριακούς μηγανισμούς και επάγοντας αντιμικροβιακούς παράγοντες (Ngou et al., 2021). Από την άλλη μεριά το ΕΤΙ ενισχύει την αμυντική απόκριση από το ΡΤΙ ρυθμίζοντας θετικά τις πρωτεΐνες σήματος του μονοπατιού και ελέγχοντας την μεταγραφή, την μετάφραση και την δυναμική διακίνηση (turn over) των πρωτεϊνών αυτών (Anderson et al., 2014). Με άλλα λόγια, οι PRRs αποτελούν την πρωταρχική απόκριση ανόσιας, ενώ οι NLRs ενισχύουν τον μηχανισμό αυτόν, αναπληρώνοντας/αντικαθιστώντας τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο ΡΤΙ, και είτε έχουν παρεμποδιστεί από βακτηριακούς τελεστές, ή έχουν γρήγορο ρυθμό turn over, μετά την ενεργοποίηση τους (Yuan et al., 2021). Τέλος πρέπει να σημειωθεί, παρόλο τον αριθμό των γονιδίων R που παρουσιάζονται σε κάθε οργανισμό, τα γονίδια αυτά δεν εκφράζονται συνεχώς, καθιστώντας τη συμβολή του ΕΤΙ στην ανοσία των φυτικών οργανισμών περιορισμένη, και ενισχύοντας την υπόθεση της συνεργασίας των δύο συστημάτων (Ngou et al., 2021).

1.5 Το σύμπλοκο εξωκύττωσης

Το σύμπλοκο εξωκύττωσης είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο οχτώ υπομονάδων, το οποίο συμμετέχει στη μεταφορά κυστιδίων από το σύστημα Golgi στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου, όπου τα κυστίδια συντήκονται με αυτήν, με τη βοήθεια των πρωτεϊνών SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptors) (Mei and Guo, 2018). Ύστερα από την πρώτη αναγνώριση και χαρακτηρισμό του συμπλόκου στη ζύμη το 1995, περαιτέρω μελέτες έδειξαν πως παρόλη τη διαφορά στην ομολογία μεταξύ των υπομονάδων στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, τόσο η συμμετοχή τους στη δημιουργία του συμπλόκου, όσο και η ίδια τους η λειτουργία, στην οποία συγκαταλέγεται και η ικανότητα αλληλεπίδρασης τους και με άλλα πρωτεϊνικά μόρια, παραμένουν εν πολλοίς συντηρημένες μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών (Martin-urdiroz *et al.*, 2016). Οι υπομονάδες αυτές είναι τα πρωτεϊνικά μόρια Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 και Exo84 (Mei *et al.*, 2018). Στα πρώτα στάδια της δημιουργίας του συμπλόκου οι υπομονάδες αυτές
δημιουργούν διμερή ανά ζεύγη μεταξύ τους: Sec3-Sec5, Sec6-Sec8, Sec10-Sec15 και Exo70-Exo84, ενώ στη συνέχεια δημιουργούνται δύο πρωτεϊνικά υποσύμπλοκα: το υποσύμπλοκο Ι (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8) και το υποσύμπλοκο ΙΙ (Sec10, Sec15, Exo70, Exo84) (Picco et al., 2017). Οι υπομονάδες του συμπλόκου εξωκύττωσης αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, μέσω ενός συντηρημένου μοτίβου στο αμινοτελικό τους άκρο, το CorEx μοτίβο (Εικόνα 1.8) (Lepore, Martínez-Núñez and Munson, 2018). Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί, κατά τους οποίους το σύμπλοκο εξωκύττωσης παίρνει την τελική του μορφή. Ο πρώτος μηχανισμός περιγράφτηκε στην ζύμη. Σύμφωνα με αυτόν, η υπομονάδα Sec3 βρίσκεται συνδεδεμένη στην μεμβράνη, όπου και γίνεται αρχικά η «συναρμολόγηση» του υποσυμπλόκου ΙΙ και στη συνέχεια το τελικό σύμπλοκο εξωκύττωσης. Σε αντίθεση με τις ζύμες, στα θηλαστικά έχει προταθεί πως το υποσύμπλοκο ΙΙ δημιουργείται πάνω στο υπό έκκριση κυστίδιο, αλλά το τελικό σύμπλοκο εξωκύττωσης δημιουργείται πάνω στην κυτταρική πλασματική μεμβράνη (Mei and Guo, 2019). Ο ρόλος της εκάστοτε πρωτεϊνικής υπομονάδας έχει μελετηθεί εκτενώς, όπως και η συμμετοχή της στη μεταφορά και σύντηξη των κυστιδίων (Mei and Guo, 2018).



Εικόνα 1.8 Στάδια σχηματισμού του συμπλόκου εξωκύττωσης, Α. Σχηματισμός ετεροδιμερών ανά ζεύγη. Παράδειγμα Εxo70B1-Exo84, **B.** Δημιουργία υποσυμπλόκων Ι και ΙΙ, Γ. Τα δύο υποσύνολα αλληλεπιδρούν και το σύμπλοκο εξωκύττωσης παίρνει την τελική μορφή του. Χρώματα για την απεικόνιση (Γ): Sec3 κόκκινο, Sec5 γκρι, Sec6 πράσινο, Sec8 μωβ, Sec10 κίτρινο, Sec15 magenta, Exo70 κυανό και Exo84 πορτοκαλί.

1.5.1 Η υπομονάδα Εχο70 του συμπλόκου εξωκύττωσης

Η υπομονάδα Εxo70 του συμπλόκου εξωκύττωσης, η οποία παρουσιάζει τα περισσότερα παράλογα στους φυτικούς οργανισμούς (Žárský et al., 2020), διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του (Grunt et al., 2012). Αυτό προκύπτει μέσω της ικανότητάς της να δημιουργεί ομοδημερή και να αλληλεπιδρά με τα υπόλοιπα μέλη του συμπλόκου εξωκύττωσης, συμβάλλοντας έτσι σε μία πληθώρα βιολογικών διεργασιών (He and Guo, 2009). Παρόλο που στις ζύμες και στα θηλαστικά υπάρχει μόνο ένα γονίδιο από το οποίο μεταφράζεται, οι φυτικοί οργανισμοί παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος στον αριθμό των γονιδίων exo70, τα οποία είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση διαφόρων παραλογών. Ο αριθμός αυτός κυμαίνεται από 21 αντίγραφα στο Symphytum tuberosum μέχρι και 47 στο ρύζι (Oryza sativa) (Zhao et al., 2019). Τα γονίδια αυτά έχουν διαφοροποιηθεί πιθανόν από τρία αρχικά γονίδια (Exo70.1, Exo70.2 και Exo70.3) (Žárský et al, 2020). Περαιτέρω διπλασιασμός των τελευταίων οδήγησε στην οργάνωση τους σε εννιά ομάδες (Exo70A-Exo70J) (Zhao et al., 2019). Στα φυτά τα διαφορετικά παράλογα έχει δειχθεί ότι συμμετέχουν σε μία ποικιλία κυτταρικών διεργασιών. Συνοπτικά οι μέχρι τώρα γνωστές διεργασίες στις οποίες συμμετέχουν τα παράλογα της Εχο70 είναι:

<u>Exo70A</u>: Διαφοροποίηση της κασπαριανής ζώνης, ανάπτυξη των τριχιδίων της ρίζας και του περιβλήματος του σπόρου (Li *et al.*, 2013)

Exo70C: Επιμήκυνση γυρεοσωλήνα (Kulich, 2017)

Exo70D: Ρύθμιση ευαισθησίας κυτοκινήνων (Kwame et al., 2020)

<u>Exo70E</u>: Ρύθμιση έκφρασης *bph6* (brown planthopper resistance gene 6) (Guo *et al.*, 2018)

Exo70F: Συμμετοχή στην φυτική ανοσία (Fujisaki et al., 2015)

<u>Exo70H</u>: Ανθεκτικότητα κατά του νηματώδη της σόγιας, ωρίμανση του κυτταρικού τείχους του τριχώματος (Ha *et al.*, 2011)

Exo70I: Επαγωγή κατά τη διάρκεια συμβίωσης σε μυκόρριζες (X. Zhang et al., 2015)

<u>Exo70J</u>: Γήρανση των φύλλων (Wang et al., 2016)

Συγκεκριμένα τόσο η πρωτεΐνη Exo70B1 όσο και η πρωτεΐνη Exo70B2, έχει αποδειχτεί ότι συμμετέχουν στην ανοσία έναντι των φυτικών παθογόνων (Peenková et al., 2011; Stegmann et al., 2014a). Μεταλλαγές στο γονίδιο της Exo70B1 είχε σαν αποτέλεσμα τον μειωμένο αριθμό αυτοφαγωσωμάτων, αυξημένη συγκέντρωση σαλικυλικού οξέος, και εκτοπικές αντιδράσεις υπερευαισθησίας (Kulich et al., 2013). Επιπλέον και τα δύο παράλογα συμμετέχουν στις αποκρίσεις αβιοτικής καταπόνησης ρυθμίζοντας την κίνηση των στομάτων (Seo et al., 2016). Οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί μέχρι σήμερα και με τους οποίους η Exo70B1 συμμετέχει στην άμυνα των φυτών είναι: α) η πρωτεϊνική κινάση CPK5 (calcium dependent kinase 5) φωσφωρυλιώνει την Exo70B1 μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος εξαρτάται από τη συγκέντρωση ασβεστίου (Liu et al., 2017), ενώ στη συνέχεια αλληλεπιδρά με τον άτυπο NLR υποδοχέα άμυνας TN2 (Zhao et al., 2015), ο οποίος την διατηρεί ενεργή και της δίνει την ικανότητα να συνεχίσει να φωσφορυλιώνει μετέπειτα στόχους της, ή β) αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη RIN4, η οποία αποτελεί ρυθμιστή του PTI (Sabol, Kulich and Žárský, 2017).

1.5.2 Ρόλος των υπομονάδων του συμπλόκου εξωκύττωσης στην επιλογή του φορτίου των κυστιδίων και στη διαδικασία σύντηξης τους στην μεμβράνη.

Τα περισσότερα μόρια, συμπεριλαμβανομένων και των πρωτεϊνών PRRs, είναι πολύ μεγάλα σε μέγεθος για να περάσουν απευθείας από τις μεμβράνες. Για τον λόγο αυτό, οργανώνονται σε μεμβρανικούς σχηματισμούς, τα λεγόμενα κυστίδια (Peenková et al., 2011; Stegmann et al., 2014b; Wang et al., 2020; Michalopoulou et al., 2022). H δημιουργία των κυστιδίων και η επιλογή του φορτίου που μεταφέρουν, έχει μελετηθεί εκτενώς στη ζύμη (Huang et al., 2021). Συγκεκριμένα, ο μηγανισμός του πρωτεϊνικού συμπλόκου κάλυψης ΙΙ (coat protein complex II, COPII), ο οποίος ρυθμίζει τη μεταφορά των κυστιδίων από το ενδοπλασματικό δίκτυο στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου, βασίζεται στην πρόσληψη του ετεροδιμερούς sec23-sec24 και στη συνέχεια του τετραμερούς sec13-sec31 από την sar1 (Arcangelo, Stahmer and Miller, 2013). Η τελευταία είναι μία μικρή GTPαση, η οποία είναι ικανή τόσο να δεσμεύει συγκεκριμένο φορτίο στα κυστίδια, όσο και να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας Rab μέσω της διαδικασίας της υδρόλυσης (Aridor and Traub, 2002). Μία από αυτές τις πρωτεΐνες είναι και η sec4, η οποία αλληλεπιδρά με την sec15 και την Myo2, μία πρωτεΐνη η οποία είναι υπεύθυνη για την μεταφορά των κυστιδίων στην μεμβράνη (Lepore, Martínez-Núñez and Munson, 2018). Σε αυτό το σημείο πραγματοποιείται και η δημιουργία του υποσυμπλόκου ΙΙ του συμπλόκου εξωκύττωσης. Από την άλλη μεριά, μία ομάδα πρωτεϊνών που συμμετέχει στην κίνηση των κυστιδίων, είναι οι v-SNARE πρωτεΐνες, οι οποίες εντοπίζονται μεμβράνη των κυστιδίων. Μία από αυτές είναι η snc2, η αλληλεπίδραση της οποίας με την Sec6, αποτελεί το δεύτερο σημείο χρονικά, όπου δημιουργείται το υποσύμπλοκο Ι (Gu et al., 2020). Περίπου έως και 20 σύμπλοκα εξωκύττωσης μπορούν να δημιουργηθούν σε ένα κυστίδιο (Picco et al., 2017).

Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πώς οι πρωτεΐνες της οικογένειας Εχο70 μπορούν και αλληλεπιδρούν με τη μεμβράνη του κυττάρου μέσω συντηρημένων αμινοξέων λυσίνης στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Η συγγένεια της αλληλεπίδρασης αυτής ποικίλει ανάλογα με την σύσταση των μεμβρανικών λιπιδίων (Synek *et al.*, 2021). Επίσης, μεταλλαγές που δημιουργήθηκαν στην Εχο70Α1 πρωτεΐνη, επηρέασαν την ικανότητα πρόσδεσης της Sec6 με πρωτεΐνες του

34

μηχανισμού εξωκύττωσης, που ήταν αποτέλεσμα της μεταβολής του στερεοδομικά κενού χώρου μεταξύ των δύο πρωτεϊνών (Shen *et al.*, 2013).

1.5.3 Στόχευση των πρωτεϊνών Εχο70 από τελεστές φυτικών παθογόνων.

Εξαιτίας της συμμετοχής των πρωτεϊνών Εχο70 σε μία σειρά σημαντικών βιολογικών διαδικασιών, πολλοί τελεστές φυτικών παθογόνων στοχεύουν τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες του ξενιστή, ώστε να παρεμποδίσουν τη λειτουργία του συμπλόκου εξωκύττωσης (Kotsaridis et al., 2022; Michalopoulou et al., 2022; Tsakiri et al., 2022). Ο τελεστής Avr-Pii από του μύκητα Magnaporthe oryzae, που μολύνει επιτυχώς το ρύζι, αλληλεπιδρά με δύο Exo70 παράλογα του ξενιστή, τα Exo70F2 και Exo70F3, μέσω του καρβοξυτελικού του άκρου. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στην επαγωγή της ΕΤΙ άμυνας του ξενιστή, καθώς στη συνέχεια ο τελεστής αναγνωρίζεται από τον NLR υποδοχέα, Pii-2 (Fujisaki et al., 2015). Ένας ακόμα τελεστής του βακτηριακού παθογόνου Pseudomonas syringae pv. tomato ο AvrPtoB, ο οποίος παρουσιάζει μοτίβο Ε3-λιγάσης στο καρβοξυτελικό του άκρο, στοχεύει την πρωτεΐνη Exo70B1 του ξενιστή Arabidopsis thaliana (Lei, Stevens and Coaker, 2020). Στην ίδια δημοσιευμένη έρευνα διαπιστώθηκε μέσω της δοκιμασίας δύο υβριδίων του σακγαρομύκητα (Y2H), αλληλεπίδραση της τελευταίας και με άλλους τελεστές του συγκεκριμένου παθογόνου όπως οι: HopH1, HopK1, HopO1-1 και HopY1 (Wang et al., 2019).

Ένας ακόμη τελεστής πού στοχεύει την Exo70B1 είναι ο XopP του βακτηριακού παθογόνου Xanthomonas campestris pv. campestris. Ο συγκεκριμένος τελεστής αλληλεπιδρά επίσης και με την Exo70B2, χωρίς να ενεργοποιεί την εξαρτώμενη από τον TN2 άμυνα του ξενιστή. Επίσης, διαπιστώθηκε η ικανότητα αυτού του τελεστή να αλληλεπιδρά και με άλλες υπομονάδες του συμπλόκου εξωκύττωσης όπως οι Exo84b και Sec10a (Michalopoulou *et al.*, 2022). Τέλος, ένας ακόμη τελεστής πού στοχεύει την Exo70B1 είναι και ο RipE1 του βακτηριακού παθογόνου Ralstonia solanacearum, ο οποίος έχει χαρακτηριστεί ως πρωτεάση κυστεΐνης (Tsakiri *et al.*, 2022).

1.6 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Ο στόχος της παρούσας διατριβής είναι η δομική διερεύνηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ: α) του τελεστή XopP από το παθογόνο Xanthomonas campestris pv. campestris και β) του τελεστή RipE1 του παθογόνου Ralstonia solanacearum με την πρωτεϊνική υπομονάδα του συμπλόκου εξωκύττωσης Exo70B1 του φυτού-ξενιστή Arabidopsis thaliana, αλλά και ο λειτουργικός χαρακτηρισμός και επίδραση των δύο αυτών τελεστών πάνω στον πρωτεϊνικό τους στόχο.

Αρχικά, οι αλληλεπιδράσεις XopP-Exo70B1 και RipE1-Exo70B1 είχαν παρατηρηθεί σε *in vivo* πειράματα, (Michalopoulou *et al.*, 2022),(Tsakiri *et al.*, 2022) αντίστοιχα. Και ακολούθησαν, για τον σκοπό της μελέτης, πειράματα δομικής βιολογίας, SAXS και κρυσταλλογραφίας, για να μπορέσει να υπολογιστεί η τριτοταγής δομή του εκάστοτε μορίου ανεξάρτητα, ενώ ακολούθησαν πειράματα βιοφυσικής ανάλυσης για να μπορέσουν να διερευνηθούν περαιτέρω οι δυνάμεις που διέπουν το συγκεκριμένο σύμπλοκο.

Τέλος, και λόγω της ραγδαίας ανάπτυξης των προγραμμάτων τεχνητής νοημοσύνης, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό AlphaFold, με το οποίο υπολογίστηκε *in silico* η δομή και των τριών προς μελέτη πρωτεϊνών, ενώ η σύγκριση τους με βάσεις δεδομένων, κατέστησε ικανό τον σχεδιασμό πειραμάτων για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό των τελεστών και εν τέλει στην καθίδρυση μιας ακολουθίας/ενός συνδυασμού τεχνικών από διάφορους τομείς της επιστήμης της βιολογίας όπως η βιοπληροφορική, η μοριακή βιολογία, η βιοφυσική/βιοχημεία, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί εύκολα σε διάφορα πρωτεϊνικά συστήματα για παρόμοιους σκοπούς.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Μέθοδοι μοριακής βιολογίας

2.1.1 Εξαγωγή ολικού φυτικού RNA

Για την απομόνωση RNA χρησιμοποιήθηκε ο οικότυπος Columbia-0 του Arabidopsis thaliana. Σπόροι αγρίου τύπου, όπως επίσης και σπόροι διαγονιδιακών φυτών Arabidopsis που εκφράζουν τον τελεστή ΧορΡ, έμειναν στους 4°C για 3 μέρες, με κατάλληλο ποσοστό υγρασίας προτού τοποθετηθούν σε χώμα και αναπτυχθούν σε συνθήκες θερμοκηπίου. Η εξαγωγή φυτικού ολικού RNA πραγματοποιήθηκε με χρήση αντιδραστηρίου TRI (Ambion) ακολουθώντας τις οδηγίες της εταιρείας. Συγκεκριμένα, 50-100 mg φυλλικού ιστού με τη μορφή μικρών δίσκων τοποθετήθηκαν σε μικροσωληνάρια 1.5 ml τύπου (Eppendorf) και καταψύχθηκαν σε υγρό άζωτο. Ακολούθησε ομογενοποίηση σε λεπτή σκόνη των δειγμάτων με ραβδάκια ομογενοποίησης, προσθήκη 1 ml TRI σε κάθε δείγμα και έντονη ανάδευση για 1 min. Τα δείγματα αφέθηκαν 5 min σε ηρεμία (θερμοκρασία δωματίου) και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 11.000 στροφές/min (rpm) στους 4°C, για 15 min. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέους μικροσωληνάρια, και προστέθηκαν 200 μl χλωροφορμίου. Έγινε ανάμειξη και τα δείγματα αφέθηκαν 15 min σε ηρεμία (θερμοκρασία δωματίου) και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν. Η υπερκείμενη υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέους μικροσωληνάρια, προστέθηκε ίσος συνολικά όγκος φαινόλης/χλωροφόρμιου (1:1) και ακολούθησε ανάδευση. Μετά από 5-10 min ηρεμίας σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέους μικροσωληνάρια. Στη συνέχεια προστέθηκαν 500 μl ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση για 15 sec. Ύστερα από 10 min σε θερμοκρασία δωματίου έγινε νέα φυγοκέντρηση, απομάκρυνση του διαλύματος και ξέπλυμα του κατακρημνισμένου RNA σε 1 ml 75% παγωμένης αιθανόλης. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση, απομάκρυνση της αιθανόλης και αναμονή μέχρι να εξατμιστεί πλήρως, και αναδιάλυση του κατακρημνισμένου RNA σε 20 μl υπερκάθαρου νερού. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν μέχρι τη χρήση τους στους -20 °C ή -80 °C.

2.1.2 Αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription, RT)

H RT πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια, σύμφωνα με τις οδηγίες της προμηθεύτριας εταιρείας του ενζύμου (SuperScriptTM II, INVITROGENTM). Πιο αναλυτικά: Σε μικροσωληνάρια Eppendorf 1,5 ml προστέθηκαν 0,5 μg ολικού RNA και 2 pmole ειδικού για το γονίδιο εκκινητή ή μείγμα OligoDT¹ (τελικής συγκέντρωσης 5 μM), σε dH₂0 με τελικό όγκο 12 μl και επωάστηκαν για 5 min στους 65°C. Στην συνέχεια προστέθηκαν 5 μl 5 x FS buffer, 2 μl 0,1 M DTT, 0,4 μl dNTP's², 1 μl RNaseOUT (40 units/μL)³ και 1 μl SuperScriptTM II (200 units) σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μl. Ακολούθησε ανάδευση και επώαση του δείγματος στους 42°C (στην περίπτωση των εκκινητών OligoDT) για 50 min ή σε θερμοκρασία ανάλογη για τον ειδικό εκκινητή για 50 min. Προστέθηκαν 80 μl dH₂O και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

¹Το μείγμα των εκκινητών OligoDT αποτελείται από τους εκκινητές OligoDT₁₆, OligoDT₁₈ και OligoDT₂₀, τα οποία αποτελούνται από 16,18 και 20 μόρια θυμίνης αντίστοιχα και υβριδίζονται στην πολύ-Α περιοχή των mRNA.

²Το μείγμα dNTP's αποτελείται από dATP, dCTP, dGTP και dTTP, τα οποία χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση του DNA προϊόντος

³RNaseOUTTM έχει τη λειτουργία αναστολέα RNAασης, δηλαδή μπορεί και συνδέεται με την RNAαση και να παρεμποδίζει τη λειτουργία της.

2.1.3 Ανάπτυξη βακτηριακών καλλιεργειών και καθαρισμός πλασμιδίων

Μοναδική αποικία *E. coli* που περιείχε το πλασμίδιο ενδιαφέροντος αναπτύχθηκε σε 10 ml LB¹, στο οποίο είχε προστεθεί το αντίστοιχο αντιβιοτικό για 16 h. Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών φαίνονται στον πίνακα 2.1. Τα κύτταρα περιστράφηκαν στα 11.000 g και το υπερκείμενο υγρό αφαιρέθηκε. Για τον καθαρισμό των πλασμιδίων για τα πειράματα κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε miniprep σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή Macherey-Nagel ή μέσω αλκαλικής λύσης.

Πίνακας 2	2.1	Αντιβιοτικά	επιλογής	και	01	προτεινόμενες	συγκεντρώσεις	στα
<u>διαλύματα</u>		·						

Αντιβιοτικά	Τελικές Συγκεντρώσεις (mg/ml)
Αμπικιλίνη	100
Καναμυκίνη	50
Χλωραμφενικόλη	34
Τετρακυκλίνη	10

¹LB μέσο ανάπτυξης (Luria-Bertani medium) για καλλιέργεια κυττάρων E.coli:

- 10 g/L Tryptone
- 10 g/L Sodium chloride
- 5 g/L Yeast Extract
- dH_2O για τελικό όγκο διαλύματος 1 L
- Για τη δημιουργία τρυβλίων, γίνεται προσθήκη 1.4% Agar

2.1.4 Αλκαλική λύση

Μεταφορά 1,5 ml βακτηριακής καλλιέργειας σε μικροσωληνάριο συλλογής και στη συνέχεια φυγοκέντρηση σε 17900 g για 5 min. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 100 μl διαλύματος A^1 . Ακολούθησε επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκαν 200 μl διαλύματος B^2 και ήπια ανάδευση. Αφού προστέθηκαν 150 μl διαλύματος Γ^3 , ακολούθησε φυγοκέντρηση του διαλύματος σε 15000 g για 15 min και μεταφορά των 400 μl του υπερκειμένου σε νέο μικροσωληνάριο συλλογής. Ακολούθησε κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη 2.5 όγκων (σε σχέση με το αρχικό διάλυμα) 100% παγωμένης απόλυτης αιθανόλης και 1/10 του όγκου 3M NaOAC (pH 5,2). Στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 5 min. Μετά την απομάκρυνση της αιθανόλης έγινε αναδιάλυση του κατακρημνισμένου DNA σε 30 μl υπερκάθαρου νερού. Αποθήκευση πλασμιδιακό DNA στους -20 °C.

¹Διάλυμα Α:

- 50 mM γλυκόζη
- 25 mM Tris HCl, pH 8
- 10 mM EDTA

²Διάλυμα Β:

- 0,2 M NaOH
- 1% SDS

 3 Διάλυμα Γ:

- 3 M οξικού καλίου (CH₃COOK)
- 2 M οξικού οξέος (CH₃COOH)

2.1.5 Ποσοτικοποίηση DNA

Για τον υπολογισμό της ποσότητας του DNA σε ένα δείγμα χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο ND-1000 (Nanodrop). Η ποσότητα του DNA υπολογίζεται με βάση την απορρόφησή του στα 260 nm με τη χρήση της μεθόδου Beer-Lambert: A=ecl, όπου A είναι η απορρόφηση στα 260 nm, e είναι ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης, c είναι η συγκέντρωση και l το μήκος διαδρομής. Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης για δίκλωνο DNA είναι 0,02 (ng/ml)⁻¹ cm⁻¹. Η καθαρότητα του DNA εκτιμήθηκε βάσει του λόγου της απορρόφησης στα 260 nm/280 nm.

2.1.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Aλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε με χρήση της πολυμεράσης Phusion (NEB, Hertfordshire, UK). Το μείγμα αντίδρασης περιείχε 10 μL ρυθμιστικό διάλυμα Phusion HF (5x), 1 μL 10 mM dNTPs, 2,5 μL από τον εκάστοτε εκκινητή στα 10 μM, <1μg πρότυπου DNA, 0,5 μL πολυμεράσης Phusion και ddH2O χωρίς νουκλεάση σε τελικό όγκο 50 μL. Οι συνθήκες αντίδρασης ήταν 98°C για 30 δευτερόλεπτα, 35 κύκλοι των 68-72°C για 20-30 δευτερόλεπτα (ανάλογα με τους εκκινητές, Πίνακας 2.2) ακολουθούμενοι από 30 δευτερόλεπτα ανά kb του DNA στους 72°C με τελική επέκταση 5 λεπτών στους 72°C και αποθήκευση στους 4°C.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Γονίδιο
XccXopP- FW	CGCCATATGCATCGTGTCGAA	XopP
XccXopP- REV	CCGCTCGAGCGGGAGGCT	XopP
Xo100_FW	GAAGATCTATGCATCGTGTCGAAATGA	XopP
RipE146 Fw	CGCCATATGCCAGCTGCCCTGCAAGGCCT	RipE1
RipE146 Rv	CCGCTCGAGGCTTTCCGTGGCGGGCGGCT	RipE1
ExFw_1	CCAGCAGCAGACGGGAGGTATGCATCGTGTCGAAA TGATCAAGCAGCGCTCTATAGAGTTGG	Exo70B1
ExFw_87	CCAGCAGCAGACGGGAGGTGACCCAGGCGAAATGC TGAGAAAAGCGCTTAGCAAGG	Exo70B1
EX10Rv_62 4.0	GGCGGCGGAGCCCGTTACTCAAACAGCGTGCCGCG ATCTCCATTGTCGTG	Exo70B1
LICcpk5Fw	CCAGCAGCAGACGGGAGGTATGGGCAATTCTTGCC GTGGATCTTTCAAGG	СРК5
LICcpk5Rev	GGCGGCGGAGCCCGTTACGCGTCTCTCATGCTAATG TTTAGACTATTTCT	СРК5

Πίνακας 2.2 Λίστα εκκινητών, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε σε ολικό cDNA των οργανισμών Arabidopsis thaliana, Xanthomonas campestris pv. campestris και Ralstonia solanacearum ή πλασμιδιακό DNA που περιείχε τα γονίδια του ενδιαφέροντος μας όπως παρουσιάζονται παρακάτω:

• <u>Xanthomonas campestris pv. campestris XopP (XC_2994)</u>

<u>Γονίδιο</u>

atgcatcgtgtcgaaatgatcaagcagcgctctatagagttggctgagtcgacgaaccttgccattgtg ggacttgccgccaggccccccaagcccgtaaggcagaccgttgtgggttcgtctgatgtgttgccgggg ccatcaagccctgtgttattacccgcggctgccatgcagcttcagtgcattgacccaggcgaaatgctg agaaaagcgcttagcaaggccaagatctttagagatgtgatcggcagtaacgaaggcccgcagggacaa cgcgaaggattgcaggcagtcgacgatttgaaggtgcagggggggttgcagtctaaagccgcagtggag ${\tt cacgaacatgcattgttgacgcttctcggaacgtccgctgcagtcggttatgcagcacgtgacgaactg}$ $\verb+ctggaagacaagtggatgcagcaatttgacatcattcagccgattgagcccgcgatcggcgccactatt$ gtgcaggcggagctgcacaatagtgatgttgagcgtcagcaaaccgaagagtggcaggggtatttgagc gaaatcgaacagtaccggggagcaatggatgagttgctgagacgcatgaaggcgccggatacacacaag aaaatacgcgaaaatgtctcagccatggtgccgttgatcaggaccaatctgggtttttgccatgaaacg atgcagtcaatccggagtctgctcgtcgatatccatcgtctgcagctggagcgtcaggtcgaggccaag ggcatgccggaagtcatggctagattgcacgaattggacgaggccaagaactaccgcggcgatgacgta gcagcggcgttttcggcgctgagccaagtcgtgatcgaatcgatatgtccctcggaagccggcgttgca ttgactccgcaggtggtggcacaacacaaagacgttcttgaggactatgcagagcactttgggcgcatc ggtctgaagctatgcgtggatgtcgccgctctcattgagaatgattgtgacgatcatatctggagatcg $\verb"gccggaaagcgcgaggtcgtcacgtcgccatctgcaacgatcgagcagctgcccgtgccgaggggcgtcg"$ $\verb|ccgagaccggccagcaagcatcgcaagccggtcaatcgagcggccgaagagtctagcctagtccctgca||$ cctcctgccatcttgagcgataaacggacgcttgcacaaaaacaagcggatgcgctgttgaagagcatt gacaccagcagcgtcggcagtatgatgcatcgctccgggcaagatgcggcgattgctttcacgttcgta cgcgcgtcggtccgggactggttcgcaagggatcggttgctgcagacaaaggcgaaactgtcgccagaa gacgatcgggttgcccaactcaccgagcgtttgcagctggtggacatgatcgagcagcgtgtgcggatc cgcgaagcagatgcgctgaagagcgacccgcagccccgttcgccgcatctttcgcgcttgctgaagatgagcgaggttgcccgcgtaacttcaccaattcgattaccctccgaccacgacaatggagatcgcggcacg $\tt ctgtttgagatacgtatcgaccacgcaccgttgtccaacggcaagcgccctgcgccatggttcgtacac$ catctgaaaacggcaagagagaaaaatctagggaagcgctgggagatgctcatgcgagcgctcggtcat ggtgtgaagccacattcggatagttctcagaccagtagtggcgcctgtatcagcctcccgtaa

<u>Πρωτεΐνη (733 αμινοξέα) – 82199 Da</u>

MHRVEMIKQRSIELAESTNLAIVPTDSATATNTTGGRPAKQSPQLHGLAARPPKPVRQTVVG SSDVLPGPSSPVLLPAAAMQLQCIDPGEMLRKALSKAKIFRDVIGSNEGPQGQRGATSKVVP EQKVKLSLAAMKSAREGLQAVDDLKVQGRLQSKAAVEHEHALLTLLGTSAAVGYAARDELLE DKWMQQFDIIQPIEPAIGATIVQAELHNSDVERQQTEEWQGYLSEIEQYRGAMDELLRRMKA PDTHKKIRENVSAMVPLIRTNLGFCHETMQSIRSLLVDIHRLQLERQVEAKGMPEVMARLHE LDEAKNYRGDDVAAAFSALSQVVIESICPSEAGVALTPQVVAQHKDVLEDYAEHFGRIGLKL CVDVAALIENDCDDHIWRSMLDLAQALTDYRQCVLDLTSSVVAGKREVVTSPSATIEQLPVP RASPRPASKHRKPVNRAAEESSLVPAPPAILSDKRTLAQKQADALLKSIPLERSMVNELDAD FMLIAKMLGRDTSSVGSMMHRSGQDAAIAFTFVRASVRDWFARDRLLQTKAKLSPEDDRVAQ LTERLQLMDMIEQRVRIREADALKSDPQPRSPHLSRLLKMSEVARVTSPIRLPSDHDNGDRG TLFEIRIDHAPLSNGKRPAPWFVHLHTAEPVTADALPTLGYKAFNAVHLKTAREKNLGKRWE MLMRALGHADAKVHRSTIDSALLASLLHMRSGVKPHSDSSQTSSGACISLP

• Arabidopsis thaliana Exo70B1 (At5g58430)

<u>Γονίδιο</u>

atggcggagaatggtgaagagaagttacttgctgttgcgcgtcacatagccaaaacacttggccacaat gaatccatggccgatgatatcttacagatcttctccaacttcgacggcagattttctcgcgagaagctcggtcagatctctcgctttgttgctgcggaccaaccaatttgggctgatcctgcagattcagctgctttc $\verb+ctcgacacaatcgatgagctcgttgcaatcattagagagtggagtcccatggcttcagagaaacctatc$ ggcatctgtctaacacgcgccgacgatatgatgcagcaagctatgttccgcatcgaagaagagttcagg $\verb+tcgcttatggagcgtggagctgagtctttcggacttaatcctcagggagacgctggtgcgatgaatcat+$ $\tt cgtttcgattctgaggaagaagaagatgatgacagagacttcaacaacggtgatgatattcagatccca$ ${\tt gtggcacagccactcactgactacgatcttatcattgatgctctcccttcggcgacaattaacgatcta}$ cacgagatggctaagcgaatgcttggcgctggatttggtaaggcgtgttctcatgtttatagttcttgt aggagagagtttctggaagaagtatgtcaaggttagggttacagaagctgagtattgaagaagttcataagatgccgtggcaggagttagaagatgagatagataggtggatcaaagctgctaacgttgctctaaga atcctgtttcctagcgaacgtagactctgtgaccgtgtcttcttcggtttctcctctgctgctgatctt agcagatcgcctgagagattgtttaaagtgcttgatgtgtttgagacaatgagggatttgatgcctgaa ${\tt tttgagtctgtgttctcggatcagttttgctcagttcttagaaatgaagcagtaactatttggaaacgg}$ $\tt ttgggagaggcgataagaggtatatttatggagcttgagaatttgatccggcgagacccggctaaagct$ $\verb"gcggttccgggcggtggcctccacccgatcactcgttatgtgatgaattacctccgtgcggcttgtaga"$ $\verb+tcccggcaaaccttagagcaagtgtttgaggaaagcaatggtgtcccttctaaagattcaactctgttg$ actgtacagatgtcttggatcatggagcttctagagagtaacttggaagtaaaatctaaagtgtacaaagatccagctttgtgctatgtgtttctgatgaataatgggagatacattgttcagaaagtcaaagatggagatctaggattgctgttaggagatgattggattcggaaacacaatgtcaaagtgaaacaataccatatg aattatcagagaagctcatggaataagatgctggggttgctgaaggtggataatactgcagcaggcatg aacggtttggggaagaccatgaaggagaagctgaagcagttcaatattcagtttgatgagatatgtaaa gtgcattcgacgtgggtagtgtttgacgagcagctgaaagaagagctaaagatctcactggccaggctt $\tt ttggtaccggcatacgggagcttcatcggcaggttccaaaaccttggagacatagggaaaaacgcagac$

aagtacatcaagtatggagttgaggacatagaggcgcgtattaacgagctgttcaaagggactaccacg ggaagaaaatga

<u>Πρωτεΐνη (624 αμινοξέα) – 70640 Da</u>

MAENGEEKLLAVARHIAKTLGHNESMADDILQIFSNFDGRFSREKLAEGQAGEDGSGVATLE RALNSIDGQISRFVAADQPIWADPADSAAFLDTIDELVAIIREWSPMASEKPIGICLTRADD MMQQAMFRIEEEFRSLMERGAESFGLNPQGDAGAMNHRFDSEEEEDDDRDFNNGDDIQIPVA QPLTDYDLIIDALPSATINDLHEMAKRMLGAGFGKACSHVYSSCRREFLEESMSRLGLQKLS IEEVHKMPWQELEDEIDRWIKAANVALRILFPSERRLCDRVFFGFSSAADLSFMEVCRGSTI QLLNFADAIAIGSRSPERLFKVLDVFETMRDLMPEFESVFSDQFCSVLRNEAVTIWKRLGEA IRGIFMELENLIRRDPAKAAVPGGGLHPITRYVMNYLRAACRSRQTLEQVFEESNGVPSKDS TLLTVQMSWIMELLESNLEVKSKVYKDPALCYVFLMNNGRYIVQKVKDGDLGLLLGDDWIRK HNVKVKQYHMNYQRSSWNKMLGLLKVDNTAAGMNGLGKTMKEKLKQFNIQFDEICKVHSTWV VFDEQLKEELKISLARLLVPAYGSFIGRFQNLGDIGKNADKYIKYGVEDIEARINELFKGTT TGRK

• Ralstonia solanacearum RipE1 (A0A850FGJ1)

<u>Γονίδιο</u>

atgccgcccgtcctgccgtcgatcctgaggtgcttccgcccggccgtctcgcgcccggaggcggaaacc gctgccctgcaaggcctgacgccacgggccggatcgtcgcgccaggcacccgaggcaccggcc gggccggcgcgcttcctgaccgatggcgaacgccagttcggcggctatctgatggcccgggatgtcgac cagcgtccccgtccacggtgaaccactggacacattgcgcagcgccaacgaaacactgctgcaaacccgc atcgcgcagggtggccgctccatccaggaatccatgtggcgtgcccatcccaagcctgtcgtatgggcc gccatcgcaatggtggcaggggggggggaactgcggcggaacacgccgatctggccaccttcctccacgccgcgaaactgaaggaaggggaagcggtcgacaacgtccatatcgacgacttcgaccacttctgggcaatc gtgcaccgtgccgaaccggatctggaacgcgacgtctacatcgacgcatggggcaaggggccggcgatc $\tt tttgcggtggacggcatgatgacctaccgtcccggggaacggagaacgaagttcggctacgacaaggct$ $\verb+ ccggcgaggaagcccacgccgacatggaaatgctggcgaccgtgctggcgacacggatgcggcggc$ ${\tt ctcatggtgcccccggactgtgccaccccttcctccgtcgagccgccggtcaccaacgagcgcctgatg}$ $\verb|caaccgctgcggcacgagatccacgccacgcgcatcgccaggacgctcggcgcgcacagcgtcgacacc|| \\$ atggcgcatgctgcccgacgcatcgttgcagtcgcatccgatctgcaggggtaccccatcgaggcgcatctgggcaaaggcgagccgcccgccacggaaagctga

<u>Πρωτεΐνη (429 αμινοξέα) – 46898 Da</u>

MPPVLPSIFRCFRPSVSRPEAETAAPSSSRGPDQPGSPARSPRRAPAALQGLTPRIGSSRRQ ALPEPPETPAEPARFLTDGERQFGGYLMAREVDQRPVHGEPLDTLRDANETLLQARRILKHG RGNVQVDIDATNGLSTHIAQGGRSIQESMWRAHPKPVVWAAIAMVAGAGNCGEHADLATFLH AAKLKEGETVDNVHIDDFDHFWAVVHRGAEPDPERDVFIDPWGKGSALFAVDGAMTYHPGDR NTKFGYDKASGEEAHADMEMLETVLATRMRGGIGETMRQLGPDYRYPPDKVWGVTPIVARAF TDRVKADMSKPADLDKLAVPPDCATPSSAEPPVTNERLMQPLRREIHATRVARMIGAHSVDT MTDAAQRIVEVASDLRGYPVQPHPLQAKKDAEDITAAERRRARRAALGKDTPPEPQT

• Arabidopsis thaliana CPK5 (At4g35310)

<u>Γονίδιο</u>

atgggcaattcttgccgtggatctttcaaggacaaactcgacgaaggcgataacaataagcctgaagattactctaaaacctctaccaccaacttgtcttctaattccgaccattcaccgaacgctgcagacatcatt gctcaagaattctccaaagacaacaacagcaacaacagcaaagatccagctcttgttattccttta agagaaccaatcatgaggcgtaacccagacaatcaagcttactatgttcttggtcataagacaccaaac attcgtgatatctatacccttagccgcaagctaggtcaaggtcaatttggaacgacttatctatgtaca gagattgcctcaggcgttgactacgcttgtaagtcaatatccaagaggaagttgatctctaaagaagatgttgaggatgttagaagggagattcagataatgcatcatttagctggtcacggtagtatcgtgacgatt aaaggagcttatgaggactctttgtatgttcacattgttatggagctttgtgctggaggtgaattgttt gataggattattcagagaggacattatagtgagaggaaagctgctgagctgactaagatcattgtcggt gttgttgaagcgtgtcattcgcttggtgtgatgcatagagacttgaagcctgagaatttcttattggtt aataaggatgatgatttctctctcaaggctattgattttgggctatctgtctttttcaaaccaggtcaa atattcactgatgttgttggaagtccatattatgttgctcctgaggttttgctcaaacgttatgggcctgaagctgatgtgggactgctggtgttatattgtatattgctaagcggagtcccacctttctgggcagaaacacagcaagggatatttgatgctgtgttgaaaggatatatcgactttgagtcagacccgtggcct gtgatatccgacagtgctaaagacttgatccgcagaatgttatcctccaagcctgcagaacgtttgaccgctcatgaagtcttgcgtcatccatggatctgtgagaatggtgttgcaccagatagagcactagatcca $\verb|gctgttctttctcgtctcaagcaattctctgcaatgaataaactaaagaagatggctttgaaggttata||$ $\verb|gctgagagtctctcggaagaagagatagctggtttaagagaaatgtttcaagcaatggatactgataac||$ agcggggcaatcacatttgatgaactcaaagctgggctgagaaaatatggatctaccttgaaagacaca gagatccatgatcttatggatgcggctgatgtagacaacagtggggacaatagattacagtgagttcatt gcagcgacgatccatctcaacaaactagagcgggaagagcatcttgttgcagcgtttcaatattttgacaaagatggaagcggtttcataacaattgatgagctacaacaagcgtgtgttgaacatggcatggctgat gtggagatgatgcaaaagggaaatgctggtgttggaagaaggacgatgagaaatagtctaaacattagc atgagagacgcgtag

<u>Πρωτεΐνη (556 αμινοξέα) – 62127 Da</u>

MGNSCRGSFKDKLDEGDNNKPEDYSKTSTTNLSSNSDHSPNAADIIAQEFSKDNNSNNNSKD PALVIPLREPIMRRNPDNQAYYVLGHKTPNIRDIYTLSRKLGQGQFGTTYLCTEIASGVDYA CKSISKRKLISKEDVEDVRREIQIMHHLAGHGSIVTIKGAYEDSLYVHIVMELCAGGELFDR IIQRGHYSERKAAELTKIIVGVVEACHSLGVMHRDLKPENFLLVNKDDDFSLKAIDFGLSVF FKPGQIFTDVVGSPYYVAPEVLLKRYGPEADVWTAGVILYILLSGVPPFWAETQQGIFDAVL KGYIDFESDPWPVISDSAKDLIRRMLSSKPAERLTAHEVLRHPWICENGVAPDRALDPAVLS RLKQFSAMNKLKKMALKVIAESLSEEEIAGLREMFQAMDTDNSGAITFDELKAGLRKYGSTL KDTEIHDLMDAADVDNSGTIDYSEFIAATIHLNKLEREEHLVAAFQYFDKDGSGFITIDELQ QACVEHGMADVFLEDIIKEVDQNNDGKIDYGEFVEMMQKGNAGVGRRTMRNSLNISMRDA

2.1.7 Αντίδραση λιγάσης

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας, οι πλασμιδιακοί φορείς και τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR έπρεπε να επεξεργαστούν με κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα ώστε είτε να δημιουργηθούν συμπληρωματικά άκρα. Ο φορέας που επιλέχθηκε για την έκφραση και απομόνωση των βακτηριακών τελεστών ήταν το πλασμίδιο pET26b(+), το όποιο προσφέρει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη (Εικόνα 2.1). Οι εκκινητές για τα προς μελέτη γονίδια σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο, ώστε να προστεθούν στο καρβοξυτελικό άκρο των εκφραζόμενων πρωτεϊνών τα έξι μόρια ίστιδίνης που υπάρχουν στον φορέα έκφρασης, ώστε να μπορέσει να απομονωθεί η πρωτεΐνη με χρωματογραφία συγγένειας. Για τον σκοπό αυτό τόσο τα προϊόντα της PCR, όσο και ο συγκεκριμένος φορέας επεξεργάστηκαν ταυτόχρονα με τα περιοριστικά ένζυμα NdeI και XhoI (NEB, Hertfordshire, UK). Το τελικό μείγμα της αντίδρασης αποτελούταν από: NdeI (400 U/ml), XhoI (400 U/ml), ρυθμιστικό διάλυμα Cutsmart και 1 μg DNA, σε τελικό όγκο 50 μl στους 37°C. Στη συνέχεια, κατάλληλη ποσότητα¹, κατεργασμένων με περιοριστικά ένζυμα, μορίων πλασμιδιακού φορέα και της αλληλουχίας ενθέματος προστίθενται, μαζί με ρυθμιστικό διάλυμα Τ4 DNA λιγάσης και Τ4 λιγάσης σε τελικό όγκο 20 μl.

¹Η αναλογία της ποσότητας των μορίων του πλασμιδιακού φορέα και της εισδοχής, υπολογίστηκε με βάση των παρακάτω τύπο:

Μοριακή αναλογία = Μέγεθος φορέα (Kb)*Ποσότητα εισδοχής (ng)/Μέγεθος εισδοχής (Kb)* Ποσότητα φορέα (ng)



Εικόνα 2.1 Απεικόνιση πλασμιδιακού φορέα pET26b(+) από το πρόγραμμα SnapGene.

2.1.8 Κλωνοποίηση χωρίς λιγάση (Ligation Independent Cloning, LIC)

Ο φορέας που επιλέχθηκε για την κλωνοποίηση των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών του φυτού-ξενιστή ήταν ο πλασμιδιακός φορέας LIC1.10 (Εικόνα 2.2), ο οποίος μας δόθηκε από το Ινστιτούτο Καρκίνου της Ολλανδίας. Ο συγκεκριμένος φορέας προσφέρει την αμινοτελική προσθήκη του μορίου 6xHis:SUMO3, το οποίο αποτελείται από έξι μόρια ιστιδίνης, ώστε να μπορέσει να απομονωθεί η εκφρασμένη πρωτεΐνη με χρωματογραφία συγγένειας, αλλά και την πρωτεΐνη SUMO3, η οποία βοηθάει στη διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Η τελευταία αναγνωρίζεται από την πρωτεάση SENP2, και μπορεί να απομακρυνθεί στο στάδιο της διαπίδυσης. Πραγματοποιείται πέψη του πλασμιδιακού φορέα με το περιοριστικό ένζυμο KpnI (EnzyQuest) σε αντίδραση: 1 μl KpnI (10 U/ml), 5 μl ρυθμιστικό διάλυμα EQ 10x και 1μg DNA σε τελικό όγκο 50 μl στους 37°C. Ακολουθεί η αντίδραση T4 εξωνουκλεάσης (25 min στους 22°C και στη συνέχεια 20 min στους 75°C για την απενεργοποίηση του ενζύμου), σε δύο διαφορετικά μείγματα αντιδράσεων για τον πλασμιδιακό φορέα και το επεξεργασμένο προϊόν PCR. Επεξεργασμένος πλασμιδιακός φορέας τελικής συγκέντρωσης 0,1 pmol προστίθεται σε μείγμα αντίδρασης 1 μl NEB ρυθμιστικού διαλύματος 2 (Blue), 1 μl 25 mM dTTP, 1ml 50 mM DTT, 1 μl 1 1mg/ml BSA και 0,5 μl T4 DNA πολυμεράση σε τελικό όγκο 10 μl. Το ίδιο μείγμα αντίδρασης δημιουργείται και για το προς μελέτη γονίδιο με αντικατάσταση του dTTP με dATP.

Η τελική αντίδραση εισαγωγής του γονιδίου στον πλασμιδιακό φορέα γίνεται με τα εξής στάδια; Ανάμειξη του επεξεργασμένου φορέα και γονιδίου σε αναλογία 1:2 και επωάζουμε το μείγμα για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Αφού προσθέσουμε 2 μl EDTA συγκέντρωσης 50 mM επωάζουμε την αντίδραση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Τόσο η τελική αντίδραση, όσο και τα επεξεργασμένα πλασμίδια και γονίδια της επιλογής μας, αποθηκεύονται στους -20°C.



Εικόνα 2.2 Απεικόνιση πλασμιδιακού φορέα LIC 1.10 από το πρόγραμμα SnapGene.

2.1.9 Προετοιμασία χημικά δεκτικών κυττάρων: μέθοδος χλωριούχου ρουβιδίου (RbCl)

Τα στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli* που επιλέχθηκαν στην παρούσα εργασία είναι το BL21 (DE3) για τους τελεστές των παθογόνων και το RosettaBlue (DE3) για

τις ευκαρυωτικές πρωτεΐνες του φυτού ξενιστή. Το χρωμοσωμικό αντίγραφο του γονιδίου της T7 RNA πολυμεράσης, το οποίο υποδηλώνεται με τον χαρακτηρισμό και τον δύο πλασμιδιακών φορέων ως <<DE3>>, τους καθιστά κατάλληλους ως προς την παραγωγή πρωτεϊνών ύστερα από επαγωγή με IPTG, ενώ συγκεκριμένα ο φορέας RosettaBlue είναι κατάλληλος για την έκφραση ευκαρυωτικών πρωτεϊνών, καθώς παρέχει τα tRNAs: AGG, AGA, AUA, CUA, CCC και GGA, τα οποία δεν συναντώνται σε προκαρυωτκούς οργανισμούς (Lipinszki et al., 2018). Η προετοιμασία των χημικά δεκτικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε στα εξής στάδια: 2 ml από καλλιέργεια, η οποία έχει επωαστεί στους 37°C για 16 h, εμβολιάζονται σε 200 ml αποστειρωμένου θρεπτικού LB και επωάζονται στους 37°C εκ νέου έως η οπτική πυκνότητα $(OD_{600}) = 0.6$. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στους 4°C και 2.500 rpm. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και επαναδιαλύεται η πελέτα στ TFB1¹ διάλυμα. Αφού επωαστούν τα κύτταρα για 30 min στους 4°C, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στους 4°C και 2.000 rpm. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 2 ml TFB2², ενώ στη συνέγεια μοιράζονται σε τελικό όγκο 100 μl και αποθηκεύονται στους -80°C.

¹TFB1:

- 30 mM CH₃COOK
- 100 mM RbCl
- $50 \text{ mM MnCl}_2*4\text{H}_2\text{O}$
- 10 mM CaCl₂
- 15% γλυκερόλη

²TFB2:

- 10 mM MOPS
- 75 mM CaCl₂*2H2O
- 10 mM RbCl
- 15% γλυκερόλη

2.1.10 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E. coli

Σε 100 μl όγκο ειδικά προετοιμασμένων κυττάρων (βλέπε παραπάνω) προστέθηκαν 10-50 ng πλασμιδιακού διαλύματος και επωάστηκαν στον πάγο για 30 min. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υπέστησαν θερμικό σοκ στους 42°C για 45 sec και επέστρεψαν στον πάγο για 1 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 1.000 ml LB και τα κύτταρα επωάστηκαν στους 37°C με ανακίνηση στις 200 rpm για 60 min. 200 ml κυτταρικού διαλύματος τοποθετήθηκαν στη συνέχεια σε τρυβλία LB-agar που περιείχαν το κατάλληλο αντιβιοτικό και επωάστηκαν στους 37°C για 16 h.

2.2 Μέθοδοι έκφρασης και απομόνωσης/καθαρισμού πρωτεϊνών

2.2.1 Έκφραση πρωτεϊνών

2.2.1.1 *E.coli*

Η ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών στον μικροοργανισμό *E. coli* εξαρτάται από την ουσία ισοπροπυλ β-d-1-θειογαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG) για όλους τους φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Για τις αρχικές δοκιμές έκφρασης, 10 ml κυτταρικής καλλιέργειας αναπτύχθηκαν σε LB με το κατάλληλο αντιβιοτικό στους 37°C, με ανάδευση στις 200 rpm έως ότου το OD₆₀₀ φθάσει το 0,6-0,8, οπότε και μεταφέρθηκαν σε αναδευτήρα σε κατάλληλη θερμοκρασία και προστέθηκε IPTG σε κατάλληλη συγκέντρωση για την εκάστοτε απομόνωση των πρωτεϊνών (βλέπε Κεφάλαιο 3.1). Για τον έλεγχο έκφρασης, τα κύτταρα επωάστηκαν για διαφορετικές ώρες επώασης (4 h και 16 h) και σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας (16, 10, 28 και 37°C), όπου στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε 6.000 rpm για 20 min και μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης¹ και λύθηκαν με υπερήχους, 14 κύκλους των 30 sec ο καθένας με διαστήματα ψύξης 30 sec και συχνότητα 500 παλμών. (Bioblock, Scientific vibracell 600 W). Για την αξιολόγηση της παραγωγής πρωτεϊνών ελήφθησαν διαλυτά και αδιάλυτα κλάσματα.

Για μεγάλη κλίμακα έκφρασης, 10 ml καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε, η οποία προηγουμένως είχε επωαστεί στους 37°C για 16 h, εμβολιάστηκε σε 2 ή 4 L διαλύματος LB και κατάλληλου αντιβιοτικού. Στη συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν σε 6.000 rpm για 20 min και μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, διαλύθηκαν με το κατάλληλο ανά πρωτεΐνη ρυθμιστικό διάλυμα λύσης 50 ml ανά 1L καλλιέργειας κυττάρων (όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Αποτελέσματα) με τους κατάλληλους αναστολείς πρωτεασών² και λύθηκαν με

51

υπερήχους. Για την απομάκρυνση αδιάλυτων υπολειμμάτων τα λυμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν σε 12.500 rpm για 45 min.

¹Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης

- 25 mM Tris pH.8
- 200 mM NaCl
- 10 mM β-μερκαπαιθανόλη

²Αναστολείς πρωτεασών

- 0,5 mg/ml Φαινυλο-μεθανο-σουλφονυλο-φθορίδιο, PMSF (αναστολέας πρωτεασών σερίνης)
- 0,2 mg/ml Benzamidine (αναστολέας τρυψίνης)
- 1 μg/ml Leupeptin (αναστολέας πρωτεασών κυστεΐνης)

2.2.1.2. Κύτταρα εντόμων

Για τον μετασχηματισμός κυττάρων εντόμων (Spodoptera frugiperda) σειράς sf9 και sf21 μέσω μόλυνσης τους με βακουλοϊό, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος EMBACY, το οποίο φέρει το τεχνητό χρωμόσωμα του βακουλοϊού (Bacmid). Το τελευταίο φέρει την κίτρινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (YFP) υπό τον ίδιο υποκινητή με το γονίδιοένθεμα, γεγονός που βοηθάει στον έλεγχο της έκφρασης της πρωτεΐνης. Ο μετασχηματισμός των βακτηριακών κυττάρων αρχικά πραγματοποιήθηκε με ειδικούς πλασμιδιακούς φορείς τύπου pFastbac και η επιλογή των μετασχηματισμένων φορέων με το προς μελέτη γονίδιο έγινε λόγω της ύπαρξης του γονιδίου της βγαλακτοσιδάσης. Το τελικώς μετασχηματισμένο τεχνητό χρωμόσωμα, είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας της μετάθεσης (transposition). Οι διαδικασίες μετασχηματισμού του φορέα και των κυττάρων, όπως επίσης και της απομόνωσης των μετασχηματισμένων φορέων περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2.1.

Η μόλυνση των κυττάρων των εντόμων με το Bacmid γίνεται στα εξής στάδια. Σε ειδικό πιάτο επίστρωσης (plate), προστέθηκαν 2 ml σε κάθε εισδοχή (wells) τελικής συγκέντρωσης 0,5*10⁶ και ακολούθησε επώαση για 30 min στους 27 °C. Προσθέτουμε 10 μl του μετασχηματισμένου Bacmid σε 200 μl θρεπτικού μέσου SF900II σε plate 48 εισδοχών και στη συνέχεια προστέθηκαν 5 μl Cellfectin, το οποίο είναι ένα κατιονικό-λιπιδικό σκεύασμα σχεδιασμένο για την βέλτιστη επιμόλυνση κυττάρων εντόμων. Στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό διάλυμα από τα κύτταρα, και επαναδιαλύεται το μείγμα της μόλυνσης με 1 ml θρεπτικό μέσο. Το επαναδιαλυμένο μείγμα μεταφέρεται στα κύτταρα. Μετά από πέντε ώρες επώαση στους 27°C, απομακρύνεται το θρεπτικό διάλυμα και προστίθεται 3 ml νέου θρεπτικού μέσου στο οποίο έχουν προστεθεί τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Η καλλιέργεια επωάζεται για 5 μέρες και στη συνέχεια αποθηκεύεται αποτελώντας τον ιό P0.

Για την παραγωγή του ιού P1, 1 ml του διαλύματος που περιέχει τον ιό P0 προστίθεται σε καλλιέργεια κυττάρων συγκέντρωσης $1*10^6$ κύτταρα/ml σε φλάσκα Erlenmeyer. Ο έλεγχος του πολλαπλασιασμού του ιού γίνεται: α) μέσω της παρατήρησης της έκφρασης της YFP, β) λόγω της διακοπής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (τα υγιή έχουν χρόνο διπλασιασμού 24 hrs) ή γ) λόγω της διαμέτρου των κυττάρων (τα υγιή έχουν διάμετρο 15 – 16.6 μm, ενώ τα μολυσμένα 19 -21 μm) (CASY cell counter).

Η παραγωγή πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με μεταφορά 1 ml ιού P1 καλλιέργεια κυττάρων εντόμων συγκέντρωσης 1*10⁶ κύτταρα/ml. Τα κύτταρα συλλέγονται μόλις παρατηρηθεί η διακοπή του πολλαπλασιασμού. Η συλλογή και ο καθαρισμός των κυττάρων πραγματοποιείται με την ίδια μέθοδο όπως και τα βακτηριακά κύτταρα.

2.2.2 Εκχύλιση πρωτεϊνών από φύλλα φυτικών οργανισμών

Τα φύλλα τόσο από φυτά αγρίου τύπου, όσο και από διαγονιδιακά φυτά Arabidopsis, τα οποία εκφράζουν τον τελεστή XopP, αφαιρέθηκαν και λειοτριβήθηκαν σε υγρό άζωτο. Οι πρωτεΐνες εκχυλίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα GTEN (10% γλυκερίνη, 25 mM Tris-Cl pH 7,5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) συμπληρωμένο με φρέσκο 5 mM DTT, κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών (Sigma, P9599) και 0,15% v/v NP-40. Μετά από φυγοκέντρηση 10 λεπτών στους 4°C στα 14.000 x g, το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε καθαρό σωλήνα μικροφυγοκέντρησης.

2.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακριλαμιδίου (SDS-PAGE)

Για τη μέθοδο χρειάζονται δύο πηκτώματα, το πήκτωμα επιστοίβαξης¹ και διαχωρισμού². Στο πήκτωμα επιστοίβαξης οι πρωτεΐνες συμπυκνώνονται και συσσωρεύονται σε σημεία μεγάλης συγκέντρωσης και στου διαχωρισμού

διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους βάρος. Στην παρούσα εργασία όλα τα πηκτώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 10% λόγω του μεγέθους των πρωτεϊνών.

Το υπό μελέτη πρωτεϊνικό διάλυμα αναμειγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος³ και τοποθετούνται στους 100°C για 5 min και στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 11.000 rpm για 30 sec. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ειδική συσκευή της εταιρίας Biorad και συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα (Electron buffer)³. Στη συνέχεια το πήκτωμα βάφεται με Coomasie Blue R250⁴ (staining solution) για 20 min και αποχρωματίζεται με διάλυμα αποχρωματισμού (destain solution)⁵.

¹πήκτωμα επιστοίβαξης:

- 17ml Ακρυλαμίδιο 30%
- 12.5ml 1M Tris-HCl (pH 6.8)
- 1ml 10% SDS
- 68ml ddH₂0
- 0.1ml TEMED (*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethylethylene-diamine, Biorad)
- 1ml 10% APS

²πήκτωμα διαχωρισμού:

- 33.3ml Ακρυλαμίδιο 30%
- 25.0ml 1.5M Tris-HCl (pH 8.9)
- 1.0ml 10% SDS
- 39.6ml ddH2O
- 0.08ml TEMED (*N*,*N*,*N*',*N*'-tetramethylethylene-diamine, Biorad)
- 1ml 10% APS

³Electron buffer

- 30g Tris
- 10g SDS
- 144g γλυκίνη

⁴Staining solution

- 100 ml CH₃COOH
- 500 ml μεθανόλη
- 2,5g Coomasie Blue R250
- Τελικός όγκος 1 L

⁵de-staining solution

- 200 ml μεθανόλη
- 100 ml CH₃COOH
- 300 ml H₂O

2.2.4 Καθαρισμός/Απομόνωση με χρωματογραφία συγγένειας στήλης νικελίου

Ο καθαρισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας στήλης νικελίου (Ni-NTA). Το νιτριλοοξικό οξύ (Nitriloacetic acid, NTA) είναι ένας χηλικός παράγοντας που σχηματίζει ενώσεις με ιόντα μετάλλων, από τα οποία το νικέλιο χρησιμοποιείται συχνότερα. Το σύμπλοκο που προκύπτει αλληλεπιδρά με τις ιστιδίνες λόγω της εγγενούς ικανότητας των ομάδων ιμιδαζολίου να σχηματίζουν χηλικές ενώσεις με το νιτριλοοξικό νικέλιο. Ο συνολικός όγκος του υπερκειμένου, ύστερα από την απομάκρυνση των αδιάλυτων υπολειμμάτων (βλέπε 2.2.1), προστίθεται σε στήλη Ni-NTA (Qiagen) για την πρόσδεση των πρωτεϊνών. Προκειμένου να γίνει η έκλουση της πρωτεΐνης, παρασκευάζονται διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου κρατώντας την σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος σταθερή. Πιο αναλυτικά, στα ρυθμιστικά διαλύματα πλύσης (Wash buffers), η συγκέντρωση του ιμιδαζολίου είναι από 10 mM έως 30 mM, το οποίο δεν είναι ικανό να αντικαταστήσει τα έξι μόρια ιστιδίνης που φέρουν οι πρωτεΐνες αλλά, αντικαθιστά πρωτεΐνες που έχουν συνδεθεί με πιο ασταθή χαρακτήρα. Στη συνέχεια, τα ρυθμιστικά διαλύματα έκλουσης (Elution buffers) έχουν συγκέντρωση ιμιδαζολίου από 100 mM έως 300 mM, όπου οι πρωτεΐνη του ενδιαφέροντος αντικαταστείται και συλλέγεται σε κλάσματα. Πρέπει να σημειωθεί πως το κάθε ρυθμιστικό διάλυμα συλλέγεται σε ξεχωριστό κλάσμα, τα οποία ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα ακριλαμιδίου, και επιλέγονται αυτά τα οποία περιέχουν την πρωτεΐνη χωρίς επιπλέον προσμίξεις.

2.2.5 Μέθοδος διαπίδυσης

Για την απομάκρυνση του ιμιδαζολίου, χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες διαπίδυσης της εταιρίας SpectrumLabs, οι οποίες έχουν διαχωριστική ικανότητα μοριακού βάρους 6-8 kDa. Τα πρωτεϊνικά κλάσματα που επιλέγονται ύστερα από τη χρωματογραφία συγγένειας τοποθετούνται στη μεμβράνη και στη συνέχεια προστίθενται σε 2 L ρυθμιστικού διαλύματος λύσης στους 4°C για 16 h. Στην περίπτωση των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών Exo70B1 και CPK5, στο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης προστίθεται επιπλέον 8 pmol πρωτεάσης SENP2 (βλέπε 2.1.8). Στη συγκεκριμένη περίπτωση ακολούθησε εκ νέου απομόνωση της πρωτεΐνης με στήλη νικελίου, διότι δεδομένου ότι τα έξι μόρια ιστιδίνης αποκόπτονται μαζί με της SUMO3 από το τελικό πρωτεϊνικό μας μόριο, η πρωτεΐνη συλλέγεται στα ρυθμιστικά διαλύματα πλύσης και όχι έκλουσης.

2.2.6 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Το περιεχόμενο των μεμβρανών μεταφέρεται σε σωλήνες συγκέντρωσης τύπου Amicon Ultracel 300, με διακριτική ικανότητα μοριακού βάρους 30 kDA και φυγοκεντρείται σε 4.000 rpm για 15 min, μέχρι να συμπυκνωθεί σε τελικό όγκο 2 ml. Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή ΑΚΤΑpurifier 10, για την περαιτέρω απομόνωση των πρωτεϊνών και τον διαγωρισμό τους από τυχαίες μολύνσεις που φέρουν κατά τη διάρκεια λύσης των κυττάρων. Οι στήλες που χρησιμοποίθηκαν επί το πλήστον ήταν HiPrep Sephacryl S-200 16/60 prepact G Healthcare (Πανεπιστήμιο Κρήτης) και Superdex 200, Pharmacia Biotech (Ινστιτούτο Καρκίνου Ολλανδίας). Ο προσροφητής, που πακετάρεται μέσα σε ειδική γυάλινη στήλη, αποτελείται από μικροσκοπικά σφαιρίδια πολυμερών υλικών (κυτταρίνη, αγαρόζη/σεφαρόζη). Οι διαφορετικοί πρωτεϊνικοί πληθυσμοί που υπάρχουν στα διαλύματα εκλούονται ανάλογα με το μοριακό τους βάρος όσο διαπερνούν τις στήλες, με τα μεγαλύτερα μοριακά βάρη να εκλούονται νωρίτερα. Τα κλάσματα αναλύονται με πήκτωμα ακριλαμιδίου και ακολουθεί συμπύκνωση τους και αποθήκευση του τελικού πρωτεϊνικού διαλύματος στους -80°C, αφού μεταφερθεί προηγουμένως σε υγρό άζωτο (fast freeze).

2.3 Βιοφυσικές αναλύσεις ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

2.3.1 Μέθοδος ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western immunoblot)

Τα πρωτεϊνικά μόρια, τα οποία αναλύθηκαν με πηκτώματα SDS-PAGE μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες διφθοριούχου πολυβινυλίδιου (PVDF) (Bio-Rad). Όπως έχει προαναφερθεί οι πρωτεΐνες φέρουν έξι μόρια ιστιδίνης, οπότε η ανίχνευση τους έγινε με anti-His (Qiagen) ως πρώτο αντίσωμα, ενώ η εμφάνιση των πρωτεϊνών στην μεμβράνη πραγματοποιήθηκε με το υπόστρωμα 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)/nitro blue tetrazolium (NBT) της MERCK, το οποίο παράγει ένα μπλε χρώμα, το οποίο μπορεί να παρατηρηθεί οπτικά, είναι πολύ σταθερό και δεν ξεθωριάζει στην έκθεση του φωτός.

2.3.2 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης

Το πρωτεϊνικό τμήμα XopP (100-733 αμινοξέων) καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας His-tag. Τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης, απουσία β-μερκαπτοαιθανόλης για 16 h. Η πηκτωματοειδής μορφή που προέκυψε, εναποτέθηκε σε καλυμμένο γυαλί και αφέθηκε να στεγνώσει για 16 h. Στη συνέχεια, το δείγμα καλύφθηκε με σφαιρίδια 10 nm Au/Pd και παρατηρήθηκε με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης JEOL JEM-2100 στα 20 kV.

2.3.3 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης

Από το πρωτεϊνικό τμήμα XopP 100-733 αμινοξέων, 5 μl εναποτέθηκαν σε πλέγμα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας με επικάλυψη φορμαρίνης/άνθρακα για 2 min. Αφού απομακρύνθηκε η περίσσεια με διηθητικό χαρτί, χρησιμοποιήθηκε οξικό ουρανύλιο 2% w/v προκειμένου το δείγμα να χρωματιστεί, για 2 min. Οι παρατηρήσεις πραγματοποιήθηκαν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης JEOL JEM-2100 στα 80 kV.

2.3.4 Φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης (DSF) ανεξαρτήτου χρώσης πρωτεϊνών (nanoDSF)

Η μέθοδος nanoDSF (Prometheus NT.48, 2 bind molecular interactions) χρησιμοποιείται για την ανάλυση της σταθερότητας, τη θερμική αναδίπλωση των πρωτεϊνών και την ανάλυση της θερμοκρασίας τήξης των πρωτεϊνών (Senisterra, Chau and Vedadi, 2012). Γενικά, ο εγγενής φθορισμός της τρυπτοφάνης και τυροσύνης των πρωτεϊνών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την τρισδιάστατη δομή. Με τη χρήση χημικών αποδιατακτικών παραγόντων ή με την αύξηση της θερμοκρασίας, οι πρωτεΐνες μπορούν να χάσουν την τριτοταγή δομή τους, γεγονός που οδηγεί σε αλλαγές στον εγγενή φθορισμό της τρυπτοφάνης και τυροσύνης. Αυτό μεταφράζεται σε μετατοπίσεις της κορυφής εκπομπής φθορισμού και αλλαγές στην ένταση. Με την μέθοδο αυτή παρακολουθούνται οι αλλαγές φθορισμού με υψηλή χρονική ανάλυση και μπορεί να αποκαλύψει ακόμη και πολλαπλές μεταβάσεις της αλλαγής στη δομή των πρωτεϊνικών μορίων (Εικόνα 2.3). Οι πρωτεΐνες ΧορΡ και Εχο70B1 τοποθετήθηκαν σε κατάλληλα δοχεία (cappilaries), είτε απομονωμένες ή σε σύμπλοκο, τελικής συγκέντρωσης 0,5 mg/ml, όπου και μετρήθηκε η σκέδαση των αμινοξέων της τρυπτοφάνης και τυροσύνης κατά την θερμική αποδιάταξη τους



temperature or concentration of denaturant

Εικόνα 2.3 Βασικές αρχές πίσω από τη θερμική αναδίπλωση των πρωτεϊνών: Η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί ξεδίπλωμα της τρισδιάστατης πρωτεϊνικής δομής και έτσι τα κατάλοιπα τρυπτοφάνης και τυροσύνης εκτίθενται στον διαλύτη.

2.3.5 Κυκλικός διχρωισμός

Ο κυκλικός διχρωισμός (CD) είναι μια εξαιρετική μέθοδος για την ταχεία αξιολόγηση της δευτεροταγούς δομής, της αναδίπλωσης και των ιδιοτήτων πρόσδεσης των πρωτεϊνών (Gazi and Kokkinidis, 2021). Ενώ το διάνυσμα του ηλεκτρικού πεδίου ταλαντώνεται μόνο σε ένα επίπεδο για το γραμμικά πολωμένο φως, για το κυκλικά πολωμένο φως η διεύθυνση του διανύσματος του ηλεκτρικού πεδίου περιστρέφεται γύρω από τη διεύθυνση διάδοσής του, ενώ το διάνυσμα διατηρεί σταθερό μέγεθος (Εικόνα 2.4):

$\Delta A = AL - AR$

Οι πρωτεΐνες που περιέχουν επί το πλείστον α-έλικες έχουν αρνητικές ζώνες στα 222 nm και στα 208 nm και μία θετική ζώνη στα 194 nm. Οι πρωτεΐνες με καλά καθορισμένες αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες έχουν αρνητικές ζώνες στα 218 nm και θετικές ζώνες στα 195 nm (Arnittali *et al.*, 2021).



Εικόνα 2.4 Διανύσματα ηλεκτρικού πεδίου για γραμμικά και κυκλικά πολωμένο φως (https://en.wikipedia.org/wiki/Circular_dichroism).

Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού συλλέχθηκαν σε φασματοπολαρίμετρο J815 (Jasco Corp.). Τα δείγματα των πρωτεϊνών XopP και Exo70B1 που χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις ήταν συγκέντρωσης της τάξης των 0,5 mg/ml. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα πάχους 1 mm για την καταγραφή φάσματος κυκλικού διχρωισμού σε θερμοκρασίες 10-90°C και σε μήκη κύματος 190-250 nm.

2.4 Τεχνικές δομικής βιολογίας

2.4.1 Σκέδαση ακτινών-Χ σε μικρές γωνίες (Small-angle X-ray scattering, SAXS)

Η σκέδαση ακτινών-Χ μικρής γωνίας (SAXS) είναι μια τεχνική σκέδασης με την οποία μπορούν να ποσοτικοποιηθούν οι διαφορές πυκνότητας σε πολύ μικρή κλίμακα σε ένα δείγμα. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να προσδιορίσει κατανομές μεγέθους νανοσωματιδίων και να επιλύσει το μέγεθος και το σχήμα (μονοδιάσπαρτων) μακρομορίων (Sztucki and Narayanan, 2007). Αυτό επιτυγχάνεται με την ανάλυση της ελαστικής συμπεριφοράς σκέδασης των ακτινών Χ κατά τη διέλευσή τους μέσα από το υλικό, καταγράφοντας τη σκέδαση τους (συνήθως 0,1 - 10°). Ανήκει στην οικογένεια των τεχνικών σκέδασης μικρής γωνίας (SAS) και πραγματοποιείται συνήθως με ακτίνες Χ μήκους κύματος 0,07 - 0,2 nm. Ανάλογα με το γωνιακό εύρος στο οποίο μπορεί να καταγραφεί ένα σαφές σήμα σκέδασης, η τεχνική SAXS είναι ικανή να παρέχει δομικές πληροφορίες για διαστάσεις μεταξύ 1 και 100 nm, και για επαναλαμβανόμενες αποστάσεις σε μερικώς διατεταγμένα συστήματα έως και 150 nm (Pedersen, 1997). Τα πειράματα SAXS της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο <<European Molecular Biology Laboratory>> (EMBL). Περιγραφή πειραματικής διάταξης σκέδασης από διάλυμα στην Εικόνα 2.5.



Εικόνα 2.5 Σχηματική αναπαράσταση μιας πειραματικής διάταξης σκέδασης από διάλυμα, τα οποία περιλαμβάνουν διαφορετικές μετρήσεις για το πρωτεϊνικό διάλυμα και τον διαλύτη. Θεωρώντας πως ο διαλύτης είναι ένα ομοιογενές υπόστρωμα με σταθερή πυκνότητα $ρ_s$, η διαφορά στο πλάτος σκέδασης σε ένα σωματίδιο σε σύγκριση με τον διαλύτη, καθορίζεται από τον μετασχηματισμό Fourier του επιπροσθέτου μήκους σκέδασης: $\Delta p(r) = p(r)-p_s$: $F(s) = [\Delta p(r)exp(isr)dr- όπου η ολοκλήρωση εκτελείται σε όλο τον όγκο του σωματίδιο. Σε ένα πείραμα σκέδασης η καταγραφόμενη ποσότητα είναι της έντασης <math>I(s) = F(s)F^*(s)$ και όχι το πλάτος F(s). Όπου $F^*(s)$ ο συζυγής μιγαδικός του F(s) (Kikhney and Svergun, 2015).

2.4.2 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών και πειράματα σάρωσης συνθηκών

Η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X είναι η επιστήμη η οποία προσπαθεί να προσδιορίσει την ατομική και μοριακή δομή ενός κρυστάλλου, του οποίου η κρυσταλλική δομή είναι ικανή να προκαλέσει την διάθλαση των ακτινών X σε συγκεκριμένες κατευθύνσεις. Μετρώντας τις γωνίες και τις εντάσεις των περιθλάσεων, έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία μιας τρισδιάστατης απεικόνισης της έντασης των ηλεκτρονίων μέσα στον κρύσταλλο. Χρησιμοποιώντας την απεικόνιση αυτή, μπορεί να υπολογιστεί η θέση των ατόμων μέσα στον κρύσταλλο, όπως επίσης και οι χημικοί δεσμοί μεταξύ τους, με τελικό αποτέλεσμα ολόκληρη την δομή των μορίων, από τα οποία αποτελείται ο κρύσταλλος.

Η δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης εξαρτάται από πολλούς παραμέτρους:

Ιοντικής ισχύ: Διαλύματα που έχουν διαλυτά ιόντα δεν συμπεριφέρονται ως ιδανικά διαλύματα, εκτός και αν υπάρχουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Καθώς η συγκέντρωση των ιόντων αυξάνεται στο διάλυμα ένα νοητό ''νέφος'' αντίθετων φορτισμένων ιόντων τείνει να δημιουργηθεί γύρω από ένα ιόν. Αυτό το ''νέφος'' τροποποιεί την αλληλεπίδραση με τα μόρια του νερού και κατά συνέπεια τη διαλυτότητα του ιόντος. Η αύξηση της διαλυτότητας για τα περισσότερα ιόντα σε χαμηλή ιοντική ισχύ παρατηρείται και στην περίπτωση των πρωτεϊνών, οι οποίες είναι πιο διαλυτές σε διάλυμα με χαμηλή ιοντική ισχύ παρά στο νερό. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται εναλάτωση (salting-in). Κατά την αύξηση της ιοντικής ισχύς, τα επιπρόσθετα ιόντα ανταγωνίζονται μεταξύ τους καθώς και με τον διαλύτη για τα μόρια νερού. Η απομάκρυνση μορίων νερού σε αυτήν την περίπτωση μειώνει την διαλυτότητα. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται εξαλάτωση (salting-out). Και τα δύο φαινόμενα χρησιμοποιούνται για την επίτευξη της κρυστάλλωσης (Neagu and Neagu, 2001).

<u>pH</u>: Η επίδραση του pH είναι εξίσου σημαντική στην διαλυτότητα του βιομορίου. Όταν η τιμή του pH εξισώνεται με την του pI της πρωτεΐνης, το συνολικό φορτίο της πρωτεΐνης έχει μηδενική τιμή.

<u>Θερμοκρασία</u>: Σε υψηλή ιοντική ισχύ οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι λιγότερο διαλυτές στην θερμοκρασία των 25°C παρά στην θερμοκρασία των 4°C. Σε αντίθεση σε χαμηλή ιοντική ισχύ η διαλυτότητα αυξάνει με την άνοδο της θερμοκρασίας.

<u>Οργανικοί διαλύτες</u>: Τα μικτά διαλύματα ύδατος και οργανικών ουσιών παρουσιάζουν μικρότερη διηλεκτρική σταθερά σε σύγκριση με τα αμιγή υδατικά διαλύματα. Η μείωση της σταθεράς αυτής αυξάνει την ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ των αντίθετων φορτίων των πρωτεϊνών και μειώνει την διαλυτότητα. Οι οργανικοί διαλύτες μπορούν να μειώσουν τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης μέσω εκτόπισης δεσμευμένων μορίων νερού (Blow, 1977).

62

Οι παραπάνω παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την μείωση της διαλυτότητας της πρωτεΐνης ώστε το διάλυμα να κορεστεί η να υπερκορεστεί. Ένα υπέρκορο διάλυμα είναι θερμοδυναμικά ασταθές. Η εξισορρόπηση του τελευταίου μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό τακτικά διευθετημένων συναθροίσεων των μορίων της πρωτεΐνης (πυρήνες κρυστάλλωσης), ενώ αν ο υπερκορεσμός είναι αρκετά υψηλός η πρωτεΐνη κατακρημνίζεται σαν άμορφο ίζημα (Εικόνα 2.6) (Chernov, 2003). Η διαδικασία αυτή αποτελεί περιοριστικό βήμα στην κινητική της κρυστάλλωσης καθώς απαιτεί την περισσότερη ενέργεια. Για να ξεπεραστεί ο ενεργειακός φραγμός μπορούμε να αυξήσουμε την ενέργεια στο σύστημα μέσω αύξησης του υπερκορεσμού του διαλύματος ή να την μειώσουμε παρέχοντας προϋπάρχοντες κρυστάλλους, όπως στη διαδικασία σποράς (seeding) (Mcpherson, 2014).

Επιπλέον, συνθήκες κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ρομποτική τεχνολογία (Douglas Instruments), για την αποφυγή λαθών τεχνικής φύσεως.



Εικόνα 2.6 Διάγραμμα φάσης μιας πρωτεΐνης με μεταβλητές την συγκέντρωση της στο διάλυμα και συγκέντρωση ενός ηλεκτρολύτη. Όλοι οι άλλοι παράγοντες παραμένουν σταθεροί. Ζώνη πυρήνωσης είναι η περιοχή διαλυτότητας όπου δημιουργούνται οι κρύσταλλοι. Μετασταθερή ζώνη ονομάζεται η κατάσταση στην οποία δεν δημιουργούνται επιπλέον κρύσταλλοι, αλλά οι ήδη σχηματισμένοι μπορούν και αναπτύσσονται.

Στην παρούσα εργασία οι μέθοδοι κρυστάλλωσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι μέθοδοι διάχυσης ατμών της καθιστής και της κρεμαστής σταγόνας (Εικόνα 2.7). Για τον αρχικό έλεγχο της κρυστάλλωσης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα διαλύματα που διατίθενται στο εμπόριο. Πιο αναλυτικά Grid ScreenTM PEG 6000,

Grid ScreenTM MPD, Grid ScreenTM Ammonium sulfate (Hampton Research), Structure Screen 1 - 2, PACT premierTM, JCSG-plus (Molecular Dimensions).

Και οι δύο τεχνικές λαβαίνουν χώρα σε πλαστικά πιάτα Limbro τα οποία καλύπτονται με κατάλληλες σιλικοναρισμένες καλυπτρίδες με μήκος πλευρών 22 x 22 mm. Τα αποτελέσματα των κρυσταλλώσεων εξετάζονταν σε 2 ημέρες, 1 εβδομάδα, 2 μήνες, 6 μήνες, 1 χρόνο με στερεοσκόπιο (Παράρτημα Α.).



Εικόνα 2.7 Μέθοδοι διάχυσης ατμών Α. Κρεμαστή σταγόνα, Β Καθιστή σταγόνα

2.5 Τεχνικές χαρακτηρισμού ενζυμικής λειτουργίας πρωτεϊνών

2.5.1 In vitro πειραματική δοκιμασία κινάσης

Για τα *in vitro* πειράματα φωσφορυλίωσης της Exo70B1 από την κινάση CPK5 ή από τον τελεστή XopP, ίσοι όγκοι από προηγουμένως απομονωμένες πρωτεΐνες προστέθηκαν στο τελικό μείγμα της αντίδρασης, στο οποίο μεταφέρθηκαν 6 μl από το διάλυμα αντίδρασης (60 mM MgCl₂, 60 mM CaCl₂, 6 mM ATP). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 25°C και 250 rpm για 30 min. Στη συνέχεια η αντίδραση αναλύθηκε με SDS-PAGE. Τα πεπτίδια, τα οποία περιέχουν τα φωσφορυλιωμένα αμινοξέα, ανιχνεύθηκαν και αναλύθηκαν με την μέθοδο της φασματομετρίας μάζας (Liu *et al.*, 2017).

2.5.2 In vitro πειραματική δοκιμασία πρωτεόλυσης

Η καθαρισμένη πρωτεΐνη Exo70B1 επωάστηκε με τον απομονωμένο τελεστή RipE1 σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης (25 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl), για 3 h σε θερμοκρασία δωματίου. Για τη δοκιμασία αναστολής του τελεστή RipE1, ο τελευταίος επωάστηκε με 100 μM λευπεπτίνης, είναι αναστολέας πρωτεασών κυστεΐνης, πριν από τη δοκιμασία πρωτεόλυσης, σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h πριν από την προσθήκη του υποστρώματος. Στη συνέχεια η αντίδραση αναλύθηκε με SDS-PAGE. Η ανίχνευση του πρωτεϊνικού τμήματος έγινε πρωτίστως με Western blot, για τον λόγο αυτό δεν είχε απομακρυνθεί το πρωτεϊνικό τμήμα 6xHis:SUMO3, ενώ η ανίχνευση των πεπτιδίων, οποία πραγματοποιήθηκε με φασμαμετρία μάζας, εφαρμόστηκε έπειτα της απομάκρυνσης των έξι μορίων ιστιδίνης και της πρωτεΐνης SUMO3, όπως περιγράφεται στα κεφάλαια 2.2.3 και 2.2.4.

2.5.3 Φασματομετρία μάζας (Mass spectrometry, MS)

Η φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του λόγου μάζας προς το φορτίο των ιόντων. Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται ευρέως όχι μόνο για τον εντοπισμό πεπτιδίων πρωτεϊνών που βρίσκονται στο προς μελέτη διάλυμα, αλλά και για τον προσδιορισμό των μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων που ενδέχεται να υπάρχουν σε αυτά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως φάσμα μάζας, το οποίο είναι ένα διάγραμμα της έντασης ως συνάρτηση του λόγου μάζας προς φορτίο. Η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται σε πολλούς διαφορετικούς τομείς και εφαρμόζεται τόσο σε καθαρά δείγματα όσο και σε σύνθετα μείγματα. Στην παρούσα εργασία ο τύπος της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε, ήταν η υγρή χρωματογραφία με διαδοχικές φασματομετρίες μαζών μικρής κλίμακας (nanoscale Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry, nanoLC-MS/MS) (Gaspari and Cuda, 2011).

Το πήκτωμα SDS, στο οποίο είχαν διαχωριστεί οι πρωτεΐνες προηγουμένως, επεξεργάστηκε με ρυθμιστικό διάλυμα Staining <<Blue Silver>>. Το πήκτωμα επωάστηκε για 1 hr σε ρυθμιστικό διάλυμα σταθεροποίησης (Fixation Solution, 30% Μεθανόλη και 10% Οξικό οξύ) και ακολούθησε καθαρισμός με υπερκάθαρο νερό. Στη συνέχεια το πήκτωμα επωάστηκε για 16 hr σε Staining Solution (0,12%

65

χρωστική, 10% θειικό αμμώνιο, 10% φωσφορικό οξύ και 20% μεθανόλη). Ο αποχρωματισμός του διαλύματος πραγματοποιήθηκε με υπερκάθαρο νερό.

Οι πρωτεϊνικές ζώνες που περιείχαν τις προς μελέτη πρωτεΐνες, αποκόπηκαν και επεξεργάστηκαν με τρυψίνη. Πιο αναλυτικά, τα κομμάτια του πηκτώματος καλυφθήκαν επαρκώς με ακετονιτρίλιο (DestSol) και πραγματοποιήθηκε επώαση για 15 min υπό ανάδευση. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύματος, και ακολουθεί προσθήκη 100 μl 50 mM διττανθρακικό αμμώνιο (ABS) και επώαση για 15 min υπό ανάδευση. Τα παραπάνω βήματα επαναλήφθηκαν δύο φορές ακόμα. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε το διάλυμα και τα κομμάτια του πηκτώματος καλύφθηκαν με 100 μl 50 mM διθειοθρεϊτόλη (DTT) και επωάστηκαν για 45 min σε 56°C. Ύστερα της αφαίρεσης του τελευταίου, μεταφέρθηκαν στα κομμάτια του πηκτώματος 100 μl 55 mM ιωδοακεταμίδιο (IAA) και ακολούθησε επώαση για 45 min στους 20°C. Τα κομμάτια του πηκτώματος καθαρίστηκαν με DestSol/ABS, όπως περιγράφεται παραπάνω και έγινε μεταφορά 25 μl τρυψίνης (20 μg διαλύματος τρυψίνης, Promega, σε 50 mM DestSol) στα κομμάτια του πηκτώματος, τα οποία και επωάστηκαν για 16 hr στους 37°C. Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε νέα μικροσωληνάρια συλλογής, και προστέθηκαν 50 μl υπερκάθαρου νερού. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε στα νέα μικροσωληνάρια ύστερα από ανάδευση για 20 min σε 20°C, και τα κομμάτια του πηκτώματος καλύφθηκαν με 50 μl DestSol. Ακολούθησε επώαση υπό ανάδευση για 20 min στους 20°C, μεταφορά του DestSol στα νέα μικροσωληνάρια συλλογής και μεταφορά 50 μl 0,1% τριφθοροξικό οξύ (διαλυμένο σε DestSol). Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε στα νέα μικροσωληνάρια συλλογής, και το συνολικό διάλυμα τοποθετήθηκε σε υγρό άζωτο. Παραγωγή πρωτεϊνικού προϊόντος σε μορφή ξηρής σκόνης, υπό συνθήκες κενού.

Η ανάλυση nanoLC-MS/MS πραγματοποιήθηκε σε σύστημα EASY-NanoLC II (Thermo Scientific) συνδεδεμένο με ένα LTQ-Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific) μέσω μιας πηγής ιόντων ESI (Thermo Scientific). Τα δεδομένα αποκτήθηκαν με το λογισμικό Xcalibur (LTQ Tune 2.5.5 sp1, Thermo Scientific). Πριν από την ανάλυση, το φασματόμετρο μάζας βαθμονομήθηκε με ένα πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης θετικών ιόντων ESI με καφεΐνη (Sigma), οξικό οξικό άλας L-μεθειονυλο-αργινιόληςφαινυλαλανυλαλανίνης H₂O (MRFA, Research Plus, Barnegat, NJ) και υπερφθοροαλκυλοτριαζίνη (Ultramark 1621, Alfa Aesar, Ward Hill, MA). Τα δείγματα ανασυγκροτήθηκαν σε μυρμηκικό οξύ 0,5% και το μείγμα των τρυπτικών
πεπτιδίων διαχωρίστηκε σε στήλη αντίστροφης φάσης (Reprosil Pur C18 AQ, μέγεθος σωματιδίων = 3 μm, μέγεθος πόρων = 120 Å). Ο ρυθμός ροής της nanoLC ήταν 300 nl*min-1. Η κινητή φάση LC αποτελούνταν από 0,5% μυρμηκικό οξύ σε νερό (A) και 0,5% μυρμηκικό οξύ σε ακετονιτρίλιο (B). Χρησιμοποιήθηκε διαβάθμιση πολλαπλών βημάτων, από 5% έως 30% για 120 λεπτά, έως 90% για 10 λεπτά. Αφού η κλίση παρέμεινε στο 90% για 5 λεπτά, η κινητή φάση εξισορροπήθηκε εκ νέου στις αρχικές συνθήκες της κλίσης. Το MS λειτούργησε με τάση ψεκασμού 2.300 V, τάση τριχοειδούς 35 V, τάση φακού σωλήνα 140 V και θερμοκρασία τριχοειδούς 180 °C.

Τα ακατέργαστα δεδομένα MS φορτώθηκαν στο Proteome Discoverer 2.2.0 (Thermo Scientific) και εκτελέστηκαν με τη χρήση των αλγορίθμων αναζήτησης Mascot 2.3.02 (Matrix Science, London, UK) και Sequest HT (Thermo Scientific) έναντι της αλληλουχίας Exo70B1 (NM 125229.4). Στη βάση δεδομένων συμπεριλήφθηκε κατάλογος κοινών επιμολυντών. Για την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες παράμετροι αναζήτησης: ανοχή σφάλματος πρόδρομου (precursor error tolerance) = 10 ppm, ανοχή ιόντος θραύσματος (fragment ion tolerance) = 0,8 Da, πλήρης εξειδίκευση τρυψίνης, μέγιστος αριθμός μη εξειδικευμένης πρωτεόλυσης = 3 και ως σταθερές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις: αλκυλίωση κυστεΐνης, οξείδωση μεθειονίνης, ακετυλίωση Ν-τελικού. Για την διερεύνηση των φωσφορυλιώσεων ελέγχθηκαν τα αμινοξέα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης. Για τον υπολογισμό του ποσοστού ψευδούς ανακάλυψης πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα αναζήτηση σε "ψευδή" βάση δεδομένων (decoy database) με αυστηρά κριτήρια 0,01 και χαλαρά κριτήρια 0,05 (Taus et al., 2011).

2.6 Προγράμματα βιοπληροφορικής ανάλυσης

Οι τρισδιάστατες δομές όλων των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη υπολογίστηκαν *in silico* με τη χρήση του προγράμματος τεχνητής νοημοσύνης (AI) AlphaFold Colab ή με την πλήρη έκδοση του AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2022), το οποίο έχει εγκατασταθεί σε διακομιστές στο Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε). Στη συνέχεια, η *in silico* υπολογισμένη δομή

συγκρίθηκε με τις λυμένες δομές της Τράπεζας Πρωτεϊνικών Δεδομένων (Protein Data Bank, PDB) ('Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data wwPDB consortium', 2019) μέσω του διαδικτυακού διακομιστή DALI (Holm, 2020). Η οπτικοποίηση των πρωτεϊνικών δομών πραγματοποιήθηκε με το PyMOL ('The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.).

3. Αποτελέσματα

Η αλληλεπίδραση μεταξύ του τελεστή ΧορΡ του βακτηριακού παθογόνου Xanthomonas campestris pv. campestris και της πρωτεϊνικής υπομονάδας του συμπλόκου εξωκύττωσης Exo70B1 του φυτού μοντέλου Arabidopsis thalina, ήταν ικανή να διαταράξει το σχηματισμό του υποσυμπλόκου-ΙΙ και ως εκ τούτου την τελική συναρμολόγηση του συμπλόκου της εξωκύττωσης (Michalopoulou et al., 2022). Αυτή η λειτουργική διαταραχή της εξωκύττωσης, οδηγεί στην απορρύθμιση μιας ποικιλίας αποκρίσεων που σχετίζονται με το PTI, όπως: η εξωκυτταρική εναπόθεση καλλόζης, η μη σωστή έκκριση του PRR υποδοχέα άμυνας FLS2 στην κυτταρική μεμβράνη και της πρωτεΐνης PR1. Επιπλέον, η έλλειψη ικανότητας αλληλεπίδρασης των υπομονάδων της εξωκύττωης Exo70B1 και Exo84B, οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα των πρωτεΐνών αυτών (Michalopoulou et al., 2022). Τέλος, ο τελεστής ΧορΡ μπορεί να τροποποιήσει τις αποκρίσεις PTI του ξενιστή και ταυτόχρονα να μην επάγει την εξαρτώμενη από την TN2 ανοσολογική απόκριση, δηλαδή την αντίδραση υπερευαισθησίας (Zhao et al., 2015; Liu et al., 2017).

Επιπλέον, η αλληλεπίδραση του τελεστή RipE1 του βακτηριακού παθογόνου *Ralstonia solanacearum* με την ίδια υπομονάδα Exo70B1, του συμπλόκου εξωκύττωσης του φυτού μοντέλου *Arabidopsis thaliana*, επαληθεύτηκε με ακριβώς τις ίδιες επιπτώσεις στους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή, πυροδοτώντας όμως, σε αντίθεση με τον τελετή XopP, την αντίδραση υπερευαισθησίας στον ξενιστή. Η εύρεση φυτικού οργανισμού του γένους *Nicotiana*, οδήγησε σε περαιτέρω διερεύνηση του συγκεκριμένου τελεστή *in planta* (Tsakiri *et al.*, 2022).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, διερευνήθηκαν περαιτέρω οι βιοφυσικές και βιοχημικές ιδιότητες της αλληλεπίδρασης XopP-Exo70B1, καθώς και οι λειτουργίες των τελεστών XopP και RipE1 στον πρωτεϊνικό τους στόχο.

70

3.1 Έκφραση και καθαρισμός των πρωτεΐνών *Xcc*XopP, *At*Exo70B1, *At*CPK5 και *Rs*RipE1.

3.1.1.1 Ετερόλογη έκφραση και βελτιστοποίηση έκφρασης του τελεστή ΧορΡ

Η έκφραση και καθαρισμός μιας πρωτεΐνης επηρεάζεται από έναν αριθμό παραγόντων όπως η θερμοκρασία, ο χρόνος επώασης καθώς επίσης και η συγκέντρωση IPTG. Για τον λόγο αυτό, και προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η έκφραση του τελεστή XopP ώστε να αποφευχθεί η ποσότητα της πρωτεΐνης που χάνεται στο μη διαλυτό κομμάτι του διαλύματος κατά τη λύση των κυττάρων, διαφορετικές τιμές στους παραπάνω παράγοντες δοκιμάστηκαν κατά την επαγωγή της πρωτεΐνης.

Συγκεκριμένα όσον αναφορά τη θερμοκρασία, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές 16°C, 25°C και 37°C, ενώ η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε στις 4 hrs, όπως επίσης και ύστερα από 16 hrs για τον έλεγχο της έκφρασης του XopP (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Επίπτωση των διαφορετικών τιμών των παραγόντων θερμοκρασίας και χρόνου επώασης στην έκφραση του τελεστή XopP (82199 Da).

Όπως παρατηρήθηκε (εικόνα 3.1), ο ενισχυτής του πλασμιδιακού φορέα pET26b, ο οποίος φέρει το γονίδιο του τελεστή, φέρεται ως ''leaky'', δηλαδή παρατηρήθηκε έκφραση και στην περίπτωση που δεν προστέθηκε IPTG για την επαγωγή του XopP. Διαπιστώσαμε ότι το φαινόμενο αυτό έχει αναφερθεί προγενέστερα στην

βιβλιογραφία (Schuster and Reisch, 2022). Επιπλέον και παρόλο που η παραγωγή του XopP παρατηρήθηκε να είναι σε μεγαλύτερη ποσότητα στους 37°C, επιλέχθηκε η θερμοκρασία 16°C, διότι το σαφώς μεγαλύτερο ποσοστό των παραγόμενων πρωτεϊνών που ανακτήθηκαν κατά τη λύση των κυττάρων, θα δυσκόλευαν την απομόνωση του τελεστή κατά τα μετέπειτα στάδια του καθαρισμού του.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίπτωση της συγκέντρωσης του IPTG στην έκφραση του XopP (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2. Επίπτωση των διαφορετικών τιμών των παραγόντων θερμοκρασίας και χρόνου επώασης στην έκφραση του τελεστή XopP (82199 Da). Συγκέντρωση IPTG σε mM.

Οι τιμές της θερμοκρασίας ανάπτυξης των υγρών καλλιεργειών για τον προσδιορισμό της επίδρασης της συγκέντρωσης του IPTG στην έκφραση του XopP ήταν 16°C και 20°C. Παρατηρήθηκε πως ο παράγοντα του IPTG επηρέασε όχι μόνο την έκφραση του XopP, αλλά και του συνόλου των πρωτεϊνών που εκφράστηκαν και ανακτήθηκαν κατά τη λύση των κυττάρων. Παίρνοντας υπόψιν τα παραπάνω και για να αποφευχθούν τυχαίες προσμίξεις, οι οποίες εξαρτώνται από τη συνολική έκφραση πρωτεϊνών, οι συνθήκες που τελικά επιλέχθηκαν για την έκφραση του τελεστή XopP είναι:

- Θερμοκρασία: 16°C
- Συγκέντρωση IPTG: 0,5 mM
- Χρόνος επώασης: 16 hrs

Τέλος, προκειμένου να αυξηθεί η ποσότητα της πρωτεΐνης η οποία θα υποβληθεί σε μετέπειτα στάδια του καθαρισμού, δοκιμάστηκε μία ποικιλία ρυθμιστικών διαλυμάτων, κατά τα οποία πραγματοποιήθηκε η λύση του συνόλου των βακτηριακών κυττάρων των υγρών καλλιεργειών, ώστε να διαπιστωθεί σε ποιο διάλυμα ο XopP βρίσκεται σε μεγαλύτερη διαλυτή ποσότητα (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3. Επίδραση των διαφορετικών διαλυμάτων στη διαλυτότητα του τελεστή XopP (82199 Da). (1) 20 mM Tris, 100 mM NaCl, (2) 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 5% γλυκερόλη. (3) 20 mM Tris, 100 mM NaCl + 0,5% Triton X-100, (4) 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 8 M ουρία. Υ: υπερκείμενο, Π: πελέτα.

Ανεξάρτητα του διαλύματος κατά τη λύση των κυττάρων, η μεγαλύτερη ποσότητα του τελεστή XopP, βρίσκεται σε μη διαλυτή μορφή. Το ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιείχε 8 Μ ουρίας, χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας, καθώς τα πρωτεϊνικά μόρια, στην πλειοψηφία τους, χάνουν την τριτοταγή δομή τους και βρίσκονται αποκλειστικά σε διαλυτή μορφή. Παρόλα αυτά, στα επόμενα στάδια του καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα στο οποίο είχε προστεθεί 5% γλυκερόλη, διότι η τελευταία βοηθάει στη διαλυτότητα της πρωτεΐνης σε μετέπειτα στάδια του καθαρισμού, όπως το στάδιο της διαπίδυσης, όπως επίσης και ο λόγος της ποσότητας

της πρωτεΐνης που βρίσκεται στο αδιάλυτο και στο διαλυτό τμήμα είναι πιο ικανοποιητικός.

3.1.1.2 Καθαρισμός του τελεστή ΧορΡ με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας

Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης ΧορΡ πραγματοποιήθηκε με στήλη νικελίου (χρωματογραφία συγγένειας). Το σύνολο του πρωτεΐνικού δείγματος προστέθηκε και διέτρεξε τη στήλη, όπου η εκφρασμένη πρωτεΐνη θα αλληλοεπιδρούσε με τα μόρια νικελίου και θα παρέμενε στο αδρανές υλικό εξαιτίας των έξι αμινοξέων ιστιδίνης τα οποία έχουν προστεθεί στο καρβοξυτελικό της άκρο της κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης της, ενώ το μεγαλύτερο μέρος των διαλυτών πρωτεϊνών θα διαπερνούσε τη στήλη. Στη συνέχεια η στήλη καθαρίστηκε με διαδοχικά ρυθμιστικά διαλύματα και τέλος δημιουργήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα έκλουσης αυξανόμενης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου, με σκοπό την αντικατάσταση των σηματοδοτικών μορίων ιστιδίνης πάνω στο νικέλιο. Τα πρωτεϊνικά κλάσματα που προέκυψαν, αναλύθηκαν με πήκτωμα SDS – PAGE (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4 SDS-PAGE στα πρωτεϊνικά διαλύματα που προέκυψαν από τον καθαρισμό του τελεστή XopP (82199 Da) μέσω στήλης χρωματογραφίας συγγένειας. Sa: Δείγμα, P: Πελέτα, M: Μάρτυρας, F: Flowthrough, W: Wash buffers, E: Elution buffers.

Όπως παρατηρήθηκε και στο πήκτωμα, η έκλουση του τελεστή ΧορΡ πραγματοποιείται ακόμα και στο τρίτο ρυθμιστικό διάλυμα πλυσίματος, γεγονός που υποδηλώνει ότι η σταθεροποίηση του στη στήλη δεν πραγματοποιείται αποκλειστικά από την αλληλεπίδραση της ιστιδίνης με τα μόρια νικελίου, αλλά και την μεταξύ των μορίων ΧορΡ αλληλεπίδραση, τα οποία δημιουργούν πολυμερή. Επιπλέον, σε όλα τα πρωτεϊνικά κλάσματα που έχει απομονωθεί ο ΧορΡ, παρατηρείται ότι ένα ποσοστό του αυτολύεται, όπως θα παρατηρηθεί περαιτέρω και σε άλλες τεχνικές απομόνωσης του τελεστή. Αυτό θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα της φύσης των T3SS τελεστών, το αμινοτελικό άκρο των οποίων λόγω της μη σταθερής αναδίπλωσης, χρησιμοποιείται κυρίως για την αλληλεπίδραση του τελεστή με πρωτεϊνικά μόρια οδηγούς για την μεταφορά τους μέσω του T3SS στο κύτταρο του ξενιστή, ενώ στη συνέχεια αποκόπτεται.

3.1.1.3 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης για περαιτέρω καθαρισμό του τελεστή ΧορΡ

Οι διαδικασίες κρυστάλλωσης μιας πρωτεΐνης προαπαιτούν υψηλό ποσοστό καθαρότητα της πρωτεΐνης στο πρωτεϊνικό διάλυμα. Για τον λόγο αυτό, προκειμένω να απομονωθεί/καθαριστεί περαιτέρω ο τελεστής XopP, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μοριακής διήθησης. Προηγήθηκε η απομάκρυνση του ιμιδαζολίου μέσω της διαδικασίας της διαπίδυσης και στη συνέχεια το πρωτεϊνικό διάλυμα συμπυκνώθηκε σε τελικό όγκο 2 ml. Το διάγραμμα, που προέκυψε από την διαδικασία της μοριακής διήθησής, όπως επίσης και τα πρωτεϊνικά κλάσματα τελικού όγκου 2 ml, τα οποία αναλύθηκαν με SDS-PAGE, παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.5.



Εικόνα 3.5 Χρωματόγραμμα από την διαδικασία μοριακής διήθησης του τελεστή XopP και ανάλυση των κλασμάτων, στα οποία παρουσιάζεται ο τελεστής XopP (82199 Da). S: Δείγμα, M: Μάρτυρας. Οι αριθμοί που αναγράφονται στο πήκτωμα SDS-PAGE, υποδηλώνουν τα κλάσματα έκλουσης στα οποία φαίνεται να υπάρχει η πρωτεΐνη.

Περαιτέρω ανάλυση των κορυφών που εμφανίστηκαν κατά τη συγκεκριμένη διαδικασία υποδηλώνουν τους πιθανούς πρωτεϊνικούς υπο-πληθυσμούς, που μπορεί να δημιουργεί ο τελεστής XopP. Πιο αναλυτικά, η πρώτη κορυφή (κλάσματα 14-18) ανήκει στο λεγόμενο <<κενό>> (void) της στήλης, δηλαδή περιέχει πρωτεϊνικά μόρια τα οποία ξεπερνούν την διακριτική ικανότητα της στήλης με αποτέλεσμα να μπορούν να περάσουν μέσα από αυτή. Στην αμέσως επόμενη κορυφή των κλασμάτων 19 με

23, ο τελεστής XopP παρουσιάζεται περισσότερο αποτμημέμος (εμφανίζονται περισσότερες πρωτεϊνικές ζώνες κοντά στο μέγεθος του τελεστή XopP), ενώ η φύση της κορυφής, η οποία δεν παρουσιάζεται σαν οξεία κορυφή, αλλά ως πεπλατυσμένη υποδηλώνει ότι ακόμα και σε αυτή την κορυφή δημιουργούνται περισσότεροι πρωτεϊνικοί πληθυσμοί. Η ανάλυση των κλασμάτων έκλουσης (24-29) δεν απέδειξε την ύπαρξη πρωτεϊνικών μορίων, πράγμα που μπορεί να είναι αποτέλεσμα μικρών σε μέγεθος ή σε συγκέντρωση τμήματα της πρωτεΐνης.

3.1.1.4 Το πρωτεϊνικό μόριο ΧορΡ₁₀₀ αυτό-οργανώνεται σε ινίδια

Μία από τις στρατηγικές για μία επιτυχημένη κρυστάλλωση των πρωτεϊνικών μορίων, είναι η αφαίρεση τμημάτων/αμινοξέων, στα οποία δεν παρουσιάζεται μία καθορισμένη δομική διάταξη. Όπως αναφέρεται παραπάνω, το αμινοτελικό άκρο των τελεστών δεν φέρει συγκεκριμένη δομή, ώστε να μπορέσουν να αλληλεπιδράσουν με πρωτεΐνες οδηγούς και να μεταφερθούν στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή. Για τους παραπάνω λόγους και προκειμένου να διερευνηθεί η λειτουργία του αμινοτελικού άκρου του τελεστή XopP, το πρωτεϊνικό μόριο XopP₁₀₀, το οποίο είναι ο τελεστής ΧορΡ αφού αφαιρέθηκαν από αυτό τα πρώτα 100 αμινοξέα από το αμινοτελικό του άκρο, κλωνοποιήθηκε σε φορέα pET26b(+), ώστε να μπορέσει να εκφραστεί και να απομονωθεί. Οι συνθήκες και τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό αυτού του μορίου ήταν τα ίδια με τον καθαρισμό όλου του τμήματος του τελεστή. Κατά τη διάρκεια της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού διαλύματος, αφότου είχε προηγηθεί η διαδικασία της διαπίδυσης, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός πρωτεϊνικού προϊόντος υπό μορφή πηκτώματος. Το πρωτεϊνικό προϊόν χρησιμοποιήθηκε ελέγχθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης και ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, ώστε να ταυτοποιηθεί η σύσταση του. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6, η αφαίρεση των πρώτων εκατό αμινοξέων κατέστησε ικανό τον τελεστή XopP να αυτό-οργανώνεται σε ινίδια.



Εικόνα 3.6 Το πρωτεϊνικό μόριο XopP₁₀₀ αυτό-οργανώνεται σε ινίδια. Αριστερά: Σχηματισμοί πρωτεϊνικών ινιδίων με ηλεκτρονική μικροσκοπία διάδοσης, Δεξιά: Σχηματισμοί πρωτεϊνικών ινιδίων με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης.

3.1.2.1 Ετερόλογη έκφραση της φυτική πρωτεΐνης Εχο70B1 και καθαρισμός με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας

Προκειμένου να εκφραστεί και να απομονωθεί η πρωτεΐνη Exo70B1 σε βακτηριακά κύτταρα για την επικείμενη απομόνωση της, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί πλασμιδιακοί φορείς και στελέχη του είδους *E. coli* (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7 SDS-PAGE σε στελέχη Codon+ και C43, ύστερα από 16 h επαγωγή με 0,5 mM IPTG στην έκφραση της Exo70B1 (70640 Da). Μ: Μάρτυρας, un: μη επαγόμενη.

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί η πρωτεΐνη Exo70B1 δεν μπορούσε να εκφραστεί σε κανέναν από τους φορείς (pET21b, pET26b) που χρησιμοποιήθηκαν, όπως επίσης και

σε κανένα από τα κοινά εργαστηριακά στελέχη της *E. coli*. Για τον λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας LIC1.10 σε κύτταρα *E. coli* του στελέχους «Rosetta Blue». Ο συγκεκριμένος φορέας, έχει στο αμινοτελικό του άκρο, ενδιάμεσα των έξι αμινοξέων ιστιδίνης και του εισαγόμενου γονιδίου της Exo70B1, μία γονιδιακή περιοχή, η οποία κωδικοποιεί την πρωτεΐνη SUMO3. Η τελευταία αναγνωρίζεται από την πρωτεάση SENP2 (R&D Biosystems), κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της διαπήδησης, και αφαιρείται από το τελικό μόριο. Για τον σκοπό αυτό η μέθοδος του αντίστροφου καθαρισμού απαιτείται για την απομάκρυνση της SUMO3 από το τελικό πρωτεϊνικό διάλυμα, πριν χρησιμοποιηθεί στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Εικόνα 3.9). Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν για την έκφραση της πρωτεΐνης Exo70B1, είναι (Zhang *et al.*, 2016):

- Θερμοκρασία: 20 °C
- Συγκέντρωση IPTG: 0,4 mM
- Χρόνος επώασης: 16 h

Ενώ το διάλυμα έκλουσης αποτελείται από 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 5% γλυκερόλη.



Εικόνα 3.9. Α. SDS-PAGE στα πρωτεϊνικά διαλύματα από τον καθαρισμό της πρωτεΐνης Exo70B1 (70640 Da) με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας. B. SDS-PAGE στα πρωτεϊνικά διαλύματα από την μέθοδο του αντίστροφου καθαρισμού. Sa: Δείγμα, P: Πελέτα, M: Μάρτυρας, F: Flowthrough, W: Wash buffers, E: Elution buffers.

3.1.2.2 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης για περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης Exo70B1

Η μέθοδος της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια ώστε να επιτευχθεί ένα πιο καθαρό πρωτεϊνικό διάλυμα. Σε αντίθεση με τον τελεστή XopP παρατηρήθηκαν δύο κορυφές στο διάγραμμα απορρόφησης. Τα πρωτεϊνικά διαλύματα που ανήκουν στην πρώτη κορυφή (17-20) δεν φαίνεται να περιέχουν μεγάλη ποσότητα τη πρωτεΐνης Exo70B1, σε αντίθεση με τα κλάσματα 29 έως 37, όπου εκλούεται και στο σύνολο της η Exo70B1. Δεδομένου της φύσης της δεύτερης καμπύλης, η οποία δεν είναι οξεία καμπύλη αλλά πεπλατυσμένη, συμπεραίνεται πως η Exo70B1, δημιουργεί έναν αριθμό από πρωτεϊνικούς πληθυσμούς στο δείγμα (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10 Χρωματογράφημα από την διαδικασία μοριακής διήθησης της πρωτεΐνης Εχο70B1 (70640 Da) και ανάλυση των κλασμάτων των κορυφών. Μ: Μάρτυρας. Οι αριθμοί που αναγράφονται στο πήκτωμα SDS-PAGE, υποδηλώνουν τα κλάσματα έκλουσης στα οποία φαίνεται να υπάρχει η πρωτεΐνη.

3.1.3. Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός του τελεστή RipE1

Για την έκφρασή και απομόνωση του RipE1, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα BL21 και ο πλασμιδιακός φορέας pET26b. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί και στην Εικόνες 3.11, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν μπόρεσε να απομονωθεί στο κατάλληλο βαθμό καθαρότητας, ώστε να υποβληθεί σε πειράματα δομική βιολογίας. Παρατηρούνται πρωτεϊνικές ζώνες διαφορετικών μεγεθών κατά την ανάλυση των διαλυμάτων έκλουσης μετά την χρωματογραφία συγγένειας, καθώς επίσης και στα κλάσματα που προέκυψαν από την μοριακή διήθηση. Κατά την απομόνωση του συγκεκριμένου τελεστή ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον καθαρισμό του ΧορΡ.



Εικόνα 3.11. Α. SDS-PAGE στα πρωτεϊνικά διαλύματα από τον καθαρισμό του τελεστή RipE1 με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας. Sa: Δείγμα, P: Πελέτα, M: Marker, F: Flowthrough, W: Wash buffers, E: Elution buffers. **B.** Χρωματογράφημα από την διαδικασία μοριακής διήθησης του τελεστή RipE1)62127 Da) και ανάλυση των κλασμάτων των κορυφών. Οι αριθμοί που αναγράφονται στο πήκτωμα SDS-PAGE, υποδηλώνουν τα κλάσματα έκλουσης στα οποία φαίνεται να υπάρχει η πρωτεΐνη.

3.1.4. Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός της κινάσης CPK5

Η πρωτεϊνική κινάση CPK5, αναγνωρίζει την παρεμπόδιση στη λειτουργία της Exo70B1 και την φωσφορυλιώνει, αφού πρώτα δεσμεύσει μόρια ασβεστίου. Για την έκφραση και απομόνωση της CPK5, χρησιμοποιήθηκε ο φορέας LIC 1.10, σε βακτηριακά κύτταρα Rosetta Blue. Όπως και στη περίπτωση της πρωτεΐνης Exo70B1, μετά το στάδιο της διαπίδυσης, πραγματοποιήθηκε αντίστροφος καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12 A. SDS-PAGE στα πρωτεϊνικά διαλύματα από τον καθαρισμό της πρωτεΐνης CPK5 (62127 Da) με στήλη χρωματογραφίας συγγένειας. **B.** Αντίστροφος καθαρισμός για την απομάκρυνση της πρωτεΐνης SUMO3. M: Μάρτυρας, W: Wash buffers, E: Elution buffers.

3.2 Προσδιορισμός τριτοταγής δομής μέσω πειραμάτων δομικής βιολογίας

3.2.1 Σκέδαση ακτινών σε μικρές γωνίες (SAXS) για τον τελεστή ΧορΡ

Στην Εικόνα 3.13 παρουσιάζεται η τελική καμπύλη σκέδασης του πρωτεϊνικού δείγματος που περιείχε τα κλάσματα που αντιστοιχούν στην πρώτη κορυφή του χρωματογραφήματος κατά τον καθαρισμό του τελεστή ΧοpP με τη μέθοδο της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Στο διάγραμμα εμφανίζεται ο λογάριθμος της έντασης της σκέδασης συναρτήσει του ανύσματος σκέδασης s = (4πsin2θ)/λ [1/A]. Η σύγκριση του διαγράμματος του τελεστή ΧopP με το διάγραμμα της BSA (θετικός μάρτυρας), υποδηλώνει την ύπαρξη διαφορετικών πληθυσμών του τελεστή στο πρωτεϊνικό διάλυμα, δηλαδή ο ΧopP βρίσκεται δημιουργεί συσσωματώματα.



Εικόνα 3.13. Καμπύλη σκέδασης ακτινών Χ σε μικρές γωνίες του τελεστή ΧορΡ. Μπλε: BSA, Κόκκινο: ΧορΡ.

Η συνάρτηση κατανομής αποστάσεων (pair distribution function) για τα κλάσματα των τριών κορυφών του τελεστή XopP όπως υπολογίζεται μέσω έμμεσου μετασχηματισμού Fourier, παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.14. Πιο αναλυτικά για τα κλάσματα 17 και 18 της πρώτης κορυφής, η μέγιστη διάμετρος του σωματιδίου εκτιμάται στα 260 Å, η γυροσκοπική του ακτίνα στα 69,9 Å με μέσο όρο μοριακού βάρους 242 kDA (A). Για τα πρωτεϊνικά κλάσματα 19-20 (δεύτερη κορυφή), η μέγιστη διάμετρος εκτιμάται στα 170 Å έχοντας γυροσκοπική ακτίνα 51,8 Å και μέσω όρο μοριακού βάρους 83,16 kDA (B). Τέλος, τα κλάσματα 21-23 (τρίτη κορυφή) η μέγιστη διάμετρος μορίου είναι στα 165 Å, η γυροσκοπική ακτίνα στα 43,5 Å με μέσω όρο μοριακού βάρους 37 kDA (Γ).



Εικόνα 3.14. Συνάρτηση κατανομής αποστάσεων όπως προκύπτει από τον έμμεσο μετασχηματισμό Fourier για τα πρωτεϊνικά κλάσματα: **Α.** 17-18 (πρώτη κορυφή), **Β.** 19-20 (δεύτερη κορυφή) και **Γ.** 21-23 (τρίτη κορυφή), όπως προέκυψαν από την χρωματογραφία μοριακής διήθησης.

Πληροφορία σχετικά με την σφαιρικότητα των σωματιδίων στα πρωτεϊνικά διαλύματα μπορεί να εξαχθεί παρατηρώντας το διάγραμμα Kratky, το οποίο σχεδιάζει την συνάρτηση I(s)s² έναντι του s. Στις πιο υψηλές γωνίες η ένταση της σκέδασης από ένα σφαιρικό σωματίδιο συμπεριφέρεται περίπου ανάλογα του 1/s⁴, δημιουργώντας μία κωδωνοειδή καμπύλη. Για τον λόγο αυτό, παρατηρούμε στην Εικόνα 3.15 πως, παρόλο που στα κλάσματα 17 με 18 ο τελεστής XopP φαίνεται να έχει σφαιρική μορφή, η διατήρηση του πλατό και στις μεγαλύτερες εντάσεις του s, υποδηλώνει την παρουσία μιας υπολειμματικής δομής στα σωματίδια.



Εικόνα 3.15. Διάγραμμα Kratky.Παρουσιάζονται οι πειραματικές επεξεργασμένες καμπύλες σκέδασης από τα διαλύματα κλασμάτων: XopP 17-18, XopP 19-20 και XopP 21-23.

3.2.2 Κρυστάλλωση του τελεστή ΧορΡ και της πρωτεΐνης Exo70B1

Η στρατηγική των πειραμάτων κρυστάλλωσης αναλύεται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι. Καλοσχηματισμένοι τρισδιάστατοι κρύσταλλοι παρήχθησαν σε διάστημα 1 εβδομάδας και 2 μηνών, για το τμήμα Exo70B1 (87-624 aa), όπως προέκυψε ύστερα από την αφαίρεση αμινοξέων που δεν έχουν σωστή αναδίπλωση με το υπόλοιπο πρωτεϊνικό μόριο (Zhang *et al.*, 2016), και για ολόκληρη την αμινοξική αλληλουχία του τελεστή XopP αντίστοιχα. Στην περίπτωση του τελεστή XopP, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική των καθιστών σταγόνων έναντι των κρεμαστών σταγόνων ενώ οι συνθήκες ήταν 0,2 M NaF + 0,1 M Bis Tris propane pH.7,5, 20% w/v, PEG 3350 στους 20 °C. Οι σταγόνες κρυστάλλωσης προέκυψαν ύστερα από ανάμειξη 15 μl πρωτεϊνικού διαλύματος τελικής συγκέντρωσης 4,5 mg/ml και 15 μl του διαλύματος δεξαμενής

(Εικόνα 3.16Α). Οι κρύσταλλοι, οι οποίοι παρήχθησαν για το πρωτεϊνικό τμήμα της Exo70B1, βρισκόταν στις συνθήκες 0,2 M LiSO4, Tris pH.6, 45% PEG 400 στους 20°C και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της κρεμαστής σταγόνας, η οποία αποτελούνταν από 2 μl πρωτεϊνικού διαλύματος τελικής συγκέντρωσης 3,8 mg/ml και 2 μl διαλύματος δεξαμενής (Εικόνα 3.16B).



Εικόνα 3.16. Α. Κρύσταλλοι του τελεστή ΧορΡ, **Β.** Κρύσταλλοι του πρωτεϊνικού τμήματος Exo70B1 (87-624 aa).

3.2.2.1 Συλλογή δεδομένων περίθλασης από κρυστάλλους

Κρύσταλλοι του τελεστή ΧοpP και του τμήματος της πρωτεΐνης Εxo70B1 τοποθετήθηκαν στη γραμμή ακτινοβόλησης για την συλλογή των δεδομένων περίθλασης. Η μεταφορά των κρυστάλλων γίνεται μέσω ενός βρόγχου κατάλληλου μεγέθους (cryoloop). Κάνοντας χρήση του τελευταίου και οπτικού μικροσκοπίου ο κρύσταλλος αφαιρείται από το διάλυμα της κρυστάλλωσης και τοποθετείται στη γωνιομετρική κεφαλή με μαγνητική βάση, ενώ ταυτόχρονα ψύχεται με υγρό άζωτο στους -173 °C. Τα δεδομένα καταγράφηκαν σε ανιχνευτή MARCCD (Εικόνα 3.17). Η συλλογή πραγματοποιήθηκε σε σταθερή δόση ακτινοβολίας (1300 keV) με ταυτόχρονη περιστροφή ανά 1°.

Συγκεκριμένα από το διάγραμμα περίθλασης για τον τελεστή XopP, προκύπτει το συμπέρασμα πως οι κρύσταλλοι που δημιουργήθηκαν κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης, ανήκουν στα ανόργανα συστατικά του διαλύματος δηλαδή στο φθοριούχο νάτριο (Εικόνα 3.17Α). Από την άλλη μεριά, για το τμήμα της Εxo70B1,

παρόλο που στο διάγραμμα περίθλασης φαίνεται να υπάρχουν ανακλάσεις έως την διακριτικότητα των 2 Å (μαύρες κουκκίδες), αυτές ορίζονται ως ασθενείς ανακλάσεις χωρίς συγκεκριμένο μοτίβο. Πιθανότατα προέρχονται από αλληλεπικαλυπτόμενους κρυστάλλους (Εικόνα 3.17Β). Για τους παραπάνω λόγους η περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων δεν πραγματοποιήθηκε.



Εικόνα 3.17. Α. Διάγραμμα διάθλασης από ανόργανο κρύσταλλο που προέκυψε από μεθόδους κρυστάλλωσης του τελεστή XopP, **B.** Διάγραμμα διάθλασης από το πρωτεϊνικό τμήμα Exo70B1 (87-624 aa).

3.2.3 In silico Πρόβλεψη τριτοταγής δομής πρωτεϊνών μέσω AlphaFold

Όπως μπορεί να διαπιστωθεί από τα παραπάνω πειράματα, οι προς μελέτη πρωτεΐνες XopP και Exo70B1, δεν μπόρεσαν να χαρακτηριστούν δομικά μέσω των κλασικών τεχνικών της δομικής βιολογίας. Φαίνεται να δημιουργούν πρωτεϊνικούς πληθυσμούς και συσσωματώματα, πράγμα που καθιστά την κρυστάλλωση τους αρκετά δύσκολη ως και απίθανη. Αυτό είναι ένα από τα προβλήματα των μεθόδων αυτών (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2022). Για τον λόγο αυτό και προκειμένου να συνεχιστεί η διερεύνηση τους χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα AlphaFold.

3.2.3.1 Ο τελεστής ΧοpP

Η τριτοταγής δομή του βακτηριακού τελεστή, όπως υπολογίστηκε in silico με την βοήθεια του προγράμματος AlphaFold, αποτελείται από δύο διακριτά μέρη. Το αμινοτελικό της μέρος το οποίο αποτελείται αρχικά από μία περιοχή που δεν έχει συγκεκριμένη διάταξη και ακολουθείται από έναν αριθμό α-ελίκων. Το καρβοξυτελικό της μέρος, το οποίο αποτελείται από τέσσερεις α-έλικες και μια διάταξη β-πτυχωτής επιφάνειας τεσσάρων κλώνων, ή οποία περιβάλλεται από αέλικες και βρόχους. Τα δύο διακριτά αυτά μέρη ενώνονται από μία μεγάλη από μία μεγάλη περιοχή μη καθορισμένης στερεοδιάταξης (Εικόνα 3.18).



Εικόνα 3.18. In silico υπολογισμός της τριτοταγής δομής του βακτηριακού τελεστή XopP. (Αμινοτελικό άκρο- μπλε, Καρβοξυτελικό άκρο-κόκκινο).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύγκριση της δομής του τελεστή ΧορΡ με ομόλογα, τα οποία ανήκουν σε άλλα παθογόνα. Σε όλα παρουσιάζονται τα διακριτά πρωτεϊνικά μέρη, που υπολογίστηκαν για τον τελεστή ΧορΡ, με διαφορές στους αριθμούς το αελίκων και στους κλώνους των β-πτυχωτών επιφανειών. Στην εικόνα 3.19 παρουσιάζεται αναλυτικά η υπέρθεση του τελεστή ΧορΡ με έξι ομόλογα του: Α. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* XopP-1 (XOO_3425), B. *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae XopP-2 (XOO_3426), Γ. Xanthomonas oryzae pv. oryzicola XopP-1 (XOC_1262), Δ. Xanthomonas oryzae pv. oryzicola XopP-2 (XOC_1263), Ε. Ralstonia solanacearum HLK3 (RSp0160) και ΣΤ. Acidovorax konjaci XopP (SAMN04489710_10677).



Εικόνα 3.19. Υπέρθεση της δομής του τελεστή XopP με **A**. Xanthomonas oryzae pv. oryzae XopP-1 (XOO_3425) (magenta), **B**. Xanthomonas oryzae pv. oryzae XopP-2 (XOO_3426) (magenta), **Γ**. Xanthomonas oryzae pv. oryzicola XopP-1 (XOC_1262) (magenta), **Δ**. Xanthomonas oryzae pv. oryzicola XopP-2 (XOC_1263) (magenta), **Ε**. Ralstonia solanacearum HLK3 (RSp0160) (magenta), **ΣΤ**. Acidovorax konjaci XopP (SAMN04489710_10677) (magenta). XccXopP κυανό. Αριθμοί καταχώρησης γονιδίων Uniprot σε παρένθεση. Συντηρημένη περιοχή β-πτυχωτής επιφάνειας στο πλαίσιο.

3.2.3.2 Ο τελεστής RipE1

Ο τελεστής του φυτο-παθογόνου *Ralstonia solanacearum* έχει χαρακτηρισθεί από παλαιότερες ερευνητικές μελέτες ως πρωτεάση κυστεΐνης. Για τον λόγο αυτό, δεν ήταν καθόλου παράξενο, πως και η τριτοταγής δομή του πρωτεϊνικού του μορίου ομοιάζει με την LapG πρωτεάση του μικροοργανισμού *Legionella pneumonophila*. Πιο αναλυτικά, η δομή του τελεστή RipE1, αποτελείται από: αμινοτελικά από μία

περιοχή 76 περίπου αμινοξέων χωρίς συγκεκριμένη διάταξη, στη συνέχεια από άέλικες και βρόγχους, οι οποίες διακόπτονται από μία περιοχή β-πτυχωτής επιφάνειας (Εικόνα 3.20A). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός της δημιουργίας μιας εσοχής, όπου βρίσκεται η καταλυτική τριάδα (κυστεΐνη 172-ιστιδίνη 203-ασπαρτικό οξύ 222, C-H-D), η οποία χαρακτηρίζει τις πρωτεάσες κυστεΐνης (Εικόνα 3.20B). Τέλος, πρέπει να σημειωθεί πως η υπέρθεση των RipE1 και LapG (PDB:4FGO) με RMSD (root mean square deviation) = 1,544, καταλυτικές τριάδες των δύο πρωτεϊνών βρίσκονται ακριβώς στις ίδιες αποστάσεις (Εικόνα 3.20Γ)(Παράρτημα B).



Εικόνα 3.20. Α. Παρουσίαση της πρόβλεψης της τρισδιάστατης δομής του *R.* solanacearum RipE1. Τα πρώτα 76 κατάλοιπα παρουσιάζονται χωρίς συγκεκριμένη διάταξη, **B.** Η συντηρημένη καταλυτική τριάδα (κυστεΐνη-ιστιδίνη-ασπαρτικού οξέος, C-H-D) και η θέση τους στην αμινοξική αλληλουχία, **Γ.** Υπέρθεση των ενεργών κέντρων των πρωτεϊνών LapG (κυανό) και RipE1 (magenta).

3.2.3.3 Η πρωτεΐνη Exo70B1

Η τριτοταγής δομή της Exo70B1 εμφανίζεται ως επίμηκες μόριο που περιέχει μόνο αέλικες (Εικόνα 3.21A). Στη συνέχεια, η προβλεπόμενη δομή της Exo70B1 τοποθετήθηκε σε υπέρθεση με τη γνωστή δομή της Exo70A1 (Εικόνα 3.21B και 3.21Γ). Τα αμινοτελικά άκρα των δύο πρωτεϊνών φαίνεται να διαφοροποιούνται. Τα πρώτα 93 κατάλοιπα της Exo70A1 σχηματίζουν μια ενιαία α-έλικα, ενώ τα πρώτα 54 κατάλοιπα της Exo70B1 σχηματίζουν 2 α-έλικες που συνδέονται με το υπόλοιπο μόριο με έναν σύντομο βρόχο. Η υπέρθεση μεταξύ αυτών των πρωτεϊνικών μορίων οδήγησε σε μια τιμή RMSD 1,8, με τη μεγαλύτερη απόκλιση να είναι στα αμινοτελικά και σε μια περιοχή βρόχου που φάνηκε να είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση της Exo70B1 (Εικόνα 3.21Γ).



Εικόνα 3.21. Πρόβλεψη τρισδιάστατης δομής Α. Εχο70Β1 (αμινοτελικό άκρο μπλε, καρβοξυτελικό άκρο κόκκινο), Β. Εχο70Α1 (αμινοτελικό άκρο μπλε, καρβοξυτελικό άκρο κόκκινο), Γ. Υπέρθεση μεταξύ των Εχο70Β1 (κυανό) και Εχο70Α1 (ματζέντα). Τα πλαίσια υποδεικνύουν τους βρόχους και τις παραλλαγές του αμινοτελικού άκρου μεταξύ των δύο πρωτεϊνών.

Επιπροσθέτως, υπολογίστηκε η τριτοταγής δομή του ολοκληρωμένου δολώματος Exo70-like του ανοσολογικού υποδοχέα NLR RGH2 του οργανισμού *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*, (Εικόνα 3.22A) και τοποθετήθηκε σε υπέρθεση με το Exo70B1 (Εικόνα 3.22B). Αυτό οδήγησε σε υψηλή δομική ομοιότητα μεταξύ του Exo70-like ID και του Exo70B1, με τις διαφορές να εμφανίζονται στα N-τελικά τους και στην περιοχή βρόχου, παρόμοια με τη σύγκριση των Exo70B1 και Exo70A1.



Εικόνα 3.22. Προβλέψεις πρωτεϊνικής δομής AlphaFold. **Α.** Πρόβλεψη τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης NLR RGH2 του *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* (αμινοτελικό άκρο μπλε, καρβοξυτελικό άκρο κόκκινο), **Β.** Υπέρθεση μεταξύ RGH2 (πολύχρωμη) και Exo70B1 (κυανό).

3.3 Διερευνώντας την αλληλεπίδραση του τελεστή XopP και του φυτικού πρωτεϊνικού του στόχου Exo70B1

3.3.1 Δοκιμή χρωματογραφίας μοριακής διήθησης για την *in vitro* αλληλεπίδραση XopP-Exo70B1

Για τον προσδιορισμό της αλληλεπίδρασης μεταξύ της Exo70B1 και του τελεστή XopP χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφία μοριακής διήθησης (στήλη Superdex 200, Pharmacia Biotech) στο Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου της Ολλανδίας (Netherlands Cancer Institute, NKI). Οι πρωτεΐνες XopP και η Exo70B1 χρησιμοποιήθηκαν μεμονωμένα, αλλά και αναμείχθηκαν σε τελική αναλογία συγκέντρωσης 1:1. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 25 mM Tris pH=8, 100 mM NaCl και 10 mM β-μερκαπτοαιθανόλη με ρυθμό ροής 0,5 ml/min. Όπως

φαίνεται στην Εικόνα 3.23, όταν τα πρωτεϊνικά διαλύματα συνδυάστηκαν με αναλογία συγκέντρωσης 1:1, το πρωτεϊνικό σύμπλοκο εκλούστηκε σε μικρότερους όγκους κλασμάτων, σε σύγκριση με τα δικά τους προφίλ έκλουσης. Αυτό υποδηλώνει το σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ των πρωτεϊνών.



Εικόνα 3.23. Προφίλ έκλουσης χρωματογραφίας μοριακής διήθησης για τον τελεστή XopP (μπλε), την πρωτεΐνη Exo70B1 (πορτοκαλί) και το σύμπλοκο XopP-Exo70B1 (γκρι) (Michalopoulou *et al.*, 2022)

3.3.2 Έλεγχος της θερμικής σταθερότητας των πρωτεϊνών XopP, Exo70B1 και του συμπλόκου XopP-Exo70B1 μέσω φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης

Για την περαιτέρω διερεύνηση της δυναμικής του συμπλόκου XopP-Exo70B1, χρησιμοποιήθηκε η φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης για τις δύο πρωτεΐνες ξεχωριστά, καθώς και για το σύμπλοκο τους. Οι θερμοκρασίες τήξης (TM) του τελεστή XopP και της πρωτεΐνης Exo70B1 είναι περίπου 40°C και 50°C, αντίστοιχα. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη μέθοδο, το σύμπλοκο XopP-Exo70B1 παρουσιάζει δύο διαφορετικές θερμοκρασίες τήξης, σχεδόν ταυτόσημες με αυτές των πρωτεϊνών XopP και Exo70B1, όπως επίσης και ακόμα μία στους 60°C (Εικόνα 3.24).



Εικόνα 3.24. Διαγράμματα φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης για **A.** τον τελεστή XopP, **B.** την πρωτεΐνη Εxo70B1 και **Γ.** το σύμπλοκο XopP-Exo70B1.

3.3.2 Φάσματα κυκλικού διχρωισμού για τις πρωτεΐνες XopP, Exo70B1 και του συμπλόκου XopP-Exo70B1

Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού αποκάλυψαν τα χαρακτηριστικά ελάχιστα στα 208 και 222 nm και ένα θετικό μέγιστο στα 195 nm, τα οποία είναι κοινά χαρακτηριστικά για τις πρωτεΐνες που περιέχουν α-έλικες (Εικόνα 325Α-Γ). Επιπλέον, ο λόγος θ222/θ208 προσφέρει πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με την α-ελικτικότητα των δύο πρωτεϊνών. Στην περίπτωση της Exo70B1, η τιμή του λόγου είναι μεγαλύτερη από 1 (Εικόνα 3.25Α), γεγονός που υποδηλώνει διαμόρφωση παρόμοια με <<coiled-coil>>. Όσον αφορά τον τελεστή XopP, ο λόγος είναι κάτω από 1, με αποτέλεσμα να έχουμε απομονωμένες α-έλικες (Εικόνα 3.25Β). Ένα άλλο ενδιαφέρον σημείο είναι η ύπαρξη δύο διχρωικών σημείων για το σύμπλοκο (Εικόνα 3.25Γ), σε σύγκριση με τις πρωτεΐνες XopP και Exo70B1. Λαμβάνοντας υπόψη τις πολλαπλές διαφορετικές καταστάσεις που εμφανίζονται στην περίπτωση του συμπλόκου λόγω των δύο διχρωικών σημείων, σε συνδυασμό με τη θερμική του σταθερότητα που αποκαλύπτεται από την παρουσίαση των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Εικόνα 3.26), το σύμπλοκο ΧορΡ-Εχο70B1 φαίνεται να χάνει την δομή του και να την επανακτά, καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, γεγονός που υποδηλώνει μια πολύ ισχυρή αλληλεπίδραση.



Εικόνα 3.25. Ο τελεστής ΧορΡ και η πρωτεΐνη Εχο70B1 σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με υψηλή θερμική σταθερότητα: Α. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της Εχο70B1, Β. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της ΧccXopP, Γ. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού του συμπλόκου XopP-Exo70B1. Τα βέλη υποδηλώνουν τα ισοδιχρωικά σημεία.



Εικόνα 3.26. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού του συμπλόκου XopP-Exo70B1 στην περιοχή θερμοκρασιών 10-90°C. Ο οριζόντιος άξονας δηλώνει το μήκος κύματος 190-250 nm. Υ-άξονας: μοριακή ελλειπτικότητα, Χ άξονας: μήκος κύματος 190-250 nm

3.3 Χαρακτηρισμός λειτουργίας των τελεστών XopP και RipE1 στον πρωτεϊνικό τους στόχο Exo70B1

3.3.1.1 In silico σύγκριση τριτοταγής δομής του τελεστή ΧορΡ με βάσεις δεδομένων

Η *in silico* δομή του XccXopP συγκρίθηκε με εκείνες που έχουν κατατεθεί στην βάση δεδομένων PDB (Protein Data Bank) χρησιμοποιώντας τον διακομιστή DALI. Τα πρώτα αποτελέσματα αυτής της αναζήτησης ήταν ο στόχος των θηλαστικών της ραπαμυκίνης, mTOR (PDB: 7PEA) (Yang et al., 2013) (Παράρτημα B). Η τελευταία είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης του φωσφοϊνοσιτιδίου-3. Η υπέρθεση του καρβοξυτελικού άκρου του τελεστή XopP με την περιοχή κινάσης (kinase domain, KD) της πρωτεΐνης mTOR αποκάλυψε τιμή RMSD = 2,763 (Εικόνα 3.27). Προκειμένου να διερευνηθεί η υπόθεση, αν ο τελεστής XopP έχει δραστικότητα κινάσης στην Exo70B1, σχεδιάστηκαν πειράματα για να ελεγχθεί η φωσφωρυλίωση της, τόσο μέσα στο φυτό-ξενιστή όσο και *in vitro*.



Εικόνα 3.27. Υπέρθεση μεταξύ του τελεστή XopP (πολύχρωμο) και της περιοχής KD της κινάσης mTOR των θηλαστικών (magenta).

3.3.1.2 Ανίχνευση φωσφορυλιωμένων αμινοξέων της πρωτεΐνης Exo70B1 σε διαγονιδιακά φυτά Arabidopsis thaliana

Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή επίδραση που θα μπορούσε να έχει ο τελεστής ΧορΡ στην πρωτεΐνη Εχο70Β1, λήφθηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα τόσο από φυτά αγρίου τύπου, όσο και από διαγονιδιακά φυτά Arabidopsis που εκφράζουν XopP. Η έκφραση του τελεστή XopP στο διαγονιδιακό Arabidopsis επιβεβαιώθηκε μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας σε δύο σειρές διαγονιδιακών φυτών, δεδομένου ότι η πρωτεΐνη ήταν επισημασμένη με το χρωμοφόρο mCherry (Εικόνα 3.28A). Η συγκριτική ανάλυση των δεδομένων nanoLC/MS-MS μεταξύ των φυτών αγρίου τύπου διαγονιδιακών φυτών αποκάλυψε μεγαλύτερο αριθμό και των φωσφορυλιωμένων αμινοξέων για την Exo70B1 στα διαγονιδιακά φυτά, σε σύγκριση με τα φυτά άγριου τύπου (Εικόνα 3.28Β). Στην συνέχεια οι πρωτεΐνες ΧορΡ και Exo70B1 απομονώθηκαν (Κεφάλαιο 3.1) για δοκιμές in vitro, προκειμένου να διερευνηθεί αν αυτές οι φωσφορυλιωμένες θέσεις είναι αποτέλεσμα της δραστηριότητας του τελεστή XopP ή των κινασών του φυτού-ξενιστή Arabidopsis thaliana.



Εικόνα 3.28. Φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα του Εχο70B1 από αγρίου τύπου και ΧορΡ διαγονιδιακά φυτά Arabidopsis thaliana, A. Έκφραση του τελεστή ΧορΡ σε διαγονιδιακά φυτά Arabidopsis thaliana. Το κανάλι mCherry απεικονίζεται με magenta και η χλωροφύλλη με κυανό χρώμα. Κλίμακα 50 μm, B. Οι φωσφορυλιωμένες θέσεις επισημαίνονται στην πρωτεΐνη Εχο70B1 ως κυανό (διαγονιδιακά φυτά), κίτρινο (τόσο σε άγριο τύπο όσο και σε διαγονιδιακά φυτά) και magenta (μόνο σε αγρίου τύπου).

3.3.1.3 Ο τελεστής ΧορΡ φωσφορυλιώνει in vitro την πρωτεΐνη Exo70B1

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες κινάσης *in vitro* για τη διαλεύκανση της λειτουργίας του τελεστή XopP στον πρωτεϊνικό του στόχο Exo70B1. Η ανάλυση δεδομένων nanoLC MS/MS αποκάλυψε ότι ο τελεστής XopP είναι ικανός να φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη Exo70B1. Τα φωσφορυλιωμένα αμινοξέα της πρωτεΐνης Exo70B1 ήταν τα: Ser107 (σερίνη), Ser111 (σερίνη), Ser248 (σερίνη), Ser308 (σερίνη), Thr309 (θρεονίνη) και Thr364 (θρεονίνη) (Εικόνα 3.29A-B) (Εικόνα 3.30) (Παράρτημα Γ). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα προηγούμενα *in vivo* πειράματα. Τα συγκριμένα αμινοξέα εμφανίστηκαν φωσφορυλιωμένα μόνο στα διαγονιδιακά φυτά. Η περικομμένη έκδοση της XopP 1-420, η οποία περιέχει μόνο το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, δεν ήταν ικανή να φωσφορυλιώσει την Exo70B1 σε κανένα αμινοξικό κατάλοιπο (Εικόνα 3.31), γεγονός που υποδηλώνει ότι η δραστικότητα κινάσης υπάρχει στο καρβοζυτελικό άκρο του τελεστή XopP. Τέλος, είναι πολύ ενδιαφέρον να αναφερθεί ότι τα κατάλοιπα που φωσφορυλιώνονται φαίνεται να βρίσκονται στην περιοχή της Exo70B1 που αλληλεπιδρά άμεσα με την XopP (Εικόνα 3.29Γ), όπως είχε υπολογιστεί *in silico* μέσω του AlphaFold.

А						
Πεπτίδια φωσφωρυλιωμένων				Εχο70Β1 αμινοξικά		
αμινοξέων				κατάλοιπα		
EWsPMASEKPIGICLTR				Ser107		
EWSPMAsEKPIGICLTR				Ser111		
LsIEEVHKMPWQELEDEIDR				Ser248		
GsTIQLLNFADAIAIGSR				Ser308		
GStIQLLNFADAIAIGSR				Thr309		
NEAVtIWK			Thr364			
В						
70 LERALNSIDG	80 QISRFVAADQ	90 PIWADPADSA	AF	100 LDTIDELV	110 AIIREW <mark>S</mark> PMA	120 SEKPIGICLT
130 RADDMMQQAM	140 FRIEEEFRSL	150 MERGAESFGL	NP(160 QGDAGAMN	170 HRFDSEEEED	180 DDRDFNNGDD
190 IQIPVAQPLT	200 DYDLIIDALP	210 SATINDLHEM	AKI	220 RMLGAGFG	230 KACSHVYSSC	240 RREFLEESMS
250 RLGLQKL <mark>S</mark> IE	260 EVHKMPWQEL	270 EDEIDRWIKA	AN	280 VALRILFP	290 SERRLCDRVF	300 FGFSSAADLS
310 FMEVCRG <mark>ST</mark> I	320 QLLNFADAIA	330 IGSRSPERLF	KVI	340 LDVFETMR	350 DLMPEFESVF	360 SDQFCSVLRN
370 EAV <mark>T</mark> IWKRLG	380 EAIRGIFMEL	390 ENLIRRDPAK	AA	400 VPGGGLHP	410 ITRYVMNYLR	420 AACRSRQTLE



Εικόνα 3.29. Ο τελεστής ΧορΡ φωσφορυλιώνει την Exo70B1 in vitro. Α. Κατάλογος πεπτιδίων που περιέχουν φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα, Β. θέση των φωσφορυλιωμένων καταλοίπων στην αμινοξική αλληλουχία της Exo70B1, Γ. Πρόβλεψη δομής του πρωτεϊνικού συμπλόκου XopP (magenta) - Exo70B1 (πολύχρωμη). Η περιοχή της Exo70B1 που αλληλεπιδρά με την XopP υποδεικνύεται με γκρι χρώμα.



Εικόνα 3.30. Απεικόνιση φασματομετρίας μάζας των φωσφορυλιωμένων πεπτιδίων Exo70B1 από τον τελεστή XopP. Πεπτίδια που περιέχουν τα κατάλοιπα **A.** Ser107, **B.** Ser111, **Γ.** Ser248, **Δ.** Ser308, **E.** Thr309 και **ΣΤ.** Thr364.



Εικόνα 3.31. Απεικόνιση φασματομετρίας μάζας των μη φωσφορυλιωμένων πεπτιδίων Εxo70B1 από το πρωτεϊνικό τμήμα του τελεστή XopP 1-420. Πεπτίδια που περιέχουν τα αμινοξέα, **A.** Ser107 και Ser111, **B.** Ser248, **Γ.** Ser308 καιThr309 και **Δ.** Thr364.
3.3.1.4 Ο τελεστής ΧορΡ προστατεύει την πρωτεΐνη Εxo70B1 από τη φωσφορυλίωση της CPK5

Έχει ήδη αποδειχθεί από τους Liu et. al. (2017), ότι η κινάση CPK5 φωσφορυλιώνει την Exo70B1 όταν διακόπτεται η λειτουργία της. Τα δεδομένα που προέκυψαν από τα MS/MS αποκάλυψαν ότι, η φυτική κινάση CPK5 φωσφορυλιώνει τα αμινοξικά κατάλοιπα: 19Thr (θρεονίνη), 25Ser (σερίνη), 67Ser (σερίνη), 364Thr (θρεονίνη), 582Ser (σερίνη) της πρωτεΐνης Exo70B1 (Εικόνα 3.32) (Παράρτημα Γ). Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν όταν προστέθηκαν ταυτόχρονα στο μείγμα πρωτεϊνών οι XopP, Exo70B1 και CPK5. Ωστόσο, τα σχετικά κατάλοιπα δεν φωσφορυλιώθηκαν όταν πραγματοποιήθηκε επώαση 30 λεπτών μεταξύ των πρωτεϊνών Exo70B1 και XopP πριν από την προσθήκη της κινάσης CPK5 στο μείγμα της αντίδρασης (Εικόνα 3.32A). Αυτό υποδηλώνει ότι ο τελεστής XopP διαταράσσει τη σωστή αλληλεπίδραση της κινάσης CPK5 με την πρωτεΐνη Exo70B1 και τη φωσφορυλίωσή της. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται εν μέρη σε συμφωνία με την *in silico* δομή του πρωτεΐνικού συμπλόκου Exo70B1-CPK5 για τα φωσφορυλιωμένα αμινοτελικά κατάλοιπα (Εικόνα 3.32B).



Εικόνα 3.32. Ο τελεστής ΧορΡ προστατεύει την πρωτεΐνη Εχο70B1 από τη φωσφορυλίωση της κινάσης CPK5 in vitro, **A.** Κοινά φωσφορυλιωμένα αμινοξέα από δοκιμασίες κινάσης in vitro: Τα φωσφορυλιωμένα αμινοξικά κατάλοιπα της Εχο70B1 από την CPK5 (πορτοκαλί κύκλος), από τη δοκιμασία in vitro κινάσης, είναι πανομοιότυπα όταν εκτελούμε τη δοκιμασία με CPK5-Εχο70B1-ΧορΡ χωρίς προηγούμενη επώαση (κίτρινος κύκλος). Δεν παρατηρήθηκαν φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα, όταν η Εχο70B1-ΧορΡ επωάστηκε στο πρωτεϊνικό δείγμα για 30 min (γκρι κύκλος), **B.** Πρόβλεψη δομής του πρωτεϊνικού συμπλόκου CPK5 (magenta), Εχο70B1(πολύχρωμο).

3.3.2 Ο τελεστής RipE1 έχει πρωτεολυτική δράση στον πρωτεϊνικό του στόχο Exo70B1

Για να διευρύνουμε την αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης Exo70B1 και του τελεστή RipE1, υπολογίστηκε η δομή του πρωτεϊνικού συμπλόκου *in silico* από το AlphaFold (Εικόνα 3.33A). Με βάση αυτή, η περιοχή 146-201 αμινοξέα της Exo70B1 φαίνεται να προσεγγίζει την καταλυτική τριάδα της πρωτεάσης κυστεΐνης RipE1. Η παρατήρηση αυτή, μαζί με την αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών, υποδεικνύουν ότι η Exo70B1 αποτελεί υπόστρωμα για την RipE1. Προκειμένου να ελεγχθεί η πρωτεολυτική δράση του RipE1 στην Exo70B1, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες πρωτεόλυσης *in vitro* με τις καθαρισμένες πρωτεΐνες (Εικόνα 3.33B). Η καθαρισμένη 6xHis-SUMO3-Exo70B1 επωάστηκε με την RipE1-6xHis, με και χωρίς

την προσθήκη του αναστολέα πρωτεάσης κυστεΐνης, την λευπεπτίνη. Κάθε πρωτεΐνη ενδιαφέροντος και το πρωτεΐνικό μόριο 6xHis-SUMO3 επωάστηκαν όλες ξεχωριστά, ώστε να χρησιμεύσουν ως αρνητικοί μάρτυρες για τη δοκιμασία. Η RipE1 φάνηκε να έχει αυτοπρωτεολυτική δράση σε όλες τις περιπτώσεις. Από την άλλη πλευρά, μια ζώνη που αντιπροσωπεύει τη διασπασμένη 6xHis-SUMO3-Exo70B1 ανιχνεύθηκε μόνο απουσία αυτού του αναστολέα και παρουσία RipE1 (Εικόνα 3.33B).

Πειράματα πρωτεόλυσης *in vitro* επαναλήφθηκαν, μετά την αφαίρεση του μορίου His:SUMO3 από το Exo70B1. Με βάση το μοριακό βάρος της διασπασμένης ζώνης 6xHis-SUMO3-Exo70B1 (Εικόνα 3.33B) και με το μόριο His-SUMO3 να έχει αφαιρεθεί, επιλέχθηκαν τρεις ζώνες για περαιτέρω ανάλυση μέσω φασματομετρίας μάζας, οι οποίες επισημαίνονται με τα βέλη στην Εικόνα 3.33Γ. Η ανάλυση των δεδομένων που προέκυψαν εντόπισε πεπτίδια του Exo70B1, που υπάρχουν σε αυτές τις ζώνες, όπως υποδεικνύεται από τις γκρίζες περιοχές (Εικόνα 3.33Γ). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαίωσαν ότι η πρωτεΐνη Exo70B1 διασπάται από τον τελεστή RipE1 *in vitro*, μεταξύ της συγκεκριμένης αλληλουχίας.



Εικόνα 3.33. Ο τελεστής RipE1 διασπά την πρωτεΐνη Exo70B1 μεταξύ της αλληλουχίας της. **Α.** Πρόβλεψη της αλληλεπίδρασης Exo70B1 (κυανό) - RipE1 (magenda). Η περιοχή Exo70B1 (κυανό) προσεγγίζει την καταλυτική τριάδα του RipE1 (μπλε), **B.** Western blot της δοκιμής πρωτεόλυσης *in vitro*, **Γ.** Πήκτωμα SDS-PAGE. Τα βέλη υποδεικνύουν τις ζώνες που αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας. Οι γκρίζες περιοχές δείχνουν τα πεπτίδια Exo70B1 που έχουν ταυτοποιηθεί.

4. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Το σύμπλοκο εξωκύττωσης είναι ένα συντηρημένο οκταμερές πρωτεϊνικό σύμπλοκο που ρυθμίζει τη σύνδεση των κυστιδίων έκκρισης με την κυτταρική μεμβράνη (He and Guo, 2009; Vukašinovic and Žárský, 2016; Lepore, Martínez-Núñez and Munson, 2018). Η σύντηξη των κιστιδίων στην μεμβράνη διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε μία πληθώρα κυτταρικών μηχανισμών, καθιστώντας τις πρωτεϊνικές υπομονάδες του συμπλόκου εξωκύττωσης βασικούς στόχους των τελεστών των βακτηριακών παθογόνων. (Kotsaridis et al., 2022; Michalopoulou et al., 2022; Tsakiri et al., 2022). Μία εκ των υπομονάδων του συμπλόκου εξωκύττωσης των φυτών είναι η πρωτεΐνη Εχο70Β1, η οποία ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών Exo70 (Zhao et al., 2019). Τα πρωτεϊνικά παράλογα αυτής της πρωτεϊνικής οικογένειας, έχει αποδειχθεί από διάφορες μελέτες πως είναι ικανά να ρυθμίσουν την μεταφορά των κυστιδίων στην μεμβράνη και την σύντηξη τους με συγκεκριμένους λιπιδιακούς σχηματισμούς της (Zhao et al., 2019; Viktor Žárský, Juraj Sekereš, Zdeňka Kubátová, Tamara Pečenková, 2020). Από την άλλη μεριά, τα παθογόνα χρησιμοποιούν πρωτεϊνικούς τελεστές, οι οποίοι έχουν ποικίλες λειτουργίες πάνω στους πρωτεϊνικούς τους στόχους στα κύτταρα του ξενιστή (White et al., 2009; Kirzinger, Butz and Stavrinides, 2015) και εισάγονται στα κύτταρα του ξενιστή βοηθώντας τα πρώτα να παρακάμψουν τους αμυντικούς του μηχανισμούς (Daniela, 2016).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η συγκεκριμένη εργασία παρουσιάζει, την διαφορετική δράση των τελεστών XopP και RipE1 στον πρωτεϊνικό τους στόχο Exo70B1, με την οποία τα παθογόνα Xanthomonas campestris pv. campestris και Ralstonia solanacearum, παρεμποδίζουν την δράση του συμπλόκου εξωκύττωσης. Τα συμπεράσματα των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται αναλυτικά στη συνέχεια.

4.1 Οι πρωτεΐνες XopP και Exo70B1 δημιουργούν πρωτεϊνικούς πληθυσμούς στο πρωτεϊνικό τους διάλυμα

Τόσο οι τεχνικές καθαρισμού των πρωτεϊνών XopP και Exo70B1, όσο και οι τεχνικές δομικής βιολογίας SAXS (Kikhney and Svergun, 2015) και κρυσταλλογραφίας (Thompson, Yeates and Rodriguez, 2020), έδειξαν πως οι δύο πρωτεΐνες δημιουργούν έναν αριθμό από πρωτεΐνικούς πληθυσμούς στα διαλύματα. Πιο αναλυτικά,

παρατηρήθηκε πως τόσο ο τελεστής XopP, όσο και η πρωτεΐνη Exo70B1 εκλούεται σε ένα μεγάλο εύρος κλασμάτων κατά την χρωματογραφία μοριακής διήθησης, το πρώτο εκ των οποίων (16-18) ανήκει στην μη διακριτική ικανότητα της στήλης. Αυτό δηλώνει πως και οι δύο πρωτεΐνες δημιουργούν μεγαλομοριακούς πληθυσμούς, που δεν εισάγονται στη στήλη και εκλούονται στο λεγόμενο <<void>> της στήλης. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την συνεχή πρωτεόλυση, η οποία παρατηρήθηκε από το πρώτο βήμα καθαρισμού, την χρωματογραφία συγγένειας με στήλη νικελίου, οδήγησαν στην αλλαγή στρατηγική προσέγγισης για να επιτευχθεί η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών ΧορΡ και Εχο70Β1. Μία στρατηγική της τεχνικής της κρυσταλλογραφίας είναι η αφαίρεση τμήματος των πρωτεϊνών, που έχει παρατηρηθεί ή έχει υπολογιστεί με βιοπληροφορική ανάλυση, πως δεν παίρνουν συγκεκριμένη δομική διάταξη. Όσον αναφορά για την πρωτεΐνη Εχο70B1, ακολουθήθηκε η στρατηγική με την οποία κρυσταλλώθηκε προηγουμένως το παράλογο της, η πρωτεΐνη Exo70A1 (Zhang et al., 2016). Ανάλυση του αμινοτελικού άκρου της απέδειξε πως τα πρώτα 87 αμινοξέα, σχηματίζουν την δομή 2 α-ελίκων χωρίς να αλληλεπιδρούν σταθερά με το υπόλοιπο πρωτεϊνικό τμήμα. Από τη άλλη μεριά, πολλές πρωτεΐνες τελεστές, έχει αποδειχθεί πως φέρουν στο αμινοτελικό τους άκρο μία αλληλουχία η οποία δεν παίρνει συγκεκριμένη δομή και τις βοηθάει να αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες οδηγούς για την μεταφορά τους στο εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή. Για τον λόγο αυτό αφαιρέθηκαν τα πρώτα εκατό αμινοξέα, τα οποία ανήκουν στο συγκεκριμένο τμήμα, από τον τελεστή ΧοpP και γίνανε προσπάθειες καθαρισμού του. Παρατηρήθηκε πως το συγκεκριμένο πρωτεϊνικό τμήμα αυτό-οργανώνεται σε ινίδια κατά την διάρκεια της συγκέντρωσης τους, ύστερα της μεθόδου διαπίδυσης. Αυτό ίσως είναι αποτέλεσμα της φύσης της τριτοταγής δομής των τελεστών. Πιο αναλυτικά, η διαδικασία της μεταφοράς των τελεστών από το βακτηριακό κύτταρο στα κύτταρα του ξενιστή προδιαθέτει την έλλειψη μιας ισχυρής τριτοταγής δομής, δηλαδή οι τελεστές να είναι πιο ευέλικτοι ώστε να μπορέσουν να περάσουν μέσω του εκκριτικού συστήματος 3 (LeBlanc et al., 2021). Επιπρόσθετα, ο μεγάλος αριθμός των α-ελίκων που παρουσιάζονται στην αμινοτελική περιοχή των τελεστών, οι οποίοι έχουν τα χαρακτηριστικά του τύπου <<coiled-coil>>, βοηθούν τους τελεστές να πάρουν την τελική τους μορφή αφού αλληλεπιδράσουν με τον τελικό τους στόχο (Gazi et al., 2008). Τα παραπάνω, ίσως αποτελούν τους λόγους της δημιουργίας πρωτεϊνικών πληθυσμών του τελεστή ΧορΡ και την δημιουργία ινιδίων από το πρωτεϊνικό τμήμα XopP₁₀₀. Περαιτέρω ανάλυση

με τη μέθοδο SAXS, έδειξε πως η ο τελεστής XopP δημιουργεί συσσωματώματα, καθιστώντας τον μη μονοδιάσπαρτο στο διάλυμα, δηλαδή δεν βρίσκεται σε μία μόνο κατάσταση στο διάλυμα. Επιπλέον, η μη απόκτηση πρωτεϊνικών κρυστάλλων για τις υπό μελέτη πρωτεΐνες της εργασίας, οι οποίοι να είναι κατάλληλοι για τη συλλογή περιθλάσεων, οδήγησαν στην χρήση προγραμμάτων για την πρόβλεψη της τριτοταγής δομής των πρωτεϊνικών τους μορίων.

4.2 Οι *in silico* υπολογισμένες τριτοταγείς δομές των τελεστών XopP και RipE1 υποδεικνύουν ενζυμικές λειτουργίες κινάσης και πρωτεάσης αντίστοιχα.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η πρωτεϊνική δομή της Εχο70Α1 είχε λυθεί μέσω της κρυσταλλογραφίας (Zhang et al., 2016). Επιπλέον, πρόσφατες έρευνες δημοσίευσαν την πρωτεϊνική δομή ενός επιπλέον παράλογου πρωτεϊνικού μορίου της Exo70B1, της Exo70F2 σε σύμπλοκο με τον τελεστή AVR-Pii του μυκητιακού παθογόνου Magnaporthe oryzae, που μολύνει το ρύζι (De la Concepcion et al., 2022). Οι δύο αυτές τριτοταγείς δομές δείξανε πολύ μικρή διαφοροποίηση μεταξύ τους, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από το ότι τα πρώτα αμινοξέα των πρωτεϊνών είχαν αφαιρεθεί και από τα δύο μόρια. Στην παρούσα εργασία, το λογισμικό AlphaFold χρησιμοποιήθηκε για τον in silico υπολογισμό τις τριτοταγής δομής τόσο των τελεστών, όσο και της υπομονάδας Εχο70B1 και των παραλόγων της. Η πρωτεϊνική δομή της τελευταίας, παρουσίασε μεγάλη ομολογία με το παράλογο της Εχο70Α1 (Zhang et al., 2015), με τις κύριες διαφορές να παρουσιάζονται στο αμινοτελικό τους άκρο, όπως επίσης και στο μέγεθος του βρόχου, που παρουσιάζεται ενδιάμεσα του πρωτεϊνικού τους μορίου. Δεδομένου, πως οι διαφορές αυτές δεν μπόρεσαν να υπολογιστούν από τις κλασικές μεθόδους κρυσταλλογραφίας, λόγω των δυσκολιών κρυστάλλωσης ολόκληρου του πρωτεινικού τμήματος των παραλόγων, η μεγάλη δομική ομολογία που παρουσιάζει με το Exo70-ID του NLR RGH2 (Brabham et al., 2017) συμπεριλαμβανομένου και του αμινοτελικού τμήματος της, υποδεικνύει και τον λόγο της αλληλεπίδρασης του XopP τόσο με το Exo70-ID όσο και με την Exo70B1 (Michalopoulou et al., 2022).

Όσον αφορά τον τελεστή XopP, η τριτοταγής δομή του αποκαλύπτει ότι διαθέτει μια μακρά αμινοτελική περιοχή η οποία δεν έχει συγκεκριμένη δομή. Το πρωτεϊνικό

προϊόν που έμοιαζε με πήκτωμα, το οποίο εμφανίστηκε κατά τον καθαρισμό του πρωτεϊνικού τμήματος XopP 100-733 αμινοξέων, υπέδειξε ότι η μακρά μη αναδιπλωμένη αμινοτελική περιοχή προστατεύει τον τελεστή από τη δημιουργία συσσωματωμάτων. Την τελευταία ακολουθεί μια περιοχή, η οποία περιέχει αποκλειστικά α-έλικες και διαχωρίζεται με ένα τμήμα που δεν παρουσιάζει συγκεκριμένη δομική, από το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης, το οποίο αποτελείται από έναν σχηματισμό β-πτυχωτής επιφάνειας τεσσάρων κλώνων περιβαλλόμενων από α-έλικες και βρόχους. Η σύγκριση της δομής του τελεστή ΧορΡ με παράλογα του A. Xanthomonas oryzae pv. oryzae XopP-1, Xanthomonas oryzae pv. oryzae XopP-2 (Lee et al., 2005), Xanthomonas oryzae pv. oryzicola XopP-1, Xanthomonas oryzae pv. oryzicola XopP-2 (Bogdanove et al., 2011), E. Ralstonia solanacearum HLK3 (Salanoubat et al., 2002) каз Acidovorax konjaci XopP (Baxevanis, 2000), παρουσίασε την συντήρηση των δύο διακριτών περιοχών του, με τις διαφορές να παρουσιάζονται κυρίως στο μέγεθος των περιοχών διασύνδεσής τους. Το καρβοξυτελικό άκρο του τελεστή ΧορΡ, όταν συγκρίθηκε με τις πρωτεϊνικές δομές στη βάση δεδομένων PDB, φαίνεται να έχει υψηλή δομική ομολογία με την πρωτεΐνη mTOR των θηλαστικών, μια κινάση σερίνης/θρεονίνης (Yang et al., 2013). Πρέπει να σημειωθεί πως, η ευκαρυωτική κινάση mTOR, έχει δειχθεί πως έχει ως στόχο και φωσφορυλιώνει την ευκαρυωτική υπομονάδα των θηλαστικών ExoC7 του συμπλόκου εξωκύττωσης, η οποία είναι παράλογο της φυτικής Exo70B1 (Zaman et al., 2021).

Η δομή του RipE1 που προέκυψε επιβεβαίωσε ότι έχει αναδίπλωση πρωτεάσης κυστεΐνης (Nakano and Mukaihara, 2019). Οι πρωτεάσες κυστεΐνης (θειολικές πρωτεάσες) είναι ένζυμα με την ικανότητα αποικοδόμησης πρωτεϊνών με αποπρωτονίωση μιας θειόλης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Επομένως, όλα τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας έχουν μια κοινή καταλυτική τριάδα ή δυάδα που περιλαμβάνει ένα πυρηνόφιλο κατάλοιπο κυστεΐνης (Ζ. Μ. Zhang *et al.*, 2016). Η τριτοταγής δομή του RipE1 συγκρίθηκε με δομές της Protein Data Bank μέσω του διαδικτυακού διακομιστή DALI. Η υψηλότερη ομοιότητα ήταν με την πρωτεάση LapG του μικροοργανισμού *Legionella pneumophila* (Chatterjee *et al.*, 2012). Στη συνέχεια, η υπέρθεση της περιοχής των ενεργών κέντρων μεταξύ των δύο πρωτεϊνών RMSD 1,544, ενώ η καταλυτική τριάδα κυστεΐνης-ιστιδίνης-ασπαρτικό οξύ (C-H-D) του τελεστή RipE1, συγκεκριμένα C172-H203-D222, φάνηκε να ταυτίζεται με την

καταλυτική τριάδα C137-H172-D189 της LapG. Ο RipE1 ανήκει στην οικογένεια τελεστών HopX1/AvrPphE, τα μέλη της οποίας μοιράζονται μια συντηρημένη αμινοτελική περιοχή και μια καταλυτική τριάδα με προβλεπόμενη δραστικότητα πρωτεάσης κυστεΐνης (Chini *et al.*, 2014).

4.3 Ο τελεστής ΧορΡ αλληλεπιδρά με την πρωτεϊνική υπομονάδα Exo70B1 με μεγάλη θερμική σταθερότητα *in vitro*

Η αλληλεπίδραση μεταξύ του τελεστή XopP και της πρωτεΐνης Exo70B1 παρατηρήθηκε με ένα πλήθος τεχνικών, τόσο κατά τη διάρκεια της απομόνωσης τους, όσο και με τεχνικές μελέτης των βιοφυσικών ιδιοτήτων τους.

Αρχικά, με την πραγματοποίηση της μεθόδου της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, το σύμπλοκο φαίνεται να εκλούεται νωρίτερα, συγκριτικά με όταν οι πρωτεΐνες υποβλήθηκαν στη μέθοδο ξεχωριστά. Αυτό υποδηλώνει, πως οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν στο διάλυμα *in vitro*, δημιουργώντας ένα μόριο μεγαλύτερου μεγέθους.

Στη συνέχεια ο έλεγχος της θερμικής σταθερότητας τόσο των πρωτεϊνών ανεξάρτητα όσο και του συμπλόκου που δημιουργούν μέσω φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης, είχε σαν αποτέλεσμα την παρουσία μίας μοναδικής τιμής ως θερμοκρασία τήξης για τον XopP (Tm=40°C) και για την Exo70B1 (Tm=50°C), ενώ στην περίπτωση του συμπλόκου, η τρίτη τιμή που παρουσιάστηκε ίσως αποτελεί το σημείο, όπου οι δύο πρωτεΐνες σταματάνε να αλληλεπιδρούν και το σύμπλοκο χάνει τη δομή του.

Ο κυκλικός διχρωισμός είναι μια δομική μέθοδος που χρησιμοποιεί πολωμένο φως, μετρώντας τη διαφορική απορρόφηση αριστερόστροφου και δεξιόστροφου φωτός, ανάλογα με το πρωτεϊνικό μόριο στο οποίο προσπίπτει. Τα ελάχιστα των φασμάτων του κυκλικού διχρωισμού έδειξαν ότι οι δύο πρωτεΐνες αποτελούνται από α-έλικες, σχηματίζοντας μια δομή παρόμοια με <<coiled-coil>> δομές για την πρωτεΐνη Εxo70B1. Στην περίπτωση του τελεστή XopP, τα ελάχιστα στα φάσματα του κυκλικού διχρωισμού αποκάλυψαν ότι αποτελείται από απομονωμένες α-έλικες, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με την πρόβλεψη της δομής της πρωτεΐνης μέσω του AlphaFold. Αυτό θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα του μεγάλου αριθμού α-ελίκων

που εμφανίζονται στο πρωτεϊνικό μόριο. Επιπλέον, το σύμπλοκο φαίνεται να διατηρεί το σχηματισμό του, ακόμη και στους 90°C. Η ύπαρξη ισοδιχρωικού σημείου στα φάσματα του κυκλικού διχρωισμού υποδηλώνει έναν πληθυσμό δύο καταστάσεων για ένα πρωτεϊνικό δείγμα. Η εμφάνιση δύο διχρωικών σημείων σε συνδυασμό με τη σταθερότητα του συμπλόκου σε υψηλές θερμοκρασίες υποδηλώνει ότι, το σύμπλοκο μεταβαίνει μεταξύ δύο καταστάσεων (αναδίπλωση-αποδίπλωση), καθώς οι δύο πρωτεΐνες οδηγούνται στο να χάσουν την τριτοταγή δομή τους, αλλά η ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ τους έχει ως αποτέλεσμα την διατήρηση του σχηματισμού του συμπλόκου καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία.

4.4 Ο τελεστής ΧορΡ φωσφορυλιώνει *in vivo* και *in vitro* την πρωτεΐνη Εχο70B1 ενώ την προστατεύει από την φωσφορυλίωση της κινάσης CPK5

Κατά τη διάρκεια της ζωής τους, οι φυτικοί οργανισμοί πρέπει να ρυθμίζουν τους κυτταρικούς μηχανισμούς τους, όπως η ανάπτυξη, η αναπαραγωγή, η ανοσία κ.λπ (Zulawski and Schulze, 2015). Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών είναι η πιο άφθονη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που συναντάται και έχει πολύ κρίσιμο ρόλο σε πολλές βιολογικές διαδικασίες. Καταλύεται από ειδικά ένζυμα, τα οποία ονομάζονται κινάσες και έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν φωσφορυλικές ομάδες από μόρια ATP στα αμινοξέα σερίνης, θρεονίνης και τυροσύνης των υποστρωμάτων-στόχους τους (van Wijk *et al.*, 2014). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι 940 κινάσες κωδικοποιούνται στο γονιδίωμα του *Arabidopsis thaliana* (Zulawski *et al.*, 2014). Η μεγάλη ρυθμιστική σημασία αυτών των ενζύμων οδηγεί μια ποικιλία από T3SS τελεστών να υιοθετήσουν τέτοιες λειτουργίες προκειμένου να παρεμβαίνουν στους μηγανισμούς ανάπτυξης ή ανοσίας των ξενιστών τους.

Ολικά εκχυλίσματα πρωτεϊνών τόσο από αγρίου τύπου φυτών Arabidopsis όσο και από διαγονιδιακά φυτά, τα οποία εκφράζουν τον τελεστή XopP (Michalopoulou *et al.*, 2022), αναλύθηκαν με τη μέθοδο της φασματομετρίας μάζας και ελέγχθηκαν ως προς την φωσφορυλίωση των αμινοξέων της πρωτεΐνης Exo70B1. Οι θέσεις φωσφορυλίωσης της Exo70B1 στην περίπτωση των διαγονιδιακών φυτών, ήταν πολύ περισσότερες συγκριτικά με τα φωσφορυλιωμένα αμινοξέα της υπομονάδας Exo70B1, η οποία προήλθε από φυτά αγρίου τύπου. Με βάση τη διαφορά στις θέσεις των φωσφορυλιωμένων καταλοίπων και προκειμένου να διευκρινιστεί εάν αυτές οι φωσφορυλιωμένες θέσεις είναι αποτέλεσμα της λειτουργίας του τελεστή XopP ή του μεγάλου αριθμού εγγενών κινασών, οι δύο πρωτεΐνες εκφράστηκαν και καθαρίστηκαν για *in vitro* δοκιμασίες.

Η λειτουργία του τελεστή ΧορΡ έχοντας ως υπόστρωμα πρωτεΐνη Εxo70B1 διερευνήθηκε με δοκιμασίες κινάσης *in vitro*. Αρχικά, τα κατάλοιπα Ser107, Ser111, Ser248, Ser308, Thr309 και Thr364 της πρωτεΐνης Exo70B1 φωσφορυλιώθηκαν από τον τελεστή XopP, αποδεικνύοντας ότι η τελευταία δρα ως κινάση. Αυτό δεν συνέβη στην περίπτωση του πρωτεΐνικού τμήματος XopP 1-420 αμινοξέων αποδεικνύοντας ότι η καρβοξυτελική περιοχή του τελεστή είναι υπεύθυνη για τη δράση της κινάσης. Λαμβάνοντας υπόψη τα προηγούμενα αποτελέσματά μας, αυτός θα μπορούσε να είναι ο λόγος της μείωσης της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης Exo70B1 παρουσία του τελεστή XopP (Michalopoulou *et al.*, 2022). Επιπλέον, τα φωσφορυλιωμένα αμινοξέα της πρωτεΐνης Exo70B1 από την κινάση CPK5 (19Thr, 25Ser, 67Ser, 364Thr, 582Ser) δεν παρατηρήθηκαν, όταν η πρωτεΐνη Exo70B1 και ο τελεστής XopP επωάστηκαν για 30 min πριν από τη δοκιμασία κινάσης με την CPK5. Αυτό υποδηλώνει ότι ο τελεστής έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει τη φωσφορυλίωση του Exo70B1 από την CPK5 και επομένως να μην επάγει τις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή.

4.5 Ο τελεστής RipE1 πρωτεολύει την πρωτεΐνη Exo70B1 in vitro στην περιοχή του ενδιάμεσου βρόχου

Δοκιμασίες πρωτεόλυσης πραγματοποιήθηκαν με τις απομονωμένες πρωτεΐνες RipE1 και Exo70B1 *in vitro*. Τόσο η ανάλυση των δοκιμασιών με Western blot και με φασματομετρία μάζας έδειξαν την πρωτεόλυση της πρωτεΐνης Exo70B1 από τον τελεστή RipE1. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της φασματομετρίας μάζας μπορούν και ανιχνεύονται τα πεπτίδια των πρωτεϊνών που βρίσκονται σε συγκεκριμένα τμήματα του πηκτώματος SDS-PAGE, αφού πρώτα έχουν επεξεργαστεί με τρυψίνη, και στη συνέχεια γίνεται σύγκριση τους με την αλληλουχία της επιθυμητής πρωτεΐνης. Δεδομένου πως ο τελεστής RipE1, έχει δραστικότητα πρωτεάσης κυστεΐνης, η επεξεργασία με τρυψίνη που κόβει το πρωτεϊνικό μόριο μετά την αναγνώριση των αμινοξέων αργινίνης και λυσίνης, οδήγησε σε τροποποίηση των

προγραμμάτων επεξεργασίας των δεδομένων (Sequest, Mascott) και το σύνολο των πεπτιδίων που βρέθηκαν συγκρίθηκαν με την αλληλουχία της πρωτεΐνης Exo70B1. Το ποσοστό κάλυψης της πρωτεΐνης στις τρεις ζώνες που εξετάστηκαν είχε σαν αποτέλεσμα την υπόδειξη του τμήματος της πρωτεΐνης που πρωτεολύεται από τον τελεστή. Συγκεκριμένα, τα σημεία που υπάρχει πρωτεϊνική κάλυψη και στις τρεις υπό μελέτη ζώνες, φαίνεται να είναι μετά την περιοχή 146-201, η οποία ανήκει στο τμήμα του βρόχου της Exo70B1. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε απόλυτη συμφωνία με την *in silico* δομή του συμπλόκου.

4.6 Σύνοψη - Μελλοντικοί στόχοι

Συνολικά στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ένας βασικός πειραματικός σχεδιασμός, κατά τον οποίο δεδομένα από προηγούμενες μελέτες πάνω στην τριτοταγή δομή πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν για τον λειτουργικό χαρακτηρισμό τελεστών του T3SS των βακτηριακών παθογόνων. Πιο αναλυτικά, η πρόβλεψη της δομής του πρωτεϊνικού μορίου του τελεστή ΧορΡ και η σύγκριση της με βάσεις δεδομένων, οδήγησε στο να σχεδιαστούν πειράματα δοκιμασιών κινάσης, τα οποία επιβεβαίωσαν την αρχική υπόθεση τόσο in vivo όσο και in vitro και αποσαφήνισε τον μηχανισμό με τον οποίο ο συγκεκριμένος τελεστής παρακάμπτει την αμυντική απόκριση του ξενιστή Arabidopsis thaliana, ενώ ταυτόχρονα διαταράσσει τη λειτουργία της πρωτεϊνικής υπομονάδας Εχο70Β1 του συμπλόκου εξωκύττωσης, για μια επιτυχημένη μόλυνση από το βακτηριακό παθογόνο Xanthomonas campestris pv. campestris. Προηγούμενες μελέτες απέδειξαν την ύπαρξη συντηρημένων μοτίβων/περιοχών σε τελεστές παρόμοιας ενζυμικής λειτουργίας (Kotsaridis, Tsakiri and Sarris, 2022). Παρόλο που προηγουμένως δεν είχε αποδειχθεί η λειτουργία των παραλόγων του ΧορΡ στους κυτταρικούς του στόχους, όπως για παράδειγμα η λειτουργία του τελεστή XopP του παθογόνου X. oryzae pv. oryzae στον πρωτεϊνικό του στόχο PUB44 (Ishikawa et al., 2014), μία περαιτέρω διερεύνηση τους ίσως αποδείξει παρόμοια ενδοκυτταρική λειτουργία, με την οποία οι συγκεκριμένοι τελεστές διακόπτουν τον μηγανισμό που συμμετέχουν οι πρωτεϊνικοί στόχοι τους στο φυτό-ξενιστή.

Επίσης, οι βακτηριακοί τελεστές έχουν χρησιμοποιηθεί προηγουμένως σε μελέτες για την αντιμετώπιση ή καθυστέρηση της μετάστασης τύπου καρκίνου, όπως το

μελάνωμα (Park *et al.*, 2020). Η ευκαρυωτική κινάση mTOR, η περιοχή κινάσης της οποίας έδειξε μεγάλη ομολογία με την περιοχή του τελεστή XopP που αποδείχτηκε πως είναι υπεύθυνο για την ενζυμική λειτουργία του, έχει ως στόχο το παράλογο της Exo70B1 που υπάρχει στα θηλαστικά, την πρωτεΐνη ExoC7. Λαμβάνοντας υπόψιν την συμμετοχή συγκεκριμένων ισομορφών της πρωτεΐνης ExoC7 στη μετατροπή των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (Lu *et al.*, 2013), το οποίο αποτελεί το πρώτο βήμα της μετάστασης του καρκίνου, μία περαιτέρω διερεύνηση του τελεστή XopP θα μπορούσε να αποδείζει το κατά πόσο μπορεί να καθυστερήσει ή να σταματήσει την μετατροπή αυτή.

Ακόμα, η περαιτέρω διερεύνηση των αμινοξικών θέσεων, στις οποίες ο τελεστής XopP φωσφορυλιώνει την Exo70B1, θα μπορούσε να οδηγήσει στη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών, τα οποία πιθανώς θα παρουσιάζουν ανθεκτικότητα ως προς το παθογόνο Xanthomonas campestris pv. campestris, ενώ χρησιμοποιώντας τα συγκεκριμένα φυτά θα καταστήσει την αναγνώριση άλλων τελεστών που έχουν ως στόχο την Exo70B1 πιο εύκολη χρησιμοποιώντας έναν αριθμό από τεχνικές όπως η ανοσοκατακρήμνιση ή η φασματομετρία μάζας.

Στην περίπτωση του τελεστή RipE1 του βακτηριακού παθογόνου Ralstonia solanacearum, επαληθεύτηκε η δράση του ως πρωτεάση σε πειράματα in vitro, ενώ πρέπει να εξακριβωθεί το κατά πόσο έχει την ίδια λειτουργία κατά την παρουσία του στο εσωτερικό του φυτού-ξενιστή. Σε αντίθεση με τον τελεστή XopP, ο τελεστής RipE1 είναι ικανός να επάγει την αντίδραση υπερευαισθησίας σε φυτικούς οργανισμούς του γένους Nicotiana. Η μελέτη της λειτουργίας του τελεστή RipE1, στο είδος Nicotiana sylvestris, στο οποίο δεν επάγεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, θα μπορούσε να οδηγήσει στην αναγνώριση του υποδοχέα άμυνας που αναγνωρίζει τον συγκεκριμένο τελεστή και το κατά πόσο η in vivo πρωτεόλυση της πρωτεΐνης Εχο70B1 συμμετέχει στην αναγνώριση αυτή.

5. Βιβλιογραφία

Alonso G. Pe' rez-Donoso, Qiang Sun, M. Caroline Roper 2, L.C.G. and Bruce Kirkpatrick, and J.M.L. (2010) 'Cell Wall-Degrading Enzymes Enlarge the Pore Size of Intervessel Pit Membranes in Healthy and Xylella', 152(March), pp. 1748–1759. Available at: https://doi.org/10.1104/pp.109.148791.

Álvarez, B., López, M.M. and Biosca, E.G. (2019) 'Biocontrol of the Major Plant Pathogen Ralstonia solanacearum in Irrigation Water and Host Plants by Novel Waterborne Lytic Bacteriophages', *Frontiers in Microbiology*, 10(December), pp. 1–17. Available at: https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02813.

Anderson, J.C. *et al.* (2014) 'Decreased abundance of type III secretion system- inducing signals in Arabidopsis mkp1 enhances resistance against Pseudomonas syringae', 111(18). Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.1403248111.

Arcangelo, J.G.D., Stahmer, K.R. and Miller, E.A. (2013) 'Biochimica et Biophysica Acta Vesicle-mediated export from the ER : COPII coat function and regulation ☆', *BBA -Molecular Cell Research*, pp. 1–9. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.003.

Aridor, M. and Traub, L.M. (2002) 'Cargo Selection in Vesicular Transport : The Making and Breaking of a Coat', (1), pp. 537–546.

Arlat, M. *et al.* (2016) 'Using Ecology , Physiology , and Genomics to Understand Host Specificity in'. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100147.

Arnittali, M. *et al.* (2021) 'Structure and Thermal Stability of wtRop and RM6 Proteins through All-Atom Molecular Dynamics Simulations and Experiments'.

Ashida, H. and Sasakawa, C. (2017) 'Bacterial E3 ligase effectors exploit host ubiquitin systems', *Current Opinion in Microbiology*, 35, pp. 16–22. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.11.001.

Bai, X., Mcmullan, G. and Scheres, S.H.W. (2014) 'How cryo-EM is revolutionizing structural biology', *Trends in Biochemical Sciences*, pp. 1–9. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.005.

Barrett, L.G. *et al.* (2008) 'Life history determines genetic structure and evolutionary potential of host – parasite interactions', (October). Available at: https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.06.017.

Bartho, J.D. *et al.* (2019) 'The structure of Erwinia amylovora AvrRpt2 provides insight into protein maturation and induced resistance to fire blight by Malus × robusta 5', *Journal of Structural Biology*, 206(2), pp. 233–242. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.03.010.

Baxevanis, A.D. (2000) 'The Molecular Biology Database Collection : an online compilation of relevant database resources', 28(1), pp. 1–7.

Bernard, C. *et al.* (2002) 'The DspB / F protein of Erwinia amylovora is a type III secretion chaperone ensuring efficient intrabacterial production of the Hrp-secreted DspA / E pathogenicity factor', 3, pp. 313–320.

Blow, D. (1977) 'Protein crystallography Plutonium and other actinides', 265, p. 1977.

Bogdanove, A.J. *et al.* (2011) 'Two New Complete Genome Sequences Offer Insight into Host and Tissue Specificity of Plant Pathogenic Xanthomonas spp . 2 +', 193(19), pp. 5450–5464. Available at: https://doi.org/10.1128/JB.05262-11.

Bonas, D.B. uttner & U. (2009) 'Regulation and secretion of Xanthomonas virulence factors'. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00192.x.

Boutrot, F. and Zipfel, C. (2017) 'Function , Discovery , and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance', (June), pp. 1–30.

Brini, E., Simmerling, C. & Dill, K. (2020) 'Protein storytelling through physics', 3041. Available at: https://doi.org/10.1126/science.aaz3041.

Büttner, D. (2012) 'Protein Export According to Schedule : Architecture , Assembly , and Regulation of Type III Secretion Systems from Plant- and Animal-Pathogenic Bacteria'. Available at: https://doi.org/10.1128/MMBR.05017-11.

Caldwell, D., Kim, B. and Iyer-pascuzzi, A.S. (2017) 'Ralstonia solanacearum Differentially Colonizes Roots of Resistant and Susceptible Tomato Plants', (1), pp. 528–536.

Chatterjee, D. *et al.* (2012) 'Structural characterization of a conserved, calcium-dependent periplasmic protease from Legionella pneumophila', *Journal of Bacteriology*, 194(16), pp. 4415–4425. Available at: https://doi.org/10.1128/JB.00640-12.

Chernov, A.A. (2003) 'Protein crystals and their growth', 142, pp. 3–21. Available at: https://doi.org/10.1016/S1047-8477(03)00034-0.

Chini, A. et al. (2014) 'The Bacterial Effector HopX1 Targets JAZ Transcriptional Repressors to

Activate Jasmonate Signaling and Promote Infection in Arabidopsis', 12(2). Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001792.

Chisholm, S.T. *et al.* (2006) 'Review Host-Microbe Interactions : Shaping the Evolution of the Plant Immune Response', pp. 803–814. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008.

Cohen, M.S. and Chang, P. (2018) 'Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation', *Nature Chemical Biology*, 14(3), pp. 236–243. Available at: https://doi.org/10.1038/nchembio.2568.

Coll, N.S. and Valls, M. (2013) 'Opinion Current knowledge on the Ralstonia solanacearum type III secretion system'. Available at: https://doi.org/10.1111/1751-7915.12056.

Costa, T.R.D. *et al.* (2015) 'Secretion systems in Gram-negative insights', *Nature Publishing Group*, 13(6), pp. 343–359. Available at: https://doi.org/10.1038/nrmicro3456.

Dangl, jonathan D.G.J.& J.L. (no date) 'The plant immune system', pp. 3–9. Available at: https://doi.org/10.1038/nature05286.

Daniela, B. (2016) 'Behind the lines – actions of bacterial type III effector proteins in plant cells', (July), pp. 894–937. Available at: https://doi.org/10.1093/femsre/fuw026.

Deng, D. *et al.* (2012) 'Structural Basis for Sequence-Specific Recognition of', 335(February), pp. 720–723.

Du, D. and Gai, F. (2006) 'Understanding the folding mechanism of an α -helical hairpin', *Biochemistry*, 45(44), pp. 13131–13139. Available at: https://doi.org/10.1021/bi0615745.

Fowler, N.J. and Williamson, M.P. (2022) 'Article The accuracy of protein structures in solution determined by AlphaFold and NMR Graphical abstract II II The accuracy of protein structures in solution determined by AlphaFold and NMR', *Structure/Folding and Design*, 30(7), pp. 925-933.e2. Available at: https://doi.org/10.1016/j.str.2022.04.005.

Fritschi, F.B., Lin, H. and Walker, M.A. (2007) 'Xylella fastidiosa Population Dynamics in Grapevine Genotypes Differing in Susceptibility to Pierce 's Disease', 3, pp. 326–332.

Fujisaki, K. *et al.* (2015) 'Rice Exo70 interacts with a fungal effector , AVR-Pii , and is required for AVR-Pii-triggered immunity', pp. 875–887. Available at: https://doi.org/10.1111/tpj.12934.

Gaspari, M. and Cuda, G. (2011) 'Chapter 9 Nano LC - MS / MS : A Robust Setup for

Proteomic Analysis', 790(LC), pp. 115–126. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-319-6.

Gazi, A.D. *et al.* (2008) 'Evidence for a coiled-coil interaction mode of disordered proteins from bacterial type III secretion systems', *Journal of Biological Chemistry*, 283(49), pp. 34062–34068. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M803408200.

Gazi, A.D. and Kokkinidis, M. (2021) ' α -Helices in the Type III Secretion Effectors : A Prevalent Feature with Versatile Roles'.

Gouran, H. *et al.* (2016) 'The Secreted Protease PrtA Controls Cell Growth , Biofilm Formation and Pathogenicity in Xylella fastidiosa', *Nature Publishing Group*, (July), pp. 1–13. Available at: https://doi.org/10.1038/srep31098.

Grossman, A.S. *et al.* (2021) 'A widespread bacterial secretion system with diverse substrates', *mBio*, 12(4). Available at: https://doi.org/10.1128/mBio.01956-21.

Grunt, M. *et al.* (2012) 'Evolution of the land plant exocyst complexes', 3(July), pp. 1–13. Available at: https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00159.

Gu, X. *et al.* (2020) 'Vesicle Transport in Plants: A Revised Phylogeny of SNARE Proteins', *Evolutionary Bioinformatics*, 16. Available at: https://doi.org/10.1177/1176934320956575.

Guarischi-sousa, R. *et al.* (2016) 'Complete genome sequence of the potato pathogen Ralstonia solanacearum UY031', *Standards in Genomic Sciences*, pp. 1–8. Available at: https://doi.org/10.1186/s40793-016-0131-4.

de Guillen, K. *et al.* (2015) 'Structure Analysis Uncovers a Highly Diverse but Structurally Conserved Effector Family in Phytopathogenic Fungi', *PLoS Pathogens*, 11(10), pp. 1–27. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005228.

Guo, J. *et al.* (2018) 'confers broad resistance to planthoppers in rice'. Available at: https://doi.org/10.1038/s41588-018-0039-6.

Ha, M. *et al.* (2011) 'The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant – pathogen interaction', 62(6), pp. 2107–2116. Available at: https://doi.org/10.1093/jxb/erq402.

Hayes, C.S., Aoki, S.K. and Low, D.A. (2010) 'Bacterial Contact-Dependent Delivery Systems', (Cdi). Available at: https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091449.

He, B. and Guo, W. (2009) 'The exocyst complex in polarized exocytosis', pp. 537–542.

Available at: https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.04.007.

Hekkelman, M.L. *et al.* (2021) 'AlphaFill : enriching the AlphaFold models with ligands and co-factors', pp. 1–25.

Holm, L. (2020) 'Using Dali for Protein Structure Comparison', *Methods in Molecular Biology*, 2112, pp. 29–42. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0270-6_3.

Hou, S. *et al.* (2019) 'Damage-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity in Plants', 10(May). Available at: https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00646.

Huang, Y. *et al.* (2021) 'An in vitro vesicle formation assay reveals cargo clients and factors that mediate vesicular trafficking', 118(35), pp. 1–12. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.2101287118.

Id, C.C., Disalvo, B. and Id, M.C.R. (2021) 'Xylella fastidiosa : A reemerging plant pathogen that threatens crops globally', (Fig 1), pp. 1–6. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009813.

Ishikawa, K. *et al.* (2014) 'Bacterial effector modulation of host E3 ligase activity suppresses PAMP-triggered immunity in rice', *Nature Communications*, 5(1), p. 5430. Available at: https://doi.org/10.1038/ncomms6430.

Iwabuchi, N. *et al.* (2019) 'Crystal structure of phyllogen, a phyllody-inducing effector protein of phytoplasma', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 513(4), pp. 952–957. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.060.

J., H.B. *et al.* (2017) 'An ancient integration in a plant NLR is maintained as a trans-species polymorphism'.

Janjusevic, R. (2014) 'A Bacterial Inhibitor of Host Programmed Cell Death Defenses Is an E3 Ubiquitin Ligase', 222(2006). Available at: https://doi.org/10.1126/science.1120131.

Jaskolski, M., Dauter, Z. and Wlodawer, A. (2014) 'A brief history of macromolecular crystallography , illustrated by a family tree and its Nobel fruits', 281, pp. 3985–4009. Available at: https://doi.org/10.1111/febs.12796.

Jeong, B.R. *et al.* (2011) 'Structure function analysis of an ADP-ribosyltransferase type III effector and its RNA-binding target in plant immunity', *Journal of Biological Chemistry*, 286(50), pp. 43272–43281. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M111.290122.

Jha, G., Rajeshwari, R. and Sonti, R. V (2007) 'Between Two Xanthomonas oryzae pv . oryzae

Secretion Systems in Modulating Virulence on Rice', 20(1), pp. 31-40.

Jumper, J. *et al.* (2021) 'Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold', *Nature*, 596(7873), pp. 583–589. Available at: https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2.

Ka-Wai Ma, W.M. (2016) 'YopJ Family Effectors Promote Bacterial Infection through a Unique', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(4), pp. 1011–1027. Available at: https://doi.org/10.1128/MMBR.00032-16.Address.

Kay, S. and Bonas, U. (2009) 'How Xanthomonas type III effectors manipulate the host plant', *Current Opinion in Microbiology*, 12(1), pp. 37–43. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.12.006.

Kikhney, A.G. and Svergun, D.I. (2015) 'A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins', *FEBS LETTERS* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.027.

Kirzinger, M.W.B., Butz, C.J. and Stavrinides, J. (2015) 'Inheritance of Pantoea type III secretion systems through both vertical and horizontal transfer', *Molecular Genetics and Genomics*, 290(6), pp. 2075–2088. Available at: https://doi.org/10.1007/s00438-015-1062-2.

Kornev, A.P. *et al.* (2006) 'Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47), pp. 17783–17788. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.0607656103.

Kotsaridis, K. *et al.* (2022) 'The functional and structural characterization of Xanthomonas campestris pv . campestris core effector XopP revealed a new kinase activity'.

Kotsaridis, K., Tsakiri, D. and Sarris, P.F. (2022) 'Understanding enemy' s weapons to an effective prevention : common virulence effects across microbial phytopathogens kingdoms', *Critical Reviews in Microbiology*, 0(0), pp. 1–15. Available at: https://doi.org/10.1080/1040841X.2022.2083939.

Kroj, T. *et al.* (2016) 'Integration of decoy domains derived from protein targets of pathogen effectors into plant immune receptors is widespread', *New Phytologist*, 210(2), pp. 618–626. Available at: https://doi.org/10.1111/nph.13869.

Kulich, I. *et al.* (2013) 'Arabidopsis Exocyst Subcomplex Containing Subunit EXO70B1 Is Involved in Autophagy-Related Transport to the Vacuole', *Traffic*, 14(11), pp. 1155–1165. Available at: https://doi.org/10.1111/tra.12101. Kulich, I. (2017) 'EXO70C2 Is a Key Regulatory Factor for Optimal Tip Growth of Pollen 1', 174(May), pp. 223–240. Available at: https://doi.org/10.1104/pp.16.01282.

Kurti, P.B.- (2019) 'The plant hypersensitive response : concepts , control and consequences',0, pp. 1163–1178. Available at: https://doi.org/10.1111/mpp.12821.

Kwame, A. *et al.* (2020) 'EXO70D isoforms mediate selective autophagic degradation of type-A ARR proteins to regulate cytokinin sensitivity'. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.2013161117.

De la Concepcion, J.C. *et al.* (2022) 'A blast fungus zinc-finger fold effector binds to a hydrophobic pocket in host Exo70 proteins to modulate immune recognition in rice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(43). Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.2210559119.

Lasica, A.M. *et al.* (2017) 'The Type IX Secretion System (T9SS): Highlights and Recent Insights into Its Structure and Function', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(MAY). Available at: https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00215.

LeBlanc, M.A. *et al.* (2021) 'Type III secretion system effector proteins are mechanically labile', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(12), pp. 1–8. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.2019566118.

Lee, B. *et al.* (2005) 'The genome sequence of Xanthomonas oryzae pathovar oryzae KACC10331 , the bacterial blight pathogen of rice', 33(2), pp. 577–586. Available at: https://doi.org/10.1093/nar/gki206.

Lee, C.C. *et al.* (2004) 'Crystal structure of the type III effector AvrB from Pseudomonas syringae', *Structure*, 12(3), pp. 487–494. Available at: https://doi.org/10.1016/j.str.2004.02.013.

Lei, L., Stevens, D.M. and Coaker, G. (2020) 'Phosphorylation of the Pseudomonas Effector AvrPtoB by Arabidopsis SnRK2 . 8 Is Required for Bacterial Virulence', *Molecular Plant*, 13(10), pp. 1513–1522. Available at: https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.08.018.

Lepore, D.M., Martínez-Núñez, L. and Munson, M. (2018) 'Exposing the Elusive Exocyst Structure', *Trends in Biochemical Sciences*, 43(9), pp. 714–725. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.012.

Li, P. *et al.* (2020) 'The Lifecycle of the Plant Immune System The Lifecycle of the Plant Immune System', 2689(May). Available at: https://doi.org/10.1080/07352689.2020.1757829.

Li, S. *et al.* (2013) 'EXO70A1-Mediated Vesicle Traf fi cking Is Critical for Tracheary Element Development in Arabidopsis', 25(May), pp. 1774–1786. Available at: https://doi.org/10.1105/tpc.113.112144.

Lipinszki, Z. *et al.* (2018) 'Enhancing the Translational Capacity of E. coli by Resolving the Codon Bias', *ACS Synthetic Biology*, 7(11), pp. 2656–2664. Available at: https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00332.

Liu, J.H. *et al.* (2019) 'Crystal structure-based exploration of arginine-containing peptide binding in the ADP-ribosyltransferase domain of the type III effector xopai protein', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), pp. 1–21. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms20205085.

Liu, N. *et al.* (2017) 'Calcium-dependent protein kinase5 associates with the truncated NLR protein TIR-NBS2 to contribute to exo70B1-mediated immunity', *Plant Cell*, 29(4), pp. 746–759. Available at: https://doi.org/10.1105/tpc.16.00822.

Lopez, V.A. *et al.* (2019) 'A Bacterial Effector Mimics a Host HSP90 Client to Undermine Immunity', *Cell*, 179(1), pp. 205-218.e21. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.020.

Lu, H. *et al.* (2013) 'Exo70 isoform switching upon epithelial-mesenchymal transition mediates cancer cell invasion', *Developmental Cell*, 27(5), pp. 560–573. Available at: https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.10.020.

Mak, A.N. (2012) 'The Crystal Structure of TAL Effector PthXo1 Bound to Its DNA Target', 716. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1216211.

Marchal, C. *et al.* (2022) 'Show me your ID: NLR immune receptors with integrated domains in plants', *Essays in Biochemistry*. Edited by K. Kanyuka and K. Hammond-Kosack, 66(5), pp. 527–539. Available at: https://doi.org/10.1042/EBC20210084.

Martin-urdiroz, M. *et al.* (2016) 'The Exocyst Complex in Health and Disease', 4(April), pp. 1– 22. Available at: https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00024.

May, C. Le *et al.* (2020) 'Editorial : Plant Pathogen Life-History Traits and Adaptation to Environmental Constraints', 10(January), pp. 10–13. Available at: https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01730.

McGrath, M.E. (1999) 'The lysosomal cysteine proteases', *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 28, pp. 181–204. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.28.1.181.

Mcpherson, A. (2014) 'IYCr crystallization series Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules IYCr crystallization series', pp. 1445–1467. Available at: https://doi.org/10.1107/S2053230X14019670.

Mei, K. *et al.* (2018) 'Cryo-EM structure of the exocyst complex', *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(2), pp. 139–146. Available at: https://doi.org/10.1038/s41594-017-0016-2.

Mei, K. and Guo, W. (2018) 'The exocyst complex', *Current Biology*, 28(17), pp. R922–R925. Available at: https://doi.org/10.1016/J.CUB.2018.06.042.

Mei, K. and Guo, W. (2019) 'Exocytosis: A New Exocyst Movie', *Current Biology*, 29(1), pp. R30–R32. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.11.022.

Meng, X. and Zhang, S. (2013) 'MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling', (April), pp. 1–22. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102314.

Mermigka, G. and Sarris, P.F. (2019) 'The Rise of Plant Resistosomes', *Trends in Immunology*, 40(8), pp. 670–673. Available at: https://doi.org/10.1016/j.it.2019.05.008.

Michalopoulou, V.A. *et al.* (2022) 'The host exocyst complex is targeted by a conserved bacterial type-III effector that promotes virulence', *The Plant Cell* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1093/plcell/koac162.

Miletic, S. *et al.* (2021) 'Substrate-engaged type III secretion system structures reveal gating mechanism for unfolded protein translocation', *Nature Communications*, 12(1), pp. 1–14. Available at: https://doi.org/10.1038/s41467-021-21143-1.

Monteiro, F. and Nishimura, M.T. (2018) 'Structural , Functional , and Genomic Diversity of Plant NLR proteins : An Evolved Resource for Rational Engineering of Plant Immunity', (June), pp. 1–25.

Montella, I.R., Schama, R. and Valle, D. (2012) 'The classification of esterases: An important gene family involved in insecticide resistance - A review', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(4), pp. 437–449. Available at: https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000400001.

Mukhi, N. *et al.* (2021) 'Perception of structurally distinct effectors by the integrated WRKY domain of a plant immune receptor', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(50). Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.2113996118.

Nakano, M. and Mukaihara, T. (2019) 'Comprehensive Identification of PTI Suppressors in Type III E ff ector Repertoire Reveals that Ralstonia solanacearum Activates Jasmonate Signaling at Two Di ff erent Steps'.

Nascimento, R. *et al.* (2016) 'The Type II Secreted Lipase / Esterase LesA is a Key Virulence Factor Required for Xylella fastidiosa Pathogenesis in Grapevines', *Nature Publishing Group*, (June 2015), pp. 1–17. Available at: https://doi.org/10.1038/srep18598.

Neagu, A. and Neagu, M. (2001) 'Fluctuations and the Hofmeister Effect', 81(2). Available at: https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75786-4.

Ngou, B.P.M. *et al.* (2021) 'Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors', *Nature*, 592(7852), pp. 110–115. Available at: https://doi.org/10.1038/s41586-021-03315-7.

Nu, T.S. *et al.* (2007) 'Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses', pp. 931–940. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03192.x.

Ouest, A. *et al.* (2011) 'Seasonality and the evolutionary divergence of plant parasites', 92(12), pp. 2159–2166.

Pariaud, B. *et al.* (2009) 'Aggressiveness and its role in the adaptation of plant', pp. 409–424. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x.

Park, S.H. *et al.* (2020) 'Bacterial type III effector protein HopQ inhibits melanoma motility through autophagic degradation of vimentin', *Cell Death and Disease*, 11(4). Available at: https://doi.org/10.1038/s41419-020-2427-y.

Pedersen, J. a n S. (1997) 'Analysis of small-angle scattering data from colloids and polymer solutions : modeling and least-squares fitting I J a n Skov Pedersen', 70, pp. 171–210.

Peenková, T. *et al.* (2011) 'The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant-pathogen interaction', *Journal of Experimental Botany*, 62(6), pp. 2107–2116. Available at: https://doi.org/10.1093/jxb/erq402.

Peeters, N. et al. (2013) 'Pathogen profile Ralstonia solanacearum , a widespread bacterial

plant pathogen in the post-genomic era', 14, pp. 651–662. Available at: https://doi.org/10.1111/mpp.12038.

Pérez-reytor, D. *et al.* (2018) 'Accessory Toxins of Vibrio Pathogens and Their Role in Epithelial Disruption During Infection', 9(September), pp. 1–11. Available at: https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02248.

Picco, A. *et al.* (2017) 'The In Vivo Architecture of the Exocyst Provides Structural Basis for Exocytosis', *Cell*, 168(3), pp. 400-412.e18. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.004.

Potnis, N. *et al.* (2011) 'Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper'.

'Protein Data Bank : the single global archive for 3D macromolecular structure data wwPDB consortium' (2019), 47(October 2018), pp. 520–528. Available at: https://doi.org/10.1093/nar/gky949.

Qi, D. and Innes, R.W. (2013) 'Recent advances in plant NLR structure , function , localization , and signaling', 4(October), pp. 1–10. Available at: https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00348.

Rapicavoli, J.N. *et al.* (no date) 'Lipopolysaccharide O-antigen delays plant innate immune recognition of Xylella fastidiosa', (2018). Available at: https://doi.org/10.1038/s41467-018-02861-5.

Rawat, A. *et al.* (2021) 'Cysteine proteases: Battling pathogenic parasitic protozoans with omnipresent enzymes', *Microbiological Research*, 249(April), p. 126784. Available at: https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126784.

Rivera-Calzada, A. *et al.* (2021) 'Type VII secretion systems: structure, functions and transport models', *Nature Reviews Microbiology*, 19(9), pp. 567–584. Available at: https://doi.org/10.1038/s41579-021-00560-5.

Roper, M.C. *et al.* (2007) 'Xylella fastidiosa Requires Polygalacturonase for Colonization and Pathogenicity in Vitis vinifera Grapevines', 20(4), pp. 411–419.

Roy, A., Kucukural, A. and Zhang, Y. (2010) 'I-TASSER : a unified platform for automated protein structure and function prediction', 5(4), pp. 725–738. Available at: https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5.

Ryan, R.P. *et al.* (2011) 'Pathogenomics of Xanthomonas : understanding bacterium – plant interactions', *Nature Publishing Group*, 9(5), pp. 344–355. Available at: https://doi.org/10.1038/nrmicro2558.

Sabol, P., Kulich, I. and Žárský, V. (2017) 'RIN4 recruits the exocyst subunit EXO70B1 to the plasma membrane', *Journal of Experimental Botany*, 68(12), pp. 3253–3265. Available at: https://doi.org/10.1093/jxb/erx007.

Salanoubat, M. *et al.* (2002) 'Genome sequence of the plant pathogen Ralstonia solanacearum', 415(January), pp. 497–502.

Sarris, P.F. *et al.* (2016) 'Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens', *BMC Biology*, 14(1), p. 8. Available at: https://doi.org/10.1186/s12915-016-0228-7.

Schmidtke, C. *et al.* (2020) 'Genome-wide transcriptome analysis of the plant pathogen Xanthomonas identifies sRNAs with putative virulence functions', 40(5), pp. 2020–2031. Available at: https://doi.org/10.1093/nar/gkr904.

Schoonbeek, H. *et al.* (2015) 'Rapid report Arabidopsis EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat', pp. 606–613.

Schuster, L.A. and Reisch, C.R. (2022) 'Plasmids for Controlled and Tunable High-Level Expression in E. coli', *Applied and Environmental Microbiology*. Edited by M. Vives, 88(22). Available at: https://doi.org/10.1128/aem.00939-22.

Senisterra, G., Chau, I. and Vedadi, M. (2012) 'Thermal Denaturation Assays in Chemical Biology', (April), pp. 128–136. Available at: https://doi.org/10.1089/adt.2011.0390.

Seo, D.H. *et al.* (2016) 'The N-terminal und motif of the arabidopsis U-box E3 ligase pub18 is critical for the negative regulation of aba-mediated stomatal movement and determines its ubiquitination specificity for exocyst subunit Exo70B1', *Plant Cell*, pp. 2952–2973. Available at: https://doi.org/10.1105/tpc.16.00347.

Sertedakis, M. *et al.* (2021) 'Expression of putative effectors of different Xylella fastidiosa strains triggers cell death- - like responses in various Nicotiana model plants', (June), pp. 1–9. Available at: https://doi.org/10.1111/mpp.13147.

Sgro, G.G. *et al.* (2019) 'Bacteria-Killing Type IV Secretion Systems', 10(May), pp. 1–20. Available at: https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01078. Shen, D. *et al.* (2013) 'The synaptobrevin homologue Snc2p recruits the exocyst to secretory vesicles by binding to Sec6p', *Journal of Cell Biology*, 202(3), pp. 509–526. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.201211148.

Silva, A.C.R. *et al.* (2002) 'Comparison of the genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities', 417(May).

Simon, G.M. and Cravatt, B.F. (2011) 'Activity-based Proteomics of Enzyme Superfamilies : Serine Hydrolases as a Case Study *', *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), pp. 11051– 11055. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.R109.097600.

Singer, A.U. *et al.* (2013) 'A Pathogen Type III Effector with a Novel E3 Ubiquitin Ligase Architecture', *PLoS Pathogens*, 9(1). Available at: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003121.

Sippl, M.J. (1990) 'Calculation o f Conformational Ensembles from Potentials o f M e a n Force An Approach to the Knowledge-based Prediction of Local Structures in Globular Proteins', pp. 859–883.

Stegmann, M. *et al.* (2014a) 'The exocyst subunit Exo70B1 is involved in the immune response of Arabidopsis thaliana to different pathogens and cell death', *Plant Signaling and Behavior*, 8(12). Available at: https://doi.org/10.4161/psb.27421.

Stegmann, M. *et al.* (2014b) 'The exocyst subunit Exo70B1 is involved in the immune response of Arabidopsis thaliana to different pathogens and cell death', *Plant Signaling and Behavior*, 8(12), pp. 1–5. Available at: https://doi.org/10.4161/psb.27421.

Steinegger, M., Mirdita, M. and Söding, J. (2019) 'Protein-level assembly increases protein sequence recovery from metagenomic samples manyfold', *Nature Methods*, 16(July). Available at: https://doi.org/10.1038/s41592-019-0437-4.

Synek, L. *et al.* (2021) 'Plasma membrane phospholipid signature recruits the plant exocyst complex via the EXO70A1 subunit', 118(36). Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.2105287118.

Szczesny, R. *et al.* (2010) 'Functional characterization of the Xcs and Xps type II secretion systems from the plant pathogenic bacterium Xanthomonas campestris pv vesicatoria', pp. 983–1002.

Sztucki, M. and Narayanan, T. (2007) 'Development of an ultra-small-angle X-ray scattering instrument for probing the microstructure and the dynamics of soft matter', pp. 459–462.

Available at: https://doi.org/10.1107/S0021889806045833.

Tang, J. *et al.* (2021) 'Trends in Microbiology | Microbe of the Month Xanthomonas campestris Pathovars Trends in Microbiology | Microbe of the Month', *Trends in Microbiology*, 29(2), pp. 182–183. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.06.003.

Taus, T. *et al.* (2011) 'Universal and Confident Phosphorylation Site Localization Using phosphoRS', *Journal of Proteome Research*, 10(12), pp. 5354–5362. Available at: https://doi.org/10.1021/pr200611n.

Taylor, S.S. and Kornev, A.P. (2011) 'Protein kinases: Evolution of dynamic regulatory proteins', *Trends in Biochemical Sciences*, 36(2), pp. 65–77. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.09.006.

'The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.' (no date).

Thomma, B.P.H.J., Nu, T. and Joosten, M.H.A.J. (2011) 'Of PAMPs and Effectors : The Blurred PTI-ETI Dichotomy', 23(January), pp. 4–15. Available at: https://doi.org/10.1105/tpc.110.082602.

Thompson, M.C., Yeates, T.O. and Rodriguez, J.A. (2020) 'Advances in methods for atomic resolution macromolecular structure determination [version 1; peer review : 2 approved]', 9, pp. 1–18.

Timilsina, S. *et al.* (2019) 'Multiple Recombination Events Drive the Current Genetic Structure of Xanthomonas perforans in Florida', 10(March), pp. 1–13. Available at: https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00448.

Tollenaere, C., Susi, H. and Laine, A. (2016) 'Evolutionary and Epidemiological Implications of Multiple Infection in Plants', *Trends in Plant Science*, 21(1), pp. 80–90. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.10.014.

Troisfontaines, P. and Cornelis, G.R. (2022) 'Type III Secretion : More Systems Than What Is Type III Secretion ?'

Tsakiri, D. *et al.* (2022) 'Ralstonia solanacearum core effector RipE1 interacts and cleaves the Arabidopsis exocyst component', *BioRxiv* [Preprint].

Valencia, U.P.D.E. (2016) " Xylella fastidiosa (Wells et al ., 1987), the dangerous pathogen in Europe ".

Vanengelenburg, S.B. and Palmer, A.E. (2008) 'Quantification of Real-Time Salmonella

Effector Type III Secretion Kinetics Reveals Differential Secretion Rates for SopE2 and SptP', (June), pp. 619–628. Available at: https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.04.014.

Varadi, M. *et al.* (2022) 'AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models', *Nucleic Acids Research*, 50(D1), pp. D439–D444. Available at: https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061.

Verma, S., Dixit, R. and Pandey, K.C. (2016) 'Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets', *Frontiers in Pharmacology*, 7(APR), pp. 1–12. Available at: https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00107.

Vicente, J.G. and Holub, E.B. (2013) 'Pathogen profile Xanthomonas campestris pv . campestris (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops', 14, pp. 2–18. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x.

Vukašinovic, N. and Žárský, V. (2016) 'Tethering complexes in the Arabidopsis endomembrane system', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(MAY), pp. 1–13. Available at: https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00046.

Wallingford, A. (2008) 'Determining the threat of Pierce's disease to Virginia vineyards .', (December 2008), p. 96.

Wang, W. *et al.* (2019) 'The Pseudomonas Syringae Effector AvrPtoB Associates With and Ubiquitinates Arabidopsis Exocyst Subunit EXO70B1', *Frontiers in Plant Science*, 10. Available at: https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01027.

Wang, W. *et al.* (2020) 'The Arabidopsis exocyst subunits EXO70B1 and EXO70B2 regulate FLS2 homeostasis at the plasma membrane', *New Phytologist*, 227(2), pp. 529–544. Available at: https://doi.org/10.1111/nph.16515.

Wang, Z. *et al.* (2016) 'Expression and Functional Analysis of a Novel Group of Legumespecific WRKY and Exo70 Protein Variants from Soybean', *Nature Publishing Group*, (August), pp. 1–13. Available at: https://doi.org/10.1038/srep32090.

Weiberg, A. and Jin, H. (2015) 'ScienceDirect Small RNAs — the secret agents in the plant – pathogen interactions', *Current Opinion in Plant Biology*, 26, pp. 87–94. Available at: https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.033.

Weigt, M. *et al.* (2009) 'Identification of direct residue contacts in protein – protein interaction by message passing', 106(1). Available at:

https://doi.org/10.1073/pnas.0805923106.

White, F.F. *et al.* (2009) 'The type III effectors of Xanthomonas', *Molecular Plant Pathology*, 10(6), pp. 749–766. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00590.x.

van Wijk, K.J. *et al.* (2014) 'Meta-Analysis of Arabidopsis thaliana Phospho-Proteomics Data Reveals Compartmentalization of Phosphorylation Motifs', *The Plant Cell*, 26(6), pp. 2367– 2389. Available at: https://doi.org/10.1105/tpc.114.125815.

Wittmers, F. *et al.* (2022) 'Genomes from Uncultivated Pelagiphages Reveal Multiple Phylogenetic Clades Exhibiting Extensive Auxiliary Metabolic Genes and Cross-Family Multigene Transfers', *mSystems*, 7(5). Available at: https://doi.org/10.1128/msystems.01522-21.

Wüthrich, K. (2001) 'The way to NMR structures of proteins', 8(11), pp. 923–925.

Yang, H. *et al.* (2013) 'MTOR kinase structure, mechanism and regulation', *Nature*, 497(7448), pp. 217–223. Available at: https://doi.org/10.1038/nature12122.

Yuan, M. *et al.* (2021) 'Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity', *Nature*, 592(April 2020). Available at: https://doi.org/10.1038/s41586-021-03316-6.

Zaman, A. *et al.* (2021) 'Exocyst protein subnetworks integrate Hippo and mTOR signaling to promote virus detection and cancer', *Cell Reports*, 36(5), p. 109491. Available at: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109491.

Žárský, V. *et al.* (2020) 'Three subfamilies of exocyst EXO70 family subunits in land plants: Early divergence and ongoing functional specialization', *Journal of Experimental Botany*, 71(1), pp. 49–62. Available at: https://doi.org/10.1093/jxb/erz423.

Zhang, C. *et al.* (2015) 'Endosidin2 targets conserved exocyst complex subunit EXO70 to inhibit exocytosis'. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.1521248112.

Zhang, C. *et al.* (2016) 'Endosidin2 targets conserved exocyst complex subunit EXO70 to inhibit exocytosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(1), pp. E41–E50. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.1521248112.

Zhang, X. *et al.* (2015) 'EXO70I Is Required for Development of a Sub- domain of the Periarbuscular Membrane during Report EXO70I Is Required for Development of a Subdomain of the Periarbuscular Membrane during Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis', *Current* Biology, 25(16), pp. 2189–2195. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.075.

Zhang, Z.M. *et al.* (2016) 'Structure of a pathogen effector reveals the enzymatic mechanism of a novel acetyltransferase family', *Nature Structural and Molecular Biology*, 23(9), pp. 847–852. Available at: https://doi.org/10.1038/nsmb.3279.

Zhao, J. *et al.* (2019) 'Identification and characterization of the EXO70 gene family in polyploid wheat and related species', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), pp. 1–22. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms20010060.

Zhao, T. *et al.* (2015) 'A Truncated NLR Protein, TIR-NBS2, Is Required for Activated Defense Responses in the exo70B1 Mutant', *PLoS Genetics*, 11(1), pp. 1–28. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004945.

Zheng, X. *et al.* (2019) 'Combined use of a microbial restoration substrate and avirulent Ralstonia solanacearum for the control of tomato bacterial wilt', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–10. Available at: https://doi.org/10.1038/s41598-019-56572-y.

Ziv, C. *et al.* (2018) 'Multifunctional Roles of Plant Cuticle During Plant-Pathogen Interactions', 9(July), pp. 1–8. Available at: https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01088.

Zulawski, M. *et al.* (2014) 'The Arabidopsis Kinome : phylogeny and evolutionary insights into functional diversification The Arabidopsis Kinome : phylogeny and evolutionary insights into functional diversification'.

Zulawski, M. and Schulze, W.X. (2015) 'The Plant Kinome', in, pp. 1–23. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2648-0_1.

6. Δημοσιεύσεις

SHORT COMMUNICATION

Molecular Plant Pathology 🊳 WILEY

Expression of putative effectors of different Xylella fastidiosa strains triggers cell death-like responses in various Nicotiana model plants

Matthaios Sertedakis¹ | Konstantinos Kotsaridis^{1,2} | Dimitra Tsakiri^{1,2} Glykeria Mermigka² | Ana Dominguez-Ferreras³ | Vardis Ntoukakis³ Panagiotis F. Sarris^{1,2,4}

¹Department of Biology, University of Crete, Heraklion, Greece ²Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology-Hellas, Heraklion, Greece ³School of Life Sciences, University of Warwick, Coventry, UK ⁴Biosciences, University of Exeter, Exeter, UK

Correspondence

Panagiotis F. Sarris, Department of Biology, University of Crete, 714 09 Heraklion, Crete, Greece. Emails: p.sarris@imbb.forth.gr; p.sarris@uoc.gr

Funding information

General Secretariat of Research and Innovation (GSRI), Grant/Award Number: T1E∆K-01878: General Secretariat for Research & Technology (GSRT), Hellas, Grant/Award Number: 20182E01300000

Abstract

The wide host range of Xylella fastidiosa (Xf) indicates the existence of yet uncharacterized virulence mechanisms that help pathogens to overcome host defences. Various bioinformatics tools combined with prediction of the functions of putative virulence proteins are valuable approaches to study microbial pathogenicity. We collected a number of putative effectors from three Xf strains belonging to different subspecies: Temecula-1 (subsp. fastidiosa), CoDiRO (subsp. pauca), and Ann-1 (subsp. sandyi). We designed an in planta Agrobacterium-based expression system that drives the expressed proteins to the cell apoplast, in order to investigate their ability to activate defence in Nicotiana model plants. Multiple Xf proteins differentially elicited cell death-like phenotypes in different Nicotiana species. These proteins are members of different enzymatic groups: (a) hydrolases/hydrolase inhibitors, (b) serine proteases, and (c) metal transferases. We also classified the Xf proteins according to their sequential and structural similarities via the I-TASSER online tool. Interestingly, we identified similar proteins that were able to differentially elicit cell death in different cultivars of the same species. Our findings provide a basis for further studies on the mechanisms that underlie both defence activation in Xf resistant hosts and pathogen adaptation in susceptible hosts.

KEYWORDS

cell death, effectors, innate immunity, PTI, resistance, Xylella

a conserved bacterial type-III effector that promotes virulence

The host exocyst complex is targeted by

Vassiliki A. Michalopoulou (1), ^{1,2} Glykeria Mermigka (2), ² Konstantinos Kotsaridis (1), ^{1,2} Andriani Mentzelopoulou (2), ¹ Patrick H.N. Celie (2), ³ Panagiotis N. Moschou (2), ^{1,2,4} Jonathan D.G. Jones (2), ⁵ and Panagiotis F. Sarris (2), ^{1,2,6}, ¹

- Department of Biology, University of Crete, Heraklion, Crete 714 09, Greece
- Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology-Hellas, Heraldion, Crete 70013, Greece 2
- Division of Biochemistry, the Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands

Department of Plant Biology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala BioCenter, Linnean Center for Plant Biology, Uppsala S-75007, Sweden

THE PLANT CELL 2022: 00: 1-25

The Sainsbury Laboratory, Norwich Research Park, Norwich, UK

6 Biosciences, University of Exeter, Exeter, UK

https://doi.org/10.1093/plcell/koac162

*Author for correspondence: p.sarris@imbb.forthgr

[†]Senior author

PFS, designed the research and supervised the project V.A.M. carried out most of the experiments K.K. and P.H.N.C. purified recombinant proteins and performed in vitro interaction assays; G.M. performed additional experiments and contributed to organizing some of the experiments in the lab. VA.M. performed Arabidopsis transformation; P.N.M. and A.M. contributed to FRET analysis and some confocal microscopy experiments and A.M. and V.A.M performed the statistical analysis. P.F.S. and V.A.M. initiated the project; P.F.S. and V.A.M. wrote the manuscript. P.N.M and J.D.G.J. edited the manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (https://academic.oup.com/pkell) is Panagiotis F. Sarris (psarris@imbb.forth.gr; p.sarris@uoc.gr).

Abstract

For most Gram-negative bacteria, pathogenicity largely depends on the type-III secretion system that delivers virulence effectors into eukaryotic host cells. The subcellular targets for the majority of these effectors remain unknown. Xanthomonas campestris, the causal agent of black rot disease of crucifers such as Brassica spp., radish, and turnip, delivers XopP, a highly conserved core-effector protein produced by X. campestris, which is essential for virulence. Here, we show that XopP inhibits the function of the host-plant exocyst complex by direct targeting of Exo70B, a subunit of the exocyst complex, which plays a significant role in plant immunity. XopP interferes with exocyst-dependent exocytosis and can do this without activating a plant NOD-like receptor that guards Exo70B in Arabidopsis. In this way, Xanthomonas efficiently inhibits the host's pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity by blocking exocytosis of pathogenesis-related protein-1A, callose deposition, and localization of the FLAGELLIN SENSITIVE2 (FLS2) immune receptor to the plasma membrane, thus promoting successful infection. Inhibition of exocyst function without activating the related defenses represents an effective virulence strategy, indicating the ability of pathogens to adapt to host defenses by avoiding host immunity responses.

Received April 29, 2021. Accepted May 23, 2022. Advance access publication May 30, 2022

American Society of Plant Biologists 2022. All rights reserved. For permis ase emaik journals.permi





Check for updates

Understanding enemy's weapons to an effective prevention: common virulence effects across microbial phytopathogens kingdoms

Konstantinos Kotsaridis^a* (b), Dimitra Tsakiri^a* (b) and Panagiotis F. Sarris^{a,b,c} (b)

^aDepartment of Biology, University of Crete, Crete, Greece; ^bInstitute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology-Hellas, Crete, Greece; ^cBiosciences, University of Exeter, Exeter, UK

ABSTRACT

Plant-pathogens interaction is an ongoing confrontation leading to the emergence of new diseases. The majority of the invading microorganisms inject effector proteins into the host cell, to bypass the sophisticated defense system of the host. However, the effectors could also have other specialized functions, which can disrupt various biological pathways of the host cell. Pathogens can enrich their effectors arsenal to increase infection success or expand their host range. This usually is accomplished by the horizontal gene transfer. Nowadays, the development of specialized software that can predict proteins structure, has changed the experimental designing in effectors' function research. Different effectors of distinct plant pathogens tend to fold alike and have the same function and focussed structural studies on microbial effectors can help to uncover their catalytic/functional activities, while the structural similarity can enable cataloguing the great number of pathogens' effectors. In this review, we collectively present phytopathogens' effectors with known enzymatic functions and proteins structure, originated from all the kingdoms of microbial plant pathogens. Presentation of their common domains and motifs is also included. We believe that the in-depth understanding of the enemy's weapons will help the development of new strategies to prevent newly emerging or re-emerging plant pathogens.

ARTICLE HISTORY

Received 10 March 2022 Revised 18 May 2022 Accepted 25 May 2022 Published online 16 June 2022

KEYWORDS

Plant pathogens; virulence effectors; common protein functions; conserved protein domains; effectors' structure
Ralstonia solanacearum core effector RipE1 interacts and cleaves the Arabidopsis exocyst component Exo70B1

4	
4	Dimiter Terkinile Konstanting Katerilile Versilili (Michaelenseler) Michael
5	Dimitra Isakiri [*] , Konstantinos Kotsariais [*] , Vassiliki A. Michalopoulou, Michael
6	Kokkinidis ^{1,2} , Panagiotis F. Sarris ^{1,2,5} *
7	
8	¹ Department of Biology, University of Crete, 714 09 Heraklion, Crete, Greece,
9	² Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology-Hellas,
10	Heraklion, Crete, Greece,
11	⁹ Biosciences, University of Exeter, Exeter, United Kingdom.
12	
13	*Conversion ding Anthony
14	Professor Panagiotis E. Sarris: a sarris@imbb forth ar: a sarris@uoo.ar
15	Projessor Fundgious F. surris. <u>p.sarris@into.rorul.gr</u> , <u>p.sarris@uoc.gr</u>
16	
17	Revel contribution
17	Equal contribution
18	
19	Keywords
20	Pathogen effector, T3E, Plant defense, Cysteine protease, T3SS, exocyst complex
21	
22	
22	

23 Abstract

24 Ralstonia solanacearum depends on numerous virulence factors, also known as effectors, to 25 promote disease in a wide range of economically important host-plants. Although some of these effectors have been characterized, none has been shown to target the host's secretion machinery 26 27 so far. Here, a screening was performed, using an extended library of NLR plant immune 28 receptors' integrated domains (IDs), to identify new effector targets. The results uncovered that the core effector RipE1, of the R. solanacearum species complex, among other targets, associates 29 with Arabidopsis exocyst component Exo70B1. RipE1, in accordance with its predicted cysteine 30 31 protease activity, cleaves Exo70B1 in vitro between its sequence and is able to promote Exo70B1 degradation in planta. RipE1 enzymatic activity additionally results in the activation of TN2-32 33 dependent cell death. TN2 is an atypical NLR that has been proposed to guard Exo70B1. Despite the fact that RipE1 has been previously reported to activate defense responses in model plant 34 35 species, we present here a Nicotiana species, in which RipE1 expression does not activate cell death. Overall, this study uncovers a new RipE1 host target, while providing evidence and novel 36 37 tools to advance in-depth studies of RipE1 and homologues effectors.

1 The functional and structural characterization of

```
    Xanthomonas campestris pv. campestris core effector XopP
    revealed a new kinase activity
```

- 4
- 5 Konstantinos Kotsaridis^{1,2}, Vassiliki A. Michalopoulou^{1,2}, Dimitra Tsakiri¹, Dina
- 6 Kotsifaki¹, Aikaterini Kefala^{1,2}, Nikolaos Koundourakis², Patrick H.N. Celie⁴, Michael
- 7 Kokkinidis^{1,2}, Panagiotis F. Sarris^{1,2,3}*
- 8
- ¹Department of Biology, University of Crete, 714 09 Heraklion, Crete, Greece.
- 10 ²Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology-Hellas,
- 11 Heraklion, Crete, Greece.
- 12 ³ Biosciences, University of Exeter, Exeter, United Kingdom.
- 13 ⁴ Division of Biochemistry, the Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands.
- 14

15*Corresponding Author:

- 17 Professor Panagiotis F. Sarris: p.sarris@imbb.forth.gr; p.sarris@uoc.gr
- 18

19 Keywords

20 Alphafold, Pathogen effector, Plant defense, Novel kinase, T3SS, Exo70B1, Exocyst

21

33 Summary

The exocyst complex subunit protein Exo70B1 plays a crucial role in a variety of cell mechanisms including immune responses against pathogens. The calcium dependent kinase 5 (CPK5) of *Arapidopsis thaliana*, phosphorylates *At*Exo70B1 upon functional disruption. We previously reported that, the *Xanthomonas campestris* pv. *campestis* effector XopP, compromises Exo70B1 and bypasses the host's hypersensitive response (HR), in a way that is still unclear.

Herein we designed an experimental approach based on biophysical, biochemical
 and molecular assays, based on structural and functional predictions, as well as,
 utilizing Aplhafold and DALI online servers respectively, in order to characterize
 the *in vivo Xcc*XopP function.

The interaction between *At*Exo70B1 and *Xcc*XopP is very stable in high temperatures, while the *At*Exo70B1 appeared to be phosphorylated at *Xcc*XopP expressing transgenic *Arabidopsis*. *Xcc*XopP reveals similarities with known mammalian kinases, and phosphorylates *At*Exo70B1 at Ser107, Ser111, Ser248, Thr309 and Thr364. Furthermore, *Xcc*XopP protects *At*Exo70B1 from *At*CPK5 phosphorylation.

50 Together these findings show that, *Xcc*XopP is an effector, which not only 51 functions as a novel serine/threonine kinase upon its host's protein target 52 *At*Exo70B1, but also protects the latter from the innate AtCPK5 phosphorylation, 53 to bypass the host's immune responses.

Παράρτημα Α. Συνθήκες Κρυστάλλωσης πρωτεϊνών



Grid Screen[™] PEG 6000 (Hampton Research)

1. 0.1 M Citric acid pH 4.0, 5% w/v Polyethylene glycol 6,000 2. 0.1 M Citric acid pH 5.0, 5% w/v Polyethylene glycol 6,000 3. 0.1 M MES monohydrate pH 6.0, 5% w/v Polyethylene glycol 6,000 4. 0.1 M HEPES pH 7.0, 5% w/v Polyethylene glycol 6,000 5. 0.1 M Tris pH 8.0, 5% w/v Polyethylene glycol 6,000 6. 0.1 M BICINE pH 9.0, 5% w/v Polyethylene glycol 6,000 7. 0.1 M Citric acid pH 4.0, 10% w/v Polyethylene glycol 6,000 8. 0.1 M Citric acid pH 5.0, 10% w/v Polyethylene glycol 6,000 9. 0.1 M MES monohydrate pH 6.0, 10% w/v Polyethylene glycol 6,000 10. 0.1 M HEPES pH 7.0, 10% w/v Polyethylene glycol 6,000 11. 0.1 M Tris pH 8.0, 10% w/v Polyethylene glycol 6,000 12. 0.1 M BICINE pH 9.0, 10% w/v Polyethylene glycol 6,000 13. 0.1 M Citric acid pH 4.0, 20% w/v Polyethylene glycol 6,000 14. 0.1 M Citric acid pH 5.0, 20% w/v Polyethylene glycol 6,000 15. 0.1 M MES monohydrate pH 6.0, 20% w/v Polyethylene glycol 6,000 16. 0.1 M HEPES pH 7.0, 20% w/v Polyethylene glycol 6,000 17. 0.1 M Tris pH 8.0, 20% w/v Polyethylene glycol 6,000 18. 0.1 M BICINE pH 9.0, 20% w/v Polyethylene glycol 6,000 19. 0.1 M Citric acid pH 4.0, 30% w/v Polyethylene glycol 6,000 20. 0.1 M Citric acid pH 5.0, 30% w/v Polyethylene glycol 6,000 21. 0.1 M MES monohydrate pH 6.0, 30% w/v Polyethylene glycol 6,000 22. 0.1 M HEPES pH 7.0, 30% w/v Polyethylene glycol 6,000 23. 0.1 M Tris pH 8.0, 30% w/v Polyethylene glycol 6,000 24. 0.1 M BICINE pH 9.0, 30% w/v Polyethylene glycol 6,000

Grid ScreenTM MDP (Hampton Research)

0.1 M Citric acid pH 4.0, 10% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 5.0, 10% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M MES monohydrate pH 6.0, 10% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M HEPES pH 7.0, 10% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M Tris pH 8.0, 10% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M BICINE pH 9.0, 10% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M Citric acid pH 4.0, 20% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 5.0, 20% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M MES monohydrate pH 6.0, 20% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M MES monohydrate pH 6.0, 20% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M MES pH 7.0, 20% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M Tris pH 8.0, 20% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M Tris pH 8.0, 20% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M Tris pH 8.0, 20% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M DICINE pH 9.0, 20% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M Tris pH 8.0, 20% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M Citric acid pH 4.0, 40% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
 0.1 M Citric acid pH 4.0, 40% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol

15. 0.1 M MES monohydrate pH 6.0, 40% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol

16. 0.1 M HEPES pH 7.0, 40% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
17. 0.1 M Tris pH 8.0, 40% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
18. 0.1 M BICINE pH 9.0, 40% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
19. 0.1 M Citric acid pH 4.0, 65% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
20. 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 5.0, 65% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
21. 0.1 M MES monohydrate pH 6.0, 65% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
22. 0.1 M HEPES pH 7.0, 65% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
23. 0.1 M Tris pH 8.0, 65% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
24. 0.1 M BICINE pH 9.0, 65% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol

Grid Screen[™] Ammonium Sulfate (Hampton Research)

- 1. 0.1 M Citric acid pH 4.0, 0.8 M Ammonium sulfate 2. 0.1 M Citric acid pH 5.0, 0.8 M Ammonium sulfate 3. 0.1 M MES monohydrate pH 6.0, 0.8 M Ammonium sulfate 4. 0.1 M HEPES pH 7.0, 0.8 M Ammonium sulfate 5. 0.1 M Tris pH 8.0, 0.8 M Ammonium sulfate 6. 0.1 M BICINE pH 9.0, 0.8 M Ammonium sulfate 7. 0.1 M Citric acid pH 4.0, 1.6 M Ammonium sulfate 8. 0.1 M Citric acid pH 5.0, 1.6 M Ammonium sulfate 9. 0.1 M MES monohydrate pH 6.0, 1.6 M Ammonium sulfate 10. 0.1 M HEPES pH 7.0, 1.6 M Ammonium sulfate 11. 0.1 M Tris pH 8.0, 1.6 M Ammonium sulfate 12. 0.1 M BICINE pH 9.0, 1.6 M Ammonium sulfate 13. 0.1 M Citric acid pH 4.0, 2.4 M Ammonium sulfate 14. 0.1 M Citric acid pH 5.0, 2.4 M Ammonium sulfate 15. 0.1 M MES monohydrate pH 6.0, 2.4 M Ammonium sulfate 16. 0.1 M HEPES pH 7.0, 2.4 M Ammonium sulfate 17. 0.1 M Tris pH 8.0, 2.4 M Ammonium sulfate 18. 0.1 M BICINE pH 9.0, 2.4 M Ammonium sulfate 19. 0.1 M Citric acid pH 4.0, 3.0 M Ammonium sulfate 20. 0.1 M Citric acid pH 5.0, 3.0 M Ammonium sulfate 21. 0.1 M MES monohydrate pH 6.0, 3.0 M Ammonium sulfate 22. 0.1 M HEPES pH 7.0, 3.0 M Ammonium sulfate 23. 0.1 M Tris pH 8.0, 3.0 M Ammonium sulfate
- 24. 0.1 M BICINE pH 9.0, 3.0 M Ammonium sulfate

Structure Screen 1 + 2 (Molecular Dimensions)

1. 0.02 M Calcium chloride dihydrate 0.1 M Sodium acetate 4.6 30 % v/v MPD

2. 0.2 M Ammonium acetate 0.1 M Sodium acetate 4.6 30 % w/v PEG 4000

3. 0.2 M Ammonium sulfate 0.1 M Sodium acetate 4.6 25 % w/v PEG 4000

4. 2.0 M Sodium formate 0.1 M Sodium acetate 4.6

5. 2.0 M Ammonium sulfate 0.1 M Sodium acetate 4.6

6. 0.1 M Sodium acetate 4.6 8 % w/v PEG 4000

7. 0.2 M Ammonium acetate 0.1 M Sodium citrate 5.6 30 % w/v PEG 4000

8. 0.2 M Ammonium acetate 0.1 M Sodium citrate 5.6 30 % v/v MPD

9. 0.1 M Sodium citrate 5.6 20 % w/v PEG 4000 20 % v/v 2-Propanol

10. 1.0 M Ammonium phosphate monobasic 0.1 M Sodium citrate 5.6

11. 0.2 M Calcium chloride dihydrate 0.1 M Sodium acetate 4.6 20 % v/v 2-Propanol

12. 1.4 M Sodium acetate trihydrate 0.1 M Sodium cacodylate 6.5

13. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate 0.1 M Sodium cacodylate 6.5 30 % v/v 2-Propanol

14. 0.2 M Ammonium sulfate 0.1 M Sodium cacodylate 6.5 30 % w/v PEG 8000

15. 0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate 0.1 M Sodium cacodylate 6.5 20 % w/v PEG 8000

16. 0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate 0.1 M Sodium cacodylate 6.5 30 % v/v MPD

17. 1.0 M Sodium acetate trihydrate 0.1 M Imidazole 6.5

18. 0.2 M Sodium acetate trihydrate 0.1 M Sodium cacodylate 6.5 30 % w/v PEG 8000

19. 0.2 M Zinc acetate dihydrate 0.1 M Sodium cacodylate 6.5 18 % w/v PEG 8000

20. 0.2 M Calcium acetate hydrate 0.1 M Sodium cacodylate 6.5 18 % w/v PEG 8000

21. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate 0.1 M Sodium HEPES 7.5 30 % v/v MPD

22. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M Sodium HEPES 7.5 30 % v/v 2-Propanol

23. 0.2 M Calcium chloride dihydrate 0.1 M Sodium HEPES 7.5 28 % v/v PEG 400

24. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M Sodium HEPES 7.5 30 % v/v PEG 400

25. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate 0.1 M Sodium HEPES 7.5 20 % v/v 2-Propanol

26. 0.8 M Potasium sodium tartrate tetrahydrate 0.1 M Sodium HEPES 7.5

27. 1.5 M Lithium sulfate 0.1 M Sodium HEPES 7.5

28. 0.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate/ 0.1 M Sodium HEPES 7.5 0.8 M Potasium phosphate monobasic

29. 1.4 M Sodium citrate tribasic dihydrate 0.1 M Sodium HEPES 7.5

30. 2.0 M Ammonium sulfate 0.1 M Sodium HEPES 7.5 2 % v/v PEG 400

31. 0.1 M Sodium HEPES 7.5 20 % w/v PEG 4000 10 % v/v 2-Propanol

32. 2.0 M Ammonium sulfate 0.1 M Tris 8.5

33. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M Tris 8.5 30 % w/v PEG 4000

34. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate 0.1 M Tris 8.5 30 % v/v PEG 400

- 35. 0.2 M Lithium sulfate 0.1 M Tris 8.5 30 % w/v PEG 4000
- 36. 0.2 M Ammonium acetate 0.1 M Tris 8.5 30 % v/v 2-Propanol
- 37. 0.2 M Sodium acetate trihydrate 0.1 M Tris 8.5 30 % w/v PEG 4000
- 38. 0.1 M Tris 8.5 8 % w/v PEG 8000
- 39. 2.0 M Ammonium phosphate monobasic 0.1 M Tris 8.5
- 40. 0.4 M Potasium sodium tartrate tetrahydrate
- 41. 0.4 M Ammonium phosphate monobasic
- 42. 0.2 M Ammonium sulfate 30 % w/v PEG 8000
- 43. 0.2 M Ammonium sulfate 30 % w/v PEG 4000
- 44. 2.0 M Ammonium sulfate
- 45. 4.0 M Sodium formate
- 46. 0.05 M Potassium phosphate monobasic 20 % w/v PEG 8000
- 47. 30 % w/v PEG 1500
- 48. 0.2 M Magnesium formate dihydrate
- 49. 0.1 M Sodium chloride 0.1 M BICINE 9.0 30 % v/v PEG 500 MME
- 50. 2.0 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M BICINE 9.0
- 51. 0.1 M BICINE 9.0 10 % w/v PEG 20000 2 % v/v 1,4-Dioxane
- 52. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M Tris 8.5 3.4 M 1,6-Hexanediol
- 53. 0.1 M Tris 8.5 25 % v/v tert-Butanol
- 54. 1.0 M Lithium sulfate/ 0.1 M Tris 8.5
- 55. 0.01 M Nickel(II) chloride hexahydrate
- 56. 1.5 M Ammonium sulfate 0.1 M Tris 8.5 12 % v/v Glycerol
- 57. 0.2 M Ammonium phosphate monobasic 0.1 M Tris 8.5 50 % v/v MPD
- 58. 0.1 M Tris 8.5 20 % v/v Ethanol
- 59. 0.01 M Nickel(II) chloride hexahydrate 0.1 M Tris 8.5 20 % w/v PEG 2000 MME
- 60. 0.5 M Ammonium sulfate 0.1 M Sodium HEPES 7.5 30 % v/v MPD
- 61. 0.1 M Sodium HEPES 7.5 10 % w/v PEG 6000 5 % v/v MPD
- 62. 1.6 M Ammonium sulfate/ 0.1 M Sodium HEPES 7.5 0.1 M Sodium chloride
- 63. 2.0 M Ammonium formate 0.1 M Sodium HEPES 7.5

64. 1.0 M Sodium acetate trihydrate 0.1 M Sodium HEPES 7.5 0.05 M Cadmium sulfate 8/3-hydrate

- 65. 0.1 M Sodium HEPES 7.5 70 % v/v MPD
- 66. 4.3 M Sodium chloride 0.1 M Sodium HEPES 7.5
- 67. 0.1 M Sodium HEPES 7.5 10 % w/v PEG 8000 8 % v/v Ethylene glycol
- 68. 1.6 M Magnesium sulfate heptahydrate 0.1 M MES 6.5
- 69. 2.0 M Sodium chloride/ 0.1 M MES 6.5 0.1 M Potassium phosphate monobasic/
- 0.1 M Sodium phosphate monobasic monohydrate
- 70. 0.1 M MES 6.5 12 % w/v PEG 20000
- 71. 1.6 M Ammonium sulfate 0.1 M MES 6.5 10 % v/v 1,4-Dioxane
- 72. 0.05 M Cesium chloride 0.1 M MES 6.5 30 % v/v Jeffamine® M-600
- 73. 0.01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate 0.1 M MES 6.51.8 M Ammonium sulfate
- 74. 0.2 M Ammonium sulfate 0.1 M MES 6.5 30 % w/v PEG 5000 MME
- 75. 0.01 M Zinc sulfate heptahydrate 0.1 M MES 6.5 25 % v/v PEG 500 MME
- 76. 0.1 M Sodium HEPES 7.5 20 % w/v PEG 10000

77. 2.0 M Ammonium sulfate 0.1 M Sodium citrate 5.6 0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate

78. 1.0 M Lithium sulfate 0.1 M Sodium citrate 5.6 0.5 M Ammonium sulfate

79. 0.5 M Sodium chloride 0.1 M Sodium citrate 5.6 4 % v/v Polyethyleneimine

80. 0.1 M Sodium citrate 5.6 35 % v/v tert-Butanol

81. 0.01 M Iron(III) chloride hexahydrate 0.1 M Sodium citrate 5.6 10 % v/v Jeffamine® M-600

82. 0.01 M Manganese(II) chloride tetrahydrate 0.1 M Sodium citrate 5.6 2.5 M 1,6-Hexanediol

83. 2.0 M Sodium chloride 0.1 M Sodium acetate 4.6

84. 0.2 M Sodium chloride 0.1 M Sodium acetate 4.6 30 % v/v MPD

85. 0.01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate 0.1 M Sodium acetate 4.6 1.0 M 1,6-Hexanediol

86. 0.1 M Cadmium chloride hemi(pentahydrate) 0.1 M Sodium acetate 4.6 30 % v/v PEG 400

87. 0.2 M Ammonium sulfate 0.1 M Sodium acetate 4.6 30 % w/v PEG 2000 MME

88. 2.0 M Sodium chloride 10 % w/v PEG 6000

89. 0.5 M Sodium chloride/0.1 M Magnesium chloride hexahydrate/0.01 M CTAB

- 90. 25 % v/v Ethylene glycol
- 91. 35 % v/v 1,4-Dioxane
- 92. 2.0 M Ammonium sulfate 5 % v/v 2-Propanol
- 93. 1.0 M Imidazole 7.0
- 94. 10 % w/v PEG 1000 10 % w/v PEG 8000
- 95. 1.5 M Sodium chloride 10 % v/v Ethanol
- 96. 1.6 M Sodium citrate 6.5

PACT premier[™] (Molecular Dimensions)

- 1. 0.1 M SPG 4.0 25 % w/v PEG 1500
- 2. 0.1 M SPG 5.0 25 % w/v PEG 1500
- 3. 0.1 M SPG 6.0 25 % w/v PEG 1500
- 4. 0.1 M SPG 7.0 25 % w/v PEG 1500
- 5. 0.1 M SPG 8.0 25 % w/v PEG 1500
- 6. 0.1 M SPG 9.0 25 % w/v PEG 1500
- 7. 0.2 M Sodium chloride 0.1 M Sodium acetate 5.0 20 % w/v PEG 6000
- 8. 0.2 M Ammonium chloride 0.1 M Sodium acetate 5.0 20 % w/v PEG 6000
- 9. 0.2 M Lithium chloride 0.1 M Sodium acetate 5.0 20 % w/v PEG 6000

10. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M Sodium acetate 5.0 20 % w/v PEG 6000

11. 0.2 M Calcium chloride dihydrate 0.1 M Sodium acetate 5.0 20 % w/v PEG 6000

- 12. 0.01 M Zinc chloride 0.1 M Sodium acetate 5.0 20 % w/v PEG 6000
- 13. 0.1 M MIB 4.0 25 % w/v PEG 1500
- 14. 0.1 M MIB 5.0 25 % w/v PEG 1500

15. 0.1 M MIB 6.0 25 % w/v PEG 1500 16. 0.1 M MIB 7.0 25 % w/v PEG 1500 17. 0.1 M MIB 8.0 25 % w/v PEG 1500 18. 0.1 M MIB 9.0 25 % w/v PEG 1500 19. 0.2 M Sodium chloride 0.1 M MES 6.0 20 % w/v PEG 6000 20. 0.2 M Ammonium chloride 0.1 M MES 6.0 20 % w/v PEG 6000 21. 0.2 M Lithium chloride 0.1 M MES 6.0 20 % w/v PEG 6000 22. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M MES 6.0 20 % w/v PEG 6000 23. 0.2 M Calcium chloride dihydrate 0.1 M MES 6.0 20 % w/v PEG 6000 24. 0.01 M Zinc chloride 0.1 M MES 6.0 20 % w/v PEG 6000 25. 0.1 M PCTP 4.0 25 % w/v PEG 1500 26. 0.1 M PCTP 5.0 25 % w/v PEG 1500 27. 0.1 M PCTP 6.0 25 % w/v PEG 1500 28. 0.1 M PCTP 7.0 25 % w/v PEG 1500 29. 0.1 M PCTP 8.0 25 % w/v PEG 1500 30. 0.1 M PCTP 9.0 25 % w/v PEG 1500 31. 0.2 M Sodium chloride 0.1 M HEPES 7.0 20 % w/v PEG 6000 32. 0.2 M Ammonium chloride 0.1 M HEPES 7.0 20 % w/v PEG 6000 33. 0.2 M Lithium chloride 0.1 M HEPES 7.0 20 % w/v PEG 6000 34. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M HEPES 7.0 20 % w/v PEG 6000 35. 0.2 M Calcium chloride dihydrate 0.1 M HEPES 7.0 20 % w/v PEG 6000 36. 0.01 M Zinc chloride 0.1 M HEPES 7.0 20 % w/v PEG 6000 37. 0.1 M MMT 4.0 25 % w/v PEG 1500 38. 0.1 M MMT 5.0 25 % w/v PEG 1500 39. 0.1 M MMT 6.0 25 % w/v PEG 1500 40. 0.1 M MMT 7.0 25 % w/v PEG 1500 41. 0.1 M MMT 8.0 25 % w/v PEG 1500 42. 0.1 M MMT 9.0 25 % w/v PEG 1500 43. 0.2 M Sodium chloride 0.1 M Tris 8.0 20 % w/v PEG 6000 44. 0.2 M Ammonium chloride 0.1 M Tris 8.0 20 % w/v PEG 6000 45. 0.2 M Lithium chloride 0.1 M Tris 8.0 20 % w/v PEG 6000 46. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M Tris 8.0 20 % w/v PEG 6000 47. 0.2 M Calcium chloride dihydrate 0.1 M Tris 8.0 20 % w/v PEG 6000 48. 0.002 M Zinc chloride 0.1 M Tris 8.0 20 % w/v PEG 6000 49. 0.2 M Sodium fluoride 20 % w/v PEG 3350 50. 0.2 M Sodium bromide 20 % w/v PEG 3350 51. 0.2 M Sodium iodide 20 % w/v PEG 3350 52. 0.2 M Potassium thiocyanate 20 % w/v PEG 3350 53. 0.2 M Sodium nitrate 20 % w/v PEG 3350 54. 0.2 M Sodium formate 20 % w/v PEG 3350 55. 0.2 M Sodium acetate trihydrate 20 % w/v PEG 3350 56. 0.2 M Sodium sulfate 20 % w/v PEG 3350 57. 0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate 20 % w/v PEG 3350 58. 0.02 M Sodium/potassium phosphate 20 % w/v PEG 3350

59. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate 20 % w/v PEG 3350

60. 0.2 M Sodium malonate dibasic monohydrate 20 % w/v PEG 3350

61. 0.2 M Sodium fluoride 0.1 M Bis-Tris propane 6.5 20 % w/v PEG 3350

62. 0.2 M Sodium bromide 0.1 M Bis-Tris propane 6.5 20 % w/v PEG 3350

63. 0.2 M Sodium iodide 0.1 M Bis-Tris propane 6.5 20 % w/v PEG 3350

64. 0.2 M Potassium thiocyanate 0.1 M Bis-Tris propane 6.5 20 % w/v PEG 3350

65. 0.2 M Sodium nitrate 0.1 M Bis-Tris propane 6.5 20 % w/v PEG 3350

66. 0.2 M Sodium formate 0.1 M Bis-Tris propane 6.5 20 % w/v PEG 3350

67. 0.2 M Sodium acetate trihydrate 0.1 M Bis-Tris propane 6.5 20 % w/v PEG 3350

68. 0.2 M Sodium sulfate 0.1 M Bis-Tris propane 6.5 20 % w/v PEG 3350

69. 0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate 0.1 M Bis-Tris propane 6.5 20 % w/v PEG 3350

70. 0.02 M Sodium/potassium phosphate 0.1 M Bis-Tris propane 6.5 20 % w/v PEG 3350

71. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate 0.1 M Bis-Tris propane 6.5 20 % w/v PEG 3350

72. 0.2 M Sodium malonate dibasic monohydrate 0.1 M Bis-Tris propane 6.5 20 % w/v PEG 3350

73. 0.2 M Sodium fluoride 0.1 M Bis-Tris propane 7.5 20 % w/v PEG 3350

74. 0.2 M Sodium bromide 0.1 M Bis-Tris propane 7.5 20 % w/v PEG 3350

75. 0.2 M Sodium iodide 0.1 M Bis-Tris propane 7.5 20 % w/v PEG 3350

76. 0.2 M Potassium thiocyanate 0.1 M Bis-Tris propane 7.5 20 % w/v PEG 3350

77. 0.2 M Sodium nitrate 0.1 M Bis-Tris propane 7.5 20 % w/v PEG 3350

78. 0.2 M Sodium formate 0.1 M Bis-Tris propane 7.5 20 % w/v PEG 3350

79. 0.2 M Sodium acetate trihydrate 0.1 M Bis-Tris propane 7.5 20 % w/v PEG 3350

80. 0.2 M Sodium sulfate 0.1 M Bis-Tris propane 7.5 20 % w/v PEG 3350

81. 0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate 0.1 M Bis-Tris propane 7.5 20 % w/v PEG 3350

82. 0.02 M Sodium/potassium phosphate 0.1 M Bis-Tris propane 7.5 20 % w/v PEG 3350

83. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate 0.1 M Bis-Tris propane 7.5 20 % w/v PEG 3350

84. 0.2 M Sodium malonate dibasic monohydrate 0.1 M Bis-Tris propane 7.5 20 % w/v PEG 3350

85. 0.2 M Sodium fluoride 0.1 M Bis-Tris propane 8.5 20 % w/v PEG 3350

86. 0.2 M Sodium bromide 0.1 M Bis-Tris propane 8.5 20 % w/v PEG 3350

87. 0.2 M Sodium iodide 0.1 M Bis-Tris propane 8.5 20 % w/v PEG 3350

88. 0.2 M Potassium thiocyanate 0.1 M Bis-Tris propane 8.5 20 % w/v PEG 3350

89. 0.2 M Sodium nitrate 0.1 M Bis-Tris propane 8.5 20 % w/v PEG 3350

90. 0.2 M Sodium formate 0.1 M Bis-Tris propane 8.5 20 % w/v PEG 3350

91. 0.2 M Sodium acetate trihydrate 0.1 M Bis-Tris propane 8.5 20 % w/v PEG 3350

92. 0.2 M Sodium sulfate 0.1 M Bis-Tris propane 8.5 20 % w/v PEG 3350

93. 0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate 0.1 M Bis-Tris propane 8.5 20 % w/v PEG 3350

94. 0.02 M Sodium/potassium phosphate 0.1 M Bis-Tris propane 8.5 20 % w/v PEG 3350

95. 0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate 0.1 M Bis-Tris propane 8.5 20 % w/v PEG 3350

96. 0.2 M Sodium malonate dibasic monohydrate 0.1 M Bis-Tris propane 8.5 20 % w/v PEG 3350

JCSG-plus (Molecular Dimensions)

- 1. 0.2 M Lithium sulfate 0.1 M Sodium acetate 4.5 50 % w/v PEG 400
- 2. 0.1 M Sodium citrate 5.5 20 % w/v PEG 3000
- 3. 0.2 M Ammonium citrate dibasic 20 % w/v PEG 3350
- 4. 0.02 M Calcium chloride dihydrate 0.1 M Sodium acetate 4.6 30 % v/v MPD
- 5. 0.2 M Magnesium formate dihydrate 20 % w/v PEG 3350
- 6. 0.2 M Lithium sulfate 0.1 M Phosphate/citrate 4.2 20 % w/v PEG 1000
- 7. 0.1 M CHES 9.5 20 % w/v PEG 8000
- 8. 0.2 M Ammonium formate 20 % w/v PEG 3350
- 9. 0.2 M Ammonium chloride 20 % w/v PEG 3350
- 10. 0.2 M Potassium formate 20 % w/v PEG 3350
- 11. 0.2 M Ammonium phosphate monobasic 0.1 M Tris 8.5 50 % v/v MPD
- 12. 0.2 M Potassium nitrate 20 % w/v PEG 3350
- 13. 0.8 M Ammonium sulfate 0.1 M Citrate 4.0
- 14. 0.2 M Sodium thiocyanate 20 % w/v PEG 3350
- 15. 0.1 M BICINE 9.0 20 % w/v PEG 6000
- 16. 0.1 M HEPES 7.5 10 % w/v PEG 8000 8 % v/v Ethylene glycol
- 17. 0.1 M Sodium cacodylate 6.5 40 % v/v MPD 5 % w/v PEG 8000
- 18. 0.1 M Phosphate/citrate 4.2 40 % v/v Ethanol 5 % w/v PEG 1000
- 19. 0.1 M Sodium acetate 4.6 8 % w/v PEG 4000
- 20. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M Tris 7.0 10 % w/v PEG 8000
- 21. 0.1 M Citrate 5.0 20 % w/v PEG 6000
- 22. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M Sodium cacodylate 6.5 50 % v/v PEG 200
- 23. 1.6 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 6.5
- 24. 0.2 M Potassium citrate tribasic monohydrate 20 % w/v PEG 3350
- 25. 0.2 M Sodium chloride 0.1 M Phosphate/citrate 4.2 20 % w/v PEG 8000
- 26. 1.0 M Lithium chloride 0.1 M Citrate 4.0 20 % w/v PEG 6000
- 27. 0.2 M Ammonium nitrate 20 % w/v PEG 3350
- 28. 0.1 M HEPES 7.0 10 % w/v PEG 6000
- 29. 0.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate 0.1 M Sodium HEPES 7.5 0.80 M Potassium phosphate monobasic
- 30. 0.1 M Phosphate/citrate 4.2 40 % v/v PEG 300
- 31. 0.2 M Zinc acetate dihydrate 0.1 M Sodium acetate 4.5 10 % w/v PEG 3000
- 32. 0.1 M Tris 8.5 20 % v/v Ethanol
- 33. 0.1 M Sodium/potassium phosphate 6.2 25 % v/v 1,2-Propandiol
- 10 %v/v Glycerol

34. 0.1 M BICINE 9.0 10 % w/v PEG 20,0002 % v/v 1,4-Dioxane

35. 2.0 M Ammonium sulfate 0.1 M Sodium acetate 4.6

36.10 % w/v PEG 1000 10 % w/v PEG 8000

37. 24 % w/v PEG 1500 20 % v/v Glycerol

38. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M Sodium HEPES 7.5 30 % v/v PEG 400

39. 0.2 M Sodium chloride 0.1 M Sodium/potassium phosphate 6.2 50 % v/v PEG 200

40. 0.2 M Lithium sulfate 0.1 M Sodium acetate 4.5 30 % w/v PEG 8000

- 41. 0.1 M HEPES 7.5 70 % v/v MPD
- 42. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M Tris 8.5 20 % w/v PEG 8000
- 43. 0.2 M Lithium sulfate 0.1 M Tris 8.5 40 % v/v PEG 400
- 44. 0.1 M Tris 8.0 40 % v/v MPD
- 45. 0.17 M Ammonium sulfate 25.5 % w/v PEG 4000 15 % v/v Glycerol
- 46. 0.2 M Calcium acetate hydrate 0.1 M Sodium cacodylate 6.5 40 % v/v PEG 300

47. 0.14 M Calcium chloride dihydrate 0.07 M Sodium acetate 4.6 14 % v/v 2-Propanol 30 % v/v Glycerol

- 48. 0.04 M Potassium phosphate monobasic 16 % w/v PEG 8000
- 49. 1.0 M Sodium citrate tribasic dihydrate 0.1 M Sodium cacodylate 6.5
- 50. 2.0 M Ammonium sulfate 0.1 M Sodium cacodylate 6.5 0.2 M Sodium chloride
- 51. 0.2 M Sodium chloride 0.1 M HEPES 7.5 10 % v/v 2-Propanol
- 52. 1.26 M Ammonium sulfate 0.1 M Tris 8.5 0.2 M Lithium sulfate
- 53. 0.1 M CAPS 10.5 40 % v/v MPD
- 54. 0.2 M Zince acetate dihydrate 0.1 M Imidazole 8.0 20 % w/v PEG 3000
- 55. 0.2 M Zinc acetate dihydrate 0.1 M Sodium cacodylate 6.5 10 % v/v 2-Propanol
- 56. 1.0 M Ammonium phosphate dibasic 0.1 M Sodium acetate 4.5
- 57. 1.6 M Magneisum sulfate heptahydrate 0.1 M MES 6.5
- 58. 0.1 M BICINE 9.0 10 % w/v PEG 6000

59. 0.16 M Calcium acetate hydrate 0.08 M Sodium cacodylate 6.5 14.4 % w/v PEG 8000 20 % v/v Glycerol

60. 0.1 M Imidazole 8.0 10 % w/v PEG 8000

- 61. 0.05 M Cesium chloride 0.1 M MES 6.5 30 % v/v Jeffamine® M-600
- 62. 3.2 M Ammonium sulfate 0.1 M Citrate 5.0
- 63. 0.1 M Tris 8.0 20 % v/v MPD
- 64. 0.1 M HEPES 7.5 20 % v/v Jeffamine® M-600
- 65. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M Tris 8.5 50 % v/v Ethylene glycol
- 66. 0.1 M BICINE 9.0 10 % v/v MPD
- 67. 0.8 M Succinic acid pH 7.0
- 68. 2.1 M DL-Malic acid pH 7.0
- 69. 2.4 M Sodium malonate dibasic monohydrate pH 7.0

70. 1.1 M Sodium malonate dibasic monohydrate 0.1 M HEPES 7.0 0.5 % v/v Jeffamine® ED-2003

- 71. 1.0 M Succinic acid 0.1 M HEPES 7.0 1 % w/v PEG 2000 MME
- 72. 0.1 M HEPES 7.0 30 % v/v Jeffamine® M-600

73. 0.1 M HEPES 7.0 30 % v/v Jeffamine® ED-2003

74. 0.02 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M HEPES 7.5 22 % w/v Poly(acrylic acid sodium salt) 5100

75. 0.01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate 0.1 M Tris 8.5 20 % w/v Polyvinylpyrrolidone

76. 0.2 M TMAO 0.1 M Tris 8.5 20 % w/v PEG 2000 MME

77. 0.005 M Cobalt(II) chloride hexahydrate 0.1 M HEPES 7.5 12 % w/v PEG 3350

0.005 M Cadmium chloride hemi(pentahydrate)

0.005 M Magnesium chloride hexahydrate

0.005 M Nickel(II) chloride hexahydrate

78. 0.2 M Sodium malonate dibasic monohydrate 20 % w/v PEG 3350

79. 0.1 M Succinic acid 15 % w/v PEG 3350

80. 0.15 M DL-Malic acid 20 % w/v PEG 3350

81. 0.1 M Potassium thiocyanate 30 % w/v PEG 2000 MME

82. 0.15 M Potassium bromide 30 % w/v PEG 2000 MME

83. 2.0 M Ammonium sulfate 0.1 M BIS-Tris 5.5

84. 3.0 M Sodium chloride 0.1 M BIS-Tris 5.5

85. 0.3 M Magnesium formate dihydrate 0.1 M BIS-Tris 5.5

86. 1.0 M Ammonium sulfate 0.1 M BIS-Tris 5.5 1 % w/v PEG 3350

87. 0.1 M BIS-Tris 5.5 25 % w/v PEG 3350

88. 0.2 M Calcium chloride dihydrate 0.1 M BIS-Tris 5.5 45 % v/v MPD

89. 0.2 M Ammonium acetate 0.1 M BIS-Tris 5.5 45 % v/v MPD

90. 0.1 M Ammonium acetate 0.1 M BIS-Tris 5.5 17 % w/v PEG 10,000

91. 0.2 M Ammonium sulfate 0.1 M BIS-Tris 5.5 25 % w/v PEG 3350

92. 0.2 M Sodium chloride 0.1 M BIS-Tris 5.5 25 % w/v PEG 3350

93. 0.2 M Lithium sulfate 0.1 M BIS-Tris 5.5 25 % w/v PEG 3350

94. 0.2 M Ammonium acetate 0.1 M BIS-Tris 5.5 25 % w/v PEG 3350

95. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate 0.1 M BIS-Tris 5.5 25 % w/v PEG 3350

96. 0.2 M Ammonium acetate 0.1 M HEPES 7.5 45 % v/v MPD

Παράρτημα Β. Αποτελέσματα του προγράμματος DALI

XopP

No: Chain Z rmsd lali nres %id PDB Description 1: 7pea-A 10.8 16.8 179 2192 6 MOLECULE: SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE MTOR; 2: 4jsx-A 10.6 10.6 207 1054 6 MOLECULE: SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE MTOR; 3: 4jt6-A 10.6 10.2 209 1054 6 MOLECULE: MTOR; 4: 4jsv-A 10.6 10.3 211 1058 8 MOLECULE: SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE MTOR; 5: 4jsv-B 10.4 6.0 180 1058 4 MOLECULE: SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE MTOR; 6: 6xr1-A 10.3 3.7 129 513 13 MOLECULE: DTOR 9X57R; 7: 5cwq-A 10.0 3.1 117 233 10 MOLECULE: DESIGNED HELICAL REPEAT PROTEIN; 8: 7pea-B 10.0 15.0 176 2192 5 MOLECULE: SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE MTOR; 9: 1y1u-B 9.9 22.1 191 544 7 MOLECULE: SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF

RipE1

No:	Chain	Ζ	rmsd	lali	nres	%id	PDB Descri	iption
1:	4fgp−B	7.8	3.7	113	186	9	MOLECULE:	PERIPLASMIC PROTEIN;
2:	4xa9-c	7.8	3.5	138	224	7	MOLECULE:	GALA PROTEIN TYPE 1, 3 OR
4;								
3:	4xa9-g	7.8	3.5	137	225	7	MOLECULE:	GALA PROTEIN TYPE 1, 3 OR
4;								
4:	4fgp-A	7.7	3.7	112	186	10	MOLECULE:	PERIPLASMIC PROTEIN;
5:	4xa9-f	7.7	3.3	135	226	9	MOLECULE:	GALA PROTEIN TYPE 1, 3 OR
4;								
6:	4xa9-h	7.7	3.7	138	229	7	MOLECULE:	GALA PROTEIN TYPE 1, 3 OR
4;								
7:	4xa9-b	7.7	3.8	142	227	8	MOLECULE:	GALA PROTEIN TYPE 1, 3 OR
4;								
8:	4xa9-d	7.7	3.7	142	228	8	MOLECULE:	GALA PROTEIN TYPE 1, 3 OR
4;								
9:	4xa9-e	7.7	3.5	138	227	7	MOLECULE:	GALA PROTEIN TYPE 1, 3 OR
4;								

Παράρτημα Γ. Αποτελέσματα Φασματομετρίας Μάζας

#1	b+	b ²⁺	b ³⁺	Seq.	y ⁺	y ²⁺	У ³⁺	#2
1	130.04987	65.52857	44.02147	E				17
2	316.12918	158.56823	106.04791	W	1925.90132	963.45430	642.63862	16
3	483.12754	242.06741	161.71403	S-Phospho	1739.82200	870.41464	580.61219	15
4	580.18031	290.59379	194.06495	Р	1572.82364	786.91546	524.94607	14
5	711.22079	356.11403	237.74511	Μ	1475.77088	738.38908	492.59514	13
6	782.25790	391.63259	261.42415	А	1344.73040	672.86884	448.91498	12
7	869.28993	435.14860	290.43483	S	1273.69328	637.35028	425.23595	11
8	998.33253	499.66990	333.44903	E	1186.66125	593.83427	396.22527	10
9	1126.42749	563.71738	376.14735	К	1057.61866	529.31297	353.21107	9
10	1223.48025	612.24376	408.49827	Р	929.52370	465.26549	310.51275	8
11	1336.56432	668.78580	446.19296	1	832.47093	416.73911	278.16183	7
12	1393.58578	697.29653	465.20011	G	719.38687	360.19707	240.46714	6
13	1506.66984	753.83856	502.89480	1	662.36541	331.68634	221.45999	5
14	1666.70049	833.85388	556.23835	C-	549.28134	275.14431	183.76530	4
				Carbamidomethyl				
15	1779.78456	890.39592	593.93304	L	389.25069	195.12899	130.42175	3
16	1880.83223	940.91976	627.61560	Т	276.16663	138.58695	92.72706	2
17				R	175.11895	88.06311	59.04450	1

Πίνακας 1. Ο τελεστής ΧορΡ φωσφορυλιώνει την Εχο70Β1 Α) Πεπτίδιο που περιέχει το αμινοξύ S107

B) Πεπτίδιο που περιέχει το αμινοξύ S111

#1	b+	b ²⁺	b ³⁺	Seq.	у *	y ²⁺	y ³⁺	#2
1	130.04987	65.52857	44.02147	E				17
2	316.12918	158.56823	106.04791	W	1941.89623	971.45175	647.97026	16
3	403.16121	202.08424	135.05859	S	1755.81692	878.41210	585.94382	15
4	500.21397	250.61063	167.40951	Р	1668.78489	834.89608	556.93315	14
5	647.24937	324.12833	216.42131	M-Oxidation	1571.73213	786.36970	524.58223	13
6	718.28649	359.64688	240.10035	А	1424.69673	712.85200	475.57043	12
7	885.28485	443.14606	295.76647	S-Phospho	1353.65961	677.33345	451.89139	11
8	1014.32744	507.66736	338.78066	E	1186.66125	593.83427	396.22527	10
9	1142.42240	571.71484	381.47899	К	1057.61866	529.31297	353.21107	9
10	1239.47517	620.24122	413.82991	Р	929.52370	465.26549	310.51275	8
11	1352.55923	676.78325	451.52459	1	832.47093	416.73911	278.16183	7
12	1409.58069	705.29399	470.53175	G	719.38687	360.19707	240.46714	6
13	1522.66476	761.83602	508.22644	1	662.36541	331.68634	221.45999	5
14	1682.69541	841.85134	561.56999	C-	549.28134	275.14431	183.76530	4
				Carbamidomethyl				
15	1795.77947	898.39337	599.26467	L	389.25069	195.12899	130.42175	3
16	1896.82715	948.91721	632.94723	Т	276.16663	138.58695	92.72706	2
17				R	175.11895	88.06311	59.04450	1

#1	b+	b ²⁺	b ³⁺	Seq.	y ⁺	y ²⁺	y ³⁺	#2
1	114.09134	57.54931	38.70196	L				20
2	281.08970	141.04849	94.36808	S-Phospho	2463.08978	1232.04853	821.70144	19
3	394.17376	197.59052	132.06277	1	2296.09142	1148.54935	766.03533	18
4	523.21636	262.11182	175.07697	E	2183.00736	1092.00732	728.34064	17
5	652.25895	326.63311	218.09117	E	2053.96477	1027.48602	685.32644	16
6	751.32736	376.16732	251.11397	V	1924.92217	962.96472	642.31224	15
7	888.38628	444.69678	296.80028	Н	1825.85376	913.43052	609.28944	14
8	1016.48124	508.74426	339.49860	К	1688.79485	844.90106	563.60313	13
9	1147.52172	574.26450	383.17876	Μ	1560.69988	780.85358	520.90481	12
10	1244.57449	622.79088	415.52968	Р	1429.65940	715.33334	477.22465	11
11	1430.65380	715.83054	477.55612	W	1332.60664	666.80696	444.87373	10
12	1558.71238	779.85983	520.24231	Q	1146.52732	573.76730	382.84729	9
13	1687.75497	844.38112	563.25651	E	1018.46875	509.73801	340.16110	8
14	1800.83903	900.92316	600.95120	L	889.42615	445.21671	297.14690	7
15	1929.88163	965.44445	643.96539	E	776.34209	388.67468	259.45221	6
16	2044.90857	1022.95792	682.30771	D	647.29950	324.15339	216.43802	5
17	2173.95116	1087.47922	725.32191	E	532.27255	266.63991	178.09570	4
18	2287.03523	1144.02125	763.01659	1	403.22996	202.11862	135.08150	3
19	2402.06217	1201.53472	801.35891	D	290.14590	145.57659	97.38682	2
20				R	175.11895	88.06311	59.04450	1

Γ) Πεπτίδιο που περιέχει το αμινοξύ S248

Δ) Πεπτίδιο που περιέχει το αμινοξύ S308

#1	b+	b ²⁺	b ³⁺	Seq.	у *	y ²⁺	y ³⁺	#2
1	100.03931	50.52329	34.01795	G-Acetyl				18
2	267.03766	134.02247	89.68407	S-Phospho	1869.94700	935.47714	623.98719	17
3	368.08534	184.54631	123.36663	Т	1702.94865	851.97796	568.32107	16
4	481.16941	241.08834	161.06132	1	1601.90097	801.45412	534.63851	15
5	609.22798	305.11763	203.74751	Q	1488.81690	744.91209	496.94382	14
6	722.31205	361.65966	241.44220	L	1360.75833	680.88280	454.25763	13
7	835.39611	418.20169	279.13689	L	1247.67426	624.34077	416.56294	12
8	949.43904	475.22316	317.15120	Ν	1134.59020	567.79874	378.86825	11
9	1096.50745	548.75737	366.17400	F	1020.54727	510.77727	340.85394	10
10	1167.54457	584.27592	389.85304	А	873.47886	437.24307	291.83114	9
11	1282.57151	641.78939	428.19535	D	802.44174	401.72451	268.15210	8
12	1353.60862	677.30795	451.87439	А	687.41480	344.21104	229.80978	7
13	1466.69269	733.84998	489.56908	1	616.37769	308.69248	206.13075	6
14	1537.72980	769.36854	513.24812	А	503.29362	252.15045	168.43606	5
15	1650.81387	825.91057	550.94281	1	432.25651	216.63189	144.75702	4
16	1707.83533	854.42130	569.94996	G	319.17244	160.08986	107.06233	3
17	1794.86736	897.93732	598.96064	S	262.15098	131.57913	88.05518	2
18				R	175.11895	88.06311	59.04450	1

#1	b+	b ²⁺	b ³⁺	Seq.	у *	y ²⁺	y ³⁺	#2
1	100.03931	50.52329	34.01795	G-Acetyl				18
2	187.07133	94.03931	63.02863	S	1869.94700	935.47714	623.98719	17
3	368.08534	184.54631	123.36663	T-Phospho	1782.91498	891.96113	594.97651	16
4	481.16941	241.08834	161.06132	1	1601.90097	801.45412	534.63851	15
5	609.22798	305.11763	203.74751	Q	1488.81690	744.91209	496.94382	14
6	722.31205	361.65966	241.44220	L	1360.75833	680.88280	454.25763	13
7	835.39611	418.20169	279.13689	L	1247.67426	624.34077	416.56294	12
8	949.43904	475.22316	317.15120	Ν	1134.59020	567.79874	378.86825	11
9	1096.50745	548.75737	366.17400	F	1020.54727	510.77727	340.85394	10
10	1167.54457	584.27592	389.85304	А	873.47886	437.24307	291.83114	9
11	1282.57151	641.78939	428.19535	D	802.44174	401.72451	268.15210	8
12	1353.60862	677.30795	451.87439	А	687.41480	344.21104	229.80978	7
13	1466.69269	733.84998	489.56908	I	616.37769	308.69248	206.13075	6
14	1537.72980	769.36854	513.24812	А	503.29362	252.15045	168.43606	5
15	1650.81387	825.91057	550.94281	1	432.25651	216.63189	144.75702	4
16	1707.83533	854.42130	569.94996	G	319.17244	160.08986	107.06233	3
17	1794.86736	897.93732	598.96064	S	262.15098	131.57913	88.05518	2
18				R	175.11895	88.06311	59.04450	1

Ε) Πεπτίδιο που περιέχει το αμινοξύ Τ309

ΣΤ) Πεπτίδιο που περιέχει το αμινοξύ Τ364

#1	b+	b ²⁺	Seq.	у *	y ²⁺	#2
1	115.05020	58.02874	Ν			8
2	244.09280	122.55004	E	926.43831	463.72279	7
3	315.12991	158.06859	А	797.39572	399.20150	6
4	414.19832	207.60280	V	726.35860	363.68294	5
5	595.21233	298.10981	T-	627.29019	314.14873	4
			Phospho			
6	708.29640	354.65184	1	446.27618	223.64173	3
7	894.37571	447.69149	W	333.19212	167.09970	2
8			К	147.11280	74.06004	1

<u>Πίνακας 2. Πεπτίδια που περιέχουν τα φωσφορυλιωμένα αμινοξέα Εxo70B1 της από την</u> <u>κινάση CPK5</u>

Εγκυρότητα	Αλληλουχία πεπτιδίου	Τροποποιήσεις
Υψηλή	LLVPAYGsFIGR	S8(Phospho)
Υψηλή	LLVPAYGsFIGR	S8(Phospho)
Υψηλή	TLGHNEsmADDILQIFSNFDGR	S7(Phospho); M8(Oxidation)
Υψηλή	tLGHNESmADDILQIFSNFDGRFSR	T1(Phospho); M8(Oxidation)
Υψηλή	NEAVtIWK	T5(Phospho)
Υψηλή	TLGHNEsmADDILQIFSNFDGRFSR	S7(Phospho); M8(Oxidation)
Υψηλή	ALNsIDGQISR	S4(Phospho)
Υψηλή	NEAVtIWKR	T5(Phospho)

<u>Πίνακας 3. Πεπτίδια που περιέχουν τα φωσφορυλιωμένα αμινοξέα της Εχο70B1 από την</u> <u>κινάση CPK5, κατά τη δοκιμασία κινάσης ΧοpP-Εχο70B1-CPK5</u>

Εγκυρότητα	Αλληλουχία πεπτιδίου	Τροποποιήσεις
Υψηλή	tLGHNESmADDILQIFSNFDGR	T1(Phospho); M8(Oxidation)
Υψηλή	TLGHNEsmADDILQIFSNFDGR	S7(Phospho); M8(Oxidation)
Υψηλή	LLVPAYGsFIGR	S8(Phospho)
Υψηλή	LLVPAyGSFIGR	Y6(Phospho)
Υψηλή	TLGHNEsmADDILQIFSNFDGR	S7(Phospho); M8(Oxidation)
Υψηλή	tLGHNESmADDILQIFSNFDGR	T1(Phospho); M8(Oxidation)
Υψηλή	TLGHNEsmADDILQIFSNFDGR	S7(Phospho); M8(Oxidation)
Υψηλή	TLGHNEsmADDILQIFSNFDGR	S7(Phospho); M8(Oxidation)
Υψηλή	tLGHNESmADDILQIFSNFDGR	T1(Phospho); M8(Oxidation)
Υψηλή	TLGHNEsmADDILQIFSNFDGR	S7(Phospho); M8(Oxidation)
Υψηλή	TLGHNEsmADDILQIFSNFDGR	S7(Phospho); M8(Oxidation)
Υψηλή	LLVPAYGsFIGR	S8(Phospho)
Υψηλή	LLVPAYGsFIGR	S8(Phospho)
Υψηλή	LLVPAYGsFIGR	S8(Phospho)
Υψηλή	tLGHNESmADDILQIFSNFDGR	T1(Phospho); M8(Oxidation)
Υψηλή	NEAVtIWK	T5(Phospho)
Υψηλή	INELFKGtTTGRK	T8(Phospho)