

# Μοριακές αλληλεπιδράσεις φυτών μικρο-οργανισμών

The background features several 3D molecular models. On the left, a large, textured purple structure represents a protein or a complex of proteins. To its right, a blue and white double helix represents DNA. In the foreground, a blue and white double helix is shown with colorful (red, green, yellow, blue) rectangular blocks representing base pairs. The overall scene is set against a light yellow background with soft, out-of-focus clouds.

Ε. Σιναπίδου,  
Αν. καθηγήτρια, ΔΠΘ

# Αλληλεπιδράσεις φυτών μικροοργανισμών

## Χρήσιμοι όροι:

- ξενιστής – φυτό (host) [οργανισμός]
- παθογόνο – παράσιτο (pathogen, parasite)

## Σχέσεις ξενιστή - μικροοργανισμού:

- Συμβίωση (symbiosis)
- Παρασιτισμός (parasitism)

# Παθογόνα – Παράσιτα

## A. Υποχρεωτικά παράσιτα – Βιοτροφικά παθογόνα (obligate parasites, biotrophs)

Επιβιώνουν μόνον σε ζωντανά κύτταρα

→ *κάποιοι μύκητες, κάποια βακτήρια, ιοί, νηματώδεις*

Δε σκοτώνουν  
άμεσα τον  
ξενιστή τους

## B. Προαιρετικά παράσιτα

(non-obligate parasites, facultative parasites)

Ζουν συνήθως σαπροφυτικά (σε νεκρά φυτικά υποστρώματα), αλλά σε ορισμένα στάδια του βιολογικού κύκλου ή κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορεί να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν ως παράσιτα

→ *μύκητες, βακτήρια*

### • Προαιρετικά σαπρόφυτα (facultative saprophytes)

Επιβιώνουν σε ζωντανά κύτταρα και νεκρό οργανικό υπόστρωμα

→ ημί-βιοτροφικά παθογόνα (semi-biotrophs)

# Παθογόνα – Παράσιτα

- Υποχρεωτικά σαπρόφυτα (obligate saprophytes, saprobes)  
Αναπτύσσονται και επιβιώνουν σε νεκρή οργανική ύλη
  - Νεκροτροφικά παράσιτα (necrotrophs): νεκρώνουν γρήγορα τον ξενιστή τους
  - Παράσιτα αδυναμίας: προσβάλλουν εξασθενημένα φυτά
  - Δευτερογενή παράσιτα: εγκαθίστανται δευτερογενώς σε ιστούς ήδη προσβλημένους από άλλα παθογόνα

# Παθογόνα – Εξέλιξη

Μη υποχρεωτικά παράσιτα

Παθογόνο - Ξενιστής

Παράλληλη εξέλιξη (co –evolution)

Υποχρεωτικά παράσιτα (: εξειδίκευση)

Κάποιοι μύκητες και βακτήρια, Ιοί, νηματώδεις

# Παθογόνα – Εξέλιξη

## Νεκροτρόφα παράσιτα

- Έχουν μεγάλο εύρος ξενιστών
- Επιβιώνουν σαπροφυτικά μακριά από τον ξενιστή
- Προσβάλουν νεαρά, εξασθενημένα ή γηρασμένα φυτά

## Βιοτροφικά παράσιτα

- Έχουν περιορισμένο κύκλο ξενιστών
- Δε μπορούν να αναπτυχθούν και να επιβιώσουν μακριά από τον ξενιστή τους
- Μπορούν να προσβάλουν υγιή κύτταρα, ιστούς και όργανα σε όλα τα στάδια του κύκλου τους πάνω στο φυτό

# Αντοχή Ξενοστή

## A. Παθητική ή προϋπάρχουσα αντοχή (passive, constitutive resistance)

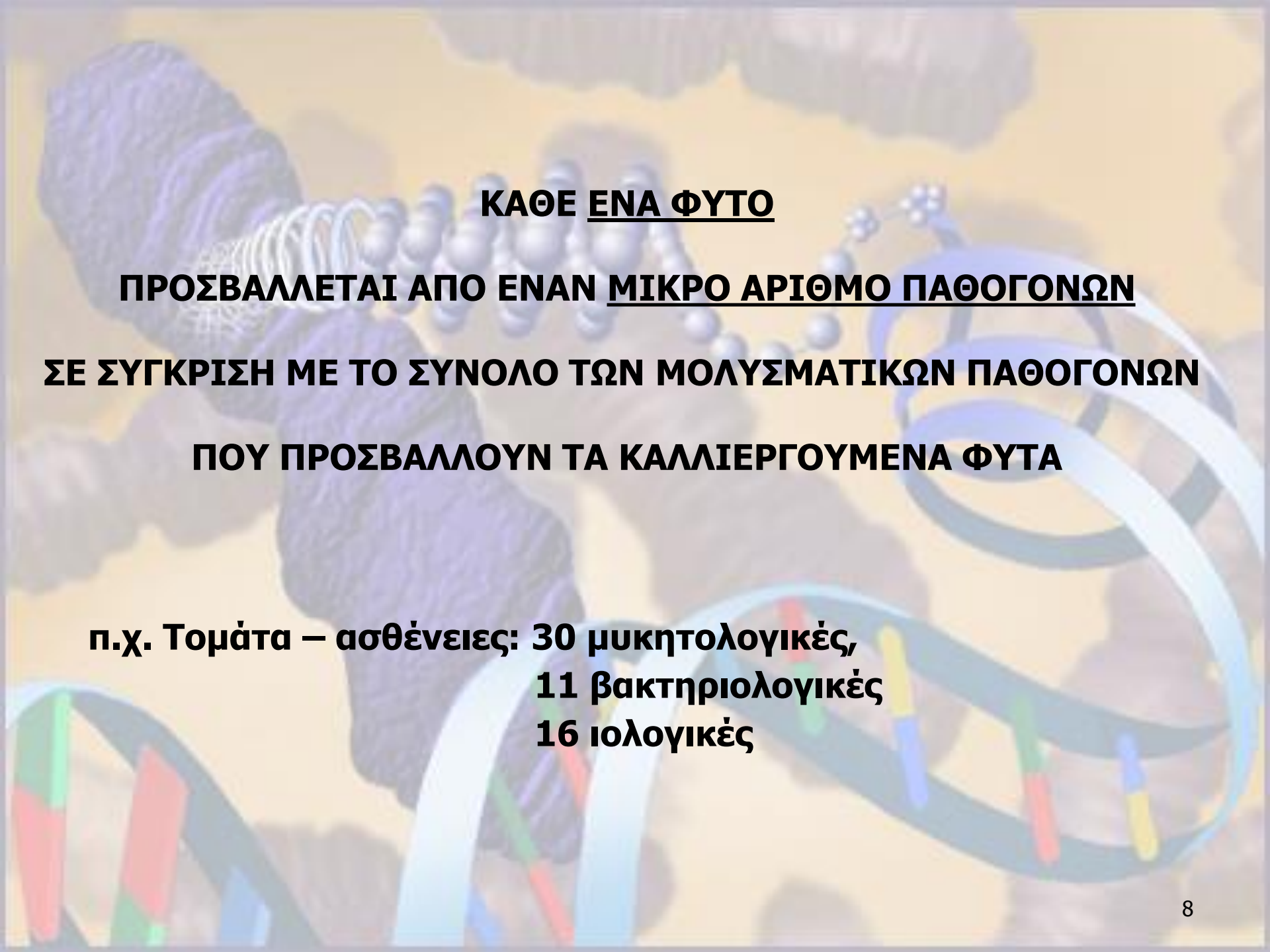
Οφείλεται σε στοιχεία κληρονομούμενα που υπάρχουν στο φυτό πριν τη μόλυνση από το παθογόνο

## B. Ενεργητική ή επαγώγιμη αντοχή (active, inducible resistance)

Βασίζεται σε αντιδράσεις που λειτουργούν στον ξενοστή μετά τη μόλυνση από το παθογόνο και προκαλούν δυναμική αντιμετώπιση του παθογόνου

## Γ. Αντοχή λόγω διαφυγής (escape, avoidance)

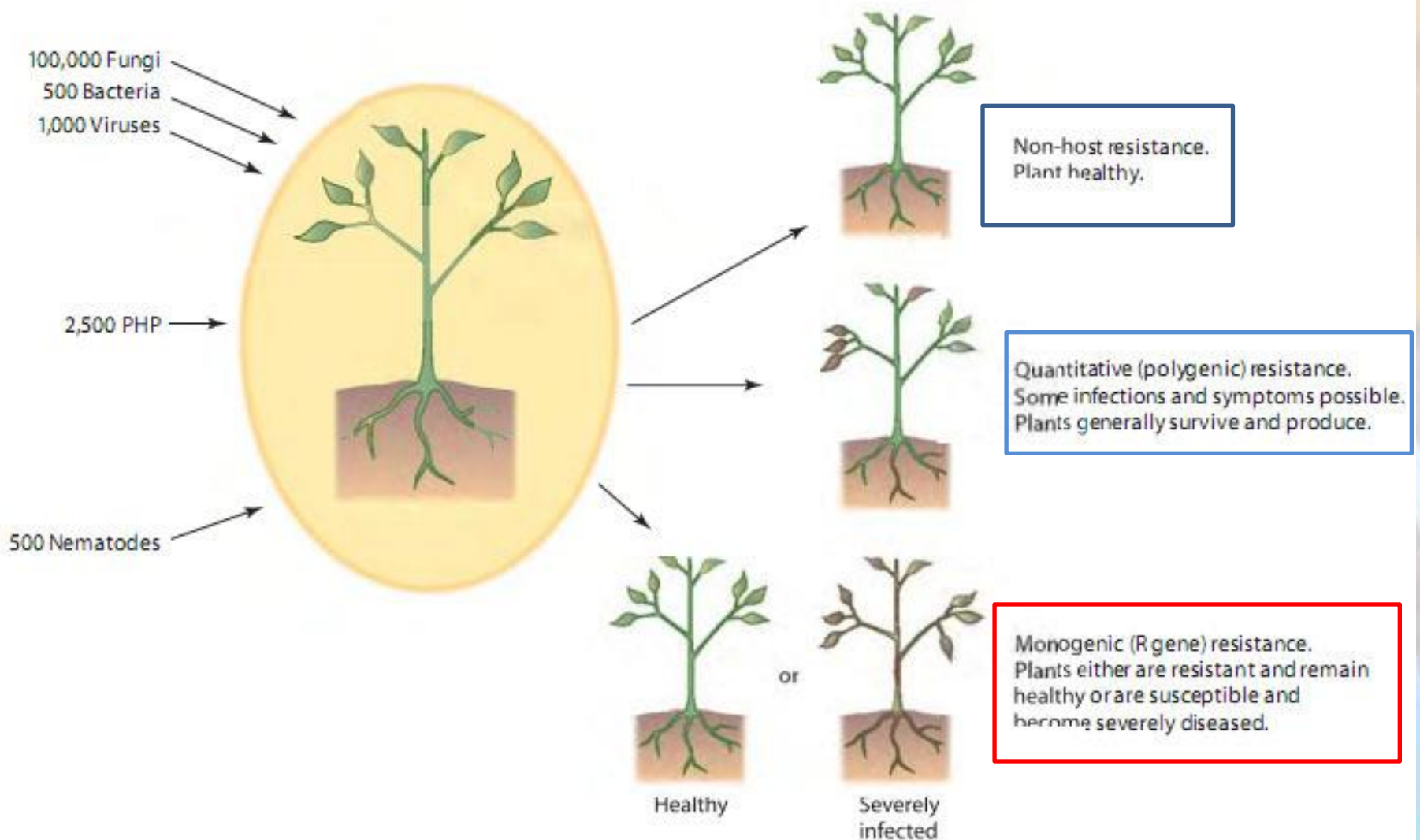
π.χ. το φυτό είναι ευαίσθητο, αλλά συμπληρώνει την ανάπτυξή του σε εποχή που το περιβάλλον δεν είναι ευνοϊκό για το παθογόνο



**ΚΑΘΕ ΕΝΑ ΦΥΤΟ**  
**ΠΡΟΣΒΑΛΛΕΤΑΙ ΑΠΟ ΕΝΑΝ ΜΙΚΡΟ ΑΡΙΘΜΟ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ**  
**ΣΕ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ**  
**ΠΟΥ ΠΡΟΣΒΑΛΛΟΥΝ ΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΑ ΦΥΤΑ**

**π.χ. Τομάτα – ασθένειες: 30 μυκητολογικές,  
11 βακτηριολογικές  
16 ιολογικές**





**FIGURE 6-1** Types of reaction of plants to attacks by various pathogens in relation to the kind of resistance of the plant.

# Άμυνα Ξενοστή

## **A. Ανοσία**

**(immunity, non-host resistance)**

**Το φυτό δεν αποτελεί ξενοστή για το παθογόνο**

## **B. Αντοχή – ανθεκτικά φυτά**

**(Resistance, resistant plants)**

**Φυτά που έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την εγκατάσταση ή/και την ανάπτυξη των παθογόνων στους ιστούς τους**

## **Γ. Ευπάθεια – ευπαθή/ ευαίσθητα φυτά**

**(susceptibility, susceptible plants)**

**Φυτά που μολύνονται εξαιτίας μη αποτελεσματικής άμυνας**

# Παράγοντες παθητικής αντοχής

## A. Μορφολογικά – ανατομικά χαρακτηριστικά

- 1. Εξωτερικά στρώματα κυρώδους σύστασης (υδρόφοβη επιφάνεια), παρουσία διαφόρων κατασκευών (π.χ. τριχών)**
- 2. Αντοχή κυτταρικών τοιχωμάτων (πάχος, τραχύτητα) (περιορισμός εξάπλωσης μυκήτων, αντοχή σε πληγές)**
- 3. Υφή των στοματίων (στομάτια με προεξέχοντα καταφρακτικά κύτταρα παρεμποδίζουν την είσοδο μυκήτων, βακτηρίων)**
- 4. Ιστογενή φράγματα (ποικιλίες σίτου, στις οποίες ο ιστός των στελεχών αποτελείται από κολέγχυμα που διακόπτεται από δέσμες σκληρεγχύματος είναι πιο ανθεκτικές στις σκωριάσεις)**

# Παράγοντες παθητικής αντοχής

## B. Χημικοί παράγοντες

- 1. Εκκρίσεις των φυτών από διάφορα όργανα (παρεμπόδιση βλάστησης σπορίων και μόλυνσης)**  
π.χ. κρεμμύδια με έγχρωμους εξωτερικούς χιτώνες (πλούσιοι σε φαινολικές, μυκοτοξικές ουσίες) παρουσιάζουν αντοχή στον μύκητα *Colletotrichum circinans* σε σχέση με τις ποικιλίες κρεμμυδιού με λευκούς χιτώνες
- 2. Τοξικές ουσίες που προϋπάρχουν στον κυτταρικό χυμό (φαινολικές ουσίες, ταννίνες, υδρολυτικά ένζυμα)**  
π.χ. στη βρώμη η ουσία avenacin προκαλεί λύση των μεμβρανών των μυκήτων
- 3. Έλλειψη ουσιών στα κύτταρα του ξενιστή που είναι είτε:**
  - \* απαραίτητα στοιχεία για τη διατροφή του παθογόνου**
  - \* αποδέκτες ουσιών που παράγονται από το παθογόνο και το βοηθούν στον παρασιτισμό του**

# Παράγοντες ενεργητικής άμυνας

## A. Μορφολογικά – ανατομικά χαρακτηριστικά

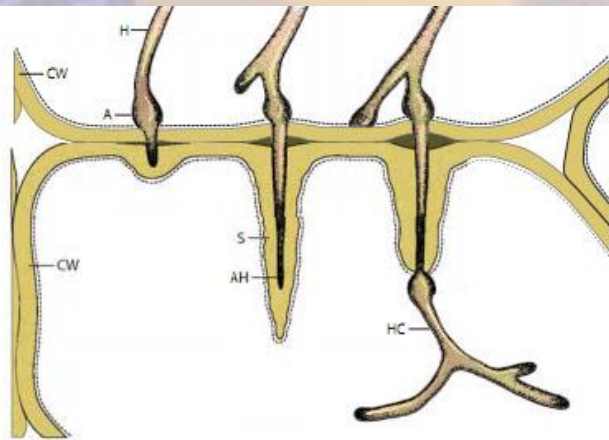
**1. Αφοριστικοί ιστοί με τη μορφή φελλωδών επουλωτικών ιστών που παρεμποδίζουν την επέκταση του παθογόνου**

### **2. Στρώματα αποχωρισμού**

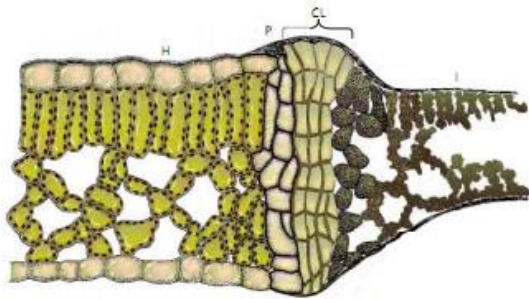
π.χ. γύρω από τις νεκρωτικές κηλίδες στα φύλλα των πυρηνόκαρπων μετά από προσβολή του μύκητα *Stigminta carporhila* οπότε σχηματίζονται χαρακτηριστικές οπές («τρύπες από σκάγια» shotholes)

### **3. Τυλώσεις**

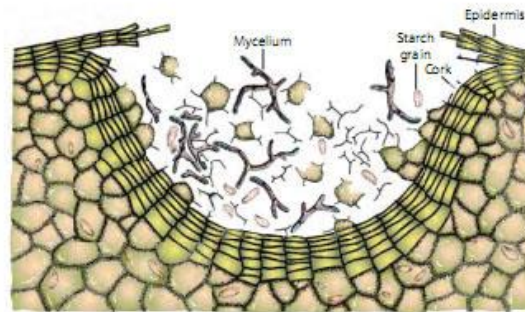
**είναι εξογκώματα στο εσωτερικό των αγγείων του ξύλου που προέρχονται από διόγκωση του πρωτοπλάσματος γειτονικών παρεγχυματικών κυττάρων (μηχανική απόφραξη μυκήτων που αναπτύσσονται στα αγγεία και της κυκλοφορίας των τοξινών τους)**



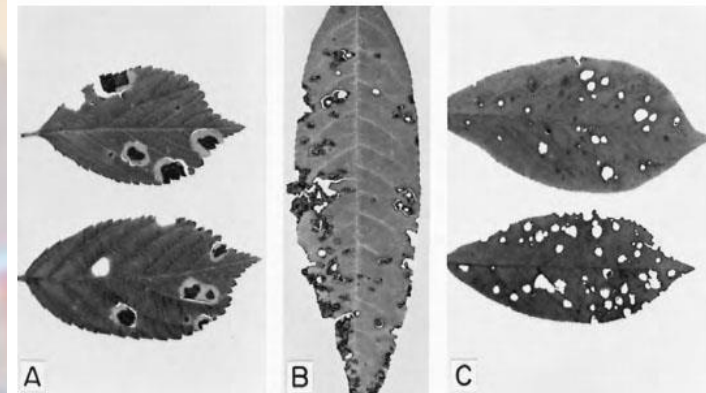
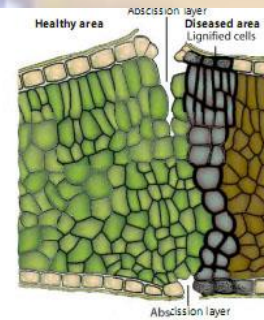
**FIGURE 6-4** Formation of a sheath around a hypha (H) penetrating a cell wall (CW). A, appressorium; AH, advancing hypha still enclosed in sheath; HC, hypha in cytoplasm; S, sheath.



**FIGURE 6-5** Formation of a cork layer (CL) between infected (I) and healthy (H) areas of leaf. P, phellogen. [After Cunningham (1928). *Phytopathology* 18, 717-751.]



**FIGURE 6-6** Formation of a cork layer on a potato tuber following infection with *Rhizoctonia*. [After Ramsey (1917). *J. Agric. Res.* 9, 421-426.]



**FIGURE 6-7** Schematic formation of an abscission layer around a diseased spot of a *Prunus* leaf. [After Samuel (1927).] (A-C) Leaf spots and shot holes caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* bacteria on (A) ornamental cherry leaves; characteristic broad, light green halos form around the infected area before all affected tissue falls off, (B) on peach, and (C) on plum. The shot hole effect is particularly obvious on the plum leaves.

# Παράγοντες ενεργητικής άμυνας

## B. Βιοχημικοί παράγοντες

- 1. Παραγωγή νέων ουσιών ή μεταβολή προϋπαρχουσών ουσιών.**  
Πρόκειται για φαινολικές ουσίες (π.χ. καφεϊκό οξύ) που συσσωρεύονται στους προσβλημένους ιστούς  
π.χ. μετά από προσβολή κονδύλων πατάτας από τον μύκητα *Phytophthora infestans*
- 2. Φυτοαλεξίνες (phytoalexins)**  
είναι χημικές ουσίες μικρού μοριακού βάρους,  
χαρακτηριστικές για κάθε ξενιστή που τις παράγει  
π.χ. φασεολίνη (φασόλι), πιασάτινη (μπιζέλι), καψιδιόλη (πιπεριά),  
φυτοτουμπερίνη (πατάτα)
- 3. Αντίδραση υπερευαισθησίας (hypersensitive response- HR):**  
Αντίδραση του φυτού που εκδηλώνεται με ταχύτατη νέκρωση των κυττάρων στο σημείο εισόδου του παθογόνου με αποτέλεσμα τον εντοπισμό της προσβολής (λόγω νέκρωσης ή εξασθένησης του παθογόνου)

# Δράση του παθογόνου

## A. Μηχανική πίεση

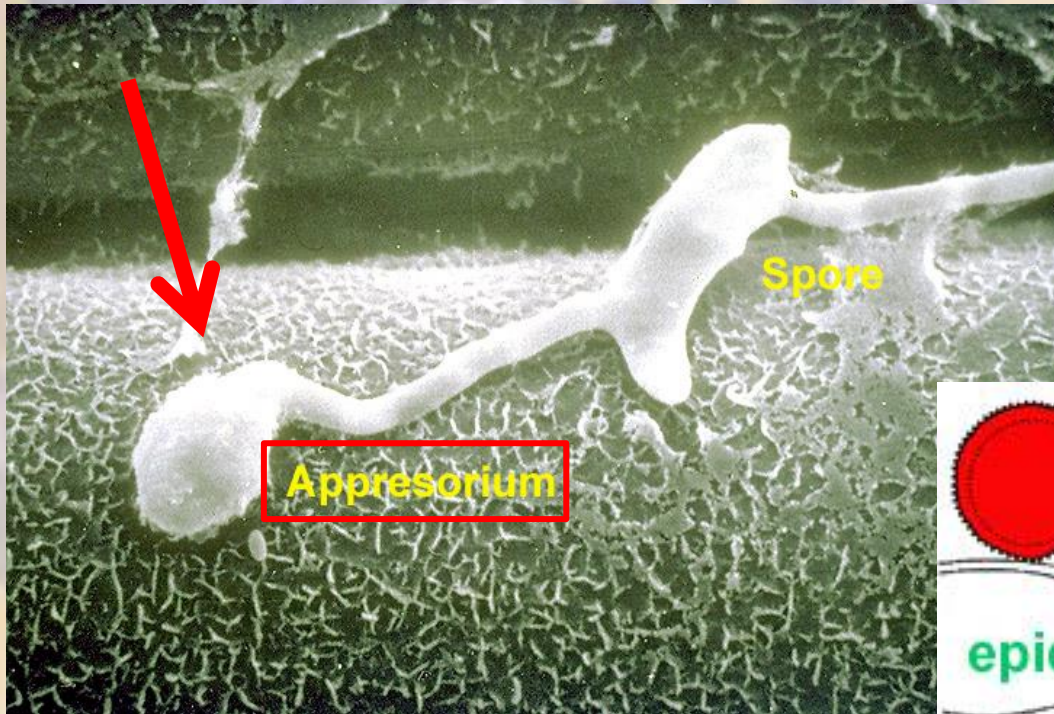
### Μύκητες

Σπόρια μυκήτων: βλάστηση στην επιφάνεια του ξενιστή →

- Απρεσσόριο (appressorium)  
δισκόμερφο όργανο που σχηματίζεται στο άκρο του βλαστικού σωλήνα όταν αυτός συναντήσει την εφυμενίδα
- Υφή μόλυνσης (penetration peg)  
λεπτή υφή («ράμφος») που διατρυπά την εφυμενίδα και την επιδερμίδα και φτάνει στους μεσοκυττάριους χώρους

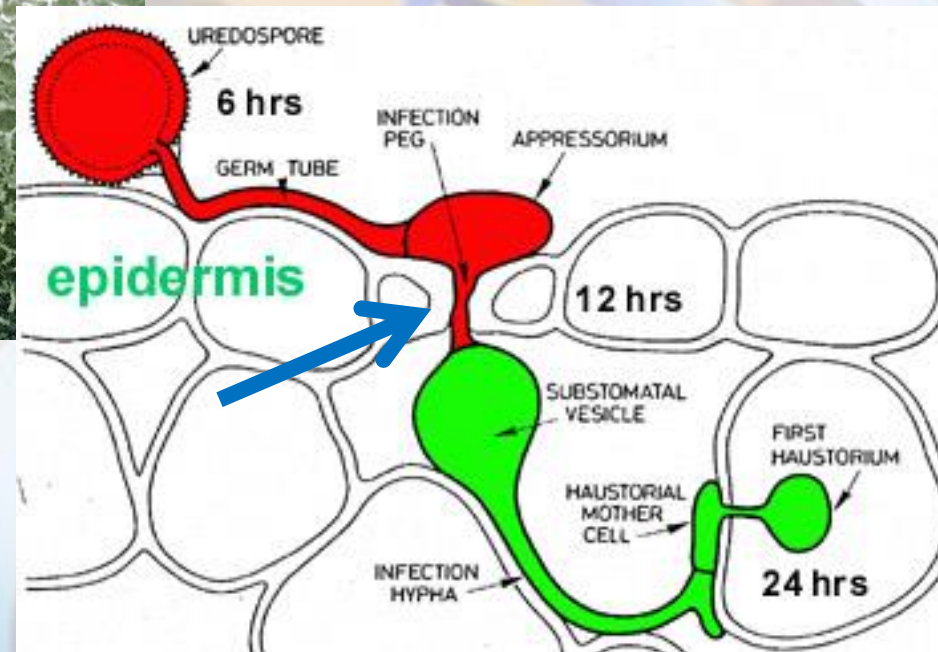


# Απρεσσόριο, υφή μόλυνσης



[www.botany.ubc.ca/bakkeren/rust\\_infection\\_process.htm](http://www.botany.ubc.ca/bakkeren/rust_infection_process.htm)

[140.254.84.203/wiki/index.php/Apressorium](http://140.254.84.203/wiki/index.php/Apressorium)



# Δράση του παθογόνου

## B. Χημική δράση

Τα παθογόνα παράγουν διάφορες ουσίες, όπως

- Ένζυμα (enzymes)
- Τοξίνες (toxins)
- Ρυθμιστές αύξησης (growth regulators)
- Πολυσακχαρίτες (polysaccharides)

# Ένζυμα

Τα ένζυμα προκαλούν αποδιοργάνωση των κυτταρικών τοιχωμάτων και υλικών του μεσοτοιχίου → αποδιοργάνωση ιστών

## ΙΣΤΟΙ:

- **ΕΦΥΜΕΝΙΔΑ** (υμενίνη, κηρώδεις πλάκες)  
Διάτρηση κυρίως μηχανικά  
(λίγοι μύκητες και το βακτήριο *Streptomyces scabies*)
- **ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ** (κυτταρίνη, λιγνίνη, πηκτίνη)  
Μύκητες: κυτταρινολυτικά ένζυμα  
Βασιδιομύκητες: λιγνινάσες
- **ΜΕΣΟΤΟΙΧΙΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ – ΣΥΝΔΕΤΙΚΟΣ ΙΣΤΟΣ** (πηκτίνες, πολυζακχαρίτες)  
Μύκητες, βακτήρια (σήψεις): πηκτινολυτικά ένζυμα, πηκτινάσες, πολυγαλακτονουράσες

# Τοξίνες

Δρουν ως δηλητήρια πάνω στο πρωτόπλασμα ή μπορούν επιπλέον να προκαλέσουν αλλοίωση της ημι-διαπερατότητας των μεμβρανών ή αναχαιτίζουν τη δράση ενζύμων του κυττάρου

- Τοξίνες εξειδικευμένες προς τον ξενιστή (host-specific toxins)

Η τοξίνη παράγεται από ένα παθογόνο και είναι τοξική για συγκεκριμένο ξενιστή (ή ξενιστές)

π.χ. HC-toxin: παράγεται από τον μύκητα *Cochliobolus carbonum* που προκαλεί κηλίδωση στα φύλλα του καλαμποκιού

Ανθεκτικές στο παθογόνο ποικιλίες καλαμποκιού φέρουν το γονίδιο *Hm1* που κωδικοποιεί την παραγωγή του ενζύμου HC-toxin reductase που καθιστά την τοξίνη ανενεργή

# Τοξίνες

- Τοξίνες μη εξειδικευμένες προς τον ξενιστή (non host-specific toxins)

Η τοξίνη που παράγεται από το παθογόνο προκαλεί ορισμένα συμπτώματα στον ξενιστή,

αλλά παρόμοια συμπτώματα μπορεί να παράγει και σε μη ξενιστές

! επιπλέον, η παρουσία της τοξίνης δεν είναι καθοριστική για να προκληθεί ασθένεια

(φυλές του ίδιου παθογόνου που δεν παράγουν την τοξίνη είναι εξίσου παθογόνες)

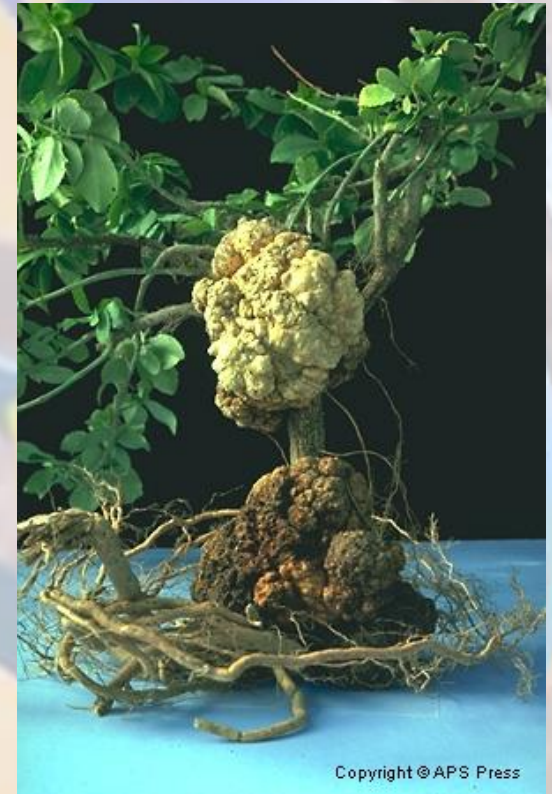
# Ρυθμιστές αύξησης

**Αυξίνες, γιββερίλινες, κυτοκινίνες, αιθυλένιο**

**Τα παθογόνα διαταράσσουν τα επίπεδα των ρυθμιστών αύξησης**

- είτε παράγοντας και αυτά τις ίδιες ουσίες**
- είτε διεγείροντας την ανεξέλεγκτη παραγωγή των ουσιών αυτών**

π.χ. το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* (>100 ξενιστές)  
→ μεταφέρει τμήμα του DNA του στον ξενιστή με αποτέλεσμα το σχηματισμό όγκων



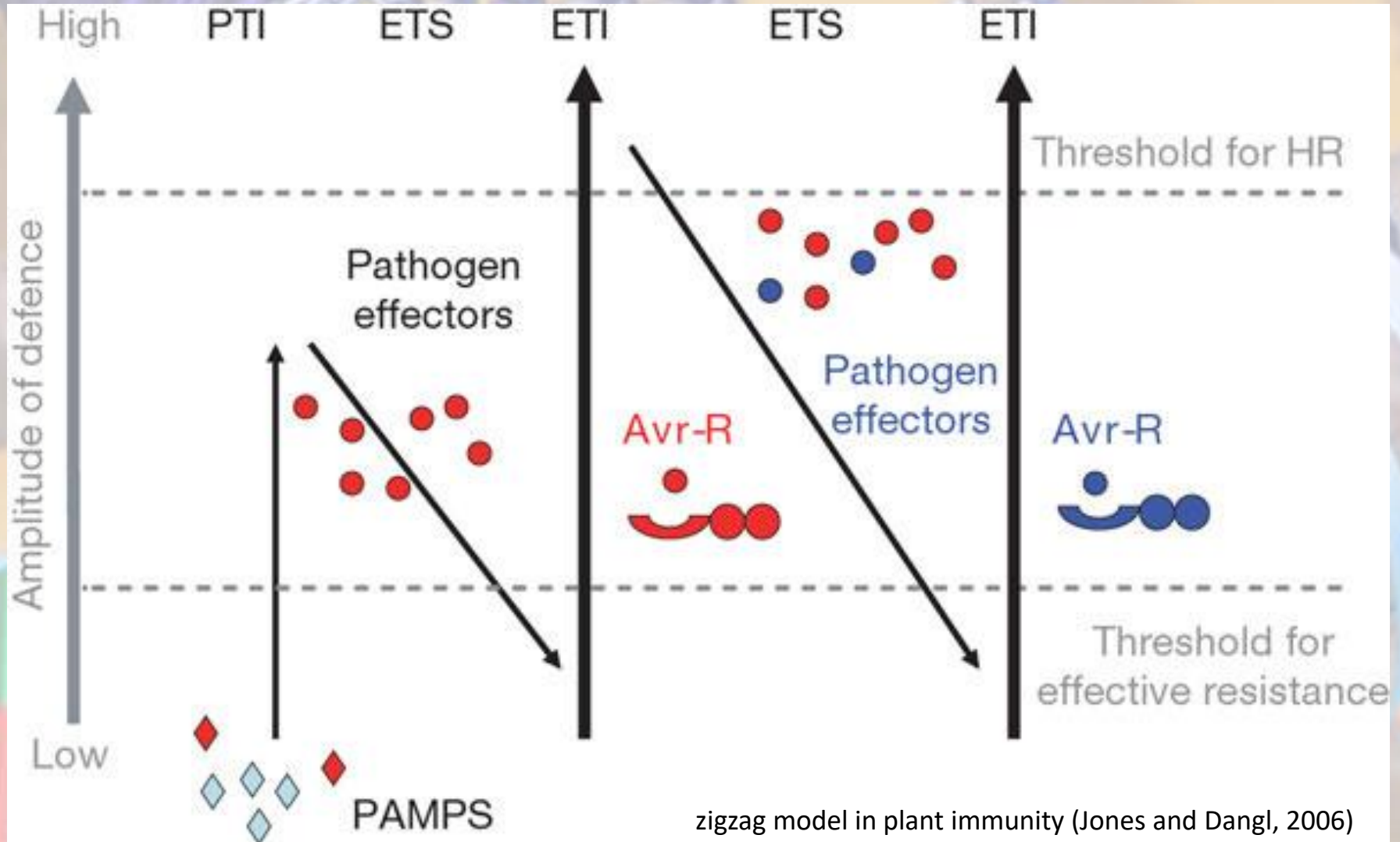
Copyright © APS Press

# Πολυσακχαρίτες

Ουσίες που εκκρίνονται από παθογόνα (μύκητες, βακτήρια), οι οποίες προκαλούν έμφραξη των αγγειωδών δεσμίδων των φυτών

- Παρεμπόδιση ανόδου του νερού
- Μαρασμός

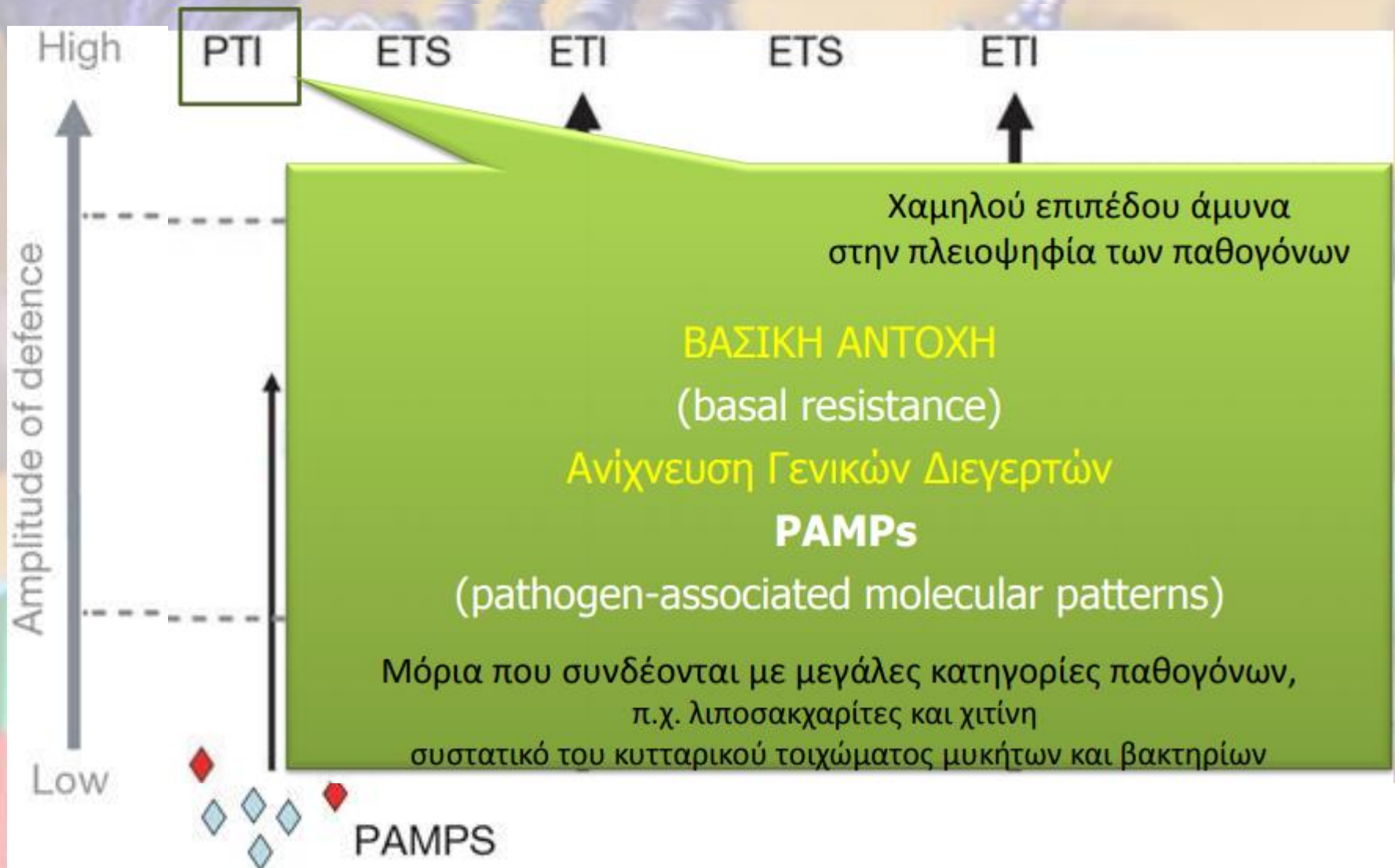
# Το μοντέλο zigzag του «ανοσοποιητικού συστήματος» των φυτών



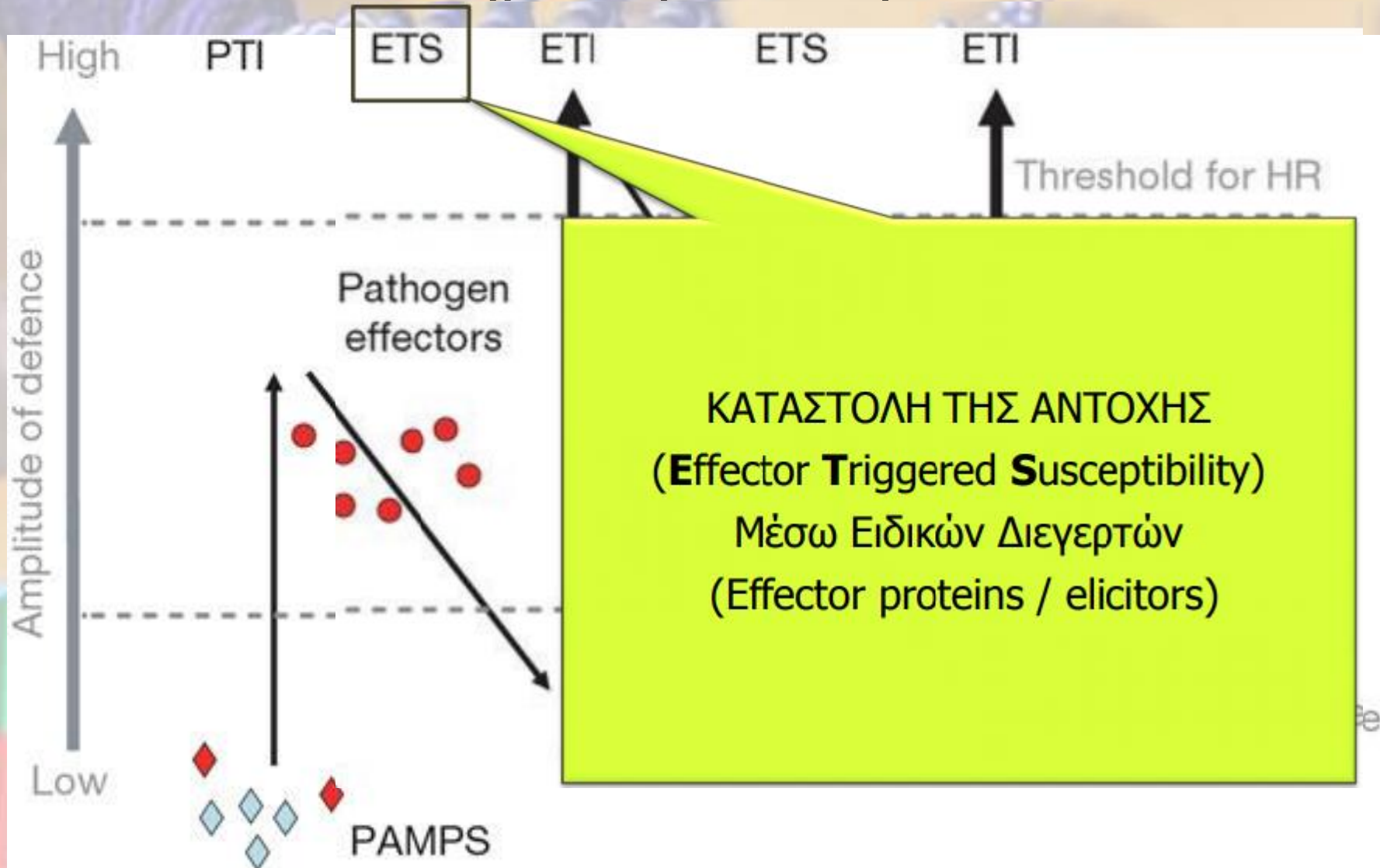
zigzag model in plant immunity (Jones and Dangl, 2006)



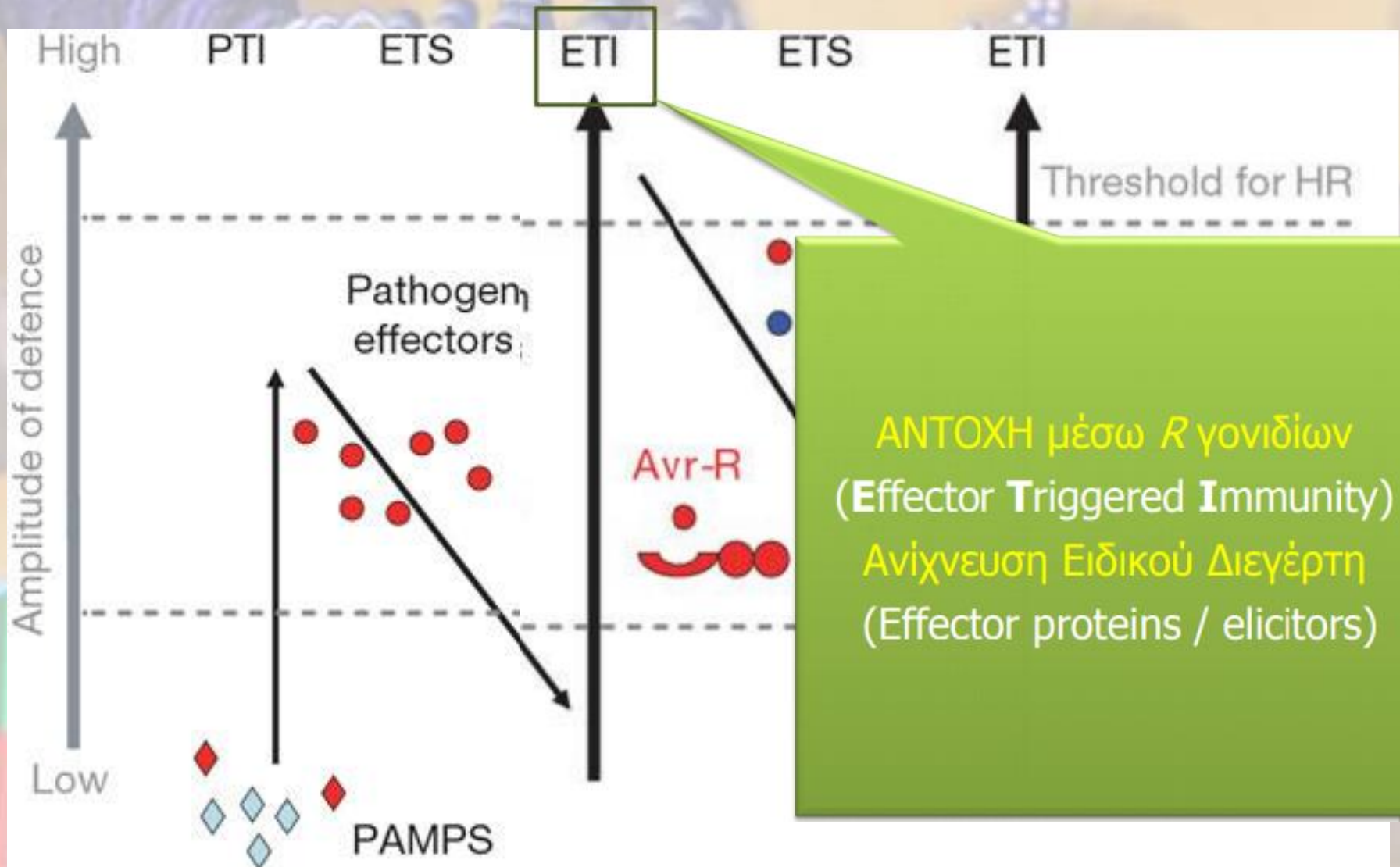
# Το μοντέλο zigzag του «ανοσοποιητικού συστήματος» των φυτών



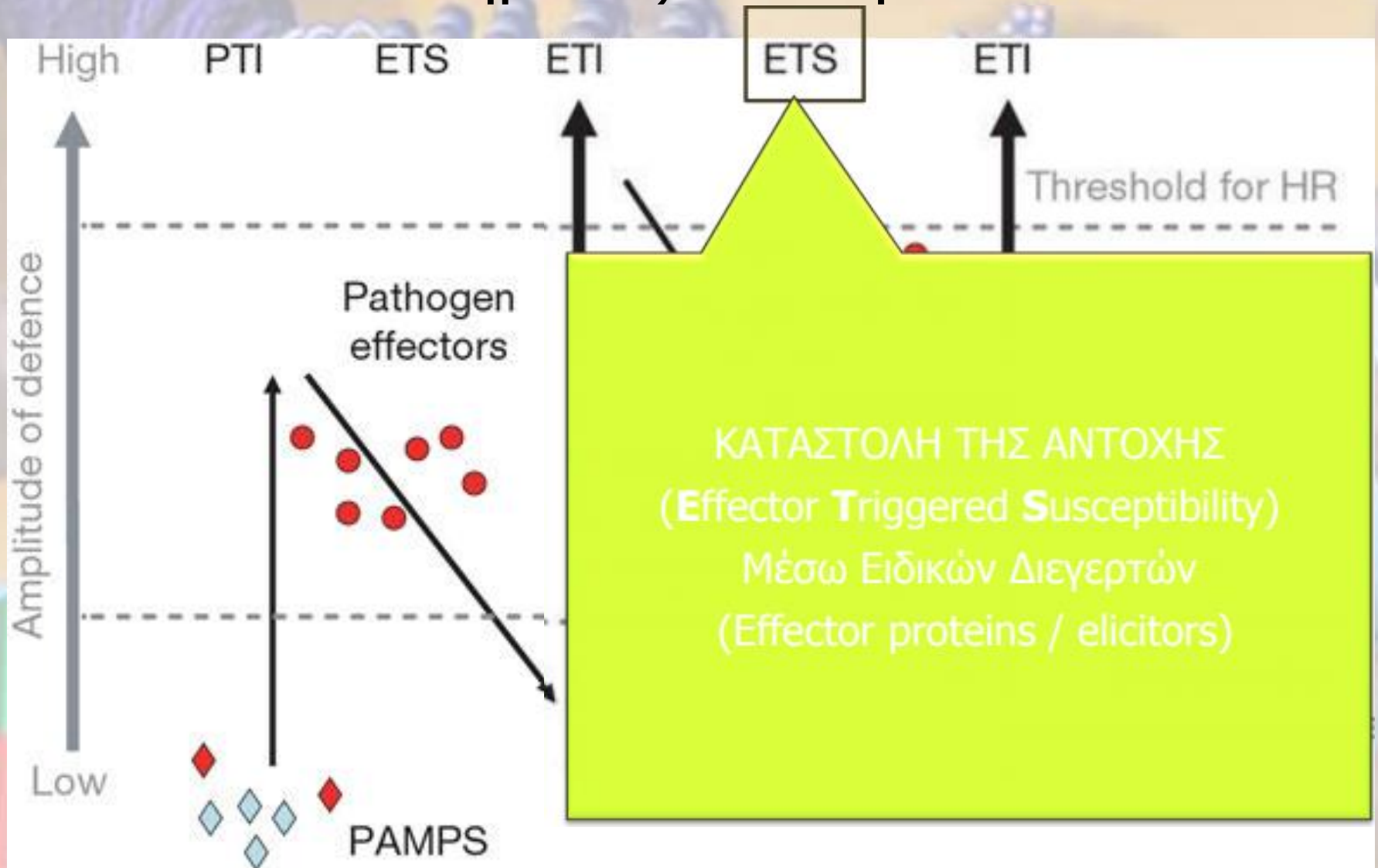
# Το μοντέλο zigzag του «ανοσοποιητικού συστήματος» των φυτών



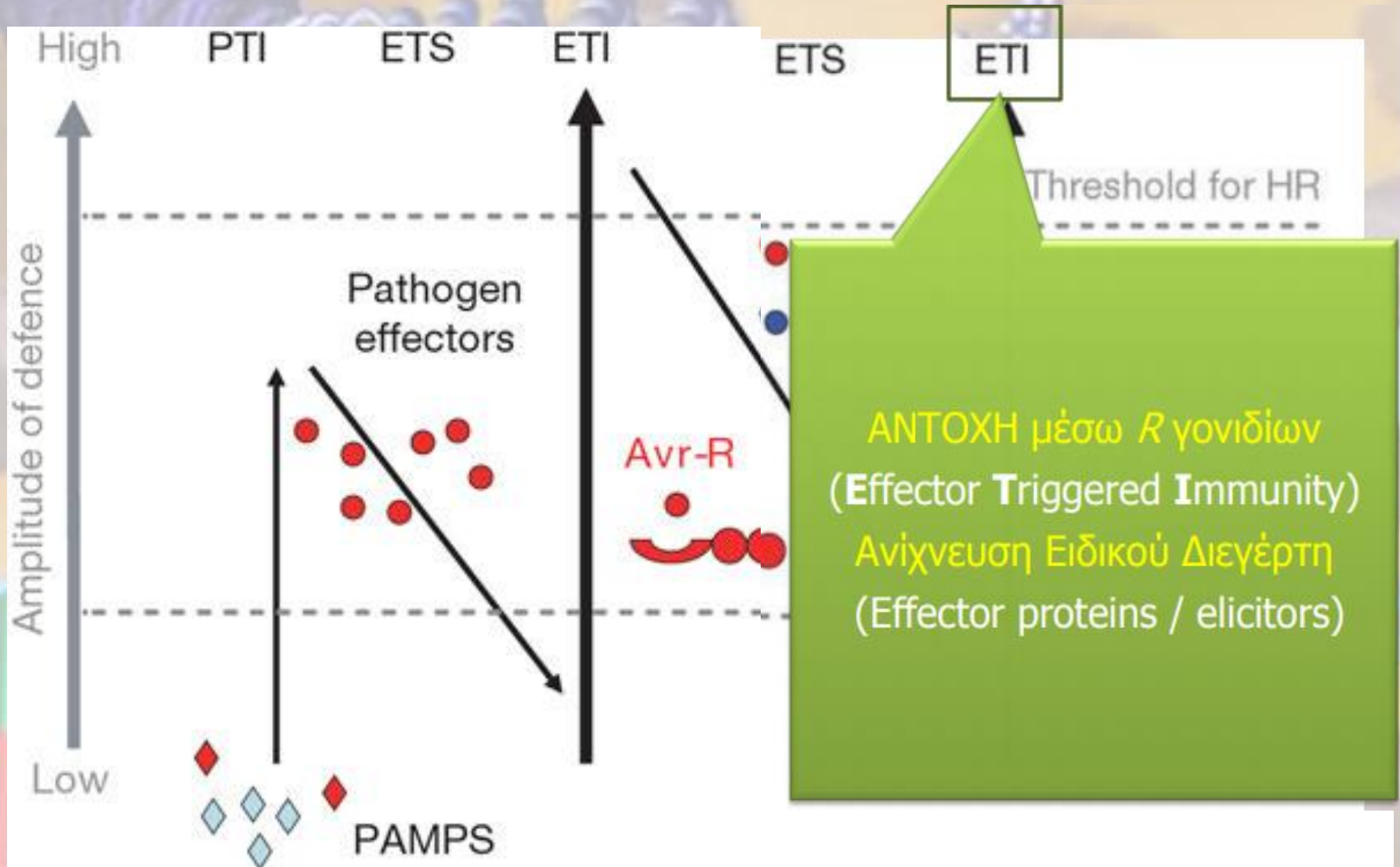
# Το μοντέλο zigzag του «ανοσοποιητικού συστήματος» των φυτών

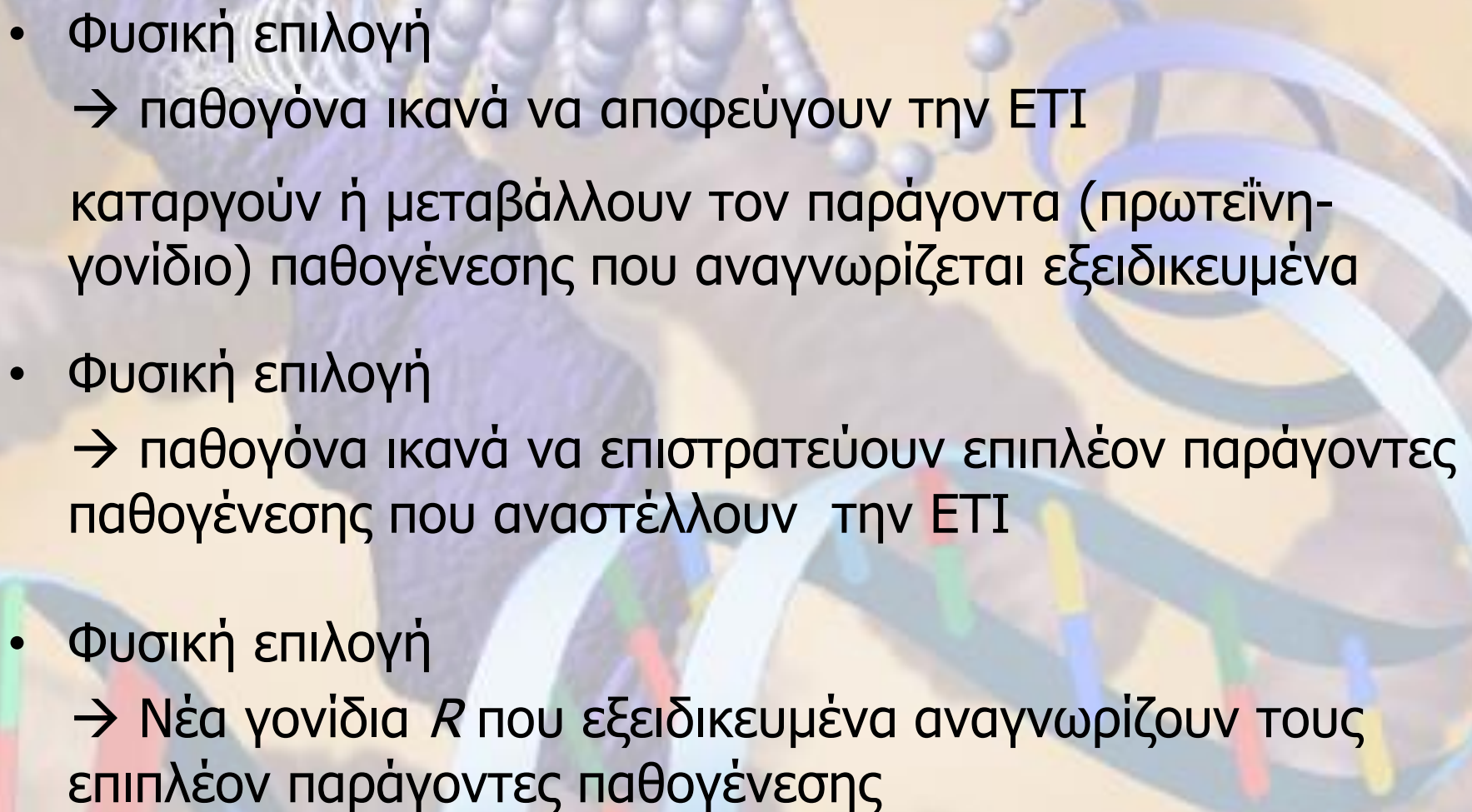


# Το μοντέλο zigzag του «ανοσοποιητικού συστήματος» των φυτών



# Το μοντέλο zigzag του «ανοσοποιητικού συστήματος» των φυτών



- 
- Φυσική επιλογή  
→ παθογόνα ικανά να αποφεύγουν την ETI  
καταργούν ή μεταβάλλουν τον παράγοντα (πρωτεΐνη-γονίδιο) παθογένεσης που αναγνωρίζεται εξειδικευμένα
  - Φυσική επιλογή  
→ παθογόνα ικανά να επιστρατεύουν επιπλέον παράγοντες παθογένεσης που αναστέλλουν την ETI
  - Φυσική επιλογή  
→ Νέα γονίδια  $R$  που εξειδικευμένα αναγνωρίζουν τους επιπλέον παράγοντες παθογένεσης

# Ζεύγος: Παθογόνο – Ξενιστής

Ξενιστής  
(Host)

Πολλές ποικιλίες (varieties)  
με διαφορετική αντοχή στο παθογόνο

Παθογόνο  
(Pathogen)

Πολλές φυλές (races)  
με διαφορετική παθογόνο ικανότητα  
(pathogenicity)  
→ παθότυποι (pathotypes, pathovars)

# Σχέσεις Παθογόνου – Ξενοιστή

Ευαισθησία  
(Compatibility)

Αντοχή  
(Incompatibility)

- Φυτό: γονίδια αντοχής *R* (resistance)
- Παθογόνο : γονίδια μη μολυσματικότητας (*Avr*) (avirulence)

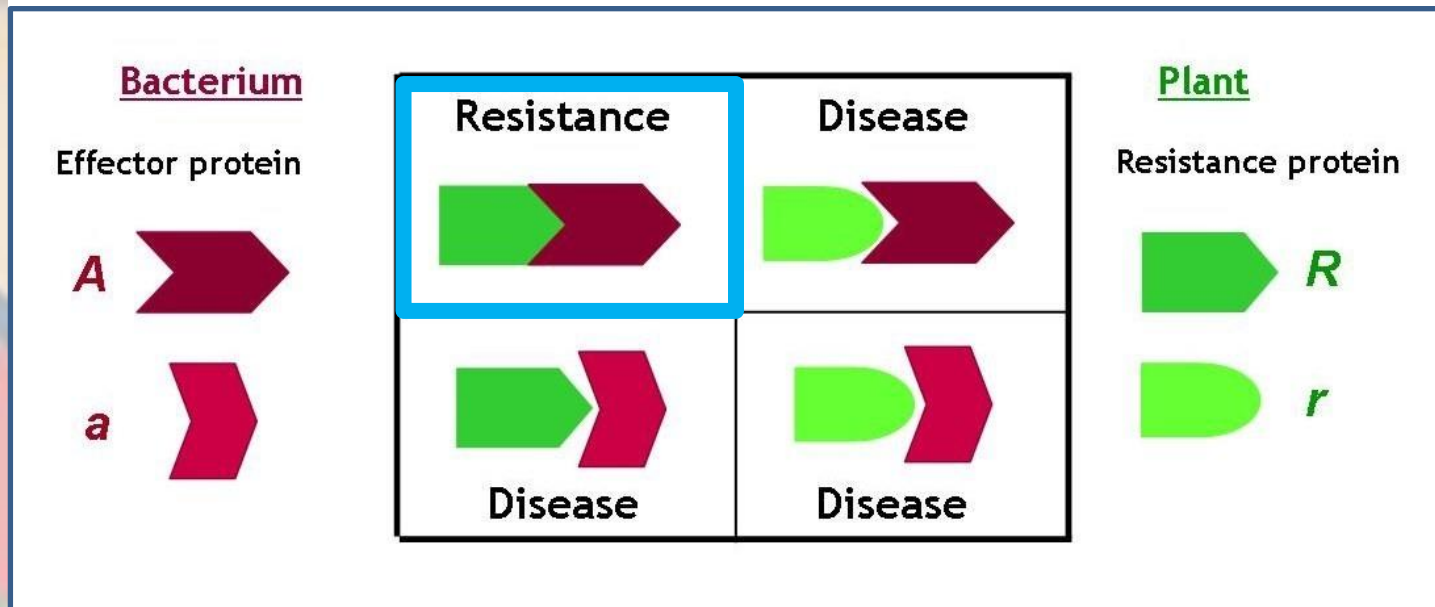


# Γονίδιο-προς-Γονίδιο (gene-for-gene)

- Flor (δεκαετία του '40): μελέτησε τη γενετική αλληλεπίδραση ανάμεσα σε διαφορετικές ποικιλίες (varieties) του *Linum usitatissimum* και φυλές (races) του παθογόνου του μύκητα *Melampsora lini*
- Ένα κυρίαρχο γονίδιο *R* του φυτού προκαλούσε αντίδραση αντοχής παρουσία ενός επίσης κυρίαρχου γονιδίου στο παθογόνο (το *Anr* γονίδιο)
- Το φυτό-ξενιστής που φέρει το *R* γονίδιο είναι ανθεκτικό στο παθογόνο μόνον όταν το παθογόνο φέρει το αντίστοιχο *Anr* γονίδιο
- Αν απουσιάζει είτε το γονίδιο *R* από το φυτό-ξενιστή, είτε το αντίστοιχο *Anr* γονίδιο από το παθογόνο (ή το παθογόνο φέρει ένα διαφορετικό, μη αντίστοιχο αλληλόμορφο), τότε προκύπτει ασθένεια

## The Gene-for-Gene Model of Plant Immunity

<b>Bacterium</b>	<b>Plant</b> Resistance gene	<i>R</i>	<i>r</i>
	Effector gene		
	<i>A</i>	Resistance	Disease
	<i>a</i>	Disease	Disease

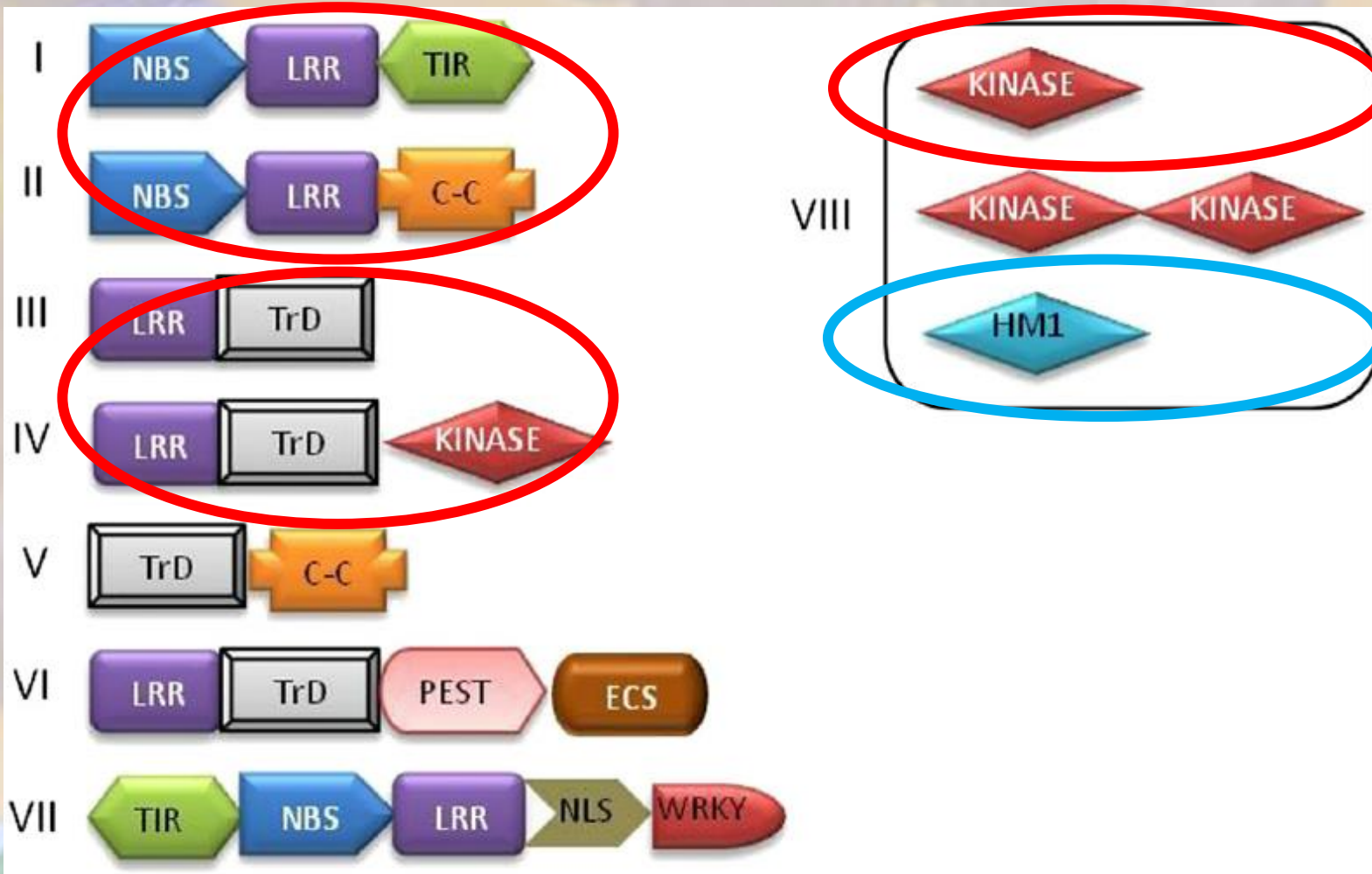


# Γονίδιο-προς-Γονίδιο (gene-for-gene)

- Παρά τις διαφορές στους μηχανισμούς παρασιτισμού που παρουσιάζουν τα διάφορα παθογόνα, ο μηχανισμός άμυνας με κυρίαρχα γονίδια αντοχής *R* έχει καταγραφεί για όλα ταξινομικά τα είδη παθογόνων/ παρασίτων
- Η παρουσία του ζεύγους των γονιδίων *R – Avr* είναι αρκετή για να οδηγήσει το κύτταρο σε διαδικασία προγραμματισμένης νέκρωσης (PCD: programmed cell death), που είναι γνωστή με τον όρο «Αντίδραση Υπερευαισθησίας» (HR: hypersensitive response)
- Τα *R* γονίδια προσφέρουν αντοχή εναντίον βιοτροφικών παθόγονων που στερούνται λόγω κυτταρικού θανάτου θρεπτικά στοιχεία και την ικανότητα να προχωρήσουν σε άλλα κύτταρα
- Η HR, αν και συνηθισμένη, δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση – έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου το παθογόνο αναχαιτίζεται απουσία HR

# ***R* γονίδια (*R* genes)**

- ***R* γονίδια έχουν απομονωθεί (cloned) από διάφορα φυτά**
- **Τέτοια γονίδια προσφέρουν αντοχή σε ιούς, βακτήρια, μύκητες, ωομύκητες, νηματώδεις και έντομα**
- **Παρόλο που ένας μικρός αριθμός τέτοιων γονιδίων είναι μοναδικά, τα περισσότερα ανήκουν σε έναν μικρό αριθμό κατηγοριών\* πρωτεϊνών →**
- **Η αντοχή σε διαφορετικού είδους παθογόνα επιτυγχάνεται μέσω παρόμοιων μηχανισμών**



Major classes of plant resistance (R) genes based on the arrangement of the functional domains. **LRR** e Leucine rich repeats; **NBS** e Nucleotide-binding site; **TIR** **Toll/ Interleukin-1- receptors**; **C-C** e Coiled coil; TrD e Transmembrane domain; PEST e Protein degradation domain (proline-glycine-serine-threonine); ECS e Endocytosis cell signaling domain; NLS e Nuclear localization signal; WRKY e Amino acid domain; HM1 e *Helminthosporium carbonum* toxin reductase enzyme.

# Εντοπισμός *R* γονιδίων

- Η πλειοψηφία των *R* γονιδίων κωδικοποιεί πρωτεΐνες που μπορούν να κατηγοριοποιηθούν
- Αυτό επιτρέπει τον εντοπισμό ομόλογων *R* γονιδίων χωρίς να είναι γνωστό ποια σχέση γονίδιο-προς-γονίδιο διέπουν
- Υπάρχουν όμως και *R* γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δεν ανήκουν σε καμία «τυπική» κατηγορία

# Δομικές περιοχές πρωτεϊνών *R* γονιδίων : (Structural domains of *R* gene products) – 1

- Κινάσες Σερίνης – Θρεονίνης (Serine-Threonine Protein Kinases)
  - Πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διαδικασίες φωσφορυλίωσης\*
  - Φέρουν συντηρημένες περιοχές (conserved regions) με αμινοξέα σερίνης και θρεονίνης που φωσφορυλιώνονται

\* Διαδικασία ρύθμισης της δράσης των πρωτεϊνών

# Δομικές περιοχές πρωτεϊνών *R* γονιδίων : (Structural domains of *R* gene products) – 2

- Επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη (Leucine-Rich Repeats: LRRs)
  - Αποτελούνται από διαδοχικές επαναλήψεις ενός μοτίβου από 24 περίπου αμινοξέα, από τα οποία τα περισσότερα είναι λευκίνες (κ άλλα υδρόφοβα αμινοξέα) που επαναλαμβάνονται σε τακτά διαστήματα
  - Η κρυσταλλική τους δομή μοιάζει με γροθιά (ή ελατήριο), όπου κάθε δάχτυλο αντιπροσωπεύει μία επανάληψη του μοτίβου
  - Τα συντηρημένα (conserved) υδρόφοβα αμινοξέα που βρίσκονται εσωτερικά της κατασκευής δίνουν στην πρωτεΐνη το χαρακτηριστικό της σχήμα
  - Τα υδρόφιλα (λιγότερο συντηρημένα) αμινοξέα που βρίσκονται εξωτερικά (εκτεθειμένα) πρέπει να ευθύνονται για τη δράση της πρωτεΐνης



# Δομικές περιοχές πρωτεϊνών *R* γονιδίων : (Structural domains of *R* gene products) – 2

- Επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη (Leucine-Rich Repeats) - συνέχεια
  - **Αντίστοιχες πρωτεΐνες από τις ζύμες, τη Δροσόφylla και τον άνθρωπο συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών (protein-protein interactions)**

π.χ. ανάμεσα σε ένζυμα, ανάμεσα σε πρωτεΐνες στο ίδιο μονοπάτι, ανάμεσα σε μία ορμόνη και τον υποδοχέα της
  - **Η εξειδίκευση της πρωτεΐνης είναι αποτέλεσμα του αριθμού των επαναλαμβανόμενων μοτίβων ή/και των αμινοξέων (πλην της λευκίνης) που διαφοροποιούνται**

# Δομικές περιοχές πρωτεϊνών *R* γονιδίων : (Structural domains of *R* gene products) – 3

- Περιοχές σύνδεσης νουκλεοτιδίων (Nucleotide Binding Sites: NBS)
  - Περιλαμβάνονται σε πρωτεΐνες που παρουσιάζουν σύνδεση με ATP ή GTP
  - Φέρουν περιοχές πολύ συντηρημένες (highly conserved)
  - Είναι απόλυτα απαραίτητες για τη δράση των *R* πρωτεϊνών
  - → μεταλλάξεις συγκεκριμένων συντηρημένων αμινοξέων είχε ως αποτέλεσμα την κατάργηση της HR παρουσία του παθογόνου σε πειράματα προσωρινής έκφρασης (transient expression assays)

# Δομικές περιοχές πρωτεϊνών *R* γονιδίων : (Structural domains of *R* gene products) – 4

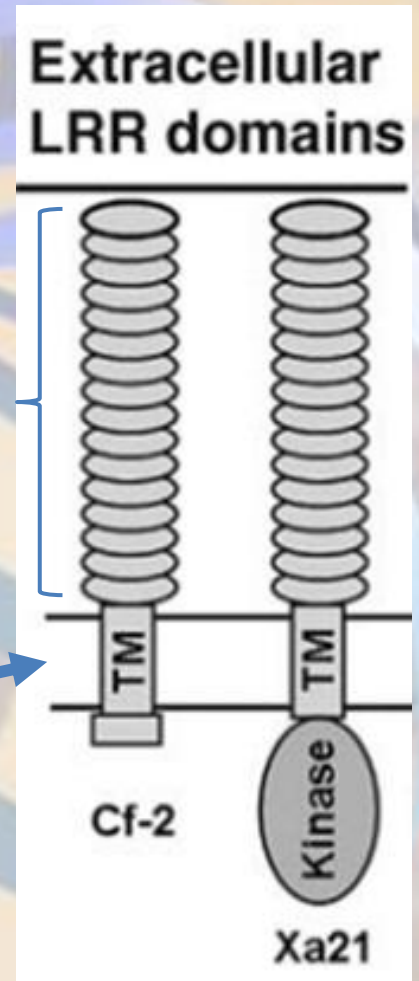
- Φερμουάρ λευκίνης (Leucine Zippers: LZ)
- Σπειροειδής σπείρες (Coiled Coils: CC)
- Συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών
- Βοηθούν τη δημιουργία διμερών κατασκευών από όμοιες ή διαφορετικές πρωτεΐνες (homo-, hetero-dimerization)

# Δομικές περιοχές πρωτεϊνών *R* γονιδίων : (Structural domains of *R* gene products) – 5

- Περιοχές όμοιες με τους υποδοχείς Toll (Δροσόφylla) και IL-1R (Interleukin-1: άνθρωπος) (Toll/Interleukin-1 receptor similarity)
  - Είναι περιοχές γονιδίων που συμμετέχουν στη μετάδοση σημάτων (signalling)
  - Ο υποδοχέας Toll συμμετέχει στην ενεργοποίηση παραγόντων ρύθμισης της μεταγραφής (transcription factors)
  - Ο υποδοχέας IL-1R προκαλεί την έναρξη της μεταγραφής μιας πρωτεΐνης\* που συμβάλλει στην παραγωγή ενεργού οξυγόνου (activated oxygen).
  - Η έκφραση της ίδιας \*πρωτεΐνης επηρεάζεται από ουσίες όπως το σαλικυλικό οξύ (salicylic acid).

# ***R* γονίδια με εξω-κυτταρικές περιοχές (*R* genes encoding extracellular domains)**

- Τα γονίδια *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-9* της τομάτας προσφέρουν αντοχή στο μύκητα *Cladosporium fulvum*
- Κωδικοποιούν πρωτεΐνες που φέρουν μια μεγάλη περιοχή από επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη (LRR domain)
- Η περιοχή αυτή βρίσκεται έξω από το κυτταρόπλασμα
- Υπάρχει επίσης μια περιοχή που συγκρατεί την πρωτεΐνη στην κυτταρική μεμβράνη (transmembrane domain: TM)
- Επίσης, υπάρχει ένα μικρό μέρος της πεπτιδικής αλυσίδας στο κυτταρόπλασμα



# ***R* γονίδια με εξω-κυτταρικές περιοχές** (***R* genes encoding extracellular domains**)

- Οι *Cf* πρωτεΐνες που παράγουν τα διαφορετικά αλληλόμορφα *Cf* γονίδια διαφέρουν στην LRR περιοχή ως προς τον αριθμό των επαναλήψεων (από 25 ως 38) όσο και την αλληλουχία των αμινοξέων (πρωτοταγής δομή)
- Αυτές οι πρωτεΐνες λέγονται πρωτεΐνες που μοιάζουν με υποδοχείς (receptor-like proteins: RLPs)
- Τα προϊόντα των *Anr* γονιδίων (για τα αντίστοιχα *Cf* γονίδια) είναι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες

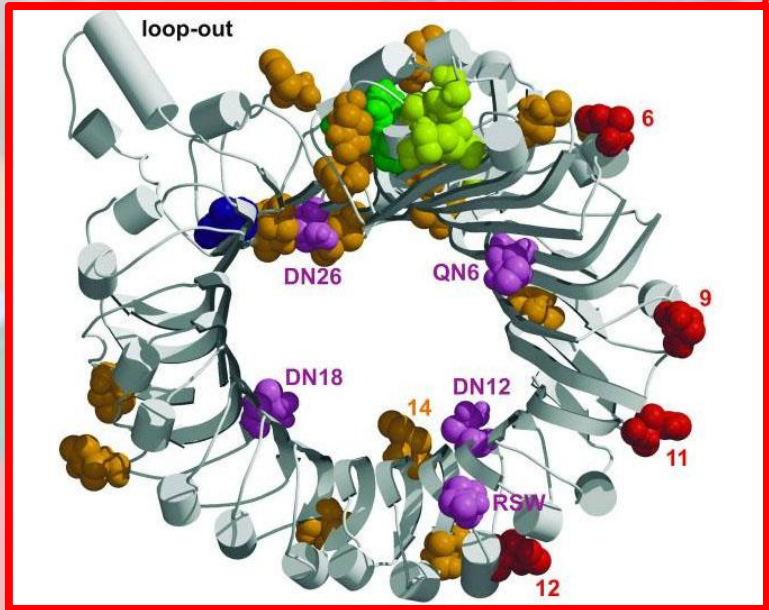
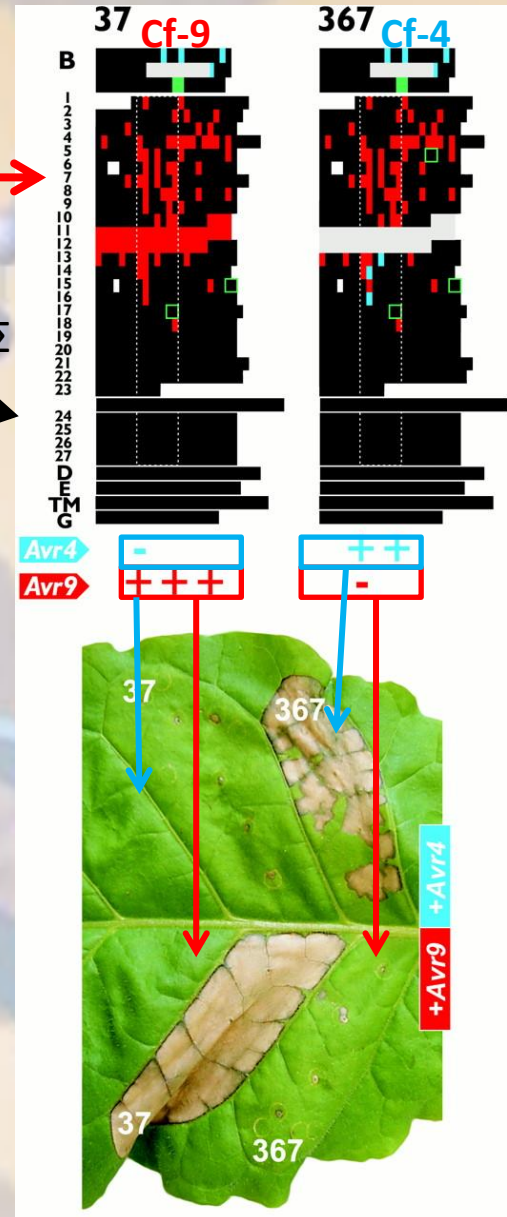
# ***R* γονίδια με εξωκυτταρικές περιοχές- συνέχεια** **(*R* genes encoding extracellular domains)**

- Οι διαφορές ανάμεσα στις πρωτεΐνες από διαφορετικά αλληλόμορφα *Cf* γονίδια βρίσκονται κυρίως στην LRR περιοχή

# Διερεύνηση της σχέσης Cf-4/ 9 προς Avr4/ 9



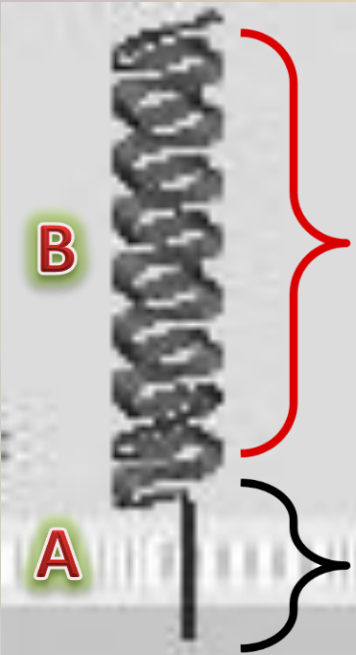
Cf-4/ 9





# ***R* γονίδια με εξωκυτταρικές περιοχές- συνέχεια** **(*R* genes encoding extracellular domains)**

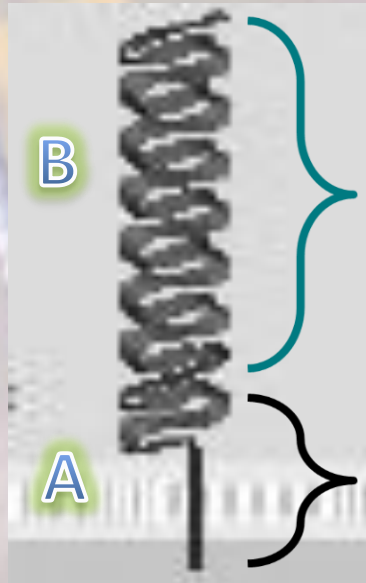
- Οι διαφορές ανάμεσα στις πρωτεΐνες από διαφορετικά αλληλόμορφα *Cf* γονίδια βρίσκονται κυρίως στην LRR περιοχή
- Πειράματα εναλλαγής πρωτεϊνικών περιοχών (domain-swapping experiments) ανάμεσα σε διαφορετικά *Cf* αλληλόμορφα γονίδια έδειξε ότι η περιοχή αυτή σχετίζεται με την ικανότητα αναγνώρισης (recognition specificity)



Cf-9



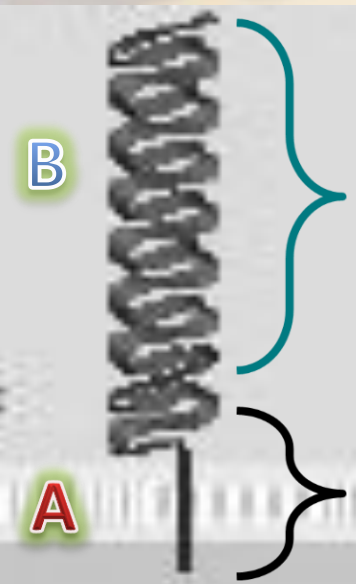
Cf-9



Cf-4



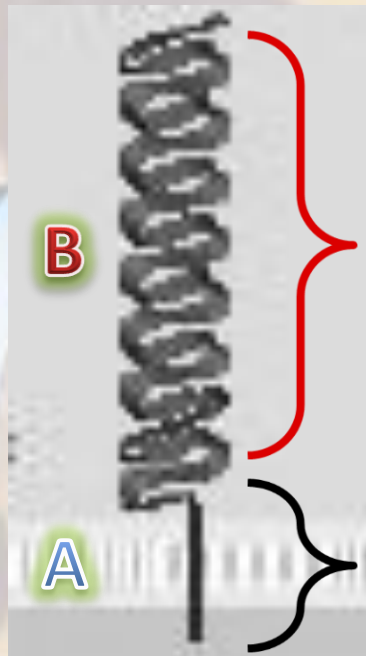
Cf-4



Cf-4



Cf-9



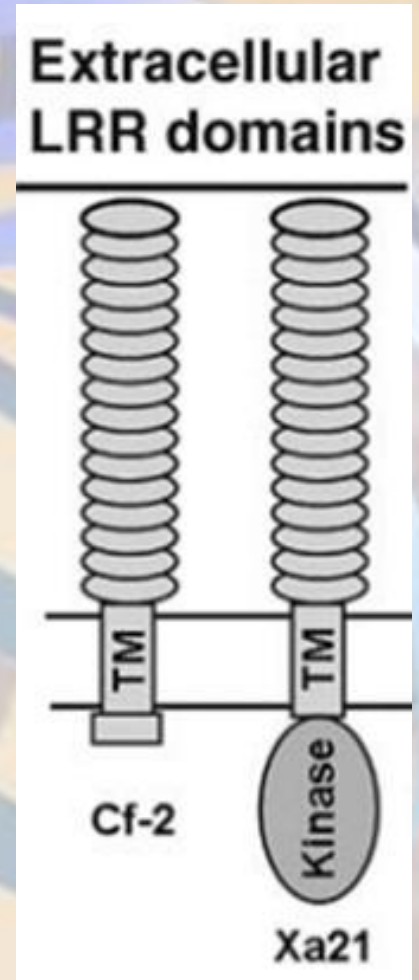
Cf-9



Cf-4

# ***R* γονίδια με εξω-κυτταρικές περιοχές και κυτταροπλασματική κινάση (*R* genes encoding extracellular domains and a cytoplasmic kinase)**

- Τα γονίδια *Xa21*, *Xa3/Xa26*, του ρυζιού προσφέρουν αντοχή στο βακτήριο *Xanthomonas oryzae*
- Κωδικοποιούν πρωτεΐνες που φέρουν μια μεγάλη περιοχή από επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη (LRR domain)
- Η περιοχή αυτή βρίσκεται έξω από το κυτταρόπλασμα
- Φέρουν όμως επίσης και μία κινάση που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα
- Αυτές οι πρωτεΐνες λέγονται κινάσες που μοιάζουν με υποδοχείς (receptor-like kinases: RLKs)



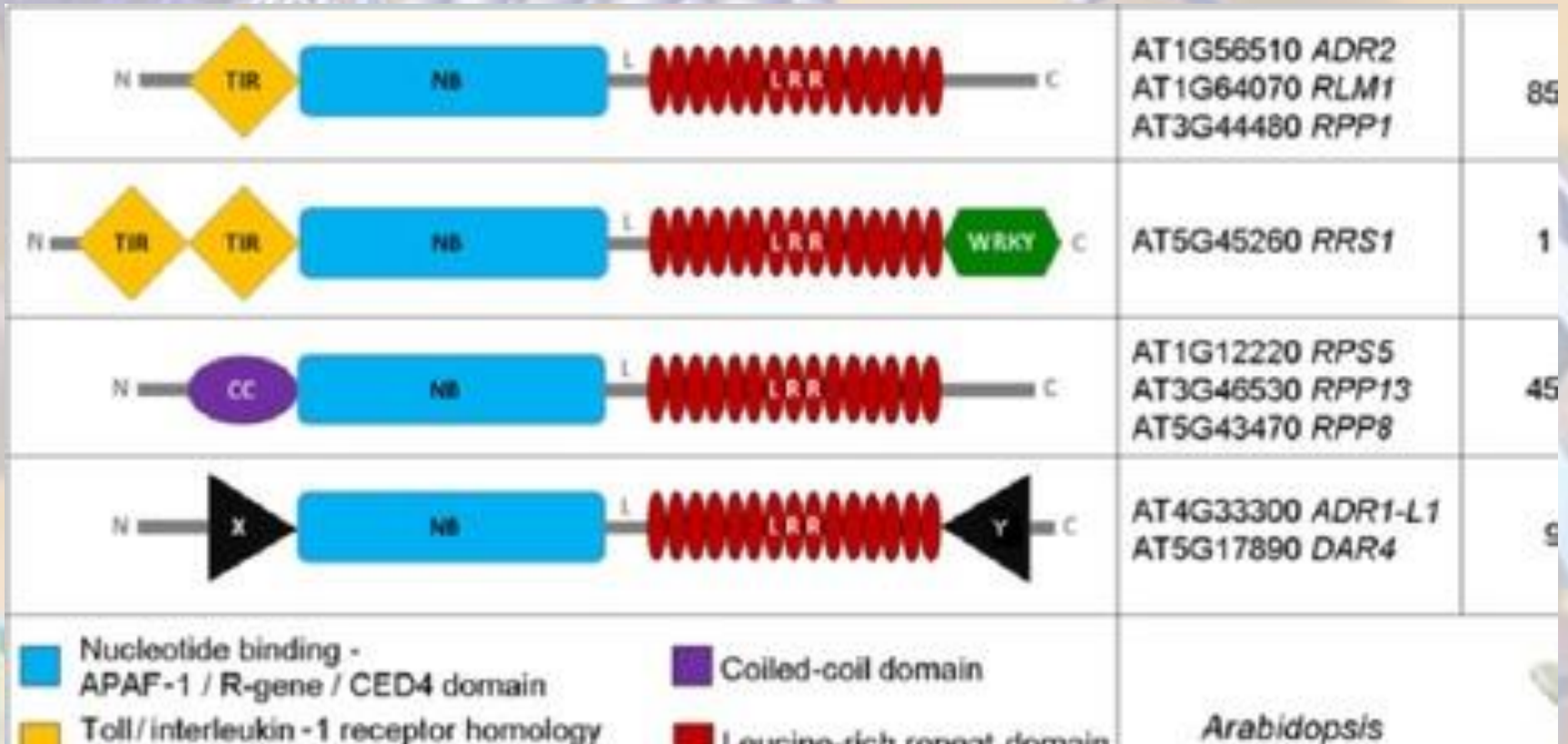
## RLPs - RLKs

- Τα γονίδια που κωδικοποιούν RLPs – RLKs πρωτεΐνες είναι από τα πιο πολυμορφικά ανάμεσα σε διαφορετικές «ποικιλίες» του φυτού μοντέλου *Arabidopsis*
- Σχετικά μικρός αριθμός γονιδίων αντοχής σε παθογόνα (*R genes*) κωδικοποιεί RLPs - RLKs πρωτεΐνες
- → πολλές από αυτές ενδεχομένως να λειτουργούν ως υποδοχείς γενικών διεγερτών (PAMP receptors)
- Ο τρόπος μετάδοσης των μηνυμάτων (signalling) των RLPs είναι άγνωστος, ωστόσο στις RLKs ενδεχομένως να γίνεται μέσω της κινάσης τους

# ***R* γονίδια με περιοχές σύνδεσης νουκλεοτιδίων και επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη (*R* genes encoding NB-LRR domains)**

- Οι NB-LRR πρωτεΐνες των φυτών έχουν ομοιότητες με πρωτεΐνες-υποδοχείς που λειτουργούν σε αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος των ζώων
- Αποτελούνται από μία κεντρική περιοχή σύνδεσης νουκλεοτιδίων (NB) και ένα καρβοξυλικό άκρο με επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη (LRR)
- Η περιοχή LRR διαφέρει εξελικτικά από την αντίστοιχη των πρωτεϊνών με εξωκυτταρικό τμήμα
- Η διαφοροποίηση των πρωτεϊνών αυτών γίνεται με βάση τις δομές (μοτίβα) που υπάρχουν στο αμινικό τους άκρο
- Η κύρια κατηγοριοποίηση τους γίνεται με την παρουσία ή όχι περιοχής TIR (των υποδοχέων Toll, interleucine-1)

# Δομή R γονιδίων



# ***R* γονίδια με περιοχές σύνδεσης νουκλεοτιδίων και επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη- συνέχεια (*R* genes encoding NB-LRR domains)**

- Αναλύσεις βιοπληροφορικής έχουν αποκαλύψει μεγάλο αριθμό τέτοιων γονιδίων
- Στο *Arabidopsis* 149 γονίδια κωδικοποιούν NB-LRR πρωτεΐνες, από τα οποία 94 με αμινικό TIR άκρο
- Σε φυτά με μεγαλύτερο γονιδίωμα ο αριθμός είναι μεγαλύτερος
- Στο ρύζι ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν NB-LRR πρωτεΐνες είναι 400, καμία ωστόσο δε φέρει TIR αμινικό άκρο
- Στην παπάγια μόνον 58 γονίδια κωδικοποιούν NB-LRR πρωτεΐνες, οι περισσότερες από τις οποίες ανήκουν στην κλάση CC-NB-LRRs

# ***R* γονίδια με περιοχές σύνδεσης νουκλεοτιδίων και επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη- συνέχεια (*R* genes encoding NB-LRR domains)**

- Συχνά τα γονίδια κωδικοποιούν NB-LRR πρωτεΐνες βρίσκονται σε ομάδες (clusters)
- → αποτέλεσμα διπλασιασμού (duplication) ή χιασμάτων (crossing-over)



# ***R* γονίδια με περιοχές σύνδεσης νουκλεοτιδίων και επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη- συνέχεια (*R* genes encoding NB-LRR domains)**

- ***R* γονίδια με μεγάλη ομοιότητα μπορεί να αναγνωρίζουν πολύ διαφορετικούς μικρο-οργανισμούς**
- **Τα γονίδια *Rx* και *Gpa2* από την πατάτα, βρίσκονται στην ίδια ομάδα (cluster) και προσδίδουν αντοχή σε έναν ιό το πρώτο και έναν νηματώδη το δεύτερο**
- **Τρία αλληλόμορφα γονίδια από διαφορετικές «ποικιλίες» *Arabidopsis* (τα *HRT*, *RCY1*, *RPP8*) προσδίδουν αντοχή σε δύο διαφορετικά γένη ιών TCV, CMV και στο μύκητα *Hyaloperonospora parasitica*, αντίστοιχα**
- **Ένα γονίδιο το *RPM1* του *Arabidopsis* αναγνωρίζει δύο ειδικούς διεγέρτες (effectors) του βακτηρίου *Pseudomonas syringae* (*AvrRPM1*, *AvrB*)**

# ***R* γονίδια με περιοχές σύνδεσης νουκλεοτιδίων και επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη- συνέχεια (*R* genes encoding NB-LRR domains)**

- Το γονίδιο *Mi-1* της πατάτας προσδίδει αντοχή σε έναν νηματώδη και σε μία αφίδα της πατάτας
- Τα γονίδια *RPM1* και *Rgp1-b* από το *Arabidopsis* και τη σόγια, αντίστοιχα, αναγνωρίζουν τον ίδιο ειδικό διεγέρτη (effector) από το βακτήριο *P. syringae* (AvrB) παρόλο που κωδικοποιούν δύο CC-NB-LRR πρωτεΐνες με λίγες ομοιότητες μεταξύ τους.

# ***R* γονίδια με περιοχές σύνδεσης νουκλεοτιδίων και επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη- συνέχεια (*R* genes encoding NB-LRR domains)**

- Τα γονίδια που κωδικοποιούν NB-LRR πρωτεΐνες είναι από τα πιο πολυμορφικά γονίδια του *Arabidopsis*
- Ο πολυμορφισμός εκδηλώνεται ακόμη και με την παρουσία/απουσία ενός *R* γονιδίων ανάμεσα στα άτομα ενός πληθυσμού («ποικιλία») ή μεταξύ πληθυσμών
- Ο πολυμορφισμός εντοπίζεται κυρίως στην LRR περιοχή
- → Η LRR περιοχή είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του παθογόνου (pathogen recognition specificity)
- (α) Πειράματα ανταλλαγής LRR περιοχών (domain swapping experiments) ανάμεσα σε συγγενή *R* γονίδια
- (β) Αλλαγή των ιών που αναγνωρίζονται από την Rx πρωτεΐνη, ανάλογα με αλλαγές στην LRR περιοχή

# ***R* γονίδια με περιοχές σύνδεσης νουκλεοτιδίων και επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη- συνέχεια (*R* genes encoding NB-LRR domains)**

- Η TIR περιοχή είναι πολύ συντηρημένη στα γονίδια της TIR-NB-LRR κλάσης των φυτών
- Η TIR περιοχή στα ζώα είναι υπεύθυνη για τη μετάδοση μηνυμάτων (signalling)
- Η μετάδοση σημάτων στα ζώα μέσω των TIR περιοχών γίνεται με την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών που περιέχουν TIR περιοχές
- → Αλληλεπίδραση μεταξύ μιας TIR-NB-LRR πρωτεΐνης και τμήμα της NB περιοχής της προκάλεσε αντίδραση υπερευαισθησίας απουσία του παθογόνου (φυτά: *Arabidopsis*, λινάρι) (transient expression)

# ***R* γονίδια με περιοχές σύνδεσης νουκλεοτιδίων και επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη- συνέχεια (*R* genes encoding NB-LRR domains)**

- Στις κλάσεις των γονιδίων που κωδικοποιούν NB-LRR πρωτεΐνες χωρίς TIR περιοχή το αμινικό άκρο δεν είναι τόσο συντηρημένο
- Στα Σολανώδη υπάρχουν γονίδια που κωδικοποιούν CC-NB-LRR πρωτεΐνες που φέρουν επιπλέον συντηρημένες περιοχές και ονομάζονται Σολανώδης περιοχή (Solanaceous domain)

# ***R* γονίδια με περιοχές σύνδεσης νουκλεοτιδίων και επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη- συνέχεια (*R* genes encoding NB-LRR domains)**

- Η κεντρική **NB** περιοχή είναι η πιο συντηρημένη ανάμεσα στα γονίδια που κωδικοποιούν NB-LRR πρωτεΐνες όλων των κλάσεων
- Υπερ-έκφραση (over-expression) της NB περιοχής της *R<sub>x</sub>* προκάλεσε αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) → συμμετοχή στη μετάδοση σημάτων
- Ανάμεσα στις NB και LRR περιοχές υπάρχει μια περιοχή που λέγεται **ARC** εξαιτίας της συντήρησης σε αυτήν που παρατηρείται ανάμεσα στις πρωτεΐνες Araf-1 (άνθρωπος\*) – *R* (των φυτών) – Ced-4 (*C. elegans*: νηματώδης\*)
- \* σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα και την απόπτωση (: κυτταρικός θάνατος)
- Η περιοχή ARC διαιρείται στις περιοχές ARC1 και ARC2

# ***R* γονίδια με περιοχές σύνδεσης νουκλεοτιδίων και επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη- συνέχεια (*R* genes encoding NB-LRR domains)**

- Θεωρείται ότι οι NB-LRR πρωτεΐνες πριν την αναγνώριση του παθογόνου διατηρούνται ανενεργές (δε μεταδίδουν σήματα) χάρη στην τρισδιάστατη δομή τους λόγω αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις περιοχές ARC και LRR
- → Διαγραφή ή μεταλλάξεις νουκλεοτιδίων στις περιοχές ARC ή/και LRR προκάλεσε αντίδραση υπερευαισθησίας (HR) απουσία του παθογόνου
- Μεταλλάξεις σε μια πολύ συντηρημένη περιοχή 3 αμινοξέων της περιοχής ARC2 οδήγησαν σε αυτόματη λειτουργία του γονιδίου
- → ο ρόλος της ARC2 είναι η ενεργοποίηση των διεργασιών που ακολουθούν την αναγνώριση του παθογόνου

# Απευθείας αναγνώριση της Avr πρωτεΐνης

- Ο πιο ευνόητος μηχανισμός της θεωρίας γονίδιο-προς-γονίδιο για την αντοχή του φυτού στα παθογόνα είναι η απευθείας αναγνώριση του ειδικού διεγέρτη (effector) που παράγει το *Avr* γονίδιο από την R πρωτεΐνη του φυτού
  - Ο μηχανισμός της απευθείας αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις πρωτεΐνες R - Avr ως «υποδοχέας – υπόστρωμα» έχει αποδειχθεί σε πολύ λίγες περιπτώσεις
    - 1) Λινάρι (flax): πρωτεΐνες L5, L6 – *M. lini* (σκωρίαση): πρωτεΐνες AvrL567
    - 2) *Arabidopsis*: RRSI-R – *R. solanacearum*: PopP2
    - 3) \*Ρύζι: Pi-ta – *M. grisea* (πυρικούλαριωση): AvrPi-ta
    - 4) \*\*Καπνός: N – TMV: P50 υπομονάδα της ρεπλικάσης
- \* Αλληλεπίδραση με ολόκληρη (full-length) την πρωτεΐνη ή χωρίς την TIR περιοχή  
\*\* Αλληλεπίδραση με ολόκληρη (full-length) την πρωτεΐνη ή μόνον την LRR περιοχή



# Μη απευθείας αναγνώριση της Avr πρωτεΐνης

- Η αναγνώριση του ειδικού διεγέρτη (effector) που παράγει το *Avr* γονίδιο γίνεται από μια δεύτερη πρωτεΐνη που αντιδρά με την LRR πρωτεΐνη του φυτού
- Σύμφωνα με την «υπόθεση του φύλακα» (guard hypothesis), η NB-LRR πρωτεΐνη ελέγχει την κατάσταση μιας δεύτερης πρωτεΐνης του φυτού, η οποία είναι ο στόχος δράσης της *Avr* πρωτεΐνης
- Έτσι, η NB-LRR πρωτεΐνη-«φύλακας» εντοπίζει αλλαγές που προκαλεί στη δομή της δεύτερης πρωτεΐνης (υπό έλεγχο) η δράση της *Avr* πρωτεΐνης του παθογόνου

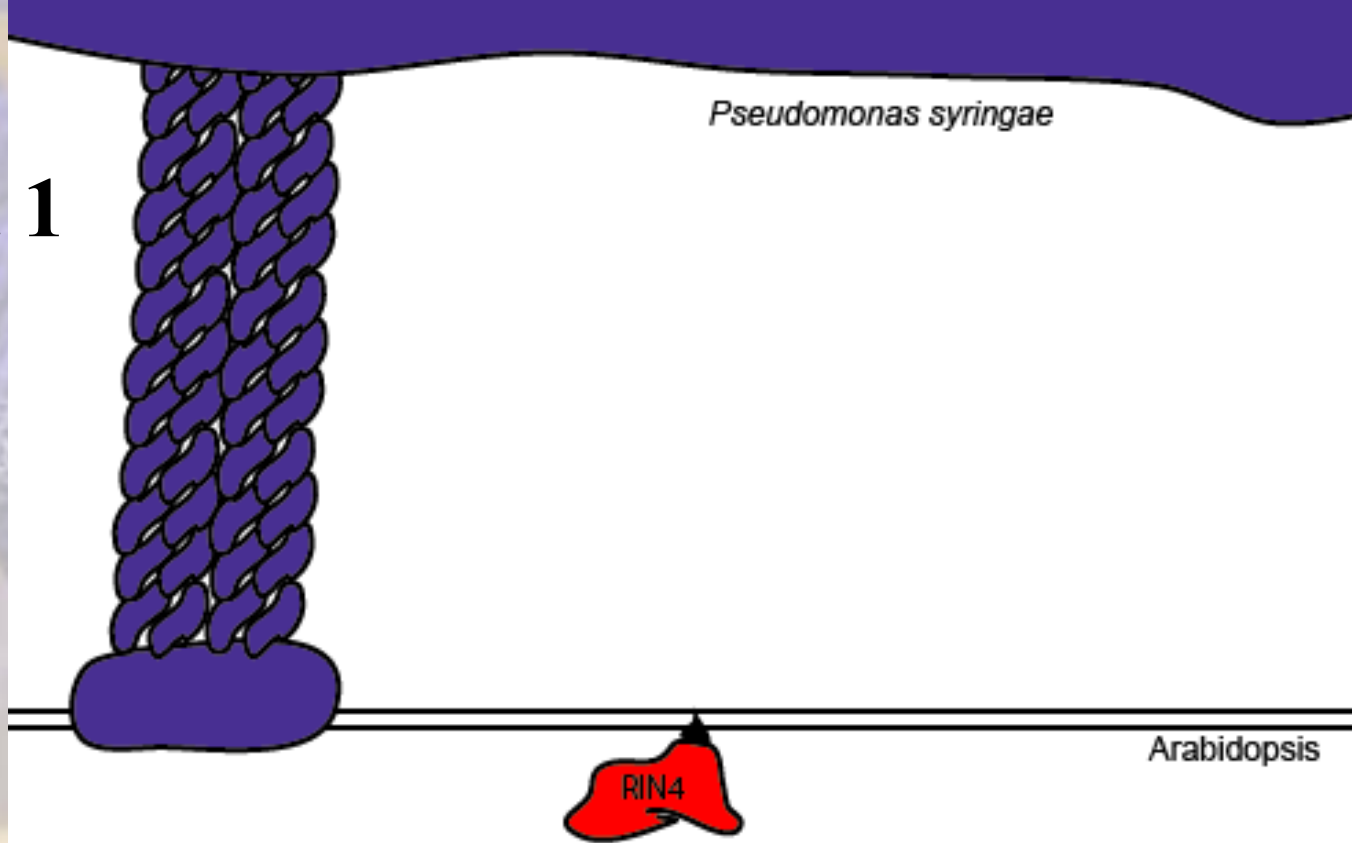
# Μη απευθείας αναγνώριση -συνέχεια

- Στο *Arabidopsis*, ο συμπαράγοντας (co-factor) RIN4 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη RPM1 (στην CC περιοχή της CC-NB-LRR πρωτεΐνης)
- Ο RIN4 αλληλεπιδρά επίσης με τις πρωτεΐνες AnrRpm1 και AnrB → φωσφορυλίωση της RIN4 → ενεργοποίηση της RPM1 (HR: αντοχή στο *P. syringae*)

# Μη απευθείας αναγνώριση -συνέχεια

- Στο *Arabidopsis* ο συμπαράγοντας (co-factor) RIN4 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη RPS2 (στην CC περιοχή της CC-NB-LRR πρωτεΐνης)
- Ο RIN4 αλληλεπιδρά επίσης με την πρωτεΐνη AnrRpt2 → κυστεϊνική πρωτεάση που «κόβει» την RIN4 → ενεργοποίηση της RPS2 (HR: αντοχή στο *P. syringae*)

# Round 1

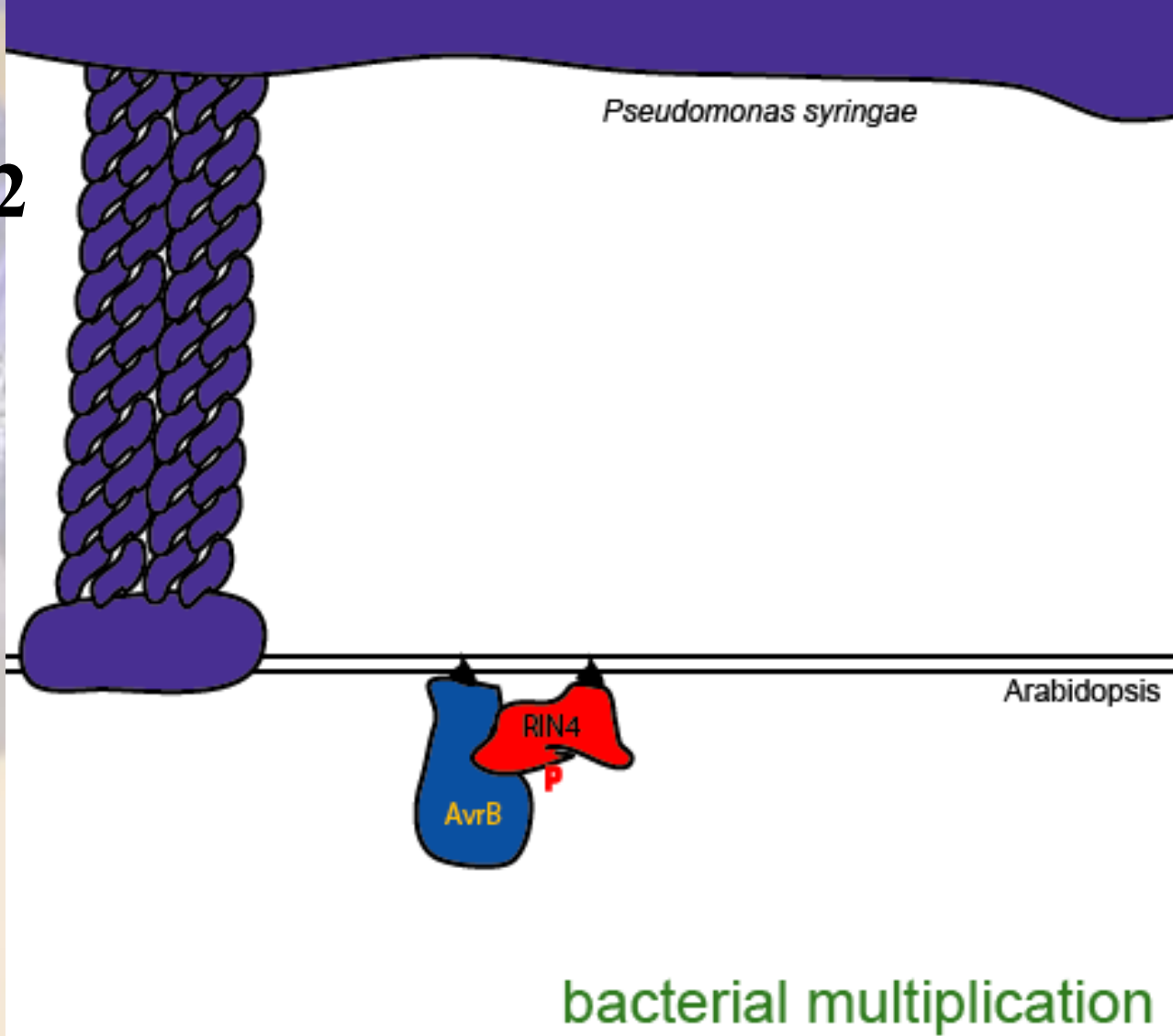


Arabidopsis

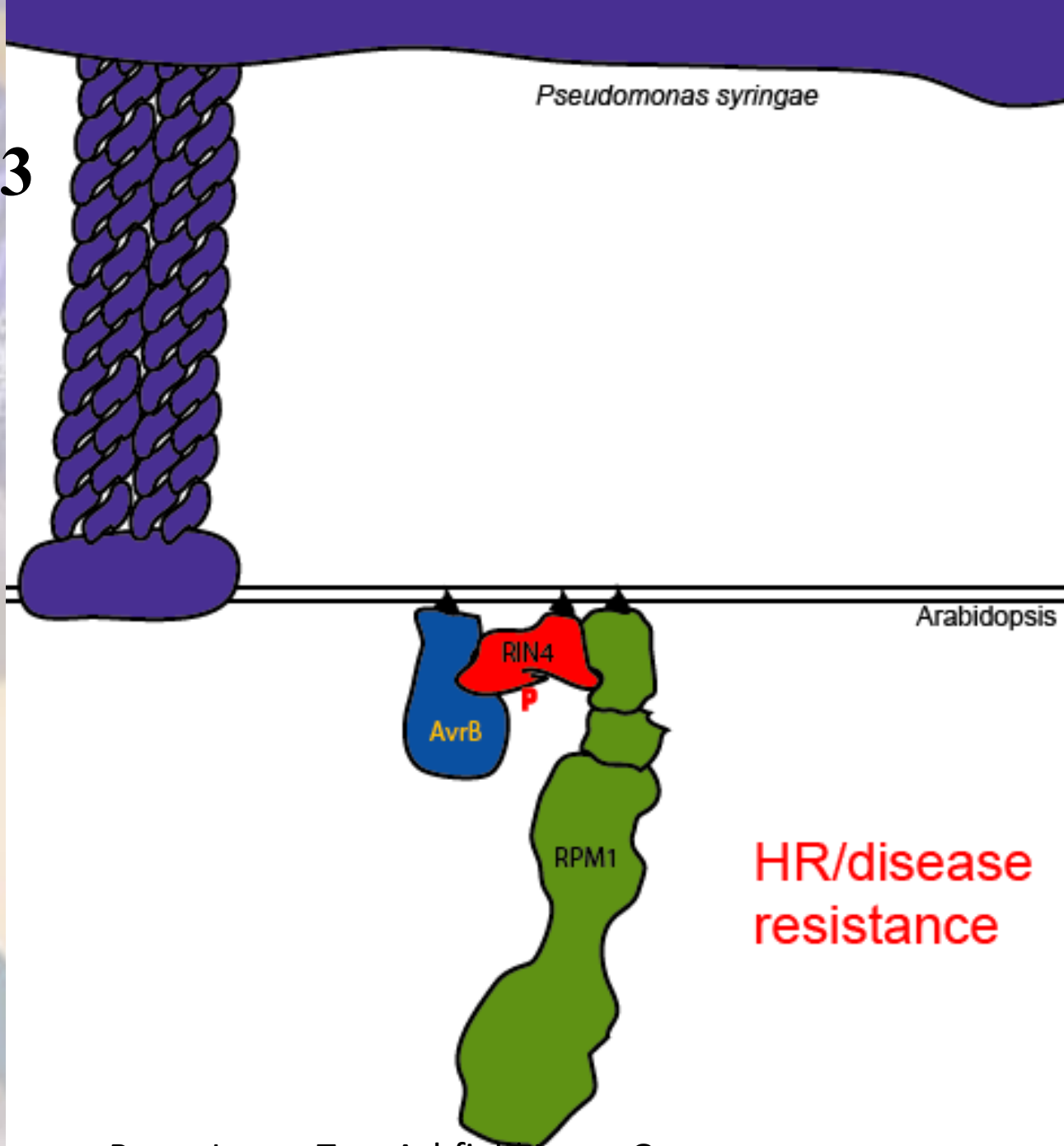
RIN4

**basal defense**

# Round 2



# Round 3



*Pseudomonas syringae*

Arabidopsis

AvrB

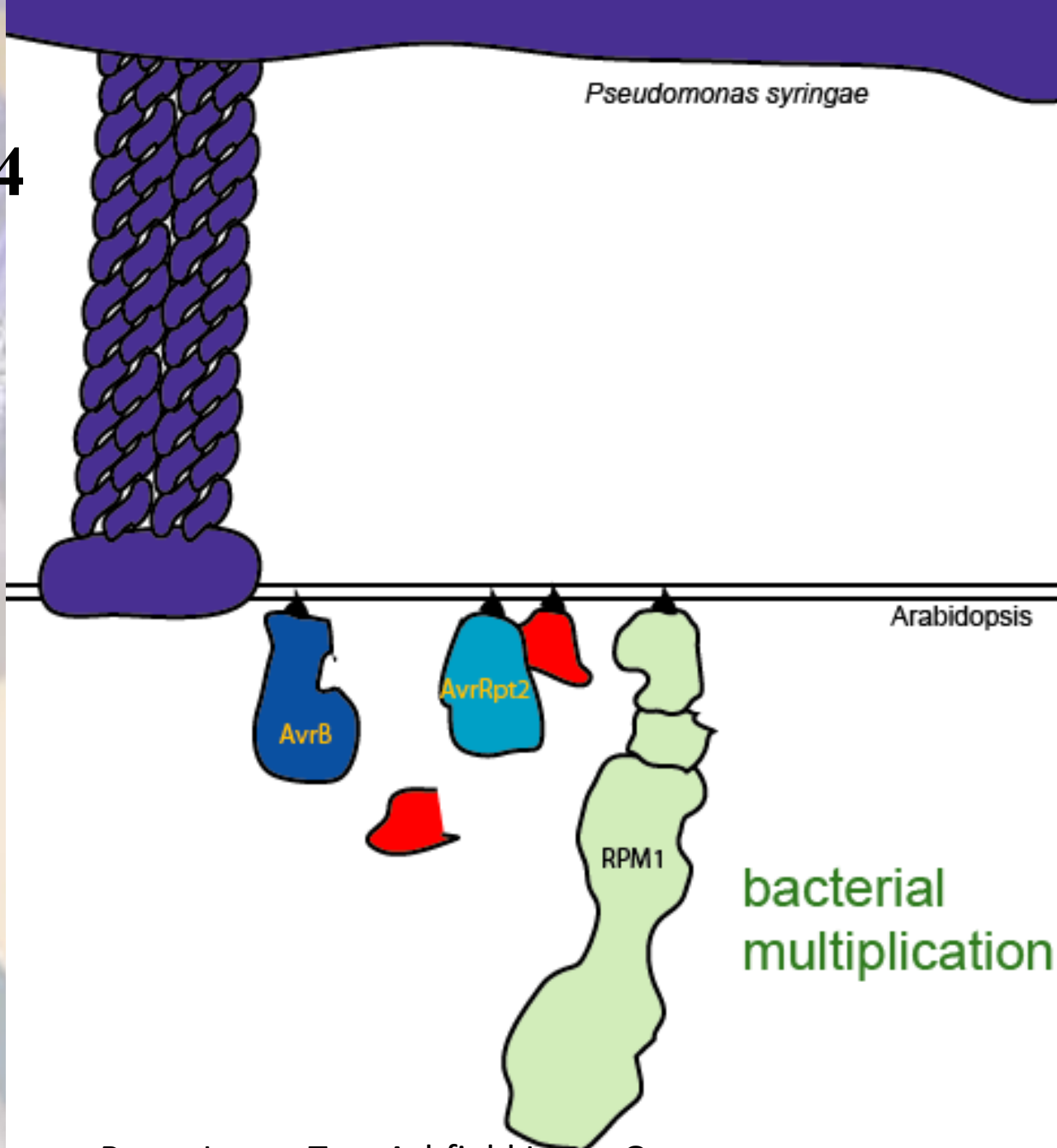
RIN4

P

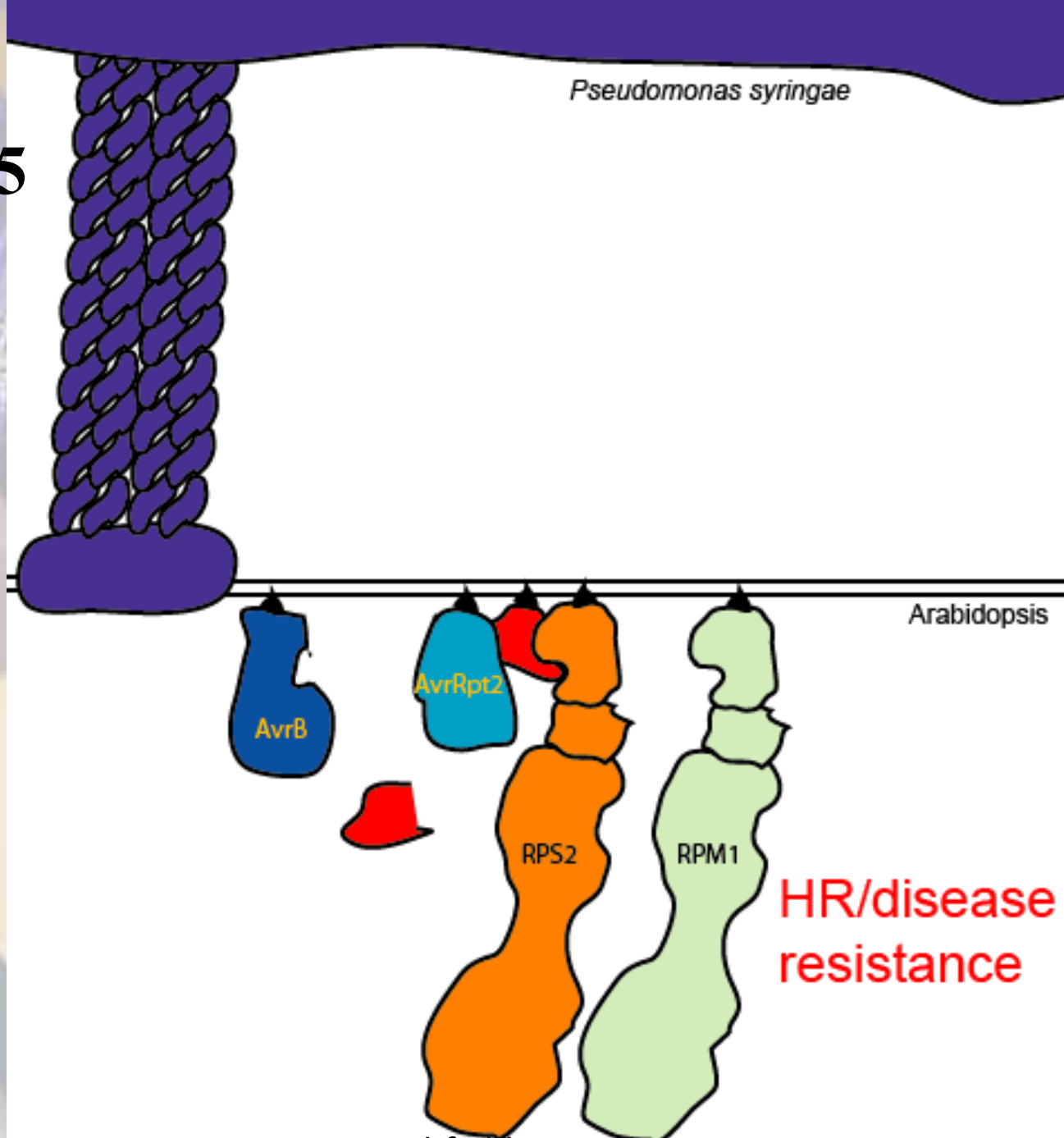
RPM1

HR/disease  
resistance

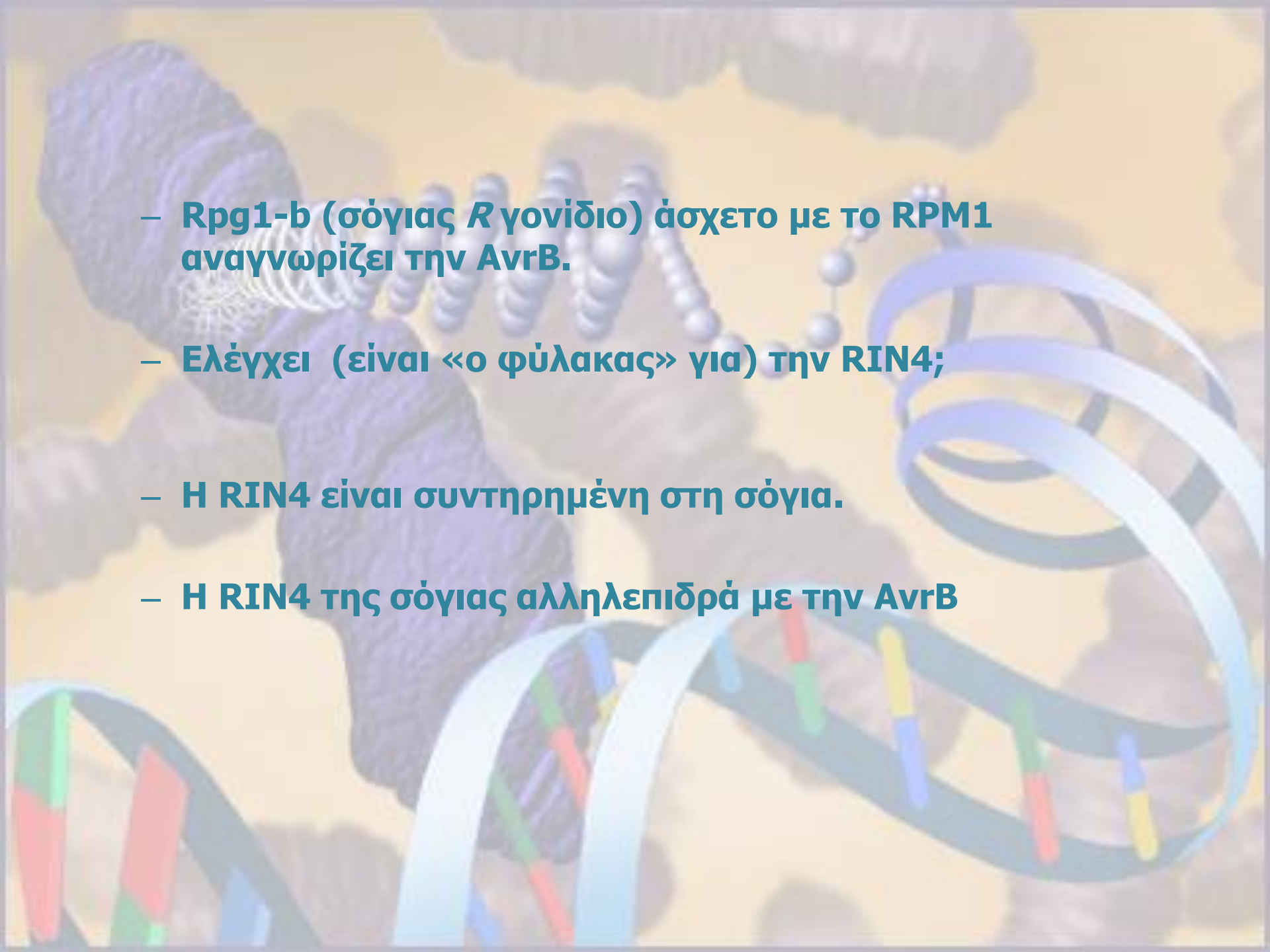
# Round 4



# Round 5





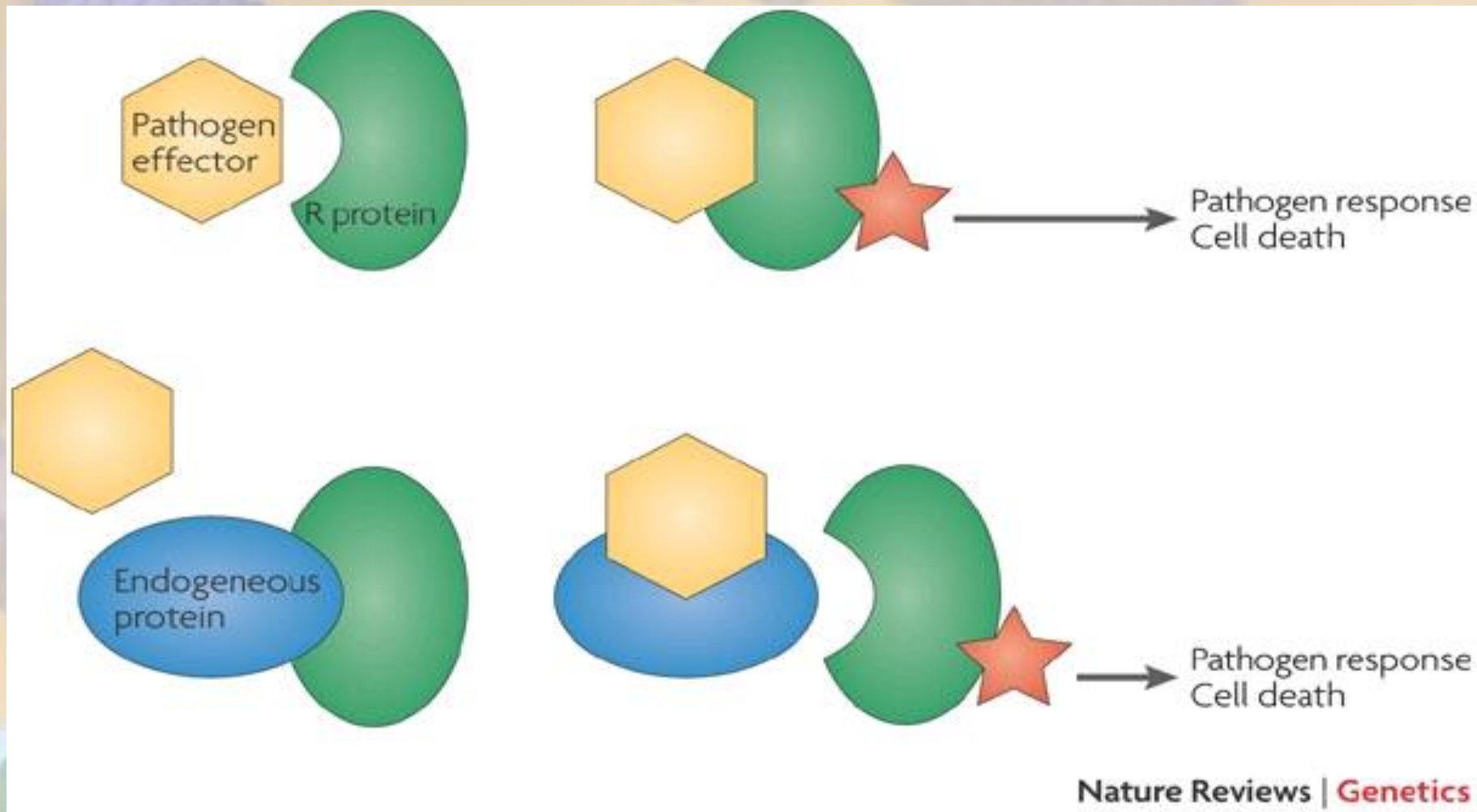
- 
- A 3D molecular model showing a large, dark purple protein structure on the left, which is interacting with a DNA double helix. The DNA is represented by a blue ribbon structure with colorful base pairs (red, green, yellow, blue) visible. The background is a light yellowish-brown with some faint, larger-scale molecular structures.
- Rpg1-b (σγίας *R* γονίδιο) άσχετο με το RPM1 αναγνωρίζει την AnrB.
  - Ελέγχει (είναι «ο φύλακας» για) την RIN4;
  - Η RIN4 είναι συντηρημένη στη σόγια.
  - Η RIN4 της σόγιας αλληλεπιδρά με την AnrB

# Μη απευθείας αναγνώριση -συνέχεια

- Στον καπνό, η πρωτεΐνη N αλληλεπιδρά (στην TIR περιοχή) με την πρωτεΐνη NRIP1 (χλωροπλάστη), που λειτουργεί ως σουλφουρική τρανσφεράση (2008)
- Η NRIP1 αλληλεπιδρά επίσης με τον ειδικό διεγέρτη του TMV την υπομονάδα P50 της ρεπλικάσης
- Ήταν ήδη γνωστό (2006) ότι η N αλληλεπιδρά με την P50 (στην NB-LRR περιοχή)
- → Μπορεί στο φυτό (*in planta*) η αλληλεπίδραση με τις NB-LRR πρωτεΐνες στο αμινικό τους άκρο να δημιουργεί τον κατάλληλο «σκελετό» όπου στη συνέχεια οι R και Avr πρωτεΐνες θα σχηματίσουν ένα σύμπλοκο, στο οποίο οι R πρωτεΐνες θα αλληλεπιδρούν με το LRR άκρο τους

# Μη απευθείας αναγνώριση -συνέχεια

- Η πρωτεΐνη Anr2 (από το *C. fulvum*) αλληλεπιδρά με μια πρωτεάση από την τομάτα, την Rcr3, και ανακόπτει τη δράση της
- Αυτή η αλληλεπίδραση είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση της αντίδρασης υπερευαισθησίας (HR) από τη δράση της Cf-2 (RLP πρωτεΐνη)
- Παρόλα αυτά δεν έχει αποδειχθεί αλληλεπίδραση μεταξύ της Cf-2 και της Rcr3



# Πλεονεκτήματα της μη απευθείας αναγνώρισης της Avr πρωτεΐνης

- Αναγνώριση της αλλαγής στη δομή μιας πρωτεΐνης ή αλλαγών στις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών
- → Οι R πρωτεΐνες μπορεί να αναγνωρίζουν τη δράση των ειδικών διεγερτών (effectors) χωρίς αυτό να εξαρτάται απόλυτα από την αλληλουχία της πρωτεΐνης τους
- → Αυτό επιτρέπει την αναγνώριση ενός ειδικού διεγέρτη ακόμη και όταν συμβούν κάποιες μεταλλάξεις στην αλληλουχία του : πίεση επιλογής
- → Δεν απαιτείται μεγάλος αριθμός πολύ εξειδικευμένων «υποδοχέων», όπως συμβαίνει με τα αντισώματα στα ζώα
- → Η αναγνώριση «σε δύο στάδια» επιτρέπει την ανάπτυξη μεγαλύτερου εύρους αναγνώρισης : ένα γονίδιο του φυτού – αναγνώριση γονιδίων από πολλά παθογόνα (π.χ. Mi τομάτας: αφίδες, νηματώδεις)