



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y
APLICADAS
Centro de Investigación en Dinámica Celular

Análisis funcional de los dominios involucrados en la
interacción de las proteínas NPR1-NPR3 y NPR1-NPR4
mediante la Complementación Bimolecular de la
Fluorescencia (BiFC)

TESIS

que para obtener el título de
Licenciado en Ciencias área terminal de Bioquímica y
Biología Molecular

Presenta

EVERARDO JAIR FLORES CUEVAS

Director de Tesis:

Dr. Mario Alberto Serrano Ortega
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y
APLICADAS
Centro de Investigación en Dinámica Celular

Análisis funcional de los dominios involucrados en la
interacción de las proteínas NPR1-NPR3 y NPR1-NPR4
mediante la Complementación Bimolecular de la
Fluorescencia (BiFC)

TESIS

que para obtener el título de
Licenciado en Ciencias área terminal de Bioquímica y
Biología Molecular

Presenta

EVERARDO JAIR FLORES CUEVAS

Director de Tesis:

Dr. Mario Alberto Serrano Ortega
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó el C. **FLORES CUEVAS EVERARDO JAIR** con número de matrícula **20164003490** cuyo título es:

"Análisis funcional de los dominios involucrados en la interacción de las proteínas NPR1-NPR3 y NPR1-NPR4 mediante la Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC)"

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 07 de junio del 2021

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
DR. GUSTAVO RODRÍGUEZ ALONSO
DR. MARIO ALBERTO SERRANO ORTEGA
DR. CARLOS DANIEL AMERO TELLO
DR. DAMIEN JEAN-RENE FORMEY DE SAINTLOUVENT

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE
SEGUNDO SUPLENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DAMIEN JEAN RENÉ FORMEY DE SAINT LOUVENT | Fecha:2021-06-07 13:47:03 | Firmante

AJo0huJnZid5dTCHM7jgOmRhvzNXePI88f/NukMYqOp/1g6QB68ZvEDgWe5CJZyQNmjBbtQeR5BQL9XIRfOMFoXN4xKUSCZDcWGAq5uwkOh8cVTYEMaVGMjsKofh+qjSwPndqNYWXZHagcP3sJl19iknuA6uAeQ6Ckkzt5ijKyzN9zZhJEEmPdGVC9kAQm6wMhtKAIMWweumpYqijLd56SkJZ/ufcKbQ2cmfWWHDv9RGS2CyyT18BbiAplS86fbYj56JxJvGs/KmTgImGNcRkdZna4H3kcOcpLgn0aLz+mredlgXD3/jp3ZVWexuw00hBNZyNS4khe0XSXE2yDbczA==

MARIO ALBERTO SERRANO ORTEGA | Fecha:2021-06-07 14:12:40 | Firmante

S9xxgPqanijPjsNnSlmPfdEeQ/pmbHLGAAMMi3Fobde9tkhq1STbjyc7HKNypWISYeWr5BySzUce410/8GSf0WVwy9vaB5mQdPpl/6jHk5Yi5S1jW58Ok8RsGEcAEQKWfoAHrxZ8/XdS/YaW/d1jmnYjSgeQz8liVgr90wANELb8MaJnLJ1RqnXX4H5xhhCJhpE8UUriE3PtL9q+/8Am+UepQ/SUMLfeOFmOGKXGhLxqxx7KvblYc6O66MfK9omM+W9LoJ/PAqD5R4zCPyVCXJBw2yLihTbwEbgDn9TeKcW7nlZamp3viUO/jRjj+O3V9FiyKQDj2UadWqhFw==

LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO | Fecha:2021-06-07 21:15:05 | Firmante

bXNFhEex+4+MV4IV3Eb3DjRD6xIkjZ7NcqZhpvsySfuf154jFQcB+7A9RnENHo7GDcoLkwubj1n54ldpAHWaECJlyFZZGC6A4uo2jhwKnrC/rJ5Ny9KznDo+Tln2j8yOHetxyiZfXmgWIVmTIHgePPrAUw3VC/G813zUNU6wqIPU5D3ubmT7nYLRosZKL4sR4USERLYjWwnUjJEEEGepDCqcvBGtCVM79JYQ2uYTFQeWXPIm0AXgWxmU18NbWU8C2WfyEuynYn57zcRqFYnILfMLHjK/75JI8tKTnAVtPPWOS7w2VcaFICOfmOorWrrx4Z9b4eTjvAV5bL6P8mWlw==

GUSTAVO RODRÍGUEZ ALONSO | Fecha:2021-06-08 13:52:50 | Firmante

dreeRUpwVBkQPA7n+SSNHpGehYdgKedfrwvuiPN75Z5pWcwuwsRAGlN9zEuXhLDFHGUxsnwDml0PB2H170sYeN6Nc+rAbOOIXCMp3m5wYcmqozG+Hmy6JWmUj8mjmj8U hUGe4qLHqWbcAiR90DoU2F+bl9pCk5tiQNdCfuy91mMvnVuagS5x0HdzBRmXeq3T72FkXB4ISFmALREtbBUVtAcj3QE CyaQ8VC5D95f3DKT9xZO+BcGbc5kOhjlr/F5UKGvSvQHGYE7Y5INC7ypHeshkx3vxsISD020rXqTISTrTnTrocdRQXQNIOS/oCAyI46L2tCXGyEgAfN037qIQ==

CARLOS DANIEL AMERO TELLO | Fecha:2021-06-08 18:26:15 | Firmante

WCJMTpjrrcZwKDKsDJT+cl9reK1jJimEznkJjWrWdyphATHSCc/h0ldF5ntqQP7yOkU9xUnkGT9XRT6Tb4QSeW8/0HVP0AR7lpJeGE/c3txHI00aAQw9nIHFKLHhRXnI6E/5TWt39CH90OICtNGvWrEYc3fUCrkF4nKy25b7Z77ceLXaL1X8SRzA9vYDF9pWrJWtG2G7EBOC/z+UjpazGUKJmKdBUUNT4vRCQ5BY2Xyj9uHwZTKQVE9r4OB32oXnyqXH05ywJ580JrEc87NvQQZvEfy52R5j26ll51WU0FCaaYU8PfuUSmuniBSTj7H+iW7OI+6iRsfYhkJmBA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



BorUu5

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/na0mS4sult1PuDnc8d8Gk63zlwLFco4E>



Este trabajo fue desarrollado bajo la tutoría del Dr. Mario Alberto Serrano Ortega, Investigador Titular A del Programa de Genómica Funcional de Eucariotes del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM. Gracias al apoyo económico de DGAPA-PAPIIT por medio del proyecto IN203720.

Agradecimientos

A mis padres, por el apoyo y cariño incondicional a lo largo de todos estos años. Por su paciencia y por todo su esfuerzo gracias al cual pude tener una formación académica. Gracias por siempre darme un motivo por el cual seguir esforzándome y disfrutar de lo que hago.

Al Dr. Mario Serrano, por recibirme en su grupo, por su confianza y apoyo. Gracias por el seguimiento y comentarios durante todo este proyecto, y por dejarme conocer más sobre su trabajo.

Al Dr. Israel Maruri, por darme la oportunidad de trabajar con él, por su paciencia y dedicación gracias a lo cual pude aprender de él. Gracias por motivarme a seguir aprendiendo y por toda la retroalimentación que me permitió mejorar durante este proceso.

A los miembros del comité, por su tiempo y comentarios a este trabajo. Gracias por haber sido parte de mi formación académica.

Al grupo del laboratorio, por haberme apoyado siempre que lo necesité y por su buen humor, gracias a lo cual disfruté mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos de la carrera, especialmente a Alejandra y Kimberly, quienes fueron una parte muy importante durante esta etapa, por todos los buenos momentos que pasamos a lo largo de estos años de carrera sin los que no hubiera sido lo mismo. Gracias por haber estado en cada momento.

ÍNDICE GENERAL

I. Resumen

II. Lista de abreviaturas

III. Lista de tablas

IV. Lista de figuras

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Aspectos generales.....	1
1.2. Estructura y función de la familia NPR	2
1.3. Regulación postraduccional de NPR1	6
1.4. Participación de las proteínas NPR en la inmunidad de las plantas.....	7
1.5. Transformación genética de plantas	10
2. ANTECEDENTES	11
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVO GENERAL	16
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
7. METODOLOGÍA.....	17
7.1. Construcción de los vectores de entrada de NPR1 y NPR3	17
7.2. Construcción de los vectores de expresión pYFC-NPR1 y pYFN-NPR3 para el análisis de la interacción <i>in planta</i>	17
7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
7.4. Extracción de DNA plasmídico (pDNA) de <i>Escherichia coli</i>	18
7.5. Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
7.6. Selección de líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	19
7.7. Microscopia confocal de fluorescencia.....	19
8. RESULTADOS	20
8.1. Construcción de las diferentes versiones de la proteína NPR3 para el análisis de la interacción <i>in planta</i>	20
8.2. Análisis de la interacción de las proteínas NPR1-NPR3	21
8.2.1. Influencia del SA en la interacción NPR1-NPR3	22
8.3. Transformación de plantas mutantes <i>npr3-2</i> de <i>A. thaliana</i> con las diferentes versiones de NPR3 mediada por <i>A. tumefaciens</i>	23
9. DISCUSIÓN.....	24
10. CONCLUSIÓN.....	28
11. PERSPECTIVAS	29
12. BIBLIOGRAFÍA.....	29

I. Resumen

El ácido salicílico (SA) es una fitohormona que juega un papel esencial en la activación y regulación de múltiples respuestas al estrés biótico y abiótico; especialmente, para activar la resistencia sistémica adquirida (SAR), un mecanismo que utilizan las plantas para enfrentar el ataque de patógenos.

En *Arabidopsis thaliana*, el SA es percibido por los receptores NPR1, NPR3 y NPR4. El reconocimiento del SA por sus receptores induce una reprogramación transcripcional de los genes de defensa que está mediada principalmente por NPR1, el cual funciona como un coactivador transcripcional, mientras que una de las funciones propuestas para NPR3 y NPR4 es la de regular la degradación de NPR1. El mecanismo de regulación entre estas proteínas es complejo, por lo que diferentes estudios se han enfocado en caracterizar la interacción de estas proteínas para conocer más sobre su regulación. Sin embargo, a la fecha los dominios de interacción entre estas proteínas han sido poco explorados.

Con el objetivo de caracterizar *in planta* los dominios de interacción de las proteínas NPR1, NPR3 y NPR4, y para entender mejor su papel en la inmunidad de las plantas, en este proyecto se caracterizó funcionalmente a los dominios que participan en la interacción NPR1-NPR3. Para ello se generaron diferentes versiones de la proteína NPR3 de *A. thaliana* que incluyen a los dominios BTB/POZ, repeticiones de anquirina y dominio carboxilo, nombrados N, M y C, respectivamente, así como las combinaciones M+C, M+N y N+C en el vector pYFC43. Además, se clonó la secuencia completa de NPR1 y NPR3 en los vectores pYFC43 y pYFN43 para el análisis de la interacción NPR1-NPR3 mediante la Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC). Todas las construcciones generadas se clonaron en el vector pMDC43 con el objetivo de analizar la localización subcelular debido a que incluye a GFP como reportero. Además de introducir las diferentes construcciones de NPR3 en la mutante susceptible a *Pseudomonas syringae* pv. DC3000 (*Pst*) *npr3-2* y en la planta de tipo silvestre Col-0 de *A. thaliana*, de manera que se pueda evaluar la susceptibilidad a

la infección por *Pst*, así como determinar si alguna de las versiones de NPR3 promueve la respuesta de defensa mediada por SA sin comprometer otros mecanismos de defensa al influir en la estabilidad de NPR1.

En este trabajo se observó la interacción de las proteínas NPR1-NPR3 *in planta* mediante el sistema BiFC. Como era conocido, esta interacción es favorecida por el SA y por determinados análogos estructurales del SA, por lo que se utilizó salicilato de metilo (MeSA) como una forma conjugada de transporte del SA. Debido a que no se había evaluado la participación del MeSA en la interacción NPR1-NPR3, se demostró que el MeSA favorece dicha interacción y que en ausencia de este no hay una señal detectable de la fluorescencia.

II. LISTA DE ABREVIATURAS

SA: ácido salicílico

SAR: resistencia sistémica adquirida

BiFC: complementación bimolecular de la fluorescencia

PTI: inmunidad desencadenada por patrones

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

ETI: inmunidad desencadenada por efectores

PR: genes relacionados con la patogénesis

NHP: ácido N-hidroxipípecólico

NPR: nonexpressor of pathogenesis-related genes

CRL3: ubiquitina E3 ligasa de culina

NLS: señal de localización nuclear

CTD: dominio carboxilo terminal

NTD: dominio amino terminal

SBC: centro de unión del SA

PDB: banco de datos de proteínas

SUMO: pequeño modificador del tipo ubiquitina

SIM: motivo de interacción de SUMO

IC: complejos de inicio de la transcripción

DNA: ácido desoxirribonucleico

RNA: ácido ribonucleico

T-DNA: DNA de transferencia

Ti: inductor de tumores

TAD: dominio de transactivación

Y2H: doble híbrido en levadura

ORF: marco de lectura abierto

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pDNA: DNA plasmídico

OD: densidad óptica

CLSM: microscopio confocal invertido de barrido láser

GFP: proteína verde fluorescente

III. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Vectores generados de la proteína NPR1 y versiones de NPR3.	20
Tabla 2. Plantas transgénicas generadas	24

IV. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Respuesta de defensa mediada por el SA en <i>A. thaliana</i>	2
Figura 2. Estructura de las proteínas NPR1, NPR3 y NPR4 de <i>A. thaliana</i>	5
Figura 3. Modificaciones postraduccionales de NPR1 inducidas por el SA	7
Figura 4. Modo de acción de las proteínas NPR1, NPR3 y NPR4 en la inmunidad de las plantas.	9
Figura 5. Interacción entre las proteínas NPR1 y NPR3 mediante BiFC.....	21
Figura 6. Interacción entre las proteínas NPR1 y NPR3 en presencia de MeSA. .	22
Figura 7. Análisis de los controles negativos pYFN-NPR1 y pYFC-AKIN.	23
Figura 8. Alineamiento del CTD de NPR1, NPR3 y NPR4 de <i>A. thaliana</i>	27

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos generales

Las plantas son organismos sésiles que están expuestos a una gran variedad de factores bióticos, por lo que necesitan de respuestas inmunes especializadas ante una infección. Uno de los mecanismos de defensa es la inmunidad innata desencadenada por patrones (PTI) la cual tiene una alta especificidad debido a que reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) mediante receptores extracelulares. Sin embargo, esta primera línea de defensa puede ser evadida y la inmunidad de la planta depende de un segundo mecanismo: la inmunidad desencadenada por efectores (ETI), en la cual se induce la muerte celular en el sitio de la infección para evitar la propagación del patógeno. Además, en tejidos distantes no infectados se establece una respuesta defensiva generalizada denominada resistencia sistémica adquirida (SAR) (Qi *et al.*, 2018).

Las fitohormonas juegan un papel importante en las respuestas al estrés biótico y abiótico (Bigeard *et al.*, 2015). En particular, el ácido salicílico (SA) regula la ETI y es esencial para establecer la SAR, debido a que induce cambios en la expresión de los genes de defensa (Figura 1), principalmente de genes relacionados con la patogénesis (PR), los cuales codifican proteínas con funciones antimicrobianas, así como genes que regulan la biosíntesis del SA en el tejido local y distal de la infección. Además, se conoce que la acumulación de SA en el sitio de la infección es necesaria para inducir la ETI (Lee *et al.*, 2015), mientras que para inducir la SAR es necesaria la síntesis del ácido N-hidroxipípecólico (NHP) el cual es utilizado como molécula de señalización (Liu *et al.*, 2020).

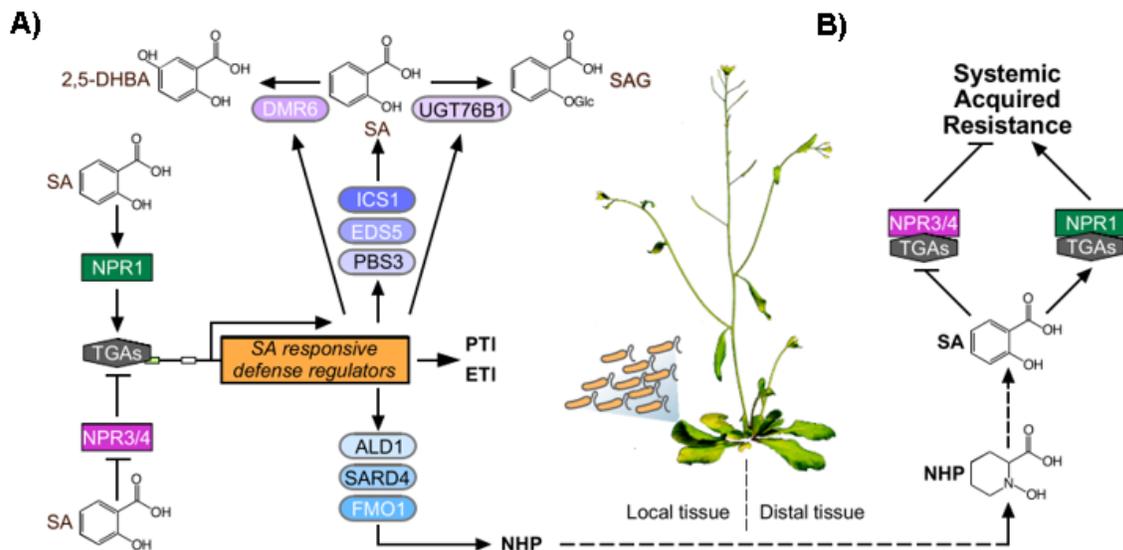


Figura 1. Respuesta de defensa mediada por el SA en *A. thaliana*. La unión del SA a NPR1 promueve su actividad como coactivador de genes de defensa al desestabilizar la formación de complejos oligoméricos en el citoplasma, aumentar el transporte al núcleo y al favorecer interacciones con factores de transcripción como los TGAs, mientras que la unión a NPR3/NPR4 inhibe su actividad como correpresores mediante un mecanismo desconocido. **A)** En el tejido local de la infección la interacción de NPR1 con factores TGAs controlan la expresión de genes de defensa que regulan las respuestas PTI, ETI, así como la biosíntesis del SA y NHP. **B)** En tejidos distales, NHP es una molécula de señalización que induce la biosíntesis del SA para activar la SAR. Imagen tomada de (Liu *et al.*, 2020).

1.2. Estructura y función de la familia NPR

Algunos miembros de las proteínas NONEXPRESSION OF PATHOGENESIS-RELATED GENES (NPR) han sido identificados previamente como receptores del SA (Wu *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2012), aunque el mecanismo molecular por el cual perciben el SA y coordinan la señalización hormonal sigue siendo desconocido. En *Arabidopsis thaliana* la familia NPR está formada por seis miembros: NPR1, NPR2, NPR3, NPR4, BOP1 y BOP2, los cuales están involucrados en la regulación de la

respuesta de defensa y también participan en diferentes procesos al activar genes relacionados con el ritmo circadiano, en la vía secretoria y en el desarrollo de órganos laterales (Backer *et al.*, 2019). Las proteínas NPR1, NPR3 y NPR4 son los únicos receptores del SA conocidos hasta ahora (Wu *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2012); mientras que la participación de los demás miembros de la familia NPR en la percepción del SA ha sido poco estudiada (Castelló *et al.*, 2018).

Los NPRs son proteínas modulares, las cuales presentan los dos dominios de interacción proteína-proteína: BTB/POZ y repeticiones de anquirina (Figura 2A). El dominio BTB/POZ es característico de proteínas que funcionan como adaptadoras de la ubiquitina E3 ligasa de culina (CRL3); proteínas E3 ligasas que participan en el proceso de ubiquitinación de proteínas al unir el sustrato con la enzima que transfiere el residuo de ubiquitina (Rusnac & Zheng, 2020), mientras que las repeticiones de anquirina son dominios que se encuentran en proteínas con funciones diversas, tales como iniciadores de la transcripción, reguladores del ciclo celular y transportadores de iones (Genschik *et al.*, 2013; Rusnac & Zheng, 2020).

Además, las proteínas NPRs contienen una señal de localización nuclear (NLS) bipartita en su dominio carboxilo terminal (CTD). Es interesante mencionar que la proteína NPR1 se distingue por tener una señal de degradación proteolítica (DSXXXS) en su dominio amino terminal (NTD), la cual es fosforilada en los residuos de serina 11 y 15 (Spoel *et al.*, 2009). Esta señal es similar a la presente en la proteína I κ B, involucrada en la inmunidad de los mamíferos (Ryals *et al.*, 1997).

En *A. thaliana*, la proteína NPR1 es el principal regulador de la expresión de genes de defensa inducida por el SA. Además, funciona como un coactivador transcripcional que participa en la formación de complejos de la transcripción y que interacciona con remodeladores de la cromatina de la familia CBP/P300 (Jin *et al.*, 2018). El SA se une al extremo carboxilo de NPR1 e influye en su actividad (Wu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2020). El primer cambio a nivel proteína que induce el SA en

NPR1 es un cambio conformacional, desestabilizando a los oligómeros en el citoplasma.

A nivel de proteína, NPR3 y NPR4 muestran un 73% de identidad entre sí y se ha reportado que promueven la degradación de NPR1 debido a su función como adaptadoras de CRL3 (Fu *et al.*, 2012); Además, se ha observado que NPR3 y NPR4 regulan la estabilidad de EDS1; un regulador positivo en la inmunidad de las plantas (Chang *et al.*, 2019).

La estructura tridimensional de las proteínas NPR1, NPR3 y NPR4 es aún desconocida; sin embargo, se ha identificado que cuentan con un sitio de unión del SA (SBC) en el CTD. Para NPR4 se ha determinado la estructura del SBC, el cual corresponde a los residuos 373 a 516. El SBC está formado por 5 α -hélices, cuatro de ellas interaccionan directamente con el SA, mientras que la hélice del extremo amino contribuye a la estabilidad de dicho sitio (Figura 2B) (Wang *et al.*, 2020).

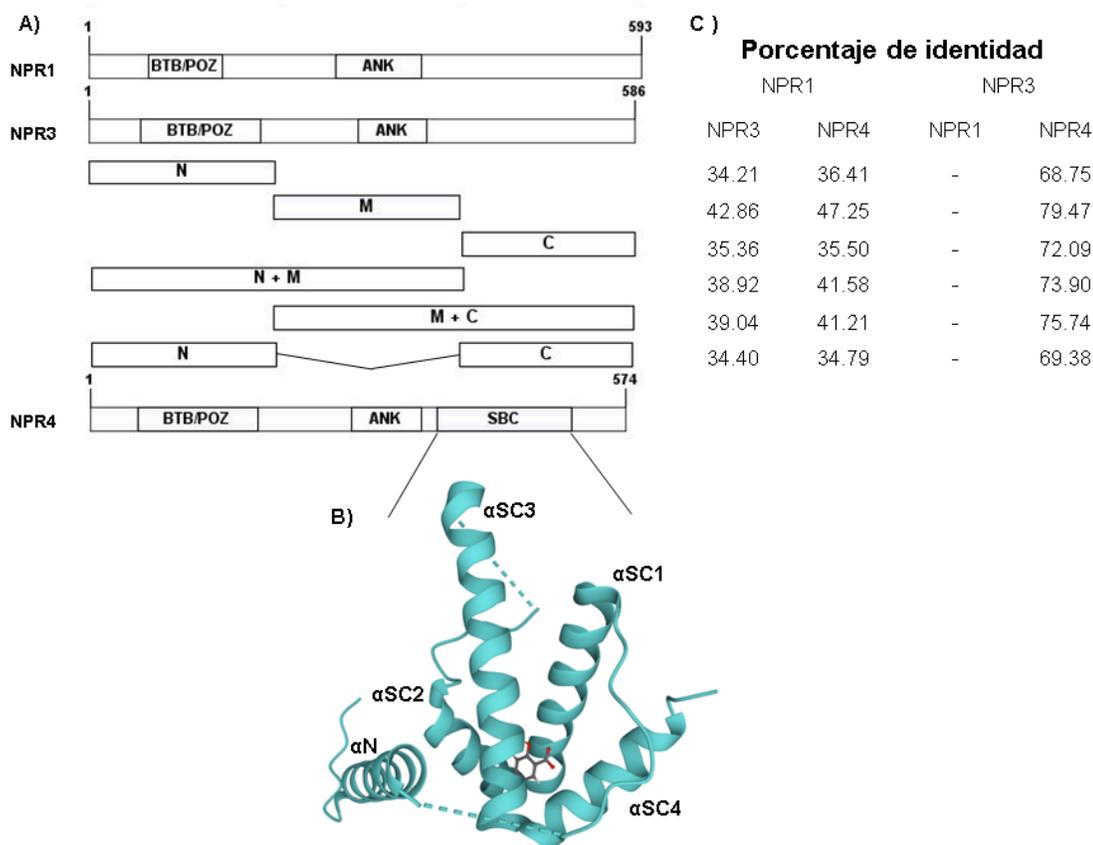


Figura 2. Estructura de las proteínas NPR1, NPR3 y NPR4 de *A. thaliana*. **A)** Representación esquemática de los dominios BTB/POZ, repeticiones de anquirina y el sitio de unión del SA (SBC) de las proteínas NPR1, NPR3 y NPR4. Además, se muestran las construcciones generadas de la proteína NPR3 de los dominios de interés para el análisis de la interacción con NPR1. **B)** Estructura tridimensional del SBC de NPR4 unido al SA. El SBC está formado por 5 α -hélices (N, SC1-4), α SC1-4 interactúan con el SA, mientras que α N estabiliza a la estructura. Código PDB 6WPG. **C)** Porcentaje de identidad de las versiones de NPR3 con los segmentos correspondientes en las proteínas NPR1 y NPR4. Los valores están ordenados con la respectiva versión de la proteína del panel A.

1.3. Regulación postraduccional de NPR1

La actividad de NPR1 está regulada por modificaciones postraduccionales, particularmente por fosforilación, ubiquitinación y sumoilación, que en conjunto orquestan la formación de complejos de transactivación que darán lugar a la expresión de genes blanco (Figura 3). Estas modificaciones son favorecidas durante la SAR debido a la respuesta inducida por el SA (Spoel *et al.*, 2009; Saleh *et al.*, 2015; Skelly *et al.*, 2019).

La sumoilación es una modificación postraduccional similar a la ubiquitinación, que consiste en la transferencia de una proteína llamada SUMO a residuos de lisina mediante la actividad de tres enzimas que participan en su activación, conjugación y transferencia, respectivamente. Además, la proteína SUMO se puede unir de manera no covalente a residuos de lisina localizados en secuencias consenso [VIL]-x-[VIL]-[VIL] o [VIL]-[VIL]-x-[VIL] conocidas como motivos de interacción de SUMO (SIM) (Benlloch & María Lois, 2018).

En NPR1, la proteína SUMO3 se une al motivo SIM3 localizado en las repeticiones de anquirina. Se ha sugerido que la sumoilación de NPR1 es una modificación necesaria para llevar a cabo la expresión de genes de defensa debido a que determina la interacción con activadores como el factor de transcripción TGA3 (Figura 3) (Saleh *et al.*, 2015).

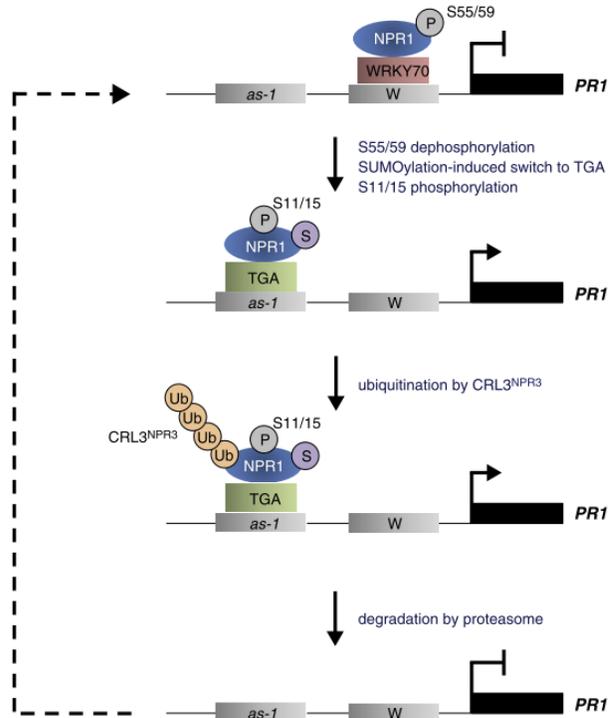


Figura 3. Modificaciones postraduccionales de NPR1 inducidas por el SA. La fosforilación de S55/59 de NPR1 disminuye la expresión de genes blanco de NPR1, mientras que la fosforilación en S11/15, la sumoilación y ubiquitinación controlan la expresión de genes como PR1. Imagen tomada de (Skelly *et al.*, 2016).

1.4. Participación de las proteínas NPR en la inmunidad de las plantas

Las modificaciones postraduccionales de NPR1 son favorecidas durante la SAR debido a la respuesta inducida por el SA (Spoel *et al.*, 2009; Skelly *et al.*, 2019; Saleh *et al.*, 2015). Es por ello que el efecto de NPR1 en la regulación de genes es variado y depende de los factores de transcripción con los que interacciona (Stallcup & Poulard, 2020; Backer *et al.*, 2019).

En el núcleo, NPR1 interacciona con diferentes factores de transcripción TGAs; nombrados así por la secuencia de DNA que reconocen en los promotores (TGACG)

de sus genes blancos, mediante el dominio de repeticiones de anquirina. Además, NPR1 interacciona con los factores de transcripción WRKY y NIMIN mediante el dominio BTB/POZ (Weigel *et al.*, 2001; Shearer *et al.*, 2009). Algunos miembros de estas proteínas son reguladores negativos de la SAR y en algunos casos, la concentración de SA determina la interacción con NPR1.

En ausencia de un patógeno, la proteína NPR1 se encuentra predominantemente como un complejo oligomérico en el citoplasma unido por puentes disulfuro en residuos conservados de C82/216 (Figura 4A y 4B) (Tada *et al.*, 2008). Aunque la mayor parte de NPR1 forma complejos oligoméricos en el citoplasma, una pequeña cantidad de NPR1 está presente como monómero, la cual es transportada al núcleo para mantener una defensa basal. Sin embargo, para evitar la SAR, una fracción de la proteína nuclear es fosforilada en los residuos S55/59, esta modificación permite la interacción de NPR1 con el factor de transcripción WRKY70 para reprimir la expresión del gen ISOCORISMATO SINTASA 1 (*ICS1*) el cual participa en la principal vía en la biosíntesis de SA (Figura 3) (Saleh *et al.*, 2015).

La degradación de NPR1 por el proteosoma 26S en ausencia de una infección es un mecanismo utilizado para regular la homeostasis de proteínas celulares y para asegurar la correcta expresión génica al controlar el tiempo que NPR1 permanece activo, por lo que la degradación de NPR1 en ausencia de un estímulo depende de la interacción con las proteínas NPR4 y CRL3 (Skelly *et al.*, 2019).

Durante la infección por un patógeno (Figura 4C y 4D), la acumulación de SA induce cambios en el potencial redox celular, los puentes disulfuro en C82/216 se reducen y NPR1 como monómero es traslocado al núcleo en respuesta a la fosforilación del residuo S589 localizado en la NLS, este proceso es llevado a cabo por la cinasa SnRK2.8 (Lee *et al.*, 2015). Se ha sugerido que la sumoilación de NPR1, además de determinar la interacción con otras proteínas, promueve la degradación de NPR1 (Figura 3) (Saleh *et al.*, 2015).

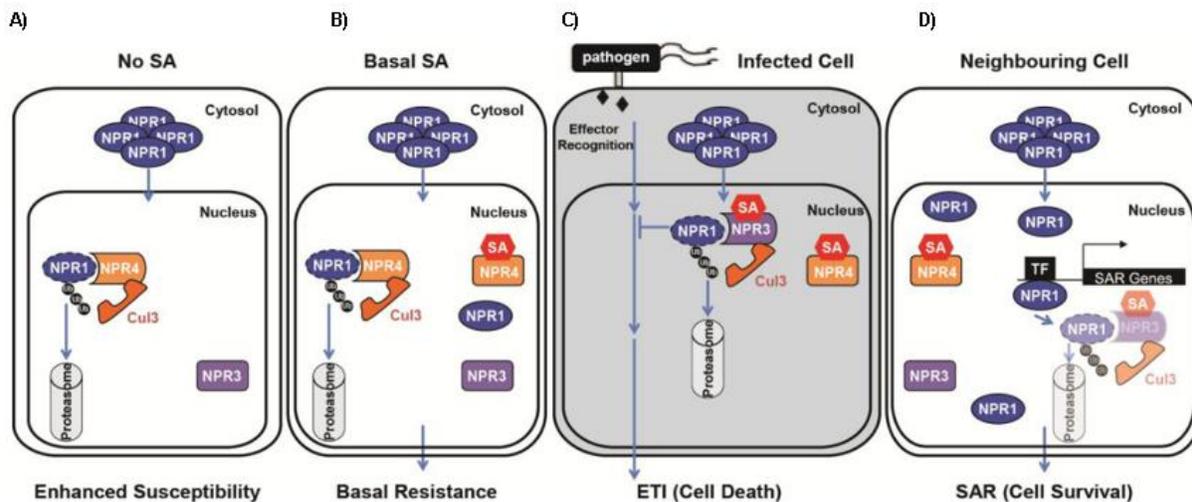


Figura 4. Modo de acción de las proteínas NPR1, NPR3 y NPR4 en la inmunidad de las plantas. La concentración de SA modifica la actividad de los NPRs, lo que permite controlar diferentes respuestas inmunes en sitios locales o distales de la infección. **A)** Deficiencias en la síntesis del SA promueven la degradación de NPR1 mediada por NPR4-CRL3, lo que compromete la susceptibilidad de las plantas. **B)** En concentraciones basales de SA, NPR1 regula la resistencia basal y es degradado para evitar la SAR. Como respuesta a una infección se induce la síntesis de SA, en el sitio local de la infección **C)** NPR1 es degradado por el proteosoma para así poder inducir la ETI, debido a que NPR1 promueve la supervivencia celular, mientras que en tejidos distantes no infectados **D)** se induce la SAR. Imagen tomada de (Fu *et al.*, 2012).

El mecanismo propuesto de la regulación de NPR1 sugiere que después de iniciar o participar en diferentes rondas de transcripción es marcado como “agotado”, debido a que es poliubiquitinado es degradado por el proteosoma para que la formación de complejos de inicio de la transcripción (IC) sea reanudada con NPR1 “nuevo”, es decir, con una menor poliubiquitinación (Spoel *et al.*, 2009). Debido a esto, el proteosoma tiene una función dual en la actividad de NPR1: en ausencia de una infección evita la activación temprana de genes al degradar NPR1, mientras

que, durante la SAR, asegura la máxima expresión de genes de defensa al remover NPR1 poliubiquitinado (Skelly *et al.*, 2019).

A pesar de que los mecanismos que controlan tanto la actividad y los patrones de interacción proteína-proteína de NPR1 han sido estudiados ampliamente, los dominios involucrados en las interacciones NPR1-NPR3 y NPR1-NPR4 no han sido descritos. Se han reportado diferentes afinidades de los tres receptores por el SA (Wu *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2012; Ding *et al.*, 2018), y se ha observado que la unión del SA a NPR4 interrumpe la interacción NPR1-NPR4 y favorece la interacción NPR1-NPR3. Recientemente se ha sugerido que el SA puede intervenir en estas interacciones posiblemente al inducir cambios estructurales en las proteínas NPRs (Wang *et al.*, 2020). Debido a la amplia participación que tienen las proteínas NPRs en la inmunidad de las plantas, el objetivo de este trabajo es identificar los dominios de interacción entre ellas, lo que nos permitirá tener una mejor caracterización de su función en la respuesta inmune.

1.5. Transformación genética de plantas

Para el análisis de los dominios de interacción entre las proteínas NPR1, NPR3 y NPR4 *in planta*, es necesario la expresión de los genes de interés en el tejido vegetal. Para ello se utiliza *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria patógena de plantas dicotiledóneas, la cual está asociada a la formación de tumores debido a la transferencia, integración y expresión de un segmento de DNA de la bacteria, denominado DNA de transferencia (T-DNA) al núcleo de la célula del hospedero. El T-DNA está localizado en el plásmido Ti (inductor de tumores), el cual contiene secuencias adicionales (*vir*) que promueven la transferencia del T-DNA.

La transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es una técnica ampliamente utilizada que permite la expresión de un gen de interés en plantas, además, es utilizada para la generación de líneas mutantes (Radhamony *et al.*, 2005). El proceso de transferencia del gen de interés se puede generalizar en dos

etapas: el ingreso del material genético de la bacteria a la célula hospedera (transfección) y la integración del T-DNA al genoma de la planta (transformación). La transfección no asegura la transformación de las células, debido a esto, las células transfectadas mantienen una expresión transitoria del T-DNA y células en los que ocurren ambos procesos mantienen una expresión estable (Tyurin *et al.*, 2020).

A. thaliana y *Nicotiana benthamiana* son las dos especies utilizadas en este trabajo para la expresión estable y transitoria de los genes de interés, respectivamente. La expresión estable en el mutante *npr3-2* de *A. thaliana* permitirá entender la importancia biológica de las diferentes versiones de NPR3, además de ser una base para futuros análisis. Por otra parte, *N. benthamiana* proporciona una mayor superficie de la hoja que puede ser infectada, además de ser más susceptible a la infección por *A. tumefaciens*, lo que la hace una especie óptima para el análisis BiFC .

2. ANTECEDENTES

Wu y colaboradores (2012) identificaron a NPR1 como un receptor del SA y observaron que, además de los cambios redox, la unión del SA induce la monomerización de NPR1. En ausencia de SA el dominio BTB/POZ y el dominio de transactivación (TAD, localizado en el CTD) de NPR1 interactúan entre sí, lo cual inhibe la función de NPR1 al impedir la unión de otros factores de transcripción a esos dominios. Se ha reportado que el SA se une a las C521/529 mediante el ion cobre que es utilizado como cofactor. Así mismo, Wu y colaboradores (2012) proponen que la unión de SA en este sitio expone el dominio BTB/POZ y permite la activación de NPR1 al interrumpir la interacción entre sus dominios.

Fu y colaboradores (2012) analizaron la participación de NPR3 y NPR4 como proteínas adaptadoras de CRL3 debido a los dominios característicos de estas proteínas. Su trabajo mostró que la estabilidad de NPR1 aumenta en plantas mutantes simples de *npr3* y *npr4* y en el doble mutante *npr3/npr4* de *A. thaliana*. Además, identificaron a NPR3 y NPR4 como receptores del SA con diferente grado de afinidad, siendo NPR3 el de menor y NPR4 el de mayor. Su trabajo concuerda con los resultados obtenidos por Wu y colaboradores (2012) quienes mostraron que el tratamiento con SA afecta la interacción NPR1-NPR4 y favorece la interacción NPR1-NPR3. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual el SA modifica estas interacciones.

Las proteínas NPR3 y NPR4 tienen 37% y 39% de identidad con NPR1 respectivamente, y la mayor variación se localiza en su dominio CTD. Ding y colaboradores (2018) aislaron un mutante de NPR4 (*npr4-4D*) con ganancia de función, que consiste en la sustitución de aminoácido R419Q localizado en el CTD. Las plantas de *A. thaliana* que contienen esta mutación, muestran el mismo fenotipo que las plantas silvestres y una expresión completamente suprimida de los genes *PR1* y *PR2*. La fusión del gen de la luciferasa a los promotores de los genes de defensa *SARD1* y *WRKY70* muestra que la expresión del reportero es menor cuando se sobreexpresa NPR3 y NPR4 en protoplastos.

Ding y colaboradores (2018) sugieren que NPR3 y NPR4 funcionan como represores constitutivos de genes de defensa; esto depende de la interacción de NPR3 y NPR4 con los factores de transcripción tipo TGA2/5/6. Además, se ha sugerido que la unión de SA a NPR3 o NPR4 impide su actividad como represores, aunque el mecanismo mediante el cual reprime esta actividad es aún desconocido.

A nivel de expresión génica, la familia NPR varía de acuerdo con el tipo de tejido. NPR1 tiene una mayor expresión en hojas, mientras que NPR3 se expresa principalmente en flores y NPR4 en raíces (Shi *et al.*, 2013). Shi y colaboradores (2013) mostraron que NPR3 es un regulador negativo de genes de defensa durante el desarrollo temprano de flores. A diferencia de lo que ocurre en hojas, las

mutaciones en NPR3 o la infección por un patógeno no afectan los niveles de NPR1. Con el objetivo de identificar *in planta* la interacción de NPR3 con TGA2 y NPR1, mediante un ensayo de Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC) se observó que los complejos NPR3-TGA2 y NPR3-NPR1 se localizan en el citoplasma y en el núcleo de las células epidérmicas de cebolla (Shi *et al.*, 2013).

La estabilidad de NPR1 durante la SAR fue analizada en detalle por Spoel y colaboradores (2009). Los autores observaron que la sustitución de S11/15A en la región de degradación de NPR1, así como la pérdida de función de CRL3 aumentan la estabilidad de la proteína, pero afecta la expresión génica inducida por SA y dependiente de NPR1, por lo que las plantas con estas mutaciones son más susceptibles a la infección.

Es conocido que NPR1 es fosforilado en S11/15; sin embargo, no se ha identificado en qué momento de la activación ocurre esto. Se ha propuesto que NPR1 se fosforila durante la formación del IC por una cinasa asociada con dicho complejo (Spoel *et al.*, 2009). Por otra parte, al sustituir las S11/15D de NPR1, éste muestra una respuesta similar a plantas silvestres, en el que aumenta la afinidad de NPR1 por CRL3 y la susceptibilidad a la infección es menor en las líneas mutantes S11/15D de *A. thaliana*. Además, se ha observado que el nivel máximo de expresión de algunos genes blanco de NPR1 es regulada por la estabilidad de la misma proteína (Spoel *et al.*, 2009); en el que la expresión de algunos genes *WRKY* muestran una mayor dependencia por la degradación de NPR1 a diferencia de lo observado para el gen *PR-1*.

Estos resultados muestran cierta discordancia con los obtenidos por Saleh y colaboradores (2015), quienes analizaron los efectos de la sumoilación de NPR1 y las mutaciones en el motivo SIM3 aumentan la estabilidad de la proteína NPR1, tanto en células de levadura como en *A. thaliana*, la mutación no afecta la localización nuclear pero sí su asociación con cuerpos nucleares; compartimentos sub-nucleares en los que se ha sugerido pueden regular funciones como la expresión de genes o procesamiento de RNAs (Meyer, 2020), y a nivel estructural

no parece inducir un cambio drástico debido a que aún es capaz de interactuar con los factores NIMIN y TGA.

Adicionalmente, NPR1 es fosforilado después de la sumoilación (Saleh *et al.*, 2015), lo cual solo ocurre en el núcleo y apoya la hipótesis de que NPR1 es fosforilado durante la formación de IC (Spoel *et al.*, 2009). Usando el sistema heterólogo doble híbrido en levadura (Y2H) se observó que aunque la sumoilación es necesaria para la fosforilación de S11/15 y esto favorece la unión con CRL3, la mutación de la señal de degradación y de SIM3 (S11/15D_sim3) interrumpe la interacción de NPR3 y NPR4 con NPR1 (Saleh *et al.*, 2015).

En NPR1 la fosforilación de S11/15 favorece la interacción con las proteínas SUMO3, NPR3 y NPR4, mientras que la sustitución S11/15A tiene poco efecto en estas interacciones en Y2H, por lo que el reconocimiento de la secuencia de degradación parece depender de cambios estructurales en NPR1. Interesados en determinar la función de la ubiquitinación de NPR1, Skelly y colaboradores (2019) mostraron que el grado de ubiquitinación de NPR1 regula su actividad y este proceso está bajo un control estricto de CRL3, UBE4 y por las desubiquitininas UBP6 y UBP7. CRL3 adiciona los primeros residuos de ubiquitina y aumenta la transcripción de genes blanco de NPR1. Cuando al menos 4 residuos de ubiquitina son adicionados, la proteína UBE4 reconoce al sustrato y extiende las cadenas de ubiquitina para que NPR1 sea degradado, las desubiquitininas UBP6 y UBP7 evitan la degradación de NPR1 al eliminar en bloque las cadenas de ubiquitina, lo que aumenta la estabilidad de NPR1 y prolonga el tiempo en que participa en la formación de IC.

3. JUSTIFICACIÓN

La reprogramación transcripcional inducida por el SA y dependiente de NPR1 es de gran importancia en la SAR, sin embargo, los únicos receptores de SA reportados hasta ahora son las proteínas NPR1, NPR3 y NPR4. A pesar de que los

mecanismos que controlan tanto la actividad y los patrones de interacción proteína-proteína de NPR1 han sido estudiados ampliamente; principalmente mediante el análisis en sistemas heterólogos como levadura, la caracterización de los dominios involucrados en las interacciones NPR1-NPR3 y NPR1-NPR4 no han sido descritos.

Debido a la importancia y la poca información sobre cómo la actividad de NPR1, NPR3 y NPR4 es modificada por el SA y por modificaciones postraduccionales, conocer cómo se llevan a cabo las interacciones NPR1-NPR3 y NPR1-NPR4 ayudará a entender mejor su papel en la inmunidad de las plantas. Por lo que el objetivo de este trabajo de Tesis es generar construcciones génicas que permitan identificar los dominios de interacción entre estas proteínas para una mejor caracterización de su función en la respuesta inmune de las plantas.

Determinar la interacción entre proteínas es uno de los aspectos necesarios para conocer más sobre su función biológica, por lo que diferentes técnicas han sido desarrolladas con este propósito. Conocer el compartimento celular donde se llevan a cabo las interacciones y como esto puede ser modificado por diferentes condiciones como la unión de un ligando a su receptor o la presencia de otras proteínas de interacción, proporciona una información más detallada de la interacción. Una de las técnicas que permite el estudio de localización subcelular y de interacciones de proteínas es BiFC. El sistema BiFC es utilizado debido a que esta herramienta permite detectar interacciones de proteínas *in vivo*, por lo que a diferencia de otros sistemas, el análisis tipo BiFC permite la detección directa y la localización subcelular de interacciones proteína-proteína sin un mayor procesamiento de las muestras. Además, la reconstitución de la fluorescencia mediante interacciones proteína-proteína se caracteriza por ser un proceso irreversible y por tener una alta estabilidad aún en la formación de complejos, lo que permite detectar interacciones en un rango menor a 10 Å.

4. HIPÓTESIS

El dominio de repeticiones de anquirina de las proteínas NPR3 y NPR4 podría regular la interacción con la proteína NPR1, mientras que la fosforilación y sumoilación de NPR1 durante la SAR regulan la interacción con NPR3 y NPR4.

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar funcionalmente los dominios involucrados en la interacción de las proteínas NPR1, NPR3 y NPR4 de *Arabidopsis thaliana*.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- 6.1. Clonar en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO los genes *NPR1*, *NPR3* y *NPR4* de *A. thaliana*.
- 6.2. Generar las construcciones que contengan los dominios BTB, repeticiones de anquirina y el extremo C-terminal de los genes *NPR1*, *NPR3* y *NPR4*.
- 6.3. Recombinar las construcciones de los objetivos 6.1 y 6.2 en los vectores del sistema BiFC, pYFN43 y pYFC43; así como en el vector de expresión pMDC43.
- 6.4. Analizar la interacción de las diferentes construcciones mediante el sistema BiFC.
- 6.5. Analizar si las versiones generadas de NPR3 pueden afectar a la defensa inducida por el SA en las plantas.

7. METODOLOGÍA

7.1. Construcción de los vectores de entrada de NPR1 y NPR3

Los marcos de lectura abiertos (ORFs) de los genes *NPR1* y *NPR3* fueron amplificados por PCR y clonados en el vector de entrada pCR8/GW/TOPO. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar y clonar las secuencias correspondientes a los dominios BTB/POZ (1-600), repeticiones de anquirina (601-1200) y el extremo carboxilo (1201-1761) del gen *NPR3* en el vector pCR8/GW/TOPO. Estos tres segmentos nombrados N, M y C, respectivamente, fueron recombinados para generar las versiones N+M, N+C y M+C de NPR3 en el vector de entrada.

7.2. Construcción de los vectores de expresión pYFC-NPR1 y pYFN-NPR3 para el análisis de la interacción *in planta*

Para caracterizar los dominios que participan en la interacción entre las proteínas NPR1-NPR3 de *A. thaliana*, los vectores de entrada generados (Tabla 1) fueron subclonadas en los vectores destino del sistema BiFC: pYFN43 y pYFC43, mediante recombinación sitio específica usando la enzima LR Clonasa II. Las clonas seleccionadas de los vectores de entrada y destino se secuenciaron usando el oligo M13 (-20).

Los vectores de expresión pYFC43-NPR1 y pYFN43-NPR3 incluyen la secuencia completa de las proteínas, por lo que fueron utilizados como control positivo de interacción (Castelló *et al.*, 2018). Como control negativo se utilizó la proteína AKIN (Figura 7B), una subunidad catalítica de la cinasa SnRK de *A. thaliana*, la cual no ha sido reportada de interactuar con proteínas NPR (Castelló *et al.*, 2018).

7.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones del kit “HotStar HiFidelity PCR” (QIAGEN) en un volumen de 56 μL , del cual, 34 μL fueron de agua milliQ, 10 μL de Buffer 5x “HotStar HiFidelity PCR” (contiene dNTP's), 10 μL de solución Q 5x, 1 μL (1 μM) de oligonucleótidos y 1 μL “HotStar HiFidelity PCR”. Como templado se utilizaron vectores que contienen los ORFs de los genes *NPR1*, *NPR3* y *NPR4*, los cuales se adquirieron del Centro de Recursos Biológicos Arabidopsis (ABRC, USA).

7.4. Extracción de DNA plasmídico (pDNA) de *Escherichia coli*

Se siguió el método basado en la lisis alcalina de las células. Se tomaron volúmenes de 1.5 ml de cultivo saturado de *E. coli*, se centrifugaron a 12,000 g y el precipitado de células se resuspendió de manera sucesiva con las soluciones I, II y III. Seguidamente se centrifugó la mezcla neutralizada durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante para ser precipitado en hielo durante 30 minutos con 0.7 volúmenes de isopropanol. Después de precipitar se centrifugó por 15 minutos y el precipitado de ADN se lavó con etanol al 70%. Una vez libre de etanol, el precipitado se resuspendió en 50 μl de agua estéril.

7.5. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizó el método de infiltración de *Agrobacterium* para la expresión transitoria de cada una de las construcciones en hojas de *Nicotiana benthamiana* de 4 semanas. Además, se utilizó el método de “floral dip” para la expresión estable de las construcciones en plantas mutantes de *A. thaliana npr3-2*. Para ello se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, la cual contiene las construcciones generadas. Las células de *A. tumefaciens* se dejaron crecer hasta alcanzar una OD_{600} de 2.0, se recolectaron mediante centrifugación y resuspendieron en una

solución de infiltración (10 mM de MgCl₂, 10 mM de MES pH 5.6 y 200 µM de acetosiringona) y se prepararon para la infiltración. Las cepas fueron incubadas a 28°C por 3 horas. Para la expresión transitoria, se preparó una mezcla 1:1 de cepas de *Agrobacterium* que contiene las construcciones pYFN43 y pYFC43. Se realizó la infiltración en el lado abaxial de hojas de *N. benthamiana*. Las construcciones se infiltraron con un tratamiento de 1 mM de salicilato de metilo (MeSA). Tres días después de la infiltración, dos hojas transformadas de tres plantas fueron analizadas en un microscopio confocal. Los experimentos se repitieron al menos tres veces para cada combinación. Para la expresión estable, se añadió 0.05% v/v de *silwet* L-77 a las cepas que fueron incubadas a 28° C por 3 horas. Las inflorescencias en desarrollo de plantas de *A. thaliana npr3-2* fueron sumergidas durante 5 segundos en los cultivos preparados.

7.6. Selección de líneas transgénicas de *A. thaliana*

Las semillas de *A. thaliana* se sembraron en cajas de Petri con medio MS suplementado con 50 µl/ml de higromicina, éstas son estratificadas durante 2 días, posteriormente son sometidas a un régimen de 4 a 6 h luz, 48 h oscuridad y 24 h luz para su selección, las plántulas resistentes al antibiótico se identificaron mediante el tamaño del hipocótilo y la raíz, las cuales son más grandes en comparación con las plantas que no son resistentes (Harrison *et al.*, 2006).

7.7. Microscopia confocal de fluorescencia

La reconstitución de la fluorescencia se observó utilizando un Microscopio Confocal invertido de Barrido Láser (CLSM) Olympus FV100. En la excitación láser se utilizó una longitud de onda de 488 nm y la detección espectral se configuró con valores entre 497 y 537 nm para GFP. El análisis de las imágenes se realizó con el programa Fiji.

8. RESULTADOS

8.1. Construcción de las diferentes versiones de la proteína NPR3 para el análisis de la interacción *in planta*

Con el objetivo de analizar los dominios de interacción entre las proteínas NPR1-NPR3, se amplificaron, clonaron y recombinaron las secuencias 1-600, 601-1200 y 1201-1761 del gen *NPR3* en el vector pYFC43, las cuales contienen a uno de los tres dominios de interés (Figura 2A). Estas tres versiones, nombradas N, M y C, codifican a los residuos 1-200, 201-400 y 401-586 de NPR3, respectivamente. Además, se generaron las construcciones N+M, N+C y M+C, estas dos últimas para mantener la localización nuclear de la proteína.

Como controles se amplificaron, clonaron y recombinaron las secuencias completas de NPR1 y NPR3 en los vectores pYFC43 y pYFN43. De esta manera, se puede comparar la interacción de cada una de las versiones de NPR3 con la secuencia completa de NPR1.

Construcciones	NPR1	NPR3	NPR3 N	NPR3 M	NPR3 C	NPR3 N+M	NPR3 N+C	NPR3 M+C
PCR8	X	X	X	X	X	X	X	X
pYFN	X*	X*	-	-	-	-	-	-
pYFC	X*	X*	X*	X*	X*	X*	X*	X*
pMDC43	X*	X*	X*	X*	X*	X*	X*	X*

Tabla 1. Vectores generados de la proteína NPR1 y versiones de NPR3. Con X se indican todos los vectores generados de NPR1 y NPR3, los cuales fueron utilizados para transformar células electrocompetentes de *E. coli* TOP10. El asterisco indica los vectores que también se encuentran en *A. tumefaciens* GV3101.

Para determinar la localización subcelular de las versiones y de las secuencias completas de las proteínas, se clonaron en el vector pMDC43 que codifica a la proteína GFP. Sin embargo, el acceso limitado al Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA) debido a la pandemia ocasionada por el virus SARS-CoV-2, solo permitió analizar la interacción de la secuencia completa de NPR1 y NPR3 correspondiente a los vectores YFN-NPR1 y YFC-NPR3, respectivamente (Tabla 1).

8.2. Análisis de la interacción de las proteínas NPR1-NPR3

El análisis de la interacción *in planta* de las proteínas NPR1 y NPR3 mediante el sistema BiFC se realizó utilizando los vectores pYFN-NPR1 y pYFC-NPR3. Ambos vectores fueron co-transformados en hojas de *N. benthamiana* en una proporción 1:1, tres días después se analizó la interacción mediante CLSM (Figura 5).

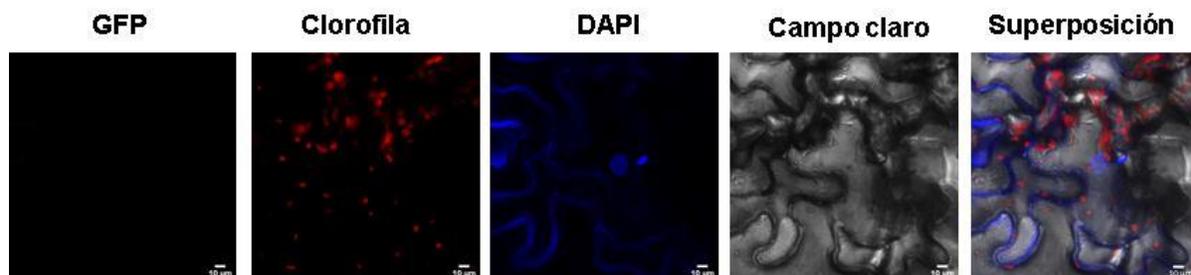


Figura 5. Interacción entre las proteínas NPR1 y NPR3 mediante BiFC. Análisis de la interacción de las proteínas NPR1 y NPR3. La barra de escala corresponde a 10 µm.

Como se observa en la Figura 5, no se detecta la reconstitución de la fluorescencia de GFP. Debido a que se ha comprobado la interacción de las proteínas en sistemas heterólogos e *in planta*, esto sugiere que la interacción entre NPR1-NPR3 es baja en ausencia de un estímulo. El vector pYFN-NPR1 fue analizado individualmente para descartar ruido por autofluorescencia (Figura 7A).

8.2.1. Influencia del SA en la interacción NPR1-NPR3

Se ha observado que el SA favorece la interacción de las proteínas NPR1 y NPR3 e interrumpe la interacción NPR1-NPR4. Para confirmar que el SA promueve la interacción entre las proteínas NPR1 y NPR3, se adicionó 1 mM de salicilato de metilo (MeSA); un análogo estructural del SA, al cultivo de infiltración y se analizó la reconstitución de la fluorescencia (Figura 6).

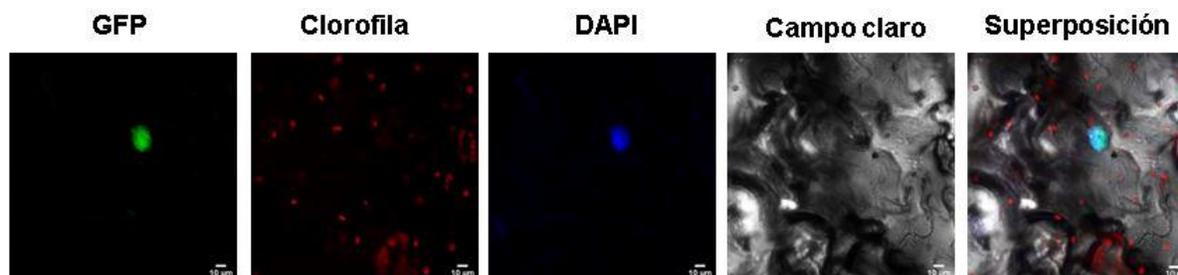


Figura 6. Interacción entre las proteínas NPR1 y NPR3 en presencia de MeSA. Análisis de la interacción de las proteínas NPR1 y NPR3 en un tratamiento con 1mM de MeSA. La barra de escala corresponde a 10 μ m.

Como se observa en la Figura 6, el tratamiento con MeSA favorece la interacción entre las proteínas NPR1-NPR3. La fluorescencia de GFP colocaliza con la señal de DAPI, lo cual indica que esta interacción ocurre en el núcleo de las células. Estos resultados confirman la interacción de las proteínas NPR1-NPR3 *in planta*, además, muestra que MeSA induce una respuesta similar al SA al promover la interacción de estas proteínas.

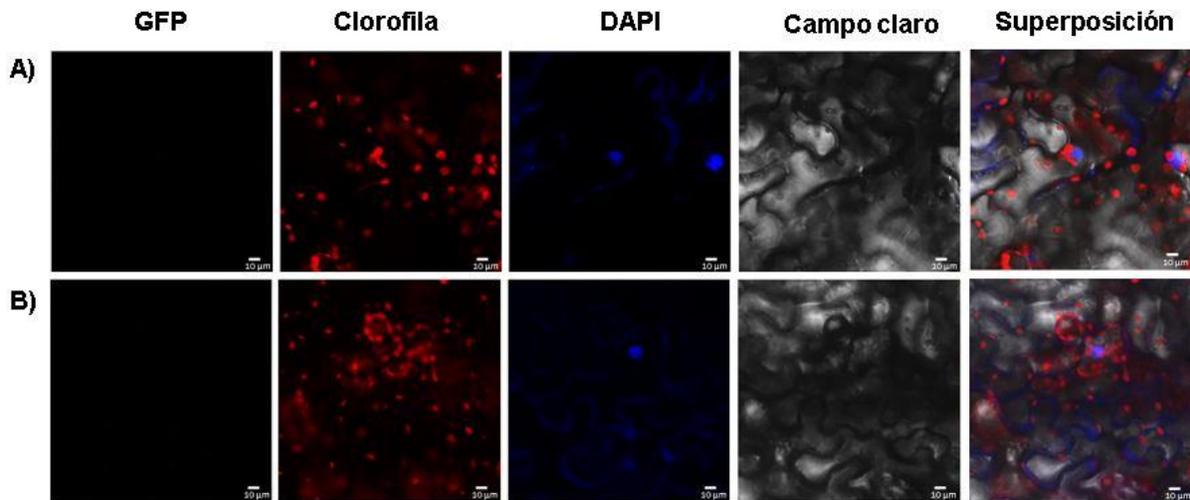


Figura 7. Análisis de los controles negativos pYFN-NPR1 y pYFC-AKIN. A) Análisis de la autofluorescencia de la proteína pYFN-NPR1. **B)** Interacción entre las proteínas pYFC-AKIN/ pYFN-NPR1. La barra de escala corresponde a 10 µm.

8.3. Transformación de plantas mutantes *npr3-2* de *A. thaliana* con las diferentes versiones de NPR3 mediada por *A. tumefaciens*

Para analizar si estas versiones pueden afectar a la defensa inducida por el SA en las plantas, utilizamos la mutante de *A. thaliana* en el gen *npr3*, la cual es más susceptible a la infección por el patógeno *Pst*. Para evaluar si la sobreexpresión de las construcciones de *NPR3* pueden restaurar el fenotipo de plantas silvestres de *A. thaliana*, se obtuvieron semillas de la línea mutante *npr3-2* (SALK_043055), se sembraron y seleccionaron hasta obtener plantas mutantes homocigotas.

Las plantas *npr3-2* homocigotas y Col-0 de dos meses de edad fueron transformadas siguiendo el protocolo de “Floral dip” (Zhang *et al.*, 2006). El procedimiento se realizó dos veces para cada planta con un día de por medio, esto con la finalidad de maximizar la eficiencia de infección. La Tabla 2 muestra todas las versiones que fueron sobreexpresadas en plantas silvestres (Col-0) y en la línea mutante *npr3-2*. Por lo que 5 semanas después de la transformación se recuperaron semillas para la selección de las transformantes en higromicina.

Plantas transformadas		
Construcción(pMDC43)	Col-0	<i>npr3-2</i>
NPR3-N	-	X
NPR3-M	X	X
NPR3-C	X	X
NPR3-N+M	X	X
NPR3-N+C	X	X
NPR3-M+C	X	X

Tabla 2. Plantas transgénicas generadas. Sobreexpresión de las versiones de NPR3 en el vector pMDC43 en las líneas Col-0 y *npr3-2* de *A. thaliana*.

9. DISCUSIÓN

La familia de las proteínas NPR ha sido asociada a diferentes procesos fisiológicos de las plantas (Backer *et al.*, 2019), y en los últimos años ha surgido un mayor interés acerca de su participación en la respuesta inmune mediada por el SA. Se han sugerido dos vías de regulación de las proteínas NPR1, NPR3 y NPR4 en la expresión de genes de defensa mediada por el SA. En la primera, NPR3 y NPR4 interaccionan con NPR1 y controlan su estabilidad, un mecanismo que es regulado por la concentración de SA (Fu *et al.*, 2012). La segunda vía sugiere que NPR3 y NPR4 funcionan de manera redundante e independiente de NPR1 como correpresores transcripcionales de genes de defensa, en este mecanismo el SA inhibe la actividad de NPR3 y NPR4 y favorece la de NPR1 como coactivador (Ding *et al.*, 2018). Si bien estos dos mecanismos podrían ocurrir de manera independiente, no implica que sean mutuamente excluyentes debido a que el mecanismo de acción depende de la concentración del SA como respuesta a la infección (local o distal) (Figura 1, Figura 4).

Debido a que existe poca evidencia de la interacción directa *in vivo* entre estas proteínas (Castelló *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2013), esta tesis se enfoca en el primer mecanismo de regulación e intenta determinar los dominios involucrados en la interacción de las proteínas NPR1-NPR3 *in planta*. Se demostró que la interacción es favorecida por un análogo estructural del SA (Figura 6), y que en ausencia de éste, la reconstitución de la fluorescencia no es detectable.

El MeSA es una forma volátil del SA que es transportada en el floema para ser localizada en tejidos distantes, en donde es convertido a SA, lo cual favorece la activación de la SAR (Pokotylo *et al.*, 2019; Maruri-López *et al.*, 2019). Se ha observado que el MeSA tiene una afinidad muy baja por NPR1, y a nivel estructural, no es capaz de inducir un cambio conformacional en NPR1 como ocurre en presencia de SA (Palmer *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2012). Diferentes análogos del SA han sido utilizados para determinar el efecto que tienen en la interacción NPR1-NPR3. Entre los análogos probados, el ácido 5-metilsalicílico (5-MeSA) ha mostrado favorecer dicha interacción, además de promover la formación de homodímeros de NPR3 y NPR4 en Y2H (Palmer *et al.*, 2019). Sin embargo, se desconoce la participación directa de MeSA en la interacción NPR1-NPR3, por lo que lo observado en la figura 6, pudiera ser debido a la conversión de MeSA en SA y no por la unión directa de MeSA a las proteínas. Debido a esto, el SA además de regular la actividad de NPR1, NPR3 y NPR4, influye en la interacción entre las proteínas, lo que permite tener una mayor regulación durante una respuesta inmune.

A pesar de que se desconoce el mecanismo por el que el SA favorece la interacción NPR1-NPR3, pudiera deberse a tres factores no excluyentes: 1) una mayor acumulación de NPR1 en el núcleo debido a la unión de SA a C521/529 interrumpiendo la interacción entre los dominios BTB/POZ y repeticiones de anquirina de NPR1 (Wu *et al.*, 2012), y la fosforilación de S589 (NLS) por SnRK2.8 (Lee *et al.*, 2015). 2) la sumoilación de NPR1, que determina la interacción con otras proteínas, como NPR3 y NPR4 (Saleh *et al.*, 2015). 3) la unión de SA a NPR4 desplaza la interacción con NPR1 debido a un cambio conformacional en el sitio de

unión del SA de NPR4 (Wang *et al.*, 2020); aumentando la presencia de NPR1 “libre” y promoviendo la interacción con NPR3.

Como se menciona en los tres puntos previos, el análisis de la interacción entre estas proteínas se centra en NPR1 y se desconoce en gran parte la participación de NPR3 y NPR4. Para NPR4, se ha sugerido que el SBC adopta una conformación abierta que es accesible al SA, y que después de la unión del SA se induce una conformación cerrada (Figura 2B) (Wang *et al.*, 2020).

Los residuos R419, T488 y V489 de NPR4 forman parte de los 14 residuos que interaccionan con el SA y se localizan en el SBC (Figura 8) (Wang *et al.*, 2020). Los mutantes R419Q, T488V y V489A de NPR4 interaccionan con NPR1 aún en ausencia de SA (Wang *et al.*, 2020). Cuando se compromete la unión del SA a NPR4 en los mutantes R419Q y V489A, la interacción con NPR1 no cambia, sin embargo, cuando la unión del SA se mantiene en T488V, la interacción NPR1-NPR4 disminuye. Los autores sugieren que la interacción NPR1-NPR4 es interrumpida por cambios conformacionales en NPR4, por lo que los residuos de NPR4 que interaccionan con NPR1, pudieran ser accesibles a NPR1 en la conformación abierta del SBC de NPR4, y al inducirse un cambio conformacional por el SA, los residuos no interaccionan con NPR1.

NPR1	EDKREQIPRDVPPSFVAVADELKMTLLDLENRVALAQRLFPT EAQAAMEIAEMKGTCEFI	460
NPR3	----NPMVLDTPMCSISMPEDLQMRLLYLEKRVGLAQLFFPTEAKVAMDIGNVEGTSEFT	456
NPR4	-----C SHSMPEDLQMRLLYLEKRVGLAQLFFPAEANVAMDVANVEGTSECT	447
	*	
NPR1	VTSLPDRLTGT-KRTSPGVKIAPFRILEEHQSRLKALSKTVELGKRFFPRCSAVLDQIM	519
NPR3	GLS--PPSSGLTGNLSQVDLNETPHMQTQRLLTRMVALMKTVETGRRFFPYGSEVLDKYM	514
NPR4	GLLTPPPSNDTTENLGKVDLNETPYVQTKRMLTRMKALMKTVETGRRYFPCS YEVL DKYM	507
	**	
NPR1	NC---EDLTQLACGEDDTAEKRLQKKQRYMEIQETLKKAFSEDNLELG-NSSLTDS TSST	575
NPR3	AEYIDDDILDDFHFEKGS THERRLKRMRYRELKDDVQKAYS KD KESKIARSCLSASSPS	574
NPR4	DQYMDEEIPDMSYPEKGTVKERRQKRMRYNELKNDVVKAYS KD K---VARSCLSSSSPA-	563
NPR1	SKSTGGKRSNRKLSHRRR	593
NPR3	SSSIRDDLHNTT-----	586
NPR4	-SSLREALENPT-----	574

Figura 8. Alineamiento del CTD de NPR1, NPR3 y NPR4 de *A. thaliana*. En rojo se muestran los 14 aminoácidos reportados que interactúan con el SA en NPR4. El asterisco indica los tres aminoácidos de NPR4 que interactúan con NPR1 en ausencia del SA.

De los 14 aminoácidos de NPR4 que interactúan con el SA solo los residuos 512 y 506/507 de NPR1 y NPR3, respectivamente, no son conservados (Figura 8). Además de estos residuos, regiones en el extremo amino y en las repeticiones de anquirina de los NPR también contribuyen a la unión del SA probablemente mediante la interacción con los residuos superficiales expuestos del sitio de unión del SA, como lo son los residuos F426, E469 y K505, los cuales han mostrado tener una mayor importancia en la unión del SA. Debido a estas características y a la proximidad de los R419, T488 y V489 con las repeticiones de anquirina es posible que la interacción de NPR1 con NPR3 y NPR4 está mediada por este dominio, y que la interacción NPR1-NPR3 sea modificada de una manera similar a la de NPR4.

Apoyando esta idea, Wang y colaboradores (2020) sugieren que además de los cambios conformaciones en el SBC de NPR4 debido a la unión del SA, las regiones de repeticiones de anquirina 317-344 y 325-344 de NPR4 también son modificadas por cambios conformaciones en presencia de SA, aunque en menor grado que los cambios en el SBC.

Basado en el alto porcentaje de identidad entre NPR3 y NPR4, las diferentes construcciones de NPR3 permitirán analizar cada una de las regiones que en NPR4 han mostrado tener relevancia en la unión del SA y en la interacción NPR1-NPR4. Por lo que una vez que se identifique la región de interacción entre NPR1-NPR3, será posible comparar la identidad de ésta con la secuencia correspondiente en NPR4 y así poder generar una construcción génica que permita analizar la interacción NPR1-NPR4 *in planta*. Además, los vectores generados en este trabajo permiten analizar la formación de homodímeros de NPR1 y NPR3 *in planta*, particularmente en el caso de NPR3, esto proporcionaría más información de su comportamiento en presencia de SA y posiblemente en el reconocimiento de NPR1 para mediar su degradación.

Determinar la interacción entre las proteínas no es suficiente para entender su función en la inmunidad de las plantas, por lo que la obtención de líneas transgénicas permite enfrentarlas a diferentes patógenos y así poder evaluar su susceptibilidad. Se ha reportado que plantas mutantes en el gen *NPR3* (*npr3-2*) y plantas Col-0 que sobreexpresan la proteína NPR3 son más susceptibles a la infección por *Pst* (Shi *et al.*, 2013), en ambos casos se debe a que se afecta la estabilidad de NPR1, por lo que analizar el efecto que tiene cada una de las versiones en la estabilidad de NPR1 y en la inmunidad de las plantas, permitirá conocer si alguna de estas puede promover los mecanismos de defensa sin comprometer otras respuestas inmunes.

10.CONCLUSIÓN

Basado en el alto porcentaje de identidad que tienen las versiones generadas de la proteína NPR3 con los segmentos correspondientes de NPR4 (Figura 2C), el análisis estructural de la proteína NPR4 sirve como una base para conocer si puede existir un mecanismo de regulación similar al de esta proteína. Por lo que además de caracterizar los dominios de interacción, el análisis de la interacción de las versiones de NPR3 con NPR1 en presencia y ausencia de SA, nos permitirá entender el efecto funcional del SA en la interacción de estas proteínas.

Las plantas transgénicas generadas en este proyecto complementarán el estudio del mecanismo de regulación entre las proteínas NPR1 y NPR3, y permitirá conocer más sobre la importancia biológica de esta interacción.

11. PERSPECTIVAS

- 11.1. Analizar y corroborar las regiones de interacción mediante co-inmunoprecipitación.
- 11.2. Evaluar la susceptibilidad a la infección de líneas transgénicas que sobreexpresen las versiones de NPR3.
- 11.3. Determinar si la sobreexpresión de las versiones de NPR3 en la línea mutante *npr3-2* influye en la estabilidad de NPR1.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Backer, R., Naidoo, S., & van den Berg, N. (2019). The NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1) and related family: Mechanistic insights in plant disease resistance. *Frontiers in Plant Science*, 10(February), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00102>
- Benlloch, R., & Maria Lois, L. (2018). Sumoylation in plants: Mechanistic insights and its role in drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 69(19), 4539–4554. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery233>
- Bigeard, J., Colcombet, J., & Hirt, H. (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant*, 8(4), 521–539. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>
- Castelló, M. J., Medina-Puche, L., Lamilla, J., & Tornero, P. (2018). NPR1 paralogs of Arabidopsis and their role in salicylic acid perception. *PLoS ONE*, 13(12), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209835>
- Chang, M., Zhao, J., Chen, H., Li, G., Chen, J., Li, M., Palmer, I. A., Song, J.,

- Alfano, J. R., Liu, F., & Fu, Z. Q. (2019). PBS3 Protects EDS1 from Proteasome-Mediated Degradation in Plant Immunity. *Molecular Plant*, 12(5), 678–688. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.01.023>
- Ding, Y., Sun, T., Ao, K., Peng, Y., Zhang, Y., Li, X., & Zhang, Y. (2018). Opposite Roles of Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Transcriptional Regulation of Plant Immunity. *Cell*, 173(6), 1454-1467.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.044>
- Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S. H., Tada, Y., Zheng, N., & Dong, X. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature11162>
- Genschik, P., Sumara, I., & Lechner, E. (2013). The emerging family of CULLIN3-RING ubiquitin ligases (CRL3s): Cellular functions and disease implications. In *EMBO Journal* (Vol. 32, Issue 17, pp. 2307–2320). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.173>
- Jin, H., Choi, S. M., Kang, M. J., Yun, S. H., Kwon, D. J., Noh, Y. S., & Noh, B. (2018). Salicylic acid-induced transcriptional reprogramming by the HAC-NPR1-TGA histone acetyltransferase complex in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gky847>
- Lee, H. J., Park, Y. J., Seo, P. J., Kim, J. H., Sim, H. J., Kim, S. G., & Park, C. M. (2015). Systemic immunity requires SnRK2.8-mediated nuclear import of NPR1 in arabidopsis. *Plant Cell*, 27(12), 3425–3438. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00371>
- Liu, Y., Sun, T., Sun, Y., Zhang, Y., Radojčić, A., Ding, Y., Tian, H., Huang, X., Lan, J., Chen, S., Orduna, A. R., Zhang, K., Jetter, R., Li, X., & Zhang, Y. (2020). Diverse Roles of the Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Plant Immunity. *The Plant Cell*, tpc.00499.2020. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00499>
- Maruri-López, I., Aviles-Baltazar, N. Y., Buchala, A., & Serrano, M. (2019). Intra and extracellular journey of the phytohormone salicylic acid. *Frontiers in Plant*

- Science*, 10(April), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00423>
- Meyer, H. M. (2020). In search of function: nuclear bodies and their possible roles as plant environmental sensors. *Current Opinion in Plant Biology*, 58, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.10.002>
- Palmer, I. A., Chen, H., Chen, J., Chang, M., Li, M., Liu, F., & Fu, Z. Q. (2019). Novel salicylic acid analogs induce a potent defense response in arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133356>
- Pokotylo, I., Kravets, V., & Ruelland, E. (2019). Salicylic acid binding proteins (SABPs): The hidden forefront of salicylic acid signalling. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms20184377>
- Qi, G., Chen, J., Chang, M., Chen, H., Hall, K., Korin, J., Liu, F., Wang, D., & Fu, Z. Q. (2018). Pandemonium Breaks Out: Disruption of Salicylic Acid-Mediated Defense by Plant Pathogens. *Molecular Plant*, 11(12), 1427–1439. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.10.002>
- Radhamony, R. N., Prasad, A. M., & Srinivasan, R. (2005). T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis: A tool for functional genomics. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(1), 82–106. <https://doi.org/10.2225/vol8-issue1-fulltext-4>
- Rusnac, D.-V., & Zheng, N. (2020). Structural Biology of CRL Ubiquitin Ligases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1217, 9–31. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1025-0_2
- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H. Y., Johnson, J., Delaney, T. P., Jesse, T., Vos, P., & Uknes, S. (1997). The arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor IκB. *Plant Cell*, 9(3), 425–439. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.3.425>
- Saleh, A., Withers, J., Mohan, R., Marqués, J., Gu, Y., Yan, S., Zavaliev, R., Nomoto, M., Tada, Y., & Dong, X. (2015). Posttranslational modifications of the master transcriptional regulator NPR1 enable dynamic but tight control of plant immune responses. *Cell Host and Microbe*, 18(2), 169–182.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.07.005>

- Shi, Z., Maximova, S., Liu, Y., Verica, J., & Guiltinan, M. J. (2013). The salicylic acid receptor NPR3 is a negative regulator of the transcriptional defense response during early flower development in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, *6*(3), 802–816. <https://doi.org/10.1093/mp/sss091>
- Skelly, M. J., Frungillo, L., & Spoel, S. H. (2016). Edinburgh Research Explorer Transcriptional regulation by complex interplay between post-translational modifications. *Current Opinion in Plant Biology*, *33*, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.004>
- Skelly, M. J., Furniss, J. J., Grey, H. L., Wong, K. W., & Spoel, S. H. (2019). Dynamic ubiquitination determines transcriptional activity of the plant immune coactivator NPR1. *ELife*, *8*, 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.47005>
- Spoel, S. H., Mou, Z., Tada, Y., Spivey, N. W., Genschik, P., & Dong, X. (2009). Proteasome-mediated Turnover of the Transcription Coactivator NPR1 Plays Dual Roles in Regulating Plant Immunity. *Cell*, *135*(2), 612–615. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Stallcup, M. R., & Poulard, C. (2020). Gene-Specific Actions of Transcriptional Coregulators Facilitate Physiological Plasticity: Evidence for a Physiological Coregulator Code. *Trends in Biochemical Sciences*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.02.006>
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., & Dong, X. (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, *321*(5891), 952–956. <https://doi.org/10.1126/science.1156970>
- Tyurin, A. A., Suhorukova, A. V., Kabardaeva, K. V., & Goldenkova-Pavlova, I. V. (2020). Transient gene expression is an effective experimental tool for the research into the fine mechanisms of plant gene function: Advantages, limitations, and solutions. *Plants*, *9*(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/plants9091187>

- Wang, W., Withers, J., Li, H., Zwack, P. J., Rusnac, D. V., Shi, H., Liu, L., Yan, S., Hinds, T. R., Guttman, M., Dong, X., & Zheng, N. (2020). Structural basis of salicylic acid perception by Arabidopsis NPR proteins. *Nature*, August 2019. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2596-y>
- Weigel, R. R., Bäuscher, C., Pfitzner, A. J. P., & Pfitzner, U. M. (2001). NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from Arabidopsis that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. *Plant Molecular Biology*, 46(2), 143–160. <https://doi.org/10.1023/A:1010652620115>
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J. Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., De Luca, V., & Després, C. (2012). The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Reports*, 1(6), 639–647. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.008>
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., & Chua, N. H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nature Protocols*, 1(2), 641–646. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>