

# Caracterización de la hipotética proteína de defensa codificada por el gen At5G38850 en *Arabidopsis thaliana*

Diego López-Márquez<sup>1</sup>, Ángel Del Espino<sup>1</sup>, Nieves López-Pagan<sup>1</sup>, Javier Ruíz-Albert<sup>1</sup>, Eduardo R. Bejarano<sup>1</sup> y Carmen R. Beuzon<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC). Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Málaga, 29071, España.

*adep@uma.es*

La interacción planta-patógeno a lo largo del tiempo ha dado lugar al desarrollo y evolución de mecanismos de defensa, en las plantas, así como de virulencia, en los patógenos. Siendo uno de los ejemplos más representativos la defensa tipo PTI en plantas (Pattern triggered immunity), la cual evita la infección por parte de un gran número de patógenos. Esta se basa en unos receptores (PRRs) que son capaces de reconocer moléculas muy conservadas presentes en los patógenos denominadas *Patrones Moleculares Asociados a Patógenos* (PAMPs). Este reconocimiento desencadena la puesta en marcha de la respuesta de defensa incluyendo la deposición de callosa, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de MAPK, etc. Frente a esto, algunas bacterias patógenas, como *P. syringae* han desarrollado mecanismos que le permiten suprimir dicha respuesta PTI. El factor de virulencia más importante de *P. syringae* es el sistema de secreción tipo III (T3SS), que le permite suprimir la PTI, al introducir en la célula vegetal proteínas denominadas efectores, que interactúan con los elementos de la cascada de señalización de la misma, inhibiéndola. Las plantas no obstante presentan un segundo nivel de defensa, la ETI (*Effector triggered immunity*), capaz de detectar la actividad de los efectores del T3SS, mediante proteínas “R” que actúan como receptores intracelulares, codificadas por genes de resistencia. El reconocimiento directo o indirecto de los efectores tiene como consecuencia la activación de rutas de señalización que inducen una respuesta más rápida e intensa, que generalmente conlleva la puesta en marcha de mecanismos de defensa similares a los activados durante la PTI, pero con una mayor amplitud. Además, la ETI va frecuentemente asociada al disparo de muerte celular programada del tejido vegetal infectado, conocida como HR (Hypersensitive Response), con el fin de frenar el avance del patógeno. Las proteínas R se caracterizan por presentar dominios de tipo NBS-LRR, y se clasifican en dos subfamilias en función del tipo de dominio amino-terminal que presenten, pudiendo ser TIR (Toll/interleucina receptor-like domain) o un motivo CC (Coiled-Coil). Estos dominios intervienen en la transducción de la señal, que induce la interacción del efector con los dominios NBS y LRR.

Los niveles de expresión de genes R, deben estar finamente regulados, ya que altos niveles de estos, pueden desencadenar efectos deletéreos. Dentro de dichos procesos de regulación destaca el papel del silenciamiento génico mediado por pequeños RNAs. En plantas, los pequeños RNAs, son producidos por la acción de RNAsas del tipo III conocidas como “Dicer-Like proteins” (DCLs). Existen dos tipos principales de pequeños RNAs involucrados en silenciamiento génico: Los pequeños RNAs interferentes (siRNAs) y los microRNAs (miRNAs), difiriendo estos en su biogénesis y modo de acción, pero compartiendo tamaños similares (20-24 nt). Los microRNAs son pequeños RNAs no codificantes, de cadena sencilla capaces de regular negativamente la expresión de transcritos diana mediante la unión al complejo RISC (RNA-induced silencing complex) por un mecanismo dependiente de secuencia. Esta regulación es englobada dentro del silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS). El PTGS mediado por miRNAs ha demostrado ser de vital importancia en las respuestas de defensa frente a multitud de patógenos, al permitir la rápida modulación de una gran batería de genes. Debido a su papel en defensa, han surgido proteínas efectoras que presentan por diana algunos componentes de la maquinaria involucrada en la producción y funcionamiento de los miRNAs. En nuestro laboratorio, trabajamos con un miRNA de *A. thaliana* denominado miR825\*. Este miRNA825\* presenta como dianas genes “R” del tipo TIR-NBS-LRR, aún por caracterizar. Hemos mostrado que dicho miRNA regula la expresión de algunos genes R y desencadena la generación de pequeños RNAs en fase (phasiRNAs) a partir de una de estas dianas. Asimismo, hemos visto que tras la activación de PTI por *P. syringae*, los niveles del precursor de miRNA825\* (pri-miRNA825) disminuyen activándose así la expresión de estos genes

R. Hemos demostrado que plantas con niveles alterados de miRNA825\* muestran una PTI alterada lo cual sugiere un papel del miRNA825\* en la regulación de este mecanismo de defensa frente a la bacteria.

Con el fin de relacionar de forma directa el papel del miRNA con la modulación de defensas observada, hemos seleccionado una de las dianas reguladas por este miRNA, el gen AT5G38850, para su caracterización. Mediante microscopia confocal, hemos determinado la localización tanto nuclear como citoplasmática de esta proteína R fusionada a GFP. También hemos caracterizado el patrón de expresión del gen y del miRNA, demostrando que este último regula los niveles del primero en diferentes tejidos de la planta. Por último, hemos generado un sistema de expresión inducible mediante el cual expresar la proteína R para su purificación, de cara a ensayos de detección de posibles interactores. Todo ello se ha realizado en dos fondos distintos de *Arabidopsis thaliana*, Col-0 (silvestre) y DCL234 (mutante afectado en la biogénesis de siRNAs). Un análisis mas exhaustivo nos ha permitido observar, que dicha proteína se acumula en el fondo mutante DCL234 y no en la planta silvestre Col-0. Este resultado, sugiere un mecanismo de autorregulación de los niveles del transcrito, mediante la generación de phasiRNAs.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Bonardi V, Cherkis K, Nishimura M T, Dangl J L (2012) A new eye on NLR proteins: Focused on clarity or diffused by complexity? *Curr. Opin. Immunol.* 24: 41–50.
2. Jones J D, Dangl J L (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
3. Liu J, Gitta C (2008) Nuclear trafficking during plant innate immunity. *Molecular plant* 1.3: 411-422.
4. Manavella, et al. (2012) Plant secondary siRNA production determined by microRNA-duplex structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 7: 2461-2466.
5. Peart J R, Lu R, Sadanandom A, Malcuit I, Moffett P, Brice D C, Schauser L, Jaggard D A W, Xiao S, Coleman M J, Dow M, Jones J D G, Shirasu, Baulcombe D C (2002) Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 10865-10869.
6. Takken F L, Albrecht M, Tameling W I (2006) Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 383–390.