



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización funcional de la interacción NPR1-NPR3 en el patosistema  
*Pseudomonas syringae-Arabidopsis thaliana*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
EVERARDO JAIR FLORES CUEVAS

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Adán Guerrero Cárdenas, Instituto de Biotecnología, UNAM  
Dr. Damien Formey de Saint Louven, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Abril, 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

A mi madre y hermanas, por su gran apoyo y motivación que me brindaron durante esta etapa. Gracias por seguir apoyándome en lo que disfruto hacer, y por ser parte de cada uno de mis logros. Agradezco mucho el poder tenerlas como familia.

A Mariana, por su apoyo y cariño que me brinda. Gracias por todos los buenos momentos que pasamos juntos, por su apoyo en el laboratorio y por su paciencia. Gracias por siempre estar presente y por ser una persona muy especial.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Emir, Martha y Elizabeth, por los buenos momentos que pasamos juntos. Gracias por haber estado presentes, por su apoyo y su buen humor, que hicieron para mí una etapa muy agradable.

Agradezco a Ivette por su gran apoyo durante todo el proyecto, por su disposición para resolver dudas, y por su gran paciencia. También agradezco a Norma, por su apoyo y consejos en la planificación de experimentos.

Al Dr. Mario Serrano, por permitirme trabajar con él y por su confianza. Gracias por brindar los recursos y espacio para poder realizar el proyecto.

Agradezco a los miembros del comité tutorial, el Dr. Adán Guerrero y al Dr. Damien Formey, por sus valiosos comentarios y apoyo, que permitieron que el trabajo pudiera realizarse de una forma adecuada.

Agradezco a los miembros del jurado, por su tiempo y dedicación, gracias al cual se pudo obtener una mejor versión de la tesis. Gracias por compartir de sus conocimientos, lo que me permitió ampliar mi criterio en cada uno de los aspectos que conforman un proyecto. Agradezco especialmente a la Dra. Rosana Sánchez, por sus palabras, por su tiempo, por su gran aporte al escrito. Gracias por demostrar su completo acompañamiento en ese último proceso del trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), por el apoyo económico para la realización de este proyecto con número de beca 1137328. Así mismo, agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo económico recibido (Clave IN203023).

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
1.1. Aspectos generales de la inmunidad innata de las plantas .....	9
1.2. Participación del ácido salicílico en la inmunidad innata.....	11
1.3. La familia NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES en respuesta al SA 12	
1.4. Estructura de la familia NPR .....	13
1.5. Función de la familia NPR .....	16
1.6. Participación de las proteínas NPR en la inmunidad de las plantas .....	16
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>18</b>
2.1. NPR1, NPR3 y NPR4 como receptores del SA .....	18
2.2. Modificaciones postraduccionales que influyen en la estabilidad de NPR1 .....	19
2.3. Análisis estructural en la percepción del SA por las proteínas NPR .....	21
2.4. Condensados de NPR1 que promueven la supervivencia celular .....	22
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>24</b>
<b>4. HIPÓTESIS:</b> .....	<b>24</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL:</b> .....	<b>24</b>
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES:</b> .....	<b>24</b>
<b>7. METODOLOGÍA</b> .....	<b>25</b>
7.1. Predicción de las interacciones NPR1 con las versiones truncas de NPR3 .....	26
7.2. Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	28
7.3. Microscopía confocal de fluorescencia .....	29
7.4. Selección de líneas transgénicas .....	29
7.5. Construcción de los vectores de expresión en el sistema doble híbrido en levadura... 30	
7.6. Infección con <i>P. syringae</i> .....	31
<b>8. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
8.1. Predicción <i>in silico</i> de las interacciones de NPR1 con las versiones de NPR3.....	31
8.2. Predicción de la energía libre de Gibbs y de la constante de disociación de los complejos NPR1-NPR3 .....	39
8.3. Impacto de los segmentos de YFP en la interacción de los complejos NPR1-NPR3 .....	42
8.4. Análisis de los dominios de interacción entre las proteínas NPR1-NPR3.....	46
8.5. Análisis de la localización subcelular .....	53
8.6. Selección de líneas transgénicas .....	57

8.7. Expresión transitoria de las diferentes versiones de NPR3 en fusión con GFP y su caracterización fenotípica de plantas de <i>A. thaliana npr3-2</i> inoculadas con <i>pseudomonas syringae DC3000</i> .....	59
8.8. Construcción de los vectores de expresión en el sistema doble híbrido en levadura...	60
<b>9. DISCUSIÓN .....</b>	<b>62</b>
<b>10. CONCLUSIONES .....</b>	<b>66</b>
<b>11. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>67</b>
<b>12. REFERENCIAS.....</b>	<b>67</b>

## **Lista de abreviaturas (por sus siglas en inglés)**

**ANK** Ankyrin

**BiFC** Bimolecular Fluorescence Complementation

**BTB/POZ** Broad-Complex, Tramtrack and Bric a Brac/Pox virus and Zinc finger

**CLSM** Confocal Laser Scanning Microscopy

**CRL3** CUL3-RING-E3 Ligase

**CTD** C-terminal domain

**CUL3** Cullin Ubiquitin Ligase

**2,5-DHBA** 2,5-Dihydroxybenzoic acid

**ETI** Efecetor-triggered immunity

**ETS** Effector-triggered susceptibility

**GFP** Green Fluorescent Protein

**4HBA** 4-hydroxybenzoic acid

**HR** Hypersensitive response

**IC** Iniciator Complex

**ICS1** Isochorismate synthase 1

**INA** 2,6-dichloroisonicotinic acid

**Kd** Dissociation constant

**MS** Murashige and Skoog

**NHP** N-hydroxypipicolinic acid

**NLS** Nuclear Localization Signal

**NPR** Nonexpressor of pathogenesis related genes

**NTD** N-terminal domain

**PAMPs** Pathogen-associated molecular patterns

**PCD** Programmed cell death

**PID** Protein Interaction Domain

**PR** Pathogenesis-Related

**Pst** *Pseudomonas syringae* tomato

**PTI** PAMP-triggered immunity

**SA** Salicylic acid

**SAG** SA O- $\beta$ -glucoside

**SAR** Systemic Acquired Resistance

**SBC** SA-binding core

**SIM3** SUMO-interaction motif

**SINC**s SA-induced NPR1 condensates

**SUMO3** Small ubiquitin-like modifier 3

**TAD** Transactivation domain

**Ub** Ubiquitin

**Y2H** Yeast Two Hybrid

## Resumen

El ácido salicílico (SA) es una fitohormona que tiene un papel clave en la activación y regulación de múltiples respuestas a estrés bióticos y abióticos, particularmente para inducir la resistencia sistémica adquirida (SAR), un mecanismo utilizado por las plantas para resistir el ataque de patógenos.

En *Arabidopsis thaliana*, el SA es percibido por las proteínas NONEXPRESSER OF PATHOGENESIS-RELATED GENES (NPRs), específicamente por NPR1, NPR3 y NPR4, los cuales también participan en la respuesta de defensa. La proteína NPR1 es el regulador maestro en la percepción del SA debido a que, en conjunto con factores de transcripción, participa en la activación de genes de defensa inducidos por SA. Por otra parte, se ha sugerido que las proteínas NPR3 y NPR4 funcionan como adaptadoras de la ubiquitina E3 ligasa de culina (CUL3), para promover la degradación de NPR1 en una manera regulada por el SA.

El mecanismo de regulación de estas proteínas es complejo y no es conocido con detalle y, a pesar de que la interacción entre estas proteínas ha sido analizada, los dominios por los cuales interaccionan no han sido caracterizados. Por lo que entender cómo ocurre la interacción entre las proteínas NPR1 y NPR3, y el cómo la interacción puede ser modificada por diferentes estímulos, nos permitirá entender su papel en la inmunidad de las plantas.

En este trabajo los segmentos potenciales de participar en la interacción entre NPR1 y NPR3, fueron caracterizados mediante un análisis *in silico* y mediante la complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC). Para esto, fueron utilizadas las secuencias que codifican a los residuos 1-200, 201-400 y 401-587 de la proteína NPR3. Estas secuencias incluyen al dominio BTB/POZ, repeticiones de anquirina (ANK), y el dominio carboxilo terminal (CTD), respectivamente. Así mismo, se generaron deleciones de solo uno de los segmentos mencionados. Además, se generaron fusiones traduccionales de la secuencia completa de NPR1, así como de los fragmentos generados de NPR3, con la proteína verde fluorescente (GFP).

Las fusiones traduccionales fueron expresadas transitoriamente en hojas de plantas mutantes *npr3-2* de *A. thaliana*, haciendo posible evaluar la susceptibilidad a la infección de estas plantas como un análisis preliminar en la caracterización de los dominios de NPR3 durante una infección con *pseudomonas syringae*.



## Abstract

Salicylic acid (SA) is a phytohormone that plays a key role in the activation and regulation of multiple biotic and abiotic stress responses, particularly to induce systemic acquired resistance (SAR), a mechanism used by plants to resist pathogen attack.

In *Arabidopsis thaliana*, SA is sensed by NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES (NPRs) proteins, specifically by NPR1, NPR3, and NPR4, which also participate in the defense response. The NPR1 protein is the master regulator in SA perception because, in conjunction with transcription factors, it participates in the activation of SA-induced defense genes. On the other hand, it has been suggested that NPR3 and NPR4 proteins function as adaptors of the ubiquitin E3 cullin ligase (CUL3) to promote the degradation of NPR1 in an SA-regulated manner.

The regulatory mechanism of these proteins is complex and is not known in detail and, although the interaction between these proteins has been analyzed, the domains by which they interact have not been characterized. Therefore, understanding how the interaction between NPR1 and NPR3 proteins occurs, and how the interaction can be modified by different stimuli, will allow us to understand their role in plant immunity.

In this work, *in silico* analysis and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) were used to characterize the potential segments involved in the interaction between NPR1 and NPR3. Sequences encoding residues 1-200, 201-400 and 401-587 of the NPR3 protein were used for this purpose. These sequences contain the BTB/POZ domain, ankyrin repeats (ANK), and the carboxyl-terminal domain (CTD), respectively. Deletions of only one of these segments were also generated. In addition, translational fusions of the complete sequence of NPR1 and the generated fragments of NPR3 with green fluorescent protein (GFP) were generated.

The translational fusions were transiently expressed in leaves of *npr3-2* mutant plants of *A. thaliana*. This allowed us to assess the susceptibility of these plants to infection as a preliminary analysis in the characterization of NPR3 domains during infection with *Pseudomonas syringae*.

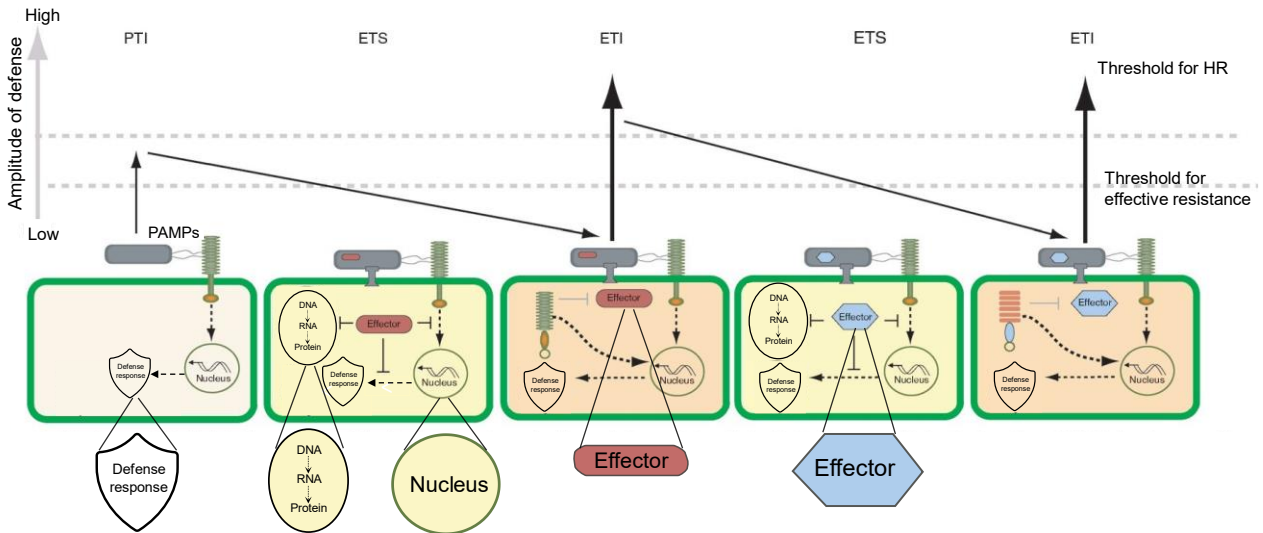
## 1. Introducción

### 1.1. Aspectos generales de la inmunidad innata de las plantas

Las plantas son organismos sésiles que están en constante interacción con una gran variedad de microorganismos, por lo que han tenido que desarrollar mecanismos de defensa especializados que limitan el posible daño que este tipo de interacciones pudiera ocasionarles. Estos mecanismos incluyen desde barreras físicas extracelulares hasta respuestas intracelulares, pero, a diferencia de mamíferos, carecen de un sistema inmune adaptativo (Jones & Dangl, 2006). De manera que cada una de las células vegetales tiene la capacidad de poder reconocer agentes externos y mediar una respuesta de defensa ante dicho estímulo como parte de su sistema inmune innato (Bigeard *et al.*, 2015; Ngou *et al.*, 2022).

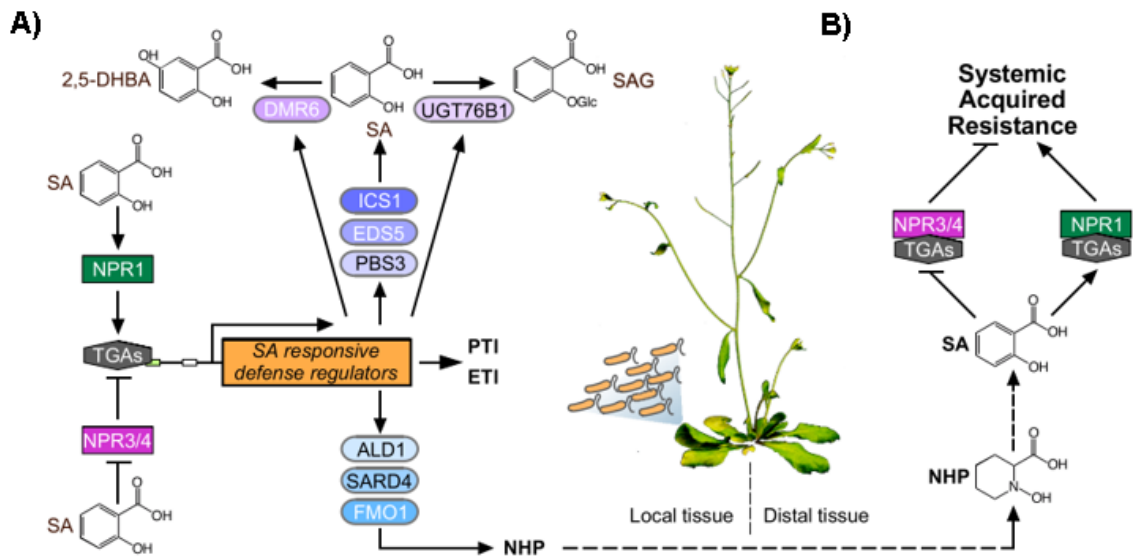
Algunos microorganismos patógenos necesitan de células vivas para mantener su ciclo de infección, mientras que otros ocasionan la muerte de la célula con el mismo fin, por lo que se denominan biotróficos o necrotróficos, respectivamente. Incluso se pueden identificar patógenos que implementan ambas estrategias y son conocidos como hemibiotróficos. De esta manera, dependiendo del tipo de microorganismo, la planta induce una respuesta de defensa que le permite confrontar adecuadamente al microorganismo patogénico (Bigeard *et al.*, 2015).

En plantas, la inmunidad innata consiste en dos respuestas, la inmunidad desencadenada por patrones (PTI) y la inmunidad desencadenada por efectores (ETI). La PTI es la primera línea de defensa y es activada por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), mediante receptores extracelulares. Mientras que la ETI sirve como una vía de respaldo cuando la PTI es evadida debido a la presencia de moléculas llamadas efectores, las cuales son sintetizadas por el patógeno, y previo a inducir la ETI se induce una fase vulnerable conocida como susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS). De forma general, la ETI representa una vía más compleja que la PTI debido a que la duración y amplitud de la respuesta es mayor (Nguyen *et al.*, 2021; Qi *et al.*, 2018)(Figura 1).



**Figura 1. Modelo de Zig-zag del sistema inmune de las plantas.** La presencia de receptores extracelulares en las células vegetales permite el reconocimiento de estructuras conservadas presentes en los microorganismos. Este reconocimiento induce a la inmunidad desencadenada por patrones (PTI). Algunos microorganismos patógenos han adquirido la capacidad de evadir la PTI mediante proteínas efectoras que interfieren en procesos celulares durante una infección, lo que promueve una fase vulnerable conocida como susceptibilidad desencadenada por efectores (ETS). Un segundo mecanismo de defensa de la inmunidad innata es la inmunidad desencadenada por efectores (ETI), que se distingue por ser una respuesta más robusta y rápida que la PTI y que, en algunos casos, induce una respuesta hipersensible (HR), caracterizada por promover la muerte celular en el sitio de la infección para evitar la propagación del patógeno. Figura tomada y modificada de Leach *et al.* (2014).

Ambos mecanismos se activan en el sitio local de la infección (Figura 2A) y como respuesta secundaria, se activa la resistencia sistémica adquirida (SAR), en tejidos distantes no infectados (Figura 2B). El control de cada uno de estos mecanismos es imprescindible para evitar prolongar la respuesta cuando ya no es necesaria o para limitar cualquier daño a los tejidos por una respuesta muy agresiva, como puede ser la muerte celular programada (PCD), que tiene lugar durante la ETI y que se conoce como respuesta hipersensible (HR) (Figura 1).



**Figura 2. Modelo general sobre el funcionamiento de los receptores del SA durante los mecanismos de defensa.** La reprogramación transcripcional inducida por el SA depende del reconocimiento de esta fitohormona por receptores intracelulares, de los cuales, hasta la fecha se han descrito a tres miembros de la familia NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES (NPR), nombrados NPR1, NPR3 y NPR4. Sin embargo, aún se tiene poca información sobre el mecanismo molecular detallado por el cual perciben el SA y se coordina la señalización hormonal (Fu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). A) En el sitio local de la infección, la unión de SA a NPR1 y NPR3/NPR4 promueve e inhibe su actividad como coactivador y represor de genes de defensa, respectivamente. B) Como respuesta a una infección, en tejidos distantes se induce la SAR, un mecanismo desencadenado por el ácido N-hidroxipípecólico (NHP); un derivado del SA y que es utilizado como molécula de señalización. “AGD2-like defense response protein” (ALD1), “2,5-Dihydroxybenzoic acid” (2,5-DHBA), “ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY5” (EDS5), “DOWNY MILDEW RESISTANT 6” (DMR6), “FLAVIN-DEPENDENT MONOOXYGENASE 1” (FMO1), “avrPphB SUSCEPTIBLE 3” (PBS3), “SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE DEFICIENT 4” (SARD4), “UDP-glucosyltransferases” (UGT76B1), “Salicylic acid beta-glucoside” (SAG), “Systemic acquired resistance” (SAR). Figura tomada de Liu *et al.* (2020).

## 1.2. Participación del ácido salicílico en la inmunidad innata

Las fitohormonas juegan un papel importante en diferentes procesos fisiológicos de las plantas, incluyendo aquellas respuestas inducidas por factores bióticos y abióticos. Específicamente, en las respuestas de defensa de las plantas, el ácido salicílico (SA), regula la ETI y la SAR, debido a que induce la expresión de genes de defensa y de aquellos

genes que regulan la propia biosíntesis del SA (Figura 2). Principalmente, los genes de defensa inducidos por el SA son los relacionados con la patogénesis (PR), los cuales codifican péptidos con funciones antimicrobianas, mientras que otro de los genes inducidos y que controla la principal vía de biosíntesis del SA es el gen de la *ISOCORISMATO SINTASA 1 (ICS1)*; actuando como un mecanismo de retroalimentación positiva.

Existen diferentes análogos estructurales del SA como lo son el ácido 2,5 dihidroxibenzoico (2,5-DHBA) y el SA O- $\beta$ -glucósido (SAG) (Figura 2A), entre otros. Estos análogos son formados por modificaciones químicas del SA, como lo son la hidroxilación, metilación y glicosilación (Maruri-López *et al.*, 2019). A nivel funcional, se ha identificado que los análogos representan una forma menos activa de la misma molécula. De éstos, se distinguen aquellos que pueden presentar cierta funcionalidad, como lo es el ácido 2,6 dicloroisonicotínico (INA), y aquellos que representan una forma completamente inactiva del SA, como lo es el ácido 4-hidroxibenzoico (4HBA) (Fu *et al.*, 2012). En conjunto, estas características permiten el uso de los análogos como una forma de almacenamiento en la célula vegetal, principalmente almacenados en citosol, cloroplasto y vacuola (Maruri-López *et al.*, 2019). De esta manera, cuando el SA es necesario, los análogos estructurales pueden ser convertidos rápidamente a SA (Maruri-López *et al.*, 2019). De éstos, el ácido N-hidroxipípecólico (NHP), es de gran relevancia durante la SAR debido a que es utilizado como molécula de señalización para inducir la acumulación de SA en tejidos distantes al sitio de infección (Liu *et al.*, 2020) (Figura 2).

### **1.3. La familia NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES en respuesta al SA**

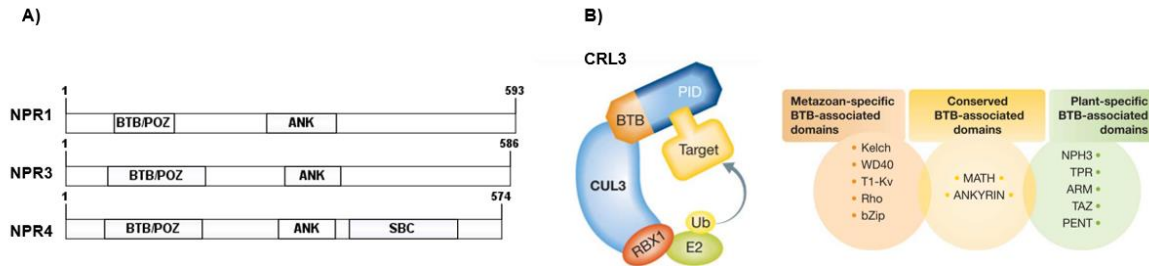
En *A. thaliana* la familia NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES (NPR), está formada por seis miembros: NPR1, NPR2, NPR3, NPR4, NPR5 y NPR6, los cuales además de participar en la respuesta de defensa, intervienen en la activación de genes relacionados con el ritmo circadiano, en la vía secretoria y en el desarrollo de órganos laterales (Backer *et al.*, 2019). Aunque se ha evaluado la participación de los miembros de la familia NPR en la percepción del SA, solo las proteínas NPR1, NPR3 y NPR4 se unen con las propiedades típicas de ligando-receptor con el SA (Fu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). El resto de los miembros de la familia NPR parecen estar regulando el reconocimiento del SA debido a que, a pesar de que pueden interactuar con el SA, no se han caracterizado

sitios de unión y la afinidad por el SA no corresponde a la descrita para interacciones ligando-receptor (Castelló *et al.*, 2018).

#### **1.4. Estructura de la familia NPR**

Las proteínas NPRs tienen dos dominios de interacción proteína-proteína (Figura 3A): el dominio (Broad-Complex, Tramtrack and Bric a Brac/Pox virus and Zinc finger) BTB/POZ y las repeticiones de anquirina localizados en el extremo amino terminal. El dominio BTB/POZ es característico de proteínas adaptadoras de la ubiquitina E3 ligasa de Culina (CUL3), como la proteína CRL3 (“CUL3-RING-E3 Ligase”, Figura 3B), esta última representa un complejo conformado por la proteína adaptadora, CUL3 y la subunidad RBX1. Estas proteínas adaptadoras tienen dominios adicionales de reconocimiento del sustrato de CRL3, como lo son las repeticiones de anquirina (ANK) (Figura 3B). Además, los NPRs tienen una señal de localización nuclear en el dominio carboxilo terminal (CTD), y NPR1 se distingue por tener una señal de degradación proteolítica (DSXXXS, donde la “X” representa cualquier aminoácido), en su dominio amino terminal (NTD), la cual es fosforilada en los residuos de serina 11 y 15, y que hasta ahora esta fosforilación ha mostrado promover la degradación de NPR1.

Las proteínas NPR1, NPR3 y NPR4 tienen 593, 586 y 574 residuos de aminoácidos, respectivamente, y en su CTD, estos tres NPRs tienen un sitio de unión de SA (SBC), sin embargo, solo para NPR4 se ha identificado la posición y la estructura tridimensional de esta región. En el SBC de NPR4, se han identificado 14 residuos que interactúan directamente con el SA. De estos 14 residuos, 12 son conservados en NPR3 y 13 son conservados en NPR1 (Wang *et al.*, 2020). Únicamente se ha reportado que NPR1 es modificado postraduccionalmente por fosforilación, sumoilación y ubiquitinación (Saleh *et al.*, 2015; Skelly *et al.*, 2019; Spoel *et al.*, 2009).

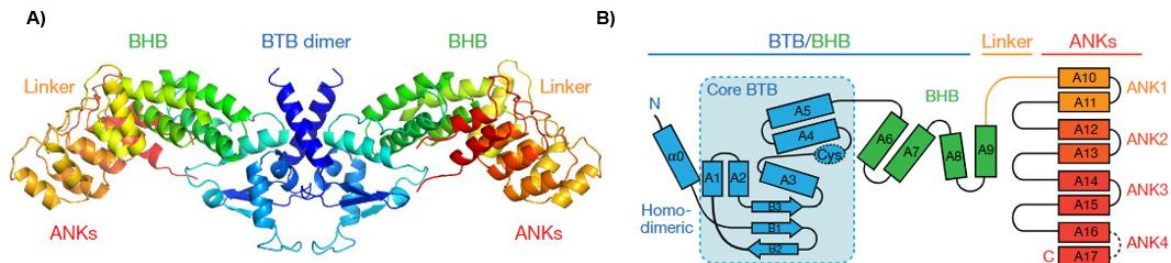


**Figura 3. Dominios de interacción proteína-proteína de los NPRs.** A) NPR1, NPR3 y NPR4 tienen los dos dominios de interacción proteína-proteína, BTB/POZ y de repeticiones de anquirina (ANK). Además, en el CTD de estos 3 NPRs hay un sitio de unión del SA (SBC), únicamente se conoce la posición y estructura para el SBC de NPR4. B) En proteínas adaptadoras de CRL3, conformado por la proteína adaptadora, CUL3 y RBX1, se ha caracterizado la interacción del dominio BTB/POZ con CUL3, mientras que estas proteínas cuentan con dominios adicionales que le permiten reconocer al sustrato de CRL3 que será ubiquitinado y degradado; una interacción que no puede realizar directamente CUL3. Un ejemplo de estos dominios adicionales de las proteínas adaptadoras, son las repeticiones de anquirina. “Protein interaction domain” (PID). “Enzyme Ligase E2” (E2), “Ring box protein 1” (RBX1) “Ubiquitina” (Ub). Imagen en B tomada de Genschik *et al.* (2013).

Únicamente se ha determinado la estructura tridimensional parcial de NPR1 y la estructura completa del SBC de NPR4, lo que ha permitido entender un poco más sobre la participación del SA en la función de estas proteínas (Wang *et al.*, 2020). Una de las principales dificultades en la caracterización de la estructura tridimensional de los NPRs, es la presencia de regiones intrínsecamente desordenadas. De acuerdo con lo reportado en la base de datos de proteínas (PDB), hay una alta probabilidad de que los residuos 1-35 y 379-593, presentes en el extremo amino y carboxilo de NPR1, respectivamente, correspondan a regiones intrínsecamente desordenadas. Por lo que la estructura tridimensional de NPR1 disponible en la base de datos (PDB: 7mk2, Figura 4A) no incluye dichas regiones, lo que restringe la localización de los residuos identificados en el análisis *in silico* a esos segmentos.

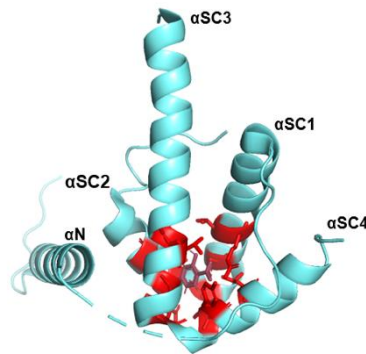
La proteína NPR1 forma un homodímero mediante el dominio BTB debido a la presencia de un motivo dedo de zinc, localizado en dicha región, y que interacciona con las repeticiones de ANK. La estructura del homodímero asemeja a un ave con las alas extendidas (Figura 4), y junto a cambios conformacionales inducidos por el SA, el dímero representa la forma activa que induce la expresión de determinados genes blanco, como

aquellos mediados por la activación del factor de transcripción TGA3, nombrados así por la secuencia que reconocen (TGACG) (Kumar *et al.*, 2022).



**Figura 4. Estructura de NPR1.** A) Representación de la estructura tridimensional de NPR1, la cual forma un homodímero mediante el dominio BTB. La formación de dímeros ha demostrado importancia en el modo de reconocimiento de sustratos. B) Se muestra cada una de las estructuras secundarias identificadas en toda la estructura tridimensional. (Broad-Complex, Tramtrack and Bric a Brac (BTB), Basic Helix Basic turn (BHB), Ankyrin (Ank) Imagen tomada de Kumar *et al.* (2022).

Por otra parte, el SBC de NPR4 está formado por 5  $\alpha$ hélices, 4 de ellas ( $\alpha$ SC1-4), contienen a los residuos que interactúan directamente con el SA y adoptan una conformación en forma de V, mientras que la hélice del extremo amino ( $\alpha$ N), estabiliza la estructura formada por las otras hélices (Figura 5).



**Figura 5. Estructura tridimensional del sitio de unión del SA de NPR4.** El SBC de NPR4 está formado por 5  $\alpha$ -hélices. En presencia de SA, las hélices ( $\alpha$ SC1-4), adoptan una estructura en forma de "V", mientras que la quinta hélice ( $\alpha$ N) estabiliza la estructura. En rojo se muestran a los 14 residuos que interactúan directamente con el SA.



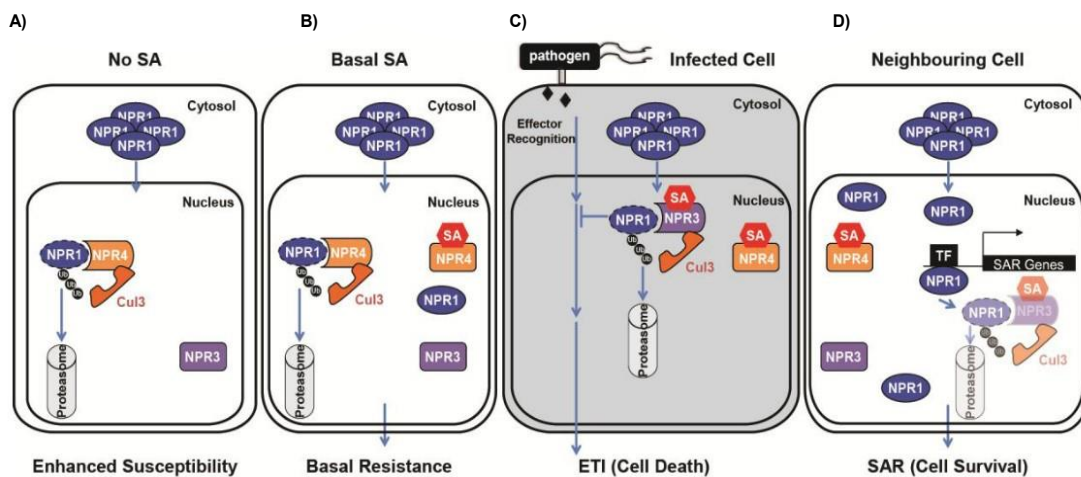
## 1.5. Función de la familia NPR

En *A. thaliana*, la proteína NPR1 es un coactivador transcripcional y es el principal regulador de la expresión de genes de defensa inducida por el SA, además, recientemente se observó que puede funcionar como proteína adaptadora de CRL3, un tipo de E3 ligasa de Culina), como respuesta a un aumento a la concentración de SA de hasta 5 mM (Zavaliev *et al.*, 2020). Por otra parte, las proteínas NPR3 y NPR4 tienen un 73% de identidad entre sí y han sido asociadas a dos posibles funciones: como proteínas adaptadoras de CRL3 y como represores de genes de defensa (Ding *et al.*, 2018; Fu *et al.*, 2012).

## 1.6. Participación de las proteínas NPR en la inmunidad de las plantas

NPR1 es regulado por las modificaciones postraduccionales como fosforilación, sumoilación y ubiquitinación, las cuales son más detectables durante la SAR debido a un aumento de la concentración de SA y que en conjunto permiten que NPR1 orqueste la formación de complejos de transcripción que darán lugar a la expresión de los genes blanco (Saleh *et al.*, 2015; Skelly *et al.*, 2019; Spoel *et al.*, 2009). La actividad de NPR1, NPR3 y NPR4 en la respuesta inmune es regulada por la concentración de SA, cuya síntesis es promovida durante una respuesta de defensa, por lo que en algunos casos la interacción de estas proteínas con otros reguladores transcripcionales también está determinada por la concentración de SA (Boyle *et al.*, 2009; Shearer *et al.*, 2009; Weigel *et al.*, 2001).

En ausencia de un patógeno, la concentración de SA es baja y NPR1 es retenido en el citoplasma en forma de complejos oligoméricos unidos por puentes disulfuro (Figura 6 A, B) (Tada *et al.*, 2008). Una pequeña cantidad de NPR1 no forma complejos oligoméricos, en su lugar se encuentra como monómero en el citoplasma, lo que permite su transporte al núcleo para mantener un nivel de defensa basal. La fracción de NPR1 que es transportada al núcleo es degradada por el proteosoma 26S, esto sirve como un mecanismo para regular la homeostasis de proteínas celulares y para que esto sea posible, depende de la interacción con NPR4 y CRL3 (Fu *et al.*, 2012). Además, el proceso de degradación de NPR1 en el núcleo, adiciona un nivel de regulación de la respuesta inmune debido a que limita la acumulación de NPR1 en dicho compartimento, lo que evita inducir la SAR (Figura 6B).



**Figura 6. Modelos representativos sobre la participación de las NPRs durante una respuesta de defensa basal, ETI y SAR.** **A)** En mutantes deficientes en la biosíntesis de SA, el transporte de NPR1 al núcleo es limitado. Al mantenerse activa la degradación de NPR1, mediada por la interacción con NPR4, se desarrolla un estado más susceptible a la infección por patógenos. **B)** En condiciones basales de SA, NPR1 forma oligómeros en el citoplasma y es transportado al núcleo en pequeñas cantidades para mantener una defensa basal. **C)** Cuando se induce la muerte celular durante la ETI, NPR1 se degrada debido a que es un factor que promueve la supervivencia celular. Debido a un aumento en la concentración de SA, se desplaza la interacción NPR1-NPR4 y se favorece la interacción con NPR3 para mantener una degradación activa de NPR1. **D)** Durante la SAR, existe un mayor nivel de regulación que permite mantener una expresión activa de genes de defensa, asegurando la supervivencia de la célula. Figura tomada de Fu *et al.* (2012).

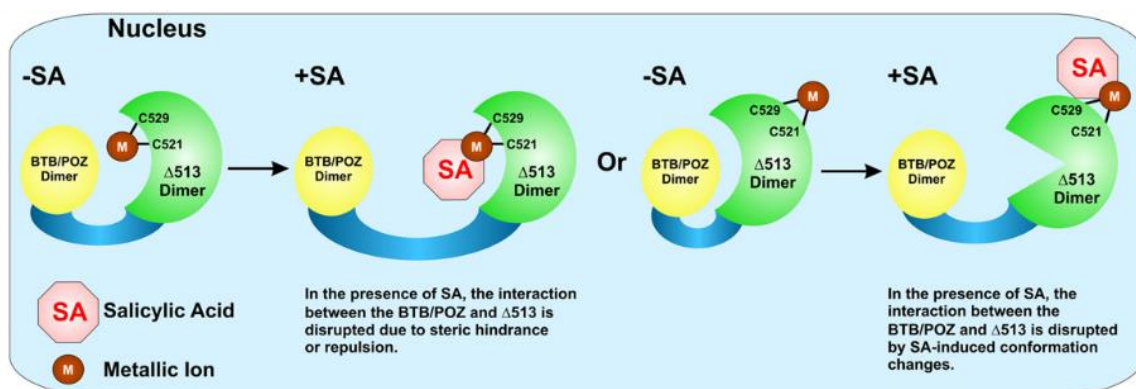
Sin embargo, durante la infección por un patógeno, existe una mayor acumulación de SA y de especies reactivas del oxígeno (ROS), induciendo cambios en el potencial redox intracelular. Estos factores promueven la disociación del complejo oligomérico de NPR1 y permite que NPR1 sea traslocado al núcleo en respuesta a la fosforilación por la SnRK2.8, en el residuo S589 localizado en su NLS (“Nuclear Localization Signal”) (Figura 6C, D) (Lee *et al.*, 2015). En el núcleo, la fosforilación, sumoilación y ubiquitinación de NPR1 promueven la expresión génica. De estas modificaciones, la ubiquitinación inicial de NPR1, correspondiente a la adición de hasta 3 residuos de ubiquitina, ha mostrado contribuir a la expresión de genes de defensa, y la posterior extensión de las cadenas de ubiquitina lo marca para degradación (Skelly *et al.*, 2019). Estos ciclos de síntesis-degradación han mostrado gran relevancia durante la SAR y se ha propuesto como un mecanismo de

regulación para mantener NPR1 “activo” (Skelly *et al.*, 2019; Spoel *et al.*, 2009). A diferencia de lo que ocurre en la inmunidad basal, NPR1 interacciona con NPR3 para ser degradado por el proteosoma (Figura 6D).

## 2. Antecedentes

### 2.1. NPR1, NPR3 y NPR4 como receptores del SA

Wu y colaboradores (2012), demostraron que NPR1 es un receptor del SA, en el que la afinidad de unión es característica a interacciones hormona-receptor, únicamente para el SA y no con otros análogos estructurales como lo son el ácido 2,6-dicloro-isonicotínico (INA) y el ácido 4-hidroxibenzoico (4HBA). Además, sugirieron un mecanismo en el que el SA induce cambios conformacionales en NPR1, el cual contribuye a la completa desestabilización de los oligómeros citoplasmáticos de NPR1. Este mecanismo sugiere que, en ausencia de SA, el dominio BTB/POZ y el dominio de transactivación (TAD, localizado en el CTD) interactúan, lo que limita la unión de otros reguladores transcripcionales y, por lo tanto, funciona como un mecanismo de autoinhibición. Cuando el SA se une, lo hace en los residuos de cisteína 521/529 mediante el ion cobre, el cual es utilizado como cofactor. La unión del SA interrumpe la interacción entre los dominios BTB/POZ y TAD, promoviendo la actividad de NPR1 (Figura 7).



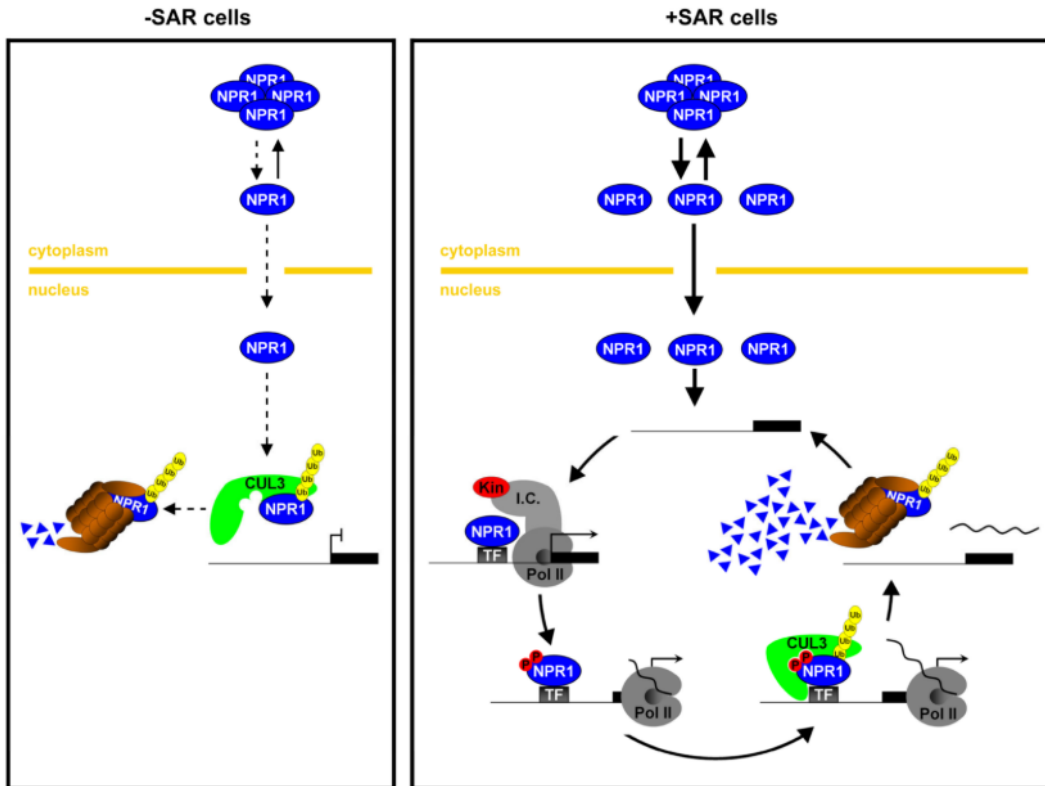
**Figura 7. Modelo que sugiere la autoinhibición de NPR1.** En ausencia de SA, los dominios BTB y CTD de NPR1 interactúan. En presencia de SA, la hormona se une a los residuos C521 y C529 mediante el ión cobre. Esta unión libera la autoinhibición de NPR1. Figura tomada de Wu *et al.* (2012).

Fu y colaboradores (2012), evaluaron la participación de NPR3 y NPR4 en el proceso de degradación de NPR1. Los autores identificaron a ambas proteínas como adaptadoras de CRL3, esto debido a que observaron una mayor estabilidad de NPR1 en plantas con mutaciones simples *npr3* y *npr4*, así como en la doble mutante *npr3/npr4* de *A. thaliana*. Además, mostraron que NPR3 y NPR4 son receptores del SA, y a pesar de que ambas proteínas cumplen la misma función, el grado de afinidad que tienen por el SA es diferente, siendo NPR3 el de menor y NPR4 el de mayor afinidad. Al utilizar el sistema heterólogo doble híbrido en levadura (Y2H), observaron que el SA interrumpe la interacción NPR1-NPR4 y favorece la interacción NPR1-NPR3 (Figura 6B, C), sugiriendo que la participación de NPR3 y NPR4 en la degradación de NPR1, depende de cambios en la concentración de SA.

## **2.2. Modificaciones postraduccionales que influyen en la estabilidad de NPR1**

Interesados en entender la estabilidad de NPR1, Spoel y colaboradores (2009), observaron que la sustitución de S11/15A, así como la pérdida de función de CRL3, aumentan la estabilidad de NPR1 de manera similar a plantas de tipo silvestre. Sin embargo, disminuye la expresión génica inducida por SA y dependiente de NPR1 (Figura 8), por lo que las plantas con estas mutaciones son más susceptibles a la infección a *pseudomonas syringae* pt. DC3000 (*P.s.t* DC3000/*avrRpt2*).

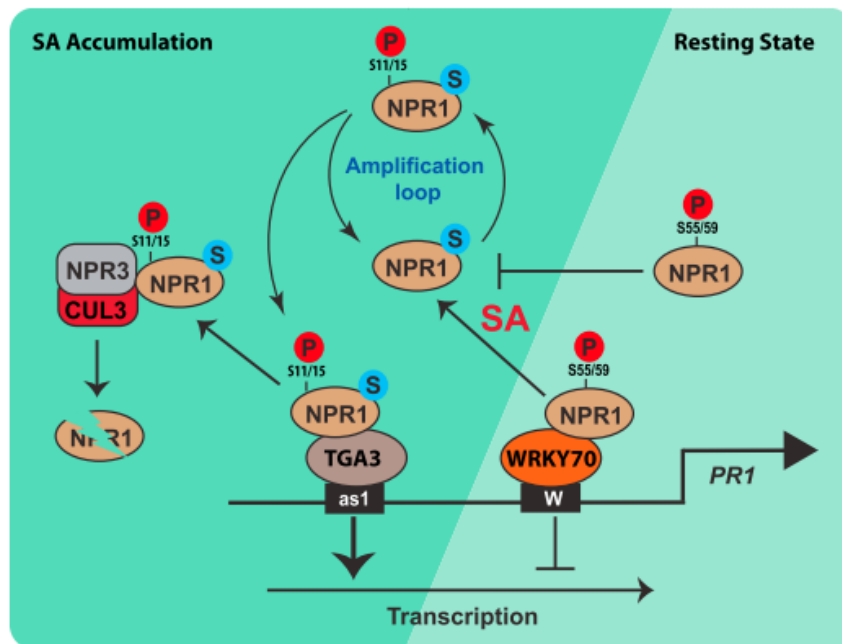
Para determinar la relevancia de esta modificación, sustituyeron S11/15D de NPR1 y observaron un aumento en la afinidad de NPR1 por CRL3, así como una menor susceptibilidad a la infección en las líneas mutantes S11/15D de *A. thaliana*. Además, se ha observado que la estabilidad de NPR1 influye de manera diferente en la expresión de sus genes blanco; en algunos genes *WRKY* se observa una mayor dependencia por la degradación de NPR1 a diferencia de lo observado para el gen *PR-1*.



**Figura 8. Mecanismo propuesto de regulación de NPR1 durante la SAR.** En condiciones basales cuando la SAR no es activada, NPR1 se acumula principalmente en el citoplasma y una pequeña fracción de la proteína es transportada al núcleo para una defensa basal, para evitar la activación de SAR se regula por degradación la cantidad de NPR1 en el núcleo. Durante la SAR, hay una mayor presencia de NPR1 en el núcleo donde participa en la formación del complejo iniciador (I.C) y es fosforilado por una cinasa (kin) presente en dicho complejo. Después de diferentes ciclos de transcripción, NPR1 es marcado para degradación. Figura tomada de Spoel *et al.* (2009).

A diferencia de lo observado por Spoel (2009), Saleh y colaboradores (2015), observaron que mutaciones en el motivo de interacción de SUMO (SIM3) aumentan la estabilidad de NPR1, tanto en células de levadura como en *A. thaliana*. Este cambio afecta la asociación de NPR1 a cuerpos nucleares y a nivel estructural no parece inducir un cambio significativo, debido a que aún es capaz de interactuar con otros factores de transcripción al igual que NPR1 de tipo silvestre. Además, muestran que plantas mutantes *SIM3* son más susceptibles a la infección a *Psm* ES4326. Los autores sugieren que la sumoilación es una modificación que favorece la interacción con otras proteínas, incluyendo con NPR3 (Figura 9).

Usando el sistema 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).



**Figura 9. Modelo que sugiere las etapas en las modificaciones postraduccionales de NPR1.** En un estado basal, NPR1 se encuentra predominantemente fosforilado en S55/59, esto evita que la sumoilación y fosforilación (S11/15) de NPR1 ocurra, lo cual favorece la interacción de NPR1 con reguladores negativos de la transcripción (WRKY70). Al acumularse SA, NPR1 es sumoilado y fosforilado (S11/15), esto permite la asociación de NPR1 con reguladores positivos de la transcripción (TGA3). Una vez que participa en la transcripción, NPR1 es marcado para degradación. Figura tomada de Saleh *et al.* (2015).

### 2.3. Análisis estructural en la percepción del SA por las proteínas NPR

Wang y colaboradores (2020), identificaron la estructura del SBC de NPR4. Una vez identificada la estructura, basado en análisis estructurales encontraron a los 14 residuos que interaccionan directamente con el SA. Los residuos identificados fueron R419, V420,

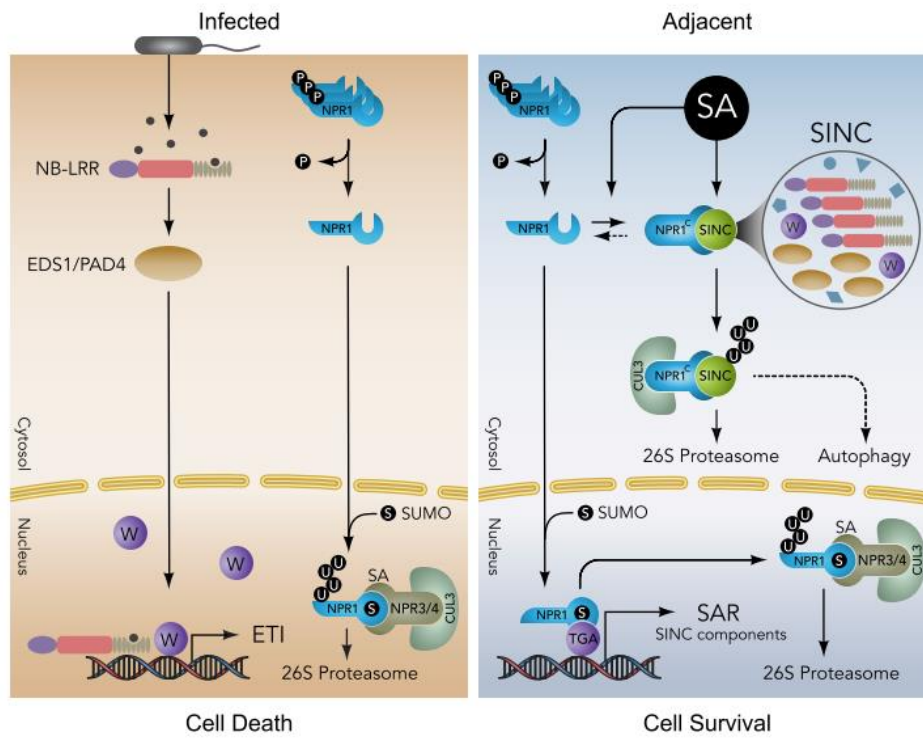
A423, F427, E430, A431, A434, T488, V489, G492, F496, C499, Y500 y L503. Debido a que únicamente observaron cambios conformacionales en el SBC en presencia de SA, los autores sugieren que el SBC adopta una conformación abierta que es accesible al SA y su unión induce una conformación cerrada.

Al sustituir tres de los residuos que interactúan directamente con el SA, correspondiente a los mutantes *R419Q*, *T488V* y *V489A* de NPR4, éstos interactúan con NPR1 en ausencia de SA (Wang *et al.*, 2020). Únicamente en los mutantes *R419Q* y *V489A* de NPR4 la unión del SA es comprometida, y se observa que la interacción con NPR1 no cambia, sin embargo, cuando la unión del SA se mantiene en el mutante *T488V*, la interacción NPR1-NPR4 disminuye. Debido a esto, los autores sugieren que un cambio conformacional en el SBC interrumpe la interacción NPR1-NPR4. Además, pudieron generar un mutante de NPR4 (*F426L/T459G*) hipersensible a SA que promovió la inmunidad basal sin comprometer la ETI, debido a que esta mutante nuevamente se puede asociar a NPR1 como respuesta a un aumento en la concentración de SA.

#### **2.4. Condensados de NPR1 que promueven la supervivencia celular**

Recientemente, Zavaliev y colaboradores (2020), estudiaron el papel de NPR1 durante la ETI como un factor regulador de la supervivencia y muerte celular. Los autores observaron la formación de condensados de NPR1 inducidos por SA (SINCs) en el citoplasma. Los cuales están compuestos de una gran variedad de proteínas de respuesta a estrés incluyendo a NPR3. La acumulación de estas proteínas se asocia como una señal de muerte celular, por lo que los SINCs retienen a las proteínas de respuesta a estrés y junto a CUL3, median la ubiquitinación y posterior degradación de las proteínas retenidas en los condensados. A diferencia de lo mostrado en otros trabajos, los autores observan que NPR1 puede reclutar a los demás componentes en dichos condensados cuando la concentración de SA es mayor (5 mM) que durante la SAR. Para mediar la ubiquitinación y degradación de estas proteínas, NPR1 funciona como adaptadora de CUL3 (Figura 10). Los autores sugieren que la sumoilación y fosforilación de S55/59 de NPR1 determinan la interacción con CUL3; en ausencia de éstas, la interacción directa NPR1-CUL3 ocurre en el citoplasma, mientras que en el núcleo favorecen la interacción de CUL3 con NPR2-NPR4. Así mismo, los autores sugieren que el dominio BTB de NPR1 interactúa con CUL3 debido a que observan que este dominio es suficiente para co-inmunoprecipitar a CUL3. La

interacción del dominio BTB de NPR1 con CUL3 fue detectada en *A. thaliana*, *N. benthamiana* y *E. coli*, y fue favorecida por el tratamiento con 1 mM de SA.



**Figura 10. Condensados de NPR1 inducidos por SA.** En tejido adyacente al sitio donde ocurre muerte celular debido a una infección, se forman SINC como una forma de controlar la muerte celular y evitar un mayor daño a la hoja. Figura tomada de Zavaliev *et al.* (2020).



### **3. Justificación**

A pesar de que NPR1 es un regulador positivo durante la respuesta de defensa, interferir en su degradación compromete la respuesta inmune, especialmente la SAR. Esta interferencia se observa principalmente cuando se modifica la interacción de NPR1 con los parálogos NPR3 y NPR4. La interacción de los NPRs con otros reguladores de las respuestas de defensa ha sido ampliamente descrita, principalmente analizada en sistemas heterólogos, tales como Y2H. Sin embargo, los dominios que participan en la interacción entre las proteínas NPR1 y NPR3 no han sido completamente caracterizados. Además, el mecanismo molecular por el cual el SA modifica estas interacciones es poco conocido, por lo que analizar los diferentes dominios de NPR3 que participan en la interacción con NPR1, así como el efecto que tienen en los mecanismos de defensa, nos permitirá entender mejor el rol que juegan las interacciones NPR1-NPR3 en la respuesta inmune.

### **4. Hipótesis:**

La proteína NPR1 se regula por la interacción con NPR3 mediante los dominios BTB/POZ y repeticiones de anquirina, sin comprometer la SAR, en *A. thaliana*.

### **5. Objetivo general:**

Identificar y caracterizar funcionalmente a los diferentes segmentos correspondientes a los dominios involucrados en la interacción NPR1-NPR3 en plantas de *Arabidopsis thaliana* durante la infección con *Pseudomonas syringae*.

### **6. Objetivos particulares:**

1. Caracterización *in silico* de la interacción entre segmentos correspondientes a los diferentes dominios de NPR1 y NPR3.
2. Analizar la interacción proteína-proteína entre los segmentos correspondientes a los diferentes dominios de NPR3 con NPR1.

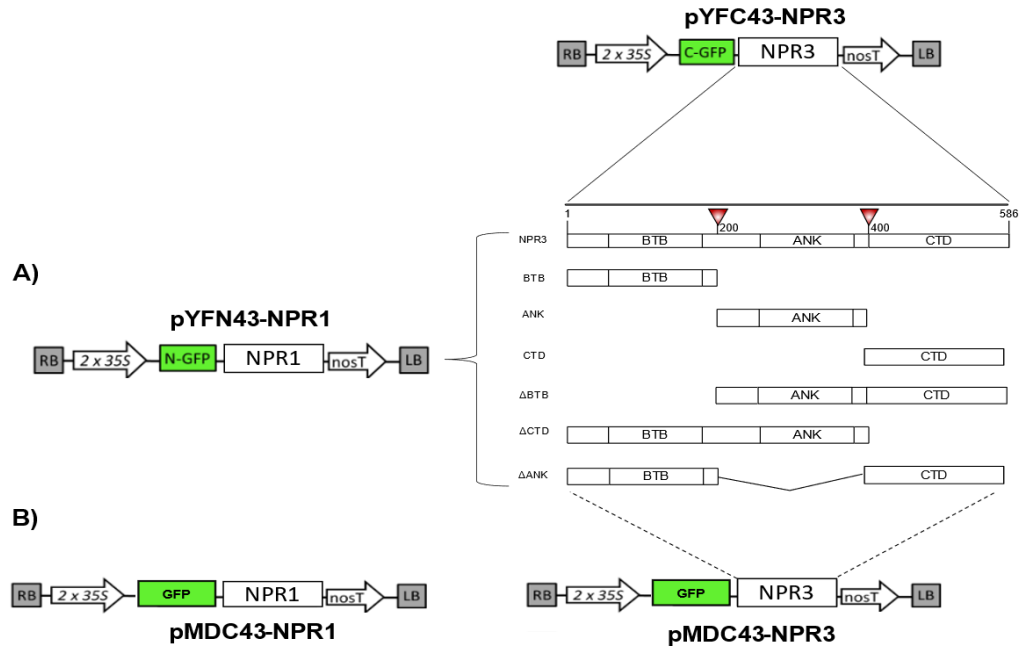
3. Examinar la localización subcelular de los segmentos correspondientes a los diferentes dominios de NPR3 en células de *Nicotiana benthamiana*.
4. Caracterizar la participación de los diferentes dominios de NPR3 en la respuesta inmune del mutante *npr3-2* de *Arabidopsis thaliana* con *pseudomonas syringae*.

## 7. Metodología

Para poder entender el efecto funcional que tienen los diferentes dominios de NPR3 en la interacción con NPR1, se utilizaron diferentes versiones previamente generadas (Tesis de Licenciatura, Flores Cuevas, E. J., 2021), estas versiones fueron generadas para su análisis mediante la Complementación Bimolecular de la Fluorescencia (BiFC), para determinar la localización subcelular y para la sobreexpresión de las versiones *in planta*. De forma individual, estas versiones contienen los fragmentos que codifican para los residuos de aminoácidos 1-200, 201-400 y 401-586 de NPR3, los cuales contienen al dominio BTB, a las repeticiones de anquirina y al carboxilo terminal, respectivamente. Por simplicidad estos segmentos fueron nombrados BTB, ANK y CTD, respectivamente (Figura 11). Así mismo, se generaron deleciones de uno de los segmentos que contuviera a alguno de los dominios mencionados, nombrados  $\Delta$ BTB,  $\Delta$ ANK y  $\Delta$ CTD. Todas las versiones mencionadas se encuentran en los vectores pYFC43 y pMDC43, que son específicos para el análisis mediante BiFC y para la sobreexpresión en plantas de *A. thaliana*, respectivamente. Además, las secuencias completas de NPR1 y NPR3 se encuentran en el vector pYFN43 y pMDC43 (Figura 11).

De acuerdo con el tipo de vector utilizado, las versiones son mencionadas con los nombres del promotor, seguido por el correspondiente a la secuencia de la proteína fluorescente (YFN, YFC o PMDC43) y por el nombre de la secuencia de interés, además, se mencionan de acuerdo con la posición que ocupan en la construcción. Las fusiones génicas son separadas por dos puntos dobles (::). Los segmentos que contienen a los diferentes

dominios de NPR3, así como las secuencias completas de las proteínas NPR1 y NPR3 fueron utilizados para un análisis *in silico*.



**Figura 11. Representación de las versiones de NPR1 y NPR3. A)** En la figura se muestra cada una de las versiones utilizadas en este trabajo para el análisis de BiFC. En el lado derecho de la figura se muestran las versiones generadas de NPR3 que fueron clonadas en el vector pYFC43, estas versiones se confrontaron con la secuencia completa de NPR1 (pYFN43-NPR1) en una proporción 1:1. **B)** Los mismos segmentos mostrados en A y la secuencia completa de NPR1 se clonaron en el vector pMDC43, que permite la fusión con el reportero GFP. El triángulo rojo indica las posiciones correspondientes a los residuos de aminoácidos 200 y 400, las líneas sólidas y punteadas indican la posición de los segmentos de NPR3 en el vector pYFC43 y pMDC43, respectivamente. Extremo amino de YFP (N-YFP), extremo carboxilo de YFP (C-YFP), promotor (2x35S), terminador de la transcripción (nosT), extremo izquierdo (LB) y extremo derecho (RB).

## 7.1. Predicción de las interacciones NPR1 con las versiones truncas de NPR3

Para determinar los posibles sitios de interacción entre NPR1 y NPR3, primero se obtuvo la estructura tridimensional ya caracterizada de la proteína NPR1 (PDB: 7mk2), así como la estructura predicha por AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2022) para la

proteína NPR3 (AF-Q8L746-F1). Para aislar los segmentos que contienen a los dominios de interacción de NPR3, las secuencias de aminoácidos de cada segmento fueron cargadas en el servidor de modelado por homología SWISSMODEL (Bienert *et al.*, 2017; Guex *et al.*, 2009; Waterhouse *et al.*, 2018), utilizando el alineamiento blanco-modelo, tomando como modelo a la estructura predicha por AlphaFold. De esta forma se aislaron los segmentos de NPR3 manteniendo la estructura tridimensional predicha. Una vez obtenida todas las estructuras, se continuó con el acoplamiento molecular (docking) utilizando el servidor ClusPro (Kozakov *et al.*, 2017; Vajda *et al.*, 2017), evaluando la interacción de cada segmento de NPR3; así como de la secuencia completa de la misma proteína, con la secuencia completa de NPR1. Una vez obtenidos los modelos predichos para cada interacción, se seleccionaron los de menor energía para así poder identificar las regiones de interacción.

Cada modelo fue analizado mediante el programa Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC). Primero se identificaron a los residuos que se encuentran a una distancia menor o igual a 5 Å respecto al ligando (NPR3) y respecto al receptor (NPR1), mediante el comando “show sticks, byres all near\_to 5 of ligand” y “show sticks, byres all near\_to 5 of receptor”, respectivamente. Esta distancia fue elegida debido a que con la técnica BiFC se pueden detectar interacciones menores a 10 Å, y la previa detección empleando este mismo valor mostraba un mayor número de residuos que no participan en interacciones ligando-receptor. Posteriormente se identificaron los residuos que forman interacciones mediante la selección “find polar interactions”. Una vez identificados, cada residuo fue seleccionado de forma manual. Así mismo, se identificó la posición de esos residuos dentro de los segmentos que contienen a los dominios de interacción.

Cada uno de los complejos obtenidos fue utilizado para determinar los valores predichos de energía libre de Gibbs y la constante de disociación (Kd), empleando el servidor de predicción de energía de unión de proteínas (Prodigy)(Kurkcuoglu *et al.*, 2018; Vangone *et al.*, 2019). Estas dos variables fueron utilizadas para un análisis de conglomerados; técnica estadística que permite formar grupos a partir de un conjunto de datos multivariantes. Para realizar el análisis de conglomerados se cargaron los datos obtenidos de Prodigy (datos crudos) en el software STATISTICA 8 (Hill *et al.*, 2006) y se realizó considerando el tipo de unión “unweighted pair-group average”, así mismo, se consideró las distancias euclidianas

como algoritmo de medición. Para determinar cuál variable influye más en la formación de los dendrogramas, se hizo el análisis de agrupamiento de k medias.

## **7.2. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

Se utilizó el método de infiltración de *Agrobacterium* para la expresión transitoria de cada una de las versiones de NPR3 en hojas de *Nicotiana benthamiana* de 4 semanas de edad. Además, se utilizó el método de “floral dip” para la expresión estable de las versiones en plantas mutantes *npr3-2* y de tipo silvestre Col-0 de *A. thaliana*. Este mutante tiene una expresión disminuida debido a la inserción de aproximadamente 300 pares de bases en el segundo exón del gen de NPR3 (Alonso *et al.*, 2003), y nombrada así por (Zhang *et al.*, 2006). Se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, la cual contenía a las versiones generadas. Las células de *A. tumefaciens* se cultivaron hasta alcanzar una OD600 de 2.0, se recolectaron mediante centrifugación y resuspendieron en una solución de infiltración (10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MES pH 5.6 y 200 μM de acetosiringona) y se prepararon para la infiltración. Las cepas fueron incubadas a temperatura ambiente por 3 horas.

Para el análisis BiFC, la expresión transitoria consistió en la preparación de una mezcla 1:1 de células de *Agrobacterium* que contiene a las versiones pYFN43 y pYFC43, además, se incluye en la misma proporción a la cepa que codifica para la proteína p19; un inhibidor del silenciamiento postranscripcional obtenida de tombusvirus. Para las versiones clonadas en el vector pMDC43 se mantuvo una proporción 1:1 con la construcción que codifica a p19. Se realizó la infiltración con una jeringa sin aguja en el lado abaxial de hojas de *N. benthamiana*, ejerciendo una ligera presión sobre la hoja evitando dañarla. Posterior a la infiltración, las plantas se recuperaron en oscuridad por una noche, transcurrido el tiempo se mantuvieron en la cámara de cultivo. Tres días después de la infiltración, dos hojas transformadas de tres plantas fueron analizadas en un microscopio confocal. Para evaluar el efecto del SA en la interacción, las hojas fueron asperjadas con un tratamiento de 1 mM de SA de manera uniforme 6 horas previas a la visualización en el microscopio confocal. Los experimentos se repitieron al menos tres veces para cada combinación.

Para la expresión estable se repitió el protocolo mencionado, únicamente se añadió 0.05% v/v de silwet L-77 a las cepas que fueron incubadas a temperatura ambiente por 3 horas. Las inflorescencias en desarrollo de plantas de *A. thaliana npr3-2* se sumergieron durante 5 segundos en los cultivos preparados.

### **7.3. Microscopía confocal de fluorescencia**

Para la preparación de las muestras, se tomó una circunferencia (discos) de aproximadamente 1 cm de diámetro de las hojas transformadas, específicamente considerando regiones localizadas entre dos zonas de infiltración. Posteriormente, las zonas seleccionadas fueron montadas en el portaobjetos con un volumen de 30 µl de agua estéril y fueron selladas con parafilm para evitar la pérdida de agua.

La reconstitución de la fluorescencia se observó utilizando un Microscopio Confocal invertido de Barrido Láser (CLSM) Olympus FV100 utilizando el objetivo 60x/1.3 con una un pinhole de 1 unidad de Airy, una velocidad de escaneo de 4, potencia de láser de 2%, HV de 554, offset de 20. 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 y procesamiento de las imágenes se realizó con el programa Fiji. Se modificó el brillo y contraste de cada imagen, para hacerlo de una forma similar, todas las imágenes obtenidas fueron separadas por canal y se realizó un “stack” por cada uno de éstos. Se ajustó el brillo y contraste modificando los valores del histograma sin modificar los valores absolutos, posteriormente se agregaron las escalas y se separaron las imágenes.

### **7.4. Selección de líneas transgénicas**

Las semillas de *A. thaliana* se sembraron en cajas de Petri con medio Murashige and Skoog (MS) al 0.2X de concentración, suplementado con 50 µg/ml de Higromicina o con 5 µg/ml

de glufosinato de amonio (BASTA), para las plantas complementadas con las versiones en el vector pMDC43 o pUBQ1, respectivamente. Las semillas se estratificaron durante 2 días. Posteriormente fueron sometidas a un régimen de 4 a 6 h luz, 48 h oscuridad y 24 h luz para su selección. De manera general, la identificación de las plantas no complementadas y que no disponen de la resistencia al antibiótico presentan un desarrollo incompleto en el que las plantas se mantienen en un estado de dos cotiledones, mientras que las plantas complementadas desarrollan hojas verdaderas. Además, al observar las zonas del hipocótilo y la raíz, las plantas transformadas muestran visiblemente elongación de dichas regiones en comparación con las plantas no complementadas. Por lo que la identificación de las plantas complementadas con las versiones de NPR3 se hizo de forma visual, considerando los criterios mencionados. Las imágenes fueron tomadas con la cámara canon DSLR EOS Rebel T8i.

## **7.5. Construcción de los vectores de expresión en el sistema doble híbrido en levadura**

Todas las versiones de NPR1 y NPR3 que fueron clonadas en el vector de entrada PCR8/GW/TOPO, fueron utilizadas para la amplificación de las secuencias completas de NPR1 y NPR3, así mismo, se amplificaron todas las versiones de los dominios y deleciones de éstos. Posteriormente, los vectores del sistema Y2H y todos los amplicones fueron digeridos con la enzima Sfil durante 16-18 hr, esto con la finalidad de asegurar la digestión de los extremos para formar extremos cohesivos. Una vez transcurrido el tiempo, la digestión fue inactivada incubando las muestras a 70°C por 5 minutos, y se prepararon las muestras para su ligación con la enzima T4 (Thermo Scientific), en una incubación a 22°C por 2 horas.

## **7.6. Infección con *P. syringae***

La cepa de *pseudomonas syringae* se sembró en cajas Petri con medio LB sólido adicionando 50 µg/ml de rifampicina e incubó por 48 horas a 28°C. Se inoculó en medio LB líquido con rifampicina a 28°C hasta alcanzar una OD<sub>600</sub>=0.2. Los cultivos preparados fueron infiltrados en el lado abaxial de las hojas de plantas complementadas genéticamente en el mutante *npr3-2* de *A. thaliana* de 4 semanas de edad. Tres días después de la infección, se cortaron 3 hojas para evaluar el crecimiento del patógeno mediante cambios en la clorosis de las hojas.

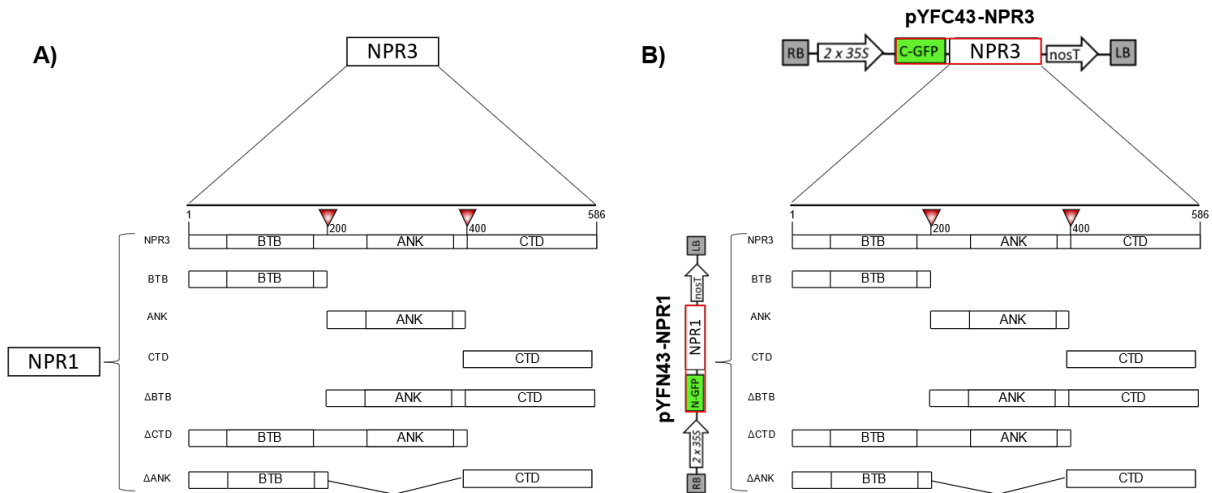
## **8. Resultados**

### **8.1. Predicción *in silico* de las interacciones de NPR1 con las versiones de NPR3**

Como un primer acercamiento para poder identificar los segmentos potenciales de interacción entre las proteínas NPR1 y NPR3, se hizo un análisis *in silico* de acoplamiento molecular. En este análisis se evaluó, de forma individual, la interacción de la estructura tridimensional de NPR1 (PDB: 7mk2), con la estructura correspondiente a cada uno de los segmentos de NPR3 predicha por AlphaFold. En estos segmentos se encuentran las secuencias que codifican a los residuos 1-200, 201-400 y 401-586 de la proteína NPR3. De forma individual, los segmentos contienen al dominio BTB, repeticiones de anquirina y el carboxilo terminal y fueron nombrados BTB, ANK y CTD, respectivamente. Así mismo, se diseñaron delecciones de un solo segmento mencionado, nombrados como ΔBTB, ΔANK y ΔCTD (Figura 12A). Cada interacción fue nombrada por la versión de las proteínas

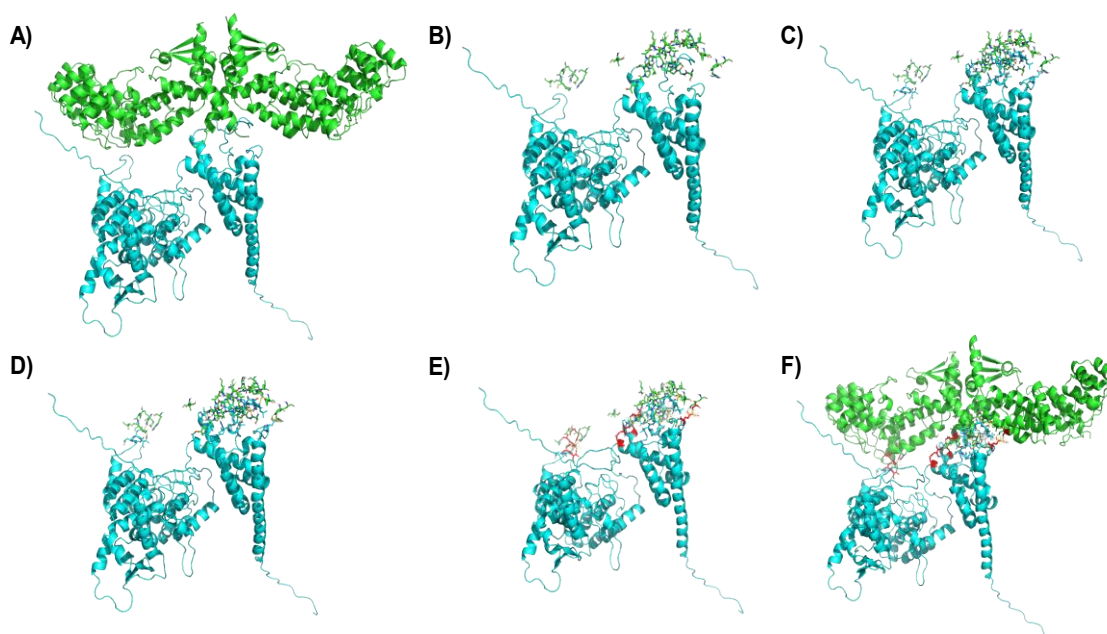


evaluadas separadas por un guion, es decir, para la interacción de la secuencia completa entre NPR1 y NPR3 el modelo obtenido se nombró NPR1-NPR3 y así respectivamente.



**Figura 12. Representación gráfica de las versiones utilizadas para el análisis *in silico*.** A) En la figura se muestra cada una de las versiones generadas a partir de la secuencia completa de NPR3. La secuencia de aminoácidos correspondiente a cada construcción fue utilizada para un análisis de acoplamiento molecular confrontada con la secuencia completa de la proteína NPR1. B) Para determinar la influencia de los extremos amino y carboxilo de YFP, se fusionó el linker y el extremo carboxilo de YFP a las versiones de NPR3, mientras que el linker y el extremo amino de YFP se fusionó a la secuencia completa de NPR1. Posterior a la generación de las construcciones, se hizo la predicción de la estructura en el servidor I-TASSER. Los bordes rojos delimitan las zonas utilizadas en la predicción de las estructuras.

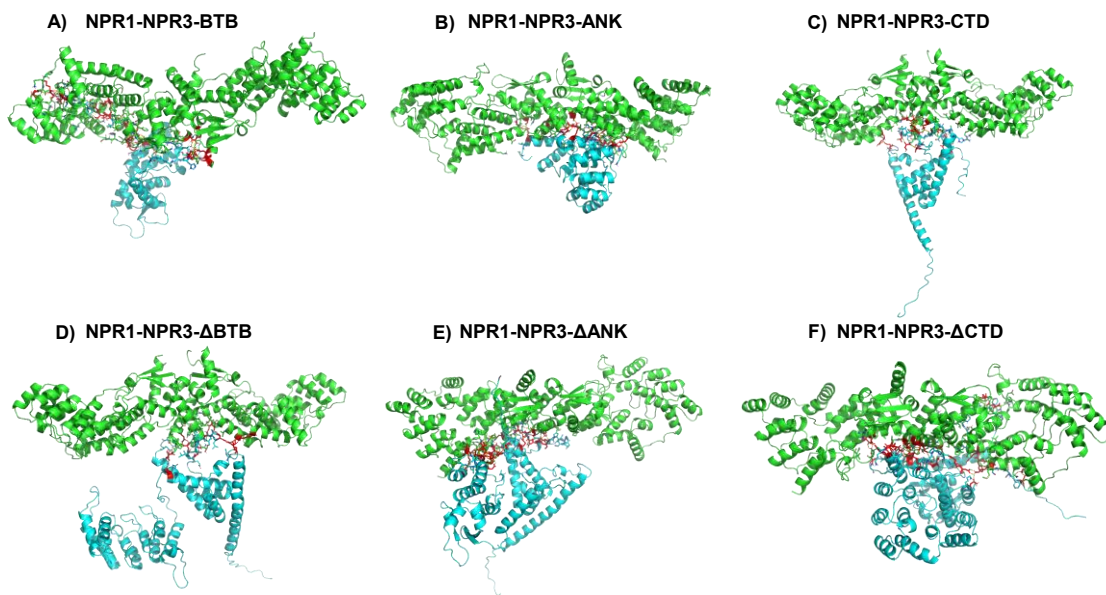
Cada uno de los modelos obtenidos del acoplamiento molecular fueron visualizados con Pymol. En la Figura 13 se muestra como ejemplo cada uno de los pasos realizados en Pymol para el modelo obtenido de las secuencias completas de NPR1 y NPR3. Primero se buscaron los residuos más cercanos entre las proteínas, con una distancia óptima de detección de 5 Å; un rango menor al límite de detección de BiFC. Para facilitar la visualización únicamente se mostraron los residuos detectados a esta distancia y fueron representados como barras y esferas (Figura 13B y 13C). Posteriormente se buscaron los residuos que interaccionan entre NPR1 y NPR3 (Figura 13D), así mismo, se midió la distancia a la cual se encuentran dichos residuos (Figura 13E).



**Figura 13. Identificación de los residuos potenciales que participan en la interacción NPR1-NPR3. A)** modelo predicho del acoplamiento molecular de la interacción NPR1-NPR3, en verde y azul, respectivamente. **B)** Identificación de los residuos a una distancia menor a 5 Å de NPR3 (azul) y de C) NPR1 (verde). **D)** Identificación de los residuos que forman interacciones entre NPR1-NPR3, en el que la interacción se muestra con líneas punteadas. **E)** Medición de las distancias entre los

aminoácidos que participan en la interacción NPR1-NPR3. **F)** Marcaje de los aminoácidos seleccionados en **E)**.

Por último, cada par de residuos potenciales de interacción fueron marcados con color rojo y se determinó la posición de cada residuo en la secuencia completa de NPR1 y NPR3 (Figura 13F). Este mismo procedimiento se repitió para los modelos obtenidos de la interacción de NPR1 con las versiones NPR3-BTB, NPR3-ANK, NPR3-CTD, NPR3- $\Delta$ BTB, NPR3- $\Delta$ ANK y NPR3- $\Delta$ CTD (Figura 14).



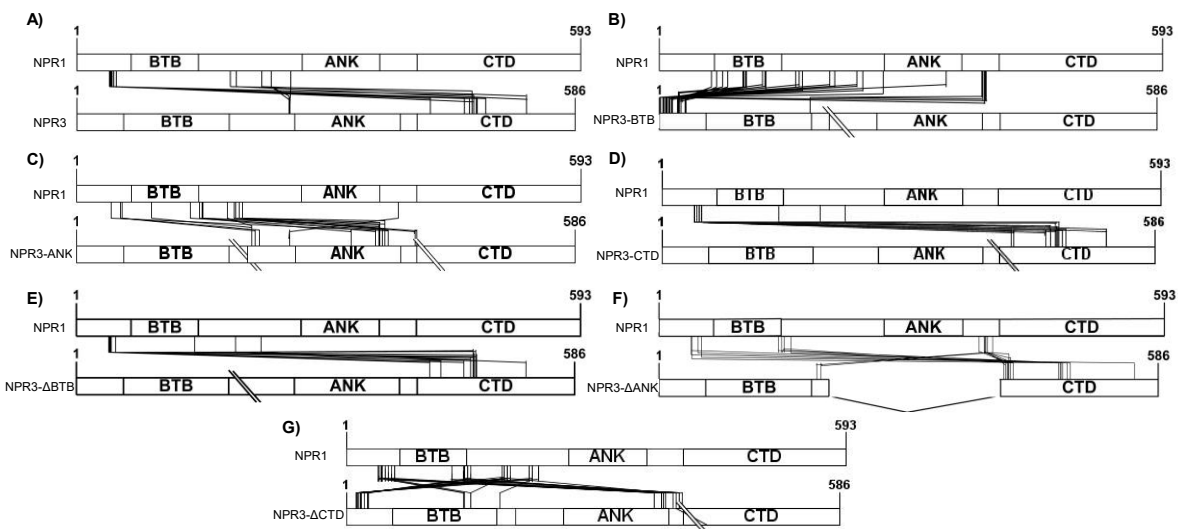
**Figura 14. Modelos predichos de la interacción NPR1 con los segmentos que contienen a los dominios de NPR3.** Representación general de los modelos del acoplamiento molecular de NPR1 con las versiones de NPR3. En cada modelo se marcan con rojo los residuos potenciales que participan en la interacción NPR1 y NPR3, marcados de color verde y azul, respectivamente. **A)** NPR1-NPR3-BTB. **B)** NPR1-NPR3-ANK. **C)** NPR1-NPR3-CTD. **D)** NPR1-NPR3- $\Delta$ BTB **E)** NPR1-NPR3- $\Delta$ ANK y **F)** NPR1-NPR3- $\Delta$ CTD. Modelos obtenidos con el servidor Cluspro (Bienert *et al.*, 2017; Guex *et al.*, 2009; Waterhouse *et al.*, 2018) y visualizados con PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC) .

Una vez determinada la posición de todos los residuos, se asignó un código de colores en el que cada segmento que contiene a los dominios de NPR1 y NPR3 fue marcado con un

color diferente (Tabla 1). De esta manera es más fácil visualizar en qué segmentos de las proteínas se localizan los residuos potenciales de interacción. Además, se generaron modelos que indican la posición de cada residuo identificado de la tabla 1 (Figura 15), por simplicidad solo se representa una secuencia de NPR1, a pesar de que en el análisis *in silico* la proteína NPR1 es representada cómo un dímero (Figura 14).

Es de esperarse que todos los residuos identificados para los modelos obtenidos de las versiones de NPR3, que representan versiones truncas de la proteína, únicamente localicen en las regiones correspondientes, debido a que se está delimitando la zona de interacción. Debido a esto, el análisis es empleado para determinar qué segmentos contienen un mayor número de residuos potenciales de interacción con NPR1 y que pudieran ser segmentos más probables de participar en la interacción con NPR3. Así mismo, se tomó en consideración lo que ocurre en el complejo NPR1-NPR3 el cual corresponde al control (Figura 15A).

En el caso del modelo NPR1-NPR3, el residuo T39 corresponde al primer residuo de NPR1, respecto a la posición de los 593 residuos que conforman la proteína, que interacciona con NPR3; por lo que se localiza en el segmento que contiene al dominio BTB de un monómero de NPR1 (Figura 15A), mientras que el residuo R252 corresponde al último residuo de NPR1 que participa en la interacción y se localiza en el segmento que contiene al dominio de repeticiones de anquirina del segundo monómero (Tabla 1, Figura 15A). Para NPR3, el primer residuo que interacciona con NPR1 es E250 y se localiza en el segmento que contiene al dominio de repeticiones de anquirina, mientras que E416 es el último residuo que interacciona con NPR1 y se localiza en los últimos residuos del segmento que contienen al dominio carboxilo (Tabla 1).



**Figura 15. Representación gráfica de la posición de los residuos que pudieran participar en la interacción con NPR1.** Los residuos identificados del acoplamiento molecular entre NPR1 y las versiones de NPR3 fueron indicados en la posición correspondiente de cada proteína. En A) se muestra al modelo NPR1-NPR3 correspondiente al control, en B) se muestra al modelo NPR1-NPR3-BTB, C) modelo NPR1-NPR3-ANK, D) modelo NPR1-NPR3-CTD, E) NPR1-NPR3-ΔBTB, F) NPR1-NPR3-ΔANK, G) NPR1-NPR3-ΔCTD.

NPR1-NPR3		NPR1-NPR3-ANK		NPR1-NPR3-CTD		NPR1-NPR3-ΔBTB	
Residuo NPR1	Residuo NPR3	Residuo NPR1	Residuo NPR3-ANK	Residuo NPR1	Residuo NPR3-CTD	Residuo NPR1	Residuo NPR3-
THR39	GLU 416	ASP42	ARG 367	THR39	GLN 419	THR39	GLU 416
THR39	SER 470	SER52	GLN 211	THR39	GLU 416	THR39	SER 470
GLY40	SER 470	GLU54	ARG 215	THR39	THR 456	GLY40	SER 470
PRO41	THR 456	SER89	GLN 207	THR39	ASN 468	PRO41	THR 456
ASP42	GLY 467	TYR134	ARG 367	ASP42	GLN 481	ASP42	ASN 468
ASP42	GLN 481	LYS145	SER 323	SER44	GLU 476	GLN47	GLN 471
SER44	GLN 481	SER148	SER 356	SER44	SER 462	VAL140	ASN 468
SER44	SER 462	GLU149	SER 356	GLN47	SER 470	VAL140	GLY 467
GLN47	GLN 471	LYS178	GLN 207	GLN47	VAL 472	ARG188	GLU 429
GLU181	LEU 465	TYR186	ASP 357	ARG139	LEU 469	ARG188	GLY 464
ARG188	GLU 529	ARG188	ASN 363	ARG188	GLU 529	LYS218	GLU 529
LYS218	GLU 529	ASP192	SER 352	LYS218	GLU 529		
LYS229	THR 251	ASP192	SER 360				
LYS229	GLU 250	ASP192	ASN 363				
ARG252	GLU 250	LYS196	ILE 398				
		LYS196	LYS 400				
		ASN379	THR 251				

**Tabla 1. Residuos predichos para participar en la interacción entre NPR1 con los diferentes dominios de NPR3.** En la tabla se muestran cada uno de los residuos detectados con el servidor ClusPro y en el servidor Prodigy. Cada par de columnas representa a los residuos que interactúan,

siendo la columna de la izquierda el residuo de NPR1 y la columna de la derecha el residuo correspondiente a NPR3. En azul se muestran los residuos que se encuentran en el segmento que contiene al dominio BTB, en color amarillo a los residuos que se encuentran en el segmento que contiene a las repeticiones de anquirina y en gris a los residuos que se encuentran en el dominio CTD.

Los modelos NPR1-NPR3-CTD, NPR1-NPR3- $\Delta$ BTB NPR1-NPR3- $\Delta$ ANK muestran una tendencia similar a la observada con el modelo NPR1-NPR3, en el que la mayoría de los residuos que pudieran participar en la interacción localizan mayoritariamente en el CTD de NPR3. Por otra parte, para los modelos NPR1-NPR3-BTB, y NPR1-NPR3- $\Delta$ CTD, se observa una tendencia diferente a la observada para el modelo NPR1-NPR3 (Tabla 1 y 2); en la que los residuos de NPR3 que interaccionan con NPR1 se localizan principalmente en el dominio BTB.

NPR1-NPR3-BTB		NPR1-NPR3- $\Delta$ CTD		NPR1-NPR3- $\Delta$ ANK	
Residuo NPR1	Residuo NPR3-BTB	Residuo NPR1	Residuo NPR3- $\Delta$	Residuo NPR1	Residuo NPR3- $\Delta$
ASP62	SER 22	THR39	HIS 375	THR39	GLN 471
LYS68	SER 32	GLY40	LYS 377	GLY40	LEU 474
ARG75	PHE 13	ASP42	LYS 377	GLY40	VAL 472
ARG75	SER 15	ASP42	HIS 375	GLN47	LEU 469
ARG81	ASN 26	SER44	THR 140	ASN51	LEU 558
LYS99	SER 22	SER44	HIS 148	ASN51	SER 459
LYS99	GLY 24	GLN47	HIS 375	ARG141	GLU 416
LYS100	ILE 23	ASN51	CYS 141	LYS145	SER 411
LYS102	ASN 26	SER55	ARG 366	SER148	HIS 479
ASP103	SER 31	ASP58	ARG 399	CYS156	GLN 483
GLU122	SER 12	ASP58	ARG 366	VAL376	CYS 410
PHE125	PHE 13	ASP126	ARG 396	PRO382	MET 409
ASP126	SER 15	VAL140	ARG 388	GLU383	MET 409
ARG161	SER 10	ARG141	TYR 374	GLN384	SER 413
ASP165	SER 10	ARG141	ASP 392	GLN384	SER 411
GLU169	SER 12	ARG141	GLU 395	LYS386	THR 407
ASP201	SER 8	LYS145	HIS 27	LYS386	LEU 405
LYS207	GLU 6	LYS145	ASN 26	LYS386	GLU 186
ASP233	MET 1	GLU149	ASN 26	ARG392	GLU 191
ASP233	ALA 2	TYR186	SER 22		
SER240	THR 5	ARG188	SER 19		
LYS264	ALA 2	ARG188	PHE 18		
MET338	SER 9	ASP192	SER 19		
LYS340	SER 9	ASP192	LYS 380		
ASN380	GLN 178	ASP192	PHE 18		
ILE381	GLN 178	ASP195	SER 15		
GLU383	ARG 179	LYS218	ASP 149		
GLN384	SER 16	LYS218	ASN 183		
GLN384	ARG 179	ARG222	SER 15		
CYS385	SER 16	ARG222	THR 14		
		LYS229	SER 12		
		LYS229	PHE 13		

**Tabla 2. Residuos predichos para participar en la interacción entre NPR1 con las versiones NPR3-BTB, NPR3- $\Delta$ CTD y NPR3- $\Delta$ ANK.** En la tabla se muestran cada uno de los residuos detectados que pudieran participar en la interacción para el resto de las versiones de NPR3 evaluadas. En azul se muestran los residuos que se encuentran en el segmento que contiene al dominio BTB, en color amarillo a los residuos que se encuentran en el segmento que contiene a las repeticiones de anquirina y en gris a los residuos que se encuentran en el dominio CTD.

En los modelos NPR1-NPR3-BTB y NPR1-NPR3- $\Delta$ CTD se identificaron 30 y 32 residuos potenciales de interacción, siendo los modelos en los que se identificó un mayor número de

residuos (Tabla 2). Es importante observar que en estos dos modelos se identificó casi el mismo número de residuos y que la única diferencia entre estos es la presencia del segmento que contiene a las repeticiones de anquirina (Figura 11). Esto sugiere que las regiones que contienen a los dominios BTB y repeticiones de ANK de NPR3 son sitios que pueden contribuir con un mayor número de residuos a la interacción con NPR1, respecto al resto de modelos.

Por otra parte, para todos los modelos obtenidos se observó el mismo patrón para NPR1, en el que el segmento que contiene al dominio BTB y de repeticiones de anquirina son los únicos que tienen a los residuos potenciales de interacción. A pesar de la limitación ocasionada por la presencia intrínsecamente desordenadas, puede sugerirse que ambos segmentos también pueden contribuir en la interacción con NPR3.

## **8.2. Predicción de la energía libre de Gibbs y de la constante de disociación de los complejos NPR1-NPR3**

Cada uno de los modelos obtenidos en el servidor ClusPro fue utilizado para predecir la estabilidad y afinidad que tienen los interactores. En la Tabla 3 se reportan los valores de energía y constante de disociación predichos para cada uno de los complejos evaluados. Típicamente los valores de Kd obtenidos experimentalmente para interacciones ligando-receptor se encuentran en el rango de micro a nanomolar, representando una interacción de baja y alta afinidad, respectivamente (Perkins *et al.*, 2010). Sin embargo, en nuestro análisis los valores de la constante de disociación están en el rango de  $1.2 \cdot 10^{-08}$  a  $7.1 \cdot 10^{-15}$ , correspondiente al rango nano y femtomolar, respectivamente, esto sugeriría que la afinidad entre los interactores es muy alta y que posterior a la interacción ésta sea irreversible. De acuerdo con lo reportado en la literatura es poco probable que esto ocurra (Fu *et al.*, 2012; Perkins *et al.*, 2010), por lo que estos valores son utilizados únicamente para determinar cuál de estos modelos es más probable de interactuar con NPR1.

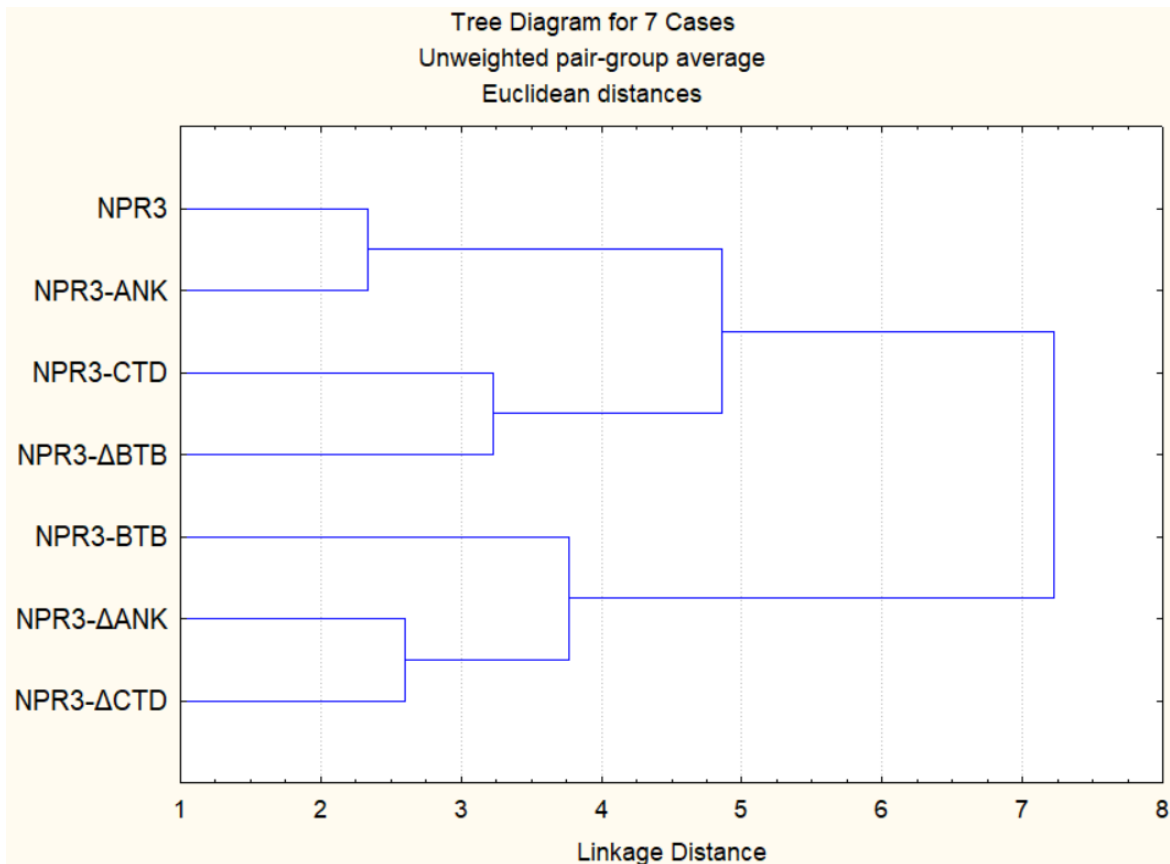


Complejo proteína-proteína	$\Delta G$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	Kd (M) at 25.0 °C
NPR1-NPR3	-13.8	$7.4 \times 10^{-11}$
NPR1-NPR3-ANK	-12.6	$5.9 \times 10^{-10}$
NPR1-NPR3-CTD	-9.6	$9.7 \times 10^{-08}$
NPR1-NPR3- $\Delta$ BTB	-10.8	$1.2 \times 10^{-08}$
NPR1-NPR3-BTB	-18.7	$1.9 \times 10^{-14}$
NPR1-NPR3- $\Delta$ ANK	-16.9	$3.9 \times 10^{-13}$
NPR1-NPR3- $\Delta$ CTD	-19.3	$7.1 \times 10^{-15}$

**Tabla 3. Valores reportados de energía libre de Gibbs y de la constante de disociación de los complejos NPR1-NPR3.** En rojo se indican los valores más bajos, en verde los valores más altos y en azul los valores con un rango intermedio.

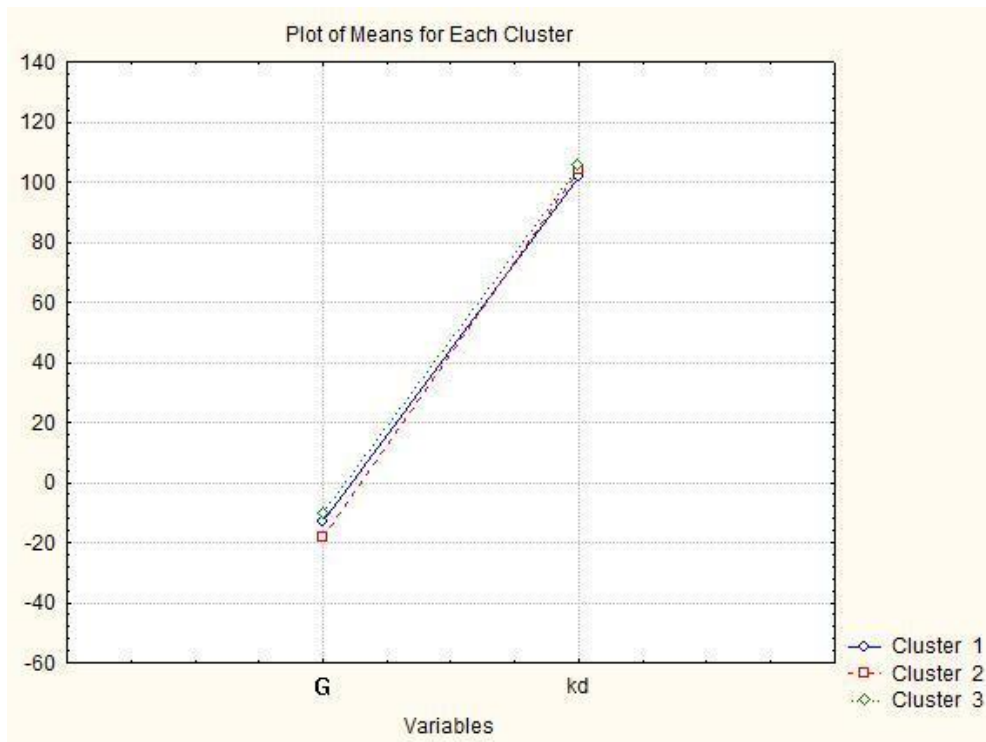
Para determinar qué versiones de NPR3 tienen mayor probabilidad de interactuar con NPR1, se hizo un análisis de conglomerados; el cual toma en cuenta las variables  $\Delta G$  y Kd para agrupar los complejos con mayor similitud. En la Figura 14 se muestra el resultado del análisis de conglomerados, el cual sugiere la formación de tres grupos: el grupo 1, formado por NPR3 y NPR3-ANK; el grupo 2, formado por NPR3-CTD y NPR3- $\Delta$ BTB; el grupo 3, formado por NPR3-BTB, NPR3- $\Delta$ ANK y NPR3- $\Delta$ CTD. El grupo 2 contiene a los complejos con mayor energía y mayor Kd; relativo a los valores obtenidos en la predicción y no a los reportados en la literatura para otras interacciones ligando-receptor, mientras que el grupo 3 contiene a los dos de menor energía y menor Kd. Además, se observa que el segmento ANK de NPR3 tiene una  $\Delta G$  y Kd similar a la predicha para el complejo NPR1-NPR3, correspondiente a la secuencia completa de ambas proteínas y el cual representa el control de cada predicción.

Al determinar qué características tienen en común los miembros de cada grupo, se puede observar que en el grupo 3, los tres miembros tienen en común la presencia del dominio BTB. Por otra parte, los miembros del grupo 2 tienen en común la presencia del dominio CTD de NPR3. Esto sugiere que el dominio BTB no contribuye a la estabilidad y afinidad predicha de los complejos, mientras que el CTD tiene el efecto opuesto.



**Figura 16. Dendrograma que muestra los grupos formados del análisis de conglomerados.** Cada grupo fue formado de acuerdo con las variables  $\Delta G$  y  $K_d$ , determinando a los grupos que tienen mayor probabilidad de interactuar con NPR1.

Para determinar qué variable tiene mayor influencia en la formación de los grupos, se utilizó el método de agrupamiento de k-medias, el cual permite determinar si la formación de los 3 grupos (Figura 16), es la más adecuada, además, facilita determinar la influencia de las variables  $\Delta G$  y  $K_d$  en la formación de los grupos. Este método mostró que la  $K_d$  es la variable que contribuye más a la formación de los grupos, posiblemente por la mayor variabilidad que hay entre los datos obtenidos del servidor Prodigy. Por lo que se decidió centrar el análisis basado en la  $K_d$  de cada complejo.



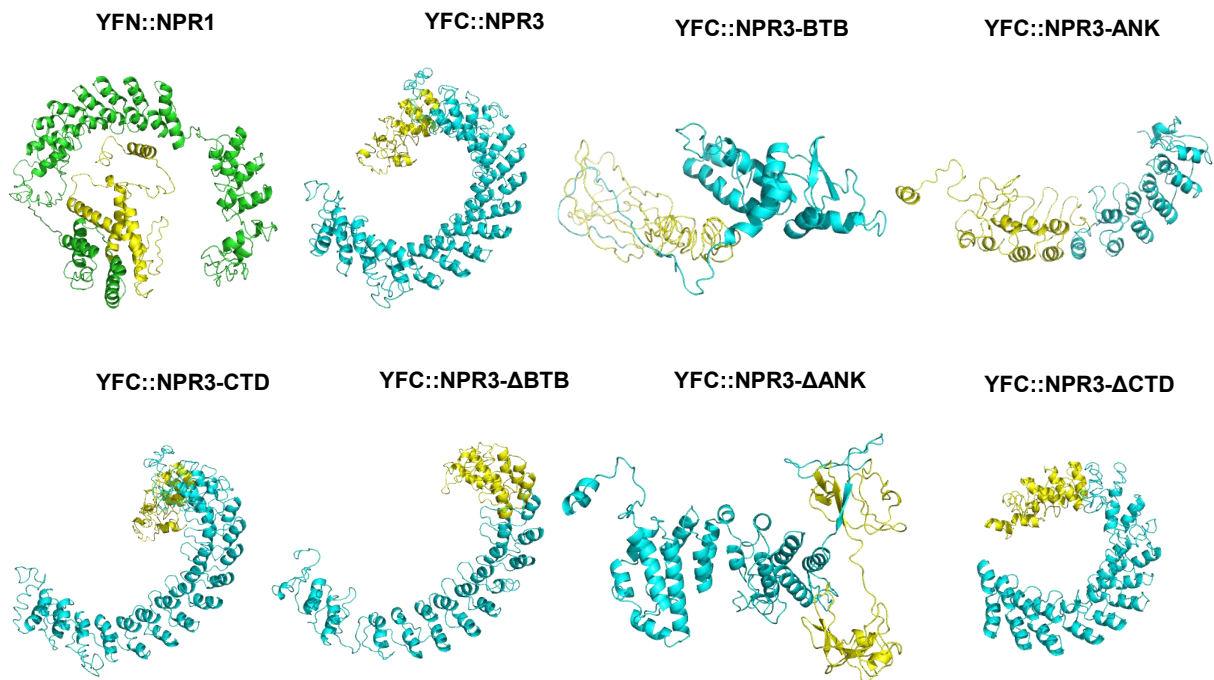
**Figura 17. Gráfica de promedios de cada grupo considerando las variables  $\Delta G$  y  $K_d$ .** La gráfica muestra que la constante de disociación tiene un mayor impacto en la formación de los grupos.

### 8.3. Impacto de los segmentos de YFP en la interacción de los complejos NPR1-NPR3

Una vez identificados los sitios potenciales de interacción, se decidió evaluar el impacto de los fragmentos de YFP en la interacción de NPR1 con las versiones de NPR3. Esto con la finalidad de poder determinar si las versiones de NPR3 pudieran tener una interacción diferente al estar etiquetados con los fragmentos de YFP. Los vectores del sistema BiFC están diseñados de tal forma que se limite cualquier tipo de impedimento que pudiera modificar la interacción entre las proteínas de interés. Para descartar que los vectores del sistema BiFC pudieran causar alguna modificación en la interacción, a pesar de que están diseñados para evitar dicho problema, se hizo un análisis *in silico* con las estructuras predichas correspondientes a las fusiones traduccionales de NPR1 unido al “linker” y al extremo amino de YFP (YFN::NPR1), y a las versiones de NPR3 unidas al “linker” y al extremo carboxilo de YFP (YFC::NPR3) (Figura 12B), las cuales son codificadas por secuencias en sitios diseñados en los vectores del sistema BiFC para la expresión de la

proteína de interés fusionada a los extremos YFN y YFC, respectivamente (Anexo Figura S1).

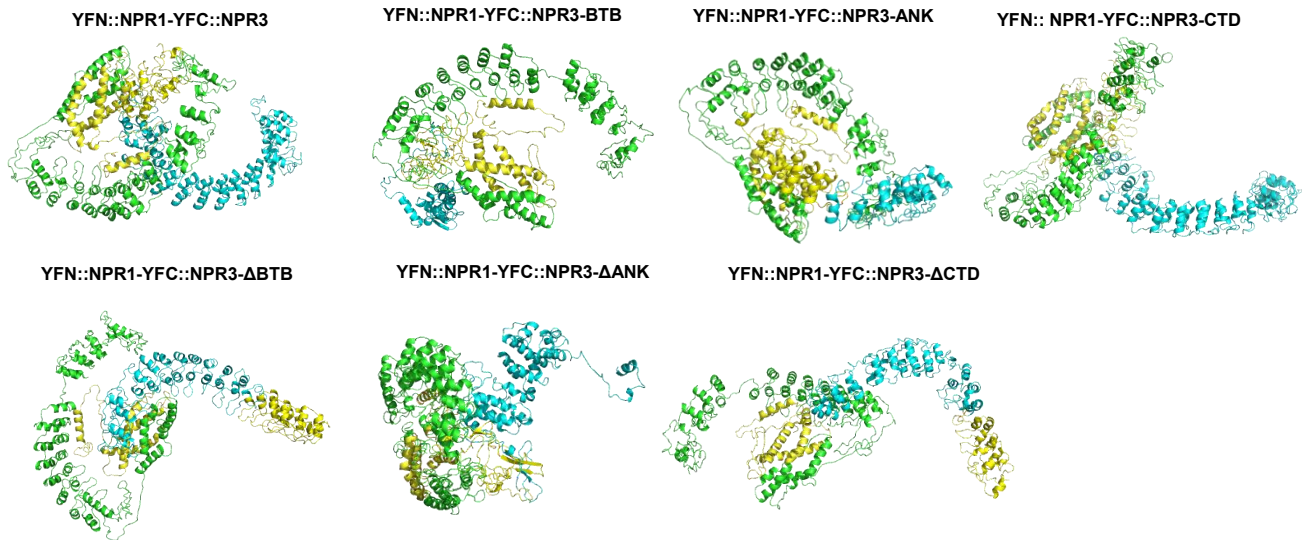
Cada una de las estructuras obtenidas (Figura 17), fue utilizada para el acoplamiento molecular entre YFN::NPR1 y las versiones de YFC::NPR3 (Figura 18), empleando los mismos parámetros que en los resultados mostrados en la sección 8.1. Así mismo, se indicó en amarillo la región correspondiente a los extremos YFN y YFC (Figura 18).



**Figura 18. Estructuras predichas de NPR1 y de las versiones de NPR3 con el servidor I-TASSER.** En verde se muestra la estructura de NPR1 que pudiera adoptar al estar unido al extremo amino de la YFP mediante un “linker” (YFN::NPR1) mientras que en azul se muestran cada una de las estructuras de las versiones de NPR3 unidas al extremo carboxilo de la YFP (YFC::NPR3), marcado en amarillo. (Roy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014; Zhang, 2008)

Los modelos de las interacciones de YFN::NPR1 con YFC::NPR3, YFC::NPR3-BTB, YFC::NPR3-ANK, YFC::NPR3-CTD o YFC::NPR3-ΔANK, ilustrados en la Figura 19, indican que los extremos YFN y YFC (en amarillo) están en proximidad entre sí, y potencialmente con capacidad de fluorescer por complementación (Figura 19). Mientras que en los modelos

YFN::NPR1-YFC::NPR3- $\Delta$ BTB y YFN::NPR1-YFC::NPR3- $\Delta$ CTD (Figura 19), se observa que los extremos YFN y YFC (en amarillo) se encuentran en posiciones alejadas entre sí.



**Figura 19. Modelos obtenidos del acoplamiento molecular de la interacción de NPR1 y de las versiones de NPR3 etiquetadas con los extremos de YFP.** En la parte superior de cada modelo se indica el nombre de los interactores. En color verde se representa a NPR1 fusionada al extremo amino de YFP (YFN::NPR3), mientras que en azul se representa a cada una de las versiones de NPR3 fusionadas al extremo carboxilo de YFP (YFC::NPR3), marcado en amarillo.

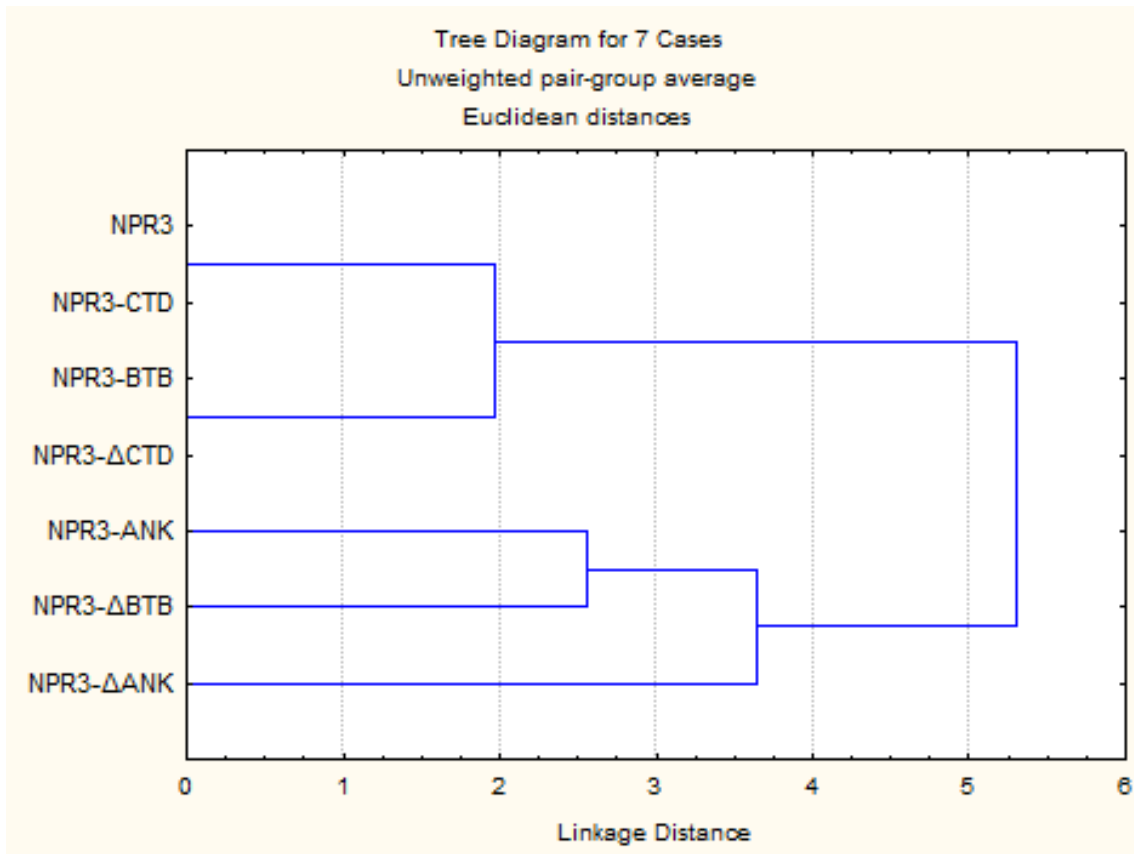
Posteriormente, los modelos obtenidos fueron cargados al servidor Prodigy para la predicción de energía libre y de la constante de disociación (Tabla 4). Los valores obtenidos de Kd se encuentran en el rango nano y femtomolar, similar a lo mostrado en la tabla 3, por lo que son valores alejados a lo conocido experimentalmente para interacciones ligando-receptor.

Complejo proteína-proteína	$\Delta G$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	Kd (M) at 25.0 °C
NPR1-NPR3	-12.7	4.6*10 <sup>-10</sup>
NPR1-NPR3-BTB	-14.4	2.8*10 <sup>-11</sup>
NPR1-NPR3-CTD	-12.7	4.6*10 <sup>-10</sup>
NPR1-NPR3- $\Delta$ CTD	-14.4	2.8*10 <sup>-11</sup>
NPR1-NPR3-ANK	-15.4	5.0*10 <sup>-12</sup>
NPR1-NPR3- $\Delta$ ANK	-19.7	3.3*10 <sup>-15</sup>
NPR1-NPR3- $\Delta$ BTB	-17.0	3.4*10 <sup>-13</sup>

**Tabla 4. Valores reportados de energía libre de Gibbs y de la constante de disociación de los complejos NPR1-NPR3 etiquetados con los extremos de YFP.** En rojo se indican los valores más bajos, en verde los valores más altos y en azul los valores con un rango intermedio.

Estos valores obtenidos fueron utilizados para realizar un análisis de conglomerados (Figura 20). A diferencia de lo observado en la Figura 14, este dendrograma sugiere la formación de 2 grupos: el grupo 1, formado por YFC::NPR3, YFC::NPR3-CTD, YFC::NPR3-BTB y YFC::NPR3- $\Delta$ CTD, mientras que el segundo grupo está formado por YFC::NPR3-ANK, YFC::NPR3- $\Delta$ ANK y YFC::NPR3- $\Delta$ BTB. El grupo 1 tiene a los miembros con mayor energía, mientras que el segundo grupo tiene a los de menor energía. Al comparar los valores de Kd obtenidos en este nuevo análisis respecto a los mostrados en la Tabla 3, se puede observar que hay una diferencia de 3 y 5 órdenes de magnitud para las versiones YFC::NPR3-BTB y YFC::NPR3- $\Delta$ BTB, respectivamente. Mientras que, para el resto de las construcciones, la diferencia fue de solo dos órdenes de magnitud.

Debido a que en las estructuras tridimensionales predichas de los modelos YFN::NPR1 y YFC::NPR3, YFC::NPR3-BTB, YFC::NPR3-ANK, YFC::NPR3-CTD o YFC::NPR3- $\Delta$ ANK se observa en proximidad a los extremos de YFP, sugiere que la presencia de los extremos de YFP no interfiere en las interacciones, y lo que origina una variación respecto a lo mostrado en la Tabla 3, es principalmente atribuido a la estructura tridimensional de las versiones.



**Figura 20. Análisis de conglomerados de los complejos NPR1-NPR3 etiquetados con los fragmentos de GFP.** La formación de los grupos fue determinada por las variables  $\Delta G$  y  $K_d$  (Tabla 4).

#### 8.4. Análisis de los dominios de interacción entre las proteínas NPR1-NPR3

Una vez identificados cuáles segmentos de NPR3 tienen una mayor probabilidad de interactuar con NPR1; ya sea basado en las  $\Delta G$  y  $K_d$  predichas o en el número de residuos que pudieran interactuar con NPR1, se continuó con una validación experimental mediante microscopía confocal en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

Para poder analizar la interacción proteína-proteína *in vivo* en hojas de plantas, se utilizó la técnica BiFC, la cual también nos proporciona información sobre el compartimento

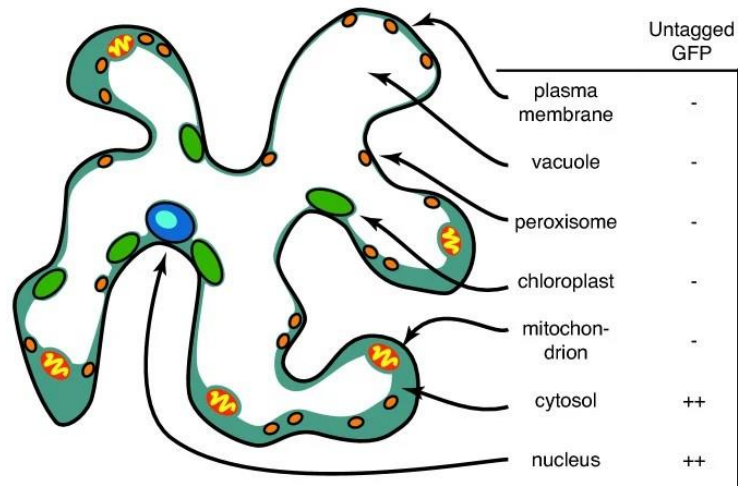
subcelular donde se detectan las interacciones, siendo algo fundamental para entender su función. A pesar de esta ventaja del sistema BiFC, es importante destacar que la finalidad de este análisis es determinar si ocurre o no la interacción entre NPR1 y las versiones de NPR3, independientemente del compartimento en donde son detectables. Debido a que se están utilizando versiones truncas de la misma proteína y las cuales no se encuentran en plantas de tipo silvestre, por lo que respecto a este trabajo y análisis, su localización subcelular no está directamente asociada a su función, sin embargo, se hace una distinción general si las interacciones ocurren o no en núcleo con un fin ilustrativo.

Para evaluar la interacción de las versiones de NPR3 con NPR1, se utilizaron como controles las versiones completas de NPR1 y NPR3. Así mismo, se utilizó como control negativo una de las subunidades de la proteína SnRK (AKINB), la cual es una cinasa que ha mostrado tener un papel central en la señalización en respuesta a estrés y demanda energética (Jossier *et al.*, 2009). Algunas de las subunidades de SnRK han sido utilizadas en análisis del tipo BiFC con diferentes proteínas y específicamente como control negativo en el análisis de interacción entre los NPRs (Castelló *et al.*, 2018; Maruri-López *et al.*, 2015).

Además, se evaluaron las interacciones 2x35S::YFN::NPR1/2x35S::YFC::AKINB y la interacción de los extremos amino y carboxilo de GFP 2x35S::YFN/2x35S::YFC correspondiente a los vectores pYFN43-pYFC43, respectivamente. Todas las interacciones evaluadas fueron sometidas a un tratamiento de 1 mM de SA 6 horas previas a la visualización de las muestras, así mismo se evaluaron a las mismas interacciones en ausencia de SA.

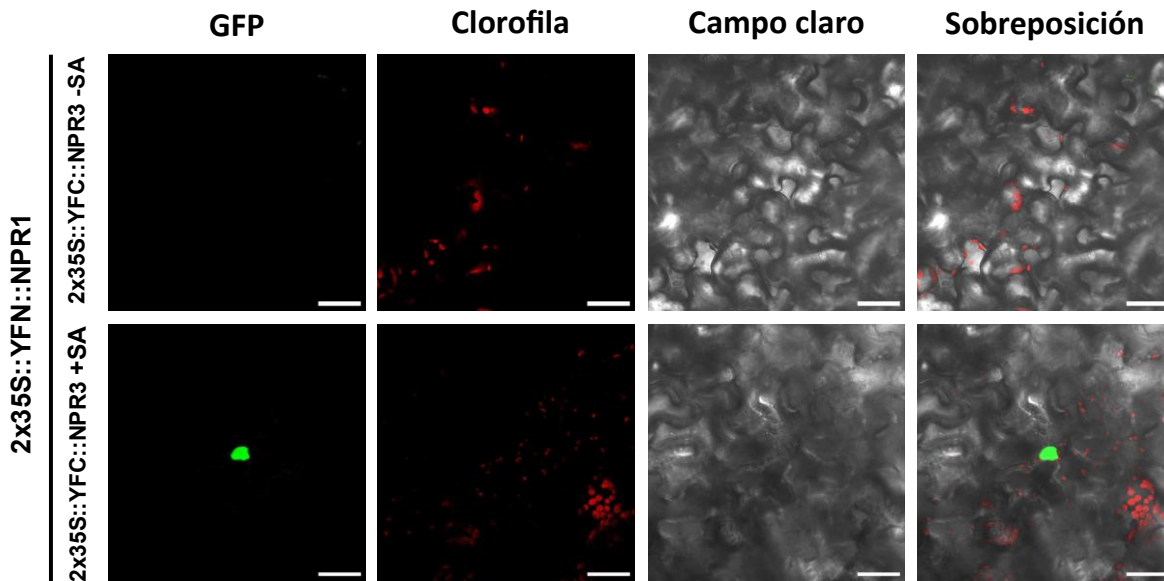
Para los análisis de microscopía confocal de fluorescencia no se utilizaron marcadores que permitieran identificar los compartimentos subcelulares, por lo que la localización mencionada para cada imagen se basó en lo descrito en la literatura sobre las células de plantas de tabaco Figura 21. Estas células tienen una vacuola de mayor tamaño, por lo que desplazan los demás compartimentos subcelulares hacia la periferia de la célula.





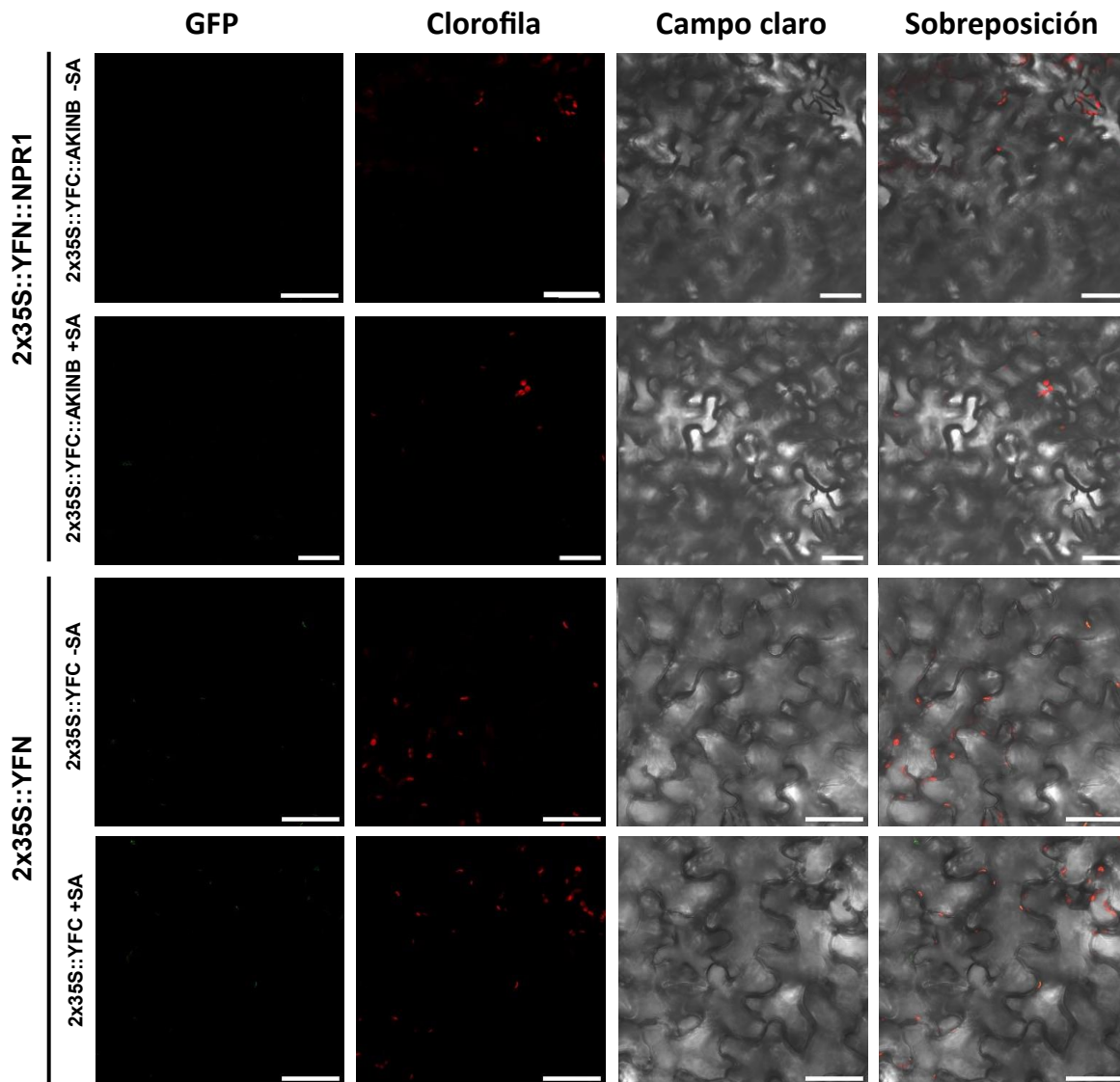
**Figura 21. Localización subcelular típica de GFP en una célula de tabaco.** Representación general de los compartimentos subcelulares en los que localiza la proteína GFP, indicado por “++”, al ser expresada en hojas de tabaco. Imagen tomada y modificada de Mattozzi *et al.* (2014).

Únicamente en presencia de SA, las proteínas NPR1-NPR3 interaccionan y muestran una señal en el núcleo (Figura 22), siendo consistente a lo descrito en la literatura (Castelló *et al.*, 2018).



**Figura 22. Análisis de la interacción NPR1-NPR3.** Las proteínas completas de NPR1 y NPR3 fueron co-infiltradas en hojas de *N. benthamiana* a una proporción 1:1 en condiciones sin SA (-SA) y en presencia de SA 1 mM (+SA). La barra de escala de escala corresponde a 35  $\mu$ m.

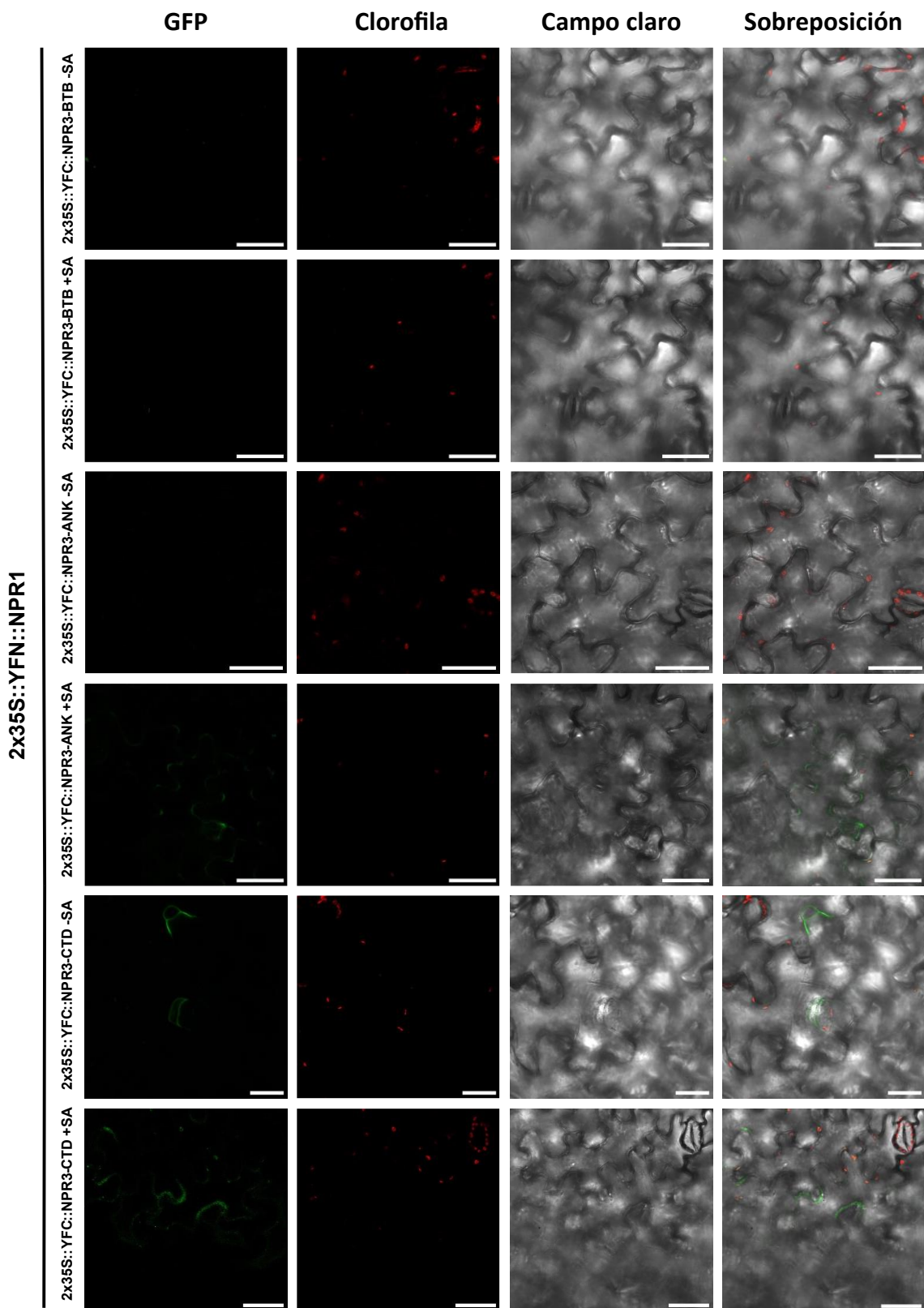
Al visualizar las hojas agroinfiltradas con los vectores 2x35S::YFN/2x35S::YFC; que permiten detectar la fluorescencia basal del sistema BiFC, se observó una señal fluorescente apenas detectable comparada a la observada en la interacción 2x35S::YFN::NPR1/2x35S::YFC::NPR3, mientras que para el control negativo (2x35S::YFN::NPR1/2x35S::YFC::AKINB) no se observó alguna señal fluorescente (Figura 23). Esto indica que los controles son adecuados para el sistema y cuya interacción no se ve modificada por el SA.



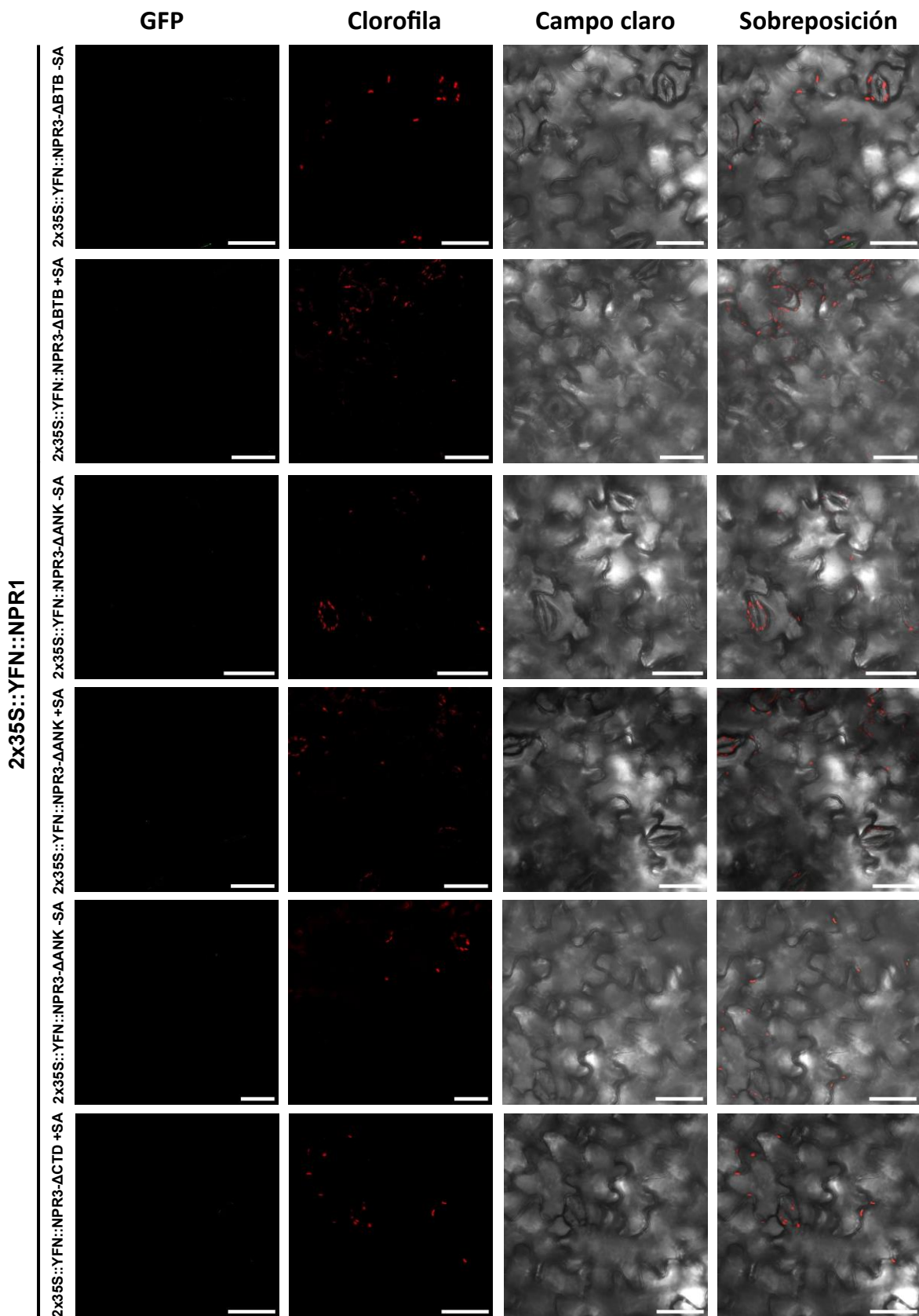
**Figura 23.** Análisis de los controles 2x35S::YFN::NPR1/2x35S::YFC::AKINB y 2x35S::YFN/2x35S::YFC. Las versiones indicadas en la columna izquierda corresponden al control negativo (2x35S::YFN::NPR1/2x35S::YFC::AKINB) mientras que para determinar la fluorescencia basal del sistema BiFC se utilizaron los vectores (2x35S::YFN/2x35S::YFC). Estos controles fueron confrontados a una proporción 1:1 en condiciones sin SA (-SA) y en presencia de SA 1 mM (+SA). La barra de escala de escala corresponde a 35  $\mu$ m.

Al evaluar la interacción de las versiones 2x35S::YFN::NPR1 y 2x35S::YFC::NPR3-ANK, se observó una tenue señal de fluorescencia, lo que no permite asegurar que dicha interacción ocurra. Mientras que para la interacción entre 2x35S::YFN::NPR1 y 2x35S::YFC::NPR3-CTD se observó fluorescencia con y sin tratamiento de SA hacia la periferia de la célula (Figura 24). Mientras que para la versión 2x35S::YFN::NPR1 y 2x35S::YFC::NPR3-BTB, no se observó fluorescencia.

Para las versiones 2x35S::YFC::NPR3- $\Delta$ BTB, 2x35S::YFC::NPR3- $\Delta$ ANK y 2x35S::YFC::NPR3- $\Delta$ CTD, que tienen delección en el segmento que contiene al dominio BTB, ANK y CTD, respectivamente, no se observó reconstitución de la fluorescencia en las dos condiciones evaluadas (Figura 25). Contrario a lo esperado, debido a que las versiones 2x35S::YFC::NPR3- $\Delta$ CTD y 2x35S::YFC::NPR3- $\Delta$ ANK contienen a los segmentos de repeticiones de anquirina y al CTD, respectivamente, y que las versiones 2x35S::YFC::NPR3-ANK y 2x35S::YFC::NPR3-CTD, que contienen a estos dominios sí mostraron fluorescencia (Figura 24).



**Figura 24. Análisis de la interacción de NPR1 con los segmentos BTB, ANK y CTD de NPR3.** Las versiones marcadas en la columna izquierda fueron confrontadas a una proporción 1:1 en condiciones sin SA (-SA) y en presencia de SA 1 mM (+SA) y visualizadas mediante microscopía confocal de fluorescencia. La barra de escala de escala corresponde a 35  $\mu$ m.

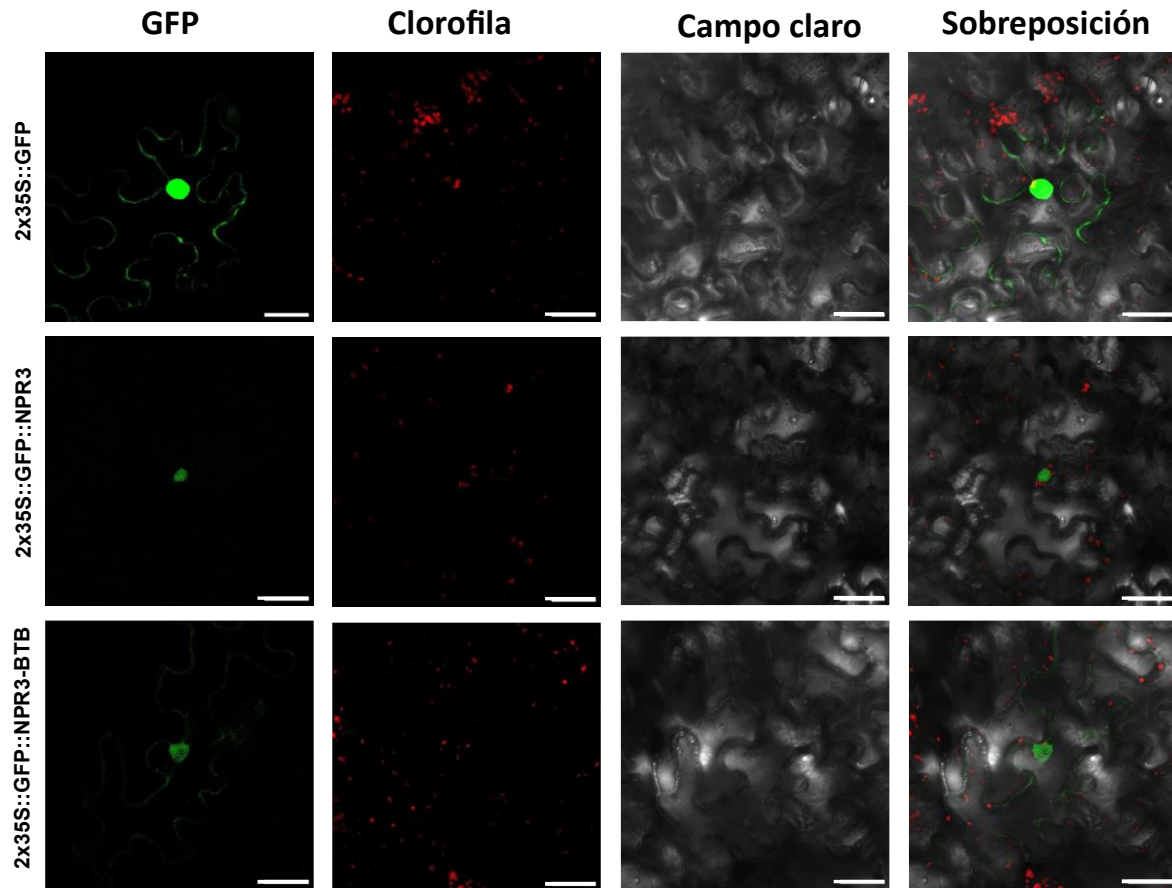


**Figura 25. Análisis de la interacción de NPR1 con los segmentos  $\Delta$ BTB,  $\Delta$ ANK y  $\Delta$ CTD de NPR3.** Las versiones con deleciones de solo un segmento de NPR3; indicadas en la columna izquierda, fueron confrontadas a una proporción 1:1 en condiciones sin SA (-SA) y en presencia de SA 1 mM (+SA). La barra de escala de escala corresponde a 35  $\mu$ m.

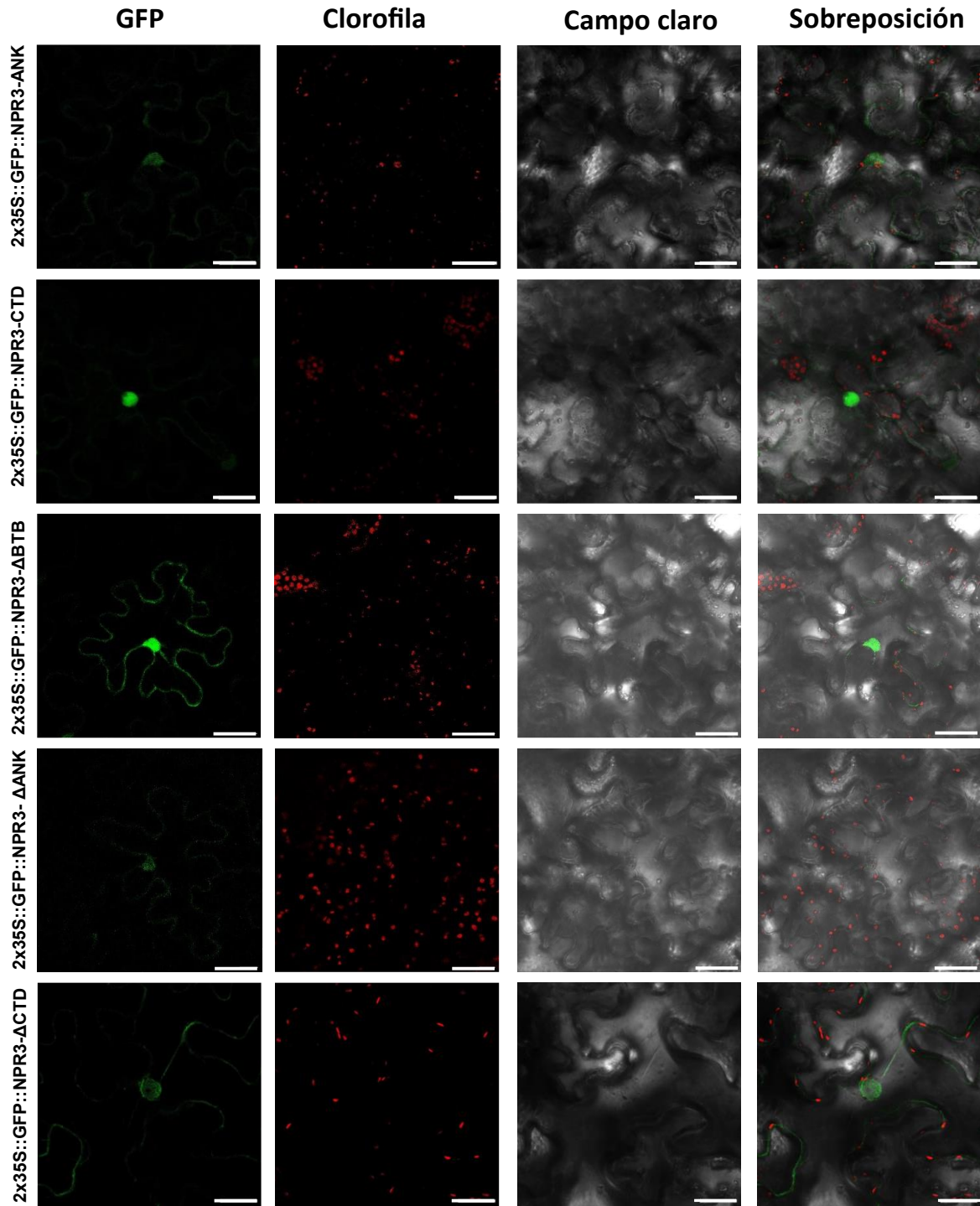
## 8.5. Análisis de la localización subcelular

Al aislar diferentes segmentos de una proteína, es posible que se modifique su localización subcelular debido a que se pudiera estar interfiriendo con una señal de localización, con la interacción con otras proteínas, así como modificar el tamaño de la misma proteína. Por lo que para poder dar una explicación más detallada de las interacciones entre NPR1 y las versiones de NPR3 se analizó la localización subcelular de cada una de éstas en hojas de *N. benthamiana* (Figura 26 y 27). De manera que sea posible determinar si la localización de cada una de las versiones de NPR3 pudiera ser diferente a la esperada, y sea un motivo por el cual no se detectó alguna interacción. Al igual como se mencionó en la sección 8,4, para la finalidad de este análisis se hace una distinción general sobre la posible localización; debido a la baja expresión y a la falta de marcadores específicos de compartimentos, mencionando la presencia nuclear o no nuclear de las versiones de NPR3 con fines ilustrativos.

Cada una de las versiones generadas de NPR3, así como los controles 2x35S::GFP y 2x35S::GFP::NPR3 (pMDC43), fueron co-infiltradas en hojas de *N. benthamiana* con la construcción que codifica a la proteína p19 en una proporción 1:1. De acuerdo con lo mostrado en la Figura 21, la localización de las versiones parece ser núcleo y la periferia de la célula (Figura 26 y 27).



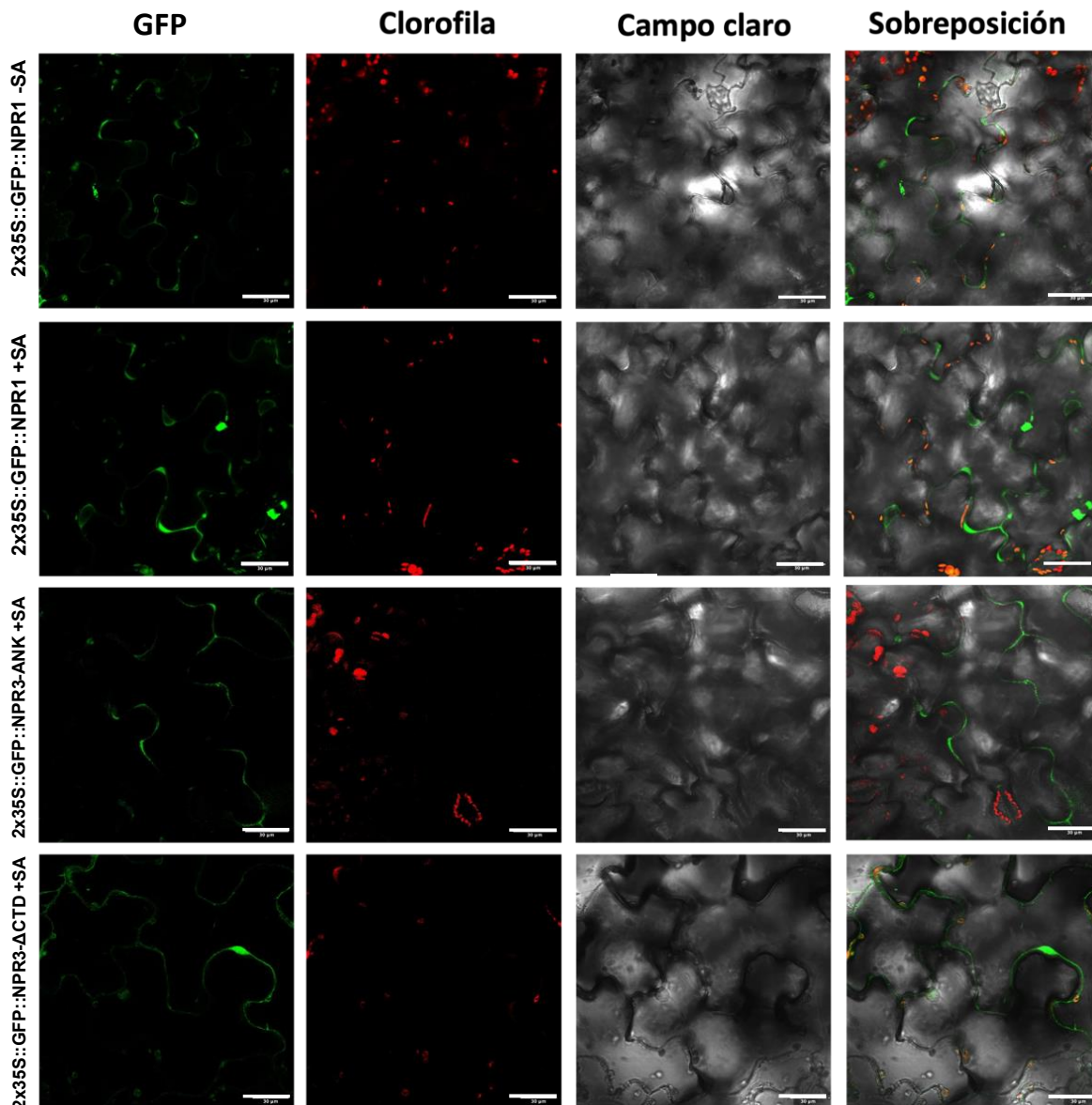
**Figura 26. Localización subcelular de GFP, NPR3 y NPR3-BTB.** Las versiones 35S::GFP, 2x35S::GFP::NPR3 y 2x35S::GFP::NPR3-BTB fueron expresadas en hojas de *N. benthamiana* sin el tratamiento de SA (-SA). La barra de escala de escala corresponde a 35  $\mu$ m.



**Figura 27. Localización subcelular de las diferentes versiones de NPR3 fusionadas a GFP.** Cada una de las versiones indicadas en la figura, fueron expresadas en hojas de *Nicotiana benthamiana* en ausencia de SA.



Para determinar la influencia del SA en la localización subcelular de NPR1 y de las versiones de NPR3, se decidió evaluar la localización en presencia de 1 mM de SA. Como se observa en la Figura 28, en ausencia de SA la proteína NPR1 localiza predominantemente en la periferia de la célula. Mientras que en el tratamiento de 1 mM SA, hay presencia de NPR1 en el núcleo; incluso siendo detectable en la periferia de la célula. Por otra parte, las versiones 2x35S::GFP::NPR3-ANK y 2x35S::GFP::NPR3- $\Delta$ CTD localizan en los mismos compartimentos que los observados en la Figura 27.

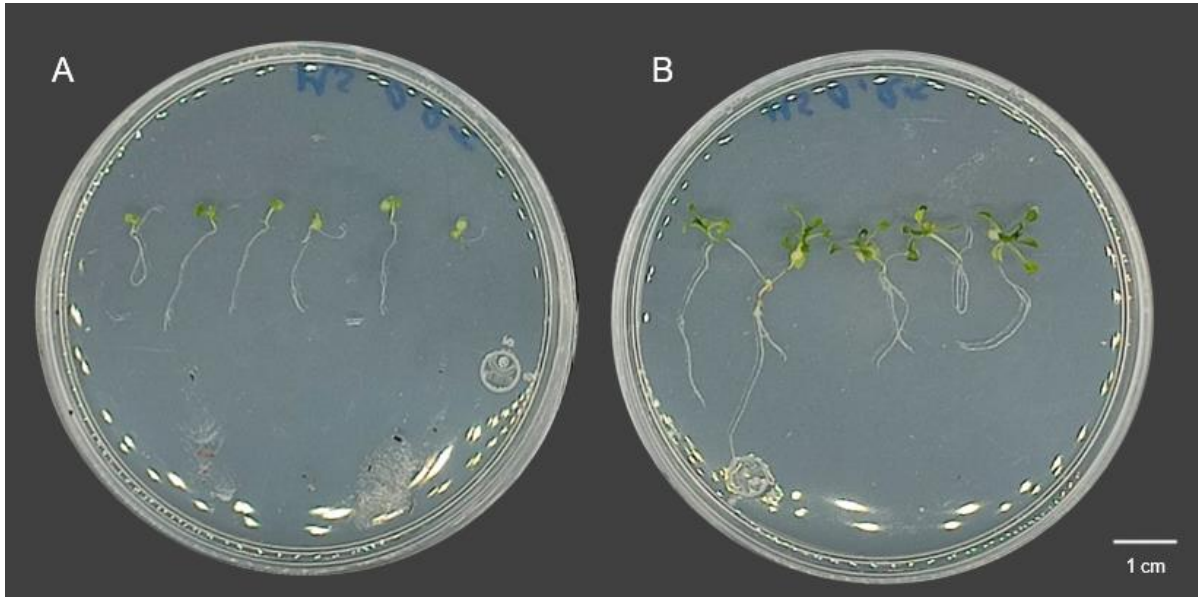


**Figura 28. Localización subcelular de NPR1 y de las versiones NPR3-ANK y NPR3- $\Delta$ CTD.** Las versiones indicadas en la columna de la izquierda fueron tratadas con 1mM de SA, únicamente para NPR1 se incluye la localización en ausencia de SA. La barra de escala corresponde a 30  $\mu$ m.

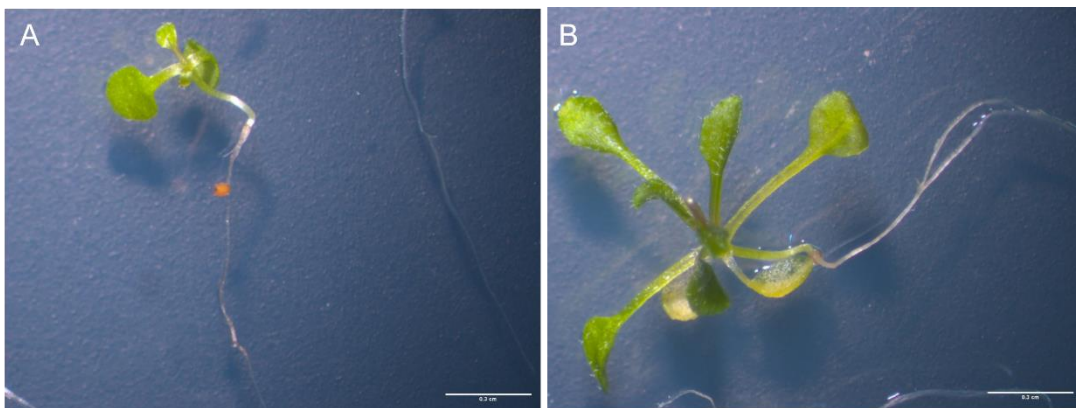
## 8.6. Selección de líneas transgénicas

Para continuar la caracterización de las versiones de NPR3 y determinar su contribución en la respuesta de defensa, se realizaron ensayos de transformación por “floral dip” de la mutante *npr3-2* de *A. thaliana* con las versiones de NPR3 clonadas en el vector pMDC43. Sin embargo, a pesar de los diferentes intentos realizados, la eficiencia de transformación fue baja, por lo que se decidió trabajar con el vector pUBQ10:YFP-GW, que permite la expresión de proteínas en fusión traduccional, cuyo extremo N-terminal es YFP. Estas versiones y su transformación en Col-0 y *npr3-2* de *A. thaliana* se obtuvieron en colaboración con el Dr. Israel Maruri López, “Center for Desert Agriculture, Biological and Environmental Science and Engineering Division (BESE), King Abdullah University of Science and Technology (KAUST), Thuwal, Saudi Arabia”. Mientras que los eventos de selección con las diferentes versiones fueron realizados en nuestro grupo de trabajo. Solo las semillas de plantas transformadas con las versiones pUBQ10:NPR3- $\Delta$ BTB::YFP y pUBQ10:NPR3- $\Delta$ CTD::YFP están disponibles, mientras que la obtención de las semillas que portan las versiones faltantes sigue en proceso.

En un análisis preliminar del fenotipo de la mutante *npr3-2* de *A. thaliana* al ser tratadas con BASTA, se observó que el crecimiento de las plantas se mantiene en el estadio de 2 cotiledones y no forman hojas verdaderas (Figuras 29A y 30A), mientras que las plantas de la mutante *npr3-2* transformadas con la construcción pUBQ10:YFP::NPR3- $\Delta$ BTB presentaron elongación del hipocótilo y mostraron el desarrollo de “hojas verdaderas” (Figuras 29B y 30B).



**Figura 29. Selección de plantas transformadas.** Germinación de semillas del mutante *npr3-2* en medio MS suplementado con Basta 5  $\mu\text{g/ml}$  durante 10 días. **A)** plantas no transformadas, utilizadas como referencia. **B)** plantas complementadas con la construcción pUBQ10::YFP::NPR3- $\Delta$ BTB.

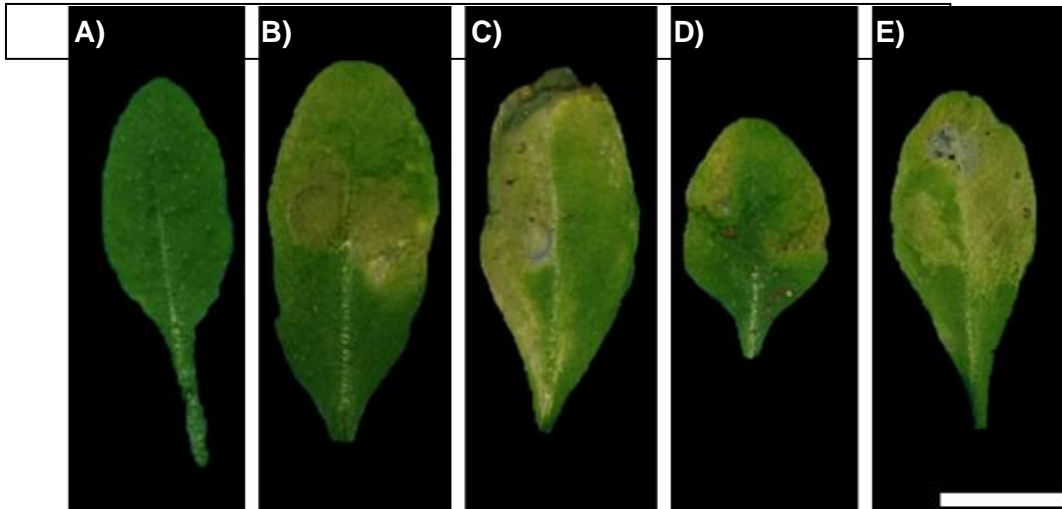


**Figura 30. Diferencia fenotípica de entre la mutante *npr3-2* de *A. thaliana* planta transformada.** A) Planta no transformada que muestra un desarrollo incompleto de sus hojas. B) Desarrollo de hojas verdaderas en una planta transformada con la construcción pUBQ10::YFP::NPR3- $\Delta$ BTB. Imágenes tomadas con un estereoscopio. Barra de escala de 3 mm.

### **8.7. Expresión transitoria de las diferentes versiones de NPR3 en fusión con GFP y su caracterización fenotípica de plantas de *A. thaliana npr3-2* inoculadas con *pseudomonas syringae DC3000***

El análisis preliminar del efecto de la expresión transitoria de 2x35S::GFP::NPR3, 2x35S::GFP::NPR3-ANK o 2x35S::GFP::NPR3- $\Delta$ CTD en hojas de *A. thaliana npr3-2* infectadas con *pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 (pst DC3000)* es mostrado en la figura 32. Posterior a la infección, las hojas de plantas que expresan las versiones 2x35S::GFP::NPR3 o 2x35S::GFP::NPR3- $\Delta$ CTD muestran cambios en la coloración de la hoja (Figura 31 C y E), principalmente en sitios cercanos al lugar de infiltración (parte central de la hoja). Por otra parte, las hojas que expresan a la 2x35S::GFP::NPR3-ANK muestran cambios en la coloración poco perceptibles, similar al observado a las plantas infectadas del mutante *npr3-2* (Figura 31 B).

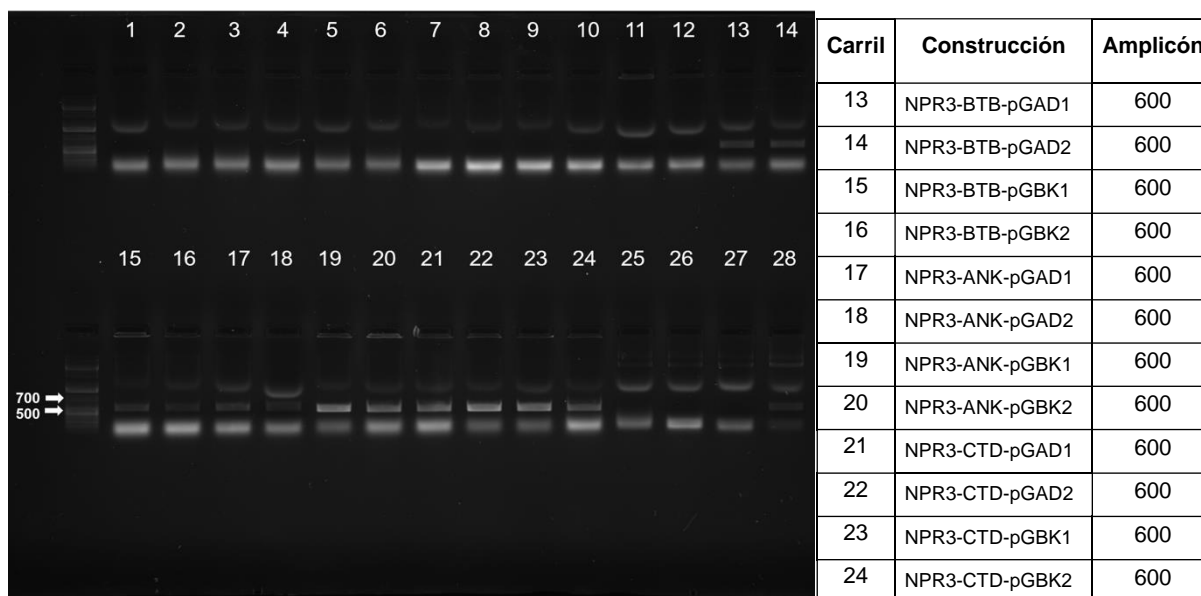
De acuerdo con lo reportado en la literatura, el mutante *npr3-2* y el doble mutante *npr3-3 npr4-2* muestran un fenotipo menos susceptible a la infección con *pseudomonas* debido a una mayor acumulación de NPR1 ((Fu *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013), mientras que al sobreexpresar de forma constitutiva a NPR3, se observa que el fenotipo es más susceptible comparadas con plantas de tipo Col-0 (Shi *et al.*, 2013). Por lo que de confirmarse en líneas transgénicas que expresen las versiones 2x35S::GFP::NPR3, se pudiera validar que los cambios en la clorosis observados en este trabajo, se deben a la interacción de las versiones de NPR3 con NPR1.



**Figura 31. Susceptibilidad a la infección con *pseudomonas syringae* DC3000 en plantas mutantes *npr3-2* de *Arabidopsis thaliana* que expresan transitoriamente las versiones de NPR3.** Imágenes representativas de hojas de: **A y B**) la mutante *npr3-2* no transformada, tratadas con agua estéril (**A**) o infectadas con *P. syringae* Pst DC3000, **C-E**) la mutante *npr3-2* transformada con 35S:GFP::NPR3 (**C**), 35S:GFP::NPR3-ANK (**D**) o 35S:GFP::NPR3-CTD (**E**), respectivamente, infectadas con *P. syringae* Pst DC3000. Para cada construcción se transformaron 8 plantas. Fotos tomadas 3 días después de la infección (dpi) La barra de escala corresponde a 1 cm.

### **8.8. Construcción de los vectores de expresión en el sistema doble híbrido en levadura**

Una estrategia propuesta para validar los resultados obtenidos *in silico* y de BiFC, se basa en el sistema de doble híbrido en levadura (siglas en inglés de Yeast-2-Hybrid), en el que las versiones truncas NPR3-BTB, NPR3-ANK y NPR3-CTD, en fusión con el dominio BD (del inglés Binding Domain) de GAL4 será el cebo (bait en inglés) y como presa se usará la proteína NPR1 con el dominio AD (del inglés activation domain) de GAL4, o viceversa. Los vectores de expresión utilizados son pGADT7 y pGBKT7. En la figura 32 se ilustran las versiones obtenidas hasta el momento. Se cuenta con 2 clonas por construcción, las cuales se encuentran en proceso de validación por secuenciación.



**Figura 32. Validación por PCR de colonia de las versiones de NPR3 para el sistema Y2H.** Las versiones NPR3-BTB, NPR3-ANK y NPR3-CTD clonadas en los vectores pGADT7 y pGBKT7 fueron validadas por PCR de colonia, para cada construcción se indican dos clones con un tamaño de amplicón de 600 pares de bases. Las flechas blancas indican el tamaño de las bandas de 500 y 700 pares de bases, mientras que los números indican la posición de los carriles. La tabla de la derecha indica los carriles 13 a 24, correspondiente a las versiones clonadas.

## 9. Discusión

Como se mencionó, el SA tiene diferentes funciones fisiológicas en las plantas, especialmente en regular diversos mecanismos de defensa (Maruri-López *et al.*, 2019). Sin embargo, se desconoce gran parte del mecanismo molecular por el que el SA induce su señalización mediante los receptores intracelulares NPRs. Para contribuir en la comprensión de este mecanismo; especialmente durante la SAR, nuestro trabajo se centra en identificar y caracterizar diferentes segmentos que contienen a los dominios conocidos de NPR3 y que pudieran participar en la interacción con NPR1.

Los resultados obtenidos en el análisis de predicción *in silico* sugieren que el segmento BTB de NPR3, así como la versión trunca de NPR3, NPR3- $\Delta$ CTD, conformada por los dominios BTB y ANK, son los que tienen el mayor número de residuos que potencialmente interactúan con NPR1, con respecto al resto de las versiones de NPR3 analizadas. Sin embargo, los valores estimados de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) y de la constante de disociación (Kd) asociados a cada potencial complejo de interacción NPR1-NPR3-BTB y NPR1-NPR3- $\Delta$ CTD, sugiere que estos segmentos de NPR3 forman interacciones con NPR1 relativamente menos estables que el resto de los complejos evaluados. La interacción NPR1-NPR3-ANK es la que presenta los valores con mayor estabilidad, similar a la observada en la interacción NPR1-NPR3 (Tabla 3), por lo que ambos modelos se encuentran localizados en el grupo 1, el cual indica que tiene la mayor probabilidad de interactuar con NPR1, que los grupos 2 y 3 conformados por NPR3-CTD y NPR3- $\Delta$ BTB, y NPR3-BTB, NPR3- $\Delta$ ANK y NPR3- $\Delta$ CTD, respectivamente (Figura 16).

De manera general, el análisis *in silico* por acoplamiento molecular sugiere que los segmentos que contienen al dominio ANK y CTD, forman complejos más estables y que mayor probabilidad tienen de interactuar con NPR1, a pesar de contribuir con un menor número de residuos a la interacción (Tabla 1). Por otra parte, los modelos que contienen al dominio BTB de NPR3, tienen una menor probabilidad de interactuar con NPR1, a pesar de tener un mayor número de residuos predichos de participar en dicha interacción (Tabla 2). A pesar de que la presencia del segmento que contiene al dominio BTB parece influir en la estabilidad teórica de los complejos, es posible que pudiera participar en la interacción mediante residuos superficiales cuando se promueve la degradación de NPR1. Esto es similar a lo observado por Wang y colaboradores (2020), quienes reportan que regiones en los dominios BTB y ANK pueden modificar la unión del SA en el SBC de NPR4 mediante

residuos superficiales, a pesar de que no son regiones que participan directamente en la interacción NPR1-NPR4.

Como ya se mencionó, existen diferentes limitaciones que pueden explicar las diferencias entre los resultados obtenidos en las predicciones *in silico* y los de BiFC. Sin embargo, es importante destacar algunas aportaciones del análisis *in silico*. Se encontró que el análisis de los conglomerados, basado en los valores de  $\Delta G$  y  $K_d$ , que oscilan entre -9.6 a -19.3 kcal mol<sup>-1</sup> y  $1.2 \cdot 10^{-08}$  a  $7.1 \cdot 10^{-15}$ M, respectivamente, permitió agrupar a las versiones de NPR3 en los grupos 1, 2 y 3, ordenados de mayor a menor probabilidad de interaccionar con NPR1, respectivamente (Figura 16). Los valores intermedios de  $\Delta G$  y  $K_d$  de NPR3 y NPR3-ANK (grupo 1) permite proponerlos como interactores óptimos de NPR1. Sin embargo, el análisis de BiFC sólo confirmó la interacción de NPR1-NPR3 en núcleo inducida en respuesta a SA. La baja señal de fluorescencia observada no permite afirmar tal interacción entre NPR1 y NPR3-ANK (Figura 24). Por otro lado, los ensayos de BiFC de las versiones de NPR3 del grupo 2 (Figuras 24 y 25), con altos valores de  $\Delta G$  y  $K_d$ , sugieren la interacción entre NPR3-CTD y NPR1, sin que se observe diferencias entre las muestras con y sin tratamiento con SA. Mientras que la interacción entre NPR1 y NPR3- $\Delta$ BTB, y los miembros del grupo 3 no fue detectable.

La interacción de NPR1 con NPR3- $\Delta$ BTB, NPR3- $\Delta$ ANK y NPR3- $\Delta$ CTD sugiere la posibilidad de que haya algún impedimento estérico en la interacción (Figura 14), debido a que comparten al dominio CTD quien mostró interacción con NPR1 (Figura 24). Lo observado en los acoplamientos moleculares entre NPR1 y las versiones NPR3-BTB, NPR3- $\Delta$ ANK y NPR3- $\Delta$ CTD, las cuales tienen en común la presencia del dominio BTB, sugiere que este dominio forma una estructura que disminuye la probabilidad de la interacción entre NPR1 y estas versiones de NPR3 del grupo 3 (Figura 16), lo que fue confirmado en experimentos de BiFC (Figuras 24 y 25).

Con respecto a la posible localización subcelular de las versiones de NPR3 en fusión con GFP utilizadas en este trabajo, se encontró que 2x35S::GFP::NPR3 citolocaliza en núcleo, desafortunadamente los niveles de expresión de 2x35S::GFP::NPR3-ANK fueron bajos lo que no permitió establecer con exactitud la localización de esta proteína. En el caso de las proteínas 2x35S::GFP::NPR3-BTB y 2x35S::GFP::NPR3-CTD su citolocalización es en núcleo y citoplasma (Figura 26 y 27), es similar a lo encontrado al analizar NPR1-BTB y NPR1-CTD (Zavaliev *et al*, 2020). Estos autores documentaron que la interacción intramolecular entre el BTB y el CTD de NPR1 confiere una estructura "cerrada" que inhibe



la interacción de NPR1 con CUL3 en citoplasma, cuando NPR1 tiene una función de proteína adaptadora. También demostraron que el dominio BTB es el que interactúa con CUL3 y que CTD es el dominio que compete como inhibidor de esta interacción (Zavaliev *et al.*, 2020). En el caso de las proteínas GFP-NPR3-BTB, GFP-NPR3- $\Delta$ ANK y GFP-NPR3- $\Delta$ CTD, las imágenes de microscopía confocal muestran una citolocalización en núcleo (Figuras 26 y 27).

En otro orden de ideas, si bien el dominio BTB de NPR3 sólo tiene 34% de identidad de secuencia respecto al dominio BTB de NPR1, es posible considerar que NPR3 presente la capacidad de formar homodímeros, mediada por el dominio BTB, como es el caso de NPR1 (Kumar *et al.*, 2022). Esta hipótesis es apoyada en experimentos tipo Y2H que mostraron la capacidad de NPR3 y NPR4 de formar homo y heterodímeros en presencia de SA (Fu *et al.*, 2012). Por lo que, de ser posible, el homodímero de NPR3 pudiera estar involucrado en el reconocimiento de NPR1 para formar un heterotrímero. En ese sentido, los resultados obtenidos en experimentos de BiFC realizados en este trabajo sugieren que no hay interacción entre NPR1 y el segmento NPR3-BTB (Figura 24).

Por otra parte, el dominio CTD de NPR3 tiene 72% de identidad con el dominio CTD de NPR4, y conserva 12 de los residuos del SBC de NPR4, involucrados en la interacción entre NPR4 y el SA, acompañado por los cambios conformacionales en el SBC que potencialmente determinan la interacción NPR1-NPR4 (Wang *et al.*, 2020). De regularse de una forma similar, es posible que el SA induzca en NPR3 cambios conformacionales similares. Por lo observado en el ensayo de BiFC (Figura 24), la señal fluorescencia asociada a la interacción entre NPR1 y NPR3-CTD es apenas detectable, tanto en ausencia como en presencia de SA. Sin embargo, es importante considerar que el plegamiento del NPR3-CTD puede implicar un impedimento estérico en el reconocimiento de SA, y el subsecuente cambio conformacional necesario para la interacción con NPR1 (Figura 14C).

Otro punto que considerar al evaluar los resultados obtenidos en los ensayos de BiFC es la posibilidad de que uno (o ambos) de los fragmentos N- o C- terminal de YFP pueda interferir en la interacción entre GFP-NPR1 y las versiones GFP-NPR3 analizadas. Las predicciones *in silico* indican que las interacciones entre 2x35S::YFN::NPR1 y 2x35S::YFC::NPR3, 2x35S::YFC::NPR3-BTB, 2x35S::YFC::NPR3-ANK, 2x35S::YFC::NPR3-CTD o 2x35S::YFC::NPR3- $\Delta$ ANK son las que potencialmente fluorescerían por complementación.

Es importante enfatizar que la relevancia de los resultados de los análisis *in silico*, de BiFC y citolocalización de las versiones NPR3 en ausencia y presencia de SA deben ser reforzados con un análisis de interacción entre NPR1 y las versiones NPR3 *in planta*. Con este propósito, en colaboración con el Dr. Israel Maruri ("Center for Desert Agriculture", BESE, KAUST), se obtuvieron semillas de la mutante *npr3-2* de *A. thaliana* transformada pUBQ10::YFP::NPR3- $\Delta$ BTB o pUBQ10::NPR3- $\Delta$ CTD::YFP, respectivamente. El análisis preliminar del fenotipo de las plantas *npr3-2* que portan pUBQ10::YFP::NPR3- $\Delta$ BTB mostró que presentan una mayor elongación del hipocótilo y formación de hojas verdaderas (Figuras 29B y 30B). En contraste, el fenotipo de *npr3-2* no transformada, muestra que el desarrollo permanece en el estadio de 2 cotiledones (Figuras 29A y 30A).

Por último, con respecto a la participación de NPR3 durante la infección de hojas de *A. thaliana npr3-2*, el análisis preliminar de la caracterización funcional de las versiones de NPR3 en la susceptibilidad a la infección con *pseudomonas* sugiere que, al sobreexpresar a 2x35S::GFP::NPR3 y 2x35S::GFP::NPR3- $\Delta$ CTD, se observa cambios notables en la coloración de las hojas (clorosis) (Figura 31 C y E), mientras que al expresar a 2x35S::GFP::NPR3-ANK, el cambio en la coloración apenas es perceptible, similar a la observada en plantas *npr3-2* no complementadas (Figura 31 B y D). De confirmarse estos datos sobre la susceptibilidad a la infección con *pseudomonas* en las líneas transgénicas, en su interpretación se debe de tener en cuenta que NPR3 media la degradación de NPR1 durante una infección con *pseudomonas* (Fu *et al.*, 2012; Saleh *et al.*, 2015). En la mutante *npr3-2*, la proteína NPR1 se acumula (Fu *et al.*, 2012), y al igual que al interferir en la degradación de NPR1, se observa que las plantas son menos susceptibles a *pseudomonas* (Fu *et al.*, 2012; Saleh *et al.*, 2015; Skelly *et al.*, 2019; Spoel *et al.*, 2009. Por lo que sería interesante determinar los valores comparativos de acumulación de NPR1 tanto en las hojas de *A. thaliana* tipo silvestre como de *npr3-2* en el contexto de la sobreexpresión de NPR3, NPR3- $\Delta$ CTD y el resto de las versiones de NPR3.

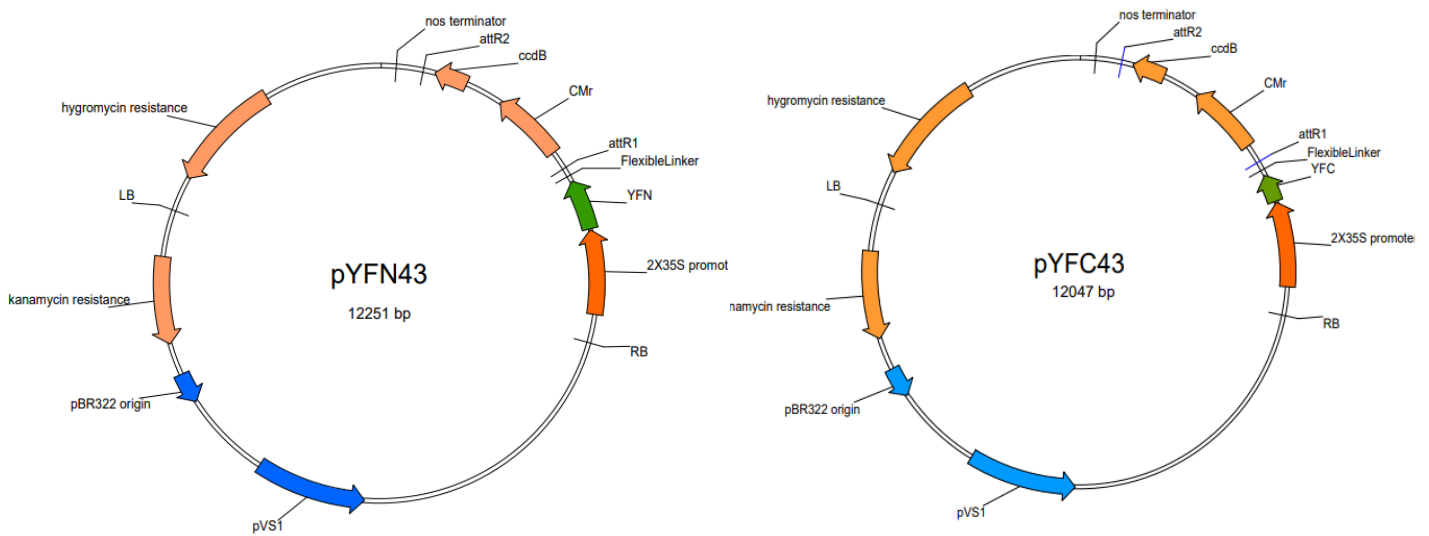
## 10. Conclusiones

- El análisis *in silico* sugiere que los segmentos que contienen al dominio BTB y a las repeticiones de anquirina son sitios potenciales de interacción entre NPR1 y NPR3. Además, este mismo análisis sugiere un efecto desestabilizador del CTD de NPR3 en la interacción con NPR1.
- El análisis *in vivo* sugiere una participación de los segmentos que contienen a los dominios ANK y CTD en la interacción con NPR1, ambos en presencia de SA. Es posible que exista impedimento estérico por parte de algún otro dominio de NPR3.
- La expresión transitoria sugiere que la sobreexpresión de las versiones de NPR3 pudiera restaurar el fenotipo de susceptibilidad a la infección de *pseudomonas syringae* del mutante *npr3-2*.

## 11. Perspectivas

- Evaluar las interacciones bajo las mismas concentraciones de SA, incluyendo aquellas evaluadas en la formación de condensados.
- Determinar si las interacciones evaluadas son específicas del SA y no a 4HBA.
- Evaluar la interacción utilizando Y2H.

## ANEXOS



**Figura 1S. Representación gráfica de los plásmidos YFN43 y YFC43.** Elementos reguladores que conforman a los dos vectores del sistema BiFC. Promotor 35S (2x35S), extremo amino de GFP (YFN), extremo carboxilo de GFP (YFC), espaciador flexible ("linker"), AttR1, attR2 sitios de recombinación R1 y R2, resistencia a cloranfenicol (CMr), gen de selección negativa (ccdB), terminador transcripcional (nosT), resistencia a higromicina (HygR), resistencia a kanamicina (KanR), extremo izquierdo y derecho (RL y LB), origen de replicación (pBR322). Belda-Palazón *et al.* (2012)

## 12. Referencias

- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., ... Ecker, J. R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, *301*(5633), 653–657. <https://doi.org/10.1126/science.1086391>
- 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>
- Belda-Palazón, B., Ruiz, L., Martí, E., Tárraga, S., Tiburcio, A. F., Culiáñez, F., Farràs, R., Carrasco, P., & Ferrando, A. (2012). Aminopropyltransferases Involved in Polyamine Biosynthesis

- Localize Preferentially in the Nucleus of Plant Cells. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046907>
- Bienert, S., Waterhouse, A., De Beer, T. A. P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D313–D319. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>
- 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>
- Boyle, P., le Su, E., Rochon, A., Shearer, H. L., Murmu, J., Chu, J. Y., Fobert, P. R., & Després, C. (2009). The BTB/POZ domain of the arabidopsis disease resistance protein npr1 interacts with the repression domain of TGA2 to negate its function. *Plant Cell*, 21(11), 3700–3713. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.069971>
- 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>
- 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>
- Guex, N., Peitsch, M. C., & Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*, 30(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1002/elps.200900140>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Jossier, M., Bouly, J. P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S., Grahame Hardie, D., & Thomas, M. (2009). SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 59(2), 316–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03871.x>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*, 12(2), 255–278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>

- Kumar, S., Zavaliev, R., Wu, Q., Zhou, Y., Cheng, J., Dillard, L., Powers, J., Withers, J., Zhao, J., Guan, Z., Borgia, M. J., Bartesaghi, A., Dong, X., & Zhou, P. (2022). Structural basis of NPR1 in activating plant immunity. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04699-w>
- Kurkcuoglu, Z., Koukos, P. I., Citro, N., Trellet, M. E., Rodrigues, J. P. G. L. M., Moreira, I. S., Roel-Touris, J., Melquiond, A. S. J., Geng, C., Schaarschmidt, J., Xue, L. C., Vangone, A., & Bonvin, A. M. J. J. (2018). Performance of HADDOCK and a simple contact-based protein–ligand binding affinity predictor in the D3R Grand Challenge 2. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, *32*(1), 175–185. <https://doi.org/10.1007/s10822-017-0049-y>
- 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., Radojičić, 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>
- Maruri-López, I., Hernández-Sánchez, I. E., Ferrando, A., Carbonell, J., & Jiménez-Bremont, J. F. (2015). Characterization of maize spermine synthase 1 (ZmSPMS1): Evidence for dimerization and intracellular location. *Plant Physiology and Biochemistry*, *97*, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.10.017>
- Mattozzi, M. D., Voges, M. J., Silver, P. A., & Way, J. C. (2014). Transient gene expression in tobacco using gibson assembly and the gene gun. *Journal of Visualized Experiments*, *86*. <https://doi.org/10.3791/51234>
- Ngou, B. P. M., Ding, P., & Jones, J. D. G. (2022). Thirty years of resistance: Zig-zag through the plant immune system. *The Plant Cell*. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac041>
- Nguyen, Q. M., Iswanto, A. B. B., Son, G. H., & Kim, S. H. (2021). Recent advances in effector-triggered immunity in plants: New pieces in the puzzle create a different paradigm. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22094709>
- Perkins, J. R., Diboun, I., Dessailly, B. H., Lees, J. G., & Orengo, C. (2010). *Transient Protein-Protein Interactions: Structural, Functional, and Network Properties* (Vol. 18, Issue 10, pp. 1233–1243). <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.08.007>
- 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>

- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, *5*(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- 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>
- Shearer, H. L., Wang, L., De Long, C., Despres, C., & Fobert, P. R. (2009). NPR1 enhances the DNA binding activity of the Arabidopsis bZIP transcription factor TGA7. *Botany*, *87*(6), 561–570. <https://doi.org/10.1139/B08-143>
- Shi, Z., Maximova, S., Liu, Y., Verica, J., & Gultinan, 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., 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*, *137*(5), 860–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.038>
- 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>
- Vajda, S., Yueh, C., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R., & Kozakov, D. (2017). New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, *85*(3), 435–444. <https://doi.org/10.1002/prot.25219>
- Vangone, A., Schaarschmidt, J., Koukos, P., Geng, C., Citro, N., Trellet, M. E., Xue, L. C., & Bonvin, A. M. J. J. (2019). Large-scale prediction of binding affinity in protein-small ligand complexes: The PRODIGY-LIG web server. *Bioinformatics*, *35*(9), 1585–1587. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty816>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- 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>

- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- 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>
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2014). The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. In *Nature Methods* (Vol. 12, Issue 1, pp. 7–8). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- Zavaliev, R., Mohan, R., Chen, T., & Dong, X. (2020). Formation of NPR1 Condensates Promotes Cell Survival during the Plant Immune Response. *Cell*, *182*(5), 1093–1108.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.016>
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, *9*. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
- Zhang, Y., Cheng, Y. T., Qu, N., Zhao, Q., Bi, D., & Li, X. (2006). Negative regulation of defense responses in Arabidopsis by two NPR1 paralogs. *Plant Journal*, *48*(5), 647–656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02903.x>