



POLITÉCNICA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA

AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**DEPARTAMENTO DE
BIOTECNOLOGÍA-BIOLOGÍA VEGETAL**

Análisis de las proteínas RIN4-like de Arabidopsis thaliana y de su interacción con proteínas involucradas en defensa frente a estreses bióticos

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor: Rocío Marugán Pinos

**Tutores: Estefanía Contreras Navarro
y Manuel Martínez Muñoz**

Julio de 2020



POLITÉCNICA



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

**ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS RIN4-LIKE DE *ARABIDOPSIS THALIANA* Y
DE SU INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN DEFENSA
FRENTE A ESTRESSES BIÓTICOS**

TRABAJO FIN DE GRADO

Rocío Marugán Pinos

MADRID, 2020

Directores: Estefanía Contreras Navarro
y Manuel Martínez Muñoz

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA

Dpto. de Biotecnología-Biología Vegetal



POLITÉCNICA



E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,
ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS

**TÍTULO DEL TFG - ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS RIN4-LIKE DE
ARABIDOPSIS THALIANA Y DE SU INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS
INVOLUCRADAS EN DEFENSA FRENTE A ESTRESSES BIÓTICOS**

**Memoria presentada por ROCÍO MARUGÁN PINOS para la obtención
del título de Graduado en Biotecnología por la Universidad
Politécnica de Madrid**

Fdo: Rocío Marugán Pinos

VºBº Tutor

**Dña Estefanía Contreras Navarro
Investigadora, Postdoc-programa oficial Severo Ochoa
Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA
Universidad Politécnica de Madrid**

VºBº Tutor UPM

**D Manuel Martínez Muñoz
Investigador, Profesor Titular Universidad
Dpto. de Biotecnología-Biología Vegetal
ETSIAAB - Universidad Politécnica de Madrid**

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todo el grupo del laboratorio 121, en especial a mis tutores Manu y Fany y a Isabel, que me acogiesen en febrero para realizar prácticas y TFG, aunque solo pudiese estar un mes. He aprendido un montón trabajando con ellos día a día y me llevo una muy buena experiencia.

También a todos mis compañeros de la carrera, jamás pensé que conocería a gente tan increíble en la universidad.

Pero, sobre todo, quiero agradecer a mi familia el haber estado siempre ahí, apoyándome en cada curso y motivándome para seguir adelante. Esto no habría sido posible sin vosotros.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción y objetivos	1
1.1. Introducción	1
1.2. Objetivos	6
2. Materiales y métodos	7
2.1. Análisis de las secuencias de proteínas de la familia de RIN4 y búsqueda de interactores <i>in silico</i>	7
2.2. Diseño de oligonucleótidos y PCR	7
2.3. Vectores	8
2.4. Geles de agarosa	9
2.5. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	9
2.6. Ligación del gen de interés a pGEM-T easy	10
2.7. Ligación del gen de interés a pENTR1A	10
2.8. Inserción del gen de interés a pDEST22 y pDEST32 por recombinación	10
2.9. Transformación de células competentes	10
2.10. Extracción y cuantificación de DNA plasmídico	11
2.11. Digestión con enzimas de restricción	11
2.12. Secuenciación	11
3. Resultados	12
3.1. Análisis bioinformático de las proteínas RIN4-like	12
3.2. Búsqueda de interactores experimentalmente determinados	13
3.3. Diseño de oligonucleótidos y PCR	14
3.4. Ligación a pGEM-T easy	17
3.5. Ligación a pENTR1A	19
3.6. Inserción en pDEST22 y pDEST32 por recombinación	19
4. Discusión	21
5. Conclusiones	24
Bibliografía	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para este trabajo con sus dianas de restricción y temperaturas de fusión utilizadas	8
Tabla 2. Vectores empleados	9
Tabla 3. Cambios significativos en la expresión de cuatro genes RIN4-like y de <i>RIN4</i> obtenidos en un análisis mediante RNAseq a partir de rosetas de <i>A. thaliana</i> infestadas con el ácaro <i>T. urticae</i>	12
Tabla 4. Cambios significativos en la expresión de cuatro genes que codifican proteínas interactoras de RIN4 obtenidos en un análisis mediante RNAseq a partir de rosetas de <i>A. thaliana</i> infestadas con el ácaro <i>T. urticae</i>	14
Tabla 5. Patrones de digestión de las diferentes construcciones generadas por la clonación de los genes RIN4-like, <i>RIN4</i> y <i>NDR1</i> en los vectores empleados en este trabajo	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de reconocimiento indirecto de los efectores de tipo III de <i>Pseudomonas syringae</i> AvrB, AvrRpm1 y AvrRpt2 por las proteínas de resistencia de <i>Arabidopsis thaliana</i> RPM1 y RPS2, a través de la proteína intermediaria RIN4, para la activación de la respuesta de defensa (Spoel & Dong, 2012).....	4
Figura 2. Alineamiento múltiple de las proteínas RIN4-like seleccionadas (AT2G17660, AT3G07195.1, AT3G48450, AT5G48657) y RIN4	13
Figura 3. Interactores de RIN4 experimentalmente determinados	14
Figura 4. Sitios de clonación del vector de entrada del sistema Gateway pENTR1A	15
Figura 5. Esquema de las isoformas 1 y 2 del gen de la familia de <i>RIN4 AT3G07195</i>	16
Figura 6. Productos de PCR de <i>AT3G07195.1</i> y <i>NDR1</i> a partir de cDNA de <i>A. thaliana</i>	16
Figura 7. Comprobación por digestión de la inserción de <i>AT3G07195.1</i> y <i>NDR1</i> en el vector de subclonación pGEM-T easy	18
Figura 8. Cromatograma de la secuenciación de pGEM-T easy- <i>AT3G07195.1</i>	18
Figura 9. Comprobación por digestión de la inserción de los genes RIN4-like y <i>RIN4</i> en pDEST22 y pDEST32.....	20

LISTA DE SÍMBOLOS

°C: grados centígrados

pb: pares de bases

mM: milimolar

p/v: peso/volumen

v/v: volumen/volumen

mL: microlitros

rpm: revoluciones por minute

ng: nanogramos

g/L: gramos/litro

µg/mL: microgramos/mililitro

mg/mL: miligramos/mililitro

M: molar

mL: mililitros

LISTA DE ABREVIATURAS

PRRs: pattern recognition receptors

HAMPs: herbivore-associated molecular patterns

MAMPs: microbe-associated molecular patterns

DAMPs: damage-associated molecular patterns

PAMPs: pathogen-associated molecular patterns

Proteínas/genes R: proteínas/genes de resistencia

Proteínas Avr: proteínas de avirulencia

Proteínas NB-LRR: proteínas que contienen un nucleotide-binding domain y leucine-rich repeats

ETI: effector-triggered immunity

RPM1: resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1

RIN4: RPM1- interacting protein 4

RLCKs: receptor-like cytoplasmic kinases

RIPK: receptor-interacting protein kinase

RPS2: resistance to *Pseudomonas syringae* 2

NDR1: non-race-specific disease resistance 1

NOI: NO₃-induced

T_m: temperatura de *melting*

DNA: deoxyribonucleic acid

RNA: ribonucleic acid

RCS: RIN4 cleavage site

Y2H: yeast two hybrid assay

BiFC: bimolecular fluorescent complementation

RESUMEN

Elevated CO₂ and temperature as a consequence of climate change are altering interactions between plants and pests with important implications for ecology and agriculture. This is due to a positive effect on pest appearance as a result of a shortening of their life cycle and an increment on their host range. An example is the spider mite *Tetranychus urticae*, which is becoming a model of arthropod pest as it is able to feed on more than 1,100 plant species and has its entire genome sequenced and annotated.

On the other hand, plants have evolved a sophisticated innate immune system to recognize these invading organisms and induce host defenses to achieve resistance. A component of this system in *Arabidopsis thaliana* is RIN4, an intrinsically disordered protein anchored to the plasma membrane. Its regions lacking stable structure function as a protein hub promoting protein interactions. It is also a post translational modification target of multiple bacterial effectors, which allows indirect recognition of a wide variety of pathogenic molecules and activates plant disease resistance (R) proteins.

A. thaliana has 15 RIN4-like paralogous genes, four of which (*AT2G17660*, *AT3G07195*, *AT3G48450* and *AT5G48657*) were found significantly overexpressed in *A. thaliana* rosettes infested with *T. urticae* in a RNAseq experiment performed in the laboratory. In this work, the sequences of these proteins were analyzed and compared. As RIN4, the proteins *AT3G07195* and *AT5G48657* have intrinsically disordered regions and two NOI (NO₃-induced) domains, which play an important role in effector recognition and R protein activation. By contrast, *AT2G17660* and *AT3G48450* are shorter and only possess one NOI domain. Several defence related RIN4 interacting proteins were identified in an interaction repository. Four of these, R proteins RPM1, RPS2, RIPK and NDR1, were also overexpressed upon *T. urticae* infestation and were chosen to study their interactions with the RIN4-like proteins. Selected proteins were amplified and cloned into the yeast expression vectors pDEST22 and pDEST32 with the aim of performing a yeast two hybrid assay. Depending on the results, additional experiment went to be proposed regarding the consequences on the interactions of phosphorylations, partial deletions or in planta assays. Restrictions due to Covid-19 impeded bring to completion these experiments.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

En su ecosistema natural, las plantas se enfrentan diferentes a estreses de carácter biótico y abiótico desarrollando sistemas de defensa constitutivos e inducibles (Wilkinson *et al.*, 2019; Wu & Baldwin, 2010). En las últimas décadas, el aumento en los niveles de CO₂ y en la temperatura asociados al cambio climático han desregulado estas interacciones con implicaciones importantes para la ecología y la industria agrícola. Una de las principales consecuencias ha sido un efecto positivo sobre los organismos fitófagos, pues al acortarse su ciclo de vida las plagas se desarrollan más rápido y en un mayor rango de especies hospedadoras (DeLucia *et al.*, 2012; Ximénez-Embún *et al.*, 2017). Dentro del filo Arthropoda, clase Acari, la familia de las arañas rojas (*Tetranychidae*) destaca con casi 1,300 especies descritas en 77 géneros, de las que aproximadamente el 10% son herbívoras (Vacante, 2015). En concreto, la especie *Tetranychus urticae* Koch es una de las más polífagas, alimentándose de alrededor de 1,100 especies de plantas de las cuales más de 150 son de interés agrícola (“Spider Mites Web: Home page,” n.d.). Otros aspectos a destacar de *T. urticae* son un ciclo de vida corto (7-10 días), una abundante descendencia y una gran facilidad para desarrollar resistencias a pesticidas (Van Leeuwen *et al.*, 2015).

En el contexto de sus interacciones, las plantas y los ácaros han seguido una evolución paralela. El establecimiento de modelos de interacción planta-fitófago ha sido fundamental para el desarrollo de protocolos de observación directa a nivel celular del proceso de alimentación del ácaro y como puntos de referencia para un mejor entendimiento de las vías moleculares de defensa. *T. urticae* se está asentando como modelo de ácaro desde que su genoma fue secuenciado, encontrándose un alto número de genes pertenecientes a familias involucradas en su flexibilidad de adaptación a cambios en el hospedador, como son aquellas implicadas en el proceso de digestión, o en el transporte y detoxificación de xenobióticos (Grbić *et al.*, 2011). A esto se le añade el desarrollo de diversos sistemas experimentales de interacción planta-ácaro (Díaz-Riquelme *et al.*, 2016; Martel *et al.*, 2015; Wybouw *et al.*, 2015; Zhurov *et al.*, 2014) y una gran variedad de herramientas genómicas que han sido puestas a punto para *T. urticae* (Cazaux *et al.*, 2014; Santamaría *et al.*, 2012; Suzuki, Nunes, *et al.*, 2017; Suzuki, Urizarna, *et al.*, 2017).

T. urticae se localiza principalmente en el envés de las hojas, desde donde utiliza una estructura bucal con forma de estilete para penetrar entre las células de la capa epidérmica, sin dañarla, o por las aperturas estomáticas para succionar el contenido de las células del mesófilo (Bensoussan *et al.*, 2016). Una alimentación continuada afecta significativamente a la tasa

fotosintética, el contenido total de clorofila y el verdor de la hoja; acabando en clorosis, defoliación y alteraciones importantes en el crecimiento y desarrollo de la planta que llevan a importantes pérdidas económicas (Park & Entomology, 2002; Meck *et al.*, 2012). Debido a su falta de movilidad, las plantas deben ser capaces de orquestar una respuesta rápida y específica contra la especie concreta de herbívoro que haya iniciado la agresión. La inducción de la defensa comienza cuando receptores específicos (PRRs, pattern recognition receptors) reconocen patrones asociados al fitófago (HAMPs, herbivore-associated molecular patterns), a secreciones que contienen microbiota endosimbionte de su tracto digestivo (MAMPs, microbe-associated molecular patterns) y al daño causado en los tejidos de la planta (DAMPs, damage-associated molecular patterns) (Basu *et al.*, 2018; Duran-Flores & Heil, 2016; Yamaguchi & Huffaker, 2011).

Los PRRs activan la respuesta a corto plazo a través de distintas cascadas de señalización que conducen a la síntesis de fitohormonas y a la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de compuestos de defensa (Zebelo & Botany, 2015). En un segundo paso, se inicia una respuesta tardía basada en la liberación de sustancias que interfieren con el metabolismo, el desarrollo y la fecundidad del herbívoro; así como de compuestos volátiles que atraen a sus enemigos naturales (Mithöfer & Boland, 2012; Santamaria *et al.*, 2013).

Distintas moléculas de las secreciones salivares y gástricas pueden funcionar no solo como elicitores de esta primera línea de defensa de la planta, sino también como efectores para su supresión. Esto genera una verdadera interacción planta-fitófago en la que la planta responde mediante la aparición de genes de resistencia (R) específicos para dichos efectores.

La interacción entre efectores y genes de resistencia se ha estudiado, sobre todo, en la respuesta de la planta al ataque de patógenos bacterianos. Las bacterias introducen los efectores, también conocidos como proteínas de avirulencia (Avr), en el citoplasma de la célula vegetal a través del sistema de secreción de tipo III para suprimir la respuesta a corto plazo mediada por las proteínas PRR (Chen *et al.*, 2000). La planta es capaz de reconocer esos efectores mediante los genes de resistencia, que forman una superfamilia altamente polimórfica que predominantemente codifica proteínas de la clase NB-LRR, las cuales reciben este nombre por contener un dominio de unión a nucleótidos (nucleotide-binding domain) y repeticiones de fragmentos ricos en leucinas (leucine-rich repeats) (Meyers *et al.*, 1999). Al ser activadas por su efector correspondiente, las proteínas NB-LRR inician la señalización para múltiples vías de defensa cualitativamente similares a la primera línea, pero más fuertes y rápidas denominadas en conjunto ETI (effector-triggered immunity) (Chisholm *et al.*, 2006). Entre ellas se encuentran el reforzamiento de la pared celular, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la

inducción de la expresión de proteínas de defensa y una forma de muerte celular programada alrededor del punto de infección conocida como respuesta hipersensible, que limita el crecimiento bacteriano (Espinosa & Alfano, 2004).

La gran especificidad existente entre efector-proteína R demuestra el elevado grado de presión selectiva al que están sometidos tanto plantas como patógenos durante la evolución (Baker *et al.*, 1997). Según esta idea, se planteó un modelo en el que las proteínas NB-LRR iniciaban la cascada de transducción de la señal a partir de una interacción directa con sus respectivos efectores. Por el contrario, la evidencia experimental demostró un modelo de reconocimiento de carácter indirecto. Las proteínas R funcionan como “guardas” de los verdaderos objetivos de los efectores de tipo III, moléculas accesorias implicadas en la regulación de la primera línea de defensa en respuesta a PAMPs o en el mantenimiento fisiológico de la planta. Su disrupción es detectada por las NB-LRR para el inicio de la ETI (Dodds & Rathjen, 2010; Dangl & Jones, 2001).

Esta teoría tiene dos dogmas principales. El primero establece que una misma proteína R es capaz de detectar dos o más efectores de tipo III no relacionados que tengan la misma maquinaria del hospedador como objetivo. Un ejemplo es la proteína NB-LRR de *Arabidopsis* RPM1 (resistance to *Pseudomonas syringae* pv. maculicola 1), que confiere resistencia contra cepas de *P. syringae* expresoras de los efectores de tipo III AvrRpm1 o AvrB (Grant *et al.*, 1995). Está asociada de forma periférica a la parte interna de la membrana plasmática (Boyes *et al.*, 1998) y se ha demostrado que ambos efectores son miristoilados al expresarse en células vegetales para una localización subcelular similar (Nimchuk *et al.*, 2000). Tanto AvrRpm1 como AvrB funcionan fosforilando a la proteína accesoria RIN4 (RPM1-interacting protein 4), lo que es detectado directamente por RPM1 permitiendo su acumulación para la activación de la respuesta hipersensible y otras rutas que permitan la restricción del crecimiento bacteriano (Fig. 1). Mediante una co-inmunoprecipitación *in vivo*, se demostró que RIN4 es capaz de interactuar tanto con RPM1 como con AvrB y AvrRpm1. También que actúa regulando negativamente la inmunidad mediada por PAMPs y la expresión de genes de resistencia a *Pseudomonas*, pues en plantas *rpm1* se favorecía significativamente la virulencia de *P. syringae* expresora de AvrB y AvrRpm1. Esto llevó a la conclusión de que la interacción de estos efectores con RIN4 es independiente de RPM1, promoviendo su inhibición de la primera línea de defensa (Kim *et al.*, 2005; Mackey *et al.*, 2002). El reconocimiento del péptido bacteriano flagelina, un MAMP altamente conservado, induce la acumulación de RIN4 hiperfosforilado en la posición S141, a través de la familia de las RLCKs (receptor-like cytoplasmic kinases), desreprimiendo la respuesta de defensa. A su vez, AvrB y AvrRpm1 favorecen una

hiperfosforilación en T166 mediante RIPK (receptor-interacting protein kinase) que contrarresta a la anterior, devolviendo a RIN4 su poder inhibitorio (Chung *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2011). Se conoce también que varios efectores de tipo III inhiben irreversiblemente a quinasas cercanas a RIPK, pudiendo interferir con la activación de RPM1, dando a entender que la regulación de la fosforilación de RIN4 ha estado en el punto de mira del proceso de evolución en patógenos de forma repetida (Feng *et al.*, 2012).

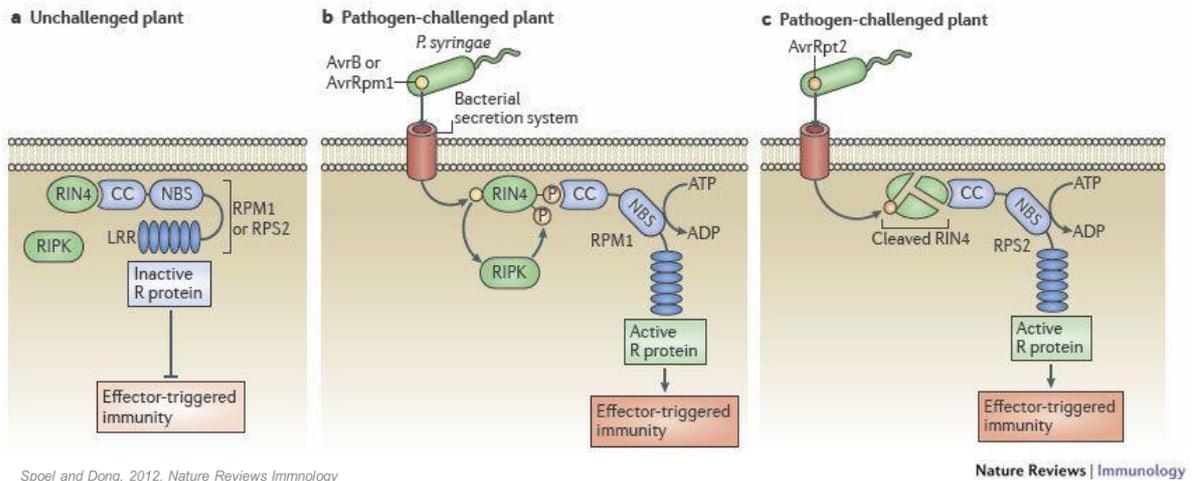


Figura 1. Modelo de reconocimiento indirecto de los efectores de tipo III de *Pseudomonas syringae* AvrB, AvrRpm1 y AvrRpt2 por las proteínas de resistencia de *Arabidopsis thaliana* RPM1 y RPS2, a través de la proteína intermediaria RIN4, para la activación de la respuesta de defensa (Spoel & Dong, 2012).

El segundo dogma determina que es lógico que estas moléculas accesorias con las que interactúan los efectores de tipo III tengan más de una proteína R que las “guarde”. RPS2 (resistance to *Pseudomonas syringae* 2) es una NB-LRR también de *Arabidopsis* que induce resistencia frente a *P. syringae* expresora del efector de tipo III AvrRpt2. Se trata del tercer efector de esta bacteria que interactúa con RIN4, en este caso provocando su eliminación post transcripcional gracias a su actividad cisteín proteasa, tanto en ausencia como en presencia de RPS2 (Axtell & Staskawicz, 2003). El objetivo de todo el mecanismo sería el mismo que con AvrB y AvrRpm1, primero la perturbación de RIN4, con una adicional interferencia con RPM1 en el caso de AvrRpt2 (Rittera & Dangla, 1996), para mejorar el crecimiento de la colonia bacteriana y su virulencia; la cual induce la activación de RPS2 con la consecuente segunda línea de defensa ETI (Fig. 1). Se demostró que así era observando cómo un aumento en la expresión de RIN4 inhibía la función de RPS2 y AvrRpt2, mientras su desaparición activaba RPS2. RPS2 y RIN4 debían interactuar en la planta antes de la infección, en ausencia de AvrRpt2, indicando que el reconocimiento de la presencia del patógeno por RPS2 era un resultado de la eliminación de RIN4. Esta interacción, al igual que con RPM1, AvrB y

AvrRpm1, se lleva a cabo a nivel de la parte interna de la membrana plasmática (Axtell & Cell, 2003; Mackey *et al.*, 2003). De todos modos, RIN4 y RPM1 no son los únicos objetivos de AvrRpt2 en la planta (Belkhadir *et al.*, 2004). Su actividad proteolítica también elimina proteínas, posiblemente asociadas con RIN4, requeridas para la transducción de la señal dependiente de PAMPs (Kim *et al.*, 2005). Esta inducción de diferentes modificaciones post traduccionales de RIN4 por parte de distintos efectores de tipo III ofrece una respuesta a la pregunta de cómo un número limitado de proteínas NB-LRR son capaces de detectar un gran número de efectores no relacionados estructuralmente.

Adicionalmente, se conoce que RIN4 no solo es “guardado” por las proteínas R RPM1 y RPS2, sino que también se encarga de bloquear su activación inapropiada. La inserción de un T-DNA en el gen *RIN4*, anulando la expresión de la proteína, es letal a nivel embrionario. Esta letalidad revertía en plantas *rin4 rps2*, dando a entender que era causada por una activación inapropiada de la respuesta inmune desde momentos tempranos en el desarrollo (Mackey *et al.*, 2003). Aun así, gracias a RPM1, tenían la capacidad de mantener una defensa a nivel basal, siendo eliminada en mutantes triples *rin4 rps2 rpm1*. Cabe destacar que este RPM1 residual no funcionaba a partir de la transducción de señales procedente de AvrB y AvrRpm1, demostrando que su activación también es negativamente regulada por RIN4 (Belkhadir *et al.*, 2004).

En el intrincado conjunto de interacciones moleculares que regulan la respuesta inmune al reconocimiento de *P. syringae*, también parece jugar un papel importante la proteína NDR1 (non-race-specific disease resistance 1), compartida por las vías de señalización de RIN4-RPS2 y RIN4-RPM1 (Century *et al.*, 1997). Es una proteína de membrana anclada a través de una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI), de la cual se conocía su importancia en Arabidopsis en la activación de la resistencia a patógenos mediada por la clase NB-LRR de proteínas R (Coppinger *et al.*, 2004). Se demostró, mediante un doble híbrido seguido de varias co-inmunoprecipitaciones in vivo, que su porción N-terminal interacciona con RIN4 y que esta interacción es necesaria para favorecer la activación de la defensa tras la infección de *P. syringae* expresora de AvrRpt2, aunque no para la inducción de virulencia por este efector de tipo III en plantas susceptibles. Esto se dedujo al observar que la sobreexpresión de NDR1 hiperactivaba la respuesta inducida por RPS2 y que al interferir con el contacto RIN4-NDR1 aumentaba la susceptibilidad a infección por esta cepa. Se postuló que esta interacción probablemente funcione como un elemento adicional de regulación positiva de la respuesta de resistencia, modulando la cantidad de RIN4 libre para regular a su vez la activación de RPS2 (Day *et al.*, 2006).

De esta asociación descrita de RIN4 con múltiples componentes de la señalización requerida

para la resistencia de *Arabidopsis* a *P. syringae*, se deduce su funcionamiento como interruptor molecular en la célula vegetal, modulando a diferentes niveles varias rutas de defensa basales y en respuesta a efectores de tipo III. RIN4 pertenece a una familia de proteínas específica de plantas denominada RIN4-like o NOI (por sus siglas en inglés, NO₃-induced), formada por 15 miembros en *Arabidopsis* (Sun *et al.*, 2014). Proteínas ortólogas a RIN4 se han encontrado desde musgos a plantas superiores. Estas proteínas comparten tres zonas altamente conservadas: dos dominios NOI, uno en la región N-terminal (N-NOI) y otro en la zona C-terminal (C-NOI) y un motivo de anclaje a membrana rico en cisteínas en el extremo C-terminal. Entre los dominios NOI se sitúa una larga región desordenada y con poca identidad de secuencia (Sun *et al.*, 2014). Además de proteínas con dos dominios NOI, existen proteínas más cortas con un solo dominio NOI que se agrupan en un clado junto a los fragmentos C-terminales de las proteínas con dos dominios (Afzal *et al.*, 2011).

Al analizar la expresión de los 15 miembros de la familia NOI en *Arabidopsis* mediante RNAseq a distintos tiempos de infestación con *T. urticae*, cuatro genes de la familia de *RIN4* no caracterizados previamente aumentaron su expresión. En consecuencia, estos genes podrían estar involucrados en la defensa de la planta frente a estreses bióticos, como lo está *RIN4*. Como se ha descrito anteriormente, *RIN4* presenta una estructura altamente desordenada que ejerce una función de andamiaje en su interacción con diferentes proteínas presentes en la cascada de señalización en respuesta a estreses bióticos. Entre ellas se encuentran proteínas asociadas a resistencia como RPM1, RPS2, RIPK o NDR1.

1.2 Objetivos

Partiendo de estos resultados, el principal objetivo de este trabajo es analizar las interacciones entre las proteínas RIN4-like inducidas por el ácaro y diferentes proteínas candidatas como RPM1, RPS2, RIPK y NDR1; que, según la literatura, interaccionan con *RIN4*.

Para ello se propusieron los objetivos específicos:

1. Análisis comparativo de secuencias de las proteínas RIN4-like utilizando diferentes herramientas bioinformáticas y búsqueda de posibles interactores *in silico*.
2. Amplificación por PCR de la secuencia codificante de los interactores candidatos RPM1, RPS2, RIPK y NDR1.
3. Clonación de las secuencias codificantes de *RIN4*, de las proteínas RIN4-like y de los interactores elegidos amplificados en vectores de expresión necesarios para realizar la técnica del doble híbrido.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Análisis de las secuencias de proteínas de la familia de RIN4 y búsqueda de interactores *in silico*

Las secuencias de las proteínas RIN4 y RIN4-like se obtuvieron de la base de datos TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) y su alineamiento múltiple se realizó mediante el programa MUSCLE de EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Para la predicción de las regiones intrínsecamente desordenadas se hizo uso de la interfaz web IUPred2A (<https://iupred2a.elte.hu/>).

Se utilizó la base de datos de interacciones moleculares BioGRID (<https://thebiogrid.org/>) para la búsqueda de interacciones experimentalmente determinadas.

2.2 Diseño de oligonucleótidos y PCR

Los pares de oligonucleótidos fueron diseñados en ambos extremos de la secuencia codificante o CDS (por sus siglas en inglés) de los genes de interés, obtenida de la base de datos TAIR. Para su diseño se usaron programas que calculan la temperatura de fusión (también conocida como temperatura de *melting*, T_m) y predicen la formación de estructuras secundarias y dímeros como Tm Calculator (Thermo Fisher Scientific), OligoAnalyzer Tool (IDT, Integrated DNA Technologies) y Sequence Manipulation Suite (<https://www.bioinformatics.org/>). Para asegurar su especificidad, se realizaron alineamientos utilizando TAIR BLAST.

Se les añadieron colas en 5' con dianas de restricción que fuesen compatibles con el sitio de clonación del vector de entrada Gateway pENTR1A. Para la selección y diseño de las dianas se hizo uso de la herramienta NEBCutter (New England Biolabs, <https://nc2.neb.com>).

Fueron suministrados por IDT y se emplearon para realizar PCR con la polimerasa Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) en un termociclador BioRad T100, utilizando como molde cDNA sintetizado previamente en el laboratorio a partir de rosetas de *A. thaliana*. Sus secuencias, sitios de restricción añadidos en 5' y temperaturas de fusión empleadas en la PCR están especificados en la Tabla 1. Se programó una reacción de PCR con gradiente de temperatura con el objetivo de ajustar la temperatura de fusión óptima para cada pareja de oligonucleótidos.

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para este trabajo con sus dianas de restricción y temperaturas de fusión utilizadas.

Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	T _m (°C)
Interactores de RIN4			
<i>RPM1</i> (AT3G07040)	(KpnI) <u>GGTACCGAATGGCTTCGGCT</u> ACTGTTG	(XhoI) <u>CTCGAGTAAGATGAGAGGCTCACATA</u> GAAAG	62.8
<i>RPS2</i> (AT4G26090)	(SalI) <u>GTCGACATGGATTTTCATCTC</u> ATCTCTTATC	(EcoRV) <u>GATATCTACAATTTGGAACAAAGCG</u>	57.4
<i>RIPK</i> (AT2G05940)	(SalI) <u>GTCGACATGGCGGTGAAGAA</u> GAAAG	(EcoRV) <u>GATATCTATAGTACCGTTCCCCACC</u>	60.9
<i>NDRI</i> (AT3G20600)	(SalI) <u>GTCGACATGAATAATCAAAA</u> TGAAGACACAG	(EcoRV) <u>GATATCTATAACGAATAGCAAAGAAT</u> ACGAG	59.4
Proteínas RIN4-like			
<i>AT3G07195.1</i>	(BamHI) <u>GGATCCGGATGGGGCAAACC</u> GTCCACACGTTT	(XhoI) <u>CTCGAGAAATATTTACTTCCCCTGCGG</u> CACC	68.3
<i>AT3G07195.2</i>	(BamHI) <u>GGATCCGGATGGCAAACCGT</u> CCACACGTTCCGAAG	(XhoI) <u>CTCGAGACATCAAAACACAAATTCTAA</u> CGATG	63.9

2.3 Vectores

Los vectores utilizados, sus características y su función aparecen en la Tabla 2.

Tabla 2. Vectores empleados.

Vector	Tamaño (pb)	Resistencia	Uso
pGEM-T easy (Promega)	3,015	Carbenicilina	Subclonación
pENTR1A (Invitrogen, Life Technologies)	2,717	Kanamicina	Vector de entrada para tecnología Gateway
pDEST22 (Invitrogen, Life Technologies)	12,266	Carbenicilina	Vector destino para tecnología Gateway. Expresión en levadura
pDEST32 (Invitrogen, Life Technologies)	8,930	Gentamicina	Vector destino para tecnología Gateway. Expresión en levadura

2.4 Geles de agarosa

Los productos de PCR o los productos de digestión con enzimas de restricción fueron analizados en geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón TE (1X: Tris 10 mM y EDTA 1mM) y bromuro de etidio 0.004% (v/v), permitiendo su visualización mediante un transiluminador ultravioleta (Bio-Rad). Las muestras a analizar se cargaron mezcladas con 2 μ L de tampón de carga 10x y el primer pocillo siempre se reservó al marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific).

2.5 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Las bandas de DNA de interés se escindieron de los geles de agarosa y purificaron usando el Qiaex II Gel Extraction Kit de Qiagen. La agarosa se solubilizó a 56°C en un termobloque y se mezcló con 10 μ L de resina, aplicando vórtex cada 2 minutos para una correcta mezcla y resuspensión. La resina se lavó, se dejó secar completamente y se añadieron 15 μ L de tampón Tris 10 mM pH 8.5 para eluir el DNA de la resina. Tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, la resina se precipitó centrifugando 30 segundos a 13,000 rpm y se separó del DNA purificado, que se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher).

2.6 Ligación del gen de interés a pGEM-T easy

El producto de PCR purificado fue sujeto a la adición de dATP a cada extremo 3' de la doble cadena (A-tailing). Para ello se empleó 1 μL de tampón de la polimerasa ExTaq (Takara), 1 μL de polimerasa Ex Taq (Takara) y 0.2 mM de dATPs (Promega), junto con el DNA purificado y H_2O hasta un volumen final de 10 μL . La reacción se incubó 30 minutos a 72°C en el termociclador.

La reacción de ligación a pGEM-T easy se llevó a cabo según el protocolo especificado por el fabricante, usando 3 μL del producto de la reacción de adición de dATP y 1 μL (50 ng) de vector.

2.7 Ligación del gen de interés a pENTR1A

Se digirieron el vector pGEM-T easy con los genes de interés y el vector pENTR1A con las enzimas de restricción correspondientes según las colas de los oligonucleótidos diseñados (Tabla 1). Tras la separación de las muestras por electroforesis, se escindieron las bandas necesarias del gel y se purificaron (apartado 2.5).

Para la reacción de ligación se emplearon 100 ng de vector pENTR1A y 17 ng de inserto, junto con 1 μL de Ligase 10x Buffer, 1 μL de T4 DNA Ligase y H_2O hasta un volumen final de 10 μL . Las muestras se incubaron hasta el día siguiente a 4°C.

2.8 Inserción del gen de interés a pDEST22 y pDEST32 por recombinación

Para realizar la reacción de recombinación LR entre las colas L (*attL1* y *attL2*) y las colas R (*attR1* y *attR2*) se usaron 150 ng de pENTR1A (vector origen) y 150 ng de vectores destino del sistema Gateway pDEST22 y pDEST32, 6 μL de tampón TE (pH 8) y 0.5 μL de LR Clonase II enzyme mix (Invitrogen). Después de aplicar vortex y una corta centrifugación, las muestras se incubaron a 25°C en el termobloque durante 24 horas. Para parar la reacción se añadió 1 μL de solución de Proteinasa K a las muestras y se incubaron a 37°C 10 minutos.

2.9 Transformación de células competentes

La transformación de la cepa químicamente competente DH5 α *Escherichia coli* con 10 μL de DNA plasmídico se realizó mediante shock térmico a 42°C durante 40 segundos. Tras 5 minutos en hielo, las células se recuperaron durante 1 hora en agitación a 37°C en 500 μL de LB (10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura y 10 g/L NaCl). Las células transformadas (80 μL) se

extendieron en placas de LB sólido con la resistencia correspondiente (Carbenicilina 75 µg/mL, Kanamicina 50 µg/mL o Gentamicina 20 µg/mL). En el caso de pGEM-T easy, se añadieron previamente al medio solidificado 20 µL de X-gal 50 mg/mL y 80 µL de IPTG 0.1M.

2.10 Extracción y cuantificación de DNA plasmídico

La extracción y purificación de DNA plasmídico se realizó a partir de cultivos de *E. coli* crecidos durante un día en 4 mL de medio líquido LB con el antibiótico correspondiente en un agitador orbital a 200 rpm a 37°C. Se utilizó el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega, y para su posterior cuantificación se empleó el espectrofotómetro NanoDrop 1000 de Thermo Fisher.

2.11 Digestión con enzimas de restricción

Se emplearon 700 ng de DNA, 2 µL de tampón de la enzima de restricción correspondiente, 1 µL de enzima de restricción (Takara) y H₂O hasta un volumen final de 20 µL. Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 37°C (con la excepción de *BamHI*, que se incubó a 30°C) en el termobloque y las bandas resultantes se analizaron en electroforesis en gel de agarosa.

2.12 Secuenciación

Se utilizaron 500 ng de DNA plasmídico, 2.5 µL de oligonucleótido 10 mM y H₂O hasta un volumen final de 10 µL. Se enviaron para su secuenciación por electroforesis capilar a la compañía Macrogen.

En el caso de las construcciones en pDEST22 y pDEST32 los oligonucleótidos empleados fueron los que se diseñaron para levantar cada gen de interés, mientras que para las construcciones en pGEM-T easy se usó el oligonucleótido de secuenciación M13 reverso (5'-3') CAGGAAACAGCTATGAC.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

Cuatro genes RIN4-like aumentaron su expresión significativamente en respuesta a la infestación con *T. urticae*, según datos de un RNAseq realizado previamente en el laboratorio. La expresión se inducía especialmente a los 30 minutos de exposición con el ácaro. Sin embargo, el gen *RIN4* no aumentó su expresión (Tabla 3).

Tabla 3. Cambios significativos en la expresión de cuatro genes RIN4-like y *RIN4* obtenidos en el análisis mediante RNAseq a partir de rosetas de *A. thaliana* infestadas con el ácaro *T. urticae*.

Gen	Descripción	30'	1h	3h	24h
AT3G25070	RIN4	ns	ns	ns	ns
AT2G17660	RIN4-like	3.66	2.65	2.43	ns
AT3G07195	RIN4-like	4.63	2.32	2.53	3.45
AT3G48450	RIN4-like	3.79	2.39	2.51	3.14
AT5G48657	RIN4-like	2.65	2.83	4.16	3.13

3.1 Análisis bioinformático de las proteínas RIN4-like

Con el objetivo de identificar los principales dominios y motivos conservados en las secuencias de las proteínas de RIN4 y de la familia de RIN4, se llevó a cabo un alineamiento múltiple (Fig. 2).

Dos de estas proteínas, AT3G07195 y AT5G48657, presentan una longitud similar a RIN4, y mantienen los dos dominios NOI N-terminal y C-terminal. Las otras dos proteínas, AT2G17660 y AT3G48450, son más cortas y solo presentan el dominio NOI C-terminal con el motivo conservado PxFGxW, correspondiente al sitio de corte de AvrRpt2. Las cuatro proteínas mantienen el motivo Y/FTxxF, que contiene el residuo de tirosina fosforilado por los efectores de tipo III AvrRpm1 y AvrB; así como los residuos de cisteína terminales requeridos para el anclaje a la membrana plasmática. Según la herramienta de predicción de regiones desordenadas IUPred, se aprecia que todas las proteínas analizadas son intrínsecamente desordenadas, como ya se conocía en el caso de RIN4. Estas regiones han sido descritas como potenciales andamiajes de interacción con otras proteínas.

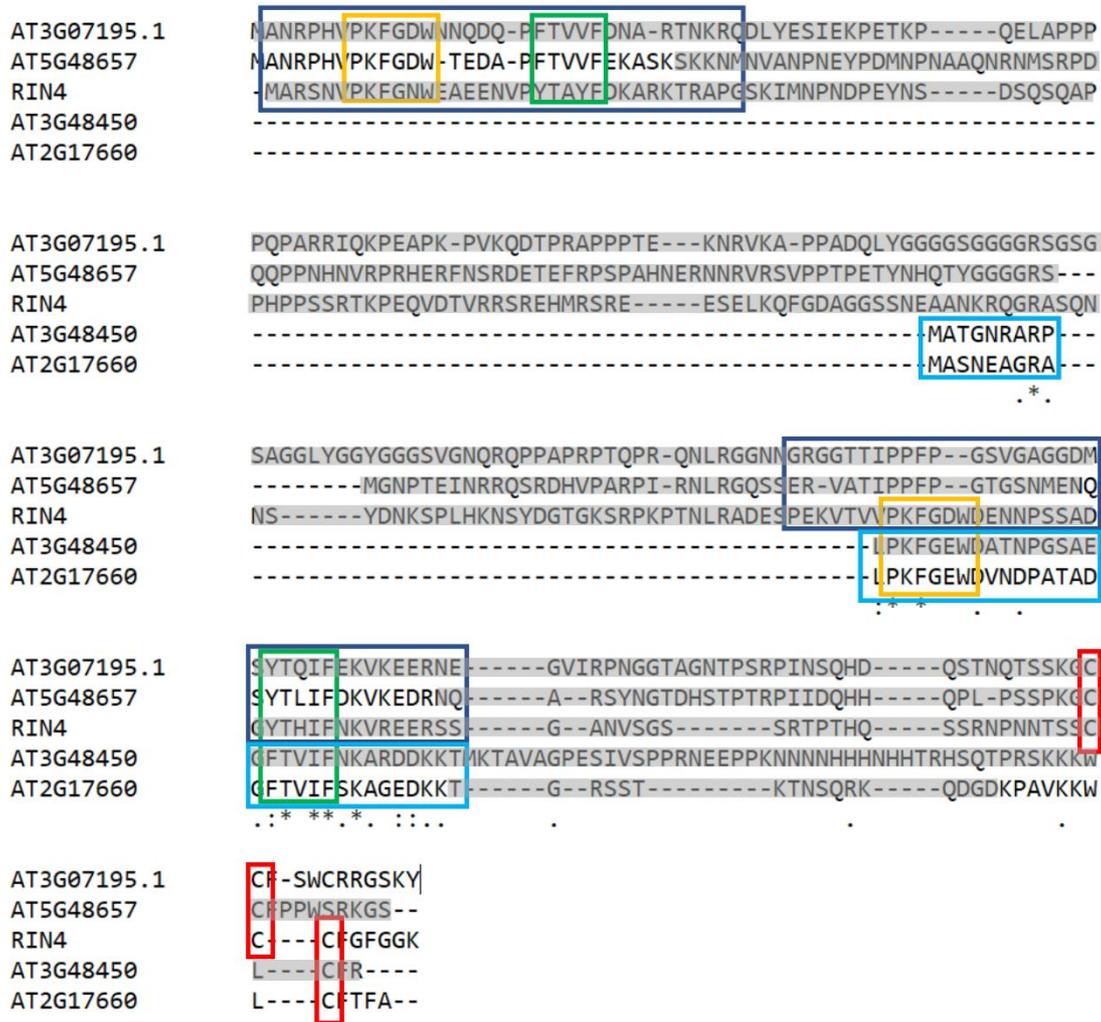


Figura 2. Alineamiento múltiple de las proteínas RIN4-like seleccionadas (AT2G17660, AT3G07195.1, AT3G48450, AT5G48657) y RIN4. Los dos dominios NOI N-terminal y C-terminal de RIN4, AT3G07195.1 y AT5G48657 aparecen recuadrados en azul oscuro mientras que AT2G17660 y AT3G48450 solo presentan un dominio NOI, recuadrado en azul más claro. El motivo conservado PxFGxW está señalado en amarillo. El segundo motivo conservado Y/FTxxF aparece en color verde. Los residuos de cisteína terminales están marcados en rojo. Por último, las regiones intrínsecamente desordenadas se observan sombreadas en color gris.

3.2 Búsqueda de interactores experimentalmente determinados

Como RIN4 está descrita como proteína con regiones intrínsecamente desordenadas y las proteínas elegidas de su familia tienen regiones similares, se visualizaron todas las proteínas interactoras de RIN4 determinadas experimentalmente utilizando la herramienta BioGRID (Fig. 3).

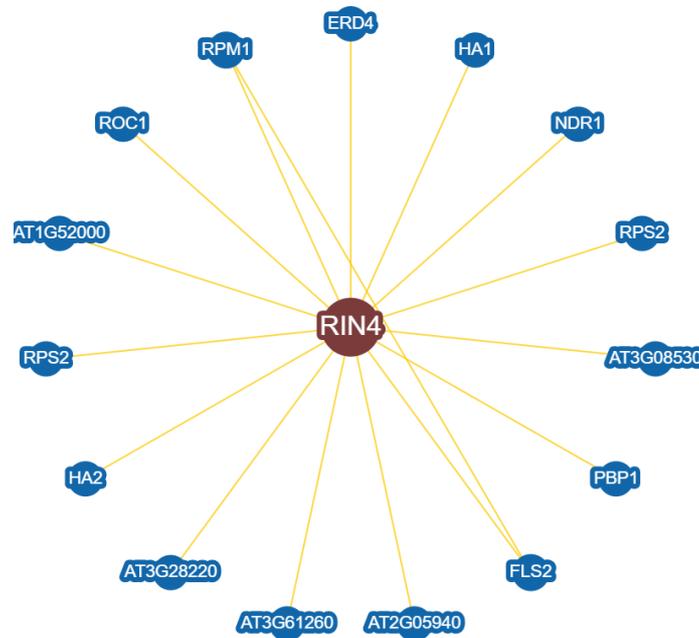


Figura 3. Interactores de RIN4 experimentalmente determinados.

Entre ellas, se encontraron muchas proteínas implicadas en la defensa de la planta, de las que se eligieron RPM1, RPS2, RIPK y NDR1 por sus niveles de expresión en infestación con *T. urticae*, determinados como en el caso de las proteínas de la familia de RIN4 en un RNAseq previamente realizado en el laboratorio (Tabla 4).

Tabla 4. Cambios significativos en la expresión de cuatro genes que codifican proteínas interactoras de RIN4 obtenidos en un análisis mediante RNAseq a partir de rosetas de *A. thaliana* infestadas con el ácaro *T. urticae*.

Gen	Descripción	30'	1h	3h	24h
AT3G07040	RPM1	1.18	ns	ns	ns
AT2G05940	RIPK	1.20	ns	ns	ns
AT3G20600	NDR1	2.41	ns	ns	ns
AT4G26090	RPS2	1.43	ns	ns	ns

3.3 Diseño de oligonucleótidos y PCR

Una vez seleccionados los posibles interactores (RPM1, RPS2, RIPK y NDR1) candidatos a interactuar con las proteínas RIN4-like seleccionadas (AT2G17669, AT3G07195, AT3G48450 y AT5G48657), se procedió a obtener su región codificante. Para ello, se diseñaron parejas de oligonucleótidos para cada gen, en concreto, para la región codificante (CDS) de

cada uno con el fin de evitar amplificar los intrones y las regiones UTR ya que se utilizó como molde cDNA de rosetas de *A. thaliana* Col-0.

Este diseño se llevó a cabo de manera que posibilitasen un buen anillamiento a la región de interés en una reacción de PCR; evitando la formación de homodímeros, heterodímeros y estructuras secundarias. Se usaron en el proceso diversas herramientas bioinformáticas. Se incluyeron en sus extremos 5' colas con dianas de restricción con el fin de, posteriormente, permitir una adecuada ligación al vector de entrada del sistema Gateway pENTR1A (Fig. 4). Las dianas se seleccionaron siguiendo dos condiciones: debían formar parte de los sitios de clonación múltiple del vector, pero no podían estar presentes en el gen de interés para evitar cortes durante las digestiones. En algunos casos, fue necesario añadir nucleótidos en el oligonucleótido directo entre la diana de restricción añadida y el codón de inicio de la transcripción ATG para conservar la pauta de lectura; mientras que en el oligonucleótido reverso se eliminó el codón de parada, con el fin de poder expresar los genes fusionados a distintos dominios codificados en los vectores destino.

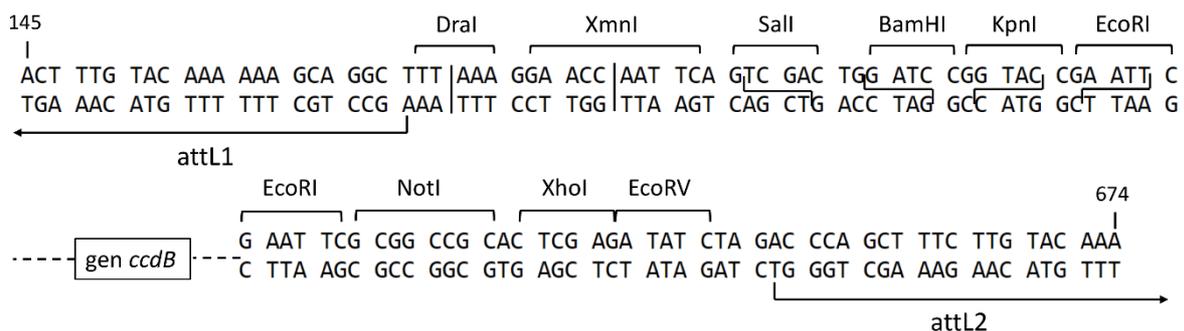


Figura 4. Sitios de clonación del vector de entrada del sistema Gateway pENTR1A.

Para *NDRI*, por ejemplo, los oligonucleótidos diseñados fueron:

- Directo con cola *Sall*: GTC GAC ATGAATAATCAAATGAAGACACAG. En este caso no fue necesario añadir nucleótidos adicionales porque los tripletes de la cola *Sall* escogida cuadraban con el codón inicio de la transcripción ATG.
- Reverso con cola *EcoRV*: CTCGTATTCTTTGCTATTCGTTAT AGA TAT C. Para evitar la parada de la transcripción por el codón TAA, se cambió el último nucleótido, que pasó a codificar para una tirosina. Además, se añadió inmediatamente después una adenina (A) que permitiese cuadrar la pauta de lectura del gen con la de la diana *EcoRV* en pENTR1A.

Se diseñaron, además, dos oligonucleótidos para la conversión a la isoforma 1 del gen RIN4-like *AT3G07195* a partir de la isoforma 2, previamente amplificada en el laboratorio y ligada al vector pENTR1A, ya que la isoforma 1 se corresponde con el transcrito de referencia del gen. Ambas isoformas son idénticas en su región N-terminal y varían en la zona C-terminal. Se realizaron tres reacciones de PCR consecutivas empleando en cada una el producto de la anterior. Uno de los oligonucleótidos se diseñó para su fusión parcial en 5' a la isoforma 2 del gen y contenía parte de la secuencia de la isoforma 1 en 3'. El segundo oligonucleótido se diseñó para su fusión en 5' a la secuencia añadida con el anterior, mientras que en 3' se incluyó una nueva secuencia de la isoforma 1. En la última reacción, se hizo uso de una pareja de oligonucleótidos de la que disponía el laboratorio para completar esta isoforma 1 (Fig. 5).



Figura 5. Esquema de las isoformas 1 y 2 del gen RIN4-like *AT3G07195*. La secuencia de los oligonucleótidos que se fusionan al DNA molde (isoforma 2 o producto de PCR) aparece en rojo y la que no, aparece en verde.

Los productos de amplificación de la isoforma 1 de *AT3G07195* (685 pares de bases, pb) y *NDR1* (669 pb) se analizaron por electroforesis en gel de agarosa, de donde se escindieron las bandas correspondientes para la extracción y purificación del DNA (Fig. 6). No se consiguió la obtención de productos de PCR de las regiones codificantes de *RPM1*, *RPS2* y *RIPK*.

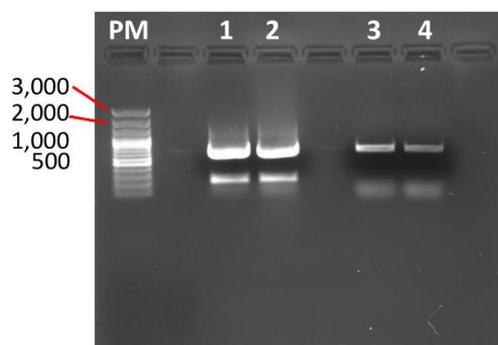


Figura 6. Productos de PCR de *AT3G07195.1* y *NDR1* a partir de cDNA de *A. thaliana*. Las columnas 1 y 2 representan el producto de PCR de la región codificante de la isoforma 1 de *AT3G07195*. Las columnas 3 y 4 se corresponden con el producto de PCR de la región codificante de *NDR1*.

3.4 Ligación a pGEM-T easy

Los genes de interés purificados se ligaron al vector de subclonación pGEM-T easy, un vector linealizado cuyos extremos cohesivos 5' con timinas (T) aumentan la eficiencia de clonación de productos de PCR con extremos cohesivos con adeninas (A) en 3'. Debido a esto se añadió, previamente a la ligación, dATP en los extremos 3' del DNA purificado. Además, se calculó la cantidad de inserto necesaria en la reacción de ligación según el tamaño de cada gen, para que la ratio inserto:vector fuese 3:1 según la fórmula:

$$\frac{50 \text{ ng vector} \times \text{Kb inserto}}{\text{Kb vector (3.015 Kb)}} \times 3$$

pGEM-T easy permite la selección de transformantes basados en el marcador *lacZ*. Este gen, que se expresa solo si el vector recirculariza y no contiene al inserto, codifica para una β -galactosidasa que, junto con el inductor IPTG y el sustrato X-gal, genera un producto azul que colorea la colonia. De esta forma, después de la transformación de *E. coli* con los productos de ligación, se seleccionaron las colonias blancas para su cultivo y extracción de DNA plasmídico.

El DNA plasmídico de las colonias elegidas se validó mediante digestión, utilizando las enzimas de restricción correspondientes a las dianas de restricción añadidas a las colas de los oligonucleótidos diseñados. Es posible diferenciar los vectores vacíos de los ligados al gen de interés porque se genera un patrón de corte diferente (Tabla 5).

Tabla 5. Patrones de digestión de las diferentes construcciones generadas por la clonación de los genes RIN4-like, *RIN4* y *NDR1* en los vectores empleados en este trabajo. Los tamaños de banda aparecen en pares de bases (pb).

Inserto	Enzimas	pGEM-T easy	pENTR1A	pDEST22	pDEST32
Vacío	<i>XhoI</i>			7437 / 1493	10560 / 1706
Vacío	<i>Sall/EcoRV</i>	3015	2253 / 464		
Vacío	<i>BamHI/XhoI</i>	3015	2267 / 450		
<i>AT2G17660</i>	<i>XhoI</i>			5264 / 1493 / 633	8515 / 1706 / 505
<i>AT3G07195.1</i>	<i>BamHI/XhoI</i>	3022 / 685	2267 / 685		

<i>AT3G48450</i>	<i>XhoI</i>			5264 / 1493 / 693	8515 / 1706 / 565
<i>AT5G48657</i>	<i>XhoI</i>			5264 / 1493 / 1083	8515 / 1706 / 955
<i>RIN4</i>	<i>XhoI</i>			5805 / 1493 / 512	9056 / 1706 / 364
<i>NDR1</i>	<i>Sall/EcoRV</i>	2986 / 669 / 33	2253 / 669		

Fue necesario digerir varias de las colonias seleccionadas hasta conseguir el patrón de bandas correcto, las cuales aparecen señaladas con una flecha (Fig. 7).

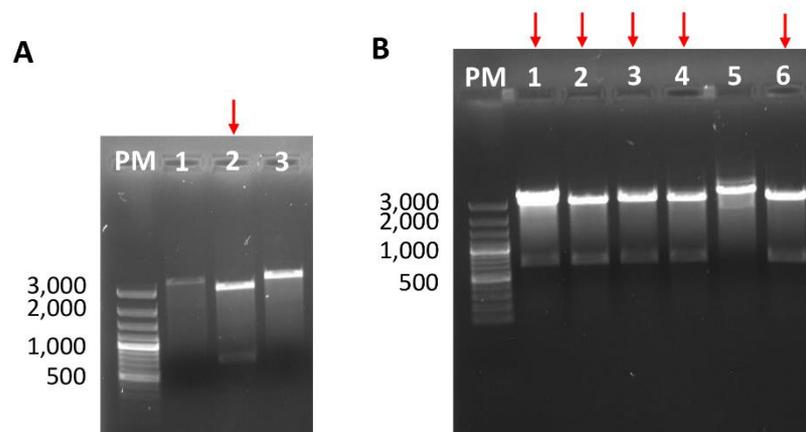


Figura 7. Comprobación por digestión de la inserción de *AT3G07195.1* y *NDR1* en el vector de subclonación pGEM-T easy. (A) Digestión *BamHI/XhoI* de la construcción pGEM-T easy-*AT3G07195*. (B) Digestión *Sall/EcoRV* de la construcción pGEM-T easy-*NDR1*. Las colonias con un patrón de digestión correcto aparecen señaladas en la imagen. PM = patrón de peso molecular (materiales y métodos).

Las colonias correctamente validadas se mandaron a secuenciar para verificar la ausencia de mutaciones puntuales y que la inserción del gen se había producido en la orientación adecuada (Fig. 8).

File: 1E6AZAE039_premix.ab1 Run Ended: 2020/3/10 3:41:25 Signal G:1103 A:1245 C:2300 T:2096
 Sample: 1E6AZAE039_premix Lane: 94 Base spacing: 15.112737 1461 bases in 17739 scans

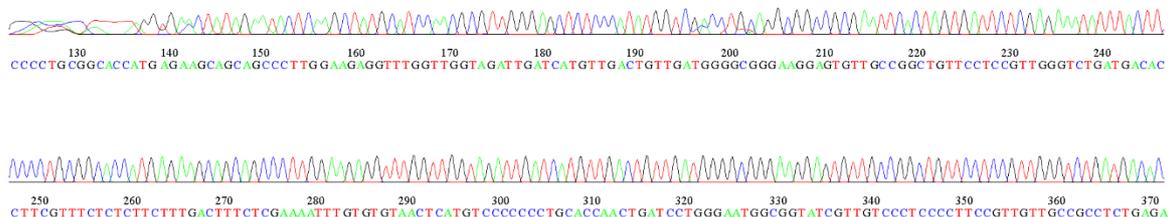


Figura 8. Cromatograma de la secuenciación de pGEM-T easy-*AT3G07195.1*.

3.5 Ligación a pENTR1A

Las construcciones correctas de pGEM-T easy-*AT3G07195* y pGEM-T easy-*NDR1* y el vector pENTR1A vacío se digirieron con las mismas enzimas de restricción empleadas en la digestión comprobación, para proceder a la ligación de los dos genes de interés a pENTR1A tras su escisión y purificación del gel de agarosa.

pENTR1A fue escogido como vector de entrada del sistema Gateway, permitiendo la recombinación de los genes de interés a los vectores de destino pDEST. En pENTR1A, el sitio de clonación múltiple está flanqueado por colas *attL1* y *attL2* (Fig. 4). Estas colas son reconocidas por la enzima LR Clonasa, que lleva a cabo una reacción de recombinación con los sitios *attR1* y *attR2* presentes en los vectores destino. Utilizando esta tecnología, se consigue una mayor eficiencia de clonación en sistemas de expresión específicos que utilizando únicamente la clonación tradicional basada en enzimas de restricción.

3.6 Inserción a pDEST22 y pDEST32 por recombinación

pDEST22 y pDEST32 fueron seleccionados como vectores destino del sistema Gateway por ser vectores de expresión en levadura, organismo en el que se llevan a cabo los ensayos de doble híbrido. pDEST22 contiene el dominio de unión a DNA y pDEST32 el dominio de activación del factor de transcripción GAL4, regulador positivo de la expresión de genes inducidos por galactosa. Al traducirse, estos dominios quedan unidos a las proteínas de interés de manera que, si interactúan entre ellas, el factor de transcripción queda restituido e induce la transcripción de un gen reportero.

Los genes RIN4-like junto con *RIN4*, a diferencia de la isoforma 1 de *AT3G07195* y *NDR1*, ya se encontraban clonados en pENTR1A en el laboratorio antes del comienzo del presente trabajo. Por tanto, se procedió a insertar las regiones codificantes de *AT2G17660*, *AT3G07195.1*, *AT3G48450*, *AT5G48657*, *RIN4* y *NDR1* en los vectores destino del sistema Gateway pDEST22 y pDEST32 por recombinación. La transferencia del inserto a estos vectores destino, sustituye al gen *ccdB* que confiere genotipo letal a las células DH5 α de *E. coli*, permitiendo únicamente el crecimiento de las células transformadas por vectores recombinantes.

De nuevo, el DNA plasmídico de las colonias recombinantes seleccionadas se validó por digestión con las enzimas de restricción correspondientes a los sitios de restricción de las colas de los oligonucleótidos diseñados. Se comprobó si la recombinación se había producido adecuadamente en cada construcción observando el patrón de corte en una electroforesis en gel

de agarosa. Todas las colonias dieron patrones de banda correctos excepto la segunda réplica biológica de pDEST32-*RIN4* (Fig. 9, Tabla 5). Las colonias verificadas se enviaron a secuenciar para asegurar que el gen de interés se encontraba en el lugar correcto del vector.

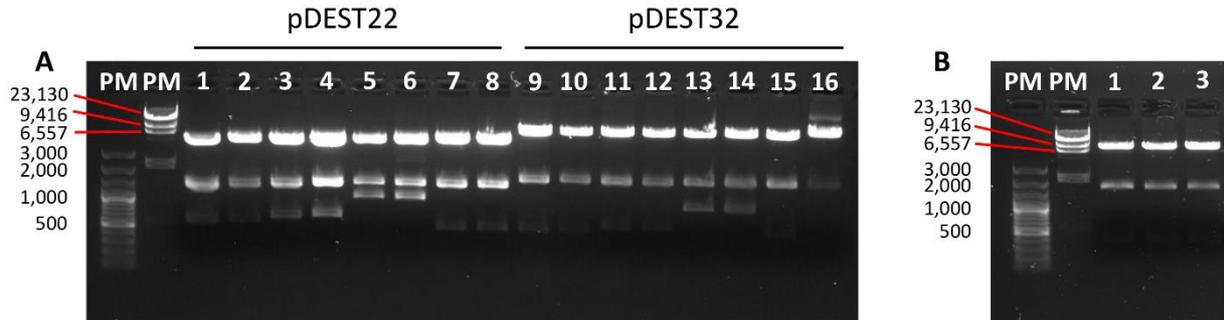


Figura 9. Comprobación por digestión de la inserción de los genes *RIN4*-like y *RIN4* en pDEST22 y pDEST32. (A) Digestión con *XhoI* de cuatro colonias de *AT2G17660* (columnas 1, 2, 9 y 10), *AT3G48450* (columnas 3, 4, 11 y 12), *AT5G48657* (columnas 5, 6, 13 y 14) y *RIN4* (columnas 7, 8, 15 y 16); con dos replicas biológicas por construcción. (B) Digestión de la construcción pDEST32-*RIN4* con *XhoI*.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

El papel de la proteína RIN4 en la inmunidad de la planta frente a patógenos bacterianos se ha estudiado en detalle (Ray *et al.*, 2019). La relevancia de su papel defensivo se apoya en la gran cantidad de efectores que producen modificaciones posttraduccionales en RIN4, su capacidad para interactuar con proteínas que regulan la apertura estomática y su interacción con proteínas implicadas en exocitosis (Kaundal *et al.*, 2017; Sabol *et al.*, 2017; Toruño *et al.*, 2019).

Aunque se ha sugerido un papel frente a otros patógenos en función de sus proteínas interactoras, no se ha postulado un papel en la defensa frente a plagas. Aunque RIN4 pertenece a una familia con 15 miembros en *Arabidopsis*, no se ha analizado el posible papel en defensa de otros miembros de esta familia. En un análisis transcriptómico mediante RNAseq se encontraron 4 genes de esta familia cuya expresión aumentaba tras la infestación con *T. urticae*, lo que sugiere alguna función de estas proteínas en la respuesta de la planta. RIN4 no se induce en respuesta a *T. urticae*, pero no se puede descartar que tenga un papel en la interacción planta-ácaro.

La comparación de las secuencias de RIN4 y las cuatro proteínas de la familia de RIN4 seleccionadas permite encontrar pistas sobre la posible función de dichas proteínas. Globalmente, los dos dominios NOI (N-terminal y C-terminal) de RIN4 en AT3G07195 y AT5G48657, mientras que en AT2G17660 y AT3G48450 se mantiene solo el N-terminal. Dentro de estos dominios, además, están conservados los motivos que juegan un papel clave en la función de RIN4 como proteína reguladora de la defensa inducida por PAMPs.

El primero de estos motivos es el sitio de corte PxFGxW del efector de tipo III de *P. syringae* AvrRpt2, necesario para la proteólisis de RIN4 inductora de la activación de la proteína de resistencia RPS2 (Mackey *et al.*, 2003). Esta diana se encuentra una vez en las proteínas RIN4-like, frente a las dos veces (una por dominio NOI) que aparece en la secuencia de RIN4. Está descrito que un derivado de RIN4 sin estos dos dominios pierde la capacidad de suprimir la respuesta PTI y que el corte por AvrRpt2 no elimina únicamente la proteína, sino que produce fragmentos que eficazmente cumplen con la función de RIN4 como regulador negativo de la primera línea de defensa frente a patógenos (Afzal *et al.*, 2011). También se ha demostrado que estos fragmentos se mantienen detectables en la planta tras la proteólisis y que AvrRpt2 es capaz de hidrolizar a varias proteínas con dominios NOI en *A. thaliana*, por lo que se hipotetiza que la conservación de esta diana de corte pueda funcionar como señuelo para evitar la eliminación de RIN4 (Van Der Hoorn & Kamoun, 2009).

En segundo lugar, se observan en el alineamiento los motivos Y/FTxxF, en este caso uno por dominio NOI en todas las proteínas de la familia de RIN4, al igual que en RIN4. Estos motivos contienen un residuo de tirosina cada uno que, en RIN4, se sabe son fosforilados por la quinasa RIPK (T21 y T166) en respuesta a los efectores de tipo III de *P. syringae* AvrB y AvrRpm1. La acumulación de RIN4 fosforilada mantenida en el tiempo induce, a su vez, la activación de la respuesta de defensa a efectores (ETI) a través de la proteína de resistencia RPM1 (Mackey *et al.*, 2002).

En el alineamiento también aparece la conservación de los residuos de cisteína en C-terminal que RIN4 requiere para su acilación y anclaje a la cara citoplasmática de la membrana. Según la literatura, la localización subcelular de RIN4 es esencial para el mantenimiento de su actividad. Derivados de la proteína sin las cisteínas terminales no eran capaces de anclarse a la membrana y provocaban una respuesta de muerte celular (Afzal *et al.*, 2011). Además, a pesar de no haber encontrado dominios transmembrana en su secuencia mediante los métodos de predicción, RPM1 y RPS2 también se localizan *in vivo* en la cara interna de la membrana plasmática (Axtell & Staskawicz, 2003; Boyes *et al.*, 1998; Takemoto & Jones, 2005).

Por último, se ha determinado mediante la herramienta de predicción IUPred que, al igual que RIN4, las cuatro proteínas de la familia de RIN4 presentan regiones intrínsecamente desordenadas en su secuencia. Está descrito que estas regiones funcionarían en RIN4 como elementos de plasticidad estructural para permitirle cumplir sus funciones de regulador negativo en varios puntos de la cascada de señalización de defensa frente a PAMPs y de molécula intermediaria en el reconocimiento indirecto de los efectores de tipo III AvrB, AvrRpm1 y AvrRpt2 por las proteínas de resistencia RPM1 y RPS2, respectivamente. Se ha hipotetizado que las proteínas intrínsecamente desordenadas son capaces de evolucionar más rápido por su mayor flexibilidad estructural, permitiendo así a la planta seguir los ritmos evolutivos de los patógenos, a la vez que mantienen los dominios y motivos que requieren para realizar sus funciones (Sun *et al.*, 2014).

La conservación en la secuencia de AT2G17660, AT3G07195, AT3G48450 y AT5G48657 de estos motivos y residuos clave para el cumplimiento de la función de defensa de RIN4, planteó la posibilidad de que estas cuatro proteínas pudiesen también interactuar con las mismas proteínas de resistencia que RIN4. Tras una búsqueda en base de datos de interactores de RIN4 demostrados experimentalmente (Fig. 3), se seleccionó a las proteínas RPM1, RPS2, RIPK y NDR1; en base a sus niveles de expresión en presencia de *T. urticae* (Tabla 4).

La planificación del presente trabajo consistía en, una vez clonados todos los genes de interés

en los vectores de expresión en levadura pDEST22 y pDEST32 (los genes de la familia de *RIN4*, *RIN4* y los interactores de *RIN4*), transformar con estas construcciones *Saccharomyces cerevisiae* con el objetivo de determinar mediante un ensayo de doble híbrido (Y2H) si existe o no una interacción de las proteínas RIN4-like con los interactores de RIN4 determinados experimentalmente. Sin embargo, las circunstancias originadas por la pandemia de SARS-CoV-2 imposibilitaron poder finalizar los experimentos por el cierre de las instalaciones del centro de investigación donde se encuentra el laboratorio.

Una vez conseguidas las construcciones, se habrían realizado los ensayos de Y2H, y en función de los resultados obtenidos se podría continuar por diferentes caminos. En caso de encontrar interacciones entre las proteínas RIN4-like con los interactores de RIN4, se podría sugerir una función de regulación de la activación de la defensa a efectores de tipo III similar a la de RIN4. Además, teniendo en cuenta la diferencia en tamaño y presencia de solo un dominio NOI en AT2G17660 y AT3G48450 frente a los dos de AT3G07195 y AT5G48657, sería de interés estudiar en el doble híbrido si las secuencias cortas interaccionan con las largas, lo cual indicaría una posible relación de regulación entre ellas. En los resultados del Y2H que diesen positivo, el siguiente paso consistiría en analizar si estas interacciones se mantienen truncando las secuencias de las proteínas RIN4-like para comprobar si estas interacciones se deben a los dominios NOI, o están implicadas con las regiones intrínsecamente desordenadas. Igualmente, se podría comprobar experimentalmente el papel de los residuos de tirosina conservados que son fosforilados por RIPK, mediante el uso de fosfomiméticos, para determinar posibles cambios en las interacciones en su estado fosforilado en comparación con el no fosforilado.

Por otro lado, sería interesante determinar las interacciones *in planta* mediante la técnica de complementación bimolecular con fluorescencia (BiFC), en la que cada proteína de interés se fusiona a cada una de las mitades de una proteína fluorescente. Si se recupera la fluorescencia al observar mediante microscopía los tejidos transformados con ambas construcciones se confirmaría la interacción.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. Las proteínas RIN4-like de *A. thaliana* cuya expresión se induce en respuesta al ácaro *T. urticae*, AT2G17660, AT3G07195, AT3G48450 y AT5G48657, comparten con RIN4 la presencia de dominios NOI, de zonas intrínsecamente desordenadas y de una zona de anclaje a membrana. Sin embargo, mientras que AT3G07195 y AT5G48657 mantienen los dos dominios NOI (N-terminal y C-terminal) de RIN4; AT2G17660 y AT3G48450 solo presentan un dominio NOI.
2. La conservación de los dominios NOI, requeridos por RIN4 para el mantenimiento de la regulación negativa de la respuesta de defensa a PAMPs y para la interacción con las proteínas de resistencia RPM1 y RPS2, sugiere un papel similar en la respuesta de defensa para las proteínas RIN4-like.
3. Se han encontrado distintas proteínas que interactúan con RIN4 en las bases de datos. Cuatro de ellas, RPM1, RPS2, RIPK y NDR1, también se inducen en respuesta a *T. urticae*, lo que podría significar una interacción de estas proteínas con las proteínas RIN4-like.
4. Las construcciones para el ensayo de doble híbrido en levadura, que no se pudieron completar por las restricciones debidas al SARS-Cov-2, nos habrían confirmado la existencia de dichas interacciones, abriendo nuevos caminos para profundizar en el papel de las proteínas RIN4-like en defensa.

BIBLIOGRAFÍA

- Afzal, A. J., da Cunha, L., & Mackey, D. (2011). Separable fragments and membrane tethering of Arabidopsis RIN4 regulate its suppression of PAMP-triggered immunity. *Plant Cell*, 23(10), 3798–3811. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.088708>
- Axtell, M., Cell, B. S.-, & 2003, undefined. (n.d.). Initiation of RPS2-specified disease resistance in Arabidopsis is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Elsevier*. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867403000369>
- Axtell, M. J., Chisholm, S. T., Dahlbeck, D., & Staskawicz, B. J. (2003). Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Molecular Microbiology*, 49(6), 1537–1546. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03666.x>
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., & Dinesh-Kumar, S. P. (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, 276(5313), 726–733. <https://doi.org/10.1126/science.276.5313.726>
- Basu, S., Varsani, S., & Louis, J. (2018, January 1). Altering plant defenses: Herbivore-associated molecular patterns and effector arsenal of chewing herbivores. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-17-0183-FI>
- Belkhadir, Y., Nimchuk, Z., Hubert, D. A., Mackey, D., & Dangl, J. L. (2004). Arabidopsis RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by RPS2 and RPM1 downstream or independent of the NDR1 signal modulator and is not required for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *Plant Cell*, 16(10), 2822–2835. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024117>
- Bensoissan, N., Estrella Santamaria, M., Zhurov, V., Diaz, I., Grbić, M., & Grbić, V. (2016). Plant-herbivore interaction: Dissection of the cellular pattern of *Tetranychus urticae* feeding on the host plant. *Frontiers in Plant Science*, 7(JULY2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01105>
- Boyes, D. C., Jaesung, N. *, & Dangl, J. L. (1998). The Arabidopsis thaliana RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Plant Biology* (Vol. 95). Retrieved from www.pnas.org.
- Cazaux, M., Navarro, M., Bruinsma, K. A., Zhurov, V., Negrave, T., Van Leeuwen, T., ... Grbic, M. (2014). Application of two-spotted spider mite tetranychus urticae for plant-pest interaction studies. *Journal of Visualized Experiments*, (89). <https://doi.org/10.3791/51738>
- Century, K., Shapiro, A., Repetti, P., ... D. D.-, & 1997, undefined. (n.d.). NDR1, a pathogen-induced component required for Arabidopsis disease resistance. *Science.Sciencemag.Org*. Retrieved from <https://science.sciencemag.org/content/278/5345/1963.short>
- Chen, Z., Kloek, A. P., Boch, J., Katagiri, F., & Kunkel, B. N. (2000). The *Pseudomonas syringae* avrRpt2 gene product promotes pathogen virulence from inside plant cells. *Molecular Plant-*

Microbe Interactions, 13(12), 1312–1321. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.12.1312>

- Chisholm, S., Coaker, G., Day, B., Cell, B. S.-, & 2006, undefined. (n.d.). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Elsevier*. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867406001838>
- Chung, E. H., El-Kasmi, F., He, Y., Loehr, A., & Dangl, J. L. (2014). A plant phosphoswitch platform repeatedly targeted by type III effector proteins regulates the output of both tiers of plant immune receptors. *Cell Host and Microbe*, 16(4), 484–494. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.09.004>
- Coppinger, P., Repetti, P. P., Day, B., Dahlbeck, D., Mehlert, A., & Staskawicz, B. J. (2004). Overexpression of the plasma membrane-localized NDR1 protein results in enhanced bacterial disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 40(2), 225–237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02203.x>
- Day, B., Dahlbeck, D., & Staskawicz, B. J. (2006). NDR1 interaction with RIN4 mediates the differential activation of multiple disease resistance pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18(10), 2782–2791. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044693>
- DeLucia, E. H., Nabity, P. D., Zavala, J. A., & Berenbaum, M. R. (2012). Climate change: Resetting plant-insect interactions. *Plant Physiology*, 160(4), 1677–1685. <https://doi.org/10.1104/pp.112.204750>
- Díaz-Riquelme, J., Zhurov, V., Rioja, C., Pérez-Moreno, I., Torres-Pérez, R., Grimplet, J., ... Grbic, V. (2016). Comparative genome-wide transcriptome analysis of *vitis vinifera* responses to adapted and non-adapted strains of two-spotted spider mite, *tetranychus urticae*. *BMC Genomics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2401-3>
- Duran-Flores, D., & Heil, M. (2016, August 1). Sources of specificity in plant damaged-self recognition. *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.019>
- Espinosa, A., & Alfano, J. R. (2004, November). Disabling surveillance: Bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cellular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00452.x>
- Feng, F., Yang, F., Rong, W., Wu, X., Zhang, J., Chen, S., ... Zhou, J. M. (2012). A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature*, 485(7396), 114–118. <https://doi.org/10.1038/nature10962>
- Grant, M., Godiard, L., Straube, E., ... T. A.-, & 1995, undefined. (n.d.). Structure of the *Arabidopsis* RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science.ScienceMag.Org*. Retrieved from <https://science.sciencemag.org/content/269/5225/843.short>
- Grbić, M., Leeuwen, T. Van, Clark, R., Nature, S. R.-, & 2011, undefined. (n.d.). The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature.Com*. Retrieved from

<https://www.nature.com/articles/nature10640>

- Kaundal, A., Ramu, V., Oh, S., Lee, S., ... B. P.-T. P., & 2017, undefined. (n.d.). GENERAL CONTROL NONREPRESSIBLE4 degrades 14-3-3 and the RIN4 complex to regulate stomatal aperture with implications on nonhost disease. *Am Soc Plant Biol*. Retrieved from http://www.plantcell.org/content/29/9/2233?utm_source=TrendMD&utm_medium=cpc&utm_campaign=Plant_Cell_TrendMD_0
- Kim, M. G., Da Cunha, L., McFall, A. J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J. L., & Mackey, D. (2005). Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell*, *121*(5), 749–759. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.025>
- Liu, J., Elmore, J. M., Lin, Z. J. D., & Coaker, G. (2011). A receptor-like cytoplasmic kinase phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor. *Cell Host and Microbe*, *9*(2), 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.01.010>
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Dangl, J. L. (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell*, *112*(3), 379–389. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00040-0)
- Mackey, D., Holt, B. F., Wiig, A., & Dangl, J. L. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*, *108*(6), 743–754. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00661-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00661-X)
- Martel, C., Zhurov, V., Navarro, M., Martinez, M., Cazaux, M., Auger, P., ... Grbic, V. (2015). Tomato Whole Genome Transcriptional Response to *Tetranychus urticae* Identifies Divergence of Spider Mite-Induced Responses Between Tomato and *Arabidopsis*. / *343 MPMI*, *28*(3), 343–361. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-14-0291-FI>
- Meck, E. D., Walgenbach, J. F., & Kennedy, G. G. (2012). Association of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) feeding and gold fleck damage on tomato fruit. *Crop Protection*, *42*, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.07.027>
- Meyers, B. C., Dickerman, A. W., Michelmore, R. W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W., & Young, N. D. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *The Plant Journal*, *20*(3), 317–332. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00606.x>
- Mithöfer, A., & Boland, W. (2012). Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. *Annual Review of Plant Biology*, *63*(1), 431–450. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103854>
- Nimchuk, Z., Marois, E., Kjemtrup, S., Leister, R., Cell, F. K.-, & 2000, undefined. (n.d.). Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Elsevier*. Retrieved from

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400808466>

Park, Y., Entomology, J. L.-J. of E., & 2002, undefined. (n.d.). Leaf cell and tissue damage of cucumber caused by twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *Academic.Oup.Com*. Retrieved from <https://academic.oup.com/jee/article-abstract/95/5/952/2217643>

Ray, S., Macoy, D., Kim, W., ... S. L.-M. and, & 2019, undefined. (n.d.). Role of RIN4 in regulating PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity: current status and future perspectives. *Ncbi.Nlm.Nih.Gov*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6681865/>

Rittera, C., & Dangla>b, J. L. (1996). *Interference between Two Specific Pathogen Events Mediated by Distinct Plant Disease Recognition Resistance Genes*. *The Plant Cell* (Vol. 8). American Society of Plant Physiologists. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/8/2/251.short>

Sabol, P., Kulich, I., botany, V. Ž.-J. of experimental, & 2017, undefined. (n.d.). RIN4 recruits the exocyst subunit EXO70B1 to the plasma membrane. *Academic.Oup.Com*. Retrieved from <https://academic.oup.com/jxb/article-abstract/68/12/3253/3038177>

Santamaría, M. E., Hernández-Crespo, P., Ortego, F., Grbic, V., Grbic, M., Diaz, I., & Martinez, M. (2012). Cysteine peptidases and their inhibitors in *Tetranychus urticae*: A comparative genomic approach. *BMC Genomics*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-307>

Santamaria, M. E., Martínez, M., Cambra, I., Grbic, V., & Diaz, I. (2013, August 21). Understanding plant defence responses against herbivore attacks: An essential first step towards the development of sustainable resistance against pests. *Transgenic Research*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s11248-013-9725-4>

Spider Mites Web: Home page. (n.d.). Retrieved May 7, 2020, from <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb/>

Spoel, S. H., & Dong, X. (2012, February 25). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3141>

Sun, X., Greenwood, D. R., Templeton, M. D., Libich, D. S., McGhie, T. K., Xue, B., ... Rikkerink, E. H. A. (2014). The intrinsically disordered structural platform of the plant defence hub protein RPM1-interacting protein 4 provides insights into its mode of action in the host-pathogen interface and evolution of the nitrate-induced domain protein family. *FEBS Journal*, *281*(17), 3955–3979. <https://doi.org/10.1111/febs.12937>

Suzuki, T., Nunes, M. A., España, M. U., Namin, H. H., Jin, P., Bensoussan, N., ... Grbic, M. (2017). RNAi-based reverse genetics in the chelicerate model *Tetranychus urticae*: A comparative analysis of five methods for gene silencing. *PLoS ONE*, *12*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180654>

Suzuki, T., Urizarna, M., 1, E., Nunes, M. A., Zhurov, V., Dermauw, W., ... Grbic, V. (2017). Protocols

- for the delivery of small molecules to the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Journals.Plos.Org*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180658>
- Takemoto, D., & Jones, D. A. (2005). Membrane release and destabilization of Arabidopsis RIN4 following cleavage by *Pseudomonas syringae* AvrRpt2. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(12), 1258–1268. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-1258>
- Toruño, T. Y., Shen, M., Coaker, G., & Mackey, D. (2019, November 12). Regulated disorder: Posttranslational modifications control the RIN4 plant immune signaling hub. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. American Phytopathological Society. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-18-0212-FI>
- Vacante, V. (2015). The handbook of mites of economic plants: identification, bio-ecology and control. Retrieved from https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=yc4_CwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&ots=ovzgooeHpX&sig=h5LEFIB0qBIQKNPtcZB_EuBKY-g
- Van Der Hoorn, R. A. L., & Kamoun, S. (2009). PERSPECTIVE From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell*, 20. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194>
- Van Leeuwen, T., Tirry, L., Yamamoto, A., Nauen, R., & Dermauw, W. (2015). The economic importance of acaricides in the control of phytophagous mites and an update on recent acaricide mode of action research. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.009>
- Wilkinson, S. W., Magerøy, M. H., López Sánchez, A., Smith, L. M., Furci, L., Cotton, T. E. A., ... Ton, J. (2019). Surviving in a Hostile World: Plant Strategies to Resist Pests and Diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 57(1), 505–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-095959>
- Wu, J., & Baldwin, I. T. (2010). New Insights into Plant Responses to the Attack from Insect Herbivores. *Annual Review of Genetics*, 44(1), 1–24. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163500>
- Wybouw, N., Zhurov, V., Martel, C., Bruinsma, K. A., Hendrickx, F., Grbic, V., & Van Leeuwen, T. (2015). Adaptation of a polyphagous herbivore to a novel host plant extensively shapes the transcriptome of herbivore and host. *Molecular Ecology*, 24(18), 4647–4663. <https://doi.org/10.1111/mec.13330>
- Ximénez-Embún, M. G., Castañera, P., & Ortego, F. (2017). Drought stress in tomato increases the performance of adapted and non-adapted strains of *Tetranychus urticae*. *Journal of Insect Physiology*, 96, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.10.015>
- Yamaguchi, Y., & Huffaker, A. (2011, August 1). Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.05.001>

Zebelo, S., Botany, M. M.-J. of E., & 2015, undefined. (n.d.). Role of early signalling events in plant–insect interactions. *Academic.Oup.Com*. Retrieved from <https://academic.oup.com/jxb/article-abstract/66/2/435/2893261>

Zhurov, V., Navarro, M., Bruinsma, K. A., Arbona, V., Santamaria, M. E., Cazaux, M., ... Grbi, V. (2014). Reciprocal Responses in the Interaction between Arabidopsis and the Cell-Content-Feeding Chelicerate Herbivore Spider Mite 1[W][OPEN]. *Plant Physiology* *0*, 164, 384–399. <https://doi.org/10.1104/pp.113.231555>