



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Departamento de Biotecnología

---

**Implicación de las modificaciones de tRNA y  
del metabolismo de los folatos en la  
respuesta inmune de Arabidopsis**

MEMORIA DE TESIS PRESENTADA POR

**Beatriz González García**

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN  
BIOTECNOLOGÍA POR LA  
UNIVERSIDAD POLITÈCNICA DE VALENCIA

DIRECTOR

**Dr. Pablo Vera Vera**

Valencia, Julio 2017





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



El Dr. Pablo Vera Vera, Profesor de Investigación del CSIC, perteneciente al Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP, CSIC-Universidad Politécnica de Valencia) de Valencia.

CERTIFICA:

que la Licenciada en Biotecnología Beatriz González García ha realizado bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas el trabajo que lleva por título “Implicación de las modificaciones de tRNA y del metabolismo de los folatos en la respuesta inmune de Arabidopsis”, y autoriza su presentación para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Valencia, a 20 de junio de 2017.

Dr. Pablo Vera Vera



*A mi familia,*

*por enseñarme los valores del esfuerzo, dedicación y lucha  
continua en la vida, y a buscar siempre el por qué de las cosas.*



# ÍNDICE

RESUMEN .....	17
RESUM .....	19
ABSTRACT.....	21
ABREVIATURAS.....	23
INTRODUCCIÓN.....	31
1. El sistema de inmunidad en la planta .....	33
1.1. Introducción general.....	33
1.2. Interacción planta-patógeno.....	34
1.2.1. Defensa pasiva o constitutiva.....	34
1.2.2. Defensa activa o inducible.....	35
1.3. Respuestas defensivas .....	40
1.4. El concepto de priming en inmunidad.....	45
1.5. Regulación epigenética.....	48
2. Modificaciones de los tRNAs.....	53
2.1. Síntesis de los tRNAs .....	53
2.2. Características de las modificaciones post-transcripcionales.....	54
2.3. Relevancia funcional.....	56
3. Los folatos en la planta .....	57
3.1. Aspectos generales.....	57
3.2. Síntesis, transporte y regulación.....	59
3.3. Reacciones dependientes de folatos .....	63
4. Metionina, un aminoácido esencial en la planta.....	65

4.1.	Síntesis de metionina .....	65
4.2.	Regulación del contenido en metionina .....	68
5.	La genética química como herramienta de trabajo.....	70
5.1.	Características generales .....	70
5.2.	Aplicaciones en biología vegetal.....	72
6.	Antecedentes del trabajo .....	73
	OBJETIVOS .....	77
	RESULTADOS.....	81
	CAPÍTULO 1.....	83
1.	Resumen.....	85
2.	Introducción .....	86
3.	Resultados .....	89
3.1.	Identificación de <i>scs9</i> .....	89
3.2.	Las plantas <i>scs9</i> mantienen intactos los componentes de la inmunidad innata y la inmunidad mediada por SA.....	92
3.3.	<i>SCS9</i> es At5g01230 y codifica una 2'- <i>O</i> -ribosa metiltransferasa de tRNA .....	96
3.4.	<i>SCS9</i> complementa la mutación <i>trm7Δ</i> de levadura .....	100
3.5.	El mutante <i>scs9</i> es hipersensible a paramomicina y rosa de bengala	102
3.6.	<i>SCS9</i> se localiza en el núcleo .....	104
3.7.	<i>SCS9</i> se requiere para la metilación 2'- <i>O</i> -ribosa de tRNA <i>in vivo</i> .....	105
3.8.	Otras modificaciones de tRNA no son esenciales para la inmunidad.	110
4.	Discusión.....	113
5.	Materiales y Métodos .....	118
5.1.	Mapeo e identificación del gen <i>SCS9</i> .....	119



5.2.	Construcciones génicas, expresión en levadura y plantas transgénicas...	120
5.3.	Tratamientos con flg22 y quitosano .....	121
5.4.	Ensayos de paramomicina y rosa de bengala .....	122
5.5.	Cuantificación de antocianinas y SA .....	122
5.6.	Ensayo de inhibición por NaCl .....	123
5.7.	Extracción de tRNA, digestión y análisis HPLC y LC-MS .....	124
5.8.	Análisis northern blot de tRNA .....	125
5.9.	Líneas de inserción de T-DNA y oligos utilizados .....	126
	CAPÍTULO 2 .....	129
1.	Resumen .....	131
2.	Introducción .....	132
3.	Resultados .....	135
3.1.	Las sulfonamidas promueven la activación transcripcional de <i>Ep5C::GUS</i> .....	135
3.2.	Las sulfonamidas promueven la fosforilación de MPK3/MPK6 y sensibilizan para un incremento en la acumulación de PR1 mediada por SA.....	137
3.3.	Sulfadiazina (SDZ) induce resistencia a <i>P.s.</i> DC3000 .....	138
3.4.	La inhibición de la ruta metabólica de los folatos promueve la resistencia a <i>P.s.</i> DC3000 .....	142
3.5.	El tratamiento con ácido fólico aumenta la susceptibilidad a <i>P.s.</i> DC3000 .....	144
3.6.	<i>P.s.</i> DC3000 promueve la sobreacumulación de metionina sintasa (METS1) en plantas <i>scs9</i> .....	146
3.7.	La sobreexpresión de <i>METS1</i> incrementa la susceptibilidad a <i>P.s.</i> DC3000 .....	151

3.8. La metilación de DNA se incrementa de manera global por la sobreexpresión de <i>METS1</i> .....	155
4. Discusión.....	161
5. Materiales y Métodos .....	166
5.1. Rastreo de genética química directa.....	167
5.2. Condiciones de aplicación de los diferentes compuestos.....	167
5.3. Estudio de la actividad antibiótica de SDZ sobre el crecimiento de <i>P.s.</i> DC3000 .....	168
5.4. Cuantificación del nivel de SA.....	168
5.5. Análisis proteómico .....	169
5.6. Construcción génica <i>35S::METS1-YFP</i> .....	169
5.7. Análisis de letalidad embrionaria .....	170
5.8. Análisis del nivel de metilación.....	170
5.9. Líneas de inserción de T-DNA y oligos utilizados.....	171
DISCUSIÓN GENERAL .....	173
CONCLUSIONES .....	183
MATERIALES Y MÉTODOS.....	187
1. Condiciones de crecimiento de las plantas .....	189
2. Ensayo de inoculación con <i>P.s.</i> DC3000 y análisis de la tasa de crecimiento.....	189
3. Tinción histoquímica para analizar la actividad GUS.....	190
4. Análisis de la deposición de calosa.....	191
5. Extracción de DNA y RNA.....	191
6. PCR y RT-qPCR.....	192
7. Extracción de proteínas y western blot.....	192
8. Tratamiento de inducción por SA .....	193

9.	Transformación estable de plantas de <i>Arabidopsis</i> .....	193
10.	Expresión transitoria en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	194
	BIBLIOGRAFÍA .....	195



# ÍNDICE DE FIGURAS

## Introducción

Figura 1. Esquema de la teoría de co-evolución planta-patógeno.....	36
Figura 2. Modelo de percepción de SA dependiente de NPR1, NPR3 y NPR4.	43
Figura 3. Esquema del concepto de priming en inmunidad de plantas. ....	46
Figura 4. Esquema de los 3 mecanismos responsables de la metilación de DNA en plantas .....	50
Figura 5. Estructura química de THF y sus derivados .....	58
Figura 6. Rutas de síntesis de metionina .....	66
Figura 7. Inducción de <i>P69C::GUS</i> como mecanismo de respuesta a la infección por <i>P.s.</i> DC3000 y por la aplicación exógena de SA.....	73
Figura 8. Inducción específica en tomate de <i>Ep5C</i> en respuesta a la infección por <i>P.s.</i> DC3000 y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	75
Figura 9. Inducción de <i>Ep5C::GUS</i> en Arabidopsis tras una infección por <i>P.s.</i> DC3000 y la aplicación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	75

## Capítulo 1

Figura 1. Caracterización de las plantas <i>scs9</i> .....	91
Figura 2. Caracterización del mutante <i>scs9</i> .....	93
Figura 3. <i>scs9</i> es un alelo mutante de At5g01230.....	98
Figura 4. Complementación de la cepa <i>tm7Δ</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con el cDNA de <i>SCS9</i> de Arabidopsis, e hipersensibilidad de las plántulas <i>scs9-2</i> a paramomicina y rosa de bengala .....	101
Figura 5. Localización nuclear de <i>SCS9</i> .....	105

Figura 6. Contenido reducido de 2'-*O*-metilcitosina (Cm), 2'-*O*-metiluracilo (Um) y 2'-*O*-metilguanina (Gm) en mutantes *scs9-1* y *scs9-2* .....107

Figura 7. Mutantes tipo *trm* y resistencia a enfermedad frente a *P.s.* DC3000. ....113

## Capítulo 2

Figura 1. Caracterización de las sulfonamidas identificadas como moléculas promotoras de priming de la respuesta inmune.....137

Figura 2. SDZ induce resistencia frente a *P.s.* DC3000 con independencia de la ruta de SA .....141

Figura 3. FA complementa el efecto de SDZ en *Arabidopsis* .....143

Figura 4. FA induce la susceptibilidad frente a *P.s.* DC3000 sin implicación de la ruta de SA.....145

Figura 5. Análisis proteómico comparativo de plantas Col-0, *scs9-1* y *scs9-2* inoculadas con *P.s.* DC3000 (3 d.p.i) .....147

Figura 6. La sobreexpresión de *METS1* promueve un incremento en la susceptibilidad a *P.s.* DC3000 .....152

Figura 7. La sobreexpresión de *METS1* produce un incremento en la metilación de DNA.....157

## Suplementarias Capítulo 1

Figura S1. Alineación de las secuencias de aminoácidos de SCS9 de *Arabidopsis* con las MTasas de tRNA .....100

Figura S2. Ensayos de inhibición por NaCl de la germinación de las semillas (A) y del crecimiento de las plántulas (B).....103

Figura S3. Cromatograma de HPLC de nucleósidos modificados derivados de tRNA.....108

Figura S4. Efecto de *P.s.* DC3000 en el contenido del nucleósido Gm en las plántulas Col-0, *scs9-1* y *scs9-2*.....109

Figura S5. Fenotipos de los mutantes *trm* de *Arabidopsis* .....111

## Suplementarias Capítulo 2

Figura S1. Ensayo de crecimiento de <i>P.s.</i> DC3000 en plantas de <i>Arabidopsis</i> crecidas en cultivo hidropónico tras tratamiento con SDZ o DMSO (mock).....	139
Figura S2. La resistencia inducida por SDZ no es debida a un efecto antibiótico del compuesto .....	140
Figura S3. Imágenes DeCyder de los análisis proteómicos 2D-DIGE (Fig. 5A). .....	149
Figura S4. Localización subcelular de <i>35S::METS1-YFP</i> .....	153
Figura S5. Caracterización del desarrollo de plantas <i>35S::METS1-YFP</i> .....	155
Figura S6. La sobreexpresión de <i>METS1</i> mantiene el incremento en la metilación de DNA tras la infección por <i>P.s.</i> DC3000 .....	159
Figura S7. La infección por <i>P.s.</i> DC3000 produce una reducción en la metilación de DNA en plantas Col-0 .....	160
Figura S8. La infección por <i>P.s.</i> DC3000 produce una reducción en la metilación de DNA en plantas <i>35S::METS1</i> .....	160

# ÍNDICE DE TABLAS

## Capítulo 1

Tabla 1. Marcadores SSLPs utilizados en el mapeo de la mutación *scs9*.....120

Tabla 2. Líneas de inserción de T-DNA para el mutante *scs9-2* y los mutantes de tipo *trm*. Secuencias de los oligos utilizados en los diferentes ensayos realizados en el Capítulo 1.....126

## Capítulo 2

Tabla 1. Líneas de inserción de T-DNA para el mutante *mets1-1*. Secuencias de los oligos utilizados en los diferentes ensayos realizados en el Capítulo 2...171

## Suplementarias Capítulo 1

Tabla S1. Acumulación de la proteína PR1 ..... 96

## Suplementarias Capítulo 2

Tabla S1. Lista de proteínas identificadas en los geles 2D-DIGE.....150



## RESUMEN

Las plantas, a lo largo de la evolución, han desarrollado un sofisticado entramado de rutas de señalización que permiten la activación y el control de la respuesta inmune. Identificar qué procesos metabólicos participan en modular la amplitud de dicha respuesta inmune es un reto en el campo de la interacción planta-patógeno. Con este propósito, se han utilizado dos aproximaciones genéticas llevadas a cabo en *Arabidopsis thaliana* contra la infección por la bacteria hemibiotrofa *Pseudomonas syringae* DC3000. Los resultados ponen de manifiesto la importancia de la regulación de dos mecanismos, a su vez relacionados, para la activación de una respuesta inmune efectiva. Mediante un rastreo genético en busca de componentes reguladores de la inmunidad, identificamos el mutante que denominamos *scs9* (*supresor de csb3*). *scs9* muestra una resistencia afectada que conlleva un incremento en la susceptibilidad a *P.s.* DC3000 a través de un mecanismo independiente a la respuesta inmune mediada por ácido salicílico (SA). La clonación y caracterización de *SCS9* revela que codifica una 2'-O-ribosa metiltransferasa de tRNA. Nuestros resultados indican que la modificación por metilación mediada por *SCS9* de los nucleósidos N32 y N34 de la región anticodón de los tRNAs, es clave para la inmunidad de la planta. Por otro lado, mediante un rastreo de genética química en busca de moléculas agonistas de la respuesta inmune, identificamos un grupo de sulfonamidas como moléculas activadoras de un mecanismo de priming. Este conlleva una más rápida y/o más intensa activación de la respuesta defensiva dependiente de SA y de un incremento de la resistencia frente a *P.s.* DC3000. El análisis del mecanismo de acción de dichas moléculas revela que la síntesis y acumulación de folatos ejerce un control negativo sobre la respuesta inmune frente a *P.s.* DC3000; y ese control es ejercido de manera independiente a la ruta de señalización mediada por SA. A través de un análisis proteómico comparativo identificamos la proteína 5-metiltetrahidropteroiltriglutamato homocisteína metiltransferasa 1 (*metionina sintasa*, denominada aquí *METS1*), responsable de la síntesis de metionina en el metabolismo C1 dependiente de folatos y sobreacumulada en los mutantes *scs9*. Esta proteína participa entonces como componente modulador de la respuesta inmune a

*P.s.* DC3000. La sobreexpresión de *METS1* en plantas transgénicas observamos que suprime la respuesta inmune y conlleva a un incremento en la susceptibilidad frente a *P.s.* DC3000. Dicho efecto represor de la resistencia acontece a raíz de un incremento del nivel de metilación de DNA en todo el genoma mediado por la sobreacumulación de *METS1* y del consiguiente posible aumento en la síntesis de metionina dependiente de folatos. Por tanto, estos resultados ahondan en el conocimiento de cómo la metilación de DNA y el control epigenético ejercen una influencia sobre la respuesta inmune. Esta influencia puede ser controlada a través del metabolismo de folatos, y en particular a través de *METS1*, enzima cuya síntesis está a su vez controlada por determinadas modificaciones de tRNA mediadas por *SCS9*.

# RESUM

Les plantes, al llarg de l'evolució, han desenvolupat un sofisticat entramat de rutes de senyalització que permeten l'activació i el control de la resposta immune. Identificar quins processos metabòlics participen en la modulació de l'amplitud d'aquesta resposta immune és un repte en el camp de la interacció planta-patogen. Amb aquest propòsit, s'han utilitzat dues aproximacions genètiques en *Arabidopsis thaliana* en resposta a la infecció pel bacteri hemibiotrofo *Pseudomonas syringae* DC3000. Els resultats posen de manifest la importància de la regulació de dos mecanismes, al seu torn relacionats, per a l'activació d'una resposta immune efectiva. Mitjançant un rastreig genètic per a la recerca de components reguladors de la immunitat, es va identificar el mutant que denominem *scs9* (*supresor de csb3*). *scs9* mostra una resistència afectada que comporta un increment en la susceptibilitat a *P.s.* DC3000 fent ús d'un mecanisme independent a la resposta immune mediada per l'àcid salicílic (SA). La clonació i caracterització de *SCS9* revela que codifica una 2'-*O*-ribosa metiltransferasa de tRNA. Els nostres resultats indiquen que la modificació per metilació mediada per *SCS9* dels nucleòsids N32 i N34 de la regió anticodó dels tRNAs, és clau per a la immunitat de la planta. D'altra banda, per mitjà d'un rastreig de genètica química per a la recerca de molècules agonistes de la resposta immune, es va identificar un grup de sulfonamidas com a molècules activadores d'un mecanisme de priming. Aquest, comporta una més ràpida i/o més intensa activació de la resposta defensiva dependent de SA i d'un increment de la resistència enfront de *P.s.* DC3000. L'anàlisi del mecanisme d'acció d'aquestes molècules revela que la síntesis i acumulació de folats exerceix un control negatiu sobre la resposta immune davant el bacteri *P.s.* DC3000; i eixe control és exercit de manera independent a la ruta de senyalització mediada per SA. Amb un anàlisi proteòmic comparatiu es va identificar la proteïna 5-metiltetrahydropteroyltriglutamato homocisteína metiltransferasa 1 (metionina síntasa, denominada ací *METS1*), responsable de la síntesi de metionina al metabolisme C1 dependent de folats i sobreacumulada en els mutants *scs9*. Aquesta, així doncs, es troba participant com a component modulador de la resposta immune a *P.s.* DC3000. La sobreexpressió de *METS1*

en plantes transgèniques suprimeix la resposta immune i comporta a un increment en la susceptibilitat per *P.s.* DC3000. L'efecte repressor de la resistència succeïx arran d'un increment del nivell de metilació de DNA en tot el genoma, mediat per la sobreacumulació de METS1 i del consegüent possible augment en la síntesi de metionina dependent de folats. Per tant, aquests resultats aprofundixen en el coneixement de com la metilació de DNA i el control epigenètic exerceixen una influència sobre la resposta immune. Aquesta influència pot ser controlada mitjançant el metabolisme de folats, i en particular a través de l'enzim METS1, la síntesi de la qual està al seu torn controlada per determinades modificacions de tRNA mediades per SCS9.

# ABSTRACT

Throughout evolution, plants have developed a sophisticated network of signaling pathways allowing the activation and regulation of immune responses. The identification of metabolic pathways which are involved in modulating the intensity of that immune responses is an important challenge in the field of plant-pathogen interaction. With this aim, we performed two genetic approaches in *Arabidopsis thaliana* against the disease caused by the hemibiotroph bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* DC3000. We demonstrate that the regulation of two pathways, related between them, is crucial to activate an effective immune response. By means of a genetic screening of regulators components of plant immunity, we identified the mutant *scs9* (*suppressor of csb3*) which shows an affected resistance that triggers a enhanced susceptibility to *P.s.* DC3000 through an independent pathway of salicylic acid (SA)-mediated immune response. The cloning and characterization of *SCS9* reveals that it codes for 2'-*O*-ribose tRNA methyltransferase. Our results indicate that the *SCS9*-mediated methylation of nucleosides N32 and N34, located in the tRNAs anticodon loop, is crucial for the plant immunity effectiveness. On the other hand, with a chemical genetic screening of agonist molecules of the immune response, we identified the sulfonamides as priming inducer molecules that exhibit a faster and/or stronger activation of SA-related defense responses and enhanced resistance to *P.s.* DC3000. Analysis of the mechanism of action of these molecules reveals that synthesis and accumulation of folates exert a SA-independent negative control on the immune response to *P.s.* DC3000. Through comparative proteomic analysis we identified the 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase 1 (*methionine synthase*, here named as *METS1*), enzyme responsible of the methionine synthesis in the folate-dependent 1C metabolism and overaccumulated in *scs9* mutants, as modulator component in the immune response to *P.s.* DC3000. We observed that the overexpression of *METS1* in transgenic plants of *Arabidopsis* suppresses plant immune responses and promotes enhanced susceptibility to *P.s.* DC3000. This repressor effect is due to a genome-wide increase in DNA methylation level, which is mediated by

the overaccumulation of METS1 and the consequent increase of folate-dependent methionine synthesis. Therefore, the findings of this work provide a deeper knowledge about the mechanisms by which the DNA methylation and epigenetic regulation exert an influence on plant immunity through folate metabolism, particularly by METS1, whose synthesis is regulated through specific tRNA modifications mediated by SCS9.

# **ABREVIATURAS**





<b>aaRSs</b>	Aminoacyl tRNA synthetase	Aminoacil ARNt sintetasa
<b>ABA</b>	Abscisic acid	Ácido abscísico
<b>ACC</b>	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid	Aminociclopropano-1-carboxilato
<b>ADC</b>	Aminodeoxychorismate	Aminodeoxicorismato
<b>ADCL</b>	Aminodeoxychorismate lyase	Aminodeoxicorismato liasa
<b>ADCS</b>	Aminodeoxychorismate synthase	Aminodeoxicorismato sintasa
<b>AGO</b>	Argonaute	Argonauta
<b>BABA</b>	$\beta$ -aminobutyric acid	Ácido $\beta$ -aminobutírico
<b>BS-seq</b>	Bisulfite sequencing	Secuenciación por bisulfito
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin	Albúmina de suero bovina
<b>BTH</b>	Benzothiadiazole	Benzotiadiazol
<b>C1</b>	1 Carbone	Carbono 1
<b>CBL</b>	Cystathionine $\beta$ -lyase	Cistationina $\beta$ -liasa
<b>CDS</b>	Coding sequence	Secuencia codificante
<b>CGS</b>	Cystathionine $\gamma$ -synthase	Cistationina $\gamma$ -sintasa
<b>-CH<sub>3</sub></b>	-Methyl	-Metilo
<b>Cm</b>	Methylcytosine	Metil citosina
<b>CMT</b>	Chromomethylase	Cromometilasa
<b>Csb3</b>	Constitutive subtilisin 3	Subtilisina constitutiva 3
<b>Cy</b>	Cyanine	Cianina
<b>d.p.i</b>	Days post-inoculation	Días post-inoculación
<b>DAMPs</b>	Damage-associated molecular patterns	Patrones moleculares asociados a daño
<b>DAP</b>	Dapsone	Dapsona
<b>DCL</b>	Dicer-like	Tipo-Dicer
<b>DE</b>		Desviación estándar
<b>DHF</b>	Dihydrofolate	Dihidrofolato
<b>DHFR</b>	Dihydrofolate reductase	Dihidrofolato reductasa
<b>DHFS</b>	Dihydrofolate synthase	Dihidrofolato sintasa
<b>DHN</b>	Dihydroneopterin	Dihidroneopterina
<b>DHNA</b>	Dihydroneopterin aldolase	Dihidroneopterina aldolasa
<b>DHP</b>	Dihydropteroate	Dihidropteroato
<b>DHPS</b>	Dihydropteroate synthase	Dihidropteroato sintasa

<b>DIGE</b>	2D-Difference gel Electrophoresis	Electroforesis 2D en gel diferencial
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNMT</b>	DNA methyltransferase	Metiltransferasa de ADN
<b>DRM2</b>	Domains rearranged methyltransferase 2	Metiltransferasa de reorganización de dominios 2
<b>EDS</b>	Enhanced disease susceptibility	Susceptibilidad aumentada a enfermedad
<b>EMS</b>	Ethyl methanesulfonate	Metanosulfonato de etilo
<b>ET</b>	Ethylene	Etileno
<b>EtBr</b>	Ethidium bromide	Bromuro de etidio
<b>ETI</b>	Effector-triggered immunity	Inmunidad activada por efectores
<b>ETS</b>	Effector-triggered susceptibility	Susceptibilidad activada por efectores
<b>FA</b>	Folic acid	Ácido fólico
<b>Flg</b>	Flagellin	Flagelina
<b>FPGS</b>	Folylpolyglutamate synthase	Folilpoliglutamato sintasa
<b>FW</b>	Forward	Directo
<b>GCHI</b>	GTP cyclohydrolase I	GTP ciclohidrolasa I
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein	Proteína verde fluorescente
<b>GGH</b>	$\gamma$ -Glutamyl Hydrolase	$\gamma$ -glutamil hidrolasa
<b>Gln</b>	Glutamine	Glutamina
<b>Glu</b>	Glutamic acid	Ácido glutámico
<b>Gm</b>	Methylguanosine	Metil guanosina
<b>GUS</b>	$\beta$ -glucuronidase	$\beta$ -glucoronidasa
<b>h.p.i</b>	Hours post-inoculation	Horas post-inoculación
<b>Hcys</b>	Homocysteine	Homocisteína
<b>HMDHP</b>	6-hydroxymethyl dihydropterin	6-hidroximetildihidropterina
<b>HMT</b>	Homocysteine methyltransferase	Homocisteína-S-metiltransferasa
<b>HOG</b>	Homology-dependent gene silencing	Silenciamiento génico dependiente de homología

<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography	Cromatografía líquida de alta eficacia
<b>HPPK</b>	HMDHP pyrophosphokinase	HMDHP pirofosfoquinasa
<b>HR</b>	Hypersensitive response	Respuesta hipersensible
<b>ICS1/SID2</b>	Isochorismate synthase 1	Isocorismato sintasa 1
<b>IR</b>	Induced resistance	Resistencia inducida
<b>ISR</b>	Induced systemic resistance	Resistencia sistémica inducida
<b>JA</b>	Jasmonic acid	Ácido jasmónico
<b>LATCA</b>	Library of active compounds in Arabidopsis	Colección de compuestos activos en Arabidopsis
<b>LC-MS</b>	Liquid chromatography-mass spectrometry	Cromatografía líquida-Espectometría de masas
<b>Leu</b>	Leucine	Leucina
<b>m<sup>1</sup>G</b>	1-methyl guanosine	1-metil guanosina
<b>m<sup>7</sup>G</b>	7-methyl guanosine	7-metil guanosina
<b>MAMPs</b>	Microbe-associated molecular patterns	Patrones moleculares asociados a microorganismos
<b>MAPKs/MPKs</b>	Mitogen activated protein kinases	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
<b>Met</b>	Methionine	Metionina
<b>METS</b>	Methionine synthase	Metionina sintasa
<b>MMT</b>	Methionine S-methyltransferase	Metionina-S-metiltransferasa
<b>MS</b>	Murashige & Skoog	
<b>MTA</b>	5'-methylthioadenosine	5-metiltioadenosina
<b>MTHFD</b>	Methylenetetrahydrofolate deshydrogenase	Metilenotetrahidrofolato deshidrogenasa
<b>MTHFR</b>	Methylenetetrahydrofolate reductase	Metilenotetrahidrofolato reductasa
<b>MTX</b>	Methotrexate	Metotrexato
<b>NA</b>	Nicotianamine	Nicotianamina
<b>NaCl</b>	Sodium chloride	Cloruro sódico

<b>NPR</b>	Non-expressor of Pathogenesis-Related genes	No-expresor de genes relacionados con patogénesis
<b>Ocp</b>	Overexpressor of cationic peroxidase	Sobreexpresor de la peroxidasa catiónica
<b>ORF</b>	Open reading frame	Marco de lectura abierto
<b>P.s.</b>	<i>Pseudomonas syringae</i>	
<b>pABA</b>	<i>p</i> -aminobenzoic acid	Ácido <i>p</i> -aminobenzoico
<b>PAL</b>	Phenylalanine ammonia lyase	Fenilalanina amonio-liasa
<b>PAMPs</b>	Pathogen-associated molecular patterns	Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PCG</b>	Protein coding gene	Gen codificante de proteína
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDF</b>	Plant defensin	Defensiva de plantas
<b>PF</b>		Peso fresco
<b>Phe</b>	Phenylalanine	Fenilalanine
<b>pI</b>	Isoelectric point	Punto isoeléctrico
<b>PIP</b>	Phosphatidylinositol phosphate	Fosfatidilinositol fosfato
<b>Pol</b>	Polymerase	Polimerasa
<b>PR</b>	Pathogenesis-Related	Relacionadas con patógenos
<b>PRRs</b>	Pattern recognition receptors	Receptores de reconocimiento de patrones
<b>PTI</b>	PAMP-triggered immunity	Inmunidad activada por PAMPs
<b>RdDM</b>	RNA-directed DNA methylation	Metilación de ADN dirigida por ARN
<b>RDR</b>	RNA-dependent RNA polymerase	ARN Polimerasa dependiente de ARN
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species	Especies reactivas de oxígeno

<b>RT-qPCR</b>	Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa por transcripción reversa
<b>RV</b>	Reverse	Reverso
<b>SA</b>	Salicylic acid	Ácido salicílico
<b>SAG</b>	$\beta$ -O-D-glucosalicylic acid	$\beta$ -O-D-glucosalicílico
<b>SAH</b>	S-adenosylhomocysteine	S-adenosilhomocisteína
<b>SAHH</b>	S-adenosylhomocysteine hydrolase	S-adenosilhomocisteína hidrolasa
<b>SAM</b>	S-adenosylmethionine	S-adenosilmetionina
<b>SAMS</b>	SAM synthase	SAM sintasa
<b>SAR</b>	Systemic acquired resistance	Resistencia sistémica adquirida
<b>SAR</b>	Structure-affinity relationship	Relación de estructura-afinidad
<b>SB</b>	Sulfabenzamide	Sulfabenzamida
<b>SBT</b>	Subtilase	Subtilasa
<b>SCH</b>	Sulfachloropyridazine	Sulfacloropiridazina
<b>SCS9</b>	Suppressor of csb3 9	Supresor de csb3 9
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate	Dodecilsulfato sódico
<b>SDZ</b>	Sulfadiazine	Sulfadiazina
<b>SGN</b>	Sulfaguanidine	Sulfaguanidina
<b>SHMT</b>	Serine hydroxymethyltransferase	Serina hidroximetiltransferasa
<b>siRNAs</b>	Small interfering RNAs	Pequeños ARNs de interferencia
<b>SMM</b>	S-methylmethionine	S-metilmetionina
<b>SMTH</b>	Sulfamethizole	Sulfametizol
<b>SMZ</b>	Sulfamethazine	Sulfametazina
<b>SNL</b>	Sulfanilamide	Sulfanilamida
<b>STH</b>	Sulfathiazole	Sulfatiazol
<b>T-DNA</b>	Transfer DNA	ADN de transferencia
<b>TCA</b>	Trichloroacetic acid	Ácido tricloroacético
<b>TE</b>	Transposable element	Elemento transponible
<b>TGS</b>	Transcriptional gene silencing	Silenciamiento génico transcripcional

<b>THF</b>	Tetrahydrofolate	Tetrahidrofolato
<b>tRFs</b>	tRNA-derived fragments	Fragmentos derivados de ARNts
<b>Trm</b>	tRNA methyltransferase	Metiltransferasa de ARNt
<b>tRNA</b>	Transfer RNA	ARN de transferencia
<b>Trp</b>	Tryptophan	Triptófano
<b>TTSS</b>	Type three secretion system	Sistema de secreción de tipo tres
<b>ufc</b>		Unidades formadoras de colonias
<b>Um</b>	Methyluridine	Metil uridina
<b>YFP</b>	Yellow fluorescent protein	Proteína amarilla fluorescente



# INTRODUCCIÓN





# 1. El sistema de inmunidad en la planta

## 1.1. Introducción general

Como organismos sésiles, las plantas han desarrollado un amplio espectro de mecanismos de adaptación con el fin de resistir los continuos cambios que se producen en su entorno. Por una parte, han de tolerar el estrés abiótico debido a alteraciones en la climatología, y que redundan en la disponibilidad de agua, cambios en la temperatura externa y alteraciones en la concentración de sales y en el contenido de micronutrientes en el sustrato sobre el que se desarrollan. Por otro lado, sufren las consecuencias del estrés biótico producido por la presencia de microorganismos (*e.g.*, virus, bacterias, hongos y nemátodos), insectos o animales, ante los cuales han de defenderse si son patógenos, o al menos adaptarse a su presencia si resultan beneficiosos para su desarrollo. En el sistema evolutivo de las diferentes interacciones planta-patógeno, la planta trata de impedir la entrada y propagación de patógenos de una manera inespecífica, a través de barreras estructurales ya preformadas en sus células y tejidos; y de una manera más específica, a través de diferentes metabolitos cuya síntesis se ve activada tras el reconocimiento de un patógeno. A su vez, los patógenos también desarrollan mecanismos con los que superar o evitar esas estrategias de defensa o alterar las rutas metabólicas de la planta para su propio beneficio y así conseguir ganar la batalla en la propagación de la especie. Sin embargo, como consecuencia del gasto energético y del daño producido en el proceso de infección o de su adaptación medioambiental específica, la planta puede ver afectado negativamente su desarrollo, composición de su metabolismo o su ciclo de vida con la consecuente manifestación de síntomas o de patologías características (Agrios, 2005a, b; Dodds y Rathjen, 2010).

Tanto las características de la planta como la naturaleza del agente patogénico, influirán en el tipo de estrategias utilizadas para establecer un sistema de inmunidad eficiente y adecuado para cada situación. Según el estilo de vida y la forma de entrada y propagación en la planta, los organismos patógenos se clasifican en dos grandes grupos: patógenos necrotrofos y biotrofos. El primero de ellos se alimenta de los nutrientes contenidos en las células muertas del tejido que infectan y destruyen tras la

invasión, mediante la producción de fitotoxinas y enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular. Por el contrario, los del segundo grupo se caracterizan por utilizar la energía disponible en la planta que hospedan y por nutrirse de sus tejidos vivos mediante el desarrollo de estructuras celulares propias del patógeno (Glazebrook, 2005). También existen patógenos vegetales que combinan ambos estilos de vida, y que se denominan patógenos hemibiotrofos, los cuales, tras la invasión de la planta a través de aperturas naturales y heridas, se multiplican alimentándose de tejido sano de la planta pero acabando, en la fase final del proceso infeccioso, con la maceración y necrosis del tejido infectado. Este es el caso de la bacteria *Pseudomonas syringae*, la cual es causante de enfermedades económicamente importantes en un amplio rango de cultivos (*e. g.*, enfermedad de la peca en Solanáceas). A pesar de que cada cepa de este género puede exhibir un alto grado de especificidad con el huésped que infecta, existe un grupo, pathovar (*pv.*) *tomato*, concretamente DC3000 (cepa resistente a rifampicina), que es patógeno de tomate y de la planta modelo *Arabidopsis*. Este hecho la convierte en un patógeno muy utilizado en investigación para estudiar los mecanismos implicados en la interacción planta-patógeno y cómo las bacterias causan enfermedad en las plantas susceptibles. Esta bacteria infecta de una manera local, conteniéndose en zonas cercanas al sitio de entrada, sin extenderse a otras partes de la planta, y principalmente en zonas aéreas de la planta, tales como hojas y frutos, donde produce un amarilleamiento del tejido infectado (Katagiri *et al.*, 2002; Xin y He, 2013).

## 1.2. Interacción planta-patógeno

### 1.2.1. Defensa pasiva o constitutiva

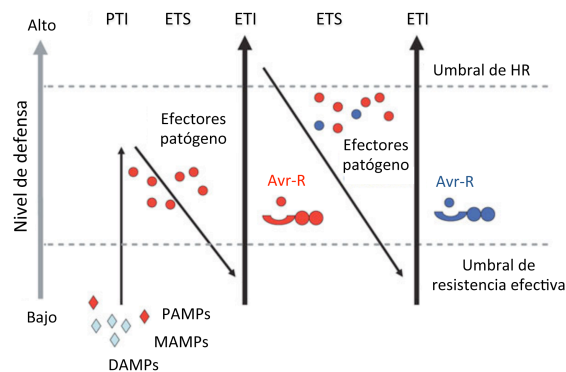
Engloba el conjunto de elementos estructurales presentes en la planta de forma previa al proceso infectivo y que constituyen la primera barrera inespecífica para poder frenar la entrada de un organismo agresor. Dentro de esta categoría forma parte la cutícula, que protege las células de la epidermis y que consiste en una cubierta gruesa, hidrofóbica e impermeable. La pared celular *per se* es otra de las barreras estructurales preestablecidas y que debido a su composición en celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina, junto

con un conglomerado de proteínas, puede impedir también la entrada y el avance del patógeno. Además, la composición de dicha pared también se ve alterada y reforzada en su contenido cuando la invasión tiene lugar, en particular a través de la deposición de calosa, un polímero asociado a la cara interna de la pared celular (Vorwerk *et al.*, 2004). Las aperturas naturales de la planta, tal y como son los estomas, se les ha atribuido también un papel activo en la defensa debido al control que ejerce la coronatina, un factor de virulencia de *P. syringae*, en su mecanismo de cierre y apertura para favorecer la entrada (Melotto *et al.*, 2008). Los tricomas, los pelos radiculares y los metabolitos secundarios antimicrobianos presentes en la planta, constituyen otros ejemplos de defensa pasiva.

### 1.2.2. Defensa activa o inducible

Constituye todos los mecanismos moleculares de defensa que se activan *de novo* tras la entrada y el reconocimiento específico del patógeno por parte de la célula vegetal. Si gracias a este reconocimiento la planta consigue restringir la replicación y la diseminación del patógeno, entonces se considera a la interacción planta-patógeno de naturaleza incompatible. Alternativamente, en una interacción de naturaleza compatible (*e.g.*, *P. syringae* DC3000-Arabidopsis), debido a fallos de este reconocimiento y/o defectos en la inducción de una adecuada respuesta defensiva, el patógeno prolifera y acontece la enfermedad. Con el fin de frenar este proceso de infección, la planta activa entonces diferentes estrategias de defensa alternativa englobadas en lo que se define como inmunidad activada por PAMPs (PTI, PAMP-Triggered Immunity). A su vez, éstas tratan de ser evitadas o ser suprimidas por parte del patógeno mediante la síntesis de nuevos mecanismos de invasión basados en efectores virulentos, frente a los cuales la planta vuelve a reaccionar desarrollando mecanismos de defensa subsiguientes que forman lo que viene a denominarse como inmunidad activada por efectores (ETI, Effector-Triggered Immunity). Estos procesos de sucesiva adaptación ocurren a modo de carrera armamentística (*arm race*) y se atienen a un modelo denominado “zig-zag”, a través del cual los niveles de defensa fluctúan a favor de la supervivencia de uno u otro organismo y en cada fase. Ello constituye el modelo de co-evolución planta-patógeno mediante el cual se permite el ajuste fino tanto del sistema de infección por

parte del patógeno como el de la inmunidad por parte de la planta (Fig. 1) (Boller y He, 2009; Chisholm *et al.*, 2006; Jones y Dangl, 2006).



**Figura 1. Esquema de la teoría de co-evolución planta-patógeno.** Extraído de Jones y Dangl, 2006.

### - Inmunidad activada por PAMPs (PTI)

Los PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) son moléculas propias derivadas del patógeno, generalmente biotrofo, que además de ser esenciales para él, actúan como patrones moleculares comunes para cada grupo de microorganismos (por conservación evolutiva). Ejemplo de éste lo constituye la flagelina (péptido Flg22), una proteína presente en los flagelos de las bacterias responsables del movimiento. La quitina, componente de la pared de los hongos, o los peptidoglucanos de la membrana de las bacterias son otros ejemplos de PAMPs bien caracterizados. Los PAMPs, a su vez, se engloban dentro de una clasificación más amplia conocida como patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs, Microbe-Associated Molecular Patterns) en la que quedan englobados también los microorganismos no patogénicos (Boller y Felix, 2009). En el caso de los patógenos necrotrofos, las moléculas equivalentes que activan la respuesta defensiva a este nivel se denominan DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns). Constituyen ejemplos de los mismos los fragmentos oligoméricos derivados de la degradación de las pectinas de la pared celular de la planta por la acción de pectinasas segregadas por el patógeno fúngico (Schneider y Collmer, 2010).

De esta forma, estas moléculas actúan a modo de huella digital en el proceso de identificación de cada grupo de patógeno en la matriz extracelular de la célula vegetal. Tras dicha identificación se desencadena el mismo tipo de respuesta para los patógenos que disponen de la misma clase de huella o patrón molecular. Este reconocimiento es realizado por receptores de la membrana plasmática denominados PRRs (Pattern Recognition Receptors). Se tratan de una extensa gama de receptores trans-membrana que se caracterizan por tener una región N-terminal rica en leucinas (LRR) que queda generalmente orientada hacia el exterior de la célula (apoplasto) y que se encarga del reconocimiento de los patrones patogénicos. La región citoplasmática de estos receptores, por el contrario, puede variar entre aquellos en los que hay un dominio serin/treonin quinasa (LRR-RLK) y los que no presentan este dominio en esta región (LRR-RLP) (Zipfel, 2014).

Tras este reconocimiento inicial tiene lugar la activación de un conjunto de respuestas defensivas en la planta que podrían inhibir la progresión del patógeno. Además, éstas actúan como señales de alerta que quedan activadas y promueven una mejor y más rápida respuesta de defensa en futuras infecciones, lo que se conoce como estado de primación (“priming”, concepto que se desarrolla más adelante). Cuando el microorganismo agresor no es capaz de suprimir este sistema de inmunidad, se clasifica dentro de la resistencia *non-host*, ya que la planta deja de ser huésped de ese patógeno.

#### - Inmunidad activada por efectores (ETI)

Constituye todo el conjunto de respuestas defensivas que se activan en la planta tras la detección específica e intracelular de los efectores liberados por el patógeno, y que son sintetizados con el fin de superar la inmunidad PTI y poder promover la virulencia del patógeno (Abramovitch y Martin, 2004; Hann y Boller, 2011). Este reconocimiento es llevado a cabo por proteínas de resistencia (proteínas R, codificadas por los genes *R*) propias de la planta, que conlleva a la inducción de mecanismos de resistencia acorde a las moléculas efectoras identificadas (Bent y Mackey, 2007). Concretamente, basándose en el modelo de “interacción gen a gen” (Flor, 1971), los genes *R* interactúan con los genes de avirulencia (*Avr*) como si se trataran de señales patogénicas, frente a las que desencadenan una nueva cascada de señalización con la consiguiente inducción de nuevas defensas o niveles más intensificados de

dichas defensas. Esta respuesta de la célula vegetal se denominada respuesta hipersensible (HR). La HR se caracteriza por promover en última instancia un proceso de suicidio de la célula infectada que se manifiesta de forma localizada en el sitio de entrada del patógeno y que eventualmente evita la propagación del mismo a zonas distales no infectadas. Dicha resistencia mediada por la activación ETI generalmente genera una interacción incompatible, y en la que al patógeno se le denomina como avirulento. Asimismo, los mecanismos de defensa inducidos en la ETI también pueden actuar subsiguientemente como señales de alerta que predisponen a la planta para una respuesta más rápida tras una futura infección a través de lo que se denomina como resistencia sistémica y que representa, en esencia, un mecanismo de “priming” inmunológico. En el caso de que el reconocimiento entre las proteínas R y los efectores virulentos (codificados por los genes *Avr*) sea fallido, el proceso infeccioso prosigue su curso y el patógeno virulento prolifera por la planta permitiéndose el establecimiento de una interacción de naturaleza compatible. Este es el caso de la cepa *P. syringae* DC3000, donde ciertos genes *Avr* están ausentes (Király *et al.*, 2007). Sin embargo, en otro modelo propuesto para este reconocimiento (Van der Hoorn *et al.*, 2002; van Loon *et al.*, 2006), proteínas de la planta, asociadas a las proteínas R, actúan como diana para ser modificadas por el efector del patógeno. Y es esta alteración precisamente la que es reconocida por las proteínas R, y por *ende* desencadena la respuesta ETI. De esta forma, si diferentes efectores tienen la misma diana proteica, la planta puede responder a una gran variedad de efectores con un número determinado de proteínas R. Ejemplos de ello, son las proteínas de Arabidopsis, RPS2 y RPS5, que reconocen la degradación de las proteínas RIN4 y PBS1 inducida por los efectores *AvrRpt2* y *HopAR1* de *P. syringae* (Mackey *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2003). Independientemente de esto, el número de genes *R*, al igual que para los genes *PRR*, es muy amplio, lo que permite también a la planta poder interactuar con un amplio espectro de efectores y por tanto de microorganismos patogénicos potenciales.

En el caso de los efectores, existe también una gran diversidad asociada a la especificidad del patógeno que los segrega. Sin embargo, la funcionalidad de la mayoría de ellos en el proceso de infección en la planta puede ser redundante, ya que se ha visto que la eliminación, tanto a nivel individual o de manera combinada de genes *Avr*, puede resultar en un bajo efecto en la

reducción de la proliferación del patógeno en la planta (Schneider y Collmer, 2010). Por el contrario, existen otros cuya presencia es determinante para suprimir la respuesta defensiva en la planta, como es el caso del efector HopM1 (Gangadharan *et al.*, 2013; Nomura *et al.*, 2006). La diferencia de los efectores con respecto a los PAMPs, es que mientras los primeros son elicitores que se liberan en el citoplasma de las células y se producen específicamente para un contexto planta-patógeno determinado, los segundos son moléculas propias del patógeno, estables evolutivamente y presentes continuamente en su estructura, cuyo efecto es independiente de la planta huésped. Como ejemplo podemos mencionar aquellos efectores dirigidos a suprimir el sistema de silenciamiento génico posttranscripcional de la planta activado por moléculas de RNA de doble cadena del virus (Anandalakshmi *et al.*, 1998). También, y característico de patógenos bacterianos, son los efectores secretados al interior de la célula hospedadora a través de uno de los sistemas de secreción, como el sistema de secreción de tipo III microbiano (TTSS, de Type III Secretion System) (Cunnac *et al.*, 2009), para suprimir la respuesta inmune mediada por los receptores PRR de la planta en la PTI (Deslandes y Rivas, 2012). Esto es el caso del efector AvrPtoB, con cuya actividad E3 ligasa se encarga de ubiquitinar el receptor diana CERK1 para su degradación (Giménez-Ibáñez *et al.*, 2009), o también la de aquellos efectores cuya diana se ha visto que es suprimir la actividad del proteosoma implicado en inmunidad (Üstün *et al.*, 2016). Por otro lado, existen efectores cuya función es la de modificar una ruta metabólica de la planta y que como resultado se incrementa la proliferación del patógeno. Constituyen ejemplos de dicha interferencia metabólica la alteración del transporte de nutrientes para suplir sus necesidades nutricionales o la modificación de rutas implicadas en un correcto desarrollo de la planta (Macho, 2016).

Tal y como mencionamos con anterioridad, desde un punto de vista evolutivo y en el cambiante discurrir de la interacción planta-patógeno, el patógeno puede mutar los genes que codifican los efectores o hacer uso de nuevos efectores que supriman la ETI promovida inicialmente. Asimismo, la planta puede generar nuevas proteínas R a través de recombinación genética que podrían reconocer a los nuevos efectores. Es por ello, y en este permanente proceso de adaptación co-evolutiva, el que ambos grupos de genes sean

considerados como familias génicas con mayor diversidad polimórfica (Almeida *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2007). El punto en el que esta evolución quede interrumpida determinará el éxito del patógeno o de la planta en la lucha por la supervivencia.

### 1.3. Respuestas defensivas

La planta, como respuesta inmune al ataque patogénico, activa un amplio conjunto de respuestas defensivas. El fin de dichas defensas es impedir la propagación del patógeno respecto al lugar de infección inicial (inmunidad local) y también el prevenir infecciones futuras que puedan acontecer en tejidos distales (inmunidad sistémica). De este modo, se activa a nivel local una cascada de transducción y amplificación de la señal percibida, mediada por MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases). Se trata de una activación por fosforilación de quinasas que señalizan la activación de las defensas. Entre éstas destacan las fluctuaciones en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares y la alteración en el flujo de iones a través de la membrana plasmática para modificar su potencial y afectar al transporte de metabolitos. Además, esta señalización desencadena en variaciones en la composición de la pared celular, como un aumento en la deposición de calosa, o en la síntesis de compuestos antimicrobianos. También, como resultado de esta activación defensiva, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), como peróxido de hidrógeno, que convergen en muerte celular. Esta acumulación de ROS es debida a la alteración de la cadena de electrones en el aparato fotosintético que varía las reacciones de óxido-reducción, así como por la producción de óxido nítrico que inhibe las enzimas responsables de la detoxificación de ROS, como las peroxidasas. Asimismo, tras la cascada de señalización se induce una reprogramación transcripcional de la célula vegetal con la consiguiente expresión de factores de transcripción y activación de genes de defensa. La velocidad o intensidad con la que tenga lugar la activación de dicho arsenal defensivo, determinará el éxito de la defensa (Asai *et al.*, 2002; Chisholm *et al.*, 2006; Dodds y Rathjen, 2010; Shetty *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2008).



Para coordinar la respuesta defensiva, la planta regula los niveles de determinadas hormonas vegetales, tanto para inducir la inmunidad local como dirigir la señalización a zonas distales, e incluso interactuar con otras plantas. Aunque el reconocimiento del patógeno es específico, el tipo de respuestas defensivas que se activan posteriormente a dicho reconocimiento son muy similares para las diferentes situaciones de estrés biótico. Sin embargo, se han establecido ciertas diferencias; así, se asocia generalmente una inducción de defensas dependiente de la señalización por la hormona ácido salicílico (SA) a los patógenos biotrofos (*e.g.*, *Pseudomonas sp.*, *Hyaloperonospora sp.*), mientras que dependiente del ácido jasmónico (JA) y del etileno (ET) para los patógenos necrotrofos (*e.g.*, *Botrytis cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina*) (Spoel *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2014).

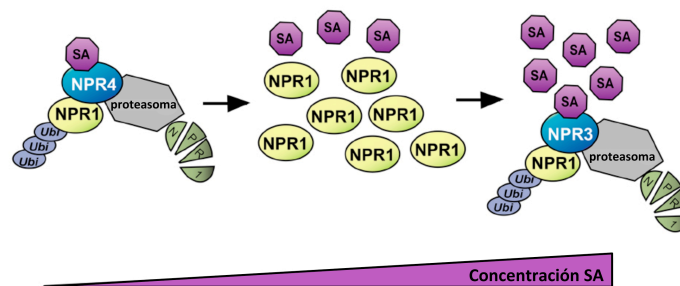
Las hormonas vegetales, además de su papel en la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta, tienen una importante función en la orquestación de la compleja red de señalización inmune que culmina con la reprogramación transcripcional y subsiguiente activación de la expresión de genes de defensa. Como se comentó anteriormente, el SA y el JA, junto a sus derivados, se consideran las principales hormonas de defensa. Sin embargo, otras fitohormonas, como brasinoesteroides, auxinas, giberelinas, citoquininas, óxido nítrico, etileno y ácido abscísico, ejercen también una importante función como moduladores, no independientes, de la señalización de la respuesta inmune. De hecho, todas estas rutas interactúan entre ellas, de forma antagonista y/o sinérgica, para establecer, dentro de un amplio rango de respuestas, el sistema de inmunidad más adecuado frente a un determinado patógeno, y cuya regulación es lo que se conoce como “cross-talk”. Por tanto, esto puede supeditar el éxito de una de ellas en función de las infecciones precedentes o potenciar una frente a otra en caso de infecciones simultáneas por diferentes patógenos. Por otro lado, todas estas hormonas contribuyen no sólo a activar una respuesta inmune, también la regulación de los niveles hormonales (por síntesis, acumulación y percepción) permite la redistribución de fuentes de nutrientes, la regulación de la muerte celular y daño oxidativo, controlar el estrés por humedad, etc.; factores todos ellos que están siempre asociados a una mejor o peor efectividad del proceso infeccioso por parte del patógeno. Es por ello que regular el nivel de estas hormonas, es esencial para maximizar la eficiencia de la respuesta defensiva de las plantas

contra diferentes tipos de patógenos. De hecho, los patógenos, como parte de su sofisticado mecanismo de infección, también han desarrollado estrategias para manipular la síntesis de determinadas hormonas e incluso intervenir en su mecanismo de señalización; ello, siempre con el fin de contrarrestar las defensas de la planta y redirigir el uso del metabolismo del huésped para su propio crecimiento y nutrición (Kunkel y Brooks, 2002; López *et al.*, 2008; Pieterse *et al.*, 2012).

El SA es un compuesto fenólico cuya síntesis, en condiciones patogénicas, tiene lugar en el cloroplasto a partir de corismato, un metabolito primario procedente de la ruta del shikimato, y gracias a la acción de la enzima isocorismato sintasa (ICS/SID2). Esta última, necesita de la formación de un intermediario, isocorismato, el cual es convertido posteriormente a SA. Alternativamente, el SA también puede sintetizarse a raíz de la ruta de los fenilpropanoides y con la participación de la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL) (Dempsey *et al.*, 2011). Debido a que mutaciones en el gen *ICS1* en *Arabidopsis* llevan a una pérdida casi completa de acumulación de SA inducida por la presencia de patógeno, y mientras que mutaciones en los genes PAL reducen el contenido en SA en menor medida, se le considera a la primera como la principal vía de síntesis de SA que opera para activar la respuesta inmune (Seyfferth y Tsuda, 2014). La regulación de los niveles de SA es de gran importancia ya que su acumulación en exceso, y por el efecto de retroalimentación sobre la aparición de ROS y su capacidad termogénica, puede ejercer un efecto negativo sobre la homeostasis de la planta. Esta síntesis está regulada por el control transcripcional de los genes *ICS1* y de *EDS1* (Enhanced Disease Susceptibility 1), un regulador central de la retroalimentación positiva de SA a través de la señalización por los niveles de calcio.

La activación de la señalización inmune por SA es también dependiente de su percepción, que se controla en *Arabidopsis* por tres receptores de la familia NPR (de Non-expressor of Pathogenesis-Related genes), NPR1, NPR3 y NPR4. En un primer modelo (Wu *et al.*, 2012), NPR1 une directamente a SA, lo que produce un cambio conformacional de la proteína para la transducción de la señal responsable de la reprogramación transcripcional en inmunidad, funcionando así como un coactivador transcripcional de un conjunto de genes relacionados con defensa dependientes de SA. Estos son los genes PR (de

Pathogenesis-Related) y codifican proteínas con actividad antimicrobiana, siendo PR1 el marcador molecular más utilizado en los estudios de la respuesta inmune dependiente de la percepción de SA en plantas (van Loon *et al.*, 2006). Además, por medio de NPR1, cuya función se regula también por los cambios de óxido-reducción producidos por el SA, esta hormona induce la activación de muchos factores de transcripción WRKY, los cuales activan o suprimen los genes de respuesta a SA, asociando su expresión a la activación rápida de las respuestas defensivas de la planta. Así, mutaciones producidas en este receptor convergen en un incremento de la susceptibilidad a patógenos biotrofos (Dong, 2004). En un modelo posterior (Fu *et al.*, 2012), NPR3 y NPR4 interactúan con NPR1 para regular su degradación por ubiquitinación según los niveles de acumulación de SA en la planta, regulando así el nivel del receptor de SA a nivel post-traduccion. De esta forma, cuando no hay SA, NPR4 se une a NPR1 para su degradación vía proteasoma, pero cuando los niveles aumentan, esta interacción se desestabiliza para favorecer la percepción de SA por parte de NPR1 y promover la reprogramación transcripcional de los genes de defensa dependientes de esta hormona. Si el aumento de SA es muy elevado, NPR3 se une entonces a NPR1 para mediar de nuevo su degradación (Fig. 2). De hecho, se ha demostrado que algunos efectores, como los secretados por *P. syringae* (*e.g.*, HopX1), interfieren en la señalización por SA evitando la acumulación de la hormona o afectando a la señalización y reprogramación transcripcional (Giménez-Ibáñez *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014). Todas estas evidencias demuestran la relevancia del SA y NPR1 en el establecimiento de la inmunidad frente a patógenos biotrofos en plantas.



**Figura 2. Modelo de percepción de SA dependiente de NPR1, NPR3 y NPR4.**  
Extraído de Seyfferth y Tsuda, 2014.

La señalización de la inmunidad dependiente de SA permite a su vez el establecimiento de la respuesta defensiva en zonas distales al sitio de infección primario, en lo que se conoce como Resistencia Sistémica Adquirida (SAR). A través de este mecanismo se consigue la activación de dichas respuestas de una manera más acelerada e intensa, y también de manera inespecífica, tras subsiguientes procesos de infección. Esto confiere a la planta un mecanismo de protección de larga duración y de amplio espectro. El SA, sintetizado en la zona local de infección, es necesario pero no suficiente para la inducción de SAR, y se asocia a su vez con un aumento en los niveles de SA en el tejido distal (Fu y Dong, 2013).

Además, la ruta de señalización dependiente de SA se puede regular también por la compleja conexión con la señalización de otras fitohormonas como JA, ET y ácido abscísico (ABA). Aunque pueden existir interacciones sinérgicas o neutrales, la mayoría son antagonistas, como en el caso de la ruta del JA que promueve la infección a hongos biotrofos debido a la interacción antagonista con la síntesis de SA. Por ejemplo, en la infección por *P. syringae*, una fitotoxina liberada por el patógeno, la coronatina, análoga al JA, se une directamente al receptor del ácido jasmónico (COI1) para inducir la respuesta defensiva dependiente de JA, inhibiendo la acumulación de SA y por tanto la inmunidad al patógeno (Zheng *et al.*, 2012). El aumento de JA se asocia generalmente a la activación de genes de respuesta a esta hormona, como *PDF1.2* (de Plant Defensin) por medio de dos vías de señalización (*MYC* y *ERF*) que inducen las defensas de la planta frente a la infección por insectos y hongos necrotrofos. Éstos activan la biosíntesis de JA que, al ser reconocido por el receptor COI1, media en la degradación de los factores de transcripción tipo JAZ que dejan de reprimir la activación de los genes de respuesta a JA mediada por MYC2 (Pieterse *et al.*, 2012). Por otro lado, el etileno participa también en los mecanismos de defensa de manera concertada con JA, y cuya regulación permite establecer la respuesta sistémica inducida (ISR), que consiste en la inducción de mecanismos de resistencia frente a posteriores infecciones de diversos patógenos tras una primera activación por microorganismos que colonizan las raíces (Pieterse *et al.*, 1998).

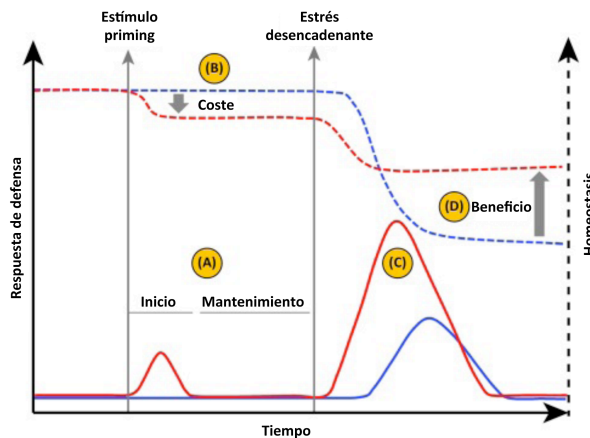
De esta forma, el conjunto de respuestas defensivas aquí descritas constituyen los “hallmarks” o indicadores de la activación de un estado inmune en la planta. Entender cómo se consigue la inducción de estas

respuestas, los reguladores y ejecutores de dichas respuestas, el tiempo requerido para su activación y el control de su mantenimiento en el tiempo o los fundamentos de dicha memoria inmunológica son factores de gran interés para los estudios en el campo de la interacción planta-patógeno.

#### 1.4. El concepto de priming en inmunidad

En el marco de la interacción planta-patógeno se ha establecido un término para referirse al estado de preparación de la planta que promueve una respuesta defensiva más efectiva frente a la llegada de un patógeno. Es lo que se conoce como el fenómeno de primación (o “priming”, término inglés utilizado en esta memoria) en el que una determinada situación ambiental prima o ceba a la planta para la consecución de un posterior estado de inmunidad más efectivo, ya sea en rapidez o en intensidad de la inducción. Este fenómeno está conservado evolutivamente también fuera del reino vegetal, y se entiende como un mecanismo de memoria en la respuesta inmunológica. Netea *et al.* (Netea *et al.*, 2011) acuñó el término de “inmunidad entrenada” a este fenómeno para diferenciarlo de la “inmunidad innata”, ya que es inducida solamente de manera secundaria en aquel huésped que previamente ha sufrido una infección primaria; y también para diferenciarla de la “inmunidad adaptativa”, ésta última específicamente inducida a través de linfocitos T y B. En los primeros trabajos en los que se definió este concepto en inmunidad de plantas (Conrath *et al.*, 2006; Conrath *et al.*, 2002), se daba la importancia al hecho de potenciar la capacidad defensiva de las plantas frente a futuros patógenos sin una inducción de los mecanismos de defensa en la fase de acondicionamiento de la planta previa a la infección. Sin embargo, recientemente, se ha redefinido este concepto, nombrándose específicamente “priming de defensa”, como una medida defensiva de la planta, de bajo coste y adaptativa, donde las respuestas de defensa no han sido activadas, o sólo ligera y transitoriamente, por un estímulo dado inductor de este estado (estímulo de priming). Tras este proceso de preparación de su sistema defensivo para adaptarse al nuevo ambiente, la planta queda alertada y así, cuando se percibe posteriormente la señal de un patógeno (estímulo desencadenante), las respuestas de defensa

son activadas de una forma más rápida, fuerte y/o adecuada (Fig. 3). De esta forma, se acepta que el priming es una parte intrínseca de la resistencia inducida (IR), ya que la planta a la vez que activa las defensas para su protección frente a un potencial agresor, también prepara su sistema defensivo para una mejorada respuesta inmune frente a una posterior situación de estrés ambiental. Por lo que la IR exhibe también características de memoria molecular tras la exposición previa a un estrés biótico (Conrath *et al.*, 2015).



**Figura 3. Esquema del concepto de priming en inmunidad de plantas.** Las líneas sólidas representan las respuestas defensivas y las líneas punteadas la homeostasis de la planta. Se representa de aquellas plantas que han sido sometidas a un fenómeno de priming (en rojo) respecto de aquellas plantas que no (en azul). Características del priming: (A) Memoria; (B) Bajo coste; (C) Respuesta defensiva más robusta; (D) Mejor desarrollo. Extraído de Martínez-Medina *et al.*, 2016.

El estímulo inductor de priming abarca un amplio y diverso grupo de señales, entre las que se encuentran aquellas derivadas de patógenos, como los PAMPs o MAMPs; las procedentes de microorganismos beneficiosos como las rizobacterias y hongos que promueven el crecimiento de la planta e inducen ISR; compuestos sintetizados químicamente o metabolitos naturales de la planta producidos en la activación de defensas, como las hormonas, que son aplicados de forma exógena; de origen físico o biológico producido por artrópodos, como la sensibilidad al caminar de los insectos por las hojas o las secreciones orales y volátiles; y por último, condiciones climáticas como

calor, frío o sal, que confieren también después una mayor tolerancia a estreses abióticos futuros. De todos estos estímulos, los compuestos químicos, ya sea de origen natural o de síntesis orgánica, normalmente inducen una respuesta mucho más reproducible, razón por la cual frecuentemente los investigadores prefieren usarlos para llevar a cabo estudios moleculares y genéticos relacionados con el fenómeno de priming. Sin embargo, los mecanismos moleculares que hay detrás de la IR promovida por agentes químicos no siempre está completamente dilucidada (Mauch-Mani *et al.*, 2017). Un ejemplo de este tipo de estímulos de priming es el ácido  $\beta$ -aminobutírico (BABA) (Ton y Mauch-Mani, 2004), o del benzothiadiazole (BTH), un análogo del SA (Kohler *et al.*, 2002). Por otro lado, cuando llega un estímulo de alguna de todas estas clases, se puede inducir la fase de priming o directamente las respuestas defensivas características de la inmunidad innata, según cómo de estresante sea la nueva situación para la planta. Por ello, es importante saber clasificar cada señal como agente inductor de priming y determinar la dosis necesaria para no inducir el sistema inmune.

Por su importancia, y en la búsqueda de estímulos inductores de este estado, resulta necesario conocer las características clave en las que se fundamenta el fenómeno de priming inmunológico (Fig. 3). En primer lugar, se caracteriza por ser un estado que tiene memoria, es decir, la información del estímulo inductor del priming queda memorizada en la planta para hacerse efectiva tan pronto como la planta queda expuesta a un nuevo estímulo causante del estrés. En segundo lugar, la consecución de este estado y su mantenimiento a lo largo del tiempo ha de suponer un bajo coste para la planta, sin comprometer la homeostasis de la misma. En tercer lugar, la activación de un estado de priming ha de converger en una respuesta defensiva más robusta que permita a la planta superar los estímulos estresantes venideros de manera más eficiente. La inducción de priming, por consiguiente, ha de permitir un mejor rendimiento general en la planta (Martínez-Medina *et al.*, 2016).

Los cambios que se producen en la fase de priming dependen de la naturaleza del estímulo inductor. En la mayoría de los casos dichos cambios se acompañan de la deposición de MPKs activas o de la síntesis de hormonas, como señal previa a la reprogramación transcripcional, y que está regulada epigenéticamente a través de modificación de histonas y de metilación de

DNA. Por otro lado, el tiempo requerido para la inducción de estos cambios moleculares desde la percepción del estímulo, así como la duración en el tiempo de vida de la planta en relación a la información memorizada por los cambios producidos, son factores susceptibles de variación entre diferentes eventos de priming. Cabe resaltar también, que el fenómeno de priming puede ser heredado de generación en generación. Esta última característica es lo que se conoce como priming transgeneracional, y en la que los componentes reguladores de modificaciones epigenéticas estarían implicados (Luna *et al.*, 2012). La inducción del estado de priming confiere posteriormente una mejorada capacidad de percepción del patógeno (*e.g.*, por un aumento en los niveles de receptores de señales patogénicas) y de activación de respuestas defensivas (*e.g.* síntesis de hormonas, activación de receptores, acumulación de moléculas defensivas como fitoalexinas, ROS, glucosinolatos, volátiles, etc.). Por tanto, una mayor sensibilidad en la capacidad para activar respuestas defensivas, que es heredable y además es inespecífica frente a cualquier tipo de patógeno, representa sin duda una clara ventaja para las plantas en su permanente enfrentamiento con agresiones patogénicas (Conrath *et al.*, 2015).

### 1.5. Regulación epigenética

El concepto de epigenética hace referencia al conjunto de modificaciones químicas de la cromatina, estables mitóticamente y meióticamente, que se asocian con cambios en los niveles de expresión génica y por tanto inciden en alteraciones en el fenotipo. Por lo que aún siendo heredables, las modificaciones epigenéticas no alteran la secuencia primaria del DNA. Los cambios que se producen en este contexto de remodelación de cromatina engloban desde las modificaciones de histonas, a través de (de)acetilaciones o (de)metilaciones, hasta la (de)metilación del DNA o RNAs no codificantes (Shen *et al.*, 2016). La característica más relevante de las modificaciones epigenéticas es su heredabilidad, lo que se traduce en un efecto en la descendencia del organismo que ha sido sometido a un estrés y en el que se ha activado esta regulación epigenética. Este campo de estudio está actualmente en auge debido a la implicación que el control epigenético ejerce

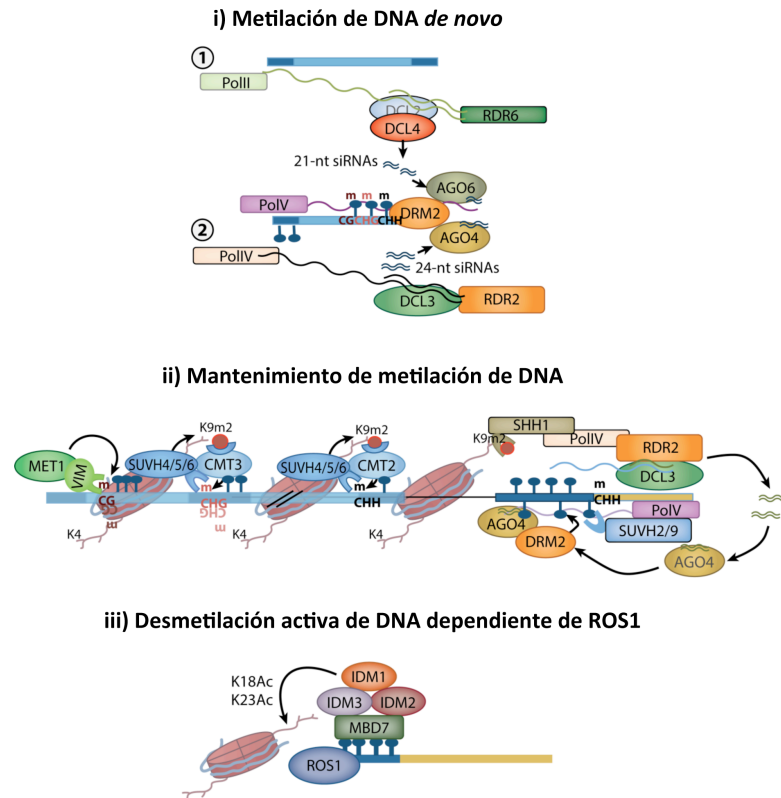


sobre diversos procesos celulares, entre los que resalta la respuesta inmune o memoria inmunológica de las plantas. Aun a pesar de que el control epigenético sobre la reprogramación transcripcional parece más que evidente, incluso durante la activación de mecanismos de defensa, sin embargo, los mecanismos que regulan su activación o represión para los diferentes procesos no están bien definidos (Deleris *et al.*, 2016).

En lo referente a la remodelación de cromatina y las histonas, las modificaciones covalentes más frecuentemente encontradas son a través de acetilaciones (ac), metilaciones (me), ADP-ribosilaciones, SUMOilaciones y fosforilaciones, las cuales suelen producirse en las regiones amino terminales de los 4 tipos (*i.e.*, H2A, H2B, H3 y H4). Dependiendo del tipo de modificación, y en qué residuo de aminoácido concreto se produzca, ejercen un efecto diferente sobre la expresión de genes. Así, modificaciones del tipo H3Lys9me2 pueden actuar como marcas de inhibición transcripcional y va generalmente asociado a heterocromatina. En cambio, modificaciones del tipo H3Lys4me3 o H3Lys36ac pueden actuar como marcas para la activación transcripcional y son más abundantes en zona eucromática. De ahí, que modificaciones de este tipo suelen acompañar la activación o represión de genes de defensa durante episodios de activación o bloqueo de la respuesta inmune inducida por SA y patógenos biotrofos (Ding y Wang, 2015).

En cuanto a la variación de los patrones de metilación del DNA de plantas, y que juegan un papel esencial en la integridad del genoma, hay descritos tres mecanismos básicos de reprogramación epigenética y que operan únicamente sobre residuos de citosina (C): (i) metilación de *nov*, (ii) mantenimiento y (iii) desmetilación (Fig. 4). En cualquier caso, la metilación se produce por adición de un grupo metilo en el quinto carbono de las citosinas encontradas en el genoma y siempre y cuando dichas citosinas se encuentren en uno de los siguientes tres contextos de secuencias: contextos simétricos, bien sea CG y CHG, y contexto asimétrico CHH (donde H puede ser A, T o C). En el genoma de *Arabidopsis*, los niveles de metilación para estos contextos son aproximadamente de 24%, 6.7% y 1.7%, respectivamente, pudiéndose dar tanto en las regiones promotoras y en el mismo cuerpo del gen, así como en secuencias repetitivas o correspondientes a elementos transponibles. El efecto derivado de la metilación en cada región puede ser

diferente y además no siempre es completamente elucidado (Law y Jacobsen, 2010).



**Figura 4. Esquema de los 3 mecanismos responsables de la metilación de DNA en plantas.** Extraído de Deleris *et al.*, 2016.

La vía de metilación de *de novo* es llevada a cabo por la compleja maquinaria de la RdDM (Metilación de DNA dirigida por RNA), un mecanismo implicado además en la modificación de la expresión de genes de respuesta defensiva. La alteración funcional de esta ruta de metilación puede comprometer o favorecer la inmunidad frente a patógenos biotrofos, según la proteína del complejo que haya sido mutada, como Argonauta4 (AGO4) o la RNA Polimerasa V (PolV) (Agorio y Vera, 2007; López *et al.*, 2011). Esta maquinaria es mediada por dos rutas solapantes, que descrito de forma muy breve, consiste en el inicio de la transcripción de secuencias diana mediada

por la RNA Pol II. Los transcritos nacientes son convertidos en RNAs de doble cadena por la RDR6 (RNA Polimerasa dependiente de RNA 6) y procesados posteriormente, por acción de DCL (Dicer-Like)-2 y -4, en pequeños RNAs de interferencia (siRNAs). Éstos se unen a la proteína AGO6 y sirven como molde, por su unión de bases al transcrito generado por la PolIV, la cual colocaliza con AGO6, para asociar este complejo a la cromatina en las secuencias genómicas diana homólogas y que serán metiladas por el reclutamiento de la proteína DRM2 (Metiltransferasa de Reorganización de Dominios 2). Esta ruta induce la activación de la segunda ruta en la que siRNAs son generados por medio de la degradación de transcritos de doble cadena (llevado a cabo por la proteína DCL3) convertidos a partir de transcritos de simple cadena (por la enzima RDR2), que fueron generados por la Pol IV, la cual es reclutada por un factor de remodelación de cromatina y que transcribe DNA metilado. Estos siRNA se unen a la proteína AGO4 que interactúa con la PolIV y sirven como molde para la metilación del DNA (molde del transcrito de la PolIV) realizada por la proteína DRM2. Por lo tanto, el mecanismo de la RdDM que conlleva la metilación del DNA forma parte de la vía de silenciamiento génico transcripcional (TGS), que es uno de los mecanismos utilizados en la respuesta inmune. Además, la RdDM está también implicada en la modificación de metilación de histonas y como parte de la maquinaria de RNA de interferencia, mediada por la degradación de mRNA, en el silenciamiento génico post-transcripcional (Matzke y Mosher, 2014). En cuanto al mecanismo de mantenimiento del patrón de metilación, tiene lugar por medio de las DNA metiltransferasas (DNMTs) MET1 (o también conocida como DMT1, DNA metiltransferasa 1), asociada al contexto CG, también CMT2 y CMT3 (Cromometilasa 2 y 3), implicadas en el contexto CHG, y e incluso DRM2, que regula el mantenimiento de la metilación de *novo* en el contexto CHH. Este último contexto también es metilado por CMT2, dependiendo del loci diana. Estas DNMTs interactúan a su vez con otras proteínas necesarias para ejercer su función y unirse al DNA diana. Además, el mantenimiento de estas marcas de metilación se correlaciona con una de las modificaciones de histonas, en concreto H3K9me, cuya presencia se asocia a genoma silenciado. Por último, el mecanismo de desmetilación del DNA puede llevarse a cabo de forma pasiva, por replicación en ausencia de una correcta función de las rutas de mantenimiento de la metilación, o de forma activa, por la eliminación de la metilación de las citosinas mediada por enzimas con actividad DNA

glicosilasa, como son DME (Demeter), ROS1 (Represor del silenciamiento 1) o DML2 y DML3 (Demeter-like 2 y 3), que actúan a su vez junto a otras proteínas para ejercer su función (Law y Jacobsen, 2010). La implicación de este mecanismo en el establecimiento de la respuesta inmune ha sido recientemente establecido (López Sánchez *et al.*, 2016). Por otro lado, el efecto contrario derivado de cada una de estas rutas hace necesaria una vía de regulación de los mecanismos de metilación y desmetilación para el control de la expresión de los genes de interés en cada proceso de la planta, como es el caso de aquellos genes implicados en la defensa. Como se ha visto, estas tres rutas son utilizadas como mecanismo de regulación de la respuesta en los procesos de interacción planta-patógeno, tanto en el establecimiento del priming como en las propias respuestas defensivas, representando pues el control epigenético una capa adicional de regulación de la respuesta inmune.

Aunque las enzimas responsables de realizar la transferencia del grupo metilo en las reacciones de metilación de histonas y de DNA son diferentes, en ambos casos comparten el sustrato S-adenosilmetionina (SAM), el donador universal de grupos metilo en las reacciones de transmetilación. SAM adquiere el grupo metilo a través de la ruta metabólica C1 dependiente de la síntesis de folatos, y en particular a partir del aminoácido metionina que es sintetizado en la ruta C1 a partir de homocisteína y metiltetrahidrofolatos (CH<sub>3</sub>-THFs) (proceso descrito en el apartado 4). SAM suministra el grupo metilo a sus diferentes dianas por medio de tres tipos de enzimas: O-, N- y C-metiltransferasas. Las primeras participan en la metilación del grupo carboxilo del ácido salicílico y jasmónico, por ejemplo, para producir los metil éster volátiles correspondientes y que participan en las respuestas defensivas de la planta frente a un ataque patogénico. También en reacciones de metilación del grupo hidroxilo de los nucleosidos de los RNAs. Las N-metiltransferasas actúan en la metilación de histonas y DNA descrita anteriormente. Las C-metiltransferasas participan en la metilación de lípidos y síntesis de la vitamina E (Roje, 2006). Por lo tanto, la regulación de los niveles del sustrato (SAM) para las reacciones de metilación podría tener relevancia para el establecimiento de una correcta respuesta inmune.

## 2. Modificaciones de los tRNAs

### 2.1. Síntesis de los tRNAs

El RNA de transferencia (tRNA) es la molécula encargada de portar el aminoácido correcto a la maquinaria ribosomal para la síntesis de proteínas. Los tRNAs son uno de los grupos más abundantes de moléculas de pequeños RNAs no codificantes. Para llevar a cabo su función, los transcritos de pre-tRNA, han de madurar y unirse al aminoácido correspondiente mediante una reacción enzimática dependiente de ATP. La transcripción de los genes que codifican el tRNA se lleva a cabo por la unión de un factor de transcripción (TFIIIC) a las dos cajas intragénicas del gen (A-box y B-box), seguido de la unión de un factor de transcripción (TFIIIB) formado por 3 subunidades en la región anterior al gen, que dirige el reclutamiento de la RNA polimerasa III. La etapa de maduración del pre-tRNA es clave para poder sintetizar la molécula de aminoacil-tRNA y realizar así su función en la traducción a proteínas, ya que únicamente los tRNAs correctamente procesados serán sustrato para las enzimas aminoacil tRNA sintetetasas (aaRSs). Además, la maduración del pre-tRNA es esencial para mantener la identidad y la integridad de la molécula procesada de tRNA. Los eventos que tienen lugar en el procesamiento de la molécula precursora incluyen la retirada de nucleósidos de las zonas 5' y 3', la eliminación de los intrones y la adición enzimática de una cadena de residuos invariable con los nucleósidos CCA en la región 3', donde se unirá el aminoácido por un enlace covalente con el grupo hidroxilo de la adenosina. Todo ello permite la formación de la molécula de tRNA cuya estructura secundaria, por emparejamiento intramolecular de bases, adopta la conocida forma de "hoja de trébol" y con una conformación terciaria por plegamiento de forma de L. Ésta se compone del brazo aceptor del aminoácido, formado por las regiones 5' y 3', los brazos T y D, orientados perpendicularmente, una posible región de longitud variable (V), y el brazo con la región del anticodón, cuya posición es del nucleótido 34 a 36, que estará en la parte externa de la molécula para reconocer el codón del RNA mensajero al que unirse. La longitud de cada brazo puede variar entre los diferentes tRNAs, dependiendo de la secuencia génica que lo contiene, así como entre especies. Además, en el proceso de maduración también se llevan a cabo un conjunto de modificaciones post-

transcripcionales en algunos de los residuos del tRNA como metilación, deaminación o reducción, entre otras, y que pueden ocurrir en posiciones específicas para un tRNA o en zonas características conservadas para todos los tRNAs, representando en su conjunto lo que viene a conocerse como el código de los tRNAs (Giegé y Frugier, 2000-2013; Kirchner y Ignatova, 2015).

## 2.2. Características de las modificaciones post-transcripcionales

De todas las modificaciones que se pueden encontrar en los nucleósidos del RNA (aproximadamente se conocen unas 150 modificaciones diferentes), la mayoría tienen lugar en las moléculas de los tRNAs (aproximadamente hasta unas 100 modificaciones), lo que denota su importancia para su estructura final. Existe una gran variedad de modificaciones en los residuos de los tRNAs, que varían desde una simple metilación en la ribosa o en la unidad de base del nucleósido hasta modificaciones de cadenas laterales complejas en diferentes posiciones del anillo de purina o pirimidina. Pero en general, se pueden dividir en tres categorías principales, donde el primer grupo incluye aquellas modificaciones cuya posición e identidad están conservadas en la mayoría de tRNAs existentes, tales como 2'-*O*-metilguanosina (Gm) en el brazo D o 5-metiluridina (m<sup>5</sup>U) y pseudouridina ( $\psi$ ) en el brazo T, y que son introducidas por enzimas normalmente conservadas evolutivamente. El segundo grupo lo componen aquellas modificaciones en las que la posición, pero no necesariamente la identidad, está conservada, como las que tienen lugar en el brazo anticodón. El tercer grupo está formado por el resto de modificaciones encontradas en posiciones únicas de un solo grupo limitado de tRNAs e introducidas por enzimas muy diversos y específicos de especies. Un ejemplo de éstas son alteraciones químicas sencillas (*e.g.*, metilaciones). Por tanto, el número total e identidad de las modificaciones que ocurren, así como la distribución por la molécula de tRNA y la frecuencia de modificaciones presentes en cada residuo, es muy variable entre los diferentes tRNAs, lo que determina también su identidad y variabilidad (Bjork y Hagervall, 2014; Machnicka *et al.*, 2014).

Estas modificaciones post-transcripcionales pueden ocurrir de forma aislada en un residuo, o ser parte de un grupo complejo de modificaciones que ocurren en un residuo de manera secuencial por dos o más enzimas, donde dependen unas de otras. Entre los ejemplos más conocidos se pueden encontrar la dihidrouridina (D), la adición de un grupo tiol donde el grupo azufre deriva de cisteína, como 4-tiouridina ( $S^4U$ ), el intercambio por la molécula inosina (I) o ribotimidina (T), la inserción de la molécula queuina (Q), el cambio de posición en el nucleósido de la unidad de ribosa ( $\psi$ ), la adición de un grupo isopentenilo (como  $i^6A$ ), o la combinación de algunas de ellas como metilación y tiolación ( $mcm^5s^2U34$ ) (El Yacoubi *et al.*, 2012; Lehninger *et al.*, 2000). Sin embargo, de todos los tipos posibles que se pueden encontrar, la metilación es la modificación más frecuente. Además, la metilación suele ser el primer tipo de modificaciones introducidas en los tRNAs y que da paso secuencialmente a la introducción de otro tipo de modificaciones. Concretamente en plantas, y aunque los estudios de modificaciones de tRNA están muy rezagados respecto al de otros eucariotas, existen muchos nucleósidos metilados, donde  $m^1G$  es una de las modificaciones más conservadas. La metilación es llevada a cabo por las metiltransferasas de tRNA (TRMs) y utilizan SAM como donador de metilos. Las TRMs son específicas para cada tipo de modificación y dependientes de si la metilación se da en la base o en la ribosa del nucleósido (Chen *et al.*, 2010). La versatilidad de las posibles modificaciones en los tRNAs queda reflejada también en la variedad de enzimas responsables de introducir estas modificaciones en los tRNAs (El Yacoubi *et al.*, 2012). De esta forma, a pesar de que en algunos organismos, como *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae* o incluso en humanos, la mayor parte de los genes responsables de dichas modificaciones de los tRNAs han sido ya identificados. En el caso de las plantas, el desconocimiento de estos genes es prácticamente total, siendo escaso también el número de estudios encaminados a la identificación de modificaciones de tRNA y los procesos que las regulan. Por ello, éste es un campo poco explorado aunque de una importancia capital para la homeostasis y correcto funcionamiento de la célula vegetal.

### 2.3. Relevancia funcional

El reconocimiento del tRNA adecuado por parte de una de las 20 aminoacil tRNA sintetasas que existen depende de la secuencia del brazo anticodón así como del residuo específico presente en la posición anterior a la cadena CAA. Sin embargo, la identificación de las modificaciones presentes en esta zona del anticodón, así como en el brazo aceptor, permiten que esta unión sea precisa y no haya errores en el proceso de carga del aminoácido específico (eficiencia de aminoacilación). Esto es necesario para la especificidad tRNA-aminoácido y la especificidad codón-aminoácido, a pesar de la degeneración del código genético. Esto se determina por la posición de balanceo y reduce el número total de tRNAs isoaceptores existentes, requeridos para decodificar los 61 codones, a aproximadamente unos 30. La posición de balanceo se debe a que el emparejamiento de bases es estricto sólo en los dos primeros residuos del codón. De esta forma, las modificaciones que tienen lugar en la posición 34 del anticodón, que une a la tercera posición del codón del mRNA, están altamente conservadas, para asegurar esta especificidad (Kirchner y Ignatova, 2015). Por lo tanto, dado que participan en la fidelidad de la unión codón-anticodón, así como con el aminoácido, las alteraciones en el patrón de modificación de los tRNAs podrán afectar a la correcta traducción de las proteínas lo que afectará al metabolismo celular (Björk, 1995).

El número de tRNAs depende esencialmente del número de genes que los codifiquen, el cual aumenta con la complejidad del organismo. Pero las modificaciones post-transcripcionales que se introduzcan favorecen en gran medida la diversidad química de las moléculas de tRNA. Por ello puede variar el número de tRNAs isodecodificadores que existan en el organismo, que son los tRNAs diferentes que portan el mismo aminoácido y el mismo anticodón, pero se diferencian en variaciones en el resto de la secuencia del tRNA (Goodenbour y Pan, 2006).

Las modificaciones son relevantes también para el correcto plegamiento y estabilidad de la molécula de tRNA y alteraciones en las mismas pueden promover la degradación del tRNA para evitar una traducción errónea (El Yacoubi *et al.*, 2012). Además, las modificaciones de tRNA pueden estar conservadas entre especies y pueden afectar a la traducción de proteínas ya



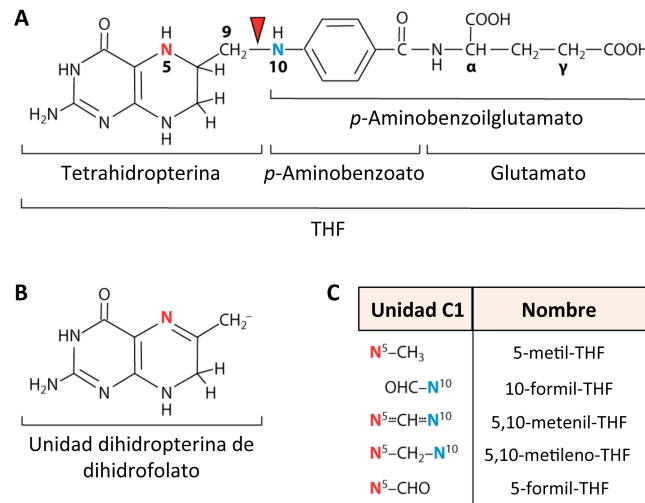
sea de manera general o de manera específica dentro de un proceso (Phizicky y Hopper, 2010). Por ello, la relevancia de estas modificaciones en la función de los tRNA asegura la expresión de aquellas proteínas que necesiten de esos tRNAs modificados para los aminoácidos concretos que contengan, y esto puede tener un efecto en los procesos celulares que dependan de esas proteínas. Por ejemplo, en *S. cerevisiae* el estrés oxidativo promueve el incremento en la metilación del tRNA que carga el aminoácido leucina para aumentar así la síntesis de las proteínas relacionadas con este estrés y que contienen en su mayoría este aminoácido (Chan *et al.*, 2012). Sin embargo, en otros casos, la alteración en las modificaciones de los tRNAs actúa como una señal para afectar a la traducción de las proteínas relacionadas con el estrés. Este es el caso de la modificación metoxycarbonilmetil (mcm<sup>5</sup>) o 2-tiol (s<sup>2</sup>) del residuo U34, cuya pérdida en los tRNAs que las contengan, aunque no compromete la fidelidad de la traducción, si reduce la eficiencia de la traducción de las proteínas que necesiten de esos tRNAs por no favorecer la interacción codón-anticodón, como por ejemplo de aquellas implicadas en determinados tipos de patologías (Chen *et al.*, 2009).

### 3. Los folatos en la planta

#### 3.1. Aspectos generales

Los folatos (VitB9) son un conjunto de metabolitos compuestos por una molécula de pterina, una de ácido *p*-aminobenzoico (*p*ABA) y una cadena de glutamatos de número variable. Las diferencias entre ellos se encuentran en el estado de oxidación del anillo de pterina (di- o tetrahidrofolato), la oxidación de la molécula de un carbono (C1) que se encuentra unida a la molécula principal y el número total de moléculas de glutamato adheridas (Rébeillé *et al.*, 2006) (Fig. 5). Debido a su capacidad para transportar grupos metilos, su función consiste en actuar como cofactores esenciales de los enzimas que median en las reacciones de transferencia de este grupo en el metabolismo de un carbono (C1). El metabolismo C1 participa en diversas rutas de biosíntesis, incluidas la síntesis de serina, glicina y metionina, en la síntesis de ácidos nucleicos, en la síntesis de polímeros estructurales como la

lignina, en el ciclo de la fotorrespiración en plantas C3, el metabolismo de metanol, formaldehído, glioxilato y formato y en los ciclos de recirculación de S-adenosilmetionina y de S-metilmetionina (Hanson y Roje, 2001). Las rutas metabólicas en las que el conjunto de folatos es utilizado varían entre los diferentes organismos. Sin embargo, tanto plantas como animales, humanos, bacterias, hongos y levaduras, necesitan de los derivados del folato para un correcto metabolismo.



**Figura 5. Estructura química de THF y sus derivados.** (A) Estructura de THF en su forma monoglutamato. La flecha roja indica la posición donde tiene lugar la rotura oxidativa de la molécula. (B) Forma más oxidada del anillo de pterina. (C) Sustituyentes C1 de la molécula de THF. Extraído de Hanson y Gregory, 2011.

Por tanto, dada la implicación vital de estos compuestos en el metabolismo, se considera una vitamina de gran importancia cuya deficiencia puede desencadenar en efectos devastadores en todos los organismos, tanto en plantas, produciendo entre otros la letalidad en el embrión o retardo en el crecimiento (Ishikawa *et al.*, 2003; Reyes-Hernández *et al.*, 2014; Srivastava *et al.*, 2011), como en humanos, asociándose a anemia, enfermedades cardiovasculares o mayor riesgo de padecer cáncer como de tipo colorrectal (Kim, 2005; Scott *et al.*, 2000). Por ello, se destinan recursos para fortificación de alimentación industrial con folatos, producción farmacológica de suplementos (*e.g.*, pastillas de ácido fólico), e ingeniería metabólica de plantas

para aumentar el contenido propio de folatos (biofortificación) o mejorar su estabilidad o transporte (Basset *et al.*, 2005; Blancquaert *et al.*, 2014; Díaz de la Garza *et al.*, 2007; Storozhenko *et al.*, 2007a).

### 3.2. Síntesis, transporte y regulación

El tetrahidrofolato (THF) es el producto final de la ruta biosintética de los folatos y es, del conjunto de moléculas derivadas de la ruta, la única que actúa de cofactor en las reacciones de transferencia de un carbono (C1). La síntesis de THF se produce en tres pasos y se fundamenta en la síntesis de los dos precursores de los que consta la molécula, la pterina y el *p*ABA, que tiene lugar en el citosol y el cloroplasto, respectivamente, y un tercer paso que conlleva el ensamblaje final de los mismos y la unión de la molécula de glutamato, que acontece en la mitocondria (Hanson y Gregory, 2011).

#### - Síntesis de la pterina

Este precursor comienza con la conversión de una molécula GTP a dihidroneopterina (DHN) trifosfato mediante la enzima GTP ciclohidrolasa I (GCHI; EC 3.5.4.16). Posteriormente, una enzima difosfatasa y otra fosfatasa llevan a cabo dos procesos de defosforilación consecutivos, liberando una molécula de pirofosfato y una de fosfato, respectivamente. La molécula DHN resultante es utilizada por la enzima dihidroneopterina aldolasa (DHNA; EC 4.1.2.25) para liberar una molécula 6-hidroxi metildihidropterina (HMDHP) y un glicolaldehído.

#### - Síntesis del *p*ABA

Este metabolito es sintetizado a partir de una molécula de corismato, procedente de la ruta del shikimato, con el paso intermedio de la producción de la molécula aminodeoxicorismato (ADC). Estas reacciones enzimáticas tienen lugar gracias a la ADC sintasa (EC 2.6.1.85) y ADC liasa (EC 4.1.3.38), respectivamente (Basset *et al.*, 2004a; Basset *et al.*, 2004b).

### - Síntesis de la molécula final de THF

La molécula pterina, previamente pirofosforilada por la HMDHP pirofosfoquinasa (HPPK; EC 2.7.6.3), y el *p*ABA son utilizados posteriormente como base para sintetizar dihidropteroato (DHP). Esta reacción está mediada por la DHP sintasa (EC 2.5.1.15), que confiere la misma afinidad por ambos sustratos. En plantas, se ha descrito que estas dos enzimas son en realidad dos dominios de una única enzima bifuncional presente en la mitocondria, que es donde tienen lugar ambas reacciones (Rébeillé *et al.*, 1997). En *Arabidopsis*, se ha descrito una forma citosólica de esta enzima HPPK/DHPS pero se expresa únicamente en semillas en desarrollo y plántulas sometidas a estrés salino, además de no tener un homólogo en otras plantas (Storozhenko *et al.*, 2007b). En el siguiente paso se produce la adición de una molécula de glutamato al grupo carboxilo del DHP para dar lugar a la molécula de dihidrofolato (DHF), mediante una reacción dependiente de ATP catalizada por la DHF sintasa (EC 6.3.2.12). El paso final de la síntesis de THF tiene lugar gracias a la enzima DHF reductasa (EC 1.5.1.3) que, usando NADPH como donador de electrones, ejerce la función de reducir el anillo de la unidad de pterina del DHF a THF, teniendo esto lugar en la mitocondria (Neuburger *et al.*, 1996).

De todos los organismos, los animales y humanos son los únicos que no disponen de la ruta biosintética completa para obtener THF, y por tanto sólo disponen de los enzimas implicados desde la DHFR en adelante. Es por ello, que al no poder sintetizar folatos *de novo* se convierte en necesaria la aportación diaria de esta vitamina en la dieta, siendo los alimentos procedentes de plantas la principal fuente, sobresaliendo por su contenido las judías, las espinacas y los pimientos. El ácido fólico es un derivado de folato, sintetizado químicamente para su aplicación exógena, que se encuentra en un mayor grado de oxidación y para ejercer su función ha de ser reducido en sendas reacciones mediadas por la enzima DHFR.

Tras la síntesis de THF, por diversas reacciones enzimáticas de interconversión de las unidades de un carbono, se producen los diferentes derivados de los folatos que actuarán como cofactores en el metabolismo C1. Los sustituyentes pueden unirse enzimáticamente en las posiciones N5 y/o N10 del THF y según el grado de oxidación en el que se encuentren, se tratará

de una unidad de formilo, metenilo, metileno o metilo (de mayor a menor estado oxidado, respectivamente) (Rébeillé *et al.*, 2006) (Fig. 5). También existe otro nivel de variación en el conjunto de derivados de los folatos según el número de moléculas de glutamato que se unen a la molécula de THF. La enzima folilpoliglutamato sintasa (FPGS; EC 6.3.2.17) es la encargada de catalizar esta unión secuencial de residuos de glutamato mediante adición a modo de cabeza-cola. La reacción se basa en un enlace covalente entre el grupo amino del carbono  $\alpha$  de la nueva unidad de glutamato y el grupo carboxilo del carbono  $\gamma$  del glutamato anterior presente en el folato (Fig. 5). De esta forma, se puede sintetizar una cadena de poliglutamatos de longitud variable y que oscila entre 2 y 11 residuos. En *Arabidopsis* se han identificado 3 genes que codifican para 3 isoformas de FPGS diferentes y que se encuentran en la mitocondria, citosol y cloroplasto (Ravanel *et al.*, 2001). Esto unido al hecho de que los 3 compartimentos celulares disponen de folatos poliglutamados, establece que este último paso de derivación de los folatos tiene lugar tras el transporte del THF desde la mitocondria al resto de compartimentos de la célula (Cossins y Chen, 1997).

Las enzimas implicadas en la ruta biosintética de los folatos, y con ello los genes codificantes, están caracterizadas en plantas. Sin embargo, la dificultad observada a la hora de estudiar esta ruta se debe a la escasa disponibilidad de mutantes de los genes de biosíntesis, debido al carácter esencial de dicha ruta, y también debido a la baja abundancia de las enzimas de dicha ruta metabólica y su compartimentalización subcelular compleja. Por otra parte, las moléculas intermediarias de la ruta (*e.g.*, THFs, S-adenosilmetionina y S-adenosilhomocisteína) son lábiles y a veces resultan difíciles de cuantificar de manera precisa (Hanson y Roje, 2001).

Los folatos tienen diferente grado de estabilidad en la célula según el estado en el que se encuentren. Por un lado, pueden producirse reacciones de oxidación reversible del anillo de pterina (de THF a DHF), siendo la forma reducida la más abundante en la célula. Por otro lado pueden sufrir una reacción espontánea de rotura oxidativa del enlace C9-N10 que une los residuos de pterina y *p*ABA, disminuyendo así el conjunto de folatos disponibles (Fig. 5). THF y DHF son los más inestables, y preferentemente sobre ellos se produce esta reacción, mientras que 5-metil y 5 y 10-formiltetrahidrofolato son los más estables (Hanson y Gregory, 2011). La

adición de los sustituyentes C1, así como de las moléculas de glutamato, favorece la estabilidad de los folatos y también permite la retención en un compartimento celular determinado así como un incremento en la afinidad con las enzimas dependientes de los folatos. Todo ello, en definitiva, favorece la correcta funcionalidad de estos metabolitos (Appling, 1991; Rébeillé *et al.*, 2006). De hecho, se considera la forma monoglutamato (THF) como la forma de transporte principal de los folatos por la célula (Sahr *et al.*, 2005). En plantas, de los posibles derivados de folatos, se encuentran en mayor abundancia aquellos con grupo metilo (45-65%) y formilo (30-55%) mientras que la forma THF y metileno sólo representa el 10-15% del conjunto total (Cossins y Chen, 1997). Adicionalmente, existe una enzima que puede desarrollar un papel importante en la regulación de su transporte de un compartimento a otro. Se trata de la  $\gamma$ -glutamil hidrolasa (GGH), encargada de eliminar los residuos de la cadena de glutamatos (total o parcialmente) y cuya actividad está presente únicamente en las vacuolas. Por ello, y junto al hecho de que las vacuolas no disponen de FPGS, estos orgánulos importan los folatos con la cadena de glutamatos (Akhtar *et al.*, 2010; Orsomando *et al.*, 2005). Los residuos generados por estas reacciones de degradación de la molécula principal de folato pueden ser reutilizados, tras reacciones de hidrólisis y reducción, como precursores para la síntesis de nuevos folatos. Sin embargo, en animales y humanos, que no pueden reponer el reservorio de los metabolitos activos, al no disponer de las enzimas de la ruta biosintética, deben tener una aportación diaria y continua de folatos (Hanson y Gregory, 2011).

Para el correcto funcionamiento de la ruta biosintética de los folatos, dada la compartimentalización de precursores en los orgánulos, es necesaria la existencia de un sistema de transporte de los metabolitos implicados en la biosíntesis de THFs. Así se encuentran, en diversa proporción, en cloroplastos (10%), mitocondria (40%), citosol (30%) y vacuolas (20%). Sin embargo, en plantas no ha sido aún completamente caracterizado si este mecanismo es mediado por transportadores específicos (Rébeillé *et al.*, 2006).

Cómo se regula la síntesis de los diferentes derivados de folatos en función de la demanda metabólica de unidades C1, es un aspecto que aún no se ha elucidado, ello, en parte debido al escaso conocimiento que se tiene sobre las propiedades catalíticas de los enzimas implicados en la ruta. Sin embargo, en

el caso de la enzima DHPS, se ha demostrado la capacidad de DHP, DHF y THF de regular negativamente la actividad enzimática, según un mecanismo de inhibición por producto. Esto es debido a que actúan como inhibidores competitivos de ambos sustratos de la enzima, y por tanto la acumulación de estos intermediarios es considerada como uno de los pasos claves de regulación de la ruta de los folatos. Las sulfonamidas, compuestos químicos sintetizados análogos a uno de los sustratos, ejercen también una inhibición competitiva de esta enzima (Prabhu *et al.*, 1997; Rébeillé *et al.*, 1997). De forma parecida ocurre lo mismo con el análogo metotrexato y la enzima DHFR (Prabhu *et al.*, 1998). Sin embargo se desconoce si estos mismos mecanismos de regulación metabólica propia operan también en plantas.

### 3.3. Reacciones dependientes de folatos

De la diversidad de moléculas de folatos que podemos encontrar, según la unidad de carbono que se transporta unida al esqueleto de THF, cada uno de los derivados es utilizado en una de las diferentes rutas del metabolismo C1. Es gracias a esta variación por lo que se puede considerar a los folatos como moléculas versátiles en cuanto al número de procesos metabólicos vitales en los que participan en los organismos vivos.

Así, la biosíntesis de purinas y formil-metionina-tRNA dependen de 10-formiltetrahydrofolato, el cual es sintetizado a partir de formato y THF (Cossins y Chen, 1997). 5,10-metilenotetrahydrofolato es esencial para la síntesis de timidilato (a partir de uridilato), pantotenato (vitamina B5) y formaldehído. Concretamente, la síntesis de timidilato es llevado a cabo por la timidilato sintasa (TS; EC 2.1.1.45), una enzima que forma parte de una enzima bifuncional junto con la DHFR. En este caso el folato es utilizado también como donador de electrones, por lo que el DHF resultante de la conversión de la base nitrogenada es reciclado a THF posteriormente por la acción de DHFR. Es por ello, que esta enzima puede utilizar la forma monoglutamato y poliglutamato de DHF, para la síntesis de THF a partir de sus precursores y la recirculación del derivado de folato utilizado en la conversión de deoxiuridina monofosfato (dUMP) a deoxitimidina monofosfato (dTMP), respectivamente. Sin embargo, la mayoría de enzimas

dependientes de folatos son más afines por las formas poliglutamadas del cofactor (Hanson y Roje, 2001; Scott *et al.*, 2000).

Representa otro ejemplo de versatilidad de los folatos, su participación en la conversión reversible de glicina a serina, llevada a cabo por la serina hidroximetiltransferasa (SHMT; EC 2.1.2.1). Aquí se requiere del derivado 5,10-metilenotetrahidrofolato, el cual es a su vez sintetizado, a partir de tetrahidrofolato como resultado de la reacción enzimática llevada a cabo por la glicina decarboxilasa. Esta enzima libera una molécula de CO<sub>2</sub> a expensas de una molécula de glicina, y a su vez, esta molécula de glicina utilizada por la decarboxilasa se deriva de un evento de oxidación catalizado por la Rubisco y la toma de O<sub>2</sub>. Por ello, se considera que la biosíntesis de folatos está relacionada con la fotorrespiración (Scott *et al.*, 2000).

El 5-metiltetrahidrofolato es sintetizado a partir de 5,10-metilenotetrahidrofolato por la acción de la metilenotetrahidrofolato reductasa (MTHFR; EC 1.5.1.20). Se trata del derivado predominante disponible en las plantas y en el caso de los humanos es la única forma encontrada en el plasma circulatorio, concretamente en su forma monoglutamato (Rébeillé *et al.*, 2006). Dicho metabolito tiene como única función conocida proporcionar el grupo metilo requerido para la conversión, a través de la enzima metionina sintasa, de homocisteína a metionina. Este aminoácido es destinado en su mayor parte (en torno al 80% del total sintetizado (Giovaneli *et al.*, 1985b)), para la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM) en el ciclo de metilo activado (ó ciclo SAM), el cual es el donador universal de grupos metilo en las reacciones de metilación de DNA e histonas llevadas a cabo en el control epigenético para la expresión génica. Por ello, la ruta del THF está adquiriendo cada vez más relevancia para la correcta regulación de los mecanismos epigenéticos en el control de la estabilidad del genoma y del silenciamiento génico (Rocha *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013).



## 4. Metionina, un aminoácido esencial en la planta

La metionina es uno de los nueve aminoácidos esenciales en animales debido a que no puede ser sintetizado de *novo* y ha de ser aportado en la dieta (Galili *et al.*, 2016). Su importancia deriva de los procesos celulares en los que este metabolito es empleado: principalmente en la síntesis de proteínas y en la ruta de asimilación del azufre. Además, es considerado también fundamental por ser el precursor de S-adenosilmetionina (SAM), el donador universal de grupos metilos para la metilación de DNA, entre otras reacciones, así como precursor de otros metabolitos como son la biotina, la hormona etileno, las poliaminas, la nicotianamina (NA) o la vitamina B1 (Hesse *et al.*, 2004). Por tanto, de forma indirecta a través de la síntesis de SAM, la correcta biosíntesis de metionina es necesaria para regular procesos celulares esenciales como la división celular, la síntesis de polímeros de pared celular o la síntesis de clorofila (Amir, 2010; Roje, 2006). Es por ello que la alteración de los niveles de metionina puede confluír en graves consecuencias para la fisiología de la planta por la modulación de diferentes rutas del metabolismo implicadas en una gran cantidad de procesos celulares. De hecho, plantas con niveles muy bajos de metionina muestran defectos graves en el desarrollo y la germinación (Gallardo *et al.*, 2002; Ravanel *et al.*, 1998).

### 4.1. Síntesis de metionina

En plantas, la metionina es sintetizada por dos vías alternativas: mediante la biosíntesis de *novo*, en los cloroplastos, o alternativamente, a partir de subproductos derivados de su propio catabolismo, ya sea a través del ciclo de Yang, del ciclo del SAM o del ciclo del SMM, estando todos ellos localizados en el citosol (Fig. 6).

- Síntesis de *novo*:

Partiendo de un derivado del aspartato, la homoserina, se sintetiza el precursor inicial de la metionina, O-fosfohomoserina. Este sustrato, junto a

una molécula de cisteína que es la encargada de aportar la unidad de azufre, es utilizado por la enzima cistationina  $\gamma$ -sintasa (CGS, EC 2.5.1.48) como donador del esqueleto del aminoácido para sintetizar cistationina. Debido a que la enzima treonina sintasa (EC 4.2.3.1) compite por el mismo sustrato que CGS, la afinidad en un sentido u otro se considera determinante para desviar la síntesis a cada una de las dos rutas, y por tanto, conlleva a una diferente acumulación de los dos aminoácidos resultantes (Lee *et al.*, 2005). En el tercer paso, la enzima cistationina  $\beta$ -liasa (EC 4.4.1.8) cataliza la síntesis a homocisteína para ser posteriormente metabolizada a metionina mediante el uso de un derivado de folato (5-metiltetrahidropterilglutamato) por medio de la metionina sintasa independiente de cobalamina (MS; EC 2.1.1.14) (Jander y Joshi, 2009).

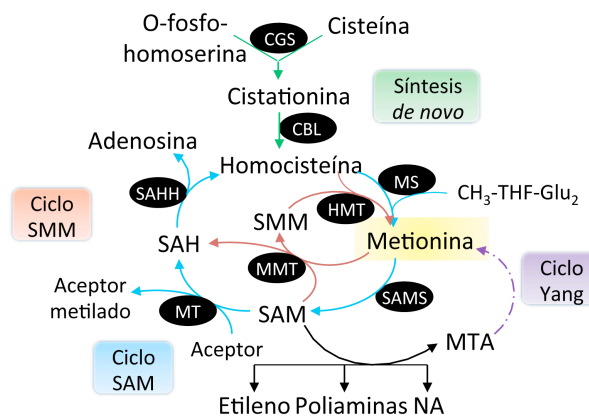


Figura 6. Rutas de síntesis de metionina.

- Ciclo de Yang:

Por medio de este ciclo, la metionina es recircularizada a partir de la degradación inicial de MTA (5-metiltioadenosina), cuya reacción libera una molécula de adenina, y tras posteriores reacciones de defosforilación, isomerización y reducción. Este metabolito intermediario es sintetizado como resultado de la ruta de síntesis del precursor del etileno (ACC, 1-aminociclopropano-1-carboxilato), de las poliaminas y de nicotianamina, todos ellos sintetizados a partir de SAM, el producto derivado directamente de la metionina. El fin de esta ruta cíclica es detoxificar el MTA y recuperar el

grupo de azufre reducido reponiendo el nivel de metionina. Por tanto, este ciclo está implicado en la asimilación del grupo de azufre en el metabolismo de la planta por medio de la regeneración de metionina, siendo de gran importancia en condiciones de ayuno de azufre pero prescindible cuando se disponen de niveles suficientes de este elemento (Sauter *et al.*, 2013).

- Ciclo SAM:

S-adenosilmetionina (SAM) es el donador de metilos por excelencia en las reacciones de metilación; siendo utilizado por el 90% del conjunto de las 239 metiltransferasas (MT; EC 2.1.1.x) existentes en el genoma de *Arabidopsis*. El consumo de SAM deriva en la formación de S-adenosilhomocisteína (SAH). A partir de la metabolización de esta molécula por medio de la enzima SAH hidrolasa (EC 3.3.1.1) se liberan los intermediarios homocisteína y adenosina. El primero de ellos es utilizado para la regeneración de metionina por medio de la acción de la enzima metionina sintasa, cuyo cofactor es un derivado de THF. A partir de dicha metionina y por la acción de SAM sintasa (EC 2.5.1.6), dependiente de ATP, se sintetiza de nuevo SAM en lo que se denomina como ciclo SAM. Esta vía metabólica de reutilización de subproductos permite mantener unos niveles adecuados de SAM en la planta para los diferentes procesos celulares en los que es utilizado. La actividad SAM sintasa en *Arabidopsis* está representada por 4 isoformas que muestran redundancia funcional y que además no muestran diferencias en el patrón de expresión entre ellas (Goto *et al.*, 2005).

- Ciclo SMM:

Como parte de uno de sus procesos catabólicos, la metionina, junto con una molécula de SAM, sintetizan S-metilmetionina (SMM) a través de la enzima metionina-S-metiltransferasa (MMT, EC 2.1.1.12), la cual es genuina de plantas. Del resultado de esta reacción se produce también una molécula de SAH, que es posteriormente metabolizada a homocisteína por la enzima SAH hidrolasa. En este caso, se lleva a cabo la regeneración de metionina a partir de este último intermediario usando como donador del grupo metilo a SMM (y no un derivado de folato) por medio de la enzima homocisteína-S-metiltransferasa (HMT, EC 2.1.1.10). Esta ruta cíclica permite controlar los niveles de metionina libre en la célula en base a la síntesis y degradación de

SMM. Así, este metabolito actúa como la forma de transporte y de almacenaje de metionina en las plantas, y permite establecer una conexión entre órganos fuente y sumidero como son las hojas y las flores y semillas (Bourgis *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 2015; Ranocha *et al.*, 2001).

### 4.2. Regulación del contenido en metionina

De lo comentado anteriormente, en cuanto a los procesos celulares en los que interviene, se deduce que mantener el contenido en metionina en niveles adecuados es un aspecto crucial para la supervivencia de la planta. Por ello, es de interés entender los mecanismos de regulación de su biosíntesis con el fin de conseguir aumentar su contenido y por *ende* el valor nutricional de las plantas en cuanto a fuente de alimentación. El bajo contenido endógeno de dicho aminoácido en la planta, se debe al elevado consumo metabólico del mismo por su conversión en diferentes productos del metabolismo primario. Concretamente, se ha visto que el 80% del contenido de metionina se destina a la síntesis de SAM y el 20% restante va dirigido para la síntesis de proteínas (Giovanelli *et al.*, 1985b), por lo que si estas rutas son altamente demandadas en la planta, el contenido neto del aminoácido será bajo pudiendo comprometer aspectos claves de la homeostasis celular.

Tal como se ha descrito hasta ahora, el contenido en metionina viene establecido principalmente por el grado de expresión de la enzima CGS, considerándose clave y factor determinante para la síntesis del aminoácido por su competencia por el sustrato común con la treonina sintasa (Kim *et al.*, 2002). De hecho, numerosos estudios se han realizado siguiendo esta estrategia, con la sobreexpresión de la enzima, para aumentar el contenido en este aminoácido y así mejorar la calidad nutricional de plantas (Avraham *et al.*, 2005; Di *et al.*, 2003; Hacham *et al.*, 2008). Sin embargo, existe controversia al demostrar si la metionina tiene algún efecto en la regulación de la expresión de CGS (Giovanelli *et al.*, 1985a; Ravanel *et al.*, 1998).

Por el contrario, la existencia de rutas catabólicas de la metionina contribuye a disminuir los niveles de metionina en la planta. Cabe destacar a la metionina  $\gamma$ -liasa que se encarga de metabolizar a la metionina en metanetiol,

amonio y 2-oxobutanoato. El subproducto metanetiol se reincorpora para la síntesis de cisteína y el 2-oxobutanoato puede ser utilizado como precursor para la síntesis de isoleucina (Goyer *et al.*, 2007). Además, la metionina es utilizada también para la síntesis de glucosinolatos, un grupo de metabolitos secundarios con actividad repelente contra insectos herbívoros y patógenos (Falk *et al.*, 2007). Sin embargo, el modo en el que estas rutas son reguladas e influyen en el contenido neto de metionina es aún desconocido (Jander y Joshi, 2009). No obstante, el principal consumo de metionina deriva de las 3 rutas de recirculación mencionadas anteriormente: el ciclo de Yang, ciclo SMM y ciclo SAM. Concretamente, el 6% del contenido neto de metionina es movilizado por el ciclo de Yang, mientras que el 75% depende de las rutas de recirculación asociadas a reacciones de metilación dependientes de SAM (Amir, 2010). Resaltar también que a pesar de la diferente compartimentación de las rutas de biosíntesis de la metionina, la cantidad de metionina que se destina a la síntesis de SAM se encuentra únicamente en el citosol, debido a la exclusiva localización citosólica de SAM sintasa, la ausencia de SAH hidrolasa en cloroplastos y la identificación de un sistema de transporte de SAM/SAH en plastidios, lo que indica que el ciclo SAM está claramente diferenciado de la síntesis de *novo* de metionina, ruta por la cual se produce metionina para el aporte de síntesis de proteína y metabolismo de la metionina dentro del cloroplasto (Wirtz y Droux, 2005). De hecho, la relación directa entre el contenido de metionina y el ciclo SAM se puede explicar por los efectos que conlleva la mutación en SAM sintasa 3 (de *Arabidopsis*), al sobreacumular este aminoácido por la ausencia de una de las enzimas principales encargadas de su catabolismo (Shen *et al.*, 2002). Por todo ello, la biosíntesis de metionina a partir de homocisteína y folato, llevada a cabo por la metionina sintasa en el metabolismo C1 dependiente de THF, es una de las rutas de más relevancia en cuanto al control de los niveles de SAM, y por *ende*, de su implicación en el potencial de metilación. Por ello, las isoformas funcionales de la enzima metionina sintasa implicadas en esta ruta son aquellas localizadas en el citosol, cuyos genes descritos en *Arabidopsis thaliana* son At5g17920 y At3g03780. Una tercera isoforma de esta enzima está localizada en el cloroplasto y está codificada por el gen At5g20980 (Ravanel *et al.*, 2004). La metionina sintasa, como ya se ha mencionado, requiere del uso de THFs, aceptando el grupo metilo del mismo en su forma poliglutamada (concretamente con 3 unidades) y presentando una afinidad

90-220 veces mayor que la observada a partir de la forma no-poliglutamada (Ferrer *et al.*, 2004). Por otro lado, el ciclo del SMM permite reducir la toxicidad derivada de la sobreacumulación de homocisteína debida a la limitación del contenido en folatos para síntesis de metionina. Sin embargo, esta vía no es suficiente para mantener los niveles de SAM adecuados en la planta ya que no se puede completar el ciclo de SAM, el cual depende directamente del contenido en folatos (Sauter *et al.*, 2013). Por ello, la mencionada conexión directa de la metionina sintasa con el ciclo del SAM, convierte a esta enzima en una diana de interés para modular los niveles de metilación.

## 5. La genética química como herramienta de trabajo

### 5.1. Características generales

La genética química se define como la disciplina que estudia los sistemas biológicos, en un contexto celular o de organismo vivo, mediante la aplicación de pequeñas moléculas bioactivas. Éstas se unen directamente de manera reversible o irreversible a la diana proteica de un proceso celular concreto para alterar su función por un período determinado, y ello conlleva a la aparición de un determinado fenotipo (Carlson y White, 2011; Schreiber, 1998). Por tanto, la genética química se considera multidisciplinar, ya que aúna el campo de la síntesis química y el de la genética, junto con diversas técnicas analíticas y bioinformáticas, y es una combinación de estos conocimientos y metodologías lo que permite su éxito (Smukste y Stockwell, 2005).

La base de la genética química se fundamenta en las propiedades de las moléculas utilizadas. Entre ellas podemos destacar la especificidad de los ligandos por su diana en una gran cantidad de procesos metabólicos, la permeabilidad al interior de la célula, y la rapidez de su bioactividad activando o inhibiendo la diana de manera puntual. Además, la actividad biológica de las moléculas depende del tiempo, momento y concentración

aplicada, por lo que el fenotipo resultante varía temporal y cuantitativamente. Debido a estas características, se considera la genética química una adecuada herramienta para el estudio de proteínas multifuncionales y la realización de análisis a gran escala y con alto rendimiento para una gran variedad de organismos. Además, esta disciplina facilita el estudio de proteínas correspondientes a familias multigénicas entre las que existe redundancia funcional, así como permite analizar la función de genes esenciales cuya pérdida por mutación genera letalidad (O'Connor *et al.*, 2011; Stockwell, 2000; Walsh y Chang, 2006).

Los dos tipos de estrategias que existen de genética química son la directa y la reversa. La primera, siendo éste el enfoque más utilizado hasta la fecha, se basa en la aplicación de compuestos bioactivos en un sistema biológico para la selección de candidatos que modulen un fenotipo de interés conocido. Posteriormente es necesario identificar la diana proteica de la molécula y la función que ejerce en una ruta molecular determinada para la consecución del fenotipo de estudio. La identificación de la diana es uno de los pasos más importantes, y a la vez, uno de los factores más limitantes en el éxito de este tipo de estrategias. Por el contrario, la genética química reversa se basa en la búsqueda de moléculas candidatas que interaccionen directamente con una proteína específica, fijada en una matriz, para analizar el fenotipo que produce la molécula en el organismo y descifrar entonces la función molecular que realiza dicha proteína (O'Connor *et al.*, 2011; Smukste y Stockwell, 2005). En ambas estrategias, se requiere de la puesta a punto de la metodología más eficiente y efectiva a emplear en el rastreo de las moléculas candidatas. Un punto clave en este paso es la elección de la colección de compuestos más adecuada en base al objetivo del proyecto, pudiéndose encontrar compuestos sintetizados químicamente o derivados de productos naturales. La efectividad de la técnica depende de la diversidad de las moléculas utilizadas (Hicks y Raikhel, 2012; Raj Kumar *et al.*, 2011; Toth y van der Hoorn, 2010).

## 5.2. Aplicaciones en biología vegetal

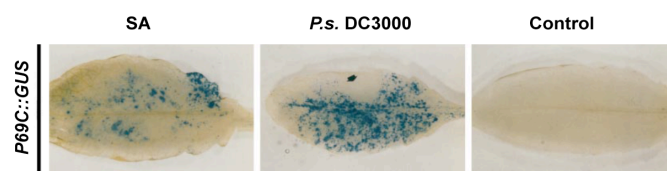
Los principales sectores de aplicación de la genética química son a nivel farmacológico y a nivel agroquímico (Blackwell y Zhao, 2003; Cong *et al.*, 2012). Aparte de los rastreos industriales basados en búsqueda exclusiva de pesticidas, el uso de la genética química en investigación básica de plantas ha adquirido actualmente una década de experiencia, resultando en casos de éxito que han permitido esclarecer nuevos mecanismos en áreas de estudio como el tráfico de endomembrana, señalización hormonal, pared celular, inmunidad y pequeños RNAs (Hicks y Raikhel, 2014). Uno de ellos es la pirabactina, un análogo novel del ABA, con el que se identificó el receptor PYR1 dentro de la familia de receptores PYR/PYL implicados en la señalización y respuesta al ABA. Esto fue posible por la capacidad del compuesto para inducir un fenotipo medible a través de su actividad selectiva sobre uno de los receptores de la familia multigénica, evitando la redundancia funcional (Park *et al.*, 2009). Además, la selectividad de las moléculas por sus dianas específicas, permitió identificar dos de las 6 celulosas sintetas mediante la aplicación de isoxaben, un compuesto inhibidor de la biosíntesis de celulosa (Scheible *et al.*, 2001); así como una de las proteínas, ABF5, homólogas al receptor de auxinas TIR1, implicadas en la represión transcripcional de respuestas a auxinas, mediante la aplicación del herbicida DAS534 (Walsh *et al.*, 2006). En la mayoría de los casos, la identificación de la diana se ha conseguido a través de la estrategia basada en la búsqueda de mutantes insensibles al efecto del compuesto. El uso de la genética química para la modulación de la respuesta inmune es otro de los campos de estudio, resultando en la identificación de inductores de defensa sintéticos, de gran interés a nivel comercial y en el descubrimiento de nuevas rutas de señalización (Bektas y Eulgem, 2014). Algunos ejemplos de estos inductores sintéticos son: i) análogos funcionales del ácido salicílico, como el ácido isonicotínico que produce una expresión de larga duración de genes *PR* sin afectar a los niveles de SA e induce resistencia en *Arabidopsis* frente a cepas virulentas de *Hyaloperonospora arabidopsidis* o *P. syringae* DC3000 (Uknes *et al.*, 1996); ii) un conjunto de compuestos de diferente naturaleza química que fueron definidos como imprimatinas, por su capacidad de activar un mecanismo de priming en las células de *Arabidopsis* para promover la respuesta inmune (Noutoshi *et al.*, 2012b); las sulfonamidas, con potencial



para incrementar la resistencia de *Arabidopsis* frente a *P. syringae* DC3000 al observar su capacidad para reducir el blanqueamiento del cotiledón producido por la infección con *P. syringae* o promover la muerte celular inducida tras la infección con la cepa avirulenta (Noutoshi *et al.*, 2012a; Schreiber *et al.*, 2008); o el derivado de la vitamina K3 (MSB, menadione sodium bisulfite), un compuesto inductor de priming capaz de activar la respuesta defensiva de *Arabidopsis* frente a *P. syringae* DC3000, así como de otras especies frente a otros patógenos (Borges *et al.*, 2009). Sin embargo, el modo de acción de estos inductores de defensa sintéticos no ha sido esclarecido, y denota la importancia de continuar avanzando en la implementación exitosa de estrategias adecuadas para la identificación de la diana de las pequeñas moléculas.

## 6. Antecedentes del trabajo

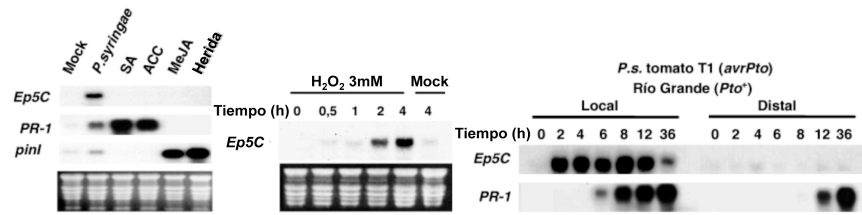
En el laboratorio donde se ha realizado la presente Tesis Doctoral se han identificado y caracterizado previamente dos genes, *P69C* y *Ep5C*, que se activan como respuesta en un contexto de interacción planta-patógeno. *P69C* es una serín-proteasa de la familia de las subtilasas, que son glicoproteínas proteolíticas que se secretan al apoplasto, una región colonizada por muchos patógenos, para realizar su función (Jordá *et al.*, 1999; Tornero *et al.*, 1996). La construcción *pP69C::GUS* introducida en *Arabidopsis* reveló que el gen se expresa como mecanismo de respuesta, local y distal, a la infección producida por la interacción tanto compatible e incompatible con diferentes cepas de *P. syringae* DC3000, y también en respuesta a la aplicación de SA (Fig. 7) (Jordá y Vera, 2000).



**Figura 7. Inducción de *P69C::GUS* como mecanismo de respuesta a la infección por *P.s.* DC3000 y por la aplicación exógena de SA. Extraído de Jordá y Vera, 2000.**

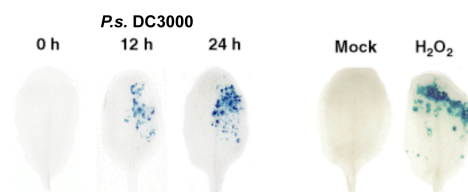
La línea transgénica *P69C::GUS* fue utilizada posteriormente como herramienta para la búsqueda de genes reguladores de la respuesta inmune. El mutante *csb3* (*constitutive subtilisin3*) se identificó en este rastreo al resultar en la expresión constitutiva del transgen, y que mostró un incremento de la resistencia a *P.s.* DC3000, asociado a un aumento en la síntesis y percepción de SA. El gen *CSB3* codifica una enzima de la ruta de biosíntesis de isopentenil difosfato a través de la ruta dependiente del metil-eritritol ciclofosfato en el cloroplasto. Por lo que este mutante permitió establecer un nuevo nivel de complejidad en la respuesta inmune de la planta al relacionar a *CSB3*, y la ruta metabólica en la que participa, como un punto modulador de la implementación de una adecuada respuesta de resistencia mediada por SA a patógenos biotrofos (Gil *et al.*, 2005). Además, el mutante *csb3* mostró un incremento de la activación transcripcional del gen *SBT3.3*, una subtilasa extracelular endógena de *Arabidopsis*, recientemente descrita en el laboratorio, e implicada en la respuesta inmune frente a patógenos biotrofos. La sobreexpresión de este gen produjo un incremento de la resistencia, mientras que la inhibición de *SBT3.3* resultó en un aumento de la susceptibilidad. Esta modulación de la respuesta inmune fue debida a una regulación del mecanismo de remodelación de cromatina por la activación de marcas epigenéticas, que resultó en una activación del mecanismo de priming dependiente de SA. Con estos resultados, se pudo concluir la importancia de la subtilasa *SBT3.3* en el establecimiento de una adecuada respuesta inmune a través de un mecanismo de priming dependiente del control epigenético (Ramírez *et al.*, 2013).

Otro de los genes caracterizados, *Ep5C*, codifica una peroxidasa catiónica extracelular, identificada en plantas de tomate, cuya expresión se induce rápida y específicamente en respuesta a la infección producida por *P. syringae* DC3000 y por el tratamiento exógeno con  $H_2O_2$ . A diferencia de otros genes asociados con la respuesta defensiva, la expresión de *Ep5C* no parece estar modulada por la respuesta a SA (Fig. 8) (Coego *et al.*, 2005a).



**Figura 8. Inducción específica en tomate de *Ep5C* en respuesta a la infección por *P.s.* DC3000 y  $H_2O_2$ .** Extraído de Coego *et al.* 2005a.

La inducción característica y singular de *Ep5C* en tomate fue de gran interés para generar líneas transgénicas funcionales de *Arabidopsis pEp5C::GUS* que mostraran dicha inducción específica (Fig. 9) para su utilización como herramienta de trabajo para la búsqueda de reguladores de la inmunidad.



**Figura 9. Inducción de *Ep5C::GUS* en *Arabidopsis* tras una infección por *P.s.* DC3000 y la aplicación de  $H_2O_2$ .** Extraído de Coego *et al.* 2005a.

Con esta estrategia, se identificaron en el laboratorio los mutantes *ocp* (*overexpressor of cationic peroxidase*), como *ocp1*, *ocp3* y *ocp11* (Agorio y Vera, 2007; Coego *et al.*, 2005b; García-Andrade *et al.*, 2013; López *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2009), cuya implicación en la respuesta defensiva ha sido establecida en este laboratorio y han permitido descubrir nuevos componentes del complejo sistema inmune de la planta. Concretamente, el mutante *ocp1* se corresponde con una mutación en el gen *NRPD2*, que codifica la segunda subunidad mayor de la RNA PolIV, requerida de forma esencial para el desarrollo de la RdDM, un mecanismo responsable de la metilación de DNA en el silenciamiento génico como vía de regulación epigenética. El incremento de la resistencia frente a *P.s.* DC3000 observado en plantas mutantes defectuosas para la PolIV, sugirió la implicación de esta enzima en la respuesta inmune de la planta, a través de un mecanismo de priming basado en la inducción de genes de defensa dependientes de SA mediado por un

incremento en la deposición de marcas de activación de histonas (como la acetilación de H3K9 y la trimetilación de la H3K4). Estos resultados resaltaron la importancia de la regulación epigenética como un mecanismo para la regulación de la inmunidad de la planta (López *et al.*, 2011). La mutación *ocp11* corresponde a un fallo genético en el gen *ARGONAUTA4* (AGO4), un componente también esencial en la ruta RdDM. Por el contrario, los mutantes *ocp11* mostraron un incremento de la susceptibilidad frente a *P.s.* DC3000, a pesar de no estar afectados en la percepción de SA. Este fenotipo se asoció a una reducción en el contenido de citosinas metiladas en el DNA. Por lo que este mutante puso de manifiesto la implicación de la ruta RdDM, via AGO4, como un mecanismo de regulación epigenética, fundamental para la correcta activación de la respuesta defensiva de la planta frente a patógenos biotrofos (Agorio y Vera, 2007).

En resumen, con estos antecedentes y por la inducción de estos genes en la respuesta de la planta en un contexto patogénico, se justifica la utilización de las líneas *P69C::GUS* y *Ep5C::GUS* como herramientas genéticas idóneas para descifrar y entender nuevos componentes de las complejas rutas metabólicas que se regulan en la respuesta inmune de la planta frente a patógenos biotrofos.



# OBJETIVOS



Con el fin de profundizar en el conocimiento sobre los mecanismos que controlan la activación de la respuesta inmune en plantas, y de forma particular durante la interacción de la planta *Arabidopsis thaliana* con la bacteria hemibiotrofa *Pseudomonas syringae* DC3000, se plantean dos objetivos específicos:

1. Identificación de mutaciones supresoras del fenotipo de resistencia del mutante *csb3* de *Arabidopsis*. Clonación del gen responsable, caracterización del producto génico y evaluación del mecanismo y rutas de señalización a través del cual ejerce su función en el control de la inmunidad.
2. Puesta a punto de métodos de escrutinio basados en genética química y eventual identificación de moléculas agonistas de la respuesta inmune. Entendimiento del mecanismo de acción de las moléculas identificadas, caracterización de sus dianas e incardinación de dichos hallazgos en el contexto de su potencial papel regulador de la respuesta inmune activada por patógeno.







# RESULTADOS





# CAPÍTULO 1

La correcta metilación de la región anticodón de los tRNAs es requerida para la respuesta inmune

\* Los resultados presentados en este Capítulo han sido realizados en colaboración con los siguientes coautores: Vicente Ramírez, Ana López, María José Castelló, María José Gil, Graham J Etherington, Bo Zheng y Peng Chen; y serán enviados próximamente para su publicación.



## 1. Resumen

El RNA de transferencia (tRNA) es el tipo de RNA que sufre un mayor número de modificaciones, y estas modificaciones de tRNAs están altamente conservadas en todos los organismos vivos. La mayoría de dichas modificaciones, e independientemente de su posición dentro de la molécula y de la frecuencia con la que se producen en cada especie de tRNA, están fundamentadas en procesos de metilación. Recientes descubrimientos han revelado una complejidad sin precedentes en los patrones de modificación de tRNA, su regulación y las funciones de éstos, sugiriendo que cada nucleósido modificado en el tRNA puede tener su propia función específica. Sin embargo, en plantas, nuestro conocimiento respecto al papel de las modificaciones individuales de tRNA y cómo se regulan estas modificaciones es muy limitado. En un rastreo genético diseñado para identificar factores que regulan la respuesta inmune en *Arabidopsis*, identificamos el mutante que denominamos *scs9* (por *supresor de csb3*), el cual muestra una susceptibilidad aumentada al patógeno *Pseudomonas syringae* DC3000. Nuestros resultados revelan que *SCS9* codifica una 2'-O-ribosa metiltransferasa de tRNA encargada de metilar los nucleosidos N32 y N34 de la región anticodón de los tRNAs. Estas modificaciones de tRNA mediadas por *SCS9* se incrementan durante el curso de la infección con *P.s.* DC3000, y la pérdida de tal modificación de tRNA, como se observa en los mutantes *scs9*, compromete severamente la inmunidad de la planta contra el mismo patógeno sin afectar la ruta de señalización inmune mediada por el ácido salicílico (SA). Nuestros resultados apoyan un modelo que da importancia al control de ciertas modificaciones de tRNA para la implementación de una respuesta inmune efectiva en *Arabidopsis*, y por tanto expande el repertorio de componentes moleculares esenciales para una eficiente respuesta de resistencia a enfermedad.

## 2. Introducción

El RNA de transferencia (tRNA) es un RNA no codificante responsable de la adición precisa de un aminoácido a la proteína naciente que está siendo sintetizada por la maquinaria ribosomal y, por lo tanto, funciona como una molécula adaptadora responsable de decodificar el RNA mensajero en la secuencia peptídica correspondiente. Las moléculas de tRNA están constituidas por 75-78 nucleótidos y adoptan una conformación tridimensional característica en forma de L, a menudo representada bidimensionalmente como una hoja de trébol para indicar cada uno de los cuatro brazos de tallo-bucle (brazo aceptor, brazo D variable, brazo anticodón y brazo variable/T $\psi$ C) generados por el apareamiento interno de bases. Una característica distintiva adicional del tRNA es que de las 107 modificaciones post-transcripcionales encontradas en el conjunto de todos los tipos de RNA, 92 corresponden específicamente a los tRNAs (Machnicka *et al.*, 2013). Curiosamente, la ruta biosintética de la mayoría de las modificaciones de tRNA incluyen al menos una etapa de metilación y el número de bases modificadas varía entre tipos de tRNA individuales, y entre diferentes especies procariontas y eucariotas. Las modificaciones pueden consistir desde una única metilación en la ribosa hasta modificaciones complejas de cadenas laterales, que pueden encontrarse en diferentes posiciones en el anillo purina/pirimidina (El Yacoubi *et al.*, 2012; Hori, 2014; Machnicka *et al.*, 2013). En bases de datos de modificaciones de RNA (*e.g.*, <http://modomics.genesilico.pl/>) se deposita la información completa sobre tipos y posiciones de estas modificaciones en las moléculas de tRNA, rutas biosintéticas de tRNA, y enzimas responsables de las mismas. Las modificaciones de nucleósidos de tRNA siguen siendo ampliamente estudiadas en bacterias y levaduras, y datos sobre ello en humanos han sido recientemente descubiertos. El hecho de que las modificaciones post-transcripcionales estén altamente conservadas, basado en la variedad de organismos estudiados, enfatiza su importancia. En bacteria y *S. cerevisiae*, la relación entre el tipo y la cantidad de nucleósidos modificados en las moléculas de tRNA y el metabolismo se ha sugerido como un dispositivo regulador que actúa como sensor biológico, continuamente adaptándose en base a las condiciones de crecimiento (El Yacoubi *et al.*, 2012; Novoa *et al.*, 2012; Phizicky y Hopper, 2010). Sin embargo, poco se ha documentado sobre

los nucleósidos modificados en los tRNA de plantas, y la investigación de la regulación genética y bioquímica aún está en sus inicios. Sin embargo, un estudio reciente realizado en *Arabidopsis* y el álamo híbrido (*Populus tremula* x *tremuloides*) identificó 21 nucleósidos modificados en tRNAs en ambas especies (Chen *et al.*, 2010). A pesar de ello, se dispone de muy pocas secuencias de tRNA de plantas para identificar nucleósidos modificados en posiciones concretas dentro de los diferentes tRNAs, y tampoco se han identificado muchas enzimas de plantas encargadas de las modificaciones de tRNA (Chen *et al.*, 2010; Kalhor y Clarke, 2003; Miyawaki *et al.*, 2006; Walden *et al.*, 1982).

Los tRNAs de *S. cerevisiae* tienen una media de 12.6 modificaciones por cada molécula de tRNA, donde parte (2.6 modificaciones) se encuentran dentro de la región anticodón (N32-N38), y el resto están alejadas de esta región formando parte de la alteración del cuerpo principal del tRNA (Juhling *et al.*, 2009). Este ratio y distribución de las modificaciones parece estar conservado en los tRNAs de mamíferos. Las modificaciones en el cuerpo principal del tRNA parecen ser cruciales para la estabilidad de la molécula, ya que la ausencia de ciertas modificaciones en esta zona promueve una ruta de control de calidad que resulta en la degradación de tRNAs específicos no procesados correctamente (Thompson y Parker, 2009). Por otro lado, muchas modificaciones de tRNA que ocurren en la región anticodón juegan varios papeles cruciales en la traducción (Agris *et al.*, 2007; Phizicky y Hopper, 2010). Algunas de estas modificaciones exhiben la función de asegurar la fidelidad de carga del aminoácido, mientras que otras son responsables de la eficiencia y/o precisión de la traducción, ya que afectan en la interacción codón-anticodón que tiene lugar en el ribosoma. Además, las modificaciones que ocurren en esta región, incluso cerca de ella, afectan también al mantenimiento del marco de lectura adecuado en el proceso de traducción de proteínas. Las deficiencias de nucleósidos modificados pueden por lo tanto desencadenar en una reducción de la correcta traducción proteica, por un incremento en el número de errores de la decodificación, que afectarán a la regulación de la expresión génica y al metabolismo celular. En la mayoría de los casos, sin embargo, no se ha esclarecido exactamente los tRNAs que se ven afectados por la falta de modificaciones específicas en la región anticodón, cómo este hecho explica un determinado fenotipo en el organismo en

cuestión o cómo dicha alteración en el patrón de modificaciones influye en algún paso concreto de la traducción (Chen *et al.*, 2010; Guy *et al.*, 2012). Una de estas modificaciones relevantes es la simultánea 2'-*O*-metilación de las posiciones N32 y N34, donde la segunda ocupa el nucleótido de la posición de balanceo (nucleótido "wobble") del anticodón. Esta modificación es crítica para la función del tRNA, pero sin embargo permanece aún inexplorada. En levadura, la 2'-*O*-metilación de dichos nucleósidos ocurre en los tRNAs correspondientes al tRNA<sup>Phe</sup>, tRNA<sup>Leu</sup> y tRNA<sup>Trp</sup>, y se requiere de la metiltransferasa Trm7. Las cepas mutantes *trm7* muestran reducción de crecimiento, probablemente debido a defectos en la traducción (Pintard *et al.*, 2002). El interés que suscita la función realizada por Trm7 y las modificaciones asociadas se debe además a dos motivos (Guy *et al.*, 2012). En primer lugar, la 2'-*O*-metilación de la región anticodón está altamente conservada en eucariotas. De hecho, cinco genes secuenciados correspondientes al tRNA<sup>Trp</sup> de eucariotas mostraron la presencia de Cm32 y Cm34, y los 17 genes secuenciados del tRNA<sup>Phe</sup> de eucariotas poseían las modificaciones Cm32 y Gm34, ésta última encontrada sólo en 16 de esos genes (Juhling *et al.*, 2009). En segundo lugar, porque la falta de dichas modificaciones está también asociada con patologías de humanos. Así, mutaciones en la metiltransferasa homóloga de humanos, FTSJ1, se han asociado con demencias mentales (Takano *et al.*, 2008). Además, la población de moléculas de tRNA<sup>Phe</sup> de células procedentes de neuroblastoma y de tumores ascíticos de Ehrlich está compuesta por una proporción substancial de moléculas que no presentan las modificaciones Cm32 y Gm34 (Kuchino *et al.*, 1982). A pesar de los defectos en el crecimiento de los mutantes *trm7Δ* de levadura, del hecho de que está conservada entre diferente organismos la 2'-*O*-metilación en la región anticodón, y la probable importancia funcional de dichas modificaciones mediadas por FTSJ1 en humanos, no existen evidencias hasta la fecha que apoyen la importancia de este tipo de modificación del tRNA en plantas, y las consecuencias de un fallo en su control por defectos en la(s) metiltransferasa homóloga a TRM7. Además, mientras que las modificaciones de nucleósidos de tRNA son comúnmente reportadas en bacteria y levadura, donde se han identificado la mayoría de las rutas bioquímicas y los genes que codifican las enzimas de modificación, el estudio de los nucleósidos modificados de tRNA en plantas y su funcionalidad ha sido raramente documentado. La presencia de nucleósidos modificados está bien



aceptada pero existe escasa información de las enzimas modificadoras en plantas.

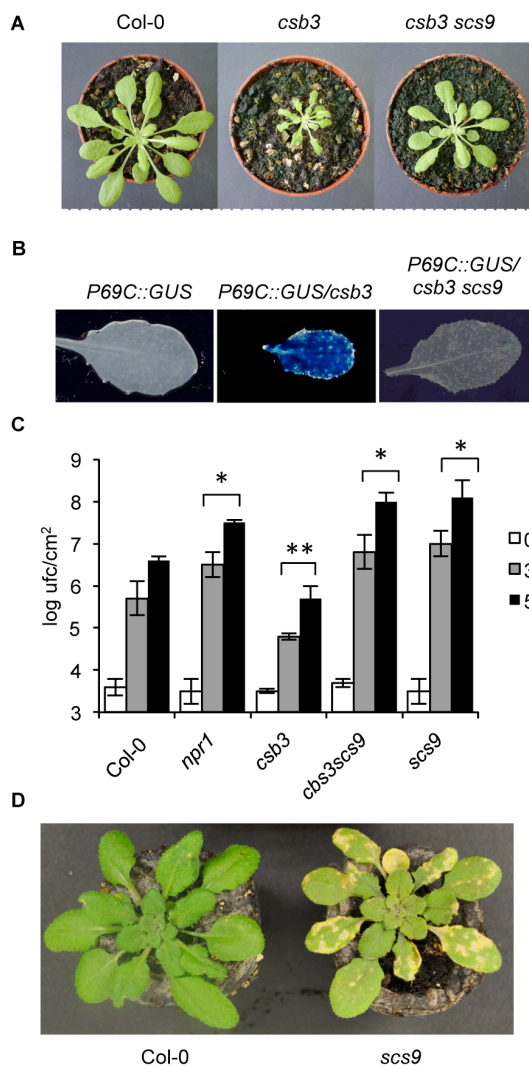
El presente estudio proporciona información sobre las implicaciones funcionales de algunas modificaciones específicas de tRNA en la región anticodón sobre la activación de la resistencia en *Arabidopsis* frente al patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* DC3000. Durante la búsqueda de supresores genéticos en *Arabidopsis* de la resistencia aumentada a enfermedad observada en el mutante *csb3* (Gil *et al.*, 2005), identificamos el gen *SCS9* (procedente de supresor de *csb3*), que codifica un homólogo funcional de la metiltransferasa Trm7 de levadura. Nuestros resultados proporcionan evidencias que indican que *SCS9* es crucial para mantener intacta la inmunidad de la planta frente al patógeno bacteriano *P.s.* DC3000. Así, alelos mutantes de pérdida de función de *SCS9* suprimen dicha inmunidad. Análisis genéticos, moleculares y fisiológicos indican por tanto que es de capital importancia para la planta el mantener intacta la 2'-*O*-metilación de la región anticodón de las moléculas de tRNA para asegurar la inmunidad contra *P.s.* DC3000. Por lo tanto, nuestros resultados descubren un nuevo componente crítico requerido para la resistencia a enfermedad en *Arabidopsis*.

### 3. Resultados

#### 3.1. Identificación de *scs9*

El mutante *csb3* con resistencia notablemente incrementada a patógenos biotrofos fue identificado y caracterizado por Gil *et al.* (Gil *et al.*, 2005) durante una búsqueda de supresores de la respuesta inmune en *Arabidopsis*. La resistencia aumentada a *P.s.* D3000 en el mutante *csb3* se acompañó con un aumento en la acumulación de ácido salicílico (SA) y la expresión constitutiva de genes relacionados con patogénesis (*PR*). Además, el análisis de epistasia con diferentes genes involucrados en la ruta de transducción de señal del SA reveló que las plantas *csb3* requerían la síntesis de SA intacta y su reconocimiento a través del receptor NPR1 (Gil *et al.*, 2005).

Realizamos posteriormente una búsqueda de supresores de *csb3* en un rastreo por segunda mutagénesis para mejorar nuestro entendimiento sobre la inmunidad de plantas. Para ello, semillas homocigotas de *csb3* fueron mutagenizadas con metanosulfonato de etilo (EMS), y se crecieron aproximadamente 20000 semillas M2 para su rastreo y para identificar individuos que dejaran de exhibir el incremento de la resistencia frente a *P.s.* DC3000 atribuido a la mutación *csb3*. Este rastreo se tradujo en el aislamiento del mutante recesivo *scs9* (Fig. 1). Las plantas *csb3 scs9* perdieron el característico fenotipo de arresto morfológico y de crecimiento de las plantas *csb3* (Fig. 1A). Además, el marcador del gen de respuesta a patógeno *pP69C::GUS* (Jordá y Vera, 2000), expresado constitutivamente en el mutante simple *csb3* (Gil *et al.*, 2005), fue derogado en el mutante doble *csb3 scs9* (Fig. 1B). Además, observaciones comparativas de las tasas de crecimiento de *P.s.* DC3000 en las hojas infectadas de Col-0, *csb3* y *csb3 scs9*, mostraron que la mutación *scs9* bloquea la resistencia aumentada frente a *P.s.* DC3000 característica de la mutación *csb3* (Fig. 1C). Notablemente, las plantas *csb3 scs9* fueron mucho más susceptibles a *P.s.* DC3000 que las plantas Col-0, evidenciado por un incremento del crecimiento bacteriano de 100 veces comparado con las plantas *csb3*. La susceptibilidad aumentada de las plantas *csb3 scs9* frente a *P.s.* DC3000 fue de magnitud similar, o incluso superior, a la observada en plantas *npr1* (Fig. 1C). Además, el análisis genético indicó que la mutación *scs9* era extragénica a *csb3*, y cuando fue segregada del fondo mutante de *csb3* por retrocruzamiento con plantas Col-0, la respuesta inmune comprometida conferida exclusivamente por la mutación *scs9* se mantuvo en ausencia de la mutación *csb3* (Fig. 1C). El aumento del crecimiento bacteriano en el mutante simple *scs9* fue acompañado por los síntomas característicos de clorosis inducida, probablemente debido a los niveles altos de crecimiento bacteriano alcanzados en el mutante (Fig. 1D). En resumen, estos resultados indican que *SCS9* representa un locus importante en la regulación de la inmunidad de la planta frente a *P.s.* DC3000 en *Arabidopsis*.



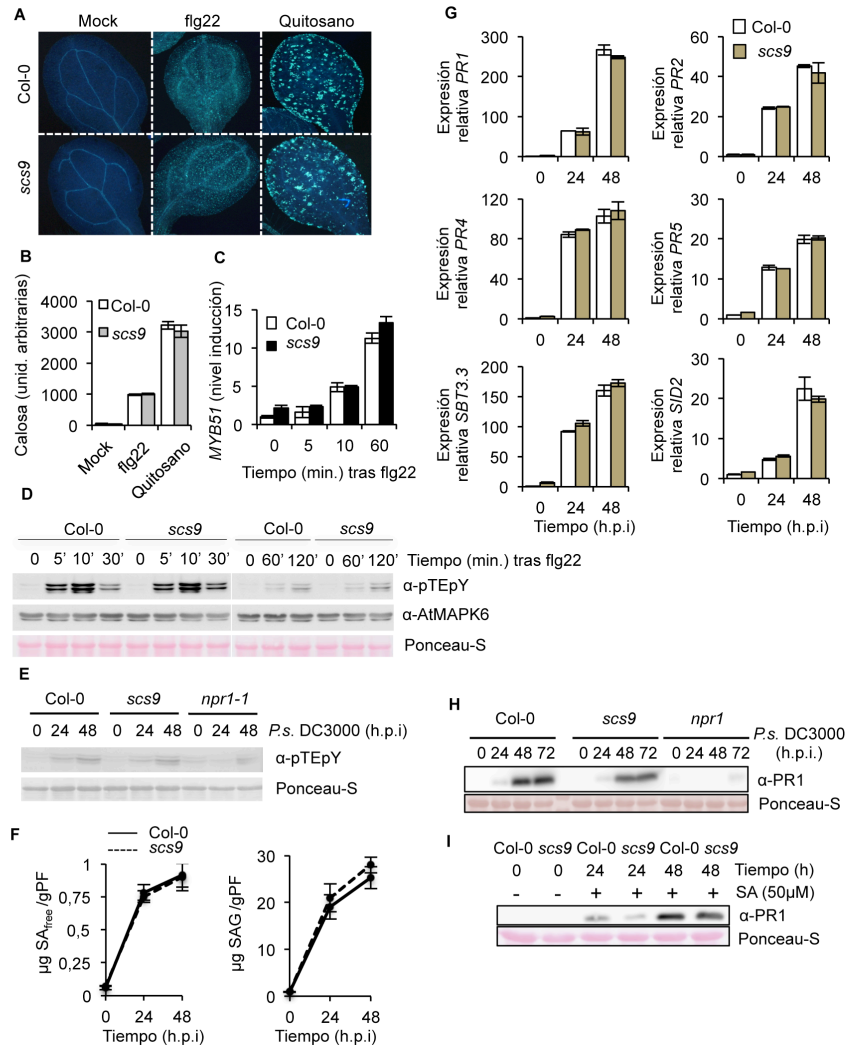
**Figura 1. Caracterización de las plantas *scs9*.**

(A) Comparación de las plantas Col-0, *csb3* y *csb3 scs9* a 4 semanas después de la siembra. Se puede observar el fenotipo enano del mutante simple *csb3* y la recuperación del crecimiento conferida por la mutación *scs9* en el mutante doble *csb3 scs9*. (B) Análisis histoquímico comparativo de la actividad GUS en hojas de roseta de la planta parental Col-0 que porta el transgen *pP69C::GUS*, la cual no muestra expresión del gen delator (izquierda), de las plantas *csb3* que muestran expresión constitutiva de GUS (centro), y la reversión de dicha expresión en la planta *csb3 scs9* (derecha). (C) Tasa de crecimiento de *P.s.* DC3000 en plantas Col-0, *npr1-1*, *csb3*, *csb3 scs9*, y *scs9*. El crecimiento bacteriano se midió a 0 (barras blancas), 3 (barras grises), y 5 (barras negras) días post inoculación (d.p.i). Las barras de error representan la desviación estándar (DE) (n=12). Los asteriscos indican diferencias estadísticas respecto a Col-0 (P<0.05) utilizando un análisis estadístico t-Student. (D) Plantas representativas de Col-0 y *scs9* inoculadas con *P.s.* DC3000, donde el mutante *scs9* exhibe un aumento distinguido de la clorosis debida al crecimiento bacteriano.

### 3.2. Las plantas *scs9* mantienen intactos los componentes de la inmunidad innata y la inmunidad mediada por SA

La susceptibilidad aumentada a *P.s.* DC3000 de las plantas *scs9* podría resultar de una pérdida del reconocimiento del patógeno o por defectos en cualquiera de las etapas posteriores en la ruta de señalización que lleva a la activación de la respuesta inmune. El entendimiento sobre el nivel al cual *scs9* podría estar operando se consiguió al estudiar las principales marcas características de las respuestas inmunes de la planta, en búsqueda de defectos que pudieran explicar la inmunidad defectuosa del mutante. En primer lugar, probamos si las plantas *scs9* podrían estar afectadas en el reconocimiento temprano de los patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs) a través de la medida de la deposición mediada por PAMP de calosa, un polímero  $\beta$ -1,3-glucano que se deposita en la cara interna de la pared de la célula infectada y se asocia a la inmunidad innata. El grado de inducción de deposición de calosa en hojas tratadas con PAMP se monitorizó tras la tinción con azul de anilina, se examinó por microscopía de fluorescencia UV (Fig. 2A), y se cuantificó mediante conteo de los píxeles amarillos de las imágenes digitales (Fig. 2B). La respuesta al péptido inductor de flagelo bacteriano flg22, o al quitosano, los cuales son PAMPs no relacionados entre ellos que inducen la deposición de calosa en *Arabidopsis*, fue similar en las plántulas *scs9* y Col-0 (Fig. 2A y 2B). La expresión del gen *MYB51* (Clay *et al.*, 2009) y la activación de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (Asai *et al.*, 2002; Bethke *et al.*, 2009) constituyen marcas características adicionales de la señalización inmune temprana mediada por PAMP. La inducción de la acumulación del transcrito *MYB51*, medida por RT-qPCR a los 5, 10 y 60 min después de la aplicación de flg22, no reveló diferencias entre las plantas Col-0 y *scs9* (Fig. 2C). La inducción temprana de la activación de MAPK tras la aplicación de flg22 se visualizó empleando un anticuerpo que reconoce los residuos fosforilados dentro de la región de activación de MAPK. El análisis western blot de extractos de proteínas derivados de las plantas Col-0 y *scs9* reveló señales inmunorreactivas positivas en los dos polipéptidos correspondientes a MPK6 y MPK3 (Fig. 2D). La activación transitoria de ambas quinasas se produjo después de la aplicación de flg22; siendo la

activación máxima a 5-10 min. y luego disminuida a los 30 min., permaneciendo sólo parcialmente activa a 120 min. después del tratamiento. Los resultados no revelaron diferencias entre las plantas Col-0 y *scs9* con respecto al patrón de activación de MAPK (Fig. 2D). Todas estas observaciones indican por tanto que la activación de la inmunidad basal no se vio afectada en el mutante *scs9*.



**Figura 2. Caracterización del mutante *scs9*.** (A) Deposición de calosa en cotiledones de plántulas Col-0 y *scs9* tras la aplicación de flg22 y quitosano. Se aplicó la tinción de

azul de anilina y microscopía de fluorescencia para visualizar la acumulación de calosa. (B) La deposición de calosa se calculó como unidades arbitrarias por cuantificación del número de píxeles amarillos por millón en micrografías digitales de hojas tratadas con flg22 o quitosano a las 24 h. Las barras representan la media  $\pm$  DE, de n=15 repeticiones independientes. (C) Análisis por RT-qPCR que muestra la expresión génica de *MYB51* en plantas Col-0 y *scs9* tras la aplicación de flg22. Los datos representan la media  $\pm$  DE; n=3 repeticiones. (D) Western blot con los anticuerpos anti-pTEpY de extractos crudos de proteína derivados de plantas Col-0 y *scs9* a 0, 5, 10, 30, 60 y 120 minutos después del tratamiento con flg22. A continuación se muestra el western blot con un anticuerpo anti-AtMAPK6 que revela que la proteína MPK6 se acumuló a niveles similares en todas las muestras. La igual carga de proteína se verificó mediante la tinción de la membrana de nitrocelulosa con colorante Ponceau-S. Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares. (E) Western blot con el anticuerpo anti-pTEpY de extractos crudos de proteína derivados de plantas Col-0, *scs9* y *npr1-1* a 0, 24 y 48 h.p.i con *P.s.* DC3000. La carga de proteínas iguales se verificó mediante tinción del filtro de nitrocelulosa con colorante Ponceau-S. Los experimentos se repitieron tres veces con resultados similares. (F) SA libre y acumulación de SAG conjugado en Col-0 y mutante *scs9* a 0, 24 y 48 h.p.i con *P.s.* DC3000. Los datos representan la media  $\pm$  DE; n=3 repeticiones. (G) Análisis por RT-qPCR que muestra la expresión génica de *PR1*, *PR2*, *PR4*, *PR5*, *SBT3.3* y *SID2* en plantas Col-0 y *scs9* tras la infección con *P.s.* DC3000. Los datos representan la media  $\pm$  DE; n=3 repeticiones. (H - I) Western blots con el anticuerpo anti-PR1. H) inhibición de la acumulación de la proteína PR1 en *npr1*, en comparación a las plantas Col-0 o *scs9* después de la inoculación con *P.s.* DC3000. I) acumulación inducida de la proteína PR1 tras la aplicación de SA (50 $\mu$ M) en plantas Col-0 y *scs9*. Los experimentos fueron repetidos tres veces con resultados similares.

A continuación, nos preguntamos si en una interacción planta-patógeno, como la que se da tras la inoculación con *P.s.* DC3000, las plantas *scs9* podrían tener impedida la capacidad de inducción de la activación de MPK. El análisis de western blot de extractos proteicos derivados de plantas Col-0, *scs9* y *npr1*, éste último utilizado como control de un mutante con una inmunidad deprimida por la incapacidad de percibir SA, reveló señales inmunorreactivas positivas en los dos polipéptidos correspondientes a MPK6 y MPK3, que fueron visibles a las 24-48 horas post inoculación (h.p.i.) con *P.s.* DC3000 (Fig. 2E). Los resultados no mostraron diferencias notables entre los tres genotipos, lo que sugiere que los defectos de *scs9*, como en *npr1*, se situaban posteriormente a la activación de MPK tras la percepción del patógeno. Defectos en la síntesis o en la percepción del ácido salicílico (SA) explican la respuesta inmune defectuosa observada en diferentes mutantes (e.g., *sid2* o

*npr1*, respectivamente) (Cao *et al.*, 1997; Nawrath y Metraux, 1999). Por consiguiente, se consideró si las plantas *scs9* podrían tener defectos en la biosíntesis y/o acumulación de SA. Para ello examinamos comparativamente las concentraciones de SA libre y glucósido salicilato conjugado (SAG) en tejidos foliares de plantas *scs9* y Col-0 después de una inoculación con *P.s.* DC3000 (Fig. 2F). En plantas *scs9*, las cantidades basales e inducidas de SA libre igualaron los niveles observados en plantas Col-0. El contenido de SAG fue coherente con el de SA (Fig. 2F). Este hallazgo sugirió que el incremento de susceptibilidad a patógeno observado en las plantas *scs9* no era debido a defectos en la biosíntesis de SA.

Posteriormente se examinó si la percepción de SA era defectuosa en *scs9*, como le ocurre al mutante *npr1* que al no percibir SA es incapaz de inducir la expresión de genes de defensa dependientes del SA (Cao *et al.*, 1997). Para ello, se examinó por RT-qPCR la expresión inducida de varios genes dependientes del SA en plantas *scs9* y Col-0 tras la inoculación con *P.s.* DC3000. Los perfiles de expresión de los genes *PR1*, *PR2*, *PR4*, *PR5* y *SID2*, e incluso el gen *SBT3.3* recientemente descrito y que es fundamental en la inmunidad de las plantas (Ramírez *et al.*, 2013), no mostraron diferencias en las plantas *scs9* cuando se compararon con Col-0 a 0, 24 y 48 h.p.i. con *P.s.* DC3000 (Fig. 2G). Esto indicaría que la reprogramación transcripcional en las plantas *scs9* tras la percepción del patógeno no se ve afectada. Esta conclusión fue apoyada por el análisis de western blot que mostró que la acumulación de la proteína PR1 después de la infección bacteriana fue similar en *scs9* y Col-0 a las 24 h.p.i.; mostrando ambos genotipos una mayor acumulación de la proteína a 48 y 72 h.p.i. aunque con una ligera deficiencia en la acumulación de proteína PR1 observada en el mutante (Fig. 2H y Tabla S1). Como era de esperar, la acumulación de PR1 fue casi ausente en las plantas *npr1*, utilizadas aquí como control (Fig. 2H y Tabla S1). Estos resultados revelaron diferencias entre los mutantes *scs9* y *npr1*, y sugirió que las mutaciones no son alélicas. Además, se observó una notable acumulación de la proteína PR1 en respuesta a la aplicación de SA exógeno en *scs9* y Col-0 (Fig. 2I), aunque con una ligera reducción en las plantas *scs9* (Tabla S1), corroborando que las plantas *scs9* no muestran defectos severos en la percepción de SA.

**Tabla S1. Acumulación de la proteína PR1** a diferentes tiempos tras la inoculación con *P.s.* DC3000 en plantas *scs9* y *npr1* con respecto a Col-0 (tabla izquierda), y también después de la aplicación de SA en plantas *scs9* con respecto a Col-0 (tabla derecha). Las bandas de western blot, como aquellas mostradas en Fig. 2H y 2I, se cuantificaron usando el programa informático ImageJ. Se cuantificaron las intensidades de banda de tres repeticiones técnicas de dos experimentos biológicos independientes y se representaron los niveles relativos respecto al control correspondiente de Col-0 como porcentaje  $\pm$  DE.

% de acumulación de PR1 tras inoculación con <i>P.s.</i> DC3000			% de acumulación de PR1 tras aplicación de SA	
	<i>scs9</i>	<i>npr1</i>		<i>scs9</i>
24 h.p.i	98.0 $\pm$ 4.1	4.3 $\pm$ 1.2	24h	84.1 $\pm$ 11.2
48 h.p.i	88.3 $\pm$ 6.2	3.9 $\pm$ 0.9	48h	92.3 $\pm$ 8.9
72 h.p.i	82.4 $\pm$ 5.8	12.6 $\pm$ 5.4		

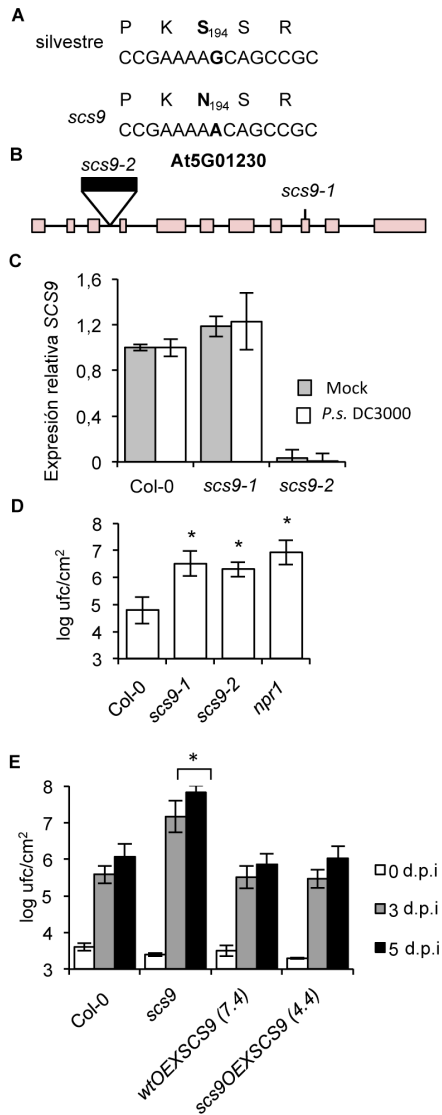
### 3.3. *SCS9* es At5g01230 y codifica una 2'-O-ribosa metiltransferasa de tRNA

La posición de la mutación *scs9* se mapeó a partir de la población segregante del retrocruce de *scs9* con plantas Landsberg *erecta* (*Ler*). Las plantas F2 fueron evaluadas por co-segregación de la susceptibilidad aumentada a *P.s.* DC3000 utilizando polimorfismos de longitud de secuencia simple (SSLPs). Se analizaron treinta y cinco plantas seleccionadas con fenotipo *scs9* y se acotó la mutación en el cromosoma 5, en cercana proximidad a la región telomérica superior, y vinculado al marcador SGCSNP13418. A continuación, se recogieron 80 individuos F2 con el fenotipo *scs9*, se aislaron los genomas individuales, que fueron agrupados y secuenciados en profundidad utilizando la plataforma Illumina GAIIx. Los datos resultantes se analizaron utilizando un sistema bioinformático desarrollado por Austin *et al.* (Austin *et al.*, 2011) para identificar una región genómica donde residieran las mutaciones putativas de interés. Entre los intervalos de mapeo identificados y el genoma secuenciado, se identificó una sustitución de un nucleótido correspondiente a una transición de G-por-A, como se esperaba para una mutación causada por mutagénesis con EMS. Esto dio como resultado una sustitución Ser-por-Asn en la posición 194 de la proteína codificada por el gen At5g01230 (Fig. 3A).



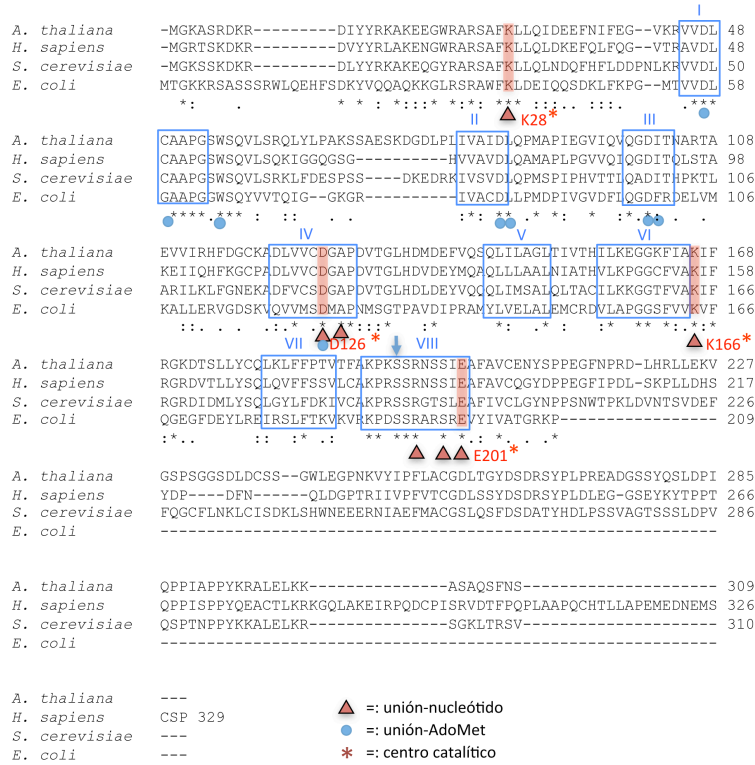
Los resultados de nuestra estrategia de clonación se complementaron mediante la búsqueda de alelos mutantes de *SCS9* en las colecciones de mutantes de inserción por T-DNA. Se detectó un alelo mutante, llamado aquí como *scs9-2*, que tenía una inserción de T-DNA en el tercer intrón de At5g01230 (Figura 3B). Los análisis de RT-qPCR de los niveles de transcritos de *SCS9* en plantas *scs9-2*, en comparación con las plantas *scs9-1* o Col-0, revelaron la ausencia de acumulación de transcrito en el primer mutante, tratándose pues de un alelo nulo (Fig. 3C). El experimento también reveló que el gen *SCS9* se expresaba en niveles moderados en Col-0 y *scs9-1*; y la expresión no cambió tras la inoculación de la planta con *P.s.* DC3000 (Fig. 3C). Una comparación de la respuesta de resistencia a enfermedad frente a *P.s.* DC3000 entre plantas *scs9-1* y *scs9-2* mostró que ambos mutantes estaban igualmente afectados, indicando un aumento notable de la susceptibilidad que fue de una magnitud similar a la mostrada en las plantas *npr1* (Fig. 3D).

Por último, para confirmar que At5g01230 se corresponde con *SCS9*, se transformaron plantas de *Arabidopsis* mediado por *Agrobacterium* para introducir en *scs9-1* (plantas *scs9OEXSCS9*) y en Col-0 (plantas *wtOEXSCS9*) el cDNA correspondiente a At5g01230, fusionado en el mismo marco de lectura a GFP, y bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV. Se generaron varias líneas transgénicas con la construcción 35S::*SCS9* y algunas se estudiaron en detalle. Todas las líneas transgénicas generadas perdieron la característica susceptibilidad aumentada a *P.s.* DC3000 atribuible a la mutación *scs9-1*. La Fig. 3E compara el crecimiento bacteriano para: i) una línea transformada en el fondo genético de *scs9-1* (línea 4.4); ii) una línea transgénica en el fondo genético de Col-0 (línea 7.4); y iii) ambas líneas con respecto a las plantas *scs9-1* y Col-0 no transformadas. La expresión de *SCS9* restableció la resistencia en plantas *scs9-1* a niveles de Col-0, lo que apoya la conclusión de que At5g01230 es *SCS9*.



**Figura 3. *scs9* es un alelo mutante de At5g01230.** (A) *SCS9* corresponde a At5g01230. El residuo nucleotídico G muta a un nucleótido A en el alelo *scs9*, como se indica en las letras en negrita. Las secuencias de aminoácidos deducidas se indican encima de cada secuencia de nucleótidos, y el cambio de aminoácido deducido (S194 a N194) se muestra también en negrita. (B) Disposición intrón-exón en At5g01230. Los exones se muestran como cajas. Las distancias son sólo aproximadas. Se indica la posición de la inserción de T-DNA en el tercer intrón (indicado por una caja negra) y la localización de la mutación inducida por EMS en el noveno exón, que corresponde a los alelos mutantes *scs9-2* y *scs9-1*, respectivamente (C) Análisis por RT-qPCR de los niveles de acumulación del transcrito *SCS9* en plantas Col-0, *scs9-1* y *scs9-2* inoculadas y no inoculadas con *P.s.* DC3000 a 3 d.p.i. Los datos representan la media ± DE; n=3 repeticiones. (D) Crecimiento comparativo de *P.s.* DC3000 en plantas Col-0, *scs9-1*, *scs9-2*, y *npr1* a 3 d.p.i. Las barras de error representan DE (n=12). (E) La sobreexpresión de *SCS9* complementa al mutante *scs9-1* y los niveles de crecimiento bacteriano alcanzan los de plantas Col-0. Las plantas del genotipo indicado se inocularon con *P.s.* DC3000. El crecimiento bacteriano se midió a 0 (barras blancas), 3 (barras grises) y 5 (barras negras) d.p.i. Las barras de error representan DE (n=12). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a Col-0 (P<0,05), analizado mediante análisis estadístico t-Student.

Una búsqueda *in silico* de secuencias homólogas reveló que la mayor similitud de SCS9 era con las proteínas FtsJ/RrmJ de bacteria (Caldas *et al.*, 2000), Trm7p de levadura (Pintard *et al.*, 2002), y FTSJ1 de humano (Bugl *et al.*, 2000), todas ellas codificando 2'-*O*-ribosa metiltransferasas de tRNA (MTasas). La Fig. S1 muestra los elementos clave conservados de los sitios de unión AdoMet- y ribosa- predichos de estas cuatro metiltransferasas de tRNA, incluyendo la tétrada catalítica predicha de dos cadenas laterales básicas y dos ácidas (K28, D126, K166, y E201, cada una marcada con un triángulo rojo) (Posfai *et al.*, 1989), lo cual es una característica conservada en muchas 2'-*O*-ribosa metiltransferasas que exhiben el dominio común 'MTasa' (Bujnicki y Rychlewski, 2001; Kalhor y Clarke, 2003). SCS9 de Arabidopsis y las MTasas ortólogas de bacteria, levadura y humano presentaron una sorprendente conservación en el sitio activo predicho y en sus secuencias adyacentes, sugiriendo la similitud de su tRNA diana. Pintard *et al.* (Pintard *et al.*, 2002) propuso un modelo de interacción tRNA-sustrato, y predijo que los residuos S197 y R194 de cadena lateral expuestos en la proteína Trm7 de levadura, equivalente a S199 y R196 en la proteína SCS9 de Arabidopsis, interactúan específicamente con el grupo fosfato del nucleótido metilado. La mutación *scs9-1* (S194/N194) se encuentra muy próximo a los residuos mencionados y al residuo catalíticamente importante E201 de la tétrada. Por lo tanto, es muy probable que la pérdida de función de *scs9-1* podría ser debida a la falta de actividad enzimática, lo que revelaría la importancia del residuo S194 para las 2'-*O*-metiltransferasas de tRNA.

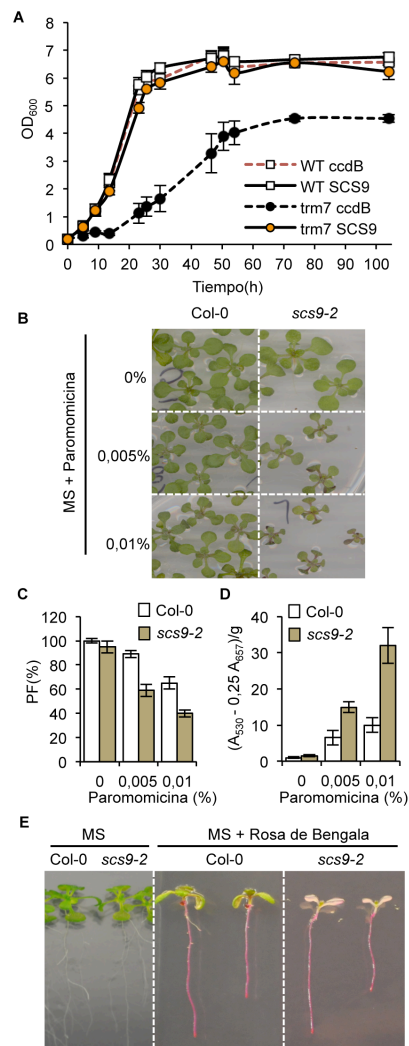


**Figura S1. Alineación de las secuencias de aminoácidos de SCS9 de Arabidopsis con las MTasas de tRNA de *S. cerevisiae* (Trm7p), *H. sapiens* (FtsJ1), y *E. coli* (FtsJ/RrmJ).** Los residuos idénticos y químicamente equivalentes se indican con asteriscos y puntos negros, respectivamente. Los motivos conservados se etiquetan según la nomenclatura propuesta por Pósfai *et al.* (Posfai *et al.*, 1989), y se muestran en azul. Las interacciones predichas con AdoMet y el nucleótido metilado del tRNA se designan con puntos azules y triángulos rojos, respectivamente. La tétrada catalítica predicha K-D-K-E está etiquetada con asteriscos rojos y sombreado rojo. La flecha azul indica el residuo de aminoácido mutado en el mutante *scs9*.

### 3.4. SCS9 complementa la mutación *trm7Δ* de levadura

La similitud entre las secuencias de aminoácidos de *SCS9* de *Arabidopsis* y la MTasa de tRNA *Trm7p* de *S. cerevisiae*, nos llevó a investigar si *SCS9* podría complementar funcionalmente al mutante *trm7p*. El fenotipo de la cepa

*trm7Δ* se caracteriza por un crecimiento lento en comparación con la cepa silvestre (Pintard *et al.*, 2002). Por lo tanto, para examinar si el gen *SCS9* cumplía las funciones del gen *TRM7* de levadura, se estudió la complementación de la cepa mutante *trm7Δ*. A diferencia del vector solo (Fig. 4A), el vector de levadura/*E. coli* portador del cDNA de *SCS9* complementó el fenotipo de crecimiento lento del mutante *trm7Δ* (Fig. 4A). Por lo tanto, concluimos que el gen *SCS9* es el homólogo funcional en Arabidopsis del gen *TRM7*.



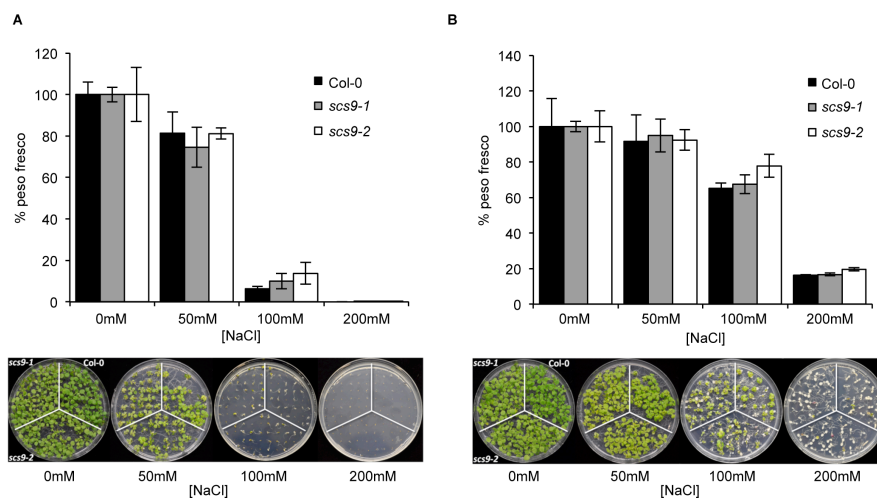
**Figura 4. Complementación de la cepa *trm7Δ* de *Saccharomyces cerevisiae* con el cDNA de *SCS9* de Arabidopsis, e hipersensibilidad de las plántulas *scs9-2* a paramomicina y rosa de bengala.** (A) Curvas de crecimiento comparativo de varias cepas de *S. cerevisiae* crecidas en YPD a 30°C. Los cuadrados representan cepas silvestres (BMA64) transformadas con el plásmido vacío p423-GAL1 (WT ccdB; línea roja discontinua) o con un plásmido que porta el cDNA de *SCS9* de Arabidopsis (WT SCS9; línea negra). Los círculos representan la cepa *trm7Δ* transformada con el plásmido vacío (*trm7 ccdB*; círculos negros) o con el plásmido que porta el cDNA de *SCS9* de Arabidopsis (*trm7 SCS9*; círculos naranjas). (B) Crecimiento de las plántulas Col-0 y *scs9-2* en placas MS sin y con la presencia de paramomicina al 0.005 y 0.01% (p/v). (C) Análisis cuantitativo de los efectos de la paramomicina en el retardo del crecimiento en plántulas Col-0 y *scs9-2* medidos como reducción del peso fresco (PF). (D) Análisis cuantitativo de la acumulación de antocianinas en plántulas Col-0 y *scs9-2* tratadas con paramomicina a las concentraciones indicadas. (E) Efectos diferenciales del rosa de bengala en la inhibición del crecimiento de las plántulas Col-0 y *scs9-2* creciendo en placas MS.

### 3.5. El mutante *scs9* es hipersensible a paramomicina y rosa de bengala

Se ha descrito que la cepa *trm7Δ* de levadura es altamente sensible a la paramomicina (Pintard *et al.*, 2002), un antibiótico de la familia de los aminoglicósidos que impide la traducción de proteínas al aumentar el fallo de lectura de codón en procariontes y eucariotes (Chernoff *et al.*, 1994). Por lo tanto, hipotetizamos que si *SCS9* y *Trm7p* son homólogos funcionales, entonces el mutante *scs9* de *Arabidopsis* también podría mostrar una mayor sensibilidad a paramomicina. El mutante *scs9-1* porta el gen de resistencia a kanamicina como marcador de selección, lo cual podría interferir con el ensayo de sensibilidad al antibiótico; por lo tanto, se empleó el mutante *scs9-2* que en su lugar porta el gen de resistencia al herbicida BASTA como marcador de selección. Las plántulas Col-0 fueron moderadamente sensibles a 0.005 a 0.01% de paramomicina, lo que ralentizó parcialmente el crecimiento de las plantas y provocó una acumulación moderada de antocianinas en las hojas, probablemente como consecuencia del estrés impuesto por el antibiótico (Fig. 4B-4D). Curiosamente, el mutante *scs9-2* mostró mayor sensibilidad al antibiótico, como se indica por la reducción del crecimiento de las plántulas y un incremento en la acumulación de antocianinas en las hojas de plántulas *scs9-2* tratadas con paramomicina (Fig. 4B-4D). Estos efectos fueron más evidentes a una concentración del antibiótico a 14 μM (0.01% p/v) en comparación con 7 μM (0.005% p/v), lo que también maximizó las diferencias entre el crecimiento de las plántulas Col-0 y *scs9-2*. Por lo tanto, en consonancia con el mutante *trm7Δ* de levadura, el mutante *scs9-2* de *Arabidopsis* fue también altamente sensible a paramomicina.

Además, Khoury *et al.* (Khoury *et al.*, 2008) reportó que la cepa *trm7Δ* era más sensible al estrés oxidativo y exhibía un aumento de la inhibición del crecimiento en presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por tanto, las plántulas de *Arabidopsis* se trataron con el colorante sintético rosa de bengala, el cual resulta en la formación de ROS dependiente de la presencia de luz (Rózanowska *et al.*, 1995), y se comparó la respuesta de las plántulas Col-0 y *scs9-2* a este agente. Las plántulas Col-0 mostraron sensibilidad al rosa de bengala a 2 μM después de 5 días de exposición, lo que provocó una

clorosis parcial en las hojas, reducción en el crecimiento de la raíz y la inhibición en la formación de raíces laterales (Fig. 4E). Las plántulas del mutante *scs9-2* mostraron un incremento de la sensibilidad al colorante, las cuales llegaron a blanquearse en lugar de ser cloróticas, y murieron finalmente después de 5 días de exposición (Fig. 4E). En contraste, las plántulas *scs9-1*, *scs9-2* y Col-0 son igualmente sensibles al estrés producido por sal, como se documentó en los ensayos de inhibición de la germinación y crecimiento de las plántulas, realizados con concentraciones crecientes (i.e., 0, 50, 100 y 200mM) de NaCl (Fig. S2). Estas diferencias podrían indicar una especificidad de la 2'-O-ribosa metiltransferasa de tRNA de referencia en la mediación de una adaptación a situaciones concretas de estrés.

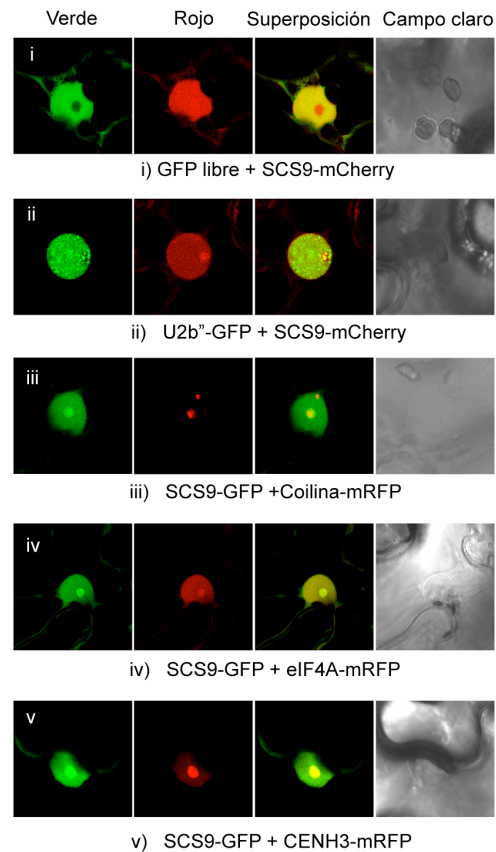


**Figura S2. Ensayos de inhibición por NaCl de la germinación de las semillas (A) y del crecimiento de las plántulas (B).** Análisis cuantitativo del efecto de inhibición en la germinación de las semillas (A) y en el crecimiento (B) de las plántulas Col-0, *scs9-1* y *scs9-2* después de la aplicación de diferentes concentraciones de NaCl (0, 50, 100 y 200mM), medido por la reducción en peso fresco (%). Los datos representan la media  $\pm$  DE; n=3 réplicas. Se muestra una placa MS representativa de cada condición con los 3 genotipos.

### 3.6. SCS9 se localiza en el núcleo

Las moléculas de tRNA, aunque transcritas en el núcleo, funcionan y están distribuidas en diferentes compartimentos subcelulares, haciendo hincapié en la importancia de la localización subcelular de enzimas modificadoras de tRNA. Por otra parte, el tRNA maduro se mueve en una dirección retrógrada desde el citoplasma al núcleo a través de la importación nuclear de tRNA, un proceso conservado desde levaduras a vertebrados, y propuesto para funcionar como una ruta que monitoriza el procesamiento final de pre-tRNAs y el estado de modificación de los tRNAs maduros (Kramer y Hopper, 2013). Nuestro objetivo era identificar el compartimento celular donde SCS9 ejercía su función como potencial modificador de tRNAs. Por lo tanto, se utilizó la proteína SCS9 etiquetada con la proteína fluorescente GFP o mCherry, y cuya construcción fue funcional al complementar el fenotipo de *scs9* (Figura 3E), y se realizaron estudios de co-localización usando microscopía confocal. La GFP libre y proteínas marcadoras de compartimentos subnucleares específicos se utilizaron para ensayos de expresión transitoria por agroinfiltración de hojas de *Nicotiana benthamiana* con cepas de *Agrobacterium* portadoras de cada construcción génica correspondiente. eIF4A, una helicasa de RNA componente del Complejo de Unión a Exón (eIF4A-mRFP) y la variante de histona H3 cenH3 (CENH3-mRFP) co-localizaron con SCS9-mCherry en el nucléolo y nucleoplasma (Fig. 5, paneles iv y v), indicando un enriquecimiento parcial de SCS9 o preferencia por el nucléolo. Coilina (Coilin-MRFP) y U2b'' (U2b''-GFP), dos marcadores de cuerpos de Cajal y otros cuerpos nucleares a menudo asociados con el nucléolo, también confirmaron la localización de SCS9 en el núcleo, y su preferencia por el nucléolo, pero no por ninguno de los cuerpos nucleares (Fig. 5, paneles ii y iii). Finalmente, la GFP libre, se acumuló en el citoplasma y en el núcleo, pero fue excluida del nucléolo, lo que permitió la clara identificación de SCS9-mCherry en el nucléolo (Fig. 5; panel i). Por lo tanto, concluimos que SCS9 está preferentemente localizada en el núcleo, y exhibe una preferencia por el nucléolo. Estos resultados sugieren que las modificaciones de las moléculas de tRNA, dirigidas por la enzima metiltransferasa, ocurren con una mayor probabilidad en el núcleo y no en el citoplasma.





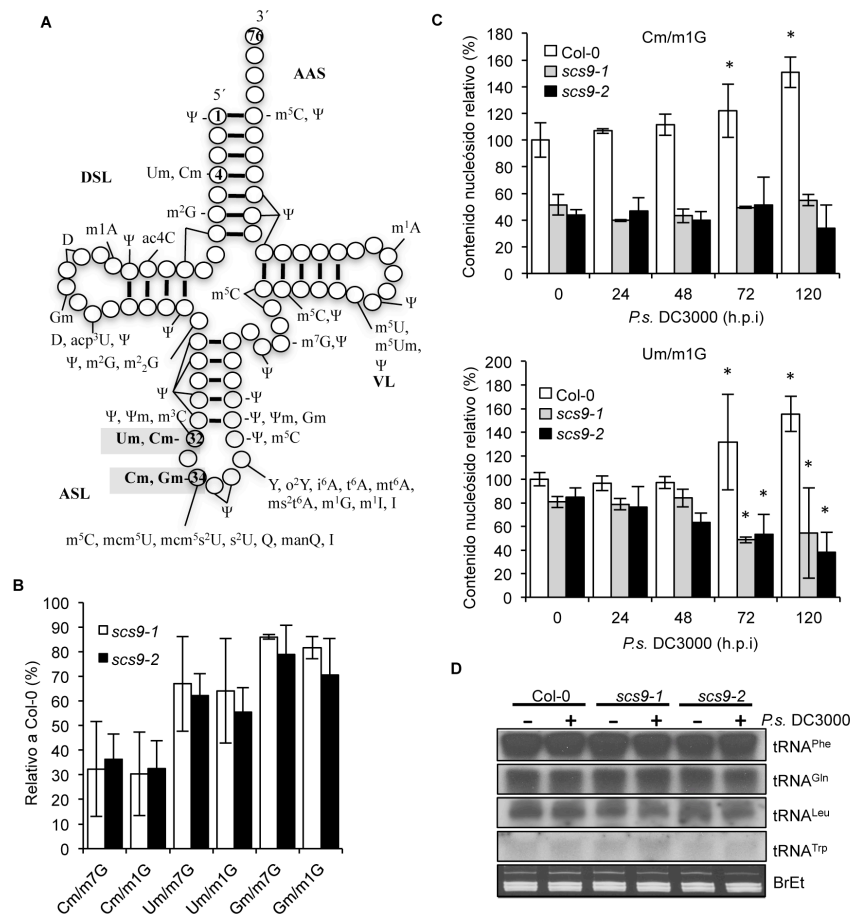
**Figura 5. Localización nuclear de SCS9.** Patrones de colocalización, evaluados por microscopía confocal, de SCS9, fusionado a GFP o mCherry, con GFP libre (panel i) y diferentes proteínas nucleares etiquetadas, incluyendo U2b'' (panel ii), Coilina (panel iii), eIF4A (panel iv), y CENH3 (panel v) en células de la epidermis de *N. benthamiana* transfectadas con el respectivo par de construcciones.

### 3.7. SCS9 se requiere para la metilación 2'-O-ribosa de tRNA *in vivo*

Basado en las similitudes estructurales entre SCS9 y las MTasas Trm7p de *S. cerevisiae*, FtsJ/RrmJ de *E. coli*, y FTSJ de humano, probamos si SCS9 estaba implicado de manera similar en la metilación 2'-O-ribosa de los nucleótidos en la región anticodón de los tRNAs en Arabidopsis. Las posiciones 32 y 34 en la región anticodón (Fig. 6A) se identificaron como dianas de las MTasas tipo-Trm7p (Pintard *et al.*, 2002). Además, cuando la posición 32 de un tRNA dado era 2'-O-metilada, la posición 34 de balanceo del mismo tRNA era 2'-O-

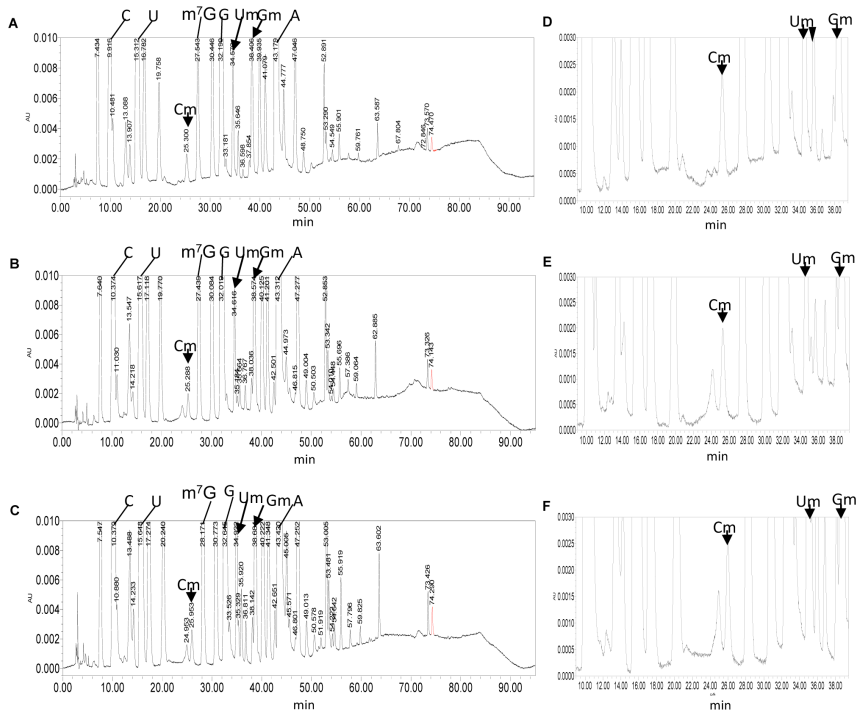
metilada por la misma enzima. Los nucleótidos modificados correspondientes a los tRNAs de *Arabidopsis*, alterados debido posiblemente a los defectos en *SCS9*, se identificaron al comparar las modificaciones de Col-0 con aquellas que difirieron comúnmente en los mutantes *scs9-1* y *scs9-2*. Se utilizaron plántulas jóvenes como fuente de material vegetal, el cual, según nuestra previa experiencia, mostró una mayor abundancia de RNA. El aislamiento de tRNAs, degradación y subsiguiente análisis de HPLC de los nucleósidos separados se realizó como se describe en Materiales y Métodos (Chen *et al.*, 2010); el tiempo de elución y el espectro de cada pico se utilizaron para identificar los diferentes nucleósidos modificados. Los cromatogramas característicos de las plantas Col-0, *scs9-1* y *scs9-2* se muestran en la Fig. S3. Se detectaron veintidós principales nucleósidos modificados en los tres fondos genéticos, los cuales cuadran con las modificaciones previamente identificadas en *Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2010). Notablemente, la comparación del cromatograma de HPLC entre Col-0 y los dos mutantes reveló que las plantas *scs9-1* y *scs9-2* mostraban evidentes reducciones idénticas en el contenido de citidina 2'-*O*-metilada (Cm) en comparación con otros nucleósidos modificados que permanecieron invariables, tales como 7-metil guanosina (m<sup>7</sup>G) o 1-metil guanosina (m<sup>1</sup>G) (Fig. S3). Los nucleósidos modificados Cm mostraron una reducción del 70% en las plantas *scs9-1* y *scs9-2* en comparación con las plantas Col-0 (Fig. 6B). Además, el contenido de uridina 2'-*O*-metilada (Um) mostró una reducción del 30% en ambos mutantes (Fig. 6B). Sin embargo, en los mutantes *scs9-1* y *scs9-2*, la disminución en el contenido de guanosina 2'-*O*-metilada (Gm) fue consistentemente mucho menor, con una reducción de sólo el 10-15% (Fig. 6B). La determinación más exacta y directa del contenido de citosina 2'-*O*-metilada (Cm) por LC-MS confirmó la notable reducción observada por el análisis de HPLC en plantas *scs9-1* y *scs9-2* al compararse con plantas Col-0 (Fig. 6C). Curiosamente, tras la inoculación con *P.s.* DC3000, las plantas Col-0 mostraron una moderada pero progresiva acumulación de Cm con un incremento estadísticamente significativo del 60% a las 72 y 120 h.p.i cuando se comparó con su control a 0 h.p.i (Fig. 6C). De manera contraria, las plantas *scs9-1* y *scs9-2* fueron deficientes en este aumento de Cm mediado por el patógeno (Fig. 6C). Para la modificación del nucleósido Um (Fig. 6C), y en menor medida también para Gm (Fig. S4), la cuantificación por LC-MS reveló

un similar aumento en su contenido en Col-0 a las 72- 120 h.p.i. Estos aumentos no se observaron en las plantas *scs9-1* y *scs9-2* (Fig. 6C y Fig. S4).



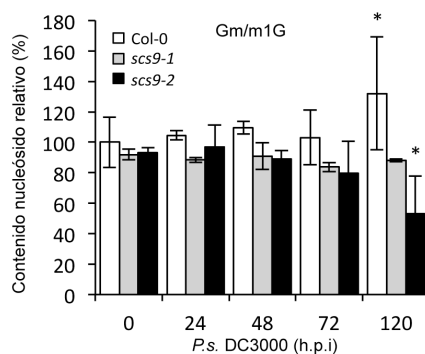
**Figura 6. Contenido reducido de 2'-O-metilcitosina (Cm), 2'-O-metiluracilo (Um) y 2'-O-metilguanina (Gm) en mutantes *scs9-1* y *scs9-2*.** (A) Posición de las modificaciones comunes encontradas en el tRNA citoplasmático en Arabidopsis y sus principales dominios. El tRNA se muestra en la forma común de su estructura secundaria, donde los círculos representan nucleótidos y las líneas representan los pares de bases. La posición en gris sombreado indica el sitio de metilación propuesto para las MTasas tipo-Trm7 en eucariotas. El residuo 34 corresponde al nucleótido de la posición de balanceo. AAS (brazo aceptor del aminoácido); DSL (brazo de la región de dihidrouridina); ASL (brazo de la región anticodón); VL (región variable). Se utilizan abreviaturas convencionales para las modificaciones de nucleósidos; ver en la

base de datos de Modomics (<http://modomics.genesilico.pl>). (B) Porcentaje de reducción del contenido de Cm, Um y Gm en *scs9-1* y *scs9-2* respecto a las plantas Col-0 determinado por análisis de HPLC. Cada valor fue relativo a la cantidad de 7-metil guanosina (m<sup>7</sup>G) y 1-metil guanosina (m<sup>1</sup>G) derivado de tRNA, los cuales permanecieron invariables en todos los genotipos. Los datos representan la media de 3 réplicas biológicas. (C) Contenido relativo de los nucleósidos modificados Cm y Um en las plantas Col-0, *scs9-1* y *scs9-2* durante el curso de la infección con *P.s.* DC3000, determinado por LC-MS. Las muestras se recogieron a 0, 24, 48, 72 y 120 h.p.i. Cada valor fue relativo a la cantidad de 1-metil guanosina (m<sup>1</sup>G) derivada de tRNA que permaneció invariable durante el proceso de infección. Los datos representan la media ± DE; n=3 réplicas. Los asteriscos indican las diferencias estadísticas comparando con su respectivo genotipo, referido a su tiempo 0 control (P<0.05), y que fue analizado usando el test t de Student. (D) Northern blot de tRNA en plantas Col-0, *scs9-1* y *scs9-2* sin y con inoculación con *P.s.* DC3000. Las muestras de las hojas se recogieron a los 3 d.p.i. Las membranas se hibridaron con sondas de marcaje radioactivo de tRNA<sup>Phe</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Leu</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>. La misma carga de RNA se verificó por tinción con EtBr (panel de abajo).



**Figura S3. Cromatograma de HPLC de nucleósidos modificados derivados de tRNA.** El tRNA purificado a partir de tejido vegetal fue digerido con nucleasa P1 y

tratado con fosfatasa alcalina. Los nucleósidos modificados se analizaron utilizando HPLC de fase reversa y una columna C-30. El cromatograma muestra los picos nucleosídicos derivados de plantas Col-0 (A, D), *scs9-1* (B, E) y *scs9-2* (C, F). Escala X: tiempo de retención en minutos. Escala Y: absorbancia UV a 254nm. Cuatro picos principales y m<sup>7</sup>G (7-metil guanosina) están marcados con líneas los cuales sirvieron como referencias en los cromatogramas. Los picos de Cm (2'-O-metilcitosina), Um (2'-O-metiluracilo) y Gm (2'-O-metilguanina) se marcan con flechas.



**Figura S4. Efecto de *P.s.* DC3000 en el contenido del nucleósido Gm en las plántulas Col-0, *scs9-1* y *scs9-2*.** El contenido relativo del nucleósido Gm en las plántulas Col-0, *scs9-1* y *scs9-2* tras la infección con *P.s.* DC3000 se determinó con LC-MS. Las muestras se recogieron a 0, 24, 48, 72 y 120 h.p.i. Cada valor fue relativo a la cantidad de 1-metil guanosina (m<sup>1</sup>G) derivada de tRNA. Los asteriscos indican diferencias estadísticas en comparación con su respectivo genotipo referido a su tiempo 0 control ( $P < 0.05$ ), usando un test t de Student.

Estas tres modificaciones de nucleósidos son modificaciones altamente conservadas en la región anticodón del tRNA, donde Cm ocurre en las posiciones 32 y 34, Um en la posición 32, y Gm en la posición 34 (Fig. 6A). Las posiciones 32 y 34 son dianas conocidas de las MTasas de tipo Trm7p, y es por lo tanto probable que SCS9 se requiera de manera similar para la metilación 2'-O-ribosa de la posición 32 y 34. En levadura, Wilkinson *et al.* (Wilkinson *et al.*, 2007) mostraron que los nucleótidos de citosina y uracilo en la posición 4 de tRNAs (Fig. 6A) también fueron 2'-O-metilados. Sin embargo, en esta posición, la metilación de ribosa era independiente de Trm7p, y en su lugar requería la metiltransferasa Trm13p. Aún se desconoce

si Um y Cm en la posición 4 ocurre en plantas, y si una enzima tipo Trm13 regula estas modificaciones específicas.

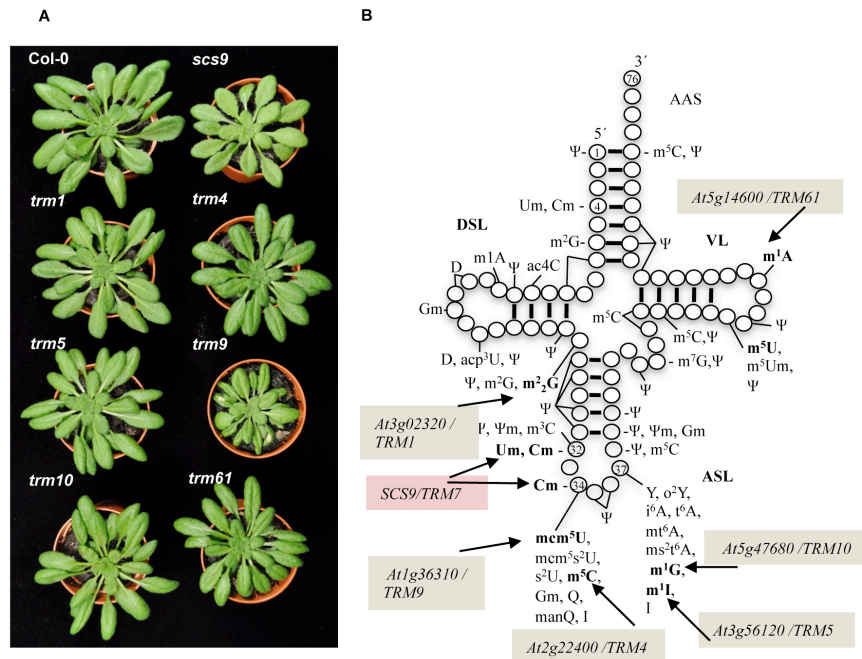
Las modificaciones 2'-*O*-ribosa de las posiciones 32 y 34 de la región anticodón reveladas en nuestro estudio tenían lugar en los tRNA<sup>Phe(GmAA)</sup>, tRNA<sup>Trp(CmCA)</sup> y tRNA<sup>Leu(UmAA)</sup> (El Yacoubi *et al.*, 2012; Pintard *et al.*, 2002). La reducción en la acumulación del nucleósido 2'-*O*-metilado observada en los mutantes *scs9-1* y *scs9-2* podría resultar entonces de una acumulación reducida de los respectivos precursores de tRNA. Por lo tanto, se realizaron northern blots de las poblaciones de pequeños RNAs extraídos de Col-0 y de los dos mutantes *scs9*, y se hibridaron las membranas con sondas radioactivas específicas para cada uno de los tres tRNAs indicados. El tRNA<sup>Gln</sup> no relacionado con estas modificaciones se utilizó como control interno. Finalmente, no se observaron cambios notables en la acumulación de RNA en ninguno de los fondos genéticos para ninguno de los tRNAs examinados (Fig. 6D). Además, no se detectaron alteraciones en el contenido de tRNA tras la inoculación con *P.s.* DC3000.

Por lo tanto, la reducción marcada en la acumulación de Cm y Um, y a un menor nivel en Gm, común en los dos mutantes *scs9*, es una consecuencia de la pérdida de función de la 2'-*O*-ribosa metiltransferasa, y que pareció no tener efecto sobre los niveles de transcrito de los tRNAs correspondientes.

### 3.8. Otras modificaciones de tRNA no son esenciales para la inmunidad

Las modificaciones basadas en metilación (por ejemplo, m<sup>1</sup>G, m<sup>2</sup>G, m<sup>2</sup><sub>2</sub>G, m<sup>7</sup>G, m<sup>5</sup>U, m<sup>5</sup>C, m<sup>1</sup>A, m<sup>1</sup>I, Am, Cm, Um, Gm) fueron las más comunes de las 21 modificaciones detectadas en los tRNAs de Arabidopsis y en álamo (Chen *et al.*, 2010). Además, el análisis bioinformático del genoma de Arabidopsis resultó en la identificación de 90 genes ortólogos para las modificaciones encontradas en plantas, excepto para los genes responsables de las alteraciones m<sup>2</sup>A y m<sup>6</sup>A, las cuales no parecen estar presentes en el genoma, y tampoco del gen *TsaA* para la modificación m<sup>6</sup>t<sup>6</sup>A (Chen *et al.*, 2010). Por lo tanto, nos cuestionamos si la ausencia de otro tipo de metiltransferasa de

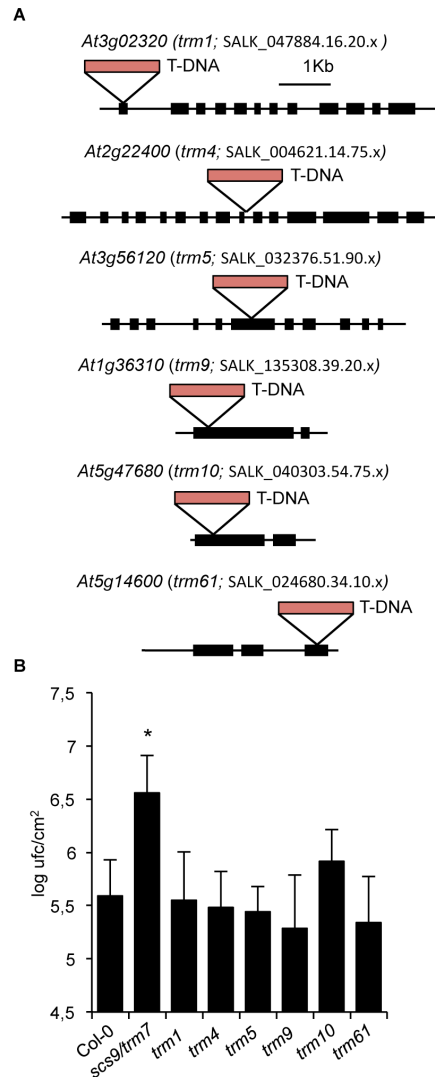
tRNA podría afectar a la inmunidad de la planta en la misma medida como la producida por la ausencia de la metiltransferasa SCS9. Consecuentemente, se identificaron varios mutantes de inserción de T-DNA interrumpiendo la ORF de un grupo seleccionado de genes *TRM* (Fig. 7A). Los resultados sugirieron que ninguno de los genes seleccionados de *Arabidopsis* que codificaban metiltransferasas de tRNA eran esenciales, y el fenotipo de las líneas mutantes no reveló diferencias con respecto a Col-0 en términos de crecimiento y desarrollo, excepto para el mutante de tipo *trm9* que mostró un ligero retardo en el crecimiento (Fig. S5).



**Figura S5. Fenotipos de los mutantes *trm* de *Arabidopsis*.** (A) Se observó un desarrollo normal en los diferentes mutantes de inserción de T-DNA de tipo *trm* a los 35 días después de la siembra y crecimiento en macetas en el invernadero. Se puede observar la ausencia de defectos en el desarrollo, excepto para el mutante de tipo *trm9*, cuyo crecimiento fue reducido. (B) Nucleósidos modificados en los tRNAs eucarióticos. Estructura de hoja de trébol del tRNA eucariótico. Cada círculo representa un nucleósido, numerado del extremo 5' a 3'. Los nucleósidos modificados diana que se encuentran en distintas posiciones se muestran en negrita. Las flechas indican la modificación específica y la posición del nucleósido en el tRNA para cada uno de las correspondientes enzimas homólogas de tipo TRM consideradas en el presente estudio.

At3g02320 es uno de los tres genes homólogos a *TRM1*, que codifica una metiltransferasa para la modificación dimetilguanosina ( $m^2G$ ) en la posición 26 en *S. cerevisiae* (Ellis *et al.*, 1986) (Fig. S5). La proteína Trm4p de levadura cataliza la formación de  $m^5C$  en las posiciones 34, 40, 48 y 49 (Motorin y Grosjean, 1999), y ocho genes homólogos pertenecientes a la familia de proteínas NOP1/NOP2/Sun están presentes en Arabidopsis. Seleccionamos arbitrariamente At2g22400 entre estos genes. At3g56120 es uno de los tres genes de Arabidopsis con homología a la *TRM5* de levadura codificando la metiltransferasa de tRNA ( $m^1I$ ), que coopera con la deaminasa Tad1p para la deaminación de A a I en las posiciones 34 y 37 en la región anticodón (Gerber *et al.*, 1998). *TRM61* y *TRM6* son genes que codifican las dos subunidades de la metiltransferasa de tRNA ( $m^1A58$ ) en el iniciador tRNA<sup>Met</sup> en levadura (Anderson *et al.*, 2000). Un homólogo de *TRM61* existe en Arabidopsis, At5g14600. At1g36310 era homólogo al gen *TRM9* de levadura que codifica la metiltransferasa de tRNA que cataliza la esterificación de los nucleótidos de uridina modificados dando como resultado la formación de 5-metilcarbonilmetiluridina ( $mcm^5U$ ) en la posición de balanceo en el tRNA<sup>Arg.Glu</sup>. Finalmente, At5g47680, representa el único homólogo del gen *TRM10* de levadura que codifica una metiltransferasa de tRNA implicada en la modificación de  $m^1G$  en la posición 9 de 10 especies diferentes de tRNA (Jackman *et al.*, 2003). Posteriormente se examinó si estos mutantes *trm* fueron defectuosos en la respuesta inmune frente a *P.s.* DC3000 como en los mutantes *scs9*. Tras la inoculación bacteriana, ninguno de los mutantes pareció estar afectado en la respuesta inmune, al menos al nivel observado para el mutante *scs9* (Fig. 7B). Sólo se observó un aumento parcial, pero no estadísticamente significativo, del crecimiento bacteriano en el mutante *trm10* comparado con Col-0. Por tanto, los resultados sugirieron un requerimiento específico de Cm y Um mediado por SCS9 en las posiciones 32 y 34 de la región anticodón de tRNAs específicos para la respuesta inmune de la planta frente a *P.s.* DC3000. En cualquier caso, en este punto no podemos descartar que para algunas metiltransferasas seleccionadas de tipo TRM, la existencia de genes parálogos podría enmascarar el fenotipo de mutantes simples, condición que, sin embargo, no parece aplicarse en SCS9 (TRM7).





**Figura 7. Mutantes tipo *trm* y resistencia a enfermedad frente a *P.s.* DC3000.** (A) Diagrama que muestra las inserciones de T-DNA que ocurren en los exones indicados de genes que codifican metiltransferasas de tipo TRM de Arabidopsis: At3g02320 es homólogo a *TRM1*; At2g22400 es homólogo a *TRM4*; At3g56120 es homólogo a *TRM5*; At1g36310 es homólogo a *TRM9*; At5g47680 es homólogo a *TRM10*; At5g14600 es homólogo a *TRM61*. Los exones se indican con rectángulos negros. Las inserciones de T-DNA se indican con rectángulos rojos. Las distancias son sólo aproximadas. (B) Tasa de crecimiento de *P.s.* DC3000 en las plantas Col-0, *scs9-1* (*trm7*) y *trm1*, *trm4*, *trm5*, *trm9*, *trm10* y *trm61*. Se muestra el crecimiento bacteriano medido a 3 días post inoculación en cada uno de los genotipos indicados. Las barras de error representan la DE (n=12). Los asteriscos indican diferencias estadísticas respecto a Col-0 (P<0.05) utilizando el test t de Student.

## 4. Discusión

En el presente estudio, empleamos un conjunto de aproximaciones con las que se define la relación entre las modificaciones específicas de tRNA en la región anticodón, y la ejecución de una respuesta inmune efectiva frente a *P.s.* DC3000 en Arabidopsis. La identificación del mutante *scs9*, el cual suprimió el

fenotipo de resistencia frente a *P.s.* DC3000 previamente descrito para el mutante *csb3*, indicó que *SCS9* era esencial para la resistencia de las plantas a este patógeno. En plantas *scs9*, los marcadores asociados con la activación de las respuestas inmunes no mostraron defectos en su análisis. Sin embargo, a pesar de este fenotipo, las plantas *scs9* fueron incapaces de activar una respuesta inmune eficiente frente a *P.s.* DC3000. Por lo tanto, las plantas *scs9* poseen una distinción crítica que diferencia a *scs9* de otras plantas mutantes con una inmunidad similarmente comprometida. NPR1 es el regulador central de la inmunidad de la planta frente a *P.s.* DC3000 mediada por SA (Yan y Dong, 2014), y por lo tanto el mutante *npr1* es incapaz de resistir a la infección por *P.s.* DC3000. Sin embargo, a diferencia de *npr1*, las plantas *scs9* no tienen comprometida la percepción de SA ni tampoco su acumulación. Esto conlleva una clara distinción entre las plantas *npr1* y *scs9*, sugiriendo que el o los defectos en el control de la inmunidad de las plantas *scs9* operan por debajo o en un punto diferente de la regulación fallida de *npr1*.

La clonación del gen *SCS9* reveló que *SCS9* es homóloga a la proteína Trm7p de levadura (Pintard *et al.*, 2002), la FTSJ1 de humanos (Bugl *et al.*, 2000), y la FtsJ/RrmJ de bacterias (Caldas *et al.*, 2000), las cuáles codifican las enzimas 2'-*O*-ribosa metiltransferasas de tRNA. Todas estas enzimas exhibieron el dominio "MTasa" (Bujnicki y Rychlewski, 2001), sugiriendo que su diana biológica de tRNA debe ser similar. De hecho, *SCS9* realizó las mismas funciones de Trm7p de levadura, demostrado por la complementación efectiva del mutante *trm7Δ* usando el cDNA de *SCS9* de Arabidopsis, aportando una evidencia inequívoca de que el gen *SCS9* es el homólogo funcional en Arabidopsis del gen *TRM7*. La relación a nivel de mecanismo entre Trm7p y *SCS9* fue posteriormente establecida mediante la observación de que la pérdida de cualquiera de las dos proteínas corresponde con una sensibilidad a estrés oxidativo de las células mutantes de *trm7Δ* y *scs9* y también con una sensibilidad a paramomicina, un antibiótico que afecta a la traducción al incrementar el fallo de lectura del codón (Chernoff *et al.*, 1994). Sin embargo, esta sensibilidad aumentada de los mutantes *scs9* no se manifestó cuando se aplicaron otros tipos de estrés, tales como estrés por salinidad. Estos resultados denotan la importancia de esta 2'-*O*-ribosa metiltransferasa de tRNA para mediar selectivamente con sólo ciertos tipos de estrés. Además, y consistente con *trm7Δ*, las plantas *scs9* de Arabidopsis

fueron defectuosas en la metilación 2'-*O*-ribosa de los nucleótidos 32 y 34 de la región anticodón de los tRNAs. La reducción en *scs9* del contenido de citosinas 2'-*O*-metiladas (Cm), y también de Um y Gm, asociadas con los nucleótidos 32 y 34 y que son dianas de la metiltransferasa Trm7p de levadura (Pintard *et al.*, 2002), reforzaron nuestra conclusión de que las metiltransferasas SCS9 de *Arabidopsis* y Trm7p de levadura son funcionalmente equivalentes. Además, la observación de que el contenido de Cm, y extendido también de manera similar al contenido de Um, se promueve tras la infección de las plantas Col-0 con *P.s.* DC3000, y que su reducción correlaciona con una respuesta inmune defectiva, es de suficiente relevancia para considerar SCS9 como un nuevo componente regulador de la respuesta inmune de la planta. Adicionalmente, la falta de un defecto en los mutantes *scs9* para activar la respuesta defensiva dependiente de SA sugiere que el punto de control de SCS9 es regular el resultado final de la respuesta inmune sin interferir en los estadios tempranos de la señalización de la inmunidad. Nuestra observación respecto a la importancia de la modificación de tRNA en la respuesta a estrés biótico se añade así a la observación de Pajerowska-Mukhtar *et al.* (Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2012), quien informó de que los niveles de tRNAs no cargados con el aminoácido que corresponden a fenilalanina mostraron un rápido y transitorio incremento en la respuesta al ataque patogénico para permitir la traducción de TBF1, un importante regulador esencial de defensa para la inmunidad mediada por SA. Incluso aunque este último estudio se focaliza en una diferente etapa de regulación de la traducción en inmunidad vegetal, la evidencia también apunta hacia la importancia del metabolismo de tRNA como un punto de control que regula la adaptación al estrés biótico.

De este modo, tratamos de entender entonces cómo un defecto en la 2'-*O*-metilación de citosinas en posiciones específicas de balanceo en el anticodón del tRNA puede interferir con la inmunidad de plantas, manteniendo intacta la señalización dependiente de SA. Ante eso especulamos que, tras una inoculación con *P.s.* DC3000, la reprogramación de modificaciones específicas en la posición de balanceo de los tRNAs permite una traducción selectiva de especies de RNA mensajero enriquecidas en la región codón equivalente a esos tRNAs, de una manera similar a aquella descrita en otras eucariotas (Chan *et al.*, 2010; Wang y He, 2014). La ausencia de modificaciones precisas

en la posición de balanceo en tRNAs específicos convergería en una traducción ineficiente o en generar un fallo de lectura de proteínas específicas, las cuáles serían vitales para una respuesta inmune efectiva. Este control traduccional es congruente con el hecho de que *SCS9* opera a un nivel inferior de *NPR1*, y de su posterior reprogramación transcripcional, durante la respuesta inmune. Es importante resaltar que los efectos fenotípicos debidos a la ausencia de la correcta modificación de tRNA 2'-*O*-metilado son condicionales a la presencia del estrés impuesto, y no mostrando las plantas *scs9* defectos aparentes en su pauta de desarrollo, a excepción de un ligero retardo en el crecimiento. Además, las plantas mutantes *scs9* no mostraron alteraciones groseras en la síntesis de proteína y sus niveles de acumulación, tal y como se dedujo del patrón normal de acumulación de proteínas observado en los geles de poliacrilamida-SDS, o por la acumulación normal de proteínas relacionadas con la patogénesis (*e.g.*, PR1). Esto apoya una hipótesis en la que los defectos derivados de las mutaciones *scs9* probablemente ejercerían un impacto a nivel de proteoma de una manera muy específica, afectando sólo a la traducción de un grupo selectivo de proteínas con un papel fundamental para la ejecución efectiva de la respuesta inmune. La bibliografía proporciona algunas evidencias para el control específico de la traducción, dependiente de modificaciones de tRNA, durante la respuesta a estrés en eucariotas, y particularmente a estrés oxidativo. Por ejemplo, Kalhor y Clarke (Kalhor y Clarke, 2003) mostraron que la metilesterificación catalizada por la Trm9 de levadura lleva a la conversión de uracilo en mcm<sup>5</sup>U en la posición de balanceo de tRNA<sup>Arg(UCU)</sup> y tRNA<sup>Glu(UUC)</sup>. Este proceso promovió la unión del anticodón, y por lo tanto, facilitó la traducción de transcritos ricos en AGA y GAA, los cuales están asociados funcionalmente a procesos de señalización de estrés para evitar los efectos deletéreos de la radiación iónica en el daño de DNA (Begley *et al.*, 2007). De forma similar, Trm4, la cual cataliza la modificación m<sup>5</sup>C en la posición de balanceo del tRNA<sup>Leu(CAA)</sup> promovió la eficiente traducción de RNAs mensajeros enriquecidos en el codón UUG reconocido por este tRNA, y la pérdida de Trm4 provocó hipersensibilidad a los efectos citotóxicos derivados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jackman *et al.*, 2003). Uno de estos RNAs mensajeros ricos en UUG, cuya traducción es controlada por Trm4, corresponde a la proteína ribosomal Rpl22A, cuyo incremento en la traducción es requerido para hacer frente al estrés oxidativo (Chan *et al.*, 2012). Esta observación se

suma a un creciente reconocimiento del papel que ejerce la diversidad funcional en la composición del ribosoma y del papel de los ribosomas en la traducción selectiva de proteínas (Mauro y Edelman, 2007). De hecho, esta reprogramación de la maquinaria de traducción se asocia con la generación de “inmunoribosomas” como un subconjunto de ribosomas de células T, responsable de la traducción de péptidos implicados en la presentación del antígeno (Yewdell *et al.*, 1996). Éstos son sólo ejemplos que muestran la enorme complejidad que subyace a los mecanismos de regulación de la traducción y nuestro limitado conocimiento particularmente en plantas. Por lo tanto, la variedad de modificaciones de tRNA y su compleja regulación apuntan hacia la existencia de mecanismos evolucionados para la regulación precisa de la respuesta a nivel de control traduccional para cualquier estímulo celular; como aquellos sugeridos para regular la inmunidad mediante SCS9.

Nuestros resultados también nos llevaron a hipotetizar que la ausencia de metilación específica en la posición de balanceo de un grupo selectivo de tRNAs controlada por SCS9, podría afectar a la síntesis de proteínas muy específicas y requeridas para la resistencia al patógeno, funcionando a través de un mecanismo de represión. Si el represor es defectuoso o está poco traducido, entonces un factor celular o proceso molecular podría llegar a ser de-reprimido, lo cual podría favorecer el crecimiento bacteriano y la colonización del huésped. Esta última explicación es también congruente con que SCS9 esté controlando un proceso de la planta no relacionado con inmunidad pero que podría regular la susceptibilidad de la planta a patógenos al operar a diferentes niveles, desde la atracción del patógeno y la unión al huésped para producción de nutrientes y transporte desde el huésped, como se ha descrito en varios estudios (Lapin y Van den Ackerveken, 2013). Esto puede asociarse con la existencia de toxinas para la degradación de tRNA, desarrolladas por ciertos microbios para actuar en posiciones específicas dentro de la región anticodón de los tRNAs dianas, tales como colicina y onconasa (Phizicky y Hopper, 2010), o la  $\gamma$ -toxina de *Kluyveromyces lactis* que tiene como diana y degrada tRNAs específicos en la levadura *S. cerevisiae*, los cuales tienen la modificación mcm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U en la posición 34 del tRNA<sup>Glu(UCC)</sup> (Lu *et al.*, 2005). En este escenario, no podemos descartar que la bacteria pueda haber desarrollado proteínas efectoras que

tengan como diana modificaciones específicas de tRNAs en plantas, o incluso la metiltransferasa responsable para tal modificación de tRNA, como parte de una estrategia patogénica.

No podemos ignorar la posibilidad de un mecanismo de supervivencia que lleva a la degradación de tRNAs hipomodificados como parte de una respuesta conservada a estrés (Kadaba *et al.*, 2004; Motorin y Helm, 2010), lo cual podría tener un potencial impacto en la traducción y en la progresión de la enfermedad, como fue descrito por Thompson y Parker (Thompson y Parker, 2009). Los fragmentos derivados de tRNA (tRFs) son una clase novel de pequeños RNAs reguladores (Lee *et al.*, 2009; Pederson, 2010) con papel potencial como reguladores del silenciamiento génico (Maute *et al.*, 2013; Raina y Ibbá, 2014), y como parte de una respuesta a estrés conservada también descrita en plantas (Thompson *et al.*, 2008). Su aparición podría por lo tanto interferir con procesos epigenéticos gobernados por pequeños RNAs, tal como la metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM), la cual ha sido recientemente demostrada como esencial para la inmunidad de la planta frente a *P.s.* DC3000 (López *et al.*, 2011). Sin embargo, este último mecanismo parece menos probable, ya que los niveles de tRNAs hipomodificados en plantas *scs9* no fueron degradados, ni incluso tras la inoculación con el patógeno.

En resumen, los presentes resultados demuestran la importancia de mantener intacta las modificaciones de tRNA para desencadenar una efectiva respuesta inmune. Descifrar componentes posteriores de la ruta, su regulación, e identificar las proteínas diana cuya traducción es regulada por estas modificaciones de tRNAs abrirán nuevos horizontes para un mejor entendimiento de cómo se regula la respuesta inmune en plantas.

## 5. Materiales y Métodos

A continuación se describe la metodología y las condiciones aplicadas en los diferentes ensayos realizados específicamente en la parte experimental del presente Capítulo. El resto de técnicas experimentales desarrolladas, que se utilizaron de manera general en la presente Tesis Doctoral y que no están

descritas en este apartado, se encuentran en el apartado general de Material y Métodos de esta memoria.

## 5.1. Mapeo e identificación del gen *SCS9*

El mutante *scs9* fue retrocruzado dos veces con la línea mutante *csb3* para confirmar su herencia recesiva en la F2. El mutante *scs9* (en fondo *csb3*) fue cruzado con la planta Col-0 para analizar la independencia del fenotipo del mutante *scs9* de la mutación *csb3*. Para el análisis de la localización cromosómica de la mutación *scs9* en el genoma de Arabidopsis, el mutante *scs9* fue cruzado con Landsberg *erecta* (*Ler*). Las plantas F2 del cruce fueron analizadas para la co-segregación del carácter fenotípico de susceptibilidad aumentada a *P.s.* DC3000 asociado a la mutación *scs9* junto con el análisis de marcadores SSLPs (polimorfismos de longitud de secuencia simple), siguiendo el método de mapeo por marcadores descrito en (Bell y Ecker, 1994; López *et al.*, 2011). Los marcadores moleculares utilizados, descritos en la Tabla 1.A, para el análisis de 50 recombinantes fueron derivados de la base de datos de polimorfismos entre los ecotipos *Ler* y Col-0 (<http://www.arabidopsis.org>). Un posterior análisis con 500 nuevos individuos recombinantes fue utilizado con los marcadores descritos en la Tabla 1, acotando la mutación en la región telomérica. La identificación de la mutación y su asociación final a un marcador molecular fue realizada a través de la secuenciación del genoma completo y la identificación de los polimorfismos presentes, y llevado a cabo en el John Innes Centre (Norwich, UK) usando la plataforma Illumina GAIIX y la herramienta bioinformática descrita en Austin *et al.* (Austin *et al.*, 2011).

**Tabla 1. Marcadores SSLPs utilizados en el mapeo de la mutación *scs9*.** (A) Marcadores utilizados para los primeros 50 recombinantes. (B) Marcadores utilizados en 500 nuevos recombinantes.

**A**

Cromosoma 1		Cromosoma 2		Cromosoma 3	
Marcador	Posición mapa físico (pb)	Marcador	Posición mapa	Marcador	Posición mapa físico (pb)
nga59	2768000	nga1145	682624	nga126	3713432
JV18/19	5160595	SNP922	4263395	MYF24	6466772
AthZFGP	8727056	SNP8895	7860251	AthGAPab	9796450
SNP10026	11562061	nga1126	11670000	T32N15	16986906
F1L21	15993202	nga168	16240385	F28P10	21398175
nga128	20695113			nga6	23040009
SNP10490	24344448				
nga111	27418736				

**B**

Cromosoma 4		Cromosoma 5		Cromosoma 5	
Marcador	Posición mapa físico (pb)	Marcador	Posición mapa físico (pb)	Marcador	Posición mapa físico (pb)
nga1111	5074681	AthCTR1	979763	cer478421	198414
AthF28J12.3	9166451	nga151	4669932	SGCSNP13418	434443
nga1139	15408641	nga76	10375531	cer478444	525577
		AthPHYC	13721807		
		S0191	16660458		
		MNF13	17908612		
		MCL19	18405168		
		MNB8	23120770		
		MUA2	23956127		
		K8K14	28518213		

## 5.2. Construcciones génicas, expresión en levadura y plantas transgénicas

Para amplificar el cDNA de *SCS9* se utilizó el kit de PCR de alta fidelidad Expand (Roche) con 1µL de cDNA y utilizando los oligos específicos



BPSCS9Fw y BPSCS9Rv fusionados a los adaptadores Gateway. Utilizando la tecnología Gateway (Life Technologies), se recombinó con el vector pDONR221 y posteriormente con los diferentes vectores de destino utilizando el kit BP y LR ClonaseMixII (Invitrogen). La lista de oligos utilizados para el clonaje se encuentra en el subapartado 5.9. Para la construcción de la sobreexpresión *SCS9-GFP*, se recombinó el vector pDONR221 SCS9 en el vector de destino pB7FWG. Para la construcción de sobreexpresión *SCS9-mCherry*, se recombinó el vector pDONR221 SCS9 en el vector destino pEarleyGate101 modificado (García-Andrade *et al.*, 2013). Los vectores de destino de las construcciones usadas para la colocación con SCS9, U2b"-GFP, Coilin-mRFP, eiF4A-mRFP y CENH3-mRFP, fueron adquiridos del catálogo NASC (ID: N795032; N795057; N795055 y N795058; respectivamente). Para el ensayo de complementación de *trm7* de levadura, el vector pDONR221 SCS9 fue recombinado con los vectores de expresión de levadura p423-GAL1 y p423-GAL1-GFP, para generar p423 GAL1/SCS9 y p423GAL1/SCS9-GFP, respectivamente. La secuenciación de clones individuales confirmó que no había errores en el cDNA de *SCS9*. p423 GAL1/SCS9, p423 GAL1/SCS9-GFP y sus respectivos vectores vacíos se transformaron en las cepas de levadura silvestre (BMA64, MAT $\alpha$ ; (Pintard *et al.*, 2002)) y en la mutante *trm7p* (YBL4409, MAT $\alpha$ , *trm7* $\Delta$ :TRP1 (Pintard *et al.*, 2002)) como se describe anteriormente (Castelló *et al.*, 2011) y fueron crecidas en placas de agar de medio mínimo sin histidina. Los transformantes de levadura se transfirieron a continuación a medio líquido selectivo que contenía 2% (p/v) de Gal para inducir la expresión de *SCS9*. Estos cultivos se incubaron a 28°C durante 2 días y luego se ajustaron a OD<sub>600</sub>=0.1 para iniciar los ensayos de crecimiento.

### 5.3. Tratamientos con flg22 y quitosano

Aproximadamente 10-12 semillas de Col-0 y *scs9*, previamente esterilizadas, fueron sembradas por cada pocillo en placas de 12 pocillos, con 2mL de medio líquido autoclavado MS sin vitaminas (Duchefa) a 2.2g/L, suplementado con 5g/L de sacarosa y 0.1g/L de tampón MES (pH final 5.9). Las plántulas fueron crecidas en condiciones controladas de luz y

temperatura, y en agitación orbital suave (90 rpm). A los 10 días, el medio de crecimiento fue reemplazado por medio fresco suplementado con flg22 1 $\mu$ M o quitosano 0.01%. Tras diferentes tiempos en presencia del compuesto, según el experimento realizado, las plántulas fueron recogidas para su análisis (García-Andrade *et al.*, 2011).

#### 5.4. Ensayos de paramomicina y rosa de bengala

Para el ensayo de paramomicina, aproximadamente 50 semillas de Col-0 y *scs9-2* fueron sembradas en placas de MS sólido (2.2g/L) suplementado con 5g/L de sacarosa, en ausencia o presencia de paramomicina (0.005% y 0.01%) durante 10 días. Las imágenes mostradas de las plántulas de este ensayo fueron tomadas a los 14 días del ensayo. Para el ensayo de rosa de bengala, aproximadamente 20 semillas de Col-0 y *scs9-2* fueron sembradas en placas cuadradas de MS sólido (igual que arriba) en posición vertical durante 4 días, para posteriormente trasladar las plántulas a nuevas placas en ausencia o presencia del colorante rosa de bengala a 2 $\mu$ M, para su crecimiento durante 3 días. Las imágenes mostradas de las plántulas de este ensayo fueron tomadas a los 7 días del ensayo.

#### 5.5. Cuantificación de antocianinas y SA

La extracción y cuantificación de antocianinas se basó en el método descrito en (Mehrtens *et al.*, 2005), con algunas modificaciones. 0.3g de tejido fresco de plántulas de 10 días crecidas en medio MS suplementado con paramomicina (con las condiciones indicadas en el subapartado anterior) fue homogeneizado en 1mL de metanol ácido (1% (p/v) HCl; 6.7mL HCl en 250mL de metanol). Las muestras fueron incubadas durante 18h a 21°C con agitación suave (95 rpm). Después de la centrifugación (21500 g, 3minutos), 0.4mL del sobrenadante fue añadido a 0.6mL de metanol ácido. La absorbancia de los extractos obtenidos a 530 y 657nm fue determinada por espectrofotometría (Biophotometer, Eppendorf). La cuantificación de antocianinas se desarrolló usando la ecuación  $Q = (A_{530} - 0.25 \cdot A_{657}) \times M^{-1}$ ;

siendo Q la concentración de antocianinas, A530 y A657 son las absorbancias medidas a las longitudes de onda indicadas, y M es el peso fresco (en gramos) del tejido vegetal utilizado (Ramírez *et al.*, 2010). La extracción y cuantificación del SA se realizó basándose en el protocolo descrito en (Defraia *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2005), con algunas modificaciones. Un cultivo de *Acinetobacter* sp. ADPWH\_lux (BSS) fue crecido por una noche a 37°C en el agitador, inoculando 2-3mL de LB con 500µL del glicerinado. Al día siguiente, una dilución de BSS (1:20) en LB fue crecida durante 3h a 37°C en el agitador. Posteriormente, las células de BSS fueron lavadas con MES 10mM dos veces. Los extractos de plantas fueron obtenidos a partir de 100mg de tejido foliar congelado homogeneizado con 1mL de MES e incubado durante 30min. a 95°C y 30min. a temperatura ambiente, para una posterior centrifugación de 10min. Para la cuantificación de SA total, se incubaron 100µL del extracto con 100µL de β-glucosidasa (10mg/mL en MES 10mM) a 37°C durante 90min. Y para la cuantificación de SA libre se incubaron 100µL del extracto con 100µL de MES. Placas con 20µL de BSS añadido a 180µL de cada preparación fueron incubadas a 37°C durante 1h, para su posterior lectura en el luminómetro. Para la lectura de la placa se utilizó un estándar de SA preparado en MES (100, 10, 5, 2, 1, 0.5 y 0.1µM) y se calcularon los ng SA/g peso fresco. La cantidad de SAG se obtuvo a partir de la resta de SA total y SA libre.

## 5.6. Ensayo de inhibición por NaCl

Para el ensayo del efecto en la germinación y crecimiento, aproximadamente 30 semillas previamente esterilizadas se sembraron en MS sólido con 5g/L de sacarosa y MES (0.1g/L), y en ausencia o presencia de NaCl (a diferentes concentraciones). Las imágenes y los datos de peso fresco fueron tomados a los 13 días del ensayo. Para analizar la inhibición del crecimiento de las plántulas por estrés salino, las semillas sembradas y cultivadas en condiciones normales (sin NaCl) durante 6 días, se transfirieron a medio MS sin y con NaCl (a diferentes concentraciones). Las imágenes y los datos del peso fresco se tomaron después de 7 días de tratamiento. Se analizaron 20 plántulas por cada réplica y 3 réplicas por condición.

## 5.7. Extracción de tRNA, digestión y análisis HPLC y LC-MS

Para este análisis, plántulas de 15 días fueron inoculadas por spray con *P.s.* DC3000 a una OD de 0.1. El RNA total se extrajo del material homogeneizado utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen), los pequeños RNAs fueron separados del RNA ribosomal y mensajero utilizando LiCl, y el tRNA se purificó adicionalmente usando la resina de celulosa DE52 (Whatman Cat. # 4057-200) como se describe en (Chen *et al.*, 2010). 100µg de tRNA resuspendido en agua MilliQ fue degradado en nucleósidos con la nucleasa PI (Sigma Aldrich Cat. #54576-84-0) y fosfatasa alcalina (TOYOBO, Japón Cat. #CAP-101) como se describe en (Chen *et al.*, 2010). Los nucleósidos modificados se analizaron usando HPLC de fase inversa (sistema HPLC Waters Alliance y Waters Absorbance Detector 2996) y una columna C-30 (columna de fase inversa Develosil C-30, 250 x 4,6 mm, Nomura Chemical Co., Ltd.). El gradiente del tampón fue el mismo descrito en (Chen *et al.*, 2010). Los nucleósidos modificados fueron cuantificados en relación a los dos estándares internos ( $m^7G$  y  $m^1G$ ). Para el análisis LC-MS, el RNA total y microRNA fue extraído utilizando un kit de extracción de microRNA (Omega Bio-tek Inc.). La concentración de RNA se determinó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific), se digirió aproximadamente 20µg de tRNA con la nucleasa 2UP1 (Sigma, N8630) y 1.5 unidades de fosfatasa alcalina de intestino de becerro (TOYOBO, CAP-101) en 20µL de HEPES-KOH 20mM (pH 7) a 37°C durante 3 horas. La muestra se resuspendió con agua MilliQ (Millipore SYNNERGY) a una concentración final de 5µg/mL, y el volumen inyectado fue de 10µL. Se utilizó un espectrómetro de masas API4000Q-TRAP (Applied Biosystems) con un sistema de HPLC LC-20A y un detector UV de diodo (190-400 nm) equipado con una fuente de ionización por electro-pulverización. ESI-MS se llevó a cabo en un modo de ión positivo. El gas nebulizador, gas auxiliar, gas cortina, la temperatura de gas turbo, el potencial de entrada y el voltaje de pulverización de ión fueron 60 psi, 65 psi, 15psi, 550°C, 10 y 5500V respectivamente. El modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) se llevó a cabo para determinar las transiciones de ion parental-producto. Se utilizó una columna reversible de InertsilODS-3 (2.1mm x 150mm, 5 dimensiones de partícula, Shimadzu)

con columna de ODS Inertsil (4mm x 10mm, Shimadzu) para la separación cromatográfica de nucleósidos. El gradiente de fase móvil consistió en acetato de amonio 2mM (disolvente A) y metanol (disolvente B). El caudal fue 0.6mL/min a temperatura ambiente. Se utilizaron los patrones de nucleósidos estándar uridina, citidina, adenosina, guanosina, 1-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metiluridina y 2'-*O*-metilguanosina (Santa Cruz Biotechnology) para distinguir los isómeros de nucleósido. La abundancia relativa de cada nucleósido modificado seleccionado se calculó como área del pico con la masa correcta y la transición iónica parental a producto, dividida por la superficie total para los nucleósidos de uridina, citidina, adenosina y guanosina monitorizados. El contenido relativo de los nucleósidos Cm, Um y Gm fueron posteriormente referenciados frente a m<sup>1</sup>G y/o m<sup>7</sup>G.

## 5.8. Análisis northern blot de tRNA

4µg de RNA total, extraído de tejidos de hojas mediante el uso de TRIzol (Invitrogen), fue utilizado para la electroforesis en geles de acrilamida al 15% bajo condiciones desnaturalizantes, y posterior transferencia a membranas de nylon Hybon N (Amersham). El mismo nivel de carga de RNA se verificó por tinción del gel con bromuro de etidio antes de la transferencia a la membrana. Las sondas de oligonucleótidos fueron marcadas con <sup>32</sup>P con la quinasa T4 (Fermentas), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y luego purificadas en una columna para centrifugación G-25 separando la sonda marcada de los nucleótidos no incorporados. La actividad específica fue determinada usando un contador de centelleo. Las secuencias de las sondas utilizadas se especifican en el subapartado 5.9. Se llevó a cabo la prehibridación de las membranas durante 30min. en un tampón de hibridación (NaPO<sub>4</sub> 0.5M (pH 7.2), 7% SDS). La hibridación con las sondas marcadas se realizó en el mismo tampón durante una noche a 40°C, seguido de 3 lavados, a la misma temperatura durante 20min. cada uno, en 0.5x SSC/0.1% SDS (1x SSC es NaCl 0.15M y citrato sódico 0.015M).

## 5.9. Líneas de inserción de T-DNA y oligos utilizados

**Tabla 2.** Líneas de inserción de T-DNA para el mutante *scs9-2* y los mutantes de tipo *trm*. Secuencias de los oligos utilizados en los diferentes ensayos realizados en el Capítulo 1.

Destino	Nombre del oligo	Secuencia 5'-3'
Genotipado <i>csb3</i>	CSB3 FW	GGAGGCCTTCTTGTGGATGG
	CSB3 RV	GTCGACCCAACGACCATGTTC
Genotipado <i>scs9-1</i>	SCS9 TSE1 FW	GCTCGGACTGCTGAAGTGGTA
	SCS9 TSE1 RV	GCTTCCGACTTTCTCCAAGAGAC
Genotipado <i>scs9-2</i>	SAIL 1298 FW	AAGCTTCTCGAGACAAAAGGG
	SAIL 1298 RV	TTGAACCTGGATGACACCTTC
	T-DNA SAIL (LB1)	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
Clonación SCS9	BP SCS9 FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TTCATGGGAAAAGCTTCTCGAGAC
	BP SCS9 RV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT ATCTAGAGTTGAAGCTTTGTGCTG
qRT SCS9	qRT SCS9 3' FW	GCTTTTGCAGTCTGCGAGAATT
	qRT SCS9 3' RV	GCCAACCACTACTGCAATCGA
	qRT SCS9 5' FW	TGGTAGCTGGAGTCAGGTCTTG
	qRT SCS9 5' RV	CATAGGCTGCAAATCGATGG
qRT PR1	PR1 FW	AAGGGTTCACAACCAGGCAC
	PR1 RV	CACTGCATGGGACCTACGC
qRT PR2	PR2 FW	GGGACGGCTCTCGTGGCTACC
	PR2 RV	CGCGCGTTATCGAAACTCGCGG
qRT PR4	PR4 FW	GCGGCAAGTGTTTAAGGGTGAAG
	PR4 RV	TCCAAATCCAAGCCTCCGTTGC
qRT PR5	PR5 FW	AAATATCTCCAGTATTCACATTC
	PR5 RV	AAGTCTGTGGCCATAACAGCAA
qRT SID2	SID2 FW	GCTTGCAAGAGTGCAACATC
	SID2 RV	AAGCCTTGCTTCTTCTGCTG
qRT SBT3.3	SBT3.3 FW	AGACCTTTAGCGGTGTGTGTGAGT
	SBT3.3 RV	GCAGCGTTAGTTCTTGAGGCTG
qRT ACT2	ACT2 FW	TCTTCCGCTCTTTCTTTCCAAGC

	ACT2 RV	ACCATTGTCACACACGATTGGTTG	
tRNA Northern blot	Leu tRF_20_22	ACCAACTCGGCCATATCAAC	
	Phe tRF_20_10	CCCAACTGAGCTATCCCCGC	
	Trp 5' tRF	CCATTGCGCCACGGATCC	
	tRF_29_6 GlnCTG	GGGTTACTGGATTTCAGAGTCCAATGTCCT	
Genotipado T-DNAs de inserción <i>trm</i>	TRM1 LP	AAGGCTTATTGGCAAAACCTG	
	TRM1 RP	CCCATGTAGGTTCAAGCAAAC	
	TRM4 LP	TCCGCTTTTTGGGAAAGTAAG	
	TRM4 RP	GACCTTCCATGCCTTAAGTCC	
	TRM5 LP	CAATTGGTTTGTGGTACCCTG	
	TRM5 RP	TTATCCTCGCAAGTTGACACC	
	TRM9 LP	ACTACCTGGACCAACCCATTC	
	TRM9 RP	GAAAGGTTCTAGAAAAGGGGG	
	TRM10 LP	GGCAGAATTTAAACAGGGGAC	
	TRM10 RP	TGAAGTGCTTCTCCCATTCAC	
	TRM61 LP	GTTCTTCTGCAGCAAAGATG	
	TRM61 RP	GGCTTTCGAAGAATGGATCTC	
	T-DNA (LBb1.3)	SALK	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC







## **CAPÍTULO 2**

### **Modulación de la respuesta inmune a través del metabolismo de los folatos**

\*Los resultados presentados en este Capítulo serán enviados próximamente para su publicación.



## 1. Resumen

Las plantas dependen del metabolismo primario para una adaptación flexible y rápida frente a los cambios en el ambiente. Tras el reconocimiento del patógeno, se desencadena una reprogramación rápida y masiva en las células de la planta con el fin de activar respuestas defensivas eficientes para combatir al agente agresor. Sin embargo, hasta qué punto las diferentes rutas del metabolismo primario modulan la respuesta inmune de la planta y cómo este control metabólico influye en el resultado final de resistencia o de susceptibilidad a patógenos es un área de estudio que, aunque en auge, requiere ser implementado. En este trabajo, a través de una combinación de genética química y análisis genético directo, identificamos que la ruta metabólica esencial de los folatos ejerce un control negativo, independiente del ácido salicílico (SA), sobre la respuesta inmune a la infección por *Pseudomonas syringae* DC3000. La inhibición de esta ruta metabólica promueve un incremento de la resistencia a *P.s.* DC3000 mediante la activación de un mecanismo de priming de la inmunidad, caracterizado por la deposición de MAP kinasas activadas y el establecimiento de una más pronta e intensa activación de las defensas mediadas por SA tras el ataque patogénico. Por el contrario, la implementación de la ruta de los folatos revierte este fenotipo y resulta en un incremento de la susceptibilidad a la enfermedad. A través de un análisis proteómico comparativo, identificamos la proteína 5-metiltetrahidropteroiltriglutamato homocisteína metiltransferasa 1 (Metionina sintasa, nombrada aquí como METS1), responsable de la síntesis de metionina a través del metabolismo C1 dependiente de folatos, como una proteína relevante en la modulación de la respuesta inmune. La sobreexpresión de *METS1* reprime la respuesta inmune y genera incrementos notables en la susceptibilidad aumentada frente a *P.s.* DC3000. Un incremento en el nivel de metilación de DNA en todo el genoma acompaña a la sobreexpresión de *METS1*, lo que implica que un aumento en el flujo de metilación a nivel genómico puede interferir en la inmunidad de las plantas. Estas observaciones convierten al metabolismo C1 dependiente de folatos como un pilar clave en la modulación de la inmunidad vegetal a través de la regulación epigenética.

## 2. Introducción

Para prevenir el crecimiento microbiano, las plantas dependen de mecanismos eficientes de resistencia que involucran complejas redes de señalización que regulan las defensas inducibles y de larga duración. Estas respuestas incluyen cambios físicos (como por ejemplo, deposición de calosa y la fortificación localizada en la pared celular (Hardham *et al.*, 2007)) y respuestas bioquímicas (como por ejemplo, producción de especies reactivas de oxígeno (Torres, 2010) o metabolitos de señalización tales como el ácido salicílico (SA) (Vlot *et al.*, 2009) y otras hormonas relacionadas con patógenos (Pieterse *et al.*, 2012)) que perturban la infección (Jones y Dangl, 2006). En la reprogramación masiva de la célula vegetal tras el reconocimiento del patógeno, la activación o represión transcripcional de un conjunto selectivo de genes es también un aspecto común en la respuesta inmune. Esto precede a la síntesis de *novο* de varias proteínas relacionadas con defensa y metabolitos secundarios, incluyendo fitoalexinas y varios compuestos fenólicos, que contribuyen al establecimiento de un estado de resistencia frente al patógeno (Ahuja *et al.*, 2012; van Loon *et al.*, 2006). La activación de diversas rutas defensivas en el huésped está asociada con un incremento en la demanda de energía y de esqueletos de carbono que son proporcionados por rutas metabólicas primarias (Bolton, 2009; Kangasjarvi *et al.*, 2012). En consistencia con esto, una reducción de la fotosíntesis debida a la regulación por inhibición de genes implicados en dicho proceso y/o de síntesis de clorofila constituye una respuesta característica de la planta al ataque por patógenos (Berger *et al.*, 2004; Bilgin *et al.*, 2010; Denoux *et al.*, 2008; García-Andrade *et al.*, 2013). Además, esta reducción probablemente palia el gasto energético asociado a la regulación por activación de las otras rutas que proporcionan esa energía demandada, pero que no contribuyen a la resistencia a enfermedad. El metabolismo de aminoácidos es otro ejemplo de cómo diferentes rutas metabólicas constituyen una parte integral del sistema inmune en plantas. Por ejemplo, el catabolismo de la lisina es requerido para la síntesis de ácido pipecólico, un regulador crítico de la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) (Navarova *et al.*, 2012), y esta evidencia sugiere que la acumulación de algunos aminoácidos o de sus subproductos metabólicos desencadenan resistencia (ver revisión (Zeier, 2013)). Así, la reconfiguración del metabolismo primario es clave en la regulación de las respuestas

inmunes, sin embargo, todavía se requieren más estudios para identificar componentes y rutas metabólicas adicionales implicadas en el control de la inmunidad vegetal, y de los mecanismos que promueven tales respuestas.

Entre los mecanismos implicados en la reprogramación celular durante la defensa, la importancia del control epigenético emerge como un nivel adicional de complejidad en el control de la inmunidad y la resistencia inducida (IR) (López *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2013). La metilación de DNA es una marca epigenética conservada, importante para el desarrollo y adaptación de la planta a estrés, y está implicada en la transmisión del estado de priming o memoria al estrés que dota a la progenie de plantas inoculadas por patógeno con una resistencia intensificada (IR transgeneracional). Este último aspecto sugiere que las plantas pueden heredar dicho estado de mayor sensibilización o priming (Luna *et al.*, 2012; Slaughter *et al.*, 2012). Los mecanismos epigenéticos que regulan los programas de expresión génica están también, de manera similar, bajo el control del flujo metabólico primario, y los cuales controlan en última instancia la actividad de las enzimas involucradas en la metilación de DNA y modificación de histonas (Shen *et al.*, 2016). En relación con esto, recientes descubrimientos indican que la regulación epigenética de la expresión génica está bajo el control del metabolismo de un carbono (C1) dependiente de folatos, el cual produce finalmente S-adenosilmetionina (SAM), el donador universal utilizado por la mayoría de metiltransferasas que metilan DNA e histonas. En consistencia con esto, la inhibición de la ruta de síntesis de folatos suprime el silenciamiento génico epigenético y con ello activa la expresión de transgenes así como la de elementos transponibles. Por el contrario, la aplicación de compuestos pertenecientes a la ruta del folato restaura dicho silenciamiento génico (Zhang *et al.*, 2012). Además, los mutantes hipomórficos de los genes HOG1 (Homology-dependent Gene silencing) (Rocha *et al.*, 2005), FPGS1 (FolilPolyGlutamate Synthase) (Zhou *et al.*, 2013) y MTHFD1 (MethyleneTetraHydrofolate Deshydrogenase) (Zhang *et al.*, 2012), defectuosos en el metabolismo C1 dependiente de folatos y, por lo tanto, en la acumulación de SAM, muestran una metilación de DNA reducida que se acompaña, en consecuencia, de una des-represión del silenciamiento génico a escala del genoma en su totalidad. Esto denota una clara interacción entre el metabolismo primario y la regulación epigenética, la cual es esencial para la adaptación de la planta. Por lo tanto, si la inmunidad

de la planta está bajo el control epigenético, podría ocurrir que similares rutas metabólicas, que ejercen un control sobre los mecanismos epigenéticos para la expresión génica, puedan también ejercer un control sobre la respuesta inmune. Sin embargo, en el continuado estudio sobre el reconocimiento de patógenos y la señalización consiguiente para la activación de defensas de la planta, la utilización de componentes del metabolismo primario para modular la inmunidad vegetal ha recibido poca atención o ha pasado desapercibida en los rastreos genéticos, presumiblemente debido a la existencia de redundancia genética o a la esencialidad de los genes de la ruta.

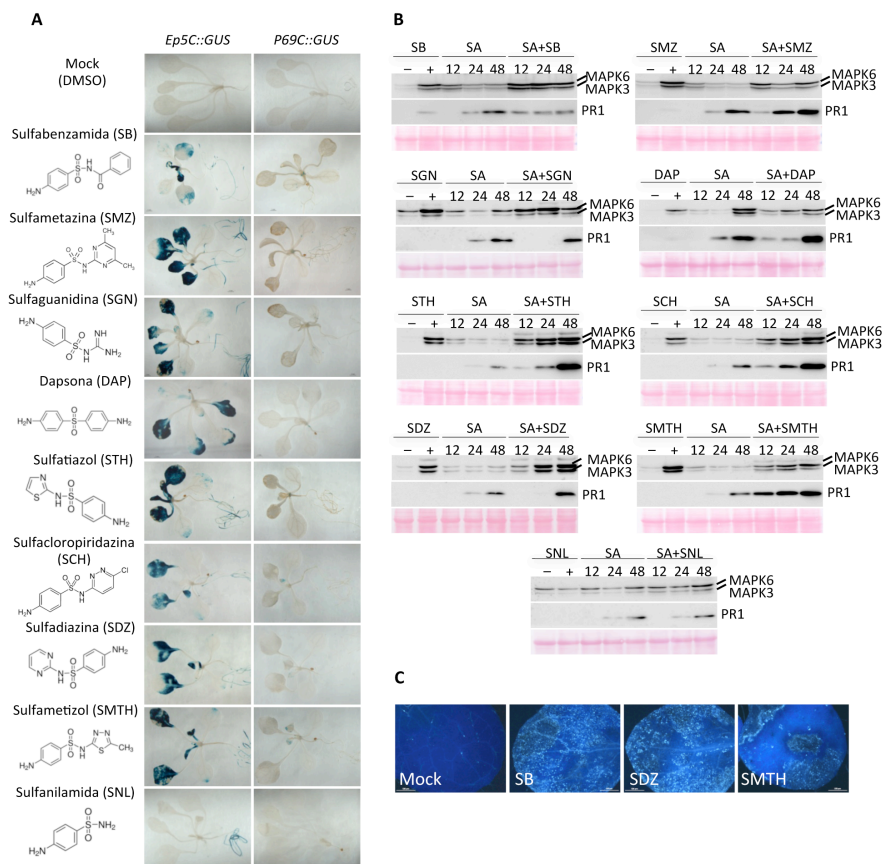
En este trabajo, presentamos la identificación de un conjunto de derivados de sulfonamidas, a través de un rastreo de genética química para la búsqueda de agonistas de la inmunidad en plantas, que promueven un estado de priming inmunológico en *Arabidopsis*. Las sulfonamidas inhiben la ruta de biosíntesis de folatos, e identificamos que esta ruta ejerce un control negativo, independiente del SA, sobre la respuesta inmune y la resistencia a *P.s.* DC3000. Además, identificamos que la acumulación de 5-metiltetrahidropteriltriglutamato homocisteína metiltransferasa 1 (Metionina sintasa, *METS1*), enzima encargada de la síntesis de metionina en la ruta del carbono simple (C1) dependiente de folatos (cuya función última es producir SAM para las reacciones de transmetilación metabólicas), inhibe la respuesta inmune y acarrea un aumento de la susceptibilidad a *P.s.* DC3000. Un incremento generalizado en la tasa de metilación en todo el genoma, y en todos los contextos de metilación (*i.e.*, CG, CHG y CHH) acompaña a la sobreexpresión de *METS1*. Así proponemos que dicho incremento en la tasa de metilación genómica generalizada podría interferir en la activación de la respuesta inmune de la planta. Estas observaciones revelan la existencia de una interacción entre la inmunidad de las plantas y la regulación epigenética a través del metabolismo primario de los folatos.

### 3. Resultados

#### 3.1. Las sulfonamidas promueven la activación transcripcional de *Ep5C::GUS*

Previamente, el promotor del gen *Ep5C* relacionado con defensa, fusionado a *GUS*, fue utilizado como un delator en rastreos genéticos directos para identificar moduladores de la respuesta inmune en *Arabidopsis*. Como resultado, mutantes defectuosos en *AGO4* (*i.e.*, *ocp11*) (Agorio y Vera, 2007) o *NRPD2/RNA PolIV* (*i.e.*, *ocp1*) (López *et al.*, 2011) fueron identificados al expresar constitutivamente el transgen *Ep5C::GUS*, acompañado por una inmunidad alterada. Estos descubrimientos revelaron la importancia del control epigenético en la regulación de la inmunidad en plantas. En la búsqueda de moléculas agonistas de la respuesta inmune en plantas, desarrollamos un rastreo de genética química directa usando una línea transgénica de *Arabidopsis* que porta la construcción *Ep5C::GUS* como delator. La colección LATCA (Library of Active Compounds in *Arabidopsis*) (<http://cutlerlab.blogspot.com/2008/05/latca.html>) fue utilizada como fuente de pequeñas moléculas biológicamente activas. Así, tras la puesta a punto de un rastreo de alto rendimiento, analizamos todos los compuestos químicos de esta colección a una concentración de 25  $\mu$ M en placas multipocillo, con análisis posteriores de comprobación del fenotipo, por triplicado, y ensayos de dosis-efectividad. En el rastreo, las moléculas químicas potencialmente activadoras de *Ep5C::GUS* se evaluaron basándose en la visualización de la actividad GUS tras tinción histoquímica de las plántulas tratadas. De los 3650 compuestos analizados, identificamos ocho candidatos que promovían la activación transcripcional de *Ep5C::GUS* (Fig. 1A). Estos ocho compuestos consistieron en derivados químicos de sulfonamidas (*i.e.*, sulfabenzamida (SB), sulfametazina (SMZ), sulfaguanidina (SGN), dapsona (DAP), sulfatiazol (STH), sulfacloropiridazina (SCH), sulfadiazina (SDZ) y sulfametizol (SMTH)), y todos ellos promovieron por toda la planta una fuerte activación transcripcional de *Ep5C::GUS* (Fig. 1A). El compuesto sulfanilamida (SNL) representa la estructura raíz de este grupo de moléculas sulfonamidas y fue identificado tras un análisis de los derivados obtenidos para identificar la unidad estructural que contribuye a la

bioactividad, un ensayo conocido comúnmente como SAR (Relación Estructura-Afinidad). SNL produjo una débil activación de la expresión *GUS* únicamente en las raíces de la plántula (Fig. 1A). Esto sugiere que el grupo R- de la sulfonamida parece ser requerido para la activación génica en estos ensayos. La expresión génica mediada por sulfonamidas pareció ser específica para *Ep5C*, ya que análisis similares realizados con una línea transgénica portadora de la construcción *P69C::GUS*, un gen relacionado con defensa y cuya inducción por *P.s.* DC3000 y SA fue demostrada previamente (Jordá *et al.*, 1999), no mostraron ningún efecto sobre su activación transcripcional (Fig. 1A). Esto sugiere que las sulfonamidas interfieren en una ruta específica del sistema inmune y activan solamente un subconjunto del arsenal de respuestas defensivas existentes.





**Figura 1. Caracterización de las sulfonamidas identificadas como moléculas promotoras de priming de la respuesta inmune.** (A) Análisis comparativo por tinción histoquímica de la actividad GUS en plántulas transgénicas *Ep5C::GUS* y *P69C::GUS* tratadas con diferentes derivados de sulfonamidas. Se muestra una plántula representativa de 14 días de cada línea transgénica tratada con cada compuesto aplicado en cultivo líquido a una concentración de 25 $\mu$ M y tras 7 días de tratamiento. (B) Análisis western blot con anticuerpos anti-pTEpY y anti-PR1 de extractos proteicos crudos de plantas *Ep5C::GUS* tratadas con diferentes sulfonamidas seguido de una aplicación de SA (50 $\mu$ M) a diferentes tiempos. La misma carga de proteína fue verificada por tinción de la membrana con el colorante Ponceau-S. (C) Deposición de calosa en hojas de plántulas tratadas con algunos de los derivados de sulfonamidas. Para su visualización se utilizó la tinción con azul de anilina y microscopio de fluorescencia con luz UV. Estos experimentos fueron repetidos 3 veces con resultados similares. El disolvente DMSO fue utilizado como control (mock).

### 3.2. Las sulfonamidas promueven la fosforilación de MPK3/MPK6 y sensibilizan para un incremento en la acumulación de PR1 mediada por SA

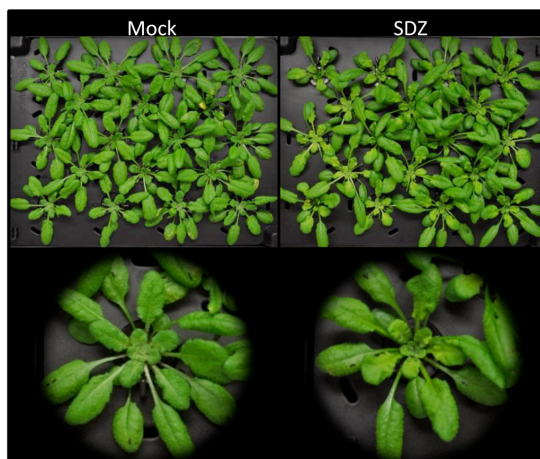
La expresión constitutiva de *Ep5C::GUS*, como fue observada previamente en los mutantes *ocp1* y *ocp11*, se asoció con la activación de un mecanismo de priming de la inmunidad donde genes relacionados con SA son cebados para una más pronta e intensa activación (López *et al.*, 2011). Debido a que la deposición de las proteínas MPKs (Mitogen-activated protein kinases) MPK3 y MPK6 activas, previo a la presencia de un estrés externo, ha sido descrita como marcador molecular para el diagnóstico de un estado de priming en *Arabidopsis*, pensamos que los derivados de sulfonamidas podrían promover la activación de MPK3 y MPK6. Para ello, llevamos a cabo análisis western blots de extractos proteicos derivados de plántulas de *Arabidopsis* tratadas con los diferentes derivados de sulfonamidas, con el fin de identificar la deposición de MPK3 y MPK6 fosforiladas mediante el empleo de un anticuerpo específico (Ramírez *et al.*, 2013). Los ensayos mostrados en la Fig. 1B (los dos primeros carriles a la izquierda de cada membrana de nitrocelulosa) revelaron una deposición aumentada de MPK3 y MPK6 tras el tratamiento con las sulfonamidas identificadas, excepto con sulfanilamida (SNL), que al igual que con su falta de efecto sobre la activación de *Ep5C::GUS*,

no promovió la deposición de las dos quinasas. Como se espera para un estado de priming, la acumulación de defensas relacionadas con SA (*e.g.*, acumulación de la proteína PR1) no tuvo lugar tras la aplicación única de las diferentes sulfonamidas (Fig. 1B, primeros dos carriles a la izquierda de cada hibridación). Por tanto, si las sulfonamidas son promotoras de priming en la planta tratada, se debería esperar que las defensas relacionadas con SA estén señalizadas para una activación más rápida y/o aumentada tras la aplicación de un inductor de defensa. Los western blots correspondientes a plántulas tratadas durante 12, 24 y 48 horas con SA a 50 $\mu$ M, en ausencia o presencia de cada una de los nueve derivados de sulfonamidas y revelados con anti-PR1 revelaron que la mayoría de las sulfonamidas sensibilizaron a las plántulas para una mas pronta inducción de PR1 siendo ya visible a las 12h tras la aplicación de SA (*i.e.*, SB, SMZ, DAP, STH, SCH, SMTH) o acumulándose a niveles más altos (*i.e.*, SMZ, DAP, SCH, SDZ, SMTH). En el caso de sulfaguanidina (SGN), a pesar de mostrar una deposición aumentada de MPK3 y MPK6, no pudimos detectar una mayor inducción de PR1 por SA. Como se esperaba, sulfanilamida (SNL) tampoco reveló un incremento de la inducción PR1. En todos los casos, el nivel de deposición pre-establecido de MPK3 y MPK6 activas no pareció estar influido por la aplicación de SA. La deposición de calosa es otra de las marcas distintivas de un estado de priming (Luna *et al.*, 2011). El resultado cualitativo de este análisis, mostrado en la Fig. 1C, indica que, comparado con la falta de deposición de calosa en plántulas control (mock; DMSO), la aplicación de SB, SDZ o SMTH promueve una notable deposición de calosa. Estos resultados sugieren así por tanto que las sulfonamidas actúan como agonistas de un mecanismo de priming inmunológico.

### 3.3. Sulfadiazina (SDZ) induce resistencia a *P.s.* DC3000

Debido a que la activación de priming provee a la planta de una resistencia frente a patógenos, el siguiente paso fue tratar de demostrar si el tratamiento con sulfadiazina, como miembro representativo de los derivados de sulfonamida identificados en el rastreo químico, ofrecería un incremento de

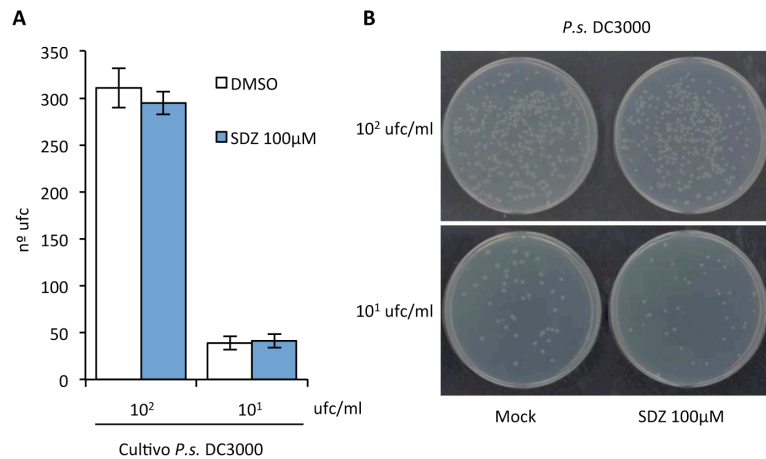
la resistencia a *P.s.* DC3000. Tras diferentes ensayos, observamos que el compuesto SDZ era más efectivo en plantas adultas mediante el suministro a través de las raíces. De esta forma, plantas de *Arabidopsis*, crecidas en un ambiente hidropónico usando el sistema Araponics (<http://www.araponics.com>) (Fig. S1), fueron tratadas con SDZ a una concentración de 100 $\mu$ M durante 3 días previos a la inoculación de las hojas por infiltración con *P.s.* DC3000.



**Figura S1. Ensayo de crecimiento de *P.s.* DC3000 en plantas de *Arabidopsis* crecidas en cultivo hidropónico tras tratamiento con SDZ o DMSO (mock).** Un desarrollo normal en plantas de 4 semanas pre-tratadas con SDZ (100 $\mu$ M) y posteriormente inoculadas con *P.s.* DC3000 fue observado en un ensayo por inmersión de las raíces en el compuesto en un sistema de crecimiento hidropónico (Araponics). Sólo una ligera clorosis en las hojas de roseta fue detectada.

El fenotipo de resistencia/susceptibilidad se analizó mediante la cuantificación del crecimiento bacteriano en las hojas inoculadas a 0, 3 y 5 días post-inoculación (d.p.i). La Figura 2A muestra que las plantas tratadas con SDZ exhibieron una reducción significativa del crecimiento bacteriano a los 3 y 5 d.p.i comparadas con las plantas control (tratadas con DMSO). Este aumento en la resistencia mediada por SDZ no fue debido a un efecto antibiótico contra *P.s.* DC3000 producido por SDZ. La monitorización del crecimiento bacteriano, tanto en medio líquido como sólido, en presencia de SDZ, a la concentración usada en nuestros experimentos, reveló que no había

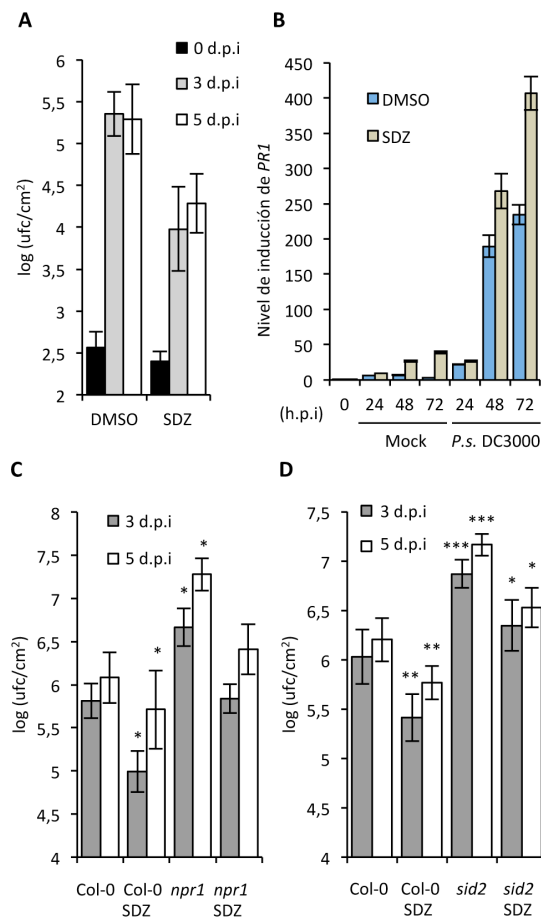
una alteración significativa del crecimiento de la bacteria (Fig. S2). La falta de efecto antibiótico de las sulfonamidas en el crecimiento de *P.s.* DC3000 fue también documentado en estudios anteriores (Noutoshi *et al.*, 2012a; Schreiber *et al.*, 2008). Por lo tanto, la resistencia mediada por SDZ en la planta no es debida a un efecto tóxico en el crecimiento de *P.s.* DC3000.



**Figura S2. La resistencia inducida por SDZ no es debida a un efecto antibiótico del compuesto.** (A) La tasa de crecimiento de cultivos de *P.s.* DC3000 a dos concentraciones en placas de LB con SDZ a 100µM indican que no se produce muerte celular como consecuencia de la presencia de SDZ. Las barras de error indican la desviación estándar (DE) (n=3). No se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. (B) Un tamaño normal de las colonias de cultivos de *P.s.* DC3000 tras el tratamiento con SDZ se observó en una placa representativa de cada condición ensayada.

Además, en plantas tratadas con SDZ, la expresión del gen *PR1* presentó una mayor activación tras la inoculación bacteriana congruente con la activación de un mecanismo de priming. Así, experimentos de RT-qPCR a diferentes tiempos post-inoculación, como se muestra en la Fig. 2B, revelaron incrementos notables en la acumulación del transcrito de *PR1* en plantas tratadas con SDZ comparados a los observados en plantas mock (DMSO). Además, este estado de priming mediado por SDZ no requiere que la ruta del SA esté intacta. De hecho, el estudio del crecimiento bacteriano en plantas mutantes *npr1* y *sid2* reveló que el incremento en la susceptibilidad

característico de estos dos mutantes es revertida por la aplicación de SDZ (Fig. 2C-D). Ya que *npr1* tiene un defecto en la percepción de SA (Cao *et al.*, 1997) y *sid2* lo tiene para la biosíntesis de SA (Wildermuth *et al.*, 2001), nuestros resultados sugieren que la acción de SDZ se basa en promover un incremento de la resistencia frente a *P.s.* DC3000 de manera independiente a la ruta de SA.



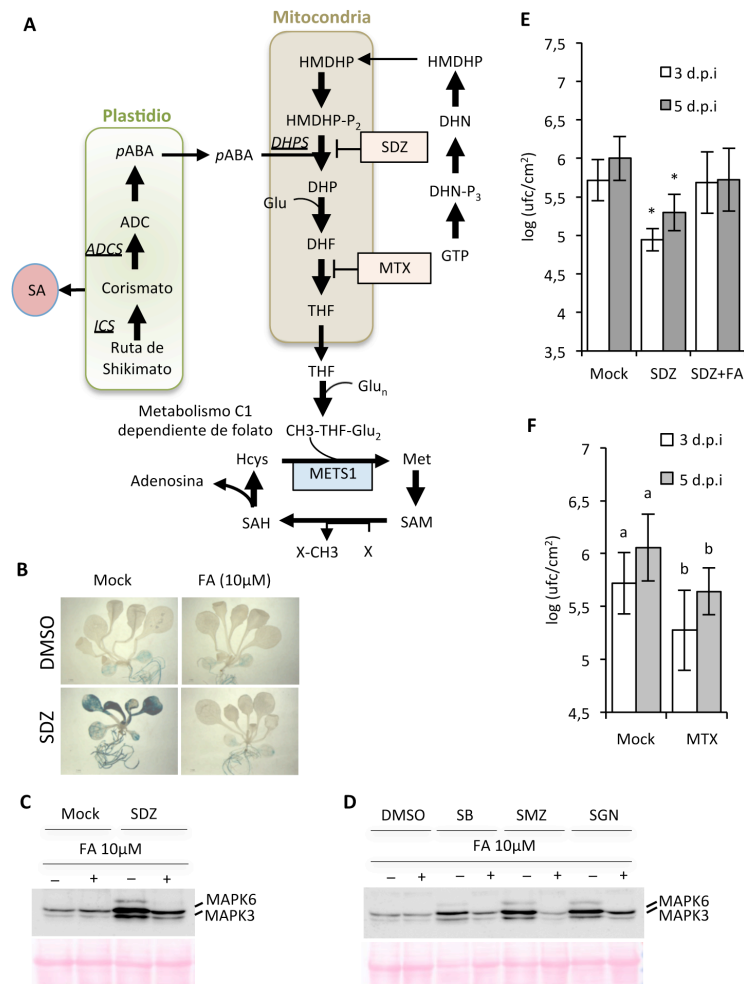
**Figura 2. SDZ induce resistencia frente a *P.s.* DC3000 con independencia de la ruta de SA.** (A) Tasa de crecimiento bacteriano de *P.s.* DC3000 en plantas Col-0 previamente tratadas con SDZ (100 $\mu$ M) o en plantas control (mock) durante 3 días. Las unidades formadoras de colonias (u.f.c) de bacteria fueron medidas a 0 (barras negras), 3 (barras grises) y 5 (barras blancas) días post inoculación (d.p.i). (B) Análisis cuantitativo de la expresión relativa de *PR1* mediante RT-qPCR en plantas Col-0 tras

un pre-tratamiento con SDZ y la inoculación posterior con *P.s.* DC3000. Las muestras fueron tomadas a las 0, 24, 48 y 72 horas post inoculación (h.p.i). Los datos representan la media  $\pm$  DE; n=3 réplicas. (C-D) Comparación de la tasa de crecimiento bacteriano medido a 3 (barras grises) y 5 (barras blancas) d.p.i con *P.s.* DC3000 con una aplicación previa de SDZ en Col-0, *npr1* (C) y *sid2* (D). Las barras de error indican la desviación estándar (DE; n=12 plantas). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento; el número de asteriscos indican el grado de diferencia entre los resultados (Test ANOVA simple;  $P < 0.05$ ).

### 3.4. La inhibición de la ruta metabólica de los folatos promueve la resistencia a *P.s.* DC3000

Las sulfonamidas identificadas son análogos estructurales al ácido *p*-aminobenzoico (*p*ABA), uno de los precursores iniciales de los folatos, por lo que inhiben competitivamente la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS) (McCullough y Maren, 1973; Prabhu *et al.*, 1997). Esta inhibición conlleva la represión de la biosíntesis del ácido dihidropteroico, el precursor intermedio del tetrahidrofolato (THF) (ver diagrama en Fig. 3A). Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2012) demostró que el tratamiento con sulfametazina (SMZ) en *Arabidopsis* afecta al metabolismo de los folatos, lo que conlleva una reducción significativa de la reserva total de folatos, incluyendo THF y sus derivados. Por lo tanto, testamos si la sola aplicación de ácido fólico (FA) podría reprimir la activación transcripcional de *Ep5C::GUS* mediada por SDZ. La figura 3B muestra que la sola aplicación de FA (10 $\mu$ M) resultó suficiente para revertir el efecto de SDZ en la reprogramación transcripcional de *Ep5C*. Además, la deposición de MPK3 y MPK6 fosforiladas mediada por SDZ fue también revertida por la aplicación de FA (Fig. 3C); inhibición que también fue reproducida cuando la deposición de MPK3 y MPK6 es mediada por otras sulfonamidas (*i.e.*, SB, SMZ y SGN) (Fig. 3D). Del mismo modo, la aplicación de FA a través de las raíces en plantas crecidas hidropónicamente suprimió la resistencia a *P.s.* DC3000 inducida por la aplicación de SDZ (Fig. 3E). Estos resultados indican pues, que los efectos producidos por sulfonamidas para activar un mecanismo de priming son probablemente debidos a la inhibición de la ruta biosintética de los folatos. De hecho, el compuesto metotrexato (MTX), un análogo de dihidrofolato (DHF), que actúa inhibiendo la enzima

dihidrofolato reductasa (DHFR) (Fig. 3A), y el cual altera la reserva del conjunto de THFs (Loizeau *et al.*, 2008; Loizeau *et al.*, 2007), también promovió un incremento de la resistencia a *P.s.* DC3000 (Fig. 3F), de manera similar a la observada para SDZ (Fig. 3E). Estas observaciones sostienen la idea de que es la inhibición de la síntesis de folatos la causante de la activación de la resistencia a *P.s.* DC3000 mediada por sulfonamidas.



**Figura 3. FA complementa el efecto de SDZ en Arabidopsis.** (A) La ruta de biosíntesis de folatos en plantas y su papel como cofactor en el metabolismo de un carbono para sintetizar metionina en el ciclo SAM. ADCS: aminodeoxicorismato (ADC) sintasa, *p*ABA: *p*-aminobenzoato, GTP: Guanina trifosfato, DHN: dihidroneopterina,

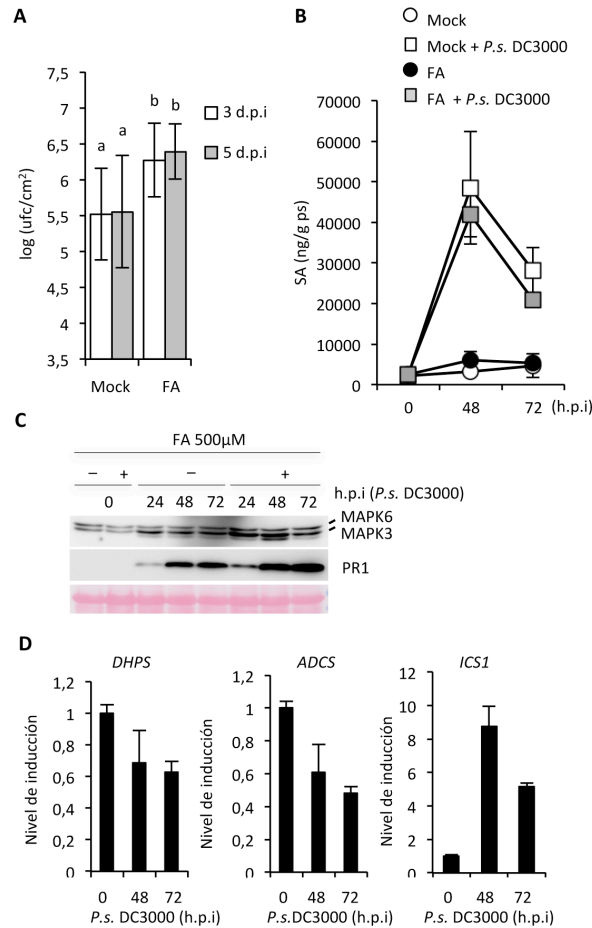
HMDHP: 6-hidroxi-metildihidropterina, ICS: isocorismato sintasa (EC 5.4.4.2), DHPS: dihidropteroato (DHP) sintasa, DHF: dihidrofolato, Glu: Glutamato, THF: tetrahydrofolato, Hcys: homocisteína, Met: metionina, SAM: S-adenosilmetionina, SAH: S-adenosilhomocisteína, METS: metionina sintasa independiente de cobalamina. (B) Análisis histoquímico de la actividad GUS en plántulas *Ep5C::GUS* tras un tratamiento con SDZ (25µM) y con o sin la aplicación simultánea de FA (10µM). Se muestra una plántula de 14 días representativa de cada condición del ensayo. (C-D) Western blot con anti-pTEpY de extractos crudos de proteínas derivados de plántulas Col-0 después de un tratamiento con SDZ (C) y otras sulfonamidas (D) con la aplicación simultánea de FA. (E) Análisis comparativo de la tasa de crecimiento de *P.s.* DC3000 a 3 y 5 d.p.i (barras blancas y grises, respectivamente) en plantas Col-0 pre-tratadas con SDZ (100µM) y FA (100µM). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control (mock). (F) Tasa de crecimiento de *P.s.* DC3000 en plantas Col-0 tras la aplicación de MTX (100µM) por impregnación de la planta. Las letras a y b indican los diferentes grupos de datos estadísticamente significativos respecto al control. Las barras de error indican DE (n=12 plantas).

### 3.5. El tratamiento con ácido fólico aumenta la susceptibilidad a *P.s.* DC3000

Para confirmar si el FA podría antagonizar la respuesta inmune, plantas de *Arabidopsis* adultas se impregnaron con FA a 500µM y las hojas fueron inoculadas por infiltración con *P.s.* DC3000. La cuantificación del crecimiento bacteriano a 3 y 5 d.p.i reveló que el FA promueve un aumento significativo del crecimiento de la bacteria (Fig. 4A). Este incremento en la tasa de crecimiento de *P.s.* DC3000 no fue debido a un defecto en la biosíntesis de SA mediado por el FA, ya que el aumento en los niveles de SA, desencadenado por la inoculación con la bacteria, fue similar en plantas tratadas con FA y en plantas control (Fig. 4B). La sensibilidad al SA tampoco se vio inhibida tras la aplicación de FA ya que la acumulación de PR1 no se vio afectada tras el tratamiento con FA (Fig. 4C). Por lo tanto, el incremento en la susceptibilidad a *P.s.* DC3000 mediado por FA tiene lugar de manera independiente a la ruta del SA. Además, la determinación de los niveles de transcritos para *DHPS* y *ADCS*, codificando enzimas cardinales de los compartimentos mitocondrial y plastidial, respectivamente, de la ruta de biosíntesis de folatos (Fig. 3A), revelaron que la expresión de estos genes se ve reprimida a las 48 y 72 h.p.i con *P.s.* DC3000 (Fig. 4D). En cambio, los niveles de transcrito de *ICS1*, que



codifica la enzima plastidial isocorismato sintasa, una enzima de la ruta de Shikimato clave para la biosíntesis de SA (Wildermuth *et al.*, 2001), sufren un notable aumento tras una inoculación bacteriana. Por lo tanto, la represión de los genes de la ruta de folatos se engloba dentro de la reprogramación transcripcional que ocurre durante la respuesta de defensa, lo que sugiere que la modulación de esta ruta podría representar un nivel adicional de complejidad a la hora de controlar el resultado de la inmunidad en plantas.

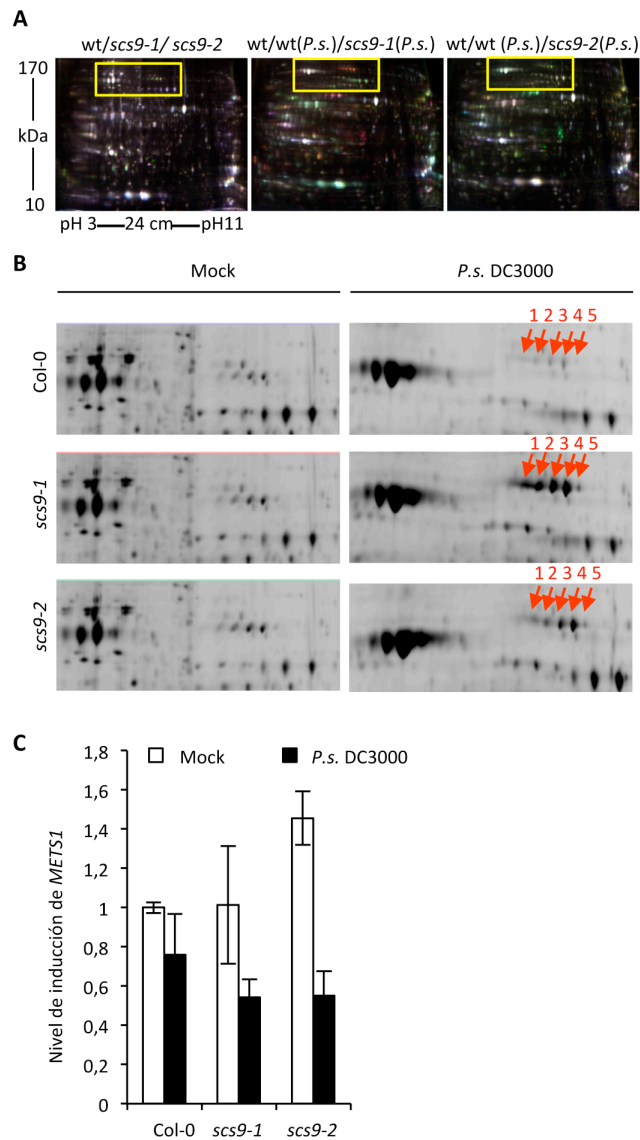


**Figura 4. FA induce la susceptibilidad frente a *P.s. DC3000* sin implicación de la ruta de SA.** (A) Tasa de crecimiento bacteriano a los 3 y 5 d.p.i en plantas Col-0 tratadas previamente por inmersión en FA (500µM). Las letras a y b (DE; n=12 plantas) indican los diferentes grupos de datos estadísticamente significativos respecto al control sin tratamiento (P<0.05). (B) Niveles de SA libre en plantas Col-0

tras la aplicación de FA a 0, 48 y 72 h.p.i con *P.s.* DC3000. Los datos representan la media  $\pm$  DE; n=3 réplicas. (C) Western blots con anti-pTEpY y anti-PR1 de extractos de proteínas derivados de plantas Col-0 pre-tratadas con FA e inoculadas con *P.s.* DC3000 a 0, 24, 48 y 72 h.p.i. (D) Análisis por RT-qPCR del nivel de expresión de los genes *DHPS*, *ADCS* y *ICS1* en plantas Col-0 a 0, 48 y 72 h.p.i con *P.s.* DC3000. Los datos representan la media  $\pm$  DE (n= 3 réplicas).

### 3.6. *P.s.* DC3000 promueve la sobreacumulación de metionina sintasa (METS1) en plantas *scs9*

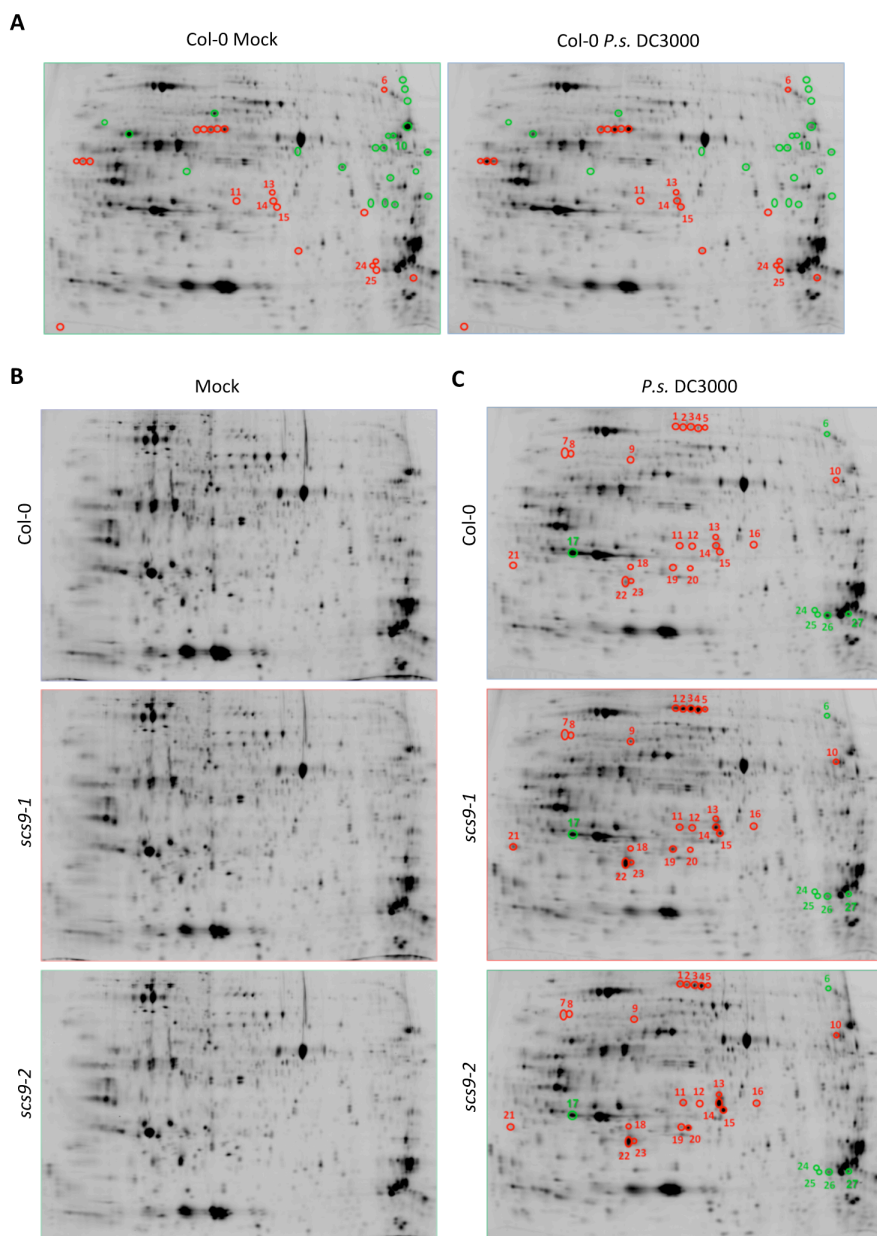
El incremento de la susceptibilidad mediada por FA evoca al fenotipo de susceptibilidad característico de los mutantes *scs9* (*supressor of cb3*) descritos en el Capítulo 1, y ambos independientes de SA. Por ello, decidimos analizar las plantas *scs9* en busca de alteraciones en la acumulación de proteínas y que pudieran dar pistas para una mejor comprensión del fenotipo mutante. Así, desarrollamos un análisis proteómico comparativo de plantas Col-0, *scs9-1* y *scs9-2* mock e inoculadas con *P.s.* DC3000. Para detectar diferencias en el patrón de acumulación de proteína entre los diferentes genotipos y tratamientos usamos la técnica DIGE (2D-difference gel electrophoresis). Extractos proteicos de estas muestras fueron entonces diferencialmente etiquetados con los fluoróforos Cy2, Cy3 y Cy5 y geles de poliacrilamida 2D representativos de este experimento se muestran en la Fig. 5A. Únicamente aquellas proteínas que mostraron una expresión diferencial mayor de 2.5 veces de inducción y que fueron además comúnmente observadas en los dos mutantes *scs9* con respecto a las plantas Col-0 tras la inoculación con *P.s.* DC3000 fueron seleccionadas para su identificación (Fig. S3). Veintisiete puntos seleccionados fueron identificados positivamente por MS-MALDI-TOF-TOF y LC-MS/MS. Estos correspondieron a 17 proteínas con acumulación diferencial (Tabla S1), de las cuales 12 aumentaban y 5 disminuían comúnmente en las dos líneas *scs9* en comparación con Col-0.



**Figura 5. Análisis proteómico comparativo de plantas Col-0, *scs9-1* y *scs9-2* inoculadas con *P.s.* DC3000 (3 d.p.i).** (A) Superposición de las 3 imágenes de fluorescencia de cada gel 2D analizado por la técnica DIGE. Gel de la izquierda: Comparación entre las muestras mock (sin inocular) de Col-0 (Cy2, azul), *scs9-1* (Cy5, rojo) y *scs9-2* (Cy3, verde); Gel del centro: Comparación entre la muestra Col-0 sin inocular (Cy3, verde) y las muestras inoculadas de Col-0 (Cy2, azul) y *scs9-1* (Cy5, rojo); Gel de la derecha: Comparación entre la muestra Col-0 sin inocular (Cy5, rojo) y las muestras inoculadas de Col-0 (Cy2, azul) y *scs9-2* (Cy3, verde). En estos gels, las

proteínas inducidas en *scs9-1* aparecen en rojo, aquellas inducidas en *scs9-2* aparecen en verde, aquellas reprimidas en ambos mutantes aparecen en azul y las proteínas no alteradas en su acumulación aparecen en blanco. (B) Imágenes DeCyder ampliadas, derivadas del cuadrado amarillo en la Fig. 5A y que corresponden a cada etiqueta de fluoróforo indicado para estos geles. Los diferentes spots (puntos) proteicos correspondientes a la misma proteína (METS1) se indican con flechas rojas y también son etiquetados con los números respectivos de la lista de proteínas identificadas por secuenciación (Tabla S1). (C) Análisis cuantitativo por RT-qPCR de la expresión relativa de *METS1* en plantas Col-0, *scs9-1* y *scs9-2* control e inoculadas con *P.s.* DC3000. Los datos representan la media  $\pm$  DE (n= 3 réplicas).

La proteína 5-metiltetrahydropteroltriglutamato homocisteína metiltransferasa 1 (Metionina sintasa (At5g17920)), de ahora en adelante nombrada como METS1, fue identificada en 5 de los spots proteicos diferenciales seleccionados, mostrando una acumulación notable en plantas *scs9-1* y *scs9-2* en comparación a Col-0 en condiciones de inoculación. METS1, es una enzima clave en el metabolismo de un carbono (C1) a través del cual unidades C1 transportadas por el cofactor folato 5-metil-THF-Glu2 actúan como donadores metilos para la síntesis de metionina (Met) catalizada por METS1; esta Met sintetizada es convertida posteriormente a S-adenosilmetionina (SAM) (Fig. 3A), el donador universal de metilos para las reacciones de metiltransferasas (Roje, 2006). La abundancia relativa de la proteína METS1 se detalla en las zonas ampliadas de los geles 2D, en la Fig. 5B. Ya que los 5 puntos identificados de METS1 difirieron en su punto isoeléctrico (pI) pero no en el peso molecular, los diferentes pI observados son probablemente el resultado de modificaciones post-traduccionales de dicha proteína. Aunque METS1 fue la proteína que mostró la mayor acumulación diferencial en plantas *scs9-1* y *scs9-2* inoculadas con *P.s.* DC3000, en cambio los niveles de transcrito de *METS1* no se vieron alterados tras la inoculación bacteriana (Fig. 5C). Aunque el mecanismo molecular que sustenta la mayor acumulación de METS1 en los mutantes *scs9* inoculados necesita aún ser investigado, una mayor estabilidad de la proteína o un incremento en su tasa de traducción podrían servir de explicaciones lógicas para entender esta observación.



**Figura S3. Imágenes DeCyder de los análisis proteómicos 2D-DIGE (Fig. 5A).** Las proteínas con una acumulación incrementada 2.5 veces son marcadas con un círculo rojo y aquellas con una acumulación 2.5 veces reducida son marcadas con un círculo verde. (A) Variación en la acumulación de proteínas entre plantas Col-0 inoculadas y

no inoculadas con *P.s.* DC3000. (B) Los mutantes *scs9* no mostraron una variación diferencial en el patrón de acumulación de proteínas con respecto a plantas Col-0, en condiciones control. (C) Variación en la acumulación diferencial de proteínas en mutantes *scs9* comparados con plantas Col-0 tras la inoculación con *P.s.* DC3000. Los números identificadores de los puntos seleccionados corresponden a aquellos mostrados en la Tabla S1.

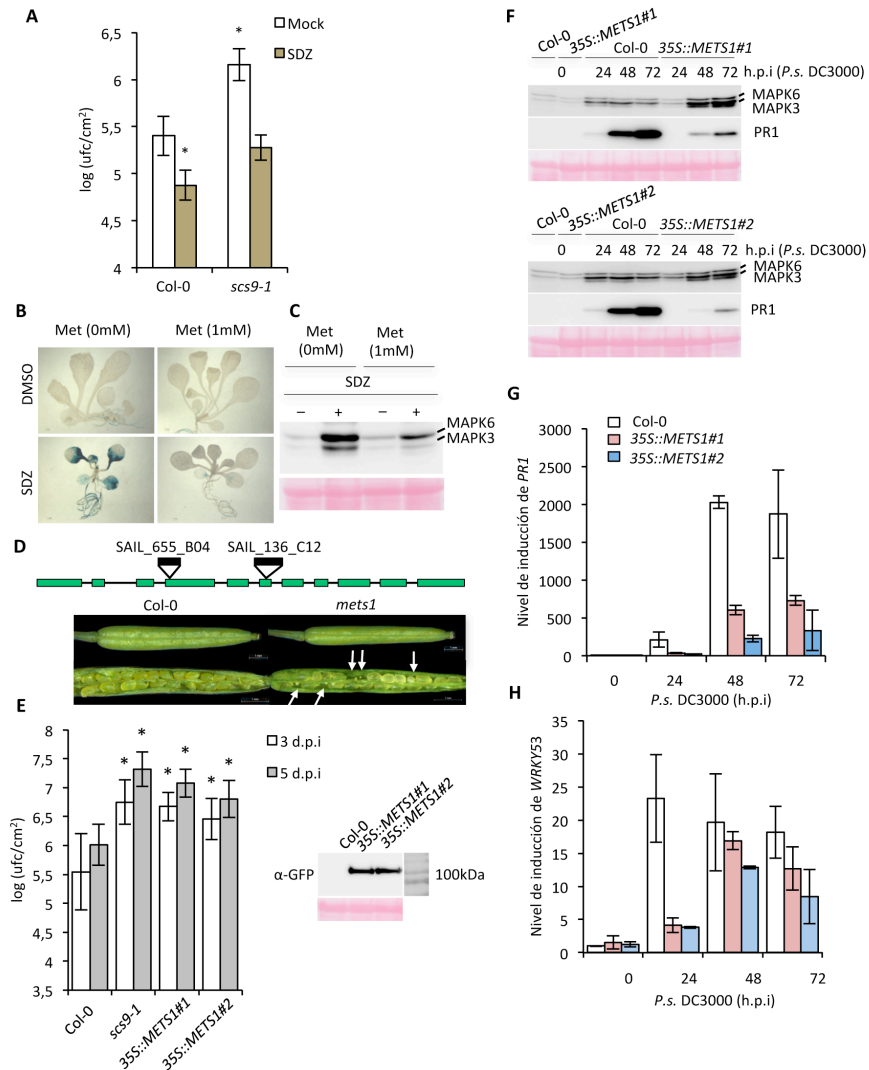
**Tabla S1. Lista de proteínas identificadas en los geles 2D-DIGE**, con un nivel de acumulación diferencial mayor o igual a 2.5 para los mutantes *scs9-1* y *scs9-2*, comparados con plantas Col-0, tras la inoculación con *P.s.* DC3000 (rojo=acumulación incrementada 2.5 veces; verde=acumulación reprimida 2.5 veces). Las proteínas seleccionadas se analizaron por MS-MALDI-TOF-TOF y LC-MS/MS. Los identificadores de los puntos corresponden a aquellos indicados en la Fig. S3. El nivel de acumulación es determinado como el ratio de la abundancia de proteína entre los diferentes genotipos (mutante respecto a planta silvestre), según el análisis informático de las imágenes DeCyder (Fig. S3). La identidad de la proteína seleccionada se indica por el identificador del locus en el genoma de *Arabidopsis* y por su anotación. Sólo fueron aceptadas las identificaciones de proteínas con un 95% de probabilidad y si contenían al menos 3 péptidos, cada uno de ellos identificados con una probabilidad mayor del 95% (para detalles, ver Material y Métodos).

Etiqueta del punto	Locus	Descripción de la proteína	nº de péptidos identificados
1	At5g17920	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1	13
2	At5g17920	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1	18
3	At5g17920	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1	22
4	At5g17920	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1	16
5	At5g17920	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1	13
6	At4g12420	Monocopper oxidase-like protein SKU5	11
7	At1g76030	V-type proton ATPase subunit B1	11
8	At1g79830	Golgin candidate 5	18
9	At2g36530	Bifunctional enolase 2/transcriptional activator	10
10	At1g07940	Elongation factor 1-alpha 1	9
11	At5g24770	Vegetative storage protein 2	4
12	At5g24770	Vegetative storage protein 2	4
13	At2g39030	L-ornithine N5-acetyltransferase NATA1	6
14	At5g24770	Vegetative storage protein 2	7
15	At5g24780	Vegetative storage protein 2	10
16	At5g24770	Vegetative storage protein 2	3
17	At1g06680	Oxygen-evolving enhancer protein 2-1, chloroplastic	6
18	At3g62030	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-3, chloroplastic	8
19	At1g77090	PsbP domain-containing protein 4, chloroplastic	10
20	At3g27890	NADPH:quinone oxidoreductase	3
21	At3g16640	Translationally-controlled tumor protein homolog	5
22	At3g62030	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-3, chloroplastic (also known as ROC4)	7
23	At3g62030	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-3, chloroplastic (also known as ROC4)	9
24	At4g20260	Plasma membrane-associated cation-binding protein 1	3
25	At4g05180	Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic	6
26	At4g05180	Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic	7
27	At4g21280	Oxygen-evolving enhancer protein 3-1, chloroplastic	6

### 3.7. La sobreexpresión de *METS1* incrementa la susceptibilidad a *P.s.* DC3000

La siguiente hipótesis que nos planteamos fue que si la resistencia a la infección bacteriana mediada por SDZ es debida a la inhibición de la ruta de THF, entonces muy probablemente la susceptibilidad incrementada y característica de las plantas *scs9* sería debida en última instancia a la sobreacumulación de *METS1*, cuya actividad enzimática depende de la producción de THFs. De ser así, dicha susceptibilidad debería ser revertida si la síntesis de THFs es inhibida con sulfonamidas. La figura 6A muestra que la aplicación de SDZ a plantas *scs9-1* revertió la susceptibilidad aumentada a *P.s.* DC3000, reduciendo la tasa de crecimiento bacteriano a niveles similares a los observados en plantas Col-0. Esto denota la importancia de la ruta de síntesis de Met por medio de la enzima *METS1* y los THFs para promover la susceptibilidad en la planta. De hecho, la sola aplicación de Met fue capaz de reprimir la activación transcripcional de *Ep5C::GUS* mediada por SDZ (Fig. 6B), así como también revertió la deposición de MPKs mediada por SDZ (Fig. 6C). Estos resultados sugieren que la biosíntesis de Met mediada por *METS1* en el metabolismo C1 dependiente de THF es un factor importante para modular la inmunidad en plantas.

Tratando de corroborar estas observaciones, usamos mutantes de *Arabidopsis* defectuosos para la proteína *METS1*. Sin embargo, no pudimos obtener plantas homocigotas a partir de líneas de inserción de T-DNA para el gen *METS1*, como SAIL\_655\_B04 y SAIL\_136\_C12, las cuales tienen una inserción de T-DNA en el 4º y 6º exón del gen, respectivamente, ya que la mutación en homocigosis resulta en letalidad para el embrión (Fig. 6D). La letalidad en mutantes defectuosos de esta ruta es una característica común a la observada para los mutantes de la ruta de THF debido al papel esencial que ejercen ambos en el ciclo celular (Chen *et al.*, 2016; Gallardo *et al.*, 2002; Roje, 2006).

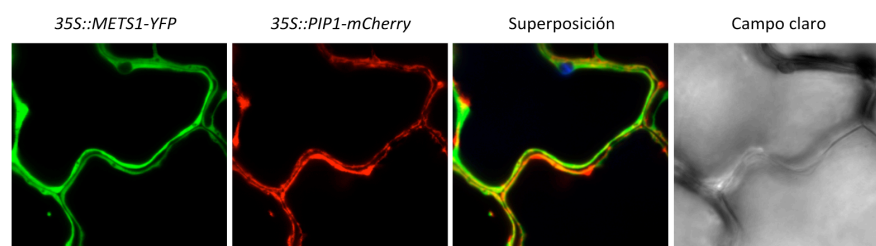


**Figura 6. La sobreexpresión de *METS1* promueve un incremento en la susceptibilidad a *P.s. DC3000*.** (A) Tasa de crecimiento bacteriano a 3 d.p.i. en plantas *scs9-1* comparadas con plantas Col-0, ambas tratadas previamente con SDZ (100µM). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin tratamiento. Las barras de error indican DE (n=12 plantas). (B) Análisis histoquímico de la actividad GUS en plantas *Ep5C::GUS* tras un tratamiento combinado con SDZ (25µM) y metionina (1mM). Se muestra una plántula de 14 días representativa de este análisis. (C) Western blot con anti-pTEpY de extractos de proteína derivados de plántulas tratadas con SDZ y metionina, como en el apartado B.



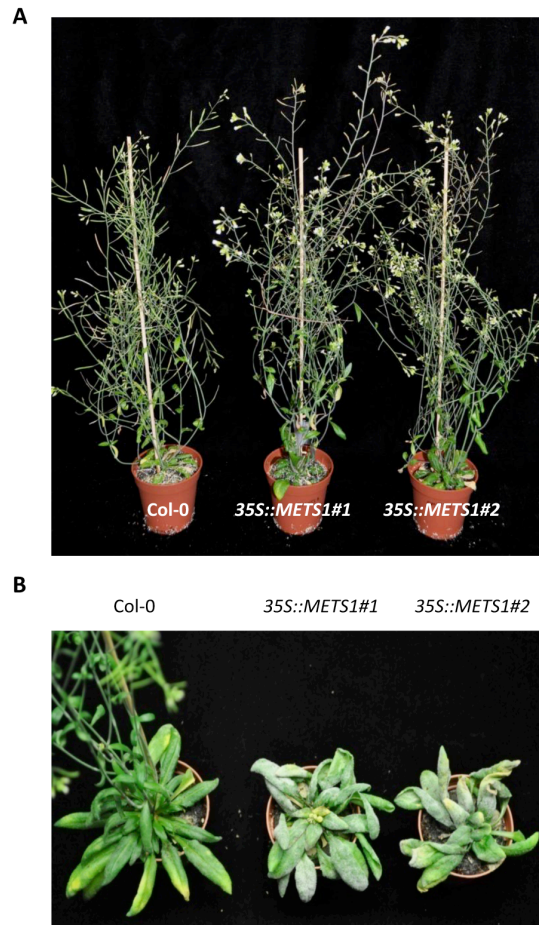
La carga de proteína fue verificada por tinción con Ponceau-S. (D) Letalidad embrionaria de los mutantes *mets1*. Se estudiaron dos alelos mutantes, derivados de la colección Salk, por inserción de T-DNA (la posición relativa de la inserción de T-DNA, representado con un cuadrado negro, en el gen *METS1* se representa en el diagrama mostrado; los cuadrados corresponden a exones y las rayas a intrones, ambos con un tamaño aproximado). Se muestra una silicua representativa de los mutantes *mets1* comparada con Col-0. Un cuarto del total de semillas en los mutantes *mets1* abortaron antes de completar su formación. Los embriones defectuosos se indican con las flechas blancas. (E) Crecimiento comparativo de *P.s.* Dc3000 entre plantas Col-0, *scs9-1* y dos líneas independientes sobreexpresoras de *35S::METS1-YFP* a los 3 (barras blancas) y 5 (barras grises) d.p.i. La sobreacumulación de *METS1* en las líneas sobreexpresoras fue verificada por western blot con anti-GFP. (F) Western blot con anti-pTEpY y anti-PR1 de extractos de proteínas derivados de plantas Col-0 y de las dos líneas sobreexpresoras (*35S::METS1#1* y *#2*) a 0, 24, 48 y 72 h.p.i con *P.s.* DC3000. (G) Análisis por RT-qPCR de la expresión relativa de los genes *PR1* y *WRKY53* en plantas Col-0 y *35S::METS1#1* y *#2* a 0, 24, 48 y 72 h.p.i con *P.s.* DC3000.

Alternativamente, nos preguntamos si la sola sobreexpresión de *METS1* sería suficiente para promover un incremento en la susceptibilidad a *P.s.* DC3000. Con este fin, generamos líneas transgénicas estables de *Arabidopsis* sobreexpresando *METS1* (fusionado con YFP) bajo el control del promotor constitutivo 35S CaMV (líneas *35S::METS1-YFP*). La observación mediante expresión transitoria de esta construcción en *Nicotiana benthamiana* reveló que *METS1-YFP* es una proteína citosólica, en consonancia con la localización citosólica también del metabolismo C1 dependiente de esta enzima (Fig. S4).



**Figura S4. Localización subcelular de *35S::METS1-YFP*.** Las células epidérmicas de hojas de *Nicotiana benthamiana* transfectadas con la construcción fueron evaluadas por expresión transitoria y microscopía confocal. La proteína de membrana PIP (*35S::PIP1-mCherry*) o el etiquetado por fluorescencia de los cloroplastos fueron utilizados como control.

Las plantas procedentes de dos líneas transgénicas homocigotas independientes (*35S::METS1#1* y *35S::METS1#2*), y que muestran una correcta acumulación de la proteína de fusión (western blot mostrado a la derecha de la Fig. 6E), fueron inoculadas con *P.s.* DC3000 y se cuantificó el crecimiento bacteriano a los 3 y 5 d.p.i. Plantas Col-0 y *scs9-1* fueron ensayadas en paralelo como controles. Los resultados de la Figura 6E revelaron que las dos líneas *35S::METS1* favorecen un crecimiento bacteriano significativamente mayor con respecto a las plantas Col-0. Este incremento de la susceptibilidad fue de una magnitud similar al observado en plantas *scs9-1*. Además, en las dos líneas transgénicas, la deposición de MPK3 y MPK6 activas mediada por la inoculación con *P.s.* DC3000 se vio acentuada a las 48 y 72 h.p.i con respecto a la deposición observada en plantas Col-0 (Fig. 6F). Esta deposición aumentada de MPKs puede reflejar el incremento en la señalización causada por el mayor crecimiento bacteriano. Sin embargo, y en contraposición, la acumulación de la proteína PR1 se ve drásticamente reprimida en ambas líneas transgénicas (Fig. 6F). Esta reducción en la acumulación de la proteína PR1 cursa con una reducción también notable en la expresión de *PR1*, medida por RT-qPCR, observada en las dos líneas transgénicas tras la infección (Fig. 6G). Esta atenuación a nivel transcripcional se vio también reflejada en la reducción de la expresión de *WRKY53* (Fig. 6H), el cual codifica un factor de transcripción esencial para la reprogramación transcripcional dependiente de SA (Asai et al, 2002; Dong et al, 2003). En resumen, nuestros resultados proporcionan evidencias para una correlación positiva de *METS1* con la susceptibilidad a enfermedad. En consistencia con estas observaciones, aunque la sobreexpresión de la enzima *METS1* no afectó al desarrollo y ciclo de vida de las plantas, las líneas *35S::METS1* mostraron, de forma cualitativa con respecto a Col-0, una mayor susceptibilidad a la infección producida por la presencia del hongo fitopatógeno *Oidium*, cuya infección severa inhibió notablemente el crecimiento y la transición de desarrollo vegetativo a reproductivo (Fig. S5).



**Figura S5. Caracterización del desarrollo de plantas *35S::METS1-YPF*.**

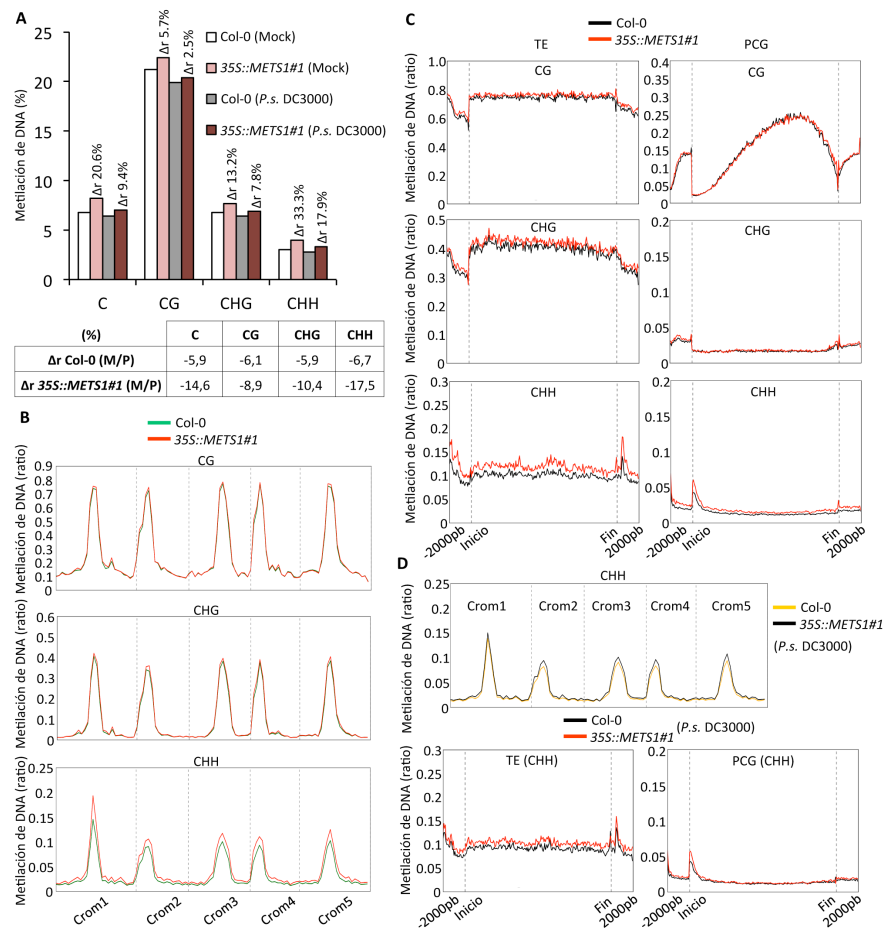
(A) Desarrollo vegetativo y reproductivo de una planta representativa de Col-0 y las dos líneas homocigotas (generación T4) sobreexpresoras de *METS1* tras 2 meses y medio de vida. (B) Mayor susceptibilidad cualitativa al hongo fitopatógeno *Oidium* mostrada por las plantas sobreexpresoras de *METS1* crecidas en el invernadero con respecto a Col-0.

### 3.8. La metilación de DNA se incrementa de manera global por la sobreexpresión de *METS1*

Debido a que la reserva de Met sintetizada por *METS1* a través del metabolismo C1 es el precursor inmediato de S-adenosilmetionina (SAM) (Fig. 3A) (Roje, 2006), hipotetizamos que la alteración observada en la respuesta inmune en las plantas *35S::METS1* vendría por tanto determinada por una modificación basada en metilación. En relación a esto, previamente

se había identificado que la expresión inducida por patógeno de *Ep5C::GUS* concurre con la de-metilación de la región promotora del gen (Agorio y Vera, 2007). Además, *Ep5C* llega a estar constitutivamente expresado en mutantes de la ruta de RdDM (López *et al.*, 2011). Por ello, razonamos que la activación de la expresión de *Ep5C::GUS* y la activación del mecanismo de priming, mediadas por sulfonamidas (mostrado en la Fig.1), podrían ser debidas a una inhibición de la metilación de DNA como consecuencia de la inhibición de la ruta de THF, lo cual a su vez bloqueará la síntesis de Met y subsiguientemente de SAM. Bajo este mismo razonamiento, hipotetizamos que potenciar la síntesis de Met a través de la sobreexpresión de *METS1* podría en última instancia potenciar la metilación de DNA, y con ello el silenciamiento génico, y en consecuencia artefactuar la respuesta inmune de la planta. Para averiguar cómo la sobreexpresión de *METS1* podría estar afectando a la metilación de DNA a escala global, se procedió a secuenciar el metiloma de plantas Col-0 y plantas *35S::METS1#1*, tanto a nivel basal como en condiciones inductivas, mediante secuenciación por bisulfito (BS-seq). Así, la comparación de los metilomas resultantes indicó que la tasa de metilación de DNA se ve incrementada en la línea sobreexpresora en un 20.6% respecto al valor mostrado en Col-0, teniendo en cuenta la tasa de metilación en todas las citosinas (Cs) analizadas (Fig. 7A). Además, observamos que el efecto más fuerte en el incremento del nivel de metilación en la línea transgénica respecto a Col-0 fue en las Cs encontradas en el contexto CHH, el cual incrementó la media en un 33.3% (Fig. 7A). Igualmente, un incremento en la tasa de metilación en los contextos CG (5.7%) y CHG (13.2%) fue revelado en la comparación entre la línea transgénica y Col-0. El incremento en el grado de metilación observado se asemeja a la variación observada para la modulación a nivel global de la metilación de DNA, por reducción en este caso, que conlleva la inhibición en la síntesis de folatos debida a la mutación del gen *MTHFD1* (Groth *et al.*, 2016). Por otro lado, se observó una reducción en los niveles de metilación del DNA en todos los contextos estudiados debido a la infección con *P.s.* DC3000, tanto en plantas Col-0 como en la línea sobreexpresora (Fig. 7A). El nivel de desmetilación inducida por la infección fue mayor en la línea transgénica que en Col-0 (Tabla inferior en Fig. 7A), posiblemente debido a unos niveles de metilación inicialmente más altos en la primera. A pesar de ello, el incremento de la metilación de DNA a nivel global observado en la línea *35S::METS1* respecto a las plantas Col-0 se

mantuvo igualmente en condiciones inductivas, mostrando un aumento del 9.4% en la tasa de metilación de todas las Cs analizadas. De igual manera, en condiciones inductivas, y a pesar de la bajada en la tasa de metilación neta, la mayor diferencia que persiste en la metilación en la línea de sobreexpresión se observó en el contexto CHH (17.9%), seguido de CHG (7.8%) y CG (2.5%).

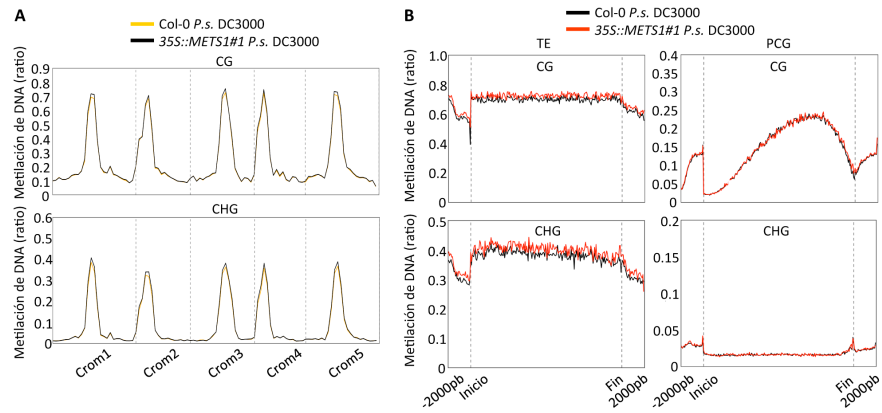


**Figura 7. La sobreexpresión de *METS1* produce un incremento en la metilación de DNA.** (A) Análisis comparativo de la media de la tasa de metilación (en %) de DNA global analizado por BS-seq entre plantas Col-0 y la línea 35S::METS1#1, en condiciones basales e inductivas, por *P.s.* DC3000. Se muestra la variación entre los dos genotipos, y los tratamientos, de la media de la tasa de metilación de todas las Cs analizadas en el contexto CG, CHG, CHH y en todo el genoma (C).  $\Delta r$ : incremento relativo del % de la tasa de metilación media respecto a su respectivo control. La tabla

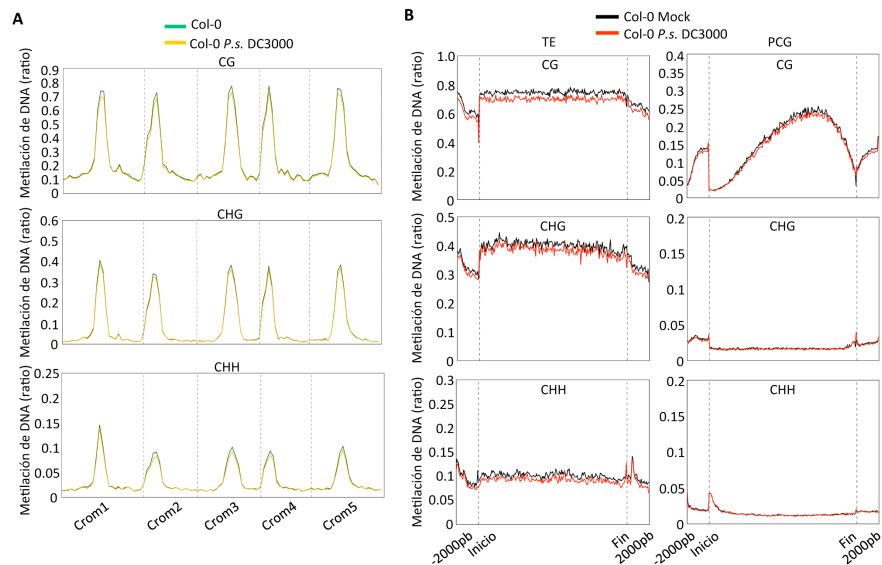
inferior muestra el  $\Delta r$  de la tasa de metilación en presencia de *P.s.* DC3000 (P) respecto a la condición mock (M), para cada genotipo. (B) Visualización del nivel de metilación de DNA global a lo largo de todo el genoma en plantas Col-0 y *35S::METS1#1*. El eje X del diagrama corresponde a la posición relativa de cada tasa de metilación a lo largo de los cromosomas de Arabidopsis. (C) Diagrama del nivel de metilación promedio para los TEs y los PCGs, analizado en los 3 contextos de metilación, para los dos genotipos. (D) Diagrama de la tasa de metilación a lo largo de los cromosomas y del nivel promedio para todos los TEs y PCGs, observado en el contexto CHH, entre Col-0 y la línea *35S::METS1#1* tras 72 h.p.i con *P.s.* DC3000.

Esta desmetilación del genoma de Arabidopsis inducida por la infección con *P.s.* DC3000 se ha observado también previamente y ha sido propuesta como parte importante en la regulación de la respuesta inmune (Dowen *et al.*, 2012; Pavet *et al.*, 2006). Adicionalmente, observamos que el incremento en la media de la tasa de metilación en la línea transgénica respecto a Col-0, para los tres contextos de secuencia, se concentraba mayoritariamente en la región pericentromérica (rica en secuencias repetidas y elementos transponibles; TE) y para los 5 cromosomas (Fig. 7B), de la misma manera que ocurre en el metiloma secuenciado de Arabidopsis (Zhang *et al.*, 2006). Esto explicaría que las mayores diferencias observadas en todo el genoma entre ambos genotipos se encuentren en los contextos CHH y CHG, ya que en Arabidopsis la metilación de contextos no CG ocurre predominantemente en TEs (Cokus *et al.*, 2008). Además, la metilación en regiones transcritas de los cuerpos génicos, al contrario que para los TEs, se ha visto asociada a un mayor nivel de expresión génica. Sin embargo, el efecto funcional de la metilación de DNA en zonas de cuerpos génicos no está aún completamente elucidado. Por ello, se observa que la metilación tiene lugar predominantemente en las secuencias repetidas y TEs, las cuales regulan también la expresión génica (Deleris *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2006). Aún así, la línea *35S::METS1* muestra una hipermetilación tanto en los TEs como en los PCGs (protein coding genes), aunque en menor grado para estos últimos, para los diferentes contextos (Fig. 7C). Estas observaciones refuerzan la consideración de que la tasa de metilación de DNA se vería incrementada, de manera generalizada, a unos niveles por encima del grado de metilación ya existente en el genoma, debido a la sobreexpresión de *METS1* y ello, presumiblemente, como consecuencia del incremento correspondiente en la síntesis de Met y por *ende* de SAM, el dador universal de grupos metilo.

Además, la hipermetilación de la línea sobreexpresora, mostrada a lo largo de los cromosomas y de forma mayoritaria en los TEs, se mantuvo por encima de Col-0 tras la infección por *P.s.* DC3000 (Fig. 7D y Fig. S6).

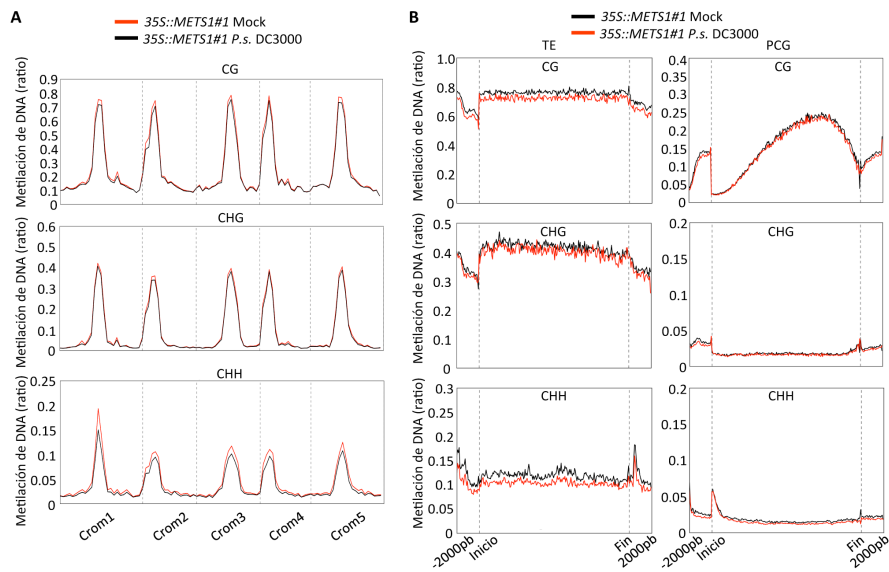


**Figura S6. La sobreexpresión de *METS1* mantiene el incremento en la metilación de DNA tras la infección por *P.s.* DC3000.** Diagrama de la tasa media de metilación a lo largo de los cromosomas (A) y del nivel de metilación promedio para todos los TEs y PCGs (B), observado en los contextos CG y CHG entre plantas Col-0 y 35S::*METS1#1* tras 72 h.p.i con *P.s.* DC3000.



**Figura S7. La infección por *P.s.* DC3000 produce una reducción en la metilación de DNA en plantas Col-0.** Diagrama de la tasa media de metilación a lo largo de los cromosomas (A) y del nivel de metilación promedio para todos los TEs y PCGs (B), observado en los 3 contextos de metilación entre plantas Col-0 mock y tras 72 h.p.i con *P.s.* DC3000.

Teniendo en cuenta que en *Arabidopsis* se activa un mecanismo de desmetilación como parte integral de la respuesta inmune frente a la bacteria, tal y como observamos en las plantas Col-0 y en la línea transgénica para los diferentes contextos de metilación (Fig. S7 y Fig. S8), posiblemente la sobreexpresión de *METS1* esté ejerciendo un efecto de “presión de la metilación” que podría artefactuar el proceso de desmetilación necesario, y consecuentemente alterar la respuesta inmune. Esto explicaría el fenotipo de susceptibilidad incrementada a *P.s.* DC3000 observada en la línea sobreexpresora y la fuerte inhibición de la activación de la expresión de genes de defensa. Estos resultados refuerzan el conocimiento existente sobre la relación entre la regulación epigenética por metilación de DNA y el control de la respuesta inmune, y además ponen de manifiesto que la modulación del metabolismo dependiente de folatos podría actuar como eje regulador en el control epigenético de la respuesta inmune.



**Figura S8. La infección por *P.s.* DC3000 produce una reducción en la metilación de DNA en plantas *35S::METS1*.** Diagrama de la tasa media de metilación a lo largo



de los cromosomas (A) y del nivel de metilación promedio para todos los TEs y PCGs (B), observado en los 3 contextos de metilación entre plantas de la línea *35S::METS1#1* en condiciones basales e inductivas tras 72 h.p.i con *P.s.* DC3000.

## 4. Discusión

Los abordajes de genética directa han sido ampliamente utilizados para descubrir la base genética de las respuestas de la planta a la presencia de patógenos y han demostrado su capacidad para descifrar múltiples niveles de complejidad en los mecanismos que controlan la inmunidad. Mediante el uso de una estrategia de genética química en busca de moléculas agonistas de la inmunidad vegetal, en este trabajo hemos identificado diferentes sulfonamidas que promueven la activación de un mecanismo de priming inmunológico. Las sulfonamidas inhiben competitivamente la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS), una enzima esencial de la ruta de folatos, por lo que bloquean la acumulación del ácido dihidropteroico, el cual es precursor del tetrahidrofolato (THF) (Prabhu *et al.*, 1997). Por lo tanto, la inhibición de la ruta de THF mediante sulfonamidas señala un mecanismo molecular que activa selectivamente la transcripción del gen *Ep5C::GUS* (previamente descrito como sensible a metilación y relacionado con defensa), promueve la deposición de MPK3 y MPK6 fosforiladas, y se acompaña también de la deposición del polímero calosa en la pared celular, reflejando pues una posible activación de un mecanismo de priming (Mauch-Mani *et al.*, 2017). Esta activación conferida por la aplicación de sulfonamidas no concurriría con la activación de genes de respuesta a SA (*e.g.*, *P69C::GUS* o *PR1*). De acuerdo a Beckers *et al.* y Conrath *et al.* (Beckers *et al.*, 2009; Conrath *et al.*, 2015), el pre-establecimiento del priming en la célula, y por consiguiente de la resistencia inducida (IR), es un fenómeno evolutivo donde las células llegan a ser sensibilizadas para responder más rápido y más fuerte a un estímulo patogénico. De forma esperable, revelamos que el tratamiento con sulfonamidas sensibilizó a las plantas para una mayor acumulación del marcador PR1 relacionado con defensa tras una aplicación de SA o tras una infección por *P.s.* DC3000. Esto refuerza así la idea de que el bloqueo de THF inicia una señalización para la activación de priming de la inmunidad. Por lo tanto, el presente descubrimiento identifica un punto a través del cual el

metabolismo del THF puede participar en el control de la respuesta inmune. Puesto que el genoma de *Arabidopsis* contiene dos isoformas de DHPS (Storozhenko *et al.*, 2007b), esto puede explicar porqué los mutantes *dhps* no han sido descubiertos previamente en los múltiples rastreos realizados para la búsqueda de mutantes que mostraran un fenotipo de resistencia alterada frente a patógenos ya que es posible que cualquiera de las isoformas es suficiente para mantener el flujo metabólico a través de la ruta biosintética de THF. Este evento fue previamente reconocido al entender la interacción entre la sacarosa y el folato para modular la señalización de auxinas en *Arabidopsis* (Stokes *et al.*, 2013). De esta forma, el tratamiento con sulfonamidas promovería un fenotipo análogo al producido por una doble mutación y que en nuestro caso ha permitido poner de manifiesto el papel de la ruta de THF en la modulación de la inmunidad de la planta. La inhibición de la ruta de THF mediada por sulfonamidas confirió un incremento de la resistencia a *P.s.* DC3000, tal como se demostró para plantas tratadas con SDZ. Del mismo modo, la inhibición de la ruta de THF a un distinto nivel, pero usando en este caso el metotrexato, un análogo del compuesto dihidrofolato, que inhibe por tanto la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) implicada en la síntesis de *nov*o de THF, confirió también un incremento de la resistencia a *P.s.* DC3000. Así, la relación entre la ruta de THF y la inmunidad de plantas queda unida con los presentes descubrimientos. Previos estudios han identificado de manera similar que las sulfonamidas ejercen un efecto positivo sobre la resistencia a enfermedad y en la muerte celular inducida por patógeno (Noutoshi *et al.*, 2012a; Schreiber *et al.*, 2008). Sin embargo, el mecanismo molecular exacto de cómo las sulfonamidas promovieron estos fenotipos no fue esclarecido en estos trabajos. Nuestros resultados indican que el fenotipo de resistencia a enfermedad conferido por la inhibición de la ruta de THF parece operar por debajo y/o de manera independiente de la ruta de SA. Esta conclusión se obtuvo tras observar que el efecto de SDZ promoviendo la inducción de resistencia permanece aún efectivo cuando el compuesto es ensayado en los mutantes *npr1* y *sid2*, los cuales son defectuosos en la percepción y biosíntesis de SA, respectivamente (Cao *et al.*, 1997; Wildermuth *et al.*, 2001). En ambos mutantes, la característica susceptibilidad aumentada frente a la infección por *P.s.* DC3000 llega a ser notablemente suprimida bajo un tratamiento con SDZ. Además, nuestros resultados también indican la existencia de un efecto represor del THF sobre

la respuesta inmune, ya que la aplicación farmacológica de FA sobre plantas Col-0 provocó un incremento de la susceptibilidad frente a *P.s.* DC3000. Esta susceptibilidad no acarrea alteraciones en la síntesis ni en la percepción de SA. Así, una implementación de la ruta de THF favorecería una presión negativa sobre la resistencia, generando por tanto incrementos en la susceptibilidad. Alternativamente, cuando ésta ruta es defectuosa o es reprimida, entonces dicha presión negativa sobre la resistencia desaparecía y emergería una respuesta inmune más efectiva. Consistente con este escenario, la expresión de los genes *DHPS* y *ADCS*, marcadores de la ruta de THF, fue parcialmente reprimida durante el curso de una infección por *P.s.* DC3000. Esto favorecería la idea de que la inhibición de la ruta de THF es una parte inherente de la reprogramación transcripcional que acompaña a la activación de la respuesta inmune. Así, la ruta de THF podría pues representar un nivel adicional de complejidad en los mecanismos de regulación de la respuesta inmune de la planta.

El incremento en la susceptibilidad a *P.s.* DC3000 promovida por FA evoca al fenotipo previamente descrito en los mutantes *scs9* defectuosos en una metiltransferasa de tRNA (ver Capítulo 1). Los mutantes *scs9* muestran una inmunidad severamente comprometida frente a *P.s.* DC3000 sin verse afectada la ruta de señalización de SA. Como hecho interesante, observamos en el presente trabajo que el fenotipo de susceptibilidad de *scs9* fue revertido tras el tratamiento con SDZ, probablemente indicando que la susceptibilidad aumentada de los mutantes *scs9* está bajo el control de la ruta de THF. La similitud entre la mayor susceptibilidad a *P.s.* DC3000 promovida por FA y la de los mutantes *scs9*, motivaron el desarrollo de una estrategia de proteómica comparativa en busca de proteínas que se acumularan diferencialmente en las dos líneas mutantes alélicas disponibles, *scs9-1* y *scs9-2*, en comparación con Col-0 y tras una inoculación con *P.s.* DC3000. Esta aproximación permitió identificar a la proteína METS1 (metionina sintasa; 5-metiltetrahydropteroylglutamato homocisteína metiltransferasa). METS1 es la enzima encargada de la síntesis de metionina (Met) en el metabolismo C1 dependiente de THF (Fig. 3A), en el cual unidades de metilo transportadas por el cofactor folato (el derivado de 5-metil-THF) son utilizadas para la síntesis de Met catalizada por METS1 (Fig. 3A). Esta reserva de Met es directamente convertida a S-adenosilmetionina (SAM), el cual es el donador

universal del grupo metilo utilizado para la mayoría de metiltransferasas que metilan DNA, RNA, histonas y otras proteínas (Loenen, 2006). Por lo tanto, hipotetizamos que la sobreacumulación inducida de METS1 en los mutantes *scs9* tras ser infectados por *P.s.* DC3000 podría ejercer una presión negativa sobre la resistencia al promover una alteración metabólica determinada basada en la síntesis de Met y cuyo resultado sería un incremento en la susceptibilidad. La observación de que la sola aplicación de Met fuera capaz de complementar la activación transcripcional de *Ep5C::GUS* mediada por SDZ y la deposición de MPK activas, reflejando así el mismo efecto que la aplicación de FA, favorece la hipótesis de que la disponibilidad de Met es un paso crítico dependiente de la ruta de THF que media en el proceso de promoción de la susceptibilidad a *P.s.* DC3000. Además, el hecho de que la susceptibilidad a *P.s.* DC3000 se viera incrementada en las líneas que sobreexpresan *METS1*, confiere una relevancia a METS1 como un factor de susceptibilidad. Además, la observación de que la activación de respuestas de defensas se vio comprometida en las líneas *35S::METS1* refuerza la idea de que el metabolismo C1 dependiente de la ruta de THF, y más en particular la enzima METS1, participa de forma activa en un mecanismo que regula negativamente la inmunidad de la planta y, consecuentemente, promueve la susceptibilidad a la infección. Por otro lado, es interesante resaltar aquí el trabajo de Zhang *et al.*, en el que con un rastreo de genética química buscando moléculas agonistas o antagonistas de la regulación epigenética, identificó que la molécula sulfametazina (SMZ) es un supresor químico del silenciamiento génico por epigenética en *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2012). De hecho, las plantas tratadas con SMZ exhibieron niveles reducidos de SAM, de metilación de DNA y de H3K9me2, y con ello la des-represión del silenciamiento génico, indicando que SMZ ejerce un control negativo sobre la regulación epigenética y el silenciamiento génico por medio de la deficiencia de las unidades de metilos dependientes del aporte de THF. De la misma forma, la liberación del silenciamiento epigenético de genes fue similarmente observado en plantas tratadas con metotrexato (Loizeau *et al.*, 2008). Además la inhibición de SAHH1 (S-adenosilhomocisteína hidrolasa), una enzima del metabolismo C1 responsable de la hidrólisis de SAH para recircularización del precursor de metionina en el ciclo de SAM, libera de forma similar el silenciamiento epigenético al promover la reducción del nivel de metilación de DNA y de H3K9me2 (Rocha *et al.*, 2005). Recientemente, Zhou *et al.* (Zhou

*et al.*, 2013), en la búsqueda de supresores de silenciamiento génico, identificó a *FPGS1* (Folilpoliglutamato sintasa), que media la poliglutamilación de folatos para su utilización por las enzimas dependientes de estos cofactores. También, Groth *et al.* (Groth *et al.*, 2016) identificó el mutante hipomórfico *mthfd1-1*, defectuoso en la enzima bifuncional MTHFD1 (methylenetetrahydrofolate deshydrogenase/ methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase) requerida para la interconversión de derivados de THF en el metabolismo C1 que convergen para su uso en la síntesis de Met via METS1. Este mutante muestra una hipometilación en todo el genoma, la pérdida de la dimetilación de H3K9 y la des-represión de elementos transponibles. Todas estas observaciones resaltan así la conexión de los mecanismos de control epigenético con el metabolismo C1/THF implicado en la síntesis de SAM. Además, en trabajos previos se presentó que el funcionamiento normal de la ruta epigenética RdDM es requerido para la susceptibilidad a enfermedad. Cuando ésta es defectiva, como se observó en diferentes mutantes defectuosos para esta ruta, se instala un mecanismo de priming que conlleva a un aumento de la resistencia (López *et al.*, 2011). Ésta, y otras observaciones en cuanto a la modulación de las marcas epigenéticas como mecanismo de resistencia transgeneracional (Luna *et al.*, 2012), ponen de manifiesto la importancia del control epigenético como un nivel adicional de complejidad en la regulación de la inmunidad vegetal. Todos estos descubrimientos permiten interconectar el mecanismo C1 dependiente de THF con los mecanismos epigenéticos y con ello con el control de la respuesta inmune.

A la vista de estas observaciones, podemos hipotetizar que la sobreacumulación de METS1, y con ello la posterior síntesis de Met y SAM, podría resultar en un aumento general de la metilación de DNA que podría reforzar el estado normal de silenciamiento epigenético de la planta a una escala global. Para estudiar el estado de metilación tras la sobreexpresión de *METS1*, y la implicación de ello en la respuesta inmune, desarrollamos un análisis comparativo de la metilación de DNA por secuenciación por bisulfito de todo el genoma de plantas Col-0 y *35S::METS1#1*, tanto en condiciones basal como tras la infección por *P.s.* DC3000. Los resultados revelaron que la media de la tasa de metilación global de DNA se vio aumentada en la línea transgénica respecto a Col-0. Además, la desmetilación producida como

consecuencia de la infección bacteriana no impidió que la línea sobreexpresora siguiera manteniendo un nivel de metilación mayor y siempre por encima de Col-0 tras la infección. Con esto, proponemos que la hipermetilación impuesta por la sobreexpresión de *METS1* podría antagonizar la liberación necesaria del estado de silenciamiento por medio de la desmetilación de DNA bajo demanda (por ejemplo, tras un ataque patogénico). Ya que la desmetilación del DNA por glicosidasas es un requisito para el establecimiento de las marcas de activación de histonas y con ello para la reprogramación transcripcional de la respuesta inmune, el estado de hipermetilación observado podría indicar que una presión de metilación impuesta por la expresión de *METS1* impediría la correcta desmetilación de DNA necesaria para activar la respuesta inmune. Esto se correspondería con la deficiente resistencia observada en dichas plantas transgénicas o en los mutantes *scs9*.

Así, la regulación del estado de metilación de DNA controlado por el flujo metabólico del metabolismo C1 dependiente de folatos parece ser esencial para modular una respuesta inmune efectiva, lo que demuestra la importancia de esta ruta metabólica para una adaptación flexible de las plantas a los cambios producidos en el ambiente, y en particular al ataque patogénico. La identificación de las regiones específicas del genoma especialmente sensibles a este control durante la respuesta inmune es nuestro reto para el futuro.

## 5. Materiales y Métodos

A continuación se describe la metodología y las condiciones aplicadas en los diferentes ensayos realizados específicamente en la parte experimental del presente Capítulo. El resto de técnicas experimentales desarrolladas, que se utilizaron de manera general en la presente Tesis Doctoral y que no están descritas en este apartado, se encuentran en el apartado general de Material y Métodos de esta memoria.

## 5.1. Rastreo de genética química directa

Tres semillas de *Arabidopsis* por pocillo, previamente esterilizadas y estratificadas en H<sub>2</sub>O MilliQ, fueron sembradas en placas de 96 pocillos con 100µL de medio MS sólido con cada uno de los 3650 compuestos de la colección LATCA a una concentración de 25µM. El control utilizado fue el disolvente de los compuestos, DMSO, a 1X. Las plántulas fueron crecidas en una cámara de crecimiento durante 7 días para la posterior detección de la actividad GUS por tinción histoquímica (ver Material y Métodos general). Los ensayos de comprobación del efecto de los potenciales candidatos seleccionados se basaron en la exposición de las plántulas a las mismas condiciones del rastreo y con 3 diluciones seriadas 1:10 de los compuestos. Los candidatos seleccionados se ensayaron a 25µM con una población de 50 plántulas en placas con 25mL de medio MS sólido. Los ensayos de dosis-efectividad de los compuestos consistieron en la aplicación de los compuestos seleccionados a 25 y 50µM en medio MS sólido, evaluación del mejor estadio de la plántula para aplicar los compuestos y tiempo de exposición suficiente para ejercer su efecto.

## 5.2. Condiciones de aplicación de los diferentes compuestos

Los ensayos *in vitro* de plántulas crecidas en presencia de los derivados de sulfonamidas fueron realizados en placas de 6 pocillos con 7mL de medio MS líquido suplementado con cada uno de los compuestos a 25µM, utilizando DMSO 1X como control. 10-15 plántulas de 7 días, crecidas previamente en placas de MS sólido, fueron transferidas a cada pocillo y crecidas en la cámara de crecimiento durante 7 días en agitación orbital suave (90 rpm). Las muestras fueron recogidas para su análisis molecular y/o detección de la actividad GUS. Los ensayos de complementación con FA y Met se basaron en la aplicación conjunta con las sulfonamidas durante los 7 días de crecimiento. Para los ensayos de impregnación con FA 500µM o MTX 100µM, las plantas de 4 semanas crecidas en sustrato compacto fueron tratadas 3 días previos al ensayo de inoculación. El tratamiento consistió en la inmersión de la planta

entera en 250mL de solución de cada compuesto durante 20seg. en los 3 días de tratamiento, sin aportación extra de solución de riego. KOH a 0.08mM fue utilizado como disolvente de FA y como control del experimento. Para los ensayos de cultivos hidropónicos, las sulfonamidas y FA fueron aplicados a 100 $\mu$ M desde 3 días previos a la inoculación hasta la finalización del experimento. Las semillas fueron sembradas en medio agargel al 0.6%, disuelto en una solución de riego nutritiva, y dispuesto en la pieza de siembra del sistema Araponics utilizado para los cultivos hidropónicos. Las plantas crecieron en este sistema durante 4 semanas con cambios semanales de la solución de riego nutritiva, permaneciendo en una cámara Percival cuyas condiciones establecidas fueron 10h luz/14h oscuridad, una temperatura de 21-22°C/18-19°C y una intensidad lumínica de 10000 luxes.

### 5.3. Estudio de la actividad antibiótica de SDZ sobre el crecimiento de *P.s.* DC3000

Cultivos de *P.s.* DC3000 en medio LB líquido fueron ajustados a una concentración 10<sup>3</sup> y 10<sup>2</sup> células/mL (en base a la OD<sub>600</sub> medida). 100 $\mu$ L del cultivo a cada concentración fueron repartidos en placas de LB sólido (25mL) en ausencia y presencia de SDZ a 100 $\mu$ M, y el número de u.f.c fue cuantificado en cada placa. El ensayo, repetido por triplicado, se basó en lo descrito anteriormente (Pato y Brown, 1963).

### 5.4. Cuantificación del nivel de SA

180mg de material congelado homogeneizado procedente de hojas tratadas de plantas de 4 semanas fueron liofilizados. Previo a la extracción de las hormonas, se añadieron 100ng de [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]SA como estándar interno. El protocolo de extracción y de cuantificación por HPLC fue el descrito previamente en (Camañes *et al.*, 2012), realizado por Víctor Flors de la Universitat Jaume I. Los niveles fueron referenciados frente al peso seco de la muestra y se cuantificaron 3 réplicas biológicas de cada condición.



## 5.5. Análisis proteómico

Plantas de 5 semanas fueron inoculadas por spray con *P.s.* DC3000, y las hojas enteras fueron recogidas para su homogeneización a 3 d.p.i. Extractos ácidos de proteínas de cada condición fueron realizados a partir de 1g de tejido homogeneizado con 1mL del tampón citrato-fosfato compuesto por ácido cítrico 84.4mM y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 31.2mM. La cantidad de proteína total fue cuantificada con el reactivo Bradford usando BSA como estándar. 100µg de proteína fueron precipitados con 1 volumen de TCA 20% durante 2-3h a 4°C y posteriores lavados con acetona. Las proteínas fueron disueltas en tampón de lisis (7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS). 50µg de proteína fueron utilizados para el ensayo 2D DIGE realizado por el servicio de Proteómica del IBMCP. Se realizó posteriormente la selección y tripsinización de los puntos proteicos con una diferencia de acumulación de 2.5 veces respecto al respectivo control como se describe en (Lisón *et al.*, 2013). Los puntos proteicos fueron analizados e identificados por el análisis proteómico MS-MALDI-TOF-TOF y posterior LC-MS/MS, llevados a cabo por el laboratorio de Proteómica SCSIE de la Universidad de Valencia, como miembro de la Plataforma de Red Proteómica del centro ISCIII Carlos III ([scsie.uv.es/](http://scsie.uv.es/)). Las proteínas fueron identificadas con confianza mayor o igual al 95%, utilizando la búsqueda en base de datos en Swiss-Prot.

## 5.6. Construcción génica *35S::METS1-YFP*

Para amplificar el cDNA de *METS1* (At5g17920, secuencia CDS) se utilizó el kit de PCR de alta fidelidad Expand (Roche) con 1µL de cDNA y utilizando los oligos específicos BP-FW y BP-Rv fusionados a los adaptadores Gateway. Utilizando la tecnología Gateway (Life Technologies), se recombinó con el vector pDONR207 utilizando el kit BP ClonaseMixII (Invitrogen). La secuenciación de clones individuales confirmó que no había errores en el cDNA de *METS1*, así como su fusión en el mismo marco de lectura con YFP. Posteriormente la construcción se recombinó con el vector de destino pEarleyGate101 con YFP en posición C-terminal utilizando el kit LR ClonaseMixII (Invitrogen). La lista de oligos utilizados para el clonaje se

encuentra en el subapartado 5.9. Se transformaron cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  para la clonación de la construcción, y posteriormente se realizó la transformación de cepas de *Agrobacterium* C58. La construcción de PIP1 (proteína integral de membrana plasmática), fusionada a mCherry, utilizada fue derivada a partir de (Dobón *et al.*, 2015).

## 5.7. Análisis de letalidad embrionaria

Seis silicuas jóvenes de plantas de las dos líneas de inserción de T-DNA de *METS1* fueron recogidas para analizar la letalidad embrionaria en la lupa Leica (MZ16F), comparándolas con Col-0. Por incisión en el extremo de cada silicua, se retiró una de las valvas dejando el septum con las semillas intacto. El número de semillas totales y aquellas que habían abortado fueron cuantificados en cada silicua.

## 5.8. Análisis del nivel de metilación

1 $\mu$ g de DNA extraído (mediante tampón CTAB) a partir de 100mg de hojas homogeneizadas, fue resuspendido en 50 $\mu$ L de tampón TE (Tris-HCl 10mM pH 8 y EDTA 1mM). El análisis de la metilación fue realizado con 80ng de DNA genómico por el servicio de Epigenética Methyl MaxiSeq de la empresa Zymo Research (ZR), basado en la lectura de las secuencias obtenidas por la plataforma Illumina HiSeq procedentes de colecciones de fragmentos de DNA tratados con bisulfito. El análisis de cada lectura, con resolución de detección de cambios en un único nucleótido, fue realizado por el software propio de ZR y usando Bismark como software de alineamiento. El nivel de metilación de cada citosina analizada para cada uno de los contextos en todo el genoma fue estimado como el número de lecturas que daban C (número de C metiladas), dividido por el número total de lecturas que daban C o T (número total de C cubiertas en ese sitio). El test de Fisher o test t de Student fue utilizado para cada citosina con una cobertura mínima de 5 lecturas de secuencias alineadas para identificar diferencias de metilación estadísticamente significativas. La tasa de metilación total de DNA en cada uno de los contextos fue calculada

como el promedio del nivel de metilación de todas las citosinas correspondientes a ese contexto, en cada una de las muestras analizadas. La tasa de metilación de DNA a lo largo de los cromosomas de Arabidopsis fue graficada como el promedio del nivel de metilación de las citosinas de cada contexto encontradas en las diferentes regiones en las que fue dividido todo el genoma (100 regiones). La tasa de metilación de DNA en los contextos de PCG y TE fue graficada como el promedio del nivel de metilación de las citosinas de cada contexto encontradas en cada una de las 200 regiones en las que fueron divididos cada PCG y TE. El promedio del nivel de metilación para todos los PCGs y TEs fue graficado, mostrando la región de 2000pb anterior y posterior. El porcentaje de citosinas no cubiertas en todo el genoma (con una cobertura de secuenciación menor de 5X) fue en torno al 17% en el contexto CG, 20% en el contexto CHG y 7% en el contexto CHH.

## 5.9. Líneas de inserción de T-DNA y oligos utilizados

**Tabla 1.** Líneas de inserción de T-DNA para el mutante *mets1-1*. Secuencias de los oligos utilizados en los diferentes ensayos realizados en el Capítulo 2.

Destino	Nombre del oligo	Secuencia 5'-3'
Clonaje <i>METS1</i>	BP FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATAT GGCTTCACACATTGTTG
	BP RV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGACTT GGCACTGGCGAGCTGGG
Genotipado <i>mets1-1</i>	SAIL 136_C12 LP	GAAACTCCAGGCCTTTACTGG
	SAIL 136_C12 BP	AAAATGTGTGACGCATAAGCC
	SAIL 655_B04 LP	TGCTGTTCCACCTAGGTATGG
	SAIL 655_B04 BP	TTGACCAAATCAAGGGTCTTG
	T-DNA SAIL (LB1)	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTC C
qRT PR1	PR1 FW	AAGGGTTCACAACCAGGCAC
	PR1 RV	CACTGCATGGGACCTACGC
qRT DHPS	DHPS FW	TGGGAGATATTTGTGGGCGACCTG

	DHPS RV	AGAATGCCTGCAGTGACAGAAGC
qRT ADCS	ADCS FW	GTTATATCGCCTGGACCTGGTTTCG
	ADCS RV	ATGGACATAACCTAGTGCCTGGTG
qRT ICS1	ICS1 FW	GCTTGCAAGAGTGCAACATC
	ICS1 RV	AAGCCTTGCTTCTTCTGCTG
qRT METS1	METS1 FW	GGATCCTTCCCACAGACTGTAGA
	METS RV	GTCCTCCTCTGAGACCTTTTTGG
qRT WRKY53	WRKY53 FW	CTCCATCGGCAAACCTTTCAC
	WRKY53 RV	CCGAGCGTACAACCTTATTCG
qRT ACT2	ACT2 FW	TCTTCGGCTCTTTCTTTCCAAGC
	ACT2 RV	ACCATTGTCACACACGATTGGTTG
qRT SAND	SAND FW	AACTCTATGCAGCATTTGATCCACT
	SAND RV	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC



# **DISCUSIÓN GENERAL**



Con el trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral se ha pretendido profundizar en el conocimiento de los mecanismos que controlan la respuesta inmune de las plantas frente a plagas y enfermedades. Esto, a través de la implicación del metabolismo primario de la planta, ofreciendo así un nivel adicional de control de los procesos moleculares ya conocidos y sobre los que se asienta la regulación de los mecanismos de defensa en general. Para este fin, se han utilizado dos tipos de estrategias encaminadas a identificar nuevos reguladores de la respuesta inmune en plantas.

En primer lugar, con los resultados mostrados en el Capítulo 1, mediante una aproximación de genética clásica hemos puesto de manifiesto la implicación e importancia de las modificaciones post-transcripcionales de los tRNAs en el establecimiento de la respuesta inmune de *Arabidopsis* frente a *P.s.* DC3000. Esta nueva aportación ha sido determinada a través de la identificación del mutante *scs9* y su consiguiente caracterización a nivel fenotípico, genético y molecular. La mutación *scs9* fue identificada a partir de un rastreo genético en busca de supresores de la respuesta inmune incrementada presente en el mutante *csb3* y que previamente se había identificado y caracterizado en el laboratorio (Gil *et al.*, 2005). Como resultado de la observación del elevado incremento de la susceptibilidad frente a *P.s.* DC3000 presente en el mutante *scs9*, se puso de manifiesto el papel clave que el locus *SCS9* tiene en la regulación de la respuesta inmune. Para este fenotipo de susceptibilidad o inmunidad suprimida, se anticiparía que la lesión en *scs9* produciría defectos en la ruta de señalización inmune mediada por la hormona SA de la misma manera que lo haría el mutante *npr1* (Cao *et al.*, 1997). Sin embargo, se observó que este mutante opera de manera independiente a dicha ruta de señalización ya que *scs9* no tiene comprometida la inmunidad innata ni está afectado en la síntesis ni en la percepción del SA. Esta clara distinción del fenotipo molecular del mutante *scs9*, respecto a otros mutantes afectados en la ruta de señalización por SA, y por su relevancia en la respuesta inmune, nos llevó a determinar la localización cromosómica de dicha mutación, asociándola al locus At5g01230. A continuación, se determinó, mediante la búsqueda de homologías de secuencias y de dominios conservados, que la proteína SCS9 es una 2'-*O*-ribosa metiltransferasa de tRNA, y homóloga, tanto estructural como funcionalmente, a la metiltransferasa de tRNA TRM7 de levadura (Pintard *et al.*, 2002). De hecho, ambas enzimas producen el mismo

tipo de modificación en los nucleósidos 32 y 34 (*i.e.*, del tipo Cm, Gm y Um) en determinados tRNAs; siendo éstas posiciones correspondientes a la región anticodón del tRNA y más en concreto en la posición de balanceo. Como resultado de la pérdida de función de esta enzima, el mutante *scs9* presenta drásticas disminuciones en el contenido en Cm y en menor medida también en Gm y Um en su población de tRNAs. Es más, en plantas Col-0, estos mismos nucleósidos modificados por la acción de SCS9 aumentaron en su contenido tras una infección con *P.s.* DC3000, indicando que dichas modificaciones forman parte del mecanismo de adaptación o resistencia de la planta a dicha infección. De esta forma, con los resultados presentados en este trabajo se da a conocer una de las enzimas encargadas de llevar a cabo modificaciones mediadas por metilación de tRNA, y el sorprendente aunque enigmático papel funcional que dichas modificaciones de tRNA ejercen para una correcta activación de la respuesta inmune.

Por tanto, saber de qué manera dichas modificaciones de tRNA regulan la respuesta inmune, y el modo en el que la función de SCS9 pudiera estar regulada en el contexto de inmunidad, son hechos que aún deben ser estudiados. Asimismo, identificar el compendio de proteínas cuya síntesis pudiera verse afectada por la ausencia de una correcta modificación de tRNAs mediada por SCS9, y entender cómo dichas proteínas ejercen un papel clave en el establecimiento de la respuesta inmune, son objetivos realistas y próximos a llevar a cabo. Ello, sin duda, aportará información crucial sobre el nuevo modo de regulación de la respuesta inmune y que se ha puesto de manifiesto a través de la identificación de SCS9. En cuanto a las proteínas cuya síntesis pueda verse afectada por el fallo en las modificaciones de los tRNAs, es muy probable que el efecto de esta alteración no se produzca a nivel general de la traducción de todas las proteínas, sino que dependa de cómo de enriquecida está la secuencia de una proteína respecto a un aminoácido concreto. Primero porque si la consecuencia de la mutación se tratara de un defecto generalizado en la traducción de proteínas, la planta habría mostrado un fenotipo drásticamente alterado en cuanto al desarrollo o su ciclo de vida (revisado en (El Yacoubi *et al.*, 2012)). Puesto que no se observó ese efecto negativo en los mutantes *scs9*, nos inclinamos por pensar que la pérdida funcional de la enzima SCS9 debe estar afectando solamente a un grupo discreto de proteínas. Además, se sabe que los tRNAs diana de la



enzima homóloga TRM7 de levadura son los correspondientes a los aminoácidos de leucina, triptófano y fenilalanina (Pintard *et al.*, 2002). Por lo tanto, pensamos que las proteínas específicamente afectadas por la mutación de *SCS9* serán aquellas cuya síntesis dependa de forma crítica de estos aminoácidos.

La relevancia funcional de *SCS9* en los mecanismos de inmunidad de la planta se asemeja en cierta medida al fenotipo observado en animales y humanos, donde mutaciones producidas en múltiples proteínas encargadas de las modificaciones y procesamiento de los tRNAs han sido identificadas en pacientes con diversas patologías neuronales y también en procesos tumorales. Sin embargo, la evidencia molecular causante para esta asociación con el desarrollo de enfermedades es desconocida en la mayoría de los casos (Blanco *et al.*, 2014; Kirchner y Ignatova, 2015; Rodríguez *et al.*, 2007). Esto pone de manifiesto la importancia de mantener un correcto funcionamiento de las enzimas encargadas de las modificaciones post-transcripcionales de los tRNAs para un eficiente sistema inmune y evitar enfermedades.

Con el objetivo de proseguir en nuestro afán de identificar nuevos elementos reguladores de la respuesta inmune, en el Capítulo 2 desarrollamos la puesta a punto de un abordaje de genética química directa con la intención de identificar moléculas agonistas de la respuesta inmune e identificar nuevas dianas en la planta necesarias para la activación de mecanismos de resistencia a patógenos. Con los resultados aquí mostrados, se demuestra que la ruta metabólica de los folatos interfiere en el sistema de inmunidad de *Arabidopsis* frente a *P.s.* DC3000, presumiblemente a través de un mecanismo de regulación epigenética, y en el que la enzima metionina sintasa (METS) adquiere especial relevancia. La intersección del metabolismo de folatos con la inmunidad se ha determinado a través de la observación de que diferentes derivados de sulfonamidas, identificados en nuestra aproximación de genética química, promueven un mecanismo que confiere un estado de mayor sensibilidad o “priming” en la planta para responder antes y de manera más efectiva a la presencia de un patógeno; ello en consonancia con lo que se puede entender como la activación de un mecanismo de resistencia inducida (IR) (Martínez-Medina *et al.*, 2016; Mauch-Mani *et al.*, 2017). Así, las diferentes sulfonamidas identificadas promueven un aumento en la deposición de MPK activas y de calosa, así como una más rápida y/o más

intensa expresión y acumulación de proteínas de defensa dependientes de SA. El descubrimiento de las sulfonamidas como inductoras de priming y la verificación de que dichas moléculas promueven por tanto un incremento de la resistencia a *P.s.* DC3000, apuntalan el éxito de nuestra aproximación de genética química.

Aunque previamente había sido observada la implicación de ciertas sulfonamidas en la activación de mecanismos moleculares asociados a la inmunidad, en ningún caso pudo ser establecido el mecanismo de acción de dichas moléculas (Noutoshi *et al.*, 2012a; Schreiber *et al.*, 2008). En nuestra búsqueda sobre el mecanismo que subyace a la activación de la resistencia mediada por priming tras la aplicación de sulfonamidas, y más en particular por sulfadiazina (SDZ), observamos que este efecto es independiente de la síntesis y de la percepción de SA. Ello, máxime, cuando la susceptibilidad incrementada a *P.s.* DC3000 que muestran los mutantes afectados en la síntesis de SA y en su señalización, tales como *sid2* y *npr1*, respectivamente, fue revertida tras la aplicación previa de SDZ. Sin embargo, la resistencia inducida por SDZ, así como la activación del mecanismo de priming, fueron revertidas por la aplicación de ácido fólico, ya que las sulfonamidas son compuestos inhibidores competitivos de la enzima mitocondrial DHPS, la cual es clave para la síntesis de los folatos en plantas (Prabhu *et al.*, 1997). Esto justifica nuestra conclusión de que la resistencia inducida por SDZ es debida a una deficiencia en la síntesis de folatos. La observación adicional de que otro inhibidor de la misma ruta, tal y como hace el antitumoral metotrexato (Loizeau *et al.*, 2008), confirió la misma resistencia a *P.s.* DC3000 que la conseguida por SDZ, nos hizo pensar que la ruta de síntesis de folatos podría participar como eje modulador, y con efecto represor, sobre la inducción de la respuesta inmune mediada por patógeno. De hecho, con la sola aplicación de ácido fólico a la planta, pudimos demostrar que la implementación de esta ruta promueve una mayor susceptibilidad frente a *P.s.* DC3000. Además, la relación entre la regulación de esta ruta y el sistema inmune de la planta quedó patente tras observar una reducción en la expresión de genes de síntesis de la ruta de folatos tras un proceso de infección bacteriana. Sin embargo, el mecanismo por el cual los folatos interfieren en la activación de la respuesta inmune no podía ser explicado tampoco por una alteración en la síntesis y percepción de SA, ya que este aspecto no se veía resentido tras el

tratamiento. Esto ponía de manifiesto la posible existencia de un mecanismo de regulación alternativo de la respuesta inmune a través de los THF o sus derivados metabólicos.

La similitud en el incremento de la susceptibilidad a *P.s.* DC3000 mediado por folatos con el descrito igualmente para los mutantes *scs9* en el capítulo 1, y ambos independientes de la ruta de SA, nos animó a realizar estudios comparativos a nivel proteómico entre plantas mutantes *scs9* y plantas Col-0, con el fin de descifrar un posible nexo común entre ambos mecanismos implicados en la respuesta inmune. Este análisis proteómico permitiría identificar proteínas cuya acumulación pudiera estar alterada diferencialmente en condiciones inductivas y que pudieran revelar aspectos claves sobre esta nueva forma de regular la respuesta inmune. Sorprendentemente y de manera contraintuitiva, se identificaron en los mutantes *scs9* un número discreto de proteínas que se acumulaban más que en las plantas Col-0 como consecuencia de la infección con *P.s.* DC3000. En particular, se identificaron aumentos notables en la acumulación de diferentes isoformas de la proteína 5-metiltetrahydropterol homocisteína metiltransferasa (METS1), una enzima requerida en el metabolismo C1 dependiente de folatos y encargada de la síntesis de metionina (Ferrer *et al.*, 2004); siendo éste un aminoácido esencial y que es además convertido en SAM, el donador universal de grupos metilos en las reacciones de metilación de diferentes biomoléculas, y en particular para la metilación de DNA en los mecanismos de silenciamiento génico mediante control epigenético (Roje, 2006). Este hallazgo vincularía, a través de METS1, al metabolismo de los THF/C1 con el control de la inmunidad mediado por SCS9. Así, se observó que la pérdida de resistencia frente a *P.s.* DC3000 observada en los mutantes *scs9* fue restablecida tras la aplicación previa de SDZ. Además, el producto de la enzima METS1, es decir metionina, aplicado farmacológicamente, fue capaz de complementar el efecto activador de SDZ. Todo ello sugeriría entonces que la adecuada biosíntesis de metionina mediada por METS1, a través del metabolismo dependiente de folatos, podría representar un punto de regulación esencial para el control de la respuesta inmune. Así, pudimos corroborar, mediante la generación de líneas transgénicas de Arabidopsis, que la sobreexpresión de la enzima METS1 es capaz de conferir una susceptibilidad incrementada frente a *P.s.* DC3000, de una forma similar a las

plantas mutantes *scs9*. Y además, que dicho fenotipo de susceptibilidad incrementada está acompañado de una represión de la expresión de genes de defensa dependientes del SA.

A pesar de que existen otras dos isoformas funcionales para esta enzima, una citosólica y otra cloroplástica (Ravanel *et al.*, 2004), nuestros resultados muestran que la acumulación de *METS1* es suficiente para suprimir una adecuada respuesta defensiva en la planta, y que por tanto es la síntesis de metionina por recirculación en el ciclo SAM, y no la síntesis de *novo* en el cloroplasto, la que estaría relacionada con la regulación del sistema inmune de *Arabidopsis*. Esto se corrobora con el hecho de que la regulación de los niveles de metionina en la planta viene determinada en su mayor parte por una eficiente actividad citosólica del ciclo del SAM, más que por la regulación a través de la ruta cloroplástica (Frank *et al.*, 2015).

Dado que SAM es utilizado en múltiples reacciones de metilación como el principal donador de grupos metilo (Roje, 2006), y junto a la observación de la notable represión de la expresión de genes de defensa en las líneas sobreexpresoras de *METS1*, decidimos analizar el índice de metilación de DNA como consecuencia de la sobreexpresión de esta enzima. Esto con el fin de poder determinar si el metabolismo de los folatos podría estar incidiendo en la regulación de la respuesta inmune a través de su ya conocido papel regulador en el control epigenético y de silenciamiento génico (Deleris *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013). Así, un análisis comparativo del metiloma tras secuenciación del genoma completo por BS-seq reveló que la sobreexpresión de *METS1* conduce a un incremento sustancial en la tasa de metilación del DNA y en los tres contextos de metilación posibles. Dicho incremento se mantiene por encima de Col-0 a pesar de la hipometilación inducida por la infección con *P.s.* DC3000. Esto nos lleva a proponer que este incremento en la metilación de DNA podría conducir a una alteración en los mecanismos de regulación epigenética, lo que explicaría la regulación de la respuesta inmune a través del metabolismo de folatos. Puesto que previamente en el laboratorio se puso de manifiesto, a través de la identificación de los mutantes *ocp1* y *ocp11* (Agorio y Vera, 2007; López *et al.*, 2011), que la respuesta inmune en *Arabidopsis* está regulada negativamente a través de la ruta epigenética RdDM, podría resultar que la presión de metilación provocada por la sobreacumulación de *METS1* redundaría en un

predominio de la metilación de DNA, y que se contrapondría a la desmetilación que es necesaria que ocurra para des-reprimir el silenciamiento génico y con ello llevar a cabo la activación de la respuesta inmune (Downen *et al.*, 2012; Pavet *et al.*, 2006). Esto se conciliaría con la observación de que la sulfonamida SMZ, por ejemplo, se ha visto que es capaz de suprimir el silenciamiento epigenético de determinados genes (Zhang *et al.*, 2012). Descifrar las regiones susceptibles a la modulación de su nivel de metilación, y responsables de la regulación de la expresión génica producida en los mecanismos de respuesta inmune, será nuestro objetivo más próximo.

Con los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, y mediante el uso de dos aproximaciones experimentales diferentes, hemos podido poner de manifiesto la relación causal entre la modificación por metilación de tRNAs mediada por SCS9 y el control del nivel de metilación de DNA mediado por METS1 a través del metabolismo THF/C1, y el efecto modulador de estas rutas metabólicas sobre la activación de la respuesta inmune. Habida cuenta de esto, no sería de extrañar que dicho circuito de regulación de la respuesta inmune pudiera ser manipulado por la bacteria durante su proceso infectivo, a través de alguno de sus efectores, con el fin de desarmar a la planta en la activación de su respuesta inmune. A su vez, la planta podría reprimir puntualmente la vía de síntesis de folatos consiguiendo reprimir de manera puntual el control epigenético de la respuesta defensiva como parte integral de la activación del mecanismo de resistencia. Por otro lado, el trabajo aquí presentado, gracias a una estrategia de genética química que evita la letalidad producida por la mutación de genes esenciales, informa de una nueva función de la ruta de síntesis de folatos y de metionina en las plantas, donde un exceso de estos metabolitos permite un mejor crecimiento bacteriano por supresión de los mecanismos de respuesta defensiva. Ello debería tenerse en cuenta a la hora de producir plantas fortificadas con un añadido valor nutricional para alimentación.

Además, con el descubrimiento realizado en este trabajo en el que las sulfonamidas son agonistas de la respuesta inmune e inductoras de resistencia a *P.s.* DC3000, se establecen las bases para nuevos estudios de optimización de dichas moléculas como compuestos agroquímicos para combatir plagas y enfermedades. Ya sea mejorando las condiciones de uso, como por la búsqueda de nuevas variantes o análogos estructurales a través

de modificaciones del grupo R de las sulfonamidas, se confiere a este trabajo un potencial biotecnológico. Además, sería interesante saber si estos compuestos serían también agonistas de la respuesta inmune frente a otros patógenos no estudiados en esta Tesis y abundaría en un mayor conocimiento sobre la especificidad o no de la regulación de la inmunidad descrita en el presente trabajo. Por otro lado, los recientes estudios que demuestran la existencia de un componente epigenético en la regulación de la inmunidad entre generaciones (priming transgeneracional) (Luna *et al.*, 2012), sería un evento interesante a estudiar con la aplicación de las sulfonamidas; de demostrarse dicho efecto de forma transgeneracional el potencial de las sulfonamidas como agroquímicos se vería favorecido.



# **CONCLUSIONES**





Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. La proteína SCS9 de *Arabidopsis* es necesaria para el establecimiento de una respuesta inmune eficaz frente a la infección por *Pseudomonas syringae* DC3000, de manera que mutaciones de pérdida de función en la misma, tales como las encontradas para los alelos *scs9-1* y *scs9-2*, provocan un incremento de la susceptibilidad frente a dicho patógeno.
2. El gen *SCS9* corresponde al locus At5g01230 y codifica una 2'-*O*-ribosa metiltransferasa de tRNA. *SCS9* tiene una localización nuclear y ejerce la función de metilar los nucleósidos de las posiciones 32 y 34 de la región anticodón de los tRNAs. Así, en los mutantes *scs9* se observa una reducción en el contenido en Cm, Um y Gm correspondientes a dichas posiciones. Por otra parte, estos mismos nucleósidos se incrementan en plantas Col-0 en el curso de una infección con *P.s.* DC3000. Por tanto, la correcta metilación en la región anticodón de determinados tRNAs parece necesaria para una correcta respuesta inmune frente a *P.s.* DC3000.
3. A través de una aproximación de genética química se han identificado 8 derivados estructurales de sulfonamidas que promueven la activación de un estado de mayor sensibilidad o "priming" frente a señales patogénicas. Los derivados de sulfonamidas identificados promueven la deposición de MAP quinasas fosforiladas y una más intensa expresión de genes de defensa ante un ataque patogénico. La aplicación de sulfonamidas, en particular SDZ, confiere un aumento en la resistencia frente a *P.s.* DC3000; y la misma se promueve de manera independiente a la síntesis y la percepción de la hormona SA. Dicho incremento en la resistencia es debido a la inhibición de la biosíntesis de folatos. Adicionalmente, la aplicación exógena de ácido fólico resulta en una mayor susceptibilidad a la infección por *P.s.* DC3000.

4. La proteína 5-metiltetrahidropteroiltriglutamato homocisteína metiltransferasa 1 (METS1), responsable de la síntesis de metionina dependiente de folatos a través del metabolismo C1/THF, es vital para la planta y dicha proteína se sobreacumula en las plantas mutantes *scs9* tras la infección por *P.s.* DC3000.
5. La sobreexpresión de METS1 en plantas transgénicas confiere un incremento en la susceptibilidad a *P.s.* DC3000, y dicha susceptibilidad va acompañada de una reducción en la inducción de genes de defensa dependientes del SA. Dicha sobreexpresión promueve una mayor tasa de metilación de DNA en todos los contextos de metilación estudiados, sugiriendo que esta hipermetilación podría interferir en el mecanismo de control epigenético que subyace a la respuesta inmune.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. Condiciones de crecimiento de las plantas

El ecotipo utilizado de *Arabidopsis thaliana* como fondo para todas las líneas mutantes ha sido Columbia-0 (Col-0). Según los experimentos realizados, las plantas fueron crecidas en fitotrones, donde se utilizó material de sustrato compacto para hidratación previa (Jiffys), y cámaras de cultivo para el crecimiento *in vitro*. Las condiciones establecidas fueron un fotoperiodo de 16/8h luz/oscuridad, con una temperatura de 24°C/18°C. Las semillas fueron almacenadas en cámaras de conservación, en presencia de bolas de sílice naranja (T3Q química). En los ensayos *in vitro*, el medio MS (Duchefa) utilizado para el crecimiento de las plántulas fue a una concentración de 2.2g/L suplementado con 5g/L de sacarosa y 0.1g/L de tampón MES, con un pH final de 5.9 (KOH 0.1M). La gelificación del medio MS se realizó con agarose (Sigma) a 6g/L. Las variaciones realizadas a este medio se indican para cada caso específico. La selección de líneas mutantes se realizó por genotipado por PCR y crecimiento en medio MS suplementado con los antibióticos kanamicina (50mg/L) o basta (9.75mg/L) según la resistencia presente en el vector de transformación. La esterilización de las semillas para los ensayos *in vitro* se basaba en un lavado con etanol 70% y SDS al 0.05% (v/v) y uno posterior con etanol 96%. La estratificación de las semillas fue en agua MilliQ a 4°C durante 3 días y en oscuridad.

## 2. Ensayo de inoculación con *P.s.* DC3000 y análisis de la tasa de crecimiento

Para la preparación del inóculo, un glicerinado de la bacteria (guardado en glicerol a -80°C) fue repartido en placas de medio King's B suplementado con rifampicina (50mg/L) (KBR) y crecido durante 2 días en oscuridad a temperatura ambiente. Una solución de MgSO<sub>4</sub> 10mM fue utilizada para recoger la bacteria de la placa y preparar la solución del inóculo ajustando la OD<sub>600</sub> a la indicada para cada tipo de inoculación. En inoculaciones por spray, tanto de plántulas como plantas adultas (de 4-5 semanas), la OD<sub>600</sub> final fue 0.1 y se utilizó Silwet L-77 a 0.02% (v/v) como humectante; una solución de

500mL de inóculo fue utilizada para inocular cada 150 plantas aproximadamente, las cuales fueron cubiertas con film transparente durante dos horas para favorecer la entrada de la bacteria. En inoculaciones por infiltración, realizadas en plantas de 4-5 semanas de edad, el inóculo fue ajustado a una  $OD_{600}$  de 0.0002 e infiltrado por jeringuilla de 5mL en el extremo lateral superior del envés de las hojas de *Arabidopsis*. 4-5 hojas del mismo estadio fueron infiltradas por cada planta inoculada. Plantas control (mock) fueron inoculadas con la solución control del inóculo ( $MgSO_4$  10mM). Si no se especifica lo contrario, las plantas fueron inoculadas por infiltración. Una vez inoculadas las plantas, se realizaron los análisis de la tasa de crecimiento de la bacteria a cada uno de los tiempos indicados tras la inoculación. Discos de hojas inoculadas (diámetro 0.9mm) fueron recogidos e inmersos en 600 $\mu$ L de la solución  $MgSO_4$  10mM para ser posteriormente homogeneizados. El extracto de plantas fue diluido con  $MgSO_4$  10mM en placas de 96 pocillos en 7 diluciones seriadas 1:5 en 250mL. Con un multiplaqueador, se depositó una gota de 10 $\mu$ L de cada extracto (inicial y diluciones) en placas de medio de crecimiento de la bacteria (KBR). La bacteria fue crecida durante dos días en oscuridad a temperatura ambiente y se cuantificaron el número de unidades formadoras de colonias de diferentes diluciones de cada extracto. La tasa de crecimiento fue finalmente representada como el logaritmo del ratio de unidades formadoras de colonias (u.f.c) por  $cm^2$  de planta analizado; siendo n=12 plantas por cada condición ensayada (Ramírez *et al.*, 2013).

### **3. Tinción histoquímica para analizar la actividad GUS**

Hojas de plantas o plántulas fueron infiltradas por vacío durante 15-20min. tras la inmersión en la solución de reacción incluyendo el sustrato de la enzima para analizar la actividad GUS, el compuesto X-Glc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido sodio sal; Duchefa) a 0.5mg/ml (disuelto en DMSO). El tejido infiltrado fue incubado a 37 $^{\circ}$ C durante una noche, y se realizaron posteriores lavados con etanol 70%. La solución de reacción está compuesta por tampón fosfato pH 7.2 a 100mM,  $K_3Fe(Cn)_6$  0.5mM,  $K_4Fe(Cn)_6$

0.5mM, EDTA 10mM, Tritón X-100 0.1% (v/v) y Metanol 0.1% (v/v). Las imágenes fueron tomadas con una lupa Leica (MZ16F) con 90-110ms de exposición, 1.2-1.5x de ganancia, 1.25-1.35 de saturación, 0.73-0.85 de gamma y 2900-3100k de luz externa.

#### 4. Análisis de la deposición de calosa

El análisis de la deposición de calosa, basado en la tinción con azul de anilina (Methyl blue, Sigma), consistió en el tratamiento previo de las plántulas con tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ) 0.07M a pH 9, usado como disolvente del colorante, durante 30 minutos. Las plántulas habían sido previamente tratadas con etanol 96%. Posteriormente, se realizó un análisis cualitativo por microscopía de fluorescencia UV y/o uno cuantitativo en base al número de píxeles amarillos, respecto al total, encontrados en 15 hojas analizadas por cada condición (García-Andrade *et al.*, 2013; Luna *et al.*, 2011).

#### 5. Extracción de DNA y RNA

El DNA de plantas fue extraído a partir de material homogeneizado con tampón CTAB, incluyendo  $2\mu\text{L}/\text{mL}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol, en una relación de 200mg tejido/mL de tampón. El tampón CTAB está compuesto por 2% CTAB, 100mM Tris-HCl pH8, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 2% PVP. El homogeneizado fue incubado a  $60^\circ\text{C}$  durante 1h, con una centrifugación posterior para separación de fases con cloroformo:isoamílico (24:1, v:v). El DNA de la fase acuosa fue precipitado con 1 volumen de isopropanol, y purificado con cloruro de litio 2M durante una noche. El DNA fue precipitado con 0.1 volúmenes de AcNa 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto, y posteriormente resuspendido en  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ. El RNA total de la planta fue extraído a partir de material congelado homogeneizado usando el reactivo TRIzol (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante, y posterior purificación con cloruro de litio 2M durante una noche y con el kit de DNA free Ambion (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. El RNA final fue resuspendido en  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ.

## **6. PCR y RT-qPCR**

La amplificación de productos génicos de DNA en los ensayos de genotipado fue realizada por PCR con 1 $\mu$ L de DNA, la enzima Taq polimerasa (Biotools) y un programa de Tm 55°C y 35 ciclos. Los oligos utilizados para cada caso se indican en las correspondientes tablas de cada capítulo. La expresión relativa de diferentes genes fue realizada a partir de la transcripción reversa (RT) de 1 $\mu$ g de RNA utilizando el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas); y posterior amplificación cuantitativa (qPCR) usando el sistema de detección 7500 Fast Real-time PCR System (7500 Software v2.0) y el reactivo SYBR-Green (Power PCR Master Mix, Applied Biosystems). El análisis de la expresión relativa fue basado en la ecuación ( $-\Delta\Delta C_t$ ) respecto al control de cada condición. Los oligos utilizados se indican en las correspondientes tablas de cada capítulo. El gen de referencia utilizado para el análisis de datos fue *ACTIN2*.

## **7. Extracción de proteínas y western blot**

Extractos crudos de proteínas fueron preparados a partir de material congelado homogeneizado con un tampón de extracción a razón 1:3 (p/v) compuesto por 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 5mM DTT, 0.6mM PMSF, 10 $\mu$ L/mL inhibidor de proteasas (Sigma), 10mM Fluoruro Sódico, 25 mM  $\beta$ -Glicerofosfato disodio hidratado (Sigma) y 1 pastilla/20mL (tampón) de inhibidor de fosfatasas (Roche). La concentración de proteínas fue medida usando el reactivo Bradford y realizando la curva de calibrado con BSA como estándar. 20 $\mu$ g de proteína total fueron utilizados para su análisis por la técnica SDS-PAGE con geles de acrilamida al 12%. De los extractos de proteínas procedentes de material homogeneizado equilibrado (100mg), se utilizaron 30 $\mu$ L del extracto final, incluyendo el tampón de carga (LB) a razón 1:3 (v LB/v E). Las proteínas fueron transferidas de los geles a membranas de nitrocelulosa (0.45 $\mu$ M, GE Healthcare, Life Sciences). La misma carga de proteína fue verificada con la tinción de las membranas con el colorante Ponceau-S 0.2% disuelto en 1% de ácido acético. Las membranas fueron hibridadas entonces con los diferentes anticuerpos primarios en la dilución



adecuada. La acumulación de la proteína de interés fue analizada por quimioluminiscencia con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo unido a peroxidasa (Roche), a una dilución 1:1000 utilizando 1mL del reactivo Western Lighting plus-ECL (Perkin-Elmer) o una dilución 1:30000 utilizando 1mL del reactivo ECL Prime Western Blotting Detection (Amersham, GE Healthcare). Las diluciones de los anticuerpos primarios fue 1:5000 para el anti-PR1, 1:1000 para el anti-pTEpY 44/42, 1:5000 para el anti-MPK6 y 1:5000 para el anti-GFP. Éste último fue revelado con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón unido a peroxidasa a una dilución 1:50000. Las membranas de nitrocelulosa fueron tratadas como indican las instrucciones del reactivo de detección ECL para poder ser hibridadas con los diferentes anticuerpos primarios.

## 8. Tratamiento de inducción por SA

Plántulas de 15 días crecidas en placas de 6 pocillos en medio MS líquido, con la misma composición que en el subapartado 1, con agitación suave orbital (90 rpm) en cámara de crecimiento *in vitro*, fueron tratadas con SA a 50 $\mu$ M en medio MS fresco. Las muestras fueron recogidas a diferentes tiempos tras la aplicación inicial de la hormona.

## 9. Transformación estable de plantas de Arabidopsis

Plantas de Arabidopsis en floración fueron transformadas por inmersión del tallo floral durante 15seg. en 200mL del medio de cultivo con el inóculo de *Agrobacterium tumefaciens* C58 portando la construcción de interés. Las plantas fueron tapadas posteriormente durante 1 día para favorecer la infección. El medio de cultivo para la inmersión está compuesto por MS 2.2g/L y sacarosa 5% (p/v), suplementado con Silwet 0.005% y BAP 0.05 $\mu$ g/mL.

## **10. Expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana***

Hojas expandidas de plantas *Nicotiana Benthamiana* fueron infiltradas con jeringuilla de 1mL con la solución de infiltración (MES 10mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, pH 5.6) suplementada con acetosiringona 1μL/mL portando el inóculo de *Agrobacterium tumefaciens* C58 transformado con la construcción de interés, precultivado durante 1 día a 28°C, a una OD<sub>600</sub> final de 1. Para los ensayos de co-infiltración, los cultivos de *Agrobacterium* con cada construcción fueron crecidos separadamente, y posteriormente ajustados cada uno a una OD<sub>600</sub> de 1 y mezclados en la misma solución de infiltración. La cepa de *Agrobacterium* expresando el supresor del silenciamiento viral p19 fue incluida en todas las soluciones de infiltración y ajustada a una OD<sub>600</sub> de 0.5. La fluorescencia fue analizada 3-4 días después en el tejido infiltrado por microscopía confocal, usando el microscopio ZEISS 780. La fluorescencia derivada de GFP e YFP fue monitorizada por excitación con las líneas de láser argón 488nm, y la emisión fue visualizada con una ventana de 30nm centrada a 515nm. Para analizar la fluorescencia derivada de mCherry, la excitación fue realizada con la línea de láser a 561nm, y la fluorescencia de emisión fue recogida de 595 a 629nm. Las imágenes fueron procesadas con el software ZEN 2011.



# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abramovitch, R.B., and Martin, G.B.** (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* 7, 356-364.
- Agorio, A., and Vera, P.** (2007). ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 3778-3790.
- Agrios, G.N.** (2005a). chapter six - HOW PLANTS DEFEND THEMSELVES AGAINST PATHOGENS. In *Plant Pathology (Fifth Edition)* (San Diego: Academic Press), pp. 207-248.
- Agrios, G.N.** (2005b). chapter ten - ENVIRONMENTAL FACTORS THAT CAUSE PLANT DISEASES. In *Plant Pathology (Fifth Edition)* (San Diego: Academic Press), pp. 357-384.
- Agris, P.F., Vendeix, F.A., and Graham, W.D.** (2007). tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *Journal of molecular biology* 366, 1-13.
- Ahuja, I., Kissen, R., and Bones, A.M.** (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci* 17, 73-90.
- Akhtar, T.A., Orsomando, G., Mehrshahi, P., Lara-Nunez, A., Bennett, M.J., Gregory, J.F., 3rd, and Hanson, A.D.** (2010). A central role for gamma-glutamyl hydrolases in plant folate homeostasis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 64, 256-266.
- Almeida, N.F., Yan, S., Lindeberg, M., Studholme, D.J., Schneider, D.J., Condon, B., Liu, H., Viana, C.J., Warren, A., Evans, C., et al.** (2009). A draft genome sequence of *Pseudomonas syringae* pv. tomato T1 reveals a type III effector repertoire significantly divergent from that of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 22, 52-62.
- Amir, R.** (2010). Current understanding of the factors regulating methionine content in vegetative tissues of higher plants. *Amino Acids* 39, 917-931.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., and Vance, V.B.** (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 13079-13084.
- Anderson, J., Phan, L., and Hinnebusch, A.G.** (2000). The Gcd10p/Gcd14p complex is the essential two-subunit tRNA(1-methyladenosine) methyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5173-5178.

**Appling, D.R.** (1991). Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5, 2645-2651.

**Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415, 977-983.

**Austin, R.S., Vidaurre, D., Stamatiou, G., Breit, R., Provar, N.J., Bonetta, D., Zhang, J., Fung, P., Gong, Y., Wang, P.W., et al.** (2011). Next-generation mapping of Arabidopsis genes. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 67, 715-725.

**Avraham, T., Badani, H., Galili, S., and Amir, R.** (2005). Enhanced levels of methionine and cysteine in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants over-expressing the Arabidopsis cystathionine  $\gamma$ -synthase gene. *Plant Biotechnology Journal* 3, 71-79.

**Basset, G.J., Quinlivan, E.P., Ravanel, S., Rebeille, F., Nichols, B.P., Shinozaki, K., Seki, M., Adams-Phillips, L.C., Giovannoni, J.J., Gregory, J.F., 3rd, et al.** (2004a). Folate synthesis in plants: the p-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1496-1501.

**Basset, G.J., Ravanel, S., Quinlivan, E.P., White, R., Giovannoni, J.J., Rebeille, F., Nichols, B.P., Shinozaki, K., Seki, M., Gregory, J.F., 3rd, et al.** (2004b). Folate synthesis in plants: the last step of the p-aminobenzoate branch is catalyzed by a plastidial aminodeoxychorismate lyase. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 40, 453-461.

**Basset, G.J.C., Quinlivan, E.P., Gregory III, J.F., and Hanson, A.D.** (2005). Folate Synthesis and Metabolism in Plants and Prospects For Biofortification. *Crop Sci* 45, 449-453.

**Beckers, G.J., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W.R., He, S.Y., Zhang, S., and Conrath, U.** (2009). Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 21, 944-953.

**Begley, U., Dyavaiah, M., Patil, A., Rooney, J.P., DiRenzo, D., Young, C.M., Conklin, D.S., Zitomer, R.S., and Begley, T.J.** (2007). Trm9-catalyzed tRNA modifications link translation to the DNA damage response. *Molecular cell* 28, 860-870.

**Bektas, Y., and Eulgem, T.** (2014). Synthetic plant defense elicitors. *Front Plant Sci* 5, 804.

- Bell, C.J., and Ecker, J.R.** (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of Arabidopsis. *Genomics* 19, 137-144.
- Bent, A.F., and Mackey, D.** (2007). Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol* 45, 399-436.
- Berger, S., Papadopoulos, M., Schreiber, U., Kaiser, W., and Roitsch, T.** (2004). Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* 122, 419-428.
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J.F., Poschl, Y., Gust, A.A., Scheel, D., and Lee, J.** (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in Arabidopsis thaliana via ethylene signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8067-8072.
- Bilgin, D.D., Zavala, J.A., Zhu, J., Clough, S.J., Ort, D.R., and DeLucia, E.H.** (2010). Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant, cell & environment* 33, 1597-1613.
- Björk, G.R.** (1995). Biosynthesis and function of modified nucleosides. In *tRNA: Structure, Biosynthesis and Function*, D. Soll, and U.L. RajBhandary, eds. (Washington DC: American Society for Microbiology), pp. 165-205.
- Bjork, G.R., and Hagervall, T.G.** (2014). Transfer RNA Modification: Presence, Synthesis, and Function. *EcoSal Plus* 6.
- Blackwell, H.E., and Zhao, Y.** (2003). Chemical genetic approaches to plant biology. *Plant Physiol* 133, 448-455.
- Blanco, S., Dietmann, S., Flores, J.V., Hussain, S., Kutter, C., Humphreys, P., Lukk, M., Lombard, P., Treps, L., Popis, M., et al.** (2014). Aberrant methylation of tRNAs links cellular stress to neuro-developmental disorders. *The EMBO journal* 33, 2020-2039.
- Blancquaert, D., De Steur, H., Gellynck, X., and Van Der Straeten, D.** (2014). Present and future of folate biofortification of crop plants. *J Exp Bot* 65, 895-906.
- Boller, T., and Felix, G.** (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60, 379-406.
- Boller, T., and He, S.Y.** (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science (New York, NY)* 324, 742-744.

- Bolton, M.D.** (2009). Primary metabolism and plant defense--fuel for the fire. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI 22, 487-497.
- Borges, A.A., Dobon, A., Expósito-Rodríguez, M., Jiménez-Arias, D., Borges-Pérez, A., Casañas-Sánchez, V., Pérez, J.A., Luis, J.C., and Tornero, P.** (2009). Molecular analysis of menadione-induced resistance against biotic stress in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* 7, 744-762.
- Bourgis, F., Roje, S., Nuccio, M.L., Fisher, D.B., Tarczynski, M.C., Li, C., Herschbach, C., Rennenberg, H., Pimenta, M.J., Shen, T.L., et al.** (1999). S-methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *Plant Cell* 11, 1485-1498.
- Bugl, H., Fauman, E.B., Staker, B.L., Zheng, F., Kushner, S.R., Saper, M.A., Bardwell, J.C., and Jakob, U.** (2000). RNA methylation under heat shock control. *Molecular cell* 6, 349-360.
- Bujnicki, J.M., and Rychlewski, L.** (2001). Reassignment of specificities of two cap methyltransferase domains in the reovirus lambda 2 protein. *Genome biology* 2, Research0038.
- Caldas, T., Binet, E., Bouloc, P., Costa, A., Desgres, J., and Richarme, G.** (2000). The FtsJ/RrmJ heat shock protein of *Escherichia coli* is a 23 S ribosomal RNA methyltransferase. *J Biol Chem* 275, 16414-16419.
- Camañes, G., Pastor, V., Cerezo, M., García-Andrade, J., Vicedo, B., García-Agustín, P., and Flors, V.** (2012). A Deletion in NRT2.1 Attenuates *Pseudomonas syringae*-Induced Hormonal Perturbation, Resulting in Primed Plant Defenses. *Plant Physiology* 158, 1054-1066.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., and Dong, X.** (1997). The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88, 57-63.
- Carlson, S.M., and White, F.M.** (2011). Using small molecules and chemical genetics to interrogate signaling networks. *ACS chemical biology* 6, 75-85.
- Castelló, M.J., Carrasco, J.L., Navarrete-Gomez, M., Daniel, J., Granot, D., and Vera, P.** (2011). A plant small polypeptide is a novel component of DNA-binding protein phosphatase 1-mediated resistance to plum pox virus in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 157, 2206-2215.
- Chan, C.T., Dyavaiah, M., DeMott, M.S., Taghizadeh, K., Dedon, P.C., and Begley, T.J.** (2010). A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress. *PLoS Genet* 6, e1001247.



- Chan, C.T., Pang, Y.L., Deng, W., Babu, I.R., Dyavaiah, M., Begley, T.J., and Dedon, P.C.** (2012). Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nature communications* 3, 937.
- Chen, C., Tuck, S., and Bystrom, A.S.** (2009). Defects in tRNA modification associated with neurological and developmental dysfunctions in *Caenorhabditis elegans* elongator mutants. *PLoS Genet* 5, e1000561.
- Chen, P., Jager, G., and Zheng, B.** (2010). Transfer RNA modifications and genes for modifying enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 10, 201.
- Chen, Y., Zou, T., and McCormick, S.** (2016). S-Adenosylmethionine Synthetase 3 Is Important for Pollen Tube Growth. *Plant Physiol* 172, 244-253.
- Chernoff, Y.O., Vincent, A., and Liebman, S.W.** (1994). Mutations in eukaryotic 18S ribosomal RNA affect translational fidelity and resistance to aminoglycoside antibiotics. *The EMBO journal* 13, 906-913.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J.** (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803-814.
- Clark, R.M., Schweikert, G., Toomajian, C., Ossowski, S., Zeller, G., Shinn, P., Warthmann, N., Hu, T.T., Fu, G., Hinds, D.A., et al.** (2007). Common sequence polymorphisms shaping genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Science (New York, NY)* 317, 338-342.
- Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G., and Ausubel, F.M.** (2009). Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science (New York, NY)* 323, 95-101.
- Coego, A., Ramirez, V., Ellul, P., Mayda, E., and Vera, P.** (2005a). The H2O2-regulated Ep5C gene encodes a peroxidase required for bacterial speck susceptibility in tomato. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 42, 283-293.
- Coego, A., Ramirez, V., Gil, M.J., Flors, V., Mauch-Mani, B., and Vera, P.** (2005b). An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor, OVEREXPRESSOR OF CATIONIC PEROXIDASE 3, mediates resistance to infection by necrotrophic pathogens. *Plant Cell* 17, 2123-2137.
- Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E.** (2008). Shotgun

bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 452, 215-219.

**Cong, F., Cheung, A.K., and Huang, S.M.** (2012). Chemical genetics-based target identification in drug discovery. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52, 57-78.

**Conrath, U., Beckers, G.J., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.A., Pieterse, C.M., Poinssot, B., Pozo, M.J., et al.** (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular plant-microbe interactions* : *MPMI* 19, 1062-1071.

**Conrath, U., Beckers, G.J., Langenbach, C.J., and Jaskiewicz, M.R.** (2015). Priming for enhanced defense. *Annu Rev Phytopathol* 53, 97-119.

**Conrath, U., Pieterse, C.M., and Mauch-Mani, B.** (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 7, 210-216.

**Cossins, E.A., and Chen, L.** (1997). Folates and one-carbon metabolism in plants and fungi. *Phytochemistry* 45, 437-452.

**Cunnac, S., Lindeberg, M., and Collmer, A.** (2009). Pseudomonas syringae type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Current opinion in microbiology* 12, 53-60.

**Defraia, C.T., Schmelz, E.A., and Mou, Z.** (2008). A rapid biosensor-based method for quantification of free and glucose-conjugated salicylic acid. *Plant methods* 4, 28.

**Deleris, A., Halter, T., and Navarro, L.** (2016). DNA Methylation and Demethylation in Plant Immunity. *Annu Rev Phytopathol* 54, 579-603.

**Dempsey, D.A., Vlot, A.C., Wildermuth, M.C., and Klessig, D.F.** (2011). Salicylic Acid biosynthesis and metabolism. *Arabidopsis Book* 9, e0156.

**Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F.M., and Dewdney, J.** (2008). Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Molecular plant* 1, 423-445.

**Deslandes, L., and Rivas, S.** (2012). Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends in Plant Science* 17, 644-655.

**Di, R., Kim, J., Martin, M.N., Leustek, T., Jhoo, J., Ho, C.-T., and Tumer, N.E.** (2003). Enhancement of the Primary Flavor Compound Methional in Potato by Increasing the Level of Soluble Methionine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5695-5702.

- Díaz de la Garza, R.I., Gregory, J.F., 3rd, and Hanson, A.D.** (2007). Folate biofortification of tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 4218-4222.
- Ding, B., and Wang, G.L.** (2015). Chromatin versus pathogens: the function of epigenetics in plant immunity. *Front Plant Sci* *6*, 675.
- Dobón, A., Canet, J.V., García-Andrade, J., Angulo, C., Neumetzler, L., Persson, S., and Vera, P.** (2015). Novel disease susceptibility factors for fungal necrotrophic pathogens in Arabidopsis. *PLoS pathogens* *11*, e1004800.
- Dodds, P.N., and Rathjen, J.P.** (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* *11*, 539-548.
- Dong, X.** (2004). NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* *7*, 547-552.
- Dowen, R.H., Pelizzola, M., Schmitz, R.J., Lister, R., Dowen, J.M., Nery, J.R., Dixon, J.E., and Ecker, J.R.** (2012). Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, E2183-E2191.
- El Yacoubi, B., Bailly, M., and de Crecy-Lagard, V.** (2012). Biosynthesis and function of posttranscriptional modifications of transfer RNAs. *Annu Rev Genet* *46*, 69-95.
- Ellis, S.R., Morales, M.J., Li, J.M., Hopper, A.K., and Martin, N.C.** (1986). Isolation and characterization of the TRM1 locus, a gene essential for the N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>-dimethylguanosine modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *261*, 9703-9709.
- Falk, K.L., Tokuhisa, J.G., and Gershenzon, J.** (2007). The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* *9*, 573-581.
- Ferrer, J.L., Ravanel, S., Robert, M., and Dumas, R.** (2004). Crystal structures of cobalamin-independent methionine synthase complexed with zinc, homocysteine, and methyltetrahydrofolate. *J Biol Chem* *279*, 44235-44238.
- Flor, H.H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* *9*, 275-296.
- Frank, A., Cohen, H., Hoffman, D., and Amir, R.** (2015). Methionine and S-methylmethionine exhibit temporal and spatial accumulation patterns during the Arabidopsis life cycle. *Amino Acids* *47*, 497-510.
- Fu, Z.Q., and Dong, X.** (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol* *64*, 839-863.

**Fu, Z.Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S.H., Tada, Y., Zheng, N., et al.** (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* *486*, 228-232.

**Galili, G., Amir, R., and Fernie, A.R.** (2016). The Regulation of Essential Amino Acid Synthesis and Accumulation in Plants. *Annu Rev Plant Biol* *67*, 153-178.

**Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P.C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J., and Job, D.** (2002). Importance of methionine biosynthesis for Arabidopsis seed germination and seedling growth. *Physiologia Plantarum* *116*, 238-247.

**Gangadharan, A., Sreerekha, M.V., Whitehill, J., Ham, J.H., and Mackey, D.** (2013). The *Pseudomonas syringae* pv. tomato type III effector HopM1 suppresses Arabidopsis defenses independent of suppressing salicylic acid signaling and of targeting AtMIN7. *PloS one* *8*, e82032.

**García-Andrade, J., Ramírez, V., Flors, V., and Vera, P.** (2011). Arabidopsis ocp3 mutant reveals a mechanism linking ABA and JA to pathogen-induced callose deposition. *The Plant Journal* *67*, 783-794.

**García-Andrade, J., Ramirez, V., Lopez, A., and Vera, P.** (2013). Mediated plastid RNA editing in plant immunity. *PLoS pathogens* *9*, e1003713.

**Gerber, A., Grosjean, H., Melcher, T., and Keller, W.** (1998). Tad1p, a yeast tRNA-specific adenosine deaminase, is related to the mammalian pre-mRNA editing enzymes ADAR1 and ADAR2. *The EMBO journal* *17*, 4780-4789.

**Giegé, R., and Frugier, M.** (2000-2013). Transfer RNA Structure and Identity. In *Madame Curie Bioscience Database* (Internet) (Austin (TX): Landes Bioscience).

**Gil, M.J., Coego, A., Mauch-Mani, B., Jorda, L., and Vera, P.** (2005). The Arabidopsis *csb3* mutant reveals a regulatory link between salicylic acid-mediated disease resistance and the methyl-erythritol 4-phosphate pathway. *The Plant journal : for cell and molecular biology* *44*, 155-166.

**Giménez-Ibáñez, S., Boter, M., Fernandez-Barbero, G., Chini, A., Rathjen, J.P., and Solano, R.** (2014). The bacterial effector HopX1 targets JAZ transcriptional repressors to activate jasmonate signaling and promote infection in Arabidopsis. *PLoS Biol* *12*, e1001792.

**Giménez-Ibáñez, S., Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V., and Rathjen, J.P.** (2009). AvrPtoB Targets the LysM Receptor Kinase CERK1 to Promote Bacterial Virulence on Plants. *Current Biology* *19*, 423-429.

- Giovanelli, J., Mudd, S.H., and Datko, A.H.** (1985a). In vivo regulation of de novo methionine biosynthesis in a higher plant (lemna). *Plant Physiol* 77, 450-455.
- Giovanelli, J., Mudd, S.H., and Datko, A.H.** (1985b). Quantitative analysis of pathways of methionine metabolism and their regulation in lemna. *Plant Physiol* 78, 555-560.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 43, 205-227.
- Goodenbour, J.M., and Pan, T.** (2006). Diversity of tRNA genes in eukaryotes. *Nucleic acids research* 34, 6137-6146.
- Goto, D.B., Onouchi, H., and Naito, S.** (2005). Dynamics of methionine biosynthesis. *Plant Biotechnology* 22, 379-388.
- Goyer, A., Collakova, E., Shachar-Hill, Y., and Hanson, A.D.** (2007). Functional characterization of a methionine gamma-lyase in Arabidopsis and its implication in an alternative to the reverse trans-sulfuration pathway. *Plant & cell physiology* 48, 232-242.
- Groth, M., Moissiard, G., Wirtz, M., Wang, H., Garcia-Salinas, C., Ramos-Parra, P.A., Bischof, S., Feng, S., Cokus, S.J., John, A., et al.** (2016). MTHFD1 controls DNA methylation in Arabidopsis. *Nature communications* 7, 11640.
- Guy, M.P., Podyma, B.M., Preston, M.A., Shaheen, H.H., Krivos, K.L., Limbach, P.A., Hopper, A.K., and Phizicky, E.M.** (2012). Yeast Trm7 interacts with distinct proteins for critical modifications of the tRNA(Phe) anticodon loop. *RNA* 18, 1921-1933.
- Hacham, Y., Matityahu, I., Schuster, G., and Amir, R.** (2008). Overexpression of mutated forms of aspartate kinase and cystathionine  $\gamma$ -synthase in tobacco leaves resulted in the high accumulation of methionine and threonine. *The Plant Journal* 54, 260-271.
- Hann, D., and Boller, T.** (2011). Microbial Effectors and Their Role in Plant Defense Suppression. In *Effectors in Plant-Microbe Interactions* (Wiley-Blackwell), pp. 33-52.
- Hanson, A.D., and Gregory, J.F., 3rd** (2011). Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants. *Annu Rev Plant Biol* 62, 105-125.
- Hanson, A.D., and Roje, S.** (2001). One-Carbon Metabolism in Higher Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52:119-37 52, 119-137.

- Hardham, A.R., Jones, D.A., and Takemoto, D.** (2007). Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Curr Opin Plant Biol* 10, 342-348.
- Hesse, H., Kreft, O., Maimann, S., Zeh, M., and Hoefgen, R.** (2004). Current understanding of the regulation of methionine biosynthesis in plants. *J Exp Bot* 55, 1799-1808.
- Hicks, G.R., and Raikhel, N.V.** (2012). Small molecules present large opportunities in plant biology. *Annu Rev Plant Biol* 63, 261-282.
- Hicks, G.R., and Raikhel, N.V.** (2014). Plant chemical biology: are we meeting the promise? *Front Plant Sci* 5, 455.
- Hori, H.** (2014). Methylated nucleosides in tRNA and tRNA methyltransferases. *Frontiers in genetics* 5, 144.
- Huang, W.E., Wang, H., Zheng, H., Huang, L., Singer, A.C., Thompson, I., and Whiteley, A.S.** (2005). Chromosomally located gene fusions constructed in *Acinetobacter* sp. ADP1 for the detection of salicylate. *Environmental microbiology* 7, 1339-1348.
- Ishikawa, T., Machida, C., Yoshioka, Y., Kitano, H., and Machida, Y.** (2003). The GLOBULAR ARREST1 gene, which is involved in the biosynthesis of folates, is essential for embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 33, 235-244.
- Jackman, J.E., Montange, R.K., Malik, H.S., and Phizicky, E.M.** (2003). Identification of the yeast gene encoding the tRNA m1G methyltransferase responsible for modification at position 9. *Rna* 9, 574-585.
- Jander, G., and Joshi, V.** (2009). Aspartate-derived Amino Acid Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book* 7, e0121.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.
- Jordá, L., Coego, A., Conejero, V., and Vera, P.** (1999). A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. *J Biol Chem* 274, 2360-2365.
- Jordá, L., and Vera, P.** (2000). Local and systemic induction of two defense-related subtilisin-like protease promoters in transgenic *Arabidopsis* plants. Luciferin induction of PR gene expression. *Plant Physiol* 124, 1049-1058.
- Juhling, F., Morl, M., Hartmann, R.K., Sprinzl, M., Stadler, P.F., and Putz, J.** (2009). tRNADB 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic acids research* 37, D159-162.

- Kadaba, S., Krueger, A., Trice, T., Krecic, A.M., Hinnebusch, A.G., and Anderson, J.** (2004). Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA<sup>Met</sup> in *S. cerevisiae*. *Genes Dev* *18*, 1227-1240.
- Kalhor, H.R., and Clarke, S.** (2003). Novel methyltransferase for modified uridine residues at the wobble position of tRNA. *Molecular and cellular biology* *23*, 9283-9292.
- Kangasjarvi, S., Neukermans, J., Li, S., Aro, E.M., and Noctor, G.** (2012). Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *J Exp Bot* *63*, 1619-1636.
- Katagiri, F., Thilmony, R., and He, S.Y.** (2002). The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* interaction. *Arabidopsis Book* *1*, e0039.
- Khoury, C.M., Yang, Z., Li, X.Y., Vignali, M., Fields, S., and Greenwood, M.T.** (2008). A TSC22-like motif defines a novel antiapoptotic protein family. *FEMS yeast research* *8*, 540-563.
- Kim, J., Lee, M., Chalam, R., Martin, M.N., Leustek, T., and Boerjan, W.** (2002). Constitutive Overexpression of Cystathionine  $\gamma$ -Synthase in *Arabidopsis* Leads to Accumulation of Soluble Methionine and S-Methylmethionine. *Plant Physiology* *128*, 95-107.
- Kim, Y.-I.** (2005). Nutritional Epigenetics: Impact of Folate Deficiency on DNA Methylation and Colon Cancer Susceptibility. *J Nutr* *135*, 2703-2709.
- Király, L., Barna, B., and Király, Z.** (2007). Plant Resistance to Pathogen Infection: Forms and Mechanisms of Innate and Acquired Resistance. *Journal of Phytopathology* *155*, 385-396.
- Kirchner, S., and Ignatova, Z.** (2015). Emerging roles of tRNA in adaptive translation, signalling dynamics and disease. *Nat Rev Genet* *16*, 98-112.
- Kohler, A., Schwindling, S., and Conrath, U.** (2002). Benzothiadiazole-Induced Priming for Potentiated Responses to Pathogen Infection, Wounding, and Infiltration of Water into Leaves Requires the NPR1/NIM1 Gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* *128*, 1046-1056.
- Kramer, E.B., and Hopper, A.K.** (2013). Retrograde transfer RNA nuclear import provides a new level of tRNA quality control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 21042-21047.
- Kuchino, Y., Borek, E., Grunberger, D., Mushinski, J.F., and Nishimura, S.** (1982). Changes of post-transcriptional modification of wye base in tumor-specific tRNA<sup>Phe</sup>. *Nucleic acids research* *10*, 6421-6432.

**Kunkel, B.N., and Brooks, D.M.** (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* 5, 325-331.

**Lapin, D., and Van den Ackerveken, G.** (2013). Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity. *Trends Plant Sci* 18, 546-554.

**Law, J.A., and Jacobsen, S.E.** (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11, 204-220.

**Lee, M., Martin, M.N., Hudson, A.O., Lee, J., Muhitch, M.J., and Leustek, T.** (2005). Methionine and threonine synthesis are limited by homoserine availability and not the activity of homoserine kinase in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 41, 685-696.

**Lee, Y.S., Shibata, Y., Malhotra, A., and Dutta, A.** (2009). A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Dev* 23, 2639-2649.

**Lehninger, A.L., Nelson, D.L., and Cox, M.M.** (2000). RNA Metabolism - Chapter 26. In *Lehninger principles of biochemistry* (New York: Worth Publishers).

**Lisón, P., Tárraga, S., López-Gresa, P., Saurí, A., Torres, C., Campos, L., Bellés, J.M., Conejero, V., and Rodrigo, I.** (2013). A noncoding plant pathogen provokes both transcriptional and posttranscriptional alterations in tomato. *PROTEOMICS* 13, 833-844.

**Liu, T., Song, T., Zhang, X., Yuan, H., Su, L., Li, W., Xu, J., Liu, S., Chen, L., Chen, T., et al.** (2014). Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis. *Nature communications* 5, 4686.

**Loenen, W.A.M.** (2006). S-Adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything? *Biochemical Society Transactions* 34, 330-333.

**Loizeau, K., De Brouwer, V., Gambonnet, B., Yu, A., Renou, J.P., Van Der Straeten, D., Lambert, W.E., Rebeille, F., and Ravanel, S.** (2008). A genome-wide and metabolic analysis determined the adaptive response of *Arabidopsis* cells to folate depletion induced by methotrexate. *Plant Physiol* 148, 2083-2095.

**Loizeau, K., Gambonnet, B., Zhang, G.F., Curien, G., Jabrin, S., Van Der Straeten, D., Lambert, W.E., Rebeille, F., and Ravanel, S.** (2007). Regulation of one-carbon metabolism in *Arabidopsis*: the N-terminal regulatory domain of cystathionine gamma-synthase is cleaved in response to folate starvation. *Plant Physiol* 145, 491-503.



- López, A., Ramírez, V., García-Andrade, J., Flors, V., and Vera, P.** (2011). The RNA silencing enzyme RNA polymerase v is required for plant immunity. *PLoS Genet* 7, e1002434.
- López, M.A., Bannenberg, G., and Castresana, C.** (2008). Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 420-427.
- López Sánchez, A., Stassen, J.H., Furci, L., Smith, L.M., and Ton, J.** (2016). The role of DNA (de)methylation in immune responsiveness of Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 88, 361-374.
- Lu, J., Huang, B., Esberg, A., Johansson, M.J., and Bystrom, A.S.** (2005). The *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin targets tRNA anticodons. *Rna* 11, 1648-1654.
- Luna, E., Bruce, T.J., Roberts, M.R., Flors, V., and Ton, J.** (2012). Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol* 158, 844-853.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., and Ton, J.** (2011). Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 24, 183-193.
- Machnicka, M.A., Milanowska, K., Osman Oglou, O., Purta, E., Kurkowska, M., Olchowik, A., Januszewski, W., Kalinowski, S., Dunin-Horkawicz, S., Rother, K.M., et al.** (2013). MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update. *Nucleic acids research* 41, D262-267.
- Machnicka, M.A., Olchowik, A., Grosjean, H., and Bujnicki, J.M.** (2014). Distribution and frequencies of post-transcriptional modifications in tRNAs. *RNA Biol* 11, 1619-1629.
- Macho, A.P.** (2016). Subversion of plant cellular functions by bacterial type-III effectors: beyond suppression of immunity. *New Phytologist* 210, 51-57.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Dangl, J.L.** (2003). Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* 112, 379-389.
- Martínez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C.M., Pozo, M.J., Ton, J., van Dam, N.M., and Conrath, U.** (2016). Recognizing Plant Defense Priming. *Trends Plant Sci* 21, 818-822.
- Matzke, M.A., and Moshier, R.A.** (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet* 15, 394-408.

- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., and Flors, V.** (2017). Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annu Rev Plant Biol.*
- Mauro, V.P., and Edelman, G.M.** (2007). The ribosome filter redux. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 6, 2246-2251.
- Maute, R.L., Schneider, C., Sumazin, P., Holmes, A., Califano, A., Basso, K., and Dalla-Favera, R.** (2013). tRNA-derived microRNA modulates proliferation and the DNA damage response and is down-regulated in B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 1404-1409.
- McCullough, J.L., and Maren, T.H.** (1973). Inhibition of dihydropteroate synthetase from *Escherichia coli* by sulfones and sulfonamides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 3, 665-669.
- Mehrtens, F., Kranz, H., Bednarek, P., and Weisshaar, B.** (2005). The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol* 138, 1083-1096.
- Melotto, M., Underwood, W., and He, S.Y.** (2008). Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. *Annual review of phytopathology* 46, 101-122.
- Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G., and Kakimoto, T.** (2006). Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16598-16603.
- Motorin, Y., and Grosjean, H.** (1999). Multisite-specific tRNA:m5C-methyltransferase (Trm4) in yeast *Saccharomyces cerevisiae*: identification of the gene and substrate specificity of the enzyme. *Rna* 5, 1105-1118.
- Motorin, Y., and Helm, M.** (2010). tRNA stabilization by modified nucleotides. *Biochemistry* 49, 4934-4944.
- Navarova, H., Bernsdorff, F., Doring, A.C., and Zeier, J.** (2012). Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell* 24, 5123-5141.
- Nawrath, C., and Metraux, J.P.** (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* 11, 1393-1404.
- Netea, M.G., Quintin, J., and van der Meer, J.W.** (2011). Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell host & microbe* 9, 355-361.

- Neuburger, M., Rebeille, F., Jourdain, A., Nakamura, S., and Douce, R.** (1996). Mitochondria are a major site for folate and thymidylate synthesis in plants. *J Biol Chem* *271*, 9466-9472.
- Nomura, K., Debroy, S., Lee, Y.H., Pumplin, N., Jones, J., and He, S.Y.** (2006). A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science (New York, NY)* *313*, 220-223.
- Noutoshi, Y., Ikeda, M., Saito, T., Osada, H., and Shirasu, K.** (2012a). Sulfonamides identified as plant immune-priming compounds in high-throughput chemical screening increase disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* *3*, 245.
- Noutoshi, Y., Okazaki, M., Kida, T., Nishina, Y., Morishita, Y., Ogawa, T., Suzuki, H., Shibata, D., Jikumaru, Y., Hanada, A., et al.** (2012b). Novel plant immune-priming compounds identified via high-throughput chemical screening target salicylic acid glucosyltransferases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *24*, 3795-3804.
- Novoa, E.M., Pavon-Eternod, M., Pan, T., and Ribas de Pouplana, L.** (2012). A role for tRNA modifications in genome structure and codon usage. *Cell* *149*, 202-213.
- O'Connor, C.J., Laraia, L., and Spring, D.R.** (2011). Chemical genetics. *Chemical Society reviews* *40*, 4332-4345.
- Orsomando, G., de la Garza, R.D., Green, B.J., Peng, M., Rea, P.A., Ryan, T.J., Gregory, J.F., 3rd, and Hanson, A.D.** (2005). Plant gamma-glutamyl hydrolases and folate polyglutamates: characterization, compartmentation, and co-occurrence in vacuoles. *J Biol Chem* *280*, 28877-28884.
- Pajerowska-Mukhtar, K.M., Wang, W., Tada, Y., Oka, N., Tucker, C.L., Fonseca, J.P., and Dong, X.** (2012). The HSF-like transcription factor TBF1 is a major molecular switch for plant growth-to-defense transition. *Current biology : CB* *22*, 103-112.
- Park, S.Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D.R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T.F., et al.** (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science (New York, NY)* *324*, 1068-1071.
- Pato, M.L., and Brown, G.M.** (1963). Mechanisms of Resistance of *Escherichia coli* to Sulfonamides. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *103*, 443-448.

- Pavet, V., Quintero, C., Cecchini, N.M., Rosa, A.L., and Alvarez, M.E.** (2006). Arabidopsis Displays Centromeric DNA Hypomethylation and Cytological Alterations of Heterochromatin Upon Attack by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* *19*, 577-587.
- Pederson, T.** (2010). Regulatory RNAs derived from transfer RNA? *Rna* *16*, 1865-1869.
- Phizicky, E.M., and Hopper, A.K.** (2010). tRNA biology charges to the front. *Genes & Development* *24*, 1832-1860.
- Pieterse, C.M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S.C.** (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* *28*, 489-521.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., and van Loon, L.C.** (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* *10*, 1571-1580.
- Pintard, L., Lecointe, F., Bujnicki, J.M., Bonnerot, C., Grosjean, H., and Lapeyre, B.** (2002). Trm7p catalyses the formation of two 2'-O-methylriboses in yeast tRNA anticodon loop. *The EMBO journal* *21*, 1811-1820.
- Posfai, J., Bhagwat, A.S., Posfai, G., and Roberts, R.J.** (1989). Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic acids research* *17*, 2421-2435.
- Prabhu, V., Chatson, K.B., Lui, H., Abrams, G.D., and King, J.** (1998). Effects of Sulfanilamide and Methotrexate on <sup>13</sup>C Fluxes through the Glycine Decarboxylase/Serine Hydroxymethyltransferase Enzyme System in Arabidopsis. *Plant Physiol* *116*, 137-144.
- Prabhu, V., Lui, H., and King, J.** (1997). Arabidopsis Dihydropteroate Synthase: General Properties and Inhibition by Reaction Product and Sulfonamides. *Phytochemistry* *45*, 23-27.
- Raina, M., and Ibba, M.** (2014). tRNAs as regulators of biological processes. *Frontiers in genetics* *5*, 171.
- Raj Kumar, D., Animesh, S., Krishnakanta, G., Duanting, Z., Wang, X., Dongdong, S., Cheryl, L., and Young-Tae, C.** (2011). Target Identification : A Challenging Step in Forward Chemical Genetics. *IBC* *3*, 3.

- Ramírez, V., Coego, A., López, A., Agorio, A., Flors, V., and Vera, P.** (2009). Drought tolerance in Arabidopsis is controlled by the OCP3 disease resistance regulator. *The Plant journal : for cell and molecular biology* *58*, 578-591.
- Ramírez, V., López, A., Mauch-Mani, B., Gil, M.J., and Vera, P.** (2013). An extracellular subtilase switch for immune priming in Arabidopsis. *PLoS pathogens* *9*, e1003445.
- Ramírez, V., Van der Ent, S., García-Andrade, J., Coego, A., Pieterse, C.M., and Vera, P.** (2010). OCP3 is an important modulator of NPR1-mediated jasmonic acid-dependent induced defenses in Arabidopsis. *BMC Plant Biol* *10*, 199.
- Ranocha, P., McNeil, S.D., Ziemak, M.J., Li, C., Tarczynski, M.C., and Hanson, A.D.** (2001). The S-methylmethionine cycle in angiosperms: ubiquity, antiquity and activity. *The Plant journal : for cell and molecular biology* *25*, 575-584.
- Ravanel, S., Block, M.A., Rippert, P., Jabrin, S., Curien, G., Rebeille, F., and Douce, R.** (2004). Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. *J Biol Chem* *279*, 22548-22557.
- Ravanel, S., Cherest, H., Jabrin, S., Grunwald, D., Surdin-Kerjan, Y., Douce, R., and Rebeille, F.** (2001). Tetrahydrofolate biosynthesis in plants: molecular and functional characterization of dihydrofolate synthetase and three isoforms of folylpolyglutamate synthetase in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 15360-15365.
- Ravanel, S., Gakiere, B., Job, D., and Douce, R.** (1998). The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 7805-7812.
- Rébeillé, F., Macherel, D., Mouillon, J.M., Garin, J., and Douce, R.** (1997). Folate biosynthesis in higher plants: purification and molecular cloning of a bifunctional 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase/7,8-dihydropteroate synthase localized in mitochondria. *The EMBO journal* *16*, 947-957.
- Rébeillé, F., Ravanel, S., Samuel Jabrin, S., Douce, R., Storozhenko, S., and Van Der Straeten, D.** (2006). Foliates in plants: biosynthesis, distribution, and enhancement. *Physiologia Plantarum* *126*, 330-342.
- Reyes-Hernández, B.J., Srivastava, A.C., Ugartechea-Chirino, Y., Shishkova, S., Ramos-Parra, P.A., Lira-Ruan, V., Díaz de la Garza, R.I., Dong, G., Moon, J.C., Blancaflor, E.B., et al.** (2014). The root indeterminacy-

to-determinacy developmental switch is operated through a folate-dependent pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The New phytologist* *202*, 1223-1236.

**Rocha, P.S., Sheikh, M., Melchiorre, R., Fagard, M., Boutet, S., Loach, R., Moffatt, B., Wagner, C., Vaucheret, H., and Furner, I.** (2005). The *Arabidopsis* HOMOLOGY-DEPENDENT GENE SILENCING1 gene codes for an S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase required for DNA methylation-dependent gene silencing. *Plant Cell* *17*, 404-417.

**Rodríguez, V., Chen, Y., Elkahloun, A., Dutra, A., Pak, E., and Chandrasekharappa, S.** (2007). Chromosome 8 BAC array comparative genomic hybridization and expression analysis identify amplification and overexpression of TRMT12 in breast cancer. *Genes, chromosomes & cancer* *46*, 694-707.

**Roje, S.** (2006). S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* *67*, 1686-1698.

**Różanowska, M.o., Ciszewska, J., Korytowski, W., and Sarna, T.** (1995). Rose-bengal-photosensitized formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* *29*, 71-77.

**Sahr, T., Ravanel, S., and Rébeillé, F.** (2005). Tetrahydrofolate biosynthesis and distribution in higher plants. *Biochem Soc Trans* *33*, 758-762.

**Sauter, M., Moffatt, B., Saechao, M.C., Hell, R., and Wirtz, M.** (2013). Methionine salvage and S-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. *Biochem J* *451*, 145-154.

**Scheible, W.R., Eshed, R., Richmond, T., Delmer, D., and Somerville, C.** (2001). Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in *Arabidopsis* Ixr1 mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 10079-10084.

**Schneider, D.J., and Collmer, A.** (2010). Studying plant-pathogen interactions in the genomics era: beyond molecular Koch's postulates to systems biology. *Annu Rev Phytopathol* *48*, 457-479.

**Schreiber, K., Ckurshumova, W., Peek, J., and Desveaux, D.** (2008). A high-throughput chemical screen for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* *54*, 522-531.

**Schreiber, S.L.** (1998). Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry. *Bioorganic & medicinal chemistry* *6*, 1127-1152.

- Scott, J., Rébeillé, F., and Fletcher, J.** (2000). Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *J Sci Food Agric* *80*, 795-824.
- Seyfferth, C., and Tsuda, K.** (2014). Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Front Plant Sci* *5*, 697.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E., and Innes, R.W.** (2003). Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. *Science (New York, NY)* *301*, 1230-1233.
- Shen, B., Li, C., and Tarczynski, M.C.** (2002). High free-methionine and decreased lignin content result from a mutation in the Arabidopsis S-adenosyl-Lmethionine synthetase 3 gene. *Plant J* *29*, 371-380.
- Shen, Y., Issakidis-Bourguet, E., and Zhou, D.X.** (2016). Perspectives on the interactions between metabolism, redox, and epigenetics in plants. *J Exp Bot* *67*, 5291-5300.
- Shetty, N.P., Jørgensen, H.J.L., Jensen, J.D., Collinge, D.B., and Shetty, H.S.** (2008). Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology* *121*, 267-280.
- Slaughter, A., Daniel, X., Flors, V., Luna, E., Hohn, B., and Mauch-Mani, B.** (2012). Descendants of primed Arabidopsis plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant Physiol* *158*, 835-843.
- Smukste, I., and Stockwell, B.R.** (2005). Advances in chemical genetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* *6*, 261-286.
- Spoel, S.H., Johnson, J.S., and Dong, X.** (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 18842-18847.
- Srivastava, A.C., Ramos-Parra, P.A., Bedair, M., Robledo-Hernandez, A.L., Tang, Y., Sumner, L.W., Diaz de la Garza, R.I., and Blancaflor, E.B.** (2011). The folylpolyglutamate synthetase plastidial isoform is required for postembryonic root development in Arabidopsis. *Plant Physiol* *155*, 1237-1251.
- Stockwell, B.R.** (2000). Chemical genetics: ligand-based discovery of gene function. *Nat Rev Genet* *1*, 116-125.
- Storozhenko, S., De Brouwer, V., Volckaert, M., Navarrete, O., Blancquaert, D., Zhang, G.F., Lambert, W., and Van Der Straeten, D.**

(2007a). Folate fortification of rice by metabolic engineering. *Nat Biotechnol* *25*, 1277-1279.

**Storozhenko, S., Navarrete, O., Ravanel, S., De Brouwer, V., Chaerle, P., Zhang, G.F., Bastien, O., Lambert, W., Rebeille, F., and Van Der Straeten, D.** (2007b). Cytosolic hydroxymethyl-dihydropteridine pyrophosphokinase/dihydropteroyl synthase from *Arabidopsis thaliana*: a specific role in early development and stress response. *J Biol Chem* *282*, 10749-10761.

**Takano, K., Nakagawa, E., Inoue, K., Kamada, F., Kure, S., and Goto, Y.** (2008). A loss-of-function mutation in the FTSJ1 gene causes nonsyndromic X-linked mental retardation in a Japanese family. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* *147b*, 479-484.

**Thompson, D.M., Lu, C., Green, P.J., and Parker, R.** (2008). tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *Rna* *14*, 2095-2103.

**Thompson, D.M., and Parker, R.** (2009). Stressing out over tRNA cleavage. *Cell* *138*, 215-219.

**Ton, J., and Mauch-Mani, B.** (2004). Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. *The Plant journal : for cell and molecular biology* *38*, 119-130.

**Tornero, P., Conejero, V., and Vera, P.** (1996). Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 6332-6337.

**Torres, M.A.** (2010). ROS in biotic interactions. *Physiol Plant* *138*, 414-429.

**Torres, M.A., Jones, J.D., and Dangl, J.L.** (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* *141*, 373-378.

**Toth, R., and van der Hoorn, R.A.** (2010). Emerging principles in plant chemical genetics. *Trends Plant Sci* *15*, 81-88.

**Uknes, S., Morris, S., Vernooij, B., and Ryals, J.** (1996). The Role of Benzoic Acid Derivatives in Systemic Acquired Resistance. In *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions*, J.T. Romeo, J.A. Saunders, and P. Barbosa, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 253-263.



- Üstün, S., Sheikh, A., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A., Ntoukakis, V., and Börnke, F.** (2016). The Proteasome Acts as a Hub for Plant Immunity and Is Targeted by *Pseudomonas* Type III Effectors. *Plant Physiology* *172*, 1941-1958.
- Van der Hoorn, R.A., De Wit, P.J., and Joosten, M.H.** (2002). Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci* *7*, 67-71.
- van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.** (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* *44*, 135-162.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., and Klessig, D.F.** (2009). Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* *47*, 177-206.
- Vorwerk, S., Somerville, S., and Somerville, C.** (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci* *9*, 203-209.
- Walden, T.L., Jr., Howes, N., and Farkas, W.R.** (1982). Purification and properties of guanine, queuine-tRNA transglycosylase from wheat germ. *J Biol Chem* *257*, 13218-13222.
- Walsh, D.P., and Chang, Y.-T.** (2006). Chemical Genetics. *Chem Rev* *106*, 2476-2530.
- Walsh, T.A., Neal, R., Merlo, A.O., Honma, M., Hicks, G.R., Wolff, K., Matsumura, W., and Davies, J.P.** (2006). Mutations in an auxin receptor homolog AFB5 and in SGT1b confer resistance to synthetic picolinate auxins and not to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* *142*, 542-552.
- Wang, X., and He, C.** (2014). Dynamic RNA modifications in posttranscriptional regulation. *Molecular cell* *56*, 5-12.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* *414*, 562-565.
- Wilkinson, M.L., Crary, S.M., Jackman, J.E., Grayhack, E.J., and Phizicky, E.M.** (2007). The 2'-O-methyltransferase responsible for modification of yeast tRNA at position 4. *Rna* *13*, 404-413.
- Wilson, I.D., Neill, S.J., and Hancock, J.T.** (2008). Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, cell & environment* *31*, 622-631.

- Wirtz, M., and Droux, M.** (2005). Synthesis of the sulfur amino acids: cysteine and methionine. *Photosynth Res* *86*, 345-362.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J.Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I.D., De Luca, V., and Despres, C.** (2012). The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell reports* *1*, 639-647.
- Xin, X.F., and He, S.Y.** (2013). *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. *Annu Rev Phytopathol* *51*, 473-498.
- Yan, S., and Dong, X.** (2014). Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Curr Opin Plant Biol* *20*, 64-68.
- Yewdell, J.W., Anton, L.C., and Bennink, J.R.** (1996). Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *157*, 1823-1826.
- Yi, S.Y., Shirasu, K., Moon, J.S., Lee, S.G., and Kwon, S.Y.** (2014). The activated SA and JA signaling pathways have an influence on flg22-triggered oxidative burst and callose deposition. *PloS one* *9*, e88951.
- Yu, A., Lepere, G., Jay, F., Wang, J., Bapaume, L., Wang, Y., Abraham, A.L., Penterman, J., Fischer, R.L., Voinnet, O., et al.** (2013). Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in Arabidopsis antibacterial defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 2389-2394.
- Zeier, J.** (2013). New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant, cell & environment* *36*, 2085-2103.
- Zhang, H., Deng, X., Miki, D., Cutler, S., La, H., Hou, Y.J., Oh, J., and Zhu, J.K.** (2012). Sulfamethazine suppresses epigenetic silencing in Arabidopsis by impairing folate synthesis. *Plant Cell* *24*, 1230-1241.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S.W.L., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., et al.** (2006). Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis. *Cell* *126*, 1189-1201.
- Zheng, X.Y., Spivey, N.W., Zeng, W., Liu, P.P., Fu, Z.Q., Klessig, D.F., He, S.Y., and Dong, X.** (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell host & microbe* *11*, 587-596.
- Zhou, H.-R., Zhang, F.-F., Ma, Z.-Y., Huang, H.-W., Jiang, L., Cai, T., Zhu, J.-K., Zhang, C., and He, X.-J.** (2013). Folate Polyglutamylation Is Involved in

Chromatin Silencing by Maintaining Global DNA Methylation and Histone H3K9 Dimethylation in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25, 2545-2559.

**Zipfel, C.** (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends in immunology* 35, 345-351.



# AGRADECIMIENTOS

Este apartado lo empiezo igual que todos los demás... Con ese "miedo" a ver la página en blanco y no saber bien cómo y por dónde empezar, saber incluso si es relevante ponerlo y si es, no olvidar decir nada importante. Así que, siguiendo un gran consejo que me dieron para la tesis: "Tú empieza a escribir ideas y de todo lo que quieres contar, que al final acabara cogiendo forma".

Y el caso es que tengo mucho que agradecer, porque en esta travesía de la tesis son muchas personas las que te acompañan y de las que puedes aprender. Obviamente muchísimo de ciencia, pero también un poco sobre maduración personal. Y, aunque ya se lo he dicho alguna vez, creo que se merecen el reconocimiento en esta gran aventura y el agradecimiento de nuevo por su ayuda.

En primer lugar, a mi director de tesis, Pablo Vera, por confiar siempre en mí y ofrecerme la oportunidad de realizar la Tesis doctoral en su laboratorio, donde he podido formarme como investigadora. Trabajando aquí he aprendido todos los conocimientos que ahora sé de ciencia, y han sentado una buena base para continuar mi formación. Gracias por estos 6 años, en los que he podido trabajar haciendo lo que me gusta, de lo que disfruté estudiando y además sin tenerme que ir lejos de casa. No todos tienen esa suerte.

Así que, mis mayores palabras de agradecimiento también a todos mis compañer@s de laboratorio, y que han sido muchos, con los que he coincidido en todos estos años. Pasando tanto tiempo entre estas paredes blancas, habéis sido como mi segunda familia y me llevo grandes y muy buenos recuerdos. Me habéis enseñado a manejarme en este laboratorio y habéis compartido conmigo vuestra experiencia en la ciencia. Gracias! Con vosotros he compartido además muchos momentos de alegría, frustración, diversión, tristeza, confidencias, aprendizaje... Vamos el cóctel de emociones típicos de una tesis! Muchas gracias por todo lo que me habéis aportado, ayudado, soportado... En especial me gustaría dedicar unas palabras a las

personas que en los últimos años han sido tan importantes en mi día a día laboral. Javi y Lourdes, habéis sido casi mis gurús espirituales aquí dentro. Muchas gracias de verdad por toda vuestra ayuda, en cualquiera de sus formas, científica y personal. Me guardo bien todos vuestros consejos, lo aprendido de vuestra experiencia y las risas compartidas. Carlos y María, muchas gracias por todo lo que he podido aprender con vosotros en el laboratorio, por vuestra gran ayuda también y por escucharme. Con vosotros además he reído y disfrutado muchos momentos fuera del trabajo: estudiando, deporte, cine y frikismos varios. Y bueno, a Bego, la técnico forever and ever de este laboratorio ;) Gracias por tu ayuda y ánimo durante la tesis. Me habéis dado muchísimo apoyo en estos meses de escritura, aguantándome en uno de esos peores momentos de la tesis... Gracias!

Por supuesto, agradecer a toda la gente que trabaja en el IBMCP: los diferentes laboratorios, personal de todos los servicios, personal del invernadero y personal de mantenimiento, limpieza y seguridad, por promover la ciencia y mantener el centro. Gracias a ellos, he podido hacer también aquí mi tesis muy a gusto. En especial, a los compañeros de la planta cero, por hacer la rutina laboral mucho más llevadera y divertida, con esos grandes encuentros por los pasillos. Y gracias a todas esas personas con las que he hablado y compartido ciencia y doctorado, y con las que he colaborado trabajando en investigación al realizar el trabajo de esta tesis. Porque me ha permitido aprender y evolucionar. Gracias también a la financiación recibida con la que he podido realizar esta tesis, con el Programa Prometeo2010/020, la ayuda predoctoral VALi+d y el proyecto BFU2015-68199-R.

Y aquí unas pequeñas palabras a mi fisio, por simplemente ser tan bueno en su trabajo y por sus consejos para llevar una vida más relajada. Me han venido geniales esas sesiones durante el doctorado.

Y qué decir de las personas que te acompañan en tu vida, ajenas a este mundo de locos y frikis. Porque aunque a veces les cuesta entender el trabajo del doctorando y lo que conlleva hacer una tesis, te quieren y apoyan como los que más. Siempre he valorado mucho que se mantengan siempre ahí conmigo, aunque no haya podido dedicarles todo el tiempo que se merecen, cuando era absorbida por el laboratorio...

Por eso, gracias a mis amigos de siempre. Por continuar nuestra amistad, por siempre buscar un hueco, por apoyarme en todo momento y compartir muchos ratos de felicidad. Por suerte estamos hechos a prueba de km! Gracias por estar ahí!

Gracias a los amigos del mundo del baile. Habéis sido mi recarga de energía en todo momento, mi vía de escape. Con vosotros he vivido, aprendido juntos todos los valores que te enseña el baile y disfrutado de verdad. Y el baile me ha permitido conocer a muchas personas que han sido y son importantes en mi vida, pero poder manteneros cerca es una gran suerte. En especial a toda la gente de la compañía de la UPV y de Eledance. Podría decir que habéis sido mi otra casa. Os habéis preocupado siempre de mí, y no sólo en los ensayos. Os guardo mucho cariño. De verdad, muchísimas gracias por hacerme sentir que formo parte de algo tan especial.

Y gracias a Joan, el arquitecto al que llamaré cuando me haga una casa! ;) Gracias por el diseño tan genial de la portada de la tesis. Plasmaste perfectamente y de forma sencilla la idea que tenía en la cabeza.

Gracias también a Eva y Miguel, mis grandes compañeros de piso. Vuestro apoyo y ayuda es incalculable. Porque a pesar de que hemos estado muchas temporadas que casi ni coincidíamos con los horarios, he sentido con vosotros un hogar. Risas, conversaciones, paseos... Gracias!!

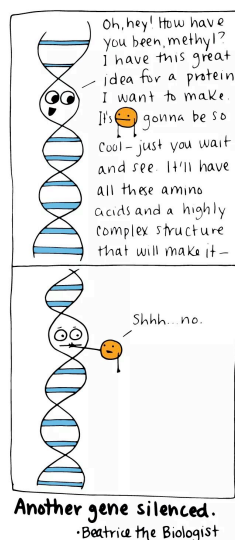
También quiero dedicar unas palabras a las personas con las que compartí una de las mejores experiencias de mi vida, el viaje de voluntariado a Tanzania del año pasado. Mzungus, hicisteis que todo fuera inolvidable y único. Nos unió algo simplemente genial! La gente que conocimos allí nos hizo valorar lo realmente importante en la vida. Y fue de mucha ayuda para aprender a ver las cosas con un poco más de perspectiva, lo cual me vino muy bien también para ese momento final de tesis. Asante sana!!

Y bueno, qué decir de mi familia!! Simplemente a ellos les debo esta tesis, y todo. Me faltan palabras de agradecimiento. De verdad, sin vosotros no hubiera podido conseguirlo, porque sois mi punto de apoyo, la fuerza para seguir y de querer siempre mejorar. Sois mi Dory, siempre susurrando: sigue nadando, sigue nadando! Una gran parte de este libro es vuestro.

Papá y mamá, gracias por ser y por estar, por vuestra educación, por darme tanto. Y gracias por hacerme el mejor regalo que pudisteis, mis dos hermanos. Luismi y Cris, me habéis cuidado y apoyado en todo momento. Gracias por ayudarme con todas mis dudas y por compartir vuestra experiencia conmigo. Valéis muchísimo y es un orgullo que seáis mis hermanos.

En resumen, gracias a todas esas personas, que sepan que han aportado su granito de arena, porque han contribuido a que pudiera sacar adelante mi objetivo, aprendiendo y disfrutando por el camino.

Y ya que parece que esta parte será la única leída por todas las personas que tengan en sus manos este libro, aprovecho para decir, a todo aquel que se plantee hacer una tesis o que esté empezando (Miguel, esto va por ti ; ) ), algo que he sacado de todo esto: Al menos para mí, la tesis es una gran reflexión de todas las emociones que podrán venirte en la vida. Creo que pocos trabajos te preparan tanto. Hay que aprovecharlo. Así que, haz algo simultáneo a la tesis que te haga feliz también y te desconecte; y cuando las cosas peor se pongan, recuerda la ilusión y por qué empezaste, porque siempre se puede intentar una vez más. Además, siempre habrán por ahí chistes frikis con los que pasar el rato, verdad 0.04? ;)



“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad” (Albert Einstein)