

ARTÍCULO DE REVISIÓN / REVIEW ARTICLE

METODOLOGÍAS PARA EL ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES PROTEICAS Y APLICACIONES EN EL CASO DE LA RELACIÓN PLANTA-BACTERIA

Methodologies Employed in the Study of Protein Interactions and Applications in the Case of Plant-bacteria Relationship

Camilo Ernesto LÓPEZ^{1*}

¹ Departamento Biología, Facultad Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Cra 30 No 45-03, Bogotá, Colombia.

* celopezc@unal.edu.co

Recibido: 25 de octubre de 2021. **Revisado:** 28 de marzo 2022. **Aceptado:** 08 de agosto de 2022.

Associate editor: Hernán Mauricio Romero

Citation/ citar este artículo como: López, C. (2024). Metodologías para el estudio de las interacciones proteicas y aplicaciones en el caso de la relación planta-bacteria. *Acta Biol Colomb*, 29(1), 5-15. <https://doi.org/10.15446/abc.v29n1.98597>

RESUMEN

La maquinaria que permite el correcto funcionamiento celular involucra principalmente proteínas. Para cumplir con sus actividades, las proteínas establecen interacciones entre ellas. Para su estudio se han empleado principalmente las técnicas de doble híbrido de levaduras, co-immunoprecipitación, GST pull-down, localización celular, BiFC y FRET. En esta revisión se presenta una descripción de estas metodologías. Además se presenta, a manera de caso de estudio, una breve descripción de cómo la aplicación de estas metodologías ha permitido ahondar en el conocimiento de los mecanismos que se activan durante la relación que establecen las plantas con las bacterias fitopatógenas.

Palabras clave: anticuerpos, bio-moléculas, inmunidad, patógeno, proteína fusión.

ABSTRACT

Proteins are the molecular machinery that allows the correct functioning of the cells. To achieve these functions, proteins establish interaction between them. There are several molecular techniques to understand the interactions, such as yeast-two-hybrid, co-immunoprecipitation, GST pull-down, cell localization, BiFC, and FRET. This review presents a general description of these technologies and a brief explanation of how their application expanded the knowledge of the mechanisms activated during the interactions between plants and their bacterial pathogens.

Keywords: antibody, biomolecules, immunity, pathogen, fusion protein.

INTRODUCCIÓN

Los organismos vivos se diferencian de la materia inerte por la naturaleza química de sus componentes, que reciben el nombre de bio-moléculas. Entre ellas se encuentran cuatro grupos principales: los carbohidratos, los lípidos, los ácidos nucleicos y las proteínas. La maquinaria molecular que permite el funcionamiento celular esta formada, principalmente por proteínas (Watson et al., 2004). Las proteínas son esenciales y participan en cada uno de los procesos celulares y son elementos clave para los mecanismos de la replicación, transcripción y traducción del ADN, así como del proceso de división celular. Muchos procesos fisiológicos, incluidos las respuestas de los organismos a los diferentes estreses bióticos y abióticos, implican cascadas de señalización en la cual intervienen un amplio grupo de moléculas tales como hormonas, pequeños ARN no codificantes, segundos mensajeros como el calcio o el óxido nítrico u otras moléculas de bajo peso molecular, especies de oxígeno reactivas,

etc. (Struk et al., 2019). La acción cooperativa y concertada de este conjunto de moléculas con las proteínas logra activar y regular los mecanismos implicados durante el crecimiento, desarrollo, diferenciación y adaptación de los seres vivos (Ben Rejebet al., 2014).

La complejidad biológica se deriva de un proceso combinatorio de interacciones entre las diferentes biomoléculas, destacándose en particular la que se lleva a cabo entre proteínas (Watson et al., 2004). Aunque existen casos es que las proteínas pueden cumplir sus funciones de manera independiente, la mayoría de las veces cumplen sus tareas biológicas a través de la interacción con otras proteínas (Alberts, 1998). Para comprender a cabalidad la función de una proteína determinada, la información sobre su actividad bioquímica, su localización celular y abundancia debe ser complementada con el conocimiento de las proteínas que interactúan con ella. Incluso, para el caso de proteínas de función desconocida, la identificación de sus interactores puede ayudar a predecir su función (Lalonde et al., 2008). Las interacciones entre proteínas están determinadas por parámetros cinéticos y termodinámicos, los cuales definen interacciones de alta afinidad y que presentan alta estabilidad, mientras que otras proteínas interactúan de manera dinámica y se caracterizan por uniones de baja afinidad (Lalonde et al., 2008). La comprensión de las redes de interacciones proteicas es fundamental para entender, no solo su función, sino también a nivel más amplio, los procesos celulares básicos y las respuestas complejas a nivel del organismo (Lampugnani et al., 2018).

Uno de los casos particulares en las cuales sobresale la función e importancia que tiene la interacción entre proteínas es la que se establece durante la relación que presentan las plantas con los microorganismos que las rodean. Este tipo de relación se puede considerar como un diálogo molecular que depende de las interacciones que se establezcan entre las proteínas presentes en unos y otros (Yuan et al., 2021). Dependiendo de ello se establecerá la posibilidad o no, de activar una respuesta de inmunidad, que será efectiva o no para contener la proliferación del microorganismo.

Teniendo en cuenta la importancia que representa el conocimiento sobre las interacciones proteicas, son varias las estrategias que existen al día de hoy para su estudio. Estas involucran desde técnicas clásicas, hasta otras que implican los desarrollos de las ciencias ómicas y aproximaciones bioinformáticas y computacionales (Lalonde et al., 2008; Lampugnani et al., 2018; Struk et al., 2018).

En esta revisión se abordarán las principales metodologías para el estudio de las interacciones proteína – proteína tanto a escala individual como global, terminando con la presentación del caso de la relación que establecen plantas y microorganismos, y como en la base de esta relación subyacen las interacciones entre proteínas.

DOBLE HÍBRIDO DE LEVADURAS

El sistema de doble híbrido de levaduras se basa en la naturaleza modular que presentan los factores de transcripción (FT) eucariotas (Paiano et al., 2019). Los FT poseen dos dominios funcional y estructuralmente bien diferenciados. El dominio de unión al ADN (del inglés Binding Domain, BD) se caracteriza por presentar una conformación estructural característica y puede ser agrupados en diferentes tipos como dedos de zinc, cremalleras de leucina u homeodominio (Watson et al., 2004). El dominio de activación de la transcripción (del inglés Activation Domain, AD) no siempre poseen una conformación tridimensional definida y se agrupan teniendo en cuenta el contenido de aminoácidos (Watson et al., 2004). Si estos dos dominios interactúan físicamente pueden reconstituir un FT funcional, permitiendo la expresión del (los) gene(s) que se encuentra(n) bajo su control (Paiano et al., 2019). El BD corresponde a la parte de la proteína encargada de unirse a los elementos del promotor del gen blanco o UAS (del inglés Upstream Activation Sequences). Por otro lado, el AD se encarga de interactuar con la maquinaria de transcripción y así regular la producción de moléculas de ARNm (Lampugnani et al., 2018).

El mecanismo de acción modular de los FT permite construir plásmidos, en los cuales la secuencia codificante de cada uno de estos dos dominios es clonada de manera independiente (Fig. 1). En estos plásmidos se insertan cada una de las regiones codificantes de las proteínas bajo estudio (Finley y Mairiang, 2018). Así por ejemplo, si se quiere determinar si la proteína X interactúa con la proteína Y, la secuencia codificante de cada una de ellas se introduce de manera independiente, una en el plásmido que contiene el AD y la otra en el BD (Rodríguez-Negrete et al., 2014). Es importante tener en cuenta que la clonación debe hacerse manteniendo el marco de lectura de tal manera que se produzca una proteína fusión. Vale la pena considerar que el estudio se puede llevar a cabo no necesariamente con toda la proteína sino cubriendo regiones de ella o con aquellas porciones que representen dominios estructurales particulares (Finley y Mairiang, 2018). Una vez realizadas estas construcciones, se introducen los plásmidos en levaduras en donde ocurre el proceso de transcripción y traducción. Si las proteínas X y Y interactúan dentro de la misma levadura, se restablece la función del FT y se lleva a cabo la expresión de un gen reportero presente en el genoma de la levadura (Paiano et al., 2019) (Fig. 1). Si, por el contrario, X no interactúa con Y, los dominios AD y BD no se encuentran físicamente cerca uno del otro y por lo tanto el FT no es reconstituido y no se expresa el gen reportero (Fig. 1). Como el experimento se realiza en levaduras e implica el uso de dos plásmidos, se le ha dado el nombre de ensayo de doble híbrido en levaduras (Y2H del inglés Yeast Two Hybrid).

El procedimiento para determinar si las proteínas X y Y interactúan inicia con la clonación de los genes que codifican para las proteínas X y Y en los plásmidos antes mencionados. Posteriormente cada uno de ellos es introducido en cepas de

levadura particulares. Uno de ellos se introduce en una levadura tipo α mientras que el segundo plásmido se introduce en la levadura tipo β (Fig. 1) (Clontech, 2009). La introducción se puede hacer mediante electroporación o por transformación química (Rodríguez-Negrete et al., 2014). Para comprobar la presencia de los plásmidos de manera individual en cada tipo o cepa de levadura, estos plásmidos poseen genes marcadores que codifican para enzimas implicadas en el proceso de biosíntesis de algún aminoácido (Clontech, 2009). Para seleccionar aquellas levaduras que han recibido el plásmido, éstas se crecen en un medio que carece de los aminoácidos correspondientes. De esta forma solo las levaduras que reciben el plásmido que contiene el gen de biosíntesis del aminoácido que esta ausente en el medio, pueden crecer y formar colonias aisladas (Paiano et al., 2019).

Posteriormente, las levaduras α y β que contienen los dos plásmidos de manera individual se someten a un proceso de apareamiento, generando levaduras diploides ($2n$) de tipo α/β que portan los dos plásmidos (Clontech, 2009). Estas levaduras se crecen nuevamente en un medio que carece de los dos aminoácidos usados para selección, permitiendo corroborar la presencia de los dos plásmidos en la misma célula de levadura (Rodríguez-Negrete et al., 2014). Finalmente, para determinar la interacción de X y Y, generalmente el FT reconstituido permite la expresión de un par de genes adicionales que están involucrados en la biosíntesis de otro par de aminoácidos que no se encuentran presentes en el medio de crecimiento de las levaduras (Clontech, 2009). Si las levaduras crecen en este medio es porque las dos proteínas interactúan y reconstituyen el FT, permitiendo la expresión de los dos genes de biosíntesis de aminoácidos (Fig. 1). Si por

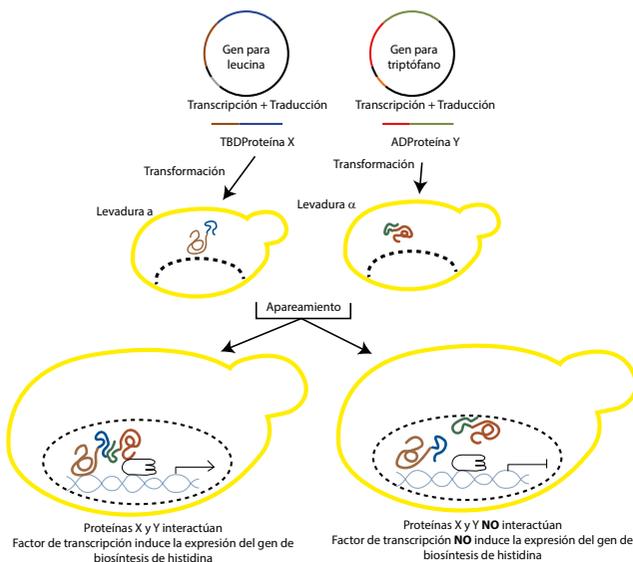


Figura 1. Determinación de la posible interacción entre las proteínas X y Y empleando el sistema de doble híbrido de levaduras. Los genes que codifican para estas proteínas son clonados en plásmidos que contienen el BD y el AD respectivamente de un Factor de Transcripción (ver detalles en el texto).

el contrario, las levaduras no son capaces de crecer en este medio carente de cuatro aminoácidos se concluye que no hay interacción (Rodríguez-Negrete et al., 2014). En ocasiones se emplea un gen reportero adicional no relacionado con la biosíntesis de aminoácidos. Se trata del gen reportero *lacZ*, el cual está bajo el control de un promotor que es reconocido por el FT. De esta manera si hay interacción entre las proteínas X y Y las levaduras tendrán un color azul cuando se crecen en un medio que posee el sustrato X-gal, el cual es degradado por la enzima β -galactosidasa codificada por el gen *lacZ* (Xing et al., 2016).

El sistema de doble híbrido tal y como se ha descrito, permite contestar la pregunta ¿la proteína X interactúa con la proteína Y? En cuyo caso se conoce tanto la identidad (y secuencia) de las dos proteínas bajo estudio. Sin embargo, en ocasiones la pregunta biológica puede ser del tipo: conociendo la proteína X, ¿con quién interactúa? En este caso, también se puede emplear el sistema de Y2H. Para ello la secuencia que codifica para la proteína X se clona en uno de los plásmidos, puede ser el que contiene el AD, por ejemplo. En paralelo se construye una librería de ADNc en el segundo plásmido, en este caso el que contiene el BD (Xing et al., 2016) (Fig. 2). De esta manera se puede realizar un tamizaje para determinar con cuál de las proteínas codificadas por los ARNm presentes en la célula a partir del cual se realizó la librería de ADNc interactúa la proteína X. De esta manera se debe disponer de alguna información o premisa que permita establecer bajo qué condiciones se debe extraer el ARN para construir la librería de ADNc y así aumentar la probabilidad de que el transcrito que codifica para la proteína interactuante esté presente (Xing et al., 2016). En muchos casos es difícil asegurar esta situación y se puede recurrir a agrupar ARNs extraídos bajo diferentes condiciones o de diferentes tejidos. Como resultado se tiene un conjunto de levaduras cada una de las cuales contiene un plásmido en el cual se ha clonado un ARNm (ADNc) codificante para una proteína (Fig. 2). A este conjunto de levaduras (librería de ADNc en levadura), también por apareamiento se le incorpora el plásmido conteniendo el gen que codifica para la proteína X. Posteriormente estas levaduras se seleccionan en un medio que carece de los cuatro aminoácidos, tal como se describió anteriormente (Clontech, 2009). Solo las levaduras en las cuales se establece una interacción entre la proteína X y alguna de las codificadas por los ARNm presentes en la librería pueden crecer en el medio de selección (Fig. 2). Para identificar cuál es la proteína que interactúa, los plásmidos de estas levaduras se extraen, y empleando primers específicos del plásmido en el cual se ha clonado la librería de ADNc se puede secuenciar el inserto, determinando de esta manera cuál o cuáles son las proteínas que interactúan con X (Clontech, 2009).

Las grandes ventajas que ofrece el sistema Y2H es que es relativamente fácil de implementar en un laboratorio de biología molecular, los protocolos son sencillos y no requieren equipos costosos (Xing et al., 2016; Lampugnani et al., 2018). Sin embargo, tiene limitaciones serias, siendo

la más importante de ellas la necesidad de que las proteínas bajo estudio se localicen en el núcleo. Esto hace que por ejemplo proteínas de membranas no sean susceptibles de ser estudiadas por Y2H o que requieran ser modificadas para forzar su localización nuclear. Para resolver este tipo de dificultad se ha desarrollado el sistema de división de ubiquitina (“*split ubiquitin*”) en donde la interacción entre las dos proteínas de membrana reconstituye la ubiquitina, permitiendo la activación de una proteasa que libera un factor de transcripción (Struk et al., 2019). Otro caso lo constituyen las proteínas citoplasmáticas muy grandes que no pueden atravesar el poro nuclear y entonces tampoco son susceptibles de ser estudiadas bajo el Y2H. Aunque se puede trabajar con solo regiones o dominios de las proteínas es necesario asegurar que continúen siendo funcionales (Xing et al., 2016). Otra desventaja del sistema es que no permite identificar interacciones débiles o transitorias, así como tampoco permite la detección de los componentes dentro de un complejo multiproteico, aunque una nueva alternativa basada en Y2H ha sido recientemente desarrollada para superar esta última dificultad (Struk et al., 2019).

CO-IMMUNOPRECIPITACIÓN

La co-immunoprecipitación (Co-IP) es una metodología empleada en el estudio e identificación de interacciones proteicas que emplea anticuerpos dirigidos específicamente

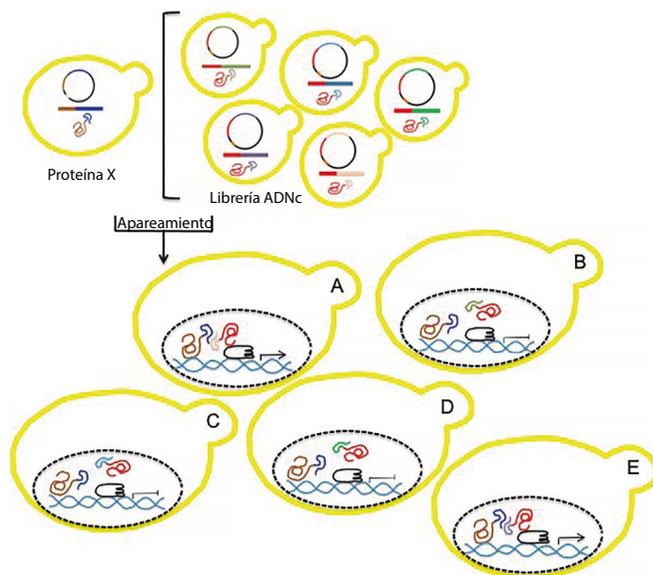


Figura 2. Identificación de las proteínas que interactúan con la proteína X mediante análisis de doble híbrido. El gen que codifica para la proteína de interés se clona en uno de los plásmidos de doble híbrido, en este caso el BD (tal como se indicó en la Figura 1). En paralelo se construye una librería de ADNc a partir de ARNm extraído del tejido del organismo bajo estudio, en el vector que contiene el AD (ver detalles en el texto).

hacia la(s) proteína(s) de interés (Speth et al., 2014). En este caso se busca identificar ya sea si una proteína determinada interactúa con una proteína de interés o, alternativamente, saber cuáles proteínas interactúan con dicha proteína.

El experimento inicia con el lisado celular o con la mezcla de proteínas en la cual se presentan las interacciones proteicas nativas. Para mantener este tipo de interacciones es necesario estabilizar dichas interacciones, las cuales se pueden deshacer como consecuencia de la manipulación experimental (Barberini y Muschietti, 2017). La mezcla de proteínas es incubada con un primer anticuerpo dirigido hacia la proteína de interés. Posteriormente se realiza una centrifugación que va a precipitar el complejo del anticuerpo con la proteína objeto de estudio unida a todas las proteínas con quien interactúa. Las proteínas que no hagan parte de este complejo quedan en el sobrenadante, son lavadas y eliminadas mediante el empleo de detergentes adecuados y/o bajo condiciones de sales particulares (Xing et al., 2016). Posteriormente el precipitado es resuspendido y analizado de acuerdo a la pregunta que se tenga. Si el interés es saber si una proteína dada (Y en este caso) está interactuando con la proteína de interés (X, por ejemplo), se realizará un western-blot empleando un anticuerpo que reconozca la proteína Y. Si se detecta una banda significa que al precipitar la proteína X con el anticuerpo anti-X se arrastró igualmente a la proteína Y, en consecuencia, se puede detectar en el western-blot con un anticuerpo anti-Y. Si el western-blot no muestra la presencia de la banda empleando el anticuerpo anti-Y significa que X y Y no interactúan (Barberini y Muschietti, 2017). Es necesario para todos estos casos incluir los adecuados controles negativos en los que se observe la correcta precipitación de la proteína y la presencia de las dos proteínas en los extractos celulares (Lampugnani et al., 2018).

Alternativamente se puede querer determinar la identidad de las proteínas que interactúan con X (Struk et al., 2019). Es decir, no se tiene información o sospecha de las proteínas con que X interactúa y en consecuencia no se pueden desarrollar anticuerpos dirigidos hacia dichas proteínas que se desconocen. En este caso se realiza de igual manera la precipitación de X con el anticuerpo específico y el precipitado se analiza mediante estrategias de proteómica (Struk et al., 2019). Las proteínas precipitadas se digieren con tripsina y los productos son analizados mediante HPLC-acoplada a espectrometría de masas. El perfil espectrométrico permite determinar la secuencia parcial de la proteína identificando así la identidad de la proteína que interactúa con X (Kaboord y Per, 2008).

En muchos casos resulta difícil, laborioso y costoso disponer de anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas que se quieren estudiar. Una vía para superar esta dificultad es desarrollar proteínas fusión que contengan etiquetas para las cuales ya se han desarrollado anticuerpos, y están disponibles comercialmente (Struk et al., 2019). Así, si por ejemplo se quiere evitar desarrollar anticuerpos específicos contra la

proteína X, la secuencia codificante para esta proteína se clona en un plásmido que contenga la secuencia de la etiqueta (Struk et al., 2019). De tal manera que al producirse la proteína X esta llevará una pequeña porción de aminoácidos que serán reconocidos por un anticuerpo específico comercial (Barberini y Muschietti, 2017). Existen diferentes etiquetas para las cuales se han generado anticuerpos específicos, las más empleadas son HA (hemaglutinina), Myc, FLAG, His (cola de seis histidinas). De igual manera se pueden emplear las secuencias de marcaje fluorescente para las cuales también existen anticuerpos comerciales (Barberini y Muschietti, 2017). En este último caso las proteínas con etiquetas que permitan visualizar la proteína en la célula pueden ser utilizada en experimentos de Co-IP, ya que esas etiquetas permiten su detección con anticuerpos comerciales. En el caso de utilizar las proteínas, etiquetadas es necesario que las células las expresen, por lo cual las construcciones se realizan en plásmidos binarios que son introducidos en *Agrobacterium* y se llevan a cabo experimentos de expresión transitoria en hojas de tabaco (Lampugnani et al., 2018; Struk et al., 2019) (Fig. 3). De esta manera se emplea un sistema que recrea las condiciones más naturales posibles en donde se pueden llevar a cabo los procesos de modificaciones, localización, direccionamiento de las proteínas, así como se encuentran en el contexto celular en donde se encuentran los componentes requeridos para que se de la interacción (Struk et al., 2019). En este caso, transcurridas 48 horas de infiltración las hojas son colectadas y las proteínas extraídas para ser analizadas. En el caso que se quiera determinar si la proteína X interactúa con Y, cada una de ellas debe ser etiquetada de manera diferente. La construcción de X con una etiqueta, y la de Y con otra etiqueta, se transforman de manera independiente en *Agrobacterium* y pueden ser ya sea co-infiltradas de manera simultánea, o una posterior a la otra (Barberini y Muschietti, 2017). Para la precipitación se puede emplear el anticuerpo dirigido contra la etiqueta presente en la proteína X y para determinar la presencia de Y en el precipitado se emplea el anticuerpo dirigido contra la etiqueta que marca a la proteína Y, siendo visualizado de igual manera mediante un western-blot (Xing et al., 2016) (Fig. 3).

En algunos casos no es posible utilizar un sistema heterólogo de expresión transitoria como el de tabaco, ya que las respuestas o fenotipos observados no corresponden con lo que se espera según la especie bajo estudio (Struk et al., 2019). En estos casos es necesario, o bien utilizar anticuerpos específicos dirigidos contra la proteína que se quiere estudiar como se describió previamente, o alternativamente, generar plantas transgénicas que expresen de manera estable la construcción que contiene la proteína con la etiqueta (Struk et al., 2019).

Como se mencionó anteriormente, la gran ventaja de la Co-IP es que recrea las condiciones naturales de la célula en donde ocurre la interacción, sin embargo, esta técnica no solo permite dar información acerca de la interacción directa de las proteínas, sino que demuestra que ellas hacen parte de un complejo molecular. Adicionalmente,

esta técnica solo permite confirmar interacciones estables y fuertes (Xing et al., 2016).

GST-PULL DOWN

Una variación a la técnica de Co-IP consiste en realizar el estudio de interacción en células de *Escherichia coli*, por ejemplo, que son fácilmente cultivables y manipulables. En este caso se trata de una purificación por afinidad, en la cual la proteína conocida es marcada con Glutati6n-S-Transferasa (GST) el cual tiene alta afinidad por el Glutati6n (GSH) Sepharose, la cual es una resina ampliamente empleada en cromatografía (Kim y Hakoshima, 2019). De esta manera el complejo de la proteína marcada con GST unida a sus proteínas interactuantes es capturado sobre las perlas que est1n inmovilizadas en el glutati6n. Una vez realizados los lavados correspondientes y la liberaci6n de las proteínas de las esferas de glutati6n las proteínas son analizadas por western-blot, el cual permite identificar la proteína marcada con GST como las proteínas con que interactúan si son conocidas (Struk et al., 2019). Si las proteínas interactuantes son desconocidas, se pueden realizar análisis de prote6mica como los descritos en la secci6n de Co-IP. Dentro de las ventajas que caracterizan a esta técnica es que no requiere un equipo especializado y es relativamente f1cil de estandarizar. Sin embargo, las interacciones d6biles o transitorias no siempre pueden ser detectadas, y se requiere tener a disposici6n los anticuerpos adecuados (Lampugnani et al., 2018).

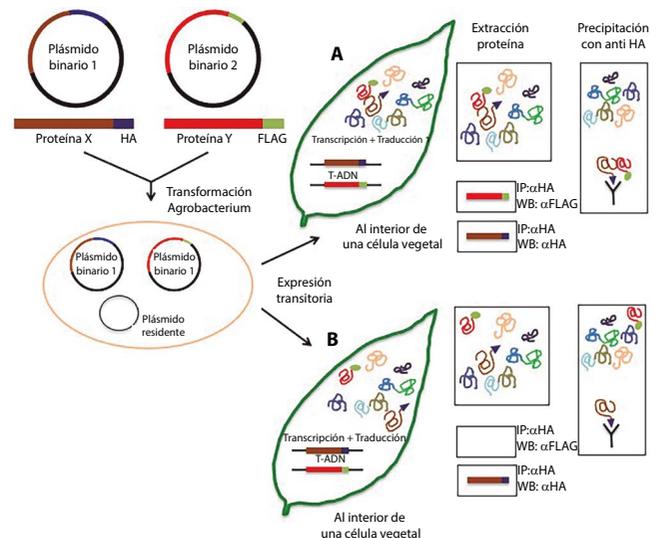


Figura 3. Determinación de la posible interacción entre las proteínas X y Y mediante Co-IP. Los genes que codifican para las proteínas X y Y son clonados en fusión con los epitopes para HA y FLAG respectivamente. A. Si las proteínas X y Y interactúan se debe detectar la presencia de la proteína marcada con α -FLAG. B. En el caso que las proteínas X y Y no interactúan se debe visualizar banda con α -HA pero no con α -FLAG (ver detalles en el texto).

CO-LOCALIZACIÓN

La co-localización es otra estrategia que permite considerar la mayor o menor probabilidad que tienen dos proteínas de interactuar. Es importante resaltar que si bien no permite demostrar una interacción física directa entre ellas dos, el hecho de que las dos proteínas se encuentren localizadas celularmente en el mismo compartimiento puede indicar una posible interacción. En este caso particular se deben generar proteínas fusión que permitan visualizar en que lugar de las células se ubican las proteínas. La manera de observar *in vivo* las proteínas dentro de la célula es utilizando marcajes con proteínas que a cierta longitud de onda emiten fluorescencia (Bolte y Cordelières, 2006). La primera proteína fluorescente identificada fue aquella que produce la medusa *Aequorea victoria*, la cual tiene un pico de excitación a 395nm dando una coloración verde brillante, por lo cual se ha denominado proteína verde fluorescente (GFP, del inglés Green Fluorescent Protein) (Chalfie, 1995). A partir de la identificación del gen responsable, se han desarrollado mutaciones que han permitido generar variantes de las proteínas que producen proteínas de colores como la EBFP (azul), ECFP (cian) y la YFP (amarillo) (Shaner et al., 2007). El procedimiento en este caso consiste en clonar en un plásmido el gen de interés justo al inicio o al final de la secuencia codificante correspondiente a alguna de las proteínas fluorescentes. De esta manera al expresarse dentro de las células vegetales se produce una proteína fusión la cual está marcada con fluorescencia ya sea en su extremo amino- o carboxi- terminal (Fig. 4). La orientación de esta etiqueta o marcaje es un factor importante para considerar ya que éste puede enmascarar algún péptido señal o superficies de interacción presentes en la proteína impidiendo la identificación de la correcta localización y/o la interacción con otras proteínas. La predicción bioinformática de la topología y la presencia de péptidos señal puede ayudar a tomar decisiones respecto a la posición del marcaje o etiqueta (Xing et al., 2016). El siguiente paso es introducir dicha construcción en las células vegetales. Para ello generalmente se emplea el sistema de expresión transitoria en tabaco. En este caso se emplea un plásmido binario el cual contiene la secuencia codificante de la proteína de interés fusionada a la secuencia de la proteína fluorescente en el ADN-T. Este plásmido binario se introduce en *Agrobacterium* y mediante infiltración en hojas de tabaco, el ADN-T es transferido y expresado de manera temporal. Generalmente 48 horas post-infiltración se toman las hojas para ser evaluadas mediante microscopía de fluorescencia (Xing et al., 2016). Para determinar la localización celular, ya sea en el núcleo, mitocondria, cloroplasto, o membrana, por ejemplo, se emplean proteínas marcadas a las que ya se conoce su localización celular. Usualmente la proteína de interés se marca con una fluorescencia, por ejemplo, verde, y la proteína marcadora con otra, amarillo, por ejemplo. De esta manera se pueden sobrelapar las dos imágenes y determinar si colocalizan por el color que emite (Zhong et al., 2017).

ENSAYO DE COMPLEMENTACIÓN BIOMOLECULAR DE LA FLUORESCENCIA (BIFC)

Esta es una de las técnicas que mayor aceptación experimental ha logrado en las últimas dos décadas (Kodama y Hu, 2012; Struk et al., 2019). Este ensayo se basa en la complementación estructural que se puede dar entre los extremos no fluorescentes N- y C- terminal de una proteína fluorescente (Xing et al., 2016; Struk et al., 2019). La base de BiFC es similar a la del funcionamiento de los FT descritos en el ensayo de doble híbrido. En este caso se ha demostrado que las proteínas fluorescentes pueden ser divididas y los dos fragmentos, que no son fluorescentes, son fusionados a las dos proteínas de interés para las cuales se sospecha que hay interacción (Xing et al., 2016; Struk et al., 2019). Si las proteínas de interés interactúan, los extremos N- y C- terminal de la proteína fluorescente se encuentran en cercanía y se reconstituye una proteína fluorescente funcional, la cual puede ser detectada a través de un microscopio de fluorescencia (Kodama y Hu, 2012; Xing et al., 2016; Struk et al., 2019).

Experimentalmente, la manera de proceder es similar a la descrita en las secciones anteriores. Es decir, las secuencias codificantes de las proteínas de interés, X y Y por ejemplo, son clonadas en plásmido binarios que contienen las secuencias codificantes correspondientes al extremo N- y C- terminal de la proteína fluorescente (Walter et al., 2004; Xing et al., 2016). Estos plásmidos son introducidos en *Agrobacterium*, ya sea mediante ensayos de expresión transitoria en tabaco o por transformación genética estable, se puede hacer el seguimiento de la interacción, exponiendo las hojas

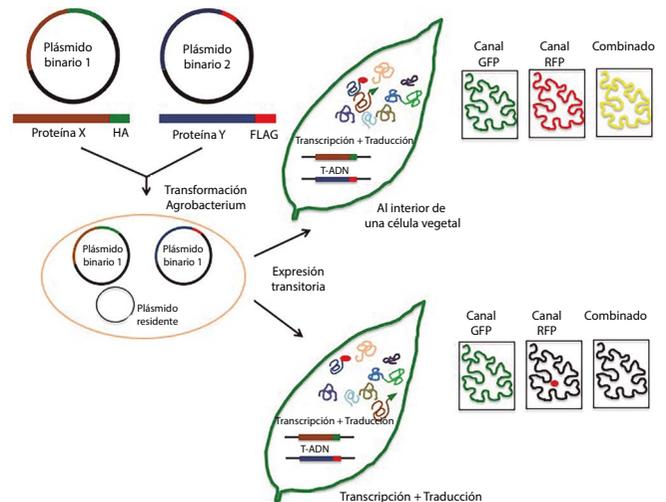


Figura 4. Determinación de la posible interacción entre las proteínas X y Y mediante co-localización celular. Los genes que codifican para las proteínas X y Y son clonados en fusión con las proteínas fluorescentes GFP y RFP respectivamente, en vectores binarios. A. Si las proteínas interactúan, al superponer las imágenes se observará una emisión de fluorescencia diferente. B. Si las proteínas no interactúan no se producirá un nuevo tipo de fluorescencia.

donde se ha hecho la agroinfiltración al microscopio de fluorescencia (Xing et al., 2016). Actualmente el número de proteínas fluorescentes disponibles para los ensayos de BiFC es bastante amplio, las cuales difieren en sus propiedades y espectro de fluorescencia, dentro de las cuales se destacan YFP, CFP, RFP (Xing et al., 2016). De manera similar a la Co-IP, en este tipo de técnica se recrean las condiciones celulares donde ocurren las interacciones siendo esta su principal ventaja. La principal desventaja es que en muchas ocasiones existe una tendencia a re-ensamblarse los dos fragmentos de la proteína fluorescente de manera espontánea generando falsos positivos (Xing et al., 2016)

TRANSMISIÓN DE ENERGÍA DE RESONANCIA O TRANSFERENCIA DE ENERGÍA DE RESONANCIA DE FÖRSTER (FRET)

El método FRET se basa en el mecanismo que describe la transferencia de energía entre dos cromóforos o moléculas que son sensibles a la luz dándole un color característico a la molécula (Förster, 2012). En varios casos los cromóforos pueden ser proteínas fluorescentes, pero esto no significa que la energía que se transfiere sea fluorescente. En esta aproximación se mide la relación de la fluorescencia entre la molécula aceptora y la donante. Para ello, en un canal se mide la ganancia en la intensidad de la fluorescencia en la molécula aceptora y en otro canal la pérdida de la intensidad de la molécula donante. Dentro de las moléculas aceptora/donante empleadas se encuentran la pareja CFP y YFP, las cuales se describieron en la sección de localización celular (Förster, 2012).

De manera similar a la descripción hecha en las secciones precedentes, el enfoque experimental consiste en clonar en un plásmido la región codificante de una de las proteínas de interés para que quede en fusión con la región codificante de una de las proteínas fluorescentes, ya sea la aceptora o la donante, por ejemplo, con CFP (Xing et al., 2016; Struk et al., 2019). En otro de los plásmidos se clona la proteína con la cual se sospecha que interactúa X, por ejemplo Y. Este plásmido contiene la secuencia de la otra proteína donador o receptor según corresponda, por ejemplo, YFP (Struk et al., 2019). Estas dos construcciones se pueden emplear en ensayos de expresión transitoria o también para transformar de manera transitoria protoplastos de células vegetales (Xing et al., 2016). Posteriormente y pasadas unas 16 horas en los canales correspondientes a cada fluorocromo y empleando microscopía se evalúa la ganancia/pérdida en la intensidad de la fluorescencia de cada molécula, determinando así la cercanía (< 10 nm) o no entre las dos proteínas bajo estudio (Förster, 2012).

Una de las grandes ventajas de esta técnica es que gracias a que se realiza *in vivo* permite un análisis cuantitativo real de lo que ocurre en células vivas. Ya que las proteínas se expresan bajo condiciones celulares, se establece un ambiente fisiológico adecuado en donde se encuentran las

condiciones y otros cofactores que permiten la interacción entre las proteínas. Además de esto, el uso de microscopía confocal permite identificar la localización celular exacta de la proteína y del compartimento celular preciso donde ocurre la interacción. Sin embargo, este último aspecto también determina el punto débil de la técnica, ya que requiere el uso de un equipo robusto como es el microscopio confocal (Struk et al., 2019).

APLICACIONES DEL ESTUDIO DE INTERACCIONES PROTEICAS DURANTE LA RELACIÓN PLANTA-BACTERIA

El modelo zig-zag

En el mundo viviente uno de los procesos biológicos más activos es el que establecen las plantas con los microorganismos con los que coexisten (Yuan et al., 2021). Tal relación implica procesos de diversificación, selección y adaptación de los genes, y en consecuencia de las proteínas, implicadas en el reconocimiento y la activación de las respuestas inmunes en las plantas y en los genes de virulencia de los patógenos. La dinámica relación planta-patógeno se ha descrito bajo el modelo zig-zag (Jones y Dangl, 2006). En este modelo la primera línea de respuesta de las plantas es el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs del inglés Pathogen Associated Molecular Patterns) por parte de un grupo de receptores llamados PRRs (del inglés PAMPs Recognition Receptors) (Yuan et al., 2021). Este reconocimiento activa una inmunidad conocida como PTI (del inglés PAMP Triggered Immunity) o inmunidad encendida por PAMPs, la cual es efectiva contra patógenos no adaptados a colonizar una especie vegetal particular (Yuan et al., 2021). Durante el proceso evolutivo, grupos particulares de microorganismos desarrollaron proteínas denominadas efectoras (Ma et al., 2018). Estas proteínas tienen la función de suprimir la primera línea de inmunidad permitiendo así colonizar especies particulares de plantas. Este proceso es descrito en el modelo zig-zag como ETS (del inglés Effector-Triggered Susceptibility) (Jones y Dangl, 2006) o susceptibilidad encendida por efectores. Finalmente, en respuesta, las especies de plantas para hacer frente a estos patógenos adaptados desarrollaron las proteínas de resistencia (Kourelis y van der Hoorn, 2018; Sun et al., 2020). Estas proteínas reconocen de manera altamente específica los efectores y activan la segunda línea de inmunidad conocida como ETI (del inglés Effector Triggered Immunity) o inmunidad encendida por efectores (Chisholm et al., 2006).

La aplicación de diferentes metodologías aplicadas al estudio de interacciones entre proteínas ha permitido develar la compleja red de funcionamiento de la percepción, de la activación de las ramas de inmunidad y de los mecanismos que emplean los patógenos para suprimir las respuestas activadas por las plantas, encontrando que si no en todos,

en la mayoría de estos procesos se requiere la mediación de múltiples proteínas (Sun et al., 2020; Mishra et al., 2021). Dado que este modelo zigzag es el actualmente más aceptado para describir la evolución y dinámica de la interacción planta patógeno, en lo que sigue se describirá como los estudios de interacciones entre proteínas ha permitido contribuir al conocimiento de cada una de las fases de este modelo para el caso particular de la interacción entre plantas y bacterias fitopatógenas.

Inmunidad encendida por PAMPs

Durante la PTI, se ha podido establecer que la percepción de los PAMPs por parte de los PRRs es un proceso que implica no solo la interacción entre el PRR y el PAMP correspondiente, sino que el reconocimiento está mediado por un complejo proteico en el cual intervienen varias proteínas, receptores y co-receptores (Boutrot y Zipfel, 2017). Dos de los PRRs más conocidos, el FLS2 y el EFR, que reconocen la flagelina y el factor de Elongación Tu (EF-Tu), respectivamente, requieren de la proteína BAK1 (Chinchilla et al., 2007). Además de esto, la proteína BIK también forma parte de este complejo dinámico con BAK1 y con los PRRs (Lu et al., 2010). Por estudios de Co-IP, se pudo demostrar la dinámica de la interacción entre estas proteínas. De manera general se estableció que en ausencia de PAMPs, la proteína BIK se encuentra asociada con BAK1 y FLS2, reprimiendo de esta manera la activación de la inmunidad. Una vez la flagelina o el EF-Tu interactúan con el receptor, éste recluta a BAK1 y BIK1 desencadenando una serie de fosforilaciones y transfosforilaciones. Como consecuencia se activan las cascadas de señalización que encienden las respuestas de defensa de la planta y finalmente la liberación de BIK1 (Lu et al., 2010). Adicionalmente se estableció, mediante ensayos de doble híbrido, que BAK1 interactúa con las proteínas PUB para fosforilarlas. Por Co-IP se encontró también que las proteínas PUB, las cuales tienen actividad E3 ubiquitin ligasa, marcan el receptor FLS2 para su degradación, evitando así la prolongada activación de la inmunidad (Lu et al., 2011). Por ensayos de inmunoprecipitación acoplada a espectrofotometría de masas, se pudo identificar otra serie de proteínas que interactúan con BAK1. Dentro de este complejo se encontraron las proteínas BIR2 y BIR3 (Halter et al., 2014; Imkampe et al., 2017). Empleando tanto Co-IP, doble híbrido y BiFC fue posible comprobar la interacción de BIR2 y BIR3 con BAK1 y por análisis funcionales se pudo demostrar que estas proteínas BIR actúan como reguladores negativos que bloquean la inmunidad en ausencia del patógeno (Halter et al., 2014; Imkampe et al., 2017).

Dentro de las principales respuestas que se dan curso abajo de la percepción del patógeno está la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species), las cuales son producidas por la enzima NADPH oxidasa. Esta enzima cataliza la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a partir de súper oxido (O_2^-) (Kadota et al., 2014). Se pudo establecer mediante ensayos de Co-IP que la proteína

NADPH oxidasa RBOHD forma un complejo con FLS2 y EFR. Una vez el PAMP (flagelina ó EF-Tu) es reconocido por el PRR (FLS2 y EFR), BIK1 interactúa con la proteína RBOHD y la fosforila lo que permite su activación y la consecuente producción de ROS (Kadota et al., 2014).

SUSCEPTIBILIDAD ENCENDIDA POR EFECTORES

Como se mencionó anteriormente, los patógenos que lograron adaptarse y colonizar una especie vegetal determinada desarrollaron efectores para suprimir la PTI. Una de las principales estrategias para determinar la forma en que estos efectores lo logran es estableciendo con que proteínas de la planta interactúan, ya que esta interacción de una u otra manera bloqueará la activación de la inmunidad (Ma et al., 2018). Por esta razón la mayoría de los estudios enfocados a dilucidar la función de los efectores inician determinando la proteína de la planta con la que interactúan.

Uno de los principales blancos de los efectores es, obviamente, las proteínas PRR encargadas de la percepción de la primera línea de defensa. Por estudios de Co-IP y GST pull-down se pudo demostrar que los efectores AvrPtoB de *Pseudomonas syringae* (Göhre et al., 2008) y XopK de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Qin et al., 2018) tienen actividad E3 ligasa, lo que les permite ubiquitinar tanto PRRs como correceptores, de tal manera que son degradados, bloqueando así las respuestas de inmunidad (Göhre et al., 2008; Qin et al., 2018). De manera similar, y empleando una combinación de metodologías (ensayos de GST pull-down, Co-IP y BiFC) se pudo demostrar que el efector HopB1 de *Pseudomonas* interactúa con BAK1 y dado que este efector tiene actividad proteasa, se produce el clivaje de BAK1 (Li et al., 2016).

Anteriormente se enunció que la activación de los PRRs depende de su fosforilación. En consecuencia, se pudo demostrar mediante Co-IP, que el efector AvrAC de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* interactúa con BIK1 con el objetivo de urdilarla (Feng et al., 2012). De manera similar, se demostró, primero por doble híbrido y posteriormente fue confirmado por Co-IP, que el efector de *Pseudomonas syringae* HopZ1 acetila un RLCK denominado ZED1 (Lewis et al., 2013). De esta manera, estas interacciones entre efectores y proteínas de la planta tienen como objetivo generar una competencia por la modificación postraduccional de los aminoácidos donde son fosforilados los correceptores de los PRRs, logrando de esta manera inactivar la inmunidad vegetal.

Inmunidad encendida por efectores

La segunda rama de inmunidad implica el reconocimiento directo de los efectores por parte de las proteínas de resistencia (R) (Sun et al., 2020). Un mecanismo posible para dicho reconocimiento es que sea mediante interacción directa, tal como se ha demostrado en algunos casos, particularmente en hongos. Para la interacción planta-

bacterias en la mayoría de los casos reportados se ha encontrado que el reconocimiento de las proteínas Avr por las R es indirecto (Yuan et al., 2021). La primera demostración de que el reconocimiento de los efectores por parte de las proteínas R depende de una tercera proteína se dio con la identificación de RIN4. Empleando el sistema de Y2H se empleó la proteína AvrB de *Pseudomonas syringae* como carnada para identificar las proteínas de la planta *Arabidopsis thaliana* con las que interactúa mediante una librería de ADNc (Mackey et al., 2002). Se encontró que AvrB no interactuaba con la proteína R correspondiente (RPM1) sino con RIN4. Posteriormente y empleando Co-IP se pudo confirmar esta interacción y demostrar además que RIN4 interactuaba con las proteínas de resistencia RPM1 y RPS2 y por otro lado con los efectores AvrRpm1 y AvrRpt2 (Mackey et al., 2003; Axtell y Staskawicz, 2003). Estos descubrimientos llevaron a confirmar experimentalmente el modelo de reconocimiento conocido como gen guardián. Dicho modelo establece que las proteínas R, más que reconocer directamente los efectores, lo que hacen es detectar las modificaciones que estos efectores hacen sobre otras proteínas de las plantas (Jones y Dangl, 2006). En este caso lo que detectan las proteínas de resistencia RPM1 y RPS2 es la fosforilación y degradación de RIN4 que hacen AvrRpm1/AvrB y AvrRpt2, respectivamente (Mackey et al., 2003; Axtell y Staskawicz, 2003). Estos hallazgos se han expandido a otros casos, empleando igualmente las diferentes metodologías para el estudio de interacciones proteicas (Cook et al., 2015).

Un modelo alternativo que ha surgido en los recientes años y que ha cobrado mayor fuerza para explicar la interacción entre proteínas efectoras y de resistencia y las fuerzas selectivas que operan sobre ellas, es el modelo del señuelo (van der Hoorn y Kamoun, 2008). El caso más sobresaliente es el de AvrAC que es reconocido no directamente por la proteína de resistencia ZAR1. Como se mencionó anteriormente, mediante ensayos de Co-IP, se pudo demostrar que el efector avrAC interactúa con BIK (una RLCK) para urdilarlo, bloqueando así la inmunidad (Feng et al., 2012). También mediante ensayos de Co-IP se pudo identificar que durante la reacción de inmunidad otras proteínas RLCKs de la planta también interactúan con AvrAC, en particular con PBL2, un parólogo de BIK1 (Wang et al., 2015). Igualmente, por Co-IP, se pudo demostrar que PBL2 interactúa con la pseudokinasa RKS1, que a su vez también interactúa con la proteína de resistencia ZAR1 (Wang et al., 2015). De esta manera, RKS1 es un señuelo de BIK1.

La representación que se desprende del conjunto de los trabajos basados en el estudio de las interacciones entre los complejos de proteínas de la planta y de los efectores bacterianos, puede describirse de la siguiente manera: en un primer momento la primera rama de inmunidad vegetal depende del reconocimiento de PAMPs por PRRs. Sin embargo, los patógenos adaptados lograron desarrollar efectores que al interactuar con la maquinaria de la PTI (ya sea receptores o co-receptores) que generaron modificaciones, bloqueando esta respuesta. A su vez las

plantas han desarrollado proteínas señuelos, similares a las proteínas blanco de los efectores, con el fin de que los efectores se unan a ellas, pero sin interferir con la inmunidad. Finalmente, la función de las proteínas R, para poder activar la ETI, se basa en poder reconocer las modificaciones que los efectores producen, tanto de los señuelos como de las otras proteínas a las cuales éstos se unen. Este proceso dinámico y permanente es el que moldea el éxito o no, tanto de plantas y patógenos, permitiendo su supervivencia.

CONCLUSIONES

Durante las décadas de los 80 y 90, gracias a los estudios de mapeo genético y mutagénesis, fue posible caracterizar las primeras proteínas R y efectoras de plantas y patógenos, respectivamente. Posteriormente el conocimiento se focalizó en comprender las funciones celulares que cumplían estas proteínas, para finalmente poder tener una representación de la manera en que se establece el diálogo molecular entre plantas y patógenos. Gracias al estudio profundo de las interacciones que establecen las proteínas efectoras con las proteínas de las plantas, se han establecido los modelos de trabajo más importantes que permiten comprender el funcionamiento, la dinámica y la evolución de los mecanismos moleculares implicados en la relación que establecen plantas y patógenos.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República (Proyecto 4395) y a la Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional, sede Bogotá (Código Hermes 48062).

CONFLICTO DE INTERESES

El autor declara no tener conflicto de intereses

REFERENCIAS

- Alberts, B. (1998). The cell as a collection of protein machines: Preparing the next generation of molecular biologists. *Cell*, 92(3):291–294. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80922-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80922-8)
- Axtell, M. J. y Staskawicz, B. J. (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell*, 112(3): 369–377. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00036-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00036-9)
- Barberini, M. L. y Muschietti, J. P. (2017). Co-immunoprecipitation of Plant Receptor Kinases. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1621:109–112. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7063-6_10
- Ben Rejeb, I., Pastor, V. y Mauch-Mani, B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress:

- Molecular mechanisms. *Plants*, 3:458–475. <https://doi.org/10.3390/plants3040458>
- Bolte, S. y Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224(3):213–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
- Boutrot, F. y Zipfel, C. (2017). Function, Discovery and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 55:257–286. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120106>.
- Clontech. (2009). Matchmaker® Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual. Consultado 20/11/2021. Disponible en: <https://www.takarabio.com/documents/User%20Manual/Matchmaker%20Gold%20Yeast%20Two/Matchmaker%20Gold%20Yeast%20Two-Hybrid%20System%20User%20Manual.pdf>
- Cook, D. E., Mesarich, C. H. y Thomma, B. P. H. J. (2015). Understanding plant immunity as a surveillance system to detect invasion. *Annual Review of Phytopathology*, 53:541–563. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120114>
- Chalfie, M. (1995). Green fluorescent protein. *Photochemistry and Photobiology*, 62(4):651–656. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb08712.x>
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., Felix, G. y Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448(7152):497–500. <https://doi.org/10.1038/nature05999>
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B. y Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4):803–814. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.008>
- Feng, F., Yang, F., Rong, W., Wu, X., Zhang, J., Chen, S., He, C. y Zhou, J.M. (2012). A *Xanthomonas* uridine 5'-monophosphate transferase inhibits plant immune kinases. *Nature*, 485(7396):114–118. <https://doi.org/10.1038/nature10962>
- Finley, R. L. y Mairiang, D. (2018). Two-Hybrid Systems to Measure Protein-Protein Interactions. In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0005980.pub3>
- Förster, T. (2012). Energy migration and fluorescence. *Journal of Biomedical Optics*, 17(1):011002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.17.1.011002>
- Göhre, V., Spallek, T., Häweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J. W. y Robatzek, S. (2008). Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Current Biology: CB*, 18(23):1824–1832. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.10.063>
- Halter, T., Imkamp, J., Mazzotta, S., Wierzba, M., Postel, S., Bücherl, C., Kiefer, C., Stahl, M., Chinchilla, D., Wang, X., Nürnberger, T., Zipfel, C., Clouse, S., Borst, J. W., Boeren, S., de Vries, S. C., Tax, F. y Kemmerling, B. (2014). The leucine-rich repeat receptor kinase BIR2 is a negative regulator of BAK1 in plant immunity. *Current Biology: CB*, 24(2):134–143. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.047>
- Imkamp, J., Halter, T., Huang, S., Schulze, S., Mazzotta, S., Schmidt, N., Manstretta, R., Postel, S., Wierzba, M., Yang, Y., van Dongen, W. M. A. M., Stahl, M., Zipfel, C., Goshe, M. B., Clouse, S., de Vries, S. C., Tax, F., Wang, X. y Kemmerling, B. (2017). The Arabidopsis Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase BIR3 Negatively Regulates BAK1 Receptor Complex Formation and Stabilizes BAK1. *The Plant Cell*, 29(9):2285–2303. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00376>
- Jones, J. D. G. y Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117):323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kaboord, B. y Perr, M. (2008). Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 424:349–364. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9_27
- Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., Jones, J. D., Shirasu, K., Menke, F., Jones, A. y Zipfel, C. (2014). Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Molecular Cell*, 54(1):43–55. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.021>
- Kim, S.Y. y Hakoshima, T. (2019). GST Pull-Down Assay to Measure Complex Formations. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1893:273–280. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8910-2_20
- Kodama, Y. y Hu, C.D. (2012). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives. *BioTechniques*, 53(5):285–298. <https://doi.org/10.2144/000113943>
- Kourelis, J. y van der Hoorn, R. A. L. (2018). Defended to the Nines: 25 Years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *The Plant Cell*, 30(2):285–299. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00579>
- Lalonde, S., Ehrhardt, D. W., Loqué, D., Chen, J., Rhee, S. Y. y Frommer, W. B. (2008). Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: Latest techniques and current limitations. *The Plant Journal*, 53:610–635. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03332.x>
- Lampugnani, E. R., Wink, R. H., Persson, S. y Somssich, M. (2018). The Toolbox to Study Protein-Protein Interactions in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 37(4):308–334. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1500136>
- Lewis, J. D., Lee, A. H.Y., Hassan, J. A., Wan, J., Hurley, B., Jhingree, J. R., Wang, P. W., Lo, T., Youn, J.-Y., Guttman, D. S. y Desveaux, D. (2013). The Arabidopsis ZED1 pseudokinase is required for ZAR1-mediated immunity induced by the *Pseudomonas syringae* type III effector

- HopZ1a. *PNAS*, 110(46):18722–18727. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315520110>
- Li, L., Kim, P., Yu, L., Cai, G., Chen, S., Alfano, J. R. y Zhou, J.M. (2016). Activation-Dependent Destruction of a Co-receptor by a *Pseudomonas syringae* Effector Dampens Plant Immunity. *Cell Host y Microbe*, 20(4):504–514. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.09.007>
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L. y He, P. (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *PNAS*, 107(1):496–501. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909705107>
- Lu, D., Lin, W., Gao, X., Wu, S., Cheng, C., Avila, J., Heese, A., Devarenne, T. P., He, P. y Shan, L. (2011). Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity. *Science*, 332(6036):1439–1442. <https://doi.org/10.1126/science.1204903>
- Ma, W., Wang, Y. y McDowell, J. (2018). Focus on Effector-Triggered Susceptibility. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 31(1):5. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-17-0275-LE>
- Mackey, D., Holt, B. F., Wiig, A. y Dangl, J. L. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*, 108(6):743–754. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00661-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00661-x)
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R. y Dangl, J. L. (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell*, 112(3):379–389. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00040-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00040-0)
- Mishra, B., Kumar, N. y Mukhtar, M. (2021). Network biology to uncover functional and structural properties of the plant immune system. *Current Opinion in Plant Biology*, 62. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102057>
- Paiano, A., Margiotta, A., De Luca, M. y Bucci, C. (2019). Yeast Two-Hybrid Assay to Identify Interacting Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 95(1). <https://doi.org/10.1002/cpps.70>
- Qin, J., Zhou, X., Sun, L., Wang, K., Yang, F., Liao, H., Rong, W., Yin, J., Chen, H., Chen, X. y Zhang, J. (2018). The *Xanthomonas* effector XopK harbours E3 ubiquitin-ligase activity that is required for virulence. *The New Phytologist*, 220(1):219–231. <https://doi.org/10.1111/nph.15287>
- Rodríguez-Negrete, E., Bejarano, E. R. y Castillo, A. G. (2014). Using the yeast two-hybrid system to identify protein-protein interactions. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1072:241–258. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-631-3_18
- Shaner, N. C., Patterson, G. H. y Davidson, M. W. (2007). Advances in fluorescent protein technology. *Journal of Cell Science*, 120(24):4247–4260. <https://doi.org/10.1242/jcs.005801>
- Speth, C., Toledo-Filho, L. A. A. y Laubinger, S. (2014). Immunoprecipitation-based analysis of protein-protein interactions. *Methods in Molecular Biology*, 1158:175–185. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0700-7_11
- Struk, S., Jacobs, A., Martín-Fontecha, E., Gevaert, K., Cubas, P. y Goormachtig, S. (2019). Exploring the protein-protein interaction landscape in plants. *Plant Cell Environ*, 42(2):387–409. <https://doi.org/10.1111/pce.13433>
- Sun, Y., Zhu, Y. X., Balint-Kurti, P. J. y Wang, G. F. (2020). Fine-Tuning Immunity: Players and Regulators for Plant NLRs. *Trends in plant science*, 25(7):695–713. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.02.008>
- van der Hoorn, R. A. L. y Kamoun, S. (2008). From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell*, 20(8):2009–2017. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.060194>
- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näge, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K. y Kudla, J. (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 40(3):428–438. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02219.x>
- Wang, G., Roux, B., Feng, F., Guy, E., Li, L., Li, N., Zhang, X., Lautier, M., Jardinaud, M.-F., Chabannes, M., Arlat, M., Chen, S., He, C., Noël, L. D. y Zhou, J.M. (2015). The Decoy Substrate of a Pathogen Effector and a Pseudokinase Specify Pathogen-Induced Modified-Self Recognition and Immunity in Plants. *Cell Host y Microbe*, 18(3):285–295. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.08.004>
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., Losick, R. (2004). *Molecular Biology of the Gene*. 4th Edición. Editorial Pearson.
- Xing, S., Wallmeroth, N., Berendzen, K. W. y Grefen, C. (2016). Techniques for the analysis of protein-protein interactions in vivo. *Plant Physiology*, 171:727–758. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00470>
- Yuan, M., Ngou, B. P. K., Ding, P. y Xin, X. F. (2021). PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 62. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102030>
- Zhong, G., Zhu, Q., Li, Y., Liu, Y. y Wang, H. (2017). Once for All: A Novel Robust System for Co-expression of Multiple Chimeric Fluorescent Fusion Proteins in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01071>