

Mecanismos de activación y evasión de defensas mediados por efectores tipo III en *Pseudomonas syringae*

Carmen R. Beuzón y Javier Ruiz-Albert

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea «La Mayora» – Universidad de Málaga – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Depto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Campus de Teatinos, 29071 Málaga

cbeuzon@uma.es



Foto de grupo. De izquierda a derecha: Nieves López Pagán, Diego López Márquez, Carmen R. Beuzón, Javier Ruiz Albert y Javier Rueda Blanco.

P*seudomonas syringae* es una bacteria Gram-negativa, patógena de plantas, que se clasifica en patovares según su especificidad de hospedador. *P. syringae* está vinculada al ciclo del agua pudiendo alcanzar la superficie de la hojas a través de precipitaciones. Una vez en la superficie de la hoja puede sobrevivir epifíticamente o penetrar en su interior a través de aperturas naturales como estomas o heridas, y crecer activamente en el apoplasto, causando en este caso enfermedad. La infección por este patógeno determina pérdidas económicas importantes pudiendo afectar gravemente tanto a la producción neta como a la

calidad. Las estrategias de prevención habituales, a menudo insuficientes, poco eficientes y/o contaminantes, consisten en el uso de tratamientos químicos con base de cobre, el uso de material vegetal libre de patógeno, la rotación de cultivos, y en el cultivo de variedades tradicionalmente más resistentes. El desarrollo de nuevas estrategias de control de las enfermedades causadas por este patógeno es por tanto necesario y de interés económico, y requiere de un mayor conocimiento tanto de los mecanismos de virulencia del patógeno como de los mecanismos de defensa contra el mismo. Nuestro equipo lleva más de 10 años dedicado

al análisis de la interacción entre *P. syringae* y la planta, siguiendo diversas aproximaciones experimentales, dirigidas por Carmen R. Beuzón y/o Javier Ruiz-Albert, y para lo cual han establecido numerosas colaboraciones dentro y fuera del país.

El éxito de *P. syringae* en la colonización y desarrollo de la enfermedad en un determinado huésped viene determinado por la capacidad del patógeno de evadir y/o suprimir defensas. *P. syringae* suprime la respuesta de defensa mediante un conjunto de proteínas conocidas como efectores, que la bacteria introduce en el citosol de la célula huésped a través de un sistema de secreción de tipo III (type III secretion system o T3SS). Los T3SS son sistemas complejos cuya estructura básica está muy conservada entre patógenos de animales y de plantas. La expresión de los genes que codifican los componentes del T3SS y sus efectores, se activa tras la entrada de la bacteria en el apoplasto, y está sujeta a una compleja regulación que combina reguladores negativos y positivos. Nuestro laboratorio ha caracterizado dicha regulación en la estirpe modelo *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448a (en adelante *Pph 1448a*) (Ortiz-Martín *et al.*, 2006; Ortiz-Martín *et al.*, 2010a; Ortiz-Martín *et al.*, 2010b). Más recientemente estamos trabajando en dos líneas relacionadas con la regulación: el análisis de la regulación del proceso de secreción, su jerarquía y señalización, y su expresión biestable durante la infección mediante el uso de fusiones transcripcionales a marcadores fluorescentes y métodos de análisis de células individuales (microscopía confocal y citometría de flujo).

Las estirpes de *P. syringae* codifican entre 15 y 35 efectores, según estirpe y patovar. Durante estos años, nuestro equipo ha desarrollado herramientas moleculares con las que hemos contribuido a completar el inventario de efectores de *Pph 1448a* (Macho *et al.*, 2009; Zumaquero *et al.*, 2010), y generado mutantes individuales para la mayoría de ellos, tanto en *Pph 1448a* como en la estirpe modelo *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (en adelante *Pto* DC3000). También hemos adaptado metodología de análisis de la virulencia previamente desarrollada en patógenos animales (Beuzón y Holden, 2001), al análisis de la virulencia en *P. syringae* y otras bacterias fitopatógenas como el patógeno de cuarentena *Ralstonia solanacearum* (Macho *et al.*, 2007; Macho *et al.*, 2010a). Esta metodología se basa en el uso de infecciones mixtas para analizar niveles de virulencia mediante índices de competitividad, lo que nos ha permitido analizar la contribución a la virulencia de todos los mutantes en efectores generados en *Pph 1448a* (Macho *et al.*, 2012) y, variando las dosis y condiciones, analizar interferencias de relevancia biológica e informativas a nivel molecular.

Las plantas responden al ataque de *P. syringae* siguiendo dos líneas de defensa, según el tipo de moléculas del patógeno que sean detectadas. La planta detecta inicialmente moléculas muy conservadas, denominadas genéricamente PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), mediante receptores de membrana denominados genéricamente PRRs (*Pattern-Recognition Receptors*), que disparan una respuesta de defensa conocida como PTI (*PAMP-Triggered Immunity*).

La activación de la respuesta PTI es rápida, pero su intensidad va incrementándose con el tiempo, lo cual resulta adecuado en una respuesta de inmunidad que no discrimina entre bacterias patógenas y no patógenas. Esta cinética permite a los patógenos adaptados suprimirla antes de que la señal se haya amplificado lo suficiente como para proteger a la planta frente al patógeno. Trabajos recientes de diferentes laboratorios, destinados a la caracterización funcional de efectores en diferentes patovares de *P. syringae*, han demostrado que muchos de estos efectores son capaces de suprimir defensas de tipo PTI cuando se sobreexpresan en sistemas heterólogos o directamente en la planta.

Un microorganismo invasor también puede ser reconocido a través de sus efectores. Este tipo de reconocimiento es indirecto, siendo su base la detección de las modificaciones que el efector lleva a cabo sobre sus dianas en la planta, y lo realizan receptores intracelulares del tipo NB-LRR (*Nucleotide-Binding, Leucine-Rich Repeat-containing proteins*), conocidos como proteínas de resistencia (proteínas R). Esto da lugar a una respuesta de elevada intensidad denominada ETI (*Effector-Triggered Immunity*) asociada habitualmente al disparo de un proceso de muerte celular programada, conocida como respuesta de hipersensibilidad (Hypersensitive Response o HR). En contraste con las PAMPs, los efectores son moléculas características de patógenos, cuyo reconocimiento provoca una respuesta de defensa rápida e intensa. La respuesta ETI es más eficaz frente a patógenos adaptados ya que por su mayor rapidez e intensidad, es más difícil de suprimir por el patógeno (Katagiri y Tsuda, 2010). La capacidad de suprimir ETI también ha sido descrita para algunos efectores siguiendo el tipo de aproximaciones usadas para la supresión de PTI. Tanto PTI como ETI puede estar asociadas al disparo de inmunidad sistémica (Systemic Acquired Resistance o SAR) (Cameron *et al.*, 1994), que protege a regiones distales de la planta frente a nuevas infecciones.

Nuestro laboratorio ha descrito un efector capaz de suprimir los tres niveles de defensa PTI, ETI y SAR: el efector HopZ1a de *P. syringae* pv. *syringae*, miembro de la familia de efectores caracterizada por el efector de *Yersinia pestis* YopJ. HopZ1a es capaz de suprimir la ETI disparada frente a diferentes efectores, dependientes de diferentes proteínas R, e inducidas a través de todas las cascadas de señalización conocidas hasta la fecha, incluyendo a las defensas basales disparadas por el patógeno *Pto* DC3000 durante el desarrollo de la enfermedad (Macho *et al.*, 2010b; Macho y Beuzón, 2010). HopZ1a es también capaz de suprimir la inmunidad sistémica o SAR. Esto apoya un mecanismo de acción generalista y sugiere que HopZ1 actúa sobre un elemento común a todas estas defensas, en cuya identificación y caracterización estamos trabajando actualmente.

La actividad supresora de los efectores es habitualmente ensayada en sistemas heterólogos y mediante sobreexpresión (Rosebrock *et al.*, 2007; Ntoukakis *et al.*, 2009; Wilton *et al.*, 2010). No obstante, el elevado número de efectores con capacidad de suprimir defensas sugiere que la supresión se lleva a cabo de forma mediante un proceso aditivo, donde la supresión cruzada de defensas tipo

ETI entre efectores de un mismo patógeno podría tener un papel determinante en el proceso de adaptación del patógeno a su hospedador. Dicha supresión cruzada podría representar una estrategia alternativa de adaptación al hospedador, frente a estrategias evolutivas generalmente consideradas, como la pérdida del efector detectado, o su mutación (patoadaptación). El estudio de esta vía evolutiva constituye otra de las líneas de investigación del laboratorio. Dentro de esta línea, hemos generado bacterias marcadas con diferentes fluoróforos que nos permiten el seguimiento del proceso de colonización y proliferación en poblaciones simples y mixtas (Figura 1).

Finalmente, los avances actuales en el conocimiento de los procesos epigenéticos que controlan la expresión génica en plantas, así como en la descripción molecular

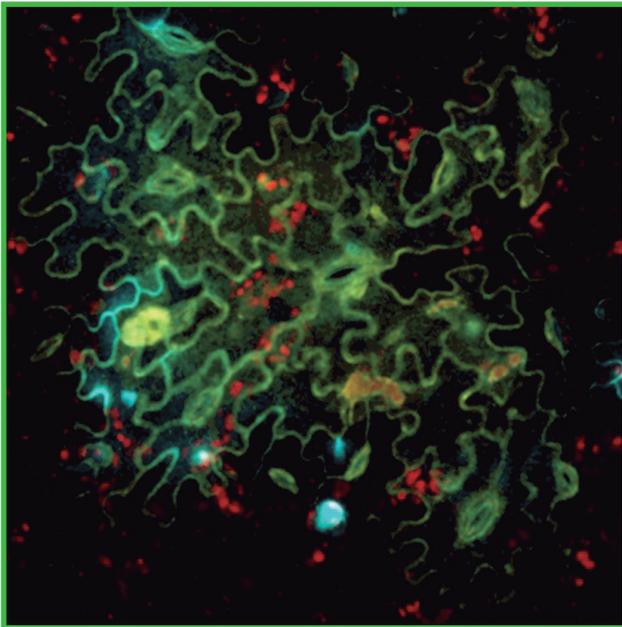


Figura 1. Imagen de microscopía confocal de una hoja de judía (*Phaseolus vulgaris*) 5 días después de ser inoculada con una estirpe de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* avirulenta en este cultivar. En la imagen se observa una microcolonia de la bacteria (marcada mediante Tn7 para expresar eYFP y por tanto amarilla) rodeada de un área donde las células de la planta que han activado la respuesta hipersensible acumulan compuestos fenólicos autofluorescentes en su pared celular.

de los procesos de silenciamiento génico, y de la implicación de estos en la defensa frente a diferentes patógenos, nos ha llevado a establecer colaboraciones como las desarrolladas con Eduardo Rodríguez Bejarano y Araceli Castillo Garriga (ambos de la Universidad de Málaga) para caracterizar el papel de estos en la defensa frente a *P. syringae*, y del papel de los efectores tipo III en la modificación de las marcas epigenéticas de la planta y de la regulación por pequeños RNAs como mecanismos de supresión de defensas.

BIBLIOGRAFÍA

- Macho AP, Zumaquero A, Ortiz-Martín I, Beuzón CR.** (2007). Competitive Index: a sensitive and accurate method to quantify growth of *Pseudomonas syringae* in different hosts. *Mol Plant Pathol* 8: 437-50.
- Macho AP, Ruiz-Albert J, Tornero P, Beuzón CR.** (2009). Identification of new type III effectors and analysis of the plant response by competitive index. *Mol Plant Pathol* 10: 69-80.
- Macho AP, Beuzón CR.** (2010). Insights into plant immunity signaling: The bacterial competitive index angle. *Plant Signal Behav* 5: 1590-1593.
- Macho AP, Guidot A, Barberis P, Beuzón CR, Genin S.** (2010a). A competitive index assay identifies several *Ralstonia solanacearum* type III effector mutant strains with reduced fitness in host plants. *Mol Plant Microb Interact* 23: 1197-205.
- Macho AP, Guevara CM, Tornero P, Ruiz-Albert J, Beuzón CR.** (2010b). The *Pseudomonas syringae* effector proteína HopZ1a suppresses effector-triggered immunity. *New Phytol* 187: 1018-1033.
- Macho AP, Zumaquero A, González-Plaza JJ, Ortiz-Martín I, Rufián JS, Beuzón CR.** (2012). Genetic Analysis of the Individual Contribution to Virulence of the Type III Effector Inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *PLoS One* 7: e35871.
- Ortiz-Martín I, Macho AP, Lambersten L, Ramos C y Beuzón CR.** (2006). Suicide vectors for antibiotic marker exchange and rapid generation of multiple knockout mutants by allelic exchange in Gram-negative bacteria. *J Microbiol Meth* 67:395-407.
- Ortiz-Martín I, Thwaites R, Macho AP, Mansfield JW, Beuzón CR.** (2010a). Positive Regulation of the Hrp Type III Secretion System in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 665-81.
- Ortiz-Martín I, Thwaites R, Mansfield JW, Beuzón CR.** (2010b). Negative Regulation of the Hrp Type III Secretion System in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 682-701.
- Rufián JS, Lucía A, Macho AP, Orozco-Navarrete B, Arroyo-Mateos M, Bejarano ER, Beuzón CR, Ruiz-Albert J.** (2015) Auto-acetylation on K289R is not essential for HopZ1a-mediated plant defense suppression. *Front Microbiol.* 6:684.
- Zumaquero A, Macho AP, Rufián JS, Beuzón CR.** (2010). Analysis of the role of the type III secretion inventory in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448a in the interaction with the plant. *J Bacteriol* 192: 4474-88.