

# De rol van AVR4 en AVR4E proteïnen in virulentie en avirulentie van de tomaatpathogeen *Cladosporium fulvum*

Nienke Westerink

Op 5 maart 2003 promoveerde Nienke Westerink aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'The role of AVR4 and AVR4E proteins in virulence and avirulence of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*'. Promotor was Prof. Dr. Ir. P.J.G.M. de Wit en copromotor Dr. Ir. M.H.A.J. Joosten, beiden werkzaam bij de leerstoelgroep Fytopathologie, Wageningen Universiteit.

## Inleiding

Actieve ziekteresistentie in planten is afhankelijk van buitengewoon gevoelige en specifieke controlesystemen. Deze systemen maken het mogelijk binnendringende ziekteverwekkers te herkennen, waarna de plant diverse afweermechanismen activeert, welke leiden tot een groeiremming van deze ziekteverwekkers. Een aantal resistentie (*R*) genen, afkomstig van verscheidene plantensoorten, is gekarakteriseerd. Deze *R* genen verschaffen de plant een typische, op het gen-om-gen principe gebaseerde, resistentie tegen ziekteverwekkers die de corresponderende avirulentie (*Avr*) genen bevatten. Herkenning van het AVR eiwit door het product van het *R* gen leidt namelijk tot een overgevoeligheidsreactie (HR). Gezien het feit dat in de aanwezigheid van het corresponderende *R* gen, een *Avr* gen product niet bijdraagt aan de virulentie van een ziekteverwekker maar juist zorgt voor avirulentie, bestaat het vermoeden dat de primaire functie van *Avr* gen produc-

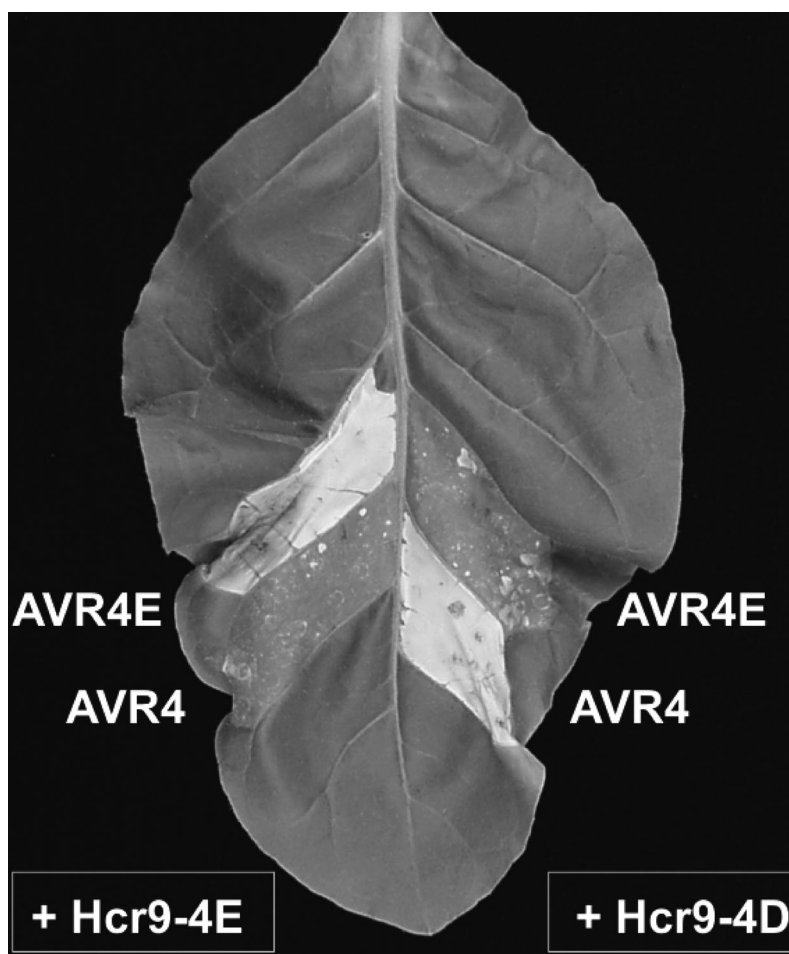
ten geassocieerd is met virulentie en niet met avirulentie van een pathogeen. Inderdaad blijkt een aantal avirulentie-eiwitten ziekteverwekkers in staat te stellen planten te infecteren door een interactie aan te gaan met virulentiedoelwitten die aanwezig zijn in de gastheer. Op deze manier wordt het (basale) verdedigingsmechanisme van de plant onderdrukt, bijvoorbeeld door de activiteit van zogenaamde pathogenese-gerelateerde eiwitten of andere geïnduceerde afweermechanismen te remmen. Dit houdt in dat het verlies van avirulentie-eiwitten, hetgeen mogelijkwijs gepaard gaat met het omzeilen van *R* gen-gebaseerde resistentie, een vermindering van de virulentie van de ziekteverwekker tot gevolg kan hebben.

## *Avr4E*, een nieuw avirulentiegen van *Cladosporium fulvum*

Tomaat bezit specifieke *R* genen (de zogenaamde *Cf* genen) tegen

de pathogene schimmel *Cladosporium fulvum*. Op het *Cf-4* locus zijn vijf *Cf* genen aanwezig, welke sterk homoloog zijn aan het resistentiegen *Cf-9* en welke '*Hcr9s*' (homologen van het *cladosporium* resistentiegen *Cf-9*) worden genoemd. Onderzocht is of homoloog *Hcr9-4E*, door middel van herkenning van het avirulentie-eiwit AVR4E, resistentie geeft tegen *C. fulvum*. Het AVR4E eiwit is gezuiverd en aan de hand van de aminozuurvolgorde kon het coderende gen worden gekloneerd. *Avr4E* codeert voor een cysteïnerijk eiwit van 121 aminozuren, dat door *C. fulvum* uitgescheiden wordt in de intercellulaire ruimtes van tomaat als een eiwit van 101 aminozuren. Transformatie van virulente isolaten van *C. fulvum* met de genomische sequentie van *Avr4E* leidt tot avirulentie op planten met het *Hcr9-4E* gen. Dit houdt in dat AVR4E functioneert als een fysio-specifiek avirulentie-eiwit dat een HR induceert in *Hcr9-4E* planten. Agrofiliëtratie-studies (Figuur 1) laten zien dat het *Avr4E* gen specifiek correspondeert met het *Hcr9-4E* resistentiegen, terwijl AVR4 specifiek wordt herkend door *Hcr9-4D* (het eiwit gecodeerd door het *Cf-4* gen). Gebleken is dat bepaalde isolaten van *C. fulvum* die virulent zijn op *Hcr9-4E* tomatenplanten het *Avr4E* gen niet tot expressie brengen, terwijl andere virulente isola-

PROMOTIE



Figuur 1. *Avr4E* is het avirulentiegen van *C. fulvum* dat correspondeert met het resistentiegen *Hcr9-4E*. *Agrobacterium* cultures met *Avr4E* of *Avr4* werden geïnfiltrerd in bladeren van tabak, samen met cultures waarin *Hcr9-4E* of *Hcr9-4D* aanwezig is. Specifieke necrose, als gevolg van een overgevoeligheidsreactie, is enkel zichtbaar bij de *AVR4E/Hcr9-4E* en *AVR4/Hcr9-4D* combinatie.

ten een stabiel *AVR4E* mutant-eiwit produceren met twee aminozuursubstituties, Phe<sup>62</sup>Leu en Met<sup>73</sup>Thr. De elicitoractiviteit van *AVR4E* wordt te niet gedaan door de enkele aminozuursubstitutie Phe<sup>62</sup>Leu, hetgeen suggereert dat deze enkele substitutie in *AVR4E* kan leiden tot virulentie van *C. fulvum* op *Hcr9-4E* tomatenplanten.

### Herkenning van *AVR4* door *Cf-4* planten

Isolaten van *C. fulvum* die het fy-sio-specifieke avirulentie-eiwit *AVR4* produceren, induceren een

HR in tomatenplanten met het *Cf-4* gen. Het mechanisme van de herkenning van *AVR4* door *Cf-4* planten is bestudeerd met behulp van bindingstudies met radioactief gelabeld *AVR4* en microsomale membraanfracties (MFs), afkomstig van MM-Cf0 (vatbare) en MM-Cf4 (resistente) tomatenplanten en plantensoorten die geen gastheer zijn voor *C. fulvum*. Een hoge affiniteits-bindingsplaats ('HABS') voor *AVR4* ( $K_D = 0,05$  nM) werd gevonden in MFs. Deze *AVR4*-HABS voldeed aan alle kenmerken die verwacht kunnen worden voor ligand-receptor interacties, zoals verzadigbaarheid, reversibiliteit en specificiteit. De geïdentificeerde *AVR4*-HABS bleek echter niet afkomstig te zijn van de tomaten-

plant, maar van schimmels die aanwezig waren op gedeeltelijk geïnfecteerde tomatenplanten. Het bleek dat deze *AVR4*-HABS bestand was tegen hittebehandeling en tegen een behandeling met proteinase K. Dit suggereert dat de *AVR4*-HABS mogelijk geen eiwitachtige component is. 'Crosslink'-experimenten lieten zien dat *AVR4* specifiek bindt aan een component van ongeveer 75 kDa, welke ook afkomstig is van de schimmel, hetgeen mogelijk duidt op een intrinsieke functie van *AVR4* voor *C. fulvum*. In MFs, afkomstig van tomatenplanten die zijn opgegroeid in een pathogeen vrije, geconditioneerde omgeving, is door ons geen *AVR4*-specifieke HABS gedetecteerd. Dit houdt mogelijkkerwijs in dat het mechanisme van herkenning van *AVR4* door *Cf-4* tomatenplanten verschilt van het mechanisme gevonden voor menig ander avirulentie-eiwit of peptide, inclusief *AVR9*, waarvoor een HABS is geïdentificeerd in MFs van verscheidene plantensoorten.

### Structuur-functie analysestudies aan *AVR4*

Het *AVR4* avirulentie-eiwit van *C. fulvum* bezit acht cysteine residuen, welke allen betrokken zijn bij het vormen van zwavelbruggen. Het patroon van de zwavelbruggen werd deels opgehelderd door een elicitor activiteitsanalyse uit te voeren aan *AVR4* mutanten, welke door het aardappelvirus X tot expressie werden gebracht in *Cf-4* tomatenplanten. Ook werd er gebruik gemaakt van een chemische methode waarbij de massa van verschillende *AVR4* fragmenten, welke werden verkregen na digestie van gedeeltelijk gereduceerd *AVR4* eiwit, werd bepaald. De vier zwavelbruggen aanwezig in *AVR4* werden geïdentificeerd als zijnde Cys<sup>11</sup>-Cys<sup>41</sup>, Cys<sup>21</sup>-Cys<sup>27</sup>, Cys<sup>35</sup>-Cys<sup>80</sup>

en Cys<sup>57</sup>-Cys<sup>72</sup>. Vervolgens werd er met behulp van het patroon van de zwavelbruggen en de onderlinge afstand van de cysteine residuen gezocht naar bekende sequentiemotieven in AVR4. In AVR4 werd een chitine-bindend domein gevonden dat sterk lijkt op het domein zoals dat in chitine bindende eiwitten van invertebraten ('inv ChBD') voorkomt. Gebleken is dat de drie geconserveerde zwavelbruggen in AVR4, met uitzondering van Cys<sup>21</sup>-Cys<sup>27</sup>, ook essentieel zijn voor de stabiliteit van AVR4. In natuurlijke isolaten van *C. fulvum* wordt de herkenning door *Cf-4* planten omzeild door verbreking van de Cys<sup>11</sup>-Cys<sup>41</sup> of Cys<sup>35</sup>-Cys<sup>80</sup> zwavelbrug. Gebleken is dat AVR4 nog steeds chitine kan binden wanneer één zwavelbrug verbroken is. Ook zijn deze zwavelbrugmutanten minder gevoelig voor proteolytische afbraak wanneer ze gebonden zijn aan chitine. Dus, hoewel de productie van instabiele AVR4 mutanten tot gevolg heeft dat isolaten van *C. fulvum* virulent worden op *Cf-4* tomatenplanten, hebben deze mutanten hun vermeende intrinsieke functie, namelijk het beschermen van de celwand van *C. fulvum* tegen chitinases, behouden.

Binding van AVR4 aan chitine is niet vereist om een afweer te induceren in *Cf-4* tomatenplanten. On-

derzocht is of er onderscheid gemaakt kan worden tussen domeinen die verantwoordelijk zijn voor de necrose-inducerende activiteit ('NIA') van AVR4 en domeinen die betrokken zijn bij de binding van AVR4 aan chitine. Om in AVR4 antigene domeinen te identificeren die mogelijk betrokken zijn bij de NIA van AVR4, is er een affiniteitsanalyse uitgevoerd met synthetische, overlappende peptiden van AVR4 en polyclonaal serum gemaakt tegen natief AVR4 (een zogenaamde 'PEPSCAN'). Deze analyse resulteerde in de identificatie van één groot (Cys<sup>41</sup>-Cys<sup>57</sup>) en twee kleinere (Ile<sup>17</sup>-Asn<sup>31</sup> en Gln<sup>62</sup>-Asn<sup>76</sup>) antigene domeinen in AVR4. Daar het grote antigene domein in AVR4 de hoogste affiniteit heeft voor polyclonale AVR4 antilichamen, zijn alle residuen, behalve Cys, Pro, and Gly, aanwezig in dit domein, vervangen door Ala en is de NIA van de mutanten bepaald. Ook is gekeken naar residuen in AVR4 die mogelijk belangrijk zijn voor chitine binding, door alle aromatische residuen en twee additionele residuen, die geconserveerd zijn in mogelijke chitine bindende domeinen, afzonderlijk te vervangen door Ala. Substitutie van de afzonderlijke aminozuren in het grote antigene domein van AVR4 leidde niet tot een significante verandering van de NIA van AVR4. Echter, substitutie van de aromatische re-

siduen Tyr<sup>38</sup> and Trp<sup>63</sup> door Ala reduceerde de NIA van AVR4 aanzienlijk. Het bleek echter dat deze AVR4 mutanten niet stabiel waren, hetgeen betekent dat Tyr<sup>38</sup> and Trp<sup>63</sup> bijdragen aan de stabiliteit maar niet aan de NIA van AVR4. De afzonderlijke aminozuursubstituties in deze studie hadden in geen van de gevallen effect op het chitine bindende vermogen van AVR4. Mogelijk zijn hier meerdere residuen bij betrokken en is er een veelvoud aan substituties nodig om een reductie teweeg te brengen in het chitine bindende vermogen van AVR4.

## Conclusie

Het zal voor *C. fulvum* waarschijnlijk heilzaam zijn om avirulentie-eiwitten zodanig te modificeren dat deze niet langer herkend worden door resistente planten, maar nog wel kunnen bijdragen aan virulentie. Aan de meeste avirulentie-eiwitten van *C. fulvum* kon tot dusver echter nog geen duidelijke rol in virulentie worden toegeschreven. Waarschijnlijk kan de functie van een groot deel van deze avirulentie-eiwitten overgenomen worden door andere eiwitten, hetgeen betekent dat de functie van deze avirulentie-eiwitten uitwisselbaar is.

PROMOTIE