

De fascinerende diversiteit van microbiële NLP effectoren

Guido van den
Ackerveken

Universiteit Utrecht

Inleiding

Bacteriën, schimmels en oömyceten gebruiken een breed scala aan mechanismen om de gastheerplant te infecteren. Ze produceren daarvoor, onder andere, zogenaamde effectoren (eiwitten of andere moleculen) om een grote verscheidenheid aan processen in de plant te beïnvloeden zodat de microbiële ziekteverwekkers kunnen groeien en ziekte veroorzaken. Op het eerste gezicht zou je denken dat verschillende micro-organismen ook erg uiteenlopende infectiemechanismen gebruiken, maar het blijkt dat sommige gereedschappen toch gebruikt worden door heel verschillende groepen micro-organismen. Een mooi voorbeeld hiervan zijn de NLP genen die voorkomen in bepaalde bacteriën, schimmels en vooral oömyceten (Seidl & van den Ackerveken, 2019).

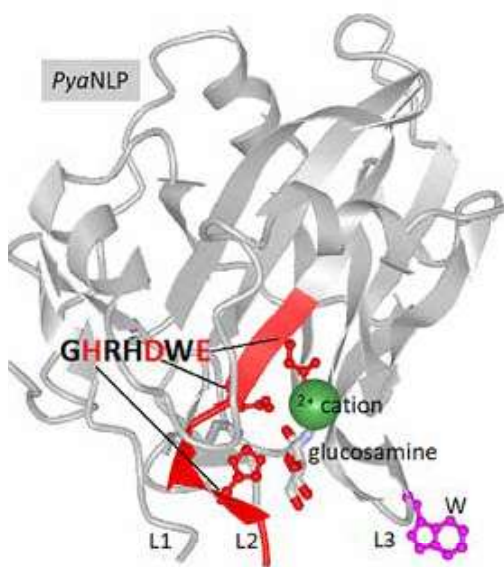
NLP staat voor Nep1-like protein; eiwitten die lijken op het Nep1 eiwit van *Fusarium*. Dicotyle, maar niet monocotyle planten zijn erg gevoelig voor het Nep1 eiwit wat necrose veroorzaakt, vandaar de naam Necrose- en Ethyleen-inducerend Protein 1 (Bailey, 1995). NLPs met een vergelijkbare activiteit zijn vervolgens gevonden in andere schimmelsoorten, maar ook in bacteriën en oömyceten.

NLP eiwitten geven celdood of necrose als ze worden geïnfilteerd in de intercellulaire ruimte (de apoplast) van bladeren van dicotyle planten. De reactie wordt gestart door hun cytolytische activiteit, d.w.z. dat ze de celmembraan permeabel maken voor ionen (Ottmann et al., 2009). Een groot aantal cytotoxische NLPs zijn gevonden in diverse micro-organismen, waarvan de meeste plant-geassocieerd zijn (Seidl & van den Ackerveken, 2019). Cytotoxische NLPs van ziekteverwekkers dragen mogelijk bij aan celdood tijdens de necrotrofe fase van infectie. Dit is echter alleen overtuigend aangetoond voor *Pectobacterium* (voorheen *Erwinia*) bacteriën, die NLPs gebruiken om rotting van aardappelweefsel te bevorderen, en waar de NLP Nip dus een virulentiefactor is (Mattinen et al., 2004).

Membraanverschillen verklaren verschil in gevoeligheid

Door de opheldering van de structuur van het cytotoxische PyaNLP eiwit van *Pythium aphanidermatum* (Ottmann et al., 2009) en recent de ontdekking van de binding van PyaNLP aan membraanlipiden (Lenarcic et al., 2017) snappen we nu beter waarom deze eiwitten alleen cytotoxisch zijn op dicotyle planten (van den Ackerveken, 2017). De grafische weergave van de driedimensionale structuur (Figuur 1) laat een aantal belangrijke functionele elementen zien. In rood is het zogenaamde heptapeptide motief zichtbaar met drie aminozuren (H, D en E) die belangrijk zijn voor de binding van een tweewaardig kation. In de structuur is dat Mg^{2+} , maar dat kan in vivo ook Ca^{2+} zijn. Daaronder is een glucosamine molecuul zichtbaar wat gebonden wordt door het NLP eiwit. De affiniteit voor bepaalde suikers maakt dat PyaNLP kan binden aan de suikerresiduen van glycosyl-inositol phosphorylceramide (GIPC), een sphingolipide in de membraan van de plant. PyaNLP kan zowel GIPCs van dicotyle als monocotyle planten binden. Bij dicotyle planten zijn er twee terminale suikergroepen en kan het gebonden NLP eiwit met de lipiden in de membraan interacteren, mogelijk met het vrijgekomen tryptofaanresidue (W, in paars aangegeven), wat door de suikerbinding meer naar buiten is gekomen. De interactie met de membraan en mogelijke multimerisatie leiden uiteindelijk tot lysis van de cel. Echter, in monocotyle planten hebben de GIPCs drie terminale suikers wat ertoe leidt dat het gebonden NLP eiwit mogelijk te ver van de membraan verwijderd is om enige lytische of toxische activiteit te hebben. Het verschil in aantal terminale suikers op GIPC sphingolipiden maakt of het NLP eiwit toxisch is of niet. Als laatste vormen twee cysteïne residuen een disulfidebrug die essentieel is voor de toxische activiteit en die mogelijk belangrijk is voor de stabiliteit van het eiwit in de apoplast (niet weergegeven).

Een analyse van de UniProt eiwitdatabank (2018) liet zien dat hierin ongeveer 1800 NLP eiwitten aanwezig waren. Van de meer dan 10.000 verschillende soorten organismen in de databank (van bacteriën tot de mens) bleken er slechts 500 één of meer NLP eiwitten te coderen in hun genoom. Taxa met veel NLP genen zijn actinomyceten en proteobacteriën, ascomyceet schimmels en



Figuur 1: Eiwitstructuur van PyaNLP met de aminozuurresiduen van het heptapeptidemotief die belangrijk zijn voor cation binding (in rood) alsmede de suiker-bindingsplaats waarin hier glucosamine is gebonden (Lenarcic et al, 2017).

oömyceten. De schimmel- en oömyceetsoorten coderen in veel gevallen voor meerdere NLP eiwitten. Een belangrijk deel hiervan blijkt niet cytotoxisch te zijn. Analyse van de NLP familie van de valse meeldauw van Arabidopsis (*Hyaloperonospora arabidopsidis*) liet zien dat geen van de 12 eiwitten necrose induceert op tabak of Arabidopsis (Cabral et al., 2012). Dit is niet onverwacht omdat valse meeldauw een obligaat biotrofe ziekteverwekker is en dus afhankelijk is van levende gastheercellen voor groei en reproductie. Maar wat is dan de functie van niet-cytotoxische NLPs voor het infectieproces als ze geen celdood induceren?

Verrassende andere activiteit van NLP eiwitten

Een mogelijke bijdrage van niet-cytotoxische NLPs aan het verhogen van de vatbaarheid van planten voor infectie werd getest in transgene Arabidopsis planten die het HaNLP3 eiwit van *H. arabidopsidis* tot overexpressie brachten. Tot onze verrassing werden deze planten juist resistent en bleven ze ook erg klein. Het bleek dat HaNLP3 herkend werd door het immuunsysteem van Arabidopsis en daarmee de afweer activeerde en de plant resistent maakte (Oome et al., 2014). Het is al langer bekend dat activatie van immuniteit vaak leidt tot vermindering van de groei...iets wat ook gebeurde in

onze transgene HaNLP3 planten. Gelijktijdig werd gevonden dat inactieve vormen van het cytotoxische PpNLP eiwit (door mutatie of hitte-inactivatie) ook het immuunsysteem van Arabidopsis aanschakelde (Bohm et al., 2014). Een klein deel van HaNLP3 (een peptide van 24 aminozuren, nlp24) of PpNLP (een peptide van 20 aminozuren, nlp20) bleek voldoende om het immuunsysteem van Arabidopsis te stimuleren (Oome et al., 2014; Bohm et al., 2014). Behandeling van bladeren met synthetische peptiden was voldoende om typische immunresponsen te geven zoals de productie van reactieve zuurstof en ethyleen, de activatie van afweergenen, en de inductie van resistentie tegen ziekteverwekkers zoals valse meeldauw. Naast Arabidopsis en meerdere andere Brassica soorten bleek ook sla de peptiden te herkennen en een immunrespons te geven (Bohm et al., 2014; Raaymakers, 2018).

Door optimaal gebruik te maken van de modelplant Arabidopsis konden op een efficiënte manier de receptoren gekloneerd worden. Biochemische en genetische studies toonden aan dat de NLP peptiden nlp20 en nlp24 binden aan het membraangebonden Receptor-Like Protein 23. Omdat RLP23 geen intracellulair kinase domein heeft, zoals de meeste receptoren, is het afhankelijk van de co-receptor SOBIR1, een receptor-like kinase (Albert et al., 2015). Samen met een derde receptor, de receptor-like kinase BAK1, leidt herkenning tot de activatie van immuniteit. Deze zogenaamde



Figuur 2: De valse meeldauw van Arabidopsis. Sporulatie op kiemblad: duidelijk zichtbaar zijn de vertakte sporendragers waarop de ongeslachtelijke sporangiosporen worden gevormd, ook zijn links een aantal bladharen van de plant zichtbaar.

pattern-recognition receptoren maken onderdeel uit van het innate of aangeboren immuunsysteem van de plant en zorgen voor de detectie van extracellulaire moleculen (Raaymakers & van den Ackerveken, 2016). De RLP23 receptor komt niet voor in andere plantensoorten terwijl de coreceptoren SOBIR1 en BAK1 sterk geconserveerd zijn binnen het plantenrijk. Aardappelplanten, die normaal geen NLP herkennen, worden door transformatie met een RLP23 transgen nu gevoelig voor nlp20 (Albert et al., 2015). Deze planten laten ook een verminderde vatbaarheid voor *Phytophthora infestans* en *Sclerotinia sclerotiorum* zien, twee ziekteverwekkers die NLP eiwitten produceren. De toepassing van dit soort genen wordt helaas beperkt door onze GMO regelgeving, maar zou anders kunnen bijdragen aan het verhogen van resistentie tegen pathogenen.

Fascinerende ontdekkingen

NLP effectoren zijn een fascinerende groep eiwitten doordat ze geproduceerd worden door vele verschillende microbiële taxa en diverse activiteiten hebben. In het afgelopen decennium is duidelijk geworden dat cytotoxische NLPs alleen actief zijn op membranen van dicotyle planten door een verschil in sphingolipiden met monocotyle planten. Een tweede belangrijke activiteit van NLPs is de activatie van immuniteit in een aantal plantensoorten door receptoren die specifiek NLP fragmenten detecteren. Een belangrijke laatste activiteit blijft onbekend: wat is een mogelijke virulentierol van niet-cytotoxische NLPs? Het feit dat NLPs ook worden geproduceerd door niet-ziekteverwekkers suggereert dat ze mogelijk effecten hebben buiten het plantenrijk. We kijken uit naar nieuwe ontdekkingen over de NLP eiwitten en hun rol voor de micro-organismen die ze produceren.

Referenties

- Albert I., Bohm H., Albert M., Feiler C.E., Imkamp J., Wallmeroth N., et al (2015). An RLP23-SOBIR1-BAK1 complex mediates NLP-triggered immunity. *Nature Plants*. 1:15140. Epub 2015/01/01. doi: 10.1038/nplants.2015.140. PubMed PMID: 27251392.
- Bailey B.A. (1995) Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology* 85:1250-1255. PubMed PMID: 14387007996701536210related:0m8ZlIzrqMcJ.
- Bohm H., Albert I., Oome S., Raaymakers T.M., Van den Ackerveken G. & Nurnberger T. (2014) A conserved peptide pattern from a widespread microbial virulence factor triggers pattern-induced immunity in Arabidopsis. *PLoS Pathog.* 10(11):e1004491. doi: 10.1371/journal.ppat.1004491. PubMed PMID: 25375108; PubMed Central PMCID: PMC4223075.
- Cabral A., Oome S., Sander N., Kufner I., Nurnberger T. & Van den Ackerveken G. (2012) Nontoxic Nep1-like proteins of the downy mildew pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*: repression of necrosis-inducing activity by a surface-exposed region. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 25(5):697-708. doi: 10.1094/MPMI-10-11-0269. PubMed PMID: 22235872.
- Lenarcic T., Albert I., Bohm H., Hodnik V., Pirc K., Zavec A.B., et al. (2017) Eudicot plant-specific sphingolipids determine host selectivity of microbial NLP cytotoxins. *Science* 358(6369):1431-4. Epub 2017/12/16. doi: 10.1126/science.aan6874. PubMed PMID: 29242345.
- Mattinen L., Tshuikina M., Mae A. & Pirhonen M. (2004) Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17(12):1366-75. Epub 2004/12/16. doi: 10.1094/MPMI.2004.17.12.1366. PubMed PMID: 15597742.
- Oome S., Raaymakers T.M., Cabral A., Samwel S., Bohm H., Albert I. et al. (2014) Nep1-like proteins from three kingdoms of life act as a microbe-associated molecular pattern in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(47):16955-60. doi: 10.1073/pnas.1410031111. PubMed PMID: 25368167; PubMed Central PMCID: PMC4250136.
- Ottmann C., Luberacki B., Kufner I., Koch W., Brunner E., Weyand M., et al. (2009) A common toxin fold mediates microbial attack and plant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(25):10359-64. Epub 2009/06/13. doi: 10.1073/pnas.0902362106. PubMed PMID: 19520828; PubMed Central PMCID: PMC42695407.
- Raaymakers T.M. (2018) Activation of plant immunity by microbial NEP1-like protein patterns, PhD thesis.
- Raaymakers T.M., Van den Ackerveken G. (2016) Extracellular recognition of oomycetes during biotrophic infection of plants. *Frontiers in Plant Science*. 7:906. doi: 10.3389/fpls.2016.00906. PubMed PMID: 27446136; PubMed Central PMCID: PMC4915311.
- Seidl M.F. & Van den Ackerveken G. (2019) Activity and phylogenetics of the broadly occurring family of microbial Nep1-Like Proteins. *Annual Review of Phytopathology*. Epub 2019/07/10. doi: 10.1146/annurev-phyto-082718-100054. PubMed PMID: 31283435.
- Van den Ackerveken G. (2017) How plants differ in toxin-sensitivity. *Science* 358(6369):1383-4. Epub 2017/12/16. doi: 10.1126/science.aar4188. PubMed PMID: 29242331.