

The Cf-4 and Cf-9 resistance proteins of tomato: molecular aspects of specificity and elicitor perception

R.A.L. van der Hoorn

Op 31 oktober 2001 promoveerde aan de Wageningen Universiteit Renier A.L. van der Hoorn op een proefschrift getiteld: The Cf-4 and Cf-9 resistance proteins of tomato: molecular aspects of specificity and elicitor perception. Promotor was Prof. dr. P.J.G.M. de Wit, hoogleraar in de Fytopathologie; co-promotor was Dr. M.H.A.J. Joosten (Wageningen Universiteit, Laboratorium voor Fytopathologie).

Inleiding

Om de toenemende wereldbevolking te kunnen voeden, is een voortdurende productieverhoging in de landbouw noodzakelijk. Daarbij is de bescherming van gewassen tegen desastreuze ziekten cruciaal. De interactie tussen de schimmel *Cladosporium fulvum* en zijn gastheer tomaat dient als modelsysteem voor het onderzoek naar interacties tussen planten en hun ziekteverwekkers. Sommige tomatenplanten hebben resistentie (*R*) genen. Deze stellen de plant in staat een schimmel te herkennen wanneer deze een complementair avirulentie (*Avr*) gen bevat. Een aantal van deze *R* en *Avr* genenparen is gekloneerd. Doel van dit promotieonderzoek was uit te zoeken via welk mechanisme planten met een *R* gen in staat zijn een schimmel met het complementaire *Avr* gen te herkennen. Meer kennis op dit gebied zou ons kunnen helpen om de bescherming van belangrijke voedselgewassen tegen ziekten te verbeteren.

Een schimmel op tomaat als modelsysteem

Cladosporium fulvum is een gespecialiseerde ziekteverwekker die de bladvlekkenziekte bij tomaat veroorzaakt. De schimmel infecteert de bladeren van tomatenplanten via de huidmondjes aan de onderkant van het blad. Het infectieproces zal doorgang vinden als er geen *R* genen in de plant aanwezig zijn, die complementair zijn aan de *Avr* genen van de schimmel. Wanneer dit wel het geval is, zal de plant de schimmel herkennen. Deze herkenning resulteert in het aanschakelen van een actieve afweerreactie, waarbij onder andere de cellen rondom de infectiehaard afsterven. Dit wordt ook wel de overgevoelighedsreactie ('HR') genoemd. Door deze afweer is de schimmel niet in staat verder te groeien en is de plant resistent. Op vatbare planten groeit *C. fulvum* alleen in de ruimtes tussen de bladcellen en produceert daar verschillende eiwitten die mogelijk belangrijk zijn voor het infectieproces. Ook de elicitoreiwitten die door *Avr9* en *Avr4* worden gecodeerd, worden door de schimmel in de ruimtes tussen de bladcellen uitgescheiden. Injectie van deze elicitoreiwitten in het blad van de tomatenplant is voldoende om een overgevoelighedsreactie te veroorzaken als de plant het resistentiegen *Cf-9*, respectievelijk *Cf-4* bevat. Zowel *Avr9* als *Avr4* coderen voor kleine, stabiele, cysteine-rijke eiwitten. De complementaire *Cf-9* en *Cf-4* genen coderen voor receptorachtige eiwitten die in de plasmamembraan verankerd zijn. *Cf*-eiwitten hebben aan de buitenkant van de cel een aantal leucine-rijke repeats (LRRs) die kunnen binden aan andere extracellulaire eiwitten. Aan de binnenkant van de cel is slechts een klein 'staartje' van het *Cf*-eiwit aanwezig. De verschillen tussen *Cf-9* en *Cf-4* eiwitten zijn niet groot. Deze verschillen bevinden zich in de N-terminale helft van de *Cf* eiwitten, vooral op plaatsen waar aminozuren aanwezig zijn die aan de buitenkant van de LRRs zitten en waarmee waarschijnlijk een specifiek herkenningsoppervlak gevormd wordt.

Een nieuw gereedschap voor onderzoek aan *Cf* resistentiegenen

Om de rol van de verschillende domeinen in *Cf* eiwitten in de herkenning van AVR's van *C. fulvum* in meer detail te kunnen onderzoeken, is tijdens dit onderzoek een functioneel expressiesysteem ontwikkeld voor *Cf-9* en *Cf-4*. Deze is gebaseerd op de infiltratie van tabaksbladeren met *Agrobacterium* stammen die *Cf* genen op het T-DNA van binaire plasmiden bevatten. Deze techniek wordt ook wel agroinfiltratie genoemd. De AVR eiwitten kunnen worden toegediend via injectie, agroinfiltratie, infectie met een virus die het *Avr* gen bevat of door het gebruik van transgene planten die het *Avr* gen bevatten. Tevens zijn de verschillen beschreven tussen de overgevoelighedsreacties geïnduceerd door *Avr9/Cf-9* en *Avr4/Cf-4*, welke vooral het gevolg zijn van een verschil in activiteit van de *Avr* genen tijdens de expressie in de plant. Tenslotte is aangetoond dat de signaaltransductieroute die leidt tot HR, geconserveerd is in de nachtschadenfamilie, maar waarschijnlijk niet in planten die niet tot deze familie behoren. Een uitzondering hierop vormt sla, behorende tot de composietenfamilie, waarin het *Avr4/Cf-4* genpaar functioneel is.

Verschillen tussen *Cf-4* en *Cf-9* resistentie eiwitten

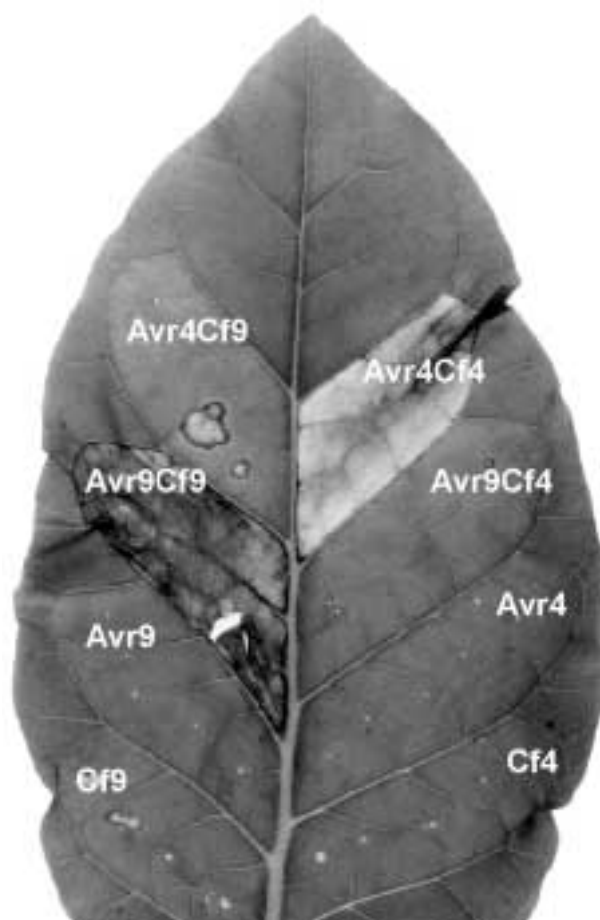
Agroinfiltratie is een uitstekend middel om het effect van mutaties in *Cf*-eiwitten te bestuderen. Deze techniek is vervolgens gebruikt om te bepalen welke domeinen en aminozuren de specificiteit van *Cf*-eiwitten bepalen. Dit is gedaan door domeinen tussen *Cf-4* en *Cf-9* uit te wisselen en vervolgens te kijken naar het effect hiervan op de herkenning van AVR4 en AVR9 eiwitten. *Cf-4* verschilt van *Cf-9* op 67 aminozuurposities en bevat drie deleties. *Cf-4* mist twee LRRs in vergelijking met *Cf-9* en deze blijken belangrijk te zijn voor *Cf-4* functie. De twee extra LRRs in *Cf-9* zijn belangrijk voor *Cf-9* functie. Specifici-

PROMOTIES

teit in Cf-4 zit niet alleen in het LRR domein, maar ook in het B-domein. Dit in tegenstelling tot Cf-9, waar de specificiteit zich enkel in de LRRs bevindt en waarschijnlijk verspreid is over dit gehele domein. De specificiteit in het LRR domein van Cf-4 bevindt zich in naast elkaar gelegen LRRs en bestaat uit slechts drie aminozuren op posities die zich waarschijnlijk aan de buitenzijde van het eiwit bevinden. Het blijkt dat de meeste van de 67 aminozuren die verschillen tussen Cf-4 en Cf-9 niet vereist zijn voor specificiteit, maar waarschijnlijk dienen als een bron voor het genereren van nieuwe specificiteiten.

Evolutie van Cf genen die AVR9 herkenning veroorzaken

Om meer te weten te komen over de aspecten in Cf-9 eiwitten die specificiteit bepalen, is ook naar de variatie van Cf-9 in de natuurlijke populatie van *Lycopersicon pimpinellifolium* (*Lp*) gekeken. Het Cf-9 locus dat we kennen van de gecultiveerde tomaat (*L. esculentum*), is vanuit deze soort ingekruist. Het blijkt dat herkenning van AVR9 veel voorkomt in de gehele *Lp* populatie. Naast Cf-9 is een tweede gen ontdekt, genaamd 9DC, dat de herkenning van AVR9 in *Lp* veroorzaakt. In vergelijking met Cf-9 komt 9DC meer voor in de populatie, is meer verspreid over de regio's waar *Lp* voorkomt en bevatten de 9DC gensequenties meer mutaties. Dit suggereert dat 9DC ouder is dan Cf-9. Het tweede deel van het 9DC gen is vrijwel identiek aan de tweede helft van Cf-9, terwijl de eerste helft vrijwel identiek is aan *Hcr9-9D*, een Cf-homoloog welke naast Cf-9 in het Cf-9 locus ligt. Dit suggereert dat Cf-9 is ontstaan via een intragene recombinatie tussen 9DC en een ander Cf-homoloog. Het feit dat 9DC en Cf-9 eiwitten beide herkenning van AVR9 veroorzaken, maar toch op 61 aminozuur posities van elkaar verschillen, laat zien dat Cf-eiwitten sterk kunnen variëren zonder effect op hun specificiteit.



Figuur 1: Transiënte expressie van Cf-9, Cf-4, Avr9 en Avr4 of combinaties daarvan in bladsectoren van tabak. Foto is 7 dagen na infiltratie met *Agrobacterium* genomen.

Geen rol voor het KKRY motief in Cf-9

Nadat de specificiteit in Cf-eiwitten onderzocht was, is de cellulaire locatie van Cf-eiwitten onderzocht. De aanwezigheid van een dilysine motief in het C-terminale domein van Cf-9 (KKRY) suggereert dat het eiwit zich in het endoplasmatisch reticulum (ER) bevindt, in plaats van in de plasmamembraan (PM). Over de lokalisatie van Cf-9 zijn recentelijk twee publicaties verschenen waarvan de resultaten duidelijk tegenstrijdig waren. Eén publicatie rapporteerde dat Cf-9 in het ER accumuleert en afwezig is in de PM, terwijl de andere publicatie liet zien dat Cf-9 in de PM zit. Bij het onderzoek dat in het proefschrift is beschreven is het dilysine motief gemuteerd, waardoor het Cf-9 eiwit niet meer in het ER kan accumuleren en hiermee is aangetoond dat de Cf-9 mutant nog steeds in staat is om herkenning van AVR9 te veroorzaken, met de inductie van de

HR als gevolg. De resultaten uit dit onderzoek en die uit de twee eerder verschenen publicaties, kunnen worden verklaard met het model dat eiwitten die mogelijk binden aan Cf-9, in staat zijn het dilysine signaal af te schermen. Deze theorie suggereert dat functioneel Cf-9 zich in kleine hoeveelheden in de PM bevindt, alwaar het, als onderdeel van een receptor complex, een rol speelt bij de herkenning van het extracellulaire AVR9 eiwit.

Een nieuw gereedschap voor verdergaand biochemisch onderzoek

De herkenning van AVR9 door tomatenplanten die Cf-9 bevatten vereist waarschijnlijk de aanwezigheid van de hoge-affiniteits bindingsplaats ('HABS') voor AVR9, die in plasmamembranen geïdentificeerd is. Echter, de HABS wordt niet gecodeerd door Cf-9 zelf, omdat deze bindingsplaats ook aanwezig is

in tomatenplanten zonder Cf-9 en ook in vele andere plantensoorten. Omdat het vermoeden bestaat dat zowel de HABS als Cf-9 eiwit een receptorcomplex vormen in de plasmamembraan, is het interessant om de HABS te zuiveren om meer inzicht te krijgen in het moleculaire mechanisme van AVR9 herkenning. In het proefschrift is een procedure beschreven voor het in oplossing brengen van de HABS uit membraanpreparaten, zonder verandering van zijn AVR9-bindende activiteit. Van de 19 zepen die zijn getest, bleek alleen octyl glucoside geschikt voor het in oplossing brengen van de HABS. Het verwijderen van het zeep is cruciaal in deze studies omdat het interfereert met de binding met AVR9. De beschreven procedure kan een essentieel ge-

reedschap vormen voor de studie naar het AVR9 receptorcomplex op biochemisch niveau.

Conclusies en vooruitblik

In de discussie worden de experimentele data van het promotieonderzoek in een breder perspectief geplaatst. Naast AVR9/Cf-9 bestaan er nog veel andere voorbeelden van gen-om-gen interacties waarbij geen directe interactie tussen avirulentie- en resistentie-eiwitten is gevonden. In veel gevallen blijkt dat de specifieke herkenning van de ziekteverwekker extra factoren van de gastheer vereist. Vaak kunnen deze factoren het virulentiedoelwit van het Avr eiwit zijn. De meeste resistentie-eiwitten lijken deze viru-

lentie-eiwitten te 'bewaken'. Deze trend kan verklaard worden door een natuurlijke selectie op resistentiegenen die, via een 'loopgraven oorlog' met de ziekteverwekkers, in de plantenpopulatie behouden blijven, omdat zij een herkenning veroorzaken die niet vermeden kan worden zonder een vermindering van virulentie van de ziekteverwekker. Dit model van resistentie-eiwitten die virulentie doelwitten 'bewaken' zal de focus van huidig onderzoek verplaatsen naar de virulentie doelwitten van Avr eiwitten. Bovendien kan het de beperkte taxonomische uitwisselbaarheid van resistentiegenen verklaren, ondanks het feit dat ze behoren tot geconserveerde genfamilies.

PROMOTIES