

Struktur, Erkennungsspezifität und Regulationsmechanismus des Resistenzproteins Bs4 aus Tomate

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Sebastian Schornack

geboren am 1. Februar 1976 in Karl-Marx-Stadt

Gutachterinnen bzw. Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. Ulla Bonas (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
2. Herr Prof. Dr. Dierk Scheel (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie)
3. Herr Prof. Dr. Martin Parniske (Ludwig-Maximilians-Universität München)

Halle (Saale) im Juli 2006

Tag der Verteidigung: 14. Dezember 2006

urn:nbn:de:gbv:3-000011055

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011055>]

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Schornack, S., Ballvora, A., Gürlebeck, D., Peart, J., Baulcombe, D., Baker, B., Ganai, M.,
Bonas, U., and Lahaye, T. (2004). *Plant Journal* 37, 46-60.

Schornack, S., Peter, K., Bonas, U., and Lahaye, T. (2005). *Molecular Plant-Microbe
Interactions* 18, 1215-1225.

Zusammenfassung

Das Resistenz (*R*)-Gen *Bs4* aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*) vermittelt Resistenz gegen Stämme des Erregers der Bakteriellen Fleckenkrankheit *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), die das Avirulenz (*Avr*)-Protein *AvrBs4* exprimieren. *Bs4* ist konstitutiv schwach exprimiert und kodiert für ein cytoplasmatisches Protein mit einer aminoterminalen Toll/Interleukin1-Rezeptor-ähnlichen (TIR)-Domäne, einer Nukleotidbindedomäne (NB) und carboxyterminalen Leucin-reichen Wiederholungen (LRR). *Bs4* induziert in mehreren Pflanzenarten bei gemeinsamer *Agrobacterium*-vermittelter transienter Expression mit kern- bzw. cytoplasmatisch lokalisierten *AvrBs4*-Derivaten eine hypersensitive Reaktion (HR), die unabhängig von Kernlokalisierungssequenzen in *AvrBs4* ist. Für die HR sind die Signalkomponenten *EDS1*, *SGT1* und *Hsp90* notwendig. *Bs4* vermittelt auch die Erkennung von *Hax3* und *Hax4*, zwei *AvrBs3*-ähnlichen Proteinen, sowohl bei *Xcv*-vermittelter Translokation, als auch bei niedriger Expression unter *Bs4*-Promotor-Kontrolle. Dagegen erfolgt *AvrBs3*-Erkennung nur bei Überexpression. Um zu testen, ob *Bs4*-Domänen intramolekulare Interaktionen eingehen können, wurden die *Bs4*-Domänen-Derivate *in planta* exprimiert. Durch Expression von TIR und NB-LRR *in trans* wurde eine *AvrBs4*-spezifische HR induziert. Außerdem interagierten TIR- und NB-LRR-Domäne bzw. TIR-NB- und LRR-Domäne miteinander, was auf intramolekulare Interaktionen in *Bs4* hindeutet. Diese Domänen-Interaktionen sind in Gegenwart von *AvrBs4* nicht mehr nachweisbar. Außerdem werden die Protein-Mengen von *Bs4* und *Bs4*-Domänen, die allein keine HR auslösen, stark reduziert. Diese *AvrBs4*-induzierten Effekte weisen auf eine Zustandsänderung des *Bs4*-Proteins hin. Um die Rolle von *Hsp90* bei der *Bs4*-vermittelten Resistenz zu analysieren, wurden Überexpressions- und Silencing-Experimente gekoppelt mit phänotypischen und biochemischen Analysen durchgeführt. *Hsp90* interagiert mit *Bs4* und *Hsp90* ist notwendig für detektierbare *Bs4*-Mengen. Sowohl Silencing als auch Überexpression von *Hsp90* hemmt die *Bs4*-HR und die HRs anderer NB-LRR-Proteine. *Hsp90*-Überexpression führt zu mehr *Bs4* und bremst den *AvrBs4*-induzierten Abbau von *Bs4*. Dieser Abbau erfolgt nicht über Polyubiquitinierung, da deren Inhibierung durch Expression der Ubiquitin-Mutante *ubr48* den *Bs4*-Abbau nicht stoppt. Vielmehr sind die *Bs4*-Mengen dann bereits ohne *AvrBs4* stark reduziert. Die Expression von *ubr48* beeinträchtigt auch die HRs anderer NB-LRR-Proteine.

Summary

The tomato (*Lycopersicon esculentum*) Bs4 disease resistance (*R*)-gene mediates resistance towards strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), the causal agent of bacterial spot disease, that express the avirulence (*Avr*) protein AvrBs4. Bs4 is constitutively expressed at low levels and encodes a cytoplasmic R-protein consisting of an amino terminal Toll/Interleukin1-like (TIR) domain, a central nucleotide binding site (NB) and carboxy terminal leucine rich repeats (LRR). Bs4 induces a hypersensitive response (HR) upon transient *Agrobacterium* mediated coexpression with nuclear or cytoplasmically localized AvrBs4 derivatives in tomato, *Nicotiana benthamiana* and other plant species independent of Avr encoded nuclear localisation sequences. This HR requires the signaling components *EDS1*, *SGT1* and *Hsp90*. Bs4 also mediates recognition of Hax3 and Hax4, two other AvrBs3-like proteins upon *Xcv* type III-dependent translocation as well as low-level transient expression driven by the *Bs4* promoter. By contrast, AvrBs3 requires to be overexpressed to trigger Bs4-HR.

Bs4 domains were expressed *in planta* to address whether they interact *in trans*, indicating intramolecular interactions. Indeed, Bs4 TIR and NB-LRR domain derivatives conferred AvrBs4-induced HR upon expression *in trans*. Furthermore the TIR interacts with the NB-LRR domain and the TIR-NB interacts with the LRR domain *in planta*, and these interactions are resolved in presence of AvrBs4. Protein levels of Bs4 and also Bs4 domains that are alone incapable of eliciting HR decline AvrBs4-dependently pointing towards a state transition of the Bs4 protein.

Hsp90 interacts with Bs4 and is required to maintain detectable Bs4 amounts. Both, silencing and overexpression of *Hsp90* inhibit the Bs4 HR and HRs of other NB-LRR proteins. Conversely, *Hsp90* overexpression results in increased Bs4 levels and blocks the Avr induced disappearance of Bs4. This does not involve polyubiquitination, as *ubr48* expression that blocks polyubiquitination does not prevent disappearance. Instead, *ubr48* expression attenuates Bs4 levels independent of AvrBs4. Expression of *ubr48* does not only interfere with Bs4 but also with HRs triggered by other NB-LRR proteins

Inhalt

Zusammenfassung	II
Summary	III
Inhalt	IV
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	VI
1. Einleitung	1
1.1. Pflanzliche Resistenzmechanismen	1
1.2. Pflanzen-Pathogen-Interaktionen	3
1.3. Das bakterielle Pathogen <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	3
1.4. Die AvrBs3-Effektor-Familie	4
1.5. AvrBs3-ähnliche Proteine als Avirulenzdeterminanten	6
1.6. Resistenzgene gegen AvrBs3-ähnliche Proteine	8
1.7. Das Resistenzgen <i>Bs4</i> aus Tomate kodiert für ein TIR-NB-LRR-Protein	9
1.8. Modelle für den Funktionsmechanismus von NB-LRR-Proteinen	12
1.9. Ebenen der Regulation pflanzlicher Resistenz	13
1.10. Zielstellung	15
2. Ergebnisse	16
2.1. Übersicht der Publikationen und Manuskripte	16
2.2. Das Tomaten-Resistenzprotein <i>Bs4</i> ist ein vorhergesagtes nicht-nukleäres TIR-NB-LRR Protein, das Abwehrreaktionen gegen stark verkürzte Derivate von AvrBs4 und überexprimiertem AvrBs3 vermittelt	18
2.2.1 Zusammenfassung	18
2.2.2 Manuskript 1	19
2.2.3 Ergänzende Ergebnisse	34
2.2.3.1. Erkennung AvrBs3-ähnlicher Proteine in verschiedenen Pflanzenarten	34
2.2.3.2. <i>Bs4</i> -Funktionalität in heterologen Pflanzenarten	37
2.3. Das Expressionsniveau <i>avrBs3</i> -ähnlicher Gene beeinflusst die Spezifität der Tomaten- <i>Bs4</i> -, jedoch nicht der Paprika- <i>Bs3</i> -vermittelten Erkennung	39
2.3.1 Zusammenfassung	39
2.3.2 Manuskript 2	40
2.3.3 Zusätzliche Ergebnisse	51
2.3.3.1. <i>Bs4</i> - und AvrBs4-Strukturvorhersagen über <i>in silico</i> 3D-Modellierung	51
2.3.3.2. 3D-Modell der TIR-Domäne von <i>Bs4</i>	51

2.3.3.3.	Die NB-Domäne von Bs4 weist eine ARC3-ähnliche Region auf.....	52
2.3.3.4.	3D-Strukturmodell der LRR-Domäne von Bs4.....	54
2.3.3.5.	3D-Modell einer möglichen AvrBs4-Bs4-Interaktion.....	55
2.4.	Die Erkennung des AvrBs4-Proteins aus <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> wird durch miteinander interagierende Bs4-TIR-NB- und LRR-Domänen vermittelt, durch Überexpression oder Silencing von <i>Hsp90</i> aufgehoben und geht außerdem mit dem Abbau von Bs4 einher	57
2.4.1	Zusammenfassung	57
2.4.2	Manuskript 3	58
3.	Diskussion	100
3.1.	Die Bs4-vermittelte Erkennung von AvrBs4 weicht vom generellen Erkennungsprinzip AvrBs3-ähnlicher Proteine ab	100
3.2.	Die Fähigkeit zur Erkennung von verkürztem AvrBs4 ist auf die Gattung <i>Lycopersicon</i> beschränkt	102
3.3.	Die Bs4-Erkennungsspezifität ist abhängig von der Avr-Menge.....	104
3.4.	Bs4 und AvrBs4: indirekte oder direkte Interaktion?.....	106
3.5.	Die Bs4-Menge wird posttranslational reguliert	108
3.6.	AvrBs4 induziert die Auflösung von Bs4-Domänen-Interaktionen und führt zum Verschwinden von Bs4	109
3.7.	Hsp90 reguliert die Bs4-Aktivität	111
3.8.	Die Bs4-HR benötigt Polyubiquitinierung	112
3.9.	Die Blockierung der Ubiquitinierung hat einen indirekten Effekt auf die Bs4-Funktion.....	113
3.10.	Das Bs4-AvrBs4-System birgt einige ungelöste Fragen und bietet vielfältige Möglichkeiten zur weiteren Charakterisierung	114
4.	Literatur	116
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	128
	Lebenslauf	129
	Veröffentlichungen.....	130

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen sind fortlaufend nummeriert. Querverweise zu Abbildungen in Manuskripten sind durch Manuskript-Nummer und dortige Abbildungsnummer angegeben (z.B. M2-1, Manuskript 2, Abb. 1).

Abbildungen

Abb. 1. Modell der Anpassung von bakteriellen Pathogenen an pflanzliche Resistenzmechanismen.....	2
Abb. 2. Phänotypen der <i>Xanthomonas</i> – Tomate – Interaktion.....	4
Abb. 3. Struktur AvrBs3-ähnlicher Proteine	5
Abb. 4. Effekte von AvrBs4 in resistenten Pflanzen.....	7
Abb. 5. Domänen-Struktur von NB-LRR-Proteinen.....	10
Abb. 6. Direktes und indirektes Erkennungsprinzip.	12
Abb. 7. Schalter-Modell der NB-LRR-Aktivierung.....	14
Abb. 8. Phänotypen nach transienter Expression von <i>avr</i> -Genen, <i>Bs4</i> und Reportergenen	38
Abb. 9. 3D-Modell der Bs4-TIR-Domäne.....	51
Abb. 10. 3D-Modell der Bs4-NB-Domäne..	53
Abb. 11. 3D-Modell der Bs4-LRR-Domäne	54
Abb. 12. AvrBs4-Strukturvorhersage.....	55
Abb. 13. Modell einer Bs4-AvrBs4-Assoziation..	56
Abb. 14. Taxonomische Verbreitung der Erkennung AvrBs3-ähnlicher Proteine und der Bs4-Funktionalität innerhalb der getesteten Nachtschattengewächse.....	103
Abb. 15. Funktionsprinzip von ubR48.	112
Abb. 16. Dosis-Modell des ubR48-Einflusses auf die Bs4-HR.	113

Tabellen

Tabelle 1. Pflanzliche Resistenzgene, die die Erkennung AvrBs3-ähnlicher Proteine vermitteln.....	8
Tabelle 2. Verbreitung der Avr-Aktivität von AvrBs3-ähnlichen Proteinen bzw. der <i>Bs4</i> -Funktionsfähigkeit.....	35