

Genetic Analysis of Plant Innate Immunity

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Xunli Lu

aus Wuhan, China

Köln, Oktober 2010

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln in der Abteilung für Molekulare Phytopathologie (Direktor: Prof. Dr. P Schulze-Lefert) angefertigt.



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT



Max-Planck-Institut für
Pflanzenzüchtungsforschung

Berichterstatter:	Prof. Dr. Paul Schulze-Lefert Prof. Dr. Marcel Bucher Prof. Dr. Thorsten Nürnberger
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Ute Höcker
Tag der mündlichen Prüfung:	25 th November 2010

Summary

Plants detect microbe associated molecular patterns (MAMPs) and trigger immune responses to restrict the growth of microbes. The Arabidopsis Leucine-rich repeat receptor-like kinases EFR and FLS2 respectively recognize bacterial MAMPs EF-Tu and flagellin (and their epitopes elf18 and flg22). The molecular basis of MAMP-triggered immunity is largely unknown. We isolated “*priority in sweet life*” (*psl*) mutants that are impaired in elf18-induced, but not flg22-induced signaling through forward genetic screens. These *psl* mutants exhibit hyper-susceptibility to a virulent bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000). We showed that *PSL2* encodes an endoplasmic reticulum (ER) lumen-localized enzyme UDP-glucose: glycoprotein glycosyltransferase and that *PSL4* and *PSL5* encode the Glucosidase II (GII) β and α subunit respectively. Mutant variants of STT3A, a key unit of the oligosaccharyltransferase complex, are also elf18-insensitive. STT3A, UGGT and GII are all highly conserved enzymes in eukaryotes. STT3A and GII regulate the *N*-glycosylation of membrane-localized proteins that are subsequently subject to folding and maturation through the calnexin/calreticulin-UGGT cycle. EFR steady-state levels, receptor ligand binding activity, and EFR signaling outputs are impaired in strong *psl2*, *psl4* and *stt3a* mutants. These data demonstrated that EFR is a client of the ER protein quality control system. EFR signaling is partially and differentially impaired in two weakly dysfunctional *gIIa* alleles, *psl5-1* and *rsw3*, which retain wildtype-like EFR steady-state levels. Interestingly, *rsw3* plants exhibit supersusceptibility to *Pst* DC3000 despite a nearly intact co-activation of MAPKs, reactive oxygen species and callose deposition in response to elf18. This indicates those signaling outputs are insufficient to mount effective immunity. *rsw3* plants fail to maintain high transcript levels of *WRKY*, *PR1*, *PR2* and *PROPEP* genes at late time points after elf18 elicitation. These data point to the importance of sustained MAMP receptor signaling as a key step in the establishment of robust immunity. We further observed that *psl2*; *psl4* and *psl5*, but not *efr*, mutant plants show a swollen root phenotype under high sucrose conditions, indicating the existence of another client protein than EFR that maintains root integrity upon abiotic stress. Our findings identify the ER-resident protein quality control system as a convergence point of biotic and abiotic stress responses in plants (Chapter 1).

Plants exhibit non-host resistance to non-adapted pathogens. Arabidopsis non-host resistance to non-adapted powdery mildew fungi involves both pre-invasive and post-invasive defense responses. Pre-invasive defense mediated by PEN1, PEN2 and PEN3 restricts fungal entry into leaf epidermal cells. EDS1, PAD4 and SAG101 function redundantly in post-invasive defense to limit subsequent invasive fungal growth that is terminated coincident with a host cell death response. To identify novel components in post-invasive non-host resistance, a mutational screen was performed using the EMS-mutagenized *pen2-1* mutant line. The mutant *enhancer of pen* (*epen*) shows enhanced epiphytic hyphal growth of both *Erysiphe pisi* (*E. pisi*) and *Blumeria graminis* f sp. *hordei* (*B. graminis*), the pea and barley powdery mildew respectively, and in which the host cell death response is delayed compared to *pen2* single mutants. An Arabidopsis whole genome re-sequencing approach was combined with a map-based cloning strategy to identify a candidate *EPEN* gene encoding a protein with a vacuolar protein sorting-associated protein domain. To validate the candidate *EPEN*, we crossed *pen2-1* plants with T-DNA insertion mutants of this gene. In future work we will analyze the inoculation phenotype of *E. pisi* and *B. graminis* on the resulting double mutants (Chapter 2).

Plant disease resistance (R) proteins recognize avirulence (Avr) effectors of pathogens and trigger immune responses that are typically associated with a hypersensitive cell death response. The barley MLA protein confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f sp. *hordei* (*Bgh*). Previous gel filtration experiments of barley leaf protein extracts revealed that the 105 kDa monomeric MLA1-HA forms *in planta* ~300-400 kDa complexes. To identify putative components present in MLA1-HA complexes *in planta*, we optimized the co-immunoprecipitation (Co-IP) conditions suitable for mass spectrometry (MS) analysis. HA peptides in an elution buffer containing MS compatible detergent efficiently eluted MLA1-HA without IgG contamination. However, preliminary MS analysis failed to detect peptide sequences of MLA1-HA, indicating the need of further protocol modifications (Chapter 3).

A European consortium including research groups at the MPIPZ, Germany, has recently established an annotated *Bgh* genome assembly. In this work, I have contributed to the annotation of the *Bgh* genome. We analyzed the annotated gene

models for those encoding putative effector proteins. Among 225 candidates for secreted effector proteins (CSEPs), the largest group represents a family of RNase-like proteins. CSEP sequence similarity analysis revealed the existence of at least 14 additional CSEP families. The sequence alignments will be useful for future functional characterization of *Bgh* effector candidates (Chapter 4).

Zusammenfassung

Pflanzen erkennen Mikroben-assoziierte molekulare Signaturen (MAMS) und initiieren eine Immunantwort um die Ausbreitung von Mikroben einzuschränken. Die Arabidopsis Rezeptor-Kinasen EFR und FLS2 erkennen die bakteriellen MAMS EF-Tu, beziehungsweise Flagellin (sowie ihre Epitopen elf18 und flg22). Die molekulare Grundlage dieser MAMS-initiierten Immunität ist größtenteils unbekannt. Durch eine genetische Sichtung identifizierten wir „*priority in sweet life*“ (*psl*) Mutanten, die eine beeinträchtigte Erkennung von elf18, aber nicht flg22, zeigen. Diese *psl* Mutanten sind gegenüber dem virulentem Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) anfälliger als Wildtyp-Pflanzen. *PSL2* kodiert für das im Endoplasmatischen Reticulum (ER) lokalisierte Enzym UDP-glucose::glycoprotein glycosyltransferase (UGGT), *PSL4* und *PSL5* kodieren für die Glucosidase II (GII) β , beziehungsweise α Untereinheiten. Mutanten von *STT3A*, einer wichtigen Untereinheit des Oligosaccharyltransferase Komplexes sind ebenfalls insensitiv für elf18. *STT3A*, UGGT und GII sind hochkonservierte Enzyme in Eukaryoten. *STT3A* und GII regulieren die N-Glykosylierung von Membran-lokalisierten Proteinen, die anschließend zur Faltung und Reifung in den calnexin/calreticulin-UGGT Zyklus gelangen. In starken *psl2*, *psl4* und *stt3a* Mutanten sind die EFR Akkumulation, Liganden-Bindung von EFR und EFR-induzierte Antworten stark beeinträchtigt. Diese Daten zeigen, dass EFR ein Klient der ER-lokalisierten Protein Qualitätskontrolle ist. In zwei schwach dysfunktionalen Allelen, *psl5-1* und *rsw3*, die unveränderte EFR Akkumulation aufweisen, sind die Antworten von EFR partiell und differentiell beeinträchtigt. Interessanterweise sind *rsw3* Pflanzen trotz der annähernd intakten elf18-induzierten Co-Aktivierung von MAPKs, reaktiven oxidativen Spezies und Callose Anlagerung, gegenüber *Pst* DC3000 anfälliger als Wildtyp-Pflanzen. Dies impliziert, dass diese induzierten Antworten unzureichend sind, um eine effektive Immunität aufzubauen. *rsw3* Pflanzen können die elf18-induzierten Transkript-Akkumulation von *WRKY*, *PR1*, *PR2* und *PROPEP* Genen nicht über längere Zeiträume aufrechterhalten. Diese Daten zeigen die Bedeutung einer anhaltenden MAMS-Rezeptor Aktivierung für die Ausführung einer robusten Immunantwort. Desweiteren stellten wir fest, dass *psl2*, *psl4* und *psl5*, jedoch nicht

die *efr* Mutanten eine angeschwollene Wurzel in der Gegenwart hoher Saccharose Konzentrationen aufwiesen. Dies weist auf die Existenz eines anderen Klienten-Proteins als EFR hin, das für die Aufrechterhaltung der Wurzel-Integrität bei abiotischem Stress zuständig ist. Unsere Ergebnisse identifizieren die ER-lokalisierte Protein-Qualitätskontrolle als einen Knotenpunkt für biotische und abiotische Stress-Antworten in Pflanzen (Kapitel 1).

Pflanzen weisen Nichtwirts-Resistenz gegen nichtadaptierte Pathogene auf. In Arabidopsis beinhaltet die Nichtwirts-Resistenz gegen Mehltau sowohl prä- als auch post-invasive Abwehrreaktionen. Die prä-invasive Abwehr wird durch PEN1, PEN2 und PEN3 vermittelt, welche den Eintritt des Pilzes in die Blattepidermiszellen begrenzen. EDS1, PAD4 und SAG101 haben eine redundante Funktion in der post-invasiven Abwehr, die mit einem Wirtszelltod korreliert, und invasives Pilzwachstum begrenzt. Zur Identifizierung von neuen Komponenten der post-invasiven Abwehr wurde eine genetische Sichtung der EMS-mutagenisierten *pen2-1* Mutantenlinie durchgeführt. Die Mutante *enhancer of pen* (*epen*) weist ein erhöhtes epiphytisches Hyphenwachstum des Erbsen- sowie Gerste-Mehltau, *Erysiphe pisi* bzw. *Blumeria graminis* f sp. *hordei*, auf, in der ein verzögerter Wirtszelltod beobachtet wurde. Durch eine Arabidopsis Genom-Resequenzierung in Verbindung mit einer DNA Marker-gestützten Genisolierung haben wir ein Kandidaten-Gen für *EPEN* identifiziert, das für ein Protein mit einer ‚vacuolar protein sorting-associated‘ Proteindomäne kodiert. Zur Bestätigung des *EPEN* Kandidaten-Gens kreuzten wir eine T-DNA Insertionsmutante dieses Gens mit *pen2-1* Pflanzen, um zukünftig den Infektionsphänotyp der Doppelmutante mit *E. pisi* und *Bgh* untersuchen zu können (Kapitel 2).

Pflanzen besitzen Resistenzproteine, die Avirulenz (Avr) Effektoren des Pathogens erkennen und eine Immunantwort einleiten, die in der Regel mit einem programmiertem Zelltod einhergeht. Das MLA R-Protein aus Gerste vermittelt rassenspezifische Resistenz gegen den Gerste-Mehltaupilz *Blumeria graminis* f sp. *hordei* (*Bgh*). Mittels Gelfiltration wurde in vorhergehenden Arbeiten ein MLA1-HA Komplex von ca. 300–400 kDa nachgewiesen. Zur Isolierung der mutmasslichen Komplexkomponenten haben wir die Bedingungen für die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) für anschließende massenspektrometrische Analysen optimiert. Durch das

Verwenden von einem Elutionspuffer mit HA Peptiden und einem für die Massenspektrometrie (MS) kompatiblen Detergenz konnte das MLA1-HA Protein effizient und ohne IgG Kontamination eluiert werden. Jedoch konnten bisher mittels MS Analyse keine MLA1-HA Peptidsequenzen detektiert werden. Daher sind in Zukunft weitere Protokollmodifikationen erforderlich (Kapitel 3).

Das Genom des Gerste-Mehltaupilzes *Bgh* wurde durch ein europäisches Konsortium einschliesslich von Forschungsgruppen des MPIPZ in Deutschland sequenziert. Die Annotierung des Genomes erfolgte automatisch sowie manuell. Ich habe zu diesem Projekt einen Teil der annotation beigesteuert. Die annotierten Genmodelle wurden im Hinblick auf mutmaßliche Effektorproteine untersucht. Darunter bilden die RNase-ähnlichen Proteine eine große Gruppe der insgesamt 225 candidates for secreted effector proteins (CSEPs). Zusätzlich haben wir weitere 14 CSEP Familien aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit identifiziert. Die Sequenzinformationen werden in Zukunft für die funktionale Charakterisierung der Effektorkandidaten nützlich sein (Kapitel 4).