

Structural insights of powdery mildew avirulence effectors

Inaugural Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Yu Cao

aus

Hubei, China

Köln, December. 2022

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Jijie Chai und Prof. Dr. Paul Schulze-Lefert durchgeführt.

The work described in this thesis was conducted under the supervision of Prof. Dr. Jijie Chai and Prof. Dr. Paul Schulze-Lefert at the Max Planck Institute for Plant Breeding Research.



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT



Berichterstatter:

Prof. Dr. Jijie Chai

Prof. Dr. Bart P.H.J. Thomma

Prüfungsvorsitzender:

Prof. Dr. Alga Zuccaro

Tag der Disputation:

27. February. 2023

Abstract

Plant-pathogen interactions are often subject to a population-level arms race involving competing sets of co-evolving genes encoding plant immune receptors and pathogen effectors, the latter required for pathogen virulence and the former for host immunity. Intracellular nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing receptors (NLRs) in plants can detect a fraction of a pathogen's effector repertoire, known as avirulence (AVR) effectors, and activate immune responses that terminate pathogen proliferation. The loci *Mildew locus a (Mla)* and *Powdery Mildew Resistance (Pm2)* encode NLRs that belong to a subclass with a N-terminal coiled-coil domain (CNLs) and confer disease resistance against various biotrophic fungal pathogens in cereal crops, including powdery mildews. The ascomycete powdery mildews *Blumeria graminis* f. sp. *hordei (Bgh)* and *Blumeria graminis* f. sp. *tritici (Bgt)* infect barley and wheat, respectively. To establish virulence, *Bgh* and *Bgt* secrete hundreds of effector proteins that act inside or outside the plant cell to manipulate host cellular processes to promote pathogen growth. Co-evolutionary diversification of NLRs in barley and wheat populations resulted in allelic variants of *Mla* and *Pm2* resistance genes each capable of recognizing different strain-specific powdery mildew AVR effectors in the corresponding pathogen populations.

In this thesis, to gain a better understanding of powdery mildew AVR effectors at the molecular level, I sought to obtain three-dimensional structures using X-ray crystallography. For this, an extensive optimization of the protein expression system and purification method was conducted. Here, by establishing conditions that allow the formation of intramolecular disulfide bridges (SHuffle *E. coli* or insect cell expression system), and prevent the formation of intermolecular disulfide bridges (optimization of reducing agents concentration during purification and crystallization), I obtained well-diffracting crystals for AVR_{A6}, AVR_{A7}, AVR_{A10}, AVR_{A22} and AVR_{PM2}.

The cores of the five *Blumeria graminis* AVR effector proteins are composed of two β -sheets and a central α -helix. Structural comparison revealed that these AVR effectors adopt a common structural fold bearing homology to that of microbial RNases from the T1/F1 family, although they are highly sequence-diversified (with the exception of allelic AVR_{A10} and AVR_{A22}). I also show that they are pseudo-RNases with diversified structural features and do not produce 2', 3'-cNMPs compared to RNase T1. Thus, the AVR effectors have lost both RNase and 2', 3'-cNMP synthetase activities. These AVR effectors belong to a diversified family of more than 100 secreted RNase-like proteins in grass powdery mildews whose accumulation is associated with the establishment of an invasive fungal infection structure, the haustorium, and is referred to as RALPH effector family. I show that RALPH effector subfamilies that harbour avirulence effectors each display distinct or overlapping conserved surface arrays. By structure-guided design of effector hybrids generated between AVR_{A6} and RALPH effector BLGH_00698/CSEP0333,

which belong to the same subfamily, it was possible to identify residues in AVR_{A6} that are necessary for recognition by MLA6. Combining the results of my findings and of previous studies (Bauer et al. 2021, Manser et al. 2021), I conclude that MLA6, MLA10, MLA22 and PM2 CNLs each recognize distinct or overlapping surface patches on the common RALPH effector scaffold. Previous studies reported evidence for the direct interaction of MLA7/AVR_{A7}, MLA10/AVR_{A10}, MLA13/AVR_{A13} in yeast and by split-luciferase assays *in planta* (Saur et al. 2019). Indeed, MLA7/AVR_{A7} can co-immunoprecipitate when co-expressed in the evolutionary unrelated insect cell expression system. Similarly, MLA1 and AVR_{A1} can be co-immunoprecipitated in insect cells, which is further evidence that recognition of RALPH avirulence effectors by MLA immune receptors relies on a direct interaction of matching *Bgh* effectors.

Based on my results, I hypothesize that different RALPH subfamilies harboring avirulence effectors may have each evolved distinct virulence activities. Furthermore, the effector structures determined here, together with previous results and the identification of residues needed for recognition of AVR_{A6} by MLA6, suggest that RALPH effectors can bind to the LRR of cognate MLA or PM2 receptors in different relative orientations. These findings imply a model in which the co-evolution of the barley *Mla* - *Bgh* pathogen interaction is driven by MLA sequence diversification upon detection of distinct or overlapping surface patches on a common RALPH structural scaffold.

In summary, by resolving the structures of five powdery mildew AVR effectors, important structural insights into potential virulence and avirulence activities of biotrophic plant pathogens can be gained. Understanding the structural basis of how sequence-diversified effectors are recognized by MLA/PM2-CNLs to activate a potent immune response is crucial to achieve the long-term goal of engineering novel and broad-spectrum resistance.

Zusammenfassung

Während ihres gemeinsamen Evolutionsprozesses befinden sich Pflanzen und Krankheitserreger in einem molekularen Wettrüsten. Intrazelluläre Nukleotidbindende Domänen- und Leucin-reiche Repeats-enhaltende Immunrezeptoren (NLRs) in Pflanzen können Avirulenz-Effektoren (AVR) von pathogenen Mikroben erkennen. Der *Mildew locus a (Mla)* und die *Powdery Mildew Resistance (Pm)*-Gene kodieren NLRs und verleihen Resistenz gegen verschiedene biotrophe Pilzpathogene in Getreiden, einschließlich dem Gräsermehltau. Die Mehлтаupilze *Blumeria graminis* f. sp. *hordei (Bgh)* und *Blumeria graminis* f. sp. *tritici (Bgt)* befallen Gerste bzw. Weizen. Für die Virulenz der pathogenen Pilze scheiden *Bgh* und *Bgt* Hunderte von Effektorproteinen aus, die innerhalb oder außerhalb der Pflanzenzelle wirken und die zellulären Prozesse des Wirts manipulieren, um das Wachstum des Pathogens zu fördern. NLRs die von allelischen Varianten der Resistenzgene *Mla* in Gerste und *Pm2* im Weizen kodiert werden, erkennen jeweils isolat-spezifische AVR Effektoren von *Bgh* bzw. *Bgt* und lösen dadurch eine wirksame Immunantwort aus.

Um die AVR-Effektoren des Mehltaus auf molekularer Ebene besser zu verstehen, habe ich in dieser Arbeit deren dreidimensionale Strukturen mittels Röntgenkristallographie bestimmt. Zu diesem Zweck wurden das Proteinexpressionssystem und die Aufreinigungsmethode der Pilzproteine umfassend optimiert. Entscheidend war die Optimierung der Reduktionsmittelkonzentration während der Aufreinigung und Kristallisation. Durch die Schaffung von Bedingungen, die die Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken ermöglichen (SHuffle *E. coli* oder Insektenzell-Expressionssystem) und die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken verhindern erhielt ich gut beugende Proteinkristalle für AVR_{A6}, AVR_{A7}, AVR_{A10}, AVR_{A22} und AVR_{PM2}.

Die Kerne der fünf *Blumeria graminis* AVR-Effektorproteine bestehen aus zwei β -Sheets und einer zentralen α -Helix. Strukturelle Vergleiche zeigen, dass die AVR-Effektorproteine ein gemeinsames strukturelles Gerüst haben und eine strukturelle Homologie mit pilzlichen RNasen der T1/F1-Familie aufweisen, obwohl sie (mit Ausnahme der allelischen AVR_{A10} und AVR_{A22}) eine hohe Sequenzdiversität besitzen. Ich zeige auch, dass sie Pseudo-RNasen mit diversifizierten strukturellen Merkmalen sind und im Vergleich zu RNase T1 keine 2', 3'-cNMPs produzieren. Die AVR-Effektoren haben also sowohl ihre RNase- als auch ihre 2',3'-cNMP-Synthetase-Enzymaktivitäten verloren. Die AVR-Effektoren gehören zu einer diversifizierten Familie von mehr als 100 sekretierten RNase-ähnlichen Proteinen im Gräsermehltau, deren Akkumulation mit der Etablierung einer invasiven Pilzinfektionsstruktur, dem Haustorium, verbunden ist und als RALPH-Effektorfamilie bezeichnet wird. Ich zeige, dass RALPH-Effektor-Unterfamilien, die Avirulenz-Effektoren beherbergen, unterschiedliche oder sich überlappende konservierte Oberflächenanordnungen aufweisen. Auf der Grundlage von strukturgeleiteten Effektor-

Hybriden von AVR_{A6} und dem Unterfamilienmitglied BLGH_00698/CSEP0333 konnten AVR_{A6} Aminosäurereste identifiziert werden, die für die Erkennung durch MLA6 wichtig sind. Kombiniert man die Ergebnisse früherer Studien und meine Daten (Bauer et al. 2021, Manser et al. 2021), kommt man zu dem Schluss, dass MLA6, MLA10, MLA22 und PM2 NLRs jeweils unterschiedliche oder überlappende Oberflächenbereiche auf einem gemeinsamen RALPH-Effektorgerüst erkennen. Frühere Studien haben Hinweise auf eine direkte Interaktion von MLA7/AVR_{A7}, MLA10/AVR_{A10}, MLA13/AVR_{A13} in Hefe und über Split-Luciferase Prüfverfahren (Saur et al. 2019) gefunden. In der Tat können MLA7/AVR_{A7} im evolutionär nicht verwandtem Insektenzellsystem co-immunopräzipitieren. Darüber hinaus können MLA1 und AVR_{A1} in Insektenzellen gemeinsam immunpräzipitieren, was ein weiterer Beleg dafür ist, dass die direkte Interaktion von passenden MLA- und AVR_A-Paaren ein konserviertes Prinzip der Aktivierung von MLA-vermittelten Immunreaktionen ist.

Auf der Grundlage meiner Ergebnisse stelle ich die Hypothese auf, dass verschiedene RALPH-Unterfamilien, die Avirulenz-Effektoren beherbergen, jeweils unterschiedliche Virulenzaktivitäten entwickelt haben könnten. Darüber hinaus deuten die hier ermittelten Effektor-Proteinstrukturen zusammen mit früheren Ergebnissen und der Identifizierung wichtiger Reste für die Erkennung von AVR_{A6} durch MLA6 darauf hin, dass RALPH-Effektoren an die LRR der entsprechenden MLA- oder PM2-Rezeptoren in unterschiedlichen relativen Ausrichtungen binden können. Diese Ergebnisse deuten auf ein Modell hin, in dem die Ko-evolution der Gersten-Mla-Bgh-AVRA-Pathogen-Interaktion durch Diversifizierung der MLA-Sequenz für die Erkennung von unterschiedlichen oder überlappenden Oberflächenfeldern auf einem gemeinsamen strukturellen Effektorgerüst vorangetrieben wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Proteinstrukturen von fünf Mehltau-AVR-Effektoren wichtige Einblicke in die Virulenz- und Avirulenzaktivitäten biotropher Pflanzenpathogene gewonnen werden können. Das Verständnis der strukturellen Grundlage dafür, wie sequenzdiversifizierte Effektoren von MLA/PM2-CNLs erkannt werden, um eine Immunantwort zu aktivieren, ist entscheidend für das Erreichen des langfristigen Ziels der Entwicklung neuartiger und breit angelegter Resistenzen.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen – , die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Jijie Chai und Prof. Dr. Paul Schulze-Lefert betreut worden.

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffenden Veränderungen, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen

Köln,

Yu Cao



Köln, December. 2022

Curriculum Vitae

Yu Cao

Carl-von-linne weg 10 50829 Köln | +49 221 5062957 | cao@mpipz.mpg.de

Education

- Max Planck Institute for Plant Breeding
PhD in Biochemistry and Biology Oct 2018- present
- Robert W. Holley Center for Agriculture & Health, USDA, Cornell University
Master Internship Apr 2017—May 2018
- South China Agriculture University
Master of Microbiology Sept 2014—Jun 2018
- Huang Gang Normal University
Bachelor of Biological Engineering Sept 2010—Jun 2014

Publication

- D Yu[#], W Song[#], E Tan[#], L Liu, **Y Cao**, J Jirschtzka, E Li, E Logemann, C Xu, S Huang, A Jia, X Chang, Z Han, B Wu, P Schulze-Lefert, J Chai. TIR domains of plant immune receptors are 2',3'-cAMP/cGMP synthetases mediating cell death. *Cell*. 2022.
- T Nobori, **Y Cao**, F Entila, E Dahms, Y Tsuda, R Garrido-Oter, K Tsuda. Dissecting the cotranscriptome landscape of plants and their microbiota. *EMBO reports*. 2022.
- Y Wang, W Yu, **Y Cao**, Y Cai, S. M. Lyi, W Wu, Y Kang, C Liang, J Liu. An exclusion mechanism is epistatic to an internal detoxification mechanism in aluminum resistance in Arabidopsis. *BMC plant biology*, 2020.
- Y Wang, Y Cai, **Y Cao**, & J Liu. Aluminum-activated root malate and citrate exudation is independent of NIP1; 2-facilitated root-cell-wall aluminum removal in Arabidopsis. *Plant signaling & behaviour*, 2018.
- **Y Cao**, H Pi, P Chandrangsu, Y Li, Y Wang, H Zhou, H Xiong, J Helmann, Y Cai. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific reports*, 2018.