

# Immunoreceptory wewnątrzkomórkowe NB-LRR/NLR rozpoznające białka efektorowe fitopatogenów i aktywujące drugą linię obrony układu odpornościowego roślin

Anna Hetmann✉

Stanisław Kowalczyk

Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu

✉ Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń; tel.: (56) 611 26 95, e-mail: ahetmann@umk.pl

Artykuł otrzymano 14 grudnia 2018 r.  
Artykuł zaakceptowano 4 lutego 2019 r.

[https://doi.org/10.18388/pb.2019\\_258](https://doi.org/10.18388/pb.2019_258)

**Słowa kluczowe:** immunoreceptory NB-LRR/NLR, białka efektorowe fitopatogenów, odporność aktywowana przez efektor

**Wykaz skrótów:** CNL – immunoreceptor typu CC-NB-LRR; DAMP (ang. *Damage/Danger-Associated Molecular Pattern*) – cząsteczka pochodząca z atakowanej rośliny; ETI (ang. *Effector-Triggered Immunity*) – odporność aktywowana przez efektor; ETS (ang. *Effector-Triggered Susceptibility*) – podatność na infekcję wywoływana przez efektor; MAMP (ang. *Microbe-Associated Molecular Pattern*) – cząsteczka pochodząca z drobnoustrojów; NB-LRR (ang. *Nucleotide-Binding-Leucine-Rich Repeat*) – immunoreceptor wewnątrzkomórkowy roślin rozpoznający białko efektorowe fitopatogena; NLR (ang. *NOD-Like Receptor*) – receptor wewnątrzkomórkowy podobny do receptorów NOD1 i 2 człowieka; NOD (ang. *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptor*) – receptor wewnątrzkomórkowy człowieka rozpoznający cząsteczki typu MAMP/PAMP; PAMP (ang. *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) – cząsteczka pochodząca z organizmu patogenego; PRR (ang. *Pattern Recognition Receptor*) – receptor błonowy rozpoznający określony wzorzec molekularny obcej bądź własnej cząsteczki; PTI (ang. *PAMP-Triggered Immunity*) – odporność aktywowana przez cząsteczkę MAMP/PAMP i DAMP; RNL – immunoreceptor typu CC<sub>R</sub>-NB-LRR (RPW8-NB-LRR); TNL – immunoreceptor typu TIR-NB-LRR

## STRESZCZENIE

Fitopatogeny syntetyzują i wprowadzają do komórek rośliny gospodarza białka efektorowe nakierowane na supresję układu odpornościowego. Efektem tłumienia reakcji odpornościowych przez białka efektorowe jest wzrost podatności rośliny na infekcję ETS (ang. *Effector-Triggered Susceptibility to infection*) sprzyjający przeżywaniu i namnażaniu fitopatogena. W odpowiedzi na syntetyzowane przez fitopatogeny białka efektorowe, rośliny w toku ewolucji wykształciły immunoreceptory wewnątrzkomórkowe NB-LRR rozpoznające w sposób bezpośredni lub częściej w sposób pośredni wprowadzane do wnętrza komórek białka efektorowe. Immunoreceptory NB-LRR, podobnie jak zwierzęce receptory NLR, mają położoną centralnie domenę NB wiążącą nukleotyd, C-końcową domenę bogatą w leucynę (LRR) oraz N-końcową domenę TIR, CC lub CC<sub>R</sub>. Zmiany konformacyjne w immunoreceptorze NB-LRR/NLR towarzyszące rozpoznaniu białka efektorowego oraz wymianie ADP na ATP aktywują wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe uruchamiające cały wachlarz odpowiedzi obronnych typu ETI (ang. *Effector-Triggered Immunity*) stanowiących drugą linię obrony lokalnej. Niektóre immunoreceptory NB-LRR/NLR migrują do jądra, gdzie bezpośrednio uczestniczą z regulacji genów związanych z odpornością, podczas gdy immunoreceptory zlokalizowane w cytoplazmie lub wykrywające białka efektorowe w powiązaniu z błoną plazmatyczną lub z błonami wewnątrzkomórkowymi aktywują: produkcję aktywnych form tlenu, napływ jonów Ca<sup>2+</sup> do cytoplazmy, kaskady kinaz MAP, biosyntezę fitohormonów związanych z odpornością oraz związków przeciwbakteryjnych, a także powodują rozległe przeprogramowanie ekspresji genów. Reakcje odpornościowe typu ETI prowadzą zwykle do wystąpienia w miejscu infekcji programowanej śmierci komórek, określanej jako reakcja nadwrażliwości HR (ang. *Hypersensitive Response*).

## WPROWADZENIE

Rośliny dysponują rozbudowanym układem odpornościowym przeciwdziałającym infekcjom i zapobiegającym rozwojowi chorób. Pierwszy poziom obrony stanowią bariery fizyczna i chemiczna, które razem współtworzą tzw. odporność przedinwazyjną (ang. *preinvasion resistance*). Bariere fizyczną tworzą komórki epidermy pokryte woskową kutykulą i wielowarstwową ścianą komórkową, zaś barierę chemiczną współtworzą syntetyzowane konstytutywnie wtórne metabolity takie jak np. antycypiny [1-3]. Prowadzone w ostatnich latach badania genów kodujących enzymy szlaków biosyntezy kutyny i wosków wykazały, że woskowana kutykula nie jest tylko bierną barierą ochronną ale podlegając różnym modyfikacjom, może aktywnie uczestniczyć w reakcjach obronnych [1,2]. Syntetyzowane fitoantycypiny (glukozynolaty, glikozydy cyjanogenne, saponiny) są magazynowane w specjalnych komórkach lub przedziałach subkomórkowych i dopiero atak fitopatogena lub zranienie tkanki powodują aktywację katalizowanych przez enzymy przemian tych substancji do biologicznie aktywnych produktów, np. związków silnie toksycznych pochodzących z glukozynolatów [4]. Grzyby i legniowce pokonują odporność przedinwazyjną, syntetyzując i wydzielając enzymy uszkadzające kutykulę i woski (kutynazy, esterazy, lipazy) oraz hydrolazy degradujące składniki ściany komórkowej. Bakterie przenikają do rośliny poprzez szparki, hydrotody lub zranienia tkanki [5,6]. Wnikające do apoplastu drobnoustroje są źródłem uwalnianych cząsteczek chemicznych typu MAMP, a gdy pochodzą z organizmów patogenych, cząsteczek typu PAMP. Cząsteczki pochodzenia bakteryjnego, takie jak np.: flagelina, peptydoglikany, lipopolisacharydy, czynnik elongacyjny EF-Tu, oraz cząsteczki syntetyzowane przez grzyby i legniowce, takie jak np.: chitoooligosacharydy, poligalakturonazy, elicytyny są rozpoznawane przez zlokalizowane w błonie plazmatycznej kompleksy receptorowe typu PRR (ang. *Pattern Recognition Receptor*) aktywujące wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe uruchamiające odpowiedzi obronne typu PTI (ang. *PAMP-Triggered Immunity*). Wyniki dotychczasowych badań poświęconych identyfikowaniu cząsteczek PAMP/MAMP i DAMP, poznawaniu mechanizmów rozpoznawania tych cząsteczek przez receptory PRR i aktywowania w roślinach różnych odpowiedzi obronnych zostały podsumowane w pracy przeglądowej opublikowanej w ubiegłym roku w Postępkach Bio-

chemii [7]. Podobnej tematyce poświęcono też prace przeglądowe opublikowane w ostatnim czasie w czasopiśmie o zasięgu ogólnosięciowym [8-10]. Odporność podstawową, nieswoistą typu PTI, u zwierząt nazywaną odpornością wrodzoną, tłumią bądź przelamują syntetyzowane przez fitopatogeny białkowe i niebiałkowe cząsteczki nazywane ogólnie efektorami. Efektorami syntetyzowanymi przez fitopatogenne grzyby są np. tomatynazy, czy avenacynazy, enzymy hydrolizujące fitoancypiny ( $\nabla$ -tomatynę i avenacynę) [1]. Sulforafan, związek z grupy izotiocyjanianów pochodzący z rozpadu glukozynolatów, chroniący rzodkiewnik przed infekcją przez *Pseudomonas syringae*, jest rozkładany przez enzymy syntetyzowane przez bakterię *P. syringae* pv. *maculicola* kodowane przez geny *Sax* (ang. *Survival in Arabidopsis Extracts*) [1]. Biotroficzny grzyb *Ustilago maydis* zawiera 33 geny CWDE (ang. *Cell Wall-Degrading Enzyme*), a hemibiotroficzny *Magnaporthe grisea* i nekrotroficzny *Fusarium graminearum* mają odpowiednio 138 i 103 geny CWDE kodujące enzymy degradujące ściany komórkowe. Niektóre lęgniowce syntetyzują peptydy z motywem RGD (Arg-Gly-Asp) wiążące się do białek błony plazmatycznej, naruszając w ten sposób przyleganie ściany do błony plazmatycznej [6]. Białka Ecp6 i Slp1 grzybów z motywami LysM przechwytyują chitooligosacharydy, produkty degradacji chityny grzybów, przeciwdziałając w ten sposób aktywacji receptorów aktywowanych przez chitynę. Inne białka z motywami LysM (Mg1LysM, Mg3LysM) hamują aktywność roślinnych chitynaz, a białko Avr4 z *Cladosporium fulvum* z motywem wiążącym chitynę hamuje degradację chityny [6,11]. Ponadto, niektóre patogenne grzyby syntetyzują inhibitory enzymów proteolitycznych syntetyzowanych i wydzielanych do apoplastu przez komórki roślin. Na przykład białko Avr2 z *C. fulvum* hamuje podobną do papainy proteazę cysteinową Rcr3 pomidora, a lęgniowiec *P. infestans* syntetyzuje EPIC1 i EPIC2B, inhibitory proteazy podobnej do cystatyny [6].

Przedstawiony tutaj krótki przegląd efektorów wydzielanych do apoplastu pokazuje jak różnorodne mechanizmy molekularne są wykorzystywane przez patogenne grzyby i lęgniowce do tłumienia reakcji odpornościowych, odpornościowych, co ostatecznie ma sprzyjać wzrostowi podatności rośliny na infekcję i jej kolonizację [11].

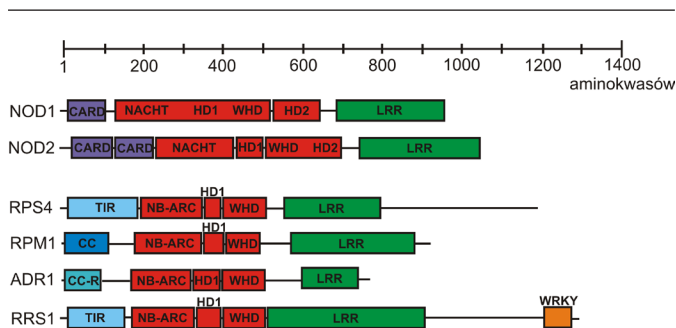
Zupełnie odrębną grupę efektorów tworzą białka syntetyzowane przez fitopatogeny, które w odróżnieniu od efektorów kierowanych do apoplastu, wprowadzane są do wnętrza komórek infekowanej rośliny. Fitopatogenne bakterie syntetyzują dziesiątki [12], a lęgniowce i grzyby setki takich białek efektorowych [11,13,14], które wewnątrz komórek atakowanej rośliny tłumią w różny sposób odporność podstawową roślin. W pracy przeglądowej zamieszczonej w obecnym zeszycie *Postępów Biochemii* podsumowano dotychczasowe osiągnięcia w identyfikowaniu białek efektorowych, poznawaniu ich właściwości biochemicznych i roszczyfrowywaniu mechanizmów supresji odporności podstawowej typu PTI [15]. Jednakże rośliny w toku ewolucji wykształciły immunoreceptory wewnątrzkomórkowe typu R (ang. *Resistance*) rozpoznające swoiście pojawiające się w komórkach białka efektorowe, stając się w ten sposób pierwszymi elementami szlaków sygnałowych aktywujących odpowiedzi obronne typu ETI (ang. *Effector-Triggered Immunity*). Immunoreceptorami wewnątrzkomórkowymi

są białka z rodziny NB-LRR (ang. *Nucleotide-Binding site, Leucine-Rich Repeat*), które pod względem budowy są podobne do zwierzęcych, wewnątrzkomórkowych receptorów NLR (ang. *NOD-Like Receptor*) rozpoznających cząsteczki PAMP/DAMP [16-19]. Immunoreceptory NB-LRR rozpoznają białka efektorowe w komórce bezpośrednio, na zasadzie oddziaływań typu ligand-receptor, ale znacznie częściej białka efektorowe są wykrywane pośrednio, poprzez monitorowanie przez immunoreceptory zmian w białkach, które są atakowane przez efektor (białka strzeżone, białka wabikowe). Zmiany konformacyjne zachodzące w immunoreceptorze NB-LRR, będące efektem rozpoznania białka efektorowego, wymuszają wymianę związanego z immunoreceptorem ADP na ATP, co ostatecznie prowadzi do utworzenia formy aktywnej NB-LRR aktywującego szlaki sygnałowe uruchamiające reakcje obronne typu ETI [19-22]. Dzisiaj już wiadomo, że niektóre immunoreceptory NB-LRR migrują do jądra, gdzie oddziałują z DNA lub z białkami regulującymi ekspresję genów, inne funkcjonują na terenie cytoplazmy lub w powiązaniu z różnymi błonami wewnątrzkomórkowymi, gdzie aktywują reakcje podobne do tych, jakie są aktywowane przez receptory wiążące cząsteczki MAMP/PAMP i DAMP, a różnice w obu tych przypadkach dotyczą głównie czasu potrzebnego do zainicjowania zmian, amplitudy i czasu trwania tych odpowiedzi. Reakcje towarzyszące ETI prowadzą z reguły do programowanej śmierci komórek typu HR, która w przypadku aktywacji odporności typu PTI pojawia się sporadycznie [7,21-24].

Celem obecnej pracy było podsumowanie wyników badań poświęconych immunoreceptorom NB-LRR/NLR, szczególnie zaś badań dotyczących mechanizmów wykrywania i rozpoznawania w komórce białek efektorowych oraz uruchamiania reakcji odpornościowych typu ETI.

## BUDOWA IMMUNORECEPTORÓW WENĄTRZKOMÓRKOWYCH NB-LRR/NLR ROZPOZNAJĄCYCH BIAŁKA EFEKTOROWE FITOPATOGENÓW

Pierwszym poznany immunoreceptorem NB-LRR jest RPS2 (ang. *Resistance to Pseudomonas Syringae2*) rzodkiewnika wykrywający w komórce obecność białka efektorowego AvrRpt2 z *P. syringae* [25,26]. Sklonowanie w 1994 roku genu *RPS2* zapoczątkowało badania, które w ciągu prawie 25 lat doprowadziły do identyfikacji w genomach 22 gatunków roślin okrytonasiennych ponad 6100 genów NB-LRR i sklonowania około 150 genów [27-29]. Okazało się, że immunoreceptory NB-LRR pod względem budowy i pełnionych funkcji są podobne do wewnątrzkomórkowych receptorów NLR (ang. *NOD-Like Receptor*) człowieka pośredniczących w percepcji cząsteczek typu PAMP/DAMP [16-19,30]. Na rycinie 1 pokazano schemat ogólny budowy receptorów NOD1 i NOD2 (ang. *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-like Receptors*) człowieka rozpoznających różne fragmenty peptydoglikanu (PGN) budującego ścianę komórkową bakterii oraz schemat budowy kilku immunoreceptorów NB-LRR roślin. Wszystkie 23 białka NLR człowieka oraz większość receptorów NB-LRR roślin zawiera trzy charakterystyczne moduły. W module N-końcowym białek NLR człowieka występuje kilka różnych domen (PYD, CARD, BIR), któ-



**Rycina 1.** Schemat przedstawiający ogólną budowę receptorów NOD1 i NOD2 człowieka oraz kilku immunoreceptorów NB-LRR/NLR roślin: RPS4 z podklasy TIR-NB-LRR (TNL), RPM1 z podklasy CC-NB-LRR (CNL), ADR1 z podklasy CC<sub>R</sub> (RNL) i RRS1 z grupy immunoreceptorów z domeną zintegrowaną (NLR-ID). Opis w tekście. (na podstawie prac [17-19,22,30,32,55], zmieniono).

rych obecność oraz budowa pozostałych dwóch modułów decydują o przynależności określonego immunoreceptora NLR do jednej z pięciu podrodziny [30]. Najlepiej poznany receptorami NLR człowieka są właśnie białka NOD1 i 2 z podrodziny NLRC, które w module N-końcowym mają jedną lub dwie domeny CARD (Ryc. 1). W roślinach, około 80% immunoreceptorów NB-LRR/NLR w tej części ma domenę TIR (ang. *Toll and Interleukin-1 Receptor*) lub CC (ang. *Coiled Coil*) (patrz następny podrozdział) [27,28]. Moduł środkowy immunoreceptorów NLR zwierząt tworzy domena NACHT oraz motywy HD1, WHD i HD2 pośredniczące w wiązaniu nukleotydów (ADP/ATP) i hydrolizie ATP [17-19,30]. W białkach NB-LRR/NLR roślin podobną rolę odgrywa moduł NB-ARC z motywami HD1 i WHD [17,18]. Większość białek NLR człowieka w module C-końcowym ma domenę utworzoną z powtórzeń LRR (ang. *Leucine-Rich Repeat*), a tylko nieliczne w tej części mają powtórzenia WD40, HEAT, powtórzenia ankirynowe czy TPR [30]. Wszystkie „klasyczne” immunoreceptory NB-LRR/NLR roślin w części C-końcowej mają powtórzenia typu LRR (Ryc. 1).

Genom rzodkiewnika zawiera 95 genów kodujących białka typu TIR-NB-LRR (TNL) i 52 geny kodujące białka typu CC-NB-LRR (CNL) [27,28]. W pomidorze, ziemniaku, fasoli, soi i lucernie zidentyfikowano odpowiednio: 31, 68, 103, 178 i 275 genów typu *TNL* i 222, 376, 224, 269 i 279 genów typu *CNL*. Genomy roślin jednoliściennych w ogóle nie zawierają genów podklasy *TNL*, zaś liczba genów typu *CNL* w genomach ryżu, kukurydzy, sorgo i kłosownicy wynosi odpowiednio: 497, 137, 325 i 252 genów [27]. Trzecią, stosunkowo liczną podklasę immunoreceptorów NB-LRR/NLR tworzą białka, które w module N-końcowym, zamiast TIR czy klasycznej domeny CC, mają domenę RPW8 (ang. *Resistance to Powdery Mildew8*). Domena RPW8 (CC<sub>R</sub>) obejmuje motyw przezbłonowy położony w części N-końcowej oraz leżącą za nim domenę CC [20,27,31]. Genomy rzodkiewnika i lucerny zawierają odpowiednio 11 i 12 genów kodujących immunoreceptory typu RPW8-NB-LRR (RNL), ale u roślin z rodziny różowatych występuje po kilkadziesiąt tego typu genów, np.: poziomka, jabłoń, grusza i brzoskwinia mają odpowiednio 58, 51, 41 i 21 genów typu *RNL* [31]. Wyniki dotychczasowych badań poświęconych immunoreceptorom podklasy RNL, takim jak ADR1 rzodkiewnika i NRG1 tytoniu dowodzą, że pełnią one funkcję białek

pomocniczych (ang. *helpers*) współdziałających z innymi immunoreceptorami NB-LRR [32,33].

Oprócz trzech podklas „klasycznych” immunoreceptorów NB-LRR/NLR, genomy większości roślin zawierają jeszcze podklasę genów kodujących immunoreceptory typu NLR-ID, które oprócz trzech typowych modułów, mają jeszcze dodatkową domenę, nazywaną domeną zintegrowaną (ang. *Integrated Domain*) pośredniczącą w rozpoznaniu białka efektorowego (patrz następne podrozdziały). Domena zintegrowana (zintegrowany wabik) może występować po domenie LRR, tak jak to jest w immunoreceptorze RRS1 rzodkiewnika (Ryc. 1) czy RGA5 ryżu, ale może też być położona w innym miejscu, tak jak np. w Pikp-1 ryżu [32-35]. Analiza genomów 40 roślin wykazała, że w 720 immunoreceptorach typu NLR-ID występuje aż 265 różnych domen zintegrowanych. Domenami najczęściej występującymi są: WRKY, DUF, BED, HMA oraz domena kinazy białkowej [36-38]. Genom rzodkiewnika zawiera 16, ryżu 22, kukurydzy 12, pomidora 21 i jabłoni 93 genów *NLR-ID* [36].

W tym miejscu warto jeszcze zwrócić uwagę, że genomy wielu roślin zawierają dodatkowo kilka grup genów kodujących „niekompletne” białka NB-LRR [27,32,39]. Genom rzodkiewnika zawiera 30 genów kodujących białka, które mają tylko domenę TIR (TX) i 21 genów kodujących białka zawierające domenę TIR i domenę NB (TN), bez domeny LRR. Immunoreceptor RBA1 (ang. *Response to HopBA1*) typu TX rozpoznaje białko efektorowe HopBA1 z *P. syringae* [40]. Białko TN2 typu TN oddziałuje z podjednostką EXO70B1 kompleksu egzocysty, które przypuszczalnie pełni funkcję białka „strzeżonego” atakowanego przez niezidentyfikowane jeszcze białko efektorowe (patrz następne podrozdziały) [41,42]. Inne poznane białko z tej grupy TN13 oddziałuje z importyną MOS6 [43].

W kontekście przedstawionych tu informacji, zasadne staje się pytanie o przyczynę tak wielkiego zróżnicowania immunoreceptorów NB-LR/NLR i to zarówno pod względem ich liczby jak również struktury. Wartym odnotowania jest fakt, że rośliny z rodziny dyniowatych (*Cucurbitaceae*) mają po kilkadziesiąt genów *NB-LRR/NLR* (ogórek 30, arbuz 55 genów), podczas gdy drzewa z rodziny różowatych (*Rosaceae*), takie jak brzoskwinia czy jabłoń, zawierają odpowiednio około 900 i ponad 1000 genów *NB-LRR/NLR*, mimo że rozmiar genomów tych drzew jest stosunkowo niewielki, bo wynosi odpowiednio około 290 i 740 Mbp [18,29,33]. Można więc przypuszczać, że przyczyną tego zróżnicowania jest presja selekcyjna wynikająca z liczby interakcji typu fitopatogeny-roślina, która w przypadku drzew jest niewątpliwie większa, niż to ma miejsce w przypadku roślin zielnych, zwłaszcza roślin jednorocznych.

#### STRUKTURA I FUNKCJA POSZCZEGÓLNYCH DOMEN IMMUNORECEPTORÓW NB-LRR

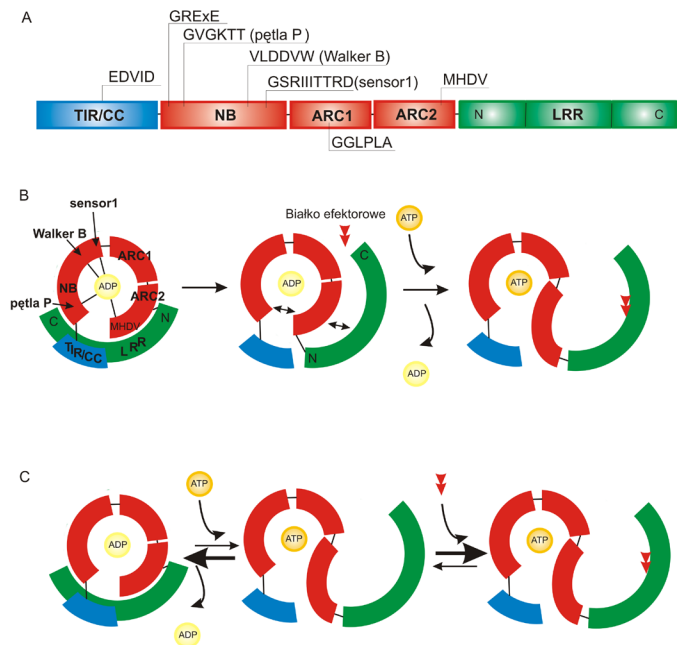
Wykonane przed ośmiu laty analizy krystalograficzne domeny TIR w immunoreceptorze L6 lnu rozpoznającego białko efektorowe grzyba *Melampsora lini* wykazały, że domena obejmuje pięć równoległych wstęg β (βA do E) otoczonych pięcioma helisami α (αA do E) [44,45]. W nowszych badaniach poświęconych analizie struktury domeny TIR w immunoreceptorach RPS4 i RRS1 rzodkiewnika, funkcjonują-

jących w formie heterodimeru w rozpoznaniu PopP2 z *Ralstonia solanacearum* i AvrRps4 z *P. syringae* wykazano, że domena TIR jednego białka oddziałuje za pośrednictwem helis  $\alpha A$  i  $\alpha E$  z podobnymi helisami  $\alpha A$  i  $\alpha E$  w drugiej domenie TIR [46]. W ten sposób powstaje struktura heterodimeryczna (RPS4/RRS1), w której immunoreceptor RRS1 typu TNL-ID funkcjonuje jako „sensor białek efektorowych”, natomiast immunoreceptor RPS4 pełni funkcję „białka pomocniczego” aktywującego szlak sygnałowy [34,46]. Tworzenie form homo- lub heterodimerycznych potwierdzono także w badaniach immunoreceptora RBA1 rzodkiewnika typu TX zawierającego tylko domenę TIR [40], a także immunoreceptorów SNC1 (ang. *Suppressor of npr1-1 constitutive1*), RPP1 (ang. *Recognition of Peronospora parasitica 1*) i L6 lnu [47]. Wyniki tych ostatnich badań pokazują, że w domenach TIR, oprócz płaszczyzn utworzonych przez helisy  $\alpha A$  i  $\alpha E$ , występują jeszcze dodatkowe płaszczyzny oddziaływania utworzone przez helisy  $\alpha D$  i  $\alpha E$ , co daje to możliwość tworzenia form homo- lub heterooligomerycznych. Konkluzja wynikająca z tych badań jest o tyle ważna, że sugeruje, iż optymalne odpowiedzi obronne wystąpią wówczas, gdy białka TNL tworzą struktury podobne do zwierzęcych oligomerycznych sygnałosomów [17,18,32].

Strukturę krystaliczną domeny CC poznano przed siedmiu laty w immunoreceptorze MLA10 jęczmienia rozpoznającego białko efektorowe AVR<sub>A10</sub> z *Blumeria graminis* pv. *hordei* [44,45]. Tworzą ją dwie przeciwrotnolegle biegnące helisy  $\alpha$ , które w dimerach asocjują, tworząc strukturę podobną do „pałeczki”. Jednakże w nowszych badaniach wykazano, że domena CC w immunoreceptorze Sr33 pszenicy aktywującym odporność przeciw *Puccinia graminis* pv. *tritici* i immunoreceptorze Rx ziemniaka wiążącego białko X wirusa ziemniaka zawiera cztery helisy  $\alpha$  [48,49]. Ostatecznie, po przeanalizowaniu struktury oraz sposobu funkcjonowania, wyróżnia się obecnie kilka rodzajów domeny CC, a mianowicie: A – CC z sekwencją EDWID (Sr33, MLA10, Rx, SINRC4, Rp1-D21, RGA5), B – CC<sub>R</sub> (ADR1, ADR1-L1, ADR1-L2, NRG1), C – CC<sub>klasyczna</sub> (RPS2, RPS5), D – SD-CC u roślin psiankowatych (Prf, Sw-5b), E – CC jak w immunoreceptorze I-2 pomidora (I-2, R3a, L, N'). Jedyne zachowane w ewolucji motywy o charakterze kwasowym, EDWID, występujący w domenie CC immunoreceptorów z grupy A i E pośredniczy w oddziaływaniu CC z domeną NB [50,51].

Wyniki wielu dotychczasowych badań pokazują, że obie domeny N-końcowe, TIR i CC, pośredniczą w dimeryzacji/oligomeryzacji immunoreceptorów, oddziałują fizycznie z innymi domenami, stabilizując właściwą konformację immunoreceptora, a także oddziałują z innymi białkami związanymi z odpornością, w tym także z białkami pośredniczącymi w przekazywaniu sygnału na elementy szlaków sygnałowych położonych poniżej immunoreceptora NB-LRR [17,19,20,44,45,50,51].

Za domeną N-końcową występuje domena NB (ang. *Nucleotide Binding*) wiążąca nukleotydy, podobna do analogicznej domeny w białkach STAND (ang. *Signal Transduction ATP-ase with Numerous Domains*) [17,19,20,44]. Funkcjonalną kieszeń wiążącą nukleotydy adeninowe (ATP/ADP) współtworzy jeszcze domena ARC (ang. *Apaf-1, R proteins, CED4*) podzielona na dwie subdomeny ARC1 i ARC2. W



**Rycina 2.** Schemat przedstawiający trójmodułową budowę immunoreceptorów NB-LRR/NLR roślin oraz proponowany model funkcjonowania immunoreceptorów jako molekularnych przełączników. A, Motywy konserwatywne w domenach CC i NB-ARC. B, Stabilizowanie konformacji nieaktywnej (autoinhibitorowej) i zmiany konformacyjne NB-LRR towarzyszące rozpoznaniu białka efektorowego i wymianie ADP związanego z domeną NB-ARC na ATP. C, proponowany model wymiany nukleotydów ADP/ATP oraz stabilizowania konformacji nieaktywnej i aktywnej immunoreceptorów L6 i L7 lnu. Opis w tekście. (na podstawie prac [17,19-21,45,52,53], zmieniono).

obrębie domen NB-ARC występuje szereg motywów zachowanych w ewolucji, pośredniczących w wiązaniu nukleotydów i jonów  $Mg^{2+}$  oraz uczestniczących w hydrolizie związanego ATP (Ryc. 2A) [17,20,45]. W wiązaniu nukleotydów bierze udział położona w obrębie domeny NB pętla P (Walker-A) z charakterystycznym motywem bogatym w reszty glicyny GVGKT/S, w którym konserwatywna reszta lizyny (K) koordynuje z resztami fosforanowymi- $\beta$  i - $\gamma$  nukleotydów adeninowych, natomiast reszty treoniny (T) lub seryny (S) koordynują z jonami  $Mg^{2+}$  (Ryc. 2B). Dwie reszty kwasu asparaginowego (DD) położone w kolejnym motywie określanym jako Walker-B pośredniczą w wiązaniu  $Mg^{2+}$  i hydrolizie związanego ATP. W przedłużeniu motywu Walker-B leży motyw TTRD (Sensor1), w którym reszta argininy (R) oddziałuje z resztą fosforanową- $\gamma$  w ATP. Motyw SEDEAWE nakierowuje cząsteczkę wody biorącą udział w hydrolitycznym rozszczepianiu ATP do ADP i reszty fosforanowej. W subdomenie ARC1 występuje jeszcze motywy GLPL, który funkcjonuje jako „zawias” pośredniczący w zmianach konformacyjnych pomiędzy strukturą „zamkniętą” niosącą ADP, a aktywną strukturą „otwartą” niosącą ATP. W części C-końcowej subdomeny ARC2 występuje motyw MHDV, który odgrywa ważną rolę regulacyjną. Reszta histydyny (H) oddziałuje z resztą fosforanową- $\beta$  w ADP, przyciągając w ten sposób subdomenę ARC2 do domeny NB, a przez to stabilizując nieaktywną strukturę autoinhibitorową (zamkniętą) immunoreceptora (Ryc. 2B) [17,19,20,45].

Wiązanie nukleotydów adeninowych oraz możliwość rozszczepiania hydrolitycznego ATP przez immunorecep-

tory NB-LRR potwierdzono doświadczalnie po raz pierwszy w badaniach immunoreceptorów I-2 pomidora i Mi-1 ziemniaka [20,45]. Immunoreceptor I-2 typu CNL funkcjonuje w odporności pomidora na fuzariozę wywoływaną przez grzyba *Fusarium oxysporum*, zaś immunoreceptor Mi-1 typu CNL w odporności ziemniaka na atak nicienia, guzaka południowego (*Meloidogyne incognita*) oraz mszycy ziemniaczanej (*Macrosiphum euphorbiae*). Wnioski wynikające z tych badań potwierdzono także w doświadczeniach prowadzonych na immunoreceptorach: N typu TNL tytoniu rozpoznającym helikazę p50 wirusa mozaiki tytoniowej (TMV), M lnu typu TNL wykrywającym białko efektorowe AvrM grzyba *Melampsora lini*, a w ostatnim czasie w badaniach allelicznych form L6 i L7 lnu wiążących alleliczne odmiany białka efektorowego AvrL567 z *M. lini* [17,20,45,52].

Za subdomeną ARC2 występuje krótka wstawka, za którą zaczyna się domena LRR obejmująca zwykle czternaście powtórzeń zbudowanych z 24 reszt aminokwasowych bogatych w resztę leucyny (LRR) tworzących równoległe wstęgi  $\beta$  ułożone w strukturę przypominającą podkowę [44,45]. Jednakże bardziej szczegółowe badania prowadzone na immunoreceptorach Rx1 i Gpa2 ziemniaka rozpoznających wirusa ziemniaka X (PVX) i nicienia, mątwika agresywnego (*Globodera pallida*), a także na immunoreceptorze Lr10 pszenicy skierowanym przeciw *Puccinia tritici* na wywołującego rdzę liściową, czy na immunoreceptorze RPS5 rzodkiewnika rozpoznającym AvrPphB z *P. syringae*, wykazały, że domena LRR przedzielona jest nieregularną strukturą na dwie subdomeny pełniące odmienne funkcje [20,45,53]. Subdomena N-końcowa LRR, położona za subdomeną ARC2, zawiera skupienia reszt aminokwasów zasadowych z ładunkami dodatnimi, które umożliwiają oddziaływanie tej subdomeny z subdomeną ARC2 [53]. W ten sposób subdomena N-końcowa LRR współuczestniczy w stabilizowaniu zwartej struktury nieaktywnej NB-LRR (Ryc. 2B) [17,20,53]. Subdomena C-końcowa LRR zawiera liczne reszty aminokwasów aromatycznych, które w przypadku niektórych immunoreceptorów pośredniczą w rozpoznaniu białek efektorowych [20,45,53].

W literaturze proponuje się obecnie ogólny model tłumaczący przełącznikową funkcję immunoreceptorów NB-LRR (Ryc. 2B). W warunkach braku białka efektorowego, immunoreceptor występuje w formie nieaktywnej (autoinhibitorowej) niosącej związany ADP, która charakteryzuje się zwartą strukturą, stabilizowaną oddziaływaniami pomiędzy poszczególnymi domenami immunoreceptora, a w formach di- lub oligomerycznych, także oddziaływaniami międzycząsteczkowymi. Forma autoinhibitorowa immunoreceptora stabilizowana jest głównie poprzez oddziaływanie domen NB-ARC z TIR/CC oraz z subdomeną N-końcową LRR [20]. Wymiana ADP związanego z NB-ARC na ATP wymusza zmiany konformacyjne prowadzące do powstania struktury aktywnej, bardziej otwartej, w której domena TIR/CC oddziałuje z białkami szlaków sygnałowych. Hydrolityczne rozszczepienie ATP do ADP i fosforanu powoduje przemianę otwartej formy aktywnej do bardziej zwartej struktury nieaktywnej [17,19,20,45,53]. Ten ogólny model funkcjonowania NB-LRR jako molekularnego przełącznika powstał w oparciu o wyniki doświadczeń prowadzonych na zmutowanych białkach, w których zmieniono niektóre

reszty aminokwasowe położone w motywach pełniących istotne funkcje. Szczególnie przydatne okazały się mutacje, które pozbawiają immunoreceptor możliwości wiązania nukleotydów, a także mutacje wyłączające aktywność ATP-Pazową, ale zachowujące zdolność wiązania ATP. Mutanty, które nie wiążą nukleotydów są całkowicie nieaktywne, natomiast mutanty pozbawione aktywności ATP-Pazowej są konstytutywnie aktywne. Mutacja w motywie MHD, położonym w subdomenie ARC2, który poprzez resztę histydyny oddziałuje z resztą fosforanową- $\beta$  w ADP prowadzi do preferencyjnego wiązania ATP i przyjmowania konformacji aktywnej [17,19,20]. Można zatem przypuszczać, że immunoreceptory NB-LRR funkcjonują jako molekularne przełączniki, które w formie nieaktywnej, niosącej związany ADP, wykrywają białka efektorowe fitopatogenów. Z chwilą swoistego rozpoznania białka efektorowego następuje częściowe rozluźnienie struktury trzeciorzędowej immunoreceptora, co umożliwia uwolnienie ADP i wiązanie pozostającego w cytoplazmie w wyższym stężeniu ATP (Ryc. 2B). Zajęcie kieszeni wiążącej nukleotydy przez ATP indukuje w immunoreceptorze dalsze rozluźnienie struktury trzeciorzędowej umożliwiające interakcję domeny N-końcowej immunoreceptora z białkiem/białkami szlaku sygnałowego. Hydroliza związanego z immunoreceptorem ATP powoduje przywrócenie bardziej zwartej, nieaktywnej struktury NB-LRR i przerwanie aktywacji reakcji odpornościowych [17,19-22,44,45].

W tym miejscu warto zwrócić uwagę na opublikowane w ostatnim czasie wyniki doświadczeń prowadzonych na immunoreceptorach allelicznych L6 i L7 lnu rozpoznających formy alleliczne AvrL567 z *M. lini*, które nieco inaczej tłumaczą zależności pomiędzy rozpoznaniem białka efektorowego, a wymianą nukleotydów związanych z immunoreceptorem (Ryc. 2C) [52]. Wnioski wynikające z tych badań sugerują, że w nieobecności białka efektorowego forma nieaktywna i forma aktywna immunoreceptora NB-LRR występuje w stanie równowagi dynamicznej, ze zdecydowaną przewagą konformacji nieaktywnej (ADP-NB-LRR). Rozpoznanie białka efektorowego prowadzi do stabilizowania formy aktywnej (ATP-NB-LRR) i przesunięcia stanu równowagi w kierunku formy aktywnej [52].

## REGULACJA POZIOMU IMMUNORECEPTORÓW NB-LRR W ROŚLINACH

Budowa wielodomenowa immunoreceptorów NB-LRR, funkcjonujących jako odwracalne przełączniki, pociąga konieczność ścisłej regulacji ekspresji kodujących je genów oraz poprawnego fałdowania syntetyzowanych białek. Ma to zapewniać pozostawanie immunoreceptorów we właściwych przedziałach subkomórkowych w konformacji autoinhibitorowej, ale ma także umożliwiać swoiste wykrywanie odpowiednich białek efektorowych [29,54-56]. Wyniki wielu doświadczeń pokazały, że zwiększona ekspresja genów NB-LRR prowadzi zwykle do autoimmunizacji, objawiającej się spontaniczną śmiercią komórek typu HR, zahamowaniem wzrostu i osłabieniem ogólnej kondycji rośliny, natomiast celowe obniżenie poziomu białka NB-LRR prowadzi do wzrostu podatności rośliny na infekcję [54]. Ekspresja genów NB-LRR w rzodkiewniku pozostaje na niskim poziomie i wykazuje zmienność tkankową i ekotypową. U większości roślin jedno- i dwuliściennych, ekspresja

NB-LRR jest silniejsza w korzeniu niż w pędzie, ale u roślin z rodziny kapustowatych ekspresja genów NB-LRR jest wyraźniejsza w pędzie [54]. Ponadto wykazano doświadczalnie, że aktywacja układu odpornościowego (infekcja fitopatogenem, aplikacja cząsteczek MAMP/PAMP, aplikacja SA) powoduje bardzo wyraźny wzrost poziomu transkryptów wielu genów NB-LRR, np. peptyd flg22 aplikowany na liście rzodkiewnika powoduje co najmniej dwukrotny wzrost ekspresji 55 genów NB-LRR [54]. Regulacja transkrypcji NB-LRR odbywa się też na poziomie modyfikacji histonów (metylacja H3, monoubikwitynylacja H2B), alternatywnego składania, alternatywnej poliadenylacji oraz regulacji poziomu transkryptów przez miRNA i siRNA [29,54-56].

Poprawne fałdowanie oraz pozostawanie immunoreceptorów w konformacji autoinhibitorowej nadzoruje kompleks HRS utworzony z trzech białek, a mianowicie białka chaperonowego HSP90 i dwóch białek kochaperonowych RAR1 i SGT1 [55]. W regulacji poziomu białek NB-LRR oraz w usuwaniu białek niewłaściwie sfalowanych uczestniczy kompleks ligazy ubikwitynowej E3 SCF<sup>CPR30</sup>, w którym białko CPR1/CPR30 z kasetą F wiąże NB-LRR. Kompleks ligazy ubikwitynowej E3 współtworzą jeszcze białka kochaperonowe SGT1 i SRFR1, a ubikwitynylowany immunoreceptor NB-LRR może podlegać dalszej poliubikwitynylacji przez ligazę typu E4 (MUSE3) [55].

#### MECHANIZMY ROZPOZNAWANIA BIAŁEK EFEKTOROWYCH I AKTYWACJA REAKCJI ODPORNOŚCIOWYCH

Obecność w immunoreceptorach NB-LRR domeny LRR o dużej zmienności sekwencji reszt aminokwasowych od początku nasuwała przypuszczenie, że to właśnie ta domena pośredniczy w swoistym rozpoznaniu białek efektorowych na zasadzie oddziaływania typu ligand-receptor, zgodnie z koncepcją gen-na-gen, a właściwie białko-na-białko Flora. Słuszność powyższego założenia potwierdzono po raz pierwszy przed osiemnastu laty w przypadku immunoreceptora Pi-ta typu TNL ryżu wiążącego białko efektorowe Avr-Pita z grzyba *Magnaporthe grisea*. Możliwość oddziaływania fizycznego pomiędzy obu białkami wykazano najpierw techniką drożdżowego systemu dwuhybrydowego, a następnie potwierdzono w badaniach prowadzonych na Pi-ta z mutacjami w domenie LRR [20-22,45]. Oddziaływanie bezpośrednie typu białko-białko potwierdzono także w kolejnych doświadczeniach prowadzonych na immunoreceptorze M typu TNL Inu wiążącym białko efektorowe AvrM z *Melampsora lini*, a także w badaniach immunoreceptorów L5 i L6 typu TNL Inu wiążących odmienne formy alleliczne białka efektorowego AvrL567 z *M. lini* [20]. W nowszych badaniach wykazano, że domena LRR immunoreceptora RPP1 (ang. *Recognition of Peronospora Parasitica1*) typu TNL rzodkiewnika wiąże białko efektorowe ATR1 (ang. *Arabidopsis Thaliana Recognized1*) z łęgniowca *Hyaloperonospora arabidopsidis*, oraz że odcinek położony pomiędzy 11 a 26 powtórzeniem LRR w immunoreceptorze Pm3 pszenicy wiąże białko Avr-PM3 z mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis*) [20].

Do oddziaływań bezpośrednich pomiędzy immunoreceptorem a białkiem efektorowym dochodzi również w

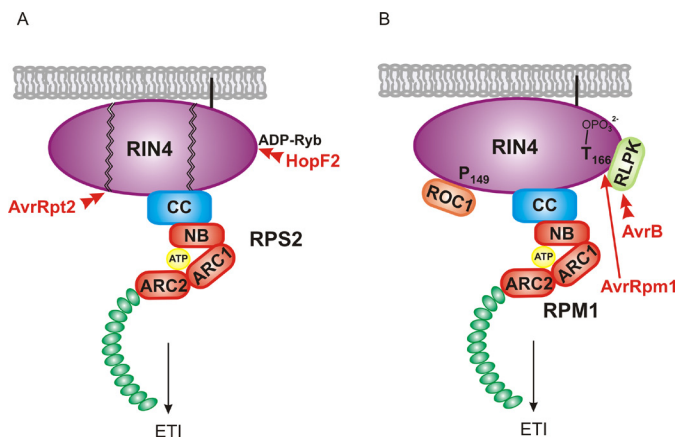
przypadku immunoreceptorów z domeną zintegrowaną typu NLR-ID, takich jak RRS1 rzodkiewnika, RGA5 ryżu, czy Pik-1 ryżu. We wszystkich tym immunoreceptorach w swoistym rozpoznaniu białka efektorowego pośredniczą domeny zintegrowane WRKY lub RATX1 [34].

Jednakże, w miarę rozwoju badań okazało się, że większość poznanych immunoreceptorów NB-LRR wykrywa w komórce obecność białek efektorowych pośrednio poprzez monitorowanie zmian w białkach, które stają się celem ataku białek efektorowych. Potwierdzono to również w ostatnim czasie w badaniach wykorzystujących technikę drożdżowego systemu dwuhybrydowego, w których wykazano, że tylko dwa, spośród 30 analizowanych immunoreceptorów NB-LRR rzodkiewnika, oddziałują bezpośrednio z białkami efektorowymi z *P. syringae* i z łęgniowca *Hyaloperonospora arabidopsidis* [20]. W ten sposób w literaturze naukowej pojawił się termin „strażnik” opisujący rolę immunoreceptora NB-LRR monitorującego zmiany w „białku strzeżonym” (ang. *guardee*) lub w białku określanym jako „wabik” (ang. *decoy*) [18-22,33,57,58].

#### ROZPOZNANIE POŚREDNIE BIAŁEK EFEKTOROWYCH

Monitorowanie zmian w białku strzeżonym (kofaktorze)

Proponowana koncepcja „strażnika” i „białka strzeżonego” okazała się słuszna w odniesieniu do wielu poznanych immunoreceptorów NB-LRR rozpoznających zmiany w białkach strzeżonych, jakie pojawiają się w wyniku ataku różnych białek efektorowych [18-22,32,33,57,58]. Dobrym przykładem takiego białka strzeżonego jest RIN4 (ang. *RPM1-Interacting Protein4*), które w rzodkiewniku funkcjonuje jako fosfoprzełącznik regulujący reakcje odpornościowe typu PTI i ETI [59,60]. Białko RIN4 jest celem ataku dla co najmniej czterech białek efektorowych z *P. syringae*, a mianowicie: AvrRpt2, AvrB, AvrRpm1, HopF2 [12,15]. Białko AvrRpt2 rozcina proteolitycznie RIN4 w obrębie domen NOI, zaś HopF2 przenosi resztę adenozyndifosforozy (ADP-rybozy) z NAD<sup>+</sup> na RIN4, co przeciwdziała trawieniu proteolitycznemu przez AvrRpt2. Białka efektorowe AvrRpm1 i AvrB oddziałują z cytoplazmatyczną kinazą białkową RIPK oraz innymi kinazami RLCK (PBL13/18/29), umożliwiając fosforylację reszty treoniny-166 w RIN4 [61]. Zmiany zachodzące w RIN4 są wykrywane przez co najmniej dwa immunoreceptory NB-LRR typu CNL, a mianowicie RPS2 (ang. *Resistance to Pseudomonas Syringae2*) i RPM1 (ang. *Resistance to Pseudomonas Maculicola protein1*). Immunoreceptor RPS2 w formie nieaktywnej oddziałuje poprzez domenę CC z zakotwiczonym w błonie RIN4 (Ryc. 3A). Pojawiające się w komórce białko efektorowe AvrRpt2 ulega najpierw autoaktywacji (odcięcie z N-końca 7 kDa oligopeptydu), stając się w ten sposób aktywną proteazą cysteinową. Zaktywowane w ten sposób AvrRpt2 trawi RIN4 w obrębie dwóch domen NOI, dając trzy polipeptydy. Dwa z nich są uwalniane do cytoplazmy, natomiast trzeci, krótki odcinek C-końcowy, pozostaje związany z błoną plazmatyczną. W konsekwencji, immunoreceptor RPS2 rozpoznaje AvrRpt2 pośrednio, wykrywając jego aktywność proteolityczną względem „białka strzeżonego” RIN4 (Ryc. 3A) [12,15,22,57,58]. Również immunoreceptor RPM1 typu CNL w konformacji autoinhibitorowej oddziałuje z RIN4 poprzez domenę CC. Pojawiające się w komór-



Rycina 3. Rozpoznanie pośrednie białek efektorowych AvrRpt2, HopF2, AvrB i AvrRpm1 przez immunoreceptory: RPS2 – A i RPM1 – B wykrywające zmiany w białku „strzeżonym” RIN4. Opis w tekście. (na podstawie prac [12,58,61,62]).

ce białka efektorowe AvrB i AvrRpm1 wiążą się do błony plazmatycznej za pośrednictwem kotwic acylowych, gdzie oddziałują z cytoplazmatyczną kinazą białkową RIPK lub kilku innymi kinazami typu RLCK fosforylującymi w RIN4 resztę treoniny 166. Modyfikacja RIN4 aktywuje izomerazę cis/trans prolyl-peptydylową (PPI)azę (ROC1), która w RIN4 izomeryzuje wiązanie peptydowe X-prolina-149 (Ryc. 4B) [12,22,57,58,61]. Wyniki badań opublikowane w ostatnim czasie sugerują, że immunoreceptor RPM1 występuje w formie homodimeru RPM1/RPM1 związanego z błoną za pośrednictwem RIN4, który po wykryciu zmian konformacyjnych w RIN4 towarzyszących fosforylacji reszty treoniny-166 pozostaje nadal w formie aktywnej związany z błoną [62].

Białkiem strzeżonym przez co najmniej trzy immunoreceptory NB-LRR jest białko EDS1 (ang. *Enhanced Disease Susceptibility1*) odgrywające ważną rolę w szlakach sygnałowych aktywowanych przez immunoreceptory typu TNL (patrz następne podrozdziały). Białko EDS1 jest celem ataku dla białek efektorowych AvrRps4 i HopA1 z *P. syringae*, a zmiany wykrywają oddziałujące z EDS1 immunoreceptory RPS4, RPS6 i SNC1 rzodkiewnika [57,63,64]. EDS1 oddziałuje z białkiem SRFR1 (ang. *Suppressor of rps4-RLD1*) zlokalizowanym w błonach siateczki śródplazmatycznej [57]. Wprowadzone do komórek białka efektorowe AvrRps4 i HopA1 powodują oddysocjowanie kompleksów EDS1-RPS4 i EDS1-RPS6 od SRFR1, co umożliwia ich migrację do jądra. Białko EDS1 pełni przypuszczalnie funkcję regulatorową w formowaniu heterodimeru RPS4/RRS1, w którym RPS4 pośredniczy w przekazywaniu sygnału [34,57].

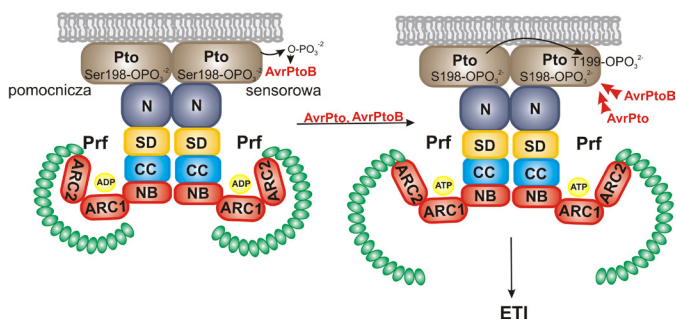
Immunoreceptor SUMM2 (ang. *Suppressor of MKK1 MKK2 2*) typu CNL rzodkiewnika pełni funkcję „strażnika” monitorującego aktywność kaskady kinaz MAP (MEK1>MKK1/2>MPK4) blokowanej przez białko efektorowe HopA1 z *P. syringae*. Białko HopA1 z aktywnością liazy fosfotreoninowej odszczepia z MPK4 resztę fosfotreoniny -C-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> [12,15]. Okazało się, że immunoreceptor SUMM2 oddziałuje z cytoplazmatyczną kinazą białkową CRCK3 (ang. *Calmodulin-binding Receptor-like Cytoplasmic Kinase3*), która jest fosforylowana przez kinazę MPK4 [65,66]. Bloko-

wanie aktywności MPK4 przez HopA1 lub mutacja *mpk4* uniemożliwiająca fosforylację CRCK3, a przypuszczalnie także białka PAT1, prowadzi do aktywacji reakcji odpornościowych zależnych od immunoreceptora SUMM2. Tak więc, immunoreceptor SUMM2 monitoruje zmiany konformacyjne w CRCK3, jakie towarzyszą fosforylowaniu przez MPK4 kilku reszt serynowych położonych pomiędzy N-końcowym motywem przezbłonowym a domeną kinazową CRCK3. Forma niefosforylowana kinazy CRCK3 aktywuje immunoreceptor SUMM2 [57,65,66].

### Wykrywanie zmian w białkach „wabikowych”

W miarę postępu badań ujawniono, że wiele białek efektorowych fitopatogenów atakuje w roślinie więcej niż jedno białko docelowe, a co szczególnie ważne, niektóre z tych białek nie biorą udziału w reakcjach odpornościowych. Opierając się na tych doniesieniach, zaproponowano przed dziesięć laty koncepcję „wabika”, według której wiele białek wewnątrzkomórkowych rośliny pełni funkcję „pułapek” przywabiających odpowiednie białka efektorowe, a zmiany w białkach wabikowych powstające w wyniku oddziaływań z białkami efektorowymi są rozpoznawane przez immunoreceptory NB-LRR [18-20,32,33,58]. Dobrym przykładem takiego białka wabikowego jest kinaza białkowa Pto pomidora atakowana przez białka efektorowe AvrPto i AvrPtoB z *P. syringae*. Kinaza Pto odgrywa rolę białka wabikowego, gdyż sama nie uczestniczy w reakcjach odpornościowych, natomiast „przywabia” AvrPto i AvrPtoB, dla których celem ataku są błonowe receptorowe kinazy białkowe funkcjonujące w percepcji cząsteczek MAMP/PAMP [12,15,67]. Immunoreceptorem monitorującym zmiany w kinazie Pto wywoływane przez AvrPto i AvrPtoB jest Prf z nietypową domeną SD-CC na N-końcu (Ryc. 4). Ta 530-aminokwasowa domena oddziałuje z zakotwiczoną w błonie plazmatycznej kinazą białkową Pto i pośredniczy w formowaniu kompleksu di-, a być może także oligomerycznego, w którym każdy immunoreceptor Prf oddziałuje z odrębnym białkiem Pto [12,50,68,69]. W kompleksie heterodimerycznym Pto/Prf-Prf/Pto, kinazy Pto ulegają autofosforylacji na resztach seryny 198, a immunoreceptory Prf występują w konformacji nieaktywnej. Pojawiające się w komórce AvrPtoB jest fosforylowane przez kinazę Pto sensorową (Pto<sub>sens</sub>) na reszcie treoniny 450, co prowadzi do inaktywacji domeny ligazowej E3 (Ryc. 4) [12,68]. Regulacja negatywna kompleksu Pto/Prf-Prf/Pto zanika wówczas, gdy AvrPto lub AvrPtoB wiąże się do kieszeni katalitycznej kinazy Pto<sub>sens</sub> i zaburza konformację pętli P+1. W tworzącym się w ten sposób kompleksie AvrPto(B)/Pto<sub>sens</sub>/Prf-Prf/Pto<sub>pony</sub>, kinaza Pto pomocnicza (Pto<sub>pom</sub>) ulega aktywacji i fosforyluje w kinazie Pto<sub>sens</sub> resztę treoniny-199 (Ryc. 4). Podwójna fosforylacja kinazy Pto<sub>sens</sub> (S-198, T-199) powoduje derepresję kompleksu immunoreceptorów Prf/Prf i aktywację reakcji odpornościowych [12,68,69].

Innym przykładem białka wabikowego jest cytoplazmatyczna kinaza białkowa PBS1, która w rzodkiewniku przywabia białko efektorowe AvrPphB z *P. syringae* z aktywnością proteazy cysteinowej. Białko AvrPphB atakuje szereg cytoplazmatycznych kinaz białkowych (BIK1, RIPK, PBS1, PBL) funkcjonujących w szlakach sygnałowych aktywowanych przez receptory typu PRR [12,15,67]. Uważa się, że

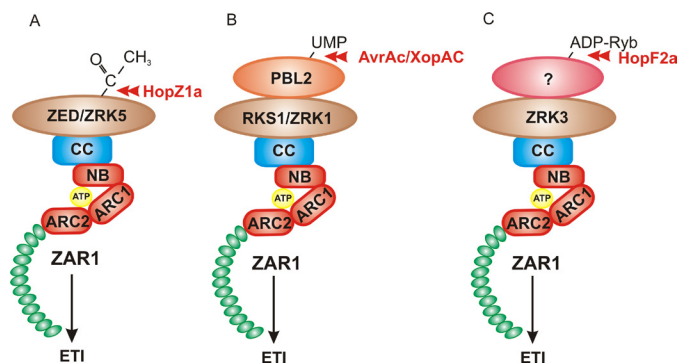


**Rycina 4.** Aktywacja homodimeru immunoreceptora Prf wykrywającego zmiany w kinazie białkowej Pto funkcjonującej jako białko „wabikowe” dla białek efektorowych AvrPto i AvrPtoB. Szczegółowy opis w tekście. (na podstawie prac [12,68,69]).

kinaza PBS1, podobnie jak kinaza Pto, pełni funkcję białka wabikowego, ponieważ mutant *pbs1* nie wykazuje zauważalnego upośledzenia w reakcjach odpornościowych. Z zakotwiczoną w błonie plazmatycznej kinazą PBS1 oddziałuje poprzez domenę CC immunoreceptor RPS5 typu CNL pozostający w formie autoinhibitorowej. Wprowadzone do komórki białko efektorowe AvrPphB rozcina proteolitycznie domenę kinazową PBS1, a powstające w obu fragmentach zmiany konformacyjne są wykrywane przez immunoreceptor RPS5 [12,70].

W ostatnich latach w rzodkiewniku odkryto interesujący mechanizm wykrywania obecności w komórce trzech różnych białek efektorowych, dwóch z *P. syringae* (HopZ1a i HopF2a) i jednego (AvrAC/XopAC) z *X. campestris*, przez jeden immunoreceptor ZAR1 (ang. *HopZ-Activated Resistance1*) typu CNL [58]. We wszystkich trzech przypadkach, immunoreceptor ZAR1 występuje w formie heterodimeru z jedną z kinaz cytoplazmatycznych ZRK z rodziny RLCK, które są pozbawione niektórych motywów niezbędnych dla aktywności kinazowej [71]. W rozpoznaniu białka efektorowego HopZ1a z aktywnością acetylotransferazy pośredniczy pseudokinaza ZED1/ZRK5 (ang. *HopZ-ETI-Deficient1*), która w tym wypadku odgrywa rolę białka wabikowego (Ryc. 5A). Białko efektorowe HopZ1a acetyluje białka JAZ, ingerując w ten sposób w szlaki sygnałowe aktywowane przez jasmoniany [12,15,72], ale jak się okazało, HopZ1a acetyluje również dwie reszty treoniny (T-125 i -177) w pseudokinazie ZED1/ZRK5 [73]. Modyfikacja białka wabikowego ZED1/ZRK5 jest rozpoznawana przez immunoreceptor ZAR1 [74].

W tkance przewodzącej rzodkiewnika, immunoreceptor ZAR1 tworzy heterodimer z pseudokinazą RKS1/ZRK1, który wykrywa obecność AvrAC/XopAC z *X. campestris*. Białko efektorowe AvrAC/XopAC jest urydynylotransferazą przenoszącą resztę urydylu 5'-monofosforanu z UTP na kinazy cytoplazmatyczne BIK1 i RIPK [12,15]. Wykazano eksperymentalnie, że w tkance przewodzącej rzodkiewnika, AvrAC/XopAC urydynyluje w kinazie cytoplazmatycznej PBL2 reszty seryny-253 i treoniny-254. Modyfikowanie przez AvrAC/XopAC białka wabikowego PBL2 jest wykrywane przez heterodimer RKS1/ZRK1/ZAR1 (Ryc. 5B) [75].



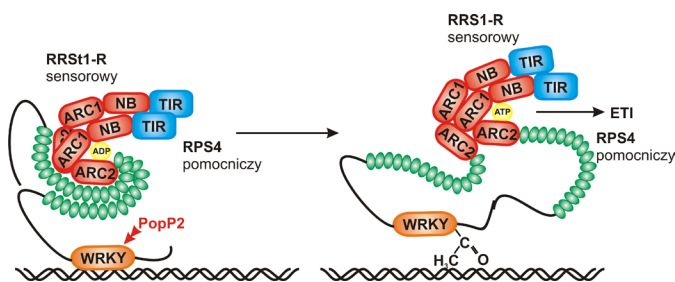
**Rycina 5.** Aktywacja immunoreceptora ZAR1 wykrywającego aktywność enzymatyczną białek efektorowych HopZ1a – A, AvrAC/XopAC – B i HopF2a – C. Opis w tekście. (na podstawie prac [71,73-76]).

W podobny sposób heterodimer ZRK3/ZAR1 wykrywa obecność białka efektorowego HopF2a z *P. syringae* z aktywnością ADP-rybozylotransferazy, modyfikującego niezidentyfikowane jeszcze białko wabikowe (Ryc. 5C) [76].

Rozpoznawanie białek efektorowych przez receptory heterodimeryczne zawierające immunoreceptor z domeną (wabikiem) zintegrowaną typu NLR-ID

Przed kilkunastu laty w rzodkiewniku poznano parę immunoreceptorów RPS4 i RRS1 typu TNL wykrywającą obecność białek efektorowych: AvrRps4 z *P. syringae*, PopP2 z *R. solanacearum* i niezidentyfikowanego jeszcze białka efektorowego z grzyba *Colletotrichum higginsianum* [34,35]. Analizy krystalograficzne domen TIR w RPS4 i RRS1 wykazały, że mogą one tworzyć formy homo- lub heterodimeryczne. Ujawniono też, że sama domena TIR białka RPS4 w formie homodimerycznej aktywuje odpowiedzi typu HR niezależnie od białka efektorowego, oraz że immunoreceptor RRS1 stabilizuje formę autoinhibitorową heterodimeru RPS4/RRS1 przeciwdziałając tworzeniu aktywnego homodimeru RPS4/RPS4 [46]. O rozdzieleniu funkcji pomiędzy dwa immunoreceptory tworzące heterodimer świadczy również fakt, że mutacja w pętli P w immunoreceptorze RRS1 pośredniczącej w wiązaniu nukleotydu nie wpływa na funkcjonowanie heterodimeru, podczas gdy podobna mutacja w RPS4 pozbawia heterodimer RPS4/RRS1 aktywności [34,35]. Derepresja formy autoinhibitorowej dimeru RPS4/RRS1 następuje wraz z rozpoznaniem w komórce białka efektorowego PopP2 lub AvrRps4 przez immunoreceptor sensorowy RRS1 [34,35]. Białko RRS1 za domeną LRR ma jeszcze domenę zintegrowaną WRKY (Ryc. 1) (zintegrowany wabik) oddziałującą z DNA w miejscu wiążącym niektóre z 74 czynników transkrypcyjnych rzodkiewnika z rodziny WRKY. Białko efektorowe PopP2 z aktywnością acetylotransferazową acetyluje szereg czynników transkrypcyjnych WRKY, ale także modyfikuje dwie reszty lizyny (K-1217 i K-1221) w domenie WRKYGQK immunoreceptora RRS1-R (forma alleliczna zawierająca krótkie przedłużenie za domeną WRKY) [77,78]. Acetylacja domeny wabikowej WRKY przeciwdziała wiązaniu heterodimeru RPS4/RRS1-R z DNA oraz powoduje derepresję heterodimeru. Dzieje się to przypuszczalnie dzięki oddziaływaniom odcinka C-





**Rycina 6.** Wykrywanie aktywności enzymatycznej białka efektorowego PopP2 przez immunoreceptor sensorowy RRS1-R z domeną (wabikiem) zintegrowaną, współtworzący heterodimer z immunoreceptorem pomocniczym RPS4. Szczegółowy opis w tekście. (Na podstawie prac [32-34,46,77-79]).

-końcowego RRS1-R z domeną C-końcową w RPS4 (Ryc. 6) [79]. Do domeny wabikowej WRKY w immunoreceptorze RRS1 w obu formach allelicznych R i S wiąże się również białko efektorowe AvrRps4 z *P. syringae* [78,79]. W tym wypadku AvrRps4 przypuszczalnie eliminuje oddziaływanie pomiędzy domeną WRKY a poprzedzającą ją domeną DM4, co sprzyja wiązaniu DM4 do domeny C-końcowej w RPS4 [79]. Tak więc, w heterodimerze RPS4/RRS1 immunoreceptor RRS1 typu NLR-ID pełni funkcję sensora i represora względem immunoreceptora pomocniczego RPS4, który po odblokowaniu przekazuje sygnał na białko/a szlaku sygnałowego [34,35,79].

Inną parę immunoreceptorów tworzą białka RGA5/RGA4 typu CNL ryżu wykrywające obecność dwóch białek efektorowych z grzyba *Magnaporthe oryzae*, a mianowicie Avr-Pia i Avr1-CO39 [34,35]. Immunoreceptor RGA5 typu NLR-ID za domeną LRR ma zintegrowaną domenę wabikową RATX1, której sekwencja jest podobna do motywu wiążącego miedź w białku cytoplazmatycznym drożdży. W tym wypadku, domena wabikowa RATX1 wiąże oba białka efektorowe, a immunoreceptor RGA5 w heterodimerze RGA5/RGA4 pełni funkcję sensora i represora względem RGA4, przeciwdziałając autoimmunizacji, zaś RGA4 przekazuje informację na szlak sygnałowy [80].

Podobną parę tworzą immunoreceptory Pikp-1 i Pikp2 typu CNL ryżu, w której Pikp-1 jest immunoreceptorem sensorowym wykrywającym obecność białka efektorowego AvrPikD z *Magnaporthe oryzae* [81]. Białko efektorowe AvrPikD jest związane do domeny wabikowej HMA (ang. *Heavy Metal-Associated*) podobnej do RATX1 w RGA5, która w Pikp-1 jest położona pomiędzy domeną CC a domeną NB-ARC [81,82].

W ryżu poznano heterodimer Pii-2/Pii-1 rozpoznający białko Avr-Pii z *Magnaporthe oryzae*. W tym wypadku immunoreceptorem sensorowym jest Pii-2, który za domeną LRR ma domenę zintegrowaną NOI [34,35,83].

#### Rola immunoreceptorów NB-LRR o nietypowej budowie

Jak już wcześniej wspomniano, genomy wielu roślin oprócz genów kodujących „klasyczne” immunoreceptory NB-LRR zawierają jeszcze kilka podklas genów NB-LRR kodujących immunoreceptory o nietypowej budowie (patrz

poprzednie podrozdziały). Jedną z podklas tworzą białka z domeną RPW8 (ang. *Resistance to Powdery Mildew8*), która obejmuje położony na N-końcu motyw przezłonowy oraz zmienioną domenę CC [27,31]. W rzodkiewniku poznano trzy białka typu CC<sub>R</sub>-NB-LRR (RNL), a mianowicie immunoreceptory ADR1, ADR1-L1 i ADR1-L2 (ang. *Activated Disease Resistance*), a w tytoniu białko NRG1 (ang. *N Requirement Gene1*) [33]. Ustalono, że wszystkie poznane immunoreceptory typu RNL odgrywają rolę białek pomocniczych funkcjonujących jako elementy szlaków sygnałowych położonych poniżej klasycznych immunoreceptorów NB-LRR [33,84]. Ponadto immunoreceptory ADR1, ADR1-L1 i L2 funkcjonują poniżej receptorów błonowych typu PRR aktywujących syntezę kwasu salicylowego oraz współdziałają z immunoreceptorami RPS2, RPP4, RPP2, jednakże w odróżnieniu od heterodimerów zawierających immunoreceptory typu NLR-ID, współdziałanie to nie wymaga oddziaływania fizycznego pomiędzy immunoreceptorami. Wykazano też, że w immunoreceptorze ADR1, pętla P pośrednicząca w wiązaniu nukleotydów nie odgrywa istotnej roli. Również immunoreceptor NRG1 w tytoniu pełni funkcję białka pomocniczego względem immunoreceptora N typu TNL rozpoznającego TMV, immunoreceptora Roq1 (ang. *Recognition of XopQ1*) typu TNL rozpoznającego białko efektorowe XopQ1/HopQ1 i immunoreceptora RPP1 (ang. *Recognition of Peronospora Parasitica1*) typu TNL wiążącego białko ATR1 (ang. *Arabidopsis Thaliana Recognized1*) [85]. Ponadto wykazano, że białko NRG1 oddziałuje fizycznie z białkiem EDS1 (ang. *Enhanced Disease Susceptibility1*) funkcjonującym w szlakach sygnałowych poniżej receptorów typu TNL (patrz następne podrozdziały).

Funkcję białek pomocniczych pełnią również immunoreceptory NRC (ang. *NLR Required for Cell death*) poznane u kilku gatunków roślin z rodziny psiankowatych [86]. W badaniach NRC2, NRC3 i NRC4 w tytoniu *N. benthamiana* wykazano, że pełnią one funkcję immunoreceptorów pomocniczych względem co najmniej ośmiu immunoreceptorów rozpoznających białka efektorowe: legniowca *P. infestans* (AVRblb2, AVR8, AVR1), bakterii (AvrBs2, AvrPto/AvrPtoB) i wirusów (CP, Nsm). Okazało się, że niektóre immunoreceptory NB-LRR sensorowe (Rpi-blb2, Mi-1.2, R1) współdziałają tylko z immunoreceptorem pomocniczym NRC4, podczas, gdy inne mogą współdziałać z dwoma lub nawet wszystkimi trzema immunoreceptorami NRC2, -3 i -4 [86]. W dotychczasowych badaniach nie potwierdzono sugestii, jakoby immunoreceptory sensorowe (Rpi-blb2, R8, R1, Bs2, Prf, Rx, Sw5b) oddziaływały fizycznie z immunoreceptorami pomocniczymi NRC, natomiast wykazano, że motywy wiążące nukleotydy w białkach NRC odgrywają istotną rolę w funkcjonowaniu tych immunoreceptorów. Wartymi odnotowania są również wyniki najnowszych badań, w których wykazano, że immunoreceptory NRC odgrywają rolę pomocniczą także w stosunku do receptorów błonowych (Cf4, Cf9, Ve1) [87], a co szczególnie interesujące, ujawniono, że w pomidorze NRC4a oddziałuje poprzez domenę CC z receptorem błonowym LeEIX2 wiążącym pochodzącą z grzybów ksylianazę EIX, cząsteczkę typu PAMP [7,88].

Genomy roślin zawierają jeszcze kilka grup genów kodujących „niekompletne” białka NB-LRR (patrz poprzednie

podrodzchiały) [27,32,33,39]. Z grupy białek TX, w rzodkiewniku liczącej 30 genów, poznano białko RBA1 (ang. *Response to HopBA1*) rozpoznające białko efektorowe HopBA1 z *P. syringae* [40]. Białko TN2, z grupy białek TN zawierających domenę TIR i domenę NB, rozpoznaje podjednostkę EXO70B1 kompleksu egzocysty. Immunoreceptor TN2 oddziałuje poprzez domenę CC z EXO70B1, które jest przypuszczalnie białkiem „strzeżonym” atakowanym przez niezidentyfikowane jeszcze białko efektorowe. Z domeną CC w białku TN2 oddziałuje też kinaza białkowa aktywowana przez  $Ca^{2+}$  (CPK5), która w tym wypadku jest przypuszczalnie pierwszym elementem szlaku sygnałowego [41,42]. Inne białko typu TN, a mianowicie TN13 jest zlokalizowane w błonie siateczki śródplazmatycznej i oddziałuje z importyną MOS6 [43].

#### AKTYWACJA ODPOWIEDZI OBRONNYCH PRZEZ IMMUNORECEPTORY NB-LRR

Zróznicowane mechanizmy rozpoznania białek efektorowych przez zlokalizowane w różnych przedziałach komórkowych immunoreceptory NB-LRR sugerują, że również aktywowane przez nie szlaki sygnałowe będą się w poszczególnych przypadkach bardzo od siebie różnić. Niestety, na razie niewiele wiadomo na temat białek współtworzących szlaki sygnałowe, z którymi immunoreceptory NB-LRR w formie aktywnej oddziałują bezpośrednio. Nielicznymi wyjątkami są immunoreceptory migrujące z cytoplazmy do jądra, takie jak: Rx, N, I-2, MLA10, Pb1, SNC1, RPS4 i RRS1, w przypadku których dowiedziono, że biorą one bezpośredni udział w regulacji transkrypcji genów związanych z odpornością [19-22,55,89]. Tak jest w przypadku immunoreceptora Rx1 typu CNL ziemniaka rozpoznającego białko wirusa X ziemniaka (PVX), który wiąże się do dwuniciowego DNA i zniekształca jego strukturę, a ponadto oddziałuje z czynnikiem transkrypcyjnym *NbGlk1* (ang. *Golden2-like*) tytoniu. Oddziaływanie domeny CC aktywnego immunoreceptora Rx1 z *NbGlk1* sprzyja wiązaniu obu białek do określonej sekwencji w DNA [90]. W kontekście wyników tych badań jeszcze bardziej zagadkowa staje się rola immunoreceptorów NRC2, 3 i 4, które, jak już wcześniej wspomniano, funkcjonują jako białka pomocnicze względem Rx1 [86]. Również immunoreceptor N typu TNL tytoniu, rozpoznający domenę helikazy p50 wirusa mozaiki tytoniowej (TMV), w obecności białka efektorowego oddziałuje z czynnikiem transkrypcyjnym SPL6 (ang. *Squamosa promoter binding Protein-Like6*) i aktywuje odporność tytoniu na TMV [21,89]. W rzodkiewniku, z czynnikiem transkrypcyjnym SPL6 oddziałuje immunoreceptor pomocniczy RPS4 współtworzący z immunoreceptorem sensorowym RRS1 typu NLR-ID funkcjonalny heterodimer [89]. Immunoreceptor I-2 (ang. *Immunity to race2*) typu CNL pomidora rozpoznający białko efektorowe Avr1 grzyba *Fusarium oxysporum* pv. *lycopersici* w formie aktywnej wiąże i zniekształca dwuniciowy DNA [91]. W jęczmieniu immunoreceptor MLA10 typu CNL rozpoznający białko A10 z grzyba *Blumeria graminis* pv. *hordei* w formie homodimeru oddziałuje poprzez domenę CC z czynnikiem aktywującym ekspresję MYB6 oraz białkiem represorowym WRKY1. Aktywacja MLA10 powoduje derepresję MYB6 hamowanego przez WRKY1 i aktywuje geny związane z odpornością [21,89]. W ryżu, immunoreceptor Pb1 (ang. *Panicle blast1*) typu CNL, aktywujący odpor-

ność przeciw *Magnaporthe oryzae*, oddziałuje z czynnikiem transkrypcyjnym WRKY45, który funkcjonuje w reakcjach odpornościowych aktywowanych przez kwas salicylowy. Okazuje się, że w komórkach niezainfekowanych czynnikiem transkrypcyjnym WRKY45 ulega degradacji proteolitycznej, podczas gdy forma aktywna immunoreceptora Pb1 przeciwdziała jego ubikwitynylacji i degradacji w proteasomach [21,89]. W rzodkiewniku immunoreceptor SNC1 (ang. *Suppressor of npr1-1, Constitutive1*) typu TNL oddziałuje z czynnikiem transkrypcyjnym bHLH84, a także z korepresorem transkrypcji TPR1 (ang. *Topless-Related1*), który oddziałuje z białkami DND1 i DND2 (ang. *Defense no Death1 and 2*) funkcjonującymi jako represory reakcji HR [89].

W kontekście wyników tych badań, wartymi odnotowania są także rezultaty doświadczeń opublikowane w ostatnich latach pokazujące, że immunoreceptory RPS2 typu CNL i RPS4 typu TNL oddziałują z nukleoporyną transbłonową CPR5 (ang. *Constitutive expresser of Pathogenesis-Related genes5*), która w formie homooligomerów ogranicza wnikanie cząsteczek do jądra i hamuje reakcje odpornościowe [92]. Okazało się, że oddziaływanie badanych immunoreceptorów z CPR5 prowadzi do rozpadu struktury oligomerycznej, co powoduje „udroźnienie” jądrowych kompleksów porowych. Dysocjacja oligomerów CPR5 powoduje także uwolnienie inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (SIM, SMR1), co w efekcie prowadzi do hiperfosforylacji RBR1 (ang. *Retinoblastoma-Related1*) przez nieznaną jeszcze kinazę białkową, aktywacji czynników transkrypcyjnych z rodziny E2F i aktywacji programowanej śmierci komórek [93].

W przeciwieństwie do immunoreceptorów migrujących do jądra, większość poznanych immunoreceptorów NB-LRR rozpoznaje odpowiednie białka efektorowe w cytoplazmie bądź w powiązaniu z błoną plazmatyczną (RPM1, RPS2, RPS5, Pit), z błonami aparatu Golgiego (L6), tonoplastu (M) czy endosomów (R3a), gdzie następuje aktywacja odpowiednich szlaków sygnałowych. Niestety, wiedza na temat szlaków sygnałowych aktywowanych przez te immunoreceptory jest jeszcze bardzo enigmatyczna [19-22,55,89]. Wiadomo, że immunoreceptory typu CNL na ogół wymagają współdziałania z białkiem NDR1 (ang. *Non-race-specific Disease Resistance1*) [20-22], natomiast immunoreceptory podklasy TNL współdziałają z białkiem EDS1 (ang. *Enhanced Disease Susceptibility1*) oraz jego dwoma partnerami, białkiem PAD4 (ang. *Phytoalexin Deficient4*) i SAG101 (ang. *Senescence Associated Gene 101*) [20-22]. Białko NDR1 z motywami występującymi w integrynach jest zakotwiczone za pośrednictwem kotwicy glikozylofosfatydylinozytolowej (GPI) w błonie plazmatycznej i przypuszczalnie uczestniczy w percepcji sygnałów zewnątrzkomórkowych wspomagających reakcje aktywowane przez NB-LRR. Białko EDS1, a także białka PAD4 i SAG101, wszystkie z motywami występującymi w lipazach, pośredniczą m. in. w sygnalizacji zależnej od aktywnych form tlenu i aktywującej biosyntezę kwasu salicylowego oraz w regulacji jądrowo-cytoplazmatycznej relokacji niektórych immunoreceptorów typu TNL [57]. W tym miejscu należy również przypomnieć prezentowane wcześniej wyniki badań z ostatnich lat dotyczące immunoreceptorów pomocniczych ADR1, -L1, -L2, NRG1, NRC1, 2, 3, 4 funkcjonujących w szlakach sygnałowych poniżej immunoreceptorów sensorowych [84-88]. Relokacja

immunoreceptora Rx pomiędzy cytoplazmem a jądrem wymaga współdziałania z białkiem RanGAP2 [94]. W błonach chloroplastów zidentyfikowano białko THF1 (ang. *Thylakoid Formation1*) z domeną CC, które oddziałuje z domeną CC immunoreceptora N' rozpoznającego białko opłaszczające z tobamowirusów, a także z domeną CC innych immunoreceptorów podobnych do I-2 (I-2, R3a, L, N') [95]. Aktywacja immunoreceptora N' prowadzi do destabilizacji białka THF1 i aktywacji zależnej od światła śmierci komórki [95].

W badaniach poświęconych identyfikowaniu elementów białkowych współtworzących szlaki sygnałowe aktywowane przez immunoreceptor Prf rozpoznający zmiany w białku wabikowym Pto udało się zidentyfikować około 25 genów, których produkty białkowe pośredniczą w aktywacji odporności typu ETI [96]. Są wśród nich m. in.: białka chaperonowe HSP90-SGT1-RAR1, małe białka G z rodziny Rac oddziałujące z oksydazami NADPH, kinazy białkowe współtworzące kaskady kinaz MAP, związana z błoną plazmatyczną fosfolipaza C (PLC6) hydrolizująca fosfatydyloinozytole, białka funkcjonujące w szlakach sekrecyjnych, enzymy funkcjonujące w biosyntezie fitohormonów oraz białkowe elementy szlaków sygnałowych aktywowanych przez SA i JA [96].

Udział kaskad kinaz MAP w aktywacji odporności typu ETI potwierdzono także w najnowszych badaniach poświęconych immunoreceptorom RPS2, RPS4 i RPM1 [21,97]. Aktywacja kinaz MPK3 i MPK6 przez immunoreceptory RPS2 i RPM1 rozpoczyna się po około 3 godz. i trwa do 7 godz. [98]. Dla porównania, warto zwrócić uwagę, że aktywacja tych samych kinaz MAP przez cząsteczki MAMP/PAMP zachodzi znacznie szybciej, bo rozpoczyna się już po około 10 min i trwa do 1 godz. [7,97]. Przedłużona aktywacja MPK3/MPK6 wpływa pozytywnie na ekspresję genów związanych z odpornością zależną od kwasu salicylowego, natomiast hamuje ekspresję genów związanych z fotosyntezą, tłumi fotosyntezę i hamuje wzmożoną na świetle produkcję anionorodników ponadtlenkowych i nadtlenu wodoru, co w konsekwencji hamuje odporność i opóźnia programowaną śmierć komórek typu HR [98,99].

Aktywacji immunoreceptorów NB-LRR, np. RPS2 czy RPM1, towarzyszy, podobnie jak w przypadku aktywacji PTI, napływ jonów wapnia do cytoplazmy, aktywacja kinaz zależnych od jonów  $Ca^{2+}$  CPK1/2/4/11 aktywujących oksydazę NADPH, fosforylacja przez CPK4/5/6/11 niektórych czynników transkrypcyjnych WRKY [100]. Napływ jonów  $Ca^{2+}$  do cytoplazmy jest powiązany z produkcją anionorodników ponadtlenkowych i nadtlenu wodoru, kluczowych czynników w aktywacji programowanej śmierci komórek typu HR [21,22,99]. Inicjowanie reakcji typu HR zależy także od wzrostu stężenia kwasu salicylowego oraz sprawności szlaków sygnałowych aktywowanych przez ten fitohormon [22,89]. Przyjmuje się powszechnie, że SA odgrywa ważną rolę w odporności przeciw bio- i hemibiotrofom, natomiast ET i JA funkcjonują głównie w odporności przeciw nekrotrofom. Jednakże wyniki opublikowane w ostatnim czasie pokazują, że aktywacja HR przez immunoreceptor RPS2 aktywuje ekspresję genów *PR1* w komórkach otaczających miejsce infekcji tworzących domenę o najwyższym stężeniu SA, ale na zewnątrz tej domeny położona jest warstwa ko-

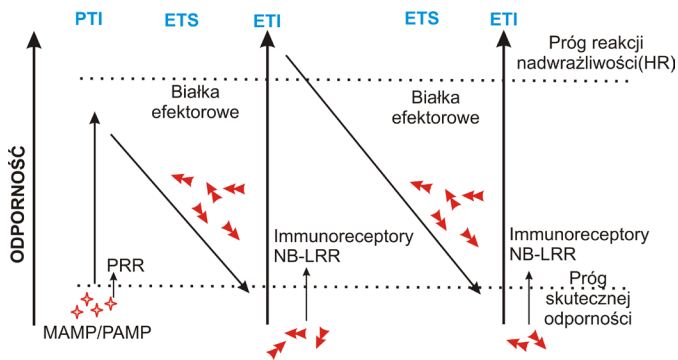
mórek, w których wzrasta ekspresja genu aktywowanego przez kwas jasmonowy – fitohormonu wzajemnie antagonistycznego z SA [101]. W doświadczeniach poświęconych analizie zmian w ekspresji genów towarzyszących aktywacji immunoreceptorów RPS2 i RPM1 wykazano, że największe zmiany zachodzą w pierwszych 4-6 godz. po infekcji i dotyczą odpowiednio około 2200 i 1570 genów [102]. W doświadczeniach wykorzystujących wielokrotne mutanty *dde2/ein2/sid2/pad4* rzodkiewnika wykazano, że w przypadku aktywacji immunoreceptora RPS2 szlaki sygnałowe aktywowane przez JA, ET, SA pośredniczą w tym szybkim i rozległym przeprogramowaniu transkrypcji tylko w pierwszych 4-6 godz. po infekcji [102].

W konkluzji, można zatem ogólnie stwierdzić, że immunoreceptory rozpoznające białka efektorowe w cytoplazmie aktywują szlaki sygnałowe, które obejmują elementy białkowe i niebiałkowe takie same jak w przypadku odporności aktywowanej przez cząsteczki MAMP/PAMP, ale reakcje odpornościowe w przypadku ETI są silniejsze i charakteryzują się wydłużonym czasem trwania [7,99].

Programowa śmierć komórek aktywowana przez immunoreceptory NB-LRR różni się od badanych u zwierząt rodzajów programowanej śmierci komórki (apoptozy, autofagii, pyroptozy, nekroptozy), chociaż wykazuje szereg podobieństw, zwłaszcza do pyroptozy i nekroptozy [103,104]. Zmiany morfologiczne towarzyszące reakcji HR obejmują m. in.: kurczenie protoplastu, pęcznienie wakuoli, pęcznienie organelli komórkowych, fragmentację jądra. Mechanizmy molekularne HR nie są jeszcze dokładnie poznane, chociaż wiadomo, że do zapoczątkowania ciągu zdarzeń wymagana jest aktywacja immunoreceptora NB-LRR, udział białek EDS1, PAD4 i SAG101 bądź białka NDR1 oraz białek kochaperonowych STG1 i RAR1. Zainicjowany ciąg reakcji prowadzi do masywnej produkcji aktywnych form tlenu, tlenu azotu, napływu jonów wapnia do cytoplazmy, aktywacji kaskad kinaz MAP, fosforylacji szeregu czynników transkrypcyjnych WRKY oraz produkcji kwasu salicylowego [103]. Przypuszczalnie, ważną rolę odgrywa pętla pozytywnego sprzężenia pomiędzy SA i produkowanymi w chloroplastach aktywnymi formami tlenu. Wzrost stężenia ROS i tlenu azotu uruchamia procesy proteolityczne, w których uczestniczą wakuolarnie enzymy proteolityczne (VPE) w tym m. in. podobne do kaspaz metakaspazy, fitaspazy i saspazy. Tworzą się także autofagosomy, struktury pęcherzykowe o podwójnej błonie, które, jak się okazuje, mogą współdziałać w rozwoju HR, ale mogą także sprzyjać wirulencji. Ostatecznie, reakcje nadwrażliwości prowadzą do śmierci zainfekowanych komórek, co ma przeciwdziałać rozprzestrzenianiu się fitopatogena na sąsiednie, niezainfekowane komórki.

## UWAGI KOŃCOWE

Koncepcja dotycząca odporności lokalnej roślin jako układu dwupoziomowego dobrze ilustruje zaproponowany przed trzynastu laty model „zygzakowy” (Ryc. 7) [23]. Wzrost odporności roślin na infekcję zostaje zapoczątkowany wraz z rozpoznaniem przez receptory błonowe typu PRR cząsteczek MAMP/PAMP (faza PTI). Wykształcone w toku ewolucji białka efektorowe fitopatogenów tłumią od-



**Rycina 7.** Model zygzakowy ilustrujący zmiany odporności w fazie aktywacji receptorów PRR przez cząsteczki MAMP/PAMP (PTI), w fazie supresji odporności PTI przez białka efektorowe fitopatogenów (ETS), w fazie aktywacji odporności ETI przez immunoreceptory wewnątrzkomórkowe NB-LRR (ETI), w fazie tłumienia odporności ETI przez inne białka efektorowe (ETS) oraz w fazie wzrostu odporności ETI aktywowanej przez inne immunoreceptory NB-LRR rozpoznające inne białka efektorowe. Opis w tekście. (Na podstawie pracy [23]).

odporność PTI, sprzyjając w ten sposób wzrostowi podatności rośliny na infekcję (faza ETS). Immunoreceptory wewnątrzkomórkowe NB-LRR rozpoznają swoiście wprowadzone do komórek białka efektorowe fitopatogena i aktywują reakcje odpornościowe typu ETI (faza ETI). Odporność ETI jest wzmocnioną wersją PTI i dlatego na ogół przekracza próg reakcji nadwrażliwości HR (Ryc. 7). Utrata w toku ewolucji niektórych białek efektorowych i pozyskanie innych może prowadzić do supresji odporności ETI i wzrostu podatności na infekcję (faza ETS). Pojawienie się form allelicznych lub w ogóle nowych immunoreceptorów NB-LRR rozpoznających nowe białka efektorowe umożliwi aktywację odporności typu ETI (faza ETI) [23]. Model Jones'a i Dangla ilustruje ogólne zasady funkcjonowania układu odpornościowego roślin, który powinien uruchamiać odpowiedzi obronne w każdej zainfekowanej komórce. Model zygzakowy jest bardzo przydatny, szczególnie w pracy dydaktycznej, ale okazał się też inspirujący, zwłaszcza młodych badaczy, w podejmowaniu badań związanych z odpornością roślin na choroby. Jednakże wraz z rozwojem badań pojawiło się wiele nowych wyników, w tym m. in. rezultaty badań immunoreceptorów NB-LRR pomocniczych (ADR1, -L1, -L2, NRG1, NRC1, 2, 3, 4) współdziałających z immunoreceptorami sensorowymi oraz funkcjonujących w szlakach sygnałowych aktywowanych przez receptory błonowe typu PRR [84-88]. Wyniki powyższych badań, podobnie jak szereg innych faktów prezentowanych w pracy opublikowanej w br. [105] skłaniają do stwierdzenia, że reakcje odpornościowe typu PTI i ETI stanowią dwa zachodzące na siebie i wzajemnie uzupełniające się poziomy odporności, których nie powinno się rozgraniczać. Przypuszczalnie z tego samego powodu, w pracy opublikowanej w ubiegłym roku, poświęconej receptorom aktywującym reakcje odpornościowe, wszystkie receptory są nazywane receptorami R (ang. *Resistance*) i dzielone są na receptory błonowe i receptory wewnątrzkomórkowe [106]. Autorzy analizują sposób funkcjonowania 128 receptorów R, spośród 314 zidentyfikowanych i sklonowanych w roślinach genów R, które podzielono ze względu na mechanizm percepcji na dziewięć grup. Niezależnie od tego, w literaturze specjalistycznej pojawiło się też szereg uwag krytycznych, w których zwraca

się uwagę na uproszczenia i niedoskonałości modelu zygzakowego, w tym m. in. pomijanie w nim fitopatogenów nekrotroficznych, nieuwzględnianie abiotycznych czynników środowiska (światło, wilgotność, temperatura) wpływających na reakcje odpornościowe, pomijanie zjawiska uwrażliwienia (ang. *priming*) układu odpornościowego. W odpowiedzi na te uwagi, w literaturze naukowej pojawiły się w ostatnich latach modele alternatywne, w tym także zaproponowany przed trzema laty i zdaniem autorów zasługujący na uwagę model wieloskładnikowy, przedstawiony w formie kołowej [107]. Zgodnie z tym modelem, reakcje obronne roślin zależą od czynników, które decydują o aktywacji reakcji odpornościowych IAC (ang. *Immunity Activation Components*) oraz czynników modulujących odporność IMC (ang. *Immunity Modulation Components*). IAC obejmuje w zasadzie wszystkie elementy związane z aktywacją PTI i ETI (MAMP/PAMP, PRR, białka efektorowe, NB-LRR), natomiast IMC współtworzą czynniki powiązane ze zmianami metabolizmu pierwotnego rośliny oraz zmiany w szlakach i sieciach sygnałowych aktywowanych przez fitohormony [107]. Zwrócenie uwagi na rolę metabolizmu pierwotnego, jako ważnego czynnika modulującego odporność jest ważna o tyle, że podejmowane przed kilkunastu laty badania w tym zakresie, zostały w ostatnich latach niemal całkowicie zaniechane. Na przykład, wg naszej wiedzy, nikt dotychczas nie podejmował badań poświęconych udziałowi kompleksów kinaz białkowych SnRK1 i TOR w regulacji reakcji odpornościowych, mimo że od jakiegoś czasu wiadomo, że oba te kompleksy odgrywają rolę kluczową w integracji informacji o stanie energetycznym i pokarmowym komórki i regulują bardzo wiele różnych procesów komórkowych. Można się też spodziewać, że zaproponowany model wieloskładnikowy wpłynie również na zintensyfikowanie trudnych i często nie dających jednoznacznych wyników badań poświęconych roli fitohormonów w aktywacji i regulacji reakcji odpornościowych, które pozostają na jeszcze bardzo wstępnym etapie zaawansowania.

## PIŚMIENNICTWO

1. Lee H-A, Lee H-Y, Seo E, Lee J, Kim S-B, Oh S, Choi E, Choi E, Lee SE, Choi D (2017) Current understanding of plant nonhost resistance. *Mol Plant-Microbe Interact* 30: 5-15
2. Ziv C, Zhao Z, Gao YG, Xia Y (2018) Multifunctional roles of plant cuticle during plant-pathogen interactions. *Front Plant Sci* 9: 1088
3. Piasecka A, Jedrzejczak-Rey N, Bednarek P (2015) Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytol* 206: 948-964
4. Burow M, Halkier BA (2017) How does a plant orchestrate defense in time and space? Using glucosinolates in *Arabidopsis* as case study. *Curr Opin Plant Biol* 38: 142-147
5. Wang B, Liang X, Gleason ML, Zhang R, Sun G (2017) Genome sequence of the ectophytic fungus *Ramichloridium luteum* reveals unique evolutionary adaptations to plant surface niche. *BMC Genom* 18: 729
6. Wang Y, Wang Y (2018) Trick or treat: Microbial pathogens evolved apoplastic effectors modulating plant susceptibility to infection. *Mol Plant-Microbe Interact* 31: 6-12
7. Hetmann A, Kowalczyk S (2018) Receptory błonowe wiążące cząsteczki typu MAMP/PAMP i DAMP aktywujące pierwszą linię obrony lokalnej układu odpornościowego roślin. *Post Biochem* 64: 29-45
8. Saijo Y, Loo EPYasuda S (2018) Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions. *Plant J* 93: 592-613

9. He Y, Zhou J, Shan L, Meng X (2018) Plant cell surface receptor-mediated signaling – a common theme amid diversity. *J Cell Sci* 131: jcs209353
10. Yun HS, Lee J-H, Park WJ, Kwon C (2018) Plant surface receptors recognizing microbe-associated molecular patterns. *J Plant Biol* 61: 111-120
11. Selin C, de Kievit TR, Belmonte MF, Fernando WGD (2016) Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: progress and challenges. *Front Microbiol* 7: 600
12. Büttner D (2016) Behind the lines-actions of bacterial type III effector proteins in plant cells. *FEMS Microbiol Rev* 40: 894-937
13. Anderson RG, Deb D, Fedkenheuer K, McDowell JM (2015) Recent progress in RXLR effector research. *Mol Plant-Microbe Interact* 28: 1063-1072
14. Franceschetti M, Maqbool A, Jiménez-Dalmaroni MJ, Pennington HG, Kamoun S, Banfield MJ (2017) Effectors of filamentous plant pathogens: Commonalities amid diversity. *Microbiol Mol Biol Rev* 81: e00066-16
15. Hetmann A, Kowalczyk S (2019) Supresja odporności podstawowej typu PII przez syntetyzowane w fitopatogenach białka efektorowe wprowadzane do wnętrza komórek infekowanej rośliny. *Post Biochem* 65: 00-00
16. Maekawa T, Kufer TA, Schulze-Lefert P (2011) NLR functions in plant and animal immune systems: so far and yet so close. *Nature Immunol* 12: 818-826
17. Bentham A, Burdett H, Anderson PA, Williams SJ, Kobe B (2017) Animal NLRs provide structural insights into plant NLR function. *Ann Bot* 119: 689-702
18. Jones JDG, Vance RE, Dangl JL (2016) Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science* 354: aaf6395-1-aaf6395-8
19. Zhang X, Dodds PN, Bernoux M (2017) What do we know about NOD-like receptors in plant immunity? *Annu Rev Phytopathol* 55: 205-229
20. Sukarta OCA, Slootweg EJ, Govere A (2016) Structure-informed insights for NLR functioning in plant immunity. *Semin Cell Dev Biol* 56: 134-149
21. Cui H, Tsuda K, Parker JE (2015) Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annu Rev Plant Biol* 66: 6.1-6.25
22. Chiang Y-H, Coaker G (2015) Effector triggered immunity: NLR immune perception and downstream defense responses. *The Arabidopsis Book* e01183
23. Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329
24. Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11: 539-548
25. Bent AF, Kunkel BN, Dahlbeck D, Brown KL, Schmidt R, Giraudat J, Leung J, Staskawicz BJ (1994) RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265: 1856-1860
26. Mindrinos M, Katagiri F, Yu G-L, Ausubel FM (1994) The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* 78: 1089-1090
27. Shao Z-Q, Xue J-Y, Wu P, Zhang Y-M, Wu Y, Hang Y-Y, Wang B, Chen J-Q (2016) Large-scale analyses of angiosperm nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes reveal three anciently diverged classes with distinct evolutionary patterns. *Plant Physiol* 170: 2095-2109
28. Zhang Y-M, Shao Z-Q, Wang Q, Hang Y-Y, Xue J-Y, Wang B, Chen J-Q (2016) Uncovering the dynamic evolution of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes in Brassicaceae. *J Integr Plant Biol* 58: 165-177
29. Borrelli GM, Mazzucotelli E, Marone D, Crosatti C, Michelotti V, Valé G, Mastrangelo AM (2018) Regulation and evolution of NLR genes: A close interconnection for plant immunity. *Int J Mol Sci* 19: 1662
30. Osiak M, Pająk N, Antosz H (2014) Wewnątrzkomórkowe receptory NOD-podobne. Skutki mutacji w obrębie ich genów. *Post Mikrobiol* 53: 3-13
31. Zhong Y, Cheng Z-M (2016) A unique RPW8-encoding class of genes that originated in early land plants and evolved through domain fission, fusion, and duplication. *Sci Rep* 6: 32923
32. Cesari S (2018) Multiple strategies for pathogen perception by plant immune receptors. *New Phytol* 219: 17-24
33. Baggs E, Dagdas G, Krasileva KV (2017) NLR diversity, helpers and integrated domains: making sense of the NLR IDENTITY. *Curr Opin Plant Biol* 38: 59-67
34. Cesari S, Bernoux M, Moncuquet P, Kroj T, Dodds PN (2014) A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: the “integrated decoy” hypothesis. *Front Plant Sci* 5: 606
35. Grund E, Tremousaygue D, Deslandes L (2019) Plant NLRs with integrated domains: Unity makes strength. *Plant Physiol w druk*
36. Sarris PF, Cevik V, Dagdas G, Jones JDG, Krasileva KV (2016) Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens. *BMC Biol* 14: 8
37. Bailey PC, Schudoma C, Jackson W, Baggs E, Dagdas G, Haerty W, Moscou M, Krasileva KV (2018) Dominant integration locus drives continuous diversification of plant immune receptors with exogenous domain fusions. *Genome Biol* 19: 23
38. Kroj T, Chanclud E, Michel-Romiti C, Grand X, Morel J-B (2016) Integration of decoy domains derived from protein targets of pathogen effectors into plant immune receptors is widespread. *New Phytol* 210: 618-626
39. Nandety RS, Caplan JL, Cavanaugh K, Perroud B, Wroblewski T, Michelmore RW, Meyers BC (2013) The role of TIR-NBS and TIR-X proteins in plant basal defense responses. *Plant Physiol* 162: 1459-1472
40. Nishimura MT, Anderson RG, Cherkis KA, Law TF, Liu QL, Machius M, Nimchuk ZL, Yang L, Chung E-H, El Kasmi F, Hyunh M, Nishimura EO, Sondek JE, Dangl JL (2017) TIR-only protein RBA1 recognizes a pathogen effector to regulate cell death in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* E2053-E2062
41. Zhao T, Rui L, Li J, Nishimura MT, Vogel JP, Liu N, Liu S, Zhao Y, Dangl JL, Tang D (2015) A truncated NLR protein, TIR-NBS2, is required for activated defense responses in the *exo70B1* mutant. *PLOS Genet* 11: e1004945
42. Liu N, Hake K, Wang W, Zhao T, Romeis T, Tang D (2017) CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE5 associates with the truncated NLR protein TIR-NBS2 to contribute to *exo70B1*-mediated immunity. *Plant Cell* 29: 746-759
43. Roth C, Lüdeke D, Klenke M, Quathamer A, Valerius O, Braus GH, Wiermer M (2017) The truncated NLR protein TIR-NBS13 is a MOS6/IMPORTIN-3 interaction partner required for plant immunity. *Plant J* 92: 808-821
44. Takken FLW, Govere A (2012) How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Curr Opin Plant Biol* 15: 375-384
45. Ma L, Van den Burg HA, Cornelissen BJC, Takken FIW (2013) Molecular basis of effector recognition by plant NB-LRR proteins. *W: Sessa G (red) Molecular Plant Immunity. First Edition. John Wiley & Sons, Inc. str. 23-40*
46. Williams SJ, Sohn KH, Wan L, Bernoux M, Sarris PF, Segonzac C, Ve T, Ma Y, Sauced SB, Ericsson DJ, Casey LW, Lonhienne T, Winzor DJ, Zhang X, Coerd A, Parker JE, Dodds PN, Kube B, Jones JDG (2014) Structural basis for assembly and function of a heterodimeric plant immune receptor. *Science* 344: 299-303
47. Zhang X, Bernoux M, Bentham AR, Newman TE, Ve T, Casey LW, Raaymakers TM, Hu J, Croll TI, Schreiber KJ, Staskawicz BJ, Anderson PA, Sohn KH, Williams SJ, Dodds PN, Kobe B (2017) Multiple functional self-association interfaces in plant TIR domains. *Proc Natl Acad Sci USA* E2046-E2052
48. Casey LW, Lavrencic P, Bentham AR, Cesari S, Ericsson DJ, Croll T, Turk D, Anderson PA, Mark AE, Dodds PN, Mobli M, Kobe B, Williams SJ (2016) The CC domain structure from the wheat stem rust resistance protein Sr33 challenges paradigms for dimerization in plant NLR proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 12856-1281
49. Slootweg EJ, Spiridon LN, Martin EC, Tameling WIL, Townsend PD, Pomp R, Roosien J, Drawska O, Sukarta OCA, Schots A, Borst JW, Joosten MHAJ, Bakker J, Smant G, Cann MJ, Petrescu A-J, Govere A

- (2018) Distinct roles of non-overlapping surface regions of the coiled-coil domain in the potato immune receptor Rx1. *Plant Physiol* 178: 1310-1331
50. Bentham AR, Zdrzalek R, De la Conception JC, Banfield MJ (2018) Uncoiling CNLs: Structure/function approaches to understanding CC domain function in plant NLRs. *Plant Cell Physiol* 59: 2398-2408
  51. Wróblewski T, Spiridon L, Martin EC, Petrescu AJ, Cavanaugh K, Truco MJ, Xu H, Gozdowski D, Pawłowski K, Michelmore RW, Taken FLW (2018) Genome-wide functional analyses of plant coiled-coil NLR-type pathogen receptors reveal essential roles of their N-terminal domain in oligomerization, networking, and immunity. *PLOS Biol* 16: e2005821
  52. Bernoux M, Burdett H, Williams SJ, Zhang X, Chen C, Newell K, Lawrence GJ, Kobe B, Ellis JG, Anderson PA, Dodds PN (2016) Comparative analysis of the flax immune receptors L6 and L7 suggests an equilibrium-based switch activation model. *Plant Cell* 28: 146-159
  53. Slootweg EJ, Spiridon LN, Roosien J, Butterbach P, Pomp R, Westerhof L, Wilbers R, Bakker E, Bakker J, Petrescu A-J, Smant G, Govers A (2013) Structural determinants at the interface of the ARC2 and Leucine-Rich Repeat domains control the activation of the plant immune receptors Rx1 and Gpa2. *Plant Physiol* 162: 1510-1528
  54. Lai Y, Eulgem T (2018) Transcript-level expression control of plant NLR genes. *Mol Plant Pathol* 19: 1267-1281
  55. Li X, Kapos P, Zhang Y (2015) NLRs in plants. *Curr Opin Immunol* 32: 114-121
  56. Richard MMS, Gratias A, Meyers BC, Geffroy V (2018) Molecular mechanisms that limit the costs of NLR-mediated resistance in plants. *Mol Plant Pathol* 19: 2516-2523
  57. Su J, Spears BJ, Kim SH, Gassmann W (2018) Constant vigilance: plant functions guarded by resistance proteins. *Plant J* 93: 637-650
  58. Khan M, Subramaniam R, Desveaux D (2016) Of guards, decoys, baits and traps: pathogen perception in plants by type III effector sensors. *Curr Opin Microbiol* 29: 49-55
  59. Sun X, Greenwood DR, Templeton MD, Libich DS, McGhie TK, Xue B, Yoon M, Cui W, Kirk CA, Jones WT, Uversky VN, Rikkerink EHA (2014) The intrinsically disordered structural platform of the plant defence hub protein RPM1-interacting protein 4 provides insights into its mode of action in the host-pathogen interface and evolution of the nitrate-induced domain protein family. *FEBS J* 281: 3955-3979
  60. Chung E-H, El-Kasmi F, He Y, Loehr A, Dangl JL (2014) A plant phosphoswitch platform repeatedly targeted by type III effector proteins regulates the output of both tiers of plant immune receptors. *Cell Host Microbe* 16: 484-494
  61. Xu N, Luo X, Li W, Wang Z, Liu J (2017) The bacterial effector AvrB-induced RIN4 hyperphosphorylation is mediated by a receptor-like cytoplasmic kinase complex in *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 30: 502-512
  62. El Kasmi F, Chung E-H, Anderson RG, Li J, Wan L, Eitas TK, Gao Z, Dangl JL (2017) Signaling from the plasma-membrane localized plant immune receptor RPM1 requires self-association of the full-length protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: E7385-E7394
  63. Heidrich K, Wirthmueller L, Tasset C, Pouzet C, Deslandes L, Parker JE (2011) *Arabidopsis* EDS1 connects pathogen effector recognition to cell compartment-specific immune responses. *Science* 334: 1401-1404
  64. Bhattacharjee S, Halane MK, Kim SH, Gassmann W (2011) Pathogen effectors target *Arabidopsis* EDS1 and alter its interactions with immune regulators. *Science* 334: 1405-1408
  65. Zhang Z, Wu Y, Gao M, Zhang J, Kong Q, Liu Y, Ba H, Zhou J, Zhang Y (2012) Disruption of PAMP-induced MAP kinase cascade by a *Pseudomonas syringae* effector activates plant immunity mediated by the NB-LRR protein SUMM2. *Cell Host Microbe* 11: 253-263
  66. Zhang Z, Liu Y, Huang H, Gao M, Wu D, Kong Q, Zhang Y (2017) The NLR protein SUMM2 senses the disruption of an immune signaling MAP kinase cascade *via* CRCK3. *EMBO rep* 18: 292-302
  67. Macho AP, Zipfel C (2015) Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Curr Opin Microbiol* 23: 14-22
  68. Ntoukakis V, Saur IML, Conlan B, Rathjen JP (2014) The changing of the guard: the Pto/Prf receptor complex of tomato and pathogen recognition. *Curr Opin Plant Biol* 20: 69-74
  69. Saur IM-L, Conlan BF, Rathjen JP (2015) The N-terminal domain of the tomato immune protein Prf contains multiple homotypic and Pto kinase interaction sites. *J Biol Chem* 290: 11258-11267
  70. Qi D, Dubiella U, Kim SH, Sloss DI, Downen RH, Dixon JE, Innes RW (2014) Recognition of the protein kinase AVRPPHB SUSCEPTIBLE1 by the disease resistance protein RESISTANCE TO PSEUDOMONAS SYRINGAE5 is dependent on S-acylation and an exposed loop in AVRPPHB SUSCEPTIBLE1. *Plant Physiol* 164: 340-351
  71. Roux F, Noël L, Rivas S, Roby D (2014) ZRK atypical kinases: emerging signaling components of plant immunity. *New Phytol* 203: 713-716
  72. Gimenez-Ibanez S, Chini A, Solano R (2016) How microbes twist jasmonate signaling around their little fingers. *Plants* 5: 9
  73. Lewis JD, Lee AH-Y, Hassan JA, Wan J, Hurley B, Jhingree JR, Wang PW, Lo T, Youn J-Y, Guttman DS, Desveaux D (2013) The *Arabidopsis* ZED1 pseudokinase is required for ZAR1-mediated immunity induced by the *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1a. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 18722-18727
  74. Baudin M, Hassan JA, Schreiber KJ, Lewis JD (2017) Analysis of the ZAR1 immune complex reveals determinants for immunity and molecular interactions. *Plant Physiol* 174: 2038-2053
  75. Wang G, Roux B, Feng F, Guy E, Li L, Li N, Zhang X, Lautier M, Jardinaud M-F, Chabannes M, Ariat M, Chen S, He C, Noël LD, Zhou J-M (2015) The decoy substrate of a pathogen effector and a pseudokinase specify pathogen-induced modified-self recognition and immunity in plants. *Cell Host Microbe* 18: 285-295
  76. Seto D, Kouloula N, Lo T, Menna A, Guttman DS, Desveaux D (2017) Expanded type III effector recognition by the ZAR1 NLR protein using ZED1-related kinases. *Nat Plant* 3: 17027
  77. Le Roux C, Huet G, Jauneau A, Camborde L, Trémousaygue D, Kraut A, Zhou B, Levaillant M, Adachi H, Yoshioka H, Raffaele S, Berthomé R, Couté Y, Parker JE, Deslandes L (2015) A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell* 161: 1074-1088
  78. Sarris PF, Duxbury Z, Huh SU, Ma Y, Segonzac C, Sklenar J, Derbyshire P, Cevic V, Rallapalli G, Saucet SB, Wirthmueller L, Menke FLH, Sohn KH, Jones JDG (2015) A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. *Cell* 161: 1089-1100
  79. Ma Y, Guo H, Hu L, Martinez PP, Moschou PN, Cevic V, Duxbury Z, Sarris PF, Jones JDG (2018) Distinct modes of derepression of an *Arabidopsis* immune receptor complex by two different bacterial effectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: 10218-10227
  80. Ortiz D, De Guillen K, Cesari S, Chalvon V, Gracy J, Padilla A, Kroj T (2017) Recognition of the *Magnaporthe oryzae* effector AVR-Pia by the decoy domain of the rice NLR immune receptor RGA5. *Plant Cell* 29: 156-168
  81. Maqbool A, Saitoh H, Franceschetti M, Stevenson CEM, Uemura A, Kanzaki H, Kamoun S, Terauchi R, Banfield MJ (2015) Structural basis of pathogen recognition by an integrated HMA domain in a plant NLR immune receptor. *eLIFE* 4: e08709
  82. Guo L, Cesari S, de Guillen K, Chalvon V, Mammri L, Ma M, Meusnier J, Bonnot F, Padilla A, Peng Y-L, Liu J, Kroj T (2018) Specific recognition of two MAX effectors by integrated HMA domains in plant immune receptors involves distinct binding surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: 11637-11642
  83. Bialas A, Zess EK, De la Conception JC, Franceschetti M, Pennington HG, Yoshida K, Upson JL, Chanclud E, Wu C-H, Langner T, Maqbool A, Varden FA, Derevnina L, Belhaj K, Fujisaki K, Saitoh H, Terauchi R, Banfield MJ, Kamoun S (2018) Lesson in effector and NLR biology of plant-microbe systems. *Mol Plant-Microbe Interact* 31: 34-45
  84. Dong OX, Tong M, Bonardi V, El Kasmi F, Woloshen V, Wünsch LK, Dangl JL, Li X (2016) TNL-mediated immunity in *Arabidopsis* requires complex regulation of the redundant *ADR1* gene family. *New Phytol* 210: 960-973
  85. Qi T, Seong K, Thomazella DPT, Kim JR, Pham J, Seo E, Cho M-J, Schultink A, Staskawicz BJ (2018) NRG1 functions downstream of

- EDS1 to regulate TIR-NLR-mediated plant immunity in *Nicotiana benthamiana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: E10979-E10987
86. Wu C-H, Abd-El-Halim A, Bozkurt TO, Belhaj K, Terauchi R, Vossen JH, Kamoun S (2017) NLR network mediates immunity to diverse plant pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 8113-8118
  87. Leibman-Markus M, Pizarro L, Bar M, Coaker G, Avni A (2018) NRC proteins – a critical node for pattern and effector mediated signaling. *Plant Sign Behav* 13: e1507404
  88. Leibman-Markus M, Pizarro L, Schuster S, Lin ZJD, Gershony O, Bar M, Coaker G, Avni A (2018) The intracellular nucleotide-binding leucine-rich repeat receptor (*SINRC4a*) enhances immune signalling elicited by extracellular perception. *Plant Cell Environm* 41: 2313-2327
  89. Wu L, Chen H, Curtis C, Fu ZQ (2014) Go in for the kill. How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. *Virulence* 5: 710-721
  90. Townsend PD, Dixon CH, Slootweg EJ, Sukarta OCA, Yang AWH, Hughes TR, Sharples GJ, Pålsson L-O, Takken FLW, Govere A (2018) The intracellular immune receptor Rx1 regulates the DNA-binding activity of a Golden2-like transcription factor. *J Biol Chem* 293: 3218-3233
  91. Fenyk S, Dixon CH, Gittens WH, Townsend PD, Sharples GJ, Pålsson L-O, Takken FLW, Cann MJ (2016) The tomato nucleotide-binding leucine-rich repeat immune receptor I-2 couples DNA-binding to nucleotide-binding domain nucleotide exchange. *J Biol Chem* 291: 1137-1147
  92. Gu Y, Zebell SG, Liang Z, Wang S, Kang B-H, Dong X (2016) Nuclear pore permeabilization is a convergent signaling event in effector-triggered immunity. *Cell* 166: 1526-1538
  93. Wang S, Gu Y, Zebell SG, Anderson LK, Wang W, Mohan R, Dong X (2014) A noncanonical role for the CKI-RB-E2F cell-cycle signaling pathway in plant effector-triggered immunity. *Cell Host Microbe* 16: 787-794
  94. Tameling WLL, Nooijen C, Ludwig N, Boter M, Slootweg E, Govere A, Shirasu K, Joosten HAJ (2010) RanGAP2 mediates nucleocytoplasmic partitioning of the NB-LRR immune receptor Rx in the Solanaceae, thereby dictating Rx function. *Plant Cell* 22: 4176-4194
  95. Hamel L-P, Sekine K-T, Wallon T, Sugiwaka Y, Kobayashi K, Moffett P (2016) The chloroplastic protein THF1 interacts with the coiled-coil domain of the disease resistance protein N' and regulates light-dependent cell death. *Plant Physiol* 171: 658-674
  96. Oh C-S, Martin GB (2011) Effector-triggered immunity mediated by the Pto kinase. *Trends Plant Sci* 16: 132-140
  97. Devendrakumar KT, Li X, Zhang Y (2018) MAP kinase signalling: interplays between plant PAMP- and effector-triggered immunity. *Cell Mol Life Sci* 75: 2981-2989
  98. Su J, Yang L, Zhu Q, Wu H, He Y, Liu Y, Xu J, Jiang D, Zhang S (2018) Active photosynthetic inhibition mediated by MPK3/MPK6 is critical to effector-triggered immunity. *PLOS Biol* 16: e2004122
  99. Peng Y, van Wersch R, Zhang Y (2018) Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity. *Mol Plant-Microbe Interact* 31: 403-409
  100. Gao X, Chen X, Lin W, Chen S, Lu D, Niu Y, Li L, Cheng C, McCormack M, Sheen J, Shan L, He P (2013) Bifurcation of *Arabidopsis* NLR immune signaling via Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases. *PLOS Pathog* 9: e1003127
  101. Betsuyaku S, Katou S, Takebayashi Y, Sakakibara H, Nomura N, Fukuda H (2018) Salicylic acid and jasmonic acid pathways are activated in spatially different domains around the infection site during effector-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 59: 8-16
  102. Mine A, Seyfferth C, Kracher B, Berens ML, Becker D, Tsuda K (2018) The defense phytohormone signaling network enables rapid, high-amplitude transcriptional reprogramming during effector-triggered immunity. *Plant Cell* 30: 1199-1219
  103. Huysmans M, Lema A S, Coll NS, Nowack MK (2017) Dying two deaths – programmed cell death regulation in development and disease. *Curr Opin Plant Biol* 35: 37-44
  104. Mukhtar MS, McCormack ME, Argueso CT, Pajeroska-Mukhtar KM (2016) Pathogen tactics to manipulate plant cell death. *Curr Biol* 26: R608-R619
  105. Alhoraibi H, Bigeard J, Rayapuram N, Colcombet J, Hirt H (2019) Plant immunity: The MTI-ETI model and beyond. *Curr Issues Mol Biol* 30: 39-58
  106. Kourelis J, Van der Hooft RAL (2018) Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *Plant Cell* 30: 285-299
  107. Andolfo G, Ercolano MR (2015) Plant innate immunity. Multicomponent model. *Front Plant Sci* 6: 987

## Effector proteins of phytopathogens recognized by intracellular immune receptors NB-LRR/NLR that activate second line of defence of the plant immune system

Anna Hetmann , Stanisław Kowalczyk

Nicolaus Copernicus University, Faculty of Biology and Environmental Protection, Department of Biochemistry, 1 Lwowska St., 87-100 Toruń, Poland

✉ e-mail: ahetmann@umk.pl

**Key words:** effector proteins, immune receptors NB-LRR/NLR, effector-triggered immunity

### ABSTRACT

The effector proteins employ common as well as pathogen-specific strategies to disturb plant immunity and to promote pathogen survival and favor their multiplication. However, in some cases, pathogen effectors are recognized by plant intracellular immune receptors NB-LRR/NLR that identify effector proteins, either directly by physical interaction or indirectly through monitoring of host proteins modification. NB-LRR immune receptors are characterized by the central nucleotide binding domain NB-ARC, C-terminal Leucine-Rich Repeats (LRRs) domain, and N-terminal TIR, CC or CC<sub>R</sub> domain. Immune receptors localized to the nucleus appears to be more directly associated with transcriptional regulation of defence gene expression, while the detection of pathogen effectors by membrane- or cytoplasm-localized immune receptors NB-LRR activate calcium-mediated signaling, ion flow, mitogen-activated protein kinase cascades, oxidative burst, biosynthesis of plant defence hormones and antimicrobial compounds, as well, far-reaching transcriptional reprogramming. Effector-triggered immunity normally culminates in programmed cell death called hypersensitive response (HR).