



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Transcriptional regulation of effector-triggered immunity (ETI) in plants: from tissue to cells

Chhillar, H.

Citation

Chhillar, H. (2026, June 3). *Transcriptional regulation of effector-triggered immunity (ETI) in plants: from tissue to cells*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4304604>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4304604>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Planten beschikken over een geavanceerd aangeboren immuunsysteem dat bestaat uit twee hoofdverdedigingslagen: pattern-triggered immunity (PTI) en effector-triggered immunity (ETI). PTI en ETI fungeren eerder als onafhankelijke routes; ze zijn sterk met elkaar verbonden en versterken elkaar wederzijds, waarbij ze samen robuuste en duurzame immuunresponsen genereren. In de afgelopen decennia heeft uitgebreid onderzoek belangrijke componenten van de immuunarchitectuur en signaaloverdracht van planten aan het licht gebracht. De complexiteit en onderlinge verbondenheid van immuunsignalering zorgen echter ervoor dat er belangrijke gaten blijven bestaan in ons begrip van de organisatie en uitvoering van ETI. Het onderzoek dat in deze scriptie wordt beschreven, gebruikt genetica en transcriptomics om te bepalen hoe ETI-signalering is verdeeld over verschillende pathway en bladceltypen bij *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis).

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de organisatorische principes die ten grondslag liggen aan plantimmunititeit, van de perceptie van pathogeen aan het celoppervlak en intracellulaire immuunreceptoren tot downstream signaalcascades en transcriptionele herprogramming. Bijzondere nadruk ligt op de regulerende lagen die de immuunoutput vormgeven, waaronder calciussignalering en de CALMODULIN-BINDING PROTEIN 60 (CBP60) familie van transcriptiefactoren, CBP60g en SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE DEFICIENT 1 (SARD1), die centrale regulatoren zijn van salicylzuur (SA)-afhankelijke immunititeit. Hoewel recente studies hebben aangetoond dat PTI en ETI samenwerken om immuunresponsen te versterken, heeft deze onderlinge afhankelijkheid het moeilijk gemaakt om ETI-specifieke signalering te ontwarren. Omdat tijdens natuurlijke pathogene infectie PTI onvermijdelijk activeert vóór ETI,

is het dissecteren van ETI in isolatie een grote experimentele uitdaging gebleven. Om deze beperking te overwinnen, maakt deze scriptie gebruik van een synthetisch, estradiol-induceerbaar ETI (SETI)-systeem, waardoor nauwkeurige activatie en analyse van ETI-signalering mogelijk is zonder versturende PTI-inputs.

Hoofdstuk 2 gebruikt dit induceerbare ETI-systeem om de functionele bijdragen van twee gedeeltelijk redundante signaaltakken in Arabidopsis TIR-NLR-gemedieerde immuniteit te analyseren. We tonen aan dat de twee ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1) geassocieerde modules, EDS1-PHYTOALEXINE DEFICIENT 4 (PAD4)-ACTIVATED DISEASE RESISTANCE 1 (ADR1) en EDS1- SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 101 (SAG101)-N REQUIREMENT GENE 1 (NRG1)) een verschillende rol spelen tijdens de uitvoering van ETI. De NRG1-SAG101-tak is voornamelijk verantwoordelijk voor het triggeren van de hypersensitive response (HR), een gelokaliseerde vorm van geprogrammeerde celdood. Deze resultaten stellen vast dat ziekteresistentie en HR scheidbare outputs van ETI zijn, in plaats van verplicht gekoppelde gevolgen van hetzelfde signaalproces.

Om de transcriptionele basis van deze functionele scheiding te achterhalen, voerden we globale transcriptomprofilerung uit in SETI_*pad4*, SETI_*sag101* en SETI_*pad4 sag101* achtergronden na PTI-, ETI- en gecombineerde PTI+ETI-activatie. Deze analyses toonden aan dat PAD4 de dominante drijfveer is van immuun-geïnduceerde transcriptionele herprogrammering, terwijl de bijdrage van SAG101 vooral duidelijk wordt in de dubbele *mutant* SETI_*pad4 sag101*, wat een contextafhankelijke redundantie tussen de twee signaaltakken benadrukt. Daarnaast identificeerden we node-specifieke genregulatiesignaturen, met verschillende sets defensie-gerelateerde genen die bij voorkeur worden

gecontroleerd door de PAD4-ADR1 of SAG101-NRG1 modules. Belangrijk is dat dit hoofdstuk ook aantoont dat immuunpriming behouden kan blijven, zelfs als de immuunsignalering gedeeltelijk verzwakt is, wat aangeeft dat planten het immuungeheugen kunnen behouden zonder volledig alle ETI-takken te activeren. Deze bevinding heeft praktische gevolgen voor de verbetering van het gewas, omdat het suggereert dat duurzame ziekteresistentie kan worden bereikt terwijl de fitheidskosten die gepaard gaan met overmatige immuunactivatie worden geminimaliseerd.

Hoofdstuk 3 breidt het concept van ETI-modulariteit uit van signaalroutes naar cellulaire en ruimtelijke organisatie. Met behulp van single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) losten we immuun-ETI-geïnduceerde transcriptieresponsen op op het niveau van individuele bladceltypen. Hoewel ETI-activatie breed over het weefsel wordt geïnitieerd, varieert de transcriptie-uitvoering aanzienlijk tussen celidentiteiten. Een geconserveerd kernverdedigingsprogramma wordt in de meeste celtypen geactiveerd en vertegenwoordigt een gedeelde ETI-ruggengraat, terwijl aanvullende immuunmodules selectief worden ingezet in specifieke celtypen, wat verschillen weerspiegelt in ontwikkelingstoestand, chromatine-toegankelijkheid en beschikbaarheid van transcriptiefactoren.

Vergelijking van enkelcel ETI-responsieve genen met bulk RNA-seq-data bevestigt dat deze transcriptieprogramma's authentieke ETI-output vertegenwoordigen in plaats van artefacten van celisolatie. We classificeren ETI-responsieve genen verder in "generalisten", tot expressie gebracht over meerdere celtypen, en "specialisten", beperkt tot één of enkele celtypen. Dit onderscheid onthult een hiërarchische immuunorganisatie waarin breed verspreide verdedigingen naast sterk gelokaliseerde, celtipe-specifieke immuunfuncties bestaan.

Een belangrijke bevinding van dit hoofdstuk is dat transcriptiefactoren CBP60g en SARD1 bij voorkeur worden geïnduceerd in epidermale wegtakcellen, de eerste fysieke barrière tegen pathogeneninvase van de plant. Functionele analyses tonen aan dat het verlies van deze regulatoren het vermogen van de epidermis om de toegang van pathogeen te beperken aantast, zelfs wanneer het binnenste weefsel immunocompetentie behoudt. Deze resultaten tonen aan dat effectieve ETI niet alleen robuuste signalering vereist, maar ook een precieze ruimtelijke inzet van immunoregulatoren over weefsellagen.

Hoofdstuk 4 richt zich op CBP60g en SARD1 als centrale transcriptieregulatoren die planten in staat stellen immunactivatie in balans te brengen met cellulaire levensvatbaarheid tijdens ETI. Door genetische analyse, induceerbare ETI-activatie en transcriptomprofiling tonen we aan dat deze transcriptiefactoren niet alleen functioneren als positieve regulatoren van SA-gemedieerde immuniteit, maar ook als meestercoördinatoren die immunbevorderende en immunbeperkende programma's integreren.

De *cbp60g sard1* dubbele mutant zorgt voor een opvallende genetische ont koppeling van ETI-outputs: ETI-inductie veroorzaakt een overdreven HR, maar de weerstand tegen ziekteverwekkers is aanzienlijk verminderd. Dit toont aan dat HR noch voldoende noch vereist is voor effectieve pathogeenbeperking, waarmee de lang bestaande aanname wordt uitgedaagd dat sterkere celdood noodzakelijkerwijs correleert met een sterkere immuniteit. Opmerkelijk is dat het ontbreken van grote ontwikkelingsdefecten in deze mutant het mogelijk maakt immuunspecifieke fenotypes te interpreteren zonder pleiotrope effecten te verstoren. Transcriptoomanalyses tonen aan dat CBP60g en SARD1 tegelijkertijd verdedigingsgenen activeren terwijl ze de expressie van

negatieve immuunregulatoren, waaronder Nudix-hydrolasen, behouden, waardoor ongecontroleerde of zelfdestructieve immuunactivatie wordt voorkomen. Hun regulerende rol kan dus worden begrepen als het vestigen van een dynamisch evenwicht dat sterke pathogeencontrole mogelijk maakt terwijl de celintegriteit wordt beschermd.

In het afsluitende **hoofdstuk 5** worden deze bevindingen geïntegreerd in een breder conceptueel kader van plantimmunititeit, en worden toekomstige onderzoeksrichtingen besproken. Gezamenlijk toont deze scriptie aan dat ETI geen uniforme of binaire respons is, maar een modulair, afstembaar en ruimtelijk gecoördineerd immuunsysteem. Door te verduidelijken hoe kern immuunsignaalknooppunten samenwerken met centrale transcriptieregulatoren over verschillende cellulaire contexten, biedt dit werk een basis voor het ontwikkelen van strategieën om ziekeresistente gewassen te ontwikkelen die groei en opbrengst behouden, een essentieel doel voor duurzame landbouw en plantenbiotechnologie.