

## Naturstoffe

## Das Kiwellinprotein: über die biologische Funktion eines Allergens

GERT BANGE<sup>1</sup>, XIAOWEI HAN<sup>2</sup>, REGINE KAHMANN<sup>2</sup>, FLORIAN ALTEGOER<sup>1</sup><sup>1</sup> ZENTRUM FÜR SYNTHETISCHE MIKROBIOLOGIE (SYNMIKRO) UND FACHBEREICH CHEMIE, UNIVERSITÄT MARBURG<sup>2</sup> MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR TERRESTRICHE MIKROBIOLOGIE, MARBURG

**Kiwellin proteins of plants have previously been recognized as important human allergens, however their biological role remained unknown. Here, we discuss recent progress towards an understanding of their role as plant-defense proteins towards pathogenic fungi and beyond.**

DOI: 10.1007/s12268-019-1060-8  
© Springer-Verlag 2019

■ Ein Kiwellinprotein wurde erstmals im Jahr 2005 aus Früchten des Chinesischen Strahlengriffels (*Actinidia chinensis*, „Kiwi Gold“) isoliert [1]. Seitdem wurden Kiwellinartige Proteine auch in anderen Pflanzen und deren Früchten gefunden. Über Röntgenkristallstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass das etwa 28 Kilodalton schwere Kiwellinprotein aus einer konservierten

$\beta$ -Fass( $\beta$ -barrel)-Domäne besteht, welche durch zahlreiche Disulfidbrücken stabilisiert wird (**Abb. 1**, [2]). Am N-terminalen Ende der  $\beta$ -Fass-Domäne finden sich zwei weitere antiparallele  $\beta$ -Stränge, die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden. Das Kiwellin in der Kiwi gehört unter der Bezeichnung Act d5 zu den wichtigsten Allergenen im essbaren Teil der Kiwifrucht. Es ist damit als primäres Mar-

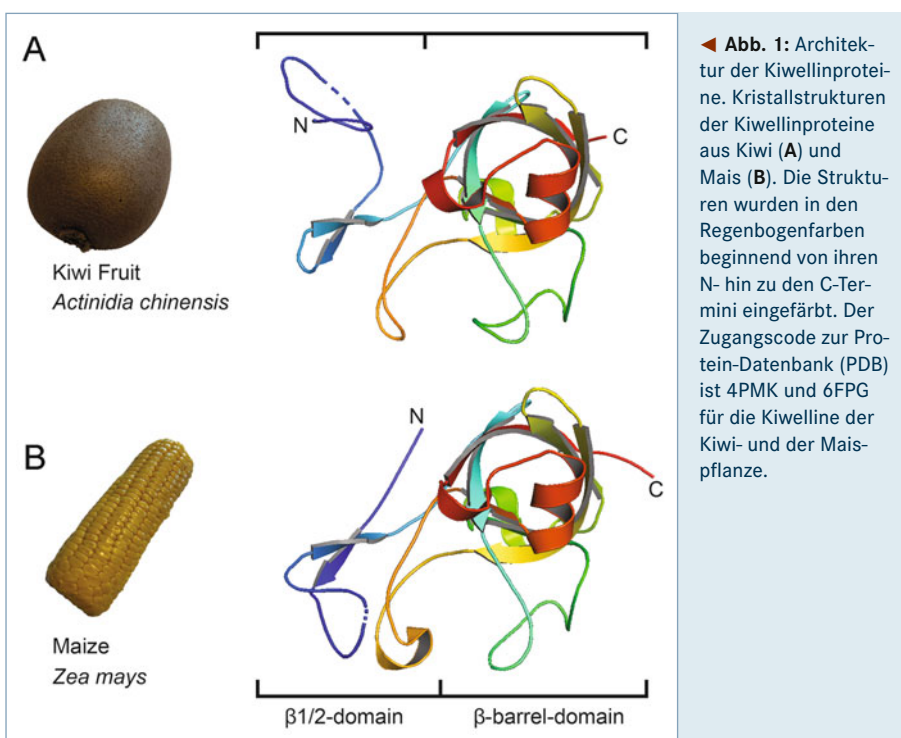
kerallergen für eine Kiwi-Sensibilisierung definiert. Die biologische Bedeutung von Kiwellinproteinen war bisher nicht bekannt.

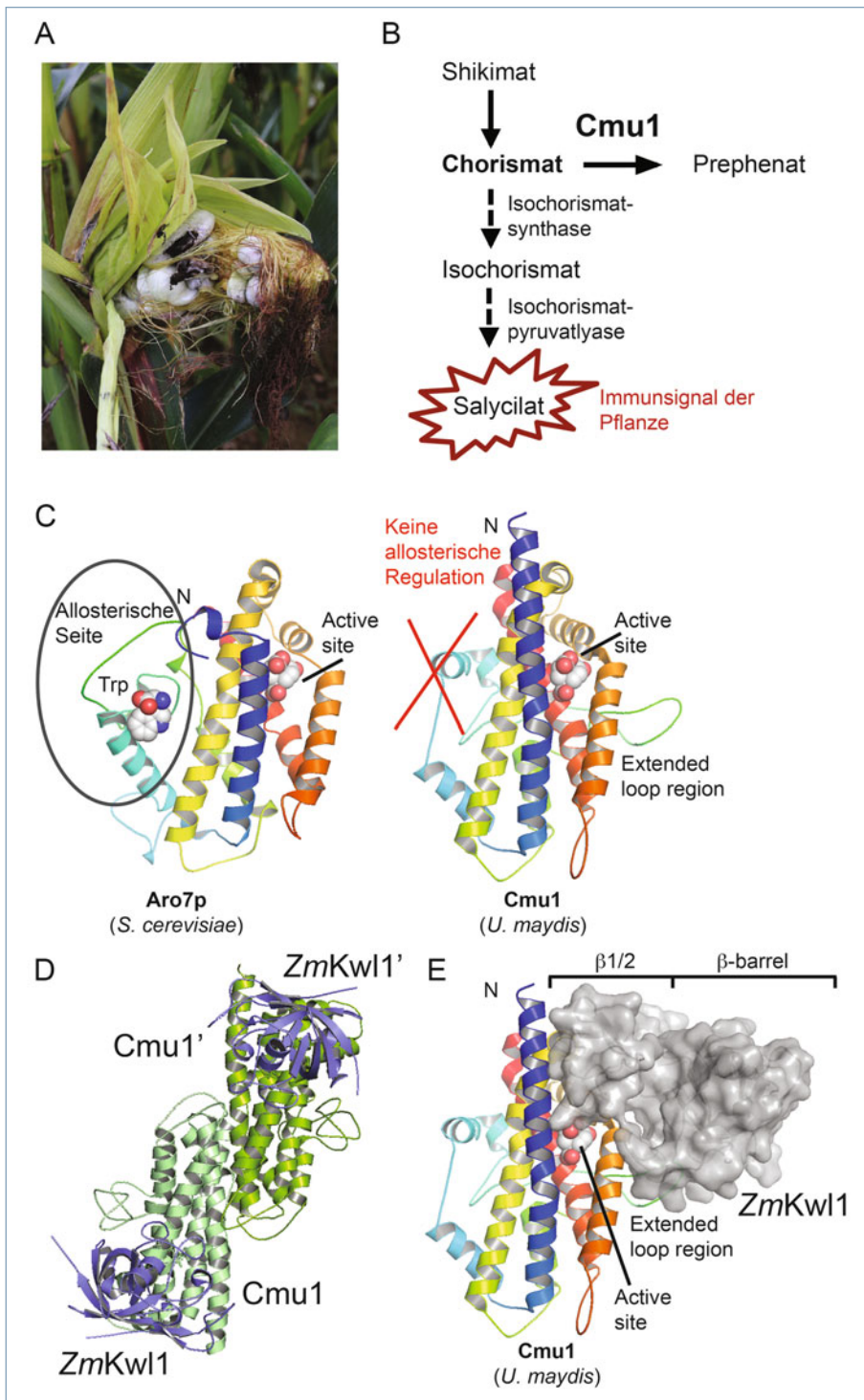
### Cmu1 – Effektor eines pathogenen Pilzes

Im Zentrum für Synthetische Mikrobiologie (SYNMIKRO), einer Forschungsallianz, bestehend aus Gruppen der Universität Marburg und des Max-Planck-Institutes für terrestrische Mikrobiologie, beschäftigten wir uns mit dem molekularen Verständnis des hochabundanten Effektorproteins Cmu1. Cmu1 wird von dem biotrophen Pilz *Ustilago maydis* neben Hunderten anderer Effektoren im Laufe der Infektion seiner Wirtspflanze Mais (*Zea mays*) in ebendiese sekretiert [3]. Diese sekretierten Effektoren bilden die molekulare Grundlage für eine erfolgreiche Kolonisierung der Maispflanze und damit die Auslösung der Maisbeulenbrand-Krankheit (**Abb. 2A**).

Dabei konvertiert die Chorismatmutase (CM) Cmu1 das zentrale Stoffwechselintermediat Chorismat zu Prephenat und manipuliert damit den Shikimisäurestoffwechselweg der Pflanze (**Abb. 2B**). Dieser ist unter anderem zentral für die Produktion von Salicylsäure – einem wesentlichen Immunsignal der Pflanze [4]. Durch diese Veränderungen des pflanzlichen Metabolismus unterdrückt *U. maydis* das Immunsystem der Pflanze zu seinem Vorteil. Forschungen der letzten Jahre konnten zeigen, dass die Unterdrückung von Salicylsäurebiosynthesewegen durch sekretierte Chorismatmutasen (oder auch Isochorismutasen) eine weitverbreitete Strategie von pflanzenpathogenen Pilzen, Oomyzeten und Nematoden darstellt.

Normalerweise werden Chorismatmutasen durch die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin positiv bzw. negativ allosterisch reguliert (**Abb. 2C**, [5]). Interessanterweise konnte für die pilzliche Chorismatmutase Cmu1 keine allosterische Regulation festgestellt werden. Die von uns bestimmte Kristallstruktur von Cmu1 zeigt deutlich, dass sich das Protein von regulierten CMs in der allosterischen Kontrollregion stark unterscheidet und damit „resistent“





▲ **Abb. 2:** Rolle des Mais-Kiwellin (*ZmKw1*). **A**, Maisbeulenbrand (Bild: Prof. Kahmann, Bauerbach bei Marburg, 2015). **B**, Die Chorismatmutase *Cmu1* aus *Ustilago maydis* konvertiert Chorismat zu Prephenat und entzieht der Pflanze damit den Vorläufer zur Biosynthese des Immunsignals Salicylat. **C**, Strukturvergleich der Chorismatmutase (CM) *Aro7p* aus *Saccharomyces cerevisiae* (links; PDB-ID: 5CSM) und von *Cmu1* aus *U. maydis* (rechts; PDB-ID: 6FPG). Beide CMs sind in der Architektur des aktiven Zentrums identisch, unterscheiden sich aber deutlich im Aufbau der allosterischen Seite. Während diese in *Aro7p* vorhanden ist und die Regulation des Enzyms durch Aminosäuren (z. B. Tryptophan, Trp) erlaubt, ist sie in *Cmu1* verloren gegangen und durch die *extended loop*-Region ersetzt. Damit ist *Cmu1* nicht mehr durch Aminosäuren regulierbar. **D**, Die Kristallstruktur des *Cmu1*/*ZmKw1*-Komplexes zeigt das *Cmu1*-Homodimer (grün), an welches zwei *ZmKw1*-Monomere binden (blau). **E**, *ZmKw1* (grau und als Proteinoberfläche dargestellt) bindet großflächig unter Einbeziehung der *extended loop*-Region an *Cmu1* und versperrt den Zugang von Substraten zum aktiven Zentrum des Enzyms.

gegenüber einer allosterischen Regulation durch Aminosäuren ist (**Abb. 2C**, [6]). Diese Beobachtung warf jedoch auch die Frage auf, ob die Maispflanze Strategien entwickelt hat, um die unkontrollierte Aktivität dieses Pathogen-Enzyms im Zaum zu halten und damit den Infektionsprozess zu kontrollieren.

### Ein Kiwellin als Pflanzenabwehrprotein

Um potenzielle Pflanzenfaktoren zu identifizieren, welche die *Cmu1*-Aktivität beeinflussen, infizierten wir Maissämlinge mit einem *U. maydis*-Stamm, der ein Affinitäts-Tag-markiertes *Cmu1*-Protein sekretiert, und führten *pull-down*-Experimente im Pilz-Pflanzen-Infektionslysat durch [6]. In diesen Experimenten konnten wir ein hypothetisches Protein der Maispflanze (GRMZM2G073114) als möglichen Interaktionspartner von *Cmu1* identifizieren. Die *in silico*-Analyse des unbekanntenen Proteins zeigte schnell dessen über 80-prozentige Identität zu dem oben erklärten Kiwellin aus der Kiwipflanze. Daher haben wir das hypothetische Maisprotein Kiwellin 1 (*ZmKw1*) genannt; die Nummer 1 deshalb, weil 19 weitere Sequenzen im Genom der Maispflanze identifiziert wurden, die Kiwellin-artige Proteine codieren. Eine bereits vorhandene RNA-Sequenzierungsanalyse der Pilz- und Pflanzengene während der biotrophen Interaktion der Maispflanze mit *U. maydis* zeigte, dass *ZmKw1* das einzige der 20 Kiwellin-Gene ist, das stark während der Infektion mit *U. maydis* hochreguliert ist. Das *silencing* der *ZmKw1*-mRNA führte zu einer deutlich höheren Virulenz des Pilzes, was nahelegte, dass *ZmKw1* ein pflanzliches Abwehrprotein zur Kontrolle der Aktivität des Pathogen-Enzyms *Cmu1* ist.

Um den Mechanismus besser zu verstehen, wurde der *Cmu1*/*ZmKw1*-Komplex aus seinen rekombinant hergestellten Einzelkomponenten konstituiert und biochemisch sowie strukturell charakterisiert [6]. Dabei zeigte sich, dass zwei *ZmKw1*-Moleküle hochaffin an die homodimere *Cmu1* binden und dass dies die Chorismatmutase-Aktivität inhibiert (**Abb. 2D**). Die hochaufgelöste Struktur des *Cmu1*/*ZmKw1*-Komplexes zeigte, dass das Abwehrprotein den Zugang von Substrat zum aktiven Zentrum der *Cmu1* und damit deren katalytische Funktion blockiert (**Abb. 2E**).

### Eine neue Klasse von Abwehrproteinen?

Durch phylogenetische Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Stefan Rensing, Uni-

versität Marburg, zur Verteilung von Kiwellin-artigen Proteinen wurde festgestellt, dass solche Proteine in Pflanzen weitverbreitet vorkommen, aber auch in einigen Pilzen zu finden sind. Damit gehören die Kiwelline zu einer großen und bis jetzt nur in einem Beispiel verstandenen Klasse von Abwehrproteinen. Allein in der Maispflanze finden sich weitere 19 Kiwellin-artige Proteine, und es ist anzunehmen, dass sich diese gegen weitere pathogene Effektoren richten. Dass Kiwelline ein nicht unwesentlicher Teil einer uni-

versellen pflanzlichen Abwehrreaktion sein könnten, legen auch frühere Studien nahe, welche die Produktion von Kiwellinproteinen in Tomaten und Kartoffeln nach einem Befall durch pathogene Organismen zeigen (z. B. [7]).

Daher wird es spannend sein zu sehen, ob weitere Effektoren durch Kiwelline erkannt und in ihrer Funktion moduliert werden. Darüber hinaus ist unklar, ob den Kiwellinen – nachdem sie einen Effektor gebunden haben – eine weitere Rolle zukommt, z. B. als Signal

für die Pflanze. Auch stellt sich die Frage, ob Kiwelline nur in Wirt-Krankheitserreger-Konstellationen wirken oder ob sie möglicherweise auch in symbiotischen oder opportunistisch-pathogenen Beziehungen eine Rolle spielen.

### Danksagung

Wir bedanken uns bei Prof. Dr. Stefan Rensing, Philipps-Universität Marburg, und allen Autoren für die großartige Zusammenarbeit. Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 987, der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) und der Max-Planck-Gesellschaft für Unterstützung sowie der LOEWE-Förderung des Landes Hessen für die Strukturförderung. X. Han wurde durch ein Stipendium des China Scholarship Council gefördert. ■

### Literatur

- [1] Tamburrini M, Cerasuolo I, Carratore V et al. (2005) Kiwellin, a novel protein from kiwi fruit. Purification, biochemical characterization and identification as an allergen. *Protein J* 24:423–429
- [2] Offermann LR, Giangrieco I, Perdue ML et al. (2015) Elusive structural, functional, and immunological features of Act d 5, the green kiwifruit kiwellin. *J Agric Food Chem* 63:6567–6576
- [3] Djamei A, Schipper K, Rabe F et al. (2011) Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* 478:395–398
- [4] Kumar D (2014) Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Sci* 228:127–134
- [5] Sträter N, Schnappauf G, Braus G et al. (1997) Mechanisms of catalysis and allosteric regulation of yeast chorismate mutase from crystal structures. *Structure* 5: 1437–1452
- [6] Han X, Altegoer F, Steinchen W et al. (2019) A kiwellin disarms the metabolic activity of a secreted fungal virulence factor. *Nature* 565:650–653
- [7] Draffehn AM, Li L, Krezdorn N et al. (2013) Comparative transcript profiling by SuperSAGE identifies novel candidate genes for controlling potato quantitative resistance to late blight not compromised by late maturity. *Front Plant Sci* 4:423

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Gert Bange  
LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie  
Hans-Meerwein-Straße 6  
D-35032 Marburg  
Tel.: 06421-28-23361  
gert.bange@synmikro.uni-marburg.de  
www.bangelab.org

### AUTOREN



#### Gert Bange

1997–2002 Biochemiestudium an der Universität Halle/Saale. 2007 Promotion bei Prof. Dr. I. Sinning an der Universität Heidelberg; dort danach Postdoc und Peter und Traudl Engelhorn-Stipendiat. 2013–2017 unabhängiger Forschungsgruppenleiter am Zentrum für Synthetische Mikrobiologie (SYNMIKRO) in Marburg. Seit 2018 als W3-Professor für Biochemie am SYNMIKRO und dem Fachbereich Chemie an der Universität Marburg.



#### Xiaowei Han

2006–2010 Bachelor in Landwirtschaft an der Northwest A & F University, China. 2010–2013 Master of Science at Shandong University, China. 2013–2017 Promotion (PhD) bei Prof. Dr. R. Kahmann am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, gefördert durch ein Stipendium des China Scholarship Council. Seitdem Postdoc bei Prof. Dr. R. Kahmann.



#### Regine Kahmann

1968–1972 Biologiestudium an der Universität Göttingen, 1974 Promotion bei Prof. Dr. T. A. Trautner am Max-Planck-Institut (MPI) für molekulare Genetik, Berlin; danach Postdoc und Junior-Gruppenleiter am Cold Spring Harbor Laboratory, USA (bis 1980) und wissenschaftliche Assistentin am MPI für Biochemie in Martinsried. 1982–1987 selbstständige Gruppenleiterin am Otto-Warburg-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft (MPG) am MPI für molekulare Genetik in Berlin, danach bist 1992 selbstständige Gruppenleiterin am IGF Berlin GmbH. 1992–2001 C4/W3-Professorin für Genetik an der LMU München. Seit 2000 wissenschaftliches Mitglied der MPG und Direktorin am MPI für terrestrische Mikrobiologie in Marburg, seit 2001 W3-Professorin für Genetik an der Universität Marburg.



#### Florian Altegoer

2007–2013 Biologiestudium an der Ruhr-Universität Bochum und der Universität Göteborg, Schweden. 2017 Promotion bei Prof. Dr. G. Bange an der Universität Marburg, anschließend Postdoc und Peter und Traudl Engelhorn-Stipendiat am Zentrum für Synthetische Mikrobiologie und dem Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg.