

Pompen of verzuipen

I. Stergiopoulos, L-H. Zwiars en M.A. de Waard

Op 1 mei 2002 promoveerde aan de Wageningen Universiteit Lute-Harm Zwiars op een proefschrift getiteld: *ABC transporters of the wheat pathogen Mycosphaerella graminicola*. Op 20 januari 2003 promoveerde Ioannis Stergiopoulos op een proefschrift getiteld: *The role of the ATP-binding cassette (ABC) transporters in pathogenesis and multidrug resistance of the wheat pathogen Mycosphaerella graminicola*. Voor beide promovendi was Prof. dr. P.J.G.M. de Wit de promotor en Dr. M.A. de Waard (Wageningen Universiteit, Laboratorium voor Fytopathologie) de co-promotor.

Inleiding

Organismen worden in de natuur voortdurend blootgesteld aan toxische verbindingen. Men is bij deze bewering al snel geneigd te denken aan bestrijdingsmiddelen, zware metalen en andere contaminanten die door de mens bewust of onbewust in de natuur worden gebracht. Echter, levende organismen kunnen zelf ook notoire producenten van giftige stoffen zijn. Zulke natuurlijk toxische verbindingen worden door veel prokaryoten en eukaryoten geproduceerd. In veel ecosystemen vindt een soort van chemische oorlogsvoering plaats. Producenten van natuurlijk toxische verbindingen proberen te overleven door in hun ecologische niche zoveel mogelijk concurrerende organismen te weren. Deze pogingen zijn niet altijd succesvol omdat organismen tijdens co-evolutie afweermechanismen hebben ontwikkeld waardoor zij ongevoelig zijn geworden voor toxische verbindingen. Weer (productie van giften) en afweer (resistentieontwikkeling tegen giften) vormen dus een belangrijke component van natuurlijke evenwichten.

Deze stelling geldt ook voor schimmels. Schimmels zijn bekende producenten van natuurlijk toxische stoffen als antibiotica, mycotoxinen, en toxinen die ne-

crose van waardplanten induceren. Schimmels staan echter zelf ook bloot aan natuurlijk toxische verbindingen die door andere organismen worden geproduceerd. Denk daarbij aan antibiotica die door concurrerende micro-organismen worden uitgescheiden en aan fungitoxische verbindingen die door planten vòòr (phytoanticipinen) en na infectie (fytoalexinen) worden gevormd. Door co-evolutie hebben plantenpathogene schimmels zich kennelijk met succes gewapend tegen fungitoxische verbindingen van hun waardplanten. Bekende mechanismen die hierbij een rol kunnen spelen zijn 1) afwezigheid van de aangrijpingsplaats, 2) modificatie van de aangrijpingsplaats, waardoor deze ongevoelig wordt, 3) detoxificatie, en 4) verminderde accumulatie door een verminderde opname. Beide proefschriften hebben betrekking op een recent ontdekt verdedigingsmechanisme dat berust op verminderde accumulatie door een verhoogde secretie. De secretie wordt mogelijk gemaakt door membraanpompen die toxische verbinding bij opname herkennen en per kerende post terug transporteren naar de uitwendige omgeving. Pompactiviteit voorkomt dat verbindingen in het cytoplasma accumuleren tot fungitoxische concentraties. Hoe hoger de activiteit des te lager de gevoeligheid van de schimmel voor

toxische verbindingen. Vandaar de naam van de titel van dit artikel: pompen of verzuipen.

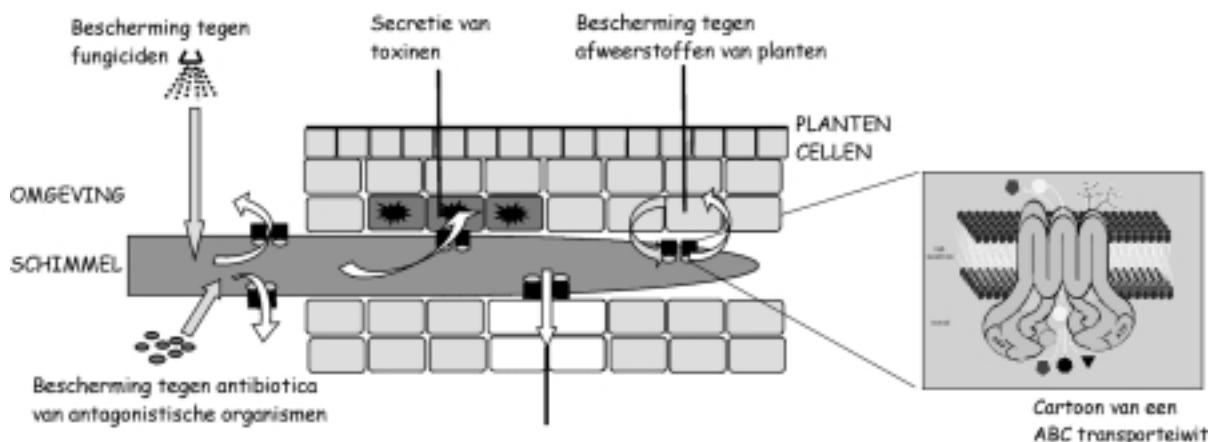
Een interessant aspect van membraanpompen is dat zij vaak een brede substraatspecificiteit bezitten. Als gevolg daarvan spelen membraanpompen niet alleen een rol bij bescherming tegen afweerstoffen van planten maar ook tegen synthetisch fungitoxische verbindingen. Dit impliceert dat membraanpompen een rol kunnen spelen bij de virulentie van plantenpathogenen, de effectiviteit van fungiciden kunnen beïnvloeden en een rol kunnen spelen bij multidrug-resistentie (MDR). MDR betekent een gelijktijdige resistentie-ontwikkeling van organismen tegen chemisch niet-verwante verbindingen en is vooral belangrijke bij resistentie van tumorcellen tegen antitumor medicijnen en van bacteriën tegen antibiotica.

Membranpompen van *M. graminicola*

Veel membraanpompen behoren tot de familie van de ATP-bindingcassette (ABC) transporteiwitten. ABC transporteiwitten bezitten ATP-bindingplaatsen waar, door hydrolyse van ATP, energie wordt gegenereerd om transport van substraten tegen een concentratiegradient over membranen mogelijk te maken. ABC transporteiwitten behoren tot één van de grootste genfamilies en komen in alle levende organismen voor. Doel van beide promotieonderzoeken was om genen die coderen voor ABC pompen van *M. graminicola* te kloneren en functioneel te analyseren. *M. graminicola* (anamorf *Septoria tritici*)

PROMOTIE

Mogelijke functies van ABC transporteiwitten in schimmels



is de veroorzaker van de septoria-bladvlekkenziekte op tarwe. Het pathogeen werd als studie-object gekozen omdat de ziekte in toeneemende mate een bedreiging is van de tarweteelt, speciaal in gebieden met hoge luchtvochtigheid en gematigde temperatuur. Om die reden is een beter begrip van moleculaire mechanismen die tijdens de pathogenese een rol spelen en van resistentieontwikkeling tegen fungiciden essentieel. In totaal werden vijf ABC transportgenen gekloneerd (*MgAtr1-MgAtr5*). Het *open reading frame* van alle genen is ongeveer 4500 basenparen lang en codeert voor eiwitten (*MgAtr1-MgAtr5*) die een hoge mate van homologie bezitten met ABC transporters van andere schimmels en gisten. Met uitzondering van *MgAtr3* kan de expressie van alle genen geïnduceerd worden door natuurlijk en synthetisch toxische verbindingen, zoals antibiotica, secundaire metabolieten van planten (o.a. fytoalexinen) en azool fungiciden. Deze waarnemingen suggereren dat de transporteiwitten inderdaad een functie kunnen vervullen bij virulentie en gevoeligheid voor fungiciden.

Multidrug pompen

De functie van *MgAtr1-MgAtr5* werd allereerst onderzocht door

de gevoeligheid van mutanten van *Saccharomyces cerevisiae* (bakkergist), waarin deze genen tot expressie werden gebracht, te testen voor natuurlijk en synthetisch toxische verbindingen. De gisttransformaten vertoonden een duidelijke verminderde gevoeligheid voor chemisch niet-verwante verbindingen (azool fungiciden, antibiotica, en fungitoxische metabolieten van planten), hetgeen er op wijst dat de gecodeerde eiwitten functioneren als multidrug pompen met een verschillende doch overlappende substratspecificiteit. De functies van de transporteiwitten werden ook onderzocht door fenotypische karakterisering van knockout mutanten van *MgAtr1-MgAtr5* in *M. graminicola*. Voor de constructie van deze mutanten werd een transformatieprotocol ontwikkeld dat gebruik maakt van *Agrobacterium tumefaciens*. Een verhoogde gevoeligheid voor fungitoxische metabolieten van planten werd alleen voor knockout transformanten van *MgAtr5* aangetoond. De overige transformanten vertoonden geen fenotype. Waarschijnlijk is dit te wijten aan activiteit van andere ABC pompen die het verlies van het uitgeschakelde gen kunnen compenseren.

Biotoetsen met antagonistische bacteriën tonen aan dat de *MgAtr2* pomp van *M. graminicola* bescherming biedt tegen antibiotica

geproduceerd door *Pseudomonas* en *Burkholderia* spp. Deze waarneming is belangrijk omdat het impliceert dat ABC pompen ook belangrijk kunnen zijn bij de overleving van de schimmel tijdens de saprofytische fase van zijn levenscyclus.

Virulentie op tarwe

De functie van *MgAtr1-MgAtr5* werd verder geanalyseerd door de virulentie van knockout mutanten te bepalen op zaailingen van tarwe. De virulentie van knockout mutanten van *MgAtr4* bleek significant minder te zijn dan die van het wildtype en de overige knockout mutanten. Histopathologisch onderzoek van het infectieproces toonde aan dat *MgAtr4* mutanten substomatale ruimten slecht koloniseren. De groeikracht van de *MgAtr4* mutant op verschillende media *in vitro* was niet vermindert. Deze resultaten wijzen er op dat *MgAtr4* een virulentiefactor is van *M. graminicola* en het pathogeen mogelijkwijs beschermt tegen een nog onbekende fungitoxische afweerstof van tarwe. Dit verschijnsel is ook gerapporteerd voor ABC pompen van andere plantenpathogenen, waaronder *Botrytis cinerea*, *Gibberella pulicaris* en *Magnaporthe grisea*.

Gevoeligheid voor azoofungiciden

Eerder onderzoek met de schimmels *Aspergillus nidulans* en *B. cinerea* toonde aan dat laboratoriumstammen met verminderde gevoeligheid voor azoofungiciden, tevens multidrug-resistentie bezitten tegen uiteenlopende verbindingen. Dit fenotype bleek te correleren met overexpressie van specifieke ABC genen en een verminderde accumulatie van azoofungiciden ten gevolge van verhoogde secretie. Beide promotieonderzoeken toonden aan dat dit mechanisme bij *M. graminicola* minder duidelijk is. Azoofungicide laboratorium stammen vertoonden weliswaar een MDR fenotype maar de verminderde gevoeligheid kon niet duidelijk worden geassocieerd met overexpressie van een specifiek ABC gen. In één van de stammen werd een duidelijke overexpressie van

MgAtr1 gevonden en disruptie van het gen herstelde de wild-type gevoeligheid voor azoofungiciden, hetgeen suggereert dat *MgAtr1* een factor is die mede bepalend is voor azoofungicide gevoeligheid van *M. graminicola*. Ook in veldisolaten met een sterk uiteenlopende gevoeligheid voor azoofungiciden kon geen duidelijke correlatie tussen expressie van geïdentificeerde ABC genen en accumulatie van azoofungiciden worden vastgesteld. De resultaten wijzen er op dat meerdere mechanismen de verschillen in gevoeligheid van veldisolaten van *M. graminicola* beïnvloeden.

Conclusies en vooruitblik

De gegevens van beide proefschriften tonen aan dat ABC pompen van *M. graminicola* belangrijke functies bezitten bij de bescherming van het pathogeen

tegen fungitoxische afweerstoffen van planten. Dit verklaart waarschijnlijk de ontdekking dat de ABC pomp *MgAtr4* een virulentiefactor van de schimmel is op tarwe. Er werden ook aanwijzingen verkregen dat ABC pompen van belang kunnen zijn voor gevoeligheid en multidrugresistentie tegen azoofungiciden. Het huidige onderzoek is erop gericht om membraanpompen te vinden die in dit opzicht een meer uitgesproken rol vervullen. Identificatie van ABC pompen die fungeren als virulentiefactor kan leiden tot de ontwikkeling van een nieuwe generatie middelen die zelf geen fungitoxische activiteit bezitten maar plantenziekten beheersen door een verbeterde exploitatie van afweerreactie van waardplanten. Identificatie van zulke MDR pompen kan leiden tot de ontwikkeling van middelen die de effectiviteit van fungiciden verhogen en MDR resistentiemechanismen teniet doen.

PROMOTIE