

De rol van *Cladosporium fulvum*-effectoreiwitten in virulentie

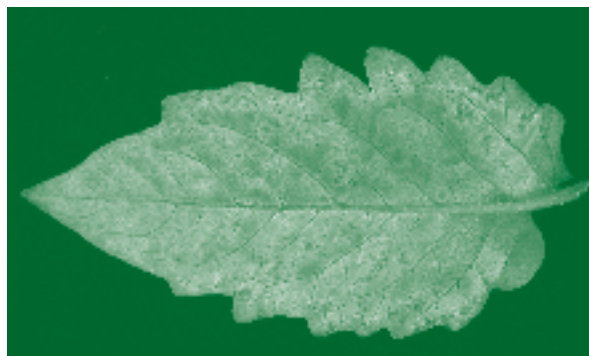
Peter van Esse

Op 9 juni 2008 promoveerde Peter van Esse aan Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld '*Cladosporium fulvum* effector proteins and their role in pathogen virulence'. Promotor was Prof. Dr. Ir. Pierre de Wit en co-promotor was Dr. Ir. Bart Thomma, beiden van de leerstoelgroep Fytopathologie van Wageningen Universiteit. Het onderzoek werd uitgevoerd in Wageningen en gefinancierd door het Centre for Biosystems Genomics (CBSG).

Inleiding

De schimmel *Cladosporium fulvum* (syn. *Pas-salora fulva*) is een biotrofe schimmel die de bladvlekkenziekte van tomaat (*Solanum es-culentum*) veroorzaakt, en al jaren als model gebruikt wordt om de interactie tussen planten en ziekteverwekkende schimmels te bestuderen. Tomatenplanten raken besmet met *C. fulvum* via luchtstromen of spatwater met conidiosporen van de schimmel. Wanneer een conidiospore op de onderkant van het blad terecht komt kiemt deze en vormt een loophyfe. Wanneer deze vervolgens een openstaand huidmondje tegenkomt dringt de hyfe de plant binnen. Ongeveer een week na infectie zijn de eerste symptomen van de ziekte te zien als lichtgroene of gele vlekken aan de bovenkant van het blad. Aan de onderkant van het blad is tien tot veertien dagen na besmetting wit tot olijfgroene schimmel te zien, die bruin wordt wanneer de schimmel begint te sporuleren (figuur 1).

Tijdens groei in de apoplast, de intercellulaire ruimte die de mesofylcellen in het blad omgeeft, scheidt *C. fulvum* eiwitten (zogenaamde effectoren) uit waarvan er tot nu toe acht bekend zijn. In resistente tomatenplanten worden deze effectoren gedetecteerd door Cf-resistentie-eiwitten. Het is deze specifieke detectie van effectoren die de afweer in resistente planten activeert, wat resulteert in een overgevoeligheidsreactie (in het Engels '*hypersensitive response*', afgekort HR)



Figuur 1. De onderkant van een *Cladosporium fulvum*-geïnfecteerd tomatenblad, 15 dagen na inoculatie. Over het gehele blad is een witte schimmel te zien die overgaat in een roestbruine kleur daar waar de schimmel sporuleert.

waarbij geprogrammeerde celdood de infectie een halt toeroept. In tomatenplanten die deze Cf-resistentie-eiwitten niet bezitten vindt deze specifieke herkenning niet plaats, waardoor de afweer niet genoeg geactiveerd wordt om de invasie van *C. fulvum* te stoppen. Dit heeft tot gevolg dat deze planten vatbaar zijn. De afweer van vatbare planten is niet afdoende omdat de *C. fulvum*-effectoren, als ze niet gedetecteerd worden door een Cf-resistentie-eiwit, bijdragen aan het tot stand komen van een succesvolle infectie. In dit promotieonderzoek is de rol die de effectoren van *C. fulvum* spelen in het tot stand brengen van de infectie op vatbare tomatenplanten bestudeerd. De centrale vraag was: hoe dragen de effectoren van *C. fulvum* bij aan een succesvolle infectie?

Avr4, een eiwitschild tegen planten-chitinasen

Eerdere studies hebben aangetoond dat de *C. fulvum*-effector genaamd Avr4 aan chitine bindt. Chitine is een belangrijke component van de schimmelcelwand, en de binding van Avr4 aan chitine resulteert *in vitro* in bescherming van

PROMOTIES



Figuur 2. Transgene tomatenplanten die het *Cladosporium fulvum*-eiwit Avr4 aanmaken zijn gevoeliger voor de schimmelziekte *Fusarium oxysporum*. (A) Een transgene tomatenplant die Avr4 aanmaakt. (B) Een controle-tomatenplant. (C) Een transgene tomatenplant die Avr4 aanmaakt, 14 dagen na inoculatie met *F. oxysporum*. (D) Een controle tomatenplant, 14 dagen na inoculatie met *F. oxysporum*. Symptomen veroorzaakt door *Fusarium oxysporum*, zoals verwelking en slechte strekking, zijn duidelijker zichtbaar op de Avr4-producerende tomatenplant.

C. fulvum tegen chitinases (chitine-afbrekende enzymen) die door de plant aangemaakt worden tijdens infectie. Om te onderzoeken wat het effect van Avr4 is op de verdediging van een plant is in de eerste plaats gekeken naar de modelplant *Arabidopsis*. Dit is gedaan door transgene *Arabidopsis*-planten te genereren die Avr4 aanmaken en uitscheiden in de apoplast. Ten opzichte van controle-*Arabidopsis* zijn deze Avr4-producerende *Arabidopsis*-planten duidelijk gevoeliger voor verschillende schimmelziekten. De vatbaarheid van Avr4-producerende planten voor bacteriën en een oömyceet, organismen die weinig tot geen chitine in hun celwand hebben, bleef ongewijzigd. Dit is een duidelijke aanwijzing dat de beschermende werking van Avr4 niet alleen *in vitro*, maar ook in de plant bestaat.

Naast transgene *Arabidopsis*-planten zijn ook transgene Avr4-producerende tomatenplanten getest voor vatbaarheid voor de vaatbundschemmel *Fusarium oxysporum*, waarvan bekend is dat ze gevoelig is voor chitinases. Ook in deze proef was een duidelijk verschil te zien tussen controle-tomatenplanten en de Avr4-producerende tomatenplanten; de Avr4-producerende planten waren duidelijk vatbaarder voor verwelkingsziekte veroorzaakt door *F. oxysporum* (figuur 2). Alle schimmels die virulenter zijn op de transgene Avr4-producerende *Arabidopsis*- en tomatenplanten kunnen *in vitro* door Avr4 beschermd worden tegen chitinases. Avr4 fungeert

als een soort eiwitschild door te plakken aan de celwand van schimmels en zo deze celwand af te schermen tegen chitinases van de plant.

Van sommige effectoren is bekend dat zij meerdere functies kunnen vervullen. Om erachter te komen of Avr4 nog wat anders doet dan het afschermen van de schimmelcelwand zijn microarray-analyses gedaan waarbij genexpressie van 22.782 genen in de transgene Avr4-producerende tomatenplanten vergeleken is met die in controle-tomatenplanten. Vergeleken met de controleplanten hadden slechts zeven genen een verhoogde of verlaagde activiteit. Ter vergelijking: eerder onderzoek heeft aangetoond dat bij herkenning van Avr4 door het resistentie-eiwit Cf-4 in tomatenplanten vele honderden genen differentiëel gereguleerd worden. Aanwezigheid van Avr4 in de apoplast, in afwezigheid van een pathogene schimmel, heeft dus geen tot weinig effect op tomatenplanten. De beschermende functie van Avr4 lijkt dus de enige functie te zijn van dit eiwit.

Ten slotte moest nog een belangrijke vraag beantwoord worden: draagt Avr4 bij aan de virulentie van *C. fulvum* zelf? Om dit te testen zijn transgene *C. fulvum*-varianten gemaakt die het Avr4-gen nog slechts in geringe mate tot expressie kunnen brengen. Deze *C. fulvum*-varianten waren minder agressief dan hun niet-getransformeerde tegenhangers en dus is Avr4 vereist voor optimale agressiviteit van *C. fulvum*.

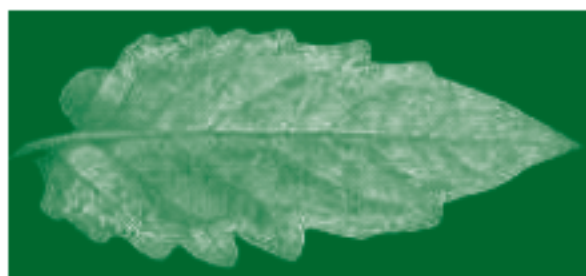
Avr2, een remmer van enzymen die betrokken zijn bij de afweer

Van de *C. fulvum*-effector Avr2 was al bekend dat deze een interactie aangaat met het enzym Rcr3. Dit enzym is een zogenaamd cysteine-protease dat voorkomt in de apoplast van tomatenplanten. Proteasen zijn enzymen die andere eiwitten afbreken en ze spelen onder andere een rol in de afweer van planten. De interactie tussen Avr2 en Rcr3 wordt in tomatenplanten die het resistentiegen *Cf-2* hebben, herkend door de *Cf-2* receptor, waarbij herkenning leidt tot een HR en resistentie in deze planten. In dit promotie-onderzoek wordt aangetoond dat Avr2 bijdraagt aan virulentie van *C. fulvum*, en dat deze effector in staat is een aantal cysteine-proteasen te remmen die vereist zijn voor de basale afweer van tomaat tegen verscheidene schimmels. Ook voor de studie aan de Avr2-effector zijn transgene *Arabidopsis*-planten gegenereerd die Avr2 aanmaken en uitscheiden in de apoplast. Ook in dit geval resulteerde de aanwezigheid van de effector in een verhoogde vatbaarheid voor een aantal schimmelpathogenen, waaronder *Botrytis cinerea* en *Verticillium dahliae*. Daarnaast zijn er microarray-analyses uitgevoerd op de transgene Avr2-producerende *Arabidopsis*. Ten opzichte van de niet-transgene controleplanten waren er veel veranderingen in genexpressie waar te

nemen in de Avr2-producerende *Arabidopsis*. Uit verdere analyses bleek dat de gen-activiteit van de Avr2-producerende *Arabidopsis* lijkt op die van *Arabidopsis*-planten die door een pathogeen aangevallen worden. Avr2 verstoort dus geen algemene huishoudelijke processen in de plant, wat tot een verhoogde vatbaarheid voor bepaalde ziektes zou kunnen leiden, maar grijpt specifiek de afweer aan.

Om nog meer te weten te komen over de Avr2-producerende *Arabidopsis*-planten zijn er biochemische analyses uitgevoerd. Hierbij is gekeken naar de protease-activiteit in deze planten. Uit deze analyses kwam naar voren dat Avr2 in staat is een aantal extracellulaire cysteine-proteasen van *Arabidopsis* te remmen. Naast *Arabidopsis* is ook gekeken naar transgene tomatenplanten die Avr2 aanmaken en uitscheiden in de apoplast. In de tomatenplanten die Avr2 aanmaken was een verhoogde vatbaarheid voor *C. fulvum*, *B. cinerea* en *V. dahliae* waar te nemen. Een biochemische analyse van de cysteine-protease-activiteit toonde aan dat Avr2 verschillende cysteine-proteasen remt, waaronder het eerder genoemde Rcr3. Ten slotte is onderzocht of een verminderde expressie van het Avr2-gen in *C. fulvum* de agressiviteit van de schimmel beïnvloedt. Hiervoor zijn, net als bij de studie van Avr4, transgene *C. fulvum*-varianten gemaakt

Infectie op tomaat 15 dagen na inoculatie



controle
Cladosporium fulvum



transgene
Cladosporium fulvum
die significant minder
Avr2 aanmaakt

Figuur 3. Avr2 maakt *Cladosporium fulvum* agressiever. Typische symptomen van een tomatenplant 15 dagen na inoculatie met een wildtype *C. fulvum* (links), en een transgene *C. fulvum* variant die significant minder Avr2 aanmaakt (rechts). Terwijl het wildtype van *C. fulvum* al sporuleert (te zien als roestbruine plekken), bevindt de transgene variant zich nog in een vroeger infectiestadium (witte schimmel over het gehele blad).

met een zeer lage expressie van het *Avr2*-gen. Ook in dit geval was een duidelijke vermindering van agressiviteit waar te nemen in de transgene *C. fulvum*-mutanten (figuur 3). Samenvattend kan gesteld worden dat *Avr2* in staat is cysteine-proteasen te remmen waarvan, op basis van de ziekte-toetsen, geconcludeerd kan worden dat deze belangrijk zijn voor de afweer van de plant.

Ecp6, een nieuwe effector met orthologen in andere schimmels

Tijdens het promotieonderzoek is ook de samenstelling van de tomaat-apoplast tijdens een infectie met *C. fulvum* nog eens extra bestudeerd. Daarvoor is twee-dimensionale polyacrylamide-gelelektroforese (2D-PAGE) gebruikt, om eiwitten te visualiseren die *C. fulvum* tijdens infectie van tomaat uitscheidt. Met deze techniek is het mogelijk eiwitten eerst te scheiden op basis van hun iso-elektrisch punt (de pH waarbij een eiwit geen lading heeft) en daarna op basis van hun massa. Met deze techniek zijn drie nieuwe *C. fulvum*-eiwitten geïdentificeerd: CfPhiA, Ecp6, en Ecp7. CfPhiA vertoont homologie met structurele eiwitten die vóórkomen op conidioforen van schimmels, terwijl Ecp6 lysine-domeinen (LysM-domeinen) bevat die betrokken zijn in de binding van koolhydraatmoleculen. Ecp7, tenslotte, is een klein cysteine-rijk eiwit met onbekende functie. Omdat de vaatbundelschimmel *F. oxysporum* ten opzichte van *C. fulvum* relatief makkelijk genetisch te modifieren is, zijn transgene varianten van deze schimmel gegenereerd die Ecp6 en Ecp7 maken en uitscheiden. Expressie van *Ecp6* verhoogde duidelijk de virulentie van de vaatparasiet *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Echter, expressie van *Ecp7* echter leverde geen veranderde virulentie op. Mede op basis van dit experiment zijn vervolgens transgene *C. fulvum*-varianten gegenereerd die het *Ecp6*-gen in sterk verminderde mate tot expressie brengen. De verminderde agressiviteit van deze mutanten laat zien dat Ecp6 een bijdrage levert aan de virulentie van *C. fulvum* op tomaat. Vervolgens is in een wereldwijde collectie van *C. fulvum*-isolaten gekeken naar de allelische variatie in het coderend gebied van *Ecp6*. Deze variatie blijkt gering te zijn, wat suggereert dat behoud van dit gen een selectief voordeel biedt. Een ander interessant resultaat was dat er geconserveerde Ecp6-orthologen (soortelijke eiwitten in andere soorten) bestaan in verschillende onverwante schimmelsoorten. Dit is opmerkelijk omdat geen van de andere tot nu toe bekende *C. fulvum*-effectoren orthologen heeft in andere organismen. Op dit moment wordt er onderzoek gedaan om de precieze functie van Ecp6 te achterhalen.

Ten slotte

De resultaten van dit promotieonderzoek leveren een belangrijke bedrage aan ons begrip over hoe pathogene schimmels de basale verdediging van planten onschadelijk maken. Voor het eerst wordt er een duidelijke link gelegd tussen de biologische functie van twee effectoreiwitten, de *C. fulvum*-effectoren *Avr2* en *Avr4*, en virulentie van de ziekteverwekker. Verder is een duidelijke rol in virulentie aangetoond voor de LysM-effector *Ecp6*. Vervolgonderzoek waarbij vergelijkbare strategieën gebruikt gaan worden als bij *Avr2* en *Avr4* zullen in de toekomst ook de biologische rol van deze effector duidelijk maken.

Het huidige werkadres van Peter van Esse is Laboratorium voor Fytopathologie, Wageningen Universiteit, Binnenhaven 5, 6709 PD Wageningen. E-mail: Peter.vanessa@wur.nl

Website: <http://www.php.wur.nl/UK/Research/Verticillium/>

Voor wie meer wil weten

- Bolton MD, van Esse HP, Vossen, JH, de Jonge R, Stergiopoulos I, Stulemeijer IJE, van den Berg GCM, Borrás-Hidalgo O, Dekker HL, de Koster CG, de Wit PJGM, Joosten MHAJ, Thomma BPHJ (2008) The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector *Ecp6* is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular Microbiology* 69: 119-136.
- Thomma BPHJ, van Esse HP, Crous PW, de Wit PJGM (2005) *Cladosporium fulvum* (syn *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. *Molecular Plant Pathology* 6: 379-393
- van Esse HP, Klooster JW van 't, Bolton MD, Yadeta KA, Baarlen P van, Boeren S, Vervoort JJM, Wit PJGM de, Thomma BPHJ (2008) The *Cladosporium fulvum* virulence protein *Avr2* inhibits host proteases required for basal defense. *The Plant Cell* 20: 1948-1963
- van Esse HP, Bolton MD, Stergiopoulos I, de Wit PJGM, Thomma BPHJ (2007) The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein *Avr4* is a virulence factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1092-1101
- van Esse HP, Fradin EF, de Groot PJ, de Wit PJGM, Thomma BPHJ (2009) The tomato transcriptomes upon infection with a foliar and a vascular fungal pathogen show little overlap. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 245-258