

Voetsporen van evolutie: de dynamiek van effectorgenen in het *Phytophthora*-genoom

Rays H.Y. Jiang

Op 29 maart 2006 promoveerde Rays H.Y. Jiang aan de Wageningen Universiteit op een proefschrift getiteld 'Footprints of evolution: the dynamics of effector genes in the *Phytophthora* genome'. Promotor was Prof.dr.ir. P.J.G.M. de Wit, hoogleraar Fytopathologie, en co-promotor was Dr.ir. F. Govers, beiden verbonden aan de leerstoelgroep Fytopathologie van Wageningen Universiteit. Het onderzoek, dat plaatsvond bij bovengenoemde leerstoelgroep, werd financieel ondersteund door de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO) in het kader van een Aspasia-subsidie toegekend aan Dr. F. Govers. De volledige tekst van het proefschrift is als pdf file beschikbaar op de digitale bibliotheek van Wageningen Universiteit (<http://library.wur.nl/wda/dissertations/dis3925.pdf>).

Inleiding

Het geslacht *Phytophthora* omvat meer dan 65 verwoestende plantenpathogene soorten die ernstige schade toebrengen aan landbouwgewassen en aan planten, struiken en bomen in de natuur. Economisch belangrijke pathogenen zijn onder andere *P. infestans*, de veroorzaker van de aardappelziekte, en *P. sojae*, die wortel- en stengelrot op sojaboon veroorzaakt. Een onlangs ontdekte soort, *P. ramorum*, is verantwoordelijk voor het Sudden Oak Death-syndroom en verwoest eikenbomen langs de westkust van de Verenigde Staten. *Phytophthora* behoort tot de oömyceten die, samen met plantenpathogene schimmels, de belangrijkste groep plantpathogenen vormen. Morfologisch gezien lijken oömyceten en schimmels op elkaar maar ze behoren tot verschillende rijken, respectievelijk de Stramenopila en de

Fungi. Convergente evolutie heeft ertoe geleid dat oömyceten en schimmels een vergelijkbaar wapenarsenaal hebben dat nodig is om planten aan te vallen.

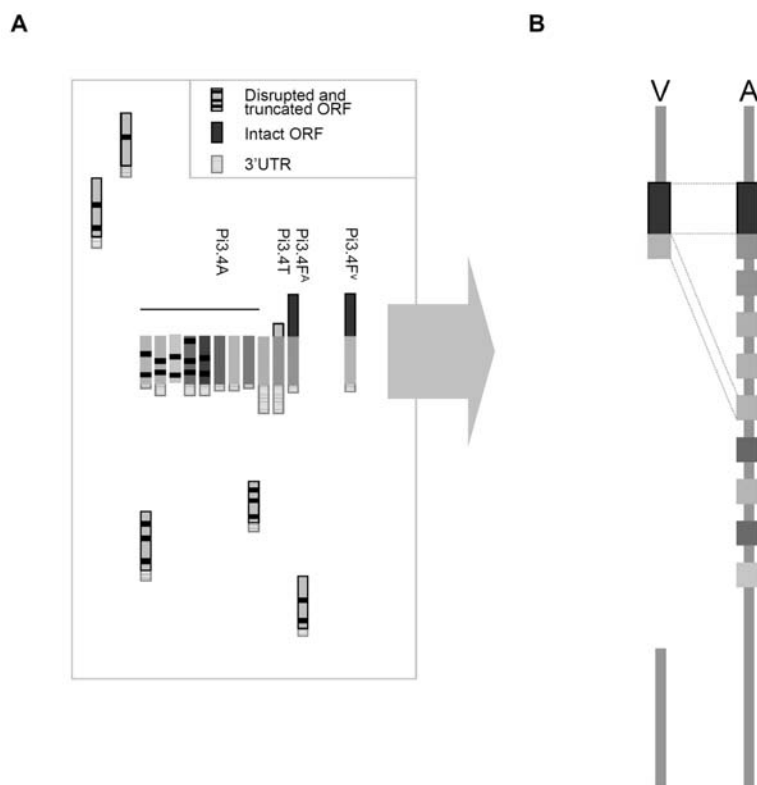
Phytophthora scheidt een breed spectrum aan moleculen uit in de plant-apoplast, waarschijnlijk om infectie te bevorderen. Deze moleculen, waarvan verondersteld wordt dat ze een rol spelen bij virulentie of pathogeniteit, worden virulentiefactoren of effectors genoemd. Ondanks hun intrinsieke virulentiefuncties kunnen effectors ook verantwoordelijk zijn voor het mislukken van een infectie, namelijk als planten de effectors herkennen en vervolgens verdedigingsreacties initiëren. Effectors die verdedigingsreacties bij planten veroorzaken worden avirulentiefactoren of elicitors genoemd. Dit proefschrift beschrijft de drastische genoomherschikkingen in een avirulentielocus in *P. infestans*,

de karakterisering van het reservoir van effectorgenen in de genomen van *P. sojae* en *P. ramorum* en evolutionaire patronen in effectorgenen.

Een avirulentie-locus met diverse modules van een geëmplificeerd gen

De interactie tussen aardappel en *P. infestans* verloopt volgens het gen-om-gen-model. Als een eerste stap naar het ontrafelen van de moleculaire interactiemechanismen moeten *P. infestans*-avirulentiegenen (*Avr*-genen) geïsoleerd worden. Om transcripten te identificeren die geassocieerd zijn met avirulentie werd een zogenaamde 'transcriptional profiling' strategie gebruikt. Met cDNA-AFLP werden transcripten vergeleken in *P. infestans*-stammen met verschillende virulentiefenotypen. Een groot aantal avirulentie-geassocieerde TDF's (Transcript Derived Fragments) werd gekloneerd en gesequenced, en vervolgens werden EST- en genoom-databanken doorgespit om meer sequentiegegevens te verkrijgen. Om veelbelovende kandidaten te identificeren werden selectiecriteria gebruikt die met behulp van bioinformatica getoetst werden, zoals het voorkomen van een signaalpeptide, het aantal cysteïne-residuen en mogelijke virulentiefuncties. Een combinatie van 'transcriptional profiling' en

PROMOTIES



Figuur 1. Een avirulentie-locus met diverse modules van een geamplificeerd gen. (A) *P. infestans* bevat meerdere kopieën van *pi3.4* die verspreid liggen over het genoom. De meeste kopieën zijn pseudogenen en hebben geen intact open leesraam (disrupted ORF). Het hemizygote *Avr3b-Avr10-Avr11*-locus bevat een groot aantal *pi3.4*-kopieën en het is het enige locus met een volledig intact *pi3.4*-gen (*pi3.4F^v*) naast afgebroken kopieën met een intact open leesraam (*pi3.4T*). (B) Ongelijke overkruising op het hemizygote *Avr3b-Avr10-Avr11*-locus. De *pi3.4*-amplificatie kan dienen als bron van modules die geassembleerd worden in nieuwe volledige *pi3.4*-genen.

genetische en fysische kartering leidde tot de karakterisering van een complex avirulentie-locus. Vier avirulentie-geassocieerde TDF's bleken afgeleid te zijn van één gen, *pi3.4*. Genetische en fysische kartering plaatste *pi3.4* op het *Avr3b-Avr10-Avr11*-locus op koppelingsgroep VIII. 'Comparative Genomic Hybridization' (CGH) liet zien dat dit *Avr*-locus behoort tot de zes loci in het genoom waarvan het aantal kopieën variabel is ('copy number variation' - CNV). Een geamplificeerd *pi3.4*-gencluster is aanwezig in het avirulente haplotype maar afwezig in het virulente haplotype. Alleen de 3' helft van het *pi3.4*-gen is geamplificeerd, en deze amplificatie

bleek variabele modules op te leveren die mogelijk gebruikt worden om nieuwe volledige genen samen te stellen (Figuur 1).

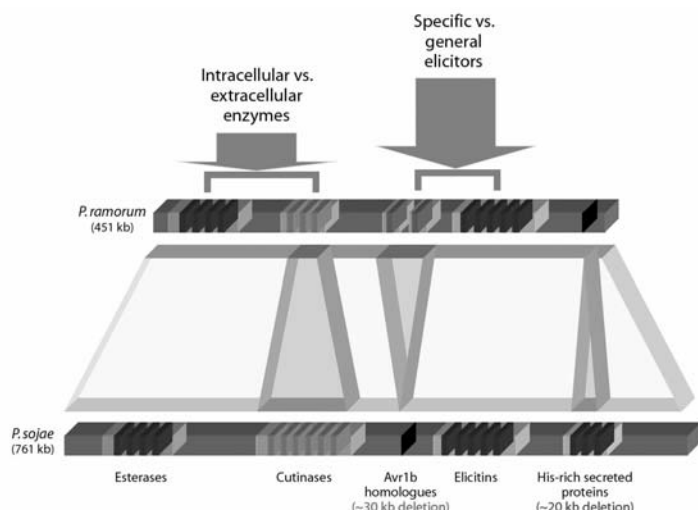
Elicitines: een grote, sterk geconserveerde en complexe familie van eiwitten

Van de eiwitten die worden uitgescheiden door *Phytophthora* worden elicities het meest overvloedig aangemaakt. Elicitines hebben elicitor-activiteit; ze veroorzaken een hypersensitieve reactie in tabaksplanten. Onderzoek naar de diversiteit en genoomorganisatie van elicitingenen in vier *Phytophthora*-

soorten toonde aan dat elicities gecodeerd worden door een grote en complexe genfamilie, en dat ze behoren tot de meest geconserveerde eiwitgroepen in het *Phytophthora*-geslacht. Vele elicities- (ELI-) en elicities-achtige (ELL-) genen komen geclusterd voor in het genoom. Fylogenetische analyse gaf aan dat de complexe elicitiesgenfamilie al bestond voordat uit de oer-*Phytophthora* de huidige *Phytophthora*-soorten ontstonden. Met moleculaire fylogenie werden leden van de elicitiesfamilie geïdentificeerd in 17 verschillende groepen, te weten 4 ELI-groepen en 13 ELL-groepen. Uit expressiepatronen en voorspellingen met behulp van bioinformatica, kon worden afgeleid dat verschillende groepen verschillende functies uitoefenen.

Recombinatie-'hotspots' in het *Phytophthora*-genoom en de positie van effectorgenen

Twee *Phytophthora*-soorten waarvan de genoomsequenties volledig bekend is, *P. sojae* en *P. ramorum*, verschillen in hun genoomgroottes, seksueel gedrag en gastheerspecificiteit. Om inzicht te verkrijgen in de evolutie van effectorgenen werd vergelijkende genoomanalyse uitgevoerd en werd de genoomorganisatie van potentiële effectorgenen nader bestudeerd. Algemene co-lineariteit werd gevonden tussen grote genoomgebieden van *P. sojae* en *P. ramorum*. Toch brachten inserties, deleties en expansies een aantal 'hotspots' voor genoomherschikkingen aan het licht (Figuur 2) en zulke hotspots bleken vaak virulentie-geassocieerde genen te herbergen. Contrasterende evolutionaire patronen werden gevonden voor naburige genfamilies waarbij, bijvoorbeeld, families



Figuur 2. Recombinatie-‘hotspots’ in het *Phytophthora*-genoom en de positie van effectorgenen.

die coderen voor extracellulaire enzymen meer herschikkingen vertoonden dan families die coderen voor intracellulaire enzymen. Ook vertoonden genen die voor gastheerspecifieke elicitors coderen meer herschikkingen dan genen die voor algemene elicitors coderen.

Het secretoom en de snelheid van evolutie van gesecreterde eiwitten

Het secretoom omvat het hele reservoir aan uitgescheiden eiwitten die onderdeel uitmaken van het proteoom van een organisme. Met behulp van bioinformatica werden alle genen die coderen voor gesecreterde eiwitten geselecteerd. Zowel *P. sojae* als *P. ramorum*, beschikt over een groot secretoom bestaande uit meer dan duizend eiwitten. De meeste genen die voor uitgescheiden eiwitten coderen kunnen gegroepeerd worden in families, en vele komen in het genoom geclusterd voor. Vergelijking van de secretomen van *P. sojae* en *P. ramorum* liet zien dat verschillende families met een verschillende snelheid evolueren. Tot de snelst evoluerende families behoren de eiwitten die aan het celoppervlak verankerd

zijn, factoren geassocieerd met paring en “RXLR-DEER”-eiwitten. Zij kunnen een belangrijke rol spelen in gastheer-pathogeninteracties of in reproductie.

Codon mimicry en retrotransposons

Voor het analyseren van basale eigenschappen van een genoom is het waardevol informatie te vergaren over de basensamenstellingen van een genoom en te berekenen hoe efficiënt de verschillende basen gebruikt worden. In dit onderzoek werd de basensamenstellingen van de *P. sojae*- en *P. ramorum*-genomen berekend en vergeleken. De coderende gebieden laten duidelijk een hoog GC3-gehalte zien (GC-codongebruik op de 3^e positie), en deze voorkeur voor het gebruik van bepaalde codons in *Phytophthora*-genen heeft een zogenaamde ‘codon bias’ tot gevolg. Gevonden werd dat evolutionaire krachten zoals selectiedruk en tendens tot mutaties de ‘codon bias’ in *Phytophthora* aanzwengelen. Het hogere GC3-gehalte in *Phytophthora*-genen die hoog tot expressie komen duidt op selectiedruk, terwijl toename van het GC-gehalte in niet-co-

derende gebieden in de ene *Phytophthora*-soort ten opzichte van de andere, wijst op een mutatietendens in het hele genoom (‘whole genome mutation bias’). De meest-verspreide groepen van transposons werden uit de genomen van de beide *Phytophthora*-soorten gefilterd en geanalyseerd, en deze vertonen een ‘codon bias’ die vergelijkbaar is met die van de genen van de gastheer-*Phytophthora*.

Tenslotte

Wat zijn nu de evolutionaire implicaties van de bevindingen die in dit proefschrift zijn beschreven? Het is evident dat voor pathogene organismen effectorgenen van belang zijn voor de interactie met hun gastheren. Dit heeft tot gevolg dat effectorgenen over het algemeen sneller evolueren dan de meeste andere genen. De resultaten gepresenteerd in dit proefschrift laten zien dat vergelijkende genomische analyse een krachtig instrument is om deze genen te ontdekken, en om veelbelovende kandidaten verantwoordelijk voor pathogenese aan te wijzen. Zodra de volledige DNA-sequentie van de genomen van andere *Phytophthora*-soorten beschikbaar is kunnen de vergelijkende genomische analyses uitgebreid worden en kunnen soortspecifieke effectorgenen gemakkelijker gedetecteerd worden. Vervolgonderzoek zal zich richten op *P. infestans*, de veroorzaker van de aardappelziekte. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift laat zien dat genomics een nieuwe impuls kan zijn voor fundamentele en toegepaste wetenschappers. Met de blauwdruk van *P. infestans* tot onze beschikking zal het aardappelziekte-onderzoek aan momentum winnen.

PROMOTIES