

Cf-afhankelijke afweerreacties, geïnduceerd door avirulentie-eiwitten van het tomatenpathogeen *Cladosporium fulvum*

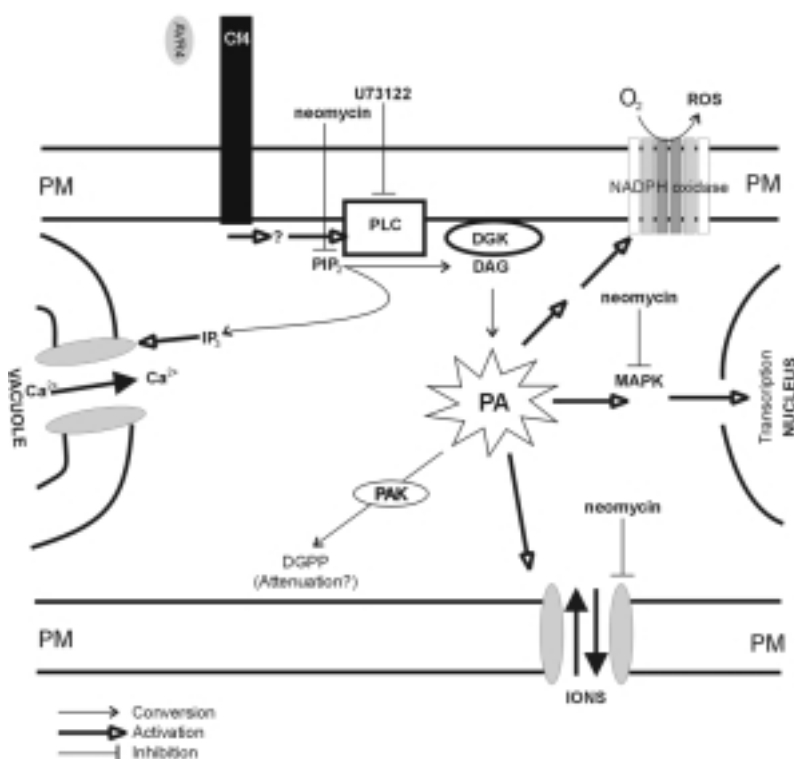
ofwel: Koude fataal voor zelfmoordtomaat

Camiel F. de Jong

Tomaten beschermen zich tegen indringers met de 'tactiek van de verschroeiende aarde': de cellen op de plaats van infectie sterven af en voorkomen daarmee dat het pathogeen verder kan groeien. Het proces begint al binnen een minuut en is temperatuurgevoelig, ontdekte Dr. Camiel de Jong. Hij promoveerde 19 juni 2002 aan de Wageningen Universiteit. Promotor was Prof. Dr. Ir. P.J.G.M. de Wit en copromotor Dr. Ir. M.H.A.J. Joosten; beiden zijn werkzaam bij de leerstoelgroep Fytopathologie van Wageningen Universiteit.

Inleiding

De uitkomst van een plant-pathogeen interactie wordt zowel door de aanwezigheid van resistentie (R) genen in de plant en corresponderende avirulentie (Avr) genen in het pathogeen bepaald. Volgens het gen-om-gen concept bestaat er voor elk dominant R gen dat aanwezig is in een waardplantpopulatie ook een corresponderend dominant avirulentiegen gen in de populatie van het pathogeen. De herkenning van een AVR eiwit door de plant een resultaat in een overgevoeligheidsreactie, ofwel



Figuur 1: Model voor de rol van fosfatidylzuur (PA) aan de Cf4/Avr4 signaaloverdracht.

Na perceptie van AVR4 door de cel wordt fosfolipase C geactiveerd. Dit enzym hydrolyseert vervolgens fosfatidylinositolbisfosfaat (PIP_2) in inositoltrisfosfaat (IP_3) en diacylglycerol (DAG). IP_3 diffundeert in het cytosol alwaar het Ca^{2+} vrijmaakt uit intracellulaire voorraden. DAG blijft in de membraan en wordt door DAG kinase (DGK) omgezet in fosfatidylzuur. PA kan direct of indirect NADPH oxidase activeren wat resulteert in de productie van reactieve zuurstof radicalen (ROS). Tegelijkertijd schept PA, direct of indirect, de juiste condities in de plasmamembraan voor het plaatsvinden van andere signaaltransductie processen zoals het openen van ion kanalen, of activering van andere afweer signaaltransductie componenten van de plant zoals MAP kinases of andere eiwit kinases. (PM: plasmamembraan)

hypersensitieve respons (HR) van plantencellen in de waardplant. De HR veroorzaakt het afsterven (necrotiseren) van een beperkt aantal plantencellen rond de primaire infectiehaard, waardoor kolonisatie van het plantenweefsel door het pathogeen wordt voorkomen. AVR eiwitten veroorzaken in de plantencellen een scala aan reacties, waaronder de productie van zuurstofradicalen. Zuurstofradicalen spelen waarschijnlijk een rol bij de activering van de afweerreactie en zijn betrokken bij de directe afweer tegen het pathogeen.

De interactie tussen de plantpathogene schimmel *Cladosporium fulvum* en tomaat volgt het hierboven beschreven gen-om-gen concept. Van dit pathosysteem zijn verscheidene resistentie- en avirulentiegenen gekloneerd, waarbij de corresponderende genenparen

Cf-4/Avr4 en Cf-9/Avr9 het best zijn bestudeerd.

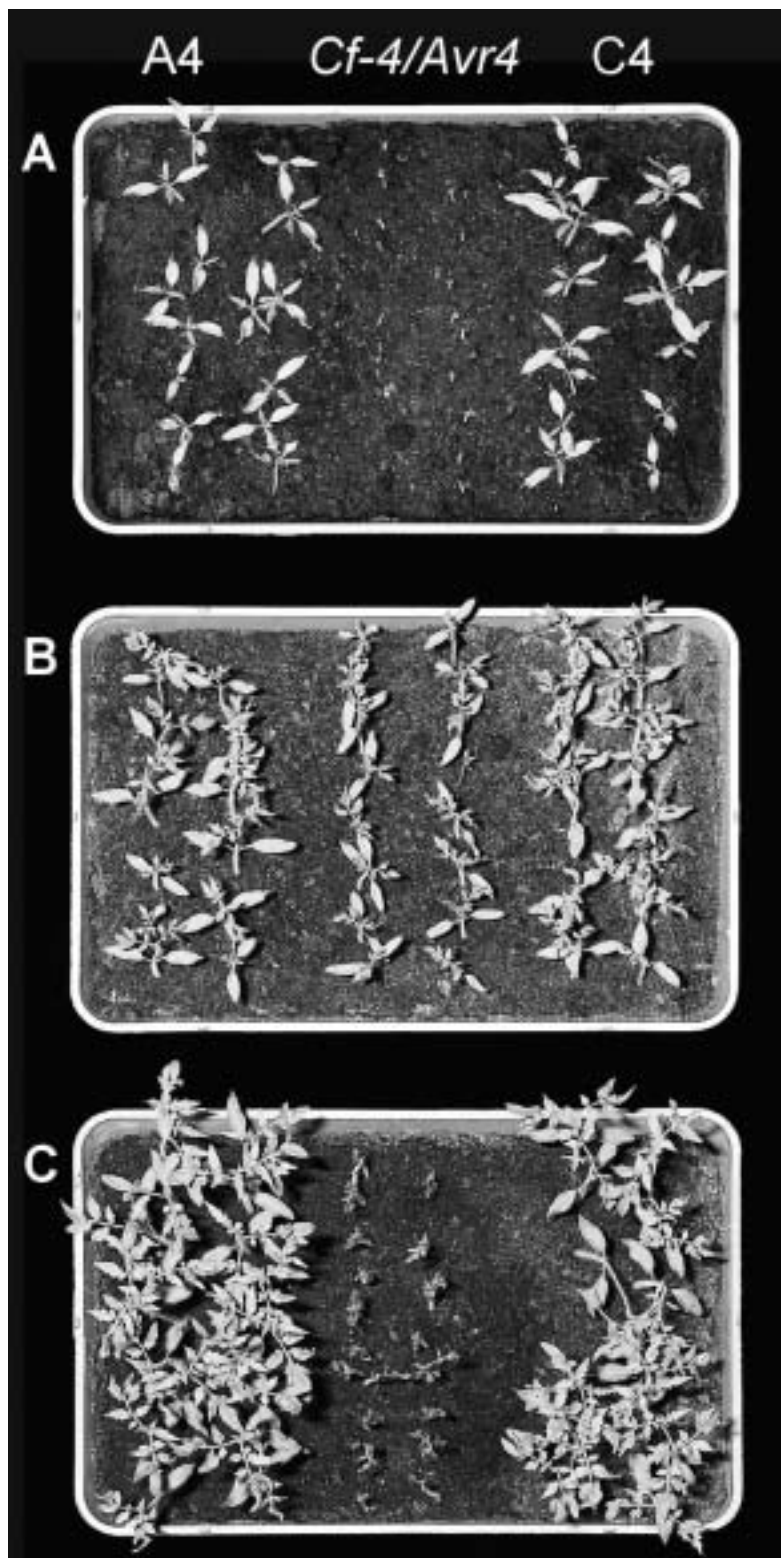
Voor deze genenparen zijn al veel pogingen gedaan om signaaloverdracht te bestuderen in celsuspensies van tomatenplanten, vaak zonder succes. Daarom is in dit

Figuur 2: De 'redding' bij 33°C van MoneyMaker Cf4 zaailingen die AVR4 tot expressie brengen. Zaden van MoneyMaker tomatenplanten zonder resistentie genen die AVR4 tot expressie brengen (Avr4⁺ MM-Cf0), MoneyMaker die het Cf-4 resistentie gen tot expressie brengt (MM-Cf4) en zaden afkomstig van een kruising tussen deze genotypen (Cf-4/Avr4) werden gezaaid onder standaard kasomstandigheden. Nadat de hypocotylen waren verschenen werden de zaailingen gedurende drie weken geïncubeerd bij 20°C of 33°C. Uiteindelijk werden zaailingen die bij 33°C geïncubeerd waren teruggeplaatst naar 20°C.

(A) Bij 20°C sterven Cf-4/Avr4 zaailingen binnen 1 week na het verschijnen van de hypocotylen terwijl de Avr4⁺ MM-Cf0 (A4) en MM-Cf4 (C4) zaailingen zich normaal ontwikkelen. De foto is 3 weken na zaaien genomen.

(B) Bij 33°C ontwikkelen alle zaailingen zich normaal, ook degenen die zowel Cf-4 als Avr4 tot expressie brengen. De foto is 4 weken na zaaien genomen.

(C) Na het terugplaatsen van de zaailingen van 33°C na 20°C ontwikkelen de Cf-4/Avr4 zaailingen een systemische overgevoelheidsreactie. Dit resulteert binnen drie dagen na terugplaatsen in de dood van deze plantjes. De foto is genomen drie dagen na het terugplaatsen van 33°C naar 20°C.



PROMOTIE

onderzoek gebruik gemaakt van celsuspensies afkomstig van transgene tabaksplanten, die getransformeerd werden met het Cf-4 of Cf-9 gen. In tegenstelling tot celsuspensies van tomaat, reageren deze celsuspensies van tabak specifiek op een behandeling met het corresponderende avirulentie-eiwit van *Cladosporium fulvum*.

Vroege afweerreacties geïnduceerd door het avirulentiegeen AVR9 in celsuspensies van tabak

We hebben de afweerreacties die geïnduceerd worden door het wildtype van AVR9 en enkele gemuteerde AVR9 eiwitten in Cf-9+-tabaksbladeren en Cf-9+-tabak celsuspensies bestudeerd. Injectie van gemuteerde AVR9 eiwitten in bladeren van zowel de tomaten cultivar MoneyMaker (MM)-Cf9 als Cf-9+-tabaksbladeren en celsuspensies liet zien dat deze eiwitten in vergelijking tot het wildtype een andere necrose-inducerende activiteit bezitten.

In vergelijking tot het wildtype vertoont een mutant (R08K) een sterker vermogen om de productie van zuurstofradicalen te induceren, terwijl twee andere mutanten (F10A en F21A) een lagere activiteit bezitten. Het wildtype en de mutant R08K verhogen de pH van het medium, terwijl behandeling met de mutant F10A de pH minder, en behandeling met F21A de pH helemaal niet verhoogt. Het is opmerkelijk dat de door de AVR9 eiwitten geïnduceerde productie van zuurstofradicalen al plaats vindt bij concentraties die honderd maal lager liggen dan concentraties die nodig zijn om de pH van het extracellulaire medium te verhogen.

AVR9 eiwitconcentraties die resulteren in een maximale pH-verhoging, zijn vergelijkbaar met concentraties die necrose induceren na injectie in bladeren van zowel de tomatenplant MM-Cf9 als Cf-9+-tabaksplanten.

De behandeling van Cf-9+-tabak celsuspensies met het wildtype resulteerde in de activering van een MAP kinase, terwijl de mutant F21A slechts een geringe activering van dit kinase induceerde. Het wildtype van Avr9 induceerde ook massale celdood 18 uur na toediening aan Cf-9+-tabakscelsuspensies. Tabakscellen die geen Cf-9 tot expressie brengen, bleven daarentegen leven na toediening van dezelfde concentratie AVR9, hetgeen de specificiteit van de inductie van deze afweerreactie aantoont.

Cf-4/Avr4-afhankelijke afweersignalen worden ondersteund door de signaalstof fosfatidylzuur (PA)

Wij hebben aangetoond dat zich na behandeling van Cf-4+-tabakscellen met AVR4 het fosfolipide fosfatidylzuur (PA) ophoopt.

Twee minuten na toediening van AVR4 begon zich de signaalstof fosfatidylzuur reeds op te hopen. Het omzettingproduct van fosfatidylzuur, diacylglycerol pyrofosfaat (DGPP), hoopte zich op vier tot acht minuten na toediening van AVR4. Het is nog niet duidelijk of DGPP zelf een signaalstof is, of dat het dient als een negatieve regulator van de fosfatidylzuur signalering.

Een differentiële labelingsstrategie toonde aan dat de signaalstof fosfatidylzuur voor het overgrote deel gegenereerd wordt via de omzetting van diacylglycerol (DAG) in

fosfatidylzuur door het enzym diacylglycerol kinase (DGK). In signaaltransductie processen kan DAG zelf weer gegenereerd worden via de hydrolyse van fosfatidylinositol 4,5 bisfosfaat (PIP2) door het enzym fosfolipase C (PLC).

Voorbehandeling van Cf-4+-tabakscellen met de fosfolipase remmers neomycine en U73122 blokkeerde de door AVR4-geïnduceerde ophoping van fosfatidylzuur. Dit gaf aan dat fosfatidylzuur inderdaad gegenereerd wordt via fosfolipase C.

De AVR4-geïnduceerde productie van zuurstofradicalen werd onderdrukt door de NADPH oxidase remmer diphenyleeniodonium chloride (DPI), terwijl deze remmer niet de door AVR4-geïnduceerde ophoping van fosfatidylzuur remde. Echter, beide AVR4-geïnduceerde responsen werden op een dosis-afhankelijke wijze onderdrukt door de fosfolipase C remmer U73122. Hieruit kan worden geconcludeerd dat activering van fosfolipase C en ophoping van fosfatidylzuur plaatsvinden vóórdat zuurstofradicalen worden geproduceerd.

Behandeling van de Cf-4+-tabakscellen met een wateroplosbaar, synthetisch fosfatidylzuuranaloog resulteerde in een acute, kleine, niet-aanhoudende productie van zuurstofradicalen.

Deze gegevens demonstreren het belang van de fosfolipide signalering in de AVR4-geïnduceerde productie van zuurstofradicalen. Additionele studies toonden aan dat ook AVR4-geïnduceerde verhoging van de pH van het extracellulaire medium en MAP kinase activering door fosfolipase C remmers onderdrukt worden. Dit suggereert dat ook deze processen afhankelijk zijn van fosfolipase C.

Onderdrukking van de door AVR9 geïnduceerde afweerreacties bij hoge temperaturen hangt samen met een afname van elicitor-binding sites

De temperatuurgevoeligheid van de *Cf/Avr*-afhankelijke afweerreacties is al eerder beschreven; Injectie van AVR4 of AVR9 in bladeren van tomaat of tabak, die respectievelijk *Cf-4* of *Cf-9* tot expressie brengen, resulteerde in necrose bij 20°C, terwijl bij 33°C deze reactie volledig onderdrukt werd.

Bij 20°C necrotiseerden tomatenzaailingen die zowel het *Cf* gen, als het corresponderende *Avr* gen tot expressie brengen spoedig na kieming als gevolg van een systemische overgevoeligheidsreactie. Deze zaailingen konden gered worden door ze na kieming te incuberen bij 33°C, maar ze stierven snel af als ze teruggezet werden naar 20°C.

Expressie-analyse van verschillende genen die betrokken zijn bij de afweerreactie, liet zien dat bij 33°C de expressie onderdrukt was, terwijl de expressie van deze genen weer snel en gesynchroniseerd op gang kwam na terugzetten van de zaailingen naar 20°C.

Deze gesynchroniseerde inductie van de overgevoeligheidsreactie vormt een uitstekende basis voor de identificatie van nieuwe genen

die betrokken zijn bij de afweerreactie. In celsuspensies ebde zowel de AVR4- als de AVR9-geïnduceerde pH verhoging van het extracellulaire medium langzaam weg na incubatie bij de hoge temperatuur, terwijl deze respons weer snel terugkeerde na terugzetten van de cellen naar 15°C.

Ook werden er verschillen in kinetiek tussen het verlies van AVR4- en AVR9-geïnduceerde pH verhoging waargenomen bij hoge temperaturen. Er is op het plasmamembraan van zowel tomaten- als tabakscellen een bindingsplaats voor AVR9 aanwezig, waarvan wordt gedacht dat deze de AVR9 receptor is, die betrokken is bij de inductie van *Cf-9/Avr9*-afhankelijke afweerreacties.

De hoeveelheid AVR9 die bindt aan microsomale fracties geïsoleerd uit tabakscellen en geïncubeerd bij 33°C, was 80% lager in vergelijking met fracties die stammen van tabakscellen die geïncubeerd werden bij 20°C. Deze afname van AVR9 binding bleek te worden veroorzaakt door een reductie van de hoeveelheid AVR9 bindingsplaatsen en niet door een afname van de affiniteit van de bindingsplaats voor AVR9 zelf. Dit gegeven vormt een moleculaire basis voor de temperatuurgevoeligheid van de *Cf-9/Avr9*-afhankelijke afweerreactie.

Conclusies

Tomatenplanten die een resistentiegen (*Cf*) tegen *Cladosporium*

fulvum tot expressie brengen, zijn volledig resistent. De producten van de resistentiegenen zoals *Cf-4* en *Cf-9* herkennen de door de schimmel uitgescheiden corresponderende producten van de avirulentiegenen *Avr4* en *Avr9*.

De herkenning resulteert in een overgevoeligheidsreactie, een plaatselijk afsterven van cellen rond de primaire infectiehaard (de HR respons).

Biochemische veranderingen die voorafgaan aan het uiteindelijke afsterven van de cellen, zijn de productie van zuurstofradicalen, influx van protonen en activering van MAP kinases.

De ophoping van de signaalstof fosfatidylzuur wordt al circa één minuut na herkenning van AVR4 veroorzaakt door het enzym fosfolipase C en behoorde tot de vroegste responsen ooit waargenomen. Deze ophoping bleek vereist voor latere processen zoals de productie van zuurstofradicalen.

Bij 33°C wordt de AVR geïnduceerde overgevoeligheidsreactie onderdrukt. Dit wordt hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt door de dramatische reductie in het aantal AVR bindingsplaatsen bij 33°C ten opzichte van 20°C. Van deze temperatuurgevoeligheid kan handig gebruik gemaakt worden om afweer gerelateerde genen te identificeren doordat hun expressie hiermee gesynchroniseerd kan worden. Op de methode en de daarmee geïdentificeerde sequenties is onlangs patent verleend aan Keygene en het Laboratorium voor Fytopathologie.

PROMOTIE