

De rol van heterotrimere G-eiwitten in de ontwikkeling en virulentie van *Phytophthora infestans*

Maita J.M. Latijnhouwers

Op 29 april 2003 promoveerde Maita J.M. Latijnhouwers aan de Wageningen Universiteit op het proefschrift getiteld 'The role of heterotrimeric G-proteins in development and virulence of *Phytophthora infestans*'. Promotor was Prof.dr.ir. P.J.G.M. de Wit en co-promotor Dr.ir. E. Govers, beiden werkzaam bij de leerstoelgroep Fytopathologie van Wageningen Universiteit. Het onderzoek werd mede gefinancierd door de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO), gebied Aard- en Levenswetenschappen (ALW).

Inleiding

In Europa en de Verenigde Staten verscheen de Aardappelziekte voor het eerst in het midden van de negentiende eeuw. Sindsdien is een mogelijke uitbraak van de ziekte elk jaar weer een grote zorg voor aardappeltelers. Bij koel en nat weer is het risico voor een uitbraak het grootst. Het is dan bijna onmogelijk infecties in de hand te houden. Veredelaars proberen al tientallen jaren resistente cultivars te ontwikkelen maar dat heeft tot nu toe nog niet de resistente aardappel opgeleverd die tevens een goede vorm, grootte en smaak heeft van de aardappel die we gewend zijn te eten zoals bijvoorbeeld het 'Bintje'. Nu is bestrijding van de Aardappelziekte geheel afhankelijk van fungiciden die op grote schaal gebruikt worden. Het overheidsbeleid wenst echter dat gewasbescherming zo min mogelijk afhankelijk is van bestrijdingsmiddelen.

De ziekteverwekker die de Aardappelziekte veroorzaakt heet *Phytophthora infestans* en hoort taxo-

nomisch bij de oömyceten. De oömyceten vormen een klasse van eukaryoten waaronder pathogenen van dieren, insecten en planten vallen, alsmede een groot aantal saprophyten. Oömyceten lijken uiterlijk op schimmels. Ze zijn echter taxonomisch niet verwant aan schimmels en hebben het vermogen om planten te infecteren onafhankelijk van de echte schimmels verworven. Morfologisch vertonen ze veel gelijkheid met schimmels doordat ze ook hyfen en een netwerk aan mycelium kunnen vormen.

Heterotrimere G-eiwitten zijn zeer algemeen voorkomende signaaltransductiecomponenten die een rol spelen bij het vertalen van extracellulaire signalen naar intracellulaire. Cellen hebben G-eiwitten nodig om adequaat te kunnen reageren op veranderingen in omstandigheden buiten de cel. Dieren, planten, schimmels en andere lagere eukaryoten bezitten allemaal heterotrimere G-eiwitten. Sommige plantenpathogene schimmels hebben G-eiwitten waarvan is aangetoond dat ze be-

trokken zijn bij belangrijke processen in de normale ontwikkeling. Voorbeelden van zulke processen zijn de sexuele en asexuele voortplanting, en het vormen van infectiestructuren. Bovendien zijn G-eiwitten vaak onmisbaar voor de virulentie van de schimmel. Om beter te begrijpen welke processen ten grondslag liggen aan de ontwikkeling en virulentie van *P. infestans*, proberen we de functie van geconserveerde signaaltransductieroutes te ontrafelen. De signaaltransductieroute die gebruik maakt van heterotrimere G-eiwitten was de eerste die in dit kader onderzocht werd.

Expressie van $G\alpha$ en $G\beta$ subunitgenen tijdens de levenscyclus

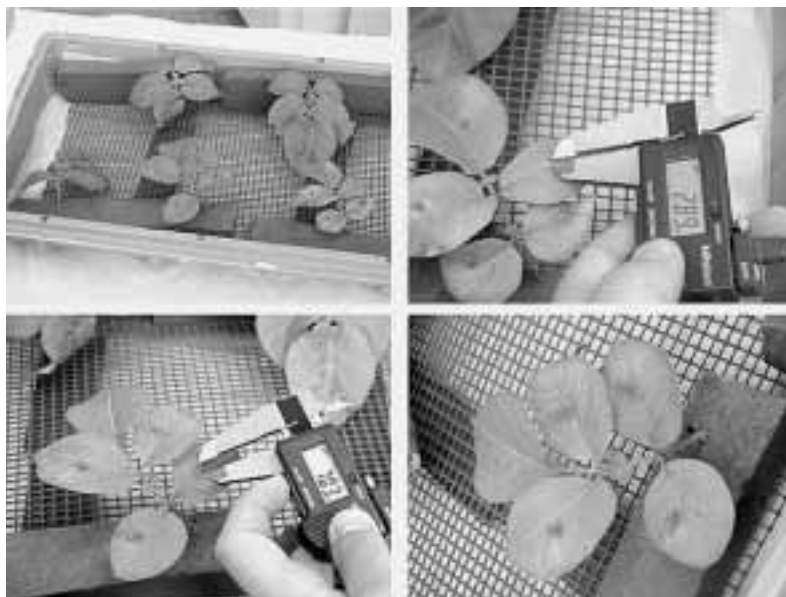
Heterotrimere G-eiwitten bestaan uit drie componenten, $G\alpha$, $G\beta$ en $G\gamma$. De aminozuurvolgorde van zowel $G\alpha$ als $G\beta$ is in hoge mate geconserveerd. Deze eigenschap hebben we gebruikt om de genen van *P. infestans* die coderen voor $G\alpha$ en $G\beta$ te isoleren. Met gedegegenerateerde oligonucleotiden die corresponderen met geconserveerde delen van $G\alpha$ werd door middel van de *polymerase chain reaction* (PCR) een fragment van een $G\alpha$ gen geamplificeerd. Het gen kreeg de naam *Pigpa1*. Een tweede gen

PROMOTIE

dat codeert voor $G\beta$, *Pigpb1*, werd geïsoleerd door gebruik te maken van een sequentie uit een gegevensbank van *expressed sequence tags* (ESTs), korte sequenties van complementair-DNA (cDNA) die gegenereerd zijn van messenger RNA (mRNA) uit mycelium. Deze sequentie was duidelijk zeer homolog aan genen uit andere organismen die coderen voor $G\alpha$'s. Het expressieniveau van *Pigpa1* en *Pigpb1* bleek afhankelijk te zijn van het ontwikkelingsstadium van *Pinfestans*. Beide genen komen hoog tot expressie in sporangia, de asexuele sporen van *Pinfestans*. In zoösporen en cysten zijn de expressieniveaus lager en *Pigpb1* komt slechts zeer laag tot expressie in mycelium. Van *Pigpa1* was geen mRNA detecteerbaar in mycelium.

De $G\alpha$ subunit bepaalt het zwemgedrag van zoösporen en is essentieel voor virulentie

Door extra kopieën van *Pigpa1* te introduceren in het genoom van *Pinfestans* bleek in enkele transformanten een mechanisme in werking te worden gesteld dat in het Engels 'gene silencing' heet. Door de *gene silencing* werd in deze transformanten het PiGPA1-eiwit niet meer gemaakt. In de transformanten waarin *Pigpa1* gesilenced was, vond de vorming van zoösporen in de sporangia minder efficiënt plaats dan in het wildtype. De zoösporen van het wildtype zwemmen normaal rechtuit en ze vormen aggregaten aan het vloeistofoppervlak. De zoösporen van de mutanten waarin *Pigpa1* gesilenced was veranderden veel frequenter van richting en ze zwommen niet naar het vloeistofoppervlak toe. Bovendien vormden ze geen aggregaten en vertoonden ze ook geen chemotaxis



Figuur 1 Infectie-essays op afgesneden aardappelbladeren om het virulentie fenotype van G -subunit mutanten van *P. infestans* te bepalen. Op 3, 4, 5 en 6 dagen na druppelinoculatie met zoösporen van mutante en wildtype *P. infestans* stammen werd de infectie-efficiëntie bepaald en de lesiegrootte gemeten.

in de richting van een gradient van aminozuren, hetgeen wel werd waargenomen bij zoösporen van het wildtype. Dit laat zien dat PiGPA1 betrokken is bij de regulatie van de bewegingen van de flagellen, bij de perceptie van externe signaalstoffen of bij beide. De mutanten vormden bovendien minder appressoria en de virulentie van de mutanten waarin *Pigpa1* gesilenced was, was ernstig aangetast (Figuur 1). Deze resultaten laten zien dat PiGPA1 belangrijk is voor de virulentie van *P. infestans*.

De $G\beta$ subunit is belangrijk voor sporulatie

Er werden ook transformanten gegenereerd waarin het *Pigpb1* gen niet langer tot expressie kwam, oftewel, waarin *Pigpb1* gesilenced was. Daarvoor werden twee verschillende methoden gebruikt. Bij de ene werden protoplasten geproduceerd en deze werden vervolgens getransformeerd. In de andere methode werden zoösporen

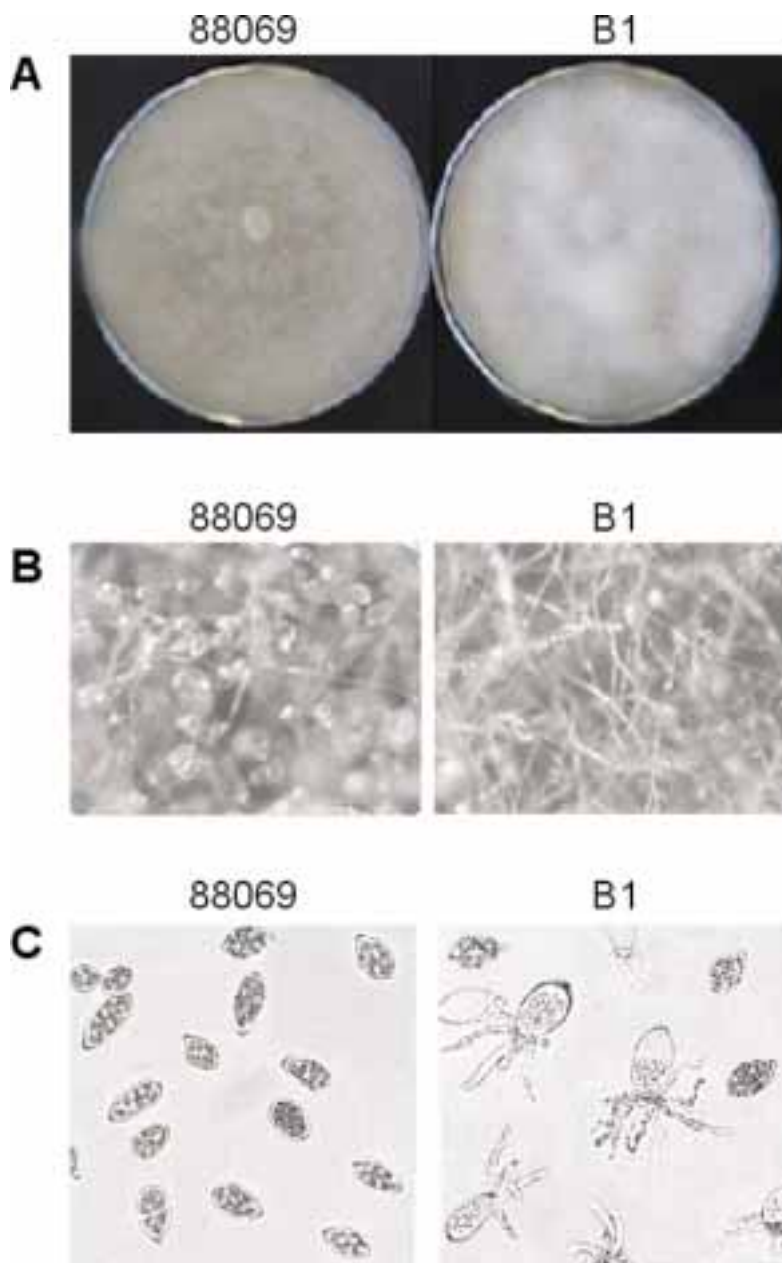
getransformeerd met behulp van electroporatie. De eerste methode gaf een veel hogere silencingfrequentie dan de tweede methode. De mutanten waarin *Pigpb1* gesilenced was, waren duidelijk te onderscheiden van het wildtype wanneer ze op rogge-suiker agar groeiden (Figuur 2). Ze vormden zeer weinig sporangia (minder dan 1% van het wildtype-niveau in transformanten waarin *Pigpb1* volledig gesilenced was) en ze produceerden meer en langere hyfen. Verder bleek dat de expressie van *Pigpb1* in mycelium toenam als onvoldoende voedingsstoffen aanwezig waren. Daarmee lijkt het PiGPB1-eiwit een belangrijke schakel te zijn tussen voedselgebrek/schaarste en sporulatie.

De $G\alpha$ subunit regelt expressie van andere genen

Wanneer G -eiwitten worden geactiveerd, wordt een signaaltransductiecascade aangeschakeld. Het signaal bereikt de celkern en dit

leidt uiteindelijk tot veranderingen in de expressie van bepaalde genen. Naar verwachting kan PiGPA1 na activatie genen ook weer uitschakelen. Met andere woorden, de activatie is vaak tijdelijk. Om genen die gereguleerd worden door de G α subunit op te sporen werd de genexpressie in sporangia van de mutanten waarin *Pigpa1* gesilenced was, en ook in het wildtype, in kaart gebracht. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een analysemethode die in het Engels 'cDNA amplified fragment length polymorphism (cDNA-AFLP)' genoemd wordt. Met deze techniek worden op grote schaal cDNA fragmenten geamplificeerd. Als interne controle werd ook genexpressie in mycelium van het wildtype in kaart gebracht. In totaal werden 77 geamplificeerde cDNA fragmenten opgespoord die aanwezig zijn in het wildtype maar afwezig waren in de mutanten waarin *Pigpa1* gesilenced was.

Anderzijds waren 11 van deze fragmenten wel aanwezig in de mutanten maar afwezig in het wildtype. Het zou kunnen dat deze fragmenten genen vertegenwoordigen die gereguleerd worden door PiGPA1. Een aantal van de fragmenten (27) werd daarom geklooneerd en hun sequentie werd bepaald. Het bleek dat een aantal van de sequenties ook aanwezig was in een of meer van de *Phytophthora* EST databanken en een enkeling tevens in de DNA sequentiedatabank van het National Center for Biotechnology Information (NCBI). De expressiepatronen van de genen die coderen voor deze fragmenten werden geverifieerd met behulp van reverse transcriptase (RT)-PCR en northern blot analysis. De fragmenten zullen in de toekomst worden gebruikt om genen te vinden die processen sturen die niet meer normaal functioneren in de mutanten waarin *Pigpa1* gesilenced is, zoals bijvoorbeeld het zwemgedrag van de zoösporen, het vormen van apressoria en virulentie.



Figuur 2 Het fenotype van mutanten die geen G β subunit maken. (A) Tijdens groei op rogge-suiker agar ziet het mycelium van mutant B1 er veel luchtiger uit, met meer en langere hyfen dan de wildtype stam 88069. (B) Bij 50x vergroting zijn in de wildtype stam 88069 duidelijk sporangia zichtbaar. Mutant B1 vormt nauwelijks sporangia. (C) De sporangia die nog wel door mutant B1 worden geproduceerd zijn veelal misvormd. Bij 200x vergroting is te zien dat er meerdere hyfedraden uit een sporangium te voorschijn komen en dat sommige sporangia leeg zijn. Dit wijkt sterk af van het fenotype van sporangia van wildtype stam 88069 (uit Latijnhouwers & Govers, 2003, *Euk. Cell* 2: in druk).

Fosfolipase D

G-eiwitten kunnen ook andere signaaltransductiecomponenten reguleren waaronder fosfolipases.

Daarom werd de activiteit van het enzym fosfolipase D (PLD) in *P. infestans* nader onderzocht. PLD katalyseert de hydrolyse van fosfolipiden, zoals fosfatidylcholine of fosfatidylserine. Dit zijn fosfolipiden die veel voorkomen in cel-

PROMOTIE

membranen. Fosfatidylzuur (PA) en de kopgroep van het betreffende fosfolipide zijn de producten van de activiteit van PLD. In dierlijke systemen en mogelijk ook in planten zijn PLD en PA betrokken bij het transport van vesikels in de cel. Daarnaast wordt PA in planten vaak omgezet tot diacylglycerolpyrofosfaat (DGPP). Waarschijnlijk is dat nodig om het PA signaal op tijd uit te doven. Door sporangia, zoösporen, cysten en mycelium van *P. infestans* met een peptide te behandelen dat G-eiwitten activeert, mastoparan geheten, namen de niveaus van PA and DGPP toe. Zulke toenames in PA en DGPP kunnen veroorzaakt worden door PLD activiteit, maar ook door fosfolipase C (PLC)-activiteit. Nader onderzoek toonde aan dat mastoparan in sporangia van *P. infestans* PLD activeert en niet PLC. Ook tijdens de vorming van cysten uit zoösporen werd activatie van PLD waargenomen. Bovendien bleken alle stoffen die PLD activeren ook de vorming van cysten te activeren. Hieruit concluderen we dat PLD waarschijnlijk betrokken is bij de cystevorming.

Infectiestrategieën van oömyceten en schimmels

De morfologie van schimmels en oömyceten vertoont, zoals gezegd, veel overeenkomsten: het vegeta-

tief mycelium bestaat uit hyfen die topgroei vertonen en waarop sporulatie plaatsvindt. De twee groepen zijn echter niet aan elkaar verwant: tijdens de evolutie hebben oömyceten zich als een geheel onafhankelijk groep van organismen ontwikkeld en sinds enkele jaren worden oömyceten niet meer ingedeeld in het schimmelijk maar bij de protoctisten. Toch hebben beide groepen het vermogen ontwikkeld om planten te infecteren maar, gezien hun taxonomisch positie, moeten hun infectiestrategieën zich ook onafhankelijk ontwikkeld hebben. Na een vergelijkend literatuuronderzoek concluderen we dat de infectiestrategieën van beide pathogenen meer overeenkomen dan aanvankelijk werd aangenomen. Er zijn duidelijke overeenkomsten tussen infectiestructuren, virulentiefactoren en signaaltransductieroutes van oömyceten en schimmels. Er zijn uiteraard ook verschillen. Zo zijn in schimmels bepaalde groepen van virulentiefactoren gerapporteerd die dusver nog niet zijn aangetroffen in oömyceten. We concluderen dan ook dat convergerende evolutie van groot belang is geweest bij de ontwikkeling van het vermogen om planten te infecteren in oömyceten en schimmels.

Tot slot

Dit onderzoek heeft voor het eerst aangetoond dat signaaltransductie

via G-eiwitten een belangrijke rol speelt in de sporulatie en virulentie van *P. infestans*. Daarmee lijkt dit onderzoek een ingang te bieden voor de ontwikkeling van nieuwe bestrijdingsmiddelen die specifiek aangrijpen op componenten in deze signaaltransductieroutes in oömyceten. Het onderzoek bij de leerstoelgroep Fytopathologie richt zich nu op het identificeren van stoffen die de G-eiwitten in *P. infestans* aanschakelen ('upstream') en het analyseren van genen die door de G-eiwitten gereguleerd worden ('downstream'). De uitdaging voor de toekomst is om op basis van deze kennis nieuwe bestrijdingsmethoden voor de Aardappelziekte te ontwikkelen.

Literatuur

- Latijnhouwers, M., Munnik, T. & Govers, F. 2002. Phospholipase D in *Phytophthora infestans* and its role in zoospores encystment. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 939-946.
- Latijnhouwers, M. & Govers, F. 2003. A *Phytophthora infestans* G-protein β subunit is involved in sporangia formation. *Eukaryotic Cell* **2**: in press.
- Latijnhouwers, M., de Wit, P.J.G.M & Govers, F. 2003. Oomycetes and fungi evolved similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology* **11**: in press.
- Latijnhouwers, M., Ligterink, W., Vleeshouwers, V.G.A.A., van West, P. & Govers F. 2003. A $G\alpha$ subunit controls zoospore motility and virulence in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. Submitted for publication.
- Laxalt, A.M., Latijnhouwers, M., van Hulst, M. & Govers, F. 2002 Differential expression of G protein α and β subunit genes during development of *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet. Biol.*, **36**: 137-146.