

Frank Niepold

Epigenetik – ein neuer Weg, Reaktionen pflanzenpathogener Pilze zu verstehen

Epigenetics – a new way to understand reactions of plant pathogenic fungi

29

Zusammenfassung

Fusarium sporotrichioides-Isolat 62423 aus der JKI-(Julius Kühn-Institut)-Stammsammlung wurde verschiedenen Umweltbedingungen ausgesetzt, was eine Veränderung des Phänotyps bewirkte. Die chromosomale DNA wurde mit den isoschizomeren Endonukleasen *MspI* und *HpaII* komplett im Palindrom CCGG verdaut, was je nach Methylierungsgrad der DNA unterschiedlich stark erfolgte und mittels PCR und Primern des Tri14-Gens nachweisbar war. So korrelierte die phänotypische Veränderung des Isolates 62423, die sich in Form von farblich unterschiedlichen Ringen auf Kartoffeldextrose-(PDA)-Agarplatten unter Blaulicht zeigte, mit einem veränderten DNA-Methylierungsgrad im Vergleich zum unter „normalen“ Tageslicht-Bedingungen gewachsenen Isolat, was mit der jeweiligen Restriktionsintensität und den amplifizierten PCR-Fragmenten sichtbar wurde.

Stichwörter: Epigenetik, *Fusarium sporotrichioides*, Restriktionsanalyse, Tri14-Gen, PCR

Abstract

Fusarium sporotrichioides isolate 62423 from the JKI-strain collection was incubated under different environmental conditions resulting in a change of its phenotype. The chromosomal DNA was allowed to be restricted completely by using the isoschizomere endonucleases *MspI*

and *HpaII* both recognizing the palindrome CCGG, however, occurring differently according to their degree of methylation. This could be shown by PCR amplification using primers of the Tri14 gene. The phenotypic change of isolate 62423 was manifested when growing on PDA by forming colored rings when dark blue light was applied. There was a correlation of the methylation intensity when the DNA of the fungus was compared with the same isolate incubated at normal daylight resulting in different amounts of amplified DNA.

Key words: Epigenetics, *Fusarium sporotrichioides*, restriction analysis, Tri14 gene, PCR

Einleitung

Der Wissenschaftszweig der Epigenetik untersucht, ob und wann Gene ein- oder ausgeschaltet sind. Dafür sorgen z.B. kleine chemische Schaltergruppen (Methylierungen) an der Erbsubstanz (Chromosom), die – ganz ähnlich wie bei einem Buch – ganze (genetische) Kapitel so verändern, dass sie nicht mehr (ab)lesbar sind, oder bei anderen Kapiteln die „Schriftgröße“ verändern, um diese zu betonen und somit neue Informationen (anderer Phänotyp) zu erzeugen. Man könnte also die Epigenetik als „übergeordnete Instanz“ des DNA-Codes bezeichnen, da sie entscheidet, welche Information in einer bestimmten Situation vom Organismus abgelesen und als Proteine synthetisiert wird. Ein drastisches Beispiel dazu

Institut

Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Braunschweig

Kontaktanschrift

PD Dr. Frank Niepold, Julius Kühn-Institut – Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Messeweg 11-12, 38104 Braunschweig, Germany, E-Mail: frank.niepold@jki.bund.de

Zur Veröffentlichung angenommen

2. November 2010

stellen bei den Insekten die Raupen bzw. Schmetterlinge dar, da in beiden Fällen zwar die DNA gleich ist, nur eben jeweils anders „abgelesen“ wird.

Mit der Epigenetik lassen sich Phänomene und Reaktionen bei Organismen erklären, die mit herkömmlichen DNA-Sequenzdaten nicht oder nur unzureichend erklärbar sind, da sich in vielen Fällen die Reihenfolge der Nukleotide an diesen Genabschnitten nicht oder nur unwesentlich unterscheidet.

Somit repräsentiert die Epigenetik eine Möglichkeit, den Einfluss von Faktoren wie Nahrungsangebot, Umwelt und Stress-Situationen auf DNA, RNA und Proteine zu verstehen. Auch scheint die Epigenetik ein bislang wenig berücksichtigter Aspekt von Pathogenitätsmechanismen bei Mikroorganismen zu sein, der vielleicht in Zukunft zu einem besseren Verständnis von Wirt-Parasit-Interaktionen (Patho-Epigenetik, MINAROVITS, J., National Centre of Epidemiology, Budapest, Ungarn; pers. Mitteilung) führen kann, weshalb auch dieser Artikel an dieser Stelle erscheint.

Die Epigenetik umfasst viele Prozesse, wobei diese Arbeit sich auf die Ebene der chromosomalen DNA beschränkt. Bei vielen Organismen werden vornehmlich die Cytosine enzymatisch mit einer Methylgruppe versehen. Dabei folgt meist unmittelbar auf das Cytosin ein Guanin (CpG). Ist die DNA an dieser Stelle methyliert, wird sie von einem Protein (methyl CpG binding protein, MeCP2) umhüllt und dadurch ein Ablesen der DNA-Information mittels Polymerasen verhindert. So steht die Methylierung in der Rangfolge über dem genetischen Code, da sie über Synthese oder Nicht-Synthese (Promotor unmethyliert oder methyliert) eines bestimmten Proteins entscheidet. Untersuchungen bei Eukaryonten zeigten, dass epigenetische DNA-Methylierungen wesentlich häufiger stattfinden als genetische Mutationen (SIEGFRIED und SIMON, 2010). Vereinfacht dargestellt könnte es wohl so sein, dass ein Organismus zunächst einmal mit der Methylierung einzelner Gene „ausprobiert“, wie er mit einer neuen Umweltsituation „fertig“ wird, bevor eine endgültige Änderung im genetischen Code vorgenommen wird. Dieser Mechanismus scheint bei den Eukaryonten ein relativ schneller Weg zu sein, sich auf geänderte Umweltbedingungen einzustellen, aber dennoch flexibel und somit reversibel aus Sicht des Mikroorganismus zu bleiben. Diese epigenetischen Veränderungen sind also relativ einfach wieder rückgängig zu machen, ohne dass gleich der genetische Code eines Organismus beeinflusst wird.

Bei der DNA-Methylierung findet also eine „repressive Modifikation“ statt, die ein „Silencing“ oder „Ausschalten“ von einem oder mehreren Genen zur Folge hat. Es gibt eine temporäre und permanente, dann irreversible Methylierung einzelner Gene, die epigenetische Prägung oder „epigenetisches Gedächtnis“ genannt wird und auch so von Generation zu Generation vererbbar ist (PETRONIS, 2010). Methylierungen wurden bislang zwar nicht in Hefe, aber in einigen Pilzen, wie beispielsweise *Neurospora crassa*, nachgewiesen (ALLIS et al., 2007). Dort werden epigenetische Mechanismen zur Regulierung von Genen verwendet. Neben Chromatin umgestaltenden und His-

ton modifizierenden Enzymen ist ein wesentlicher Mechanismus die Methylierung von CpG-Genabschnitten.

Eine einfache Art des Nachweises von DNA-Methylierungen im Erbgut eines Organismus ist eine Restriktionsanalyse. Dabei werden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, die als „Isoschizomere“ die gleiche Restriktionsschnittstelle erkennen, aber bei unterschiedlichem Methylierungsgrad auch unterschiedlich gut schneiden können. Ein solches Restriktionsendonukleasenpaar sind *MspI* und *HpaII*, die als Nukleotidfolge C↓CG↑G erkennen und erfolgreich bei Eukaryonten eingesetzt wurden (MCCLELLAND et al., 1994). Je nach Ort der Methylierungen an den beiden Cytosinen wird das Enzym *HpaII* beim Verdau der DNA an der C↓CG↑G-Schnittstelle gehemmt. Das Enzym *MspI* wird von der Methylierung nicht im Verdau beeinflusst und schneidet dort an dieser Restriktionsschnittstelle (C↓CG↑G), egal ob diese methyliert oder unmethyliert ist, und hat somit eine Art Kontrollfunktion. Die geschnittenen bzw. ungeschnittenen Fragmente lassen sich durch eine anschließende PCR nachweisen, wenn die DNA-Sequenz bekannt ist und so Primer dafür herstellbar sind. Wurde das chromosomale DNA-Fragment an dieser C↓CG↑G-Schnittstelle enzymatisch durchtrennt, lässt sich kein PCR-Fragment in der nachfolgenden PCR nachweisen, weil das Templat aus der chromosomalen DNA nicht mehr als vollständiger Strang vorliegt. Wird die DNA-Schnittstelle in Folge von Methylierungen vom Enzym *HpaII* nicht durchtrennt, bleibt das Templat vollständig erhalten, und es kann ein PCR-Fragment gebildet werden, das dann auf dem Agarosegel als ein in seiner Größe definiertes Fragment sichtbar ist.

Ergebnisse und Diskussion

Um Umwelteinflüsse auf ausgewählte pflanzenpathogene Pilze aus der JKI-Stammsammlung zu untersuchen, wurden verschiedene Temperaturen und Belichtungen durchgeführt. So führte schon rein optisch beim *Fusarium sporotrichioides*-Isolat 62423 eine Inkubation mit 12 h Blaulicht und 12 h Dunkelheit (450–380 nm) und Raumtemperatur zu einem unterschiedlich gefärbten Ringwachstum auf PDA-Nährboden (Abb. 1), was auch bei anderen pflanzenpathogenen Pilzen beobachtbar wurde (BLUHM et al., 2010). Als Kontrolle wurde das gleiche Isolat 62423 parallel bei Raumtemperatur und normalem Tag- und Nacht-Zyklus kultiviert (Abb. 2). Um eventuelle Änderungen im sekundären Stoffwechsel des Pilzes zu untersuchen, wurde als Beispiel das Tri14-Gen (Mykotoxin-Synthese-Gencluster, publizierte Sequenz aus der NCBI-Datenbank mit z.Z. variabler Funktion; ALEXANDER et al., 2009; DYER et al., 2005) gewählt. Dabei wurde der Methylierungsgrad des chromosomalen Tri14-DNA-Genabschnitts durch eine Restriktionsanalyse untersucht. Da es derartige Restriktionsuntersuchungen als Nachweis für Methylierungen von chromosomaler DNA bei pflanzenpathogenen Pilzen so noch nicht gab, wurde deshalb eine Restriktionsanalyse mit den beiden Enzymen *MspI* und *HpaII* durchgeführt, um den Methy-

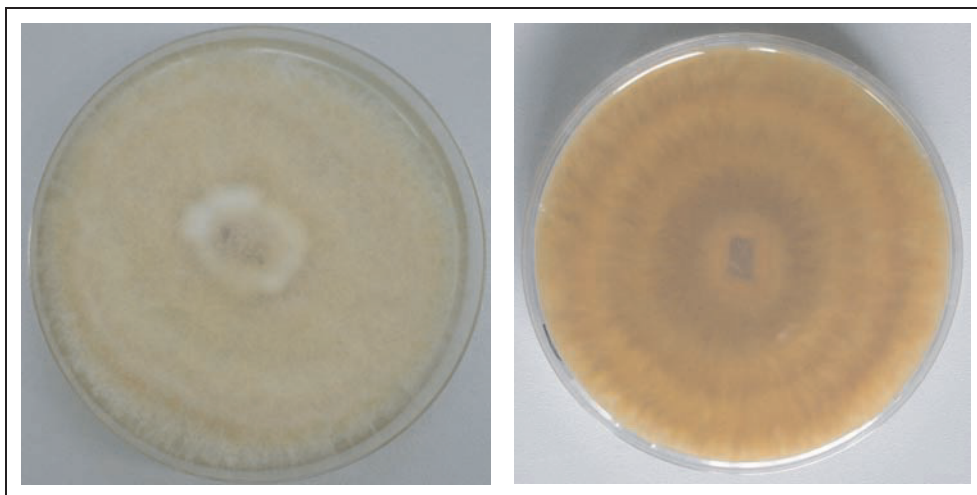


Abb. 1. Alternierendes, ringförmiges Wachstum von *Fusarium sporotrichioides*-Isolat 62423 unter Blaulicht (450–370 nm, 12 h hell/12 h dunkel) und bei gleichbleibender Temperatur (21°C). Die sichtbaren, farblich alternierenden Wachstumsringe werden abhängig vom verwendeten Nährboden (PDA) gebildet. Links: Oberseite, Rechts: Unterseite.

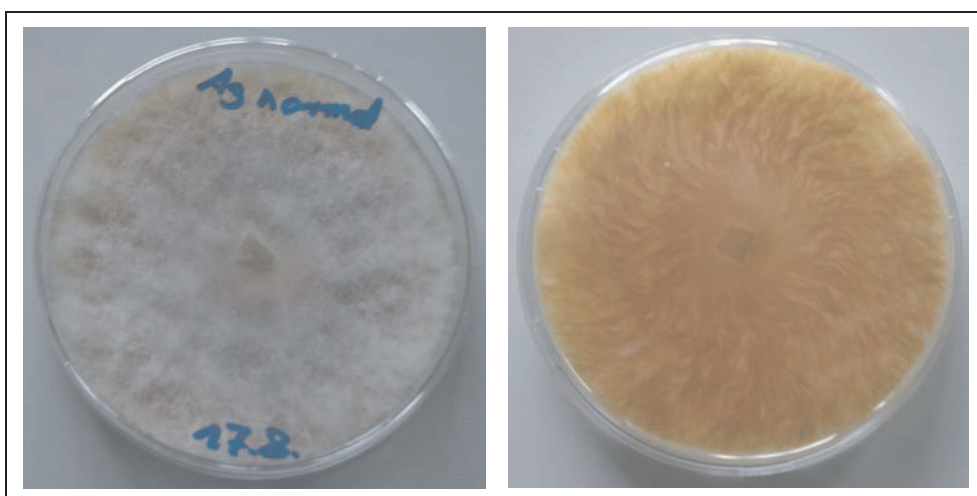


Abb. 2. Dasselbe Isolat, inkubiert auf PDA bei Tageslicht und Raumtemperatur. Unter diesen Bedingungen sind keine Wachstumsringe zu sehen. Links: Oberseite, Rechts: Unterseite.

lierungsgrad des Tri14 DNA-Genabschnittes zu untersuchen. Nach DNA-Extraktion (Qiagen-Kit) und anschließender Restriktionsanalyse wurden Tri14-spezifische Primer verwendet (forward primer: 5' gga gag ttc ttc ccg cta a 3' und reverse primer: 5' ttc gca gtc ttg aac tcg t 3'), die ein 621 bp großes DNA-Fragment amplifizierten (Abb. 3). Dabei wies das unter alternierendem Blaulicht gewachsene Isolat infolge der Methylierung keine Schnittstelle mit dem Enzym *HpaII* auf, weshalb das Fragment auch amplifiziert werden konnte (Abb. 3, C1). Beim gleichen Isolat, kultiviert unter normalen Tag- und Nacht-Zyklen und bei Raumtemperatur, war das Fragment weniger stark methyliert, weshalb auch wesentlich mehr DNA geschnitten wurde und deshalb das PCR-Signal infolge der wenigen ungeschnittenen (methylierten) Fragmente deutlich schwächer ist (Abb. 3, C2). Zur Kontrolle wurde die chromosomale DNA beider Versuchsansätze mit dem Enzym *MspI* geschnitten, das – unabhängig vom Methylierungsgrad – die Erkennungssequenz C↓CG↑G schneidet. Bei beiden chromosomalen DNA-Extraktionen war deshalb auch kein PCR-Fragment nachweisbar (Abb. 3, B1 und B2). Damit ließ sich zeigen, dass es mit Hilfe dieser epigenetischen Studien von

DNA-Fragmenten des Tri14-Gens möglich ist, unterschiedliche Phänotypen von ein- und demselben pilzlichen Genotyp innerhalb der JKI-Stammsammlung zu unterscheiden.

Eine konstant hohe Temperatur von 30°C bei normalem Tag- und Nacht-Zyklus induzierte beim gleichen Isolat 62423 die Ausbildung eines markant gelben Myzelrings. Bei normalen Temperaturen (20°C) wies das Myzel dann wieder die für dieses Isolat gewohnte Färbung auf (Abb. 4). Auch dieses Phänomen soll nun auf Veränderung im Methylierungsgrad untersucht werden.

Eine detailliertere Untersuchung von Methylierungen im Rahmen von epigenetischen Untersuchungen stellt die Bisulfit-Umwandlungsmethode (Natrium Meta-Bisulfit (Na₂S₂O₅), FROMMER et al., 1992) dar, bei der die unmethylierten Cytosine chemisch umgewandelt werden und beim anschließenden Sequenzieren nicht mehr als Cytosine auftauchen, sondern über mehrere Schritte als Thymin (C→→→Uracil→Thymin). Nur die methylierten Cytosine werden vom Bisulfit nicht angegriffen und bleiben nach der Bisulfit-Behandlung als Cytosine beim Sequenzieren erhalten. Mit dieser Methode lässt sich

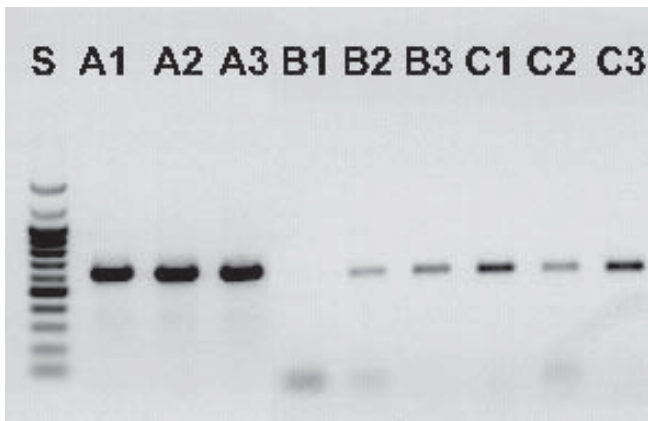


Abb. 3. Gel von *Fusarium sporotrichioides*-Isolat 62423 chromosomaler DNA, die zuvor mit den Restriktionsenzymen *Msp*II (B)/*Hpa*II (C) geschnitten wurde. Mit Tri14-spezifischen Primern ist ein 621 bp großes Fragment amplifizierbar. 1 repräsentiert das Isolat in Abb. 1 („Blaulich“) und 2 das Isolat in Abb. 2 („normal“). A1 und A2 sind ungeschnittene, amplifizierte Kontrollen. Das „Kontrollenzym“ *Msp*I schneidet am Palindrom CCGG bei beiden Isolaten (B1 und B2). Sichtbar sind Intensitätsunterschiede bei den Amplifikaten C1 und C2, weil *Hpa*II dort wegen der Methylierung unterschiedlich stark schneidet. Als DNA-Standard diente eine 100 bp Ladder.

dann im großen Stil ein möglicher Einfluss der Methylierung auf die Pathogenität bei *Fusarium*-Spezies bestimmen.

Ausblick

Welche Möglichkeiten bietet nun die Epigenetik für die Pflanzenpathologie? Die Regulation von Genen wird in Zukunft immer interessanter und wichtiger, da sie viele Reaktionen von Mikroorganismen mit Hilfe der Epigenetik erklären kann (PETRONIS, 2010). So wäre auch das Mitführen von Genen in Organismen – trotz des hohen Energieaufwandes der DNA-Synthese für den jeweiligen Organismus – erklärbar, die eigentlich keine ersichtliche Funktion mehr haben. So könnte beispielsweise eine Methylierung bei Avirulenzgenen stattgefunden haben, die somit nicht mehr in Aktion treten können, weil sie „ausgeschaltet“ sind. Dieser Methylierungsmechanismus wäre aber nur dann sinnvoll, wenn sich diese Avirulenzgene bei Vorhandensein einer anfälligen Sorte wieder gebrauchen ließen (Reprogramming). Vielleicht lassen sich aber auch anhand von Methylierungen Unterschiede bei Pilz-Pathotypen (Rassen) finden; denn es gibt zurzeit keine spezifischen Sequenzen auf der DNA-Ebene, mit denen sich Unterschiede aufzeigen lassen. Die vorgestellten Versuche sind als Einstieg in den vielseitigen Bereich der Epigenetik gedacht, um später andere Probleme des Pflanzenschutzes zu untersuchen.



Abb. 4. Abhängig von Umwelteinflüssen kann eine deutliche farbliche Veränderung (gelb) bei *Fusarium sporotrichioides*-Isolat 62423 stattfinden. Beim gelben Myzelring handelt es sich um eine reversible Färbung, die durch hohe Temperatur (30°C) ausgelöst wurde, und nicht um eine Verunreinigung, was durch PCR-Analysen nachgewiesen werden konnte.

Danksagung

Frau Sabine BONSE danke ich für ihre exzellente technische Assistenz.

Literatur

- ALEXANDER, N.J., R.H. PROCTOR, S.P. MCCORMICK, 2009: Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews* **28** (2-3), 198-215.
- ALLIS, C.D., T. JENUWEIN, D. REINBERG (Hrsg.), 2007: Epigenetics. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 502 S.
- BLUHM, B.H., A.M. BURNHAM, L.D. DUNKLE, 2010: A circadian rhythm regulating hyphal melanization in *Cercospora kikuchii*. *Mycologia* **102**, 1221-1228.
- DYER, R.B., R.D. PLATTNER, D.F. KENDRA, D.W. BROWN, 2005: *Fusarium graminearum* TRI14 is required for high virulence and DON production on wheat but not for DON synthesis *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 9281-9287.
- FROMMER, M., L.E. McDONALD, D.S. MILLAR, C.M. COLLINS, F. WATT, G.W. GRIGG, P.L. MOLLOY, C.L. PAUL, 1992: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **89**, 1827-1831.
- MCCLELLAND, M., M. NELSON, E. RASCHKE, 1994: Effect of site specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Research* **22**, 3640-3659.
- PETRONIS, A., 2010: Epigenetics as a unifying principle in the aetiology of complex traits and diseases. *Nature* **465**, 721-727.
- SIEGFRIED, Z., I. SIMON, 2010: DNA methylation and gene expression. *WIREs System Biology and Medicine*, Vol. 2, 362-371.