

University of Groningen

## Functions of hydrophobins in *schizophyllum commune*

Wetter, Marianne Marie-Anne van

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2000

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Wetter, M. M.-A. V. (2000). *Functions of hydrophobins in schizophyllum commune*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## SAMENVATTING

### *Levenscyclus Schizophyllum commune*

Filamenteuze schimmels (draadvormende schimmels) groeien in vochtige substraten, zoals hout, door aan de toppen van de hyfen (draden) te groeien en achter de toppen te vertakken. Dit resulteert in een netwerk van hyfen; het mycelium. Op een bepaald moment in de levenscyclus zal de schimmel hyfen vormen die het waterig substraat verlaten. Zo vormen veel schimmels luchtstructuren zoals luchthyfen en paddestoelen om de voortplanting mogelijk te maken, terwijl ziekteverwekkende schimmels vaak aan het waterafstotende oppervlak van een plant of dier moeten hechten voordat zij de gastheer binnen kunnen dringen. Om het waterige milieu te verlaten moeten de hyfen door de oppervlaktespanning van de waterfilm breken die hen omringt. De oppervlaktespanning van water is hoog en maakt het mogelijk dat sommige insecten over wateroppervlak kunnen lopen. Diezelfde oppervlaktespanning blijkt voor de schimmel een mechanische barrière te zijn.

Uit de sporen van de schimmel *Schizophyllum commune* (het waaiertje; familie van de gewone champignon) vormt zich aanvankelijk een mycelium bestaande uit hyfen met één kern in elk hyfecompartiment (cel) en wordt dan ook een monokaryon genoemd. Op het moment dat het mycelium voldoende voedsel heeft verzameld, worden er steriele luchthyfen gevormd. Wanneer twee monokaryotische mycelia (van verschillend kruisingstype) kruisen, wordt een dikaryon gevormd, welke twee kernen in elk hyfecompartiment bevat. Dit dikaryon kan zowel luchthyfen als paddestoelen vormen. In de paddestoelen worden sporen gevormd die vervolgens weer kunnen uitgroeien tot nieuwe monokaryotische mycelia.

### *Hydrofobines in Schizophyllum commune*

Hydrofobines zijn ontdekt als de producten van genen die hoog tot expressie komen tijdens de vorming van luchthyfen en paddestoelen in *S. commune*. Sindsdien zijn hydrofobine genen in vele andere schimmels geïdentificeerd en in verband gebracht met de vorming van verschillende luchtstructuren. *S. commune* bevat minimaal vier hydrofobine genen, *SC1*, *SC3*, *SC4* en *SC6*. Het *SC3* gen is actief in het monokaryon en het dikaryon tijdens de vorming van de luchthyfen, terwijl de andere drie hydrofobine genen alleen actief zijn in het dikaryon en geassocieerd zijn met de vorming van paddestoelen. Alleen de producten van het *SC3* gen en het *SC4* gen zijn gezuiverd en gekarakteriseerd. Deze eiwitten worden door de schimmel als monomeren (individuele moleculen) in het medium uitgescheiden. Op een waterminnend/waterafstotend grensvlak (bijvoorbeeld water/lucht) groeperen deze monomeren zich tot een monolaag welke aan de kant die naar het water gericht is waterminnend is en aan de kant die naar de lucht is gericht

waterafstotend is. Het SC3 eiwit uitgescheiden door luchthyfen van *S. commune* groepeerd zich tot een vergelijkbare monolaag op het waterminnende/waterafstotende grensvlak van de celwand en de lucht. De waterminnende kant van de eiwitlaag is naar de celwand gericht terwijl de waterafstotende kant (bestaande uit een staaftjesstructuur) geëxposeerd is aan de lucht. Luchthyfen worden dus waterafstotend, terwijl hyfen die over een waterafstotend oppervlak groeien zich vasthechten aan dit oppervlak. In een dikaryon werd het SC4 hydrofobine gelokaliseerd als een eiwitlaag die de luchtkanalen in de paddestoelen bekleedt. Hierdoor zouden de wanden van deze kanalen waterafstotend worden, wat van belang zou zijn voor de gasuitwisseling. Om de verschillende functies van SC3 en SC4 te verifiëren en verder uit te zoeken werden de genen die coderen voor deze eiwitten kapot gemaakt (gedisrupteerd) in zowel het monokaryon als het dikaryon van *S. commune* en werd het effect bestudeerd.

#### ***Functies van het SC3 hydrofobine in het monokaryon***

Een monokaryon met een kapot SC3 gen ( $\Delta SC3$  stam) bleek sterk geremd in de vorming van luchthyfen. De paar luchthyfen die gevormd werden waren waterminnend en miste dus de waterafstotende SC3 laag (Hoofdstuk 2). De  $\Delta SC3$  stam werd ook gebruikt om aan te tonen dat SC3 verantwoordelijk is voor de aanhechting van hyfen aan waterafstotende oppervlakken.

SC3 werd niet alleen op het oppervlak van luchthyfen gevonden, maar bleek ook in hoge concentraties in het medium te worden uitgescheiden. De functie van SC3 in het medium werd aanvankelijk niet begrepen, maar de ontdekking dat SC3, gegroepeerd op het water/lucht grensvlak, een erg krachtige oppervlakreactieve stof was (Hoofdstuk 3) bracht ons op het juiste spoor. Hierdoor vroegen we ons af of deze verlaging in de oppervlaktespanning ook optreedt in het medium van *S. commune*, en zo ja, of dit dan van belang is voor het ontsnappen van hyfen in de lucht. In jonge cultures van de wild-type *S. commune* stam bleef de oppervlaktespanning hoog, en werden geen luchthyfen gevormd. Op het moment dat SC3 gevormd werd werden luchthyfen gevormd en bleek de oppervlaktespanning aanzienlijk gedaald (van 72 tot 30  $\text{mJ m}^{-2}$ ). De oppervlaktespanning van het medium van een culture van de  $\Delta SC3$  stam werd maar maximaal verlaagd tot 45  $\text{mJ m}^{-2}$ , en er werden maar een paar luchthyfen gevormd. Gezien het feit dat in het wild-type de eerste luchthyfen bij 45  $\text{mJ m}^{-2}$  worden gevormd lijkt dit de kritieke oppervlaktespanning voor hyfen te zijn om uit het water te kunnen ontsnappen (Hoofdstuk 3). Toevoeging van gezuiverd SC3 eiwit aan het medium van de  $\Delta SC3$  stam resulteerde in verlaging van de oppervlaktespanning en vorming van luchthyfen vergelijkbaar met een wild-type stam. Echter, de luchthyfen die gevormd werden waren niet waterafstotend als die van een wild-type stam, maar waterminnend (Hoofdstuk 3). Blijkbaar kan SC3 in het medium de hyfen helpen het water/lucht grensvlak te doorbreken, maar kan het niet het SC3 vervangen dat uitgescheiden

wordt aan de top van de luchthyfen en deze hyfen bedekt met een waterafstotende laag. De rol van SC3 in de vorming van luchthyfen is dus een twee stappen proces: ten eerste maakt SC3 het ontsnappen van hyfen in de lucht mogelijk door de oppervlaktespanning te verlagen, en ten tweede vormt SC3 een waterafstotende laag op de luchthyfen die het eiwit uitscheiden. Als het verlagen van de oppervlaktespanning verantwoordelijk is voor het ontsnappen van hyfen uit hun waterige milieu, dan zouden andere oppervlakreactieve stoffen hetzelfde moeten kunnen bewerkstelligen. Inderdaad bleken het SC4 hydrofobine van *S. commune*, het ABH3 hydrofobine van *Agaricus bisporus* (de gewone champignon) en streptofactin (een oppervlakreactief peptide) van de filamenteuze bacterie *Streptomyces tendae*, SC3 te kunnen vervangen in de  $\Delta SC3$  stam (Hoofdstuk 3). Opvallend was ook dat SC3 instaat was om mutanten van de filamenteuze bacteriën *Streptomyces coelicolor* en *Streptomyces tendae* te kunnen complementeren. Deze mutanten kunnen geen luchthyfen meer vormen en zijn niet meer in staat de oppervlakreactieve peptiden, SapB en streptofactin, respectievelijk, te produceren. Toevoeging van SC3 aan het medium van deze mutante bacteriën resulteerde in de vorming van luchthyfen. Het lijkt er dus op dat filamenteuze schimmels en filamenteuze bacteriën vergelijkbare mechanismen gebruiken voor de vorming van luchthyfen. Dat wil zeggen; verlaging van de oppervlaktespanning door het uitscheiden van oppervlakreactieve moleculen, ook al zijn die van geheel verschillende aard (Hoofdstuk 3).

#### **Functies van de SC3 en SC4 hydrofobines in het dikaryon**

In tegenstelling tot een monokaryon, brengt een dikaryon van *S. commune* naast het SC3 hydrofobine ook de SC1, SC4 en SC6 hydrofobines tot expressie. Om de functie van deze eiwitten in het dikaryon te bepalen werden in een dikaryon van *S. commune* de SC3 en/of de SC4 hydrofobine genen kapot gemaakt (Hoofdstuk 4). Het SC3 hydrofobine bleek in het dikaryon een zelfde functie te hebben als in het monokaryon. Het verlaagt de oppervlaktespanning van het medium en zorgt ervoor dat de hyfen (bestemd om een luchthyfe of een paddestoelhyfe te worden) het water/lucht grensvlak kunnen doorbreken. Bovendien bedekt het de luchthyfen met een waterafstotende laag en hecht het de hyfen aan waterafstotende oppervlakken. Het SC4 hydrofobine aan de andere kant, bleek vooral een rol te spelen in de paddestoelen. De luchtkanalen in de paddestoelen van het  $\Delta SC4$  dikaryon liepen gemakkelijk vol met water, dit in tegenstelling tot luchtkanalen in wild-type paddestoelen. Dus, onder vochtige omstandigheden houdt SC4 de luchtkanalen open, wat de gas uitwisseling onder deze omstandigheden veilig stelt (Hoofdstuk 4). Het bedekken van luchtkanalen met een waterafstotende laag is waarschijnlijk zeer belangrijk voor lichenen (ook wel korstmossen genoemd). Een lichen is een symbiose tussen een schimmel en een alg en/of een cyanobacterie. Lichenen kunnen onder zeer extreme

omstandigheden groeien, in de bergen vind je ze bijvoorbeeld op grote hoogte op kale rotsen, blootgesteld aan extreme weersomstandigheden. Lichenen ondergaan herhaaldelijk cycli van uitdroging en bevochtiging. Tijdens deze cycli moeten de luchtkanalen, die de gasuitwisseling verzorgen, open blijven. In deze luchtkanalen werden inderdaad de typische staafjes gevormd door hydrofobines aangetroffen. In samenwerking met onderzoekers uit Zürich werd een hydrofobine gen van de schimmel partner gekarakteriseerd (Scherrer and Honegger, XPH1, A hydrophobin of the lichen-forming ascomycete *Xanthoria parietina*, self-assembles into a rodlet layer. Abstract of the Seventh International Fungal Biology Conference 1999, Groningen).

### ***Kunnen hydrofobines elkaars functies overnemen?***

Het feit dat SC3 en SC4 verschillende functies hebben in het dikaryon kan verklaard worden door hun verschillende expressiepatronen (zowel in de tijd als in de ruimte). SC3 wordt geproduceerd door de substraathyfen, de luchthyfen en de hyfen die de paddestoel bedekken en bereikt het hoogste niveau vlak voor de vorming van luchtstructuren. SC4 wordt ook geproduceerd door de substraathyfen maar dit resulteert alleen in lage hoeveelheden SC4 in het medium (Hoofdstuk 4). SC4 wordt in grote mate geproduceerd in het binnenste weefsel van de paddestoelen en bereikt een maximaal niveau tijdens de vorming van deze paddestoelen. Is het verschillende expressie patroon van SC3 en SC4 uitsluitend verantwoordelijk voor de verschillende functies die deze eiwitten hebben in het dikaryon, of zijn deze eiwitten ook speciaal gestructureerd om deze functies uit te kunnen voeren? Wanneer SC4 wordt toegevoegd aan het medium van de  $\Delta SC3$  stam, zorgt SC4 voor verlaging van de oppervlaktespanning waardoor luchthyfen gevormd kunnen worden (Hoofdstuk 3). In dit opzicht lijken SC3 en SC4 dus hetzelfde te functioneren. Om nu in meer detail op dit vraagstuk in te gaan, werd het SC4 gen tot expressie gebracht achter de SC3 promotor (de promotor bepaalt wanneer en waar een gen tot expressie komt) in het  $\Delta SC3$  monokaryon (Hoofdstuk 5). Transformanten die het SC4 gen tot expressie brachten vormden veel waterafstotende, met een staafjeslaag bedekte, luchthyfen vergelijkbaar met een wild-type stam. Echter, SC4 leek minder goed te hechten aan de celwand van de luchthyfen dan SC3. Dit zou kunnen verklaren waarom hyfen die SC4 tot expressie brengen ook minder goed hechten aan waterafstotende oppervlakken dan hyfen die SC3 tot expressie brengen. In de luchtkanalen van de paddestoelen, waar SC4 zich normaal bevindt, hecht de SC4 membraan wel goed. SC3 en SC4 bleken beide lectine-activiteit (binden aan suikers) te hebben, maar met een verschillende specificiteit (Hoofdstuk 5). Als wordt aangenomen dat er een verschil bestaat tussen de suikersamenstelling van de celwanden van de luchthyfen en de hyfen in de paddestoelen, zou de lectine activiteit van invloed kunnen zijn op de sterkte van de interactie van de hydrofobine laag met deze celwanden.

Het *SC1* hydrofobine van *S. commune* en het *ABH1* hydrofobine van *A. bisporus* werden ook tot expressie gebracht achter de *SC3* promoter in de  $\Delta SC3$  stam. De rol van het dikaryon-specifieke *SC1* hydrofobine is nog niet bekend, terwijl het *ABH1* hydrofobine zowel de luchtkanalen in de *A. bisporus* paddestoelen als de paddestoelen zelf bedekt. *SC1* en *ABH1* konden maar in zeer beperkte mate de rol van het *SC3* gen overnemen. Dit is niet verwonderlijk omdat, om de een of andere reden, de introductie van deze genen niet leidde tot goede vorming van de betreffende hydrofobines. Het *ABH1* hydrofobine bleek in het medium van de *S. commune* stam te worden afgebroken, terwijl van het *SC1* hydrofobine niet bekend is waarom het niet of nauwelijks geproduceerd werd. Hierdoor kunnen vooralsnog weinig conclusies getrokken worden over de specifieke eigenschappen van deze hydrofobines. Nader onderzoek zal hier meer duidelijkheid over moeten geven. Op grond van de resultaten verkregen met het *SC4* gen achter de *SC3* promoter lijkt het er dus op dat de verschillende hydrofobine genen binnen een soort niet overtollig zijn, maar geëvolueerd zijn om specifieke functies in de ontwikkeling van de schimmel uit te voeren. De effectiviteit van de verschillende hydrofobines zou bepaald kunnen worden door hun capaciteit te hechten aan één of beide zijden van het grensvlak waarop ze zich groeperen. In dit opzicht zou de verschillende lectine activiteit (binden aan suikers) van de hydrofobines van belang kunnen zijn.

#### ***Het effect van hydrofobines op de celwandsamenstelling***

*SC3* bleek niet alleen essentieel te zijn bij de vorming van luchtstructuren, maar bleek tevens een rol te spelen in de celwandsynthese. De celwand van filamenteuze schimmels behorend tot de basidiomyceten en ascomyceten bestaat hoofdzakelijk uit (1-3)/(1-6) $\beta$ -glucan en chitine. Deze polysacchariden (suikerketens) worden als individuele ketens aan de top van de hyfe in de celwand uitgescheiden waardoor een gehydrateerde celwand wordt gevormd die makkelijk te vervormen is. Echter, na hun uitscheiding in de wand ondergaan het glucan en het chitine structurele veranderingen. Ze reageren met elkaar waardoor een complex netwerk wordt gevormd. Hierdoor verhardt de celwand tot de wand van een buis die de inwendige druk kan weerstaan. Maar de groeiende top met plastisch wandmateriaal schuift vooruit en ontsnapt zo voortdurend aan de zone van uitharding. De celwand bevat ook (1-3) $\alpha$ -glucan en (1-3) $\beta$ -glucan waaraan enkele (1-6) $\beta$ -verbonden glucose moleculen zitten (een gel, ook wel schizophyllan genoemd). Het (1-3) $\alpha$ -glucan accumuleert aan de buitenkant van de celwand, terwijl het schizophyllan (de gel) zich vrij in het medium bevindt. Het schizophyllan kan zowel een voorloper als een afbraak product zijn van het glucan in de wand wat gebonden is aan chitine.

De celwandsamenstelling van een wild-type stam en een  $\Delta SC3$  stam bleek duidelijk te verschillen. De hoeveelheid schizophyllan was met een factor 4 tot 5 toegenomen in de  $\Delta SC3$

stam en dit leek ten koste te gaan van het glucan in de wand wat gekoppeld is aan het chitine. Het medium van de  $\Delta SC3$  stam was dan ook sterk gegeleerd, in tegenstelling tot het medium van een wild-type stam (Hoofdstuk 6). De hoeveelheden (1-3) $\alpha$ -glucan en chitine waren in beide stammen vergelijkbaar. Herintroductie van het *SC3* gen in de  $\Delta SC3$  stam herstelde de celwandsamenstelling, wat bewijst dat het effect in de  $\Delta SC3$  stam veroorzaakt wordt door de afwezigheid van *SC3*. Herstel van de celwandsamenstelling trad ook op wanneer andere hydrofobine genen (*ABH1* of *SC4*) tot expressie werden gebracht achter de *SC3* promotor in de  $\Delta SC3$  stam. Echter, toevoegen van gezuiverd *SC3* aan het medium van de  $\Delta SC3$  stam, of het kweken van de  $\Delta SC3$  stam in medium waar een wild-type stam in gekweekt was (en dus *SC3* bevat), had geen effect op de celwandsamenstelling (Hoofdstuk 6). Dus door het hydrofobine van buitenaf toe te voegen kan het blijkbaar niet de plaats bereiken waar het zijn werking moet verrichten. Hoe hydrofobines de celwandsamenstelling beïnvloeden is nog niet bekend, maar het lijkt er dus op dat ze hun functie uitoefenen in de celwand. *SC3* bleek alleen in kleine hoeveelheden in de celwand aanwezig te zijn, waardoor het eiwit geen structurele rol lijkt te spelen. Mogelijk hebben hydrofobines een enzymatische activiteit die betrokken is bij de koppeling van (1-3) $\beta$ -glucan aan chitine.