

Een halve eeuw genetica aan de Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen

Het Centrum voor Microbiële en Plantengenetica (CMPG), het vroegere F.A. Janssens Laboratorium voor Genetica, bestaat 50 jaar. Tijdens deze periode is het laboratorium binnen de K.U.Leuven uitgegroeid tot een centrum met meer dan 50 doctoraatsstudenten en postdocs, ondersteund door een technisch en administratief team van 15 medewerkers, en een academische staf van zes professoren. Het wetenschappelijk onderzoek binnen het CMPG spitst zich voornamelijk toe op onderzoek naar interacties tussen micro-organismen en hun gastheren. Leden van de academische staf verlenen ook een belangrijke bijdrage in de opleiding van onze toekomstige bio-ingenieurs en in verschillende derde cyclus programma's, waarbij hoorcolleges en practica verzorgd worden in de genetica, biochemie, biotechnologie en fytopathologie. Uitgebreide informatie hieromtrent kan gevonden worden op de website van het CMPG (www.cmpg.be).



Hoe is het CMPG ontstaan ?

In 1953 werd aan professor Joseph M. Heuts (1917-1996), gewoon hoogleraar aan de Leuvense universiteit, een nieuwe leerstoel genetica toevertrouwd. De doelstelling van deze opdracht was een onderzoeksgroep uit te bouwen ter ondersteuning van de genetische toepassingen in de veredelingslandbouw.

Daartoe richtte hij het F.A. Janssens Laboratorium voor Genetica op, zo genoemd als eerbetoon aan Frans Alfons Janssens (1863-1924), professor in de cytologie aan de toenmalige Universiteit de Louvain en ontdekker van de chiasmata, welke gevormd worden tijdens homologe recombinatie-processen bij de vorming van geslachtscellen (in profase meïocyten).

Tijdens de vijftiger en zestiger jaren werd het F.A. Janssens Laboratorium voor Genetica uitgebouwd tot een prominente onderzoeksgroep in de klassieke genetica, gespecialiseerd in de overerfbaarheid van kwantitatieve kenmerken en de studie van biologische evolutiemechanismen. Naast diverse hogere plant- en diersoorten maakte men vooral gebruik van het genetische model *Drosophila melanogaster*, het fruitvliegje.

In de jaren zeventig startte professor A. Van Gool er onderzoek in de microbiële genetica. Dit onderzoek spitste zich vooral toe op de moleculaire cytologie van bacteriële chromosomen en *Escherichia coli* celdelingsmutanten. Door

de komst van de *in vitro* recombinant DNA-technologie eind jaren zeventig werd meteen een link gelegd naar de moleculaire genetica en de bio-informatica.

Begin jaren tachtig werd onder impuls van professor J. Vanderleyden onderzoek gestart in de moleculaire genetica van *Agrobacterium tumefaciens* en naar het genetisch begrip van de communicatie tussen rhizobacteriën (*Rhizobium* en *Azospirillum*) en hun waardplanten. Tijdens het academiejaar 1983-1984, nu dus twintig jaar geleden, werden de eerste eindwerken in het domein van de recombinant DNA-technologie gemaakt. In de volgende jaren tekenden zich drie grote onderzoeksdomeinen af binnen het F.A. Janssens Laboratorium voor Genetica : biologische stikstoffixatie, kolonisatie van plantenwortels door bacteriën, en biocontrole van fungale plantpathogenen. Gedurende de jaren '90 breidden de onderzoeksdomeinen zich verder uit waarbij grote nadruk kwam te liggen op het ontrafelen van signaaltransductiewegen in bacteriën en planten. Nieuwe initiatieven in die zin, onder impuls van de professoren R. De Mot, W. Broekaert, J. Michiels en B. Cammue, bezorgden de onderzoeksgroep een verdere internationale uitstraling. De onderzoeksgroep barstte ondertussen zowat uit de haar toegewezen ruimte en in 1997 kon het F.A. Janssens Laboratorium voor Genetica verhuizen naar de vernieuwde vleugel van het hoofdgebouw van het Landbouwinstituut en kreeg zo een ruimere en aangepaste locatie. Als eerbetoon werd het auditorium in de nieuwe vleugel van het Landbouwinstituut genoemd naar prof. J. M. Heuts.



Door het toenemend aantal medewerkers en door de groter wordende specialisatie van onderzoeksdomeinen werd het laboratorium in 2000 gestructureerd in vijf onderzoeksgroepen : Plant Fungus Interacties (*Arabidopsis*), Symbiotische Interacties (rhizobia), Associatieve Interacties (azospirilla), Plantengroeibevorderende Rhizobacteriën en Biodegradatie (*Pseudomonas* en rhodococci) en Probiotica (lactobacilli versus *Salmonella*). Gezien de evolutie van het F.A. Janssens Laboratorium voor Genetica sinds zijn ontstaan, werd bij het begin van het nieuwe millennium bovendien beslist de naam te wijzigen in Centrum voor Microbiële en Plantengenetica (CMPG).

Globale onderzoeksthema's

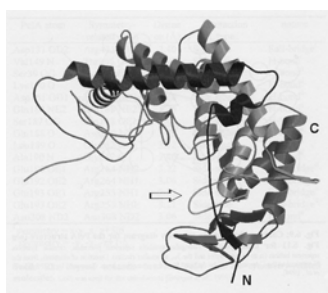
Startend vanuit de klassieke genetica, heeft het onderzoek aan het CMPG zich geleidelijk aan uitgebreid tot alle aspecten van de moleculaire biologie waarbij zowel bacteriën, gisten en schimmels, als planten en menselijke cellen worden bestudeerd. Moleculair-biologische analyses van een organisme kunnen opgedeeld worden in een aantal deelonderzoeken waarvan de resultaten samen een globaal antwoord moeten geven op het gestelde probleem.

Eerst wordt de structuur van de genomen van deze organismen ontleed op het erfelijk of DNA-niveau, zodat de genetische informatie die aanwezig is in een organisme kenbaar wordt ('structurele genomica'). Via de techniek van DNA-sequentie analyse wordt bijvoorbeeld de juiste opeenvolging van de vier basen van het DNA bepaald.



Na de structurele analyse volgt een meer uitgebreide functionele analyse van het genoom ('functionele genomica'). Hierbij wordt bijvoorbeeld de vorming van het boodschapper RNA (ook mRNA of 'messenger' RNA genoemd) uit de verschillende genen gevolgd, zodat informatie kan gewonnen worden over het moment waarop een gen 'actief' wordt. Dit wordt onderzocht door gebruik te maken van rapporteergenen of door microarrayanalyse ('transcriptomica'). Zo kon de expressie worden aangetoond van plantgroeihormoon-synthese- en kolonisatiegenen van *Azospirillum* en *Pseudomonas* bacteriën tijdens de interactie met de wortels van rijst en tarwe. Ook kon een globaal beeld bekomen worden van alle *Salmonella*-genen die actief werden bij een pH-schok, een conditie waaraan deze bacterie ook is blootgesteld bij doorgang doorheen de maag.

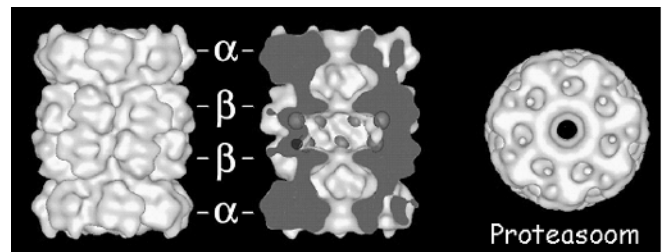
Uitgaande van deze mRNA moleculen worden ten slotte eiwitten, de eigenlijke werktuigen van de cel, gevormd. Vele van deze eiwitten zijn katalysatoren van biochemische reacties, andere zijn transporters van kleine moleculen of nog andere, de regulators, bepalen het moment waarop een gen actief wordt. Via performante scheidingstechnieken kunnen meer dan duizend verschillende eiwitten uit een cel, ook het proteoom genoemd, gelijktijdig bestudeerd worden



('proteomica'). Ten slotte kunnen ook gelijktijdig verschillende metabolieten in een cel worden geanalyseerd ('metabolomica'), hetgeen een aanwijzing geeft over de metabole toestand van een cel.

Het onderzoek volgt echter niet altijd deze werkwijze en kan ook omgekeerd verlopen. Het start dan met de studie van een bepaalde eigenschap of functie en eindigt met de structuur van een gen. Vaak is het dan ook noodzakelijk om een 'recombinant' organisme te construeren waarin bijvoorbeeld het te bestuderen gen geïnactiveerd ('knock-out') of juist geactiveerd werd.

Het hedendaagse moleculair biologisch onderzoek is niet meer in te denken zonder de hulp van krachtige computertoepassingen als ondersteuning van apparatuur of om grote hoeveelheden data correct te analyseren en te verwerken ('bioinformatica'). Het beheer van biologische databanken, het zoeken naar regulatormotieven in het DNA of het opstellen van 3D-modellen van eiwitten zijn slechts een paar voorbeelden van toepassingen van de bioinformatica.



Naast het onderzoeken van het 'zeer kleine', worden uiteindelijk de bekomen microorganismen, schimmels of planten met verbeterde eigenschappen ook getest in hun natuurlijke omgeving. Dit kan gebeuren in plantengroei-kamers met strikt gecontroleerde condities van lichtintensiteit, vochtigheid en temperatuur, of op grotere schaal in de serres of op het veld.



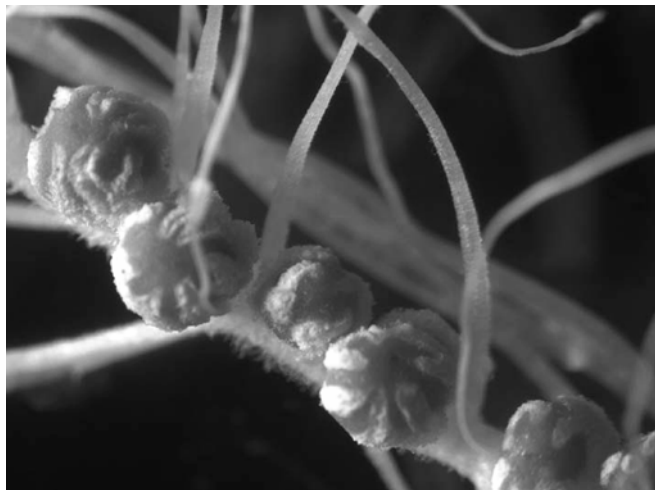
Om deze verschillende moleculen (DNA, RNA, eiwit, metabolieten, ...) in een cel te bestuderen beschikt het CMPG over infrastructuur en moderne apparatuur voor moleculair biologische analyses, zoals onder meer voor hoge-doorvoer-analyse van genomen en proteomen. Zo werd bijvoorbeeld recent geïnvesteerd in performante apparatuur voor twee-dimensionele scheiding, detectie en analyse van complexe eiwitmengsels. Tevens zijn krachtige microscopen en apparatuur beschikbaar voor microscopische analyse en scheiding van cellen gemerkt met een fluorescerend label, zoals bijvoorbeeld het groen fluorescerend proteïne. Dit laat toe om op een niet-destructieve manier de infectie van bacteriën in een plant en genactiviteiten in cellen te volgen.

Het onderzoek dat de laatste 20 jaar verricht is aan het CMPG heeft geleid tot het tot stand komen van meer dan 50 doctoraten en meer dan 300 publicaties in internationale wetenschappelijke tijdschriften.

Een greep uit het onderzoek

Hoe bacteriën met elkaar praten

Niettegenstaande atmosferische stikstof (N_2) ongeveer 80 % uitmaakt van de ons omgevende lucht, is deze vorm niet bruikbaar voor plant en dier. Luchtstikstof kan langs chemische weg omgezet worden tot een assimileerbare stikstofvorm, ammonium, maar dit proces vereist hoge druk en temperatuur. Bodembacteriën zoals *Rhizobium* zijn echter in staat om dit proces uit te voeren bij omgevingstemperatuur en -druk. Deze biologische stikstoffixatie vindt plaats tijdens een symbiose met een vlinderbloemige gastheerplant (in dit geval de boonplant), zodat de stikstofverbinding rechtstreeks ter beschikking wordt gesteld van de plant. Het gevormde ammonium kan door de plant gebruikt worden voor de aanmaak van onder meer aminozuren, de bouwstenen van de eiwitten, en nucleotiden, de bouwstenen van DNA en RNA. Om dit symbiotisch proces mogelijk te maken worden gespecialiseerde structuren ontwikkeld op de plantenwortel, ook wortelknolletjes genoemd.

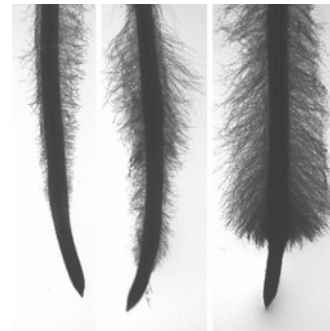


Binnen deze wortelknolletjes zitten de *Rhizobium* bacteriën dicht op elkaar gepakt in de plantencellen. Uit ons onderzoek is gebleken dat deze stikstoffixerende rhizobia met elkaar communiceren door gebruik te maken van kleine organische signaalmoleculen (acyl-homoserine lactonen, AHLs). De AHLs verschillen van elkaar door de lengte en aard van de vetzuurstaart (acyl deel). Deze moleculen diffunderen doorheen het celomhulsel van de producerende bacterie en worden waargenomen door bacteriën in de omgeving. Omdat de bacteriën zo dicht op elkaar gepakt zijn wordt de concentratie van de AHLs ook zeer hoog. Deze AHLs worden gedetecteerd door eiwitten aanwezig in de bacterie, hetgeen resulteert in het activeren van tientallen genen die belangrijk zijn voor stikstoffixatie. De bacteriën zijn op deze manier als het ware in staat om hun eigen aantal te bepalen ('quorum sensing') en indien een quorum wordt bereikt starten ze met stikstoffixatie. Het bevolken van de plantencel door de bacteriën en de stikstoffixatie zijn dus gekoppeld aan 'quorum sensing'. Buiten deze gunstige

bacterie-plant interactie, wordt dit systeem ook gebruikt door een aantal bacteriële pathogenen van plant of mens. Het is recent ook duidelijk geworden dat 'quorum sensing' de vorming van biofilmen controleert. Biofilmen zijn complexe, gestructureerde gemeenschappen van bacteriën die zich vormen op vaste substraten, en daarbij ook andere eigenschappen gaan vertonen zoals bijvoorbeeld een hogere resistentie tegen antibiotica. Het begrijpen van deze vorm van communicatie tussen bacteriën kent dus bijgevolg ook toepassingen buiten de landbouw, met name voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen.

Bacteriën en plantenvoeding

Met uitzondering van licht en CO_2 betrekken planten hun voedingsstoffen uit de bodem. De rol van plantenwortels in de voeding en gezondheid van planten kan bijgevolg moeilijk overschat worden. De metabole activiteit van plantenwortels wordt in belangrijke mate bepaald door de microorganismen die in de bodem aanwezig zijn. Dit wordt duidelijk geïllustreerd door bodembacteriën die plantengroei-regulatoren (zoals auxinen en cytokininen) produceren. Hier openen zich mogelijkheden om de wortelactiviteit, via microbiële inoculatie, te sturen in functie van omgevingsfactoren (droogte, lage nutriëntstatus van de bodem, aanwezigheid van toxische stoffen). De

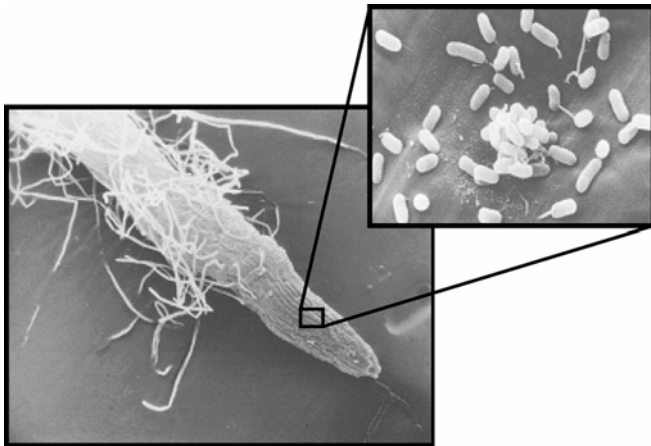


auxinesynthese van een bepaalde bodembacterie, *Azospirillum*, kan de wortelmorfologie en wortelactiviteit dermate beïnvloeden dat bodemnutriënten efficiënt kunnen opgenomen worden door planten. Aan het CMPG worden strategieën ontwikkeld om, via *Azospirillum* inoculatie, de kringloop van nutriënten in de bodem op een meer duurzame manier te laten verlopen, waarbij de nefaste nevenwerkingen van chemische bemesting op het milieu kunnen teruggedrongen worden.

Ondergrondse oorlogsvoering met chemische en biologische wapens

Planten nemen niet alleen voedingsstoffen op uit de bodem, zij scheiden via hun wortels ook aanzienlijke hoeveelheden organische stoffen af. Door de aanwezigheid van deze 'exudaten' is de nabije wortelomgeving (rhizosfeer) een zeer aantrekkelijke niche voor velerlei microorganismen. Om de rhizosfeer te veroveren en blijvend te kunnen koloniseren maken bacteriën zoals *Pseudomonas* gebruik van diverse strategieën om hun tegenstanders uit te schakelen. Zo kan de groei van schimmels onderdrukt worden door hen te beletten om het noodzakelijke element ijzer op te nemen. Een andere strategie bestaat er in chemische stoffen (secundaire metabolieten) af te scheiden die schadelijk zijn voor deze

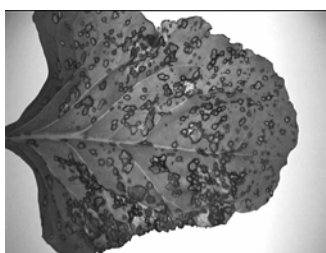
schimmels. Hier kan in de landbouw gebruik van gemaakt worden om planten te beschermen tegen fytopathogene schimmels (biocontrole) door inoculatie met dergelijke 'beneficiaire' bacteriën. Naast de hogervermelde David-Goliath strijd tegen de veel grotere schimmels nemen



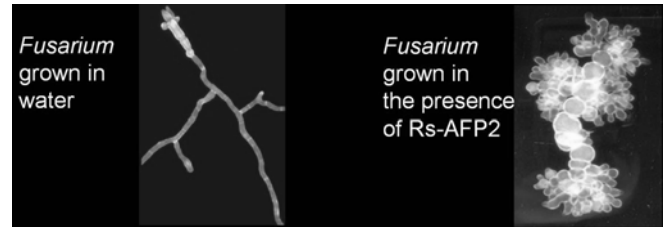
Pseudomonas bacteriën ook de wapens op tegen soortgenoten die uit zijn op de nutriënten in de rhizosfeer. Indringers kunnen gedood worden door het uitscheiden van toxische eiwitten (bacteriocinen) die de cel van de tegenstander binnendringen, terwijl de producerende bacterie zelf immuun is voor deze toxinen. In het CMPG werd een nieuw type van bacteriocine ontdekt dat, merkwaardig genoeg, sterke overeenkomsten vertoont met bepaalde lectinen (suikerbindende eiwitten) die voorkomen in hogere organismen (planten, vissen) maar waarvoor nog geen fysiologische functie werd aangetoond. Een interessante eigenschap van deze nieuwsoortige bacteriocinen is hun activiteit tegen een aantal fytopathogene bacteriën.

Planten en dieren gebruiken gelijkaardige componenten in hun afweer tegen ziekten

Net als alle levende organismen worden planten continu belaagd door verschillende soorten van pathogenen. Als sedentaire organismen kunnen planten zich echter niet verplaatsen om deze ongunstige omstandigheden te ontlopen. Daarom hebben zij een complex afweersysteem opgebouwd bestaande uit fysische barrières en antimicrobiële componenten. Ons onderzoek heeft zich vooral toegespitst op deze laatste. Meer specifiek ontdekten en karakteriseerden we de zogenaamde "plantdefensinen", kleine basische eiwitten met schimmelwerende activiteit die voorkomen in diverse plantensoorten. Deze plantdefensinen



blijken o.a. aanwezig te zijn in zaden, waaruit zij vrijkomen tijdens de kieming om aldus de jonge zaailing te beschermen



tegen bodemschimmels. Daarnaast hebben we aangetoond dat, na infectie, plantdefensinen ook geïnduceerd worden in de andere delen van de plant. Door overexpressie van deze plantdefensinen in transgene gewassen zijn we erin geslaagd deze planten meer resistent te maken tegen bepaalde schimmelziekten. Naast hun rol in de plant hebben we ons ook toegespitst op het ontrafelen van het precieze werkingsmechanisme van hun antischimmel-activiteit. Hieruit bleek dat verschillende types van plantdefensinen binden op verschillende componenten in de schimmelmembraan en deze destabiliseren. Structureel vergelijkbare defensinen blijken ook voor te komen in insecten en zoogdieren (waaronder de mens), waar zij ook worden aangemaakt als reactie op infecties. Bovendien binden bepaalde plantdefensinen en schimmelwerende defensinen uit insecten op dezelfde componenten uit de schimmelmembraan. Vanuit evolutief standpunt is het dus opmerkelijk dat zowel planten als dieren niet alleen vergelijkbare wapens (defensinen) hanteren, maar deze ook richten op dezelfde doelwitten in pathogenen. Met dit onderzoek omtrent plantdefensinen richten we ons naar toepassingen in zowel de agrarische sector (ontwikkeling van resistente gewassen en nieuwe fungiciden) als in de medische sector (ontwikkeling van nieuwe antimycotica).

Bacteriën en gezondheid van mens en dier

In de darm van elke persoon nestelen zich zowat 10^{14} bacteriën (ongeveer 1 kg). Een evenwichtige samenstelling van deze darmbiota is cruciaal voor de gezondheid. Deze oude wijsheid is voor vele bedrijven een inspiratiebron geweest om gefermenteerde voedingsproducten die grote aantallen levende melkzuurbacteriën bevatten, op de markt te introduceren, en met succes (de zogenaamde "functional foods"). Vanuit academisch oogpunt is de darm een gedroomd systeem om microbiële ecologie te bestuderen, en sinds de ontdekking dat *Helicobacter pylori* betrokken is bij het ontstaan van darmkanker, heeft de medische wereld een sterke interesse ontwikkeld in de gastrointestinale microbiologie. In het CMPG is een onderzoeksgroep actief die de communicatie tussen respectievelijk lactobacilli, *Salmonella* en darmepitheelcellen probeert te doorgronden, vanuit de hypothese dat hier nieuwe strategieën kunnen ontwikkeld worden om darminfecties te voorkomen of te behandelen, in een tijd dat gebruik van antibiotica onder druk komt te staan. Dit systeem wordt ook aangegrepen om krachtige technologische ontwikkelingen, zoals hoge doorvoeranalyses, functionele genomics en bioinformatica tenvolte te integreren in de onderzoeksactiviteiten van het CMPG en te laten doorstromen in de opleiding van bio-ingenieurs.