

Verteringsenzymen van insecten als doel voor plantaardige afweerstoffen

De verteringsenzymen (proteases) van insecten zijn een doel waarop planten hun afweer richten. Die afweer bestaat uit het produceren van proteaseremmers, die de proteases in de insectendarm blokkeren. Deze manier van bescherming kan ook via genetische modificatie in planten ingebouwd worden om plagen te bestrijden. Een aantal polyfage insecten, zoals bijvoorbeeld *Helicoverpa*, lijkt echter geen last te hebben van proteaseremmers. Deze polyfagen zijn van nature gewend om veel verschillende proteaseremmers tegen te komen. Zij hebben een protease dat ongevoelig is voor een groot aantal verschillende proteaseremmers. Proteaseremmers blijken wel inzetbaar te zijn tegen een aantal gespecialiseerde insecten en tegen insecten die contact met proteaseremmers mijden. Toepassing in de landbouwpraktijk is dan ook dichtbij.

Entomologische Berichten 63(6): 138-142

Trefwoorden: plaaginsecten, proteaseremmers, proteases, GMO, adaptatie

Inleiding

Dagelijks hebben mensen te maken met afweer van planten. Ongekookte aardappels bijvoorbeeld kunnen wij niet eten omdat we daar buikpijn en diarree van krijgen. Dat komt doordat die aardappel proteaseremmers bevat die onze eiwitverteringsenzymen, de proteases, blokkeren. Door de aardappels te koken of te frituren verliezen de proteaseremmers hun werking. Insecten gebruiken vergelijkbare verteringsenzymen, maar hebben andere manieren gevonden om 'onverteerbare' plantendelen toch te eten.

Plantaardig eiwit: een belangrijke voedselbron

Planten hebben vaak opslagorganen waarin veel voedingsstoffen liggen te wachten tot de plant ze nodig heeft. Vruchten, zaden, knollen: alle zitten ze vol eiwitten, olie en zetmeel. De plant bewaart deze voorraad voor momenten van plotselinge groei, bijvoorbeeld als zaden kiemen of knollen uitlopen. Voor veel insecten zijn deze voorraden hun dagelijks voedsel. Net als de mens hebben ze plantaardig eiwit nodig om in hun essentiële aminozuren te voorzien. Landbouwgewassen die op grote schaal verbouwd worden voeden op die manier ook grote populaties insecten, die soms uitgroeien tot een plaag.

Jules Beekwilder

Plant Research International
Postbus 16
6700 AA Wageningen
jules.beekwilder@wur.nl

Wat doet een plant om zijn eiwitvoorraden te beschermen?

Het spreekt vanzelf dat de plant zijn voedselvoorraden in de meeste gevallen bedoeld heeft voor eigen gebruik. Daarom worden ze ook goed beschermd. Naast het produceren van gifstoffen (fyto-alexines, nicotine, blauwzuur) is een van de belangrijkste maatregelen de productie van stoffen die de vertering van eiwit blokkeren. Deze proteaseremmers remmen de werking van eiwitafbrekende enzymen (proteases, bijvoorbeeld trypsine) die in de darmen eiwit afbreken tot vrije aminozuren. Die vrije aminozuren worden opgenomen in het bloed en door het lichaam gebruikt voor het maken van bijvoorbeeld spiereiwitten. Een proteaseremmer belemmert dus de aanvoer van bouwstoffen.

Proteaseremmers worden op tamelijk grote schaal gebruikt door de plant. In de aardappel is ongeveer 20% van het opgeslagen eiwit een proteaseremmer. In sommige groene tomaten kan dat oplopen tot 50%. Hier vormt de bescherming dus zelf een eiwitvoorraad. Bij de meeste vruchten worden de proteaseremmers afgebroken als de vrucht rijpt: als het zaad klaar is kan de tomaat worden opgegeten opdat het zaad verspreid wordt.

In bladeren zitten doorgaans weinig proteaseremmers, maar als het blad aangevreten wordt gaat de plant proteaseremmers aanmaken. Dit duidt er nog eens op dat deze stoffen een beschermende rol hebben. Omdat de aanmaak van proteaseremmers in bladeren enige tijd kost, heeft dit

als afweer alleen zin tegen kleinere organismen, die niet binnen een paar minuten een gehele plant verorberen. Dan gaat het dus vooral om insecten, maar ook om slakken, schimmels, bacteriën en virussen.

Proteaseremmers zijn tot in detail bekend

Omdat proteaseremmers makkelijk in grote hoeveelheden uit planten te winnen zijn is veel onderzoek gedaan naar de moleculaire structuur en de moleculaire werking. De structuur van een aantal remmers is via Röntgen-diffractie van gekristalliseerd eiwit bestudeerd, en de ligging van alle atomen van zo'n eiwit is daarmee bekend geworden. Figuur 1 geeft een aardappelproteaseremmer op twee manieren weer. De eerste weergave (a) toont het oppervlak van dit eiwit, de tweede weergave (b) toont hoe de eiwitstreng opgevouwen is om dit oppervlak te vormen. Deze gegevens zijn af te leiden uit het diffractiepatroon van het kristal, samen met de aminozuurvolgorde van de streng. Door dergelijke plaatjes te maken van complexen van een proteaseremmer met een enzym (figuur 1c) kunnen we begrijpen hoe de remmer werkt.

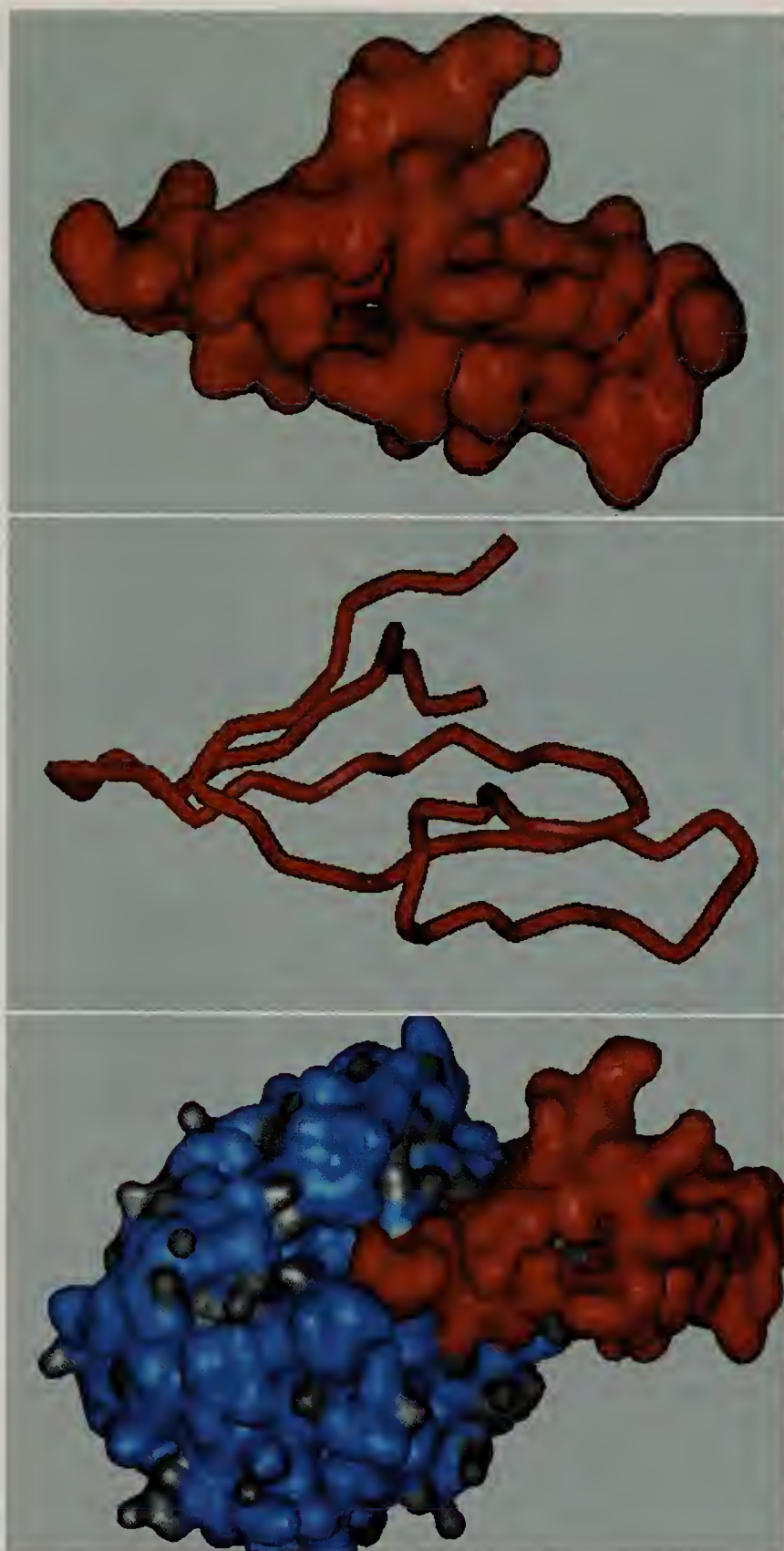
De werking van proteaseremmers komt neer op een simpele blokkade van het actieve gebied van het enzym (Bode & Huber 2000). De meeste proteaseremmers uit planten hebben een eiwitlus op hun oppervlak, die door het protease herkend wordt. Deze lus wordt door het protease gepakt en in stukken geknipt. Dan blijkt dat een deel van het oppervlak van de rest van de proteaseremmer erg goed op het oppervlak van het enzym past en stevig op zijn plaats gehouden wordt door de rest van de proteaseremmer. Hoewel de lus vaak wel geknipt wordt zal de rest van het molecuul niet meer van het verteringsenzym loslaten. Er is als het ware een kurk in het enzym gepropt waardoor het geen ander eiwit meer kan verteren.

Kan zo'n remmer nu alle proteases van planteneters remmen? De voorwaarden voor het binden van een protease lijken nogal streng, maar in de praktijk valt het erg mee: de meeste enzymen die echt op het afbreken van eiwitten in aminozuren gericht zijn moeten allerhande eiwitten aankunnen en staan dus open voor veel verschillende eiwitlussen. Dergelijke 'algemene' proteases kunnen ook geremd worden door 'algemene' remmers.

Wat doen wij om de eiwitvoorraden van onze planten te beschermen tegen insecten?

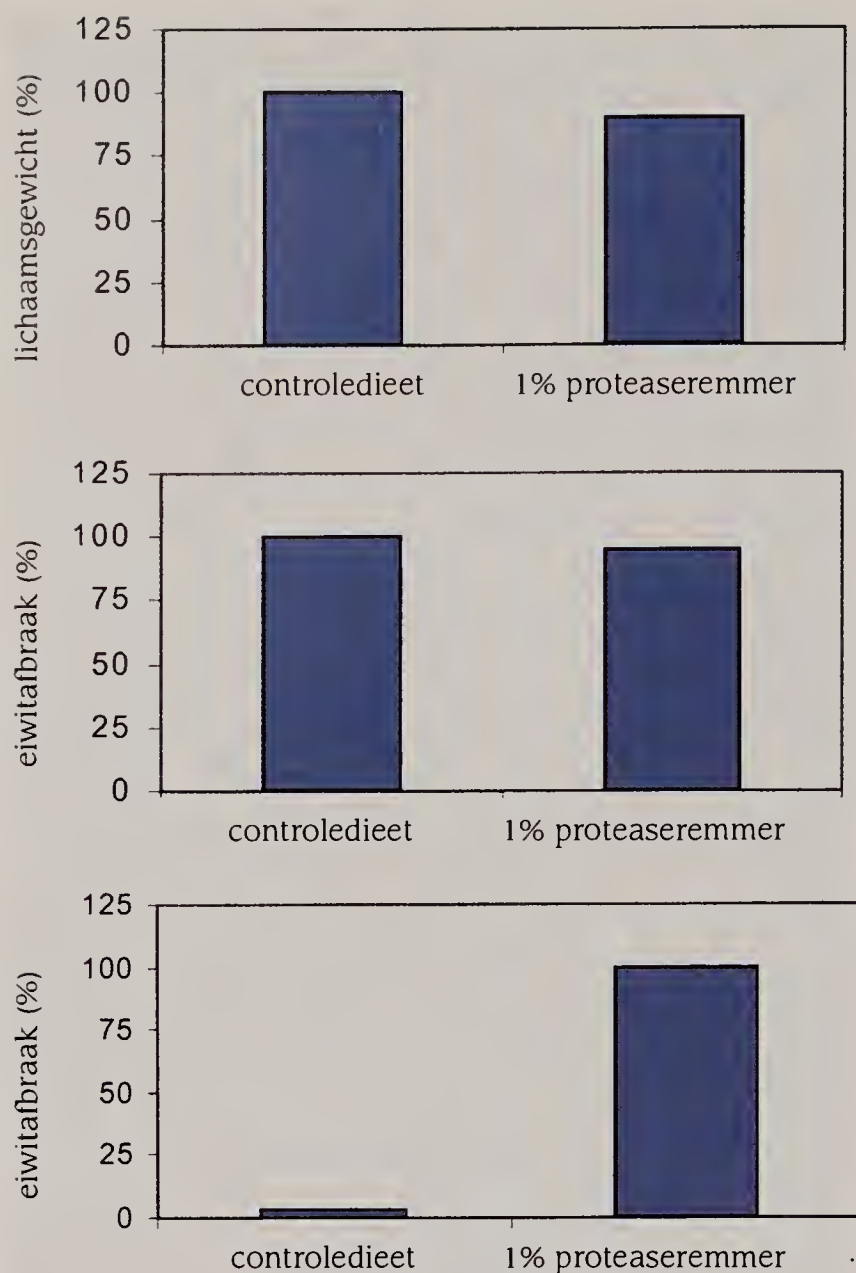
Als landbouwplagen te groot worden zal de boer zijn planten gaan beschermen. Vaak gebeurt dat met chemische middelen. In landen als China en India, waar meestal met de hand geoogst wordt, levert dit grote gezondheidsproblemen op die vaak door geldgebrek genegeerd worden. Daarom wordt in die landen door plaatselijke laboratoria gezocht naar (goedkope) oplossingen die althans het gebruik van chemicaliën zouden kunnen beperken. Eén strategie is het gebruik van een natuurlijke, plant-eigen manier van afweer, bijvoorbeeld door de plant een 'algemeen' werkende proteaseremmer te laten maken via genetische modificatie (GMO). Vooral insectenlarven, die zijn gericht op het snel verteren van voedsel, zijn daar dus gevoelig voor.

Met name naar het verteringssysteem van rupsen is veel onderzoek gedaan. De trypsine-achtige enzymen van de pijlstaartvlinder *Manduca sexta* Linnaeus (een plaag op tabak) zijn makkelijk te remmen met remmers uit andere planten,



Figuur 1. De Bowman-Birk-proteaseremmer uit soja. **A** Het oppervlak van de remmer. **B** Hier is te zien hoe de eiwitstreng is opgevouwen, waardoor het oppervlak van a gevormd wordt. **C** De proteaseremmer (rood) past precies in een protease (blauw). Het protease is in dit geval trypsine uit varkensdarmen; dit enzym lijkt sterk op de proteases uit insectendarmen. Gegevens voor deze afbeelding komen uit Koepke *et al.* (2000). *The Bowman-Birk protease inhibitor from soybean. A The surface of the protein. B The backbone strand of the protein, underlying the surface in A. C The complex of a protease (blue) and a protease inhibitor (red). The protease is in this case trypsin, isolated from pig guts. The pig enzyme is homologous to enzymes found in insect guts. Data for these pictures are from Koepke et al. (2000).*

bijvoorbeeld uit aardappel. Dit gegeven werd met enthousiasme onthaald door veredelaars, die nieuwe mogelijkheden zagen voor plaagbestrijding. Geprobeerd werd om proteaseremmers via genetische modificatie van de ene plantensoort in de andere te krijgen. In sommige gevallen bleek deze aan-



Figuur 2. De effecten van de Kunitz-proteaseremmer (SKTI) uit soja op *Helicoverpa zea*. Steeds worden insecten vergeleken die op controledieet of op proteaseremmerdieet zijn opgekweekt. (a) Het lichaamsgewicht verschilt nauwelijks. (b) De darmenzymen kunnen evengoed eiwit verteer. (c) Het protease uit het controle-insect kan niet tegen proteaseremmers, maar het enzym uit het insect dat al proteaseremmer gegeten heeft blijft actief wanneer proteaseremmer wordt toegevoegd.

The effects of the soybean Kunitz protease inhibitor (SKTI) on Helicoverpa zea. In each picture insects are compared which have been raised on either a control diet or on a diet containing protease inhibitor. (A) Body weight of larvae hardly differs. (B) Protein digestion by control proteases and adapted proteases is equally effective. (C) The protease from insects raised on control diet can easily be inhibited by a protease inhibitor, whereas the protease from the adapted insect raised on inhibitor diet cannot be inhibited.

pak te werken. Tabaksplanten die aardappeleiwit PI-2 maken zijn beschermd tegen *M. sexta* (Johnson *et al.* 1989), rijstplanten die dit eiwit uit aardappel aanmaken zijn beschermd tegen de mot *Sesamia inferens* Walker (Duan *et al.* 1996).

Proteaseremmers: geen bescherming tegen echte plagen?

Polyfage insecten - dat wil zeggen insecten die verschillende soorten planten eten - hebben opvallend vaak geen last van proteaseremmers. Voorbeelden zijn rupsen van motten zoals de floridamot (*Spodoptera*) en *Helicoverpa*. Omdat polyfage

plaaginsecten tot de lastigste plagen in het veld behoren wordt in Wageningen, maar ook bijvoorbeeld in laboratoria in India (Harsulkar *et al.* 1999), onderzocht waarom polyfage rupsen geen last hebben van proteaseremmers. We testen het effect van remmers door ze te mengen door het dieet van insecten die in het laboratorium gekweekt worden en vergelijken vervolgens de groeisnelheid van de insecten met controlegroepen. In figuur 2 is te zien hoe de rupsen van *Helicoverpa zea* Boddie reageren op een hoge concentratie proteaseremmer SKTI uit soyaboon. Het blijkt dat de rupsen niet eerder dood gaan en niet langzamer groeien (figuur 2a). Vergelijkbare experimenten laten zien dat deze insecten een heleboel remmers kunnen weerstaan. Deze eigenschap is waarschijnlijk erg nuttig voor polyfage insecten, omdat ze met veel verschillende natuurlijke proteaseremmers in hun dieet te maken krijgen.

Een polyfaag insect past zich aan

De rups van *Helicoverpa* (figuur 3) is een bekende lastpost die resistent is geworden tegen alle chemische middelen (McCafferty 1998). Er zijn twee soorten met dezelfde eetgewoonte, maar de een beperkt zich tot het Amerikaanse continent (*H. zea*), de ander tot Eurazië, Afrika en Australië (*H. armigera* (Hübner)). *Helicoverpa* heeft geen Nederlandse naam, in het Afrikaans heet *H. armigera* de 'Afrika bolwurm'. Beide soorten vormen vooral op katoen en maïs een plaag. Halverwege de jaren 90 van de vorige eeuw werd in China 30% van het katoenareaal verwoest door *H. armigera* (Krattiger 1997). Ook op kikkererwt- en gierstplanten, die vooral in armere landen gegeten worden, richt het vergelijkbaar grote schade aan.

Om zichtbaar te maken hoe *Helicoverpa* reageert op de aanwezigheid van proteaseremmers hebben we de volgende proef gedaan. Twee rupsenpopulaties zijn opgekweekt op een dieet van maïspap, waarbij de ene populatie geen en de andere wel proteaseremmer in zijn pap kreeg. Op het oog zien we geen enkel verschil in groei (figuur 2a). Vervolgens is van de darmenzymen getest hoe snel deze eiwit afbreken. Opnieuw zien we geen verschil (figuur 2b). Als we proberen de proteases te remmen met een proteaseremmer zien we echter een duidelijk verschil (figuur 2c): de proteases kunnen makkelijk geremd worden als er geen proteaseremmer in het dieet zit, maar bij aanwezigheid van remmer in het dieet werken de proteaseremmers niet. In dat laatste geval is er kennelijk iets veranderd in de proteases en zijn deze aangepast aan het dieet.

Aanpassing: hoe werkt dat?

Om meer inzicht te krijgen in de aanpassing van het insect zijn de proteases gezuiverd. We willen het protease uit de rups die maïspap zonder remmer heeft gegeten vergelijken met het enzym uit de rups die maïspap met remmer heeft gegeten. Er blijkt een groot verschil in functie te zijn: geen van de remmers die we proberen (uit soyaboon, aardappel, pompoen of mosterd) werkt tegen het 'aangepaste' protease. Dat is opvallend, want deze remmers hebben elk een geheel eigen vouwing, en daardoor een specifiek contactoppervlak met proteases. Soyaboonremmer heeft bijvoorbeeld een 'spits' contact, terwijl de aardappelremmer over een langwerpig oppervlak contact heeft (althans met 'normale' trypsinen, bijvoorbeeld uit zoogdierdarmen). Kennelijk worden

deze verschillen genegeerd door het aangepaste protease en heeft de rups één superprotease waarmee alle remmers nutteloos zijn geworden.

We wilden weten waarin het normale, rembare enzym verschilt van het aangepaste, onrembare superenzym. De fysische eigenschappen van beide enzymen blijken vrijwel gelijk. De grootte van de enzymen is vergelijkbaar en komt overeen met het trypsine dat mensen in hun darmen gebruiken. We hebben ook een groot deel van de aminozuurvolgorde bepaald en de bijbehorende genen opgezocht die coderen voor de enzymen. De enzymen bleken voor 76% identiek te zijn. Uit de verschillen tussen het aangepaste enzym en het gewone enzym proberen we het verschil in werking te verklaren aan de hand van structuurmodellen van het enzym (bijvoorbeeld figuur 1c). We zien dat de veranderingen in het aangepaste enzym vooral liggen rond het gebied van het enzym dat aan remmers bindt. Waarschijnlijk zijn een of twee van deze veranderingen ervoor verantwoordelijk dat remmers niet meer in het aangepaste protease passen, maar we weten nog niet welke veranderingen dat zijn. In ieder geval is duidelijk dat het bescheiden aantal verschillen tussen de twee enzymen grote gevolgen heeft voor de levenswijze van het insect: met het aangepaste superenzym kan elke eiwitbron aangeboord worden en kan elke plant gegeten worden. Het kan natuurlijk dat er een remmer bestaat die wel past op het aangepaste superprotease, maar deze is (nog) niet gevonden.

Proteaseremmers in het veld

Hoewel verscheidene polyfage insecten niet te bestrijden lijken met proteaseremmers is een aantal schadelijke gespecialiseerde insecten, zoals *Manduca* en *Sesamia*, gevoelig voor deze stoffen. In sommige gevallen zouden dergelijke insecten een ernstige bedreiging kunnen vormen voor gewassen, die alleen met behulp van zeer toxische chemicaliën afgewend kan worden. In die gevallen zouden werkzame proteaseremmers via genetische modificatie in de waardplanten van deze insecten ingebouwd kunnen worden. De maatschappelijke acceptatie van dergelijke maatregelen hangt vaak samen met de ernst van het probleem. Zoals met elke stof die via GMO-technieken in planten ingebracht wordt, zal moeten worden uitgezocht of er geen ongewenste neveneffecten zijn, zoals de mogelijke ontwikkeling van allergie. Waarschijnlijk zullen die problemen niet optreden bij gekookte producten of bij producten die we helemaal niet eten, zoals katoen. Ook is het mogelijk dat proteaseremmers effect hebben op nuttige insecten als bijen of lieveheersbeestjes, al wijst het schaarse onderzoek dat hieraan is gedaan niet in die richting (Malone & Burgess 2000). Hierbij is het goed te bedenken dat proteaseremmers al vrij veel voorkomen in natuurlijk plantenmateriaal.

Proteaseremmers kunnen ook werken tegen insecten die zich er aan aangepast lijken te hebben. In onze verzamelingen hebben we bijvoorbeeld proteaseremmers gevonden die duidelijk giftig zijn voor bladluis en trips (zie bijvoorbeeld Ceci *et al.* 2003). Deze insecten hebben zich aangepast aan de proteaseremmers die normaal in planten gemaakt worden als reactie op vraat. In plaats van een ongevoelig protease te gebruiken zorgen luizen er voor nauwelijks met proteaseremmers (en andere afweerstoffen) in aanraking te komen door hele subtiele beschadigingen aan te richten, waardoor de plant geen proteaseremmers gaat produceren. Als ze deze

stoffen toch tegenkomen blijken ze daar behoorlijk last van te hebben. Als ze keus hebben mijden ze planten die proteaseremmers maken.

Ook polyfage insecten als *Helicoverpa* kunnen onverwachte hinder ondervinden van proteaseremmers. Dit is waargenomen bij katoenplanten die tegenwoordig in China verbouwd worden (Fang *et al.* 2001). Daarin heeft men met behulp van genetische modificatie het gen gezet voor CpTI, een proteaseremmer die afkomstig is uit een erwtensoort. Men verbouwt katoen met het CpTI-gen om de *Helicoverpa*-schade (verder) te beperken. In de Chinese katoen wordt namelijk ook BT-toxine gemaakt. Het gen voor dit toxine is afkomstig van een bacterie en werkt goed tegen *Helicoverpa*. Volgens Chinees onderzoek versterkt de CpTI-proteaseremmer het effect van het BT-toxine-eiwit (Zhao *et al.* 1999). Zo heeft *Helicoverpa*, die weliswaar over een aangepast, onrembaar protease beschikt, toch last van proteaseremmers.

Proteaseremmers werken ook tegen aangepaste insecten

Proteaseremmers zullen in de toekomst vaker toegepast worden om insectenplagen in commercieel geteelde voedselplanten te beheersen. Deze toepassing vraagt veel onderzoek naar de juiste remmers en de mogelijke neveneffecten ervan. Intussen leren we door dit onderzoek beter hoe planten zich kunnen verweren tegen insecten en hoe insecten daaraan aangepast zijn. Soms kunnen we die aanpassingen van plant en insect zelfs tot op het niveau van eiwitstructuur begrijpen.



Figuur 3. Larve (vijfde stadium) van *Helicoverpa zea*. Foto: Alex Bayes Puig.
Larva (fifth instar) of Helicoverpa zea.

Literatuur

- Bode W & Huber R 2000. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica Biophysica Acta* 1477: 241-252.
- Ceci LR, Volpicella M, Rahbe Y, Gallerani R, Beekwilder J & Jongsma MA 2003. Selection by phage display of a variant mustard trypsin inhibitor toxic against aphids. *Plant Journal* 33: 557-566.
- Duan X, Li X, Xue Q, Abo-El-Saad M, Xu D & Wu R. 1996. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nature Biotechnology* 14: 494-498.
- Fang Z, Cheng D, Xu J, Xu R & Fan T 2001. Commercial implementation of intellectual property rights of Chinese transgenic insect-resistant cotton with Bt gene and Bt+CpTI genes. *Journal of Agricultural Biotechnology* 9: 103-106.
- Harsulkar AM, Giri AP, Gupta VS, Sainani MN, Deshpande VV, Patankar AG, Ranjekar PK 1999. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and larval growth. *Plant Physiology* 121: 497-506.
- Johnson R, Narvaez J, An G & Ryan C 1989. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 86: 9871-9875.
- Jongsma MA, Bakker PL, Peters J, Bosch D & Stiekema WJ 1995. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 92: 8041-8045.
- Koepke J, Ermler U, Warkentin E, Wenzl G & Flecker P 2000. Crystal structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3 Å resolution. Structural basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity. *Journal of Molecular Biology* 298: 477-491.
- Krattiger M 1997. Insect resistance in crops: a case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries. *ISAAA Briefs* no. 2: 42.
- Malone P & Burgess E 2000. Interference of protease inhibitors on Non-target organisms. In: *Recombinant protease inhibitors in plants* (Michaud ed). Landes Bioscience.
- McCafferty AR 1998 Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera: a global view. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 353: 1735-1750.
- Volpicella M, Ceci LR, Cordewener J, America T, Gallerani R, Bode W, Jongsma MA & Beekwilder J 2003. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. *European Journal of Biochemistry* 270: 10-19.
- Zhao J-Z, Fan YL, Fan XL, Shi XP & Lu MG 1999. Evaluation of transgenic tobacco expressing two insecticidal genes to delay resistance development of *Helicoverpa armigera*. *Chinese Science Bulletin* 44: 1871-1873.

Geaccepteerd 14 juli 2003.

Summary

Digestive enzymes of insects as targets of plant defense

Proteases from the digestive system of insects are targets of plant defense: the plant produces protease inhibitors to eliminate them. These protease inhibitors are small proteins, which can also be applied in crop protection, for instance through techniques of genetic modification (GMO). However, a number of polyphagous insects, for example *Helicoverpa* spp., appear not to be affected by protease inhibitors. Being polyphagous, these insects are used to the presence of different natural protease inhibitors in their diet. This may explain why they have adapted and use a protease that cannot be inhibited by a range of protease inhibitors. This protease is homologous to proteases that are extremely sensitive to inhibitors, and we are seeking a molecular understanding of how this adapted protease can avoid being inhibited. Protease inhibitors do work against a number of non-polyphagous insects and also against insects like aphids and thrips, which usually avoid contact with protease inhibitors. Application in agriculture is therefore increasing.