Universiteit
Leiden
The Netherlands

MYC transcription factors: masters in the regulation of jasmonate biosynthesis in Arabidopsis thaliana

Zhang, K.

Citation
Zhang, K. (2016, July 6). *MYC transcription factors: masters in the regulation of jasmonate biosynthesis in Arabidopsis thaliana*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/41032

Version:	Not Applicable (or Unknown)
License:	Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden
Downloaded from:	https://hdl.handle.net/1887/41032

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page

Universiteit Leiden

The handle http://hdl.handle.net/1887/41032 holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Zhang, K.
Title: MYC transcription factors: masters in the regulation of jasmonate biosynthesis in Arabidopsis thaliana
Issue Date: 2016-07-06

Samenvatting

Jasmonaten (JAs), een groep chemische verbindingen die jasmonzuur (JA) en haar cyclische precursors en afgeleiden omvatten, zijn signaalmoleculen die betrokken zijn bij de regulatie van een aantal processen in planten, met inbegrip van bepaalde ontwikkelingsprocessen, veroudering en reacties op biotische en abiotische stress (Wasternack, 2007). JAs zijn oxylipines die via de octadecanoid route worden gemaakt. Externe stress signalen leiden tot de biosynthese van JAs, die vervolgens de expressie van bepaalde genen aanzetten hetgeen leidt tot de aanpassing van de plant aan de gewijzigde omstandigheden. De belangrijkste bioactieve JAs is het aminozuur conjugaat jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) (Fonseca et al., 2009). Perceptie van JA-Ile door het F-box-eiwit CORONATINE-INSENSITIVE1 (COI1), dat deel uitmaakt van een Skp-Cullin-F-box-eiwit (SCF) complex met vermeende E3 ubiquitine ligase activiteit, leidt tot de afbraak van JAZ repressor eiwitten. De transcriptiefactoren die door JAZ onderdrukt worden komen daardoor vrij en schakelen JAs-responsieve genen aan (Gfeller et al., 2010).

De meeste van de enzymen betrokken bij JAs biosynthese en metabolisme zijn geïdentificeerd en de overeenkomstige genen zijn bekend (Yan et al., 2013). De expressie van de meeste biosynthese genen waaronder *LOX*, *AOS*, *AOC*, *OPR3*, *JMT* en *JAR1* wordt aangeschakeld door JAs of door verwonding, een stressomstandigheid die leidt tot JAs biosynthese (Wasternack, 2007). Dit impliceert dat JAs biosynthese wordt geregeld door een positief terugkoppelingsmechanisme. Dit model van transcriptionele regulatie van JAs biosynthese genen door terugkoppeling is algemeen aanvaard, maar de betrokken regulatie mechanismen zijn nog niet bekend. Eerdere studies in onze onderzoeksgroep toonden aan dat verhoogde expressie van de AP2/ERF-domein transcriptiefactor ORA47 resulteerde in verhoogde expressie van JAs biosynthese genen en verhoogde JAs niveaus. Verlaging van de expressie van ORA47 leidde echter niet tot een verandering van het expressieniveau van de JAs biosynthesegenen, hetgeen suggereert dat ORA47 de positieve terugkoppeling reguleert samen met (een) niet-geïdentificeerde transcriptiefactor (en) (Pré, 2006; Khurshid, 2012). De huidige kennis over de JAs biosynthese route, de JAs signaaltransductie route en over JAs-gerelateerde transcriptiefactoren wordt besproken in **Hoofdstuk 1**.

De basische helix-loop-helix (bHLH) -domein transcriptiefactor MYC2 en de nauw verwante eiwitten MYC3 en MYC4 zijn belangrijke regulatoren van JAs reacties in Arabidopsis thaliana (Lorenzo et al, 2004; Fernández-Calvo et al, 2011). De MYC eiwitten worden gereguleerd worden door de JAZ repressors. Andere onderzoekers

hebben eerder gerapporteerd dat MYC2 en ORA47 de *LOX3* promoter konden aanschakelen in een trans-activatie test in tabaksprotoplasten (Pauwels et al., 2008). Er is echter weinig bekend over de rol van MYC2, MYC3 en MYC4 in de regulatie van JAs biosynthese. Daarom was het doel van de in dit proefschrift beschreven studies om te bepalen wat de rol van MYC eiwitten is in het terugkoppelingsmechanisme dat JAs biosynthese in Arabidopsis reguleert.

Hoofdstuk 2 beschrijft de rollen van MYC2, MYC3 en MYC4 in de expressie van JAs biosynthese genen. In de drievoudige *myc234* mutant was na behandeling met methyl-jasmonaat (MeJA) of na verwonding de expressie van de JAs biosynthese genen een stuk lager dan in wildtype planten. Uit "electrophoretic mobility shift assays" (EMSAs) bleek dat MYC eiwitten in vitro konden binden aan slechts één van de twee G-boxen die in de *AOC2* promoter voorkomen. Deze G-box was essentieel en voldoende voor de activering van de *AOC2* promoter door MYC transcriptiefactoren in Arabidopsis protoplasten. Er was een perfecte correlatie tussen de in vitro binding van MYC eiwitten aan de wildtype G-box en gemuteerde sequenties en het vermogen van de MYC eiwitten om *AOC2* promoter afgeleiden met de wildtype en gemuteerde G-boxen in vivo te trans-activeren. Bovendien toonden de trans-activatie testen aan dat de MYC eiwitten en ORA47 gezamenlijk op een additieve wijze de promoters van de JAs biosynthese genen *LOX2*, *AOS*, *AOC2* en *OPR3* konden activeren. Deze resultaten geven aan dat MYC2, MYC3 en MYC4 samen met ORA47 optreden als belangrijke positieve regulatoren in het terugkoppelingsmechanisme dat JAs biosynthese reguleert.

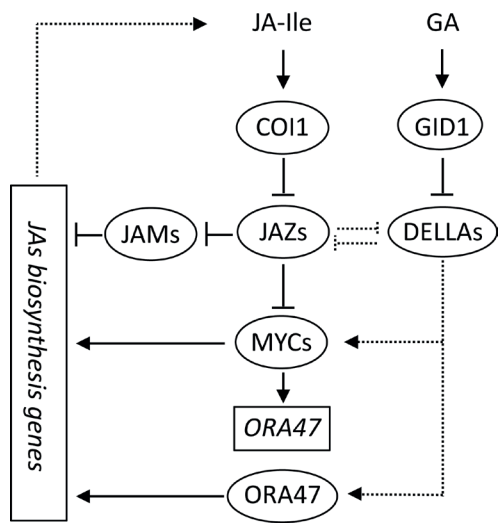
Hoofdstuk 3 beschrijft de rol van MYC2, MYC3 en MYC4 in de JAs-responsieve expressie van het *ORA47* gen. ORA47 is een positieve regulator van JAs biosynthese, en wordt zelf gecodeerd door een JAs-responsief gen. Op basis van literatuurgegevens werd de hypothese verkend dat ORA47 wordt gereguleerd door de functioneel redundante transcriptiefactoren MYC2, MYC3 en MYC4. De *ORA47* promoter bevat twee G-boxen en een G-box-achtig motief. De resultaten toonden aan dat de MYC eiwitten aan slechts één van deze G-box motieven in vitro konden binden. Uit trans-activatie testen bleek dat deze G-box sequentie essentieel is voor het aanschakelen van de *ORA47* promoter door MYC eiwitten en dat de andere G-box en de G-box-achtige sequentie bijgedragen aan een hoger expressieniveau van de ORA47 promoter in vivo. Drievoudige mutatie van de *MYC* genen of overexpressie van een stabiele JAZ1 afgeleide onderdrukte de JAs-responsieve *ORA47* expressie volledig, wat aangeeft dat de MYC-JAZ module een cruciale rol speelt in de regulatie

van *ORA47* expressie.

De regulatie van de ontwikkeling en verdediging door JAs wordt beïnvloedt door gibberellines (GAs), een ander belangrijk plantenhormoon. Studies in **Hoofdstuk 4** hadden tot doel om het effect van DELLA eiwitten, repressor eiwitten met een belangrijke rol in de GAs signaleringsroute, op de regulatie van JAs biosynthese in Arabidopsis te bestuderen. Andere onderzoekers hebben eerder gerapporteerd dat alle vijf leden van de DELLA eiwitfamilie in Arabidopsis kunnen binden aan MYC2 en daardoor interfereren met de respons die door MYC2 wordt teweeg gebracht. Uit gist twee-hybride (Y2H) testen en uit bi-moleculaire fluorescentie complementatie (BiFC) testen bleek dat twee van de DELLA eiwitten, namelijk RGA en GAI, kunnen binden aan ORA47. In trans-activatie testen hadden RGA en GAI een licht positief effect op het aanschakelen van de *AOC2* promoter door ORA47, wat weer gedeeltelijk werd afgezwakt door gelijktijdige toevoeging van de JAZ1 repressor. Dezelfde twee DELLA eiwitten, GAI en RGA, hadden een duidelijk positief effect op het aanschakelen van de *ORA47* promotor door MYC2. De expressie van de JAs biosynthese genen *LOX2*, *AOC2* en *OPR3* na toediening van JA, GA3 of beide gecombineerd was niet veranderd in de vijfvoudige della mutant of in transgene planten met constitutief verhoogde expressie van RGA of GAI vergeleken met wildtype planten. Dus hoewel deze leden van de DELLA repressor familie interactie vertonen met de transcriptiefactoren MYC2, MYC3, MYC4 en ORA47, hebben we niet kunnen vast stellen dat deze DELLA eiwitten de expressie van JAs biosynthese genen in Arabidopsis beïnvloeden.

De in dit proefschrift beschreven studies laten zien dat MYC2, MYC3 en MYC4 de JAs biosynthese genen positief reguleren zowel rechtstreeks als indirect door het reguleren van de expressie van het *ORA47* gen. GAs zijn mogelijk betrokken bij de regulatie van de JAs biosynthese genen via de interactie van DELLA eiwitten met de MYC eiwitten en met ORA47. Figuur 1 toont een model waarin de belangrijkste resultaten in dit proefschrift zijn weergegeven. De snelle productie van JA-Ile in reactie op ongunstige omgevingsomstandigheden leidt tot de afbraak van JAZ repressoren, wat resulteert in het vrijkomen van MYC transcriptiefactoren die hun doelwitgenen met inbegrip van *ORA47* aan schakelen. De MYC eiwitten en ORA47 binden respectievelijk aan de G-box en aan de GCC-box in de promoters van doelwitgenen en reguleren additief de expressie van JAs biosynthese genen, hetgeen leidt tot verhoogde JAs niveaus. Het combineren van twee verschillende cis-elementen, die het doelwit zijn van twee verschillende transcriptiefactoren, in pro-

moters heeft mogelijk tot doel om de specificiteit en gevoeligheid van het positieve terugkoppelingsmechanisme te verbeteren. Leden van de DELLA repressor familie, cruciale onderdelen van de GAs signaaltransductieroute, kunnen binden aan MYC eiwitten en aan ORA47. Zo zouden zij de expressie van JAs biosynthese genen kunnen bevorderen. Er werd eerder gerapporteerd door andere onderzoekers dat de JAZ repressors niet alleen binden aan de MYC activator eiwitten maar ook interactie vertonen met de JAM repressor eiwitten. Dit zijn ook eiwitten met een bHLH domein voor binding aan DNA die worden verondersteld te concurreren met MYC eiwitten voor binding aan G-box-sequenties. JAM eiwitten zijn daarom in het model weergegeven als negatieve regulatoren van JAs biosynthese genen. Dit model benadrukt dat planten een complex regelmechanisme bezitten dat ze in staat stelt de productie van JAs heel gevoelig af te stemmen voor het vereiste niveau van verdediging tegen ongunstige omstandigheden.



Figuur 1. Model voor de transcriptionele regulatie van de positieve terugkoppelingsmechanisme in JAs biosynthese in Arabidopsis.