



Universiteit
Leiden
The Netherlands

ORA EST : functional analysis of jasmonate-responsive AP2/ERF-domain transcription factors in *Arabidopsis thaliana*

Pré, M.

Citation

Pré, M. (2006, May 31). *ORA EST : functional analysis of jasmonate-responsive AP2/ERF-domain transcription factors in Arabidopsis thaliana*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4417>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4417>

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

Samenvatting

Planten reageren op stressomstandigheden in hun omgeving of op infectie met pathogene organismen met de productie van een aantal endogene signaalmoleculen, waaronder jasmonzuur (JA), ethyleen en salicylzuur. De biosynthese van één of een combinatie van deze hormonen en daaropvolgende signaaltransductieprocessen leiden tot grote verschuivingen in de transcriptie van genen, hetgeen leidt tot een doeltreffende verdedigingsrespons. In antwoord op bepaalde stressomstandigheden of pathogenen werken JA en ethyleen samen om de expressie van een groot aantal verdedigingsgenen te stimuleren.

JA en verwante stoffen, gezamenlijk aangeduid als jasmonaten, vormen een familie van cyclopentanoonafgeleiden, welke gemaakt worden van linoleenzuur via de zogenaamde octadecanoïed route. Deze moleculen regelen ook verscheidene aspecten van groei en ontwikkeling, maar zijn vooral betrokken bij verdediging tegen (a)biotische stress. Recentelijk is gebleken dat naast JA ook andere jasmonaten, zoals de JA precursor 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), actief zijn als signaalmoleculen.

Op dit moment is het nog grotendeels onbekend hoe de productie van JA op moleculair niveau aangezet wordt door stresssignalen. Daarentegen is het inzicht in hoe JA de expressie van genen betrokken bij verdediging aanschakelt groeiende. In de roze maagdenpalm (*Catharanthus roseus*) induceert JA de expressie van twee genen voor transcriptiefactoren die Octadecanoïed-Responsieve Catharanthus AP2/ERF-domein (ORCA) eiwitten genoemd zijn. Deze behoren tot de AP2/ERF-domein familie van transcriptiefactoreiwitten. Onder invloed van JA schakelen de ORCA eiwitten een aantal JA-gevoelige genen aan door direct te binden aan het promoter DNA van deze genen en hun transcriptie te stimuleren. Gebaseerd op deze bevindingen werd gepostuleerd dat in de zandraket (*Arabidopsis thaliana*) de expressie van een subset van genen onder invloed van JA ook geregeld wordt door leden van de AP2/ERF-domein familie. Atallah heeft in haar proefschrift 10 genen beschreven van de AP2/ERF familie, *Octadecanoïed-Responsieve Arabidopsis AP2/ERF (ORA)* genen genaamd, welke zeer snel door JA aangeschakeld worden in jonge zaailingen.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift had tot doel om de functies van deze 10 genen op te helderen, en in het bijzonder hun rol in JA-gevoelige genexpressie. De strategie die hierbij gevolgd werd was om de expressie van deze *ORA* genen te verlagen of te verhogen, en te kijken welk effect dat heeft op genexpressie of het aanzien van de plant.

Hoofdstuk 2 beschrijft de rol van de transcriptiefactor *ORA59*. De expressie van het *ORA59* gen wordt aangeschakeld door JA en ethyleen afzonderlijk, terwijl deze hormonen samen een zeer sterke stimulatie van de expressie van dit gen teweegbrengen. Analyse van de expressie van alle *Arabidopsis* genen met behulp van micro-arrays toonde aan dat

verhoogde expressie van het *ORA59* gen leidt tot een verhoging van de expressie van een groot aantal genen die ook aangeschakeld worden door de combinatie van JA en ethyleen. Deze groep bevatte meerdere genen waarvan bekend is dat ze zijn betrokken bij verdediging (zoals *PDF1.2* en *HEL*) of bij het primaire of het secundaire metabolisme. Planten met een verhoogde expressie van *ORA59* zijn ook meer resistent tegen infectie met de schimmel *Botrytis cinerea*. Door anderen is eerder aangetoond dat een verhoogde expressie van ERF1, een transcriptiefactor die sterk verwant is aan *ORA59*, ook leidt tot verhoogde expressie van de genen *PDF1.2* en *HEL*, en ook meer resistent zijn tegen *B. cinerea*. Dit suggereert dat *ORA59* en ERF1 vergelijkbare en mogelijk uitwisselbare functies hebben. Echter, zoals in Hoofdstuk 2 beschreven leidde volledige en specifieke uitschakeling van de expressie van het *ORA59* gen tot planten die genen betrokken bij verdediging, inclusief *PDF1.2* en *HEL*, niet meer tot expressie kunnen brengen in respons op schimmelinfectie of in respons op een combinatie van JA en ethyleen. Deze planten zijn ook veel gevoeliger voor schimmelinfectie. Deze experimenten tonen voor het eerst aan dat *ORA59* een unieke en essentiële functie heeft in het aanschakelen van genen door JA en ethyleen, en in schimmelresistentie.

Hoofdstuk 3 beschrijft de functies van *ORA47*. Continu verhoogde expressie van *ORA47* leidt tot dwerggroei en de productie van anthocyanen, een fenotype dat lijkt op het effect van JA. Dit leidde tot de hypothese dat verhoogde expressie van *ORA47* leidt tot de productie van JA en daardoor tot een JA fenotype. Om de functie van *ORA47* te kunnen bestuderen werd gebruik gemaakt van een induceerbaar expressiesysteem. Verhoogde expressie van *ORA47* na inductie leidde tot een toename van de expressie van genen betrokken bij de biosynthese van JA, evenals tot een 2- tot 4-voudige stijging van het niveau van de JA precursor OPDA. Een verrassing was dat het niveau van JA niet gestegen was.

Naast het effect op JA biosynthesegenen, leidde inductie van *ORA47* expressie ook tot verhoogde expressie van verscheidene genen betrokken bij verdediging, wat waarschijnlijk een indirect effect is als gevolg van de verhoogde productie van jasmonaten zoals OPDA. De verwachting is dat de genen betrokken bij JA biosynthese wel direct door *ORA47* aangeschakeld worden, hoewel dat nog experimenteel bevestigd moet worden.

Door anderen is aangetoond, en dat is in dit proefschrift ook bevestigd, dat de expressie van alle JA biosynthesegenen door JA aangeschakeld wordt. De resultaten in dit hoofdstuk geven voor het eerst aan dat *ORA47* betrokken is bij deze zelfstimulerende regulatoire lus, die waarschijnlijk dient om het signaal te versterken.

In **Hoofdstuk 4** is de aandacht gericht op *ORA37*. *ORA37* verschilt van alle andere AP2/ERF-domein transcriptiefactoren beschreven in dit proefschrift door de aanwezigheid van een zogenaamd ERF-geassocieerd repressie (EAR) domein in het C-terminale uiteinde

van het eiwit. Dit EAR domein heeft een sterk onderdrukkend effect op de transcriptie van genen. Het *ORA37* gen, ook aangeduid met *AtERF4*, wordt aangeschakeld door JA, ethyleen of verwonding. Verhoogde expressie van *ORA37* had geen effect op het basale expressieniveau van JA-gevoelige genen in onbehandelde planten. Echter na behandeling met JA en/of ethyleen werd een significant lager expressieniveau waargenomen voor een subset van JA- en ethyleen-gevoelige genen, waaronder ook de genen *PDF1.2*, *HEL* en *ChiB*. Het tegengestelde werd waargenomen na verlaging van het expressieniveau van *ORA37*. *PDF1.2*, *HEL* en *ChiB* hadden dan een hoger expressieniveau na behandeling met JA en/of ethyleen dan in controle planten. Dit toont aan dat *ORA37* een rol speelt in de signaaltransductie van JA en ethyleen als negatieve regulator van een set van verdedigingsgenen. *ORA37* en *ORA59* werken dus tegengesteld op deze subset van JA- en ethyleen-gevoelige genen.

Er werd nog een effect waargenomen van verhoogde expressie van *ORA37*, namelijk een verhoogd expressieniveau van een andere subset van JA-gevoelige genen, waaronder *VSP1* en *CYP79B2*, na behandeling met JA. Dit geeft aan dat *ORA37* ook positief kan werken op genexpressie. Aangenomen dat *ORA37* door de aanwezigheid van het EAR domein altijd als een remmer werkt, dan kan het positieve effect verklaard worden doordat *ORA37* een negatief effect heeft op de expressie van een remmer van deze genen onder het motto twee keer negatief is ook positief. De uitdaging is nu om uit te zoeken of dit inderdaad zo werkt en welke andere remmer hierbij betrokken is.

Een merkwaardige constatering is nu dat JA en ethyleen zowel activatoren (zoals *ORA59* en *ERF1*) als remmers (zoals *ORA37*) van de expressie van dezelfde subset van genen induceren. Het nut hiervan is nog onduidelijk. Het kan zijn dat een balans tussen positieve en negatieve regulatie-eiwitten leidt tot een alles of niets effect op genexpressie in respons op JA en ethyleen.

In **Hoofdstuk 5** worden pogingen beschreven om functies in genexpressie toe te kennen aan de overige ORA transcriptiefactoren. Tevens werd onderzocht of sommige ORA eiwitten gedeeltelijk dezelfde sets van genen reguleren. Elk van de 10 ORA eiwitten werd verhoogd tot expressie gebracht in een induceerbaar systeem dat aangeschakeld kan worden door toevoeging van de plantvreemde stof estradiol. Van een aantal kandidaat-genen werd het expressieniveau gemeten in ieder van de planten met verhoogde expressie van één bepaalde ORA. Deze genen werden geselecteerd omdat bekend is dat ze reageren op JA, en omdat ze betrokken zijn bij verschillende processen zoals verdediging tegen biotische of abiotische stress, biosynthese van JA, of primair of secundair metabolisme. De genexpressieprofielen die werden gevonden gaven aanleiding om de genen te onderverdelen in verschillende groepen. Sommige groepen werden aangeschakeld door een verhoogd

expressieniveau van meer dan één ORA, wat aangeeft dat deze ORA eiwitten althans gedeeltelijk dezelfde functie hebben. Voor vijf ORA eiwitten werden geen genen gevonden met een veranderd expressieniveau binnen de gekozen set. Dit zou geïnterpreteerd kunnen worden door aan te nemen dat ze geen functie hebben in JA-gevoelige genexpressie. Waarschijnlijker is echter dat de activiteit van deze eiwitten afhangt van een JA-afhankelijke activeringsstap op eiwitniveau.

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was om de functies op te helderen van de ORA transcriptiefactoren in JA-gevoelige genexpressie in de zandraket. De aanpak was om het expressieniveau te veranderen en te kijken wat voor een effect dat heeft op genexpressie en het aanzien van de planten. Voor enkele ORAs is dit goed gelukt. Het is duidelijk geworden dat ORA33, ORA37, ORA47 en ORA59 inderdaad de expressie van bepaalde subsets van genen regelen in respons op JA (Figuur 1; zie ook Figuur 2 in hoofdstuk 1). Deze ontdekkingen zijn nieuw, en in het geval van ORA59 in tegenspraak met conclusies getrokken door anderen. ORA47 is hiermee ook de eerst ontdekte transcriptionele regulator van de biosynthese van een plantenhormoon.

De conclusies over de functies van de ORA transcriptiefactoren getrokken in dit proefschrift berusten voornamelijk op de analyse van genexpressie op mRNA niveau. Maar de verwachting is dat verder onderzoek naar de regulatie van ORA activiteit op eiwitniveau zal leiden tot een veel beter beeld van de rol van de ORA transcriptiefactoren in JA signaaltransductie. Toekomstig onderzoek zal zich dan ook ongetwijfeld richten op de mechanismen waardoor JA via covalente modificaties en eiwit-eiwit interacties de activiteit van de ORA transcriptiefactoren reguleert. Een andere brandende vraag is hoe de JA-afhankelijke transcriptie van de ORA genen zelf is gereguleerd. Dit is namelijk geen Droste effect van een transcriptiefactor die de expressie van een ander transcriptiefactorgen reguleert enzovoorts ad infinitum, maar in den beginne start de signaaltransductieketen met een reeds aanwezige "meester" transcriptiefactor, die direct op eiwitniveau wordt geactiveerd onder invloed van JA. De onthulling van deze vooralsnog duistere meester is een andere belangrijke uitdaging.