



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Jasmonate-responsive transcriptional regulation in *Catharanthus roseus*

Zhang, H.

Citation

Zhang, H. (2008, November 6). *Jasmonate-responsive transcriptional regulation in Catharanthus roseus*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13223>

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/1887/13223>

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

Samenvatting bij het proefschrift:

**Jasmonzuur-responsieve transcriptionele regulatie
in *Catharanthus roseus***

Onder bedreigende omstandigheden zoals infecties of vraat produceren planten laagmoleculaire beschermende stoffen, die secundaire metabolieten worden genoemd. Meestal worden secundaire metabolieten pas gemaakt wanneer ze nodig zijn, en is hun productie nauwkeurig gereguleerd. Wanneer de bedreigende omstandigheid wordt gesignaleerd, zorgt een keten van reacties in de cel voor verhoogde expressie van genen die coderen voor eiwitten (enzymen), die betrokken zijn bij de aanmaak van deze stoffen. Een centrale rol hierbij spelen DNA-bindende eiwitten die het expressieniveau van een gen kunnen reguleren, zogenaamde transcriptiefactoren. Bij de productie van secundaire metabolieten is vaak een groot aantal verschillende enzymen betrokken die achtereenvolgend actief zijn in een productieketen. Voor een gecoördineerde aanmaak van deze enzymen zijn dan ook vooral transcriptiefactoren van belang die de expressie van een aantal genen uit de keten tegelijk kunnen reguleren (zogenaamde hoofdschakelaars). Kennis van de regulatie van hoofdschakelaars in secundair metabolisme van planten kan worden toegepast voor een verhoogde productie van waardevolle plantenstoffen. Voorbeelden van hoofdschakelaars zijn de eiwitten ORCA2 en ORCA3 van *Catharanthus roseus*.

De subtropische plant *C. roseus*, de roze maagdenpalm, produceert onder bepaalde stresscondities terpenoïde indoolalkaloïden (TIA). Een aantal van deze TIA wordt door de mens gebruikt als geneesmiddel. Onderdeel van de reactieketen, die leidt tot de productie van TIA is de aanmaak van het plantenstresshormoon jasmonzuur (JA). Planten maken ook andere actieve varianten van dit hormoon, zoals methyl-jasmonzuur (MeJA) en een conjugaat met het aminozuur isoleucine (JA-Ile). MeJA induceert o.a. de expressie van de genen coderend voor de AP2-domein transcriptiefactoren ORCA2 en ORCA3, die beide de expressie stimuleren van een aantal genen betrokken bij TIA productie. Hiertoe behoren de *TDC* en *STR* genen, die coderen voor respectievelijk tryptofaan decarboxylase en strictosidine synthase, vroege enzymen in de TIA productieketen. De expressie van zowel *TDC* als *STR* wordt door ORCA2 en ORCA3 gestimuleerd. Het in dit proefschrift beschreven onderzoek betreft studies naar de manier waarop MeJA de expressie van de *ORCA* genen activeert.

Hoofdstuk 1 geeft een samenvatting van recente inzichten in de manier waarop JA genexpressie activeert gebaseerd op studies in de modelplant *Arabidopsis thaliana* (de zandraket). JA-Ile vormt de moleculaire lijm tussen JAZ (Jasmonate ZIM domein) repressoreiwitten en het F-box eiwit COI1 (CORONATINE INSENSITIVE1). In afwezigheid van JA-Ile houden de JAZ repressoren de transcriptiefactor AtMYC2 in een inactieve toestand. AtMYC2 behoort tot een andere klasse van transcriptiefactoren dan de ORCAs, nl. de basische Helix-Lus-Helix (bHLH) klasse. COI1 is onderdeel van een ubiquitine-eiwit ligase complex, dat na binding aan JAZ eiwitten in aanwezigheid van JA-Ile het kleine eiwitje ubiquitine aan de JAZ repressoren koppelt. Deze geubiquitineerde JAZ eiwitten worden vervolgens herkend door een eiwitafbraakmachine die het 26S proteasoom wordt genoemd. Door afbraak van de JAZ repressoren wordt AtMYC2 actief en schakelt een set van genen aan die betrokken is bij bescherming tegen verwonding en insectenvraat. AtMYC2 schakelt ook de JAZ genen aan, wat leidt tot synthese van nieuwe JAZ eiwitten die vervolgens AtMYC2 weer inactief maken en daarmee de door JA-Ile in gang gezette processen stoppen. In deze serie van gebeurtenissen functioneert COI1 (of het complex tussen COI1 en JAZ) als receptor voor JA-Ile.

Hoofdstuk 2 beschrijft experimenten die tot doel hebben om te onderzoeken of het eiwit CrA42 een bepalende rol speelt bij de expressie van de alkaloidbiosynthesegenen *TDC* en *STR*. Het *CrA42* gen was oorspronkelijk geïsoleerd uit een *C. roseus* cellijn die een integratie van een T-DNA activatieconstruct in het genoom bevatte en ook verhoogde expressie vertoonde van deze genen. Het T-DNA was geïntegreerd vlak voor het *CrA42* gen. De hypothese was dat verhoogde expressie van het *CrA42* gen door de sterke promotor gelegen op het T-DNA construct de oorzaak was van de verhoogde *TDC* en *STR* expressie. In het onderzoek werd het volledige *CrA42* gen geïsoleerd en na koppeling aan een sterke promotor werd het geïntroduceerd in *C. roseus* cellen. Er kon echter hiermee niet op reproduceerbare wijze worden aangetoond dat verhoogde expressie van *CrA42* leidt tot een hogere expressie van de *TDC* en *STR* genen. Ook andere experimenten gericht op het ophelderen van de functie van CrA42 gaven geen resultaten die een functie van CrA42 als activator van genexpressie

ondersteunden. De aandacht werd daarom verlegd naar andere regulatoren die mogelijk de expressie van de *ORCA* genen zouden kunnen controleren.

In **Hoofdstuk 3** wordt de sleutelrol van CrMYC2 in de regulatie van de *ORCA* genen beschreven. CrMYC2 is het *C. roseus* equivalent van AtMYC2 uit Arabidopsis. De *ORCA3* promoter bevat een DNA sequentie die functioneert als een aan/uit schakelaar in respons op MeJA. CrMYC2 bindt in vitro aan deze sequentie. In *C. roseus* cellen activeert CrMYC2 de *ORCA3* promoter via binding aan de aan/uit schakelaar. Verlaging van het expressieniveau van het CrMYC2 gen via de RNA interferentie (RNAi) techniek leidde tot sterk verlaagde expressie van de *ORCA* genen in reactie op MeJA toediening.

Hoofdstuk 4 beschrijft dat twee leden van de JAZ eiwitfamilie in *C. roseus* de activiteit van CrMYC2 stil houden. Beide JAZ eiwitten binden aan CrMYC2 in bakkersgist, en dus hoogst waarschijnlijk ook in plantencellen. Analyse van domeinen in CrJAZ1 betrokken bij inactivatie van CrMYC2 gaf aan dat het N-terminale domein een belangrijke rol speelt. Een fusie-eiwit bestaande uit CrJAZ1 en het fluorescente eiwit GFP (Green Fluorescent Protein) was gelocaliseerd in de kern van *C. roseus* cellen. Na toediening van JA verdween het eiwit. Dit kwam door afbraak door het 26S proteasoom, aangezien toediening van de specifieke proteasoominhibitor MG132 de door MeJA veroorzaakte verdwijning teniet deed. De expressie van de *JAZ* genen wordt aangeschakeld door MeJA. In *C. roseus* cellen met verlaagde CrMYC2 expressie door RNAi is de *JAZ* genexpressie in respons op MeJA sterk verlaagd. Verhoogde expressie van CrMYC2 door koppeling aan een sterke constitutieve promoter leidde tot verhoogde expressie van de *JAZ* genen. Deze resultaten geven aan dat, net als voor AtMYC2 en AtJAZ genen in Arabidopsis, de expressie van de CrJAZ genen in *C. roseus* wordt gecontroleerd door CrMYC2.

Hoofdstuk 5 vat de gevonden resultaten samen in een model, en vergelijkt de regulatie van TIA biosynthese in *C. roseus* met de regulatie van de biosynthese van nicotine en verwante alkaloiden in tabak. In *C. roseus* worden een aantal TIA biosynthesegenen gereguleerd door de *ORCA* transcriptiefactoren. De genen coderend voor de *ORCA* transcriptiefactoren worden weer gereguleerd door CrMYC2. CrMYC2 wordt normaal stil gehouden

door binding aan CrJAZ repressoren. Na aanmaak van JA in respons op stress worden de CrJAZ repressoren afgebroken door het 26S proteasoom en wordt CrMYC2 actief. Hoogstwaarschijnlijk worden de CrJAZ repressoren geubiquitineerd door een ubiquitine-eiwit ligasecomplex dat het COI1 equivalent van *C. roseus* bevat, maar dat dient nog aangetoond te worden. Actief CrMYC2 schakelt ook de *CrJAZ* genen aan, hetgeen door synthese van nieuwe CrJAZ eiwitten leidt tot het stilleggen van CrMYC2 en het herstellen van de basistoestand in de *C. roseus* cellen. Alhoewel in de experimenten MeJA of JA werd toegediend aan de *C. roseus* cellen, wordt dit hoogstwaarschijnlijk in de plantencellen omgezet in JA-Ile, maar ook dat dient nog aangetoond te worden.

In tabak (*Nicotiana tabacum*) is aangetoond dat de expressie van nicotine biosynthesegenen en de biosynthese van nicotine in respons op MeJA wordt gecontroleerd door NtCOI1 en NtJAZ eiwitten. Over transcriptiefactoren is minder bekend. Voor twee AP2-domein transcriptiefactoren, NtORC1 en NtJAP1, is aangetoond dat ze de activiteit van de promoter van een sleutelgen in de nicotinebiosynthese in tabakscellen kunnen verhogen. NtORC1 is het tabaksequivalent van ORCA3. In **Hoofdstuk 5** wordt de hypothese opgesteld dat NtORC1 en NtJAP1 de expressie van nicotine biosynthesegenen reguleren, en dat de expressie van de genen coderend voor deze transcriptiefactoren wordt gecontroleerd door NtMYC2, het tabaksequivalent van CrMYC2 en AtMYC2. Verder onderzoek moet uitwijzen of deze hypothese klopt.

In veel plantensoorten wordt de biosynthese van secundaire metabolieten gestimuleerd door (Me)JA. Hoogstwaarschijnlijk hebben COI1, JAZ, MYC2 en ORCA-achtige eiwitten een geconserveerde rol in planten in de regulatie van de biosynthese van secundaire metabolieten.

