

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19963> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Hussain, Rana Muhammad Fraz

**Title:** WRKY transcription factors involved in PR-1 gene expression in Arabidopsis

**Date:** 2012-10-17

## **SAMENVATTING**



Planten staan doorlopend bloot aan bedreigingen uit de omgeving. Deze kunnen van abiotische aard zijn, zoals veroorzaakt door het klimaat (koude, hitte, droogte), de omgeving (grond met hoge gehalten aan zout) of weefselschade door verwonding, of ze komen van insecten die plantenweefsels eten of microbiële ziekteverwekkers (schimmels, bacteriën, virussen). In de laatste gevallen spreken we van biotische stress. Deze is weer onder te verdelen in stress veroorzaakt door enerzijds, insectenvraat en necrotrofe pathogenen en anderzijds, biotrofe pathogenen, waarbij de eerste leven van de vrijkomende suikers en andere celbestanddelen van gedood plantenweefsel, terwijl de biotrofe pathogenen parasiteren op levende cellen.

Om deze bedreigingen het hoofd te bieden beschikken planten over een uitgebreid arsenaal aan verdedigingsmechanismen. Sommige van deze mechanismen zijn continu aanwezig, zoals de celwand en de waslaag op stengels en bladeren, die de plant beschermen tegen uitdroging, mechanische schade en opportunistische schimmels en bacteriën die anders een gemakkelijk maaltje zouden hebben aan de onbeschermd cel. Andere voorbeelden van continue verdediging zijn de al dan niet met afweerstoffen gevulde bladhaartjes en blaasjes, die het insecten moeilijk maken zich op de plant te verplaatsen, of antimicrobiële verbindingen (phytoalexines) die ophopen in de weefsels van sommige planten. Daartegenover staan verdedigingsmechanismen die pas worden geactiveerd op het moment dat de plant wordt bedreigd. Deze geïnduceerde afweer resulteert veelal in de productie van eiwitten die een direct of indirect effect hebben op het vermogen van de pathogenen om zich door de plant te verspreiden. Een voorbeeld van eiwitten die worden geproduceerd tijdens de geïnduceerde afweer tegen biotrofe pathogenen zijn de zogenaamde PR-eiwitten. PR-eiwitten worden niet alleen geproduceerd in de directe omgeving van het binnendringende pathogeen, maar ook ver van de infectiehaard, in weefsels waar geen pathogeen aanwezig is. De ophoping van

PR-eiwitten is gecorreleerd met de productie van het plantenhormoon salicylzuur (SA) en gaat gepaard met een verhoging van de resistentie tegen een breed scala aan pathogenen in alle weefsels van de plant. Deze zogenaamde systemische verworven resistentie wordt aangeduid met SAR (*systemic acquired resistance*). PR-eiwitten zijn binnen het hele plantenrijk geconserveerd. Er worden zo'n 15 verschillende subgroepen onderscheiden. Tot deze groepen behoren o.a.  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2) en verschillende typen chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11), enzymen die de celwanden van bepaalde schimmels kunnen afbreken, en thaumatine-achtige eiwitten (PR-5) met een antischimmel activiteit. Ondanks het feit dat na infectie de PR-1 eiwitten in grote hoeveelheden worden aangemaakt, waardoor ze wereldwijd worden gebruikt als markers voor de geïnduceerde resistentie, is er nog niet veel bekend over hun functie. Het in dit proefschrift beschreven onderzoek was gericht op de rol van transcriptiefactoren, met name WRKY-eiwitten, in de expressie van het gen dat codeert voor het PR-1 eiwit in de modelplant *Arabidopsis*.

**Hoofdstuk 1** geeft een overzicht van de huidige kennis op het gebied van de signaaltransductie en van de transcriptionele regulatie van de afweermechanismen die door het plantenhormoon salicylzuur (SA) worden beïnvloed. Hierin wordt het gedeeltelijk in kaart gebrachte signaaltransductieproces beschreven dat leidt van herkenning van het binnendringende pathogeen tot SAR en de expressie van de genen die coderen voor de PR-eiwitten. Naast SA, dat een centrale plaats inneemt in de signaaltransductie, speelt ook het eiwit NPR1 een belangrijke rol. Als gevolg van de verhoogde productie van SA worden NPR1 monomeren vrijgemaakt uit een multimeer NPR1 complex in het cytoplasma, waarna ze verhuizen naar de celkern om daar een interactie aan te gaan met zgn. TGA eiwitten, transcriptiefactoren die binden aan de promoters van o.a. *PR* genen. Deze interactie leidt vervolgens tot activering van de transcriptie van de genen. De

promoter van het *PR-1* gen van *Arabidopsis* bevat inderdaad bindingsplaatsen voor TGA eiwitten en eerder onderzoek heeft duidelijk gemaakt dat deze plaatsen belangrijk zijn voor SA-geïnduceerde genexpressie. Echter, hetzelfde onderzoek heeft ook aangetoond dat andere sequenties in de promoter eveneens een belangrijke rol spelen. Voor een deel zijn deze sequenties identiek aan de W-box, een DNA element dat is gekarakteriseerd als bindingsplaats voor WRKY eiwitten, transcriptiefactoren die alleen bij planten voorkomen en gerelateerd zijn aan stress responsen.

In **Hoofdstuk 2** is beschreven dat AtWRKY50 de sterkste activator was van de *PR-1* expressie in *Arabidopsis* na screening van 41 van de 74 *Arabidopsis* WRKY transcriptiefactoren met behulp van transactivatie experimenten in protoplasten. AtWRKY50 verschilt van de meeste andere WRKY eiwitten door de aanwezigheid van een lysine in plaats van een glutamine in het DNA-bindende domein van het eiwit. Voorafgaand onderzoek van de groep had aangetoond dat een bepaalde WRKY transcriptiefactor in de tabaksplant, NtWRKY12, een rol speelt bij de expressie van *PR-1*. Ook tabaks NtWRKY12 heeft een lysine in het DNA-bindingsdomein en van alle *Arabidopsis* WRKY's heeft AtWRKY50 de hoogste homologie met NtWRKY12. Om te zien of deze lysine bepalend is voor het vermogen *PR-1* expressie te activeren, is ook onderzocht of de twee andere WRKY factoren van *Arabidopsis* met een lysine in plaats van glutamine in het DNA-bindingsdomein *PR-1* kunnen activeren. Dat bleek niet het geval. De expressie van het AtWRKY50 gen zelf bleek na behandeling van planten met SA te worden geactiveerd en deze activering ging iets vooraf aan die van *PR-1*, wat een functie van AtWRKY50 als activator van *PR-1* expressie ondersteunt. Vervolgens is met behulp van *electromobility shift assays* (EMSA) de bindingssequentie van AtWRKY50 in de *PR-1* promoter onderzocht. AtWRKY50 bleek te binden aan de DNA sequentie GACT(G)TTTC, die op twee plaatsen in de promoter voorkomt. Een van deze

plaatsen bleek overeen te komen met een sequentie die uit eerder onderzoek was gebleken noodzakelijk te zijn voor geïnduceerde expressie; de andere plaats overlapte gedeeltelijk met een W-box (TTGACT), waarvan eerder was gevonden dat deze een remmende werking op de expressie had. Het feit dat in de bindingsproeven alleen het C-terminale domein van AtWRKY50 in staat was aan het DNA te binden en niet het volledige AtWRKY50, suggereert dat in vivo, de configuratie van het eiwit zodanig wordt gemodificeerd dat de N-terminale helft van AtWRKY50 het C-terminale DNA-bindingsdomein niet kan afschermen.

De bindingsplaatsen van AtWRKY50 in de *PR-1* promoter liggen op korte afstand van twee bindingsplaatsen voor TGA transcriptiefactoren. Een dergelijke topografie bestaat ook in de tabaks *PR-1* promoter. Dit suggereert dat de WRKY en TGA eiwitten op de promoter wellicht een interactie aangaan, zoals ook is gevonden bij NtWRKY12 en tabaks TGA2.2. Dat dit inderdaad het geval is werd aangetoond in **Hoofdstuk 3**. In het *yeast two-hybrid* systeem bleek dat AtWRKY50 een eiwit-eiwit interactie aanging met TGA2 en TGA5 van Arabidopsis. Dit resultaat kon worden bevestigd met behulp van *bimolecular fluorescence complementation* (BiFC) experimenten in protoplasten van Arabidopsis, waaruit bovendien bleek dat deze interactie plaats vond in de celkern. DNA bindingsproeven met gezuiverd TGA2 en TGA5 toonden aan dat deze eiwitten voornamelijk bonden aan een van de twee veronderstelde TGA bindingsplaatsen in de promoter van *PR-1*, terwijl bij combinatie van TGA2 of TGA5 en het C-terminale domein van AtWRKY50 beide eiwitten tegelijk aan het promoter DNA bonden. Tevens kon uit de experimenten worden afgeleid dat de combinatie van intact AtWRKY50 met TGA2 of TGA5 de binding van beide eiwitten aan de promoter verhoogt. Tenslotte bleek uit co-expressie experimenten in protoplasten dat TGA2 en TGA5 zelf nauwelijks *PR-1* genexpressie activeerden, maar dat ze een sterk synergistisch effect hadden op

de activering door AtWRKY50. Deze resultaten ondersteunen een model waarin AtWRKY50 en TGA2 en TGA5 samenwerken in de regulatie van de *PR-1* expressie.

Zoals boven beschreven, geldt de W-box als consensus WRKY bindingsplaats, waar veel WRKY eiwitten aan kunnen binden. Uit het onderzoek beschreven in de voorgaande hoofdstukken bleek echter dat AtWRKY50 niet bond aan de W-box, maar aan een element dat er gedeeltelijk mee overlapt. In **Hoofdstuk 4** is onderzocht of andere WRKY eiwitten van Arabidopsis aan deze W-box in de *PR-1* promoter konden binden en mogelijk een effect hadden op de expressie. AtWRKY28 was in eerder onderzoek van de groep gekarakteriseerd als transcriptiefactor betrokken bij de expressie van een gen dat codeert voor een SA biosynthese enzym. In de WRKY screening beschreven in Hoofdstuk 2 was al gebleken dat AtWRKY28 ook *PR-1* expressie activeerde. Door middel van EMSA bindingsexperimenten werd aangetoond dat AtWRKY28 inderdaad bond aan de W-box naast de bindingsplaats van AtWRKY50. AtWRKY42, de op één na sterkste activator van *PR-1* in bovenvermelde screening, en AtWRKY46 bonden echter niet aan deze W-box. AtWRKY28 bond bovendien aan een tweede W-box in de *PR-1* promoter waarvan eerder was gevonden dat deze een effect had op de genexpressie. Transactivatie experimenten in protoplasten bevestigden dat beide W-boxen nodig zijn voor activering van de *PR-1* expressie door AtWRKY28. Een mogelijke rol van AtWRKY28 in de *PR-1* expressie werd verder ondersteund door de vaststelling dat het *AtWRKY28* gen wordt geïnduceerd door SA en dat dit voorafgaat aan de SA-geïnduceerde *PR-1* genexpressie.

In **Hoofdstuk 5** worden de effecten beschreven van overexpressie van AtWRKY50 en AtWRKY28 in Arabidopsis getransformeerd met constructen waarin de coderende sequenties van de WRKY's onder controle staan van de sterke constitutieve 35S promoter van Bloemkoolmozaïekvirus. De hoge



constitutieve expressie van AtWRKY50 resulteerde in een hogere accumulatie van *PR-1* mRNA dan in wild type planten, maar alleen wanneer de planten waren behandeld met SA; zonder SA bleek de *PR-1* expressie niet verhoogd in de AtWRKY50 overexpressor planten. Dit toont aan dat AtWRKY50 in zijn eentje de *PR-1* expressie niet kan induceren, maar dat na een SA-afhankelijke inductie, AtWRKY50 een hoog niveau van *PR-1* expressie ondersteunt. AtWRKY28 had een tegengesteld effect. SA-behandeling van AtWRKY28 overexpressor planten resulteerde in een lagere expressie dan in wild type planten. Dit suggereert een rol van AtWRKY28 als repressor van *PR-1* expressie, mogelijk als gevolg van zijn binding aan de W-box die eerder was gevonden een negatief effect te hebben op de expressie van *PR-1*. Infectietesten met de transgene overexpressor planten en met T-DNA knock-out mutanten waarin het *AtWRKY50* gen was uitgeschakeld, brachten geen duidelijke effecten aan het licht van de respectievelijke WRKY's op resistentie tegen de biotrofe pathogene bacterie *Pseudomonas syringae* en de necrotrofe schimmel *Botrytis cinerea*.

**Hoofdstuk 6** tenslotte, beschrijft onderzoek gedaan naar de effecten van een aantal WRKY's op het metabooloom. Daarvoor werden transgene WRKY overexpressor planten met behulp van <sup>1</sup>H NMR spectroscopie geanalyseerd. Uit multivariate data analyses van de NMR gegevens, zoals *principal component analysis*, *hierarchical cluster analysis* en *partial least square-discriminant analysis* bleek dat het metabooloom van AtWRKY50 overexpressor planten aanzienlijk verschilde van dat van wild type planten en de meeste andere WRKY overexpressor planten. Naast verschillen in de hoeveelheid van sommige suikers en aminozuren, waren met name sinapinezuur en sinapoyl glucose 2 tot 3 keer verhoogd in de AtWRKY50 overexpressor planten. Derivaten van sinapinezuur en andere hydroxy-kaneelzuren vormen componenten van lignine en het is aannemelijk dat een verandering in de relatieve hoeveelheden

van deze verbindingen gevolgen heeft voor de lignine structuur. Of AtWRKY50 een rol speelt in dergelijke stress-geïnduceerde lignine modificaties, bijvoorbeeld door de regulatie van de expressie van genen coderend voor enzymen betrokken bij lignine synthese, verdient nader onderzoek.

