



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Regulation of ORA59, a key modulator of disease resistance in Arabidopsis

Körbes, A.P.

Citation

Körbes, A. P. (2010, June 24). *Regulation of ORA59, a key modulator of disease resistance in Arabidopsis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/15722>

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/1887/15722>

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

Samenvatting

Samenvatting

De fitness en overleving van planten hangt af van efficiënte mechanismen om te reageren op bedreigende omstandigheden aanwezig in de natuurlijke leefomgeving. Bij het aanschakelen van de verdediging tegen aanvallers spelen endogeen geproduceerde plantenhormonen, zoals jasmonzuur (JA) en gerelateerde jasmonaten (JAs) en ethyleen (ET), een sleutelrol. JAs spelen een hoofdrol in de verdediging tegen verwonding, insecten en necrotrofe micro-organismen. De huidige inzichten in de biosynthese van JAs via de octadecanoïd route en in de verschillende componenten van de JA signaaltransductieroute worden beschreven in **Hoofdstuk 1**.

In de verdediging tegen necrotrofe pathogenen werken de JA en ET signaaltransductieroutes op synergistische wijze samen teneinde een specifieke set van genen aan te schakelen, zoals het *PDF1.2* gen dat codeert voor het kleine antimicrobiële eiwit PLANT DEFENSIN 1.2. De APETALA2 (AP2)-domein transcriptiefactor OCTADECANOÏD-RESPONSIEF ARABIDOPSIS AP2-domein eiwit 59 (*ORA59*) integreert de JA en ET signaaltransductieroutes in *Arabidopsis thaliana* (zandraket) en is de hoofdregulator van de expressie van het *PDF1.2* gen in respons op JA en ET. De wijze waarop *ORA59* zijn doelwitgenen aanschakelt werd nog niet eerder bestudeerd. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift was er op gericht om de werking van de JA/ET-responsieve transcriptiefactor *ORA59* in *Arabidopsis* op te helderen.

Het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 2** had als doel om de interactie van *ORA59* en de verwante transcriptiefactor ETHYLEEN-RESPONSIEVE FACTOR 1 (ERF1) met de *PDF1.2* promoter uiteen te rafelen. Andere onderzoekers hebben eerder gesuggereerd dat ERF1 ook als integrator van de JA en ET signaaltransductieroutes optreedt, maar als het al een rol speelt is deze miniem, aangezien planten die geen expressie van *ORA59* vertonen niet in staat zijn om JA- en ET-responsieve genen aan te schakelen.

Zoals beschreven in **Hoofdstuk 2** hebben wij aangetoond dat twee GCC motieven in de *PDF1.2* promoter belangrijk zijn voor *trans*-activering door *ORA59* en ERF1 in transiënte testen in protoplasten en voor binding van deze eiwitten *in vitro*. We hebben geen synergistische samenwerking tussen *ORA59* en ERF1 kunnen constateren, wat aangeeft dat deze transcriptiefactoren onafhankelijk van elkaar de *PDF1.2* promoter aanschakelen. Met behulp van de chromatine immunoprecipitatie techniek hebben we kunnen aantonen dat *ORA59 in vivo* bind aan de *PDF1.2* promoter. In stabiel getransformeerde planten doet mutatie van één van beide GCC motieven de activiteit van de *PDF1.2* promoter in respons op toediening van JA alleen of samen met de ET-genererende verbinding ethephon volledig teniet. Een tetrameer van één enkel GCC motief bracht JA/ethephon-responsieve genexpressie tot stand, wat aantoont dat de JA en ET signaaltransductieroutes convergeren naar één enkel GCC motief. Uit deze resultaten kan geconcludeerd worden dat *ORA59* en twee functioneel equivalente GCC motieven de module vormen die de synergistische respons van het *PDF1.2* gen op gelijktijdige activering van de JA en ET signaaltransductieroutes bewerkstelligt.

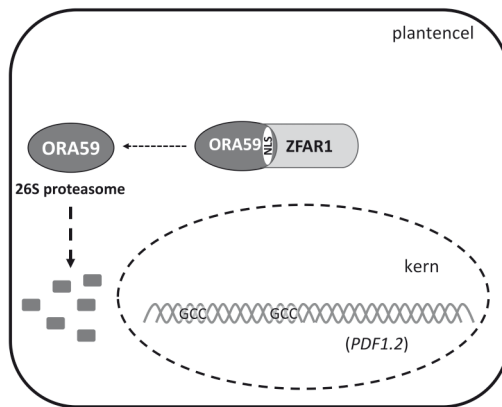
Verdediging moet onder normale groeiomstandigheden uit staan, maar moet als het nodig is snel aangezet kunnen worden. Dit vereist een strikte regulatie van de activiteit van de

sleuteltranscriptiefactoren. Onderzoek naar de effecten van JA op de activiteit van ORA59 eiwit zijn beschreven in **Hoofdstuk 3**. De resultaten laten zien dat JA zowel stabilisatie als nucleaire lokalisatie van ORA59 veroorzaakt. De herverdeling van ORA59 was afhankelijk van nucleaire lokalisatie (NLS) en nucleaire export (NES) signalen in het eiwit. Naast de NLS en NES waren nog minimaal twee andere eiwitdomeinen betrokken bij herverdeling en stabilisatie van ORA59. Een intrigerende ontdekking was dat de herverdeling van ORA59 na toediening van JA ook plaats vond in cellen die de JAs receptor COI1 missen. Gebaseerd op de resultaten in **Hoofdstuk 3** postuleren we dat Arabidopsis cellen in het bezit zijn van een JAs receptor die verschilt van COI1, van een F-box eiwit dat ORA59 markeert voor afbraak, en van een repressoreiwit dat de lokalisatie van ORA59 beperkt tot het cytoplasma.

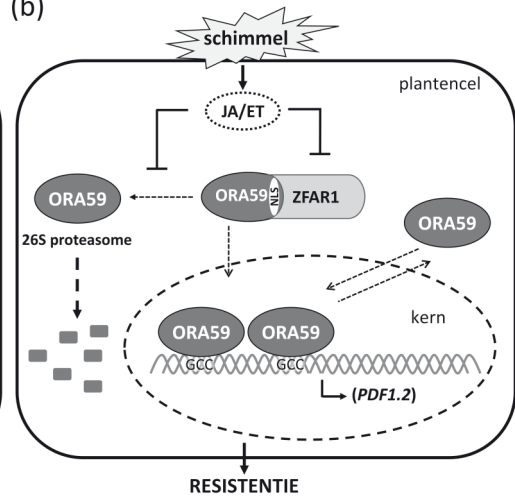
Dit bracht ons er toe om op zoek te gaan naar eiwitten die interactie vertonen met ORA59. **Hoofdstuk 4** beschrijft de karakterisering van het CCCH zinkvingereiwit ZFAR1, dat interactie vertoonde met ORA59 in tweehybride screening in gist. Een zeer verwant eiwit dat ZFAR2 is genoemd bond ook aan ORA59 in gist. Bimoleculaire Fluorescentie Complementatie (BiFC) testen toonden aan dat de binding tussen ORA59 en ZFAR1 plaats vond in het cytoplasma van Arabidopsis celsuspensieprotoplasten. Co-expressie van ZFAR1 verhinderde de nucleaire lokalisatie van ORA59 in Arabidopsis protoplasten na toediening van JA. Het remde ook de activiteit van ORA59 op de *PDF1.2* promotor in *trans*-activeringstesten. Infectietesten met de necrotrofe schimmel *Botrytis cinerea* (grijze schimmel) lieten zien dat transgene planten met een verhoogde expressie van ZFAR1 meer ziekteverschijnselen vertoonden, terwijl een *zfar1zfar2* dubbele knock-out mutant minder ziekteverschijnselen vertoonde dan wildtype planten. De significante verschillen in de ontwikkeling van ziekteverschijnselen ging niet gepaard met grote veranderingen in de expressie van JA/ET-afhankelijke merker genen voor verdediging zoals *PDF1.2*. Samen geven de resultaten aan dat ZFAR1 een repressor is dat die lokalisatie van ORA59 beperkt tot het cytoplasma om zo de basale resistentie tegen pathogenen nauwkeurig te regelen.

De identificatie van mechanismen waardoor de transcriptiefactor ORA59 op eiwitniveau geactiveerd wordt door JA, de interactie van ORA59 met andere transcriptiefactoren, en de identificatie van bindingsplaatsen in de promotors van doelwitgenen van ORA59 zijn van groot belang om te kunnen begrijpen hoe JAs de verdediging van planten reguleren. Figuur 1 toont een model dat de belangrijkste resultaten van het onderzoek beschreven in dit proefschrift samenvat. ORA59 is in zeer lage hoeveelheden aanwezig in gezonde cellen doordat het afgebroken wordt door het 26S proteasoom. De achtergrondexpressie van de doelwitgenen wordt ook nog eens verlaagd doordat ORA59 vastgehouden wordt in het cytoplasma door ZFAR1, dat de NLS in ORA59 maskeert (Fig. 1a). Na infectie met een necrotrofe schimmel produceren de plantencellen JAs en ET, die signaaltransductieroutes op gang brengen die leiden tot het loslaten van ORA59 van de repressor ZFAR1 en tot stabilisatie van ORA59. ORA59 gaat dan naar de kern, waar het genen betrokken bij verdediging zoals *PDF1.2* aan schakelt, wat vervolgens leidt tot resistentie (Fig. 1b).

(a)



(b)



Figuur 1. Model voor regulatie van ORA59. Zie tekst voor details.