



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Transcriptional regulation of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*

Darehei, M.

Citation

Darehei, M. (2025, January 15). *Transcriptional regulation of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis in Catharanthus roseus*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4175688>

Version: 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/1887/4175688>

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

Samenvatting

Planten produceren een groot aantal secundaire metabolieten, waaronder terpenoïden, fenolische verbindingen en alkaloiden. Deze verbindingen zijn essentieel voor interacties tussen planten en hun omgeving, en een aanzienlijk aantal ervan heeft farmacologische activiteit bij mensen. *Catharanthus roseus* (roze maagdenpalm) is een medicinale plant die meer dan 130 monoterpenoïde indool alkaloiden (MIAs) kan produceren, waaronder de waardevolle antikankerverbindingen vincristine en vinblastine. Deze verbindingen komen in lage concentraties voor in *C. roseus*, wat hun extractie voor farmacologisch gebruik kostbaar maakt. De chemische structuur van deze verbindingen is complex, waardoor ze niet op een kosteneffectieve manier kunnen worden gesynthetiseerd. Dit heeft in de afgelopen decennia wereldwijd onderzoek naar MIA-biosynthese in *C. roseus* gestimuleerd.

Jasmonaten (JAs) zijn plantenhormonen die een belangrijke rol spelen bij de regulatie van de productie van MIAs in *C. roseus* (Memelink, 2009). Alle bekende biosynthesegenen betrokken bij MIA-productie worden geïnduceerd door JAs (Van der Fits en Memelink, 2000; Miettinen et al., 2014). Bovendien activeren JAs genexpressie in de primaire stofwisseling, wat leidt tot de vorming van MIA-bouwstenen, wat aangeeft dat JAs een sterke invloed hebben op genexpressie en stofwisseling in planten.

De APETALA2/Ethyleenresponsfactor (AP2/ERF) transcriptiefactoren (TFs) Octadecanoïde-responsieve *Catharanthus* AP2-domeineiwitten 2 (ORCA2) en ORCA3 zijn sleutelregulatoren van verschillende MIA-biosynthesegenen, waaronder strictosidine synthase (STR). De genen die coderen voor de ORCA TFs reageren ook op JAs. De basische Helix-Loop-Helix (bHLH) TF CrMYC2 blijkt upstream van ORCA2 en ORCA3 te werken en activeert direct hun transcriptie als reactie op JAs. CrMYC2 wordt gereguleerd door de Jasmonaat ZIM-domein (JAZ) repressoren. De JAZ/MYC2-regulatiemodule is breed geconserveerd in het plantenrijk (Chini et al., 2016; Wasternack en Strnad, 2019). Bij afwezigheid van de bioactieve JAs JA-isoleucine (JA-Ile) wordt de activiteit van positieve regulatoren van de JAs-respons, zoals CrMYC2, geblokkeerd door de interactie met JAZ-eiwitten. JA-Ile bevordert de interactie tussen JAZs en het F-box-eiwit Coronatine Insensitive1 (COI1), wat leidt tot afbraak van JAZ via de ubiquitine-proteasoomroute en daarmee de repressie opheft van TFs zoals CrMYC2, die vervolgens de transcriptie van hun doelwitgenen kunnen activeren. Sommige JAZ-genen zijn doelwitgenen van CrMYC2, wat een negatieve feedback-lus creëert. De mutant CrMYC2D126N heeft een mutatie die de interactie tussen CrMYC2 en bepaalde leden van de CrJAZ-familie voorkomt (Goossens et al., 2015, Schweizer et al., 2018). Hierdoor is deze mutant actiever omdat deze in mindere mate onderhevig is aan feedback-inhibitie.

Het beheersen van biologische processen in de cel is van nature sterk afhankelijk van de regulatie van TF-activiteit. Cellen moduleren TF-activiteit door interactie met andere regulatoire eiwitten, zoals in het geval van de CrMYC2-JAZ-module, en door post-translationele modificaties zoals ubiquitinering of fosforylering die de stabiliteit of activiteit van TF beïnvloeden, zoals in het geval van de JAZ-repressoren.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek had als doel de regulatie van de activiteit van TFs te bestuderen die de MIA-route reguleren, met een focus op CrMYC2, ORCA2 en ORCA3.

- **Hoofdstuk 1** geeft een overzicht van MIA-productie door *C. roseus* en de transcriptiefactoren in de MIA-biosynthese die in dit proefschrift worden bestudeerd.

- In **Hoofdstuk 2** worden studies beschreven die onderzoeken of overexpressie van de gemodificeerde, ge-de-represseerde CrMYC2D126N mutant de productie van MIAs verhoogt. Het was mogelijk om cellijnen te verkrijgen met overexpressie van wild-type CrMYC2. Echter, in deze cellijnen was de expressie van MIA-biosynthesegenen onveranderd, waarschijnlijk door de negatieve feedback-lus. We slaagden er niet in cellijnen met overexpressie van CrMYC2D126N te verkrijgen, zelfs niet met het estradiol-induceerbare XVE-expressiesysteem. Dit wijst erop dat overexpressie van de CrMYC2D126N mutant waarschijnlijk toxisch is en dat het XVE-systeem lek is. Door deze technische beperkingen konden we onze onderzoeksvraag niet beantwoorden.
- In een poging om regulatoren van de ORCA TFs te isoleren, voerden we eiwit-eiwit-interactie screenings uit op basis van het gist-twee-hybridesysteem. In **Hoofdstuk 3** beschrijven we studies over het F-box-eiwit O2.51, dat werd geïdentificeerd als een interactor van ORCA2. We wilden de hypothese testen dat ORCA2 en mogelijk ORCA3 worden afgebroken via herkenning door dit F-box-eiwit. Eén benadering was om stabiel getransformeerde cellijnen te genereren met overexpressie of silencing van O2.51. De verkregen cellijnen vertoonden echter geen veranderingen in het O2.51-expressieniveau of vertoonden variabele genexpressiepatronen, waardoor geen betrouwbare conclusies getrokken konden worden. In transiënte transactivatie-assays remde O2.51 de activiteit van ORCA2 en ORCA3, een resultaat dat compatibel is met onze hypothese. Om de hypothese te bewijzen zijn echter verdere experimenten nodig.
- In **Hoofdstuk 4** beschrijven we studies over leden van een kleine familie van vier caseïnekinase I-eiwitten (CKIs) die als ORCA3-interactoren werden geïdentificeerd. CKI is een Ser/Thr eiwitkinase dat als monomeer werkt. De CrCKIs behoren tot een plant-specifieke groep CKIs waarvan leden betrokken zijn bij verschillende ontwikkelings- en signaaltransductie-processen. Pogingen om stabiel getransformeerde cellijnen te genereren met overexpressie van CKIs waren onsuccesvol. Kinase-studies toonden aan dat de CKIs de ORCAs konden fosforyleren. Een inhiberend Ser-rijk domein in ORCA3 was een belangrijk fosforylatiegebied, wat suggereert dat fosforylering door CKI inhiberend werkt. Consistent hiermee remde co-expressie van CKI in transactivatie-assays sterk de activiteit van ORCA2 en ORCA3. Lokalisatiestudies met CKI-GFP-fusies toonden aan dat de CKIs zich in de kern van *C. roseus* cellen bevinden, consistent met een mogelijke rol in TF fosforylering. De resultaten suggereren dat de activiteit van ORCAs in *C. roseus* wordt verzwakt door fosforylering door CKI. Het uitschakelen van CKI genen of het gebruik van niet-fosforyleerbare ORCAs kunnen benaderingen zijn om de expressie van ORCA doelwitgenen en mogelijk MIA-productie te verhogen. In een speculatief maar aantrekkelijk model zouden de ORCA-interactoren O2.51 en CKI kunnen samenwerken. Mogelijk verhoogt fosforylering door CKI de affiniteit van de ORCAs voor O2.51, wat leidt tot verhoogde afbraak. Dit model kan worden getest door ORCAs, O2.51 en CKI te combineren in transactivatie-assays, of door gist-tri-hybride assays uit te voeren.

