

DISS. ETH NO. 21342

INVESTIGATION OF
CELLULAR SIGNALING EVENTS INVOLVING
NUCLEAR β -AMYLASES IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

A dissertation submitted to the

ETH ZÜRICH

For the degree of Doctor of Sciences

Presented by

SEBASTIAN SOYK

Diplom Biologe, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Born on October 5th, 1982
in Schwetzingen, Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Samuel C. Zeeman, examiner

Prof. Hauke Hennecke, co-examiner

Prof. Christian S. Hardtke, co-examiner

SUMMARY

Plants display an amazing plasticity in their development, partly facilitated by the continuous adaptation of the genetic program to environmental conditions. A set of hormones is important for growth control. However, products of primary metabolism, such as sugars, can also act as signals to influence developmental programs. Sugars are primarily derived from photosynthesis in form of sucrose and starch. In *Arabidopsis thaliana*, starch is transiently stored in leaves and degraded during dark periods to allow leaf respiration and sucrose synthesis. β -Amylases (BAMs) are important enzymes for the breakdown of leaf starch. However, of the nine *Arabidopsis* isoforms, only BAM1 and BAM3 show substantial starch-degrading activity in the chloroplast. Two isoforms without apparent catalytic activity, BAM7 and BAM8, possess an additional domain with high sequence similarity to the BZR-family transcription factors that mediate the responses to the plant brassinosteroid hormones (BRs). Due to their two-domain structure, BAM7 and BAM8 were designated as BZR1-BAMs. Previous work demonstrated that BZR1-BAMs localize to the cell nucleus. Furthermore, BZR1-BAMs bind a specific DNA motif, the BBRE (for BZR1-BAM Responsive Element), and deregulate many genes that contain this motif in their *cis*-regulatory region. Ectopic expression of BAM8 or knockout of BZR1-BAM causes abnormal leaf development and deregulation of many BR-responsive genes. Since the genomes of many vascular plants encode BZR1-BAM proteins, proposing a conserved function of the two-domain structure seems reasonable. Moreover, BZR1-BAMs were suggested to bind a sugar ligand with their enzyme-like domain (BAM domain) to transform metabolic signals into a transcriptional response. However, experimental evidence for a function of the BAM domain was missing.

By removing or swapping the BAM domains of BZR1-BAMs I demonstrate an inhibitory impact of the BAM7 BAM domain on DNA-binding and transcriptional activation, while the BAM8 BAM domain promotes both activities. Mutagenesis of the active site shows

that transcriptional activity of BAM8 is independent of catalytic activity but requires an intact substrate binding site, suggesting the BAM domain may need to bind a ligand to be active. Microarray experiments with plants overexpressing these site-directed mutants show that only BZR1-BAM versions that are able to mediate transcriptional activation via the BBRE cause major changes the transcriptome and abnormal leaf developmental. Overexpression of the transcription factor domain alone suggests that the BAM domain increases selectivity for the *cis*-regulatory element BBRE. However, side-specificity towards the BR Responsive Element (BRRE) and the G-box may allow crosstalk to BR-signaling networks. Hence, I conducted a genetic approach by overexpressing BAM8 in the BR-signaling mutants *bri1-5*, *bzr1-1D* and *bes1-D*. Phenotypic alterations and transcriptional changes of co-regulated genes confirm antagonism between BZR1-BAMs and BR-signaling. The inverse effect of BAM8 and BZR1/BES1 on the BBRE motif was also demonstrated directly in a protoplast-based reporter system. Moreover, I identified putative interaction partners of BZR1-BAMs in a proteomics approach. BAM7 and BAM8 were able to form a heteromeric complex which may influence the sub-cellular localization of the individual proteins. In addition, I identified 14-3-3 proteins as putative interaction partners and provided evidence that 14-3-3 binding may promote transcriptional activity of BAM8. From the results obtained, I propose a regulatory impact of the enzyme-derived domain on the transcription factor function of BZR1-BAMs, reflecting their potential as metabolic sensor proteins. Furthermore, I suggest that BZR1-BAMs counteract brassinosteroid signaling by competing with BZR-family transcription factors for DNA recognition sequences in promoters of co-regulated genes. Interaction with 14-3-3 proteins may coordinate the antagonistic action of BZR1-BAMs and BZR-family transcription factors during the regulation of common target genes.

ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzenentwicklung ist von ausgeprägter Plastizität, teilweise ermöglicht durch eine kontinuierliche Synchronisierung des genetisch kodierten Entwicklungsprogramms mit wechselnden Umwelteinflüssen. Entwicklungsprozesse werden enorm von Hormonen beeinflusst. Allerdings können auch Produkte des Primärmetabolismus - wie etwa Zucker - als Botenstoffe fungieren. Zucker werden während der Photosynthese in Form von Saccharose und Stärke hergestellt. In *Arabidopsis thaliana* wird Stärke im Blatt gespeichert und nachts abgebaut, um Blattrespiration und Saccharose-Synthese zu ermöglichen. Während des Stärkeabbaus im Blatt spielen β -Amylasen (BAMs) eine wichtige Rolle. Von den neun BAM Isoformen in Arabidopsis sind allerdings nur BAM1 und BAM3 für den Stärkeabbau im Chloroplasten von katalytischer Relevanz. Zwei Isoformen ohne messbare katalytische Aktivität, BAM7 und BAM8, besitzen eine zusätzliche Proteindomäne mit hoher Sequenzähnlichkeit zu BZR-Transkriptionsfaktoren, die in der Signaltransduktion von Brassinosteroid Hormonen (BR) beteiligt sind. Aufgrund der Zwei-Domänen-Struktur werden BAM7 und BAM8 als BZR1-BAMs bezeichnet. BZR1-BAMs sind im Zellkern lokalisiert, binden ein spezifisches DNA Motiv, das 'BZR1-BAM Responsive Element' (BBRE), und können die Transkription von Genen deregulieren, welche dieses Motiv in ihrem Promotor tragen. Überexpression von BAM8 oder Verlust von BZR1-BAMs verursacht anormale Blattentwicklung und Deregulierung vieler Gene, die auch durch BRs beeinflusst werden. Da BZR1-BAMs in vielen Gefäßpflanzen vorkommen, kann von einer konservierten Funktion der Zwei-Domänen-Struktur ausgegangen werden. Es wurde vermutet, dass BZR1-BAMs mit ihrer enzymähnlichen Domäne (BAM-Domäne) einen Zuckerliganden binden und somit metabolische Signale auf Veränderungen der Genexpression übertragen könnten. Allerdings konnte bisher keine Funktion der BAM-Domäne nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit zeige ich durch vollständiges Entfernen oder Austauschen der BAM-Domänen von BZR1-BAMs, dass die BAM7 BAM-Domäne eine inhibierende Funktion

und die BAM8 BAM-Domäne einen aktivierenden Einfluss auf DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität ausübt. Gezielte Punktmutation des aktiven Zentrums belegt, dass die Funktion von BAM8 als Transkriptionsfaktor unabhängig von katalytischer Aktivität, jedoch abhängig von einer intakten Substratbindestelle ist. Transkriptionsanalysen von transgenen Pflanzen zeigen, dass nur funktionelle BZR1-BAM Mutanten relevante Veränderungen der Genexpression verursachen können. Überexpression der isolierten Transkriptionsfaktordomäne belegt, dass die BAM-Domäne die Selektivität für das BBRE Motiv erhöht. Des Weiteren überexprimierte ich BAM8 in den BR-Mutanten *bri1-5*, *bes1-D* und *bzr1-1D*. Die verursachten Veränderungen des Phänotyps und Transkriptoms bestätigen eine antagonistische Wechselwirkung zwischen BZR1-BAMs und BR-Signaltransduktionswegen. Die inverse transkriptionelle Wirkung von BAM8 und den BR-Transkriptionsfaktoren BZR1 und BES1 konnte zusätzlich in einem Protoplasten-basierten Reportersystem gezeigt werden. Durch Tandem-Massenspektrometrie identifizierte ich potentielle Interaktionspartner von BZR1-BAMs. BAM7 und BAM8 bilden einen Hetero-Proteinkomplex, der die nucleocytoplasmatische Lokalisierung der individuellen Proteine zu beeinflussen scheint. Außerdem konnte ich mehrere Mitglieder der 14-3-3 Proteinfamilie als putative Interaktionspartner identifizieren und erste Hinweise für eine regulatorische Rolle der 14-3-3/BAM8-Komplexbildung auf die transkriptionelle Aktivität von BAM8 sammeln. Aufgrund meiner Forschungsergebnisse schlage ich für die BAM-Domäne eine Funktion zur Regulation der transkriptionellen Aktivität von BZR1-BAMs vor, wodurch deren Potential als metabolische Sensorproteine bekräftigt wird. Außerdem vermute ich, dass die antagonistische Wechselwirkung mit BR-Signaltransduktionswegen durch Konkurrenz der beteiligten Transkriptionsfaktoren für *cis*-regulatorische Elemente von gemeinsam regulierten Genen ermöglicht wird. Die putative Interaktion mit 14-3-3 Proteinen könnte zur Koordination von BZR1-BAMs und BZR-Transkriptionsfaktoren beitragen.