



Doctoral Thesis

Analysis of proteasome targets in the leaf and in different leaf tissue types

Author(s):

Svozil, Julia

Publication Date:

2014

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010105037> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 21770

**ANALYSIS OF PROTEASOME TARGETS IN THE LEAF
AND IN DIFFERENT LEAF TISSUE TYPES**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

JULIA SVOZIL

Master of Science ETH in Biologie, ETH Zurich

Born on 08.03.1986

Citizen of Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wilhelm Grissem, examiner

Dr. Katja Bärenfaller, co-examiner

Prof. Dr. Robert Dudler, co-examiner

Prof. Dr. Matthias Peter, co-examiner

2014

Abstract

Cellular protein homeostasis is defined by protein synthesis and protein degradation. Our goal in this project was to better understand targeted protein degradation mediated by the proteasome and its effect on the leaf proteome. In Arabidopsis, the ubiquitin-26S proteasome system (UPS) is considered to be a specific protein degradation pathway, which involves an estimated number of around 1500 proteins. We investigated the response to inhibition of the proteasome at the protein level by treating leaves with the specific inhibitor Syringolin A. The treatment was performed in a daytime specific manner, at the end of the day and the end of the night in order to distinguish between light and darkness dependent protein accumulation. After inhibition of the proteasome we found 109 proteins with significantly increased and 140 with significantly decreased abundance. Samples treated at the end of the night were also used to enrich polyubiquitylated proteins, the direct targets of the UPS, by affinity chromatography. With this we were able to identify 1791 UPS targets in roots and leaves. With a mass spectrometry based approach we also aimed at identifying the ubiquitin footprint, which corresponds to a diglycine tag that remains attached to ubiquitylated proteins after tryptic digest, in order to identify the ubiquitin binding site at the protein and thereby validate protein ubiquitylation. Using this approach, we found a very high local false discovery rate (lFDR) in the set of spectra assigned to peptides carrying the ubiquitin footprint. We therefore used the same approach to search previously reported mass spectrometry data of ubiquitylated proteins, but also there we obtained a high lFDR. To further demonstrate that the identified ubiquitylation sites are mainly false positives we compared the spectra of the identified peptides carrying a ubiquitin footprint with the spectra of the corresponding synthetically produced peptides containing the footprint and found that they are considerably different. From this we concluded that the mass spectrometry approach to determine the ubiquitylation sites in complex peptide mixtures is problematic. To validate the results of the affinity enrichment we therefore used a tandem affinity enrichment approach instead. To gain a deeper understanding of the involvement of the proteasome in regulating the leaf proteome we developed a method to separate different leaf tissues and subsequently determined the respective proteomes. The direct targets of the UPS were again enriched by affinity purification of ubiquitylated proteins and the cellular response to inhibition of the proteasome was investigated by determination of protein accumulation and decrease. In the mesophyll we found that the protein import machinery of the chloroplast and chloroplastic proteases were targeted by the UPS, both, in a direct and an indirect manner. The high number of ubiquitylated proteins or proteins that accumulate after inhibition of the proteasome, which have their plastid signal peptide sequences still attached to the protein sequences, indicates that their precursors are targeted by the UPS in the cytoplasm. In the epidermis, the non-cyclic flux mode of the TCA cycle and cell wall biosynthetic processes were enhanced after inhibition of the proteasome, which points to increased *de novo* synthesis of amino acids and a change in cell wall composition. In the vasculature we found that the glucosinolate

biosynthesis pathway is specific to this tissue type and a direct target of the UPS, while glucosinolate degradation was distributed over the whole leaf. These processes have not been identified analyzing the total leaf data, which demonstrates the importance of the cell-type specific analysis. Mesophyll and epidermal cell preparations were also used to separate nuclei in dependence of their ploidy levels. Analysing the ploidy levels we found that mesophyll cells have a higher endoreduplication factor than epidermis cells and that the endoreduplication factor is higher in leaf number 6 than in the whole rosette. The results of the ploidy distribution allowed us to estimate the epidermal cell population to contain maximally 1.2% trichomes and maximally 40% guard cells. For the sorted cell-type and ploidy level specific nuclei, the RNA expression profile has been determined using AGRONOMICS1 tiling arrays. These results will be used for calculating a ploidy prediction model of the leaf by our collaborators. In summary, the project increased our knowledge of the role of the UPS dependent protein degradation in the leaf and underlined the importance of studying cellular processes and regulations in a tissue-type specific manner.

Zusammenfassung

Die zelluläre Protein Homeostase ist definiert durch die Proteinsynthese und den Proteinabbau. Unsere Zielsetzung in diesem Projekt war es, den gezielten Proteinabbau, der vom Proteasom vermittelt wird, und seinen Effekt auf das Proteom des Blattes besser zu verstehen. In Arabidopsis wird das Ubiquitin-26S Proteasom-System (UPS) als ein spezifischer Proteinabbauweg betrachtet und involviert eine geschätzte Anzahl von etwa 1500 Proteinen. Wir untersuchten die Reaktion auf die Inhibierung des Proteasoms auf Proteinebene durch Behandlung von Blättern mit dem spezifischen Inhibitor Syringolin A. Die Behandlung wurde abhängig von der Tageszeit, zum Ende des Tages und zum Ende der Nacht durchgeführt, um Licht- und Dunkelheitsabhängige Proteinakkumulationen zu unterscheiden. Nach Inhibierung des Proteasoms fanden wir 109 Proteine mit signifikant erhöhter und 140 Proteine mit signifikant erniedrigter Menge. Die Proben, die am Ende der Nacht behandelt wurden, wurden ebenfalls verwendet, um ubiquitinierte Proteine, die den Substraten des Proteasoms entsprechen, über Affinitätschromatographie anzureichern. Damit war es uns möglich 1791 UPS Substrate in Wurzeln und Blättern zu identifizieren. Mit einer Methode, die auf Messungen des Massenspektrometers basiert, wollten wir ebenfalls den Ubiquitinflussabdruck identifizieren, um die Bindungsstelle von Ubiquitin im Protein zu identifizieren und dadurch die Ubiquitinierung des Proteins zu validieren. Der Ubiquitinflussabdruck entspricht einem di-Glycin Rest, der nach dem tryptischen Verdau eines ubiquitinierten Proteins entsteht. Mit diesem Ansatz wurde eine sehr hohe Rate von falsch-positiven Peptiden im Datensatz der Peptide, denen ein Spektrum mit Ubiquitinflussabdruck zugeordnet wurde, detektiert. Deshalb nutzten wir den gleichen Ansatz um bereits veröffentlichte, über Messungen im Massenspektrometer gewonnene Daten ubiquitiniertes Proteine zu untersuchen. Auch hier ergab sich jedoch eine hohe Rate an falsch-positiven Peptiden mit Ubiquitinflussabdruck. Für einen weiteren Beweis, dass die identifizierten Bindungsstellen von Ubiquitin hauptsächlich Falsch-Positive sind, verglichen wir die Spektren der identifizierten Peptide mit Ubiquitinflussabdruck mit den Spektren, der jeweiligen synthetisch produzierten Peptide, die auch den Ubiquitinflussabdruck tragen und stellten fest, dass auch diese sich wesentlich unterschieden. Daraus schlossen wir, dass die Methode zur Identifizierung von Ubiquitin-Bindungsstellen, die auf Messungen des Massenspektrometers basiert, in komplexen Peptidmischungen problematisch ist. Um die Ergebnisse der Affinitätsanreicherung zu validieren, wurde daher eine Tandem-Affinitätsaufreinigung verwendet. Für ein tieferes Verständnis über die Beteiligung des Proteasoms zur Regulierung des Blattproteomes, entwickelten wir eine Methode um die einzelnen Gewebetypen des Blattes voneinander zu trennen und bestimmten danach das Proteom der jeweiligen Gewebetypen. Die Substrate des UPS wurden wieder über eine Affinitätsaufreinigung ubiquitiniertes Proteine angereichert und die zelluläre Reaktion auf die Inhibierung des Proteasoms wurde über die Bestimmung von Proteinakkumulation und Proteinrückgang untersucht. Wir stellten fest, dass das UPS im Mesophyll die Proteinimportmaschinerie des

Chloroplasten und plastidäre Proteasen direkt und indirekt reguliert. Die grosse Anzahl ubiquitinerter oder akkumulierender Proteine nach Inhibition des Proteasoms, die noch die plastidäre Signalsequenz tragen, zeigt, dass es die zytoplasmatischen Vorläuferproteine sind, die vom UPS reguliert werden. Nach Inhibierung des Proteasoms wurde in der Epidermis der Nichtzyklische-Flussmodus des Zitratzykluses und der Zellwandbiosynthese gesteigert. Dies deutet auf eine erhöhte Neusynthese von Aminosäuren und eine Änderung der Zellwandzusammensetzung hin. Die Glucosinolatbiosynthese ist spezifisch für das Vaskulargewebe und gleichzeitig sind deren Enzyme vom UPS reguliert, während der Glucosinolatabbau über das ganze Blatt verteilt ist. In den Daten des kompletten Blattes wurden diese Prozesse nicht identifiziert, was die Bedeutung einer gewebetyp-spezifischen Analyse aufzeigt. Präparate von Mesophyll und Epidermiszellen wurden ebenfalls benutzt um Zellkerne aufgrund ihrer Ploidiegrade zu trennen. Während der Analyse dieser stellten wir fest, dass Mesophyllzellen einen höheren Endoreduplikationsfaktor aufweisen als Epidermiszellen und dass der Faktor im sechsten Blatt höher ist als in der gesamten Rosette. Aus den Resultaten der Ploidieverteilung konnten wir schliessen, dass die epidermale Zellpopulation zu maximal 1.2 % aus Trichomen und zu maximal 40 % aus Schliesszellen besteht. Das RNA Expressionsprofil von gewebetyp- und ploidie-spezifischen Zellkernen wurde unter Verwendung von AGRONOMICS1 Tiling Arrays bestimmt. Diese Resultate werden für die Berechnung eines Modells zur Vorhersage von Ploidiegraden im Blatt durch unsere Kollaborationspartner verwendet werden. Zusammenfassend vergrösserte dieses Projekt unser Wissen über die Rolle des UPS-abhängigen Proteinabbaus im Blatt und unterstrich die Bedeutung zelluläre Prozesse und Steuerungen auf gewebetyp-spezifische Weise zu untersuchen.