

Abstract:

The plant hormone Jasmonic acid (JA) and its derivatives, collectively referred to as jasmonates, regulate a wide range of biological processes in plants *e.g.* responses to different biotic and abiotic stresses and developmental processes. Classical genetic approaches uncovered numerous components involved in jasmonate signaling. However, a number of questions are still open in order to fully understand JA signaling. For example, the diverse signaling properties of different jasmonates are not well understood, the role of protein kinases and phosphatases is not yet elucidated, and the molecular basis of the crosstalk with other phytohormones is also not clear. In order to solve these questions, I used a chemical genetic approach, which has the potential to circumvent the limitations of classical genetics such as redundancy, lethality, and pleiotropy of gene functions that may prevent the isolation of mutants. Essentially, chemical genetic approaches aim at identifying chemical compounds that selectively modulate a biological process. In my project, I established screening conditions to identify selective modulators of JA signaling by using a transgenic *Arabidopsis thaliana* line harboring the JA-responsive reporter *AtVSP1p::GUS*. I screened 1460 compounds to identify activators or inhibitors of the reporter. This screen yielded one activator of reporter expression and 10 inhibitors of the MeJA-induced reporter expression. Validation and characterization of the hit compounds resulted in choosing three novel and selective inhibitors of JA signaling, BML-259, nocodazole and L-cycloserine. In order to identify the mode-of-action and the molecular target of the chosen compounds, I pursued two experimental approaches: (1) I tested the effects of the compounds on known components of the JA signaling pathway and (2) I established structure-activity relationships (SAR) to define sites on the compounds for attaching tags that would aid in target identification strategies by pull-down experiments.

BML-259, an inhibitor of human cyclin-dependent protein kinase Cdk5/p25, effectively inhibited most JA-induced responses. Analysis of BML-259 effect on JA signaling revealed that it likely targets a protein kinase downstream of the SCF^{CO11}-mediated degradation of JAZ repressors, which is presumably involved in the transcription of JA-responsive genes.

Nocodazole, an inhibitor of microtubule formation, also effectively inhibited all the JA-induced processes and blocked the homo-dimerization of JAZ repressors; therefore, it may be a useful tool to investigate the biological role of the JAZ-JAZ homo-dimerization, which is not yet clear. Nocodazole-mediated effect on JA signaling is not depending on its ability to inhibit microtubule formation.

L-cycloserine, an inhibitor of serine palmitoyltransferase (SPT), impaired most of the JA-induced processes. However, its role in JA- signaling is not connected to the inhibition of SPT. Instead, it targets a component downstream of the SCF^{CO11} complex.

Finally, the SAR studies of the selected chemicals have defined the indispensable units required for their activity and sites for attaching tags. Subsequent biochemical experiments will aid identifying their protein targets and modes-of-action. Thus, BML-259, nocodazole and L-cycloserine may serve as valuable tools for dissecting further the yet unknown components of JA signaling pathway. Moreover, a broader application of the chemicals can be foreseen as they also inhibited JA signaling in the non-model plant tomato.

Zusammenfassung

Jasmonsäure (JA) und deren Derivate, allgemein zusammengefasst unter dem Begriff Jasmonate, regulieren verschiedenste biologische Prozesse in Pflanzen, die von biotischen und abiotischen Stressantworten bis hin zu Entwicklungsprozessen reichen. Klassisch-genetische Ansätze haben bereits mehrere Komponenten der Jasmonat-Signalwege aufgedeckt. Jedoch sind immer noch einige Fragen ungeklärt um die JA-Signalwege vollständig zu verstehen. Beispielsweise sind die diversen Signaleigenschaften verschiedener Jasmonate nicht gut aufgeklärt, die Rolle von Proteinkinasen und Phosphatasen ist noch nicht beschrieben und die molekulare Grundlage des Zusammenspiels mit anderen Phytohormonen ist ebenfalls unklar. Um diese Fragen zu klären habe ich einen chemisch-genetischen Ansatz verfolgt. Dieser bietet die Möglichkeit häufige Einschränkungen klassischer Genetik, wie Redundanz, Letalität und Pleiotropie von Genfunktionen zu umgehen, welche die Isolation geeigneter Mutanten verhindern könnten. Chemisch-genetische Ansätze zielen auf die Identifizierung chemischer Verbindungen ab, die in der Lage sind biologische Prozesse selektiv zu verändern. In meinem Projekt habe ich Testbedingungen für die Verwendung einer transgenen *Arabidopsis thaliana* Linie, die den JA-empfindlichen *AtVSP1p::GUS* -Reporter trägt etabliert, um selektive Modulatoren von JA-Signalwegen zu identifizieren. Ich habe 1460 Verbindungen getestet und hierbei einen Aktivator der Reporterexpression, sowie 10 Inhibitoren der MeJA-induzierten Reporterexpression identifiziert. Durch Validierung und nähere Charakterisierung dieser Kandidaten konnte ich drei neue, selektive, Inhibitoren von JA-Signalwegen bestätigen: BML-259, Nocodazol und L-cycloserin. Um die Wirkungsweise und molekulare Zielmoleküle dieser Verbindungen zu identifizieren habe ich zwei experimentelle Ansätze verfolgt: (1) Ich habe die Effekte der drei Verbindungen auf bekannte Komponenten des JA-Signalweges getestet und (2) ich habe Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) aufgestellt um Stellen dieser Verbindungen aufzuzeigen, die in Pulldown-Assays Marker binden können um Zielmoleküle zu identifizieren. BML-259, ein Inhibitor der menschlichen Cyclin-abhängigen Proteinkinase Cdk5/p25, inhibiert die meisten JA-induzierten Antworten. Analysen des BML-259 Effekts auf die JA-Signalkaskaden ergaben, dass das Zielmolekül höchst wahrscheinlich eine Proteinkinase downstream des SCF^{COI1}-medierten Abbaus des JAZ-Repressors ist. Dieser JAZ-Repressor ist wahrscheinlich an der Transkription JA-responsiver Gene beteiligt. Nocodazol inhibiert die Mikrotubulibildung, inhibierte alle JA-induzierten Vorgänge und blockierte die Homodimerisierung des JAZ-Repressors. Aus diesem Grund könnte es sinnvoll sein die biologische Rolle der JAZ-JAZ Homodimerisierung weiter aufzuklären. Der Nocodazol-vermittelte Effekt auf die JA-Signalkaskaden ist unabhängig von seiner Fähigkeit die Mikrotubulibildung zu inhibieren. L-cycloserin ist ein Inhibitor der Serin-Palmitoyltransferase (SPT) und verhinderte die

meisten JA-induzierten Prozesse. Seine Rolle in JA-Signalkaskaden ist jedoch nicht verbunden mit der Inhibierung der SPT. Dafür ist das L-cycloserin Zielmolekül downstream des SCF^{COI1}-Komplexes.

Abschließend lässt sich feststellen, dass mit Hilfe der SAR-Studien der ausgewählten Verbindungen, die essenziellen Einheiten für deren Aktivität definiert werden konnten und Markerbindestellen identifiziert wurden. Nachfolgende biochemische Experimente werden dabei helfen Zielmoleküle und Wirkmechanismen zu identifizieren. BML-259, Nocodazol und L-cycloserin können deshalb als wertvolle Werkzeuge dienen um weitere, bislang unbekannte Verbindungen des JA-Signalweges aufzugliedern. Weiterhin ist eine weitreichende Anwendung der chemischen Verbindungen möglich, da sie ebenfalls in der nicht-Modellpflanze Tomate JA-Signalkaskaden inhibieren konnten.