



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Analysis of gene expression in the outer cell layers of Arabidopsis roots during lateral root development

Veth-Tello, L.M.

Citation

Veth-Tello, L. M. (2005, March 2). *Analysis of gene expression in the outer cell layers of Arabidopsis roots during lateral root development*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/2315>

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/1887/2315>

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

Samenvatting

Zijwortels bieden planten de mogelijkheid om het wortelsysteem uit te breiden voor optimale benutting van water en voedingsstoffen uit de grond. In de modelplant *Arabidopsis thaliana* ontstaan zijwortels in een cellaag in de centrale cilinder van de wortel, de zogenaamde pericykel, vanwaar ze door de bovenliggende cellagen groeien zodat ze uiteindelijk naar buiten treden. Het wordt algemeen verondersteld dat het plantenhormoon auxine pericykelcellen activeert tot celdeling en daarmee tot de vorming en verdere ontwikkeling van zijwortels. Over het proces van zijwortelvorming in *Arabidopsis* zijn gedetailleerde beschrijvingen gepubliceerd, maar desondanks is weinig bekend over de rol van de bovenliggende cellagen in dit proces. *AIR1A*, *AIR1B* en *AIR3* zijn drie auxine-induceerbare *Arabidopsis* genen die zeer specifiek tot expressie komen in cellen die zich op de weg van de groeiende zijwortelprimordia bevinden, dat wil zeggen in de endodermis, de cortex en de epidermis van de wortel. Al voordat er sprake is van fysiek contact tussen cellen van het ontwikkelende zijwortelprimordium en cellen in de buitenste weefsellagen van de wortel blijken de *AIR1A*, *AIR1B* en *AIR3* genen al te zijn geactiveerd. Er is dus sprake van een zeer vroege interactie tussen zijwortelprimordium en bovenliggende cellagen.

AIR1A en *AIR1B* zijn twee bijna identieke genen die coderen voor eiwitten die vermoedelijk membraangebonden zijn. De *AIR1A* en *AIR1B* eiwitten tonen veel verwantschap met eiwitten van verschillende plantensoorten die een glycinerijke of prolinerijke regio bevatten. Het zou kunnen dat eiwitten met prolinerijke- of glycinerijke domeinen voor stevigheid van cellen zorgen door een fysieke koppeling te maken tussen plasmamembraan en celwand. In tegenstelling tot hun naaste verwanten bevatten *AIR1A* en *AIR1B* geen glycinerijke- of prolinerijke regio. Volgens de zojuist genoemde hypothese zouden *AIR1A* en *AIR1B* dan geen koppeling tussen plasmamembraan en celwand tot stand kunnen brengen. Hun aanwezigheid zou zelfs tot een verzwakking van de plasmamembraan-celwand connectie kunnen leiden wanneer zij de verwante eiwitten met een prolinerijk- of glycinerijk domein zouden verdringen. Hierdoor zou de uitgroei van zijwortels vergemakkelijkt kunnen worden.

AIR3 codeert voor een eiwit-afbrekend enzym dat lijkt te behoren tot de klasse van subtilisine endoproteases. Op grond van hun moleculaire kenmerken kan worden verondersteld dat *AIR3* en andere subtilisine-achtige endoproteases van planten

buiten de cel actief zijn. Wanneer door middel van AIR3 activiteit structurele eiwitten in de extracellulaire matrix van cellen in de ouderwortel afgebroken zouden kunnen worden draagt ook AIR3 expressie bij tot vergemakkelijking van zijworteluitgroei.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift was in het algemeen gericht op het verkrijgen van een beter begrip omtrent het proces van zijwortelvorming en dan met name op de rol van de genen *AIR1A*, *AIR1B* en *AIR3*. In samenhang daarmee was het van belang om na te gaan op welke manier de expressie van deze 'AIR' genen wordt gereguleerd. Voor dit doeleinde werd de expressie van de *AIR1* en *AIR3* genen in mutanten met afwijkende zijwortelvorming geanalyseerd (Hoofdstuk 2). Bij mutanten die weinig zijwortels vormen bleef de expressie van de *AIR1* en *AIR3* genen ongewijzigd. Bij mutanten die geen zijwortels vormen was geen *AIR1* of *AIR3* expressie te zien. Hier tegenover staat dat bij een mutant met verhoogde productie van zijwortels en van bijwortels (adventiefwortels) aan het hypocotyl een zeer sterke expressie van *AIR1* en *AIR3* was te zien in het wortelstelsel en in de buitenste cellagen van het hypocotyl (kiemstengel) waar zich adventiefwortels ontwikkelden. Deze resultaten tonen aan dat *AIR1* en *AIR3* genexpressie wat extra wortelvorming betreft niet strikt gebonden is aan het wortelstelsel.

Expressieanalyse suggereerde dat het hormoon auxine niet de directe aanjager van verhoogde expressie van *AIR1* en *AIR3* genen kan zijn. Het leek daarentegen waarschijnlijker dat het oorspronkelijke auxinesignaal door auxine-gestimuleerde pericykelcellen in een secundair signaal wordt vertaald om de expressie van de *AIR* genen in de buitenste cellagen te induceren. In Hoofdstuk 3 is de aandacht gericht op de identificatie van dit secundaire signaal. Hoewel in theorie verhoogde celdelingsactiviteit in de pericykel een signaal zou kunnen genereren dat door cellen in de buitenste weefsellagen wordt waargenomen bleek de *AIR1* en *AIR3* expressie niet te worden geblokkeerd door celdelingremmers. Verschillende plantensignaalstoffen werden getest op hun vermogen om de expressie van de *AIR* genen te induceren. Een mogelijke signaalkandidaat was ethyleen, aangezien auxine toevoeging de biosynthese van ethyleen stimuleert. Ethyleen bleek echter niet in staat de expressie van de *AIR* genen te verhogen. Bovendien was de *AIR1* en *AIR3* genexpressie niet veranderd in ethyleen ongevoelige mutanten. Deze resultaten bieden voldoende bewijs dat *AIR1* en *AIR3* genexpressie ethyleen onafhankelijk is.

Van de geteste plantensignaalstoffen was methyljasmonaat (MeJA) de enige stof die naast auxine *AIR1* kon induceren. Het expressiepatroon van *AIR1* na MeJA

inductie bleek identiek aan het patroon dat werd waargenomen na auxine inductie (Hoofdstuk 3). Voor het onderzoek naar de rol van MeJA kon gebruik worden gemaakt van de MeJA-ongevoelige *coi1-1* mutant. In *coi1-1* was het ongeïnduceerde *AIR1* expressiepatroon rond zijwortels ('ringen') en 'boven' zijwortelprimordia te zien, maar de auxine-induceerbare *GUS* expressie over de gehele lengte van de wortel was sterk geremd. Deze gegevens maakten duidelijk dat verschillende signalen betrokken zijn bij de basale (ongeïnduceerde) en de geïnduceerde expressie van het *AIR1* gen. Wat het *AIR1* gen betreft kan verondersteld worden dat auxine-gestimuleerde pericykelcellen van wortels (Me)JA synthetiseren en dat de stijging van de (Me)JA concentratie in de wortels het signaal is voor de geïnduceerde *AIR1* expressie. De verhoogde *AIR1* genexpressie na MeJA behandeling zou verklaard kunnen worden door versnelde afbraak van eiwitten (een proces waarbij de rol van COI1 recentelijk is aangetoond) die een negatief (remmend) effect hebben op *AIR1* expressie. In tegenstelling tot *AIR1* is *AIR3* genexpressie niet MeJA induceerbaar. Het secundaire signaal dat tot verhoogde *AIR3* genexpressie leidt na auxine toevoeging is nog onbekend.

Regulatie van genexpressie is meestal voor een groot deel afhankelijk van regulerende gebieden die zich voor het eiwitcoderende gedeelte van een gen bevinden. Deze gebieden van de *AIR1A*, *AIR1B* en *AIR3* genen zijn geanalyseerd in Hoofdstuk 4. Vergelijkingen tussen de DNA sequenties voorafgaand aan *AIR1A* en *AIR1B* lieten vijf sterk verwante regio's zien. Ondanks de grote overeenkomsten in zowel hun basale als hun geïnduceerde expressiepatroon bleek de DNA sequentie voorafgaand aan het *AIR3* gen totaal anders van structuur te zijn dan die van de *AIR1* genen. De DNA gebieden die vereist leken voor correcte expressie van de nabij gelegen eiwit-coderende gebieden zijn geïdentificeerd.

Omdat de volledige chromosomale DNA sequenties van *Arabidopsis* bekend zijn kon de chromosomale locatie van de *AIR* genen eenvoudig worden bepaald en konden deze gebieden worden geïnventariseerd. De *AIR1A* en *AIR1B* genen zijn gelegen op de lange arm van chromosoom vier en *AIR3* op de korte arm van chromosoom twee. *AIR1A* en *AIR1B* maken deel van een cluster van negen sterk verwante genen. Zes van deze genen bevatten een prolinerijk domein terwijl *AIR1A*, *AIR1B* en een daar ook gelegen 'AIR1A-achtig' gen geen prolinerijk domein hebben. De exacte functie van dit type eiwitten zonder een prolinerijk domein is nog onbekend.

Om de functie van het *AIR3* gen in *Arabidopsis* te bepalen zijn plantenlijnen met overexpressie van het *AIR3* gen gegenereerd en is een mutant met een defect *AIR3* gen

geïsoleerd (Hoofdstuk 5). Planten met overexpressie van het *AIR3* gen hadden aanzienlijk langere zijwortels dan het wildtype. In de lijnen met een defect *AIR3* gen waren geen duidelijke afwijkingen te zien. Het fenotype van de planten met *AIR3* overexpressie deed vermoeden dat deze planten een andere gevoeligheid hadden voor nitraat. In *Arabidopsis* kunnen lage nitraatconcentraties de groei van zijwortels stimuleren terwijl hoge nitraatconcentraties de groei van zijwortels remmen. Na behandeling van zaailingen met verschillende nitraatconcentraties bleek er een negatief effect van hoge nitraatconcentraties op de expressie van het *AIR3* gen te zijn. Er kan worden verondersteld dat het AIR3 eiwit een signaalpeptide genereert dat aan de oppervlakte van de cellen van de zijwortelprimordia wordt herkend. Dit signaalpeptide zou dan een serie van reacties genereren die tot een "programmering" van de groei van zijwortelprimordia zou kunnen leiden. Op die manier zou het wortelstelsel zich aan kunnen passen aan de voedingsomstandigheden in de grond.