



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Arabidopsis AGC3 kinases and PIN plasma membrane abundance

Gelderen, K. van

Citation

Gelderen, K. van. (2017, July 6). *Arabidopsis AGC3 kinases and PIN plasma membrane abundance*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/50504>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/50504>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/50504> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Gelderen, Kasper van

Title: Arabidopsis AGC3 kinases and PIN plasma membrane abundance

Issue Date: 2017-07-06

Samenvatting

Planten kunnen niet van standplaats veranderen moeten zich tijdens hun groei aanpassen aan de omgeving. De ontwikkeling van planten kan dynamisch worden aangepast door veranderingen in het groeihormoon auxine. Charles Darwin en Frits Went hebben ontdekt dat externe auxinebehandeling op graszaailingen de groeirichting van deze planten kan veranderen. Door onderzoek naar de modelplant *Arabidopsis thaliana* (zandraket) weten we inmiddels dat verschillen in auxineconcentraties tussen weefsels en tussen cellen bepalen waar in de plant organen zich ontwikkelen en in welke richting een plant groeit. Deze verschillen in auxinehoeveelheden worden bepaald door gereguleerd transport van cel naar cel. Gespecialiseerde auxinetransporteiwitten, die zich in het plasmamembraan van de cel bevinden, reguleren dit transport. Als het merendeel van deze eiwitten zich aan één kant van de cel bevindt, bepaalt dit de richting van het auxinetransport. De meest bekende van dit soort eiwitten zijn de PIN-FORMED (PIN) eiwitten en deze zogenoemde PINs zijn ofwel apicaal/basaal (respectievelijk richting scheut of wortel) ofwel lateraal (naar de één van de beide zijanten) georiënteerd in het plasmamembraan van de cel. Doordat PIN eiwitten actief auxine uit de cel transporteren geven zij een richting aan het transport. Wanneer PIN-polariteit verstoord wordt heeft dat een groot effect op de groei en ontwikkeling van de plant, doordat de auxineverschillen tussen weefsels verstoord worden. De *pin* mutant, met verlies van functie van PIN eiwitten, heeft een bloeiwijze zonder bloemen, die er uit ziet als een speldenpunt. Naast de regulering van plantontwikkeling geeft de controle over PIN-polariteit de plant ook de mogelijkheid om zijn groei aan te passen aan wisselende omstandigheden, zoals een verandering van de richting van het licht. PIN eiwitten zijn opgebouwd uit twee stukken transmembraandomein, verbonden door een hydrofiele lus (HL), die in het cytosol steekt. PIN5 en PIN8 hebben een korte HL, terwijl PIN1,2,3,4,6 en 7 een lange HL hebben. Aan deze (lange) HL kan een fosfaatgroep worden toegevoegd. Deze zogenoemde fosforylatie, die de conformationele energie van het eiwit verhoogt, wordt uitgevoerd door de AGCVIII type Serine/Threonine kinase PINOID (PID). Het groeifotype van de *pid* mutant lijkt op dat van *pin* en dit komt doordat in deze mutant de polariteit van PIN1 basaal is en niet apicaal, waardoor er minder efficiënt auxineverschillen gevormd kunnen worden in het scheutmeristeem. PID heeft enkele homologe eiwitten in *Arabidopsis*, te weten WAG1, WAG2 en AGC3-4. Samen met PID vormen deze eiwitten de groep van AGC3 kinases. De AGC3 kinases fosforyleren de PIN HL op enkele geconserveerde aminozuren in het motief TPRXS₂. Mutatie van de Serines naar Alanines in deze motieven (PIN1 S1,2,3A) resulteert in *pin-formed* bloeiwijzen, gelijk aan de *pin* mutant.

In dit proefschrift wordt onderzoek beschreven aan deze AGC3 kinases. **Hoofdstuk 1** is een introductie in het veld van PIN-polariteit en -fosforylatie. Ook wordt er een moleculair fylogenetische analyse gepresenteerd van de AGC3 kinases in verschillende

plantensoorten. Deze laat zien dat de mechanismen van PIN fosforylatie en de bijbehorende AGC3 kinases al aanwezig en geconserveerd waren in de eerste landplanten. **Hoofdstuk 2** beschrijft de analyse van het AGC3-4 gen en hier laten we zien dat AGC3-4 de PIN2 HL kan fosforyleren op bijna dezelfde manier als PID. Vergeleken met PID heeft AGC3-4 echter een tegengesteld effect op PINs en bevordert het de basale lokalisatie van PIN1 en PIN2. Dit komt waarschijnlijk doordat AGC3-4 zich ook in de kern bevindt en anders gelokaliseerd is dan PID binnen de cel. **Hoofdstuk 3** gaat over het proces van PIN afbraak. PINs kunnen actief naar de vacuole worden getransporteerd en daar worden afgebroken. In dit hoofdstuk laten we zien dat fosforylatie van PIN1 en PIN2 door AGC3 kinases de vacuolaire sortering tegengaat en daardoor de hoeveelheid PINs op het plasmamembraan van de cel verhoogt. Dit betekent dat AGC3 kinases, naast het eerder beschreven effect op polariteit, ook een positief effect hebben op de hoeveelheid PINs op het plasmamembraan, waardoor ze dus indirect de hoeveelheid auxinetransport verhogen. **Hoofdstuk 4** beschrijft het proces van zaadverspreiding van *Arabidopsis*. Wanneer *Arabidopsis* vruchten rijpen wordt er langs de rand tussen de vruchthokken een zwakke rij cellen aangelegd, waarlangs de vrucht kan opengaan wanneer deze verhout. Hierdoor kunnen de zaden vrijkomen en worden verspreid. De aanleg van deze rij cellen, de openingszone, wordt bepaald door de transcriptiefactor INDEHISCENT (IND) en is ook afhankelijk van auxine. IND werkt samen met andere transcriptiefactoren in de regulatie van dit proces en kan op deze manier onder andere de transcriptie van PID verlagen. De data in dit hoofdstuk toont aan dat de aanleg van de openingszone al vroeg tijdens de vruchtaanleg gebeurt en dat de hoeveelheid PIN3 in het plasmamembraan van de cel belangrijk is om te zorgen voor een auxineverandering die het startschot vormt voor de aanleg van deze rij cellen. IND er voor zorgt dat er minder PID wordt gemaakt, waardoor er minder PIN3 in het membraan komt en er een auxinemaximum ontstaat. Op deze manier draagt PID bij aan de zaadverspreiding van *Arabidopsis*. **Hoofdstuk 5** heeft als onderwerp de groep de MAB4/MEL eiwitten, die ook belangrijk zijn voor PIN polariteit, maar waarvan de precieze functie nog onbekend is. Wij beschrijven dat PID en PIN1/2 kunnen binden met MAB4/MELs en dat deze binding tot doel heeft PIN eiwitten te stabiliseren in het plasmamembraan, waardoor de PIN polariteit bevordert wordt. De interacties tussen MAB4/MELs en PINs kunnen de PINs beschermen tegen de-fosforylatie en versterken de onderlinge interacties tussen de PIN transmembraan delen. Door MAB4 dichtbij de PIN HL te brengen en de HL te fosforyleren bevordert PID de binding tussen MAB4 en de PIN HL en daarmee de stabiliteit van het PIN complex in het membraan. **Hoofdstuk 6** behandelt een mogelijke rol van de AGC3 kinases in de kern. PIN eiwitten zijn normaliter niet in de kern te vinden, echter sommige AGC3 kinases kan men daar wel aantreffen. Aangezien zij daar dus geen PIN eiwitten kunnen fosforyleren is het aannemelijk dat deze AGC3 kinases in de kern andere eiwitten fosforyleren. Wij laten zien dat PID en AGC3-4 kunnen binden aan de COP1 en CSN eiwitten, die als functie hebben om de groei van zaailingen

in het donker te reguleren. Overexpressie van AGC3-4 en PID eiwitten in de plant leidt tot zaailingen die in het donker groeien alsof ze in het licht zijn, een groeifenotype dat ook bekend is van zwakke *cop1* verlies-van-functie mutanten. Door PID kunstmatig naar de kern te brengen versterken wij deze fenotypes en daarnaast laten we zien dat COP1 en CSN door PID en AGC3-4 gefosforyleerd kunnen worden, wat het aannemelijk maakt dat COP1 en CSN door deze AGC3 kinases negatief gereguleerd worden.

