



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Calcium-dependent regulation of auxin transport in plant development

Wei, X.

Citation

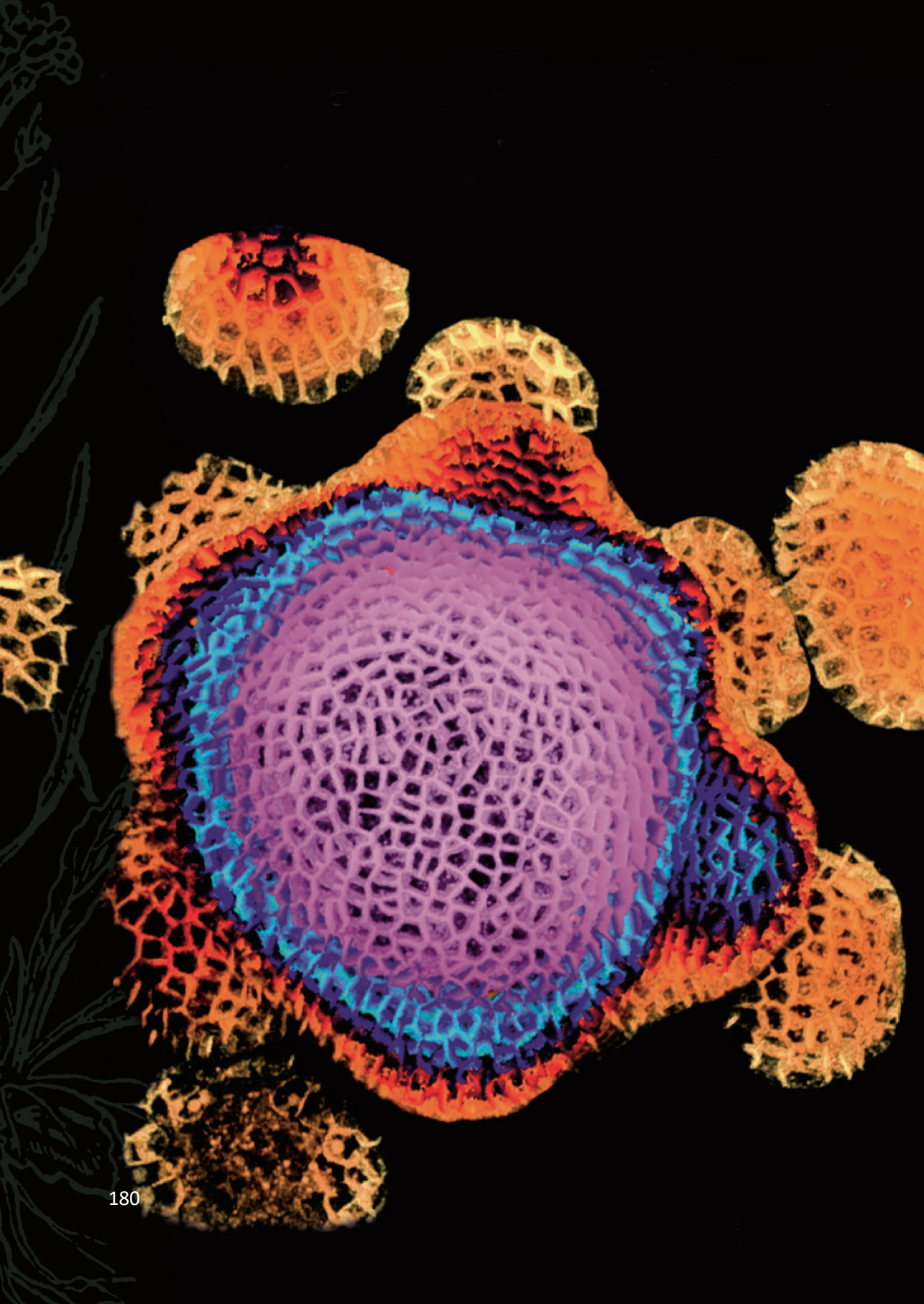
Wei, X. (2024, January 11). *Calcium-dependent regulation of auxin transport in plant development*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3677385>

Version: 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/1887/3677385>

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



Samenvatting

Vanwege hun sessiele levenswijze hebben planten een vernuftig systeem ontwikkeld om te overleven in hun steeds veranderende en vaak ongunstige omgeving. Het plantenhormoon auxine speelt daarbij een centrale rol, mede omdat het zeer basale cellulaire processen reguleert, zoals celdeling, groei en differentiatie. Het is daardoor betrokken bij een grote verscheidenheid aan biologische processen die de groei en ontwikkeling van planten bevorderen en beïnvloeden in reactie op een breed scala aan endogene en omgevingssignalen.

De afgelopen decennia is er een schat aan informatie over de biosynthese, het metabolisme, het transport en de signalering van auxine beschikbaar gekomen. In **Hoofdstuk 1** worden een aantal van deze processen besproken, met de nadruk op auxineperceptie en signaaltransductie, de distributie van het hormoon door PIN-FORMED (PIN) auxine-efflux carrier-gedreven polair auxinetransport (PAT), en hoe het bivalente kation calcium (Ca^{2+}), een universele tweede boodschapper, betrokken is bij het vertalen van zowel endogene als omgevingssignalen in auxine-gemedieerde ontwikkeling en groei. Intensief onderzoek heeft de afgelopen jaren verschillende signaaltransductieroutes voor auxine aan het licht gebracht. De standaard auxine-signalering vindt plaats in de kern, waarbij de TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1)/AUXIN-SIGNALING F-BOX (AFB) F-box-eiwitten, door auxine-gemedieerde rekrutering en ubiquitinering van Aux/IAA-repressoreiwitten, AUXINE RESPONS FACTOREN (ARF) vrijmaken om gentranscriptie te activeren. Daarnaast is er de herontdekte AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1) signaalroute, waarbij gecoördineerde binding van auxine aan ABP1 en het plasmamembraan (PM) gelokaliseerde TRANSMEMBRANE KINASE 1 (TMK1) onder andere leidt tot celwandverzuring door activering van H^+ -ATPasen. Bovendien heeft identificatie van de rol van S-Phase Kinase-Associated Protein 2A (SKP2A), ARF3 en IAA32/33/34 in auxinesignaaltransductie een beter begrip opgeleverd van de complexiteit van de

cellulaire auxine responsen. Vervolgens wordt de huidige kennis over het PIN-gedreven PAT behandeld. De richting en snelheid van de intercellulaire auxinestroom is voornamelijk afhankelijk van de asymmetrische lokalisatie en activiteit van PIN eiwitten aan het PM, waarbij Ca^{2+} -signalering betrokken is, en die wordt gereguleerd door fosforylering van de centrale hydrofiele lus in PIN eiwitten door plant-specifieke AGC proteïnekinasen.

Eén van deze AGC proteïnekinasen in *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis), het membraan-geassocieerde AGC3-kinase PINOID (PID), is een belangrijke regulator van PAT en fungeert als een binaire schakelaar in de apicaal-basale polaire targeting van PIN auxine-effluxcarriers naar het PM, die daarmee de richting van de auxinestroom bepalen. Eerder was gevonden dat PID op een Ca^{2+} -afhankelijke wijze interacteert met CALMODULIN-LIKE 12/TOUCH 3 (CML12/TCH3) en met het EF-hand-bevattende PID-BINDING PROTEIN 1 (PBP1). Deze vinding leverde één van de eerste moleculaire inzichten hoe Ca^{2+} mogelijk betrokken is bij de regulering van PAT. CML12/TCH3-binding inhibeert de activiteit van het PID-kinase, zowel *in vitro* als *in vivo*, en de interactie met CML12/TCH3 zorgt ervoor dat het PID kinase van het PM naar het cytosol beweegt. Bovendien veroorzaken verhoogde lokale auxineconcentraties een transiënte toename van de Ca^{2+} niveaus in het cytosol en een snelle en significante toename in *CML12/TCH3* expressie. Voortbouwend op deze eerdere bevindingen, wordt aan het einde van **Hoofdstuk 1** een alternatief model voor de rol van Ca^{2+} -afhankelijke CML12/TCH3-PID-signalering in de terugkoppeling van auxine op PIN polariteit voorgesteld.

In **Hoofdstuk 2** is de Ca^{2+} -afhankelijke regulering van het PID kinase door CML12/TCH3 verder onderzocht. De *tch3* verlies-van-functie mutant vertoont slechts een mild fenotype, wat suggereert dat andere CMLs en mogelijk ook CaMs redundant functioneren met CML12/TCH3. De eerste stap was daarom te testen of andere CMLs of CaMs met PID interacteren. Door middel van *in vitro* pull-downs en de Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)-assay is aangetoond dat een specifieke groep bestaande uit zeven CaMs en drie CMLs (CML8, CML10,

CML11), die het nauw verwant zijn aan CML12/TCH3, ook interacteren met PID. Co-expressie in Arabidopsis protoplasten van PID met deze CaM/CMLs in de aanwezigheid van auxine resulteerde in dissociatie van PID van het PM. Vervolgens is met behulp van *promoter:GUS* reporterfusies de spatio-temporele expressie van de overeenkomstige *CaM/CML* genen en *PID* met elkaar vergeleken. Deze analyse liet zien dat de betreffende *CaM/CML* genen in de meeste weefsels gedurende alle ontwikkelingsstadia tot expressie komen, en dat de expressiepatronen naast duidelijke verschillen ook grotendeels overlappen.

De resultaten suggereren dat er functionele redundantie bestaat tussen de CaM/CMLs die met het PID kinase interacteren. Om deze redundantie te omzeilen en daarmee de biologische functie van de CaM/CML-PID-interactie te kunnen bestuderen, is in **Hoofdstuk 3** het CaM/CML-bindend domein in PID in kaart gebracht. Het hoofddoel was aminozuren te identificeren die verantwoordelijk zijn voor CaM/CML-binding, om met deze kennis door middel van aminozuursubstituties 'untouchable' maar nog steeds functionele versies van PID te genereren. Complementatie van de *pid* verlies-van functie mutant met deze versies zou dan de rol van de Ca^{2+} -afhankelijke CaM/CML-binding aan PID moeten onthullen. Allereerst hebben we bevestigd dat PID zich associeert met het PM via het insertiedomein (ID) in het katalytische kinase domein. Vervolgens is het CaM/CML-bindende domein in PID in kaart gebracht. Het onderzoek toonde aan dat zowel CaM/CML-binding als PM-associatie plaats vindt via een amfipatische alfa-helix in het ID van PID. Verstoring van deze amfipatische alfa-helix door substitutie van positief geladen arginines door alanines (R-naar-A) verstoorte zowel CaM/CML-binding als PM-associatie. Verrassend genoeg resulteerde overexpressie van deze PID(R-naar-A) versies in dezelfde fenotypes als wildtype PID en complementeerden ze, wanneer tot expressie gebracht onder de *PID* promotor, het pin-achtige bloeiwijzefenotype van de *pid* mutant. Deze resultaten geven aan dat PM-associatie niet essentieel is voor PID functie en dat de 'untouchable' PID(R-naar-A) versies ons in staat stellen om eindelijk de rol van de

Ca²⁺-afhankelijke PID-CaM/CML interactie in de ontwikkeling van planten te ontrafelen.

In **Hoofdstuk 4** zijn de plantenlijnen die ‘untouchable’ PID(R-naar-A) versies onder de *PID* promoter in de *pid* mutante achtergrond tot expressie brengen in meer detail geanalyseerd. De zaailingontwikkeling en bloeitijd van deze planten bleek vergelijkbaar met wildtype Arabidopsis. Nadere inspectie van de bloeiwijzen bracht echter duidelijke afwijkingen in de spiraalvormige phyllotaxis aan het licht, variërend van afwijkende divergentiehoeken tussen opeenvolgende bloemen en vruchten tot de gelijktijdige initiatie van bloemprimordia. Deze fenotypes kwamen overeen met een toename in het aantal en de gerandomiseerde positie van PIN-convergentiepunten en de resulterende auxinemaxima in de bloeiwijzemeristemen van deze planten.

De resultaten beschreven in dit proefschrift geven nieuwe inzichten in hoe signalen zoals auxine en mechanische stress, die orgaanvorming in het Arabidopsis bloeimeristeem sturen, via Ca²⁺-signalering worden geïntegreerd door de CaM/CML-PID module, die daarmee zorg draagt voor een robuuste spiraal fyllotaxis die typisch is voor de Arabidopsis bloeiwijze.

