Universiteit
Leiden
The Netherlands

Forever young: how AHL15 delays developmental phase transitions to prevent ageing in plants

Luden, T.

Citation
Luden, T. (2025, May 28). *Forever young: how AHL15 delays developmental phase transitions to prevent ageing in plants*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/4247279

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/1887/4247279

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

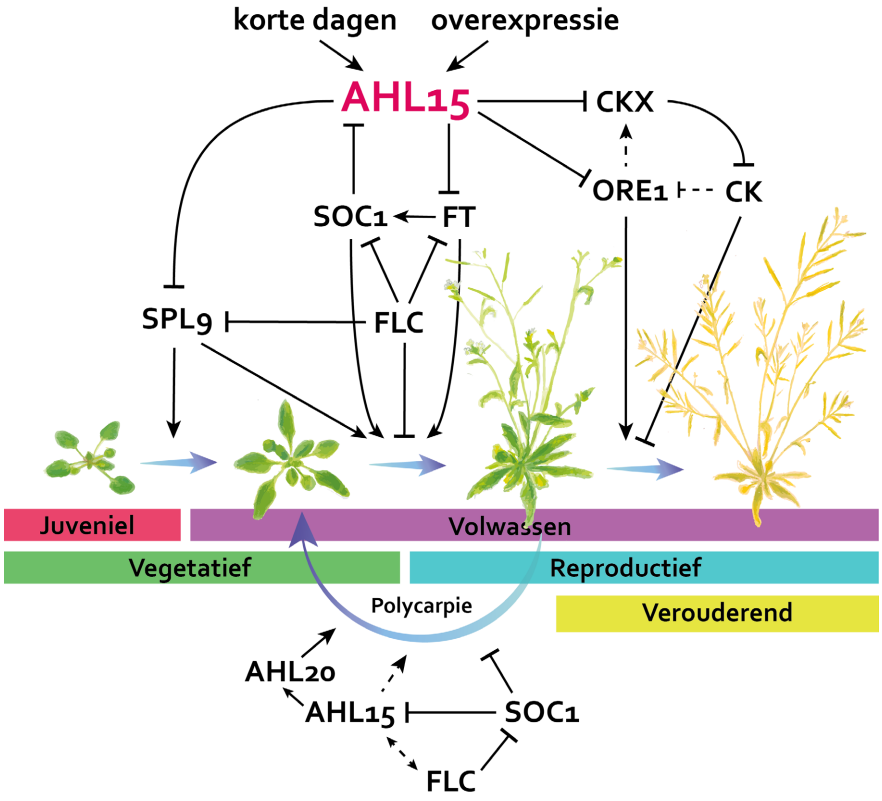
Samenvatting

Veroudering vindt plaats in alle organismen, en is een gevolg van het ondergaan van opeenvolgende stadia in de ontwikkeling. Planten ondergaan gedurende hun levensloop verschillende ontwikkelingsstadia, en de overgangen tussen opeenvolgende ontwikkelingsstadia worden ook wel fasetransities genoemd. Voorbeelden hiervan zijn de transitie van juveniele zaailingen naar volwassen planten tijdens de vegetatieve fase, en de transitie van volwassen vegetatieve planten naar een reproductieve staat. Deze fasetransities in de ontwikkeling zijn nauw gereguleerde processen die door verschillende factoren worden beïnvloed, waaronder leeftijd, fytohormonen en omgevingsfactoren zoals licht en temperatuur. Elk van deze factoren heeft invloed op de expressie en activiteit van kern-gelokaliseerde eiwitten genaamd transcriptiefactoren (TFs) die DNA kunnen binden en daarmee de expressie van genen reguleren.

Veel TFs komen tot expressie op een specifiek tijdstip in de ontwikkeling, en kunnen de fasetransitie tussen twee ontwikkelingsstadia bevorderen dan wel remmen door de transcriptie van hun targetgenen aan of uit te zetten. Andere eiwittypen kunnen ook effect hebben op fasetransities door bijvoorbeeld de concentratie van fytohormonen te veranderen, door het overbrengen/waarnemen van omgevingsfactoren of door de fysieke structuur van het DNA aan te passen via directe interactie daarmee. Dit laatste proces kan ontwikkelingstransities beïnvloeden wanneer de epigenetische code of de 3D-structuur van het DNA zodanig wordt veranderd dat het vermogen van TFs om de expressie van hun targetgenen te reguleren wordt gehinderd.

Het onderzoek in dit proefschrift is een vervolg op de eerdere ontdekking dat het AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED 15 (AHL15) eiwit fungeert als algemene suppressor van fasetransities tussen ontwikkelingsstadia in de modelplant *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis). We focussen hierbij op de rol van AHL15 in twee specifieke fasetransities en op de functie van AHL15 als regulator van gentranscriptie.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de huidige kennis over hoe fasetransities tussen ontwikkelingsstadia worden gereguleerd in de modelplant Arabidopsis, met een nadruk op de functie van TFs in deze processen. We beschrijven de levenscyclus van Arabidopsis en een aantal specifieke fasetransities tijdens de vegetatieve en reproductieve stadia (Figuur 1). Tijdens de vegetatieve fase ondergaan Arabidopsisplanten een transitie tussen de juveniele en volwassen fase waarbij met name de bladmorfologie wordt beïnvloed, een proces dat ook wel vegetatieve faseverandering (VFV) wordt genoemd. VFV wordt onderdrukt door verschillende juveniele fase-specifieke factoren, waaronder AHL15 en het microRNA miR156, die beiden hoog tot expressie komen in



Figuur 1: De effecten van verhoogde *AHL15* expressie op de fasetransitites tussen ontwikkelingsstadia in de monocarpe soort Arabidopsis. **Boven:** AHL15 vertraagt de fasetransities tussen ontwikkelingsstadia door de expressie van verschillende genen te onderdrukken wanneer het hoog tot expressie wordt gebracht. *AHL15* komt sterk tot expressie wanneer de plant in korte dag condities wordt gegroeid, of in transgene planten met een overexpressieconstruct. De juveniel-naar-volwassen transitie wordt bevorderd door SPL9, waarvan de expressie wordt onderdrukt in plantenlijnen met sterke *AHL15* expressie. Bloei wordt bevorderd door SOC1 en FT, die beiden worden onderdrukt door FLC. AHL15 remt bloei door de expressie van *FT* te represseren, en *AHL15* expressie wordt tijdens de bloeifase door SOC1 onderdrukt. AHL15 remt ook de bladveroudering door de expressie van *ORE1* en *CKX* genen direct te remmen. ORE1 is een TF die als hoofdregulator van bladveroudering fungeert, en het bladverouderingsprogramma dat door ORE1 in gang wordt gezet induceert ook de expressie van *CKX* genen. CKX eiwitten inactiveren cytokinines (CKs), fytohormonen die de bladveroudering remmen. **Onder:** Regulatie van polycarpie door bloeigenen en *AHL* genen. FLC is een repressor van *SOC1* en veel andere bloei-stimulerende genen, en helpt in polycarpe soorten bij het behouden van de vegetatieve staat tijdens het bloeien. Het expressieniveau van *SOC1* correleert sterk negatief met polycarpe eigenschappen, wat aangeeft dat dit gen een repressor van dit fenotype is. *AHL15* wordt gerepresseerd door SOC1, en hoge expressie van *AHL15* is geassocieerd met polycarpe eigenschappen. Het aan *AHL15* nauw verwante gen *AHL20* laat een significant positieve correlatie zien met polycarpe eigenschappen, wat suggereert dat dit gen betrokken is bij polycarpe ontwikkeling. Daarnaast bestaat er een positieve correlatie tussen de expressie van *AHL15* en *FLC*, maar de interactie tussen deze twee genen is vooralsnog onduidelijk.

jonge planten. Deze factoren onderdrukken de expressie van leden van de *SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE* (*SPL*) TF genfamilie op respectievelijk pre- en post-transcriptionele wijze. *SPL* genen stimuleren de volwassen staat, en hun repressie neemt af naar mate de ontwikkeling van planten vordert, wat resulteert in VFV en een volwassen morfologie.

Volwassen planten ondergaan vervolgens de bloeitransitie, een faseverandering die gevoelig is voor verscheidene factoren. In Arabidopsis wordt de bloeitransitie gestimuleerd door groei in lange dagen via activatie van het bloei-inducerende mobiele *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) eiwit. Daarnaast wordt de expressie van de bloeirepressor *FLOWERING LOCUS C (FLC)* gedempt wanneer de plant bloot wordt gesteld aan langdurige kou (vernalisatie). FT en FLC hebben respectievelijk een activerend- en remmend effect op de expressie van meerdere genen die betrokken zijn bij de bloei, en de bloeitransitie wordt in gang gezet wanneer de signalen die bloei stimuleren sterker zijn dan de remmende signalen. Dit leidt vervolgens tot formatie van een bloeiwijze, waarvan de vorm bepaald wordt door het ruimtelijke patroon waarop genen die de aanmaak van bloem-specifieke weefsels positief of negatief reguleren tot expressie komen.

Bloei activeert ook een proces van veroudering in de rozetbladeren van Arabidopsisplanten, wat helpt bij het herverdelen van nutriënten vanuit oudere bladeren naar jonge en nieuw ontwikkelende weefsels zoals de bloemen en zaden. Bladveroudering wordt gereguleerd door meerdere TFs, waaronder ETHYLENE INSENSITIVE 3 (EIN3), ORESARA1 (ORE1) en NAC-LIKE ACTIVATED BY AP3/PI (NAP). Deze TFs reguleren zowel de expressie van genen die betrokken zijn bij de afbraak van chlorofyl (Chl) als de expressie van andere TFs die andere processen in het bladverouderingsproces in gang zetten. Daarnaast wordt bladveroudering ook sterk beïnvloed door fytohormonen, waarbij ethyleen de meest bekende promotor van veroudering is en cytokinines (CKs) juist als remmers van dit proces optreden. We bespreken ook de verschillen tussen plantensoorten die na het bloeien een volledig verouderingsproces ondergaan en vervolgens sterven (monocarpen) en planten die tijdens en na het bloeien hun vegetatieve groei kunnen voortzetten en daardoor opnieuw kunnen bloeien (polycarpen). We beschrijven hoe FLC polycarpe ontwikkeling in *Brassicaceae* soorten promoot door de bloeitransitie te onderdrukken in de axillaire meristemen (AMs), en bespreken de rol van de TF FRUITFULL (FUL) en van CKs in het reguleren van de levensduur van de bloeiwijze. Aan het eind van **hoofdstuk 1** bespreken we de huidige kennis over de *AT-HOOK MOTIF NUCLEAR LOCALIZED* (*AHL*) genfamilie en benadrukken de rol van *AHL15* en

de effecten van dit gen op de ontwikkelingsbiologie van planten.

In hoofdstuk 2 hebben we gebruik gemaakt van een panel van Arabidopsis ecotypen die luchtrozetten vormen, een polycarpe eigenschap die ook in Arabidopsis lijnen waarin *AHL15* tot overexpressie is gebracht voorkomt, om de rol van *AHL15* en andere genen in dit fenotype te onderzoeken. Hiervoor kwantificeerden we het luchtrozet-fenotype en laten zien dat deze eigenschap zeer variabel is en een positieve correlatie vertoont met de expressie van *FLC* en van *AHL20,* een nauwe verwant van *AHL15.* We tonen ook aan dat de expressie van *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1)*, een bloeistimulerende TF die de expressie van *AHL15* onderdrukt, sterk negatief correleert met het luchtrozet-fenotype en dat er een vergelijkbare maar zwakkere correlatie te zien is met de expressie van *SPL15*, een gen dat de volwassen fase promoot. Tot slot laten we zien dat repressie van *FLC* expressie door vernalisatie leidt tot een volledig verlies van het luchtrozet-fenotype, wat aantoont dat FLC de belangrijkste regulator van luchtrozetvorming is in deze ecotypen (Figuur 1). Onze resultaten tonen aan dat een panel van fenotypisch diverse ecotypen kan worden gebruikt om gen-naar-fenotype relaties te onderzoeken en dat natuurlijke variatie in Arabidopsis, een als monocarp beschouwde soort, kan worden gebruikt om polycarpe ontwikkeling te onderzoeken.

Eén van de fasetransities die door AHL15 wordt onderdrukt is bladveroudering, een proces waarbij Chl wordt afgebroken met een zichtbare verkleuring van het blad van groen naar geel als resultaat. Om dit proces op een efficiëntere manier te bestuderen ontwikkelden we een protocol waarbij bladkeur wordt gebruikt om de hoeveelheid Chl in bladeren te meten. In **hoofdstuk 3** beschrijven we een snelle, niet-destructieve methode om de hoeveelheid Chl in bladeren te meten met behulp van digitale foto's. We ontwikkelden hiervoor een plugin die in de ImageJ software kan worden gebruikt en waarmee bladeren automatisch worden gedetecteerd zodat de pixelintensiteit in de groene, rode en blauwe kanalen van 8-bits foto's kan worden gemeten. Deze waarden worden vervolgens gebruikt om verschillende visuele kleurindexen te berekenen, waarvan de genormaliseerde roodwaarde (R/(R+G+B)) de sterkste correlatie toont met een traditionele, arbeidsintensieve methode van Chl meting.

We pasten deze nieuwe meetmethode toe om de hoeveelheid Chl in de bladeren van een groot aantal genotypes van sla te bepalen voor een genoom-wijde associatie studie (GWAS). Met deze data identificeerden we een significante piek rond een locus waarvan in een eerdere GWAS waarbij gebruik werd gemaakt van een traditionele Chl meetmethode was aangetoond dat het betrokken is bij chloroplastontwikkeling. Dit resultaat demonstreert dat het

meten van Chl op basis van digitale foto's een geschikt en efficiënter alternatief vormt voor de arbeidsintensieve methode van Chl extractie, en dat het kan worden toegepast in systemen waarbij een hoge doorvoer gewenst is.

In **hoofdstuk 4** hebben we de methode die wordt beschreven in **hoofdstuk 3** toegepast om het effect van AHL15 op bladveroudering te meten. We tonen aan dat overexpressie van *AHL15* de bladveroudering vertraagt, zowel tijdens de natuurlijke levensloop van de plant als wanneer bladveroudering wordt geïnduceerd door incubatie in het donker. Planten waarbij het *ahl15* gen niet meer functioneert lieten een licht maar significante versnelling van bladveroudering zien, wat aangeeft dat AHL15 een remmend effect heeft op de bladveroudering. We onderzochten ook welke door AHL15 gereguleerde genen een rol spelen in dit proces, en vonden dat AHL15 de expressie van *ORE1,* een master-regulator van bladveroudering direct onderdrukt. Daarnaast tonen we aan dat de expressie van genen in de *CYTOKININ OXIDASE (CKX)* familie, die coderen voor enzymen die CKs afbreken, door AHL15 wordt onderdrukt, wat resulteert in een vertraagde afbraak van CK tijdens door donker geïnduceerde bladveroudering. AHL15 remt zo de bladveroudering op twee manieren: door het onderdrukken van *ORE1* en door het verhinderen van CK afbraak (Figuur 1).

Tot slot hebben we in **hoofdstuk 5** onderzocht waar in het genoom AHL15 bindt en hoe het genexpressie reguleert. We tonen aan dat AHL15 bij voorkeur bindt in de regio stroomopwaarts van de transcriptie start site (TSS) en net na de transcriptie eind site (TES) van genen, en dat het vrijwel afwezig is in de genen zelf. We laten ook zien dat AHL15 sterker aan het DNA bindt wanneer het tot overexpressie wordt gebracht. Daarnaast bindt AHL15 in deze condities ook nieuwe plaatsen in het DNA, maar met een lagere affiniteit dan bij de oorspronkelijke bindingsplaatsen. Vervolgens laten we zien dat in *p35S:AHL15-GR* planten waarin het AHL15-GR fusie-eiwit door behandeling met DEX naar de nucleus wordt getransporteerd het transcriptoom grote veranderingen ondergaat, waarbij het merendeel van de genen lager tot expressie komt. Één van de genen waarvan de expressie op deze manier wordt onderdrukt is *FT* (Figuur 1), wat de vertraagde bloei in *AHL15* overexpressielijnen verklaart. Interessant genoeg bleek de affiniteit waarmee AHL15 de TSS en TES van genen die anders tot expressie kwamen bindt hoger dan bij genen waarvan de expressie niet veranderde door behandeling met DEX. Pieken van AHL15 binding waren het sterkst verrijkt bij de TSS van omhoog-gereguleerde genen, terwijl genen die verlaagd tot expressie kwamen de sterkste AHL15 verrijking hadden bij de TES. Dit suggereert dat de expressie van een gen beïnvloed wordt door de locatie waar AHL15 ten opzichte van dit gen bindt.

We onderzochten ook het effect van AHL15 op de toegankelijkheid van het chromatine door ATAC-seq toe te passen op DEX behandelde planten, en vonden tot onze verrassing dat activatie van AHL15-GR hier geen invloed op heeft. Een vergelijking van de chromatinetoegankelijkheid (ATAC-seq) met de locatie van AHL15 bindingsplaatsen (ChIP-seq) liet zien dat AHL15 bij voorkeur bindt in regio's met verlaagde chromatine toegankelijkheid die zich tussen gebieden met hoge toegankelijkheid bevinden. Vervolgens maakten we gebruik van reeds gepubliceerde data over de positie van verschillende epigenetische markers om eenzelfde vergelijking te maken. Dit wees uit dat AHL15 vooral bindt in regio's net naast gebieden in het DNA met verhoogde epigenetische modificatie. Dit laat zien dat AHL15 en waarschijnlijk ook andere eiwitten uit de AHL familie een hoge affiniteit heeft voor regio's met verlaagde toegankelijkheid met weinig epigenetische modificaties.

Tot slot laten we zien dat AHL15 het DNA op vergelijkbare plekken bindt als het high-mobility group A (HMGA) eiwit GH1-HMGA2/HON5, dat meerdere DNA bindende AT-HOOK domeinen bevat. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat GH1-HMGA2/HON5 de vorming van genlussen, die nodig zijn voor efficiënte transcriptie van een gen, verhindert. De overlap tussen de DNA bindingsplaatsen van AHL15 en GH1-HMGA2/HON5 suggereert dat AHL15 een vergelijkbare rol zou kunnen spelen in de 3D organisatie van het DNA, en daarmee genexpressie zou kunnen beïnvloeden, wat zou verklaren waarom *AHL15* overexpressie zo'n sterk effect heeft op de ontwikkeling van planten.

Samengevat onthullen onze genoom-wijde analyses dat AHL15 als een transcriptionele regulator werkt die DNA bindt met weinig voorkeur voor specifieke sequenties, maar met een hoge voorkeur voor regio's met minder epigenetische modificaties. Daarnaast laten we zien dat deze voorkeuren overlappen met die van een andere klasse van eiwitten die de chromatinestructuur kunnen aanpassen, wat suggereert dat de grootschalige veranderingen van genexpressie die door AHL15 het resultaat zijn van veranderingen in de chromatineconfirmatie. Door deze informatie te combineren met fenotypische- en genexpressie data laten we zien dat AHL15 de expressie van verscheidene TFs die betrokken zijn bij ontwikkelingsprocessen onderdrukt, en daarmee de fasetransities die gelinkt zijn met veroudering tegenhoudt. Dit onderzoek levert nieuwe inzichten op over hoe verouderingsprocessen worden gereguleerd in planten en mogelijke manieren waarop deze processen kunnen worden geremd of versneld.