



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Genes controlling the development and function of plant vacuoles

Li, Y.

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Li, Y. (2017). Genes controlling the development and function of plant vacuoles.

General rights

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Disclaimer/Complaints regulations

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <http://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

Samenvatting

Het doel van het onderzoek dat is beschreven in dit proefschrift was om nieuwe en diepere inzichten te verkrijgen in de biogenese, functie en dynamiek van vacuolen. De vacuole is het grootste organel in plantencellen en kan tot 90% van het celvolume in beslag nemen. Het is ook het meest mysterieuze organel. In tegenstelling tot andere organellen, zoals mitochondriën, chloroplasten, heeft de vacuole een reeks van verschillende functies, die bovendien ook nog wisselt tussen verschillende celtypes van een organisme, en ook tussen verschillende soorten. De verscheidenheid van vacuolaire functies wordt voor een groot deel bepaald door de aan-of afwezigheid van specifieke eiwitten.

Vacuolaire processen, zoals transport van laag moleculaire verbindingen, eiwitten en membraanblaasjes (“vesicles”) van of naar de vacuole, zijn tot nu toe vooral bestudeerd middels fysiologische en/of celbiologische strategieën. Het onderzoek in dit proefschrift berust vooral op een moleculair genetische aanpak, gebruikmakend van mutanten en natuurlijke variatie tussen soorten en ecotypes om geheel nieuwe aspecten van vacuole biologie bloot te leggen.

Hoofdstuk 2 beschrijft de opheldering van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de extreme koperhypertolerantie van *Silene vulgaris*. Koper en ander zware metalen, zoals zink, zijn in lage concentraties noodzakelijk voor het functioneren van een cel, maar worden bij hogere concentraties al snel giftig. Daarom reguleren cellen de concentraties van dergelijke elementen zeer nauwkeurig. *Silene vulgaris* heeft van alle planten een van de hoogste toleranties voor zware metalen, en komt in Europa veel voor op bodems met hoge concentraties van zware metalen. De *Silene* populaties op zulke (vervuilde) gronden voorkomen vertonen, door adaptatie, vaak een nog hogere tolerantie (hypertolerantie) voor zware metalen dan hun soortgenoten op schone gronden. Hoofdstuk 2 laat zien dat de hypertolerantie voor koper, voor tenminste een aanzienlijk deel het gevolg is van de verhoogde expressie van twee genen, *SvHMA5I* en *SvHMA5II*, welke coderen voor kopertransporterende P-ATPase transmembraanpompen.

Het eiwit SvHMA5II en het homologe Arabidopsis eiwit AtHMA5 bevinden zich onder normale condities in het endoplasmatisch reticulum (ER). Na blootstelling van de cel aan verhoogde koperconcentraties verplaatsen beide eiwitten zich naar de celmembraan – teneinde koperionen de cel uit te pompen – van waar ze weer geïnternaliseerd kunnen worden en uiteindelijk afgebroken worden in de vacuole. Het koperafhankelijke transport van SvHMA5II en AtHMA5 lijkt verrassend veel op dat van homologe eiwitten in zoogdiercellen en is, kennelijk, een extreem oud mechanisme van koperontgiftiging. Het *Silene* eiwit SvHMA5I lijkt zeer sterk op SvHMA5II en draagt in even grote mate bij aan koper(hyper)tolerantie, doch via een geheel ander mechanisme. SvHMA5I bevindt zich bij hoge en bij lage koperconcentraties in de membraan rond de vacuole (tonoplast), en maakt koperionen onschadelijk door ze naar de vacuole te transporteren. Dit is evolutionair een nieuwer mechanisme, dat

is ontstaan tijdens de evolutie van landplanten, waarschijnlijk door duplicatie van een HMA5 gen en de acquisitie van een signaalsequentie voor transport van het eiwit naar de tonoplast.

Hoofdstuk 3 beschrijft de evolutie van twee andere tonoplast P-ATPases, PH1 en PH5, die een rol spelen in het transport van H^+ ionen (protonen) naar de vacuole en daarmee de regulatie van de pH binnen de vacuole. De eiwitten PH1 en PH5 waren ontdekt door petunia mutanten met een blauwe in plaats van violette bloemkleur. PH5 behoort tot de P-ATPase subfamilie 3A en is nauwe verwant aan P_{3A} -ATPase proton pompen in de celmembranen. PH1 is de enige bekende eukaryote P_{3B} -ATPase. PH1 heeft voor zover bekend geen ion-transporterende activiteit van zichzelf, maar bindt aan PH5 en verhoogd de protonpompactiviteit PH5.

De ontdekking van PH1 en PH5 deed afbreuk aan het dogma dat de pH van intracellulaire compartimenten exclusief wordt gereguleerd door V-type ATPase (V-ATPase) en pyrophosphatase (PPase) protonpompen. Omdat in andere plantensoorten geen (bloemkleur)mutanten zijn gevonden met defecten in de verzuring van vacuolen, was onduidelijk hoe wijdverspreid de PH5/PH1 pomp is in het planten rijk. Gedetailleerde fylogenetische analyses, gebruikmakend van de schat aan beschikbare plantengenoom sequenties, in combinatie met functionele analyses toonden aan dat tijdens *PH5* (homologen) reeds in vroege zaadplanten is ontstaan door duplicatie van een gen coderend voor een plasmamembraan P-ATPase proton pomp, en dat kort daarna de PH5 voorouder eiwit door relatief kleine veranderingen in het N-terminale domein naar de tonoplast is gedirigeerd. PH1 daarentegen heeft een meer gecompliceerde evolutionaire historie. Fylogenetische analyses laten zien dat PH1 homologen wijdverspreid zijn onder zaadplanten, met uitzondering van enkele groepen van soorten, die PH1 weer verloren hebben. PH1 ontbreekt in de alle primitievere planten waarvan nu het genoom gesequenced is, terwijl verwante P_{3B} ATPases wel voorkomen in specifieke groepen van prokaryoten en schimmels. Dit suggereert dat tijdens de evolutie van PH1 waarschijnlijk één of meerdere keren horizontale genoverdracht heeft plaatsgevonden. Het feit dat PH1 en PH5 homologen wijdverspreid zijn onder zaadplanten wijst er op dat de extreme verzuring van vacuolen ook een cruciale rol speelt in heel andere processen dan bloemkleuring.

Ruim twintig jaar geleden werd al duidelijk dat (sommige) planten cellen meerdere vacuolen kunnen bevatten met verschillende samenstelling en/of functie. Anno 2017 is er echter maar voor een klein aantal celtypes onomstotelijk bewijs dat ze meerdere functioneel verschillende vacuolen bevatten, terwijl dat voor andere veel bestudeerde celtypes nog steeds controversieel is. De mechanismes die ten grondslag liggen aan de verschillende differentiatie van vacuolen binnen één cel zijn volslagen onbekend. **Hoofdstuk 4** beschrijft de ontdekking van een nieuw type (mini)vacuole, vacuolino genaamd, in de gekleurde epidermale cellen van bloemen. Het bestaan van vacuolinos kwam aan het licht in door studies aan de intracellulaire lokalisatie van vacuolaire eiwitten. In transiënte expressiestudies bleken vacuolaire eiwitten na synthese eerst te lokaliseren in vacuolinos, alvorens

verder te reizen naar de centrale vacuole. Een tweede belangrijke ontdekking was dat de vorming van vacuolinos wordt gecontroleerd door transcriptiefactoren ANTHOCYAAN1 (AN1), AN11, PH3 en PH4 die anthocyaansynthese en/of vacuolaire verzuring activeren. Dit suggereert dat een aantal genen die door AN, AN11, PH3 en PH4 worden geactiveerd essentieel zijn voor de vorming van vacuolinos en/of het transport van eiwitten en andere componenten van vacuolinos naar de centrale vacuole. De waarneming dat PH1 en PH5 direct kunnen interacteren vacuolaire SNARE eiwitten wijst er op dat deze structurele tonoplast eiwitten als tethering factoren een rol kunnen spelen in de herkenning en fusie van verschillende types van vacuolen. Dit wordt ondersteunt door de waarneming dat in *ph1* mutanten, het transport van eiwitten van vacuolino naar vacuole is geblokkeerd.

Teneinde kandidaatgenen en eiwitten te identificeren die een rol spelen bij de trafficking van eiwitten en membraanvesicles van en naar vacuolinos, analyseren we in **Hoofdstuk 5** de transcriptomen van kroonblaadjes (petalen) van een “wild type” petunia lijn en isogene lijnen met mutaties in *AN1*, *PH4* en *PH3*. Het bleek dat mutaties in *AN1*, *PH3* en *PH4* de expressie van een veel groter aantal genen beïnvloeden dan aanvankelijk gedacht. Van tenminste 31 genen is de expressie significant meer dan vijfvoudig veranderd in zowel *an1*, *ph3* en *ph4* petalen. Een aantal daarvan speelt naar verwachting een rol in de vorming van vacuolinos en/of de fusie van vacuolinos met de centrale vacuole. Voor drie van deze genen zijn lijnen gemaakt waarin hun expressie is verlaagd d.m.v. transposon inserties of RNA-interferentie (RNAi). Voor twee van deze genen, *PAT1* (coderend voor een patatin-achtig fosfolipase) en *CAC12.3* (coderend voor een eiwit met onbekende functie), leverde dat bewijs dat ze betrokken bij de vacuolino route. In epidermale petaalcellen van *pat1* knockdown mutanten begeven de vacuolaire eiwitten zich nu direct – en niet langer via vacuolinos – naar de centrale vacuole, net zoals in mesofyl van petalen en bladeren. Knockdown van *CAC12.3* leidde er toe dat vacuolaire eiwitten “blijven steken” in zeer kleine membraancompartimenten en niet langer vacuolinos of de centrale vacuole bereiken.

Het feit dat er voorheen geen enkel vermoeden was dat PAT1- of CAC12.3-achtige eiwitten een rol spelen in de biogenese van en de trafficking naar endomebraancompartimenten (in dit geval vacuolinos) geeft aan dat de vacuolinoroute en de beschikbare mutanten een zeldzame mogelijkheid bieden, om nieuwe factoren te identificeren die membraantransport processen controleren, zonder a priori aannames te hoeven doen. Het ligt in de verwachting dat nadere analyse van de hier geïdentificeerde genen, in de (nabije) toekomst nog tot vele verrassingen zal leiden.