



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Going in the right direction

Cellular mechanisms underlying root halotropism

Korver, R.A.

Publication date

2019

Document Version

Other version

License

Other

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Korver, R. A. (2019). *Going in the right direction: Cellular mechanisms underlying root halotropism*.

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: <https://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.

Summary

Worldwide salinization of the soils threatens our food supply. What makes salinization an even more urgent problem is that the areas that are affected most are in general regions with relatively lower food availability to start with. For these communities losing harvests to abiotic factors is devastating. Improvements on salt tolerant crops are being made, however, not in all cases the underlying mechanisms of the tolerance are known. Nevertheless, when the genes involved have no homologues or even orthologues in other crops, knowing the mechanism will help towards finding a solution in all crops. One major response to salinity in plants is the change of root system architecture, including root growth direction under influence of altered local concentrations of the plant hormone auxin, and auxin symmetry in the root. The current knowledge on salt-induced changes of root growth direction and the processes involved are summarized in **chapter 1**. Moreover, one essential cellular signalling pathway, phospholipid signalling, during salt stress is introduced in this chapter.

In **chapter 2**, the auxin-related changes during salt stress are summarized. From recent literature it is becoming clear that other auxin regulating processes besides polar auxin transport contribute more to the auxin-induced changes during salt stress than previously thought. Regulation of passive auxin transport and auxin storage is required to build, and even more importantly, maintain local auxin maxima. Also, local auxin biosynthesis and conjugation alters the abundance of free auxin available for processes such as auxin signalling. In a meta-analysis on recently published gene expression data it was revealed that IAA biosynthesis and conjugation related gene expression show distinct patterns in different root tissues during salt stress.

The complex interplay of factors regulating auxin flow in the root make it a system in which tweaking on small and large scale is possible. As a consequence of this complexity, it sometimes is difficult to comprehend and predict the changes that different stimuli cause to the system. In **chapter 3** the question if salt-induced changes in PIN2 polarity are sufficient for the alteration of the auxin symmetry in the root during halotropism is addressed. Due to the complexity of the auxin flow in the root it was expected that more changes would follow the PIN2 polarity change. Indeed, auxin feedback dependent changes of AUX1 were predicted and experimentally validated to be relevant. In addition, to regulate the timing of building auxin accumulations

higher supply of auxin through a transient increase of PIN in the stele was found. These results show the importance of combining *in planta* experiments to determine the exact parameters to put into *in silico* analysis to accurately and rapidly predict what changes occur in these complex processes. These predictions can then be verified by specific experiments. In this way, computational modelling will significantly speed up the discovery of factors involved in complex biological systems.

Local patches of signalling lipids in the membrane are signals for cytosolic proteins to bind the membrane and carry out their function. Phospholipase D ζ proteins hydrolyse the structural membrane lipid phosphatidyl choline (PC) into the lipid second messenger phosphatidic acid (PA). PLD ζ derived PA has been suggested to recruit proteins to the membrane involved in endocytosis during salt stress. In **chapters 4 and 5** the roles of PLD ζ 1 and PLD ζ 2 during salt stress and in particular halotropism are studied. PLD ζ 1 was found to regulate PIN2 polarity in root epidermal cells. In addition, the PIN2 and AUX1 polarity shifts observed during salt stress are altered in a *pld ζ 1* KO mutant. No indication for involvement of PLD ζ 2 in PIN2 internalization or polarity have been found. PLD ζ 1 was also observed to be involved in root gravitropism, possibly through the PIN2 polarity in the root epidermal cells. This emphasizes the importance of proteins and processes regulating the polarity of auxin carriers. In addition, we report the discovery of excess membrane material which putatively affects auxin carrier endocytosis and cycling; osmotic stress-induced membrane structures (OSIMS). This excess membrane material appears shortly after exposure of the root to osmotic stress and is not found for longer than 30 minutes at the PM in wildtype cells. In the *pld ζ 1* KO mutant OSIMS are observed for longer than 60 minutes. How OSIMS influence auxin carrier internalization or polarity remains unknown.

How clathrin-mediated endocytosis (CME) is involved in the salt response of roots is unclear. Epsin-like clathrin adaptors (ECA's) are A/ENTH domain-containing proteins putatively involved in the assembly of clathrin coated vesicles (CCV's). Characterization of ECA's during salt stress was performed (**Chapter 6**) to help unravel the role of CME during the salt response in the root cells. ECA4 negatively regulates the halotropism response while ECA1 has a positive effect. This result suggests that CME is involved in a broad range of salt-induced processes. Next to that, ECA4 was found to negatively influence main root growth and lateral root development under control conditions, as well as growth during salt stress. However, no indication was found that ECA1 or ECA4 regulate PIN2 internalization or polarity.

Therefore, it is proposed that CME is involved in many salt-induced processes, but not auxin carrier re-localization.

In **chapter 7** I discuss how these results fit into the current knowledge on halotropism and salt stress responses. I provide an outline for further studies on these subjects. It has become clear that the alteration of auxin flow through environmental stimuli is a complex process, which should be studied on both a cellular level and on a whole root level using a combination of physiological and cell biological approaches, including computational models. The focus of research on the changes of the sub-cellular localization of auxin carriers should be more towards the manipulation of the re-cycling instead of the internalization. Furthermore, CME seems to play roles outside of auxin carrier endocytosis and its protein interactions point towards new cellular mechanisms involved in halotropism that have not been studied yet. Here lies a great opportunity to further increase our understanding of root tropic responses.

Samenvatting

De wereldwijde verzilting van de bodem bedreigt onze voedselvoorraad. Wat de verzilting van bodems een nog urgenter probleem maakt is dat de regio's die het zwaarst getroffen worden, vaak het meest afhankelijk van goede lokale oogsten zijn. Voor deze gemeenschappen is het desastreus als de oogsten mislukken door abiotische factoren. Hoewel gewassen worden veredeld voor een betere tolerantie voor verzilting, zijn de onderliggende mechanismen lang niet altijd bekend. Weten welke processen ten grondslag liggen aan de zout tolerantie is essentieel als de tolerantie in bepaalde gebieden niet blijkt te werken. Ook wanneer geen homologen of zelfs orthologen van de betrokken genen kunnen worden gevonden, dan kan de kennis van het onderliggende mechanisme toch gebruikt worden om vergelijkbare processen in andere gewassen aan te passen. Een van de belangrijkste aanpassingen van een plant aan verzilting is het veranderen van de ontwikkeling van het wortelsysteem en de richting van de wortelgroei onder invloed van gewijzigde concentraties van het plantenhormoon auxine in de wortel. De huidige kennis van zout geïnduceerde verandering van de groeirichting van de wortel en de onderliggende processen is samengevat in **hoofdstuk 1**. Daarnaast wordt een essentiële signalering route tijdens zout stress, fosfolipide signalering, besproken.

In **hoofdstuk 2** worden de auxine gerelateerde veranderingen tijdens zout stress samengevat. Uit de recente literatuur is het duidelijk geworden dat naast polair auxine transport andere auxine regulerende processen meer bijdragen aan de auxine geïnduceerde veranderingen dan voorheen werd aangenomen. Regulatie van passief auxine transport en auxine opslag is vereist om een lokaal auxine maximum te creëren, en misschien nog wel belangrijker, om dit maximum in stand te houden. Ook is lokale auxine biosynthese en conjugatie belangrijk in de hoeveelheid vrije auxine die beschikbaar is voor bijvoorbeeld auxine signalering. In een meta-analyse van recent gepubliceerde genexpressie data kwam naar voren dat genen die betrokken zijn bij IAA biosynthese en conjugatie een uitgesproken, weefsel-specifiek expressiepatroon laten zien tijdens zout stress.

Het complexe samenspel van factoren die de auxine flow in de wortel reguleren maken dit systeem gemakkelijk aan te passen op zowel kleine als grote schaal. De keerzijde van de complexiteit is dat het lastig is om de veranderingen die kleine factoren veroorzaken aan het systeem te begrijpen en te voorspellen. In **hoofdstuk 3** wordt de vraag of de verandering van de

auxine transporteur PIN2 polariteit voldoende is om de auxine symmetrie in de wortel te veranderen voor halotropie beantwoord. Door de complexiteit van de auxine flow in de wortel was de verwachting dat meerdere processen betrokken zijn. En inderdaad, veranderingen van AUX1 door positieve feedback van auxine bleken ook nodig te zijn voor de verandering van de auxine flow. Daarnaast bleek ook PIN1 nodig om tijdelijk tot hogere expressie te komen in de vaatweefsel cellen om de timing van de asymmetrie te verklaren. Deze resultaten laten het belang zien van het combineren van *in planta* experimenten om de parameters voor *in silico* analyse te bepalen om snel en accuraat te voorspellen welke veranderingen er optreden in complexe systemen. Op deze manier versnelt wiskundig modelleren het vinden van processen die een rol spelen in complexe biologische systemen.

Lokale patches van signaal lipiden in het membraam zijn een signaal voor cytosolische eiwitten om het membraam te binden om hun functie uit te kunnen voeren. Phospholipase D ζ eiwitten hydrolyseren het structurele membraanlipide fosfatidylcholine (PC) naar het signaallipide fosfatifylzuur (phosphatidic acid; PA). Het is gesuggereerd dat PA, geproduceerd door PLD ζ , eiwitten naar het plasmamembraan rekruteert voor endocytose tijdens zout stress. In **hoofdstukken 4 en 5** worden de rollen van PLD ζ 1 en PLD ζ 2 tijdens zout stress en specifiek tijdens halotropie bestudeerd. Daarbij is gevonden dat PLD ζ 1 de PIN2 polariteit in epidermale wortelcellen reguleert. Ook zijn de verschuivingen van de PIN2 en de AUX1 polariteit tijdens zout stress anders in een *pld ζ 1* mutant. Er is geen indicatie gevonden dat PLD ζ 2 betrokken is bij de internalisatie of de polariteit van PIN2. Naast halotropie is ook betrokkenheid van PLD ζ 1 in gravitropie gevonden, waarschijnlijk door de invloed van PLD ζ 1 op de PIN2 polariteit in epidermale wortelcellen. Dit benadrukt hoe belangrijk eiwitten en de processen die auxine polariteit beïnvloeden zijn. In **hoofdstuk 4** word ook de vondst van overtollig membraan materiaal kort na blootstelling aan zout en Sorbitol beschreven, namelijk de osmotische stress-geïnduceerde membraan structuren (OSIMS). Dit overtollig membraan materiaal verschijnt kort na blootstelling van de wortel cellen aan osmotische stress waar ze tot 30 minuten na begin van de behandeling te zien zijn in wildtype cellen. In de *pld ζ 1* mutant zijn de OSIM compartimenten veel langer zichtbaar. Hoe deze structuren de PIN2 internalisatie of polariteit beïnvloeden blijft echter onbekend.

Het is tot op heden onduidelijk hoe clathrine gemedieerde endocytose (CME) betrokken is bij de zout stress respons. Epsin-like clathrin adaptors (ECA's) zijn A/ENTH domein bevattende eiwitten die mogelijk betrokken zijn bij de montage van clathrine gecoate blaasjes. Het karakteriseren van de rol

van ECA's tijdens zout stress (**Hoofdstuk 6**) helpt bij het ontrafelen van de rol van CME in dit proces. ECA4 reguleert de halotropische respons op een negatieve manier terwijl ECA1 een positieve invloed heeft. Dit resultaat suggereert dat CME betrokken is bij een breed scala aan zout geïnduceerde processen. Ook is betrokkenheid van ECA4 bij de lengte van de hoofdwortel en de ontwikkeling van laterale wortels gevonden zowel tijdens controle omstandigheden als zoutstress behandelingen. Toch zijn er geen indicaties gevonden dat ECA1 of ECA4 een rol spelen bij de internalisatie of de polariteit van PIN2. Daarom wordt voorgesteld dat CME in meerdere zout geïnduceerde processen betrokken is maar niet bij internalisatie of de polariteit van auxine transporteiwitten.

In **hoofdstuk 7** bediscussieer ik hoe deze resultaten passen in de huidige kennis van halotropie en zoutstress in het algemeen. Ik geef een overzicht wat gebruikt kan worden voor verdere studies gericht op deze onderwerpen. Het is duidelijk geworden dat het aanpassen van auxine flow aan de hand van een externe stimulus een complex proces is dat zowel op cellulair niveau als op het niveau van de hele wortel bestudeerd moet worden, dat laatste met name ook met wiskundige modellen. Ook lijkt het er op dat de focus met betrekking tot de lokalisatie van auxine transport eiwitten verlegd moet worden van de endocytose naar de recycling van deze eiwitten. Daarnaast lijkt CME belangrijke rollen te spelen bij meerdere processen gedurende zout stress maar niets te maken te hebben met auxine transport eiwit endocytose. Ook zijn via eiwit interacties mogelijke nieuwe processen gevonden die een rol kunnen spelen bij halotropie die tot op heden nog niet onderzocht zijn. Bij deze theorieën liggen dus nog mooie mogelijkheden om de kennis van halotropie en ons begrip van de mechanismen van het effect van zoutstress op plantengroei en architectuur te vergroten.

List of publications:

Korver RA, Koevoets IT, Testerink C (2018) Out of Shape During Stress: A Key Role for Auxin. Trends Plant Sci **23**: 783-793

van den Berg T*, **Korver RA***, **Testerink C**, **Ten Tusscher KH** (2016) Modeling halotropism: a key role for root tip architecture and reflux loop remodeling in redistributing auxin. Development **143**: 3350-3362

Putta P, **Rankenberg J**, **Korver RA**, **van Wijk R**, **Munnik T**, **Testerink C**, **Kooijman EE** (2016) Phosphatidic acid binding proteins display differential binding as a function of membrane curvature stress and chemical properties. Biochim Biophys Acta **1858**: 2709-2716

Galvan-Ampudia CS, **Julkowska MM**, **Darwish E**, **Gandullo J**, **Korver RA**, **Brunoud G**, **Haring MA**, **Munnik T**, **Vernoux T**, **Testerink C** (2013) Halotropism is a response of plant roots to avoid a saline environment. Curr Biol **23**: 2044-2050

* - These authors contributed equally to this work

Acknowledgements

Now at the end of 4 years of ups and downs, stressful and happy moments it is time to thank all whom have been involved in this work in one way or another. I can happily say that I have grown a lot, both as a researcher and as a person, during the course of this PhD and that my life now is completely different from when I started. I have had the privilege of working with many talented scientists who have had a major role in pulling me through these years and keeping me motivated. I have had my doubts along the way about the choice of doing a PhD but I can now safely say I am glad to have experienced it and meet all these wonderful people along the way.

Christa, ik wil jou graag als eerste bedanken voor alle geweldige begeleiding de afgelopen jaren. Ik had altijd al gehoord dat het werken onder jouw hoede een voorrecht is, en ik kan zeggen nu ik het zelf heb meegemaakt dat er niets van gelogen was. De vrijheid tijdens de afgelopen jaren om op mijn manier te kunnen werken met altijd het op tijd bijsturen als ik wat afdwaalde heb ik als zeer prettig ervaren. Ook de momenten waarop ik het wat moeilijker had door tegenslagen met experimenten hebben we altijd goede gesprekken gehad waardoor ik weer met vertrouwen door kon gaan. Onder jouw hoede heb ik mij kunnen ontwikkelen tot een zelfstandige onderzoeker en kijk ik met vertrouwen naar mijn toekomstige carrière.

De laatste 8 maanden van mijn PhD is mijn groep naar Wageningen verhuisd. Omdat dit voor mij niet praktisch was ben ik achtergebleven in Amsterdam waar ik ben opgenomen in de groep van **Teun**. Hiervoor, en voor alle adviezen en ideeën over mijn onderzoek ben ik je dan ook erg dankbaar. Jouw passie voor het doen van fundamenteel onderzoek heb ik altijd bewonderd en is een voorbeeld geweest om alles grondig uit te zoeken.

Michel, jouw ervaring en kennis over de plantenwetenschap samen met een goede dosis humor hebben de meetings over mijn voortgang altijd tot leuke, nuttige gesprekken gemaakt. Ook het feit dat je mij er vaak aan hebt herinnerd om wat positiever te zijn over het werk wat verzet is en hetgeen ik bereikt heb heeft mij bij tijd en wijle laten inzien dat alles de goede kant op ging.

Samenvattend heb ik het geluk gehad deze afgelopen 4 jaar om 3 geweldige mentoren gehad te hebben van wie ik verschillende wijze lessen heb geleerd die mij gemaakt hebben tot de onderzoeker die ik nu ben.

Carlos, my first internship under your guidance has been hard work but a great experience and it is what got me into Christa's group 3 years later. This was a great kick-off for my career.

Chris en Petra, mijn masterstages onder jullie begeleiding heeft mij laten zien hoe leuk het kan zijn om toegepast onderzoek te doen in een hele andere setting. Ik heb van jullie beide veel geleerd en jullie enthousiasme is op mij over geslagen wat mede heeft geleid tot de volgende stap in mijn carrière. Ik vind het dan ook een mooie bijkomstigheid van mijn nieuwe werk dat ik jullie nog tegen zal komen.

Rob, Frank, Martijn en Harrold, jullie zijn allen inspirerend geweest gedurende mijn studies aan de UvA en ook tijdens mijn PhD heb ik zo nu en dan mogen genieten van jullie advies en enthousiasme voor wetenschappelijk onderzoek.

Then there are many other people whom have helped me with my work during the past 4 years. **Dorota**, you have been a great help during the first 2 years of my PhD. As the senior PhD in our group you were always there to give me advice when most the experimental work was failing, that combined with your crazy personality made you a wonderful friend to have around. **Deji**, we started at the same time and I'm glad for the time we worked together, I wish you the best during your last months. **Iko**, jouw kennis en werk in onze groep heeft me vanaf dag 1 verbaast. Het lijkt in mijn ogen altijd alsof jij dit werk al jarenlang doet. Ik heb het samenwerken met jou dan ook altijd zeer prettig gevonden. Ik weet zeker dat jij ooit een geweldige groepleider zal worden mocht je die kant op willen. **Jessica**, je bent een geweldige hulp voor mij geweest tijdens mijn laatste experimenten. Naast dat je een geweldige toevoeging aan onze groep bent door het werk wat je doet ben je dat ook door je persoonlijkheid. Ik ben blij dat ik in Amsterdam nog een tijd met je heb kunnen samenwerken. **Ringo**, jouw gezelligheid en hulp met alles wat met het lab te maken heeft is voor iedere medewerker een verrijking, en voor mij zeker ook. Jij maakt het werken in het lab een stuk dragelijker en daarvoor en de 3 gezellige jaren samen Cellulaire Fysiologie geven ben ik je veel dank verschuldigd. **Michel de V.**, jouw hulp in het lab en met alles wat met computers te maken heeft is voor mij zeer waardevol geweest. Ook alle gesprekken met jou, omdat je je hart op je tong draagt, waren

een welkome afwisseling van het werk. **Xavi**, I have always respected your knowledge and commitment to your work. Discussions on confocal work have always been useful and I want to thank you for your advice on experiments when I needed it. **Steven**, jouw passie voor onderzoek is denk ik een voorbeeld voor iedereen, ik vond het prettig om afgelopen 4 jaar met je samen gewerkt te hebben. Ik wens je veel succes in Teun's groep en weet zeker dat je nog vele mooie papers zult produceren. **Yanxia**, I am glad for the short time we worked together. I think you are a great scientist and will do well with whatever direction you choose to go. **Safarina**, your dedication to your project and hard work with the pouches, difficult as they are to work with, have shown me that hard work is needed if you want to succeed in science. Keep it up, I know you will conquer over the pouches in the end. **Yutao**, I am grateful to have been at your beautiful wedding and for the help you gave with the smartroot for me and my student. **Ruy**, we zijn sinds het begin een beetje gelijk op gegaan in het PhD-traject, jij deed er alleen talloze activiteiten naast en was altijd bereid om anderen te helpen en nieuwe projectjes te starten. Hoe je dat gedaan hebt is mij een raadsel ik had al mijn handen vol aan de PhD alleen. Een beetje jaloers ben ik dus wel altijd geweest. Nog even volhouden en dan hoop ik ook binnenkort bij jou verdediging te zijn!

Then there is a lot of people who I have not worked with but have brightened my days during the breaks or in the office. So therefore I like to thank the **Phyto's** for tolerating me as one of the very few Plant physiologists/cell biologists at the breaks. **Ruy, Silke, Pulu, Paula, Max, Michelle, Ahmed** and **Safarina** you have always brightened up the office and made sitting behind the computer less unbearable ;). You were always in for the all important chat to give the day some variety. Others that I had the pleasure to work with for a short time: **Femke, Michael, Priya, Eva** and **Jacinto**, sharing ideas and working on related projects has been a fun experience to me. The students that I have supervised during my time at the UvA: **Jelle, Elly, Thomas** and **Simone**, van jullie allen heb ik iets geleerd of jullie hebben bijgedragen aan mijn onderzoek. Daarvoor wil ik jullie hartelijk danken. Ook Ludek en Harrold bedankt voor de altijd vriendelijke ontvangst in de kassen en het werk wat jullie daar verzetten.

Then I wish the newest members of the Wageningen group all the best during their periods in Christa's group, enjoy the ride!

Kirsten en Thea, ik heb van onze samenwerking veel geleerd en de invalshoeken die jullie zagen met betrekking tot ons onderzoek zijn telkens een verrijking geweest voor ons werk. Ik denk dan ook dat de papers samen een mooi voorbeeld zijn van hoe interdisciplinair onderzoek beide partijen laat groeien in hun kijk op wetenschap. Ik wens jullie het allerbeste en Thea veel succes met je PhD.

Mariska, moppie, zonder jouw onvoorwaardelijke steun en het doorstaan van mijn niet altijd vrolijke buien had ik dit nooit af kunnen maken. Naast het schrijven van dit proefschrift is er nog veel gebeurd in ons leven de afgelopen 4 jaar en ik had er geen seconde van willen missen. Bedankt voor al je geduld en ik hou van je.

Sophie, ik weet dat het nog wel even gaat duren voordat je dit kunt lezen. Maar als het zover is wil ik graag dat je weet dat ik zonder jou dit proefschrift veel eerder af had gehad. Toch kan ik niet meer zonder jouw schaterlach en ben ik zielsgelukkig dat je mij het afgelopen half jaar van mijn werk hebt gehouden.

Ook ben ik veel dank verschuldigd aan jullie **Pap** en **Mam**, ondanks dat jullie dit helaas niet meer meemaken hebben jullie altijd onvoorwaardelijk voor mij klaar gestaan tijdens mijn tijd als scholier en student. Jullie hebben ervoor gezorgd dat ik mij altijd zonder zorgen heb kunnen ontplooien tot wie ik nu ben. Ik hoop dat ik het net zo goed als jullie zal doen als ouder.

Joris en Paul, ondanks dat jullie niets hebben bijgedragen aan de inhoud van dit proefschrift kon ik jullie natuurlijk niet weglaten ;)

Mijn schoonfamilie, **Hans, Marian, Dennis, Julia** en **Petra**, bedankt voor alle gezelligheid en het altijd klaarstaan voor ons als er iets nodig is.

