



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Polyamine metabolism and activation of lipid signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*

Zarza Cubero, J.

Publication date

2017

Document Version

Other version

License

Other

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

Zarza Cubero, J. (2017). *Polyamine metabolism and activation of lipid signalling pathways in Arabidopsis thaliana*.

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

Unfavourable conditions can affect plant growth, development and productivity. To cope, plants have evolved complex and highly coordinated signalling systems that allow these sessile organisms to perceive, transduce, and respond to these signals, allowing them to sustain and survive. Our knowledge on the molecular mechanisms governing plant stress responses has considerably increased during the last decades, even though we are still far away to understand the complex coordination of these pathways. In this thesis the focus has been on the role of polyamines as signalling molecules.

Polyamine metabolism has emerged during the last 40 years as an important stress-related pathway and its accumulation is often a metabolic hallmark of enhanced plant stress tolerance. These small and versatile polycationic molecules are not only involved in stress responses, but also in many aspects of cellular biology and -physiology, affecting processes such as ion transport, protein- and lipid-kinase activity, transcription, protein synthesis, or stabilization of membrane- and nuclear components. Nonetheless, the molecular mechanism by which polyamines exert such a wide range of effects is still not well understood. To extend these studies, we investigated the polyamine back-conversion pathway during salt stress in *Arabidopsis* using loss-of-function mutants of the *AtPAO5* gene (**Chapter 2**), the most-induced PAO member in salt conditions. We demonstrated that the mutants exhibit normal ROS levels but constitutively increased levels of Tspm with associated increased salt tolerance, arguing in favour of an intrinsic role for Tspm in salt stress. The detailed analysis of the phenotype, revealed a transcriptional reprogramming in which the stimulation of ABA, JA and an accumulation of important compatible solutes in the mutant were identified as the potential underlying mechanisms leading to the increased tolerance.

In a different approach to study the mechanism of polyamines, we investigated their effect on plasma membrane-associated phospholipid signalling, using an optimized ^{32}P -labelling procedure that analyses phospholipid synthesis and turnover *in vivo* (**Chapter 3**). We demonstrated that cellular uptake of apoplastic polyamines triggers an increase of the lipid-signalling molecule $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ at the plasma membrane of root cells within minutes after application to *Arabidopsis* seedlings (**Chapter 4**). The identification of the lipid kinases, PIP5K7 and PIP5K9 as the main enzymes involved in $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ response, using Spm as reference polyamine, is reported for the first time in this thesis. Concurrent with the increase of $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, we found a strong Spm-induced K^+ efflux in which the Spm sensitive-PIP5K enzymes act upstream. Similarly, we found that polyamines trigger an independent second lipid-signalling pathway, which generates PA (**Chapter 5**). The latter was mainly generated by the plasma membrane-associated PLD δ . Interestingly, the

PLD δ -mediated PA response was also found upstream of the Spm-induced K⁺ efflux. Both PI(4,5)P₂- and PA responses were found to involve the lipid kinases, PI4K β 1 and PI4K β 2. The new results described in this thesis have contributed in formulating a new hypothesis (**Chapter 6**), and will help to further unravel the role of polyamines in eukaryotic cell biology in general and in plant biology in particular.

Samenvatting

Ongunstige omstandigheden kunnen de groei, ontwikkeling en productiviteit van planten nadelig beïnvloeden. Om zich hiertegen te wapenen hebben planten zeer complexe en gecoördineerde signaleringssystemen geëvolueerd die het mogelijk maken om stresssignalen waar te nemen, te vertalen, en om te zetten in responsen, die het voor de plant mogelijk maken om te overleven en succesvol te groeien. Onze kennis over de moleculaire mechanismen van stress signalering in planten is aanzienlijk toegenomen in de afgelopen decennia, ook al zijn we nog steeds ver verwijderd om de complexe coördinatie van deze signaaltransductieroutes te begrijpen. Dit proefschrift heeft de rol van polyamines in signaleringsroutes van planten onder de loep genomen.

Polyamine metabolisme is de laatste veertig jaar als een belangrijke plantstress-gerelateerde route boven komen drijven, en de ophoping van polyamines wordt vaak gezien als een kenmerk van verhoogde stresstolerantie. Deze kleine en veelzijdige polykationische moleculen zijn niet alleen betrokken bij stressresponsen, maar ook bij verschillende aspecten binnen de celbiologie en -fysiologie, waaronder processen zoals ionentransport, eiwit en lipide-kinase-activiteit, transcriptie, eiwitsynthese, en stabilisatie van membraan- en nucleaire componenten. Niettemin, het moleculaire mechanisme waarmee polyamines zo'n breed scala aan effecten kunnen bereiken is nog steeds niet duidelijk. Om het onderzoek hiernaar uit te breiden hebben we in dit proefschrift de 'polyamine terug-conversie route' van *Arabidopsis* bekeken onder zoutstress met behulp knock-out mutanten van het gen AtPAO5 (**hoofdstuk 2**). Dit gen reageert het sterkst op zout stress condities. Aangehouden is dat de mutanten normale ROS niveaus vertonen en constitutief verhoogde niveaus van Tspm met bijbehorende verhoogde zouttolerantie hebben, wat een intrinsieke rol van Tspm in zout stress benadrukt, welke onafhankelijk is van ROS signalering. Aan het fenotype blijkt een transcriptionele herprogrammering ten grondslag te liggen waarin stimulatie van ABA, JA en een accumulatie van belangrijke osmotisch-actieve stoffen mogelijk de verhoogde tolerantie in de mutant verklaren.

In een andere benadering om het mechanisme van polyaminen te bestuderen, onderzochten we het effect van polyamines op de plasmamembraan-geassocieerde fosfolipide signalering. Via een geoptimaliseerde ³²Pi-labeling procedure konden fosfolipide synthese en turnover *in vivo* worden bestudeerd (**hoofdstuk 3**). Aangehouden werd dat cellulaire opname van apoplastische polyamines leidt tot een toename van het lipide-signalerings molecuul PI(4,5)P₂ in de plasmamembraan van wortelcellen, enkele minuten na behandeling van *Arabidopsis* zaailingen (**hoofdstuk 4**). De identificatie van de lipide kinases, PIP5K7 en PIP5K9 als belangrijkste enzymen van de PI(4,5)P₂ response na toediening van spermine

wordt voor het eerst gerapporteerd in dit proefschrift. Gelijktijdig met de toename van $PI(4,5)P_2$, werd een sterke efflux van K^+ waargenomen, waarin de Spm gevoelige-PIP5Ks upstream fungeren. Polyaminen bleken een tweede, onafhankelijk lipide-signaleringsroute te activeren, nl. de route die leidt tot de productie van PA (**hoofdstuk 5**). Dit lipide wordt in reactie op polyamines voornamelijk gegenereerd door de plasmamembraan-geassocieerde PLD δ . Interessant is dat de PLD δ -gemedieerde PA respons ook upstream van de Spm-geïnduceerde K^+ efflux plaatsvindt. Interessant is dat zowel $PI(4,5)P_2$ - en PA responsen gelinkt zijn aan de lipide kinases, $PI4K\beta 1$ en $PI4K\beta 2$. De beschreven resultaten in dit proefschrift hebben bijgedragen aan een nieuwe hypothese (**hoofdstuk 6**), en zullen helpen om de rol van polyamines in eukaryotische celbiologie in het algemeen en in de plantenbiologie in het bijzonder verder te ontrafelen.