

LSU-peptiden en hun cruciale rol als regulatorische *hubs* tijdens de stressrespons van *Arabidopsis thaliana*

LSU peptides and their crucial role as regulatory hubs during the stress response of *Arabidopsis thaliana*

Promotoren:
Prof. dr. Bruno Cammue
Dr. Barbara De Coninck
Departement Microbiële en Moleculaire Systemen
Centrum voor Microbiële en Plantengenetica

Masterproef voorgedragen
tot het behalen van het diploma van
Master of science in de bio-ingenieurswetenschappen:
landbouwkunde

Hanne Claessen

juni 2016

"Dit proefschrift is een examendocument dat na de verdediging niet meer werd gecorrigeerd voor eventueel vastgestelde fouten. In publicaties mag naar dit proefwerk verwezen worden mits schriftelijke toelating van de promotor, vermeld op de titelpagina."

LSU-peptiden en hun cruciale rol als regulatorische *hubs* tijdens de stressrespons van *Arabidopsis thaliana*

LSU peptides and their crucial role as regulatory hubs during the stress response of *Arabidopsis thaliana*

Promotoren:
Prof. dr. Bruno Cammue
Dr. Barbara De Coninck
Departement Microbiële en Moleculaire Systemen
Centrum voor Microbiële en Plantengenetica

Masterproef voorgedragen
tot het behalen van het diploma van
Master of science in de bio-ingenieurswetenschappen:
landbouwkunde

Hanne Claessen

juni 2016

Woord vooraf

Met deze masterthesis sluit ik mijn opleiding aan de faculteit Bio-ingenieurswetenschappen van de KULeuven af. Het voltooien van deze masterthesis is een erg leerzaam proces geweest waarbij ik niet alleen mijn theoretische kennis heb bijgeschaafd, maar ook belangrijke vaardigheden heb verbeterd.

Graag bedank ik mijn promotor prof. Dr. Bruno Cammue om het voor mij mogelijk te maken om mijn opleiding met zo'n mooie thesis af te ronden. Bedankt ook aan mijn co-promotor Dr. Barbara De Coninck voor de vele bijsturingen en verbeteringen.

In het bijzonder wil ik mijn begeleidster Katy Vandereyken bedanken voor de dagelijkse begeleiding in het labo, het geduld als er dingen misgingen, de leuke gesprekken bij routinewerk en voor alle dingen die zij mij heeft bijgeleerd. Bedankt ook aan de andere leden van het PFI en vooral Jasper Reyskens voor de extra hulp bij de experimenten.

Bedankt aan Ana, Els en Lore voor de ontspannende dinsdagavonden en het luisterend oor tijdens moeilijke momenten. Ten slotte wil ik ook mijn ouders bedanken voor de steun en het enorme begrip dat zij voor mij, mijn broer en zussen elke dag opbrengen.

Hanne Claessen

Samenvatting

De continue blootstelling van planten aan allerlei stressoren beperkt in belangrijke mate de opbrengsten van landbouwgewassen. De ontwikkeling van gewassen met verhoogde stresstolerantie is bijgevolg een belangrijke piste in de duurzame voedselproductie. De studie van proteïnen (complexen) en peptiden, kleine proteïnen van minder dan 10 kDa, betrokken in de ontwikkelings- en verdedigingsmechanismen van planten biedt hier nieuwe mogelijkheden.

De *Arabidopsis thaliana* LSU (*response to Low Sulfur*)-peptidefamilie bestaat uit vier leden, nl. LSU1-4. *LSU1*, *LSU2* en later *LSU3* werden geïdentificeerd als *sulfur-responsive genes* die reeds na enkele uren geïnduceerd worden bij zwaveltekorten. Andere studies wijzen op hun mogelijke status als *hub*-proteïnen, door hun voorspelde interacties met een groot aantal andere *A. thaliana* proteïnen, en betrokkenheid in plant-pathogeeninteracties. Deze observaties doen vermoeden dat de LSU-peptiden een belangrijke rol spelen in de plantstressrespons, maar de exacte moleculaire functie van de LSU-peptiden is nog onbekend.

Het doel van deze masterthesis was om meer inzicht te krijgen in de moleculaire rol van de LSU-peptiden in de stressrespons en ontwikkelingsprocessen in *A. thaliana* aan de hand van (i) proteïnelokalisatiestudies via GUS-kleuringen en GFP-fluorescentiemicroscopie voor de LSU-peptiden en de geïdentificeerde LSU-interactoren GBFP en FSD2, (ii) genexpressieanalyses na blootstelling van wild-type planten aan zwaveltekorten of verhoogde sucroseconcentraties en (iii) biotische en abiotische stresstesten op lijnen met een gewijzigde expressie van *LSU1-4*.

Uit de GUS-kleuringen blijken de LSU-peptiden en GBFP vasculair in bladeren en wortels tot expressie te komen. Voor de LSU-peptiden werd bovendien stomatale expressie waargenomen. Subcellulair wordt de lokalisatie van de LSU-peptiden vastgesteld in de kern en het cytoplasma. Uit de genexpressieanalyses blijkt de verhoogde expressie van de LSU-peptiden, in respons op lage zwavelgehalten in het medium, uitsluitend in de wortels plaats te vinden. Verder werd een verhoogde expressie van de LSU-peptiden waargenomen in respons op hoge, exogene sucroseconcentraties. Voorlopig kon voor geen van de transgene/mutante lijnen een éénduidig gewijzigde gevoeligheid voor de geteste pathogenen en abiotische stress aangetoond worden. Er kon daarom niet bevestigd worden dat de LSU-peptiden betrokken zijn in de afweerrespons tegen deze stressors. Op basis van deze resultaten worden twee hypothesen voorop gesteld, namelijk een mogelijke rol van de LSU-peptiden in autofagie en een mogelijke betrokkenheid bij sucrosehomeostase van de plant. Bijkomende experimenten moeten hier in de toekomst echter meer duidelijkheid over verschaffen.

Abstract

The continuous exposure of plants to all kinds of stressors greatly limits the yields of agricultural crops. The development of more stress-tolerant crops is of major importance to reach sustainable food production. Given the importance of protein(complexes) in cellular processes, proteomics gain more and more attention. In addition to this, the role of peptides, small proteins with a molecular weight smaller than 10 kDa in plant processes becomes ever more apparent.

The *Arabidopsis thaliana* LSU (*response to Low Sulfur*)-peptidefamily consists of four members: LSU1-4. *LSU1*, *LSU2* and *LSU3* were identified as sulfur-responsive genes that are upregulated in roots as early as a few hours after the plants were exposed to sulfur deficiency. Other studies propose a possible role as hub-proteins and involvement in plant-pathogen interaction. These observations suggest that these peptides play an important role in certain defence or development processes in the plant, but their exact function still has to be specified.

The aim of this thesis was to gain more insight into the molecular role of the LSU-peptides in the immune response and development of *A. thaliana* through (i) proteinlocalization studies with GUS-staining and GFP fluorescence microscopy for the LSU-peptides and the LSU-interactors GBFP and FSD2 (ii) expression analyses after exposure to sulfur deficits or elevated sucrose concentrations in the medium and (iii) biotic and abiotic stress tests on plant lines with an altered expression of LSU1-4.

The GUS-staining showed that the LSU-peptides and interactor GBFP are expressed in the vascular tissue of leaves and roots. LSU-peptides were also expressed in the stomata. GFP-fluorescence microscopy showed subcellular localisation in the nucleus and the cytoplasm. The expression analyses showed increased expression of the LSU-peptides in response to low sulfur conditions, but only in the roots. An increased expression of the LSU-peptides was also observed in response to high sucrose concentrations in the medium. None of the transgenic/mutant lines of the LSU-peptides showed a clearly altered sensitivity to the tested pathogens and abiotic stressors. It could therefore not be confirmed that the LSU peptides are involved in the immune response against these stressors. Based on these results, two possible hypotheses are proposed for the molecular function of the LSU-peptides. The first one being a possible role in autophagy, the second one being a possible role in the regulation of the sucrose homeostasis of the plant. Additional experiments in the future should provide more clarity.

Lijst met gebruikte afkortingen

'	Minuut
''	Seconde
ABA	Abcisinezuur
ABRE	<i>ABA responsive elements</i>
ACC	1-Aminocyclopropaan-1-carbonzuur
AdoMet	S-Adenosyl-L-methionine
ALA	Alfa-linoleenzuur
AMP	Ampicilline
APS	ATP sulfurylase
APX	Ascorbaatperoxidase
AUX	Auxine
BAK1	<i>Brassinosteroid insensitive 1-associated kinase 1</i>
BASF	Baden Aniline- & Soda-Fabriek
BIN2	<i>Brassinosteroid insensitive 2</i>
BR	Brassinosteroïde
BSE	BRI1-ems-suppressor 1
BSU	BRI1-SUPPRESSOR 1
BZR1	<i>Brassinazole-resistant 1</i>
CaM	Calmoduline
CAT	Catalase
CDPK	Ca ²⁺ dependent protein kinase
CFU	<i>Colony-forming units</i>
CK	Cytokine
CMPG	Centrum voor Microbiële- en Plantengenetica
COI1	<i>Coronatine insensitive 1</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTR1	<i>Constitutive triple response 1</i>
DAMP	<i>Danger Associated Molecular Pattern</i>
DRE	<i>Drought responsive element</i>
DPI	<i>days past inoculation</i>
EDS1	<i>Enhanced disease susceptibility 1</i>
EFR	EF-TU receptor
EF1 α	<i>Elongation Factor 1α</i>
EF-TU	<i>Elongation factor thermo-unstable</i>

EIN2	<i>Ethylene insensitive 2</i>
ERF	<i>Ethylene response factor</i>
ET	Ethyleen
ETI	<i>Effector Triggered Immunity</i>
EtOH	Ethanol
ETR1	<i>Ethylene receptor 1</i>
ETS	<i>Effector triggered susceptibility</i>
FLS2	<i>Flagellin sensitive 2</i>
FSD2	<i>Fe superoxide dismutase 2</i>
<i>Foc</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
GA	Gibberelline
GBFP	<i>Guanylate binding family protein</i>
GBP	<i>Guanylate binding protein</i>
GMBH	<i>Gesellschaft Mit Beschränkter Haftung</i>
GPX	Glutathionperoxidase
GSK3-like	<i>Glycogen synthase kinase 3-like</i> proteïne kinase
HR	<i>Hypersensitive respons</i>
HSP	<i>Heat Shock proteïnen</i>
IAA	Indole-3-azijnzuur
ICS	<i>Isochorismaat synthase</i>
Ile	Isoleucine
ISR	<i>Induced systemic resistance</i>
JA	Jasmonaat
JA-Ile	(3R,7S)-jamonyl-L-isoleucine
JAZ	<i>Jasmonate ZIM-domain</i>
KD	<i>Knock-down</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LEA	<i>Late-embryogenesis-abundant</i>
LSU	<i>Response to Low Sulfur</i>
MACC	<i>1-(malonylamino)-cycloprane-1-carboxylic acid</i>
MAMP	<i>Microbial Associated Molecular Pattern</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MeJA	Methyljasmonaat
MIH	<i>Multiple-interface hubs</i>
MTA	5'-methylthioadenosine

NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NB-LRR	<i>Nucleotide-binding domain Leucine rich repeats</i>
NINJA	<i>Novel interactor of JAZ</i>
NPR	<i>Non-expressor of Pathogenesis Related genes</i>
OEX	Overexpressie
ORA59	<i>Octadecanoid-responsive Arabidopsis 59</i>
PAD4	<i>Phytoalexin deficient 4</i>
PAMP	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PCD	<i>Programmed cell death</i>
PCR	Polymerase kettingreactie
PFI	Plant Fungi interactie onderzoeksgroep
pGUS	promotor:GUS
PR-genen	<i>Pathogenesis Related genes</i>
PRR	<i>Pathogen Recognition Receptor</i>
PTI	<i>Pathogen Triggered Immunity</i>
RBOH	<i>Respiratory burst homolog proteïnen</i>
Rif	rifampicine
RLK	<i>Receptor-like kinases</i>
RLP	<i>Receptor-like proteins</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SA	Salicylzuur
SAR	<i>Systemic acquired resistance</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SFO	<i>Sensitive to Fusarium oxysporum</i>
SIH	<i>Singlish-interface hubs</i>
SOD	Superoxidedismutase
SUT1	<i>Sucrose Transporter 1</i>
TAP	<i>Tandem affinity purification</i>
TPL	<i>Topless</i>
TTSS	Type III secretiesysteem
UP9	<i>Upregulated by sulfur deficit 9</i>
VAR3	<i>Variogated 3</i>
VIB- PSB	Vlaams instituut voor Biotechnologie - Departement of Plant Systems Biology
Y2H	<i>Yeast-2-hybrid</i>

Lijst met tabellen

Tabel 1: Weergave van de huidige geselecteerde generatie OEX-, KD/ami- en pGUS-lijnen voor de LSU-peptiden en GBFP.....	38
Tabel 2: Gebruikte 1/2 MS-media en hun samenstelling.....	40
Tabel 3: Overzicht van de uitgevoerde pathogeen- en abiotische stresstesten.	56
Tabel 4: Overzicht van gebruikte primers en hun sequentie	XII

Lijst met figuren

Figuur 1: Schematische voorstelling van de lokalisatie van ‘response to Low Sulfur’ (LSU) genen in het <i>A. thaliana</i> genoom.	2
Figuur 2: Schematische voortelling van het zig-zag model.	6
Figuur 3 Rechtstreekse en onrechtstreekse effectorherkenning door NB-LRR receptoren.	9
Figuur 4: Voorstelling van de interacties tussen de signaaltransductiewegen van verschillende planthormonen betrokken bij de plantverdedigingsrespons.	11
Figuur 5: Een model voor de Brassinosteroïde signalisatieweg.	18
Figuur 6: Ligatie van de LSU1 gensequentie in de HBT-sGFP(S65T)-NOS destinatevector.	25
Figuur 7: Expressie van LSU1-4 en GFP in blad en bloem van T1 pGUS-lijnen.	48
Figuur 8: Expressie van LSU1-4 en GFP in planten van 2 weken oude <i>A. thaliana</i> T2 LSU1-4 pGUS-planten.	49
Figuur 9: Expressie van LSU1 in T2 LSU1 pGUS-lijn LSU1.4.	50
Figuur 10: Expressie van GFP in T2 GFP pGUS-lijn GFP.21.	50
Figuur 11: Expressie van LSU1 en LSU3 in 4 weken oude T2 LSU1, LSU3 en GFP pGUS-planten opgegroeid op verschillende ½ MS-media.	51
Figuur 12: Subcellulaire lokalisatie van de GFP-fusieconstructen van LSU2-4 en FSD2 in <i>A. thaliana</i> mesofyl protoplasten.	52
Figuur 13: Genexpressieanalyse van LSU1-4 en GFP in wild-type planten na 2 weken op ½ MS-medium met verhoogd sucrose- of verlaagd zwavelgehalte	54
Figuur 14: Resultaten van de LSU- en GFP-genexpressieanalyse in T1 KD/ami-lijnen.	55
Figuur 15: Resultaat van de infectietesten met <i>B. cinerea</i> op verschillende OEX-, KD- en KO-lijnen van LSU1-4.	57
Figuur 16: Resultaat van de infectietesten met <i>P. syringae</i> op OEX- en KD-lijnen van LSU1 (A) en KO-lijnen van LSU2 en LSU4 (B).	59
Figuur 17: Resultaat van de tweede infectietest met het infectieve Hpa-isolaat Noks1.	60
Figuur 18: Stresstest met paraquat op verschillende OEX-, KD- en KO-lijnen van LSU1-4.	61
Figuur 19: Kiemtest met zoutstress en osmotische stress bij verschillende OEX-, KD- en KO-lijnen van LSU1-4	62
Figuur 20: Vergelijking van de fenotypes van de wild-type lijn Col-0 en de KD/ami LSU1 2.6-3 na 5 weken op standaard ½ MS-medium of ½ MS-medium met 6% sucrose.	63

Inhoudstafel

Woord vooraf	I
Samenvatting.....	II
Abstract.....	III
Lijst met gebruikte afkortingen	IV
Lijst met tabellen	VII
Lijst met figuren	VIII
Inhoudstafel.....	IX
1. Context en doelstellingen	1
2. Literatuurstudie	5
2.1 Plant-pathogeeninteracties.....	5
2.1.1 PAMP-geïnduceerde immuniteit (PTI)	6
2.1.2 Effector-geïnduceerde gevoeligheid (ETS).....	7
2.1.3 Effector-geïnduceerde immuniteit (ETI)	8
2.2 Signaaltransductie en planthormonen.....	10
2.2.1 Reactieve zuurstofsoorten	11
2.2.2 Salicylzuur	13
2.2.3 Jasmonaat en Ethyleen	15
2.2.4 Andere planthormonen	17
2.3 Geïnduceerde verdediging.....	18
2.4 Abiotische stressrespons	19
2.4.1 Nutriëntentekorten	19
2.4.2 Droogtestress	20
2.4.3 Zoutstress	21
2.5 Hub-proteïnen in de plantstressrespons	22
2.5.1 Statische en dynamische hubs	23
2.5.2 Eigenschappen van hub-proteïnen	23
3. Materiaal en methoden	25
3.1 DNA-manipulaties.....	25
3.1.1 Amplificatie van fragmenten uit cDNA	26
3.1.2 Opzuiveren van genfragmenten	27
3.1.3 Agarose gelelektroforese	27
3.1.4 Restrictiereacties	28
3.1.5 Ligatiereacties	28
3.1.6 <i>E. coli</i> transformatie	29
3.1.7 Kolonie-PCR	29
3.1.8 Plasmide-isolatie	30

3.1.9	Concentratiebepaling via UV-absorptiespectrum	31
3.1.10	DNA-sequentiebepaling	31
3.1.11	Aanmaak van glycerolstocks.....	32
3.1.12	Protoplastmanipulaties	32
3.1.13	Protoplastisolatie.....	32
3.1.14	Protoplasttransformatie.....	33
3.1.15	Confocale laserfluorescentiemicroscopie	34
3.2	RNA-manipulaties	34
3.2.1	RNA-isolatie	34
3.2.2	DNase behandeling	35
3.2.3	cDNA synthese	35
3.2.4	qRT-PCR	35
3.3	Plant-manipulaties	37
3.3.1	Algemene informatie	37
3.3.1.1	Gebruikte lijnen	37
3.3.1.2	Selectie KD/ami- en pGUS-lijnen.....	38
3.3.2	Opgroeien van planten in potgrond.....	39
3.3.3	Opgroeien van planten op ½ MS-medium	39
3.3.4	Biotische stressbehandelingen	41
3.3.4.1	Inoculatie met <i>Botrytis cinerea</i>	41
3.3.4.2	Inoculatie met <i>Pseudomonas syringae</i>	41
3.3.4.3	Inoculatie met <i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	42
3.3.5	Abiotische stressbehandelingen.....	44
3.3.5.1	Behandeling met paraquat	44
3.3.5.2	Osmotische stress	44
3.3.5.3	Zoutstress	44
3.3.6	Histochemische GUS-kleuring	44
3.4	Statistische analyses	45
4.	Resultaten	46
4.1	Lokalisatie van LSU-peptiden en interactoren	46
4.1.1	Inleiding en proefopzet.....	46
4.1.2	Resultaten en bespreking	47
4.1.2.1	Weefsel specifieke lokalisatie van LSU1-4 en GBFP	47
4.1.2.2	Subcellulaire lokalisatie van LSU2-4 en FSD2	52
4.2	Genexpressie van de LSU-peptiden en GBFP.....	52
4.2.1	Inleiding en proefopzet.....	52
4.2.2	Resultaten en bespreking	53

4.2.2.1	Expressieanalyse van LSU-peptiden en GFP in wild-type planten op verschillende ½ MS-media.....	53
4.2.2.2	Expressieanalyse van T1 KD/ami-lijnen.....	54
4.3	Fenotypische karakterisering van <i>A. thaliana</i> -lijnen met een gemoduleerde expressie van de LSU-peptiden en -interactoren in het kader van de stressrespons.....	56
4.3.1	Inleiding en proefopzet.....	56
4.3.2	Resultaten en bespreking.....	57
4.3.2.1	Fenotypering na biotische stress.....	57
4.3.2.2	Fenotypering na abiotische stress.....	60
4.3.2.3	Fenotypering op verschillende ½ MS-media.....	62
5.	Discussie.....	64
5.1	De rol van de LSU-peptiden in <i>A. thaliana</i>	64
5.1.1	LSU-expressie is vasculair, stomataal en afwezig in worteltoppen.....	64
5.1.2	De LSU-peptiden reageren op hoge sucroseconcentraties.....	66
5.1.3	De rol van LSU-peptiden in de plantstressrespons kan niet bevestigd worden.....	67
5.2	Hypothesen naar de moleculaire functie van de LSU-peptiden.....	68
5.2.1	Hypothese 1: LSU-peptiden zijn betrokken bij autofagie.....	68
5.2.2	Hypothese 2: LSU-peptiden zijn betrokken bij sucrosehomeostase.....	69
5.3	Toekomstperspectieven.....	70
5.4	Conclusie.....	72
	Referentielijst.....	74
	Appendix I.....	XII
	Vulgariserende Samenvatting.....	XIII

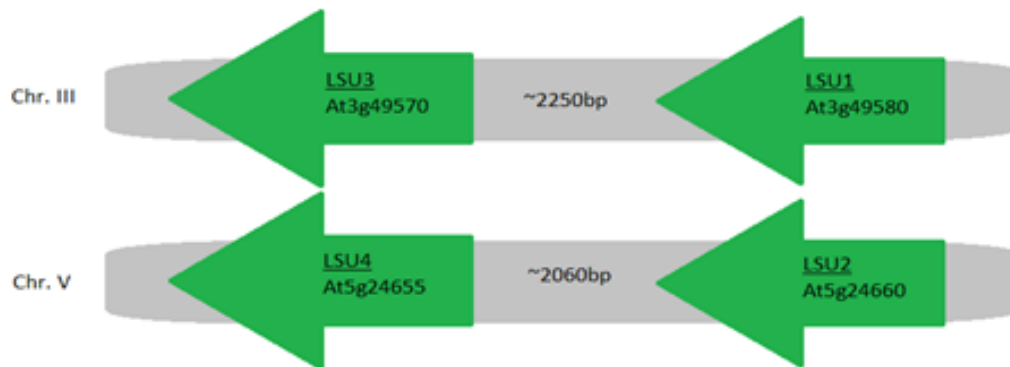
1. Context en doelstellingen

De voortdurende blootstelling van landbouwgewassen aan allerlei soorten stress tijdens de teelt leidt bij veel economisch belangrijke gewassen tot significante opbrengstverliezen (Shanker & Venkateswarlu 2011). Het belang van een duurzame en efficiënte voedselproductie blijft echter toenemen als gevolg van klimaatsverandering en de steeds groeiende wereldpopulatie (Sultan 2012; Gilland 2002). De ontwikkeling van gewassen met een verbeterde stresstolerantie en andere teeltkenmerken kan hier een aanzienlijke bijdrage leveren, maar de complexe plantverdediging- en ontwikkelingsmechanismen zijn vaak nog onvoldoende gekend. Fundamenteel onderzoek dat bijdraagt tot een beter begrip van deze mechanismen is daarom van essentieel belang. Onder andere de identificatie van genen, die specifiek in stresssituaties een veranderde expressie vertonen, verschaft een schat aan informatie over de verdedigings- en aanpassingsmechanismen van planten (Huang & Xu 2008). Aangezien de meeste cellulaire processen ofwel direct uitgevoerd ofwel gereguleerd worden door proteïnen(complexen), gaat steeds meer aandacht naar proteoomstudies (Rangeshwaran et al. 2013).

Deze masterthesis kadert in het onderzoek aan de Plant Fungi Interactie (PFI) groep van het Centrum voor Microbiële en Plantengenetica (CMPG). De PFI-groep voert in het kader van de afweerrespons onder meer onderzoek uit naar peptiden, proteïnemoleculen die kleiner zijn dan 10 kDa. Tot de bestudeerde peptiden behoren onder andere de *response to Low Sulfur* (LSU)-peptiden, die teruggevonden worden in de modelplant *Arabidopsis thaliana* (Sirko et al. 2014). Aan het CMPG-PFI werd LSU1 enkele jaren geleden gekarakteriseerd als een interactor van het E3 ubiquitine ligase SFO (*Sensitive to Fusarium oxysporum*), dat een rol speelt in de afweerrespons van *A. thaliana* tegen de *non-host* necrotrofe vaatbundelpathogeen *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (*Foc*). E3 ubiquitine ligases zijn betrokken bij de afbraak van proteïnen door het 26S-proteasoom (Rosebrock et al. 2007), maar het kon niet aangetoond worden dat LSU1 geubiquitineerd wordt door SFO. Infectietesten wijzen wel uit dat zowel *SFO knock-down*-planten als *LSU1-overexpressieplanten* gevoeliger zijn voor *Foc* (ongepubliceerde data). Deze bevindingen kunnen erop wijzen dat LSU1 werkt als een *scaffold* of chaperone-molecule die de degradatie van specifieke proteïnen reguleert in respons op omgevingsstressoren of dat LSU1 de activiteit van SFO reguleert (Dang 2015). Vermits de exacte moleculaire functie van de LSU-peptiden nog onbekend is, maar ze op basis van eigen en door andere onderzoeksgroepen gepubliceerde resultaten een belangrijke rol in de plantstressrespons lijken te spelen, werd besloten om dit aan het CMPG-PFI verder te onderzoeken.

Reeds gepubliceerd onderzoek omtrent de LSU-peptiden

De *A. thaliana* LSU-peptidefamilie bestaat uit vier leden, nl. LSU1-4. Het zijn kleine proteïnen met lengtes van 92-97 aminozuren en een sequentiegelijkenis van 59-89%. De peptiden worden gecodeerd door de genen *LSU1-4*, die in tandem gelegen zijn op de *A. thaliana* chromosomen III (*LSU1* en *LSU3*) en V (*LSU2* en *LSU4*) (Figuur 1). Homologen van de LSU-peptiden worden ook gevonden in andere belangrijke gewassen zoals tabak (de UP9 (*Upregulated by sulfur deficit 9*)-familie), tomaat, aardappel, rijst, soja, koolzaad en populier (Sirko et al. 2014).



Figuur 1: Schematische voorstelling van de lokalisatie van ‘response to Low Sulfur’ (LSU) genen in het *A. thaliana* genoom. Het aantal baseparen (bp) tussen de LSU openleesramen wordt weergegeven tussen de pijlen (Aangepast van Sirko et al. 2015)

LSU1 (At3g49580) en *LSU2* (At5g24660) werden oorspronkelijk geïdentificeerd als twee *sulfur-responsive genes*, die reeds na twee uur (*LSU1*) of vier uur (*LSU2*) op ½ MS-medium met verlaagd zwavelgehalte geïnduceerd worden in *A. thaliana* planten (Nikiforova et al. 2005a). Een grootschalige interactoomstudie op basis van *yeast two-hybrid* (Y2H) toonde aan dat de LSU-peptiden onderling en met een groot aantal andere *A. thaliana* proteïnen interageren. *LSU1*, *LSU2* en *LSU3* interageren immers respectievelijk met 64, 30 en 101 andere *A. thaliana* proteïnen die uiteenlopende functies uitoefenen (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium 2011; Mukhtar et al. 2011). Op basis van dit grote aantal voorspelde interactiepartners werd voorgesteld dat LSU-peptiden in de plant functioneren als *hub*-proteïnen. Daarnaast suggereren enkele bevindingen een mogelijke rol voor de LSU-peptiden in de plantverdediging tegen verschillende pathogenen en bepaalde abiotische stress. LSU-peptiden blijken immers als doelwit te interageren met effectoren van de (hemi)biotrofe plantpathogenen *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa), *Pseudomonas syringae* (Psy) en *Golovinomyces orontii* (Gor) (Mukhtar et al. 2011; Weßling et al. 2014). *A. thaliana* plantlijnen met een gewijzigde expressie van LSU-peptiden vertonen bovendien enkele interessante fenotypes. *LSU4 knock-out*-planten, bijvoorbeeld, vertonen een uitgestelde bloei en verstoorde bloemvorming (Myakushina et al. 2009) en *LSU2 knock-out*-planten blijken toleranter aan

zoutstress (NaCl) (Luhua et al. 2013), hebben een hoger chlorofylgehalte (Ruckle et al. 2012) en zijn gevoeliger aan Hpa en Psy (Mukhtar et al. 2011).

De LSU-peptiden worden ook in verband gebracht met signaaltransductiewegen in respons op planthormonen (§2.2) met onder meer belangrijke functies in plantontwikkeling en de stressrespons (Sirko et al. 2014; Lewandowska et al. 2010). Het LSU1-homoloog UP9C in tabak zou een rol spelen in de regulatie van de respons op zwaveltekorten via ethyleensignalisatie (Moniuszko et al. 2013). LSU2 werd dan weer geïdentificeerd als een gen dat vroeg tot expressie komt in de respons op brassinosteroiden (Rybel et al. 2009). Onlangs werd ook de ingang in de nationale fase aangekondigd van een octrooi op naam van Christophe Reuzeau (*BASF Plant Science Company, GMBH*) en Jenny Russinova (VIB Departement of Plant Systems Biology, VIB-PSB). Dit octrooi betrof een methode voor het verhogen van productiekenmerken in rijst en suikerriet via het tot overexpressie brengen van het LSU-peptide LSU2 (Reuzeau & Russinova 2014). Het blijft echter onduidelijk wat de precieze moleculaire functie van LSU-peptiden is in planten, hoewel deze kennis essentieel is voor het formuleren van mogelijke toepassingen gebaseerd op de LSU-peptiden.

Huidig LSU-onderzoek aan het CMPG-PFI

Om de LSU-interactoren, die gevonden werden via Y2H-studies, te bevestigen en om nieuwe interactoren te vinden, werden recent *tandem affinity purification* (TAP) analyses uitgevoerd in *A. thaliana* celculturen in samenwerking met de groep van Prof. Geert de Jaeger van het VIB-PSB in Gent. Deze techniek spoort enkel stabiele proteïne-proteïne interacties op en identificeerde voor de LSU-peptiden een kerncomplex interactor, nl. *guanylate binding family protein* (GBFP). Deze interactor bleek met hoge betrouwbaarheid te interageren met zowel LSU1, LSU2 als LSU3 en zou dus een belangrijke rol kunnen spelen in de functie van de LSU-peptiden. Het is opmerkelijk dat met de TAP-studie slechts één duidelijke interactor gevonden werd in tegenstelling tot de vele interactoren die geïdentificeerd werden met de Y2H-studies. De exacte functie van GBFP in *A. thaliana* is nog niet gekend, maar van guanylaat-bindende proteïnen (GBPs) is geweten dat ze GTPase activiteit bezitten, waardoor ze kunnen functioneren als een soort van schakelaars in signaaltransductie (Vestal & Jeyaratnam 2011). Menselijke GBPs zijn beter bestudeerd. Zij worden sterk geïnduceerd door interferon-gamma (IFN- γ) en vervullen belangrijke functies in de immuunrespons tegen microbiële en virale pathogenen (Vestal & Jeyaratnam 2011). Dit maakt dat het *A. thaliana* GBFP een eerste interessante interactor is om samen met de LSU-peptiden te onderzoeken in het kader van de

plantafweerrespons. Onderzoek met *A. thaliana*-lijnen met gewijzigde GBFP-expressie kan meer informatie verschaffen over de functie en lokalisatie van GBFP in de plant.

In deze thesis wordt ook gewerkt met FSD2 (*Fe superoxide dismutase 2*), een andere belangrijke LSU-interactor. Deze interactor werd geïdentificeerd tijdens de reeds vermelde grootschalige Y2H-interactoomstudies en bleek te interageren met zowel LSU1, LSU2 als LSU3 (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium 2011; Mukhtar et al. 2011). FSD2 heeft een gekende functie in de chloroplast ontwikkeling en meer specifiek in de afbraak van reactieve zuurstofsoorten (*Reactive Oxygen Species*, ROS) (§2.2.1).

Het doel van deze masterthesis is om meer inzicht te krijgen in de moleculaire functie van de *A. thaliana* LSU peptiden in de plantstressrespons. Het onderzoek dat in het kader hiervan wordt uitgevoerd kan opgedeeld worden in drie werkpakketten met volgende doelstellingen:

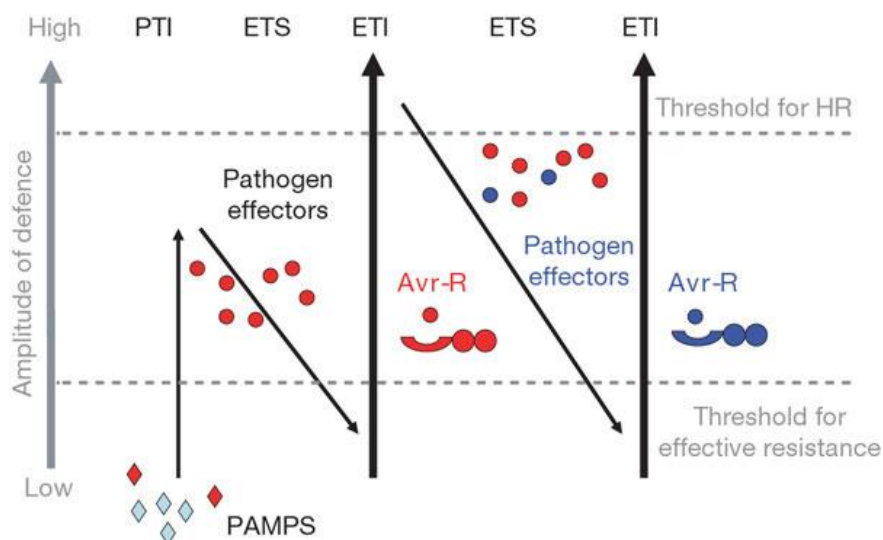
- Weefsel-specifieke en subcellulaire lokalisatie van de LSU-peptiden en -interactoren
 - Weefsel-specifieke lokalisatie d.m.v. histochemische GUS-kleuring van geselecteerde promotor:GUS-lijnen (pGUS-lijnen)
 - Subcellulaire lokalisatie d.m.v. de visualisatie van GFP-fusieconstructen via fluorescentie microscopie in *A. thaliana* mesofyl protoplasten (i.s.m. het labo van Prof. Rolland, Departement Biologie)
- Genexpressieanalyses van de LSU-peptiden en -interactoren
 - Nagaan van de gewijzigde expressie van de LSU-peptiden en -interactoren op verschillende ½ MS-media in wild-type planten
 - Selectie van homozygote T3 overexpressie en *knock-down*lijnen
- Fenotypische karakterisering van *A. thaliana*-lijnen met een gewijzigde expressie van LSU-peptiden en -interactoren in het kader van stressrespons
 - Ziektesten met necrotrofe en (hemi)biotrofe plantpathogenen
 - Abiotische stresstesten

2. Literatuurstudie

Planten worden voortdurend blootgesteld aan verschillende vormen van stress, enerzijds biotische stressfactoren zoals microbiële pathogenen en insecten, anderzijds abiotische stressfactoren, zoals ongunstige omgevingsomstandigheden. Gedurende hun evolutie hebben planten complexe verdedigingsmechanismen ontwikkeld om hiermee om te gaan. Deze verdedigingsmechanismen zullen besproken worden, te beginnen met de plant-pathogeen interactie. Daarna volgt een bespreking van planthormoonsignalisatiewegen en de geïnduceerde fysische en chemische verdediging die zij als gevolg hebben. Er wordt kort ingegaan op de abiotische stressrespons aangezien in deze masterthesis eveneens enkele abiotische stresstesten worden uitgevoerd. Tot slot volgt een beknopt overzicht van de huidige kennis van *hub*-proteïnen waartoe ook de leden van de LSU-familie behoren.

2.1 Plant-pathogeeninteracties

Planten komen voortdurend in contact met potentieel pathogene micro-organismen, maar infectie en ziekte zijn eerder de uitzondering dan de regel (Staskawicz 2001). Planten beschikken zowel over verschillende constitutieve als induceerbare verdedigingsmechanismen. De constitutieve of passieve verdedigingsmechanismen van de plant vormen de eerste verdedigingslinie en kunnen in de meeste gevallen verhinderen dat een micro-organisme in het plantweefsel doordringt. Deze passieve verdedigingsmechanismen bestaan uit fysische en chemische barrières, zoals bijvoorbeeld de hydrofobe waslaag, de cuticula, de celwand en de continue productie van secundaire metabolieten en antimicrobiële proteïnen en peptiden (Freeman & Beattie 2008). Toch kunnen naargelang de plantensoort specifieke micro-organismen deze eerste verdedigingslinie omzeilen en het plantweefsel binnendringen. In dit geval kan een snelle herkenning van de pathogeen optreden, gevolgd door de activatie van induceerbare plantverdedigingsmechanismen (Slusarenko et al. 2012; Dodds & Rathjen 2010). Als respons op deze verdedigingsmechanismen ontwikkelden plantpathogenen nieuwe infectiestrategieën waarop de plant weer zijn verdedigingsstrategie aanpaste (Dodds & Rathjen 2010). Als gevolg van deze continue co-evolutie tussen plant en pathogeen ontstond een uiterst complexe plantafweerrespons die voorgesteld kan worden aan de hand van het zigzag-model (Figuur 2) (Bari 2008). In de volgende paragrafen wordt hier in meer detail op ingegaan.



Figuur 2: Schematische voortelling van het zig-zag model. Herkenning van pathogeen-geassocieerde moleculaire patronen (PAMPs) initieert PAMP-geïnduceerde immuniteit (PTI). Om deze PTI te kunnen onderdrukken, evolueerden pathogenen effector/virulentie proteïnen die de PAMP-geïnduceerde signaalwegen blokkeren. Dit leidt in de plant tot effector-geïnduceerde gevoeligheid (ETS). Planten op hun beurt ontwikkelden effector-geïnduceerde immuniteit (ETI), dat voornamelijk gebaseerd is op de herkenning van effectoren. (Jones & Dangl 2006).

2.1.1 PAMP-geïnduceerde immuniteit (PTI)

De pathogeenherkenning in de plant gebeurt in de eerste plaats via patroonherkenningsreceptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs). Alle gekende PRRs behoren ofwel tot de receptorachtige kinasen (*Receptor like kinases*, RLKs) ofwel tot de receptorachtige proteïnen (*Receptor like proteins*, RLPs). RLKs bestaan uit een extracellulair bindingsdomein met leucinerijke herhalingen (*Leucine rich repeats*, LRR), een transmembraan domein en een intracellulair serine/threonine kinasedomein. Bij RLPs ontbreekt het intracellulaire domein (Nürnberg & Kemmerling 2006). PRRs bevinden zich in het plasmamembraan van elke plantencel waar ze pathogeengeassocieerde moleculaire patronen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) herkennen. PAMPs zijn geconserveerde microbiële moleculen die kenmerkend zijn voor volledige pathogeenklassen, vaak een essentiële functie vervullen voor de pathogeen en afwezig zijn in planten (Nicaise et al. 2009). PAMPs worden ook vaak microbegeassocieerde moleculaire patronen (*microbe-associated molecular patterns*, MAMPs) genoemd, aangezien ze ook voorkomen bij niet-pathogene micro-organismen (Zipfel 2008). Planten herkennen ook eigen moleculen, zoals celwandfragmenten, die vrijkomen tijdens pathogeenaanvallen. Deze moleculen worden aangeduid als gevaargeassocieerde moleculaire patronen (*danger-associated molecular patterns*, DAMPs) (Dodds & Rathjen 2010).

Van vele componenten afkomstig uit bacteriën, schimmels en oömyceten werd reeds aangetoond dat ze zich gedragen als PAMPs (Nürnberg et al. 2004; Zipfel & Felix 2005). Het

grote aantal gekende PAMPs staat in schril contrast met de beperkte kennis over de overeenkomstige receptoren (Nürnberger & Kemmerling 2006). Het best bestudeerde PRR is een LRR-RLK genaamd *flagellin sensitive 2* (FLS2), dat voor het eerst in *A. thaliana* werd geïdentificeerd. FLS2 herkent het peptide flg22 dat deel uitmaakt van het proteïne flagelline, een bouwsteen van het bacteriële flagellum (Nicaise et al. 2009). Een ander goed bestudeerde PAMP is chitine, een polymeer van N-acetyl-D-glucosamine (NAG) (Liu et al. 2012).

PAMP/MAMP/DAMP-herkenning door PRRs, leidt tot de activatie van PAMP-geïnduceerde-immuniteit (*PAMP triggered immunity*, PTI). De overgang van extracellulaire herkenning naar een intracellulair signaal kan gebeuren via het LRR-RLK BAK1 (*Brassinosteroid insensitive 1-associated kinase 1*), dat complexen vormt met verschillende PRRs waaronder FLS2 en EFR (Kim et al. 2013). Daarnaast heeft BAK1 ook een essentiële functie in brassinosteroïde signalering (§2.2.4), via de brassinosteroïde receptor BRI1 (Halter et al. 2014). De intracellulaire signaaloverdracht gebeurt vervolgens via een mitogeen-geactiveerde proteïnekinase (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK)-cascade. Deze MAPK-cascade leidt tot de activatie van WRKY-type transcriptie factoren, die een belangrijke regulatorische rol vervullen in plantverdediging. PAMP-herkenning zal uiteindelijk leiden tot onder andere de influx van Ca²⁺-ionen, productie van ROS, callose afzettingen nabij infectieplaatsen en planthormoonproductie (§2.2) (Nicaise et al. 2009). De PTI respons is een ‘algemene verdedigingsrespons’ tegen niet-specifieke pathogenen en biedt een efficiënte bescherming tegen zowel biotrofe als necrotrofe pathogenen. Het levert een essentiële bijdrage aan de gehele plantverdediging (Nürnberger & Kemmerling 2006; Dodds & Rathjen 2010).

2.1.2 Effector-geïnduceerde gevoeligheid (ETS)

Bepaalde pathogenen hebben het vermogen ontwikkeld om de PTI-respons te onderdrukken aan de hand van effectorproteïnen. Deze proteïnen verhogen de pathogeenvirulentie en interfereren met PTI-processen door bijvoorbeeld in te werken op MAPK-signalisatie of PRRs (Dodds & Rathjen 2010; Nicaise et al. 2009). Dit leidt in de plant tot effector-geïnduceerde gevoeligheid (*effector-triggered susceptibility*, ETS; Figuur 2).

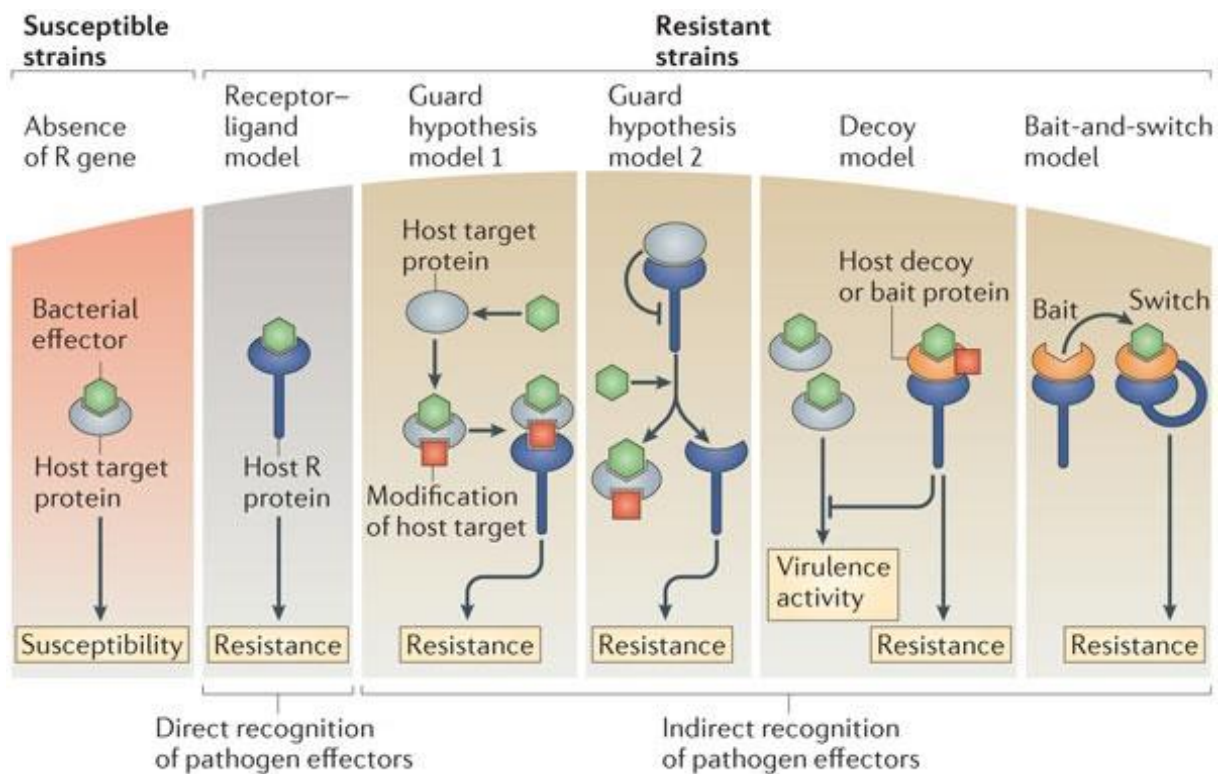
Een typische fytopathogene bacterie heeft twintig tot dertig effectoren, die als geheel essentieel zijn voor ziekteontwikkeling, maar individueel zeer variabel en vaak onderling uitwisselbaar zijn (Kvitko et al. 2009). Effectoren worden direct in het gastheercytoplasma gebracht via het type-III secretie systeem (TTSS) (Dodds & Rathjen 2010) en kunnen op verschillende manieren inwerken op doelwitproteïnen om zo cellulaire processen in de gastheer te beïnvloeden. Meestal interfereren ze rechtstreeks met PTI-responsen van de plant, maar ze kunnen ook werken als

transcriptiefactoren of planthormoonanalogen (Mudgett 2005; Abramovitch et al. 2006; Grant et al. 2006). Sommige Psy-stammen maken bijvoorbeeld het fytotoxine coronatine aan, een jasmonaat-analoog die de salicylzuur-afhankelijke verdedigingsrespons (§2.2.2) onderdrukt en het openen van stomata induceert, zodat de pathogeen gemakkelijker de apoplast kan bereiken (Jones & Dangl 2006). Schimmels en oömyceten produceren ook effectoren die in de gastheercel gebracht worden (O'Connell & Panstruga 2006; Birch et al. 2006). Haustoria spelen hierbij een belangrijke rol, zoals werd aangetoond voor de AvrL567, AvrM en AvrP123 effectoren van de roestschimmel *Melampsora lini* (Kamoun 2007).

2.1.3 Effector-geïnduceerde immuniteit (ETI)

De tweede verdedigingslinie van de plant tegen pathogenaanvallen is gebaseerd op de intracellulaire herkenning van effectoren. Indien deze intracellulaire herkenning leidt tot een succesvolle afweerrespons, verkrijgt de plant effector-geïnduceerde immuniteit (*Effector-triggered Immunity*, ETI; Figuur 2) (Chisholm et al. 2006). ETI is een specifieke verdedigingsrespons die volgens de *gene-for-gene* theorie reageert op gespecialiseerde pathogenen. Deze theorie stelt dat een plant resistent is tegen een pathogeen indien het een specifiek resistentie (R)-gen bezit dat overeenkomt met het avirulentie (Avr)-gen, dat codeert voor avirulentie proteïnen of effectoren in diezelfde pathogeen (Flor 1971). De meeste R-genen coderen voor NB-LRR proteïnen, die in hun structuur een *nucleotide-binding* (NB) domein en *Leucine rich repeats* (LRR) bezitten en functioneren als intracellulaire effectorreceptoren (Jones & Dangl 2006; Khan et al. 2015). De herkenning van pathogeen-specifieke effectoren door deze R-proteïnen kan rechtstreeks gebeuren of onrechtstreeks, via een hulpproteïne (*accessory protein*; Figuur 3) (Dodds & Rathjen 2010). In het geval van rechtstreekse herkenning zal de effector een immuunreactie uitlokken door zelf aan de receptor te binden. Deze interactie gebeurt simpelweg via het receptor-ligand model. Onrechtstreekse interacties kunnen opgedeeld worden volgens het *guard*-, *decoy*- of *bait*-model (Figuur 3). In het *guard*-model worden de effectordoelelitten 'bewaakt' door specifieke R-proteïnen. Wanneer de pathogeneeffector bindt op het effectordoelelwit wordt deze gemodificeerd en de modificatie wordt opgemerkt door het R-proteïne dat vervolgens de plantafweer opstart. In een alternatief *guard*-model zijn in de gezonde cel het R-proteïnen en het doelelwitproteïne gebonden. Tijdens een infectie wordt deze binding door de pathogeneeffector verstoord waardoor het R-proteïne vrijkomt en vervolgens een immuunrespons opstart (Figuur 3). In het *decoy*-model bindt de pathogeneeffector met een lokaasproteïne dat structureel gelijkend kan zijn op het doelelwitproteïne. De effector modificeert het lokaasproteïne waardoor het herkend kan worden

door een R-proteïne. Het *bait-and-switch*-model is sterk gelijkend op het *decoy*-model in die zin dat de pathogeen-effector ook op een lokaasproteïne bindt. Echter, in dit geval veroorzaakt het lokaasproteïne dat gebonden is aan de pathogeen-effector een modificatie in het R-proteïne waardoor diens functie wijzigt en het de plantafweer kan opstarten (Stuart et al. 2013).



Figuur 3 Rechtstreekse en onrechtstreekse effectorherkenning door NB-LRR receptoren. In een gevoelige gastheer treedt geen herkenning van de pathogeen-effector door R-proteïnen op. Een resistente gastheer beschikt over resistentie (R)-proteïnen die de pathogeen-effector rechtstreeks of onrechtstreeks kunnen herkennen en vervolgens de immuunrespons opstarten. De rechtstreekse herkenning gebeurt via het receptor-ligand-model waarbij de gastheerreceptor de effector rechtstreeks kan herkennen. In het *guard*-model worden effectordoeelwitten 'bewaakt' door specifieke R-proteïnen die de afweer opstarten wanneer de effectordoeelwitten door de pathogeen-effector worden verstoord. In een eerste model leidt de interactie tussen effector en het gastheerdoelwitproteïne tot een modificatie van het doelwit. In een alternatief *guard*-model zijn het R-proteïne en het doelwitproteïne in een gezonde cel aan elkaar gebonden en wordt het doelwitproteïne gemodificeerd door de pathogeen-effector waardoor het R-proteïne vrijkomt en een immuunrespons opstart. In het *decoy*-model bindt de pathogeen-effector niet met het eigenlijke doelwitproteïne maar met een lokaasproteïne dat structureel gelijkend kan zijn aan het doelwitproteïne. Het gemodificeerde lokaasproteïne wordt herkend door een R-proteïne waarna de immuunrespons wordt opgestart. In het *bait-and-switch*-model bindt de pathogeen-effector op een lokaasproteïne dat vervolgens het R-proteïne bindt en diens functie wijzigt (*switch*) opdat deze het immuunsysteem opstart (Stuart et al. 2013).

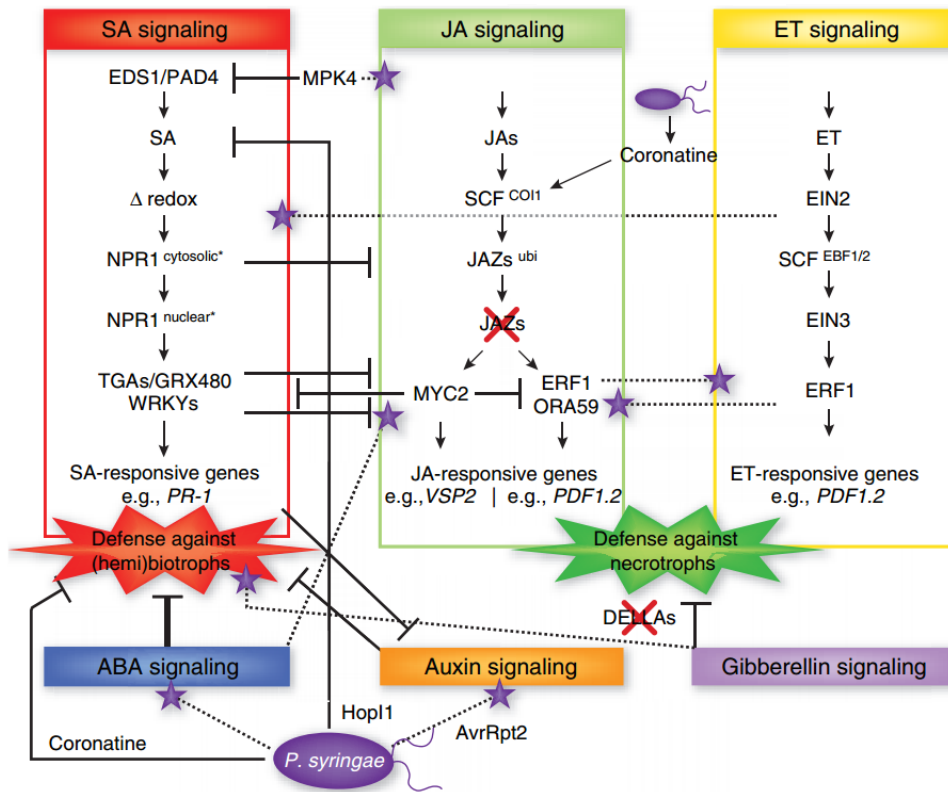
Een voorbeeld van een R-proteïne is het NB-LRR proteïne SUMM2, dat de verstoring van MAPK-signalisatie door de *P. syringae* effector HopA11 gaat herkennen (Zhang et al. 2012). Veel pathogeen-effectoren hebben elementen van MAPK-sigtaaltransductiewegen als doelwit (Zhang et al. 2007). Andere voorbeelden van effectoren die MAPK-sigtaaltransductiewegen verstoren zijn HopF2 en AvrB van *P. syringae* en VirE2 van *Agrobacterium* (Wang et al. 2010; Cui et al. 2010; Djamei et al. 2007).

Over het algemeen leiden PTI en ETI tot gelijkaardige responsen, hoewel de ETI respons sterker en sneller is (Dodds & Rathjen 2010) en vaak gepaard gaat met een hypersensitieve

respons (HR), een vorm van lokale geprogrammeerde celdood (Nicaise et al. 2009). HR is vaak efficiënt tegen biotrofe pathogenen, omdat biotrofen levend materiaal nodig hebben om te overleven (Govrin & Levine 2000a). Toch is HR geen noodzakelijk onderdeel van ETI. Bij veel interacties is het mechanisme dat de pathogeengroei stopt immers nog onbekend. De afwisseling tussen de pathogeenerkenning door de plant (ETI) en het omzeilen van het immuunsysteem door de pathogeen via de productie van nieuwe effectoren (ETS) vormt de basis van de co-evolutionaire dynamieken tussen plant en pathogeen. Deze co-evolutie treedt in veel mindere mate op bij PTI omdat veel PAMPs in tegenstelling tot effectoren, een essentiële functie vervullen in het micro-organisme en daardoor een zeer trage evolutie kennen (Dodds & Rathjen 2010).

2.2 Signaaltransductie en planthormonen

Planthormonen spelen een essentiële rol in de coördinatie van plantengroei en -ontwikkeling, maar reguleren ook in grote mate plantafweerresponsen (Santner & Estelle 2009). Als reactie op abiotische stress of een pathogeenaanval, worden in de plant verdedigingsmechanismen opgestart via verschillende signaaltransductiewegen. Daarnaast wordt niet alleen lokaal de plantverdediging opgestart, maar vaak ook in afgelegen plantendelen, wat leidt tot systemisch verkregen resistentie (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) (Baxter et al. 2014). Op gebied van plantafweer zijn salicylzuur (SA), jasmonaat (JA) en ethyleen (ET) de best bestudeerde planthormonen (Bari & Jones 2009). Maar ook andere planthormonen zoals abscisinezuur (ABA), auxine (AUX), gibberellines (GA), cytokinines (CK) en brassinosteroiden (BR) spelen een belangrijke rol in plantafweersignalisatie (Denancé et al. 2013; Lozano-Durán & Zipfel 2015; Vos et al. 2015). De signaaltransductiewegen van deze hormonen en hun interactie wordt voorgesteld in Figuur 4. Naast planthormonen wordt in dit onderdeel ook ingegaan op de signaalfunctie van reactieve zuurstofsoorten (ROS), die ook van groot belang is in de plantafweerrespons (Mittler et al. 2004).



Figuur 4: Voorstelling van de interacties tussen de signaaltransductiewegen van verschillende planthormonen betrokken bij de plantverdedigingsrespons. De SA, JA en ET signaaltransductiewegen vormen de ruggengraat van de plantverdediging, andere hormonen en pathogeen effectorproteïnen werken hierop in. Sterretjes duiden op een positief effect, geblokkeerde streepjes duiden op een negatief effect (Pieterse et al. 2009).

2.2.1 Reactieve zuurstofsoorten

ROS is een collectieve term voor zeer reactieve zuurstofverbindingen die enerzijds gevormd worden door een onvolledige reductie van zuurstof, bijvoorbeeld in het geval van waterstofperoxide (H_2O_2), het superoxide radicaal ($O_2^{\cdot-}$) en het hydroxyl radiaal ($OH\cdot$), of anderzijds door een excitatie van moleculair zuurstof, zoals bij singlet zuurstof (1O_2) (del Rio 2015; Petrov et al. 2015). ROS worden beschouwd als natuurlijke nevenproducten van zuurstofafhankelijke metabolische processen, zoals de aerobe ademhaling en fotosynthese, waardoor ROS-productie onoverkomelijk deel uitmaakt van een aerobe levenswijze (Mittler et al. 2004). Door hun sterk reactief karakter kunnen ROS ernstige, oxidatieve schade toebrengen aan lipiden, proteïnen en nucleïnezuren in levende cellen (del Rio 2015). Maar ondanks hun potentiële toxiciteit, blijken ROS een dubbele rol te vervullen in de plant. In hoge concentratie kunnen ze leiden tot geprogrammeerde celdood (*programmed cell death*, PCD), terwijl ze in lage concentratie blijken te functioneren als regulatoren van essentiële processen zoals groei, ontwikkeling, (a)biotische stressresponsen en hormoonsignalering (Mittler et al. 2011; Suzuki et al. 2011; Petrov et al. 2015).

ROS-productie en afbraak

Om ROS in hun voordeel te kunnen gebruiken, maar oxidatieve schade te vermijden, moeten planten in staat zijn om in hun weefsels een niet-toxische basisconcentratie te behouden. In *A. thaliana* reguleert een netwerk van ten minste 152 genen de ROS-homeostase. Deze genen coderen voor zowel ROS-producerende proteïnen als ROS-afbraakproteïnen en vertonen een zeer dynamische en redundante expressie (Mittler et al. 2004). De productie van ROS gebeurt als nevenreactie van aerobe processen in organellen zoals mitochondria, peroxisomen en chloroplasten, maar ook door een groot aantal oxidasen waaronder nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat (NADPH)- oxidasen, pH-afhankelijke celwand peroxidasen en amineoxidasen (del Rio 2015). De belangrijkste ROS afbraakenzymen in planten zijn onder andere superoxidedismutase (SOD), ascorbaatperoxidase (APX), catalase (CAT) en glutathionperoxidase (GPX). Ook antioxidantia zoals ascorbinezuur en glutathion worden door plantencellen gebruikt om ROS en vnl. O_2^- en H_2O_2 onschadelijk te maken (Mittler, 2004).

ROS-siginaaltransductie

ROS spelen een essentiële rol in de plantafweerrespons, zowel rechtstreeks als lokale verdedigingsmoleculen, maar ook onrechtstreeks als belangrijke signaalmoleculen (Suzuki et al. 2011). In respons op vele abiotische en biotische stressstimuli ontstaat plaatselijk een “oxidatieve uitbarsting”, als gevolg van een sterk verhoogde ROS-productie door *respiratory burst homolog* proteïnen (RBOH) (Baxter et al. 2014; Gilroy et al. 2014). Deze lokale wijziging in ROS-niveaus wordt waargenomen door allerlei proteïnen, enzymen en receptoren die op hun beurt diverse ontwikkelings- en verdedigingsmechanismen moduleren (Gilroy et al. 2014). Tegelijkertijd wordt een systemisch ROS-siginaal geïnitieerd dat zich vanuit het aangetaste weefsel over de gehele plant verspreidt (Gilroy et al. 2014). Deze ROS-golf activeert stress-specifieke hormoonsignalen in systemische weefsels na een lokale stressstimulus (Baxter et al. 2014). Het is aangetoond dat ROS-siginaalering interageert met verschillende hormoonsiginaalwegen (Fujita et al. 2006) zoals ET- (Jakubowicz et al. 2010; Mühlentock et al. 2008), SA- (Torres, 2006, Baxter, 2014), BR- (Xia, 2009) en ABA-siginaalering (Kwak et al., 2003; Sagi et al., 2004; Ma et al., 2012; Drerup et al., 2013). ROS-siginaalering kent ook een sterke interactie met calciumsiginaalering en fosforylatiecasades (Torres, 2006).

ROS als verdedigingsmolecule

Naast hun rol als signaalmolecule, hebben ROS lokaal ook een directe verdedigingsfunctie. Enerzijds functioneren ROS als directe toxines, door met hun hoge reactiviteit ernstige schade

toe te brengen aan proteïnen, lipiden en nucleïnezuren van de pathogeen (Lamb & Dixon 1997). Daarnaast spelen ROS ook een rol in het versterken van fysieke barrières op de infectieplaats, bijvoorbeeld door de inductie van het crosslinken van celwandglycoproteïnen of door het oxidatief crosslinken van precursoren, tijdens de gelokaliseerde biosynthese van lignine en suberine polymeren (Hückelhoven 2007; Temme & Tudzynski 2009). ROS kunnen eveneens de productie van phytoalexines en andere secundaire metabolieten induceren die pathogeengroei verhinderen (Thoma et al. 2003). Het verdedigingsproces waar ROS echter het meest mee in verband gebracht worden, is de geprogrammeerde celdood.

Geprogrammeerde celdood, dat optreedt tijdens HR, is een efficiënt verdedigingsmechanisme tegen biotrofe pathogenen, die afhankelijk zijn van levende gastheercellen (Glazebrook 2005; Govrin & Levine 2000b), maar is niet geschikt tegen necrotrofe pathogenen, die leven op dood of afgedood plantenweefsel. Sommige pathogenen, zoals *Botrytis cinerea* zijn niet alleen resistent tegen de oxidatieve uitbarsting, maar stimuleren het zelfs door zelf ROS te produceren en de ROS-productie te induceren in de plant (Schouten et al. 2002; Segmüller et al. 2008). Om te vermijden dat de redoxpotentiaal van de eigen cellen verstoord wordt, beschikt *B. cinerea* over een groot aantal genen die coderen voor ROS-afbraak enzymen zoals catalasen en peroxidasen (Temme & Tudzynski 2009).

2.2.2 Salicylzuur

Salicylzuur (SA) speelt een cruciale rol in plantafweer en is voornamelijk betrokken bij de activatie van afweerresponsen tegen biotrofe en hemi-biotrofe pathogenen en in SAR (Bari & Jones 2009). Daarnaast heeft het een belangrijke functie in de regulatie van de plantrespons op diverse abiotische stressen zoals zoutstress en oxidatieve stress (Chen et al. 2009). Buiten plantafweer is SA betrokken in de regulatie van plantengroei, thermogenese, bloeiïnductie en de opname van ionen (Hayat et al. 2007). SA is een fenolverbinding die gesynthetiseerd wordt vertrekkend van chorismaat in de chloroplasten, of in kleine hoeveelheden via de fenylpropanoïdsyntheseweg in het cytoplasma. De synthese wordt zowel tijdens PTI als ETI geïnduceerd en bepaalde genen zijn cruciaal voor SA-accumulatie, zoals onder meer *ICS* (*Isochorismaat synthase*), *EDS1* (*Enhanced disease susceptibility 1*) en *PAD4* (*Phytoalexin deficient 4*) (Chen et al. 2009; Wildermuth et al. 2001).

SA-siginaaltransductie

Stimulatie van immuunreceptoren na pathogeeninfectie leidt tot verhoogde intracellulaire Ca²⁺-concentraties (Dodds & Rathjen 2010; Boudsocq & Sheen 2013; Poovaiah et al. 2013), welke

door Ca^{2+} -sensoren zoals calmodulin (CaM) en Ca^{2+} -afhankelijke proteïnekinasen (CDPKs) opgemerkt worden (Seyferth 2014). Beide sensoren reguleren via verschillende transductiewegen de expressie van *ICS1* (Wang et al. 2009; Wang et al. 2011; Zhang et al. 2010; Wan et al. 2012) en *EDS1* (Seyfferth & Tsuda 2014), wat leidt tot verhoogde SA-concentraties in plantenweefsels. Deze verhoogde SA-concentratie wordt waargenomen door SA-receptoren, die de expressie van pathogenese gerelateerde (*pathogenesis related*, PR) genen induceren (Bari & Jones 2009).

In *A. thaliana* werden drie NPR-proteïnen (*Non-expressor of pathogenesis-related genes*) geïdentificeerd als SA-receptoren nl. NPR1, NPR3 en NPR4 (Fu et al. 2012). NPR1 functioneert als de belangrijkste regulator in de SA-gemedieerde immuunrespons (Shah et al. 1997; Volko et al. 1998; Dong 2004) terwijl de NPR1-analogen, NPR3 en NPR4, een rol spelen in NPR1-degradatie (Fu et al. 2012). Bij lage SA-concentraties komt NPR1 voor als oligomeer in het cytoplasma, waarbij de monomeren bijgehouden worden door intermoleculaire disulfidebindingen. Hoge SA-concentraties veroorzaken wijzigingen in de cellulaire redox potentiaal waardoor deze disulfidebindingen reduceren en NPR1 monomeriseert (Tada et al. 2008; Glazebrook 2005). De gevormde NPR1 monomeren verplaatsen zich naar de kern, waar ze de expressie van PR-genen induceren, via de interactie met bv. *TGA* transcriptiefactoren (Fu et al. 2012) die de transcriptie reguleren van SA-induceerbare genen waaronder PR-genen en ook WRKY-transcriptiefactoren (Pieterse et al. 2012; Wang et al. 2006; Pajerowska-Mukhtar et al. 2012). Een overzicht van deze signaaltransductieweg wordt voorgesteld in Figuur 4.

Functie van SA in de plantafweerrespons

Salicylzuur speelt een belangrijke rol in de plantafweer tegen (hemi)biotrofe pathogenen, maar ook in het induceren van SAR (Bari & Jones 2009). SAR is een secundaire immuunrespons in systemische plantendelen die geactiveerd wordt door een lokale verdedigingsrespons en de volledige plant voorbereidt op toekomstige infecties (Gruner et al. 2013). Exogene toepassing van SA of SA-analogen kan eveneens leiden tot verhoogde resistentie tegen bepaalde pathogenen (Achuo et al. 2004; Anand et al. 2007) en deze verhoogde resistentie is voornamelijk het gevolg van de inductie van PR-genen (Bari & Jones 2009). Sommige pathogenen verstoren de SA signaaltransductieweg om hun infectie te vergemakkelijken. Bijvoorbeeld, de necrotrofe schimmel *B. cinerea* produceert het toxine botrydial dat de SA-productie in *A. thaliana* beïnvloedt en een HR-achtige celdood induceert (Rossi et al. 2011).

2.2.3 Jasmonaat en Ethyleen

In tegenstelling tot SA worden de planthormonen jasmonaat (JA) en ethyleen (ET) voornamelijk in verband gebracht met de verdediging tegen necrotrofe pathogenen en herbivoren (Bari & Jones 2009; Berr et al. 2010). JA reguleert ook diverse andere processen zoals zaadkieming, wortelgroei, vruchtrijping, bladveroudering en stomatale opening (Bari & Jones 2009). Ethyleen is naast plantafweer ook betrokken bij kieming, bloei-inductie, vruchtrijping, bladval en veroudering van plantweefsels (Bakshi et al. 2015). JA, en zijn structureel verwante derivaten zijn lipide-afgeleide verbindingen, die gesynthetiseerd worden vertrekkende van alfa-linoleenzuur (ALA). ALA wordt vrijgezet uit galactolipiden die zich in het chloroplastmembraan bevinden. Conjugatie van JA met het aminozuur L-isoleucine (Ile) geeft het bioactieve hormoon (3R,7S)-jasmonyl-L-isoleucine (Ja-Ile) (Creelman & Mullet 1997; Wasternack & Hause 2013). ET wordt gevormd vanuit methionine via S-adenosyl-L-methionine (AdoMet) en 1-aminocyclopropan-1-carboxylzuur (ACC) (Rudus' et al. 2012).

JA-sigtaaltransductie

De JA-signalisatieweg gebeurt via het F-box proteïne COI1 (*Coronatine insensitive 1*), dat deel uitmaakt van het E3 ubiquitine ligase complex SCF^{COI1} (*SKP1-Cullin-F-box*). Binding van JA-Ile aan SCF^{COI1} leidt tot ubiquitinatie en daaropvolgende afbraak van de JAZ-proteïnen, repressors van de JA-respons. Hierdoor wordt onderdrukking van de transcriptie van JA-afhankelijke genen opgeheven, waardoor de JA-respons geactiveerd kan worden (Ballaré 2011). De daaropvolgende JA-signalisatieweg kan in *A. thaliana* via twee wegen gebeuren: (i) de MYC-weg die gecontroleerd wordt door MYC-transcriptiefactoren en geassocieerd is met resistentie tegen insecten of de respons op verwonding en (ii) de ERF-weg die gecontroleerd wordt door ERF-transcriptiefactoren (*Ethylene response factor*) en geassocieerd is met resistentie tegen necrotrofe pathogenen (Pieterse et al. 2012).

Het gasvormige planthormoon ethyleen (ET) wordt herkend door membraangeassocieerde receptoren, waaronder ETR1 (*Ethylene receptor 1*) (Yoo et al. 2009). Deze receptoren onderdrukken in samenwerking met CTR1 (*Constitutive triple response 1*) de positieve regulatoren van de ET-signalisatie, zoals EIN2 (*Ethylene insensitive 2*). De binding van ET aan de receptoren inactieveert deze en heft zo de onderdrukking van de stroomafwaartse ET-signalisatie via EIN2 op (Yoo et al. 2009; Guo & Ecker 2004). EIN2 inhibeert het SCF^{EBF1/2} E3 ubiquitine ligase complex, dat instaat voor de continue afbraak van de belangrijke transcriptiefactor EIN3 via het 26S proteasoom (Pieterse et al. 2009). EIN3 activeert ERF-transcriptiefactoren, zoals ERF1, die op hun beurt de expressie van verschillende ET-

afhankelijke genen induceren (Yoo et al. 2009). Een beknopt overzicht van ET en JA signaaltransductie wordt weergegeven in Figuur 4.

Functie van JA en ET in de plantafweerrespons en interactie tussen planthormonen

De JA en ET-afhankelijke signaalwegen worden meestal geassocieerd met de verdediging tegen necrotrofe pathogenen en herbivore insecten (Berr et al. 2010). JA en ET spelen ook een belangrijke rol in de geïnduceerde systemische resistentie (*induced systemic resistance*, ISR), welke vergelijkbaar is met SAR maar geïnduceerd wordt door goedaardige micro-organismen zoals *Trichoderma spp.* (Mengiste 2012). Binnen de JA-sigtaaltransductieweg interageren de ERF- en MYC-aftakking voornamelijk antagonistisch met elkaar (Lorenzo et al. 2004; Verhage et al. 2011; Vos et al. 2013). De expressie van transcriptiefactoren ERF1 en ORA59 (*Octadecanoid-responsive Arabidopsis 59*), die deel uitmaken van de ERF-tak in de JA-sigtaaltransductieweg en belangrijk zijn voor de plantrespons tegen necrotrofe pathogenen, wordt geïnduceerd door zowel JA als ET (Vos et al. 2015; Pré et al. 2008). ERF1 gedraagt zich ook als positieve regulator van de JA en ET signalering (Lorenzo 2002). De transcriptiefactor MYC2, onderdeel van de MYC-tak in de JA-sigtaaltransductieweg en belangrijk voor de plantrespons op insecten of verwondingen, onderdrukt ERF1 en ORA59 (Pieterse et al. 2009) en de expressie van PR-genen (Bari & Jones 2009). Via MYC2 wordt in *A. thaliana* dus de inductie gereguleerd van ofwel JA-afhankelijke pathogeenverdediging ofwel JA-afhankelijk verwondingsrespons (Dombrecht et al. 2007). SA, ET en JA signaalwegen interageren echter ook sterk met elkaar tijdens de plantverdedigingsrespons. Deze interactie maakt het voor de plant mogelijk om gepast op elke specifieke pathogeen te reageren en zo geen energie te verspillen bij het opstarten van onnodige signaalwegen (Vos et al. 2015). De SA en JA/ET transductiewegen werken meestal antagonistisch op elkaar in en NPR1 speelt hierin een centrale rol (Bari 2008). Nucleair NPR1 zorgt voor de activatie van SA-geïnduceerde genen, terwijl cytosolisch NPR1 zorgt voor het onderdrukken van JA-geïnduceerde genen (Pieterse et al. 2009). Andere belangrijke spelers in de SA-JA/ET interactie zijn (i) het proteïnekinase MPK4 (Map kinase 4), (ii) de lipase-achtige proteïnen EDS1 en PAD4, (iii) GRX480 (Glutaredoxine 80) en zijn interactie met de TGA-transcriptiefactoren en (iv) de WRKY-transcriptiefactoren (Pieterse et al. 2009). Andersom kan JA de SA-afhankelijke verdedigingsresponsen onderdrukken via de MYC2-transcriptiefactor (Robert-Seilaniantz et al. 2011).

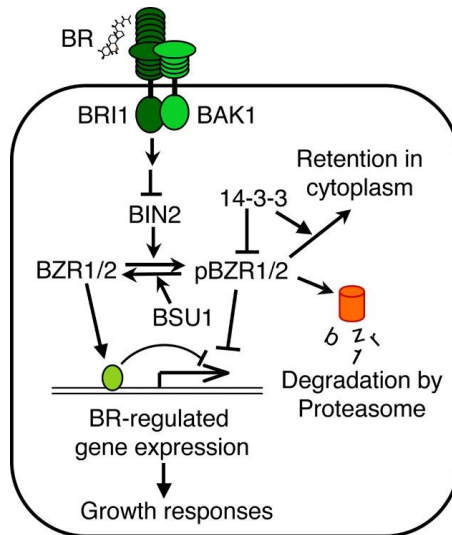
2.2.4 Andere planthormonen

Naast de bovenbeschreven planthormonen spelen ook andere planthormonen een rol waaronder abscisinezuur, auxine, gibberellines, cytokinines en brassinosteroiden. In deze paragraaf wordt enkel ingegaan op de brassinosteroiden omdat voor LSU-peptiden reeds is aangetoond dat ze hierdoor geïnduceerd worden (Rybel et al. 2009). Het belang van de andere planthormonen in de regulatie van de plantverdediging mag echter niet onderschat worden.

Brassinosteroiden

Brassinosteroiden (BR) zijn betrokken in de regulatie van groei, ontwikkeling en verschillende fysiologische responsen in de plant waaronder zaadkieming, celdeling en –elongatie, bloei, veroudering en respons op abiotische stress (Lozano-Durán & Zipfel 2015). Daarnaast beïnvloeden BR ook de plantverdedigingsrespons, onder andere via regulatie van de expressie van verschillende PR-genen en genen die instaan voor de biosynthese van andere hormonen zoals ET en JA (Krishna 2003). Naast BR zelf blijken bovendien ook diverse componenten van de BR-sigtaaltransductieweg betrokken te zijn bij de regulatie van de plantverdedigingsrespons tegen diverse pathogenen (Maruyama-Nakashita et al. 2003; Krishna 2003).

Een belangrijke speler in de BR-sigtaaltransductieweg is het BRI1-geassocieerd kinase 1 (*BRI1-associated kinase 1*, BAK1), dat interageert met de BR-receptor BRI1 na binden van BRs. Als gevolg van deze interactie kan het BR-sigtaal doorgegeven worden waardoor uiteindelijk de transcriptiefactoren BRI1-ems onderdrukker (*BRI1-ems-suppressor 1*, BSE1) en Brassinazole-resistent 1 (*Brassinazole-resistant 1*, BZR1) geactiveerd worden, die BR-afhankelijke genen kunnen aanschakelen (Figuur 5) (Li et al. 2002; Nam & Li 2002). Daarnaast is BAK1 ook betrokken bij de regulatie van de basale plantverdediging, PAMP-herkenning en geprogrammeerde celdood (Chinchilla et al. 2007; Kemmerling et al. 2007; Heese et al. 2007). Verschillende bacteriële effectoren hebben BAK1 als doelwit (Shan et al. 2008). Een andere belangrijke component is *brassinosteroid insensitive 2* (BIN2), een glycogeen synthase kinase 3-achtig (*glycogen synthase kinase 3-like*, GSK3-like) proteïne dat waarschijnlijk functioneert als een negatieve regulator van de BR-sigtaaltransductiepathway (Li & Nam 2002). BIN2 fosforyleert de transcriptiefactoren BSE1 en BZR1 in de afwezigheid van BRs waardoor ze hun DNA-bindende activiteit verliezen en het doelwit worden voor proteosoom degradatie (Figuur 5). BSE1 en BZR1 kunnen echter in het cytoplasma weerhouden worden door 14-3-3 proteïnen (Figuur 5). BIN2 wordt gedeactiveerd door BRI1-SUPPRESSOR 1 (BSU1) waardoor het een doelwit wordt voor proteosoomafbraak (Lozano-Durán & Zipfel 2015).



Figuur 5: Een model voor de Brassinosteroïde signalisatieweg. De pijlen en streepjes stellen respectievelijk inductie en inhibitie voor. BR binden aan het extracellulaire domein van de BRI1 receptor kinase waardoor deze het BAK1 receptorkinase kan fosforyleren. Het signaal wordt doorgegeven via een ongekend mechanisme en inactieveert het BIN2 kinase. Hierdoor worden BZR1 en BZR2 gedefosforyleerd waardoor ze DNA kunnen binden, wat leidt tot de expressie van BR-afhankelijke genen. Fosforylatie van BZR1 en BZR2 door BIN2 verhindert de binding op het DNA en zorgt ervoor dat ze gedegradeerd worden. Binding met 14-3-3 proteïnen bevordert retentie in het cytoplasma. (Tang et al. 2008).

2.3 Geïnduceerde verdediging

De herkenning van een pathoog door de plant en het aanschakelen van signaaltransductiewegen zal er toe leiden dat verschillende plantverdedigingsmechanismen, zowel fysisch als chemisch, worden geïnduceerd.

Fysische barrières

Onder fysische barrières verstaat men de structurele verdedigingsmechanismen die continu aanwezig zijn of geïnduceerd worden na pathoogaanval. Als reactie op pathoogaanvallen kan de celwand verdikken door de productie van cellulose-achtig materiaal om zo een efficiënte barrière te vormen tegen verdere pathoogpenetratie (Sharma 2014). Bij infectie door schimmelpathogenen kunnen callosepapillen afgezet worden in de celwand om deze te versterken (Voigt 2014). Hyfen die de cel doorheen de celwand komen, kunnen worden omhuld met callosemateriaal versterkt met fenolen ter vorming van een lignituber (Sharma 2014; Freeman & Beattie 2008; Agrios 2012). Daarnaast kunnen ook weefsels verder weg van de infectieplaats gemodificeerd worden (histologische verdedigingsstructuren). Voorbeelden hiervan zijn de vorming van kurkcellagen, abscissielagen, tylosen in het xyleem en gomvorming (Sharma 2014; Agrios 2012).

Chemische barrières

Naast primaire metabolieten, zoals suikers, proteïnen, aminozuren en nucleïnezuren, produceert een plant ook secundaire metabolieten in respons op (a)biotische stress. Secundaire

metabolieten die gericht zijn tegen schimmelpathogenen kunnen over het algemeen in 4 klassen worden onderverdeeld: polyketiden, terpenoïden, shikimaat-afgeleiden en niet-ribosomale peptiden (Pusztahelyi et al. 2015). Voorbeelden van polyketiden bij planten zijn stilbenoïden en flavonoïden. De synthese gebeurt door polyketide synthasen (PKSs), een groep enzymen die de condensatie katalyseren van een CoA ester zoals acetyl co-enzyme A met een ander CoA ester zoals malonyl co-enzyme A (Flores-Sanchez & Verpoorte 2009). Een voorbeeld van een polyketide is het stilbenoïde resveratrol uit druif (*Vitis vinifera*). Deze druivensoort is resistent tegen *B. cinerea* infectie onder andere doordat de plant bij herkenning van de pathogeen verschillende stilbenen produceert waaronder resveratrol en pterostilbeen. Deze componenten blijken *in vitro* de kieming van conidiën tegen te gaan en myceliumgroei te inhiberen (Caruso et al. 2011). Terpenoïden zijn de grootste klasse van secundaire metabolieten met meer dan 22000 beschreven componenten. Monoterpenen en sesquiterpenen zijn belangrijke componenten in essentiële oliën, die vaak functioneren als insecttoxines (Herrera et al. 2015) of beschermen tegen schimmel- of bacteriële infecties (Rao et al. 2010; Ben Arfa et al. 2006). Onder de shikimaat-afgeleiden zijn bijvoorbeeld een groot aantal fenolen, die een breed spectrum aan afweer-gerelateerde componenten bevatten waaronder tannines, fouranocoumarines en lignine (Freeman & Beattie 2008). Naast deze chemische componenten zijn ook specifieke enzymen en proteïnen nl. pathogenese-gerelateerde proteïnen (pathogenesis related proteins, PR-proteïnen) betrokken bij de chemische geïnduceerde verdediging (Filipenko et al. 2013). Deze proteïnen inhiberen specifiek pathogenen of hun effectoren door het blokkeren van de actieve sites of door het wijzigen van de enzymconformaties. Voorbeelden zijn defensinen, chitinasen en hydrolytische enzymen (Freeman & Beattie 2008).

2.4 Abiotische stressrespons

2.4.1 Nutriënttekorten

Veel bodems hebben niet de perfecte nutriëntbalansen voor plantengroei waardoor planten vaak blootgesteld zijn aan tekorten van bepaalde nutriënten. Planten maken gebruik van verschillende strategieën om externe en interne nutriëntbalansen te meten en op basis daarvan hun groei en ontwikkeling te sturen (Schachtman & Shin 2007). De primaire perceptieplaats bij een nutriënttekort is gewoonlijk de wortel waar verandering in membraanpotentiaal het eerste signaal is dat een nutriënttekort verraadt (Schachtman & Shin 2007). Immers, tijdens kaliumgebrek worden de wortelcellen gehyperpolariseerd (Spalding 1999) terwijl bij fosfaat-, sulfaat- en nitraattekort de cellen gedepolariseerd worden (Dunlop & Gradiner 1993). De snelle waarneming van gewijzigde nutriëntbalansen leidt, zeker in de wortelcellen, reeds binnen een

uur tot een gewijzigde genexpressie. De eerste wijzigingen in expressie gebeuren voornamelijk in genen die betrokken zijn bij algemene abiotische stress, maar responsen op lange termijn zijn wel specifiek gericht tegen specifieke nutriënttekorten (Hammond et al. 2003). Naast gewijzigde genexpressie verhoogt ook de ROS-concentratie in het wortelweefsel na blootstelling aan nutriënttekorten, wat de planthormoonbalansen beïnvloedt (Shin et al. 2005; Shin & Schachtman 2004) en onder andere kan leiden tot aerenchymvorming in nutriëntdeficiënte wortels (Konings & Verschuren 1980).

Aangezien in deze thesis planten blootgesteld zullen worden aan zwaveltekorten, wordt hier dieper op ingegaan. Zwavel wordt actief door de plant opgenomen onder de vorm van sulfaat. SULTR1;1 en SULTR1;2 zijn twee sulfaattransporters die de opname van sulfaat door de wortels vergemakkelijken, zeker bij zwaveltekort. In de cel wordt sulfaat ofwel opgeslagen in de vacuolen ofwel gemetaboliseerd in chloroplasten en plastiden (Takahashi et al. 2011). De sulfaattransporters in *A. thaliana* kunnen onderverdeeld worden in vijf functionele groepen (Smith et al. 1995) en hun expressie wordt net als bij andere minerale nutriënttransporters verhoogd bij sulfaattekorten (Maruyama-Nakashita et al. 2004b; Maruyama-Nakashita et al. 2003; Takahashi et al. 2000; Takahashi et al. 1997). Een belangrijke regulator van sulfaatassimilatie is miR395 dat een ATP sulfurylase (APS), een essentieel proteïne in de eerste stap van de sulfaatassimilatie, reguleert bij zwaveltekort. Wanneer planten onder zwaveltekort groeien, zullen ze mechanismen activeren om de zwavelopname uit de bodem te verhogen, maar wanneer zij toch niet voldoende sulfaat uit de bodem kunnen halen zal miR395 toenemen en de assimilatieactiviteit doen dalen (Hirai et al. 2003; Hirai & Saito 2004; Takahashi et al. 2000; Takahashi et al. 1997). Dit leidt samen met andere veranderingen als gevolg van zwaveltekort tot een vertraagd metabolisme en groei (Nikiforova et al. 2005b). De planthormonen cytokinine, auxine en JA zijn belangrijke signaalcomponenten in de respons op zwaveltekorten (Kutz et al. 2002; Maruyama-Nakashita et al. 2004a; Hirai et al. 2004; Maruyama-Nakashita 2004). Verschillende zwavelbevattende aminozuren zoals cysteïne en methionine worden aangemaakt langs de zwavelassimilatiweg en veranderingen in de concentratie van deze aminozuren zal ook leiden tot een wijziging in cellulaire processen en de levensvatbaarheid van de cel (Schachtman & Shin 2007).

2.4.2 Droogtestress

Droogte is wereldwijd een belangrijke beperkende factoren voor gewasproductie (Daryanto et al. 2015; Ashraf 2010; Zhao & Running 2010). Afhankelijk van de ernst hindert droogtestress essentiële processen zoals fotosynthese, mineraalopname en transpiratie (Schapendonk et al.

1989; Rahbarian et al. 2011). Droogtetolerante planten die niet specifiek aangepast zijn aan droge niches, kunnen relatief korte droogteperiodes wel overleven mits verschillende aanpassingen. Deze aanpassingen houden vooral verband met stomataregulatie, wortelvorming, hormonale balansen, antioxidantsystemen en osmotische aanpassingen (Chaves et al. 2003).

Droogtestress leidt in planten tot een gewijzigde hormoonbalans en genexpressie, waarbij de concentratie van groeibevorderende hormonen daalt en die van groeibeperkende hormonen stijgt (Farooq et al. 2009). Zo wordt bij droogte een sterke stijging van ABA geobserveerd terwijl de IAA- en GA-concentraties lichtjes dalen en de CK-concentratie sterk daalt (Figueiredo et al. 2008; Bano et al. 1994; Xiong & Zhu 2003; Seki et al. 2007; Seiler et al. 2011). Deze wijzigende hormoonbalans beïnvloedt de expressie van veel droogte-afhankelijke genen. Naargelang de genen een *ABA responsive element* (ABRE) of een *dehydration-responsive element* (DRE) bezitten in hun promotor zullen ze ABA-afhankelijk of ABA-onafhankelijk gereguleerd worden (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 2006). In een droge bodem accumuleert ABA in de wortels en wordt via het xyleem naar de scheuten getransporteerd waar het dient als maat voor de bodemdroogte. In de bladeren leidt dit signaal tot het sluiten van de stomata om zo het waterverlies door transpiratie te verminderen (Li 2000; Aroca 2012). Toch wordt gepostuleerd dat het niet zozeer ABA is dat het signaal doorgeeft, maar dat eerder de alkalinisatie van het xyleemsap er voor zorgt dat de stomata in de bladeren zich sluiten (Jia & Davies 2007). Beperkte wateropname bevordert ook de overproductie van ROS, door de verminderde influx van CO₂ als gevolg van het sluiten van de stomata, de verminderde enzymactiviteit en verstoorde fotosynthese (Flexas & Medrano 2002; Lawlor & Cornic 2002). Tijdens droogtestress is een versterkte activatie van het antioxidant verdedigingssysteem dus noodzakelijk (Aroca 2012).

2.4.3 Zoutstress

De respons op zoutstress is zeer analoog aan de respons op droogte, aangezien beide leiden tot cellulaire dehydratatie (Munns 2002). Ook bij zoutstress zullen belangrijke cellulaire processen zoals fotosynthese, proteïnesynthese en het energie/lipidemetabolisme negatief beïnvloed worden (Petronia Carillo 2011). De respons op zoutstress wordt opgedeeld in twee fasen naargelang de duur van de blootstelling: de osmotische fase en de ionische fase. De osmotische fase start wanneer de zoutconcentratie rond de wortels stijgt tot een drempelconcentratie, waarboven de wortels problemen krijgen bij het opnemen van water uit de bodem. In deze fase is de plantrespons zeer analoog aan droogtestress, de onmiddellijke reactie van de plant is om de stomata te sluiten (Petronia Carillo 2011; Flowers 2004; Munns 2002). In het geval van

langdurige blootstelling aan zoutstress wordt de tweede, ionische fase opgestart. In deze fase accumuleren ionen, voornamelijk Na⁺, in het bladweefsel waar ze achterblijven na transpiratie van het xyleemwater. Na⁺-accumulatie is toxisch en tast fotosynthetische componenten zoals enzymen, chlorofyl en carotenoïden aan (Davenport et al. 2005). De reductie van de fotosynthesecapaciteit kan leiden tot de productie van ROS (Miller et al. 2010).

Net als bij droogtestress functioneert ABA in de osmotische fase van zoutstress als de centrale regulator (Xiong et al. 2001). Ook hier is er sprake van een ABA-afhankelijke en -onafhankelijke signaaltransductieweg. ABA induceert de *late-embryogenesis-abundant* (LEA)-type genen, die ook bij stress als gevolg van droogte of koude tot expressie komen (Petronia Carillo 2011). De exacte functie van LEA-proteïnen is nog niet helemaal opgehelderd, maar ze zouden betrokken zijn in detoxificatieprocessen en dienst doen als chaperonnes van proteïnen in tijden van stress (Goyal et al. 2005). De tolerantiemechanismen tijdens de ionische fase zijn dan weer vooral gebaseerd op Na⁺-exclusie of Na⁺-compartmentalisatie. In beide gevallen wordt de expressie van bepaalde specifieke ionenkanalen en -transporters beïnvloed om een strikte controle van het Na⁺-transport doorheen de plant toe te laten (Munns 2002; Munns & Tester 2008; Rajendran et al. 2009).

2.5 Hub-proteïnen in de plantstressrespons

Op basis van de Y2H-studies werd voorspeld dat LSU-peptiden interageren met een groot aantal interactiepartners en daarom zouden kunnen functioneren als *hub*-proteïnen (Arabidopsis Interactome Mapping Consortium 2011; Mukhtar et al. 2011). Om deze redenen wordt in deze paragraaf wat meer uitgeweid over de kenmerken en eigenschappen van *hub*-proteïnen.

Tegenwoordig worden steeds meer studies uitgevoerd naar proteïne-interacties om het interactoom van een cel te ontrafelen. In de meeste gevallen zijn dergelijke proteïnenetwerken *scalefree*-netwerken eerder dan willekeurige netwerken. In een *scalefree*-netwerk komen knooppunten (proteïnen) voor die een veel hoger aantal interactiepartners hebben dan gemiddeld (Albert 2005). De proteïnen met de meeste interactiepartners worden vaak aangeduid als *hub*-proteïnen en zouden omwille van hun hoge interactiegraad een essentiële rol kunnen vervullen in verschillende cellulaire processen (Keskin et al. 2008; Andorf et al. 2013). Het exact aantal partners waarmee een proteïne moet interageren om als een *hub*-proteïne beschouwd te worden, is arbitrair en varieert naargelang de bron. Vaak wordt gekozen voor een interactie met minimaal vijf partners. *Hub*-proteïnen zijn evolutionair sterk geconserveerd aangezien een mutatie in een *hub*-proteïne potentieel de interactie met de vele interactiepartners verstoort, wat erg schadelijk kan zijn voor de cel (Andorf et al. 2013). Om deze reden is het

onderzoek naar *hub*-proteïnen en hun interacties uitermate belangrijk voor het verkrijgen van een beter begrip in proteïne-interactienetwerken van de plant (Andorf et al. 2013).

2.5.1 Statische en dynamische hubs

Hub-proteïnen kunnen onderling opgedeeld worden in verschillende klassen, naargelang hun structuur, expressieprofiel en reactiekinetiek (Kim et al. 2006). De meest gebruikte classificatiemethode deelt *hub*-proteïnen in als statische (*party*) of dynamische (*date*) *hub*-proteïnen naargelang reactiekinetiek en expressieprofiel. Dynamische *hubs* interageren met verschillende partners op verschillende tijdstippen en komen meestal niet gelijktijdig met hun partners tot expressie. Statische *hubs* anderzijds komen voor in functionele proteïnecomplexen waar ze tegelijkertijd interageren met verschillende partners. Ze komen vaak tegelijk met hun interactiepartners tot expressie (Andorf et al. 2013; Kim et al. 2006; Ekman et al. 2006). Volgens de huidige kennis zouden statische *hubs* zich gedragen als centrale delen van functionele proteïnecomplexen, terwijl dynamische *hubs* functioneren als verbindingsstukken tussen semiautonome modules. Dynamische *hubs* lijken daarom een essentiëlere rol te vervullen in proteïnenetwerken dan statische *hubs* (Ekman et al. 2006).

Op structureel niveau kunnen *hub*-proteïnen geclassificeerd worden als *singlish-interface hubs* (SIH) of *multiple-interface hubs* (MIH) op basis van het aantal bindingsplaatsen in hun structuur. SIHs bezitten slechts één of twee bindingsplaatsen terwijl MIHs er drie of meer in hun structuur hebben (Kim et al. 2006). Er is een sterke, maar geen complete overeenkomst tussen de indeling als MIH/SIH en statische/dynamisch *hubs*. SIHs blijken vaak dynamische *hubs* te zijn en MIHs kunnen vaak ook als statische *hubs* geclassificeerd worden (Andorf et al. 2013). Deze observatie kan verklaard worden doordat het lage aantal bindingsplaatsen bij SIHs het aantal gelijktijdige interactiepartners beperkt, wat typisch is voor dynamische *hubs*. Toch zijn niet alle dynamische *hubs* een SIH, aangezien het ook mogelijk is dat een dynamische *hub* gelijktijdig slechts met een of twee interactiepartners bindt, maar dat bij deze interactie toch verschillende bindingsplaatsen betrokken zijn. Op analoge wijze kan een MIH een dynamische of een statische *hub* zijn, afhankelijk van de interactiekinetiek (Andorf et al. 2013).

2.5.2 Eigenschappen van hub-proteïnen

Specifieke karakteristieken van *hub*-proteïnen onderscheiden hen van niet-*hubs* en geven ook aanwijzingen naar wat juist bepaalt of een proteïne evolueert tot een *hub*-proteïne of niet. Er zijn verschillende theorieën waarom *hub*-proteïnen meerdere interactiepartners kunnen binden dan gewone proteïnen. Enerzijds zijn *hub*-proteïnen meestal groter dan non-*hubs* en kunnen als

gevolg meer domeinen en herhalingen van tandemdomeinen bezitten (Ekman et al. 2006). Een andere mogelijke verklaring is dat *hub*-proteïnen paralogen in het proteoom binden en dezelfde bindingsplaats dus gebruikt kan worden om verschillende proteïnen te binden (Kim et al. 2006; Ekman et al. 2006). Daarnaast zou flexibiliteit en wanorde in de *hub*-structuur, met meer geladen en polaire aminozuren op hun oppervlak, er voor kunnen zorgen dat ze meerdere partners kunnen binden (Higurashi et al. 2008). LSU-peptiden zijn kleine proteïnen maar worden toch aangeduid als *hub*-proteïnen. Een mogelijke verklaring voor hun vermogen om vele andere proteïnen te binden is de aanwezigheid van een *coiled-coil* structuur in hun sequentie (Sirko et al. 2014). Dit zijn alfa helices die langs elkaar kunnen bewegen en zo gemakkelijk dynamische herschikkingen toelaten wanneer ze bindingen aangaan met andere proteïnen, die vaak ook alfa-helices of een *coiled-coil* in hun structuur hebben (Burkhard et al. 2001). Het is ook mogelijk dat de wanorde niet in de structuur van de *hub*-proteïnen zelf ligt, maar in die van de interactiepartners (Kim et al. 2008). Er blijft echter twijfel over de waarschijnlijkheid dat één enkele structuur honderden verschillende proteïnen kan binden, zelfs met een extreem flexibele en wanordelijke structuur. De proteïnen met een hoge interactiegraad in de proteïnenetwerken zouden misschien niet één proteïne zijn, maar eerder verschillende genproducten (verschillende proteïnen die ontstaan uit hetzelfde gen, maar verschillen als gevolg van post-translationele modificatie) (Tsai et al. 2009).

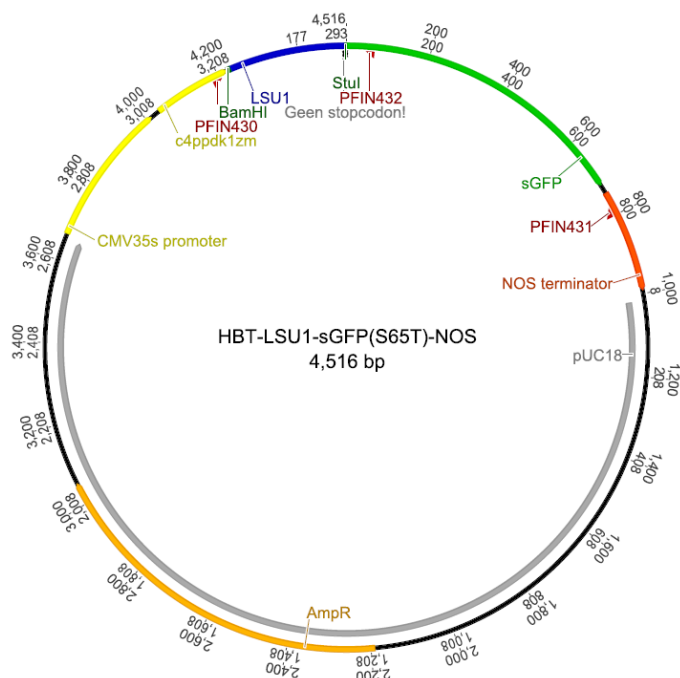
Hubs als zwakke punten in regulatorische netwerken

Pathogeen-effectoren interageren met een beperkt aantal specifieke doelwitproteïnen in de plantgastheer en bovendien vallen effectoren van evolutionair sterk verschillende pathogenen vaak dezelfde doelwitproteïnen in de plantgastheer aan. Vele van deze doelwitproteïnen zijn sterk geconnecteerde *hub*-proteïnen (Mukhtar et al. 2011) omdat *hub*-proteïnen essentieel zijn voor het samenhouden van proteïnenetwerken. Belangrijke *hubs* worden omringd door proteïnen met een lagere interactiegraad, die op hun beurt weer omringd zijn door proteïnen met een nog lagere graad. De hiërarchie die zo ontstaat, maakt dat zulke netwerk robuust zijn voor willekeurige fouten of verstoringen, maar gevoelig aan gerichte aanvallen op de meest interactieve *hub*-proteïnen (Albert et al. 2000). Vaak zijn effectordoelwitten dus belangrijke *hub*-proteïnen in de verdedigingsrespons van de plant en zal het uitschakelen van deze proteïnen leiden tot verhoogde gevoeligheid van de plant voor de pathogeen (Mukhtar, 2011). Op deze manier zijn *hubs* zowel de kracht als de zwakte van regulatorische proteïne-interactienetwerken (Cohen et al. 2000; Cohen et al. 2001; Callaway et al. 2000).

3. Materiaal en methoden

3.1 DNA-manipulaties

Voor de visualisatie van de subcellulaire lokalisatie in *A. thaliana* mesofyl protoplasten, werden GFP-fusieconstructen van de LSU-peptiden en de LSU-interactor FSD2 aangemaakt. Met behulp van restrictie- en ligatiereacties werden de gensequenties van LSU1-4 en FSD2 (zonder stopcodon) geïnsereerd in de destinatevector HBT::sGFP(S65T)-NOS (Figuur 6).



Figuur 6: Ligatie van de LSU1 gensequentie in de HBT-sGFP(S65T)-NOS destinatevector. Gelijkaardige vectoren werden bekomen voor de andere LSU-peptiden en de LSU-interactor FSD2.

Hiervoor werden eerst de gewenste genfragmenten geamplificeerd uit genomisch DNA via een polymerase kettingreactie (*Polymerase Chain Reaction*, PCR), waarbij de knipplaatsen voor de restrictie-enzymen BamHI en StuI aan de uiteinden werden toegevoegd (§3.1.4). In het geval van de LSU-interactor FSD2 werd vertrokken vanaf cDNA (complement DNA) opdat geen introns in de gensequentie aanwezig zouden zijn. Vervolgens werden de bekomen genfragmenten en de destinatevector geknipt met de vermelde enzymen (§3.1.4) en opgezuiverd (§3.1.2). De genfragmenten werden daarna in de destinatevector gebracht door middel van een plasmide-ligatie (§3.1.5). Deze plasmiden werden getransformeerd in *Escherichia coli* cellen (§3.1.6) en de correct getransformeerde cellen werden geselecteerd met behulp van het antibioticum Ampicilline (Amp) waarvoor het resistentiegen gelegen is op de destinatevector (Figuur 6). *E. coli* kolonies werden m.b.v. een kolonie-PCR gecontroleerd op het bezit van de gewenste sequentie (§3.17). Het geïsoleerde plasmide (§3.1.8) werd vervolgens

gecontroleerd op het bezit van de exacte gewenste sequentie (§3.1.10) en ten slotte gebruikt voor de transformatie van *A. thaliana* mesofyl protoplasten (§ 3.1.14).

3.1.1 Amplificatie van fragmenten uit cDNA

De gensequentie van de LSU-peptiden en de LSU-interactor FSD2 werden met behulp van PCR-reacties geamplificeerd, vertrekkende vanuit cDNA (zonder intronen), aangemaakt vanaf RNA geïsoleerd uit wildtype *A. thaliana* planten (§3.1.1, 3.2.1, 3.2.2 en §3.2.3). Voor de PCR-reactie werd gebruik gemaakt van het Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs Inc.), dat beschikt over 5'-3' polymeraseactiviteit en 3'-5' exonuclease proefleesactiviteit. De primers met restrictieknipplaatsen die ontwikkeld en gebruikt werden voor deze PCR-reacties zijn te vinden in Bijlage 1.

Voor elk staal werd volgend reactiemengsel samengesteld:

- 0.2 µl Phusion® HF DNA Polymerase 2,000 U/ml (New England Biolabs Inc.)
- 4 µl Phusion® HF Buffer 5x (New England Biolabs Inc.)
- 0.4 µl dNTPs (2 mM)
- 1 µl Forward primer (10 µM)
- 1 µl Reverse primer (10 µM)
- 5 µl cDNA (50-250 ng/µl)
- Aanlengen met milli-Q water tot 20 µl

De stalen werden in het C1000™ Thermal Cycler PCR-toestel (Bio-Rad) geplaatst. In tegenstelling tot een standaard PCR-reactie werden twee amplificatiestappen ingesteld omdat de primers eerst zonder restrictie-uiteinden binden op het doelwit-DNA en deze reactie beter opgaat bij een lagere temperatuur. In de tweede amplificatiestap bindt de gehele primer op het doelwit-DNA en kan de reactie bij een hogere temperatuur verlopen. Onderstaande instellingen werden gebruikt:

- Initiële denaturatie: 3', 98°C
- Eerste amplificatiestap (5 cycli):
 - Denaturatie: 10", 98°C
 - Hybridisatie: 30", 58°C (primerafhankelijk)
 - Elongatie: 30"/1000 bp (genafhankelijk), 72°C
- Tweede amplificatiestap (30 cycli):
 - Denaturatie: 10", 98°C
 - Hybridisatie: 30", 68°C (primerafhankelijk)

- Elongatie: 30"/1000 bp, 72°C
- Finale elongatie: 10', 72°C
- Bewaring toestel: onbepaalde duur, 4°C
- Bewaring lange termijn: -20°C

3.1.2 Opzuiveren van genfragmenten

Bekomen genfragmenten werden opgezuiverd met behulp van de QIAquick® PCR Purification kit (250) (Qiagen), dat onzuiverheden verwijdert waaronder primers, enzymen, minerale olie, zouten, agarose en ethidiumbromide. Het staal met het op te zuiveren genfragment werd aangebracht op een QIAquick scheidingskolom en vervolgens werd het geheel gecentrifugeerd opdat het DNA op het silica-membraan zou adsorberen. Er volgde een wasstap en twee centrifugatiestappen waarna het DNA geëluëerd werd door 50 µl milli-Q water op het silica-membraan aan te brengen en vervolgens het geheel te centrifugeren. Het exacte protocol kan gevonden worden in de handleiding van de QIAquick® PCR Purification kit (250) (Qiagen).

3.1.3 Agarose gelelektroforese

DNA- of RNA-fragmenten kunnen op basis van hun lengte gescheiden worden via agarose gelelektroforese. In deze techniek wordt een spanningsverschil aangelegd over de agarosegel waarop de DNA- of RNA fragmenten zijn aangebracht. Als gevolg van de negatieve ladingen die vervat zijn in hun moleculaire structuur, zullen de fragmenten migreren richting de positieve pool. Kleinere fragmenten migreren sneller doorheen de agarosegel dan grote fragmenten, waardoor een scheiding ontstaat. Deze techniek werd in het kader van de aanmaak van GFP-constructen toegepast om de kwaliteit te controleren van de uitgevoerde PCR-reacties, opzuiveringen en restrictie- en ligatiereacties.

Voor de aanmaak van een 1% agarosegel werd 2g UltraPure™ Agarose (Invitrogen) opgelost in 200 ml 1xTBE-buffer [Tris-Boraat-EDTA; 1 l 10x: 108 g Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethaan), 55g boorzuur, 40 ml 0,5M EDTA, pH 8]. De oplossing werd gedurende 2'30" opgekookt in een microgolfoven en vervolgens voldoende afgekoeld. De gel werd uitgegoten in een gelhouder waarna 15 µl ethidiumbromide (Amresco) werd toegevoegd. Deze kleurstof intercaleert met de migrerende DNA- of RNA-fragmenten en visualiseert ze door te fluoresceren bij UV-belichting (320 nm). Met een kammetje werden in de gel laantjes gevormd waarin de stalen konden worden aangebracht. De gestolde gel werd samen met de gelhouder overgebracht naar een elektroforesetank gevuld met TBE-buffer. Vooraleer de stalen over te brengen in de voorziene laantjes, werd telkens 5 µl laadbuffer [6x

TBE-buffer, 30% (v/v) glycerol, 0,25% (v/v) bromofenolblauw, 0,25% xyleencyanol] (*blue juice*) toegevoegd. Ten slotte werd ook een DNA-ladder (Smartladder, Eurogentec) in een laantje aangebracht om de lengte van de fragmenten te kunnen bepalen. Er werd gedurende 60' een potentiaalverschil van 120 V en een stroom van 400 mA aangelegd over de gel, waarna de stalen gevisualiseerd konden worden onder een UV-lamp (320 nm).

3.1.4 Restrictiereacties

De opgezuiverde PCR-producten en de HBT::sGFP(S65T)-NOS destinatievector werden onderworpen aan restrictiereacties met de restrictie-enzymen BamHI (20 000 U/ml, New England Biolabs, Inc.) en StuI (10 000 U/ml, New England Biolabs Inc.). De knipplaatsen voor deze restrictie-enzymen werden aangehecht aan de via PCR geamplificeerde genfragmenten en waren reeds aanwezig in de destinatievector. Per staal werd volgend reactiemengsel samengesteld:

- 15 µl zuiver PCR-product (50-150 ng/µl) of 2 µl vector (1000 ng/µl)
- 1 µl Bam HI (20 000 U/ml, New England Biolabs Inc.)
- 2 µl StuI (10 000 U/ml, New England Biolabs Inc.)
- 5 µl NEBuffer 3.1 (New England Biolabs Inc.)
- aanlengen met milli-Q water tot 50µl

De restrictiemengsels werden gedurende 4 uur geïncubeerd bij 37°C. De restrictieproducten werden opgezuiverd (§ 3.1.2) en het resultaat van de restrictiereacties werd geanalyseerd door middel van gelelektroforese (§ 3.1.3).

3.1.5 Ligatiereacties

De geamplificeerde, geknipte en opgezuiverde genfragmenten konden dankzij het gebruik van twee verschillende restrictie-enzymen directioneel geligeerd worden in de geknipte en opgezuiverde HBT::sGFP(S65T)-NOS destinatievector (Figuur 6). Volgend reactiemengsel werd samengesteld per staal:

- 4 µl Insert DNA (50-150 ng/µl)
- 1 µl T4 DNA ligase 5 U/µl (Invitrogen)
- 4 µl 5x T4 DNA ligase buffer (Invitrogen)
- 4 µl HBT::sGFP(S65T)-NOS vector DNA (50-150 ng/µl)
- Aanlengen met milli-Q water tot 20µl

Het ligatiemengsel werd gedurende 6 uur op kamertemperatuur geïncubeerd en vervolgens 10' op 65°C voor inactivatie.

3.1.6 *E. coli* transformatie

De geligeerde plasmiden werden naar *E. coli* getransformeerd door 2 µl van het ligatiemengsel toe te voegen aan 50 µl TOP 10 F chemisch competente *E. coli* cellen. Het reactiemengsel werd gedurende 30' op ijs geïncubeerd en daarna blootgesteld aan een hiteschok gedurende 30'' op 42°C. Na de hiteschok werden de stalen onmiddellijk terug op ijs gezet. Er werd 250 µl vloeibaar LB-medium toegevoegd en het geheel werd gedurende 1 u geïncubeerd in een schudincubator (200 rpm) bij 37°C. Vervolgens werd 100 µl van het mengsel uitgeplaat op Luria-Bertani Broth (LB)-agarplaten [LB-medium (10 g/l Bacteriological Peptone (Lab M), 10 g/l NaCl, 5 g/l gistextract (Lab M)) met 15 g/l Select Agar (Invitrogen)] en ampicilline (100 µg/ml) en de platen werden overnacht geïncubeerd bij 37°C. De *E. coli* kolonies die een correct geligeerde vector bevatten, bezaten het ampicillineresistentiegen en konden op basis van overleving geselecteerd worden. De aanwezigheid van de gewenste sequentie in deze geselecteerde kolonies werd vervolgens gecontroleerd via kolonie-PCR (§ 3.1.7) en gelelektroforese (§ 3.1.3). Na plasmide-isolatie (§ 3.1.8) werd via een DNA-sequentiebepaling (§ 3.1.10) de sequentie van het geïnsereerde DNA gecontroleerd.

3.1.7 Kolonie-PCR

Een kolonie-PCR met primers gelegen in de sequentie van de 35S-promotor en NOS-terminator van de HBT::sGFP(S65T)-NOS vector (Figuur 6, Bijlage 1) werd uitgevoerd op kolonies van de getransformeerde *E. coli* cellen om de aanwezigheid van correct geligeerde plasmiden in de cellen te bevestigen. Afzonderlijke kolonies werden vanaf de LB-agarplaten overgebracht in 40 µl milli-Q water en gedurende 5 min geïncubeerd bij 95°C om de plasmiden vrij te zetten. Per staal werd nadien volgend reactiemengsel samengesteld:

- 10 µl DNA-staal
- 0.2 µl Taq DNA polymerase (5000 U/ml; New England Biolabs Inc.)
- 2 µl Thermo Polymerase buffer (10x) (10x; New England Biolabs Inc.)
- 2 µl dNTPs (2 mM, Invitrogen)
- 1 µl Forward primer (10 µM)
- 1 µl Reverse primer (10 µM)
- Aanlengen met milli-Q water tot 20 µl

De stalen werden in het C1000™ Thermal Cycler PCR-toestel (Bio-Rad) geplaatst. Onderstaande instellingen werden gebruikt:

- Initiële denaturatie: 5', 95°C

- Amplificatiestap (34 cycli):
 - Denaturatie: 15", 95°C
 - Primerhechting: 30", temperatuur primerafhankelijk
 - Elongatie: 1'/1000 bp, 72°C
- Finale elongatie: 10', 72°C
- Bewaring toestel: onbepaalde duur, 4°C
- Bewaring lange termijn: -20°C

De producten van de PCR-reacties werden gevisualiseerd op een 1% agarosegel (§3.1.3), waarna de geschikte kolonies werden geselecteerd om mee verder te werken.

3.1.8 Plasmide-isolatie

De plasmide-isolatie uit de *E. coli* kolonies werd uitgevoerd op twee manieren, enerzijds aan de hand van de Nucleospin® Plasmid Easypure Miniprep kit (Machery-Nagel) en anderzijds met de PureYield™ Plasmid Maxiprepkit (Promega).

De plasmide-isolatie met de Nucleospin® Plasmid Easypure Miniprep kit (Machery-Nagel) gebeurde door eerst de *E. coli* kolonies met de gewenste plasmiden aan te enten in 200 ml vloeibaar LB-medium met ampicilline (100 µg/ml) en de culturen overnacht in een schudincubator (200 rpm) bij 37°C te incuberen. Vervolgens werden de *E. coli* cellen uit deze overnachtculturen geïsoleerd met behulp van de Nucleospin® Plasmid Easypure Miniprep kit (Machery-Nagel). De *E. coli* celcultuur werd in een falcon van 50 ml gecentrifugeerd om de cellen neer te slaan waarna een alkalische lysis werd uitgevoerd en de celcultuur vervolgens opnieuw werd gecentrifugeerd. Het supernatans werd op de spin kolom gebracht waar het plasmide-DNA adsorbeerde aan het silicamembraan. Er volgden enkele was- en centrifugatiestappen om contaminanten te verwijderen en ten slotte werd het gebonden plasmide-DNA geëluëerd met 50 µl AE Buffer. Het exacte protocol kan gevonden worden in de handleiding van de Nucleospin® Plasmid Easypure Miniprep kit (Machery-Nagel).

De plasmide-isolatie aan de hand van de PureYield™ Plasmid Maxiprepkit (Promega) vereiste eveneens dat de *E. coli* kolonies met de gewenste plasmiden aangeënt werden in 200 ml vloeibaar LB-medium met ampicilline (100 µg/ml). De culturen werden overnacht in een schudincubator (200 rpm) bij 37°C geïncubeerd. De *E. coli* celcultuur werd gecentrifugeerd om de cellen neer te slaan waarna het supernatans werd verwijderd en de cellen in 12 ml *cell resuspension solution* werden opgelost. Er volgde een *cell lysis* in aanwezigheid van natriumdodecylsulfaat (*Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS) waarna de oplossing met de gelyseerde

cellen overgebracht werd op een PureYield™ Clearing Column welke op een PureYield™ Maxi Binding Column werd geplaatst. Het geheel werd vervolgens onder vacuüm gebracht om het plasmide-DNA aan het silica-membraan te laten adsorberen. Er volgden twee wasstappen waarbij proteïnen, RNA en endotoxine contaminanten werden verwijderd. Ten slotte werd het plasmide-DNA geëluëerd met 1 ml RNase-vrij milli-Q water. Het exacte protocol kan gevonden worden in de handleiding van de PureYield™ Plasmid Maxiprekit (Promega). Om de concentratie van het plasmide-DNA te verhogen werd ook een ethanol-precipitatie uitgevoerd waarbij aan het plasmide-DNA 1/10 volume van een 3M natriumacetaatoplossing pH5.2 werd toegevoegd en 2,5 volume van een 95% EtOH-oplossing. Na incubatie op ijs gedurende 15 min werd het staal gecentrifugeerd om het DNA neer te slaan. Het supernatans werd verwijderd waarna het staal gewassen werd met 1 ml van een 70% EtOH-oplossing en opnieuw gecentrifugeerd. De EtOH werd verwijderd en het plasmide-DNA kon vervolgens opnieuw opgelost worden in een hoeveelheid water naargelang de gewenste concentratie. Het exacte protocol kan gevonden worden in de handleiding van de PureYield™ Plasmid Maxiprekit (Promega). De concentratie van het plasmide-DNA werd bepaald met behulp van de Nanodrop®ND-1000 UV-VIS spectrofotometer (NanoDrop Technologies) (§ 3.1.9). De geïsoleerde plasmiden werden bewaard bij -20°C.

3.1.9 Concentratiebepaling via UV-absorptiespectrum

De concentratie van DNA en RNA in een staal werd bepaald via de Nanodrop® ND-100 UV-VIS spectrofotometer (NanoDrop Technologies). Het absorptiespectrum ten opzichte van het overeenkomstige blankostaal werd gemeten en hieruit kon zowel de concentratie als de zuiverheid van het staal bepaald worden. De concentratie werd bepaald aan de hand van de absorptie bij 260 nm. Een absorptie van 1 bij deze golflengte komt immers overeen met een concentratie van 50 µg/ml DNA of 40 µg/ml RNA. De zuiverheid van het DNA- of RNA-staal werd bepaald aan de hand van de verhouding van de absorpties bij 260 nm en 280 nm. Voor een DNA-staal bedraagt deze verhouding 1,8, in het geval van een RNA staal ligt deze waarde liefst hoger dan 2. Contaminatie met bijvoorbeeld proteïnen en fenolen, die goed absorberen bij 280 nm zullen deze verhouding verlagen. De zuiverheid van het staal werd ook gecontroleerd aan de hand van de verhouding van de absorptie bij 260 nm en 230 nm. Bij deze laatste golflengte absorberen andere contaminanten zoals EDTA.

3.1.10 DNA-sequentiebepaling

DNA-sequentiebepaling werd uitbesteed aan GATC Biotech (Konstanz, Duitsland). Er werd telkens 20 µl van het geïsoleerd plasmide (30-100 ng/µl) (§ 3.1.8) opgestuurd met 20 µl van de

nodige primers (10 μ M) (Bijlage 1). De verkregen sequentieresultaten werden verwerkt met Geneious™ software (Biomatters Ltd.)

3.1.11 Aanmaak van glycerolstocks

Correct getransformeerde *E. coli* cellen werden aangeënt in 5 ml vloeibaar LB-medium waaraan ampicilline (100 μ g/ml) werd toegevoegd en deze culturen werden vervolgens overnacht geïncubeerd bij 37°C. Na incubatie werd 1 ml van een 50% glyceroloplossing toegevoegd aan 1 ml van de cultuur in een schroefdopbuisje (Nalgene, Thermo Scientific). De glycerolstocks werden bewaard bij -80°C.

3.1.12 Protoplastmanipulaties

Onderstaand protoplastwerk werd uitgevoerd in samenwerking met het labo van Prof. Filip Rolland (Departement Biologie, KU Leuven), volgens het TEAMP-protocol (*Transient Expression in Arabidopsis Mesophyll Protoplasts*) (Yoo et al. 2007).

3.1.13 Protoplastisolatie

Voor de isolatie van mesofyl protoplasten werden 5 weken oude *A. thaliana* Col-0 planten gebruikt. Van deze planten werden 10-15 volledig geëxpandeerde, volwassen blaadjes geselecteerd en met een zuiver, scherp scalpel bij zwak licht versneden in dunne reepjes van ongeveer 0.5-1 mm breed. Deze reepjes werden onmiddellijk ondergedompeld in een petriplaat met 10 ml enzymoplossing om de mesofylcellen uit het versneden bladweefsel los te maken en hun celwand te verwijderen. De enzymoplossing werd op onderstaande wijze aangemaakt:

- 20 mM MES-oplossing (pH 5.7)
- 0,4 M mannitol
- 20 mM KCl
- 2' op 70°C voor protease deactivatie
- 1,5% (wt/vol) cellulase R10
- 0,4 % (wt/vol) macerozyme R1
- 10' op 55°C voor verdere protease deactivatie en volledige oplossing
- Afkoelen op ijs tot kamertemperatuur
- 10 mM CaCl₂
- 3 μ l β -mercaptoethanol
- 0,1% BSA (10%)
- Filtersterilisatie doorheen een 0,45 μ m filter (Sarstedt)

De petriplaat met bladreepjes en enzymatische oplossing werd vervolgens goed afgesloten en gedurende 30' in het donker vacuüm geïnfiltrerd, gevolg door 2,5 u incubatie op kamertemperatuur. Na enzymatische vertering, werden de protoplasten vrijgezet door het staal zachtjes te schudden. Hierna werd een gelijke hoeveelheid W5-oplossing [2 mM MES (pH 5.7), 154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM KCl] toegevoegd en werd het geheel gefilterd doorheen Miracloth filterdoek (EMD Millipore, 35-75 µm poriegrootte). Deze nylondoek werd steeds in EtOH gehouden en grondig gespoeld met water voor gebruik. Ten slotte werd de protoplastoplossing opgevangen in een ijsgekoeld epje met ronde bodem (Microcentrifuge tube round bottomed, Globe Scientific Inc.). Het staal werd hierna gedurende 3' gecentrifugeerd aan een snelheid van 900 rpm in een Eppendorf™ 5804 Series Centrifuge. Het supernatans werd verwijderd en het pellet werd heropgelost in 200-500 µl W5-oplossing.

De protoplastconcentratie werd vervolgens bepaald aan de hand van een hemocytometer (Hausser Scientific) met een geïnverteerde microscoop (Motic AE21, Scientific Instrument Company) en gecorrigeerd tot een concentratie van $2 \cdot 10^5$ protoplasten/ml. De protoplasten werden vervolgens geïncubeerd op ijs gedurende 30' voor herstel. Hierna werd het geheel opnieuw kort gecentrifugeerd 900 rpm en heropgelost in hetzelfde volume MMg-oplossing [4 mM MES (pH 5.7), 0,4 M Mannitol, 15 mM MgCl₂] en op ijs bewaard.

3.1.14 Protoplasttransformatie

De protoplasttransformatie gebeurde aan de hand van een PEG-Ca²⁺-transformatie. Hiertoe werden Cellstar® Cell Culture Multiwell Plates 6 Well Format (Greiner Bio-One) gecoat met 5% kalfserum (Sigma-Aldrich), waarna in elke well 500 µl van een WI-oplossing [4 mM MES (pH 5.7), 0,5 M Mannitol, 20 mM KCl] werd toegevoegd. Voor de eigenlijke protoplasttransformatie werd 10-20 µg maxiprep plasmide-DNA overgebracht in epjes met ronde bodem (Microcentrifuge tube round bottomed, Globe Scientific Inc.). Hieraan werd 100 µl protoplastoplossing toegevoegd en het geheel werd zachtjes gemengd. Vervolgens werd 110 µl 40% PEG-oplossing [40% (wt/vol) PEG 4000 (Fluka), 0,2 M Mannitol, 100 mM CaCl₂] toegevoegd en zachtjes gemengd. Na exact 5' werd het mengsel twee maal verdund met W5-oplossing en zachtjes gemengd door de epjes om te keren. Het geheel werd vervolgens gedurende 1' gecentrifugeerd bij 900 rpm, waarna het merendeel van het supernatans verwijderd werd. Het ontstane pellet werd opnieuw opgelost in de WI oplossing reeds aanwezig in de voorbereide 6-well platen, waarna de platen gedurende 6 uur bij kamertemperatuur werden geïncubeerd. Na incubatie werden de stalen overgebracht in een conische 2 ml epje (Sarstedt) en gedurende 2' gecentrifugeerd bij 900 rpm. Hierna werd het merendeel van het

supernatans verwijderd en werden stalen op ijs bewaard en zo snel mogelijk onderzocht onder een confocale microscoop Olympus FV1000 (x400-600).

3.1.15 Confocale laserfluorescentiemicroscopie

Visualisatie en lokalisatie van de GFP-fusieconstructen van de LSU-peptiden en de LSU-interactor FSD2 in *A. thaliana* mesofyl protoplasten werd uitgevoerd met behulp van een confocale microscoop Olympus FV1000 (x 400-600), beschikbaar aan het departement Biologie (Prof. Thevelein, KU Leuven).

3.2 RNA-manipulaties

3.2.1 RNA-isolatie

Plantmateriaal van *A. thaliana* werd verzameld en onmiddellijk ingevroren met behulp van vloeibare stikstof. Het bevroren plantmateriaal werd met mortier en vijzel fijngemalen en overgebracht in RNase-vrije epjes. Vervolgens werd aan elk staal 500 µl Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen) toegevoegd. Dit reagens creëert een fasescheiding, vernietigt aanwezige RNAses en breekt de cellen open. Na de stalen gedurende 30'' te vortexen, werden ze horizontaal op ijs geïncubeerd gedurende 5'. Om het plantmateriaal te bezinken werden de stalen gedurende 2' bij 13000 x g op kamertemperatuur gecentrifugeerd. De bovenste fase bevatte het RNA en DNA en werd overgebracht in nieuwe RNase-vrije epjes. Aan elk staal werd vervolgens 100 µl 5 M NaCl en 300 µl RNase-vrij chloroform toegevoegd. De stalen werden vervolgens 10' gecentrifugeerd bij 12000 x g op 4°C. De bovenste waterfase werd overgebracht in nieuwe RNase-vrije epjes en aan elk staal werd een gelijk volume isopropanol toegevoegd. De stalen werden goed gemengd door op en neer te pipetteren en werden vervolgens 10' horizontaal op ijs geïncubeerd. Hierna werden de stalen opnieuw gecentrifugeerd voor 10' bij 12000 x g en 4°C, waarna het supernatans verwijderd werd. Het gevormde pellet werd gewassen met 1 ml 75% EtOH en na centrifugatie gedurende 1' bij 13000 x g op kamertemperatuur, werd het supernatans opnieuw verwijderd. Hierna werd opnieuw gecentrifugeerd gedurende 1' bij 13000 x g op kamertemperatuur en werd de EtOH zoveel mogelijk verwijderd. Ten slotte werden de stalen gedurende 1 uur in een oven bij 37°C geplaatst met de dopjes open opdat de overblijvende EtOH zou verdampen. Uiteindelijk werd het ontstane pellet opgelost in 30 µl RNase-vrij milli-Q water en werd de concentratie en zuiverheid bepaald met behulp van de Nanodrop®ND-1000 UV-VIS spectrofotometer (NanoDrop Technologies) (§ 3.1.9). De RNA stalen werden bewaard bij -80°C.

3.2.2 DNase behandeling

Een DNase-behandeling van geïsoleerd RNA is nodig om het eventueel aanwezige DNA af te breken. Naargelang de concentratie van het geëxtraheerde RNA werd volgend reactiemengsel samengesteld per staal:

- x μ l RNA (x = 2500 ng RNA)
- 5 μ l DNase I reactiebuffer 10x (New England Biolabs Inc.)
- 2 μ l DNase I 2000 U/ml (New England Biolabs Inc.)
- Aanvullen tot 49,5 μ l met RNase-vrij milli-Q water

De stalen werden 40' geïncubeerd bij 37°C, waarna 0,5 μ l 0,5 M EDTA (pH 8) werd toegevoegd, gevolgd door een hitte-inactivatiestap van 5' bij 75°C.

3.2.3 cDNA synthese

Uit het DNase-behandelde RNA werd cDNA gesynthetiseerd. Per staal werd volgend reactiemengsel samengesteld:

- 1 μ l primer oligo dT (50 μ M)
- 1 μ l dNTP (10 mM)
- 10 μ l DNase behandeld RNA
- 1 μ l RNase-vrij milli-Q water

De stalen werden vervolgens gedurende 5' geïncubeerd bij 65°C in het C1000 Thermal Cycler (Bio-rad) PCR-toestel. Er volgde een incubatie gedurende 1' op ijs, waarna per staal volgend reactiemengsel werd toegevoegd:

- 1 μ l DTT (0,1 M, Invitrogen)
- 4 μ l First-Strand buffer 5x (Invitrogen)
- 1 μ l RNase OUT (Invitrogen)
- 0.5 μ l Superscript III RT (Invitrogen)

Hierna volgde opnieuw een incubatie van de stalen in het C1000 Thermal Cycler (Bio-rad) PCR-toestel, deze keer gedurende 60' op 50°C, 15' op 75°C. Het bekomen cDNA werd 2x verdund en bewaard bij -20°C.

3.2.4 qRT-PCR

Met qRT-PCR kan niet alleen de hoeveelheid van een specifiek DNA-fragment in een cDNA-staal bepaald worden, maar ook het expressieniveau van een gen omdat er een rechtlijnig verband bestaat tussen de hoeveelheid cDNA en de oorspronkelijke hoeveelheid RNA in het staal. De DNA-amplificatie wordt in *real-time* gevolgd aan de hand van de fluorescente

kleurstof SYBR® Green (Applied Biosystems). Deze kleurstof intercaleert met dubbelstreng DNA en visualiseert het door te fluoresceren bij een golflengte van 520 nm. Tijdens het uitvoeren van de qRT-PCR werd deze fluorescentie na elke elongatiestap gemeten als maat voor de hoeveelheid DNA in het staal. Ook de smeltcurve van de PCR-producten werd bepaald, opdat de zuiverheid van het geamplificeerde DNA en de specificiteit van de gebruikte primers (Bijlage 1) nagegaan kon worden.

Volgend reactiemengsel werd samengesteld per staal:

- 0.4 µl forward primer (10 µM)
- 0.4 µl reverse primer (10 µM)
- 10 µl Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) met volgende componenten:
 - o Reactiebuffer
 - o AmpliTaq Gold® DNA polymerase
 - o dNTPs
 - o SYBR® Green I kleurstof
- Aanlengen tot 15 µl met milli-Q water

Van dit reactiemengsel werd per staal 15 µl gepipeteerd in een MicroAmp® Fast Optical 96-well plaat (Applied Biosystems) volgens een vooraf opgesteld schema. Daarna werd 5 µl cDNA (2x verdund) per staal toegevoegd. De plaat werd vervolgens afgedekt met een MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems). De qRT-PCR reactie werd uitgevoerd in het StepOne Plus™ Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) toestel met volgende programma-instellingen:

- Amplificatie (40 cycli):
 - o Initiële denaturatie: 10', 95°C
 - o Denaturatie: 15", 95°C
 - o Hybridisatie: 10", temperatuur primerafhankelijk
 - o Elongatie: 10", 72°C (meetstap)
- Smeltcurve:
 - o Denaturatie: 15", 95°C
 - o Renaturatie: 1', 60°C
 - o Denaturatie: 15", 95°C (meetstap)

Voor elk staal en bijhorende controle werd naast het expressieniveau van het gewenste gen ook dat van het referentiegen EF1α (*Elongation Factor 1α*) bepaald. De gemeten

fluorescentiesignalen in de vorm van amplificatie- en smeltcurves werden geanalyseerd met de StepOne Software v2.2.2 (Applied Biosystems). De relatieve expressieniveaus werden bepaald aan de hand van de ΔC_t - en $\Delta\Delta C_t$ -waarden (Schmittgen & Livak 2008). De C_t -waarde (*cycle threshold*) geeft het aantal cycli waarbij de fluorescentie van het geamplificeerde PCR-product een vastgelegde drempelwaarde bereikt. Deze waarde is omgekeerd evenredig met de oorspronkelijke hoeveelheid van het geselecteerde cDNA-fragment en dus ook met het expressieniveau. De $\Delta\Delta C_t$ -waarde is een maat voor de relatieve expressie van het geselecteerde gen in het staal, in vergelijking met de expressie van het gen in het controlestaal en werd berekend aan de hand van volgende formule:

$$\Delta\Delta C_t = (C_{tEF1\alpha} - C_{tgen})_{staal} - (C_{tEF1\alpha} - C_{tgen})_{controle}$$

Om de interpretatie te vergemakkelijken, werd ook de zogenaamde *fold change* berekend als $2^{\Delta\Delta C_t}$. Deze waarde geeft aan hoeveel maal het expressieniveau is toegenomen/afgenomen ten opzichte van het controlestaal.

3.3 Plant-manipulaties

3.3.1 Algemene informatie

3.3.1.1 Gebruikte lijnen

Er werd gebruik gemaakt van verschillende *A. thaliana* controle-lijnen:

- Columbia (Col-0) wild-type lijn
- Coi 1-16 lijn (deficiënt in JA-signalisatie)
- Eds1-lijn (deficiënt in SA-signalisatie)

Daarnaast werd gebruik gemaakt van verschillende overexpressie (OEX), *knock-down* (KD) en *knock-out* (KO) lijnen. Allereerst werd gebruik gemaakt van reeds beschikbare homozygote T3 (3^{de} transgene generatie) OEX- en KD/ami-lijnen voor LSU1. Er werd ook gewerkt met commercieel beschikbare homozygote T3 KO-lijnen voor LSU2 en LSU4. Deze zaden werden besteld bij NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre* en zijn afkomstig van het *Salk Institute Genomic Analysis Laboratory* (SALK). Deze lijnen hebben een T-DNA insertie in het respectievelijke LSU-gen, wat zorgt voor de uitschakeling van het gen. Er wordt een kort overzicht gegeven van alle gebruikte LSU-lijnen:

- Drie onafhankelijke homozygote T3 LSU1 OEX-lijnen (16b, 20j, 22a)
- Twee onafhankelijke homozygote T3 LSU1 KD/ami-lijnen (1.1-1 en 2.6-3)
- Een homozygote T3 LSU2 KO-lijn (SALK 48C-2)
- Een homozygote T3 LSU4 KO-lijn (SALK 14C-5)

Gedurende het verloop van de thesis werd eveneens gewerkt aan de selectie van OEX-, KD/ami- en pGUS-lijnen voor de LSU-peptiden en GBFP van de T1- naar de T2- en T3-generatie, voor gebruik in toekomstige experimenten (Tabel 1).

Tabel 1: Weergave van de huidige geselecteerde generatie OEX-, KD/ami- en pGUS-lijnen voor de LSU-peptiden en GBFP. T2 = 2^{de} transgene generatie (heterozygoot), T3 = 3^{de} transgene generatie (homozygoot), / = lijnen niet beschikbaar, X = lijnen beschikbaar maar na analyse niet geschikt gevonden

	<i>OEX</i> (<i>p35S</i>)	<i>KO</i> (<i>T-DNA</i>)	<i>KD</i> (<i>amiRNA</i>)	<i>pGUS</i>
LSU1	T3	/	T3	T2
LSU2	T2	T3	T2	T2
LSU3	T2	/	T2	T2
LSU4	T2	T3	T2	T2
GBFP	T2	X	T2	T2
LSU1&3	/	/	T2	/
LSU2&4	/	/	T2	/
LSU123	/	/	T2	/

3.3.1.2 Selectie KD/ami- en pGUS-lijnen

Voor de selectie van nieuwe KD/ami- en pGUS-lijnen voor de LSU-peptiden en GBFP van generatie T1 tot T2 en T3 werden drie technieken toegepast nl. BASTA®-selectie, genexpressieanalyse en GUS-kleuring.

BASTA-selectie voor generatie T1

Na transformatie van Col-0 wild-type *A. thaliana* planten met behulp van *Agrobacterium tumefaciens* werd T1-zaad verkregen dat een mix is van niet-getransformeerd en heterozygoot-getransformeerd zaad. De selectie van dit getransformeerd T1-zaad gebeurde aan de hand van een BASTA®-selectie (ammoniumglufosinaat, Bayer CropScience). T1 zaad werd uitgezaaid in bakjes met een mengsel van 1/3 zand en 2/3 perliet en deze bakjes werden in een oplossing met 33 µl/l BASTA® (150g/l; Bayer CropScience) geplaatst. De heterozygote planten overleefden deze selectie en konden kiemen. Na 2 weken werden de geselecteerde planten overgeplant in trays met potgrond (voor professioneel gebruik, De Ceuster Meststoffen n.v.). Van de KD/ami-lijnen werd na 4 weken plantmateriaal verzameld voor RNA-extractie (§3.2.1) en genexpressieanalyse met behulp van qRT-PCR (§3.2.4). Voor pGUS-lijnen werd na 4 weken plantmateriaal verzameld voor een GUS-kleuring (§3.3.6) om te bepalen welke lijnen het beste zijn om verder te selecteren. De planten werden vervolgens opgegroeid tot 10-12 weken in de

plantenkamer (22°C, luchtvochtigheid 70%, 12h dag/nacht-cyclus, lichtintensiteit 120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) tot zij na zelfbestuiving T2-zaad aanmaakten.

BASTA-selectie voor generatie T2

Voor de selectie van het T2 zaad met een 3:1 segregatie werden 50 zaadjes in bakjes potgrond (voor professioneel gebruik, De Ceuster Meststoffen n.v.) uitgezaaid en vervolgens na 3 weken besproeid met een 100 $\mu\text{l/l}$ BASTA® (150g/l; Bayer CropScience). In het geval van goede lijnen (*single insertion*) werd 75% overleving gezien en deze lijnen werden overgeplant in trays met potgrond (voor professioneel gebruik, De Ceuster Meststoffen n.v.). Van de KD/ami-lijnen werd na 4 weken plantmateriaal verzameld voor RNA-extractie (§3.2.1) en genexpressieanalyse met behulp van qRT-PCR (§3.2.4). Voor pGUS-lijnen werd na 4 weken eveneens plantmateriaal verzameld voor een GUS-kleuring (§3.3.6) om te bepalen welke lijnen het beste zijn om verder te selecteren. De planten werden vervolgens opgegroeid tot 10-12 weken in de plantenkamer tot zij T3-zaad aanmaakten.

Dezelfde werkwijze wordt gevolgd voor de selectie van T3 zaad, maar in dit geval werd gezocht naar 100% overleving. Lijnen die 100% resistent zijn na BASTA®-behandeling komen van een homozygote ouderplant. Deze homozygote lijnen worden opgeboukt en kunnen gebruikt worden in toekomstige experimenten.

3.3.2 Opgroeien van planten in potgrond

Een kleine hoeveelheid zaad werd uitgestrooid op een petriplaat gevuld met vochtige potgrond (voor professioneel gebruik, De Ceuster Meststoffen n.v.) en 2 à 3 dagen in het donker geïncubeerd bij 4°C om zaadkieming te induceren. Hierna werd de petriplaat in de kweekkamer (22°C, luchtvochtigheid 70%, 12h dag/nacht-cyclus, lichtintensiteit 120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) geplaatst en na een week werden de zaailingen overgeplant in afzonderlijke potjes met potgrond.

3.3.3 Opgroeien van planten op ½ MS-medium

Het is noodzakelijk om *A. thaliana* zaden te steriliseren vooraleer ze op *in vitro* media uit te zaaien. De zaden werden per lijn overgebracht in epjes waaraan 1 ml van een 30% (v/v) Javel-oplossing werd toegevoegd. Na vortexen werden de epjes horizontaal gelegd gedurende 10' en werden de zaden drie keer met 1 ml milli-Q water gewassen. Ten slotte werd 200 μl milli-Q water toegevoegd en werden de zaden in het donker bewaard bij 4°C gedurende 2 à 3 dagen. De gesteriliseerde zaadjes werden vervolgens op ½ MS-platen aangebracht (Murashige en Skoog) [8 g/l sucrose (Merck), 11 g/l Gelrite™ (Duchefa), 2,21 g/l MS basal salt mix (Duchefa), pH 5,7]. Deze platen werden daarna afgedicht met Micropore™ Medical Tape (3M™) en

horizontaal in de kweekkamer geplaatst (22°C, luchtvochtigheid 70%, 12h dag/nacht-cyclus, lichtintensiteit 120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

De samenstelling van de $\frac{1}{2}$ MS-platen verschilde naargelang de uitgevoerde experimenten. Er werd steeds gestart vanaf het standaard $\frac{1}{2}$ MS-medium (Murashige en Skoog) [8 g/l sucrose (Merck), 11 g/l Gelrite™ (Duchefa), 2,21 g/l MS basal salt mix (Duchefa), pH 5,7]. Voor de kiemtesten met osmotische stress en zoutstress (§3.3.5.2 en §3.3.5.3), werd gebruik gemaakt van $\frac{1}{2}$ MS-media met respectievelijk 150 mM mannitol en NaCl (Tabel 2). Voor de genexpressie- en fenotypische analyses werden $\frac{1}{2}$ MS-media gebruikt met extra sucrose of minder zwavel (Tabel 2). De $\frac{1}{2}$ MS-media met 3% en 6% sucrose (gewicht-volumepercent) werden aangemaakt door respectievelijk 24 g sucrose en 48 g sucrose toe te voegen aan 800 ml medium in plaats van de gebruikelijke 6.4 g sucrose in het standaard $\frac{1}{2}$ MS-medium. Het $\frac{1}{2}$ MS-medium met verlaagd zwavelgehalte werd aangemaakt door de *MS basal salt mix* (Duchefa) te vervangen door afzonderlijke macronutriënten en daarbij het zwavelhoudende MgSO_4 te vervangen door MgCl . Vervolgens werd nog 40 ml *Murashige and Skoog basal salt micronutrient solution 10x* (Sigma-Aldrich) toegevoegd (Tabel 2). Resultaten op het $\frac{1}{2}$ MS-medium werden steeds vergeleken met resultaten op een $\frac{1}{2}$ MS-medium dat eveneens met de afzonderlijke componenten werd aangemaakt, maar waarbij MgSO_4 niet werden vervangen. Er werd gezaaid op de standaard $\frac{1}{2}$ MS-platen (voor goede kieming en ontwikkeling) en deze zaailingen werden na 1 week overgeplant op nieuwe $\frac{1}{2}$ MS-platen met extra sucrose of minder S (voor stressinductie). Voor het aanbrengen van de zaailingen werd 1/3 van het medium bovenaan weggesneden om ruimte te laten voor bladontwikkeling. Platen werden afgesloten met Micropore™ Medical Tape (3M™) en verticaal in de plantenkamer geplaatst.

Tabel 2: Gebruikte $\frac{1}{2}$ MS-media en hun samenstelling

	$\frac{1}{2}$ MS	$\frac{1}{2}$ MS + 3% suc	$\frac{1}{2}$ MS + 6% suc	$\frac{1}{2}$ MS + NaCl	$\frac{1}{2}$ MS + mann		$\frac{1}{2}$ MS	$\frac{1}{2}$ MS-S
MS basal salt mix	1.8 g	1.8 g	1.8 g	1.8 g	1.8 g	KH_2PO_4	68 mg	68 mg
						MgSO_4	72.28 mg	0 mg
						$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0 mg	122 mg
						$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	176 mg	176 mg
						NH_4NO_3	660 mg	660 mg
						KNO_3	760 mg	760 mg
						nutriënten	40 ml	40 ml
Sucrose	6.4 g	24 g	48 g	6.4 g	6.4 g	sucrose	6.4 g	6.4 g
Gelrite	8.8 g	8.8 g	8.8 g	8.8 g	8.8 g	Gelrite	8.8 g	8.8 g
NaCl	0 g	0 g	0 g	7.01 g	0 g	NaCl	0 g	0 g
Mannitol	0 g	0 g	0 g	0 g	21.86 g	Mannitol	0 g	0 g
pH	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	pH	5.7	5.7

3.3.4 Biotische stressbehandelingen

3.3.4.1 Inoculatie met *Botrytis cinerea*

Ter voorbereiding van de ziektestest met de necrotrofe plantpathogeen *B. cinerea* werden een 30-tal planten van wild-type en verschillende LSU-lijnen opgegroeid tot een leeftijd van 4-5 weken. De planten werden in een willekeurige volgorde in infectieboxen geplaatst. Vervolgens werden van elk plantje 4 blaadjes geïnfecteerd met een 5 µl druppel van een $5 \cdot 10^5$ sporen/ml sporenoplossing. Er werd gewerkt met de virulente B05-10-stam. Ten slotte werd 200 ml water aan elke infectiebox toegevoegd, waarna deze werd afgesloten met een deksel opdat condities van 100% relatieve luchtvochtigheid gecreëerd werden. De infectieboxen werden vervolgens in de kweekkamer geplaatst (22°C, luchtvochtigheid 70%, 12h dag/nacht-cyclus, lichtintensiteit $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Op drie, vier en vijf dagen na inoculatie (*days past inoculation*, DPI) werd de diameter (mm) van de necrotische laesies op de geïnfecteerde bladeren gemeten. De gemiddelde laesiediameter en de standaarderror werden per lijn voor elke tijdstip berekend en grafisch weergegeven.

3.3.4.2 Inoculatie met *Pseudomonas syringae*

Opgroeien van *P. syringae*

Voor de ziektestesten met *P. syringae* werd de virulente stam *P. syringae* pv *tomato* DC3000 gebruikt, die tot gebruik als glycerolstock bewaard werd bij -80°C. Drie dagen voor inoculatie werd een hoeveelheid *P. syringae* uitgeplaat op een agarplaat met King's B-medium [10g/l BACTO™ Proteose Peptone #3 (Becton, Dickinson and Company), 1.5g/l K_2HPO_4 , 15g/l glycerol, 15g/l Bacteriologische Agar (VWR Prolabo® Chemicals), pH 7] met 25 µg/ml Rifampicine (Rif). Deze platen werden gedurende 2 dagen geïncubeerd bij 28°C en daarna aangeënt in 5 ml vloeibaar King's B-medium met 25 µg/ml Rif en gedurende 12u in een schudincubator (200 rpm) bij 28°C opgegroeid. Op de eerste dag van de ziektestest werden deze bacteriecultuur gecentrifugeerd gedurende 5' op 4000 rpm bij 4°C om de levende cellen neer te slaan. Er volgde een wasstap waarin het supernatans werd verwijderd, de bacteriecultuur opnieuw werd opgelost in milli-Q water en vervolgens opnieuw gecentrifugeerd werd gedurende 5' op 4000 rpm bij 4°C. Het supernatans werd verwijderd en de bekomen bacteriële suspensie werd verdund tot een optische dichtheid van 0.002 bij 600 nm (OD_{600}), wat overeenkomt met een bacteriële concentratie van $1 \cdot 10^6$ CFU/ml.

Infectie met *P. syringae*

Voor de infectie werden wild-type en transgene/mutante *A. thaliana* plantjes gebruikt van ongeveer 4 weken oud. De planten van werden willekeurig verdeeld over infectiebakken en vervolgens geïnfecteerd met *P. syringae* via drukinfiltratie. Vier aangeduide blaadjes per plant werden met een 1 ml spuit (zonder naald) geïnfilteerd. Na infiltratie werden de infectiebakken afgesloten met een deksel waardoor condities van 100% luchtvochtigheid werden gecreëerd.

Kwantificatie van de *P. syringae*-infectie

De CFU (*Colony-forming units*) in de geïnfecteerde bladeren werden bepaald op 0, 1, 2 en 3 DPI. De kwantificatie op dag 0 werd uitgevoerd om na te gaan of de infectie gelijkmatig gebeurde. Voor de kwantificatie werden elke dag en van elke lijn bladeren verzameld en aan de oppervlakte gesteriliseerd door ze gedurende 1' in 70% EtOH te dompelen en vervolgens te wassen in steriel milli-Q water. Hierna werd een bladcirkeltje van ongeveer 0.5 cm² uit de bladeren verwijderd met een kurkboorder. Van elke lijn werden vier bladcirkeltjes uitgesneden en verzameld in 1,5 ml epjes met 100 µl steriel milli-Q water. Deze stappen werden voor elke lijn en op elk tijdstip in vijfvoud uitgevoerd. De weefselstalen werden vervolgens elektrisch gegrind met geautoclaveerde, plastieken vijzeltjes (Kimble Chase) die na grinden met 900 µl steriel milli-Q water werden gespoeld, waardoor het totale staalvolume 1 ml bedroeg. De stalen werden grondig gevortexed en vervolgens werd een 10-voudige verdunningsreeks (10⁻² tot 10⁻⁹) gemaakt voor elk staal in 96-wellplaten. Van de stalen uit de verdunningsreeks werd telkens 50 µl uitgeplaat op agarplaten met King's B-medium met 25 µg/ml rifampicine. Er werden telkens 4 verdunningen uitgeplaat, afhankelijk van het tijdstip. De agarplaten werden gedurende 2 dagen geïncubeerd bij 28°C, waarna de CFUs geteld werden. Het gemiddeld aantal CFUs op de verschillende tijdstippen werden per lijn berekend en grafisch weergegeven.

3.3.4.3 Inoculatie met *Hyaloperonospora arabidopsidis*

In stand houden van *H. arabidopsidis*

H. arabidopsidis (Hpa) is een obligaat biotrofe pathogeen en kan daarom enkel in stand gehouden worden op levend plantenweefsel. Er werd gebruik gemaakt van 1 week oude, gevoelige Ws-Eds1 planten waarop zich 1 week na infectie een groot aantal sporangioforen vormen op de blaadjes. Deze afgeknipte blaadjes met sporen kunnen wel bewaard worden bij -80°C om later een nieuwe infectie te starten. Voor het starten van een infectietest moet de pathogeen echter eerst minstens twee infectiecycli doorlopen, voordat opnieuw gezond inoculum verkregen wordt dat goed zal infecteren. Hiertoe werden de bevroren sporen opgelost

in milli-Q water en gesproeid over 1 week oude, gezonde en gevoelige Eds1-plantjes. De geïnfecteerde plantjes werden gedurende 1 week geïncubeerd op 16°C met een fotoperiode van 12u licht/12u donker. Na een week werden de nieuw aangemaakte sporen verzameld, door de geïnfecteerde blaadjes met sporangioforen af te knippen en deze op te lossen in milli-Q water. Na het filteren van de sporenoplossing doorheen Miracloth (EMD Millipore) werd deze gesproeid over nieuwe 1 week oude Ws-eds1 plantjes. Ook tijdens de infectietesten werd de pathogeen wekelijks in stand gehouden, om telkens vers inoculum ter beschikking te hebben.

Infectietest met Cala2- en Emoy2-isolaten

De Hpa-isolaten Cala2 en Emoy2 zijn incompatibel met wild-type lijn Col-0 en zullen deze niet of weinig infecteren. Deze infectietesten werden daarom toegepast om verhoogde gevoeligheid van LSU-lijnen aan Hpa na te gaan. Ter voorbereiding op de infectietest werden deze lijnen willekeurig uitgezaaid in trays met vochtige potgrond. Elke lijn kreeg drie herhalingen van ongeveer 20 plantjes. Hierna werden ze gedurende één week in een infectiebox met open deksel opgegroeid in de plantenkamer. De 1 week oude plantjes werden vervolgens gesprayd met een sporenoplossing van Cala2 of Emoy2 aan een concentratie van $5 \cdot 10^4$ sporen/ml. De sporenconcentratie werd bepaald met behulp van een hemocytometer (Hausser Scientific) met een geïnverteerde microscoop (Motic AE21, Scientific Instrument Company). Dan werden de plantjes gedurende 1 week geïncubeerd op 16°C, waarna 15 plantjes per replica willekeurig gekozen werden. Van elk plantje werden beide cotyledons onder de stereozoom microscoop Type 102 (Nikon) bekeken bij 10x vergroting. Het gemiddelde aantal sporangioforen per plantje en standaarderror werden bepaald per lijn en grafisch weergegeven.

Infectietest met Noks1-isolaat

Het Hpa-isolaat Noks1 is compatibel met wild-type lijn Col-0 en zal deze dus sterk infecteren. Deze infectietest werd daarom toegepast om verhoogde resistentie van *A. thaliana* LSU-lijnen aan Hpa na te gaan. De infectie gebeurde op dezelfde wijze als hierboven beschreven. Na één week werden 15 plantjes per replica willekeurig gekozen en de cotyledons werden afgeknipt en geplaatst in een epje met 250 µl koud dsH₂O. De epjes werden kort gevortext waarna onmiddellijk 10 µl op de hemocytometer werd geladen om de sporenconcentratie te bepalen. Het gemiddelde aantal sporen en de standaardafwijking per lijn werd grafisch weergegeven.

3.3.5 Abiotische stressbehandelingen

3.3.5.1 Behandeling met paraquat

Een 20-tal planten van wildtype en LSU-lijnen werden gedurende 5 weken opgegroeid in potgrond en vervolgens willekeurig verdeeld over infectieboxen. Per plant werden vier volwassen blaadjes aangeduid. Vervolgens werd een druppel van 5 μl van een paraquatoplossing (methyl viologen, Sigma) met een concentratie van 40 mM op elk blaadje geplaatst. De bakken werden in de kweekkamer geplaatst (22°C, luchtvochtigheid 70%, 12h dag/nacht-cyclus, lichtintensiteit 120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) en 5 dagen na de behandeling werden foto's van de planten genomen. Deze werden geanalyseerd met ASSESS 2.0 (Lamari, 2008) Software om het percentage chlorotisch bladweefsel te bepalen. Het gemiddelde percentage en bijhorende standaarderror werd voor elke lijn berekend en grafisch weergegeven.

3.3.5.2 Osmotische stress

Gesteriliseerde zaden van de LSU-lijnen en wild-type lijn Col-0 werden uitgezaaid op 5 petriplaten met $\frac{1}{2}$ MS-medium met mannitol (150 mM) en op 5 petriplaten met standaard $\frac{1}{2}$ MS-medium (Tabel 2). Op elke petriplaat werden 10 zaden van elke lijn uitgezaaid. Deze platen werden gedurende een week horizontaal in de kweekkamer (22°C, luchtvochtigheid 70%, 12h dag/nacht-cyclus, lichtintensiteit 120 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) geplaatst. Op 5 dagen en 7 dagen na zaaien, werd het aantal gekiemde zaden geteld. Met deze tellingen werd het relatief kiemingspercentage berekend met volgende formule:

$$\text{relatief kiemingspercentage} = \frac{\% \text{ kieming op mannitol}}{\% \text{ kieming op standaard } \frac{1}{2} \text{ MS medium}} * 100$$

Voor elke lijn werden de gemiddelde waarden en bijhorende standaarderror op de drie tijdstippen berekend en vervolgens grafisch weergegeven.

3.3.5.3 Zoutstress

Om het effect van zout na te gaan, werd op dezelfde manier te werk gegaan als bij de test met osmotische stress. Hier werd gebruik gemaakt van $\frac{1}{2}$ MS-medium gesupplementeerd met 150 mM NaCl (Tabel 2).

3.3.6 Histochemische GUS-kleuring

T1 en T2 -planten van verschillende leeftijden werden gebruikt voor kleuring. Wanneer jonge plantjes of kleine afzonderlijke blaadjes gekleurd werden, werd gebruik gemaakt van een 6 well-plaat (Greiner Bio-one). In het geval van volwassen planten of grote bladeren werd gebruik gemaakt van een 15 ml falcon. Het plantmateriaal werd onmiddellijk na verzamelen

ondergedompeld in een 90% (v/v) acetonoplossing, om alle enzymatische reacties te stoppen. Vervolgens werd kleuringsbuffer toegevoegd met volgende samenstelling per ml:

- 830 μ l milli-Q water
- 100 μ l NaPO₄, pH 7 (1 M)
- 20 μ l EDTA (0.5 M)
- 10 μ l Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- 20 μ l K₃Fe(CN)₆ (50 mM)
- 10 μ l X-Gluc (0.1 M)

Hierna werd het plantmateriaal gedurende 24u geïncubeerd met de kleuringsbuffer op 37°C. Op de locaties waar het GUS-gen tot expressie kwam en β -glucosidase werd geproduceerd, werd X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide) omgezet naar het onoplosbare en sterk blauwgekleurd product 5,5'-dibromo-4,4'-dichloroindigo. De kleuringsbuffer werd verwijderd en het plantmateriaal werd enkele keren gedurende 12 u gewassen met een 50% (v/v) EtOH-oplossing om te ontkleuren. Na volledige ontkleuring werden foto's getrokken om de weefsel-specifieke expressie te visualiseren.

3.4 Statistische analyses

De initiële verwerking van de resultaten werd uitgevoerd met behulp van Microsoft® Office Excel 2013 en statistische analyses werden uitgevoerd met behulp van het statistische programma Graphpad Prism® 6. Om meerdere plantenlijnen onderling statistisch te vergelijken werden eerst twee aannames gecontroleerd, namelijk (i) de normale verdeling van de data en (ii) de homogeniteit van de varianties. De normale verdeling werd getest aan de hand van de Shapiro-Wilkinsonstest en de homogeniteit van de varianties aan de hand van een Bartlett's test. Indien aan beide aannames werd voldaan, werd een one-way ANOVA (*analysis of variance*) analyse toegepast. Indien niet aan beide aannames kon worden voldaan werd een niet-parametrische Kruskal-Wallis-test uitgevoerd. Resultaten werden telkens als significant beschouwd wanneer de p-waarde ≤ 0.05 was.

4. Resultaten

4.1 Lokalisatie van LSU-peptiden en interactoren

4.1.1 Inleiding en proefopzet

In het kader van de functionele analyse van de LSU-peptiden in de plantstressrespons, werden weefsel-specifieke en subcellulaire lokalisatiestudies uitgevoerd. De weefsel-specifieke lokalisatie werd uitgevoerd om te bepalen in welke plantendelen of –structuren de LSU-peptiden en de LSU-interactor GBFP tot expressie worden gebracht en gebeurde door middel van een GUS-kleuring (§3.3.6). De expressie werd eerst nagegaan bij volwassen bladeren en bloemen van respectievelijk 2, 8 en 10 weken oude planten van in potgrond opgegroeide T1 pGUS-lijnen van LSU1-4 en de LSU-interactor GBFP. Om na te gaan of de weefsel-specifieke expressie wijzigt doorheen de tijd, werd de expressie ook nagegaan door middel van een 4 weken durende tijdsreeks, uitgevoerd op T2 pGUS-lijnen van LSU1-4 en GBFP (§3.3.1.2). Bovendien werden deze lijnen ook uitgezaaid op verschillende ½ MS-media, met extra sucrose of een verlaagd zwavelgehalte, om ook het effect hiervan na te gaan. Hierbij werden steeds volledige plantjes gekleurd om de genexpressie over de gehele plant te bekijken.

De subcellulaire proteïnelokalisatie werd uitgevoerd in samenwerking met het labo van Prof. Rolland (Departement Biologie, KU Leuven) en gebeurde via de transformatie van *A. thaliana* mesofyl protoplasten (§3.1.14) met GFP-fusieconstructen van LSU2, LSU3, LSU4 en de via Y2H voorspelde LSU-interactor FSD2, gevolgd door visualisatie via fluorescentie microscopie (§3.1.15). In het verleden werd reeds de subcellulaire lokalisatie van LSU1 bepaald, als zijnde nucleair en cytoplasmatisch (Dang 2015). Het doel van de subcellulaire proteïnelokalisatie is om te bepalen waar de LSU-peptiden zich bevinden in de plantencel en waarschijnlijk hun functie uitoefenen. De lokalisatie van de FSD2 LSU-interactor werd uitgevoerd als controle aangezien van dit proteïne geweten is dat het zich in de chloroplasten bevindt. Op die manier kon ook gecontroleerd worden of de LSU-peptiden een gelijkaardige lokalisatie in de chloroplasten vertonen, aangezien verschillende andere LSU-interactoren net als FSD2 in de chloroplasten gelokaliseerd zijn.

4.1.2 Resultaten en bespreking

4.1.2.1 Weefsel specifieke lokalisatie van LSU1-4 en GBFP

Expressie in blad en bloem van T1 pGUS-planten

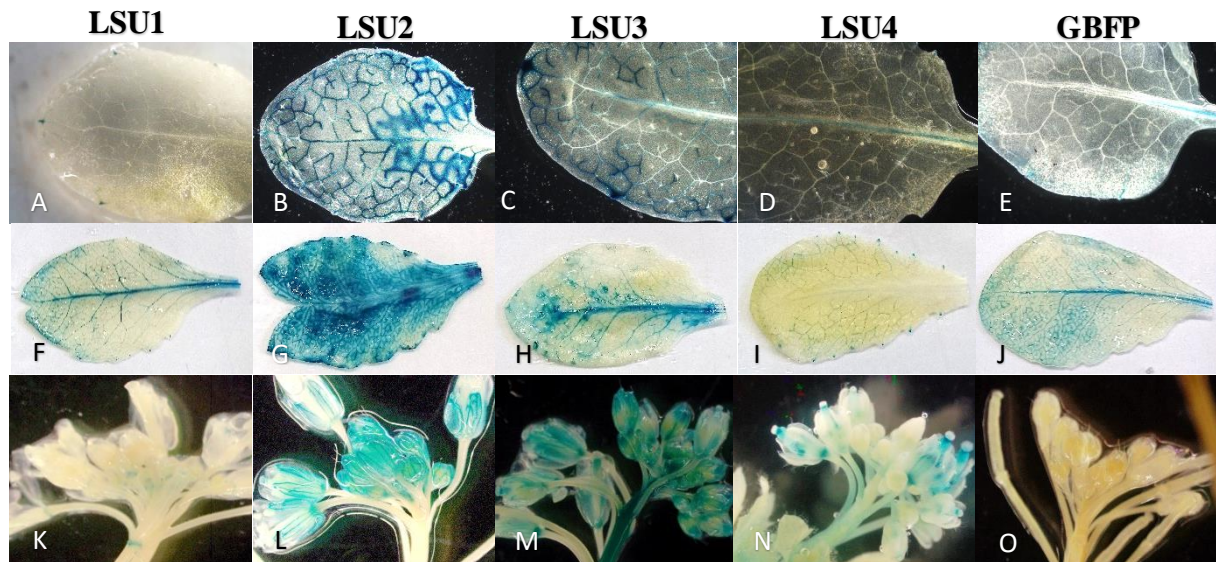
In Figuur 7 worden foto's getoond van de GUS-kleuring die werd uitgevoerd op twee en acht weken oude bladeren afkomstig van T1 LSU/GBFP pGUS-planten en op bloemen van T1 LSU/GBFP pGUS-planten van tien weken oud.

LSU1 vertoont amper expressie in het twee weken oude blad: de kleuring is enkel in de hydathoden duidelijk zichtbaar (Figuur 7, A). In het acht weken oude blad is er wel een duidelijke vasculaire expressie die zich voornamelijk in de hoofdnerf situeert (Figuur 7, F). GBFP vertoont een expressiepatroon dat sterk gelijkend is aan dat van LSU1. Net als bij LSU1 is er een sterkere kleuring in het acht weken oude blad dan in het zeer licht gekleurde twee weken oude blad (Figuur 7, E en J), hoewel deze laatste toch een iets duidelijkere vasculaire expressie aan de buitenrand en hoofdnerf vertoont dan het geval was bij LSU1 (Figuur 7, A). LSU2 en LSU3 vertonen zowel in het twee weken oude blad als in het acht weken oude blad een sterke vasculaire expressie (Figuur 7, C-D en G-H). Zeker in het geval van LSU2 is de expressie zeer hoog en niet alleen het vasculair weefsel maar ook omliggend weefsel wordt gekleurd. Dit komt overeen met de verwachtingen, omdat uit gegevens van Genevestigator¹ blijkt dat het LSU2-gen het hoogst tot expressie komt in vergelijking met de andere LSU-genen. Het acht weken oude blad van de LSU3 pGUS-lijn vertoont vasculaire kleuring, maar deze is net als bij LSU1 en GBFP voornamelijk in en rond de hoofdnerf aanwezig (Figuur 7, H). LSU4 vertoont amper kleuring in de bladeren zowel op twee als op acht weken (Figuur 7, D en I). Dat LSU4 veel minder in het vegetatieve weefsel tot expressie komt, is niet verwonderlijk aangezien uit de literatuur blijkt dat LSU4 voornamelijk in de bloemen tot expressie komt (Myakushina et al. 2009).

In de bloemen van 10 week oude plantjes (Figuur 7, K-O) treedt een sterke kleuring op bij de LSU2, LSU3 en LSU4 pGUS-lijnen, maar in veel mindere mate bij LSU1. De GUS-kleuring is volledig afwezig in de bloemstructuren van de GBFP pGUS-lijnen. De bloemen van de LSU1 pGUS-lijnen vertonen een lichte kleuring in de bloembodems, maar niet in de andere bloemstructuren. LSU2 komt vasculair tot expressie, maar enkel in de buitenste bloemblaadjes. Ook de bloemen van de LSU3 pGUS-lijnen vertonen vasculaire kleuring van de buitenste bloemblaadjes, hoewel veel diffuser dan bij de LSU2 pGUS-lijnen. Ook volledige antheren en

¹ <http://www.genevestigator.com>

de stempel kleuren blauw. LSU4 vertoont sterke genexpressie in de bloembodem en de zich vormende silices, maar amper in de bloemblaadjes of in de nog gesloten bloemen.



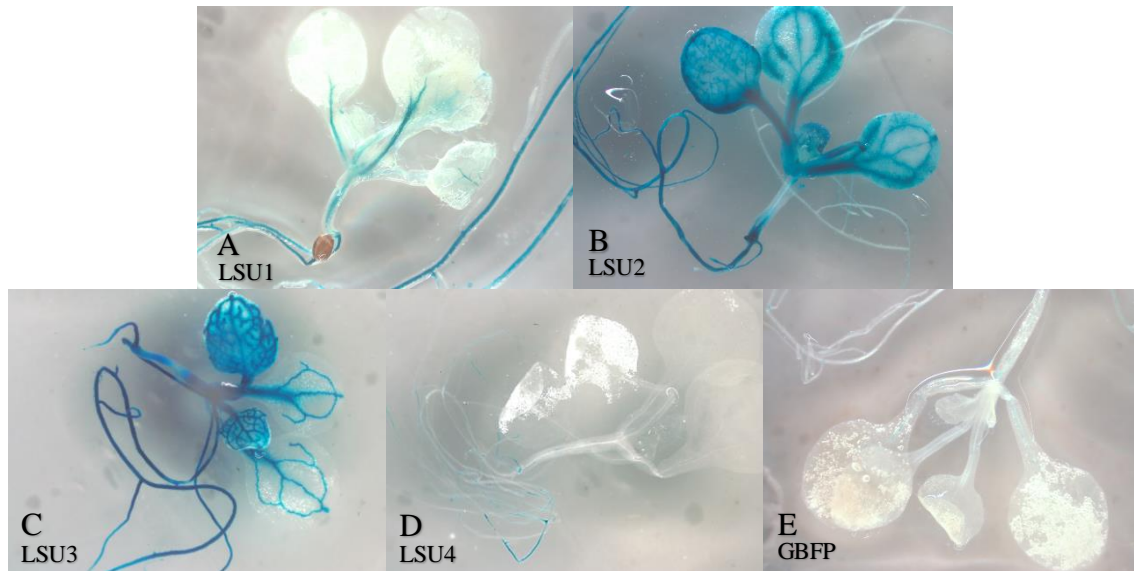
Figuur 7: Expressie van LSU1-4 en GBFP in blad en bloem van T1 pGUS-lijnen. A-E) GUS-kleuring van de eerste volwassen bladeren afkomstig van 2 weken oude T1 *A. thaliana* pGUS-planten van LSU1-4 en GBFP. F-J) GUS-kleuring van bladeren afkomstig van 8 weken oude T1 pGUS planten van LSU1-4 en GBFP. K-O) GUS-kleuring van bloemen afkomstig van 10 weken oude pGUS planten van LSU1-4 en GBFP.

Expressie in volledige T2 pGUS-planten op verschillende ½ MS-media

Na het selecteren van T2 pGUS-lijnen van LSU1-4 en GBFP (§ 3.3.1.2) werd een tijdsreeks uitgevoerd, waarbij de plantjes werden opgegroeid op standaard ½ MS-medium, ½ MS-medium met verlaagd zwavelgehalte, ½ MS-medium met 3% sucrose en ½ MS-medium met 6% Sucrose (§3.3.3) (Tabel 2). Tot een leeftijd van 4 weken werden elke week enkele plantjes verzameld en vervolgens gekleurd. Er werd in detail gekeken naar de kleuring in de volledige plantjes en of deze veranderde doorheen de tijd of onder invloed van het medium.

In Figuur 8 worden microscopiefoto's weergegeven van 2 weken oude T2 LSU1-4 pGUS-plantjes die opgegroeid werden op standaard ½ MS-medium. LSU1 komt in de LSU1 pGUS-lijn LSU1.5 voornamelijk in de wortels, stengel en bladstengel tot expressie en er is slechts zeer lichtjes vasculaire expressie in de eerste volwassen bladeren zichtbaar (Figuur 8, A). De juveniele bladeren vertonen geen zichtbare kleuring. Deze observatie komt overeen met de observatie in de T1 LSU1 pGUS-lijn (Figuur 7, A). De LSU2 pGUS-lijn LSU2.4 en de LSU3 pGUS-lijn LSU3.22 kleuren sterk vasculair in wortels, bladeren en stengel (Figuur 8, B en C). Zelfs buiten het vasculair weefsel treedt er kleuring op. De LSU4 pGUS-lijn LSU4.12 vertoont slechts lichtjes verkleurde wortels, voornamelijk in de buurt van vertakkingen, maar geen vasculaire kleuring in de blaadjes (Figuur 8, D). De T2 GBFP pGUS-lijn GBFP.21 vertoont net als bij de T1 GBFP pGUS-lijn (Figuur 7, E) slechts een zeer lichte kleuring in de bladeren

(Figuur 8, E). Ook in de stengel en wortels is er slechts een zeer lichte kleuring zichtbaar, behalve op de plaatsen waar de wortel zich vertakt in zijwortels waar de kleuring duidelijker is.

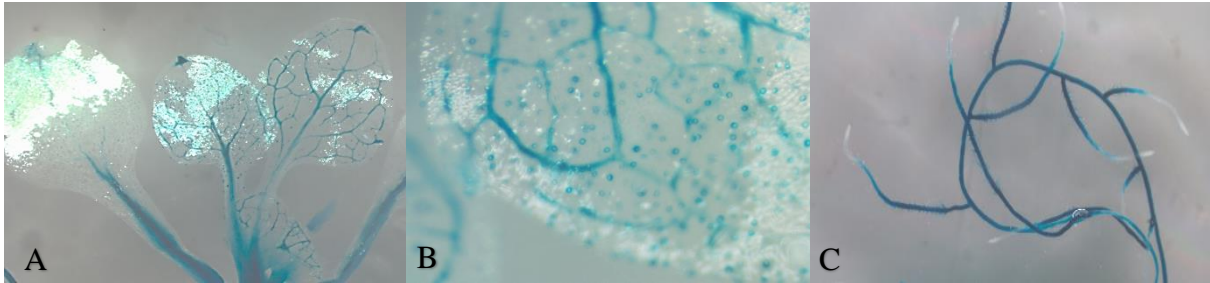


Figuur 8: Expressie van LSU1-4 en GBFP in planten van 2 weken oude *A. thaliana* T2 LSU1-4 pGUS-planten. A) GUS-kleuring van een plant van de LSU1 pGUS-lijn LSU1.5. LSU1 komt in de wortels, stengel en bladstengel, maar minder in de bladeren tot expressie. B) GUS-kleuring van een plant van de LSU2 pGUS-lijn LSU2.4. De kleuring bevindt zich in de wortels en vasculair in stengel en bladeren. C) GUS-kleuring van een plant van de LSU3 pGUS-lijn LSU3.21. Er is een sterke vasculaire expressie van LSU3 over de volledige plant. D) GUS-kleuring van een plant van de LSU4 pGUS-lijn LSU4.12. De kleuring is zeer licht aanwezig in de wortels en voornamelijk op plaatsen waar de wortel zich vertakt in zijwortels. In blad en stengel is er amper kleuring zichtbaar. E) GUS-kleuring van een plant van de GBFP pGUS-lijn GBFP.22. Er is amper GUS-kleuring in de bladeren, maar wel lichte kleuring in de stengel, bladstengel en in wortels bij vertakkingen.

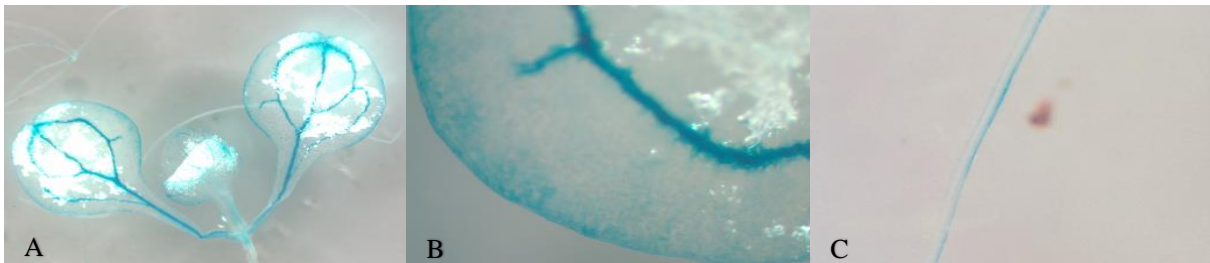
Vervolgens werd meer in detail gekeken naar de expressie van LSU1-4 en GBFP in de bladeren en wortels van twee weken oude plantjes opgegroeid op standaard ½ MS-medium. In Figuur 9 worden de eerste volwassen blaadjes getoond van een twee weken oud plantje van de T2 LSU1 pGUS-lijn LSU1.4. Er is duidelijk een gespikkeld patroon te zien, wat wijst op expressie in de stomata. Deze stomatale expressie werd in mindere mate ook opgemerkt bij de andere LSU-peptiden, maar niet bij GBFP (resultaten niet weergegeven). Daarnaast blijkt er in geen van de vier LSU pGUS-lijnen kleuring op te treden in de worteltoppen (figuur 9, C). In Figuur 10 worden blaadjes en wortelweefsel getoond van de T2 GBFP pGUS-lijn GBFP.21. Er is een diffuse kleuring zichtbaar aan de bladrand (Figuur 9, A-B) en de lokalisatie van GBFP blijkt zich steeds slechts aan de buitenzijde van de wortels te bevinden (Figuur 10, C). Deze eenmalige observaties moeten in herhalingsexperimenten bevestigd worden aan de hand van kleuringen op T3 pGUS-lijnen (§3.3.1.2).

Na deze GUS-kleuring bleken de T2 LSU1 pGUS-lijn LSU1.4 en de T2 GBFP pGUS-lijnen die werden gebruikt, op basis van de segregatie-analyse (§3.3.1.2) geen correct getransformeerde lijnen te zijn. Een mogelijke verklaring voor het afwijkende resultaat in de segregatie-analyse is dat er tijdens de transformatie meerdere inserties van het pGUS-construct

ingebracht zijn. Extra inserties kunnen zorgen voor verhoogde expressie van het GUS en dus intensere kleuring dan bij single inserties. Verhoogde expressie zou in de T2 pGUS-lijn LSU1.4 de intensere kleuring van de volwassen bladeren kunnen verklaren ten opzichte van de T2 pGUS-lijn LSU1.5, die wel een correcte segregatie vertoonde (Figuur 8, A). De juveniele blaadjes blijven net als in de T2 LSU1 pGUS-lijn 1.5 amper gekleurd. Een gelijkaardige verklaring zou kunnen gelden voor het verschil in kleuringsintensiteit tussen de T2 pGUS-lijnen GBFP.22 en GBFP.21.

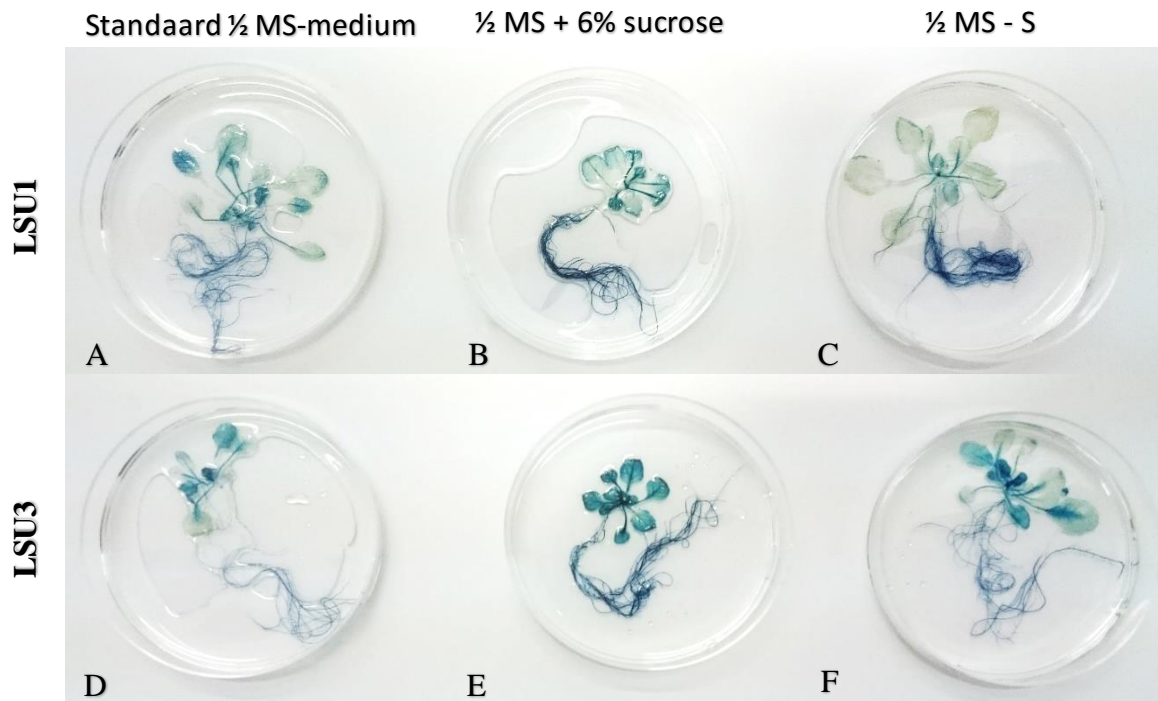


Figuur 9: Expressie van LSU1 in T2 LSU1 pGUS-lijn LSU1.4. A) GUS-kleuring van de eerste volwassen bladeren afkomstig van een 2 weken oud T2 LSU1 pGUS LSU1.4 plantje. Het gespikkeld patroon wijst op stomatale expressie. B) Detailbeeld van de GUS-kleuring in de stomata van het meeste linkse volwassen blad uit afbeelding A. C) Detailbeeld van de GUS-kleuring in de wortels. Er is een duidelijke afwezigheid van de kleuring in de worteltoppen



Figuur 10: Expressie van GBFP in T2 GBFP pGUS-lijn GBFP.21. A) GUS-kleuring van de juveniele en eerste volwassen bladeren afkomstig van 1 week oude T2 *A. thaliana* pGUS-plant van GBFP.21. GBFP vertoont vasculaire expressie in de juveniele bladeren, maar ook een diffuse kleuring van de bladrand. B) Detailbeeld van de diffuse GUS-kleuring van de bladrand van het meest linkse blad uit afbeelding A. C) GUS-kleuring van de wortel afkomstig van 1 week oude T2 *A. thaliana* pGUS-plant GBFP.21. GBFP toont niet over de volledige diameter van de wortel kleuring, maar slechts aan de buitenrand.

Vervolgens werd nagegaan of de expressie van LSU1-4 veranderde naargelang het $\frac{1}{2}$ MS-medium waarop de planten groeiden. De GUS-kleuring is intenser in de planten op het $\frac{1}{2}$ MS-medium met 6% sucrose of met verlaagde zwavelgehalten. Dit is voornamelijk het geval in de LSU1 pGUS-lijn LSU1.4 en de LSU3 pGUS-lijn LSU3.22 bij 3 en 4 weken oude planten (na resp. 2 en 3 weken op aangepast $\frac{1}{2}$ MS-medium) (Figuur 11). De planten opgegroeid op het $\frac{1}{2}$ MS-medium met 6% sucrose vertonen een sterkere verkleuring in de wortels en ook lichtjes in de bladeren (Figuur 11, B en E). Bij de planten opgegroeid op het $\frac{1}{2}$ MS-medium met verlaagd zwavelgehalte is er vooral in de wortels een intensere verkleuring (Figuur 11, C en F). In de literatuur werd immers reeds vermeld dat de LSU-peptiden voornamelijk in de wortels geïnduceerd worden bij zwavelgebrek (Sirko et al. 2014).

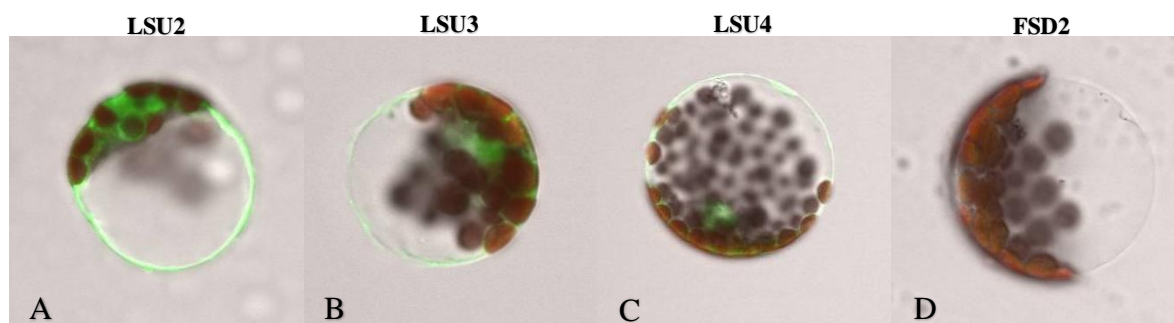


Figuur 11: Expressie van LSU1 en LSU3 in 4 weken oude T2 LSU1, LSU3 en GBFP pGUS-planten opgegroeid op verschillende ½ MS-media. A-C) GUS-kleuring van 4 weken oude planten afkomstig van de T2 *A. thaliana* pGUS-lijn LSU1.4 op standaard ½ MS-medium (A); ½ MS-medium met 6% sucrose (B) en ½ MS-medium met verlaagd zwavelgehalte (C). D-F) GUS-kleuring van 4 weken oude planten afkomstig van de T2 *A. thaliana* pGUS-lijn LSU3.22 op standaard ½ MS-medium (D); ½ MS-medium met 6% sucrose (E) en op ½ MS-medium met verlaagd zwavelgehalte (F). De planten die werden opgegroeid op medium met 6% sucrose of verlaagd zwavelgehalte vertonen een intensifiëring van de GUS-kleuring, voornamelijk in de wortels.

Ten slotte werd nagegaan of de expressielokalisatie van LSU1-4 en GBFP veranderde naarmate de planten groeiden op het standaard ½ MS-medium. De GUS-kleuring blijft aanwezig in alle geteste plantstadië (tot 4 weken oud) en het wordt verwacht op basis van eerder uitgevoerde GUS-kleuringen dat de LSU-peptiden ook in latere ontwikkelingsstadia tot expressie blijven komen. De expressielokalisatie van LSU1 lijkt te wijzigen naargelang het ontwikkelingsstadium van de plant. In jonge plantjes is er voornamelijk kleuring in de wortels en de stengel en veel lichtere kleuring in de blaadjes (Figuur 7, A; Figuur 8, A en Figuur 9, A). Blaadjes van vier weken oud (Figuur 11, A) en van acht weken oud (Figuur 7, F) vertonen echter sterkere vasculaire expressie die zich voornamelijk in de hoofdnerf situeert. Hoewel het expressiepatroon bij de andere LSU-peptiden niet in dergelijke mate lijkt te wijzigen als bij LSU1, vallen er toch subtiele verschillen op tussen kleuringen van blaadjes afkomstig van dezelfde pGUS-lijn. Dit zou erop kunnen wijzen dat de expressielokalisatie en intensiteit wijzigt bij blootstelling aan allerlei omgevingsfactoren die in de uitgevoerde experimenten niet gecontroleerd kunnen worden.

4.1.2.2 Subcellulaire lokalisatie van LSU2-4 en FSD2

In Figuur 12 worden de confocale microscopiefoto's weergegeven van de *A. thaliana* mesofyl protoplasten getransformeerd met GFP-fusieconstructen van LSU2-4 en FSD2, om de subcellulaire lokalisatie van deze proteïnen na te gaan. LSU2, LSU3 en LSU4 vertonen, net zoals reeds werd aangetoond voor LSU1 (Dang 2015), expressie in het cytoplasma en in de kern (Figuur 12, A-C). Dat de vier LSU-peptiden sterk gelijkende lokalisatie vertonen, komt overeen met de verwachtingen aangezien hun coderende sequentie sterk gelijkend is. De via Y2H voorspelde LSU-interactor FSD2 vertoont expressie in de chloroplasten (Figuur 12, D). De LSU-peptiden daarentegen lijken geen lokalisatie in de chloroplasten te vertonen. Omdat vele LSU-interactoren, zoals FSD2 wel gelokaliseerd zijn in de chloroplasten, is het interessant om na te gaan of de lokalisatie van de LSU-peptiden wijzigt naar de chloroplasten indien de protoplasten blootgesteld worden aan specifieke stresscondities zoals bijvoorbeeld hoge sucrose concentraties of toevoegen van flagelline. De subcellulaire expressie van de interactor GBFP werd nog niet nagegaan, maar zal in de toekomst zeker ook uitgevoerd worden.



Figuur 12: Subcellulaire lokalisatie van de GFP-fusieconstructen van LSU2-4 en FSD2 in *A. thaliana* mesofyl protoplasten. De afbeeldingen zijn een combinatie van het brightfield beeld (grijs), het autofluorescentiesignaal van de chloroplasten (rood) en het GFP-signaal (groen). A-C) Subcellulaire lokalisatie van respectievelijk LSU2, LSU3 en LSU4 in de kern en het cytoplasma. D) Subcellulaire lokalisatie van FSD2 in de chloroplasten.

4.2 Genexpressie van de LSU-peptiden en GBFP

4.2.1 Inleiding en proefopzet

Er werden genexpressieanalyses uitgevoerd op wild-type Col-0 *A. thaliana* planten opgegroeid op standaard ½ MS-medium, op ½ MS-medium met verlaagd zwavelgehalte en op ½ MS-medium met 6% sucrose. Dit gebeurde om de verhoogde expressie van de LSU-peptiden in respons op zwaveltekorten te controleren en om te achterhalen of de expressie van de LSU- en GBFP-genen ook in respons op hoge sucroseconcentraties wijzigt. Hiervoor werden telkens 3 maal 6 volledige planten gepoold per getest medium, om vervolgens een gemiddeld relatief expressieniveau te bepalen. Daarnaast werden ook genexpressieanalyses uitgevoerd voor de selectie van goede T1 KD/ami-lijnen voor de LSU-peptiden en GBFP. Deze transgene lijnen waren reeds bij aanvang van deze thesis beschikbaar. T2 zaden afkomstig van een T1 lijn met

een gewenste verlaagde expressie werden vervolgens uitgezaaid voor een segregatieanalyse (§3.3.1.2) en onderworpen aan verdere selectie. Deze lijnen zullen in de T3-generatie gebruikt worden in toekomstige pathogentesten of abiotische stresstesten. Van LSU1 waren reeds voor de aanvang van deze thesis KD/ami-lijnen beschikbaar, die gebruikt werden in de uitgevoerde pathogentesten en abiotische stresstesten.

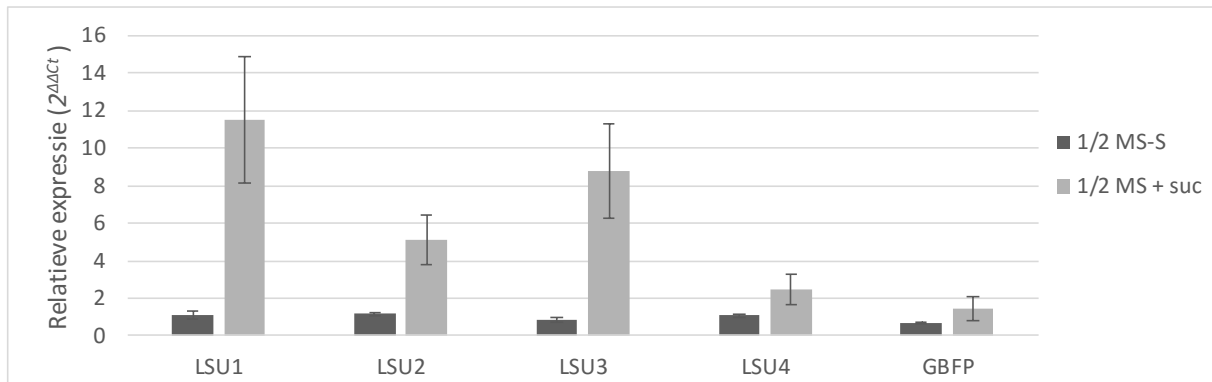
4.2.2 Resultaten en bespreking

4.2.2.1 Expressieanalyse van LSU-peptiden en GBFP in wild-type planten op verschillende ½ MS-media

In Figuur 13 worden de resultaten weergegeven van de genexpressieanalyses op 3 weken oude planten die eerst gedurende 1 week op standaard ½ MS-medium en vervolgens gedurende 2 weken op ½ MS-medium met 6% sucrose of met verlaagd zwavelgehalte groeiden. LSU1 ($\Delta\Delta C_t = 3.38 \pm 0.45$) en LSU3 ($\Delta\Delta C_t = 2.98 \pm 0.50$) worden het sterkst geïnduceerd, terwijl LSU2 ($\Delta\Delta C_t = 2.27 \pm 0.35$) slechts matig wordt geïnduceerd. LSU4 ($\Delta\Delta C_t = 1.17 \pm 0.43$) en GBFP ($\Delta\Delta C_t = 0.16 \pm 0.76$) vertonen geen verhoogde expressie. Dit resultaat wordt echter niet bekomen bij planten die slechts 1 week op het ½ MS-medium met 6% sucrose hebben gestaan (resultaat niet weergegeven). Deze verhoogde expressie na langdurige blootstelling aan hoge sucroseconcentraties in het medium kan erop wijzen dat de LSU-peptiden een rol hebben in de respons van de plant op sucrose. Anderzijds hoeft de link tussen LSU-peptiden en de respons op sucrose niet zo rechtstreeks te zijn. De planten vertonen duidelijke tekenen van stress en de verhoogde genexpressie zou dus ook onrechtstreeks een respons kunnen zijn op de stress die de plant ervaart.

Er werd geen significant verhoogde expressie van LSU1-4 en GBFP waargenomen in respons op het ½ MS-medium met verlaagd zwavelgehalte. Dit gaat in tegen de verwachting, omdat reeds werd aangetoond dat de LSU-peptiden verhoogd tot expressie komen in planten die blootgesteld werden aan zwaveltekorten (Maruyama-Nakashita et al. 2005). In deze studies wordt dit echter specifiek in de wortels aangetoond, terwijl voor de expressieanalyses tijdens deze thesis volledige planten werden gebruikt. De wortelmasse is in verhouding met de bladmasse opmerkelijk lager, waardoor de verhoogde expressie in de wortels mogelijk niet wordt waargenomen wanneer de gehele plant onderzocht wordt. Daarnaast valt ook uit de resultaten van de pGUS-kleuringen (§4.1.2.1) af te leiden dat de verhoogde expressie op ½ MS-medium met verlaagd zwavelgehalte voornamelijk plaatsvindt in de wortels. Om dit na te gaan kunnen de expressieanalyses herhaald worden, waarbij enkel wortelmasse gebruikt wordt en

dan zal naar verwachting wel een verhoogde expressie van de LSU-peptiden in respons op ½ MS-medium met verlaagd zwavelgehalte geobserveerd worden.

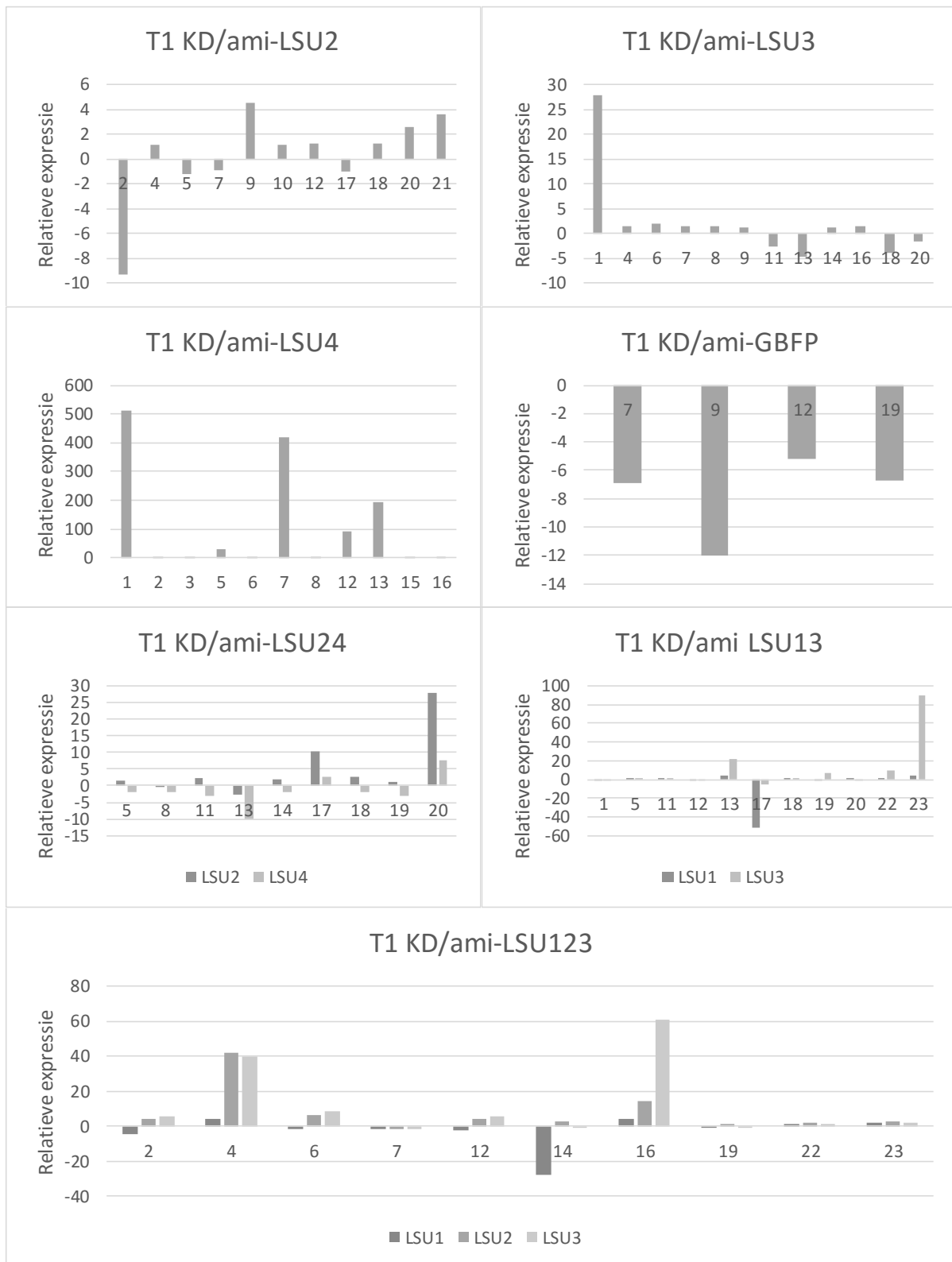


Figuur 13: Geneexpressieanalyse van LSU1-4 en GBFP in wild-type planten na 2 weken op ½ MS-medium met verhoogd sucrose- of verlaagd zwavelgehalte. De hoogte van de balken geeft de gemiddelde relatieve expressie weer van de behandelde stalen ten opzichte van de controle stalen, bekomen aan de hand van een qRT-PCR, uitgevoerd op telkens drie stalen. De relatieve expressie van LSU- of GBFP-genen werd nagegaan in de wild-type lijn na blootstelling aan hoge sucrose- of verlaagde zwavelconcentraties gedurende 2 weken ten opzichte van het basale expressieniveau in de wild-type lijn op het standaard ½ MS-medium. Er werd gebruik gemaakt van *EF1α* als referentiegen.

4.2.2.2 Expressieanalyse va T1 KD/ami-lijnen

In Figuur 14 worden de resultaten voorgesteld van de genexpressieanalyse van verschillende T1 KD/ami-lijnen van de LSU-peptiden en GBFP. Enkel de T1 KD/ami-planten met een verlaagd expressieniveau (meer dan 2 maal reductie) voor het overeenkomstige LSU-/GBFP-gen ten opzichte van het basale expressieniveau in de wild-type lijn Col-0 werden geselecteerd. T1 KD/ami-lijnen LSU24, LSU13 en LSU123 werden geconstrueerd zodat respectievelijk de expressie van LSU2 en LSU4, LSU1 en LSU3 en LSU1, LSU2 en LSU3 gereduceerd zou worden. Op basis van de data in Figuur 14 werden volgende planten geselecteerd om T2-zaden van te verzamelen: T1 KD/ami LSU2 nr. 2; T1 KD/ami LSU 3 nr. 11, 13 en 18; T1 KD/ami GBFP nr. 7, 9, 12 en 19. Voor T1 KD/ami LSU4 konden geen planten geselecteerd worden. Voor de dubbele KD/ami-lijnen werden voor T1 KD/ami LSU24 nr. 11, 13 en 19; voor T1 KD/ami LSU13 nr. 17 en voor T1 KD/ami LSU123 nr. 7 en 14 geselecteerd.

Idealiter zouden minstens 3 planten per T1 KD/ami-lijn geselecteerd worden. Er kon echter voor sommige lijnen slechts één plant geselecteerd worden en voor KD/ami LSU4 helemaal geen. Enkele planten van T1 KD/ami LSU24 vertoonden enkel verlaagde expressie voor LSU4 en zouden geselecteerd kunnen worden als T1 KD/ami LSU4-lijnen. Toch is het opvallend dat er zo weinig lijnen voldoende expressiereductie van de juiste LSU-genen vertonen.



Figuur 14: Resultaten van de LSU- en GBFP-genexpressieanalyse in T1 KD/ami-lijnen. De hoogte van de balken geeft de relatieve expressie weer van het LSU-/GBFP-gen in de T1 KD/ami-planten ten opzichte van het basale expressieniveau in de wild-type controleplanten. De resultaten werden bekomen aan de hand van een qRT-PCR, uitgevoerd op afzonderlijke, 4 weken oude T1 KD/ami -planten, die elk aangeduid worden met een uniek nummer. Er werd gebruik gemaakt van EF1 α als referentiegen.

4.3 Fenotypische karakterisering van *A. thaliana*-lijnen met een gemoduleerde expressie van de LSU-peptiden en -interactoren in het kader van de stressrespons

4.3.1 Inleiding en proefopzet

Om de rol van de verschillende LSU-peptiden in de stressrespons van *A. thaliana* te onderzoeken, werden zowel abiotische als biotische stresstesten uitgevoerd. Voor deze testen werden verschillende homozygote T3 OEX-, KD/ami- en KO-lijnen van de LSU-peptiden (§ 3.3.1.1) behandeld, waarna deze fenotypisch gekarakteriseerd werden naar verhoogde tolerantie of gevoeligheid voor de opgelegde abiotische of biotische stress. Een overzicht van de pathogeen- en abiotische stresstesten met stresstype, pathogeenspecies en –stam en gebruikte lijnen wordt weergegeven in tabel 3.

Tabel 3: Overzicht van de uitgevoerde pathogeen- en abiotische stresstesten.

Abiotische stresstesten			
stress	soort test	Gebruikte lijnen	
Oxidatieve stress	Druppeltest met paraquat	OEX LSU1 16b, 22a en KD/ami LSU1 1.1-1, 2.6-3 KO LSU2 48C-2 KO LSU4 14C-5 Controle: Col-0	
Zout- en Osmotische stress	Kiemtest (NaCl en mannitol)	OEX LSU1 16b, 20j, 22a, KD/ami LSU1 1.1-1, 2.6-3 KO LSU2 48C-2 KO LSU4 14C-5 Controle: Col-0	
Pathogeentesten			
Pathogeen	stam/isolaat	Gebruikte lijnen	
<i>B. cinerea</i>	B05.10	Test 1	KO LSU2 48C-2 KO LSU4 14C-5 Controle: Col-0, Coi1-16
		Test 2	OEX LSU1 16b, 22a KD/ami LSU1 1.1-1 en 2.6-3 Controle: Col-0, Coi1-16
		Test 3	OEX LSU1 16b, 20j, 22a KD/ami LSU1 1.1-1 en 2.6-3 KO LSU2 48C-2 KO LSU4 14C-5 Controle: Col-0, Coi1-16
<i>P. syringae</i>	DC 3000	Test 1	OEX LSU1 16b, 20j, 22a KD/ami LSU1 1.1-1 en 2.6-3 Controle: Col-0, Coi1-16
		Test 2	KO LSU2 48C-2 KO LSU4 14C-5 Controle: Col-0, Coi1-16
<i>H. arabidopsidis</i>	Noks1	Test 1 en 2	OEX LSU1 16b, 20j, 22a KD/ami LSU1 1.1-1 en 2.6-3
	Emoy2	Test 1 en 2	KO LSU2 48C-2 KO LSU4 14C-5
	Cala2	Test 1	Controle: Col-0, Eds1

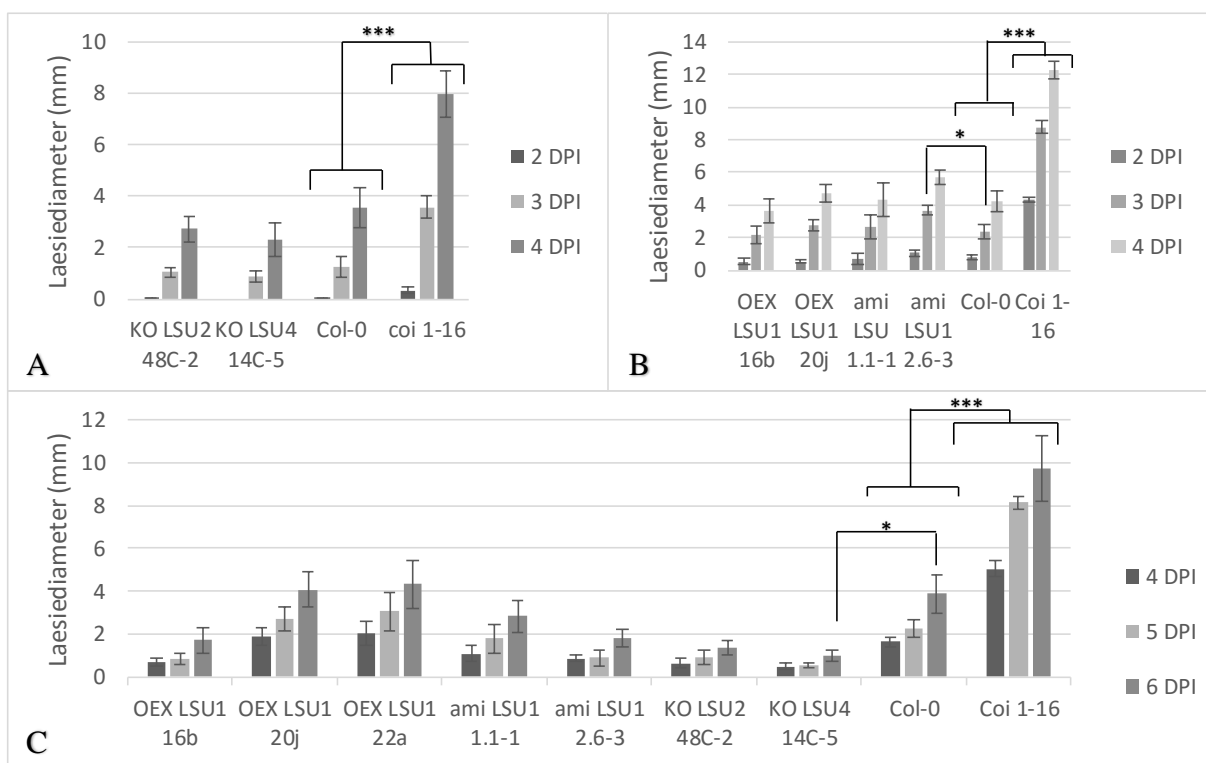
In het tweede luik van de fenotypische analyses werden de fenotypes van de verschillende LSU-lijnen bekeken nadat ze werden opgegroeid op standaard ½ MS-medium, zelfgemaakt ½ MS-medium, ½ MS-medium met verhoogde (3% en 6%) sucroseconcentraties en ½ MS-medium met verlaagd zwavelgehalte (Tabel 2).

4.3.2 Resultaten en bespreking

4.3.2.1 Fenotypering na biotische stress

Inoculatie met *Botrytis cinerea*

In Figuur 15 worden de resultaten weergegeven van drie *B. cinerea* infectietesten op de verschillende OEX-, KO- en KD/ami-lijnen. Elke LSU-lijn werd tweemaal getest.



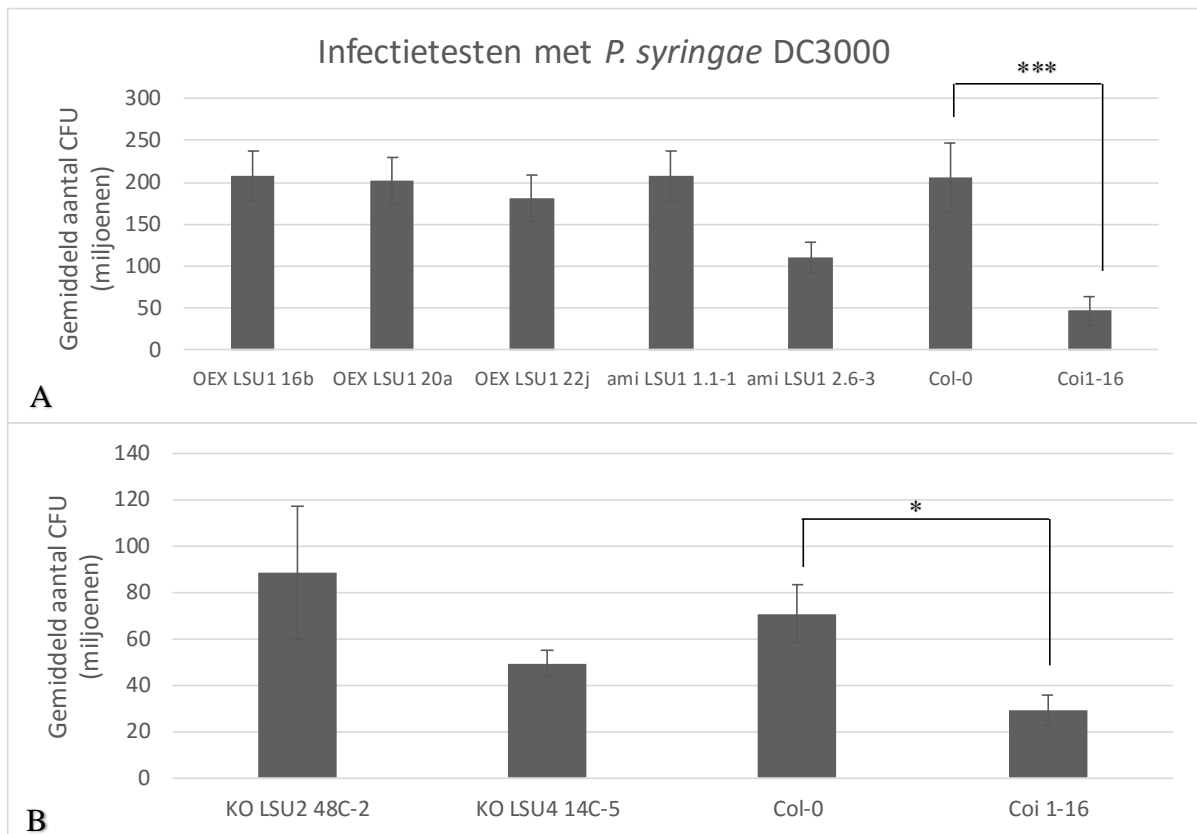
Figuur 15: Resultaat van de infectietesten met *B. cinerea* op verschillende OEX-, KD- en KO-lijnen van LSU1-4. A-C) Resultaten van respectievelijk de eerste, tweede en derde infectietest met *B. cinerea*. De hoogte van de balken geeft de gemiddelde laesiediameter ± standaarderror weer op verschillende dagen na inoculatie (DPI) met *B. cinerea* B05-10 (5 µl, 5.10⁴ sporen/ml). Er werden minimaal 16 planten per lijn gebruikt die op een leeftijd van 5 weken per vier over het benodigde aantal infectieboxen werden verdeeld. Er werd voor elk tijdstip een one-way ANOVA uitgevoerd waarbij de gemiddelde laesiediameter per plant voor elke lijn werd vergeleken met de wild-type lijn Col-0. Significantie wordt als volgt aangeduid: * als p ≤ 0.05, ** als p ≤ 0.01 en *** als p ≤ 0.001.

In de tweede infectietest komt de LSU1 KD/ami-lijn 2.6-3 naar voren als significant gevoeliger voor *B. cinerea* dan de wild-type lijn Col-0. Om dit duidelijker aan te tonen en ook omdat de LSU4 KO-lijn 14C-5 in de eerste infectietest een ietwat resistentere fenotype leek te vertonen, werd deze test herhaald. Opmerkelijk genoeg is er in de derde infectietest geen significant

verschil tussen de LSU1 KD/ami-lijn 2.6-3 en Col-0 en lijkt de lijn net resistenter. Er kon wel aangetoond worden dat de LSU4 KO-lijn 14C-5 in deze test resistenter is dan de wild-type lijn. Zowel in de eerste als de derde infectietest komt de LSU4 KO-lijn 14C-5 als resistenter naar voren, hoewel significantie enkel in de derde infectietest aangetoond kon worden en bovendien enkel op zes dagen na infectie. De resultaten voor de LSU1 KD/ami-lijn 2.6-3 uit de tweede en derde infectietest spreken elkaar echter tegen. Aangezien er vaak grote variatie optreedt bij pathogentesten, kan er op basis van deze resultaten moeilijk een uitspraak gedaan worden over de betrokkenheid van de LSU-peptiden in de afweerrespons op *B. cinerea*. Herhaalde infectietesten met deze pathogeen zijn noodzakelijk om duidelijkere conclusies te vormen.

Infiltratie met *Pseudomonas syringae*

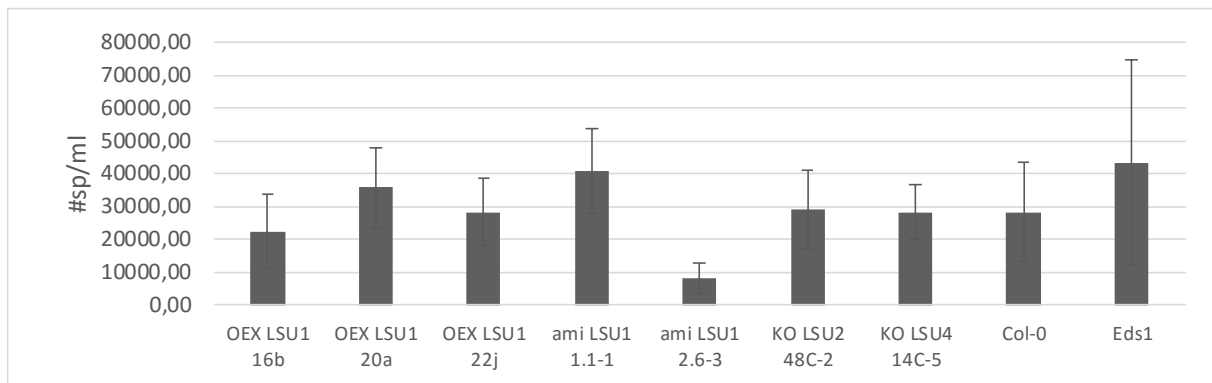
In Figuur 16 worden de resultaten weergegeven van de *P. syringae* infectietesten op verschillende OEX-, KO- en KD/ami-lijnen drie dagen na infectie. In een eerste test werden de LSU1 OEX en KD/ami-lijnen getest en in een tweede test werden de KO-lijnen van LSU2 en LSU4 getest (tabel 3). Het typische verloop van een *Pseudomonas*-infectie is een sterke toename van het gemiddeld aantal CFUs op 2 DPI (exponentiële groeifase), waarbij meestal weinig of geen verschil is te zien tussen de verschillende lijnen, gevolgd door een stabilisatie rond 3 DPI (stationaire fase) en een afname van het aantal CFU op 4 DPI (afstervingsfase). In de grafieken wordt telkens het aantal CFU weergegeven dat werd waargenomen op de derde dag na infiltratie (3 DPI). Op deze dag zijn de verschillen tussen de lijnen het best waarneembaar. In de eerste infectietest is er enkel een significant verschil tussen de wild-type lijn Col-0 en de negatieve controlelijn Coi1-16 (Figuur 16, A). De LSU1-lijnen vertonen geen significante verschillen met de wild-type lijn Col-0, hoewel er aanwijzing is dat de LSU1 KD/ami-lijn 2.6-3 resistenter is dan de wild-type lijn Col-0. Om het resistenter fenotype van de LSU1 KD/ami-lijn éénduidig na te gaan het nodig deze infectietest te herhalen, maar dit kon niet gebeuren binnen het tijdsverloop van deze thesis. Ook in de tweede infectietest met KO LSU2-lijn 48C-2 en de KO LSU4-lijn 14C-5 konden geen significante verschillen gevonden worden tussen de LSU-lijnen en de wild-type lijn Col-0, buiten de negatieve controlelijn Coi1-16 (Figuur 16, B). Dat de KO LSU2-lijn 48C-2 niet als significant gevoeliger naar voren komt ten opzichte van de wild-type lijn Col-0 is verrassend, aangezien het gevoelige fenotype van dezelfde LSU2 KO-lijn in de literatuur werd beschreven (Mukhtar et al. 2011). Het gevoelige fenotype van de LSU2 KO-lijn zoals beschreven in de literatuur kan hier dus niet bevestigd worden. Het is daarom aangewezen om deze test te herhalen aangezien dergelijke pathogentesten vaak onderworpen zijn aan sterke variaties in de resultaten.



Figuur 16: Resultaat van de infectietesten met *P. syringae* op OEX- en KD-lijnen van LSU1 (A) en KO-lijnen van LSU2 en LSU4 (B). De hoogte van de balken geeft het gemiddeld aantal CFU \pm standaarderror in de geïnfekteerde bladeren weer op 3 dagen na infectie (DPI) met *P. syringae* DC3000 (1.10^6 CFU/ml). Er werden ten minste 24 planten per lijn gebruikt die op een leeftijd van 5 weken per vier op willekeurige wijze over het benodigde aantal infectieboxen werden verdeeld. Elke dag na infiltratie werden 10 geïnfekteerde blaadjes per lijn verzameld, om in totaal 5 stalen per dag te bekomen. Er werd een one-way ANOVA uitgevoerd waarbij het gemiddeld aantal CFU van elke lijn vergeleken werd met het gemiddeld aantal CFU van de wild-type lijn Col-0. Significantie wordt als volgt aangeduid: * als $p \leq 0.05$, ** als $p \leq 0.01$ en *** als $p \leq 0.001$.

Infectie met *H. arabidopsidis*

In Figuur 17 worden de resultaten weergegeven van een van de twee infectietesten met het *H. arabidopsidis* Noks1-isolaat (gebruikt voor het nagaan van verhoogde resistentie). In beide testen heeft geen enkele lijn een significant verhoogde resistentie ten opzichte van de wild-type lijn Col-0. Hoewel de resultaten wel suggereren dat de LSU1 KD/ami-lijn 2.6-3, net als bij de infectietest met *P. syringae* (Figuur 16) resistenter is dan de wild-type lijn Col-0. De positieve Eds1 controlelijn is sterk geïnfecteerd, wat er op wijst dat de test goed is opgegaan. Het verschil met de wild-type lijn is echter niet significant, grotendeels veroorzaakt door de grote variatie op de metingen. In geen van de testen met de isolaten Cala2 en Emoy2 (gebruikt voor het nagaan van verhoogde gevoeligheid) werden significante verschillen gevonden tussen de LSU-lijnen en de wild-type lijn Col-0 (resultaten niet weergegeven). Ook hier is de controlelijn Eds1 telkens sterk geïnfecteerd, wat erop wijst dat de testen goed zijn opgegaan.



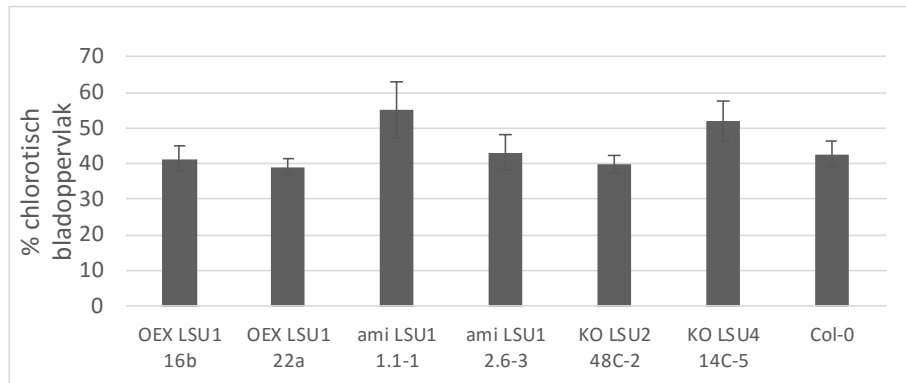
Figuur 17: Resultaat van de tweede infectietest met het infectieve Hpa-isolaat Noks1. De hoogte van de balken geeft het gemiddeld aantal sporen per ml \pm standaarderror weer verzameld in de 2 weken oude *A. thaliana* plantjes van verschillende LSU-lijnen na 1 week infectie met Hpa-isolaat Noks1 ($5 \cdot 10^4$ sporen/ml). De gemiddeldes werden berekend op basis van drie metingen met elk 15 plantjes. Er werd een one-way ANOVA uitgevoerd waarbij de gemiddeldes per lijn werden vergeleken met het gemiddelde van de wild-type lijn Col-0.

Het is ook hier opvallend dat niet kon bevestigd worden dat de LSU2 KO-lijn 48C-2 significant gevoeliger is dan de wild-type lijn Col-0. Het gevoeliger fenotype van dezelfde LSU2 KO-mutant werd in de literatuur beschreven (Mukhtar et al. 2011) en zou aanduiding geven aan de mogelijke rol van LSU2 in de afweerrespons tegen *H. arabidopsidis*. Bovendien konden geen significante verschillen aangetoond worden tussen de andere LSU-lijnen en de wild-type lijn Col-0. Op basis van deze observatie kan er geen link gevonden worden tussen de LSU-peptiden en de afweerrespons tegen deze pathogeen.

4.3.2.2 Fenotypering na abiotische stress

Paraquat

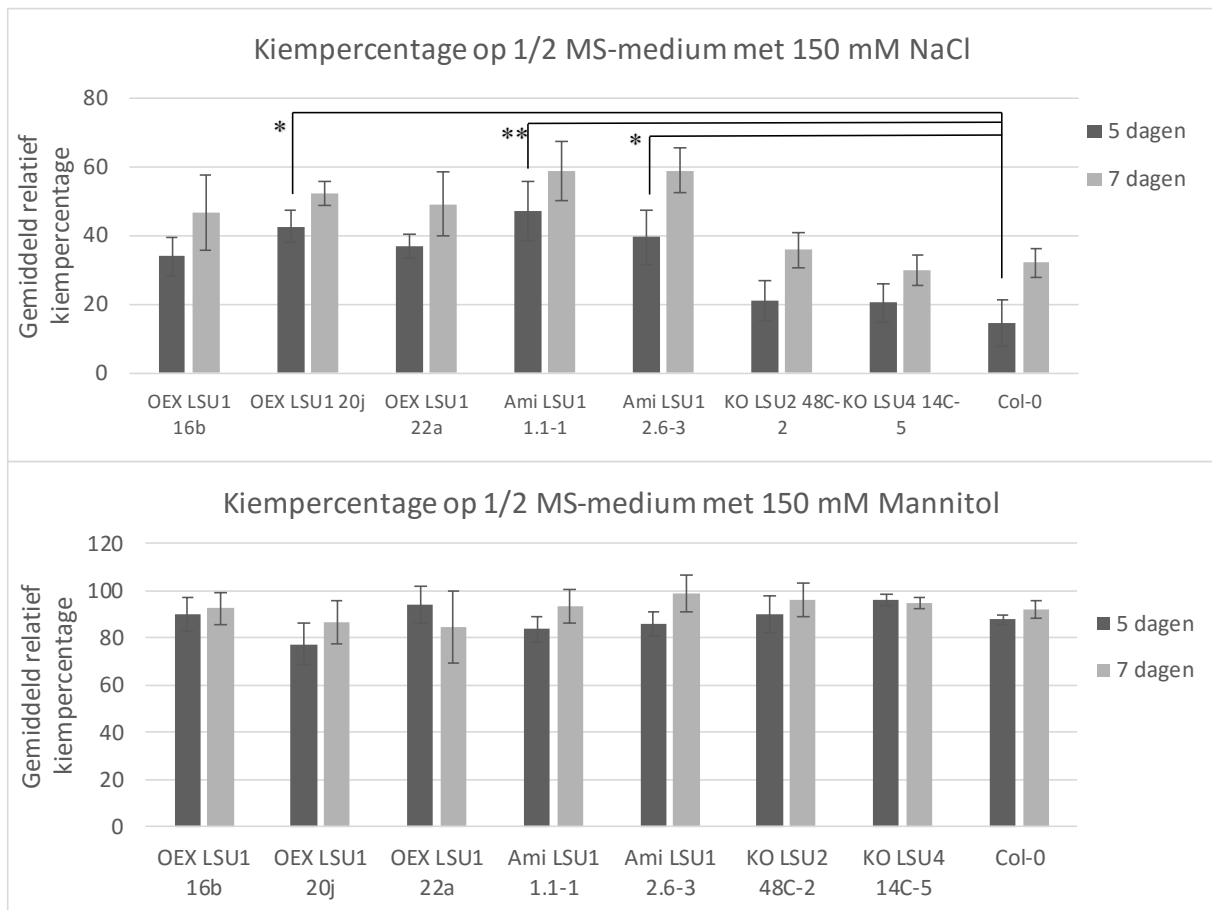
Het resultaat van de stresstest met paraquat bij de verschillende OEX-, KO- en KD/ami-lijnen wordt weergegeven in Figuur 18. Het schadebeeld op de planten was een volledige verbleking van de bladeren en werd gescoord aan de hand van het softwareprogramma *ASSESS 2.0 Image Analysis Software for Plant Disease Quantification*. Na verwerking met het programma is er geen significant verschil in percentage chlorotische bladoppervlakte waar te nemen tussen de LSU-lijnen en de wild-type Col-0 lijn. Echter, voor deze test werd een hoger dan normale concentratie aan paraquat toegediend aan de planten. Hierdoor trad zeer snel en hevig bladchlorose op over het volledige bladoppervlak van de plant. Bij dergelijk hoge concentraties is het te verwachten dat de stress op de planten zo hoog is, dat er moeilijk verschillen in gevoeligheid aangetoond kunnen worden tussen de verschillende plantenlijnen. Visueel lijken de planten van twee lijnen toch iets gevoeliger voor de paraquatbehandeling dan de andere lijnen, namelijk de KD/ami LSU1 1.1-1 en KO LSU4 14C-5 lijnen. Een herhaling van deze test met een lagere paraquatconcentratie zal in de toekomst gebeuren, om eventuele verschillen in gevoeligheid duidelijker te kunnen waarnemen.



Figuur 18: Stresstest met paraquat op verschillende OEX-, KD- en KO-lijnen van LSU1-4. De hoogte van de staven geeft het percentage chlorotisch bladoppervlak \pm standaarderror weer op 4 dagen na behandeling met paraquat (5 μ l druppel van een 40 mM oplossing op 4 blaadjes). Er werden 16 planten per lijn gebruikt die op een leeftijd van 5 weken per vier over de infectieboxen werden verdeeld. Er werd een one-way ANOVA uitgevoerd waarbij de gemiddelden per lijn werden vergeleken.

Kiemtest onder hoge zoutstress en osmotische stress

Het resultaat van de kiemtesten op $\frac{1}{2}$ MS-medium met 150 mM NaCl en 150 mM mannitol voor de verschillende OEX-, KO- en KD/ami-lijnen wordt weergegeven in Figuur 19. Na 5 dagen vertonen zowel de OEX- als de KD-lijnen van LSU1 een betere kieming dan de wild-type lijn Col-0 op het $\frac{1}{2}$ MS-medium met 150 mM NaCl. Maar deze betere kieming kon enkel voor de LSU1 OEX-lijn 20j, de LSU1 KD/ami lijn 1.1-1 en de LSU1 KD/ami-lijn 2.6-3 als significant aangetoond worden. Op 7 dagen na het uitzaaien zijn deze verschillen niet meer significant, wat erop kan wijzen dat de LSU1-lijnen een snellere kieming vertonen op het $\frac{1}{2}$ MS-medium met 150 mM NaCl, maar dat dit effect later vermindert en de kiemlingen van de wild-type lijn Col-0 hun achterstand enigszins kunnen inhalen. Op het $\frac{1}{2}$ MS-medium met 150 mM mannitol zijn er geen significante verschillen tussen de LSU-lijnen en de wild-type lijn Col-0. Dit kan erop wijzen dat de LSU-peptiden niet betrokken zijn bij de respons op osmotische stress, die ook een simulatie is voor droogtestress. De zoutstress daarentegen geeft naast osmotische stress ook stress als gevolg van de toxiciteit van voornamelijk de Na⁺-ionen (§2.4.3). Aangezien dit slechts éénmalige observaties zijn, is het aangewezen om deze kiemtest nog enkele keren te herhalen alvorens algemene conclusies te trekken uit de resultaten.

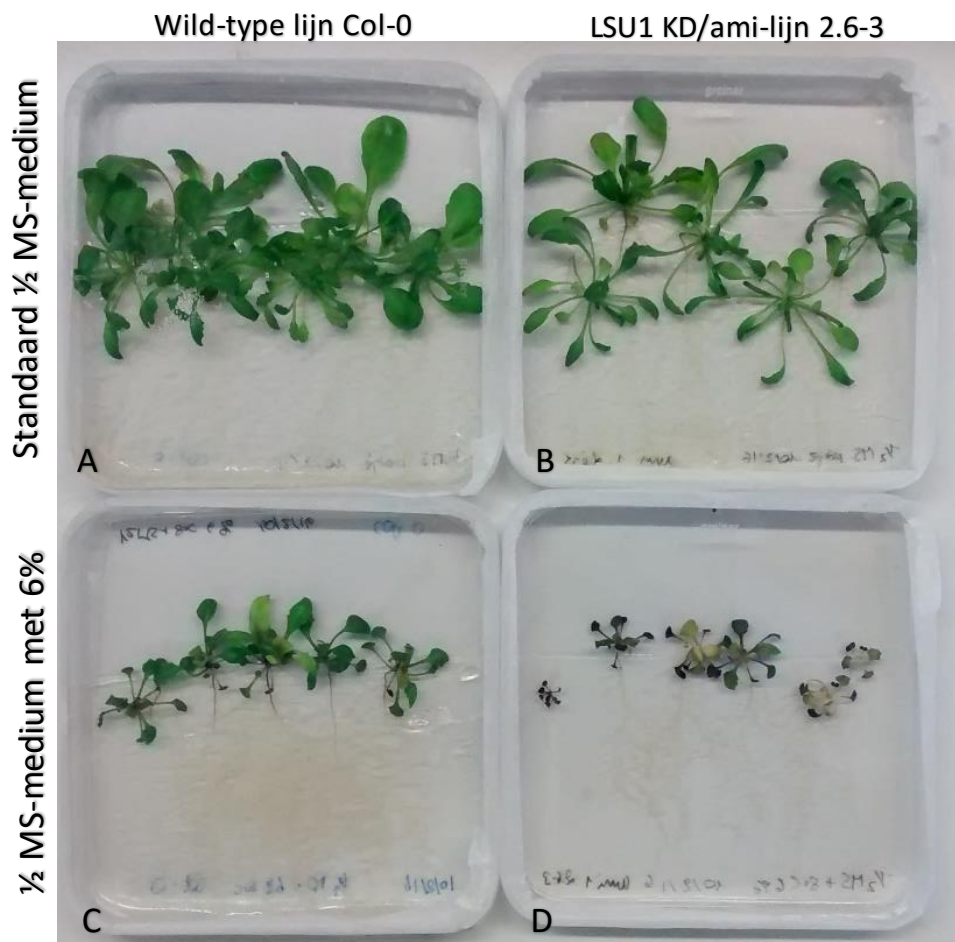


Figuur 19: Kiemtest met zoutstress en osmotische stress bij verschillende OEX-, KD- en KO-lijnen van LSU1-4. De hoogte van de balken geeft het relatief kiemperscentage weer \pm standaarderror op 5 dagen en 7 dagen na uitzaaien. De gemiddelde relatieve kiempersentages werden berekend aan de hand van 10 kiemplantjes per lijn op elk van de vijf kiemplaten van elk type $\frac{1}{2}$ MS-medium. Er werd een one-way ANOVA uitgevoerd waarbij de gemiddelde kiempersentages per lijn werden vergeleken ten opzichte van de wild-type lijn Col-0. Significantie wordt als volgt aangeduid: * als $p \leq 0.05$, ** als $p \leq 0.01$ en *** als $p \leq 0.001$

4.3.2.3 Fenotypering op verschillende $\frac{1}{2}$ MS-media

Planten die worden overgezet op $\frac{1}{2}$ MS-medium met verhoogd sucrose of verlaagd zwavelgehalte, ondervinden stress aan hun omgeving. De algemene stresssymptomen komen bij de planten op het $\frac{1}{2}$ MS-medium met 6% sucrose vanaf 3 weken tot uiting, onder de vorm van verminderde groei en anthocyaanproductie, terwijl de planten op $\frac{1}{2}$ MS-medium met verlaagd zwavelgehalte amper uiterlijke tekenen van stress vertonen, hoewel vaak een uitgebreidere wortelgroei wordt waargenomen. Enkel de LSU1 KD/ami-lijn 2.6-3 vertoont op het $\frac{1}{2}$ MS-medium met 6% sucrose een sterk afwijkend fenotype in vergelijking met de wild-type lijn Col-0 (Figuur 20). Vanaf week 2 op het $\frac{1}{2}$ MS-medium met 6% sucrose vertoont deze LSU1 KD-lijn een sterk vertraagde groei van wortels en bladeren en sterke paarsverkleuring in de bladeren als gevolg van verhoogde anthocyaanproductie. Daarnaast trad er na 5 weken ook bladsterfte op. De Col-0 planten op het $\frac{1}{2}$ MS-medium met 6% sucrose vertonen deze tekenen ook ten opzichte van de Col-0 planten op het standaard $\frac{1}{2}$ MS-medium, maar niet in dezelfde

mate als KD/ami LSU1 2.6-3. Deze sterk verhoogde gevoeligheid van de KD/ami-lijn LSU1 2.6-3 zou erop kunnen wijzen dat LSU1 op een of andere manier betrokken is bij de respons van de plant op hoge exogene sucroseconcentraties. Aangezien dit een eenmalige waarneming is, kan dit experiment best nog enkele malen herhaald worden voordat het resultaat veralgemeend kan worden.



Figuur 20: Vergelijking van de fenotypes van de wild-type lijn Col-0 en de KD/ami LSU1 2.6-3 na 5 weken op standaard $\frac{1}{2}$ MS-medium of $\frac{1}{2}$ MS-medium met 6% sucrose. Afbeeldingen A en B geven het fenotype weer van respectievelijk de wild-type lijn Col-0 en de KD/ami LSU1 2.6-3 lijn op het standaard $\frac{1}{2}$ MS-medium. Afbeeldingen C en D geven het fenotype weer van respectievelijk de wild-type lijn Col-0 en de KD/ami LSU1 2.6-3 lijn op het $\frac{1}{2}$ MS-medium met 6% sucrose. Er is een sterk verhoogde anthocyaanproductie en groeivertraging bij de KD/ami LSU1 2.6-3 op het $\frac{1}{2}$ MS-medium met 6% sucrose ten opzichte van de wild-type lijn Col-0 op hetzelfde medium.

5. Discussie

De *LSUs* werden initieel geïdentificeerd als genen die opgereguleerd worden bij zwaveltekorten, zowel in *A. thaliana* als in tabak (Maruyama- Nakashita et al., 2005). Een grote interactie studie op basis van *Yeast two-hybrid* (Y2H) wees nadien uit dat ze onderling en met een groot aantal andere *A. thaliana* proteïnen interageren en suggereerde hun mogelijke status als *hub*-proteïnen. Er werd voor de LSU-peptiden ook een mogelijke regulatorische rol voorgesteld in plantontwikkeling en de plantrespons op allerhande stressoren, zowel biotisch als abiotische (Sirko et al. 2014). Zo zouden de LSU-peptiden een doelwit zijn van effectoren van verschillende (hemi-)biotrofe plantpathogenen (Mukhtar et al. 2011) en werden ze in verband gebracht met signaaltransductiewegen in respons op de planthormonen ethyleen en brassinosteroiden (Moniuszko et al. 2013; Rybel et al. 2009). LSU2 KO-lijnen vertonen verschillende fenotypes, zoals een verhoogd chlorofylgehalte (Ruckle et al. 2012), een verhoogde tolerantie aan zoutstress (Luhua et al. 2013) en een verhoogde gevoeligheid aan *H. arabidopsidis* en *P. syringae* (Mukhtar et al. 2011), terwijl LSU4 KO-lijnen een verstoring van de vorming van bloemorganen vertonen (Myakushina et al. 2009). Daarnaast werd er aan het CMPG-PFI onderzoek gevoerd naar het LSU1-peptide, waarbij een mogelijke rol in de afweerrespons tegen *F. oxysporum* werd aangetoond via de interactie met een E3 ubiquitine ligase (Dang 2015). Maar de exacte functie van de LSU-peptiden in de plantstressrespons en hun precieze moleculaire functie is nog onbekend. Het doel van deze masterthesis was daarom om meer inzicht te krijgen in de functie van de vier LSU-peptiden in de modelplant *A. thaliana*.

5.1 De rol van de LSU-peptiden in *A. thaliana*

5.1.1 LSU-expressie is vasculair, stomataal en afwezig in worteltoppen

Uit de GUS-kleuringen blijkt over het algemeen een vasculaire expressie van de LSU-peptiden. De exacte locatie en intensiteit van de kleuring verschilt echter tussen de LSU-peptiden. LSU1 vertoont amper kleuring in de juveniele blaadjes en slechts zeer lichte kleuring in de eerste volwassen blaadjes. De wortels en stengel daarentegen zijn wel duidelijk gekleurd. Pas na 4 weken is er wel duidelijke expressie van LSU1 in de bladeren en dan hoofdzakelijk in de hoofdnerf. Dergelijke wijzigingen in de expressielokalisatie naargelang het ontwikkelingsstadium van de plant, kunnen belangrijke aanwijzingen naar de functie van LSU1. LSU2 en LSU3 komen beide sterk vasculair tot expressie in zowel bladeren, stengel en wortels. LSU2 komt over het algemeen het sterkst tot expressie zoals ook blijkt op basis van

gegevens van Genevestigator². LSU2 pGUS-plantjes vertonen vaak ook kleuring in het weefsel rond de vaatbundels, hoewel de meest intense kleuring toch steeds in de vaatbundels blijft voorkomen. LSU4 komt voornamelijk voor in de bloemen, dit is niet verwonderlijk aangezien verwacht wordt dat LSU4 een rol vervult in de bloemontwikkeling. LSU4 mutanten vertonen immers defecten in de bloemontwikkeling en gewijzigde expressie van verschillende belangrijke bloeigenen waaronder LEAFY (LFY) en APETALA1 (AP1) (Myakushina et al. 2009). De LSU-interactor GBFP vertoont een gelijkaardig expressiepatroon als de LSU-peptiden en zeker de sterke gelijkenis met LSU1 valt op. Deze gelijkenis in expressiepatroon is een extra aanwijzing dat GBFP interageert met de LSU-peptiden. Bovenstaande observaties vatten echter slechts de algemene trends samen voor het expressiepatroon van de LSU-peptiden. Het expressiepatroon kan tussen bladeren van dezelfde pGUS-lijn immers lichtjes variëren. Zoals reeds vermeld kan deze variabiliteit veroorzaakt worden door de inwerking van allerhande omgevingsfactoren die in de uitgevoerde experimenten niet gecontroleerd kunnen worden. Het is nog niet duidelijk welke omgevingsfactoren hier van belang zouden kunnen zijn, maar herhaling van deze GUS-kleuring zou meer duidelijkheid kunnen scheppen.

Uit de GUS-kleuring kan niet afgeleid worden of de vasculaire expressie zich voornamelijk voordoet in het xyleem, het floëem of beide. Het xyleem staat voornamelijk in voor het transport van water, nutriënten en mineralen uit de bodem, terwijl het floëem zorgt voor het transport van fotosyntheseproducten en nutriënten, maar ook van cellulaire componenten zoals aminozuren, proteïnen en signaalmoleculen zoals hormonen (Holbrook & Zwieniecki 2011). Het antwoord op de vraag of de LSU-peptiden voornamelijk in het floëem of het xyleem tot expressie komen, zou een extra aanwijzing kunnen zijn naar de moleculaire functie van de LSU-peptiden in de plant. Om deze reden zal de expressielokalisatie in meer detail onderzocht worden, onder andere door dwarsdoorsneden te maken van de *A. thaliana* wortel na GUS-kleuring om na te gaan of de vasculaire LSU-expressie zich enkel in het floëem of het xyleem bevindt.

Er werd naast vasculaire expressie ook expressie in de sluitcellen van de stomata opgemerkt in de 2-weken oude LSU pGUS-plantjes, maar niet bij de GBFP pGUS-plantjes. Deze stomatale expressie was het duidelijkst op te merken in de LSU1 pGUS-lijn LSU1.4, maar werd later in mindere mate ook bij alle andere LSU pGUS-lijnen opgemerkt. Stomata zijn belangrijke spelers in de regulatie van de transpiratiesnelheid in de plant: des te meer ze geopend zijn, des te gemakkelijker een plant water kan verdampen. De hydratatiestatus van de sluitcellen bepaalt in welke mate de stomata geopend zijn en wordt voornamelijk via osmose gestuurd. Deze

² www.genevestigator.be

osmoregulatie gebeurt voornamelijk via het planthormoon ABA dat het sluiten van de stomata induceert en het openen van de stomata verhindert (Li 2000). De sluitcellen nemen water op via de uitwisseling van ionen (K⁺, Cl⁻ en malaat), maar ook andere componenten zoals sucrose zijn betrokken bij dit proces (Kelly et al. 2013). De expressie van de LSU-peptiden in de stomata zou erop kunnen wijzen dat ze op een of andere manier betrokken zijn in het functioneren van dit hydratatie-dehydratatie proces in de sluitcellen.

Ten slotte werd opgemerkt dat geen van de LSU-peptiden tot expressie komt in de worteltoppen. Deze observatie suggereert dat de LSU-peptiden enkel in matuur en niet in juveniel, nog ongedifferentieerd vasculair weefsel tot expressie komen. Daar de opname van water en nutriënten bijna uitsluitend gebeurt in de worteltoppen, zou de consequente afwezigheid van LSU-expressie in de worteltoppen erop kunnen wijzen dat ze eerder betrokken zijn in transportmechanismen van nutriënten naar de scheut of redistributiemechanismen van fotosyntheseproducten via het floëem dan in de nutriëntopname zelf. Hier is echter nog grote onduidelijkheid over.

5.1.2 De LSU-peptiden reageren op hoge sucroseconcentraties

Uit de genexpressieanalyses en pGUS analyses blijkt dat LSU1 en LSU3 verhoogd tot expressie komen in de gehele plant en in het bijzonder in de wortels na minimaal 2 weken op ½ MS-medium met 6% sucrose. *LSU2* en *LSU4* kwamen ook verhoogd tot expressie in respons op de verhoogde sucroseconcentraties maar in mindere mate dan LSU1 en LSU3. Daarnaast vertoonde de LSU1 ami-lijn 2.6-3, waarin het LSU1-gen verminderd tot expressie komt, reeds na 3 weken een veel sterkere groeibeperking en anthocyaanproductie op het ½ MS-medium met 6% sucrose dan de wild-type lijn Col-0. Het is bekend dat sucrose in de plant een functie vervult als signaalmolecule en ook essentiële genen, die betrokken zijn in de anthocyaanbiosynthese verhoogd tot expressie brengt (Solfanelli et al. 2006). Een sterk verhoogde endogene sucroseconcentratie leidt tot verhoogde anthocyaanproductie (Van den Ende & El-ESawe 2014). De energie die verbruikt wordt ter productie van anthocyanen, kan niet meer gebruikt worden voor groei, wat gedeeltelijk de groei-inhibitie kan verklaren. De LSU1-promotor bevat bovendien cis-elementen die gerelateerd zijn aan dehydratie en sucrose (Sirko et al. 2014). Deze resultaten suggereren een rol voor LSU1 in de regulatie van de endogene sucrosehomeostase (§5.2.2).

5.1.3 De rol van LSU-peptiden in de plantstressrespons kan niet bevestigd worden

De infectietesten met *P. syringae* en *H. arabidopsidis* werden uitgevoerd omdat er aanwijzingen waren dat de LSU-genen en voornamelijk LSU2 betrokken zouden zijn in de afweer tegen deze pathogenen. Het fenotype van LSU2 KO-lijnen (SALK_070105 en SALK_031648C) werd reeds beschreven als gevoeliger voor infectie met *P. syringae* DC3000 en *H. arabidopsidis* isolaten Emwa1 en Emoy2 (Mukhtar et al. 2011). LSU2 werd beschreven als een essentieel peptide voor een volledig functionerende immuunrespons tijdens *P. syringae* en *H. arabidopsidis* infectie (Mukhtar et al. 2011). Gedurende deze thesis kon echter noch in *Psy*-infectietesten, noch in de *Hpa*-infectietesten een significant gevoeliger fenotype voor diezelfde LSU2-mutant aangetoond worden. Ook de andere geteste LSU-lijnen, namelijk de OEX- en KD-lijnen van LSU1 en de KO-lijn van LSU4 vertoonden geen eenduidig gevoeliger of resistentere fenotypes na infectie met deze pathogenen. Er werden wel twee LSU-lijnen vastgesteld met gewijzigde gevoeligheid voor *B. cinerea*, namelijk LSU1 KD/ami 2.6-3 (gevoeliger) en KO LSU4 14C-5 (resistentier). De resultaten voor LSU1 KD/ami 2.6-3 in deze pathogentest lijken elkaar echter tegen te spreken, wat mogelijk te maken heeft met de grote variatie die eigen is aan dergelijke pathogentesten. Het resistente fenotype van de LSU4 KO-lijn 14C-5 kan een aanwijzing zijn voor de betrokkenheid van de LSU-peptiden in de afweerrespons op *B. cinerea*. Herhaalde experimenten met deze pathogeen moeten echter uitwijzen of de gewijzigde fenotypes van deze LSU-lijnen consequent blijven voorkomen in toekomstige experimenten.

Om de mogelijke betrokkenheid van de LSU-peptiden te controleren in de plantrespons op abiotische stress werden de LSU-lijnen enerzijds blootgesteld aan het herbicide paraquat. Uit de resultaten van deze test konden geen resistentere of gevoeliger lijnen geïdentificeerd worden in vergelijking met het wild-type. De uitvoering van deze test was echter niet optimaal en de test moet herhaald worden met een lagere paraquat concentratie om beter te kunnen nagaan of er verschillen zijn tussen wild-type en LSU-lijnen in de respons op paraquat. Anderzijds werden ook kiemtesten uitgevoerd op $\frac{1}{2}$ MS-medium met 150 mM NaCl. Hier leken zowel de LSU1 KD/ami-lijnen als één van de LSU1 OEX-lijnen significant beter te kiemen dan de wild-type lijn Col-0. Ook de andere LSU1 OEX-lijnen kiemden beter dan de wild-type lijn Col-0, maar hier kon geen significant verschil aangetoond worden. Dat de LSU1 KD/ami-lijnen en één LSU1 OEX-lijn een zelfde fenotype vertonen is opvallend. Een mogelijke verklaring is dat er een bepaalde optimale expressie van LSU1 nodig is in de regulatie van de respons van

de plant op NaCl en dat zowel overexpressie als *knock-down* een gelijkaardig effect tot gevolg hebben. Omdat LSU1 met zoveel componenten interageert is het moeilijk om een eenduidige verklaring voorop te stellen. Het zou interessant zijn om deze kiemtest te herhalen en te kijken of de LSU1-lijnen inderdaad steeds beter bestand zijn tegen hoge NaCl-concentraties tijdens het kiemproces.

Ten slotte werd de LSU1 KD/ami-lijn 2.6-3 tijdens de stresstesten opgemerkt als een interessante lijn. Hoewel er geen significantie aangetoond kon worden, leek deze LSU1 KD/ami-lijn in de *H. arabidopsidis* en *P. syringae* pathogentesten steeds resistenter te zijn voor infectie dan de wild-type lijn Col-0. In de *B. cinerea* werd eenmalig een significant gevoeliger fenotype voor de lijn waargenomen. Ook in de kiemtest op ½ MS-medium met 150 mM NaCl, kwam deze lijn significant resistenter naar voren. In de fenotypische analyse daarentegen vertoonde deze lijn een verhoogde gevoeligheid voor hoge sucroseconcentraties in het medium ten opzichte van de Col-0. Om deze redenen is het interessant om met LSU1 KD/ami 2.6-3 verder te werken en om bovenstaande experimenten met pathogenen en abiotische stress te herhalen om meer inzicht te krijgen in de rol van LSU1 in de plantrespons.

5.2 Hypothesen naar de moleculaire functie van de LSU-peptiden

5.2.1 Hypothese 1: LSU-peptiden zijn betrokken bij autofagie

Autofagie is een zeer selectief proces dat instaat voor het verwijderen van beschadigde of overbodige celorganellen en macromoleculen, maar is ook een regulatiemechanisme voor geprogrammeerde celdood in respons op pathogenen (Hayward & Dinesh-Kumar 2011). Verder treedt autofagie ook op als een algemene respons op verschillende abiotische stressoren, waaronder nutriëntentekorten en oxidatieve stress. Het autofagieproces wordt gereguleerd via hormonen zoals ABA en cytokinines; en via signaaltransductiewegen die de energetische en nutritionele status van de cel interpreteren. Mutanten waarin autofagie in zekere mate verhinderd wordt, zijn niet in staat om bepaalde nutriëntdeficiënties te overleven (Hanaoka et al. 2002). Een mogelijke verklaring hiervoor is dat autofagie bijdraagt aan een efficiëntere recyclage van afvalstromen in de cel waardoor blootstelling aan nutriëntentekorten of bepaalde stressoren beter verdragen wordt (Zientara-Rytter et al. 2011).

Een belangrijk proteïne dat betrokken is bij autofagie in tabak is Joka2. Recent werd aangetoond dat *Joka2* verhoogd tot expressie komt in de plantwortels na blootstelling aan stikstof- en zwaveltekorten en werd er via Y2H een interactie gevonden met UP9C, het LSU-homoloog in tabak (Zientara-Rytter et al. 2011). UP9C komt net als de LSU-peptiden verhoogd tot expressie

na blootstelling aan zwaveltekorten en blijkt een essentiële component te zijn voor de geschikte respons op zwaveltekorten in de plant (Lewandowska et al. 2010). Op basis van deze resultaten werd gesuggereerd dat de UP9/LSU-like proteïnen in respons op zwaveltekort selectieve proteïnedegradatie zouden kunnen opstarten via autofagie (Zientara-Rytter et al. 2011).

Een andere aanwijzing dat LSU-peptiden betrokken zijn bij autofagieprocessen is de drievoudige interactie van GBFP met LSU1, LSU2 en LSU3 (ongepubliceerde data). De exacte functie van GBFP in *A. thaliana* is nog onbekend, maar zou analoog kunnen zijn aan de overeenkomstige GBPs in de mens. GBPs behoren tot de GTPase familie, die geïnduceerd kunnen worden door het interferon (IFN)-gamma en een rol spelen in de immuunrespons tegen intracellulaire pathogenen (Dupont & Hunter 2012). Een uitschakeling van GBP-genen in muizen veroorzaakt verhoogde gevoeligheid tegen pathogenen waaronder *Listeria monocytogenes* (Kim et al. 2011). De verklaring voor deze verhoogde gevoeligheid is de mogelijke rol van GBPs in het transporteren van antimicrobiële peptiden, componenten betrokken bij autofagie en componenten van het NADPH oxidase naar fagosomen die bacteriën bevatten met als doel het controleren van de bacteriële infectie (Dupont & Hunter 2012). Indien GBFP in *A. thaliana* gelijkaardige functies uitoefent, kan dit een aanwijzing zijn dat de LSU-peptiden die met dit GBFP interageren ook een rol spelen bij het autofagieproces en op die manier betrokken zijn in de plantafweer tegen intracellulaire pathogenen.

Ten slotte is autofagie een proces dat plaatsvindt in het cytoplasma. Hier werden ook de LSU-peptiden gelokaliseerd aan de hand van GFP-fluorescentiemicroscopie. Bovendien bevinden verschillende LSU-interactoren zich in de chloroplasten en omdat chloroplasten voornamelijk via autofagie afgebroken worden, zou ook hier een mogelijke link te vinden zijn tussen de LSU-peptiden en autofagie.

5.2.2 Hypothese 2: LSU-peptiden zijn betrokken bij sucrosehomeostase

Sucrose is de belangrijkste transportsuiker in de meeste planten, waaronder *A. thaliana*, omwille van de stabiele conformatie en wordt getransporteerd via het floëem vanuit de bladeren naar de plant *sinks* (Lemoine et al. 2013). Toch zijn er meer en meer aanwijzingen dat sucrose niet alleen dienst doet als transportsuiker, maar ook fungeert als signaalmolecule dat via de regulatie van specifieke genen betrokken is bij allerlei cellulaire processen waarvan de inductie van fructaan en anthocyaansynthese de best gekende zijn (Tognetti et al. 2013; Van den Ende & El-Esawe 2014). In tegenstelling tot glucose, dat een rol speelt bij de expansie van nieuw-gedeelde cellen en als signaalmolecule tijdens de vroege stadia van plantorgaanontwikkeling, vervult sucrose eerder een rol in de regulatie van functies in mature

plantorganen (Tognetti et al. 2013). De exacte mechanismen waarmee sucrose inspeelt op cellulaire processen is echter nog grotendeels onbekend. Om deze reden is het ook moeilijk om een eenduidig verband te vinden met de mogelijke rol die LSU-peptiden spelen.

Zoals eerder besproken komen *LSU1* en *LSU3* verhoogd tot expressie in planten na twee weken op ½ MS-medium met 6% sucrose (§4.2.2.1) en bevat de promotorregio van *LSU1* een cis-element dat betrokken is bij de respons op sucrose (Sirko et al. 2014). Verder lijkt de *LSU1* KD/ami-lijn 2.6-3 veel gevoeliger voor verhoogde exogene sucroseconcentraties dan de wild-type lijn (§4.3.2.3). Deze observaties doen vermoeden dat het *LSU1*-peptide betrokken zou kunnen zijn in de regulatie van de endogene sucrosehomeostase. Een mogelijke hypothese is dat *LSU1* betrokken is bij de omzetting van sucrose tot zetmeel in de chloroplasten. Verschillende interactoren van de LSU-peptiden worden immers gesitueerd in de chloroplasten. Dat de verhoogde LSU-genexpressie pas na 2 weken optreedt, zou kunnen suggereren dat de LSU-peptiden werken als een noodmechanisme wanneer stress ten gevolge van hoge exogene sucroseconcentraties langdurig optreedt en andere mechanismen niet meer voldoende zijn om de sucrosehomeostase te behouden. Anderzijds kan de endogene sucroseconcentratie eveneens gereguleerd worden via de controle van floëmbelading of ontlading. Het transport van sucrose in het floëem gebeurt aan de hand van gespecialiseerde *sucrose carriers* zoals bijvoorbeeld *Sucrose Transporter 1* (*SUT1*) in tabak (Lalonde 1999). Dit transport wordt sterk gereguleerd en LSU-peptiden zouden dus ook op deze manier betrokken kunnen zijn bij de regulatie van de sucrosehomeostase gezien hun expressielokalisatie in het vasculair weefsel.

5.3 Toekomstperspectieven

De voorgestelde hypothesen zijn gebaseerd op de huidige kennis uit de literatuur en de resultaten van de uitgevoerde experimenten in deze thesis. Het is nodig om bepaalde experimenten te herhalen en om nieuwe experimenten uit te voeren opdat deze hypothesen verbeterd of verworpen kunnen worden.

Het zou interessant zijn om in een nieuw experiment na te gaan of de vasculaire expressie van de LSU-peptiden zich voornamelijk in het xyleem of het floëem bevindt. Hiervoor kunnen gekleurde pGUS-planten in meer detail onder de microscoop bekeken worden, of er kunnen dwarsdoorsneden van het wortelweefsel gemaakt worden die in detail onder de microscoop bekeken kunnen worden. De subcellulaire lokalisatie van de LSU-peptiden aan de hand van de visualisatie van GFP-fusieconstructen zal herhaald worden na blootstelling van de protoplasten aan allerlei stressoren zoals verhoogde sucroseconcentraties en flagelline om na te gaan of de subcellulaire lokalisatie in respons op deze stressoren wijzigt. Ter controle van de resultaten

uit de GFP-microscopie zullen LSU-GFP fusieconstructen ook transiënt tot expressie worden gebracht in tabak. Indien gelijkaardige resultaten bekomen worden als in *A. thaliana*, namelijk lokalisatie in de kern en het cytoplasma, kunnen deze resultaten met meer zekerheid geïnterpreteerd worden. Daarnaast moet als controle ook de lokalisatie nagegaan worden van het GFP-proteïne, aangezien de LSU-peptiden zo klein zijn, is het mogelijk dat hun lokalisatie wijzigt als gevolg van de aanhechting aan het merker-molecule. Doordat het GFP-molecule drie maal groter is dan het LSU-peptide, zou het ook kunnen dat het kleine LSU-peptide meegevoerd wordt naar die plaatsen in de cel waar het GFP alleen ook naartoe zou diffunderen, nl. de kern.

Nu duidelijk is geworden dat LSU1 en LSU3 verhoogd tot expressie komen na blootstelling aan hoge exogene sucroseconcentraties, zou het interessant zijn om naar de genexpressie te kijken in respons op andere stressoren, bijvoorbeeld verhoogde NaCl concentraties in het medium of verhoogde concentraties van andere suikers zoals glucose en mannitol om na te gaan of de verhoogde expressie sucrose-specifiek is. De resultaten uit deze genexpressieanalyses zouden dan vergeleken kunnen worden met de resultaten uit de kiemtesten op ½ MS-medium met 150 mM NaCl. Ook zal de expressieanalyse op planten, die blootgesteld worden aan zwaveltekorten herhaald worden, maar deze keer enkel aan de hand van wortelweefsel. Het doel is om te bevestigen dat de verhoogde expressie in respons op zwaveltekorten enkel optreedt in de wortels, zoals beschreven in de literatuur (Sirko et al. 2014) en voorspeld in (§4.2.2.1).

Omdat infectietesten met pathogenen onderworpen zijn aan een heel aantal externe variabelen, is het nodig deze verschillende malen te herhalen. Vooral de infectietesten met *B. cinerea* zouden herhaald moeten worden aangezien de resultaten voor de interessante LSU1 KD/ami-lijn elkaar lijken tegen te spreken. Bovendien komt LSU4 KO-lijn 14C-5 als significant resistenter naar voren in één van de infectietesten. Dit zijn aanwijzingen dat de LSU-peptiden betrokken zouden kunnen zijn bij de afweerrespons op *B. cinerea*, maar herhaalde metingen zijn nodig om hier meer duidelijkheid over te geven. Ook de *P. syringae*-infiltratietesten en de *H. arabidopsidis* infectietesten moeten herhaald worden. In deze testen vertoont de LSU2 KO-lijn geen significant gevoeliger fenotype zoals beschreven in de literatuur (Mukhtar et al. 2011). Bovendien lijkt de LSU1 KD/ami-lijn 2.6-3 in beide pathogentesten toch een resistenter fenotype te vertonen. Maar de significantie hiervan kon nog niet worden aangetoond. Daarnaast kunnen ook nieuwe infectietesten uitgevoerd worden met andere pathogenen, bijvoorbeeld met de wortelpathogeen *F. oxysporum*. Voorgaand onderzoek suggereerde immers een mogelijke betrokkenheid van de LSU-peptiden in de immunrespons tegen deze pathogeen (Dang 2015).

Interessante resultaten zouden ook kunnen komen uit de herhaling van de abiotische stresstest met paraquat. Deze test werd in deze thesis met een hogere concentratie paraquat dan normaal uitgevoerd, waardoor er moeilijker verschillen tussen de lijnen konden waargenomen worden. Een herhaling van deze test met lagere concentraties, zou eventueel toch significant gevoeliger of resistentere lijnen kunnen aantonen. In de kiemtest op ½ MS-medium met 150 mM NaCl kiemden de twee KD-lijnen en één van de OEX-lijnen van LSU1 significant beter dan de wild-type lijn. Herhaling van deze test is echter nodig om dit resultaat te bevestigen.

5.4 Conclusie

Via GUS-kleuring van pGUS-lijnen werd vasculaire expressie van de LSU-peptiden en de expressie in de stomata en systematische afwezigheid van expressie in de worteltoppen aangetoond. Het expressiepatroon van de LSU-interactor *GBFP* is zeer gelijkend aan dat van LSU1, wat de veronderstelling ondersteunt dat GBFP een belangrijke interactor is. De interactie tussen de LSU-peptiden en GBFP is onder meer een aanwijzing voor de mogelijke betrokkenheid van de LSU-peptiden in autofagieprocessen in de cel, naast de interactie tussen de UP9C, de LSU-homoloog in tabak en Joka2, een proteïne dat een belangrijke rol speelt in autofagie. GFP-fluorescentiemicroscopie toont lokalisatie in cytoplasma en kern voor LSU2-4, overeenkomstig met wat reeds werd aangetoond voor LSU1. Via qRT-PCR genexpressieanalyses werd aangetoond dat *LSU1* en *LSU3* verhoogd tot expressie komen na minimum 2 weken blootstelling aan hoge exogene sucroseconcentraties. Dit resultaat is een eerste aanwijzing dat sommige LSU-peptiden betrokken zouden kunnen zijn in de regulatie van de sucrosehomeostase. De resultaten uit deze genexpressieanalyse werden bevestigd in de GUS-tijdsreeks, waar voornamelijk de wortels intensiever kleurden na twee weken op het ½ MS-medium met 6% sucrose. De verhoogde *LSU*-expressie bij zwaveltekorten kon niet aangetoond worden, vermoedelijk omdat de expressie specifiek in de wortels verhoogd wordt. Er werd van twee lijnen een significant gewijzigde gevoeligheid vastgesteld na infectietesten met *B. cinerea* (LSU1 KD/ami 2.6-3 en LSU4 KO 14C-5), maar geen bij *P. syringae* en *H. arabidopsidis* of na de druppeltest met paraquat. In de kiemtesten op ½ MS-medium met 150 mM NaCl kiemden de LSU1 KD-lijnen en één LSU1 OEX-lijn significant beter dan de wild-type lijn. De rol van de LSU-peptiden in de plantafweerrespons kon op basis van deze resultaten niet bevestigd worden. Herhaling van deze biotische en abiotische stresstesten is nodig om de hier verkregen resultaten te valideren. Tenslotte werd in de fenotypische analyse een sterk verhoogde gevoeligheid waargenomen van de LSU1 KD/ami-lijn 2.6-3 bij blootstelling aan hoge concentraties (6%) sucrose in het medium. Hoewel deze test nog herhaald moet worden

om deze observatie te bevestigen, geeft het een derde aanwijzing dat LSU1 en eventueel de andere LSU-peptiden betrokken zijn in de sucrosehomeostase in *A. thaliana*. Verder onderzoek zal het inzicht in de moleculaire functie van de LSU-peptiden verbeteren en uitwijzen of de hier vooropgestelde hypothesen bevestigd kunnen worden.

Referentielijst

- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C. & Martin, G.B., 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(8), pp.601–11.
- Achuo, E.A. et al., 2004. The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Pathology*, 53(1), pp.65–72.
- Agrios, G., 2012. *Plant Pathology*, Elsevier.
- Albert, R., 2005. Scale-free networks in cell biology. *Journal of cell science*, 118(Pt 21), pp.4947–57.
- Albert, R., Jeong, H. & Barabasi, A., 2000. Error and attack tolerance of complex networks. *Nature*, 406(6794), pp.378–82.
- Anand, A. et al., 2007. Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance Play a Role in Attenuating Crown Gall Disease Caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *PLANT PHYSIOLOGY*, 146(2), pp.703–715.
- Andorf, C.M., Honavar, V. & Sen, T.Z., 2013. Predicting the binding patterns of hub proteins: a study using yeast protein interaction networks. *PLoS one*, 8(2), p.e56833.
- Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011. Evidence for network evolution in an Arabidopsis interactome map. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6042), pp.601–7.
- Ben Arfa, A. et al., 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), pp.149–154.
- Aroca, R., 2012. *Plant Responses to Drought Stress: From Morphological to Molecular Features*, Springer Science & Business Media.
- Ashraf, M., 2010. Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology advances*, 28(1), pp.169–83.
- Bakshi, A. et al., 2015. History of Research on the Plant Hormone Ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(4), pp.809–827.
- Ballaré, C.L., 2011. Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends in plant science*, 16(5), pp.249–57.
- Bano, A. et al., 1994. Changes in the contents of free and conjugated abscisic acid, phaseic acid and cytokinins in xylem sap of drought stressed sunflower plants. *Phytochemistry*, 37(2), pp.345–347.
- Bari, 2008. Role of plant hormones in plant defence responses. Available at: file:///C:/Users/Hanne Claessen/Downloads/Bari & Jones 2009 (1).pdf [Accessed September 16, 2015].
- Bari, R. & Jones, J.D.G., 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant molecular biology*, 69(4), pp.473–88.
- Baxter, A., Mittler, R. & Suzuki, N., 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of experimental botany*, 65(5), pp.1229–40.
- Berr, A. et al., 2010. Arabidopsis histone methyltransferase SET DOMAIN GROUP8 mediates induction of the jasmonate/ethylene pathway genes in plant defense response to necrotrophic fungi. *Plant physiology*, 154(3), pp.1403–14.
- Birch, P.R.J. et al., 2006. Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends in microbiology*, 14(1), pp.8–11.
- Boudsocq, M. & Sheen, J., 2013. CDPKs in immune and stress signaling. *Trends in plant science*, 18(1), pp.30–40.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. & Strelkov, S. V., 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends in Cell Biology*, 11(2), pp.82–88.
- Callaway, D.S. et al., 2000. Network robustness and fragility: percolation on random graphs. *Physical review letters*, 85(25), pp.5468–71.
- Caruso, F. et al., 2011. Antifungal activity of resveratrol against *Botrytis cinerea* is improved using 2-furyl derivatives. *PLoS one*, 6(10), p.e25421.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P. & Pereira, J.S., 2003. Understanding plant responses to drought — from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30(3), p.239.
- Chen, Z. et al., 2009. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant signaling & behavior*, 4(6), pp.493–6.
- Chinchilla, D. et al., 2007. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448(7152), pp.497–500.
- Chisholm, S.T. et al., 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), pp.803–14.
- Cohen, R. et al., 2001. Breakdown of the Internet under Intentional Attack. *Physical Review Letters*, 86(16), pp.3682–3685.
- Cohen, R. et al., 2000. Resilience of the Internet to Random Breakdowns. *Physical Review Letters*, 85(21), pp.4626–4628.
- Creelman, R.A. & Mullet, J.E., 1997. BIOSYNTHESIS AND ACTION OF JASMONATES IN PLANTS. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 48, pp.355–381.
- Cui, H. et al., 2010. *Pseudomonas syringae* effector protein AvrB perturbs Arabidopsis hormone signaling by activating MAP kinase 4. *Cell host & microbe*, 7(2), pp.164–75.
- Dang, T.V.T., 2015. *Exploring the potential of a newly discovered Arabidopsis gene as a molecular trait in banana for increasing resistance against fungal diseases*.
- Daryanto, S., Wang, L. & Jacinthe, P.-A., 2015. Global Synthesis of Drought Effects on Food Legume Production. *PLoS one*,

- 10(6), p.e0127401.
- Davenport, R. et al., 2005. Control of sodium transport in durum wheat. *Plant physiology*, 137(3), pp.807–18.
- Denancé, N. et al., 2013. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in plant science*, 4, p.155.
- Djamei, A. et al., 2007. Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5849), pp.453–6.
- Dodds, P.N. & Rathjen, J.P., 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature reviews. Genetics*, 11(8), pp.539–48.
- Dombrecht, B. et al., 2007. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 19(7), pp.2225–45.
- Dong, X., 2004. NPR1, all things considered. *Current opinion in plant biology*, 7(5), pp.547–52.
- Dunlop, J. & Gradiner, S., 1993. Phosphate Uptake, Proton Extrusion and Membrane Electropotentials of Phosphorus-Deficient *Trifolium repens* L. *Journal of Experimental Botany*, 44(12), pp.1801–1808.
- Dupont, C.D. & Hunter, C.A., 2012. Guanylate-binding proteins: niche recruiters for antimicrobial effectors. *Immunity*, 37(2), pp.191–3.
- Ekman, D. et al., 2006. What properties characterize the hub proteins of the protein-protein interaction network of *Saccharomyces cerevisiae*? *Genome biology*, 7(6), p.R45.
- Van den Ende, W. & El-Esawe, S.K., 2014. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: A dual function in abiotic and biotic stress responses? *Environmental and Experimental Botany*, 108, pp.4–13.
- Farooq, M. et al., 2009. Improving the Drought Tolerance in Rice (*Oryza sativa* L.) by Exogenous Application of Salicylic Acid. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195(4), pp.237–246.
- Figueiredo, M.V.B. et al., 2008. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Applied Soil Ecology*, 40(1), pp.182–188.
- Filipenko, E.A. et al., 2013. PR-proteins with ribonuclease activity and plant resistance against pathogenic fungi. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 3(6), pp.474–480.
- Flexas, J. & Medrano, H., 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of botany*, 89(2), pp.183–9.
- Flor, H.H., 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), pp.275–296.
- Flores-Sanchez, I.J. & Verpoorte, R., 2009. Plant polyketide synthases: a fascinating group of enzymes. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale*, 47(3), pp.167–74.
- Flowers, T.J., 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of experimental botany*, 55(396), pp.307–19.
- Freeman, B. & Beattie, G., 2008. Overview of Plant Defenses. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01.
- Fu, Z.Q. et al., 2012. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486(7402), pp.228–32.
- Fujita, M. et al., 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current opinion in plant biology*, 9(4), pp.436–42.
- Gilland, B., 2002. World population and food supply. *Food Policy*, 27(1), pp.47–63.
- Gilroy, S. et al., 2014. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends in plant science*, 19(10), pp.623–30.
- Glazebrook, J., 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual review of phytopathology*, 43, pp.205–27.
- Govrin, E.M. & Levine, A., 2000a. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10(13), pp.751–757.
- Govrin, E.M. & Levine, A., 2000b. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10(13), pp.751–757.
- Goyal, K., Walton, L.J. & Tunnacliffe, A., 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *The Biochemical journal*, 388(Pt 1), pp.151–7.
- Grant, S.R. et al., 2006. Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annual review of microbiology*, 60, pp.425–49.
- Gruner, K. et al., 2013. Reprogramming of plants during systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 4.
- Guo, H. & Ecker, J.R., 2004. The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(1), pp.40–49.
- Halter, T. et al., 2014. The leucine-rich repeat receptor kinase BIR2 is a negative regulator of BAK1 in plant immunity. *Current biology : CB*, 24(2), pp.134–43.
- Hammond, J.P. et al., 2003. Changes in gene expression in *Arabidopsis* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant physiology*, 132(2), pp.578–96.
- Hanaoka, H. et al., 2002. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene. *Plant physiology*, 129(3), pp.1181–93.
- Hayat, S., Ali, B. & Ahmad, A., 2007. *Salicylic Acid: A Plant Hormone* S. Hayat & A. Ahmad, eds., Dordrecht: Springer Netherlands.

- Hayward, A.P. & Dinesh-Kumar, S.P., 2011. What can plant autophagy do for an innate immune response? *Annual review of phytopathology*, 49, pp.557–76.
- Heese, A. et al., 2007. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(29), pp.12217–22.
- Herrera, J.M. et al., 2015. Terpene ketones as natural insecticides against *Sitophilus zeamais*. *Industrial Crops and Products*, 70, pp.435–442.
- Higurashi, M., Ishida, T. & Kinoshita, K., 2008. Identification of transient hub proteins and the possible structural basis for their multiple interactions. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 17(1), pp.72–8.
- Hirai, M.Y. et al., 2003. Global expression profiling of sulfur-starved Arabidopsis by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-l-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *The Plant Journal*, 33(4), pp.651–663.
- Hirai, M.Y. et al., 2004. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27), pp.10205–10.
- Hirai, M.Y. & Saito, K., 2004. Post-genomics approaches for the elucidation of plant adaptive mechanisms to sulphur deficiency. *Journal of experimental botany*, 55(404), pp.1871–9.
- Holbrook, M. & Zwieniecki, M., 2011. *Vascular Transport in Plants*,
- Huang, B. & Xu, C., 2008. Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress. *Journal of integrative plant biology*, 50(10), pp.1230–7.
- Hückelhoven, R., 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual review of phytopathology*, 45, pp.101–27.
- Jakubowicz, M. et al., 2010. Exogenously induced expression of ethylene biosynthesis, ethylene perception, phospholipase D, and Rboh-oxidase genes in broccoli seedlings. *Journal of experimental botany*, 61(12), pp.3475–91.
- Jia, W. & Davies, W.J., 2007. Modification of leaf apoplastic pH in relation to stomatal sensitivity to root-sourced abscisic acid signals. *Plant physiology*, 143(1), pp.68–77.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature*, 444(7117), pp.323–9.
- Kamoun, S., 2007. Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Current opinion in plant biology*, 10(4), pp.358–65.
- Kelly, G. et al., 2013. Hexokinase mediates stomatal closure. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 75(6), pp.977–88.
- Kemmerling, B. et al., 2007. The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control. *Current biology : CB*, 17(13), pp.1116–22.
- Keskin, O. et al., 2008. Principles of Protein-Protein Interactions: What are the Preferred Ways For Proteins To Interact? *Chemical Reviews*, 108(4), pp.1225–1244.
- Khan, M., Subramaniam, R. & Desveaux, D., 2015. Of guards, decoys, baits and traps: pathogen perception in plants by type III effector sensors. *Current opinion in microbiology*, 29, pp.49–55.
- Kim, B.-H. et al., 2011. A family of IFN- γ -inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6030), pp.717–21.
- Kim, B.H., Kim, S.Y. & Nam, K.H., 2013. Assessing the diverse functions of BAK1 and its homologs in arabidopsis, beyond BR signaling and PTI responses. *Molecules and cells*, 35(1), pp.7–16.
- Kim, P.M. et al., 2006. Relating three-dimensional structures to protein networks provides evolutionary insights. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5807), pp.1938–41.
- Kim, P.M. et al., 2008. The role of disorder in interaction networks: a structural analysis. *Molecular systems biology*, 4(1), p.179.
- Konings, H. & Verschuren, G., 1980. Formation of aerenchyma in roots of Zea mays in aerated solutions, and its relation to nutrient supply. *Physiologia Plantarum*, 49(3), pp.265–270.
- Krishna, P., 2003. Brassinosteroid-Mediated Stress Responses. *Journal of plant growth regulation*, 22(4), pp.289–297.
- Kutz, A. et al., 2002. A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulphur-starving Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 30(1), pp.95–106.
- Kvitko, B.H. et al., 2009. Deletions in the repertoire of Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. *PLoS pathogens*, 5(4), p.e1000388.
- Lalonde, S., 1999. The Dual Function of Sugar Carriers: Transport and Sugar Sensing. *THE PLANT CELL ONLINE*, 11(4), pp.707–726.
- Lamb, C. & Dixon, R.A., 1997. THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 48, pp.251–275.
- Lawlor, D.W. & Cornic, G., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 25(2), pp.275–294.
- Lemoine, R. et al., 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. *Frontiers in plant science*, 4, p.272.
- Lewandowska, M. et al., 2010. A contribution to identification of novel regulators of plant response to sulfur deficiency: characteristics of a tobacco gene UP9C, its protein product and the effects of UP9C silencing. *Molecular plant*, 3(2),

pp.347–60.

- Li, J. et al., 2002. BAK1, an Arabidopsis LRR Receptor-like Protein Kinase, Interacts with BRI1 and Modulates Brassinosteroid Signaling. *Cell*, 110(2), pp.213–222.
- Li, J., 2000. Regulation of Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure and Anion Channels by Guard Cell AAPK Kinase. *Science*, 287(5451), pp.300–303.
- Li, J. & Nam, K.H., 2002. Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5558), pp.1299–301.
- Liu, T. et al., 2012. Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6085), pp.1160–4.
- Lorenzo, O., 2002. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *THE PLANT CELL ONLINE*, 15(1), pp.165–178.
- Lorenzo, O. et al., 2004. JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *The Plant cell*, 16(7), pp.1938–50.
- Lozano-Durán, R. & Zipfel, C., 2015. Trade-off between growth and immunity: role of brassinosteroids. *Trends in plant science*, 20(1), pp.12–9.
- Luhua, S. et al., 2013. Linking genes of unknown function with abiotic stress responses by high-throughput phenotype screening. *Physiologia plantarum*, 148(3), pp.322–33.
- Maruyama-Nakashita, A. et al., 2004a. A novel regulatory pathway of sulfate uptake in Arabidopsis roots: implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 38(5), pp.779–89.
- Maruyama-Nakashita, A. et al., 2005. Identification of a novel cis-acting element conferring sulfur deficiency response in Arabidopsis roots. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 42(3), pp.305–14.
- Maruyama-Nakashita, A., 2004. Induction of SULTR1;1 Sulfate Transporter in Arabidopsis Roots Involves Protein Phosphorylation/Dephosphorylation Circuit for Transcriptional Regulation. *Plant and Cell Physiology*, 45(3), pp.340–345.
- Maruyama-Nakashita, A. et al., 2004b. Regulation of high-affinity sulphate transporters in plants: towards systematic analysis of sulphur signalling and regulation. *Journal of experimental botany*, 55(404), pp.1843–9.
- Maruyama-Nakashita, A. et al., 2003. Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in Arabidopsis reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant physiology*, 132(2), pp.597–605.
- Mengiste, T., 2012. Plant immunity to necrotrophs. *Annual review of phytopathology*, 50, pp.267–94.
- Miller, G. et al., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, cell & environment*, 33(4), pp.453–67.
- Mittler, R. et al., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), pp.490–8.
- Mittler, R. et al., 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends in plant science*, 16(6), pp.300–9.
- Moniuszko, G. et al., 2013. Tobacco LSU-like protein couples sulphur-deficiency response with ethylene signalling pathway. *Journal of experimental botany*, 64(16), pp.5173–82.
- Mudgett, M.B., 2005. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annual review of plant biology*, 56, pp.509–31.
- Mühlenbock, P. et al., 2008. Chloroplast signaling and LESION SIMULATING DISEASE1 regulate crosstalk between light acclimation and immunity in Arabidopsis. *The Plant cell*, 20(9), pp.2339–56.
- Mukhtar, M.S. et al., 2011. Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6042), pp.596–601.
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment*, 25(2), pp.239–250.
- Munns, R. & Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of plant biology*, 59, pp.651–81.
- Myakushina, Y.A. et al., 2009. Mutation in LSU4 gene affects flower development in Arabidopsis thaliana. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 428(1), pp.257–260.
- Nam, K.H. & Li, J., 2002. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell*, 110(2), pp.203–12.
- Nicaise, V., Roux, M. & Zipfel, C., 2009. Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant physiology*, 150(4), pp.1638–47.
- Nikiforova, V., Daub, C., et al., 2005. Integrative gene-metabolite network with implemented causality deciphers informational fluxes of sulphur stress response. *Journal of experimental botany*, 56(417), pp.1887–96.
- Nikiforova, V., Kopka, J., et al., 2005. Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of Arabidopsis plants. *Plant physiology*, 138(1), pp.304–18.
- Nurnberger, T. et al., 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews*, 198(1), pp.249–266.
- Nürnberg, T. & Kemmerling, B., 2006. Receptor protein kinases--pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends in plant science*, 11(11), pp.519–22.
- O'Connell, R.J. & Panstruga, R., 2006. Tête à tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *The New phytologist*, 171(4), pp.699–718.
- Pajeroska-Mukhtar, K.M. et al., 2012. The HSF-like transcription factor TBF1 is a major molecular switch for plant growth-to-defense transition. *Current biology : CB*, 22(2), pp.103–12.

- Petronia Carillo, M.G.A.G.P.A.F. and P.W., 2011. *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations* A. Shanker, ed., InTech.
- Petrov, V. et al., 2015. ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in plant science*, 6, p.69.
- Pieterse, C.M.J. et al., 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, 28, pp.489–521.
- Pieterse, C.M.J. et al., 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, 5(5), pp.308–16.
- Poovaiah, B.W. et al., 2013. Recent advances in calcium/calmodulin-mediated signaling with an emphasis on plant-microbe interactions. *Plant physiology*, 163(2), pp.531–42.
- Pré, M. et al., 2008. The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant physiology*, 147(3), pp.1347–57.
- Pusztahelyi, T., Holb, I.J. & Pócsi, I., 2015. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in plant science*, 6, p.573.
- Rahbarian, R. et al., 2011. Drought Stress Effects on Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence and Water Relations in Tolerant and Susceptible Chickpea (*Cicer Arietinum* L.) Genotypes. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 53(1), pp.47–56.
- Rajendran, K., Tester, M. & Roy, S.J., 2009. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant, cell & environment*, 32(3), pp.237–49.
- Rangeshwaran, R. et al., 2013. Analysis of proteins expressed by an abiotic stress tolerant *Pseudomonas putida* (NBAIL-RPF9) isolate under saline and high temperature conditions. *Current microbiology*, 67(6), pp.659–67.
- Rao, A. et al., 2010. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(12), pp.5062–9.
- Reuzeau, C. & Russinova, J., 2014. PLANTS HAVING ENHANCED YIELD-RELATED TRAITS AND METHOD FOR MAKING THE SAME (US20140090110 A1). , 1(61).
- del Rio, L.A., 2015. ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), pp.2827–2837.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. & Jones, J.D.G., 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual review of phytopathology*, 49, pp.317–43.
- Rosebrock, T.R. et al., 2007. A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature*, 448(7151), pp.370–4.
- Rossi, F.R. et al., 2011. The sesquiterpene botrydial produced by *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response on plant tissues and its action is modulated by salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 24(8), pp.888–96.
- Ruckle, M.E. et al., 2012. Plastids are major regulators of light signaling in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 159(1), pp.366–90.
- Rudus, I., Sasiak, M. & Kępczyński, J., 2012. Regulation of ethylene biosynthesis at the level of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) gene. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(2), pp.295–307.
- Rybel, B. De et al., 2009. Article Chemical Inhibition of a Subset of *Arabidopsis thaliana* GSK3-like Kinases Activates Brassinosteroid Signaling. *cell*, pp.594–604.
- Santner, A. & Estelle, M., 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*, 459(7250), pp.1071–1078.
- Schachtman, D.P. & Shin, R., 2007. Nutrient sensing and signaling: NPKS. *Annual review of plant biology*, 58, pp.47–69.
- Schapendonk, A.H.C.M., Spitters, C.J.T. & Groot, P.J., 1989. Effects of water stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence of five potato cultivars. *Potato Research*, 32(1), pp.17–32.
- Schmittgen, T.D. & Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, 3(6), pp.1101–8.
- Schouten, A. et al., 2002. Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 3(4), pp.227–238.
- Segmüller, N. et al., 2008. NADPH Oxidases Are Involved in Differentiation and Pathogenicity in *Botrytis cinerea*.
- Seiler, C. et al., 2011. ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. *Journal of experimental botany*, 62(8), pp.2615–32.
- Seki, M. et al., 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current opinion in plant biology*, 10(3), pp.296–302.
- Seyfferth, C. & Tsuda, K., 2014. Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Frontiers in plant science*, 5, p.697.
- Shah, J., Tsui, F. & Klessig, D.F., 1997. Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 10(1), pp.69–78.
- Shan, L. et al., 2008. Bacterial Effectors Target the Common Signaling Partner BAK1 to Disrupt Multiple MAMP Receptor-Signaling Complexes and Impede Plant Immunity. *Cell Host & Microbe*, 4(1), pp.17–27.

- Shanker, A. & Venkateswarlu, B., 2011. *Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*.
- Sharma, P.D., 2014. *Plant Pathology*, Rastogi Publications.
- Shin, R., Berg, R.H. & Schachtman, D.P., 2005. Reactive oxygen species and root hairs in Arabidopsis root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant & cell physiology*, 46(8), pp.1350–7.
- Shin, R. & Schachtman, D.P., 2004. Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(23), pp.8827–32.
- Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K., 2006. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), pp.221–227.
- Sirko, A. et al., 2014. The family of LSU-like proteins. *Frontiers in plant science*, 5(774), p.9.
- Slusarenko, A.J., Fraser, R.S. & Loon, L.C., 2012. *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*, Springer Science & Business Media.
- Smith, F.W. et al., 1995. Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), pp.9373–9377.
- Solfanelli, C. et al., 2006. Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in Arabidopsis. *Plant physiology*, 140(2), pp.637–46.
- Spalding, E.P., 1999. Potassium Uptake Supporting Plant Growth in the Absence of AKT1 Channel Activity. Inhibition by Ammonium and Stimulation by Sodium. *The Journal of General Physiology*, 113(6), pp.909–918.
- Staskawicz, B.J., 2001. Genetics of Plant-Pathogen Interactions Specifying Plant Disease Resistance. *PLANT PHYSIOLOGY*, 125(1), pp.73–76.
- Stuart, L.M., Paquette, N. & Boyer, L., 2013. Effector-triggered versus pattern-triggered immunity: how animals sense pathogens. *Nature reviews. Immunology*, 13(3), pp.199–206.
- Sultan, B., 2012. Global warming threatens agricultural productivity in Africa and South Asia. *Environmental Research Letters*, 7(4), p.041001.
- Suzuki, N. et al., 2011. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current opinion in plant biology*, 14(6), pp.691–9.
- Tada, Y. et al., 2008. Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5891), pp.952–6.
- Takahashi, H. et al., 1997. Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate-starved roots plays a central role in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), pp.11102–7.
- Takahashi, H. et al., 2011. Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annual review of plant biology*, 62, pp.157–84.
- Takahashi, H. et al., 2000. The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 23(2), pp.171–182.
- Tang, W. et al., 2008. Proteomics studies of brassinosteroid signal transduction using prefractionation and two-dimensional DIGE. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 7(4), pp.728–38.
- Temme, N. & Tudzynski, P., 2009. Does botrytis cinerea Ignore H₂O₂-induced oxidative stress during infection? Characterization of botrytis activator protein 1. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 22(8), pp.987–98.
- Thoma, I. et al., 2003. Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *The Plant Journal*, 34(3), pp.363–375.
- Tognetti, J.A., Pontis, H.G. & Martínez-Noël, G.M.A., 2013. Sucrose signaling in plants: a world yet to be explored. *Plant signaling & behavior*, 8(3), p.e23316.
- Tsai, C.-J., Ma, B. & Nussinov, R., 2009. Protein-protein interaction networks: how can a hub protein bind so many different partners? *Trends in biochemical sciences*, 34(12), pp.594–600.
- Verhage, A. et al., 2011. Rewiring of the Jasmonate Signaling Pathway in Arabidopsis during Insect Herbivory. *Frontiers in plant science*, 2, p.47.
- Vestal, D.J. & Jeyaratnam, J.A., 2011. The guanylate-binding proteins: emerging insights into the biochemical properties and functions of this family of large interferon-induced guanosine triphosphatase. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 31(1), pp.89–97.
- Voigt, C.A., 2014. Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in plant science*, 5, p.168.
- Volko, S.M., Boller, T. & Ausubel, F.M., 1998. Isolation of New Arabidopsis Mutants With Enhanced Disease Susceptibility to Pseudomonas syringae by Direct Screening. *Genetics*, 149(2), pp.537–548.
- Vos, I.A. et al., 2015. Impact of hormonal crosstalk on plant resistance and fitness under multi-attacker conditions. *Frontiers in plant science*, 6, p.639.
- Vos, I.A. et al., 2013. Onset of herbivore-induced resistance in systemic tissue primed for jasmonate-dependent defenses is activated by abscisic acid. *Frontiers in plant science*, 4, p.539.
- Wan, D. et al., 2012. Calmodulin-binding protein CBP60g is a positive regulator of both disease resistance and drought tolerance in Arabidopsis. *Plant cell reports*, 31(7), pp.1269–81.
- Wang, D., Amornsiripanitch, N. & Dong, X., 2006. A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional

- network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS pathogens*, 2(11), p.e123.
- Wang, L. et al., 2009. Arabidopsis CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS pathogens*, 5(2), p.e1000301.
- Wang, L. et al., 2011. CBP60g and SARD1 play partially redundant critical roles in salicylic acid signaling. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 67(6), pp.1029–41.
- Wang, Y. et al., 2010. A *Pseudomonas syringae* ADP-ribosyltransferase inhibits Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases. *The Plant cell*, 22(6), pp.2033–44.
- Wasternack, C. & Hause, B., 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of botany*, 111(6), pp.1021–58.
- Weßling, R. et al., 2014. Convergent targeting of a common host protein-network by pathogen effectors from three kingdoms of life. *Cell host & microbe*, 16(3), pp.364–75.
- Wildermuth, M.C. et al., 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863), pp.562–5.
- Xiong, L. et al., 2001. Modulation of Abscisic Acid Signal Transduction and Biosynthesis by an Sm-like Protein in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 1(6), pp.771–781.
- Xiong, L. & Zhu, J.-K., 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant physiology*, 133(1), pp.29–36.
- Yoo, S.-D., Cho, Y. & Sheen, J., 2009. Emerging connections in the ethylene signaling network. *Trends in plant science*, 14(5), pp.270–9.
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H. & Sheen, J., 2007. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature protocols*, 2(7), pp.1565–72.
- Zhang, J. et al., 2007. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell host & microbe*, 1(3), pp.175–85.
- Zhang, Y. et al., 2010. Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), pp.18220–5.
- Zhang, Z. et al., 2012. Disruption of PAMP-induced MAP kinase cascade by a *Pseudomonas syringae* effector activates plant immunity mediated by the NB-LRR protein SUMM2. *Cell host & microbe*, 11(3), pp.253–63.
- Zhao, M. & Running, S.W., 2010. Drought-induced reduction in global terrestrial net primary production from 2000 through 2009. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5994), pp.940–3.
- Zientara-Rytter, K. et al., 2011. Identification and functional analysis of Joka2, a tobacco member of the family of selective autophagy cargo receptors. *Autophagy*, 7(10), pp.1145–58.
- Zipfel, C., 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 20(1), pp.10–16.
- Zipfel, C. & Felix, G., 2005. Plants and animals: a different taste for microbes? *Current opinion in plant biology*, 8(4), pp.353–60.

Appendix I

Tabel 4: Overzicht van gebruikte primers en hun sequentie

Primer	Beschrijving	Sequentie (5'-3')
<i>PFI7778</i>	EF1a forward primer	TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA
<i>PFI7779</i>	EF1a reverse primer	GGTGGTGGCATCCATCTTGTTACA
<i>PFIN160</i>	LSU1 forward primer qRT coderende sequentie	AGGAGGCGGAAGAGCAAC
<i>PFIN161</i>	LSU1 reverse primer qRT coderende sequentie	CGAGGAAGAGACGACAGAAGA
<i>PFIN168</i>	LSU3 forward primer qRT coderende sequentie	AGGAGGCCGAGGAGAGACT
<i>PFIN169</i>	LSU3 reverse primer qRT coderende sequentie	GAATTCGTAACAACGACTTCAAGA
<i>PFIN440</i>	LSU4 forward primer qRT coderende sequentie	GAGGACACAGGTGGCTGAG
<i>PFIN441</i>	LSU4 reverse primer qRT coderende sequentie	TCGGAGGAGAAACGAGAGAG
<i>PFIN442</i>	GBFP forward primer qRT coderende sequentie	CGAGAATACTGTTAGTGAGCAAAAAG
<i>PFIN443</i>	GBFP reverse primer qRT coderende sequentie (intronoverspannend)	TGATTATCTTCTCCTTTTCATCCA
<i>PFIN420</i>	HBT-vector LSU1 forward primer	CGGGATCCATGGCGAACCGAGGAGGATG
<i>PFIN421</i>	HBT-vector LSU1 reverse primer	AAGGCCTCGAGGAAGAGACGACAGAAGAA
<i>PFIN422</i>	HBT-vector LSU2 forward primer	CGGGATCCATGGGGAAAGGAGGAAACTATG
<i>PFIN423</i>	HBT-vector LSU2 reverse primer	AAGGCCTCGAGAGGCAGAGGCAGAGTC
<i>PFIN424</i>	HBT-vector LSU3 forward primer	CGGGATCCATGGGAAAAGGAGGAGGTTATG
<i>PFIN425</i>	HBT-vector LSU3 reverse primer	AAGGCCTCGAATTCGTAACAACGACTTCA
<i>PFIN426</i>	HBT-vector LSU4 forward primer	CGGGATCCATGGGAAAAGGAGGAAACTATG
<i>PFIN427</i>	HBT-vector LSU4 reverse primer	AAGGCCTGGGAGAGGCAGAGTCGGAGG
<i>PFIN428</i>	HBT-vector GBFP forward primer	CGGGATCCATGAGAAATCCAACGGACGAGT
<i>PFIN429</i>	HBT-vector GBFP reverse primer	AGATATCCTTTTCGCAAAACGGTGCGTTCA
<i>PFIN430</i>	Forward primer in promotor HBT-vector (HBT)	GTCACGTAGTAAGCAGCTCTCGG
<i>PFIN431</i>	Reverse primer in terminator HBT-vector (NOS)	CATCGCAAGACCGCAACAGGA
<i>PFIN432</i>	Reverse primer in GFP tag HBT-vector (GFP)	CGTCGCCGTCCAGCTCGAC
<i>PFIN434</i>	HBT-vector FSD2 forward primer	CGGGATCCATGATGAATGTTGCAGTGAC
<i>PFIN435</i>	HBT-vector FSD2 reverse primer	AAGGCCTTTAGTCAACCTCAGATACATCGATG
<i>PFIN438</i>	LSU2 forward primer qRT coderende sequentie	AGAAGCGGAGGAGCGTCT
<i>PFIN439</i>	LSU2 reverse primer qRT coderende sequentie	GGAGAGGCAGAGGCAGAGT

Vulgariserende Samenvatting

Landbouwgewassen krijgen tijdens de teelt voortdurend te maken met allerlei factoren die stress veroorzaken in de plant en opbrengsten sterk kunnen verminderen, zoals bijvoorbeeld droogte, nutriëntentekorten of ziektes door schimmels en bacteriën. Om te kunnen blijven voldoen aan de stijgende voedselvraag in de wereld is het belangrijk om de impact van deze factoren op de opbrengst zo goed mogelijk te verlagen. Eén van de oplossingen hiervoor is de ontwikkeling van verbeterde gewassen die door een aanpassing in hun genetische informatie minder gevoelig zijn geworden voor deze factoren. Om dit te kunnen doen is er uitgebreide kennis nodig over de werking van de genen die aangepast worden.

Het doel van deze masterthesis is om meer inzicht te krijgen in de rol van de LSU-genefamilie uit de modelplant *Arabidopsis thaliana* (Zandraket). De LSU-genefamilie bestaat uit vier LSU-genen waarvan gedacht wordt dat ze een rol spelen in het immuunsysteem en de ontwikkeling van de plant. Drie van de deze LSU-genen blijken sterker actief te worden wanneer de plant te maken krijgt met zwaveltekort, vandaar ook hun naam: *response to Low Sulfur*. Elk LSU-gen kan een LSU-peptide vormen, een klein proteïne dat allerlei functies in de plant kunnen vervullen. Het is nog niet duidelijk wat de exacte functie van deze LSU-peptiden is en precies dit wordt in deze masterthesis onderzocht.

Om te achterhalen waar in de plant de LSU-peptiden voorkomen, werden GUS-kleuringen uitgevoerd waaruit blijkt dat de LSU-peptiden vooral in de vaatbundels van zowel blad, stengel als wortels voorkomen, maar er zijn verschillen tussen de vier LSU-peptiden. Uit genexpressieanalyses blijken de *LSU1*- en *LSU3*-genen sterker geactiveerd te worden, wanneer de plant te maken krijgt met hoge suikerconcentraties bij haar wortels. Om de rol van de LSU-peptiden in het immuunsysteem van de plant te achterhalen, werden planten met gewijzigde activiteit van de LSU-genen blootgesteld aan drie ziekteverwekkers (*Botrytis cinerea*, *Hyaloperonospora arabidopsidis* en *Pseudomonas syringae*), alsook aan hoge zout-, suiker- en herbicideconcentraties. Geen van de planten met gewijzigde activiteit van de LSU-genen was duidelijk gevoeliger of resistenter aan de ziekteverwekkers of de hoge zout-, suiker- en herbicideconcentraties. Op basis van de resultaten uit deze experimenten werden twee hypothesen gevormd voor de rol van de LSU-peptiden in de plant. Enerzijds zouden ze betrokken kunnen zijn bij autofagie, een proces in de cel dat overbodige celonderdelen en moleculen afbreekt. Anderzijds zouden de LSU-peptiden ook betrokken kunnen zijn in het energiemetabolisme van de plant en regelen ze het transport en de opslag van suikers. Meer onderzoek is echter nodig om de exacte functie van de LSU-peptiden te bepalen.