Summary & samenvatting

Summary

Plants are exposed to an environment which is characterized by frequent changes in abiotic factors like temperature, soil salinity and availability of nutrients. Some conditions may adversely affect physiological processes, such that an adaptive response is required to minimize detrimental consequences. The initiation of these stress responses depends on the generation of intracellular signal molecules [1]. One of them, the minor phospholipid phosphatidic acid (PA) has emerged as a common, rapidly generated, element in abiotic as well as biotic stress responses in plants [2]. The metabolism of PA is complex due to the multiplicity of its origins (**Chapter 1**). It can be formed through the activity of phospholipase D (PLD), hydrolyzing a structural phospholipid like PC or PE [3], or by DGK [4], phosphorylating diacylglycerol (DAG) which can be formed through PLC hydrolysis of polyphosphoinositides. Moreover, PA is also a central intermediate in glycerolipid biosynthesis [5]. To better understand the functions of this lipid, it is important to distinguish between the different pathways.

To achieve this, two experimental approaches were applied (**Chapter 2**; [6]). The first relies on *in vivo* $^{32}P_i$-radiolabelling of phospholipids, allowing the visualisation and quantitation of fast changes (minutes) in minor phospholipids. To dissect the different PA forming pathways, a differential labelling protocol is followed which is based on the disparate labelling kinetics of different metabolic pools of PA and its precursors [7]. The second approach is based on mass analysis by GC of constituent fatty acids of phospholipids. As fatty acid compositions differ between phospholipid classes, they can be used as 'fingerprints' to trace PA's precursors, thus providing evidence of a metabolic pathway.

A detailed fatty acid analysis of phospholipid classes of the unicellular green alga *Chlamydomonas moewusii* revealed distinctive features (**Chapter 3**; [8]). This raised the possibility to investigate the origins of the PA response under various stress conditions. By analysis of the specific transphosphatidylation product of PLD, phosphatidylbutanol, PE was identified as its substrate (**Chapter 4**; [9]). Under salt stress, various metabolic routes were suggested to contribute to PA formation, including also a PLC-DGK pathway.

In *Chlamydomonas*, hypersalinity stress not only induced the formation of PA but also, of *lyso*-PA (LPA; [10]). The question whether this was derived from *de novo* synthesis, or from PLA_2-mediated hydrolysis of DGK- or PLD-generated PA, was addressed using both experimental approaches (**Chapter 5**). The results argue for a dominant role of PLA_2 hydrolyzing PA which is derived from a PLC-DGK route. The data are combined in a model showing multiple metabolic pools of PA and LPA characterized by distinct fatty acid compositions and radiolabelling characteristics.

Similarly, the rapid response to high NaCl concentrations in the seed plant *Arabidopsis thaliana* was shown to involve multiple PA forming pathways (**Chapter 6**). One, active at moderate NaCl concentrations (≥100 mM), involved DGK activity, and a second, active at high concentrations (≥ 500 mM), featured PLD activity. A PIP-hydrolyzing PLC was

suggested to provide the DAG substrate for DGK activity. Also under conditions of cold stress, PA rapidly accumulated in *Arabidopsis* seedlings and leaves of adult plants, with a leading role for DGK (**Chapter 7**). Again, this enzyme was suggested to phosphorylate DAG generated by PLC-mediated hydrolysis of PIP, based on ^{32}P-labeling experiments.

The *Arabidopsis* genome contains 7 *DGK* genes, 9 *PLC* genes, and 12 *PLD* genes. To implicate specific isozymes in the salt- and cold-induced PA responses, T-DNA insertion lines were used. Thus, using *pld*α and *pld*δ knock-out seedlings, the rapid, PLD-dependent PA increase under high salt stress was shown to depend on PLDδ (**Chapter 6**). Assays of *DGK* and *PLC* insertion lines failed to demonstrate clear defects in stress-induced PA formation. This could be due to the lack of knock-outs for certain genes, or a consequence of redundancy, by which a deficient gene function is neutralized by the upregulation of another gene or enzyme. To solve this experimental problem, it will be necessary to generate mutant lines containing multiple knock-outs.

The integrated analysis of the biochemical pathways leading to the formation and attenuation of PA, together with the subcellular localization of the enzymes and lipid pools by confocal microscopy [11], is a challenge for current and future research. PA has recently been suggested to act as a membrane localization signal for proteins, based on electrostatic interactions and hydrogen bonding [12], and several interesting binding partners have been found [13]. Taken together, these studies may further increase our understanding of the role of PA in stress responses.

Samenvatting

Planten staan bloot aan veranderingen in omgevingsfactoren zoals temperatuur, het zoutgehalte van de bodem, en de beschikbaarheid van voedingsstoffen. Sommige condities kunnen de fysiologie nadelig beïnvloeden, zodat een adaptieve respons nodig is om de plant te beschermen. In de cellen van de plant worden signaalmoleculen gevormd die zo'n respons kunnen initiëren [1], en één daarvan is fosfatidylzuur (PA). Zowel biotische als abiotische stress condities induceren in het algemeen een snelle toename in dit fosfolipide [2]. Het metabolisme van PA is ingewikkeld omdat het op meerdere manieren gevormd kan worden (**Hoofdstuk 1**). Zo is PA het product van de activiteit van fosfolipase D (PLD) dat structurele fosfolipiden zoals PC en PE hydrolyseert [3]. Diacylglycerolkinase (DGK) maakt PA door fosforylatie van diacylglycerol (DAG; [4]); dit laatste kan geproduceerd worden via hydrolyse van polyfosfoinositiden door fosfolipase C (PLC). PA is bovendien een centraal intermediair in de *de novo*-synthese van glycerolipiden [5]. Het is dus een heterogene lipideklasse en om de functies ervan te kunnen begrijpen is het belangrijk onderscheid te maken tussen de metabolische routes.

Hiertoe zijn twee experimentele benaderingen toegepast (**Hoofdstuk 2**; [6]). De eerste is gebaseerd op het radioactief labelen van levende planten met $^{32}P_i$. Dit maakt het mogelijk snelle veranderingen (binnen minuten) in laag-abundante fosfolipiden (zoals PA) zichtbaar te maken en te kwantificeren. Om de verschillende routes van PA-vorming te onderscheiden wordt een zogenaamde 'differentiële labeling' toegepast, die een onderscheid maakt tussen snel en langzaam gelabelde fracties van PA en zijn precursors [7]. De tweede aanpak is gebaseerd op analyse van de samenstellende vetzuren van fosfolipiden met behulp van gaschromatografie. Omdat de vetzuursamenstellingen van fosfolipide-klassen van elkaar verschillen kunnen ze gebruikt worden als 'vingerafdruk' om de precursors van PA te vinden en zo een metabolische route bloot te leggen.

Een gedetailleerde studie van vetzuursamenstellingen van fosfolipide-klassen in de ééncellige groenalg *Chlamydomonas moewusii* liet kenmerkende onderlinge verschillen zien (**Hoofdstuk 3**; [8]). Dit maakte het mogelijk om de oorsprong van de PA-respons onder verschillende condities van stress te bestuderen. Door analyse van het transfosfatidyleringsprodukt van PLD, fosfatidylbutanol, is PE geïdentificeerd als zijn substraat (**Hoofdstuk 4;** [9]). Zout-stress induceerde PA vorming via meerdere metabolische routes, onder andere een PLC-DGK-route.

In *Chlamydomonas* induceren hoge zoutconcentraties niet alleen de vorming van PA maar ook van *lyso*-PA (LPA; [10]). Gebruikmakend van beide methodes is onderzocht waar dit lipide vandaan kwam: van *de novo*-synthese of van PLA_2-gemediëerde hydrolyse van PA, dat op zijn beurt kan worden geproduceerd door DGK of PLD (**Hoofdstuk 5**). De resultaten wezen op een dominante rol voor PLA_2 dat PA hydrolyseert, afkomstig uit een PLC-DGK-route. De data zijn vervat in een model van meerdere metabolische fracties

van PA en LPA, die gekarakteriseerd worden door verschillen in vetzuursamenstelling en radiolabeling.

Zo bleken ook in de zaadplant *Arabidopsis thaliana* meerdere metabolische routes betrokken te zijn bij de snelle PA respons op hoge NaCl-concentraties (**Hoofdstuk 6**). Een DGK was actief bij matig hoge NaCl-concentraties (≥100 mM), en een PLD bij hoge concentraties (≥500 mM). Het DAG substraat voor DGK werd waarschijnlijk geleverd door een PIP-hydrolyserende PLC-activiteit. Onder koude stress accumuleerde PA snel in *Arabidopsis* zaailingen en in bladeren van volwassen planten, waarbij DGK de hoofdrol speelde (**Hoofdstuk 7**). Ook in dit geval wezen ^{32}P-labeling-experimenten erop dat het DAG-substraat voor DGK geproduceerd was door PLC-hydrolyse van PIP.

Het *Arabidopsis*-genoom bevat 7 *DGK*-genen, 9 *PLC*-genen en 12 *PLD*-genen. Om de betrokkenheid van specifieke isozymen in de zout- en koude-geinduceerde PA-responsen te onderzoeken is gebruik gemaakt van T-DNA insertie-lijnen. Zo is, gebruikmakend van *pld*α- en *pld*δ-knock-out zaailingen, aangetoond dat de PLD–afhankelijke PA-toename onder zoutstress toegeschreven kan worden aan PLDδ. In assays van DGK- en PLC-T-DNA-insertielijnen zijn geen duidelijke gebreken gevonden in de stress-geinduceerde PA-vorming. Dit kan het gevolg zijn van het ontbreken van knock-out mutanten voor bepaalde genen, of een consequentie van redundantie, waarbij een defect in een genfunctie wordt ondervangen door de toegenomen activiteit van een ander enzym. Om dit experimentele probleem op te lossen moeten meervoudige knock-out mutanten gegenereerd worden.

De geïntegreerde analyse van de biochemische routes die leiden tot de vorming en omzetting van PA, en de subcellulaire localisatie van de betrokken lipidefracties en enzymen met confocale microscopische technieken [11] is een uitdaging voor het lopende en toekomstige onderzoek. PA wordt beschouwd als een membraan-localisatie signaal voor eiwitten, op basis van electrostatische interacties en waterstofbruggen [12], en verscheidene interessante bindingspartners zijn gevonden [13]. Bijelkaar zullen deze studies bijdragen aan het begrip van de rol van PA in stress-responsen.

References

[1] L. Xiong, K.S. Schumaker, J.K. Zhu, Cell signaling during cold, drought, and salt stress, Plant Cell 14 Suppl (2002) S165-183.

[2] C. Testerink, T. Munnik, Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants, Trends in plant science 10 (2005) 368-375.

[3] T. Munnik, S.A. Arisz, T. De Vrije, A. Musgrave, G Protein Activation Stimulates Phospholipase D Signaling in Plants, Plant Cell 7 (1995) 2197-2210.

[4] S.A. Arisz, T. Munnik, Diacylglycerol kinase, in: T. Munnik (Ed.), Lipid Signaling in Plants, Springer, 2010, pp. 107-114.

[5] J. Ohlrogge, J. Browse, Lipid biosynthesis, Plant Cell 7 (1995) 957-970.

[6] S.A. Arisz, C. Testerink, T. Munnik, Plant PA signaling via diacylglycerol kinase, Biochimica et biophysica acta (2009).

[7] T. Munnik, Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger, Trends in plant science 6 (2001) 227-233.

[8] S.A. Arisz, J.A. van Himbergen, A. Musgrave, H. van den Ende, T. Munnik, Polar glycerolipids of Chlamydomonas moewusii, Phytochemistry 53 (2000) 265-270.

[9] S.A. Arisz, F. Valianpour, A.H. van Gennip, T. Munnik, Substrate preference of stress-activated phospholipase D in Chlamydomonas and its contribution to PA formation, Plant J 34 (2003) 595-604.

[10] H.J. Meijer, S.A. Arisz, J.A. Van Himbergen, A. Musgrave, T. Munnik, Hyperosmotic stress rapidly generates lyso-phosphatidic acid in Chlamydomonas, Plant J 25 (2001) 541-548.

[11] J.E. Vermeer, T. Munnik, Imaging lipids in living plants, in: T. Munnik (Ed.), Lipid Signaling in Plants, 2010, pp. 185-201.

[12] E.E. Kooijman, D.P. Tieleman, C. Testerink, T. Munnik, D.T. Rijkers, K.N. Burger, B. de Kruijff, An electrostatic/hydrogen bond switch as the basis for the specific interaction of phosphatidic acid with proteins, The Journal of biological chemistry 282 (2007) 11356-11364.

[13] C. Testerink, H.L. Dekker, Z.Y. Lim, M.K. Johns, A.B. Holmes, C.G. Koster, N.T. Ktistakis, T. Munnik, Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants, Plant J 39 (2004) 527-536.