

11. STRESZCZENIE (summary in Polish)

Rośliny w przyrodzie są narażone na stres związany z występowaniem w glebie wielu drobnoustrojów, które konkurują o węgiel organiczny produkowany przez rośliny. Niektóre mikroorganizmy są korzystne dla roślin, a inne są patogenne. Rośliny są także narażone na kontakt z roślinożercami. Niektóre zwierzęta roślinożerne i owady wykazują zachowania mutualistyczne, pomagając w zapylaniu lub broniąc rośliny przed innymi roślinożercami. Na skutek ewolucji rośliny wykształciły systemy obronne, aby przeciwdziałać swoim wrogom. Rośliny należące do rzędu kapustnych wykształciły złożony system obronny, aby chronić się przed wrogami swoje części nadziemne i podziemne. Rośliny te wytwarzają klasę metabolitów wtórnych zwanych glukozynolanami, które po aktywacji systemu obrony zapewniają ochronę przed wrogami. Glukozynolany są magazynowane w wakuolach i aktywowane przez β -glukozydazę zlokalizowaną w tzw. komórkach mirozynowych. Ten system aktywacji jest popularnie znany jako system bomby gorczycowej i występuje w roślinach krzyżowych, w tym w roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana*. Wśród β -glukozydaz opisanych u *A. thaliana* jest PYK10, która jest gromadzona w wyspecjalizowanych przedziałach pochodzących z sieci retikulum endoplazmatycznego (ER), a mianowicie w ciałach ER. Co istotne, korzenie *A. thaliana* obfitują w glukozynolany indolowe, które są produktami końcowymi metabolizmu pochodnych Trp. PYK10 jest jedną z najbardziej dominujących mirozynaz w korzeniach, o wysokiej specyficznej aktywności w stosunku do glukozynolanów indolowych. Nie zostało do tej pory wyjaśnione, czy zlokalizowane w ciałach ER mirozynazy odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu zespołu korzeń-mikrobiota poprzez hydrolizę wtórnych metabolitów pochodzących z Trp. Ciała ER zawierają PYK10 wraz z potencjalnym białkiem rusztowania NAI2, co czyni z nich przedział komórkowy z dużą zawartością białka. Ciała ER są strukturami związanymi z błoną, zawierającymi dwa integralne białka błonowe MEMBRANE OF ER-BODIES (MEB1) i MEB2. Wykazano, że geny MEB1 i MEB2 są homologiczne do transportera VACUOLAR IRON TRANSPORTER (VIT1) występującego u *A. thaliana*, i że białka te są odpowiedzialne za transport żelaza u drożdży. Jednakże funkcja MEB1 i MEB2 u roślin nie jest znana. Na początku przeprowadziłem badania nad rolą MEB1 i MEB2 u *A. thaliana*. Ponieważ MEB1 i MEB2 są transporterami, wysunąłem hipotezę, że MEB1 i MEB2 biorą udział w homeostazie kationów. Następnie zajmowałem się rolą ciał ER i ich substratów w tworzeniu społeczności mikrobioty korzeni. Do tej pory kilka badań sugerowało, że glukozynolany indolowe i produkty ich degradacji odgrywają rolę w kształtowaniu takiej mikrobioty, ale dokładna rola degradacji glukozynolanów indolowych przez PYK10 nie była znana.

W niniejszej pracy wykazałem, po pierwsze, możliwą rolę MEB1 i MEB2 w kształtowaniu morfologii ciał ER, ich ruchu i homeostazie składników odżywczych. Dzięki zaawansowanej mikroskopowej analizie konfokalnej cech tekstury wykazałam, że MEB1 i MEB2 są odpowiedzialne za morfologię i ruch ciał ER. Opierając się na jonomice badanych roślin i pomiarach ich parametrów fizjologicznych w kontrolowanych warunkach odżywczych zasugerowałem, że ciała ER odgrywają rolę w homeostazie kationów. Ogólnie rzecz biorąc, określiłem przypuszczalną rolę MEB1 i MEB2 w ciałach ER *in planta*.

Po drugie, wykazałem rolę PYK 10 i metabolitów wtórnych wytwarzanych z Trp, w kształtowaniu składu metabolitów znajdujących się w eksudatach korzeniowych, poprzez wykonanie nieukierunkowanej metabolomiki. Ponadto, zbadałem rolę ciał ER w tworzeniu zespołu korzeń-mikrobiota. Biorąc pod uwagę wyniki doświadczeń szklarniowych i korzeniowych, a także fakt, że pochodne PYK10 i Trp występują obficie w korzeniach, jest prawdopodobne, że związki będące rezultatem aktywności szlaku PYK10 i Trp, obecne w eksudatach korzeniowych, są odpowiedzialne za kształtowanie mikrobioty korzeni. Przeprowadzając eksperymenty z wykorzystaniem naturalnej gleby i zrekonstruowanej mikrobioty traktowanych eksudatami korzeniowymi pobranymi od roślin z uszkodzonym ciałem ER i szlakiem Trp, określiłem rolę mirozynyzy PYK10 zlokalizowanej w ciałach ER i szlaku Trp w modulowaniu składu mikrobioty korzeniowej. Ponadto stwierdziłem, że metabolity wtórne powstające z Trp przy udziale PYK10, znajdujące się w eksudatach korzeniowych, wywołują zmiany w społecznościach bakterii glebowych, a także syntetycznych. Zbadałem również rolę ciał ER w interakcjach roślina-grzyb w układzie monoasocjacyjnym z wykorzystaniem szczepów grzybów, roślin zmutowanych i typu dzikiego. Stwierdziłem, że zarówno aktywność PYK10, jak i szlak Trp wykazują zbieżne zachowanie w stosunku do różnych szczepów grzybów.

Podsumowując, w mojej pracy zbadałam rolę białek błonowych ciał ER: MEB1 i MEB2, *in planta* oraz rolę białka PYK10, zlokalizowanego w ciałach ER w kształtowaniu mikrobioty korzeni.

Słowa kluczowe: *Arabidopsis thaliana*, ciała ER, glukozynolan, obrona roślin, błona, morfologia organelli, ruch organelli, homeostaza kationów, fizjologia roślin, mikrobiota korzeni, wydzieliny korzeniowe, metabolity wtórne.

Alexander Bente
21.06.22

SUMMARY

Plants in nature are exposed to stress from a plethora of microbes in the soil that compete for the organic carbon produced by the plants. Some microbes are beneficial to plants, and some are pathogenic. Similarly, plants are exposed to herbivores that eat plants for their diet. Some herbivores and insects show mutualistic behaviour by either assisting in pollination or defense against other herbivores. Over the years, plants have evolved their defense systems to counter their enemies. Plants of *Brassicales* order have evolved a sophisticated defense system to protect themselves from above and below ground, these plants produce a class of secondary metabolites called the glucosinolates that provide protection against their enemies upon defense activation. Glucosinolates are stored in vacuoles and activated by β -glucosidase localized in so-called myrosin cells. This activation system is popularly known as the mustard oil bomb system, and is found in cruciferous vegetables including model plant *Arabidopsis thaliana*. Among the reported β -glucosidases in *A. thaliana* is PYK10 which is stored in specialized endoplasmic reticulum (ER) network-derived compartments, namely ER bodies. Interestingly, roots of *A. thaliana* are abundant in indole glucosinolates that are downstream products of the Trp-derived metabolism. PYK10 is reported to be one of the most dominant myrosinases in roots with high specific activity toward indole glucosinolates. It is unclear whether the ER-body-localized myrosinases play a crucial role in shaping the root-microbiota assembly by hydrolyzing the Trp-derived secondary metabolites. The ER bodies encapsulate PYK10 with a potential scaffold protein NAI2, making it a protein-dense cellular compartment. The ER bodies are membrane-bound structures, containing two integral membrane proteins MEMBRANE OF ER-BODIES (MEB1) and MEB2. It is shown that MEB1 and MEB2 genes are homologous to *A.thaliana* VACUOLAR IRON TRANSPORTER (VIT1) transporter, and these proteins are responsible for iron transportation in yeast. However, the function of MEB1 and MEB2 *in planta* is not known. At first, I investigate the role of MEB1 and MEB2 in *A. thaliana*. As MEB1 and MEB2 are reported to be transporters, I hypothesized that MEB1 and MEB2 are involved in cation homeostasis. Secondly, I addressed the role of ER bodies and their substrates in root microbiota community assembly. To date, several studies have suggested that indole glucosinolates and their degradation products play a role in shaping root microbiota but the precise role of PYK10-mediated degradation of the indole glucosinolates is not known.

In this thesis, firstly, I have demonstrated the potential role of MEB1 and MEB2 in ER body morphology, ER body movement, and nutrient homeostasis. By advanced confocal microscopic analysis of the texture features I have shown that MEB1 and MEB2 are responsible for ER body

morphology and movement. By plant ionomics and by measuring the physiological parameters of the plants in controlled nutrient condition I suggested that ER bodies have a role in cation homeostasis. Overall, I have shown the potential role of MEB1 and MEB2 in ER bodies *in planta*.

Secondly, I have demonstrated the role of PYK10 and Trp-derived secondary metabolites in the composition of the root exudates by performing untargeted metabolomics. Further, I investigated the role of ER bodies in shaping the root-microbiota assembly. Considering the results from greenhouse experiments and root exudates, together with the fact that PYK10 and Trp-derivatives are abundant in roots, it is likely that compounds downstream of PYK10 and Trp-pathway in the root exudates are responsible for shaping the root-microbiota assembly. By conducting treatment experiments using natural soil and reconstituted microbiota with root exudates collected from a set of ER body and Trp-pathway compromised plants, I investigate the role of ER body-localized PYK10 myrosinase and Trp-pathway in modulating the composition of root microbiota. Particularly, I found that PYK10 and Trp-derived secondary metabolites produce root-exuding compounds that trigger the community shift in soil and synthetic bacterial community. Further, I examined the role of ER bodies in plant-fungi interactions in a mono-association setup using fungal strains, mutant plants, and wild type plant. I found that both the PYK10 and Trp-pathway have an overlapping behaviour toward a set of fungal strains.

Overall, in my thesis, I investigated the role of ER body membrane proteins MEB1 and MEB2 *in planta* and the role of ER body-localized PYK10 in shaping root microbiota.

Keywords: *Arabidopsis thaliana, ER bodies, glucosinolate, plant defense, membrane, organelle morphology, organelle movement, cation homeostasis, plant physiology, root-microbiota, root-secretions, secondary metabolites*

Aygen Uzun Baskin

21.06.22