

Signalübertragung bei der Salzstressantwort

Salzstressantwort – Einführung, Problem, Physiologie

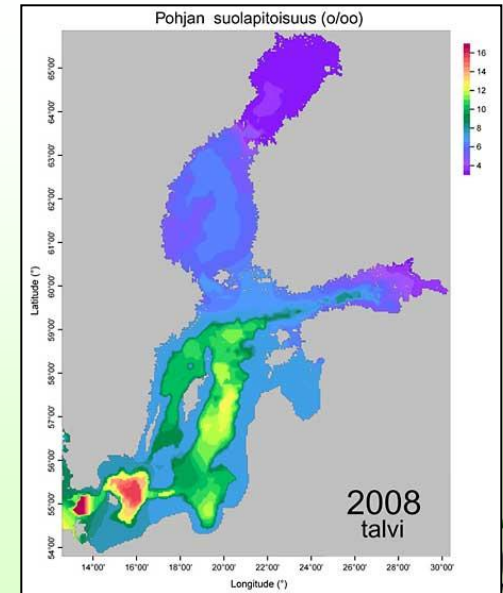
Salzstressantwort – Regulation in Hefen

Salzstressantwort – Unsere Arbeiten zu Cyanobakterien

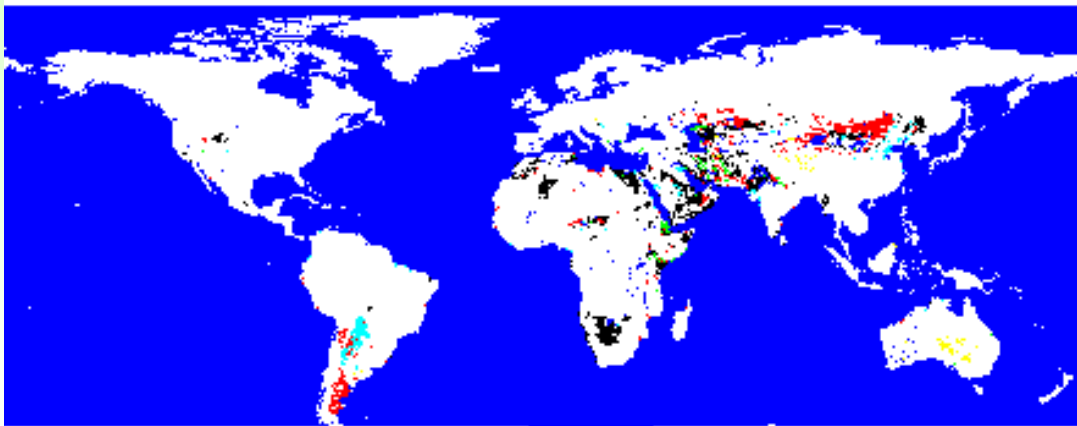
Salzstressantwort – Anpassungen von Pflanzen



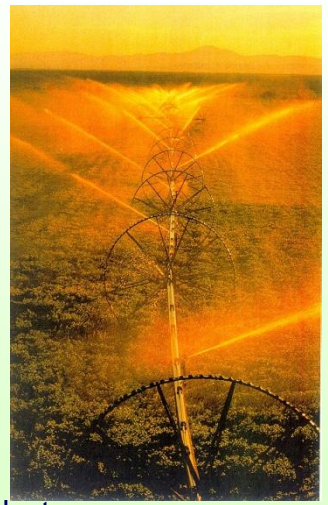
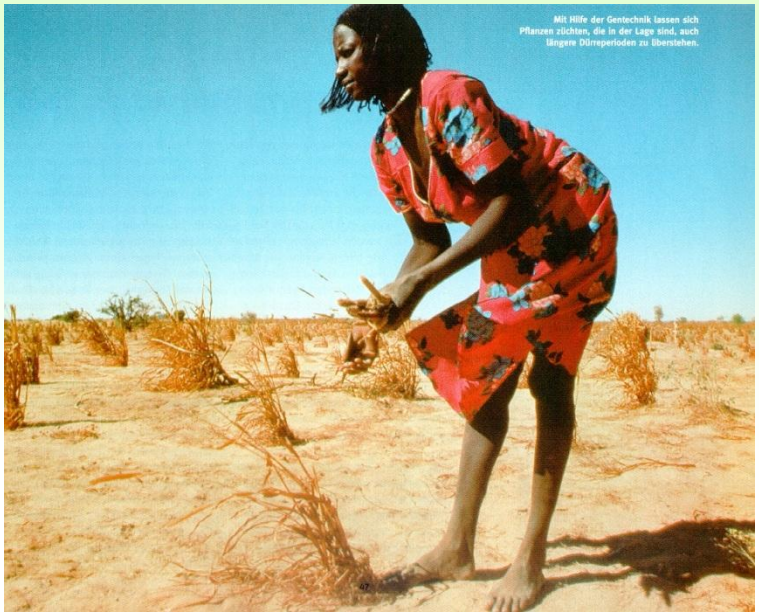
Initial motivation – what happens if cyanobacteria drift from freshwater into the Baltic Sea?



Trockenheit und Bodenversalzung sind ein globales Problem



White	in <1% of area
Black	in 1-10% of area
Red	in 11-20% of area
Orange	in 21-30% of area
Yellow	in 31-40% of area
Light Green	in 41-50% of area
Light Blue	in 51-60% of area
Dark Blue	in >60% of area

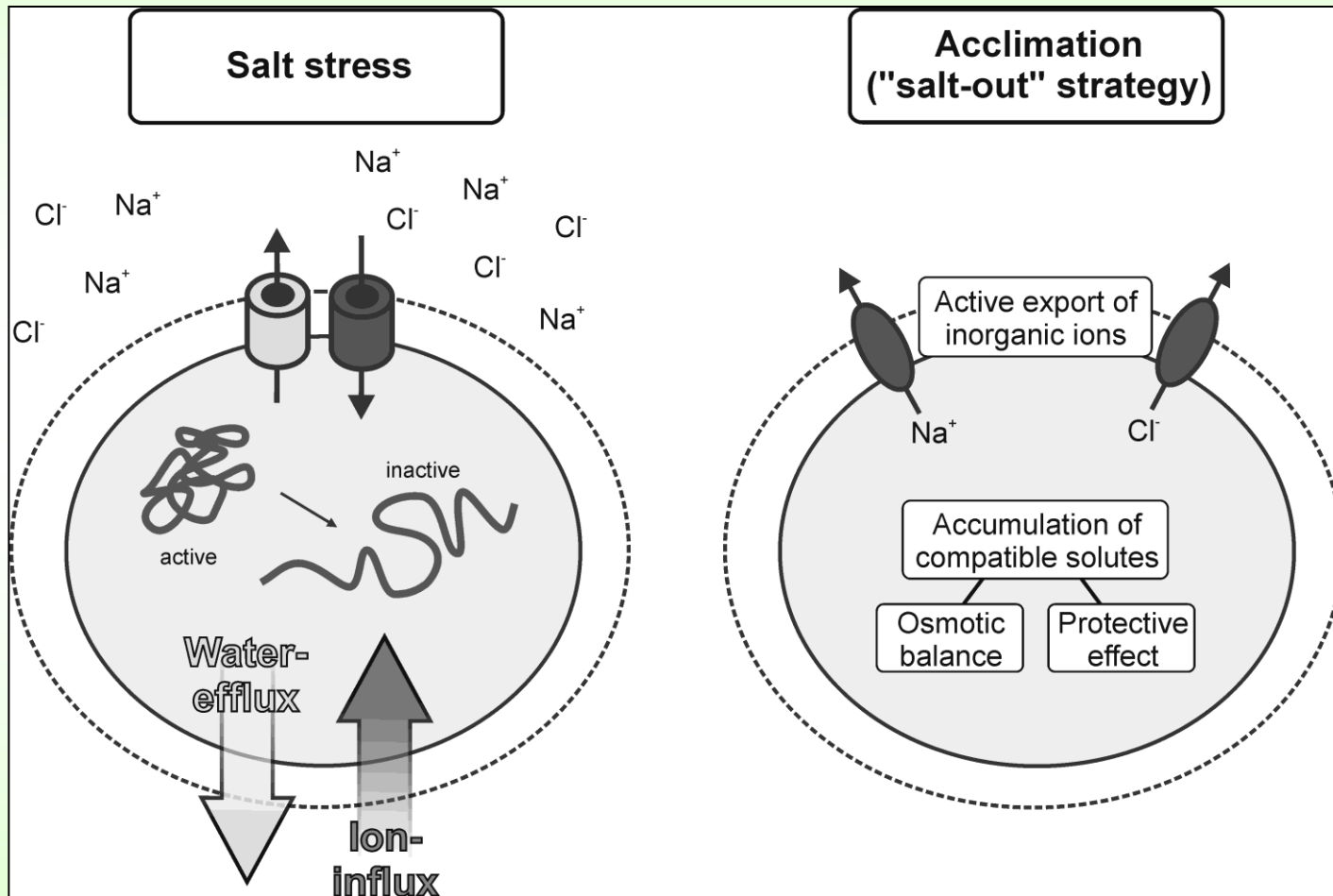


Salzstress

- 1/3 der bewässerten Anbauflächen zeigen erhöhte Salzbelastung (historisch Ägypten, Maya)
- es geht mehr Ackerland durch Versalzung verloren als neu dazu gewonnen wird
- ein großer Teil der Nutzpflanzen ist salzsensitiv
- Salz – eines der wichtigsten Handelsgüter bis heute



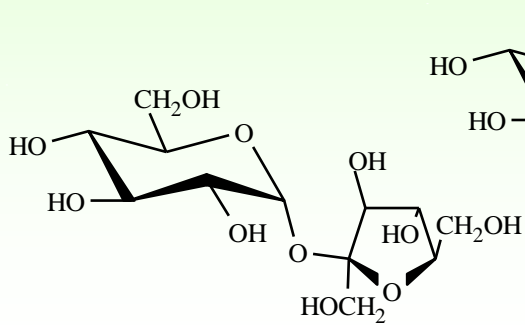
Salzstress – Ionenstress und Wasserstress (Trocken- und Kältestress)



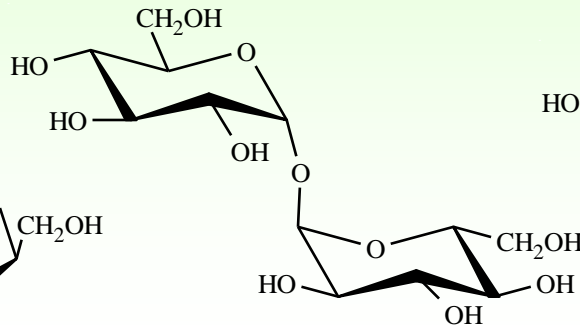
“Compatible Solutes” - Osmoprotektive Substanzen

Grundlage hoher Salztoleranz in Pro- und Eukaryoten

Kohlenhydrate

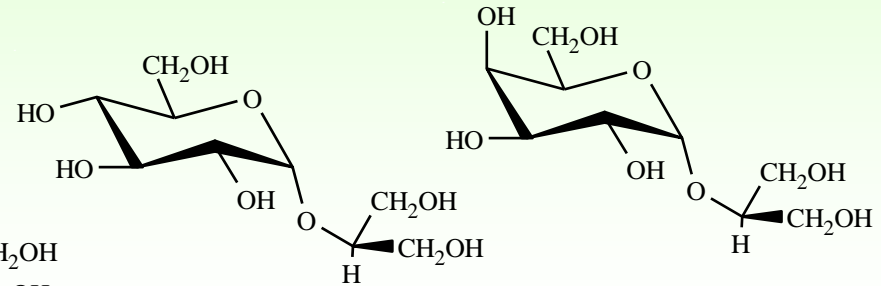


Saccharose



Trehalose

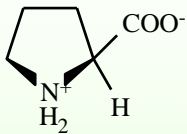
Heteroside



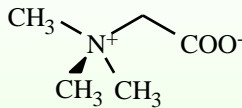
Glucosylglycerol

(Iso)Floridosid

Aminosäuren und -derivate

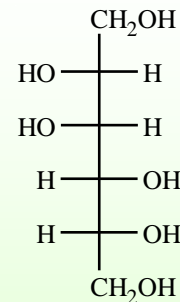


Prolin

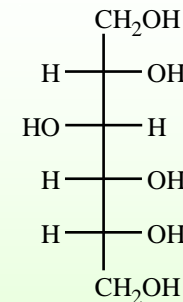


Glycinbetain

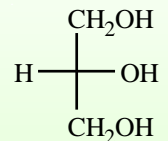
Polyole



Mannitol



Sorbitol



Glycerol

- Erhöhung der internen osmotischen Konzentration
- Direkter Schutz von Makromolekülen vor Denaturierung

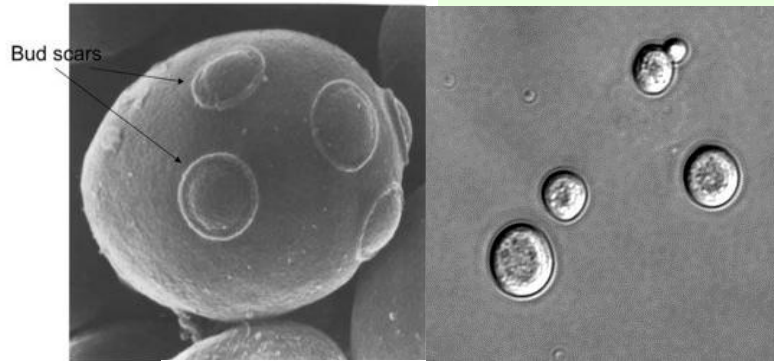
Salzstress



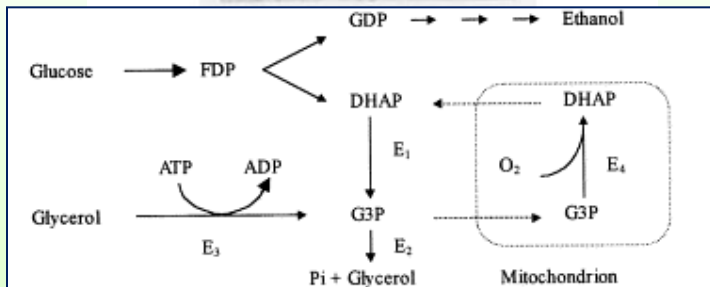
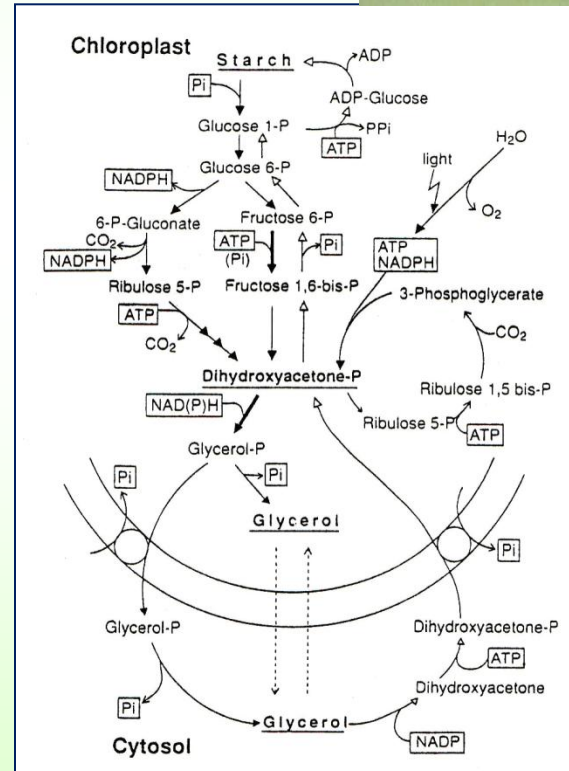
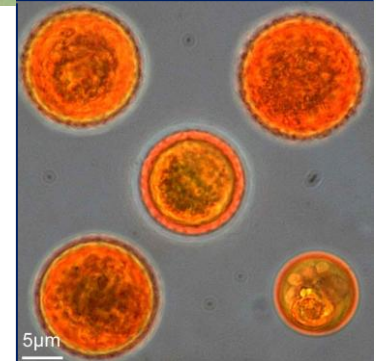
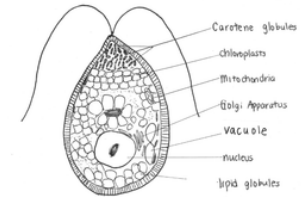
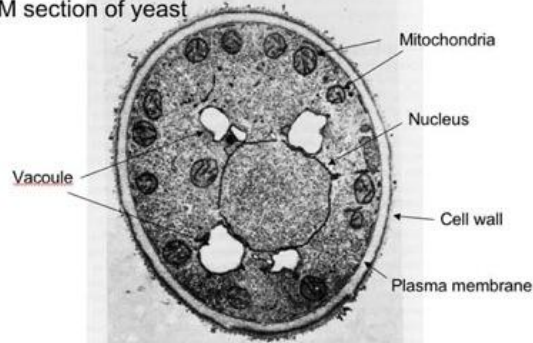
Glycerolanreicherung in Hefe und Dunaliella

Synthese ist nicht alles!

Glycerol wird aktiv im Cytoplasma durch Transporter zurückgehalten



EM section of yeast



GDP:	Glyceroldehyde 3-phosphate	FDP:	Fructose 1,6-diphosphate
DHAP:	Dihydroxy acetone phosphate	G3P:	3-Glycerol phosphate
E1:	G3P dehydrogenase	E2:	3-Glycerol phosphatase
E3:	Glycerol kinase	E4:	Mitochondrial G3P dehydrogenase



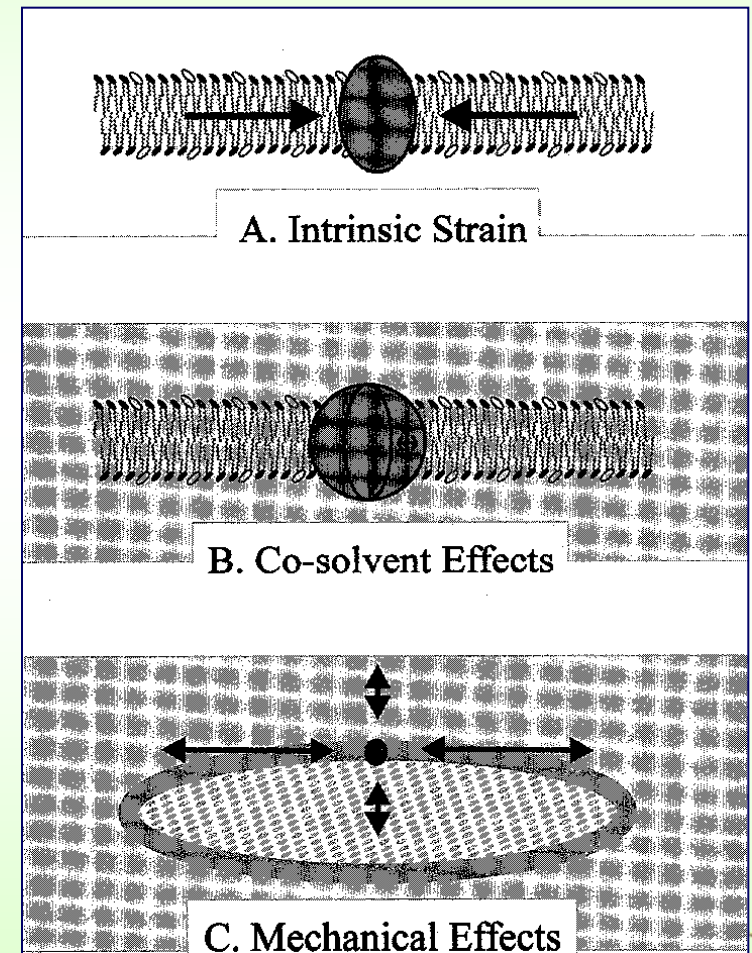
Wie wird Salzstress primär erkannt ?

Meist werden Membranprozesse verantwortlich gemacht

A: Membranspannung beim Schwellen und Schrumpfen

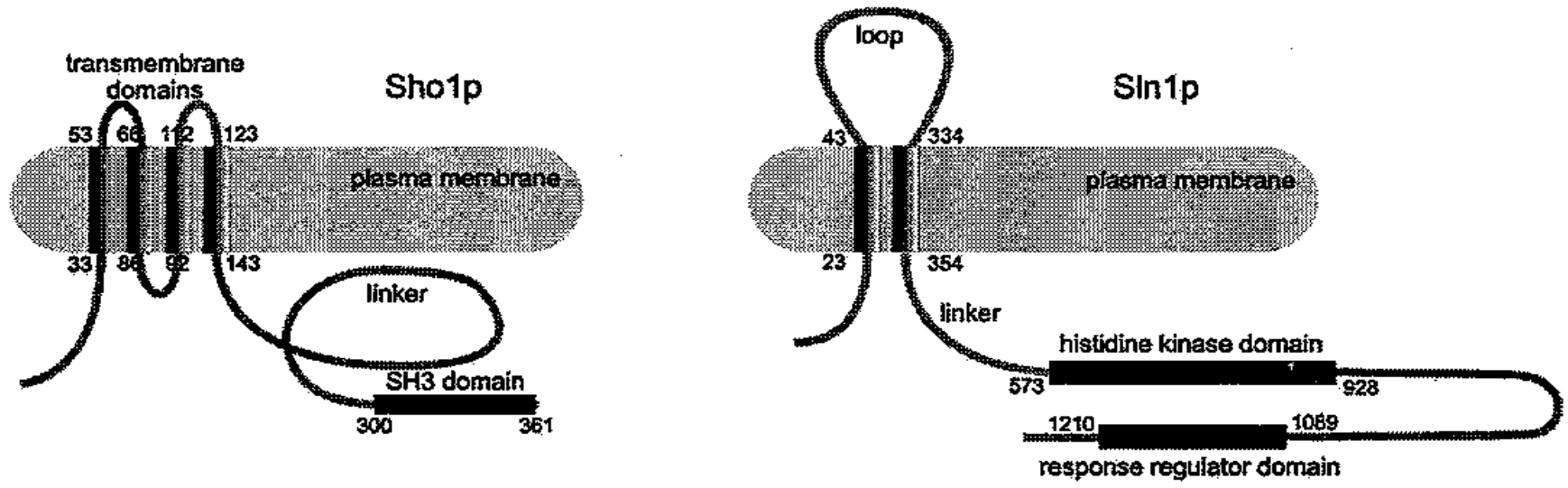
B: Interaktion mit Ionen oder anderen niedermolekularen Stoffen, macht auch lösliche Sensoren möglich

C: Mechanische Effekte, Turgordruck verändert Kontakt Membran und Zellwand



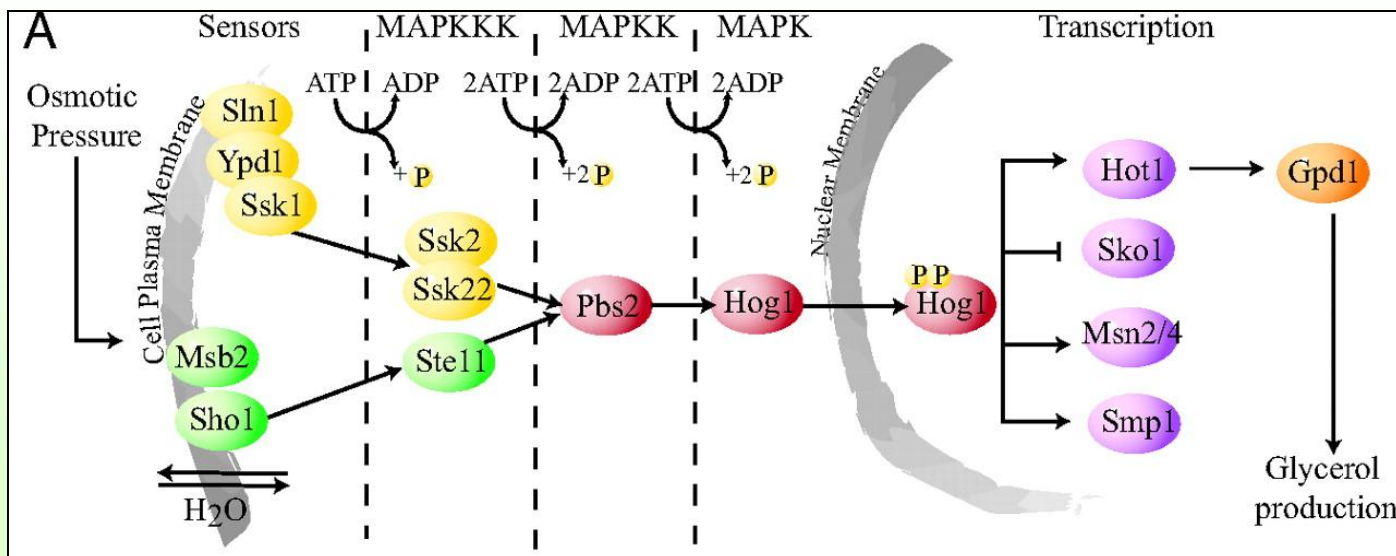
Signalleitung nach Salzstress in Hefen

1. Hefe (*S. cerevisiae*) akkumuliert Glycerol unter Salzstress
2. Glycerolsynthese und andere Salzstressantworten (ca. 100 Gene betroffen) werden durch den HOG-Signalweg aktiviert
3. Typischer MAP-Kinase Signalweg
4. Zwei vermutliche Salzsensoren identifiziert
5. Sho1p – Membranprotein, das einen Sensor komplex aufbaut
6. **Sln1p – Membranprotein**, das als Histidinkinase MAPK aktiviert
7. *E. coli* Histidinkinase EnvZ ist strukturell und funktionell sehr ähnlich!



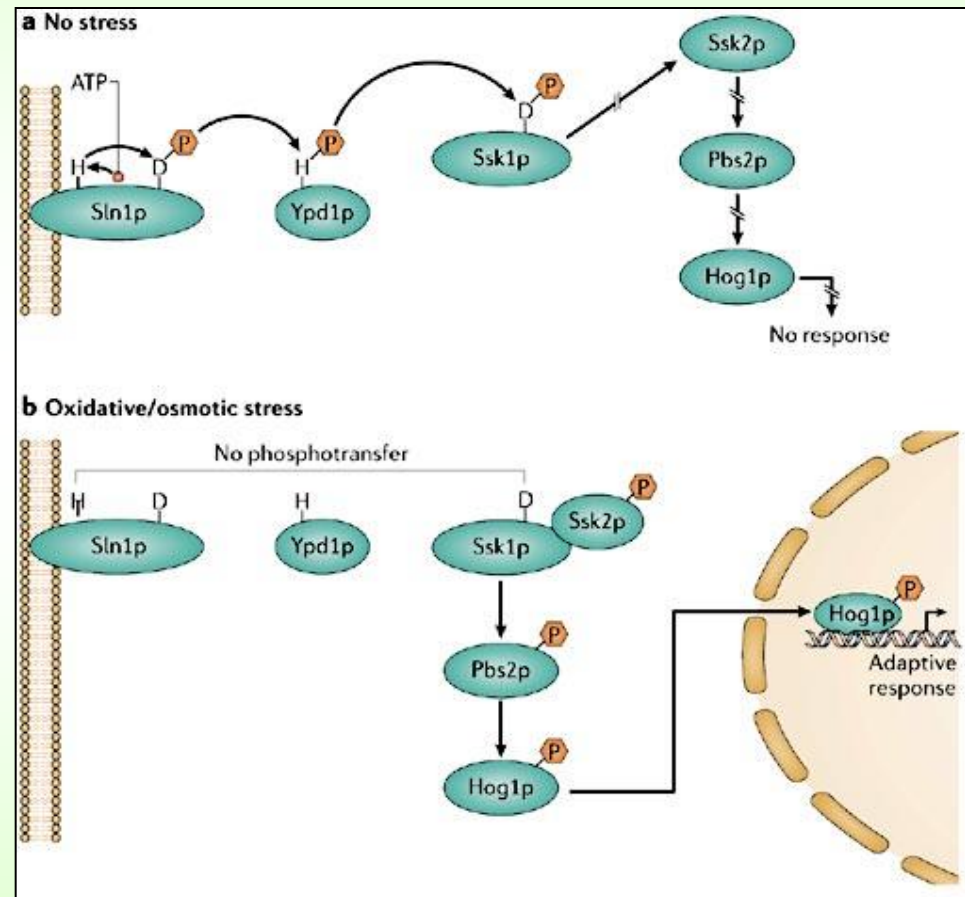
HOG (high osmolarity activated glycerol synthesis)- Signalweg

1. Zwei Sensorsysteme stimulieren den HOG-Weg
2. Wachstums- (Sho1) und Osmoreiz (Sln1 – negativer Regulator)
3. Sln1 phosphoryliert Ypd1 (his)
4. Ypd1 überträgt Phosphat auf Ssk1 (Asp), dessen Dephosphorylierung stimuliert Ssk2 und 22, MAPKKKs mit Response-Regulator-Domäne
5. Wege treffen sich bei Pbs2 (MAPKK) und stimulieren Hog1 (MAPK)
6. Mehrere Phosphatasen hemmen
7. Hog1 wird in den Kern importiert
8. TF aktiviert



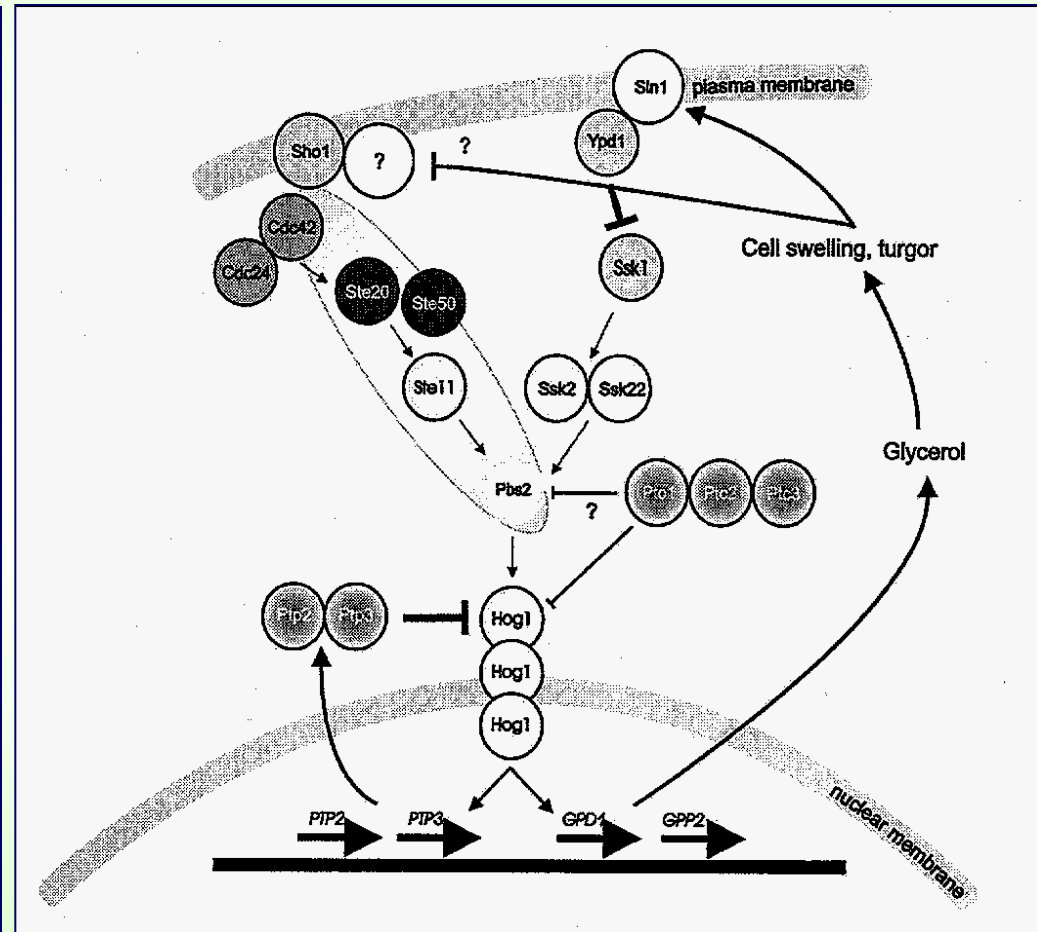
HOG (high osmolarity activated glycerol synthesis)- Signalweg

1. Sln1 – negativer Regulator, der spezifisch auf Salz- und Osmostress reagiert
2. Sln1 phosphoryliert Ypd1 (his),
3. **im Salz inaktiv oder vermindert, MAPK-Weg ist dann aktiv**
4. Hog1 wird in den Kern importiert
5. TF aktiviert
6. Glycerolsynthese u.a. aktiviert

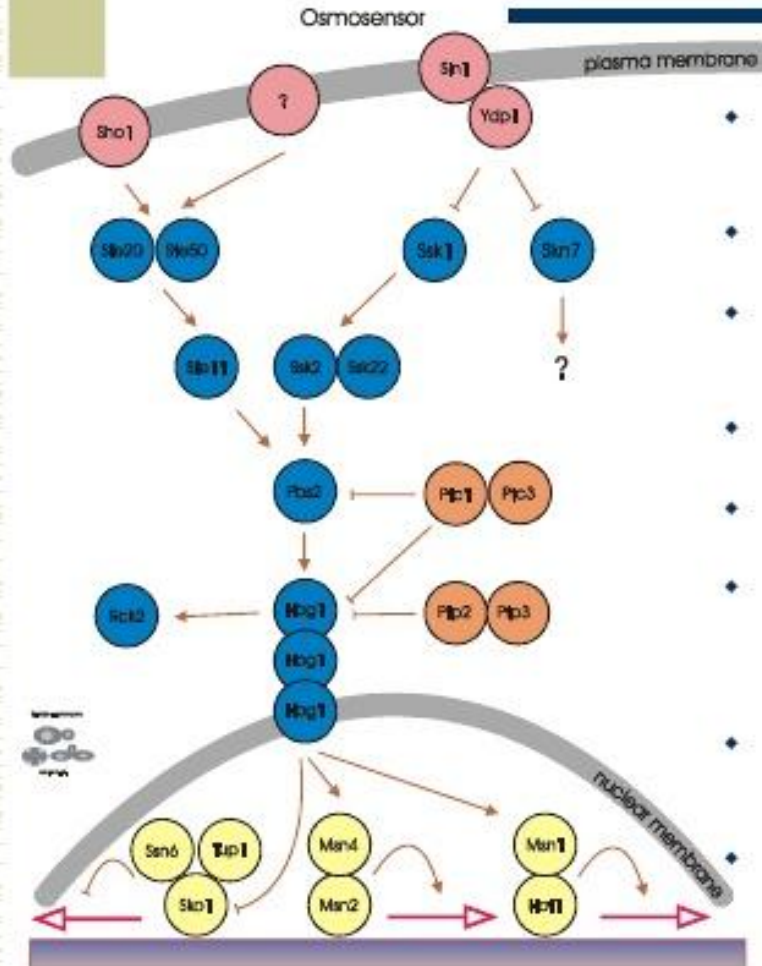
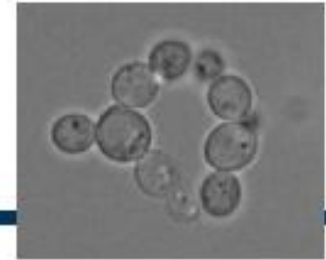


HOG-Signalweg ist ohne Salz oder in salzadaptierten Zellen inaktiv - Rückkopplung

1. HOG-stimulierte Gene kodieren Glycerolsyntheseenzyme, Turgor regeneriert
2. Sln1 – negativer Regulator ist aktiv
3. Sln1 phosphoryliert Ypd1 (His)
4. Ypd1 überträgt Phosphat auf Ssk1 (Asp) hemmt weiteren Weg
5. Auch Phosphatasen verstärkt exprimiert
6. Dephosphorylieren Hog1 u.a.



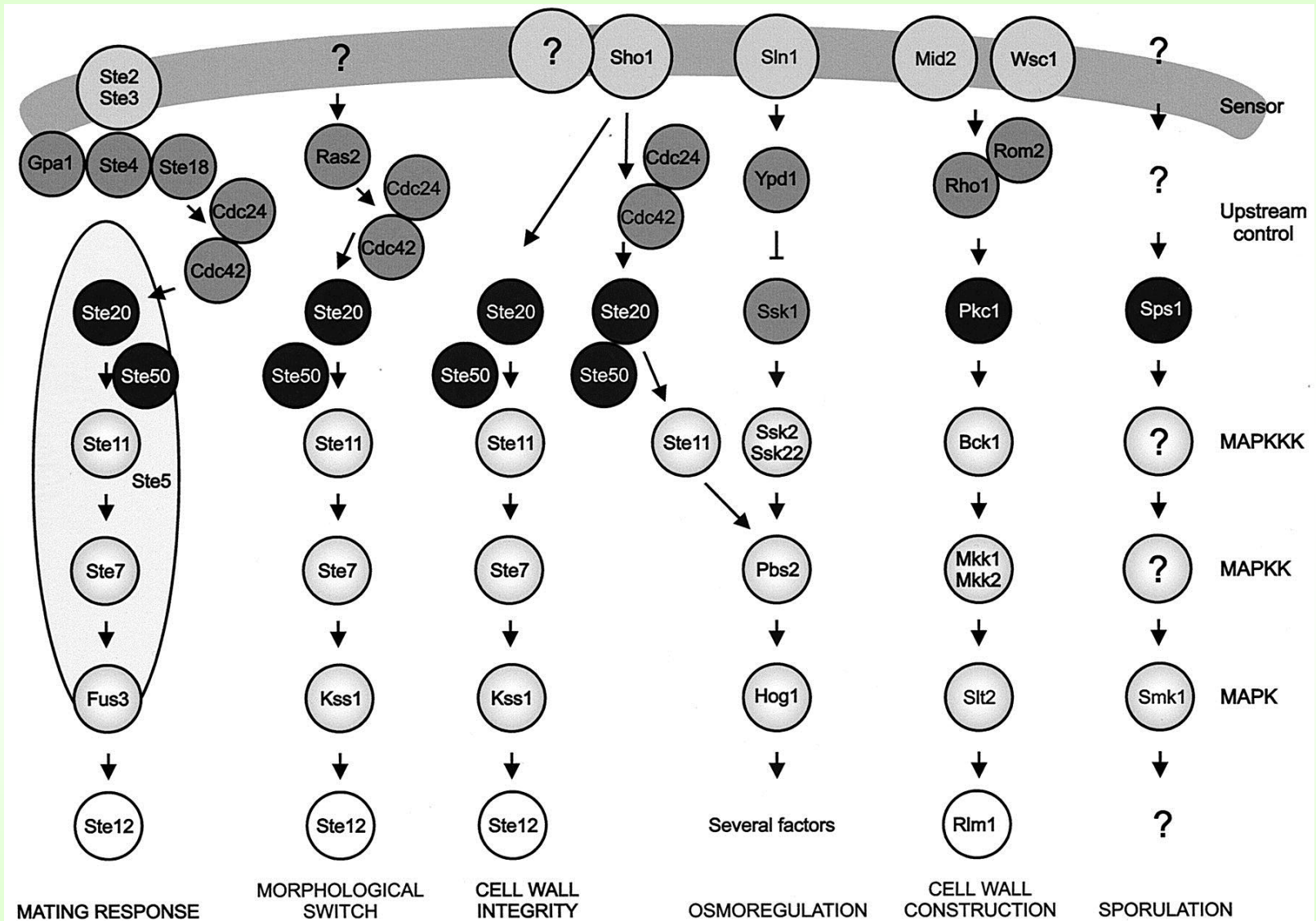
Genetic analysis in action: the HOG pathway



- The analysis of the osmosensing HOG pathway, on which we work, is a good example how different genetic tools work in action
- *PBS2* and *HOG1* were first identified in a genetic screen for salt sensitive mutants
- Deletion of *SLN1* is lethal because this sensor-histidine kinase is a negative regulator of the pathway and overactivation is deleterious
- Downstream kinases were identified as recessive suppressor mutations
- Protein phosphatases were found as multi-copy suppressors
- Targets are defined because their deletion allows, to different extent, survival of a *sln1* mutant (or commonly used an *ssk2ΔN*, which has a similar lethal effect)
- Parts of the *SHO1*-branch were found as synthetic osmosensitive mutants in combination with an *ssk2 ssk22* mutant, which is not osmosensitive
- The link between *Rck2p* and *Hog1p* and between *Hog1p* and *Hot1p* was found in two-hybrid screens

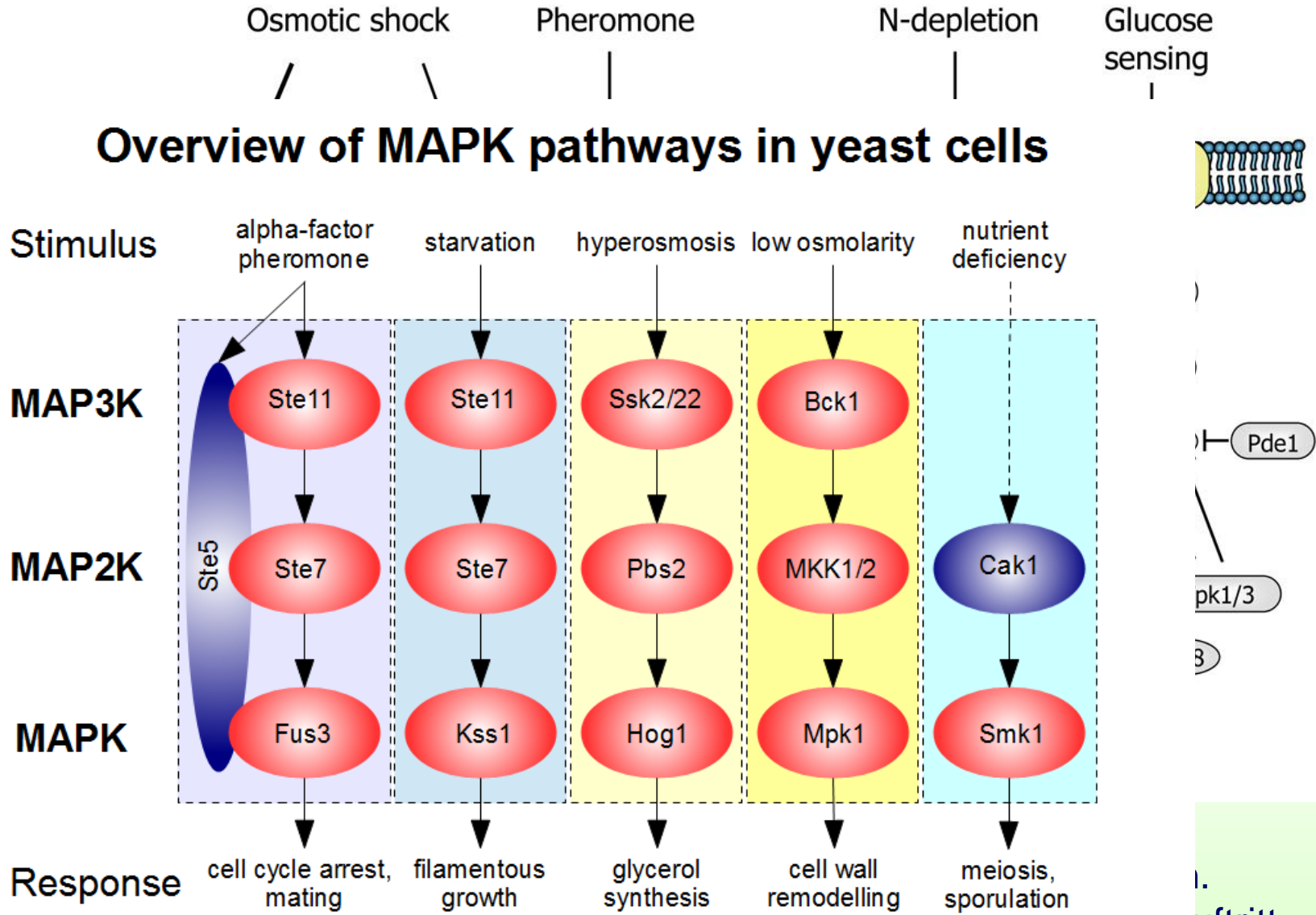


HOG-Weg ist einer von fünf MAPK-Wegen in Hefe



Yeast Signaling Pathways

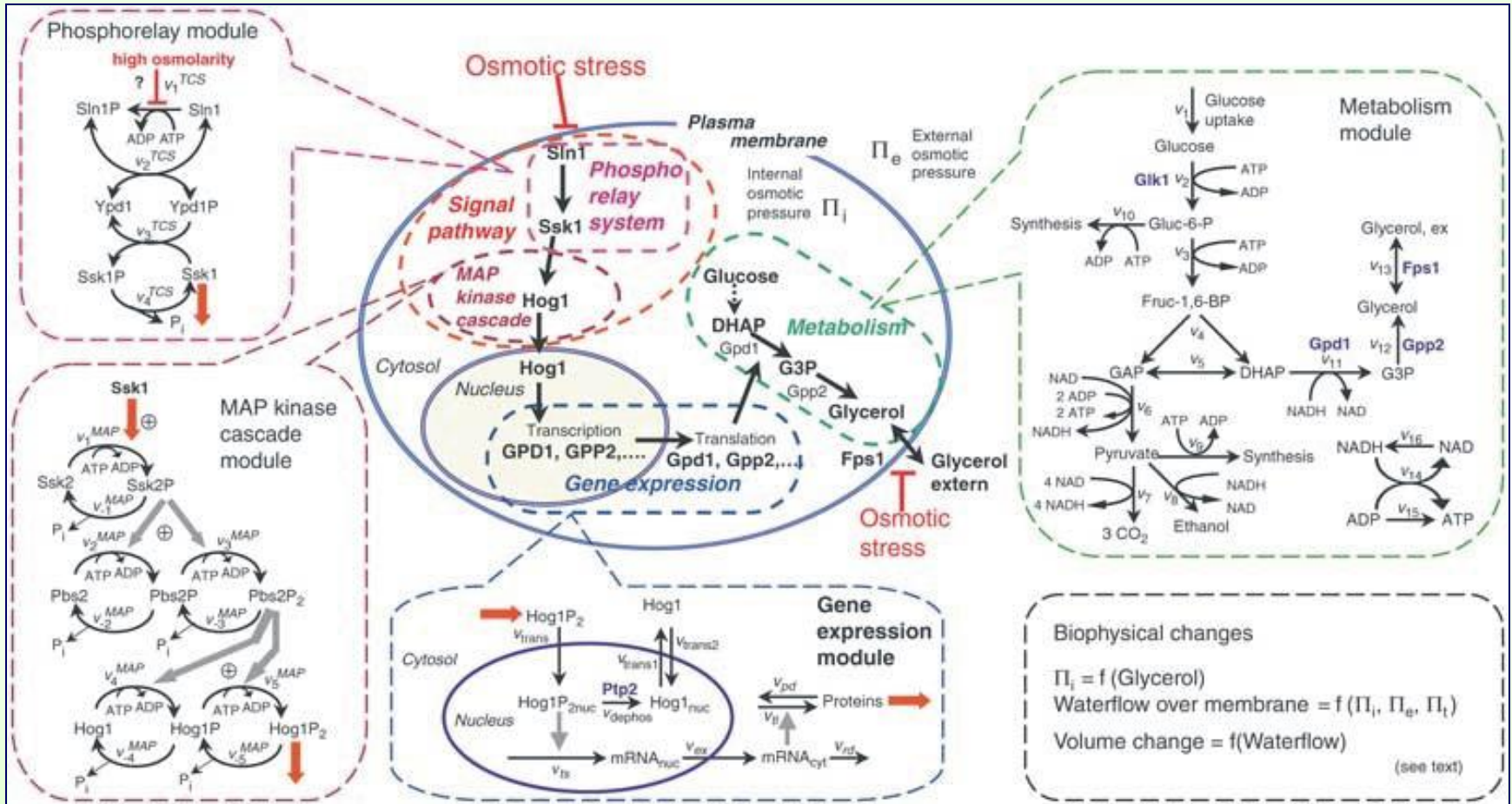
Overview of MAPK pathways in yeast cells



Zw
In
Ev

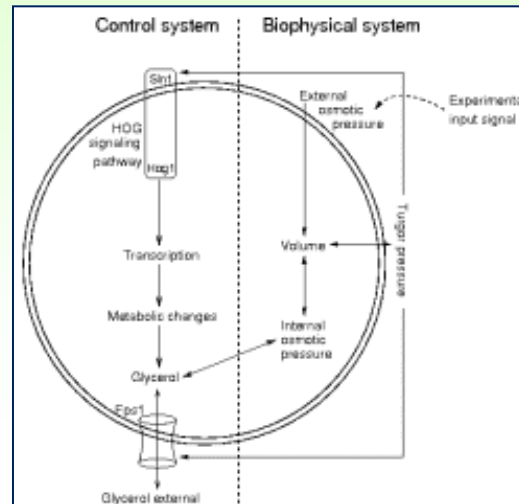


HOG (high osmolarity activated glycerol synthesis)- Signalweg – Kinetische Modelle existieren



Klipp et al., Nature Biotechnology 2005

Zusammenfassung – Salzstress in Hefe

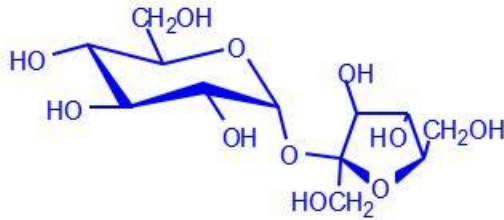


1. Salzstressantwort umfasst Ionen- und Osmoregulation
2. HOG-Signalweg in Hefen am besten bekannt
3. Zwei Membranproteine sind an der Aktivierung des HOG-Signalweges beteiligt, typischer MAPK-Weg mit Histidinkinase **Slr1** als Sensor
4. Das primäre Signal zur Aktivierung des Rezeptors ist unbekannt

Preferred compatible solute and salt tolerance correlate among cyanobacteria.

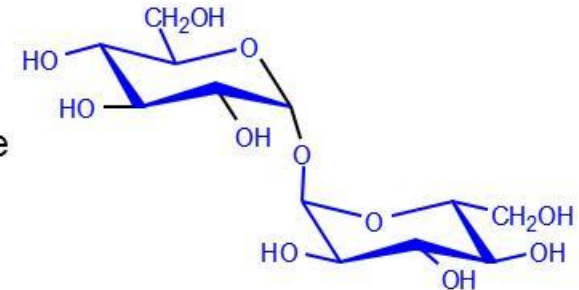
1. Fresh water strains: tolerance limit 0.6 M NaCl

Sucrose



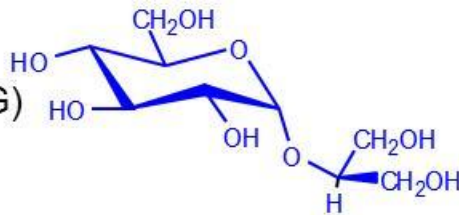
Synechococcus sp. PCC 7942

Trehalose



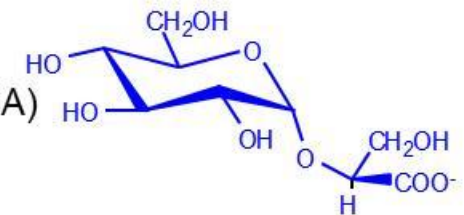
2. Moderate halotolerant (marine) strains: tolerance limit 1.7 M NaCl

Glucosylglycerol (GG)



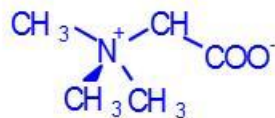
Synechococcus sp. PCC 7002

Glucosylglycerate (GGA)



3. Halophilic strains: tolerance limit 3.0 M NaCl

Glycine betaine



Synechococcus sp. PCC 7418

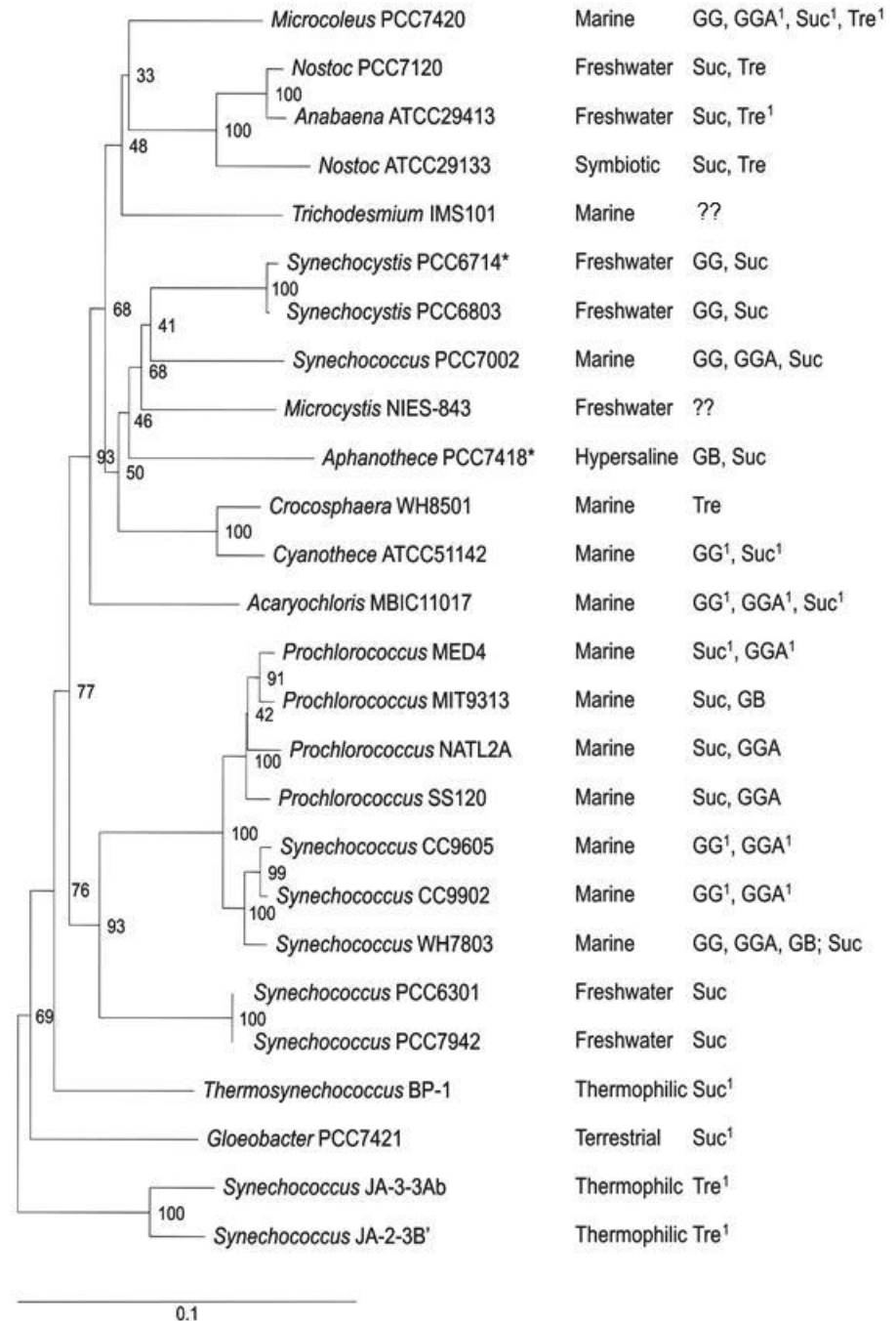


These compounds are osmotically active, are compatible with metabolism, and can directly protect proteins and membranes.

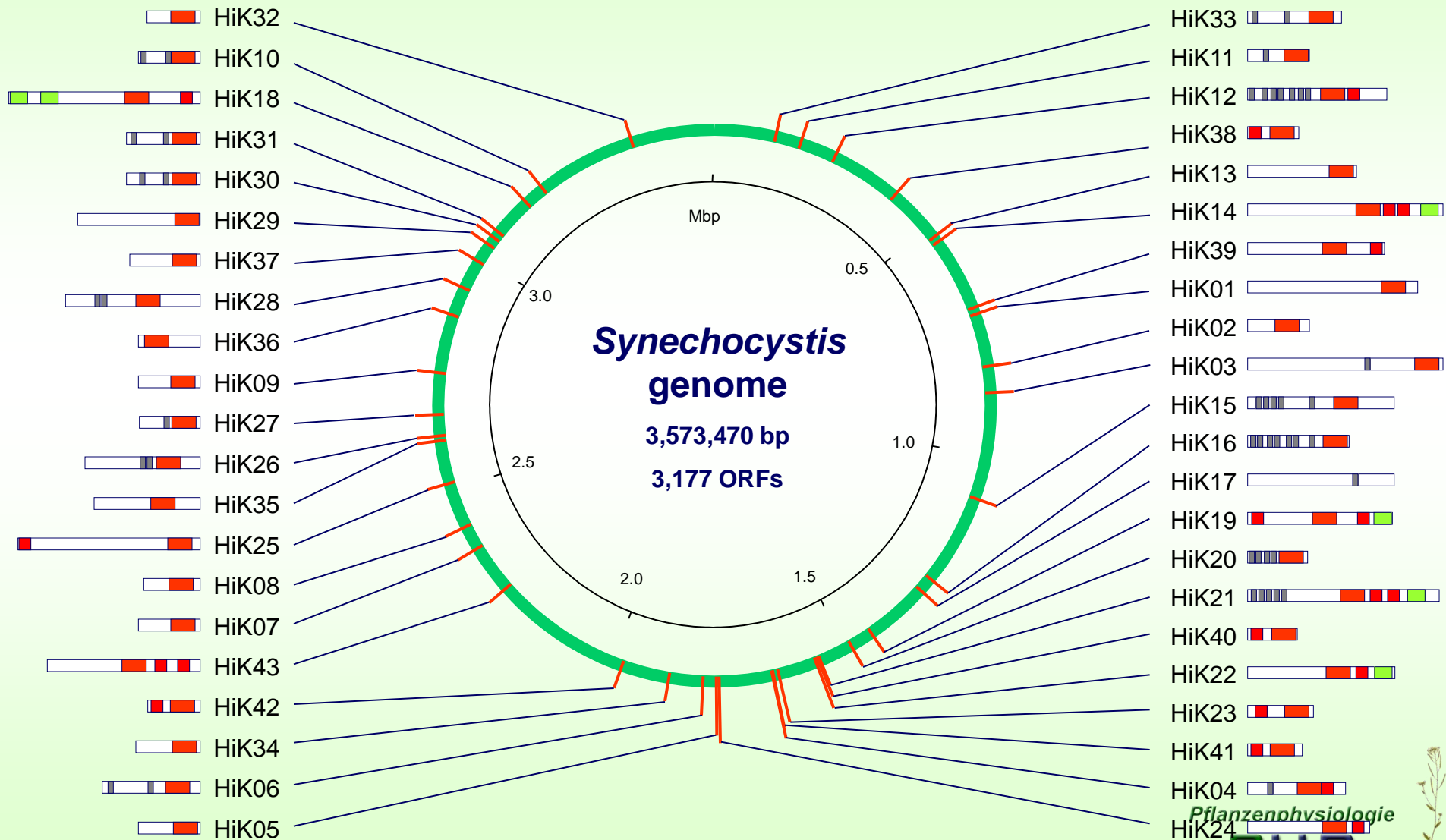
Some genomes display deviations from the expected pattern!

16s rDNA-based clustering of selected cyanobacteria (26) with known genome information including original habitats and possible compatible solute synthesis.

(Hagemann 2011, Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. FEMS Microbiol. Rev. 35: 87-123)



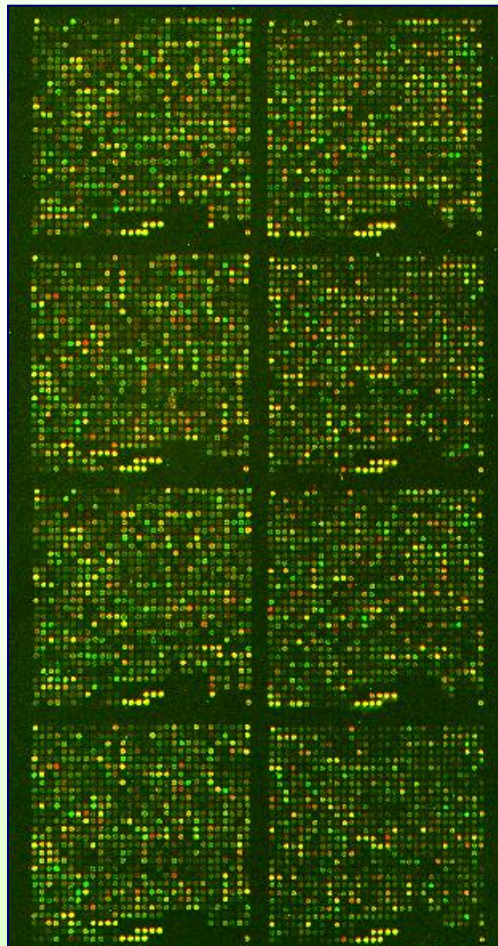
Dienen Histidinkinasen auch in anderen Organismen als Salzsensoren ? z.B. *Cyanobacterium Synechocystis* 6803



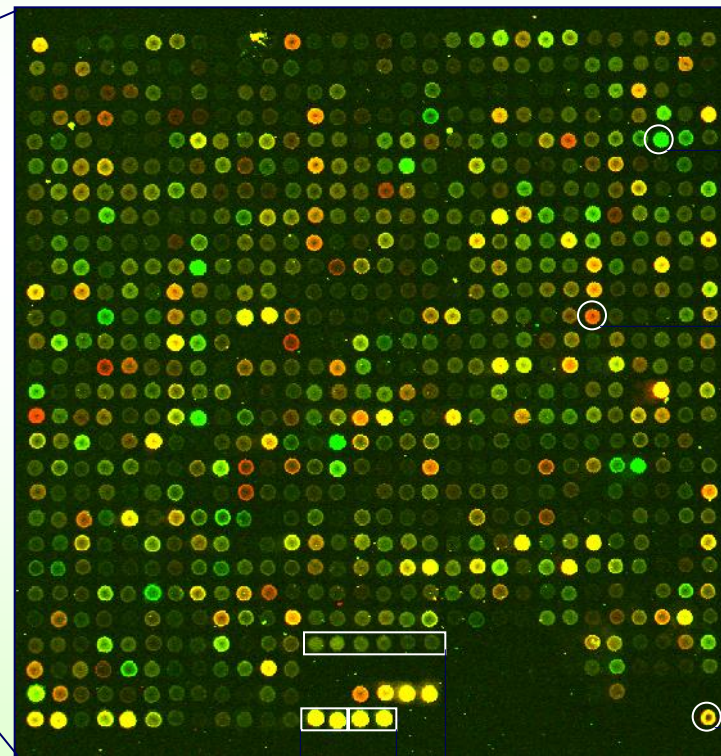
DNA-Microarray-Analyse von Salzinduzierten Genen

- Expression nur unter Kontrollbedingungen
- Expression nur unter Stressbedingungen
- Gleiche Expression unter Kontroll- und Stressbedingungen

(TaKaRa)



Salzstress



ggpS

phy

Positionsmarker

16SrDNA

23SrDNA

chromosomale DNA

Pflanzenphysiologie

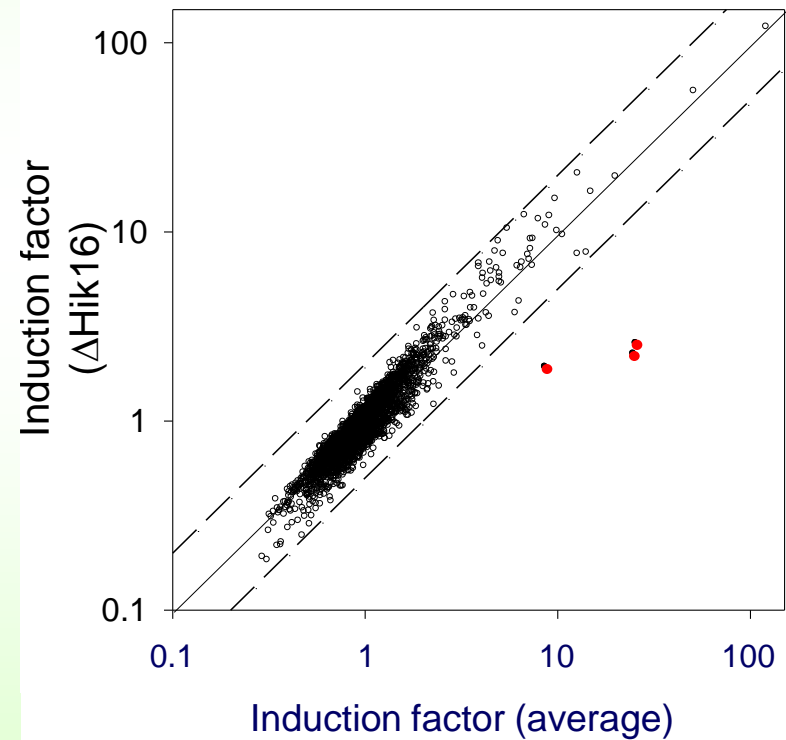
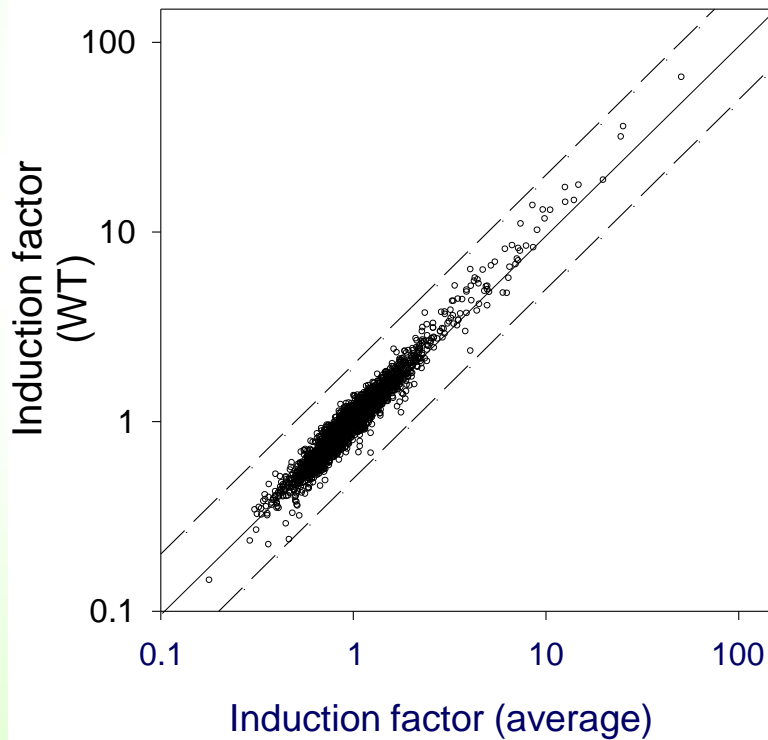
PUR

Universität Rostock

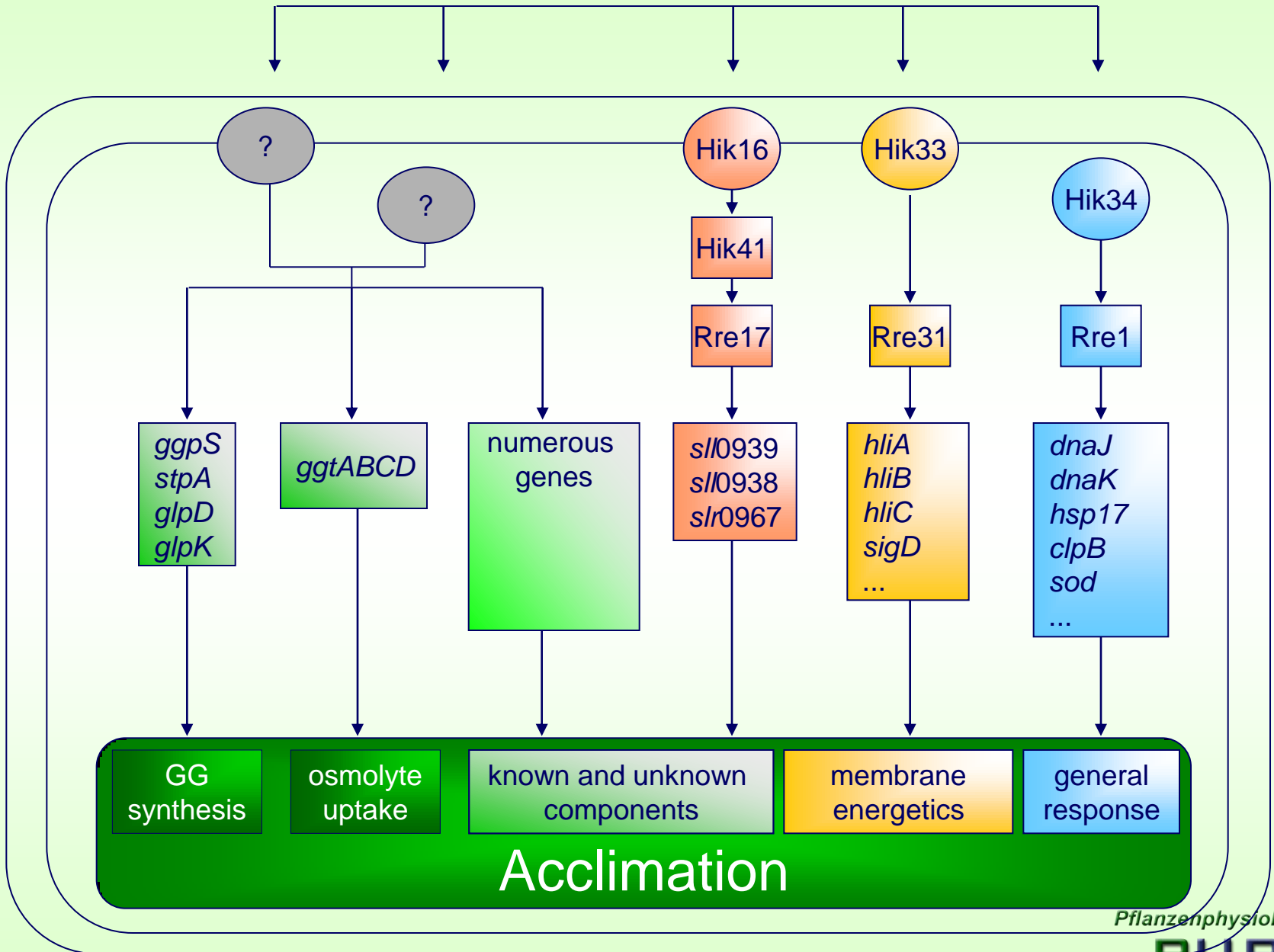
Seite 20



Salzregulierten Genexpression in Histidinkinase-Mutanten von *Synechocystis*: DNA-Microarray-Analyse

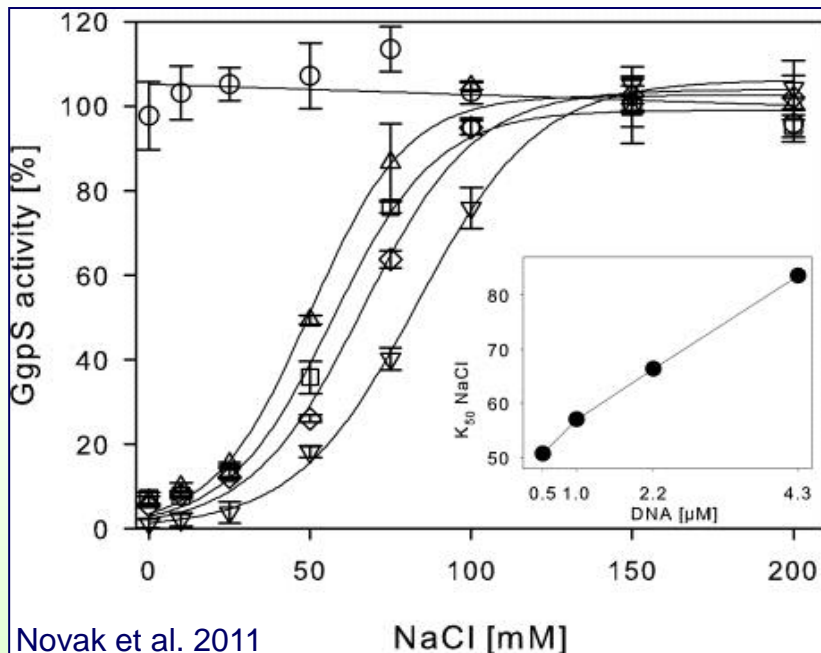


Salt-stress induces multiple regulatory pathways

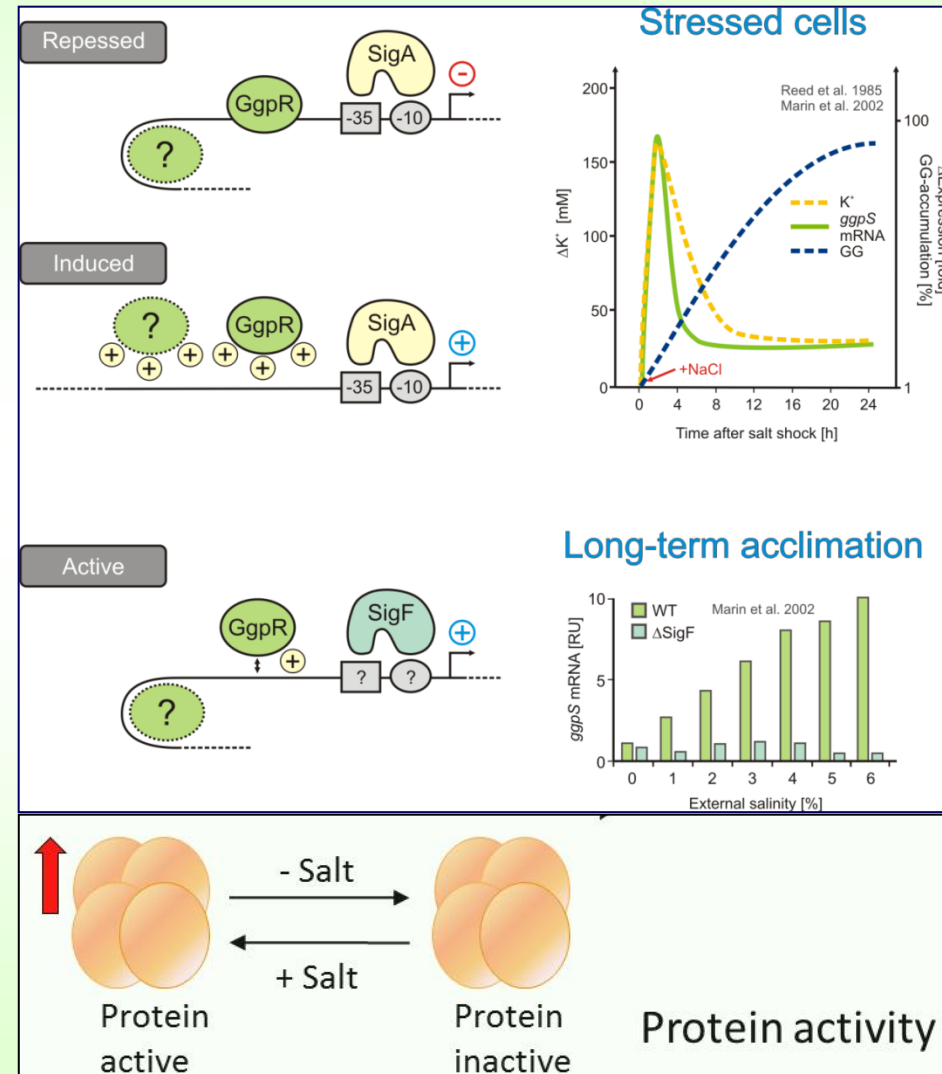


Bedarf es überhaupt eines Sensorsystems für Salz in Einzellern – direkte Regulation durch Ionen ausreichend?

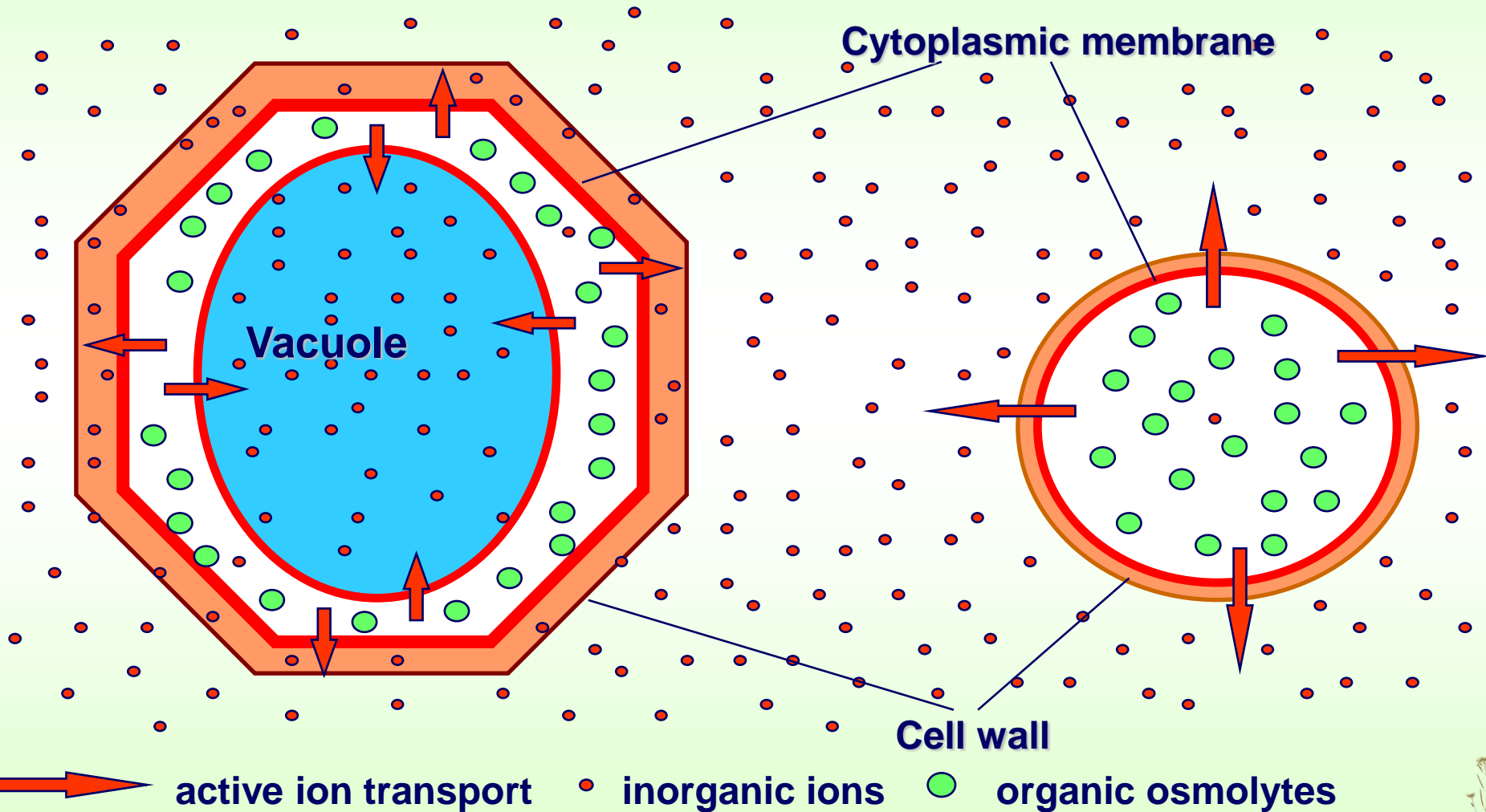
- GGPS in crude extracts is inactive and becomes active after addition of NaCl.
- Pure recombinant GGPS is active at low and high NaCl amounts (circles).
- Addition of DNA to pure GGPS restores the NaCl dependence of its activity!



DNA acts as an GGPS inhibitor at low ionic strength!

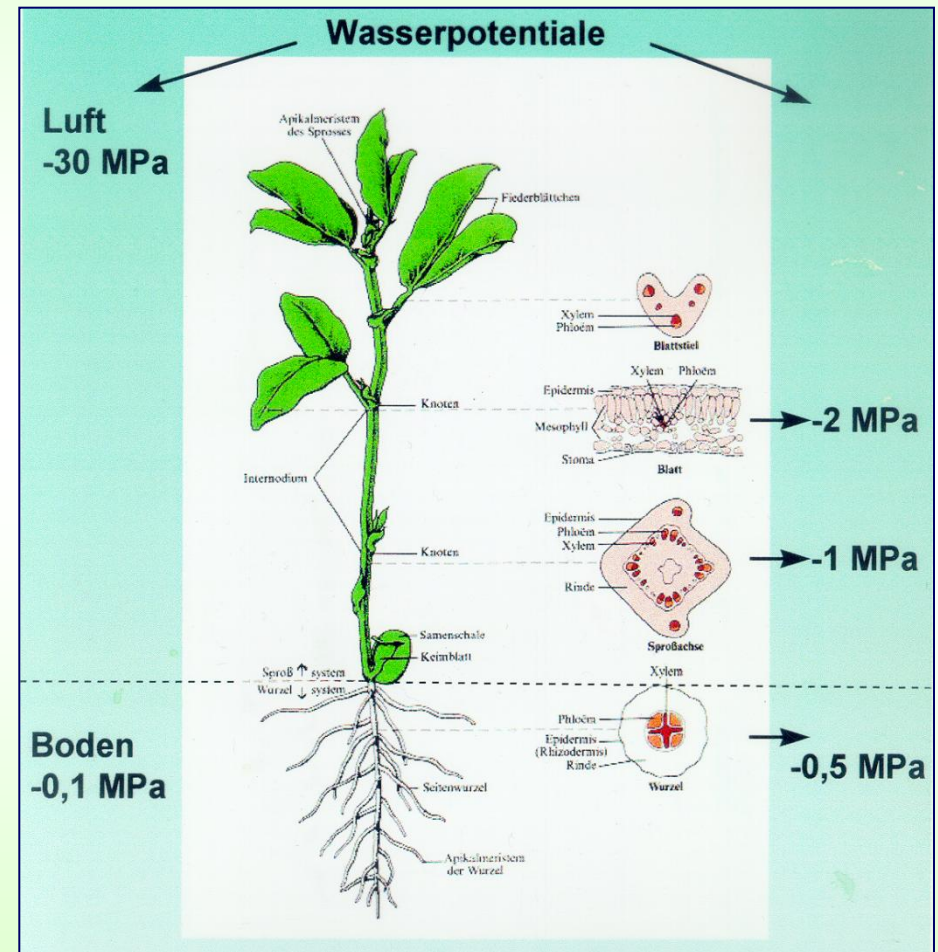


Zelluläre Kompartimentierung von Ionen und Osmolyten

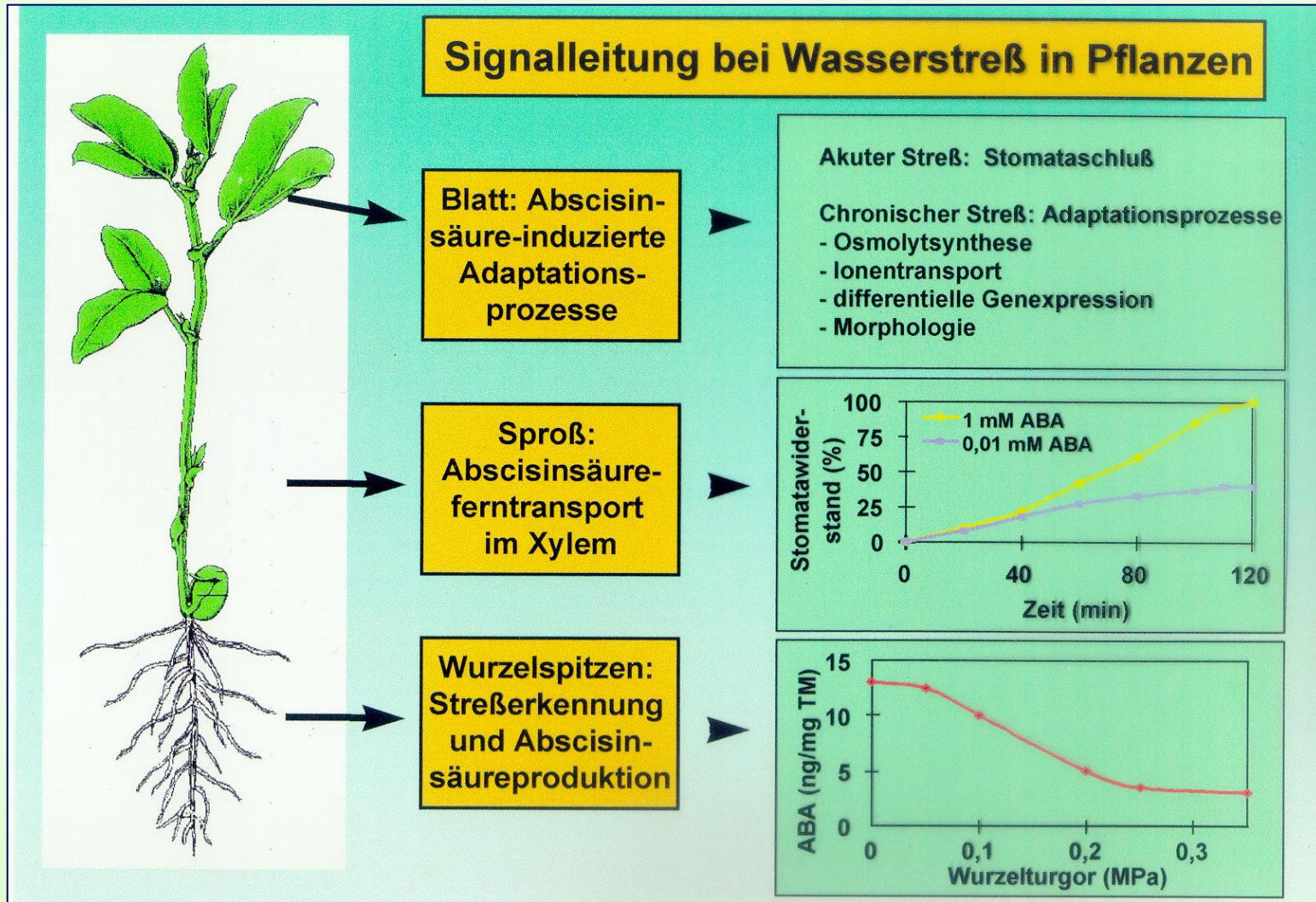


Salz- und Trockenstress bei Pflanzen – Differenzierter Kormus bedarf Kommunikation zwischen den Organen

1. Anpassungen an verschiedene Standorte
Halo- und Glykophyten
2. Überlappungen in der Stressantwort auf Salz & Trockenheit, da in beiden Fällen das Wasserpotential im Boden sinkt
3. Spezifische Antworten auf Salz beinhalten u.a. Ionentransporte

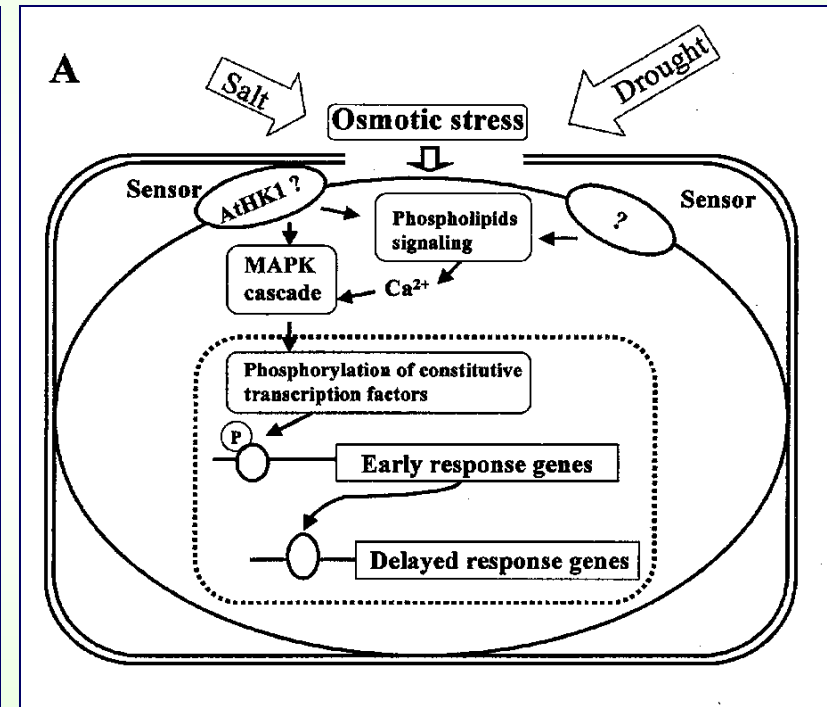


Die Vermittlung von Wasserstress im Boden erfolgt v.a. durch Abscisinsäure (Aba)



Generelle Sicht auf pflanzlichen Osmostress in Einzelzellen

1. Sensor ist unbekannt, AtHK1 ist Sln1p ähnlich (Struktur & Funkt.)
2. Ca^{2+} und IP3 Signale
3. MAPK-Kaskade beteiligt (viele pflanzliche Kinasen identifiziert, die osmotisch reguliert sind)
4. Transkriptionsfaktoren werden reguliert
5. Spezifische Promotorelemente gebunden



Transkriptionsfaktoren und cis-Elemente in der Salz- und Trockenstressantwort bei Pflanzen – zentrale Rolle von Aba

TABLE 1 *cis*-acting promoter elements on delayed-stress response genes and transcription factors (encoded by early-response genes) that bind to them

<i>cis</i> element	Gene	Transcription factor name	Transcription factor type	Transcription factor expression is induced by	References	
DRE	TACCGACAT	rd29A	DREB2A	AP2	Dehydration, ABA	Arabidopsis (56, 71)
DRE		rd29A	DREB2B	AP2	Dehydration, salt	Arabidopsis (56, 71)
DRE		rd29A	CBF1/DREB1B	AP2	Cold	Arabidopsis (19, 96, 97)
DRE		rd29A	CBF2/DREB1C	AP2	Cold	Arabidopsis (19, 96, 97)
DRE		rd29A	CBF3/DREB1A	AP2	Cold	Arabidopsis (19, 96, 97)
ABRE	CACGTGGC	Em	EmBP1	bZIP		Wheat (20)
ABRE	CCACGTGG		TAF-1	bzip		Tobacco (74)
ABRE			OSBZ8	bZIP	ABA	Rice (70)
ABRE			osZIP-1a	bZIP		Rice (72)
ABRE	(T/G/C)ACGT(G/T)GC	Osem	TRAB1	bZIP	ABA	Rice (27)
ABRE		rd29B	AREB1	bZIP	Dehydration, salt	Arabidopsis (9, 17, 102)
	GNGGTG/GTGGNG	MsPRP2	Alfin1	zink-finger		Alfalfa (4)
MYCRS	CANNTG	rd22	RD22BP1	myc	Dehydration, ABA	Arabidopsis (1)
MYBRS	NyAACPyPu	rd22	AyMyb2	myb	Dehydration, ABA	Arabidopsis (104)

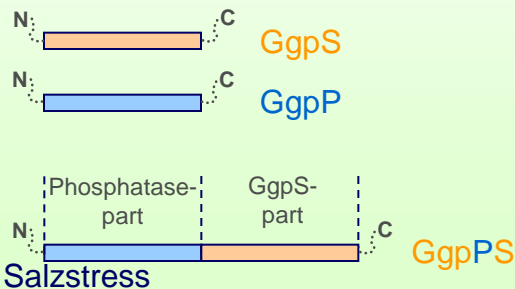
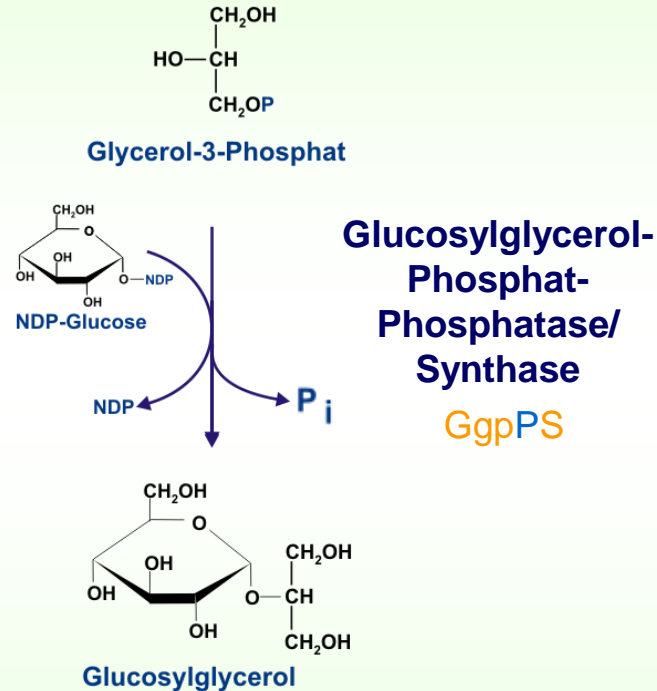


Transgene Pflanzen mit mikrobiellen Genen zur Osmolytsynthese zeigen z.T. eine erhöhte Salz- bzw. Trockentoleranz

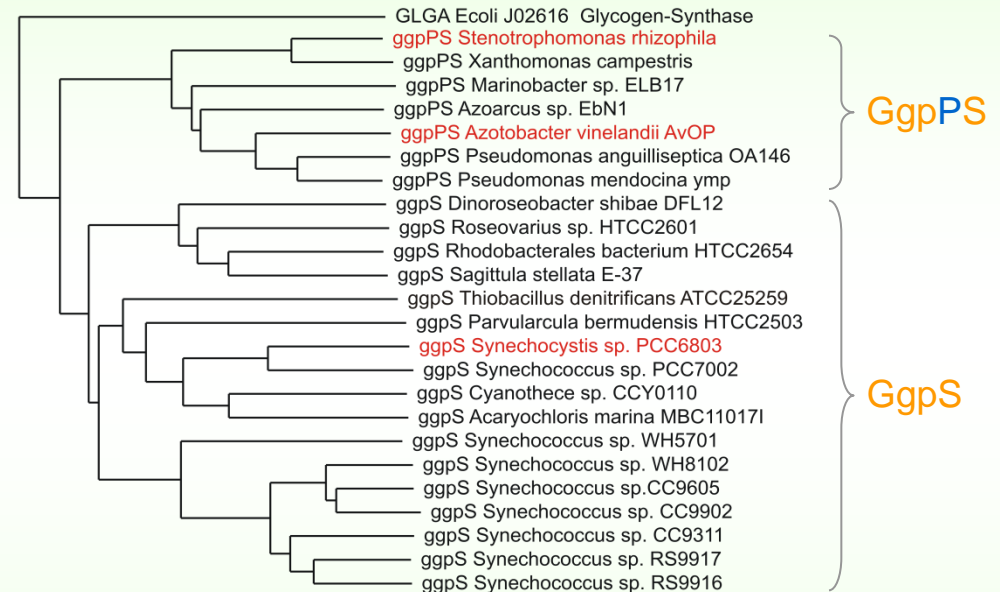
osmolyte	gene/protein	source	plant	observed effects	references
Mannitol	<i>mtlD</i> Man-1-P-DH	<i>E. coli</i>	<i>N. tabacum</i>	synthesis of mannitol-1-phosphate; dephosphorylation by a plant non-specific phosphatase, increased salt tolerance	Tarczynski et al. 1992, 1993
			<i>Arabidopsis thaliana</i>	4fold increase in salt tolerance (bis 300mM),	Thomas et al. 1995
			<i>N. tabacum</i>	increased stress tolerance after transport in chloroplasts	Shen et al. 1997
Glycine betaine	<i>codA</i> Cholineoxidase	<i>Arthrobact. globiformis</i>	<i>Synecho-coccus</i>	constitutive expression led to betaine-accumulation (60-80 mM); erhöhte increased tolerance against salt, cold and light stress	Deshnium et al. 1995, 1997
	<i>betB</i> Betaine aldehyde-DH	<i>E. coli</i>	<i>N. tabacum</i>	± transit sequenz for chloroplast import; in both cases betaine synthesis observed after supply of betaine aldehyde	Holmström et al. 1994
Trehalose	<i>otsA (+ otsB)</i> Tre-P-synth. (Tre-P-Pho.)	<i>E. coli</i>	<i>N. tabacum</i> <i>Solanum tuberosum</i>	slight trehalose accumulation in tabacco, none in potata, only after inhibition of trehalase visible, constitutive expression led to morphological changes	Goddijn et al. 1997
	<i>tps1</i> Tre-P-synth.	<i>S. cerevisiae</i>	<i>N. tabacum</i>	accumulation of small amounts of trehalose (5mM); increased desiccation tolerance, in chloroplasts effective against light stress	Holmström et al. 1996
Proline	<i>p5cs</i> Δ1-pyrrolin-5-carboxylate-S.	<i>E. coli</i>	<i>N. tabacum</i>	20fold over-accumulation of proline → slight increased tolerance against salt and desiccation	Kishor et al. 1995
Fructane	<i>sacB</i> Levan-sucrase	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>N. tabacum</i>	one step synthesis → accumulation of fructans increased growth under drought conditions	Pilon-Smits et al. 1995
D-Pinitol	<i>lmt1</i> Inositol-O-methyl transferase	<i>Mesem. crystallinum</i>	<i>N. tabacum</i>	instead of pinitol the accumulation of ononitol was observed, since tabacco has no corresponding epimerase	Vernon et al. 1993
Inositol	<i>TUR1</i> Inositol-3-phosphate-synthase	<i>Spirodela polyrrhiza</i>	<i>A. thaliana</i>	4fold increase in inositol. no phenotypical changes, no effect on salt tolerance	Smart and Flores 1997

Erzeugung salztoleranter Pflanzen durch Transfer von bakteriellen Salzresistenzgenen

GG-Synthese in heterotrophen Bakterien



Phylogenetischer Vergleich von Proteinen mit wahrscheinlicher GG-Phosphat-Synthase Aktivität



1. abweichende Struktur zu cyanobakteriellem Typ
 2. Fusionsproteine mit beiden Aktivitäten
- Möglichkeit zur effektiveren Synthese

Hagemann et al. (2008) *J. Bacteriol.*

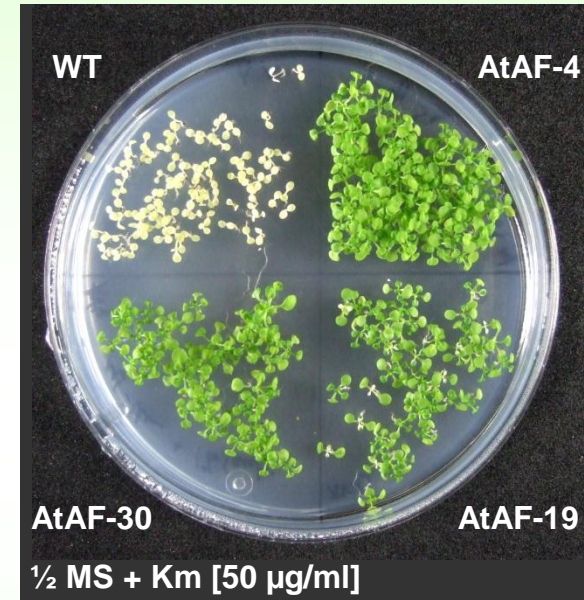
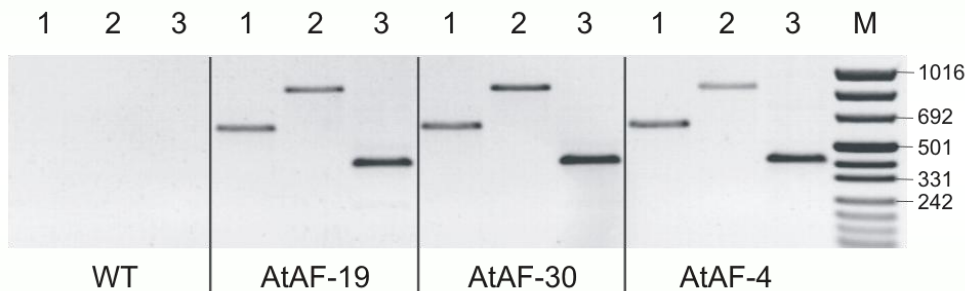
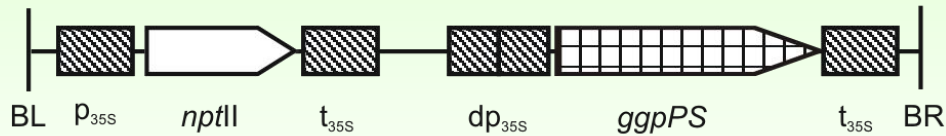
Pflanzenphysiologie

PUR

Universität Rostock



Klonierung des *ggpPS* Gens in einen Pflanzenvektor

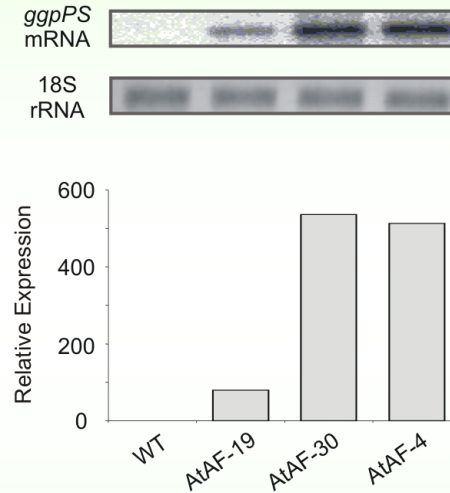
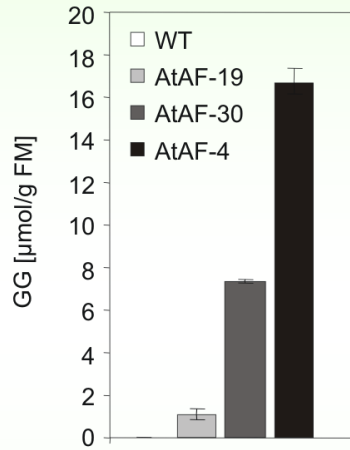


1. *Agrobacterium*-vermittelter Gentransfer (zufällige Insertion einer T-DNA)
2. Selektion von über 30 Linien
3. Beschränkung auf 3 Linien mit stabiler T-DNA-Insertion für physiologische Untersuchungen

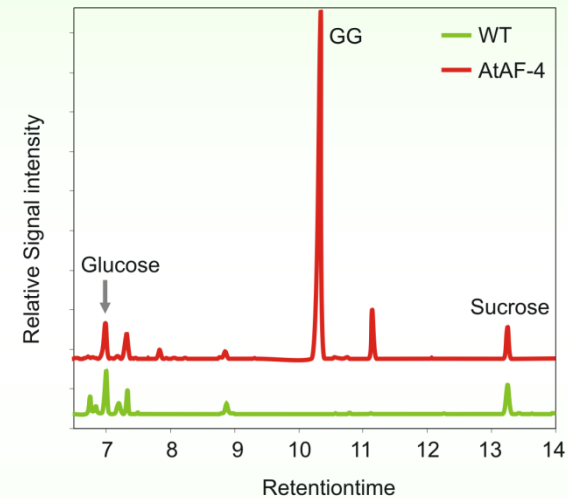


Expression des *gppPS* Gens und GG in Arabidopsis

GG-Mengen und Expression von *gppPS* in Blättern



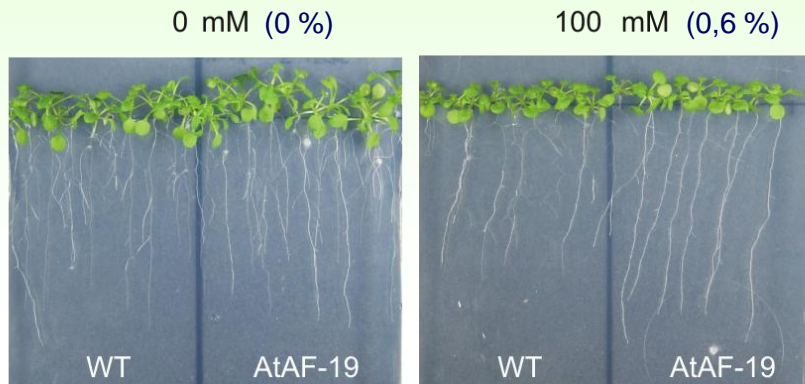
Ausschnitt aus GC-Chromatogrammen



1. Expression des *gppPS*-Gens führt zur Akkumulation beachtlicher GG-Mengen (Trockenmasseanteil von ca. 7 %)
2. Linien unterscheiden sich hinsichtlich des GG-Gehaltes
WT (0) < AtAF-19 (1-2) < AtAF-30 (2-8) < AtAF-4 (17-30)

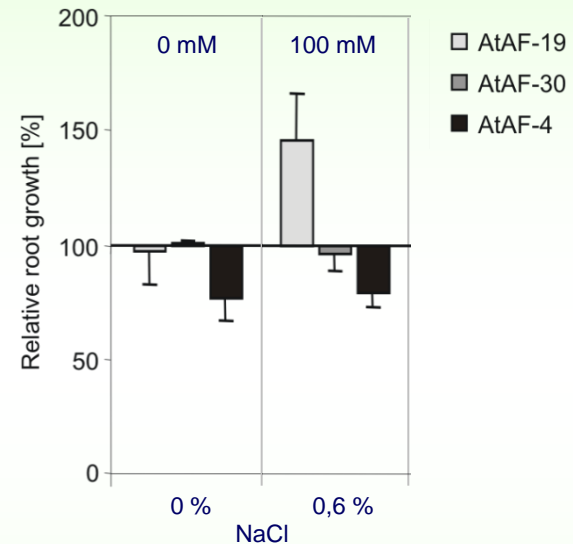


Expression des *gppPS* Gens erhöht die Salztoleranz von *Arabidopsis*



Durch Salzstress wird das Wurzelwachstum stark reduziert (Wang et al., 2009)!

Relatives Wurzelwachstum im Vergleich zum WT



1. geringere GG-Mengen (1-2 $\mu\text{mol/g}$ FM, Linie 19) reduzieren diesen negativen Effekt
→ Unter Salzstress verstärktes Wurzelwachstum im Vergleich zum WT
1. moderate Mengen (2-8 $\mu\text{mol/g}$ FM, Linie 30) zeigen keinen Effekt
2. höhere Mengen (17-30 $\mu\text{mol/g}$ FM, Linie 4) zeigen negativen Effekt (sowohl unter Kontroll- als auch Salzbedingungen)



RESEARCH PAPER

Expression of the *ggpPS* gene for glucosylglycerol biosynthesis from *Azotobacter vinelandii* improves the salt tolerance of *Arabidopsis thaliana*

Stephan Klähn¹, Daniel M. Marquardt², Inga Rollwitz^{1,2} and Martin Hagemann^{1,*}

¹ Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abteilung Pflanzenphysiologie, A.-Einstein-Str. 3, D-18051 Rostock, Germany

² Universität zu Köln, Botanisches Institut, Gyrhofstr. 15, D-50931 Köln, Germany

Received 14 November 2008; Revised 13 January 2009; Accepted 26 January 2009

