



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Protein ubiquitination in auxin signaling and transport

Santos Maraschin, F. dos

Citation

Santos Maraschin, F. dos. (2009, June 25). *Protein ubiquitination in auxin signaling and transport*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13868>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13868>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

SAMENVATTING

De studie naar het werkingsmechanisme van het plantengroeihormoon auxine heeft een relatief lange geschiedenis, en mede daardoor is auxine één van de best bestudeerde plantenhormonen. Auxine, ofwel indol-3-azijnzuur, reguleert de groei en ontwikkeling van planten via transportgegenereerde dynamische concentratiemaxima en –gradiënten. De auxineconcentraties worden vertaald in snelle cellulaire reponsen en veranderingen in genexpressie, processen die op hun beurt weer celdeling, -strekking en –differentiatie controleren. Recentelijk zijn een aantal moleculaire componenten betrokken bij de signaaltransductie van auxine in kaart gebracht. Auxine-responsieve genexpressie wordt geïnitieerd door de afbraak van Aux/IAA repressoreiwitten, zodat Auxine Respons Factoren (ARFs) de transcriptie van auxine-responsieve genen kunnen activeren. De meeste Aux/IAA eiwitten zijn instabiel, en hun levensduur wordt dramatisch gereduceerd in de aanwezigheid van auxine. Auxine bevordert namelijk de binding van het geconserveerde domein II van Aux/IAA eiwitten aan de auxinereceptor TIR1, een F-box eiwit dat onderdeel uitmaakt van het E3 ubiquitine ligase complex SCF^{TIR1}. Binding van de Aux/IAA eiwitten aan SCF^{TIR1} leidt tot hun afbraak door het 26S proteasoom.

Auxine wordt gerichte van cel naar cel getransporteerd door de asymmetrisch op het celmembraan gelokaliseerde PIN auxine transporters, en dit resulteert in auxine-maxima en -gradiënten. Het proteïne serine/threonine kinase PINOID controleert de richting van het polair auxine transport (PAT) door de apico-basale subcellulaire lokalisatie van PIN familieleden te bepalen. Recentelijk is aangetoond dat PID de centrale hydrofiele lus van PIN eiwitten fosforyleert, en dat het antagonistisch met de PP2A fosfatases de fosforylatiestatus van PIN eiwitten bepaalt. Tot nu toe zijn PIN eiwitten de enige gevalideerde fosforylatietargets van het PID kinase. In een eerdere zoektocht naar nieuwe fosforylatiestargets voor PID via een twee-hybride screen in gist zijn een viertal PID bindende eiwitten (PBPs) geïdentificeerd: de calcium-bindende eiwitten TCH3 en PBP1, het BTB/POZ domein eiwit BT1/PBP2 en subunit 8 van het COP9 signalosoom (CSN8/COP9). Geen van de PBPs bleek door PID gefosforyleerd te worden, echter zij bleken de activiteit van het kinase te

reguleren. De binding van PID met CSN8 suggereerde daarnaast een rol van het kinase in de regulering van eiwitubiquitinering. Het CSN eiwitcomplex reguleert namelijk processen in eukaryote cellen die gepaard gaan met gerichte afbraak van eiwitten. Het CSN interacteert met, en is essentieel voor de activiteit van E3 ubiquitineligases. Het CSN is initieel ontdekt via *Arabidopsis cop* mutanten die constitutieve fotomorfogenese en expressie van licht-gereguleerde genen in het donker vertonen. Het netwerk van interacties van het CSN is echter breed en complex, en het CSN speelt een rol in bijna elk aspect van plantenontwikkeling, waaronder ook auxine respons en transport.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek richtte zich op de ontrafeling van de rol van eiwitubiquitinering in auxine respons en transport. Zoals hierboven beschreven verhoogt binding van auxine aan TIR1 de affiniteit van dit F-box eiwit voor Aux/IAA eiwitten, wat leidt tot hun versnelde afbraak door het 26S proteasoom. Bewijs voor de veronderstelde ubiquitinering van Aux/IAA eiwitten door het SCF^{TIR1} E3 ubiquitineligase ontbrak echter nog. In **Hoofdstuk 2** is gebruik gemaakt van uit *Arabidopsis* celsuspensies geïsoleerde protoplasten om bewijs te vinden voor SCF^{TIR1}-gemedieerde ubiquitinering van de Aux/IAA eiwitten SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2/IAA3) en BODENLOS (BDL/IAA12). Deze twee eiwitten vertoonden een verschillende abundantie en repressoractiviteit wanneer ze in dit celsysteem tot expressie werden gebracht. De hoeveelheid endogeen TIR1 eiwit bleek limiterend voor een juiste auxine respons, zoals gemeten met het gecotransfecteerde *DR5::GUS* reporterconstruct. Cotransfectie met *35S::TIR1* leidde tot auxine-afhankelijke afbraak van Aux/IAA eiwitten, en een overmaat van het *35S::TIR1* construct zelfs tot Aux/IAA afbraak zonder auxine behandeling. Expressie van het mutante *tir1-1* eiwit of het gerelateerde F-box eiwit COI1, dat betrokken is bij jasmonzuursignaaltransductie, had geen effect op de Aux/IAA afbraak. De resultaten laten zien dat SHY2/IAA3 en BDL/IAA12 gepoly-ubiquitineerd en afgebroken worden in respons op verhoogde auxine en TIR1 niveaus. Deze resultaten leveren experimenteel bewijs voor het model dat SCF^{TIR1}-afhankelijke poly-ubiquitinering van Aux/IAA eiwitten deze eiwitten markeert voor afbraak door het 26S proteasoom, leidend tot auxine-responsieve

genexpressie. Het is waarschijnlijk dat de geobserveerde verschillen tussen de twee geteste Aux/IAs te herleiden zijn tot hun differentiële affiniteit voor de TIR1 receptor. Resultaten beschreven in Hoofdstuk 4 van dit proefschrift suggereren dat de affiniteit van BDL voor TIR1 wordt gereguleerd door fosforylering.

De resultaten in Hoofdstuk 2 passen in het algemeen aanvaarde model dat gerichte eiwitafbraak gepaard gaat met specifieke herkenning door het proteasoom van met poly-ubiquitineketens gelabelde eiwitten. In **Hoofdstuk 3** wordt echter aangetoond dat dit model niet voor alle planteneiwitten opgaat. In de zoektocht naar ubiquitineren van Aux/IAA eiwitten werd het Arabidopsis calcium-bindend eiwit PBP1, eerder geïdentificeerd als PID bindend eiwit, als controle in de protoplasttransfecties meegenomen. Daarbij bleek PBP1 een zeer instabiel gepoly-ubiquitineerd eiwit te zijn, dat in aanwezigheid van de proteasoominhibitor MG132 gestabiliseerd werd. Co-expressie van PID beïnvloedde de poly-ubiquitineren van PBP1 niet, echter dit experiment liet verrassend genoeg zien dat PID zelf geubiquitineerd werd. Substitutie van alle lysines (K) in PBP1 voor arginines (R) voorkwam wel de ubiquitineren, maar beïnvloedde niet de proteasomale afbraak van PBP1. Het mutante (K→R) eiwit behield alle geteste wildtype functies, waaronder de interactie met PID, en de subcellulaire lokalisatie. Translationele fusies van zowel het wildtype als het lysinevrije PBP1 met het GEEL FLUORESCERENDE EIWIJ (YFP) werden geubiquitineerd, wat aangeeft dat de PBP1 sequentie een *in cis* werkend ubiquitineringsignaal bevat. Het feit dat de YFP fusies relatief stabiel waren suggereert echter dat PBP1 geen degradatiesignaal (degron) bevat. PBP1 is het eerste voorbeeld van een planteneiwit dat onafhankelijk van poly-ubiquitineren door het 26S proteasoom afgebroken wordt. Hoewel de functie van PBP1 ubiquitineren nog onduidelijk is, laten onze resultaten zien dat niet alleen in dieren, maar ook in planten gerichte eiwitafbraak door het proteasoom niet noodzakelijkerwijs afhankelijk is van het labelen van targeteiwitten met poly-ubiquitineketens.

Hoofdstuk 4 beschrijft de identificatie van de labiele auxine respons repressor BDL/IAA12 als *in vitro* fosforylatietarget van PID. De observatie dat fosforylatie

door PID optreedt in het PRSS motief dat zich dicht bij het SCF^{TIR1}-interacterende domein II bevindt, suggereert dat fosforylering mogelijk de stabiliteit van BDL/IAA12 beïnvloedt. Het verwijderen van de fosforyleringsplaats door serine (S) naar alanine (A) substituties had een gering effect op de repressoractiviteit van het BDL eiwit in protoplasten of *in planta*. Echter, planten die een fosforyleringsongevoelige versie van het dominante bdl eiwit tot expressie brachten vertoonden niet de typische bodenlos fenotypes. Het fosforyleringsongevoelige bdl (S→A) eiwit is veel instabieler en laat een sterk beperkte expressie in de wortelpunt zien. Dit suggereert dat de controle op BDL via fosforylering een belangrijk mechanisme is om Arabidopsis wortelontwikkeling te reguleren. Hoewel het mechanisme en de rol van BDL fosforylering door PID verdere analyse behoeven, suggereren onze resultaten dat het PID proteïne kinase zowel auxine transport als auxine-responsieve genexpressie reguleert.

Hoofdstuk 5 beschrijft het verdere onderzoek naar de interactie van PID met CSN8/COP9. *In vitro* fosforyleringsassays lieten zien dat niet CSN8 maar het daaraan gebonden CSN7 door PID kon worden gefosforyleerd. Onder de geteste groeiomstandigheden leek deze fosforylering niet essentieel voor de *in planta* functie van CSN7. Co-expressie van PID en CSN8 in protoplasten leidde tot een cytoplasmatische en nucleaire lokalisatie van PID, en versterkte de reeds in Hoofdstuk 3 beschreven ubiquitineren van PID. De associatie van PID met het CSN kan gerelateerd zijn aan gerichte afbraak van dit kinase, echter een andere rol zou gelegen kunnen zijn in het reguleren van de interactie van de fosforylatietargets BDL en de PIN eiwitten met hun corresponderende E3 ubiquitinligases. De ontdekking van PID als een mogelijk CSN-geassocieerd kinase laat een onverwacht nieuw aspect zien van PID signaaltransductie, en verbindt de actie van dit proteïne kinase met de regulatie van eiwitubiquitineren.

Concluderend laten onze resultaten zien dat poly-ubiquitineren van eiwitten een centraal mechanisme is in de werking van het plantenhormoon auxine, en dat het PID proteïne kinase een onverwachte schakel is in de communicatie tussen auxine transport en auxine respons.