

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/29080> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Fan, Yuanwei

Title: The role of AGC3 kinases and calmodulins in plant growth responses to abiotic signals

Issue Date: 2014-10-15

Samenvatting

Planten zijn sessiele organismen die reageren op veranderingen in hun omgeving door hun groei en ontwikkeling aan te passen via een dynamisch complex van signaalperceptie- en transductiesystemen. Het plantenhormoon auxine is een centrale regulator in deze adaptieve responsen op omgevingsfactoren. Auxine wordt polair van cel naar cel getransporteerd, en dit resulteert in lokale accumulatie of depletie van het hormoon in weefsels en organen. Door op een concentratie-afhankelijke manier basale processen zoals celdeling, -differentiatie, en -elongatie te reguleren, controleert auxine de groei en ontwikkeling van een plant.

De PIN FORMED (PIN) auxine efflux carriers zijn de drijvende kracht achter polair auxine transport (PAT). Zij bepalen de richting van transport door hun asymmetrische lokalisatie op het plasmamembraan (PM). De subcellulaire lokalisatie van de PIN eiwitten is zeer dynamisch, en wordt mede gegenereerd en in stand gehouden door clathrine-afhankelijke endocytose en ARF-GEF (Guanine-nucleotide Exchange Factor van de ADP-Ribosylating Factor GTPase) -afhankelijke recycling naar het PM [1].

Het *Arabidopsis* PINOID (PID) serine/threonine proteïne kinase is geïdentificeerd als een bepalende factor in de polaire distributie van PIN eiwitten. De naam van het *PID* gen is afgeleid van de pin-achtige bloeiwijzen van de *pid* verlies-van-functie mutant, een fenotype dat vergelijkbaar is met dat van de verlies-van-functie mutant in the PIN1 auxine transporter. De defecten van de *pid* mutant in de vorming van zaadlobben in het embryo en in de orgaanvorming in de bloeiwijze worden veroorzaakt door een verschuiving in PIN1 polariteit van apicaal naar basaal (van scheut- naar wortel-gericht) in epidermis cellen in embryos en bloeimeristemen. Overexpressie van *PID* zorgt daarentegen voor de tegenovergestelde basale naar apicale verschuiving in PIN polariteit, wat leidt tot het onttrekken van auxine uit het wortelmeristeem, en uiteindelijk tot de desintegratie van het meristeem [2,3]. PID behoort samen met WAG1, WAG2 en AGC3-4 tot de AGC3 subgroep van de plant-specifieke AGCVIII proteïne kinases. PID, WAG1 en WAG2 reguleren alle drie de polariteit van de PM gelocaliseerde ("lange") PINs, door serines in drie geconserveerde TPRXS motieven in hun lange centrale hydrofiele lus te fosforyleren [4, 5]. Gefosforyleerde PIN eiwitten worden gerecruteerd door GNOM ARF-GEF-onafhankelijke (apicale, buiten-laterale, indentatie-specifieke) recycling, en dit bepaald de richting van auxine transport en reguleert onder andere de ontwikkeling van bloemen, de grootte van het wortelmeristeem, en de richting van groei ten opzichte van omgevingssignalen [4-8].

In een eerdere gist twee-hybride screen was het calmoduline-achtige eiwit CML12/TOUCH3 (TCH3) als PID-interacterend eiwit geïdentificeerd [9]. TCH3 bleek

geen fosforylatietarget van PID te zijn, maar juist de activiteit van dit kinase te reguleren door zijn Ca^{2+} -afhankelijke binding [9]. *TCH3* expressie wordt geïnduceerd door auxine en mechanische stress [10], en tegelijkertijd leiden auxine en omgevingssignalen tot een snelle verhoging van de cytoplasmatische Ca^{2+} niveaus ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) [11]. Het TCH3 eiwit was daarom een kandidaat bij uitstek om de activiteit van PID, en daarmee de PIN polariteit, te reguleren in response op zowel endogene als externe signalen.

De twee hoofddoelen van het in dit proefschrift beschreven onderzoek waren 1) om de rol van TCH3 als negatieve regulator van PID *in planta* aan te tonen, en 2) om te onderzoeken bij welke ontwikkelingsprocessen in *Arabidopsis* de kinase-CML interactie een rol speelt, en of andere AGC3 kinases en calmodulines (CaMs) of calmoduline-achtige eiwitten (CMLs) redundant werken in deze processen.

Het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 2** bevestigde dat TCH3 de activiteit van PID onderdrukt door te binden aan het katalytische domein van het proteïne kinase. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) metingen in getransfecteerde protoplasten lieten vervolgens zien dat TCH3 interacteert met PID en WAG2, maar niet met WAG1 en AGC3-4, en dat deze interactie auxine afhankelijk is. PID en WAG2 zijn beiden PM geassocieerde kinases, en een vorige studie suggereerde dat zij de PINs op het PM fosforyleren [7]. Interessant genoeg bleek TCH3 door zijn interactie met PID en WAG2 de kinases van het PM naar het cytosol te verplaatsen. De internalisatie van PID werd ook waargenomen in wortelepidermiscellen en bleek afhankelijk van de auxine geïnduceerde verhoging van de cytosolisch Ca^{2+} concentratie ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) en de *TCH3* expressieniveaus. In overeenstemming met de functie als repressor van de PID en WAG2, verminderde *TCH3* overexpressie het effect van *PID* overexpressie op het wortelmeristeem, en ontwikkelden *TCH3* overexpressie zaailingen een korte wortel, een fenotype dat ook gevonden was voor *pid/wag1/wag2* triple mutante zaailingen [7]. Zowel *TCH3* overexpressie als *tch3* verlies-van-functie mutante lijnen lieten een vertraging in de wortel geotropie zien, wat een rol suggereerde voor de TCH3-kinase interactie in deze groeiresponse. Wortelgeotropie wordt gemedieerd door PIN-gedreven herverdeling van auxine naar de onderkant van de wortelpunt [1]. In overeenstemming met eerder geobserveerde $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ pieken in de cellen aan deze kant van de wortel [11], bleek Ca^{2+} downstream van auxine te werken gedurende de geotrope response van de wortel. De auxine-geïnduceerde verhoging in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ en *TCH3* expressieniveaus resulteerden in internalisatie van het kinase en depolarisatie (en verhoogde afbraak) van PIN2. Dit bleek de asymmetrische verdeling van auxine te versterken, en uiteindelijk de

gravitrope groei van de wortel te versnellen.

De studie beschreven in **Hoofdstuk 3** had tot doel de functie van de kinase-CML interactie door de ontwikkeling van de plant heen te ontrafelen. Het milde effecten van *TCH3* verlies-van-functie suggereerde dat sommige van de 7 CAMs en 50 CMLs in *Arabidopsis* dezelfde functie vervullen. Inderdaad bleek PID te interacteren met, en van het PM gehaald te worden door de zeer verwante CML10, maar niet door de minder gerelateerde CML24/TCH2. Dit resultaat bevestigde enerzijds dat er functionele redundantie is tussen bepaalde CMLs, maar anderzijds liet het ook een niveau van specificiteit zien. Met het oog op deze redundantie, en de waarschijnlijke pleiotrope functie van CMLs, werd besloten om de rol van de kinase-CML interactie vanuit het PID kinase te bestuderen. Dit door te pogen een “untouchable PID” te generen, een kinase dat niet meer interacteert met TCH3, maar nog wel volledig functioneel is met betrekking tot PM associatie en PIN fosforylering. Eerder was aangetoond dat de PM associatie functie van PID is gelokaliseerd in een insertiedomein (ID) in het katalytische domein van het kinase [13]. Dit ID is karakteristiek voor de AGCVIII kinases [12]. Door mutanten versies van PID te maken met deleties of specifieke aminozuurvervangingen in het ID kon worden aangetoond dat de PM associatie- en TCH3 bindingsfuncties overlappen in een regio in het midden van dit ID. Nauwkeurige aminozuursequentie en 3D structuuranalyse brachten aan het licht dat het ID een amfipatische alfa helix en een IQ motief bevat die deels overlappen. Van beide eiwitdomeinen is bekend dat ze interacteren met CAMs [14-16]. *In vitro* interactiestudies toonden inderdaad aan dat TCH3, CML10 en ook *Arabidopsis* CAM2 de regio binden die de amfipatische alfa helix en het IQ motief omvat. Voor een amfipatische alfa helix is ook bekend dat het met het PM kan associëren [16]. Fusie van het gecombineerde amfipatische alfa helix/IQ motief met GFP resulteerde in een PM geassocieerd fusie-eiwit dat naar het cytosol gehaald kon worden door binding met TCH3. Aminozuurveranderingen in het IQ motief, maar buiten de amfipatische alfa helix, resulteerden nog steeds in verlies van PM associatie, wat een sterke koppeling tussen deze functie en TCH3 binding aangaf. De hechte associatie van het kinase met het PM, mogelijk versterkt door binding aan fosfolipiden, zorgt ervoor dat het kinase dicht bij zijn PIN fosforylatietargets blijft. Echter, de twee overlappende CAM/CML bindingsdomeinen die zich bevinden in het hart van het katalytische kinase domein, maken het mogelijk voor CMLs zoals TCH3 om het kinase te rekruteren en te inactiveren als de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ en de CAM/CML expressie voldoende zijn. Dit verklaart mogelijk het relatief late optreden van PID internalisatie, wat pas enkele uren na de start

van de geotrope respons kon worden waargenomen (Hoofdstuk 2).

De fenotypes van de *pid* verlies-van-functie mutant en resultaten van Reinhardt en collega's [17] suggereren dat het PID kinase betrokken is bij het in stand houden van de spiraalsgewijze fyllotaxis van de rozet en de bloeiwijzen van *Arabidopsis*. Tevens is gerapporteerd dat mechanische stress in het scheut apicale- en bloeimeristeem een sleutelrol heeft bij de fyllotactische patroonvorming [18]. Omdat *TCH3* expressie door auxine en mechanische stress wordt geïnduceerd, en dezelfde signalen ook leiden tot verhoogde $[Ca^{2+}]_{cyt}$, zou de TCH3-PID interactie een belangrijke signaaltransductiemodule kunnen zijn is bij het sturen van fyllotaxis.

Het in **Hoofdstuk 4** beschreven onderzoek bestudeerde de rol van de AGC3 kinases en hun regulatie door CaMs/CMLs in fyllotaxis. De resultaten laten zien dat omkeerbare PIN1 fosforylatie door deze kinases belangrijk is voor het in stand houden van de spiraalsgewijze fyllotaxis in *Arabidopsis* (spreidingshoek van 137.5 °). Vooral PID en WAG2 bleken belangrijk in dit proces, omdat hun verlies-van-functie regelmatig leidde tot een verschuiving van een spiraalsgewijze naar een decussate fyllotaxis (afwisselende spreidingshoeken van 90 ° en 180 °). Regelmatig werd een spreidingshoek van circa 270 ° gemeten, wat suggereerde dat de ertussen gelegen orgaaninitiatie niet had plaats gevonden. TCH3 overexpressie planten of *tch3* mutante lijnen vertoonden slechts geringe onregelmatigheden in het fyllotaxis patroon, en *TCH3* bleek laag tot niet in het scheut- en bloeimeristeem tot expressie te komen. Echter, met behulp van de *PID::PID-VENUS* reporterlijn kon worden aangetoond dat auxine en mechanische stress leiden tot Ca^{2+} -afhankelijke internalisatie van PID-VENUS in het bloeimeristeem. Een rol van TCH3 in dit proces is onwaarschijnlijk, maar mede gebaseerd op resultaten in Hoofdstuk 3 is mogelijk CML10 of een van de CAMs betrokken zijn bij het moduleren van het fyllotaxispatroon, door PID (en WAG2) van het PM af te halen in respons op verhoogde auxine niveaus of mechanische stress signalen.

Op basis van de in dit proefschrift beschreven functionele analyse van PID en de analyse van de *in vivo* interactie met TCH3 komen we tot een nieuw model, waarin de PID/WAG2-CaM/CML module zowel endogene als externe signalen vertaalt in groei en ontwikkeling van de plant door de subcellulaire lokalisatie van PINs te sturen. Zoals met al het onderzoek blijven er vragen onbeantwoord die verder onderzoek behoeven. Zo blijft het nog steeds wenselijk om middels het creëren van een “untouchable” PID de functie van de PID-CaM/CML interactie verder in kaart te brengen. Mogelijk kan dit bereikt worden door de PM associatie- en CaM/CML bindingsdomeinen verder in kaart te brengen via een “high throughput” aminozuursubstitutie benadering. Een dergelijke

studie zal belangrijke nieuwe inzichten opleveren met betrekking tot de capaciteit van planten om hun groei en ontwikkeling aan te passen in respons op zowel interne- als omgevingssignalen.