



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Components and targets of the PINOID signaling complex in *Arabidopsis thaliana*

Zago, Marcelo Kemel

Citation

Zago, M. K. (2006, June 15). *Components and targets of the PINOID signaling complex in Arabidopsis thaliana*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4436>

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/1887/4436>

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

Samenvatting

Het plantenhormoon auxine, ofwel indol-3-azijnzuur (IAA), speelt een centrale rol bij de ontwikkeling van planten. Ontwikkelingsprocessen zoals embryogenese, phyllotaxis en de geo- of fototrope groei worden gestuurd door dynamische auxine gradiënten, die gegenereerd worden middels polair transport van dit hormoon door de PIN familie van membraaneiwitten. PIN eiwitten vertonen auxine efflux activiteit en bepalen de richting van het transport door hun asymmetrische subcellulaire lokalisatie. Deze wordt in stand gehouden en gereguleerd door cyclisch transport - langs het actine cytoskelet - van PIN bevattende membraanblaasjes tussen endosomale celcompartimenten en het plasmamembraan.

Het PINOID (PID) proteïne kinase is geïdentificeerd als een regulator van de polaire lokalisatie van PIN eiwitten. Daarbij is gevonden dat het PID kinase de PIN eiwitten naar de apicale (boven-) celpool stuurt. Hoe dit kinase de lokalisatie van PIN eiwitten precies beïnvloedt, is nog niet duidelijk. Wel zijn via een twee-hybride screen in gist een viertal PID Bindende eiwitten (PBPs) geïdentificeerd. Het in dit proefschrift beschreven onderzoek richtte zich op de verdere functionele analyse van twee van deze PBPs, en op de mogelijkheid dat de PIN eiwitten zelf fosforylatiesubstraten van het PID kinase zijn.

Hoofdstuk 2 beschrijft een nadere analyse van de interactie tussen PID en PBP2, een eiwit met een BTB/POZ (Bric-a-brac, Tramtrack and Broad Complex/Pox virus and Zinc finger) domein in de amino(N)-terminale regio en een TAZ (Transcriptional Adaptor putative Zinc Finger) domein aan de carboxy(C)-terminale zijde. Van beide domeinen is bekend dat ze eiwit-eiwit interacties verzorgen, en PINOID bleek specifiek aan de BTB/POZ bevattende N-terminus van PBP2 te binden. Tevens bleek dat PBP2 geen fosforylatiesubstraat van PID is, maar dat dit eiwit de activiteit van het kinase onderdrukt. In een daaropvolgende twee-hybride screen in gist werden 16 PBP2 bindende eiwitten geïdentificeerd. De functies van deze eiwitten varieerden van transcriptiefactoren en cytoskeleteiwitten tot eiwitten met een enzymatische functie in het primaire metabolisme. Voor de meeste PBP2 bindende eiwitten kon niet eenduidig worden aangetoond dat ze een rol spelen in de signaaltransductieroute van het PID kinase. Dit suggereert dat PBP2 een multifunctioneel “scaffold” eiwit is, dat - als component van het PID signaaltransductiecomplex - betrokken is bij de regulatie van PIN polariteit.

Hoofdstuk 3 beschrijft een verdere analyse van de interactie van PBP2 met twee paraloge plant-specifieke microtubule motoreiwitten, PBP2 Bindend Kinesine 1 en -2 (PBK1 en -2). De PBKs bleken specifiek aan de TAZ bevattende C-terminus van PBP2 te binden. Een belangrijk onderdeel van de analyses betrof het aannemelijk maken dat PID, PBP2 en de PBKs een complex kunnen vormen. De drie eiwitten bleken inderdaad in dezelfde weefsels tot expressie te komen, en protoplasttransformaties met GFP-eiwitfusies toonden aan dat de drie eiwitten co-lokaliseren in het cytoplasma. Overexpressie van PBK1 leidde tot een significante

verhoging van het aantal zaailingen met drie zaadlobben, een fenotype dat kenmerkend is voor *pid* verlies-van-functie mutanten. Op basis van de eerdere observatie dat PBP2 werkt als een negatieve regulator van PID activiteit, veronderstellen we dat de PBKs betrokken zijn bij het transport van PBP2, om daarmee de PID activiteit op subcellulair niveau te onderdrukken, en daarmee polariteit te geven aan de signaaltransductie van dit kinase.

Voor een aantal dierlijke transporters is bekend dat hun subcellulaire lokalisatie gereguleerd wordt door fosforylering van aminozuurresiduen in een cytoplasmatisch domein van deze membraaneiwitten. In **hoofdstuk 4** is de mogelijkheid onderzocht dat fosforylering van de PINs zelf deze eiwitten markeert voor lokalisatie aan de apicale celpool. Zes van de acht Arabidopsis PIN eiwitten bevatten een groot cytoplasmatisch domein dat aan weerszijde geflankeerd wordt door de transmembraanregio's. Door middel van *in silico* analyse en *in vitro* fosforylatie-assays kon achterhaald worden, dat PIN eiwitten waarschijnlijk door PID op een viertal geconserveerde serine residuen in dit cytoplasmatische domein gefosforyleerd worden. Opmerkelijk was dat de twee serines die *in vitro* de sterkste fosforylering laten zien, zich bevinden in twee TPRXSN motieven die geconserveerd zijn tussen de zes Arabidopsis PIN eiwitten met een grote cytoplasmatische loop. Op dit moment worden mutante *PIN1::PIN1-GFP* fusieconstructen gegenereerd waarin de specifieke serine residuen vervangen zijn door een alanine of een glutaminezuur, waarmee fosforyleren voorkomen of juist nagebootst wordt. Door transgene Arabidopsis lijnen met deze constructen te maken, kan *in planta* worden getest wat het effect van fosforylering is op de subcellulaire lokalisatie van PIN eiwitten. Hopelijk wordt daarmee een belangrijk aspect van het moleculaire mechanisme achter de PID-afhankelijke PIN polariteit opgehelderd.

Polair auxine transport zorgt voor een differentiële verdeling van dit hormoon in weefsels en organen, en de cellulaire auxine concentraties worden vervolgens door een complexe en celspecifieke interactie tussen de ARF transcriptiefactoren en de labiele Aux/IAA repressoreiwitten vertaald in een primaire respons in genexpressie. De cellulaire niveaus van de labiele Aux/IAA repressoreiwitten worden daarbij onderdrukt door auxine geïnduceerde, SCF^{TIR1} E3-ligase-afhankelijke proteolyse, een proces dat positief gereguleerd wordt door het COP9 signalosoom (CSN).

Hoofdstuk 5 beschrijft de identificatie van CSN subeenheid CSN8/COP9 als interacterende partner van PID. Een opmerkelijke vinding daarbij was dat niet CSN8, maar de daarmee interacterende subeenheid CSN7/COP15 *in vitro* door PID gefosforyleerd wordt. De observatie dat Arabidopsis zaailingen waarin PID tot overexpressie is gebracht een aantal fenotypes vertonen die vergelijkbaar zijn met de constitutieve fotomorfogenese fenotypes van *csn* mutanten, suggereert dat PID mogelijk als een negatieve regulator van het CSN complex functioneert. Als CSN-

geassocieerd kinase zou PID echter ook de interactie tussen en het E3 ligase en een proteolyse target kunnen reguleren. In *in vitro* reacties kon inderdaad worden aangetoond, dat de Aux/IAA repressor BODENLOS(BDL)/IAA12 door PID gefosforyleerd wordt, waarschijnlijk op de serine in het PRXS motief dat zich vlak naast het SCF^{TIR1} interacterende domein II bevindt. Analyse van de *pid/bdl* dubbelmutant en transiënte expressie-experimenten in Arabidopsis protoplasten gaven belangrijke *in vivo* aanwijzingen dat PID waarschijnlijk de stabiliteit van zowel BDL/IAA12 als de paraloog IAA13 negatief reguleert, en daarmee de auxine responsieve genexpressie gedurende embryogenese stimuleert.

De rol van PID als CSN-geassocieerd kinase en als negatieve regulator van BDL/IAA12 en IAA13 behoeft verder onderzoek. Onze resultaten suggereren dat het PID kinase een schakel vormt tussen het polaire transport en de signaaltransductie van het belangrijke plantenhormoon auxine.

