



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Calcium- and BTB domain protein-modulated PINOID protein kinase directs polar auxin transport

Robert-Boisivon, H.S.

Citation

Robert-Boisivon, H. S. (2008, May 21). *Calcium- and BTB domain protein-modulated PINOID protein kinase directs polar auxin transport*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12863>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12863>

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

Samenvatting

De architectuur van planten wordt bepaald door strak gereguleerde ontwikkelingsprocessen, die in belangrijke mate worden gestuurd door het plantenhormoon auxine. Auxine is initieel ontdekt als het signaalmolecuul dat de tropische groeiresponsen van planten ten opzichte van directionele abiotische stimuli zoals licht en zwaartekracht stuurt. Een belangrijke factor in de activiteit van auxine is, naast de signaaltransductie, het polaire transport van dit hormoon door de plant. Polair auxinetransport (PAT) genereert dynamische gradiënten en maxima van auxine die de posities van organen bepalen, tropische groeiresponsen sturen, en de functionaliteit van meristemen waarborgen. De aanjagers van PAT zijn de PIN auxinetransporters, die de richting van PAT bepalen door hun asymmetrische subcellulaire lokalisatie in de cel. De polaire distributie van PIN eiwitten is zeer dynamisch, en wordt gemedieerd door cyclisch transport van membraanblaasjes via het actinecytoskelet, en gereguleerd door auxinesignaaltransductie en gerichte afbraak van PIN eiwitten.

Het *Arabidopsis* proteïne serine/threonine kinase PINOID (PID) is geïdentificeerd als de eerste determinant in de polaire subcellulaire targeting van PIN eiwitten. Wanneer de expressie en daarmee de activiteit van PID boven een drempelwaarde uitkomt, dan induceert dit een verandering in de polaire lokalisatie van PIN eiwitten van de basale (naar de wortelpunt wijzende) naar de apicale (naar het scheutmeristeem wijzende) kant van cellen. Recentelijk is aangetoond dat PID een membraangeassocieerd kinase is, en dat PID en PIN eiwitten gedeeltelijk colocaliseren op het plasmamembraan van cellen. Tevens is er bewijs gevonden voor de PID-afhankelijke fosforylering van PIN eiwitten, en dat PP2A phosphatases en PID antagonistisch werken op de lokalisatie en fosforylatiestatus van PIN eiwitten. Deze vindingen laten de essentie zien van hoe PID werkt als regulator van PAT, maar ze laten ook een aantal belangrijke vragen nog onbeantwoord. Wat reguleert de activiteit van PID, en wat bepaalt de subcellulaire lokalisatie van dit kinase? Fosforyleert PID PIN eiwitten wanneer deze op het plasmamembraan aanwezig zijn, of heeft dit plaats in endosomale compartimenten, en is PID-afhankelijke PIN fosforylering voldoende om veranderingen in PIN polariteit te induceren?

In voorgaand onderzoek zijn er door middel van een twee-hybride screen in gist een drietal PID BINDENDE EIWITTEN (PBPs) geïdentificeerd, te weten de calciumbindende eiwitten PINOID BINDING PROTEIN1 (PBP1) en TOUCH3 (TCH3), en het BTB domein eiwit PBP2. PBP1 is een klein eiwit met een enkele calciumbindingsplaats (EF-hand). Het corresponderende gen maakt deel uit van een kleine genfamilie in *Arabidopsis*, met *KIC* en het directe homoloog *PBPIH* als familieleden. TCH3 is een atypisch calmoduline-achtig eiwit met 6 EF-hands, dat wordt gecodeerd door een uniek gen in *Arabidopsis* waarvan de expressie geïnduceerd wordt door aanraking. PBP1 en TCH3 binden PID op een calciumafhankelijke wijze. PBP2 is identiek aan het eerder geïdentificeerde BTB en TAZ domein eiwit 1 (BT1). BT1 maakt deel uit van een familie van vijf eiwitten in *Arabidopsis* die gekarakteriseerd worden door een plantspecifieke combinatie van eiwit-eiwit interactiedomeinen, te weten een N-terminaal BTB domein, een

TAZ domein en een C-terminaal calmodulinebindend domein. Van BTB eiwitten is bekend dat ze als linkereiwitten bij een grote verscheidenheid van processen betrokken zijn, en dat hun specificiteit wordt bepaald door de aanwezigheid van de extra eiwit-eiwit interactiedomeinen.

Interessant genoeg worden geen van de PBPs in *in vitro* reacties door PID gefosforyleerd, maar lijken ze eerder als positieve (PBP1) en negatieve (TCH3 en PBP2) regulatoren van de PID activiteit op te treden. Het doel van het in dit proefschrift beschreven onderzoek was de interactie tussen PBPs en PID *in vivo* aan te tonen, en de functionele significantie daarvan verder te analyseren.

Hoofdstukken 2 en 3 beschrijven de verdere functionele analyse van de calciumbindende eiwitten. Additionele *in vitro* en *on chip* fosforylatieassays bevestigden dat PBP1 en TCH3 de PID activiteit respectievelijk positief en negatief beïnvloeden. Voor TCH3 kon worden aangetoond dat het specifiek bindt aan het katalytische domein van PID, terwijl PBP1 met name een interactie lijkt aan te gaan met de N- en C-terminale uiteinden van het kinase. Verder zijn er verlies- en winst-van-functie mutanten van *TCH3* en *PBP1* gebruikt om *in vivo* bewijs te krijgen voor de rol van deze eiwitten als regulators van PID. *pid* mutante embryo's bleken gevoeliger voor veranderingen in *TCH3* expressie. Zowel *tch3* verlies-van-functie als *TCH3* overexpressie leidde tot versterking van de *pid* zaadlobfenotypes. Tevens leidde overexpressie van *TCH3* tot een reductie van het *PID* overexpressie fenotype, een resultaat dat de rol van TCH3 als negatieve regulator van PID activiteit bevestigt (**Hoofdstuk 2**). In overeenstemming met het stimulerende effect van PBP1 en PBP1H op de *in vitro* activiteit van PID, leidden zowel *pbp1* als *pbp1h* verlies-van-functie mutaties tot een versterking van het *pid* embryo fenotype. Daarentegen bleek de *pbp1-1* verlies-van-functie gedeeltelijk het *pid-14* bloeiwijzefenotype te herstellen. Voorlopige resultaten suggereren dat dit herstel niet optreedt wanneer de genen coderend voor PBP1H of voor de PID-gerelateerde kinases WAG1 en WAG2 ook uitgeschakeld zijn, wat impliceert dat *pbp1* verlies-van-functie leidt tot terugkoppeling, resulterend in verhoogde transcriptie van deze genen (**Hoofdstuk 3**).

Co-expressie in Arabidopsis protoplasten van een PID:CFP (cyaan fluorescent eiwit) fusie met een fusie tussen TCH3 of PBP1 en YFP (geel fluorescent eiwit) en de daaropvolgende detectie van "Förster Resonance Energy Transfer" (FRET) bevestigde dat PID ook *in vivo* een interactie aangaat met de twee calcium-bindende eiwitten. Interessant genoeg verplaatst PID zich in aanwezigheid van TCH3 of PBP1 van het plasmamembraan naar het cytoplasma. Deze verplaatsing bleek afhankelijk van auxine, en werd niet geobserveerd in auxinegehongerde protoplasten. Recentelijk is er bewijs gevonden dat PID met het plasmamembraan associeert door binding van de karakteristieke aminozuurinsertie in het katalytische domein van PID met fosfatidylzuur en gefosforyleerde inositides. De verplaatsing van PID naar het cytoplasma van protoplasten wordt mogelijk veroorzaakt

door afscherming van de fosfolipide-bindingsplaatsen in PID door de binding van PBP1 en TCH3.

De auxineafhankelijkheid van de PID verplaatsing zou verklaard kunnen worden door de auxinegeïnduceerde verhoging van de cytoplasmatische calciumconcentratie, welke vervolgens leidt tot een sterkere interactie tussen PID en de calciumbindende eiwitten PBP1 en TCH3. Inderdaad werd in wortelepidermiscellen, waar de expressie van *PID* en *TCH3* overlappen, na auxinebehandeling een snelle transiënte dissociatie van PID van het plasmamembraan geobserveerd. Deze respons bleek afhankelijk van de activiteit van calciumkanalen en calmodulines (**Hoofdstuk 2**). Daarentegen bleek *PBP1* overexpressie PID juist meer resistent te maken tegen de auxinegeïnduceerde dissociatie van het plasmamembraan in wortelepidermiscellen. Ook bleek overexpressie van *PBP1* en *PBP1H* te leiden tot verminderde wortelgroei, mogelijk door versterking van de PID functie (**Hoofdstuk 3**). Hieruit is het model gedestilleerd dat auxinegeïnduceerde verhoging van calciumconcentraties leidt tot een sterkere interactie tussen TCH3 en het katalytische domein van PID, waarbij de fosfolipidebindingsplaats afgeschermd wordt, resulterend in dissociatie van het plasmamembraan, weg van de PIN fosforylatietargets. Veranderingen in de subcellulaire lokalisatie van eiwitten is een algemeen gebruikt mechanisme om de activiteit van het betreffende eiwit te reguleren. Voor zover ons bekend, is dit echter het eerste voorbeeld van een calcium- en calmoduline-afhankelijke membraandissociatie van een kinase dat de subcellulaire targetting van transporteiwitten stuurt.

Hoofdstuk 4 beschrijft de functionele analyse van de Arabidopsis *BT* genfamilie waartoe *PBP2/BT1* behoort. Een vergelijking van genstructuur en aminozuurvolgorde van de gecodeerde eiwitten laat zien dat de vijf genen groeperen in 3 claden. Per clade laten de genen een specifiek expressiepatroon zien, en de corresponderende BT eiwitten vertonen een specifieke subcellulaire lokalisatie. BT1 is een onstabiel eiwit dat afgebroken wordt door het 26S proteasoom. Genetische analyse van de *BT* familie laat zien dat de genen onderling functioneel redundant zijn, en dat *BT2* en *BT3* essentieel zijn voor zowel mannelijke als vrouwelijke gametogenese.

Met het in **hoofdstuk 5** beschreven onderzoek is de rol van de BT eiwitten in PID signaaltransductie nader onderzocht. BT1 interacteert met PID via het BTB domein, en onderdrukt de *in vitro* activiteit van dit kinase. Daarnaast vertonen *BT1* en *PID* overlappende expressiepatronen in Arabidopsis planten, en co-localiseren PID:CFP en BT1:YFP fusie-eiwitten in het cytoplasma van Arabidopsis protoplasten, wat aangeeft dat de *in vivo* interactie tussen de eiwitten mogelijk is. Interessant genoeg blijken de eiwitten elkaars subcellulaire lokalisatie te beïnvloeden. In protoplasten die beide eiwitten tot expressie brengen, wordt BT1:YFP gevonden op het plasma-membraan, terwijl PID:CFP kernlokalisatie laat zien. Dit bevestigt de interactie tussen de twee eiwitten, en geeft aan dat PID zeer waarschijnlijk een functie heeft in de kern van de plantencel. Tenminste vier van

de vijf BT eiwitten blijken in *in vitro* pull down assays met PID te binden, wat de in **hoofdstuk 4** beschreven functionele redundantie tussen de *BT* genen onderstreept.

De rol van BT1 als negatieve regulator van PID werd bevestigd door het feit dat *BT1* overexpressie leidde tot een versterking van het *pid* verlies-van-functie fenotype, terwijl het *PID* overexpressie fenotype werd afgezwakt. *PID* overexpressie planten vertonen normaal geen fenotype in de bloeiwijze, maar in planten die meerdere *bt* mutaties dragen bleek *PID* overexpressie het *bt* verlies-van-functie fenotype in de bloeiwijze duidelijk te versterken. Hieruit concluderen wij dat het effect van *PID* overexpressie normaal onderdrukt wordt door BT eiwitten, en dat het alleen zichtbaar wordt in planten met meerdere *bt* mutaties. Verrassend genoeg leidden meerdere *bt* mutaties tot een volledig herstel van de zaailing fenotypes van *PID* overexpressie. Dit suggereert dat BT scaffold eiwitten niet alleen de PID activiteit onderdrukken, maar dat ze in ieder geval gedurende zaailingontwikkeling essentiële componenten in PID signaaltransductie zijn.

De in dit proefschrift beschreven functionele analyse van de PBPs heeft enerzijds een nieuw regulatiemechanisme van eiwit kinases door calciumsignaaltransductie blootgelegd, en anderzijds zijn er nieuwe functies van BT eiwitten gevonden, niet alleen in PID signaaltransductie, maar ook meer algemeen gedurende plantenontwikkeling. Een interessante vraag blijft echter wat de biologische relevantie is van de fijnregulatie van PID activiteit door deze bindende eiwitten. Hoe heeft de verplaatsing van PID door calcium van het plasmamembraan naar het cytoplasma effect op de functie en lokalisatie van PIN eiwitten? En wat is de precieze functie van BT eiwitten in de PID signaaltransductieroute, en welke andere eiwitten zijn onderdeel van het BT-PID complex? De eerste stappen en componenten in PID signalering zijn nu in kaart gebracht, maar het mag duidelijk zijn dat er nog veel valt te ontdekken, voordat we de moleculaire mechanismen achter de dynamische kinase-gemedieerde sturing van auxine transport in respons op interne ontwikkelingsprogramma's en externe (abiotische) signalen volledig zullen doorgronden.

