

Charles University in Prague
Faculty of Science
Department of Plant Physiology

Academy of Sciences of the Czech Republic
Institute of Experimental Botany
Laboratory of Cell Biology

**The secretory vesicles tethering complex exocyst
and the auxin transport polarization**

Poutací komplex exocyst a polarizovaný transport auxinu



Edita Janková Drdová

Summary of the PhD Thesis
Autoreferát dizertační práce

Školitel/Supervisor: RNDr. Viktor Žárský, CSc.

Prague 2011

Personal details

Name: Edita Janková Drdová

Date of birth: 3.11.1978

E-mail: drdova@ueb.cas.cz

Education

1998-2003 Charles University, Faculty of Science, Department of Experimental Plant Biology

2003 Master of Science degree. Diploma thesis: Využití GFP při sledování lokalizace vybraných proteinů sekretorické dráhy (RABGDI1, EXO70-G1, SEC10) v rostlinné buňce.

2003-2011 PhD studies at the Faculty of Science, Department of Experimental Plant Biology, experimental work was performed at the Institute of Experimental Botany AS CR, Laboratory of Cell Biology (supervisor : RNDr. Viktor Žárský, CSc.)

Working experience - scientific stays

2003 Institute of Plant Biology, Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary (2 weeks)

2006 Oregon State University, Department of Botany and Plant Pathology, Corvallis, OR, U.S.A. (6 weeks)

2008 University of Bonn, Bonn, Germany (2 weeks)

2009 VIB / University Gent, Department of Plant Systems Biology, Gent, Belgium (2 weeks)

List of Publications

Eliáš, M., **Drdová, E.**, Žiak, D., Bavlňka, B., Hála, M., Cvrčková, F., Soukupová, H., Žárský, V. (2003) The exocyst complex in plants. *Cell Biol. Int.* 27: 199–201.

Hála, M., Cole, R., Synek, L., **Drdová, E.**, Pečenková, T., Nordheim, A., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Hochholdinger, F., Fowler, J.E., Žárský V. (2008) An exocyst complex functions in plant cell growth in Arabidopsis and tobacco. *Plant Cell* 20: 1330–1345.

Fendrych, M., Synek, L., Pečenková, T., Toupalová, H., Cole, R., **Drdová, E.**, Nebesárová, J., Sedinová, M., Hála, M., Fowler, J.E., Žárský, V. (2010) The Arabidopsis exocyst complex is involved in cytokinesis and cell plate maturation. *Plant Cell* 22: 3053–3065.

Kulich, I., Cole, R., **Drdová, E.**, Cvrčková, F., Soukup, A., Fowler, J., Žárský, V. (2010) Arabidopsis exocyst subunits SEC8 and EXO70A1 and exocyst interactor ROH1 are involved in the localized deposition of seed coat pectin. *New Phytol.* PMID: 20618910.

Pečenková, T., Hála, M., Kulich, I., Kocourková, D., **Drdová, E.**, Fendrych, M., Toupalová, H., Žárský, V. (2011) The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant-pathogen interaction. *J Exp Bot.*

Contents / Obsah

Summary.....	4
1 Introduction.....	5
2 Aims of the thesis.....	7
3 Results and discussion.....	8
4 Conclusion.....	9
Souhrn.....	10
1 Úvod.....	11
2 Cíle práce.....	13
3 Výsledky a diskuse.....	14
4 Závěr.....	15
Reference.....	16

SUMMARY

The polarization of exocytosis in yeast and animals is assisted by the exocyst – an octameric vesicle tethering complex and an effector of Rab and Rho GTPases. Recently, the exocyst was described as a functional complex involved in morphogenesis also in plants. Hála et al. (2008) described involvement of exocyst complex in pollen tube growth and hypocotyls elongation in dark grown seedlings, Fendrych et al. (2010) uncovered key role of exocyst in cell plate formation, Kulich et al. (2010) emphasized the participation of exocyst in seed coat generation and Pečenková et al. (2011) described the contribution of exocyst subunits in plant defense towards the pathogens. All these processes are intimately linked to polarized secretion. Here we show involvement of exocyst in auxin efflux carriers PINs recycling.

Using direct auxin transport measurement and GFP-tagged proteins, we showed that the exocyst is involved in recycling and polarization of PIN proteins and polar auxin transport regulation. Rootward polar auxin transport is compromised in loss-of-function mutants in exocyst subunits EXO70A1. On the cellular level we have detected small portion of PIN2:GFP in the “BFA-like” FM4-64 labelled compartments distinct from VHAA1 labeled endosomes. Moreover recycling of PIN1 and PIN2 is retarded in roots of *Arabidopsis* loss-of-function mutants in exocyst subunits EXO70A1 and SEC8 after brefeldin A treatment. Even more severe secretory defect is observed after prolonged BFA treatment. This approach normally provokes transcytosis – i.e. relocalization of PINs from BFA compartment to the apical PM in the WT plants. However in *exo70A1* and *sec8-m1* mutants PINs remain internalized in the BFA compartment. We observed that also recycling of the brassinosteroid receptor BRI1 is disturbed in similar manner as PIN recycling indicating more general PM proteins recycling defect.

Plasma membrane localization of GFP-tagged EXO70A1 and other exocyst subunits studied (SEC8, SEC10) are resistant to brefeldin A treatment suggesting that studied exocyst subunits traffic BFA-insensitive pathway. On the contrary, localization of these subunits are sensitive to wortmannin – an inhibitor that modifies membrane phospholipids. These findings indicate that binding of studied exocyst subunits to the PM might depend on the phospholipide membrane composition. Using co-immunoprecipitation we revealed that EXO70A1 is present in a complex with ICR1 – an adaptor protein

mediating interaction of activated RHO/ROP GTPases with the SEC3 exocyst subunit (Lavy et al., 2007). Recently ICR1 was proved to contribute to the regulation of polar auxin transport through PIN1 polarization (Hazak et al., 2010).

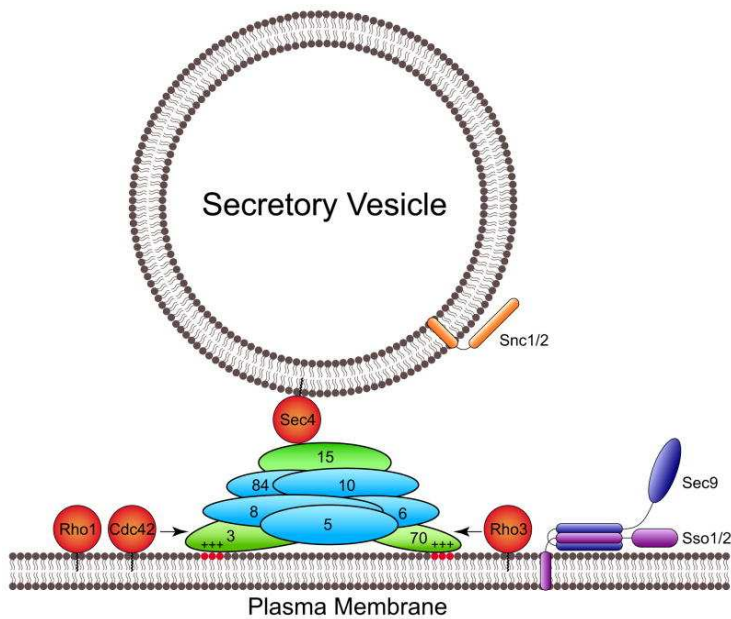
Whereas EXO70A1 along with other exocyst subunits display uniform distribution on the PM (Fendrych et al., 2010), EXO70G1 shows enrichment on the apical and basal cell sides in the root tip cells. This localization pattern might point to the role in recycling of polarly localized protein such as PINs. Since *exo70G1* mutant did not show any discernible phenotype (Synek et al., 2006) we will have to prepare double or triple mutant of *exo70G1*, *exo70G2* and *exo70A1* to uncover its function.

Our data show that polar auxin flow mediated by PIN proteins in plants relies also on the proper function of vesicle tethering complex exocyst. Despite an independent origin of plant multicellularity, the exocyst conserved its role in cell polarization and significantly participates in the regulation of polarity and morphogenesis also in plants.

1 INTRODUCTION

The exocyst is an evolutionary conserved octameric complex, consisting of Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 and Exo84 subunits, which coordinates tethering of incoming secretory vesicles to the PM. In Opisthokonts, exocyst is localized at specific PM domains, characterized by extensive fusion of post-Golgi derived exocytic vesicles. Depending on the external and internal cues, exocyst localizes also to the TGN and/or different population of endosomes (Vega and Hsu, 2001; Oztan et al., 2007).

According to the “landmark model”, EXO70 and SEC3 act as a spatial PM landmark for the rest of the exocyst subunits (Boyd et al., 2004; Roumanie et al., 2005). The polar PM localization of EXO70 and SEC3 is regulated by Rho GTPases interaction, independent on actin cytoskeleton. The remaining exocyst subunits form subcomplex on the secretory vesicle and through exocyst subunit SEC15 interact with RabGTPase Sec4 (Boyd et al., 2004). Assembling the whole exocyst complex enables tethering of exocytotic vesicles to the PM prior the SNARE complex pairing (Brennwald et al., 2005).



(He and Guo 2009)

Figure 1 Yeast model showing the role of exocyst complex in the vesicle tethering

Plant exocyst

Homologues to all eight exocyst subunits were found in plant genomes (Cvrčková et al., 2001; Eliáš et al., 2003). Recently, it was proved that the exocyst subunits function as a complex in plants and facilitate polarized secretion in growing pollen tubes and in hypocotyl elongation of etiolated seedlings in *Arabidopsis* (Hála et al., 2008). Interestingly, plant genome contains a big family of Exo70 genes- e.g. 23 members in *Arabidopsis thaliana*, while yeast and animals have a single copy of Exo70 (Eliáš et al., 2003).

2 AIMS OF THE THESIS

A To measure and compare radioactively labeled IAA transport and activity in IAA maxima using DR5 reporter between WT and *exo70A1*.

B To analyse possible involvement of EXO70A1 along with other exocyst subunits in auxin efflux carriers (PINs) localization and recycling.

C To analyse specificity of EXO70A1 for PIN recycling.

D To address the EXO70A1 and some other exocyst subunits localization in respect to membrane lipid composition.

E To study direct or indirect interactions between EXO70A1 and other proteins using co-immunoprecipitation.

4 RESULTS AND DISCUSSION

A) Using direct auxin transport measurement we have shown that rootward polar auxin transport is compromised to about 40% in loss-of-function mutant in exocyst subunits EXO70A1. Using DR5::GUS reporter line we uncovered reduced auxin maxima in the root tip of *exo70A1* mutant plants and moreover we detected canalization defect after local application of IAA in *exo70A1*.

B) On the cellular level we have detected accumulation of small portion of PIN2:GFP in the “BFA-like” compartments, that are different from early endosomes marked by VHAa1. Moreover recycling of PIN1:GFP and PIN2:GFP is retarded in roots of *exo70A1* and *sec8-m1 Arabidopsis* mutants after brefeldin A treatment. Even more severe secretory defect is observed after prolonged BFA treatment. This approach normally provokes transcytosis – i.e. relocalization of PINs from BFA compartment to the apical PM in the WT plants (Kleine-Vehn et al., 2008). However in *exo70A1* and *sec8-m1* mutants PIN1:GFP and PIN2:GFP remain internalized in the BFA compartment.

C) Loss of EXO70A1 function also affected trafficking of the brassinosteroid receptor BRI1, a transmembrane protein which constitutively cycles between endomembrane compartments and the PM through BFA-sensitive pathway (Geldner et al., 2007); recycling of BRI1:GFP back to the PM after removal BFA was delayed in *exo70A1* mutants. Relocalization of BRI1:GFP induced by prolonged BFA treatment is block in *exo70A1*. This finding indicates more general PM proteins recycling defect.

D) EXO70A1 contains a conserved C-terminal site that is responsible for binding phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in animals and yeast (He et al., 2007; Žárský et al., 2009) suggesting that EXO70A1 residence at the PM might be sensitive to wortmannin treatment. Wortmannin is a fungal metabolite that interferes with endomembrane trafficking through inhibition of phosphoinositide 3-kinases. With increasing concentration, wortmannin also inhibits phosphoinositide 4-kinases that produce phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the PM lipid bilayer (Mueller-Roeber and Pical, 2002). Wortmannin treatment for 90 min at 33 μ M concentration led to increased dissociation of GFP:EXO70A1, GFP:SEC8 and YFP:SEC10 from the PM into the

cytoplasm. Complete release of exocyst subunits from the PM was achieved by 66 μ M wortmannin treatment for 90 min.

E) Using co-immunoprecipitation we revealed that EXO70A1 is present in a complex with ICR1, indicating that PIN recycling might be regulated by interplay between exocyst, adaptor protein ICR1 and RHO/ROP GTPases.

CONCLUSION

Here we have shown that exocyst is involved in polar auxin transport and in PIN protein recycling. Recent findings indicate that this process might be regulated by cooperation of exocyst and adaptor protein ICR1. However further study will be necessary to uncover the precise mechanism of exocyst action in PIN polarization.

1 SOUHRN

U kvasinek a živočišných buněk se na polarizaci exocytózy významně podílí exocyst – oktamerní proteinový komplex, který je řízen pomocí Rab a Rho GTPáz. Nedávno byl exocyst popsán také jako funkční komplex podílející se na morfogenezi rostlin. Hála et al., (2008) objasnil zapojení tohoto komplexu do procesů růstu pylové láčky a elongace hypokotylu etiolovaných semenáčků, Fendrych et al., (2010) odhalil klíčovou roli exocystu při tvorbě nové buněčné přepážky, Kulich et al., (2010) podtrhl význam exocystu při tvorbě semenných obalů a Pečenková et al., (2011) popsala účast podjednotek exocystu v odpovědi rostliny k napadení patogenem. Všechny tyto procesy jsou úzce spjaty s polarizovanou sekrecí. Naše práce ukazuje zapojení exocystu v recyklaci auxinových přenašečů PIN.

Přímým měřením auxinového transportu jsme ukázali, že transport auxinu ke špičce kořene mutanta *exo70A1* je výrazně zpomalen. Na buněčné úrovni jsme odhalili akumulaci malého množství fúzního proteinu PIN2:GFP do kompartmentů odlišných od endosomů nesoucích VHAa1. Navíc byla v kořenech mutantů *exo70A1* a *sec8-m1* po působení brefeldinu A výrazně zpomalena recyklace fúzních proteinů PIN1:GFP a PIN2:GFP. Ještě výraznější recyklační defekt byl patrný po prodlouženém působení BFA. Tento přístup vyvolává transcytózu – tj. relokizaci PIN proteinů z BFA kompartmentů do apikální PM v buňkách kořene WT. Avšak v případě mutantů *exo70A1* a *sec8-m1* zůstávají fúzní proteiny PIN1:GFP a PIN2:GFP internalizovány v BFA kompartmentech. Zjistili jsme, že mutant *exo70A1* vykazuje defekt v recyklaci brasinosteroidového receptoru BRI1, obdobný jako v případě proteinů PIN1 a PIN2, což poukazuje na obecnější defekt při recyklaci bílkovin plazmatické membrány.

Lokalizace GFP značených podjednotek exocystu EXO70A1, SEC8 a SEC10 v plazmatické membráně je rezistentní k působení brefeldinu A, což indikuje, že studované podjednotky exocystu putují dráhou, která není citlivá k BFA. Naopak lokalizace těchto podjednotek je senzitivní k působení wortmanninu – inhibitoru modifikujícího membránové fosfolipidy. Tyto poznatky ukazují, že vazba studovaných podjednotek exocystu na PM by mohla záviset na fosfolipidovém složení membrány.

Pomocí koimunoprecipitace jsme ukázali, že EXO70A1 je přítomna v komplexu s ICR1. Tento protein funguje jako adaptor zprostředkovávající interakci aktivovaných ROP

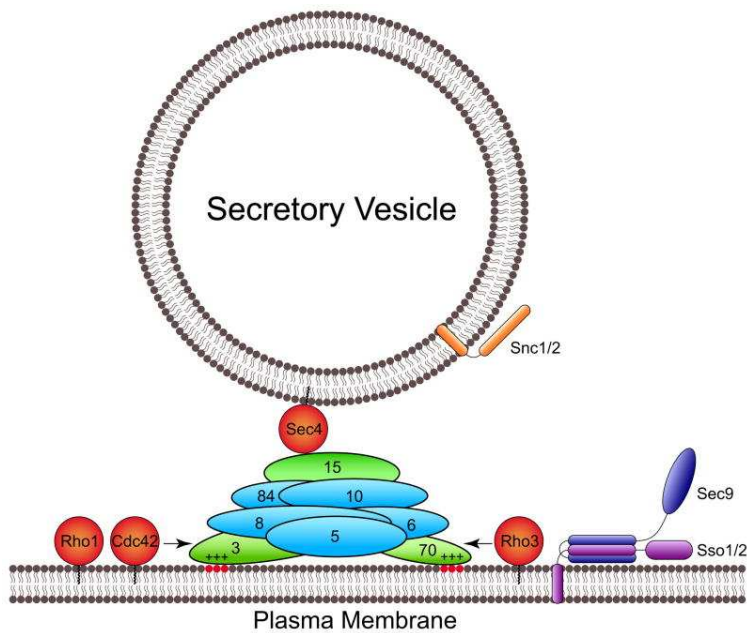
GTPáz se SEC3 podjednotkou exocystu (Lavy et al., 2007). Nedávno byl tento protein popsán při regulaci recyklace PIN1 proteinů (Hazak et al., 2010). To naznačuje, že by recyklaci PIN proteinů mohla být řízena společným působením exocystu, ICR1 a ROP GTPáz.

Zatímco EXO70A1 společně s dalšími podjednotkami exocystu je rozložena nepolárně v plazmatické membráně (Fendrych et al., 2010), EXO70G1 se lokalizuje přednostně do apikální a bazální plazmatické membrány buněk kořene *Arabidopsis*. Vzhledem k asimetrickému rozložení EXO70G1 můžeme hypotetizovat, že by se tato podjednotka mohla účastnit recyklace podobně distribuovaných protein, jako jsou například PIN protein. Jelikož *exo70G1* nevykazuje žádné odlišnosti ve fenotypu, bude potřeba připravit dvojité či trojitě mutanty *exo70G1*, *exo70G2* a *exo70A1* abychom odhalili funkci tohoto proteinu.

1 ÚVOD

Exocyst představuje evolučně konzervovaný proteinový komplex, složený z podjednotek Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 a Exo84. Tento komplex se významně podílí na poutání sekretorických váčků k plazmatické membráně. V živočišných a kvasinkových buňkách je exocyst lokalizován do specifických domén plazmatické membrány, pro které je charakteristická častá fúze sekretorických váčků. V závislosti na vnitřních a vnějších podmínkách se může exocyst v savčích buňkách lokalizovat do TGN anebo do několika různých populací endozómů.

Podle běžně přijímané hypotézy, se u kvasinek podjednotky EXO70 a SEC3 lokalizují do plazmatické membrány pomocí interakce s RhoGTPázami, nezávisle na aktinovém cytoskeletu. Zbývající podjednotky tvoří subkomplex připoutaný k sekretorickému váčku pomocí interakce mezi podjednotkou exocystu Sec15 a RabGTPázou Sec4. Vnitrobuněčný transport těchto podjednotek je tedy závislý na aktinovém cytoskeletu. Složení celého komplexu umožní připoutání váčku k plazmatické membráně (Boyed et al., 2004).



(He a Guo, 2009)

Obrázek 1 Model ukazující roli kvasinkového exocystu při poutání sekretorického váčku k plazmatické membráně.

Exocyst v rostlinné buňce

Homologní geny pro všech osm podjednotek komplexu exocyst bylo nalezeno i v genomu rostlin (Cvrčková et al., 2001, Eliáš et al., 2003). Ukázalo se, že tyto podjednotky působí jako komplex a podílí se na polarizaci sekrece při růstu pylové láčky, během dlouhivého růstu etiolovaných semenáčků *Arabidopsis* (Hála et al., 2008). Je zajímavé, že rostlinný genom obsahuje velkou rodinu genů Exo70, čítající 23 členů v genomu *Arabidopsis*, zatímco genom živočichů a kvasinek obsahuje pouze jeden gen (Eliáš et al., 2003).

2 CÍLE PRÁCE

A Změřit transport radioaktivně značené IAA a porovnat aktivitu v auxinovém maximu s využitím DR5 reportéru mezi WT a *exo70A1*.

B Objasnit zapojení EXO70A1 a dalších podjednotek exocystu v lokalizaci a recyklaci PIN proteinů-výtokových přenašečů auxinu.

C Zjistit funkční specificitu EXO70A1 pro transport a recyklaci PIN proteinů.

D Určit lokalizaci EXO70A1 a dalších podjednotek exocystu v závislosti na fosfolipidovém složení plazmatické membrány.

E Metodou koimunoprecipitace hledat interagující partnery podjednotky EXO70A1.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

A) Přímým měřením auxinového transportu jsme ukázali, že je jeho transport ke špičce kořene mutanta *exo70A1* zpomalen o 40%. S využitím reportérové linie DR5::GUS jsme odhalili zmenšené auxinové maximum v kořenové špičce mutanta *exo70A1* a navíc lokální aplikací IAA se nám podařilo odhalit kanalizační defekt v kořeni mutanta *exo70A1*.

B) Na buněčné úrovni jsme detekovali akumulaci malého množství fúzního proteinu PIN2:GFP do kompartmentů odlišných od endosomů nesoucích VHAa1. Navíc, po působení brefeldinu A byla výrazně narušena recyklace fúzních proteinů PIN1:GFP a PIN2:GFP v kořenech mutantů *exo70A1* a *sec8-m1*. Ještě výraznější recyklační defekt byl patrný po prodlouženém působení BFA. Tento přístup vyvolává transcytózu – tj. relokaci PIN proteinů z BFA kompartmentů do apikální PM v buňkách kořene WT (Kleine-Vehn et al., 2008). Avšak v případě mutantů *exo70A1* a *sec8-m1* zůstávají fúzní proteiny PIN1:GFP a PIN2:GFP internalizovány v BFA kompartmentech.

C) Zablokování funkce EXO70A1 ovlivní recyklaci brassinosteroidového receptoru BRI1, transmembránového proteinu, který putuje BFA senzitivní dráhu mezi endomembránovými kompartmenty a plazmatickou membránou. Recyklace BRI1:GFP zpět na plazmatickou membránu po působení BFA a jeho odmytí je v mutantu *exo70A1* zpomalen. Relokalizace BRI1:GFP vyvolaná dlouhým působením BFA je zablokována v *exo70A1*. Toto zjištění poukazuje na obecnější defekt při recyklaci bílkovin plasmatické membrány.

D) EXO70A1 obsahuje konzervovanou C-koncovou doménu, která je zodpovědná za vazbu fosfatidylinositol 4,5 bisfosfátu u živočichů a kvasinek (He et al., 2007; Žárský et al., 2009). Z toho vyplývá, že by tento protein mohl být senzitivní k wortmanninu. Wortmannin je inhibitor, který blokuje PI3K, a tak působí na endomembránový transport. Se vzrůstající koncentrací se ztrácí specifita inhibitoru a dochází k inhibici PI4K. PI4K je enzym produkující PI(4,5)₂P na plazmatické membráně (Müller-Roeber and Pical, 2002). Působení 33uM wortmanninu po dobu 90 min vyvolalo hromadění GFP:EXO70A1,

GFP:SEC8 a YFP:SEC10 v cytoplazmě. Při koncentraci 66uM wortmanninu po dobu 90 min bylo dosaženo úplné vymizení podjednotek exocystu z membrány.

E) Pomocí koimunoprecipitace jsme ukázali, že EXO70A1 je přítomna v komplexu s ICR1, což naznačuje, že by recyklaci PIN proteinů mohla být regulována společným působením exocystu, adaptorového proteinu ICR1 a ROP GTPáz.

ZÁVĚR

V této práci jsme ukázali, že se proteinový komplex exocyst významně podílí na transportu auxinu a na recyklaci transportérů PIN. Dosavadní výsledky naznačují, že by se na tomto procesu mohly podílet společně exocyst a adaptorový protein ICR1. Avšak bude potřeba připravit další experimenty, aby se objasnil mechanismus působení exocystu na polarizaci PIN proteinů.

REFERENCE

- Boyd, C., Hughes, T., Pypaert, M., Novick, P.** (2004) Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *J. Cell Biol.* 167: 889–901.
- Cvrčková, F., Eliáš, M., Hála, M., Obermeyer, G., Žárský, V.** (2001) Small GTPases and conserved signalling pathways in plant cell morphogenesis: from exocytosis to the Exocyst. In: Geitman, A, Cresti M, editors. *Cell Biology of Plant and Fungal Tip Growth*. IOS Press, Amsterdam. pp. 105-122.
- Hazak, O., Bloch, D., Poraty, L., Sternberg, H., Zhang, J., Friml, J., Yalovsky, S.** (2010) A RHO scaffold integrates the secretory system with feedback mechanisms in regulation of auxin distribution. *PLoS Biol.* 8, e1000282.
- He, B., Xi, F., Zhang, X., Zhang, J., Guo, W.** (2007) Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane. *EMBO J.* 26: 4053–4065.
- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Sauer, M., Brewer, P.B., Wiśniewska, J., Paciorek, T., Benková, E., Friml, J.** (2008) ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 18: 526–531.
- Lavy, M., Bloch, D., Hazak, O., Gutman, I., Poraty, L., Sorek, N., Sternberg, H., Yalovsky, S.** (2007) A Novel ROP/RAC effector links cell polarity, root-meristem maintenance, and vesicle trafficking. *Curr. Biol.* 17: 947–952.
- Mueller-Roeber, B., Pical, C.** (2002) Inositol phospholipid metabolism in *Arabidopsis*. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Physiol.* 130: 22–46.
- Oztan, A., Silvis, M., Weisz, O.A., Bradbury, N.A., Hsu, S.C., Goldenring, J.R., Yeaman, C., Apodaca, G.** (2007) Exocyst requirement for endocytic traffic directed toward the apical and basolateral poles of polarized MDCK cells. *Mol. Biol. Cell.* 18:3978-3992.
- Vega, I.E., Hsu, S-C.,** (2001) The Exocyst Complex Associates with Microtubules to Mediate Vesicle Targeting and Neurite Outgrowth. *J. Neurosci.* 21:3839 -3848.

Žárský, V., Cvrčková, F., Potocký, M., Hála, M. (2009) Exocytosis and cell polarity in plants – exocyst and recycling domains. *New Phytol.* 183: 255–272.