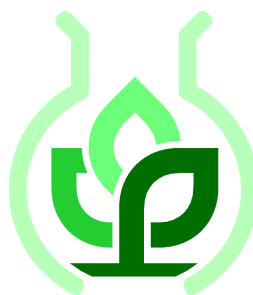


Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin
Charles University in Prague, Faculty of Sciences
Department of Experimental Plant Biology
Akademie věd ČR, Ústav experimentální botaniky
Laboratoř buněčné biologie
Academy of Science of the Czech Republic, Institute of Experimental Botany
Laboratory of Cell Biology

Doktorský studijní program: Anatomie a fyziologie rostlin

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



**Kortikální cytoskelet, exocytický komplex exocyst a jejich role v morfogenezi
rostlinných buněk**

**The interface between secretory pathway and cytoskeleton – the exocyst tethering
complex and cortical cytoskeleton in plant cell morphogenesis.**

Mgr. Matyáš Fendrych

Školitel/Supervisor: RNDr. Viktor Žárský, CSc.

Konzultantka/Consultant: doc. RNDr. Fatima Cvrčková, Dr. rer. nat

Praha 2011

Abstrakt

Morfogeneze rostlinných buněk úzce souvisí s koordinací plasmatické membrány, cytoskeletu a exocytózy. Forminy jsou proteiny regulující tvorbu vláken aktinového cytoskeletu. Rostlinné forminy náležející do třídy I jsou integrální membránové proteiny, mohou tedy regulovat dynamiku cytoskeletu z pozice membránového proteinu. Zjistili jsme, že formin AtFH4 z *Arabidopsis thaliana* se váže na mikrotubulární cytoskelet. Doména zodpovědná za tuto vazbu se nachází mezi transmembránovou a „formin homology 1“ doménou. V *in vitro* podmínkách vázal AtFH4 protein aktinová vlákna. AtFH4 se lokalizoval do membrán endoplasmatického retikula, když byl overexprimován v buňkách tabáku. Zároveň tato lokalizace způsobila rozmístění membrán endoplasmatického retikula podél mikrotubulárního cytoskeletu. Z těchto výsledků vyvozujeme, že AtFH4 je schopný být současně umístěn v membráně a svoji vazbou na aktin a mikrotubuly propojovat tyto dva typy cytoskeletu.

Rostlinná cytokineze závisí na sekreторické dráze; na exocytóze i endocytóze. Před tím, než sekreторické váčky splynou s plasmatickou membránou, jsou k ní poutány „poutacím komplexem“ zvaným exocyst, složeným z osmi podjednotek. Analyzovali jsme mutanty v jedné z podjednotek exocystu *A. thaliana* – EXO84b. Mutantní rostliny byly zakrslé, nejspíše kvůli porušené sekreторické dráze, a část jejich buněk vykazovala cytokerinetické defekty – nedokončená buněčná dělení. Soudě podle lokalizace podjednotek exocystu během buněčného dělení bylo příčinou těchto defektů špatné dozrávání buněčné destičky. Podjednotky SEC6, SEC8, SEC15b, EXO70A1 a EXO84b značené zeleným fluorescenčním proteinem se masivně lokalizovaly do buněčné destičky v okamžiku jejího vzniku a poté do zrající buněčné destičky. Úlohu exocystu ve vzniku tohoto útvaru navíc podporuje poškozené skládání buněčné destičky u rostlin mutantních v podjednotce EXO70A1. Tyto výsledky napovídají, že exocyst je klíčový pro procesy buněčného dělení – skládání buněčné destičky a dozrávání nové buněčné stěny mezi dceřinými buňkami.

Lokalizace exocystu je většinou popisována jako intenzivní signál v oblastech plasmatické membrány spojených s aktivní exocytózou. V této práci jsme použili tzv. „variable-angle epifluorescent microscopy“, která vyniká vysokým podílem signálu ku pozadí, čehož je dosaženo částečným osvětlením vzorku. Pomocí této metody jsme pozorovali umístění exocystu do teček na plasmatické membráně buněk *A. thaliana*. Abychom potvrdili, že tyto tečky představují jednotlivé exocytické váčky navázané na plasmatickou membránu, označili jsme je pomocí membránové barvy FM4-64 a proteinu VAMP721 a zjistili jsme částečnou kolokalizaci mezi exocystem a takto značenými váčky. Exocyst nekolokalizoval s endocytickými váčky označenými pomocí dynamin-related proteinu 1C. Dále jsme zjistili, že tečky značené exocystem přímo nekolokalizují s aktinovým ani mikrotubulárním cytoskeletem. Tyto výsledky představují jedny z prvních pokusů popsat ve vysokém rozlišení lokalizaci a dynamiku vázání a exocytózy váček u rostlinných buněk a zároveň podporují představu exocystu jako poutače váček na plasmatické membráně rostlinných buněk.

Abstract

Plant cell morphogenesis is largely dependent on the coordination of cytoskeletal elements, plasma membrane, and vesicle trafficking. Formin proteins are nucleators of the actin cytoskeleton. Plant Class I family formins are integral membrane proteins and thus have the ability to coordinate cytoskeletal dynamics with the plasma membrane localization. We identified *Arabidopsis thaliana* formin AtFH4 as a microtubule associated protein. The binding is conferred by a novel domain located between the transmembrane domain and the formin homology 1 domain. The protein associated with actin in *in vitro* conditions. Overexpressed AtFH4 accumulated in the endoplasmic reticulum, and induced coalignment of endoplasmic reticulum membranes with microtubules. Together, these data suggest that the combination of plant-specific and conserved domains enables AtFH4 to function as an interface between membranes and both major cytoskeletal networks .

Secretory pathways supported by the activity of the Golgi apparatus play a crucial role in cytokinesis in plant cells. Prior to their fusion with the plasma membrane, secretory vesicles are tethered at exocytic sites by the exocyst, an octameric protein complex. We analysed the mutant in the EXO84b exocyst subunit, and discovered that the mutant plants were dwarfed and exhibited cytokinetic defects. The dwarf stature of the mutants is probably caused by a general secretion defect. The cytokinetic deviations resulted from a post-cytokinetic cell wall maturation defect; this we inferred from the behaviour of GFP-tagged SEC6, SEC8, SEC15b, EXO70A1, and EXO84b exocyst subunits during cytokinesis. These exhibited distinctive localization maxima at the cell plate initiation and cell plate maturation stages, suggesting that the exocyst is also involved in the assembly of the cell plate. Accordingly, the cell plate assembly of *exo70A1* mutants was defective. We conclude that the exocyst complex is involved in secretory processes during cytokinesis in *Arabidopsis* cells; in cell plate initiation, cell plate maturation, and formation of new primary cell wall.

The available data present localizations of the bulk of exocyst proteins to plasma membrane domains associated with high secretion activity. We used variable-angle epifluorescent microscopy that provides higher signal-to-background ratio than confocal microscopy to visualize exocyst subunits at the plasma membrane. Exocyst subunits localized into distinct foci at the plasma membrane, likely corresponding to the individual exocytic sites, which were distinct from sites of endocytosis marked by the dynamin-related protein 1C. Exocyst foci partially overlapped with *bona fide* vesicles markers – the membrane fluorescent dye FM4-64 and v-SNARE VAMP721. We further analysed colocalization of the exocyst foci with actin and microtubule cytoskeletons. These results provide first insights into the dynamics of single exocytic events at the plant plasma membrane in plant cells, and at the same time provide further experimental evidence for the exocyst function in the vesicle tethering process in plants.

Úvod

Všechny buňky v těle rostlin jsou polarizované, obvykle podél jedné i více os. Ve většině situací jsou rostlinné buňky obklopené buněčnými stěnami, které vytváří pomocí tzv. difúzního nebo špičkového růstu. Asymetrické rozložení buněčných komponent tvoří buněčnou polaritu. Na jejím ustanovování a udržování se podílí mnoho procesů, včetně signálních kaskád, cytoskeletu, a váčkového transportu. Polarita buněk také zahrnuje diferenciální složení různých membránových domén(1). Příkladem takové polarity v rostlinných buňkách jsou všudypřítomné – transportéry auxinu PIN, iontové přenašeče (2). V této práci jsem se zaměřil na roli proteinů forminů (3) jako potenciální integrátorů plasmatické membrány a aktinu a mikrotubulů (4). Druhým centrem této práce je proteinový komplex exocyst, který je zodpovědný za poutání exocytických váčků k plasmatické membráně (5).

Cíle práce

Jaká je role forminů v molekulárním propojení obou typů kortikálních cytoskeletů s plasmatickou membránou v rostlinných buňkách?

Rostlinná cytokineze závisí na koordinované činnosti cytoskeletu a směrované sekrece. Jaká je role exocystu v tomto procesu?

Exocyst lokalizuje do exocyticky aktivních oblastí plasmatické membrány. Je možné vizualizovat podjednotky komplexu exocyst na jednotlivých exocytických váčcích?

Shrnutí výsledků

Formin AtFH4 asociuje se aktinem a mikrotubuly a obsahuje nově objevenou mikrotubuly vazebnou doménu(6)

Dynamické chování aktinového cytoskeletu u rostlin závisí na koordinované činnosti několika tříd aktin-vazebných proteinů. Mezi ně patří forminy, které nukleují aktinová vlákna. *Arabidopsis thaliana* kóduje více než 20 paralogů forminů (7), z nichž některé obsahují transmembránovou doménu. Identifikovali jsme rostlinně specifickou doménu forminu AtFH4, která zprostředkovává spojení s mikrotubulárním cytoskeletem. AtFH4 se lokalizoval do membrán endoplasmatického retikula, když byl overexprimován v buňkách tabáku. Zároveň tato lokalizace způsobila rozmístění membrán endoplasmatického retikula podél mikrotubulárního cytoskeletu. Z těchto výsledků vyvozujeme, že AtFH4 je schopný být současně umístěn v membráně a svoji vazbou na aktin a mikrotubuly propojovat tyto dva typy cytoskeletu.

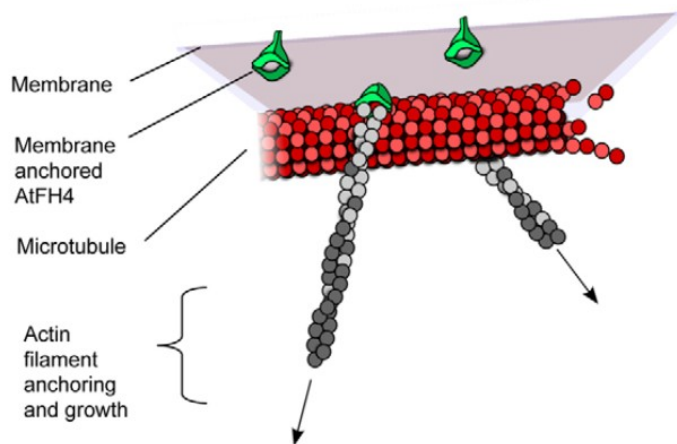
*Komplex exocyst se účastní cytokineze u *Arabidopsis thaliana*(8)*

Reprodukce buňky je složitý proces, který zahrnuje všechny buněčné struktury. Cytokineze, poslední fáze buněčného dělení, je obzvláště u rostlin závislá na váčkovém transportu. Pomocí proteomických, cytologických a genetických přístupů jsme prokázali, že rostlinný exocyst obsahuje podjednotku EXO84b. Rostliny *Arabidopsis* mutantní v této podjednotce vykazovaly trpasličí růst a poruchy buněčného dělení. V průběhu cytokineze se podjednotky exocystu SEC6, SEC8, SEC15b, EXO70A1 a EXO84b značené zeleným fluorescenčním proteinem lokalizovaly do buněčné destičky při jejím vzniku a posléze podél dozrávající buněčné přepážky; obě tyto fáze se vyznačují vysokou poptávkou po fúzi váčků. Dále uvádíme data dosvědčující defekt v sestavování buněčné

destičky u mutanta podjednotky exocystu EXO70A1. Můžeme shrnout, že komplex exocyst je zapojen do sekrečních procesů během cytokineze v buňkách *Arabidopsis*, zejména v iniciaci buněčné přepážky a následném dozrávání a formování nové buněčné stěny.

Vizualizace komplexu exocyst a jeho dynamiky na plazmatické membráně Arabidopsis thaliana

Ve třetí publikaci, která je součástí této disertace, jsme se soustředili na vizualizaci komplexu exocyst na plazmatické membráně. Jak již bylo řečeno, tento komplex se lokalizuje do sekretoricky aktivních oblastí plazmatické membrány. Jednou z příkladných domén tohoto typu je vnější membrána epidermálních buněk kořene *Arabidopsis*, která vymezuje rozhraní mezi rostlinou a nerostlinou. Použili jsme mikroskopickou metodu s vysokým rozlišením - VAEM(9) k vizualizaci podjednotek SEC6, SEC8, EXO70A1 a EXO84b. Tyto se nacházely v ohraničených tečkách na plazmatické membráně, pravděpodobně odpovídajících jednotlivým sekretorickým váčkům. Pozorovali jsme značné snížení hustoty těchto teček v buňkách mutanta podjednotky exocystu EXO70A1. Tečky značené exocystem se částečně překrývaly s *bona fide* markery sekretorických váčků - fluorescenčním barvivem FM4-64 a V-SNARE proteinem VAMP721. Zaznamenaná dynamika teček pravděpodobně reprezentuje dynamiku poutání exocytických váčků k plazmatické membráně u *Arabidopsis*. Nakonec jsme ukázali, že lokalizace exocystu je nezávislá na mikrotubulech a aktinu, ale delší narušení aktinového cytoskeletu vedlo ke změnám v polaritě exocystu v rámci buňky. Tato práce může sloužit jako podklad pro další studium exocytózy ve vysokém rozlišení u rostlin.



Model propojení plazmatické membrány s aktinovým a mikrotubulárním cytoskeletem pomocí forminu AtFH4.

A model depicting a putative role for AtFH4 at the plant membrane-cytoskeletal interface. Actin filament anchoring could theoretically occur in parallel to microtubule association, or microtubule and F-actin binding could be mutually exclusive.

Introduction

All cells in the plant body are polarized, usually along more than one axis. In the majority of situations, plant cells live interconnected by their cell walls. These cells usually grow by a so called diffuse growth. Diffuse growth is characterized by distribution of the growth along the growing region, whereas tip growth is a spatially focused cell expansion.

Asymmetric distribution of cellular components and structures constitutes cell polarity. Many processes, including signal cascades, cytoskeletal dynamics and intracellular trafficking, are engaged in cell polarity establishing and maintenance. Cell polarity includes differential composition of different membrane domains (1). Examples of such polarity in plant cells are ubiquitous – auxin transporters PIN, ion transporters (2). Cell polarity is controlled and maintained by protein and other cargo sorting in the endomembrane system, by transport of proteins and cargo to target plasma membrane (PM) domains, and by fusion of the vesicles containing the cargo with the selected PM domain. In this thesis, I focused on the role of formin proteins (3) as potential integrators of plasma membrane and both actin and microtubule cytoskeleton (4), and the exocyst tethering complex that controls the last step of the secretory pathway (5).

Aims of the thesis

What is the role of formins in the molecular machinery interconnecting the two types of cortical cytoskeletons and plasma membrane in plant cells?

Plant cytokinesis depends on coordinated action of cytoskeleton and focused secretion into the developing cell plate. What is the role of the exocyst in this process?

The exocyst localizes to highly secretory active plasma membrane domains. Is it possible to visualize subunits of the exocyst complex at exocytic sites using a high resolution imaging technique?

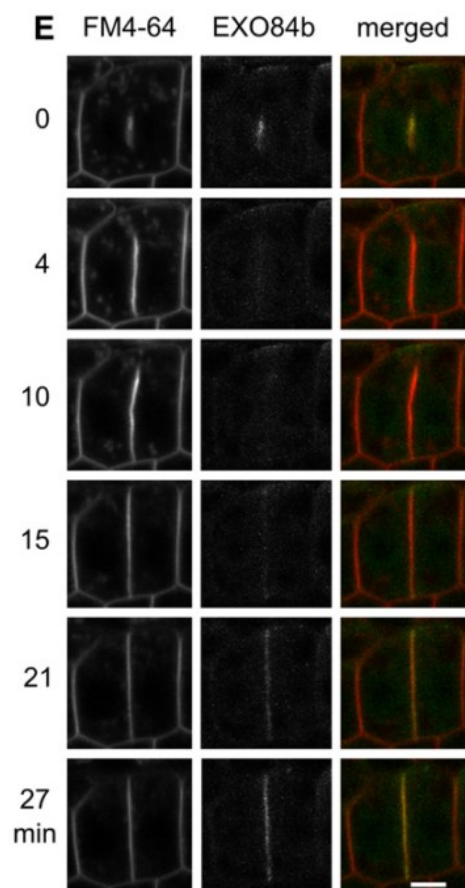
Summary of results

The plant formin AtFH4 interacts with both actin and microtubules, and contains a newly identified microtubule-binding domain(6)

The dynamic behaviour of the actin cytoskeleton in plants relies on the coordinated action of several classes of actin-binding proteins (ABPs). These ABPs include the plant-specific subfamilies of actin-nucleating formin proteins. The model plant species *Arabidopsis thaliana* has over 20 formin proteins, all of which contain plant-specific regions in place of the GTPase-binding domain, formin homology (FH)3 domain, and DAD and DID motifs found in many fungal and animal formins. We have identified for the first time a plant-specific region of the membrane-integrated formin AtFH4 that mediates an association with the microtubule cytoskeleton. In vitro analysis shows that this region (named the GOE domain) binds directly to microtubules. Overexpressed AtFH4 accumulates at the endoplasmic reticulum membrane and co-aligns the endoplasmic reticulum with microtubules. The FH1 and FH2 domains of formins are conserved in plants, and we show that these domains of AtFH4 nucleate F-actin. Together, these data suggest that the combination of plant-specific and conserved domains enables AtFH4 to function as an interface between membranes and both major cytoskeletal networks

Title: The Arabidopsis Exocyst Complex Is Involved in Cytokinesis and Cell Plate Maturation(8)

Cell reproduction is a complex process involving whole cell structures and machineries in space and time, resulting in regulated distribution of endomembranes, organelles, and genomes between daughter cells. Secretory pathways supported by the activity of the Golgi apparatus play a crucial role in cytokinesis in plants. From the onset of phragmoplast initiation to the maturation of the cell plate, delivery of secretory vesicles is necessary to sustain successful daughter cell separation. Tethering of secretory vesicles at the plasma membrane is mediated by the evolutionarily conserved octameric exocyst complex. Using proteomic and cytologic approaches, we show that EXO84b is a subunit of the plant exocyst. *Arabidopsis thaliana* mutants for EXO84b are severely dwarfed and have compromised leaf epidermal cell and guard cell division. During cytokinesis, green fluorescent protein–tagged exocyst subunits SEC6, SEC8, SEC15b, EXO70A1, and EXO84b exhibit distinctive localization maxima at cell plate initiation and cell plate maturation, stages with a high demand for vesicle fusion. Finally, we present data indicating a defect in cell plate assembly in the *exo70A1* mutant. We conclude that the exocyst complex is involved in secretory processes during cytokinesis in *Arabidopsis* cells, notably in cell plate initiation, cell plate maturation, and formation of new primary cell wall.



Lokalizace podjednotky EXO84b značené GFP během cytokineze v buňce kořene *Arabidopsis*.

EXO84b-GFP subunit during cytokinesis in *Arabidopsis* root cell. The cell plate was labelled by FM4-64

Title: Visualization of the Exocyst Complex Dynamics at the Plasma Membrane of Arabidopsis thaliana

Polarized exocytosis is crucial for plant cell morphogenesis. Prior to their fusion with the plasma membrane, secretory vesicles are tethered at exocytic sites by the exocyst, an octameric protein complex. Accordingly, exocyst subunits localize to secretory active regions of the plasma membrane of yeast, animal, and plant cells. Such a region is exemplified by the outer epidermal domain of Arabidopsis root cells that delimits the root-soil interface. We employed the high resolution VAEM(9) microscopy to visualize exocyst subunits SEC6, SEC8, EXO70A1, and EXO84b. These colocalized in distinct foci at the plasma membrane, likely corresponding to single exocytic sites, which were distinct from sites of endocytosis marked by dynamin-related protein 1C. We observed considerable decrease of SEC6-GFP foci density at the plasma membrane in Arabidopsis exocyst subunit mutant *exo70A1*. Exocyst foci partially overlapped with bona fide vesicles visualized by membrane fluorescent dye FM4-64 and by v-SNARE VAMP721. The recorded dynamics of exocyst foci plausibly represents dynamics of secretory vesicle tethering at the plasma membrane in Arabidopsis cells. Finally, we show that the exocyst foci localization was independent on microtubule and actin cytoskeleton, although prolonged actin disruption led to changes in exocyst polarization within the cells. This work provides a background for high resolution studies of Arabidopsis exocytosis.

Matyáš Fendrych

Laboratory of Cell Biology
Institute of Experimental Botany
Academy of Sciences of the Czech Republic
Rozvojová 263
Prague 6, 16505, CZ
fendryc1@natur.cuni.cz

* 1 November 1981 in Prague

Education & Research:

2006-present

Institute of Experimental Botany ASCR, Prague, Laboratory of Cell Biology, supervisor Viktor Žárský

Ph.D. thesis: The exocyst at the interface between secretory pathway and cytoskeleton

The research focuses on characterizing subunits of the exocyst vesicle tethering complex, using a reverse genetic approach, molecular cloning, microscopy (confocal microscopy, TIRF microscopy) and testing of protein-protein interactions (yeast-two hybrid, co-immunoprecipitations).

Publications:

Fendrych M, Synek L, Pečenková T, Toupalová H, Cole R, Drdová E, Nebesářová J, Šedinová M, Hála M, Fowler JE, and Žárský V. 2010. "The Arabidopsis Exocyst Complex Is Involved in Cytokinesis and Cell Plate Maturation." *The Plant Cell*. 22:3053-65

*Contribution: I co-designed and performed most of the experiments and was the primary writer of the text

Deeks MJ, **Fendrych M**, Smertenko A, Bell KS, Oparka K, Cvrčková F, Žárský V, and Hussey PJ. 2010. "The plant formin AtFH4 interacts with both actin and microtubules, and contains a newly identified microtubule-binding domain." *Journal of Cell Science*. 123:1209-1215

*Contribution: Joint first authorship; co-designed and, together with MJD, performed part of the experiments, assisted in writing the text.

Pečenková T, Hála M, Kulich I, Kocourková D, Drdová E, **Fendrych M**, Toupalová H, and Žárský V. 2010. "The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant-pathogen interaction." *Journal of Experimental Botany*, *in press*

*Contribution: molecular cloning and assistance with confocal microscopy

2009 (October)

Internship at Oregon State University, USA, Department of Botany and Plant Pathology, laboratory of Dr. John Fowler

2007 (October) – 2008 (February)

Internship at the University of Durham, UK, Integrative Cell Biology Laboratory, School of Biological and Biomedical Sciences, Prof. Patrick J. Hussey

2006 (December)

Internship at the University of Bonn, DE, Institute of Cellular and Molecular Botany, laboratory of Dr. František Baluška

2001-2006

Charles University in Prague, Faculty of Science, Master degree in Biology

2004-2006

Department of Experimental Plant Biology, master's thesis: Interaction of ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal plants via ectomycorrhizal, ericoid mycorrhizal and pseudomycorrhizal fungi. Supervisor Doc. Jana Albrechtová.

Publications:

Vohník M, **Fendrych M**, Albrechtová J, and Vosátka M. 2007. "Intracellular Colonization of Rhododendron and Vaccinium Roots by Cenococcum geophilum, Geomyces pannorum and Meliniomyces variabilis." *Folia Microbiologica*. 52:407-414.

*Contribution: performed part of the experiments

2003

Erasmus internship at the University of Central Lancashire, UK

Selected oral presentations

2010 (July)

FESPB, Valencia: *Arabidopsis* exocyst complex is involved in cytokinesis.

2010 (September)

KEBR, Prague: Role of the exocyst complex in cytokinesis in *Arabidopsis*

*winner of the best talk award

Teaching activities

2010 Supervisor of bachelor's thesis – Jitka Ortmannová

2010 Consultant of master's thesis – Bc. Juraj Sekereš

Literature

1. Žárský V, Cvrčková F, Potocký M, Hála M (2009) Exocytosis and cell polarity in plants - exocyst and recycling domains. *New Phytol* 183: 255-272.
2. Langowski L, Růžička K, Naramoto S, Kleine-Vehn J, Friml J (2010) Trafficking to the Outer Polar Domain Defines the Root-Soil Interface.. *Current Biology* : 904-908.
3. Deeks MJ, Cvrčková F, Machesky LM, Mikitová V, Ketelaar T et al. (2005) Arabidopsis group Ie formins localize to specific cell membrane domains, interact with actin-binding proteins and cause defects in cell expansion upon aberrant expression. *New Phytol* 168: 529-540.
4. Bartolini F, Gundersen GG (2010) Formins and microtubules. *Biochim Biophys Acta* 1803: 164-173.
5. Hála M, Cole R, Synek L, Drdová E, Pečenková T et al. (2008) An exocyst complex functions in plant cell growth in Arabidopsis and tobacco. *Plant Cell* 20: 1330-1345.
6. Deeks MJ, Fendrych M, Smertenko A, Bell KS, Oparka K et al. (2010) The plant formin AtFH4 interacts with both actin and microtubules, and contains a newly identified microtubule-binding domain. *J Cell Sci* 123: 1209-1215.
7. Grunt M, Žárský V, Cvrčková F (2008) Roots of angiosperm formins: the evolutionary history of plant FH2 domain-containing proteins. *BMC Evol Biol* 8: 115.
8. Fendrych M, Synek L, Pečenková T, Toupalová H, Cole R et al. (2010) The Arabidopsis exocyst complex is involved in cytokinesis and cell plate maturation. *Plant Cell* 22: 3053-3065.
9. Konopka CA, Bednarek SY (2008) Variable-angle epifluorescence microscopy: a new way to look at protein dynamics in the plant cell cortex. *Plant J* 53: 186-196.