

DISS. ETH NO. 27795

***Endomembrane trafficking in plant-microbe interactions:
Identification and characterization of host molecular factors required
for plasma membrane-mediated defense***

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

Presented by

HSIN-YAO HUANG

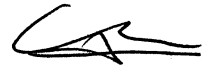
M.Sc., National Taiwan University
B.Sc., National Taiwan University

Born 14.11.1990

Citizen of the
REPUBLIC OF CHINA
TAIWAN

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Clara Sánchez-Rodríguez (examiner)
Prof. Dr. Samuel C. Zeeman (co-examiner)
Prof. Dr. Thomas Ott (co-examiner)



Abstract

Plants are immobile organisms, whose responses at the cellular level are essential for adapting to numerous environmental stresses, including pathogens. One of these pathogens is *Fusarium oxysporum* (Fo), a soil-borne fungus widespread around the world. Fo infects the plant roots by penetrating in between root epidermal cells. Its hyphae later travel through this extracellular space in roots called apoplast, which mainly comprises plant cell walls, towards root vasculature. The following rapid fungal proliferation in the vasculature blocks water and nutrient transport and eventually leads to plant death. During its movement in the apoplast, Fo secretes plenty of cell wall modifying proteins to loosen and degrade the plant cell wall and facilitate the fungal infection. It is important that plant cells recognize these changes in their cell walls and trigger the responses to halt Fo movement. This process is achieved through, among others, plasma membrane-localized sensor proteins, whose turnover is controlled by endocytosis, mainly mediated by clathrin. Following endocytosis, the plasma membrane proteins carrying degradation signals are transported through endomembrane trafficking for vacuolar degradation. This process is crucial, as sensors fulfilling its function need to be removed or replaced with new ones, so plant responses can be terminated, or plant capacity of responding to stimuli can be maintained.

The current understanding of plant response to Fo is limited. The aim of this thesis is to investigate and utilize the function of plant endocytosis in response to Fo infection for better understanding of cell wall sensing. We started the investigation by assessing the role of clathrin-mediated endocytosis (CME) in plant response to Fo. Our results revealed that perception of Fo and microbial molecules reduces the lifetime of an early adaptor protein needed for the initiation of CME, which is correlated with an enhanced endocytosis activity. Our data further suggest that this lifetime reduction is pH-independent and Ca^{2+} -dependent upon the microbe perception. Then, we utilized the endocytic pathway to identify a novel cell wall integrity sensor in response to Fo. In the enriched immunisolated late endosomal proteomes upon Fo infection, we found MATERNAL EFFECT EMBRYO ARREST 39 (MEE39). We confirmed its predicted localization at the plasma membrane by confocal microscopy analysis of the MEE39-GFP marker. A knock-out mutation in MEE39 resulted in reduced plant resistance to Fo and decreased sensitivity to cellulose synthesis inhibition by isoxaben, suggesting a role of MEE39 in plant defense and cell wall integrity sensing. Examination on *MEE39* promoter activity and its mRNA accumulation revealed that both Fo and isoxaben activate *MEE39* transcription. However, MEE39 protein accumulation was reduced by Fo while increased by isoxaben treatment. Furthermore, a previously reported cell wall integrity sensor, MALE DISCOVERER1-INTERACTING RECEPTOR LIKE KINASE2 (MIK2), was discovered as a potential interactor of MEE39. It was found to possibly function in the MEE39-dependent plant defense mechanism against Fo. Taken together, the work presented in this thesis deepens the understanding of plant response to Fo, including unravelling a Ca^{2+} -dependent modulation on CME adaptor proteins, the discovery of a potential cell wall integrity sensor, MEE39, whose function links to the previously studied sensor MIK2 and initiates the clarification of defense mechanisms against Fo. These findings are therefore beneficial for both fundamental understanding of plant cell biology and developing new strategies that facilitate plant defense against Fo.

Zusammenfassung

Pflanzen sind unbewegliche Organismen deren Reaktionen auf Zell-Ebene notwendig sind, um sich an verschiedenste Stressfaktoren in der Umwelt anzupassen, unter anderem an Krankheitserreger. Einer dieser Krankheitserreger ist *Fusarium oxysporum* (Fo), ein bodenbürtiger Pilz, der auf der ganzen Welt weit verbreitet ist. Fo infiziert die Wurzeln der Pflanzen indem er zwischen den Epidermis-Zellen eindringt. Seine Hyphen wachsen danach im extrazellulären Raum der Wurzel, bei Pflanzen Apoplast genannt und hauptsächlich mit Zellwand-Material gefüllt, weiter in Richtung des Vaskulärsystems. Die darauffolgende rapide Vermehrung des Pilzes im Vaskulärsystem blockiert den Wasser und Nährstoff-Transport und führt in Folge dessen letztendlich zum Absterben der Pflanze. Während seines Wachstums im Apoplast sekretiert Fo diverse Zellwand-modifizierende Proteine, um die Zellwand der Pflanze zu lockern und abzubauen und damit die fortschreitende Infektion zu vereinfachen. Für Pflanzenzellen ist es wichtig diese Veränderungen in der Zellwand wahrzunehmen und Reaktionen auszulösen, die das Fortschreiten der Fo Infektion stoppen. Dieser Prozess wird unter anderem durch Plasmamembran-lokalisiert Sensor-Proteine erreicht, deren Auswechslung durch Clathrin-vermittelte Endozytose kontrolliert wird. Nach der Endozytose werden Plasmamembran-Protein mit einem Abbau-Signal durch das Endomembran-System transportiert, um in der Vakuole abgebaut zu werden. Dieser Prozess ist entscheidend, da Sensoren, die ihre Funktion erfüllt haben entfernt und durch neue ersetzt werden müssen, damit die Pflanze ihre Reaktion beenden kann oder die Kapazität auf erneute Stimuli zu reagieren erhalten werden kann.

Momentan ist das Verständnis der Pflanzen-Reaktion auf Fo begrenzt. Ziel dieser Thesis ist es die Endozytose der Pflanze während der Reaktion der Pflanze auf eine Fo -Infektion zu untersuchen und zu verwenden, um ein besseres Verständnis der Zellwand-vermittelten Wahrnehmung zu bekommen. Wir haben die Forschungsarbeiten damit begonnen, dass wir die Clathrin-vermittelte Endozytose (CME) der Pflanze in Reaktion auf Fo beobachtet haben. Unsere Resultate haben gezeigt, dass die Perzeption von Fo und mikrobiellen Molekülen die Lebensdauer eines frühen Adaptor-Proteins, benötigt, um CME zu initiieren, an der Plasmamembran verkürzt hat, was einer gesteigerten Endozytose-Aktivität entspricht. Des Weiteren weisen unsere Daten darauf hin, dass diese verkürzte Lebensdauer nach Wahrnehmung von Mikroben unabhängig vom pH aber abhängig vom Ca^{2+} ist. Im Folgenden haben wir den endozytischen Vorgang verwendet, um einen neuen Zellwand-Integritäts-Sensor zu identifizieren, der eine Rolle spielt in der Reaktion auf Fo. In angereicherten, immune-isolierten Proteom der späten endosomalen Fraktion nach begonnener Fo-Infektion fanden wir MATERNAL EFFECT EMBRYO ARREST 39 (MEE39). Wir haben die Lokalisation an der Plasmamembran mittels konfokaler Mikroskopie und einem MEE39-GFP Marker bestätigt. Eine knock-out Mutation von MEE39 resultiert in verminderter Resistenz der Pflanze gegen Fo und einer geringeren Empfindlichkeit für Zellulose-Synthese Verhinderung durch Isoxaben; dies vermittelt den Anschein, dass MEE39 in der Pflanzen-Verteidigung und der Zellwand-Integrität-Wahrnehmung eine Rolle spielt. Untersuchungen des MEE39-Promoters und der MEE39-mRNA Menge haben ergeben, dass beides, Fo-Infektion und Isoxaben-Behandlung, die MEE39-Transkription erhöhen. Allerdings war die Anreicherung von MEE39-Protein verringert nach Fo-Infektion während sie erhöht war nach Isoxaben-Behandlung. Überdies wurde ein potenzieller Interaktor von MEE39 gefunden, der bereits bekannte Zellwand-Integritäts-Sensor MALE DISCOVERER1-INTERACTING RECEPTOR LIKE KINASE2 (MIK2). Er erfüllt möglicherweise eine Funktion in der MEE39-abhängigen Verteidigungsreaktion der Pflanze gegen Fo.

Alles in Allem vertieft die in dieser Thesis präsentiert Arbeit das Verständnis der Reaktion der Pflanze auf Fo. Darin inbegriffen sind Entschlüsselung einer Ca^{2+} -Abhängigkeit Modulation von CME-Adaptor-Proteinen, die Entdeckung eines potenziellen Zellwand-Integritäts-Sensors, MEE39, dessen Funktion mit der des bereits untersuchten Sensors MIK2

zusammenhängt, und leitet die Klärung der Verteidigungsmechanismen der Pflanze gegen Fo ein. Diese Resultate sind daher nützlich für beides, das grundlegende Verständnis der Pflanzenzellbiologie und auch die Entwicklung von neuen Strategien um die Pflanzen-eigene Verteidigung gegen Fo zu vereinfachen.