

Hak Rith Théa, M2 Sciences du Végétal - Parcours Recherche (Université Paris-Saclay)

Cell cycle and cytoskeleton crosstalks for mitotic entry in plant cells

Supervised by Martine Pastuglia and David Bouchez from the SPACE team, Institut Jean-Pierre Bourgin

This work has been partially supported by the EUR SPS-GSR (ANR-17-EUR-0007).

Abstract: Plant morphogenesis heavily rely on cell division, thus requiring spatiotemporal regulation. While the cell cycle machinery orchestrates the timing and sequence of events leading to mitosis, the microtubule cytoskeleton can organize into 3D arrays, allowing spatial regulation of the cellular events at play. However, the crosstalk between cell cycle and cytoskeleton has yet to be elucidated [1]. The aim of my internship was to start deciphering the main aspects of these interactions. In particular, we focused on the Preprophase Band (PPB), a ring-like structure of microtubules arrays formed at the cell cortex prior to mitotic entry. The PPB regulates the division plane orientation and its formation requires the TON1/TRM/PP2A (TTP) protein complex that can interact with cortical microtubules [1]. Interestingly, Cyclin-Dependent Kinase A;1 (CDKA;1), the central cell cycle regulator was observed at the PPB shortly before its disassembly [2], raising the following questions: Is CDKA;1 involved in PPB disassembly? Is it recruited there by the TTP complex? To address these questions, I used genetics and microscopy-based approaches in the root meristem of *Arabidopsis thaliana*. First, I characterized localization dynamics of CDKA;1 tagged with a fluorescent protein. In contradiction with previous works, I showed that CDKA;1 accumulates at the PPB at the beginning of its formation and not only upon its disassembly, suggesting another role than in its dismantlement. Then, CDKA;1 activity implication in PPB regulation was assessed using the *cdka;1-DE* hypomorphic mutant [3]. Immunolocalization with cell walls and microtubules staining was performed. PPB defects can be assessed by measuring angles formed by transverse cell walls of adjacent cells and a reference in the root as a good proxy of division orientation. Strikingly, division angles are very regular in wild-type, but were more variable in the mutant. Accordingly, microtubules staining revealed that the mutant presents wider PPBs, indicating a maturation defect, as PPBs usually condense as they mature. To further dig into molecular mechanisms, we studied CDKA;1 interaction with the TTP complex. In fact, CDKA;1 colocalizes with TTP proteins such as TRM7 and TON1 at the PPB and Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assays revealed that CDKA;1 can physically interact with TON1. Besides, expression of the CDKA;1 fluorescent marker in *ton1*, a PPB-devoid mutant, no longer displays any localization at the cortex of the cell. Overall, it suggests that CDKA;1 is recruited at the PPB through its interaction with TON1 and cannot localize at the cortex alone. Following this work, it is of particular interest to identify CDKA;1 targets at the PPB and phospho-regulation sites thanks to phosphoproteomics, which might help better understand the mechanisms leading to the formation of this peculiar ring.

Keywords: Plant morphogenesis - cell cycle – plant CDK – preprophase band – TTP complex

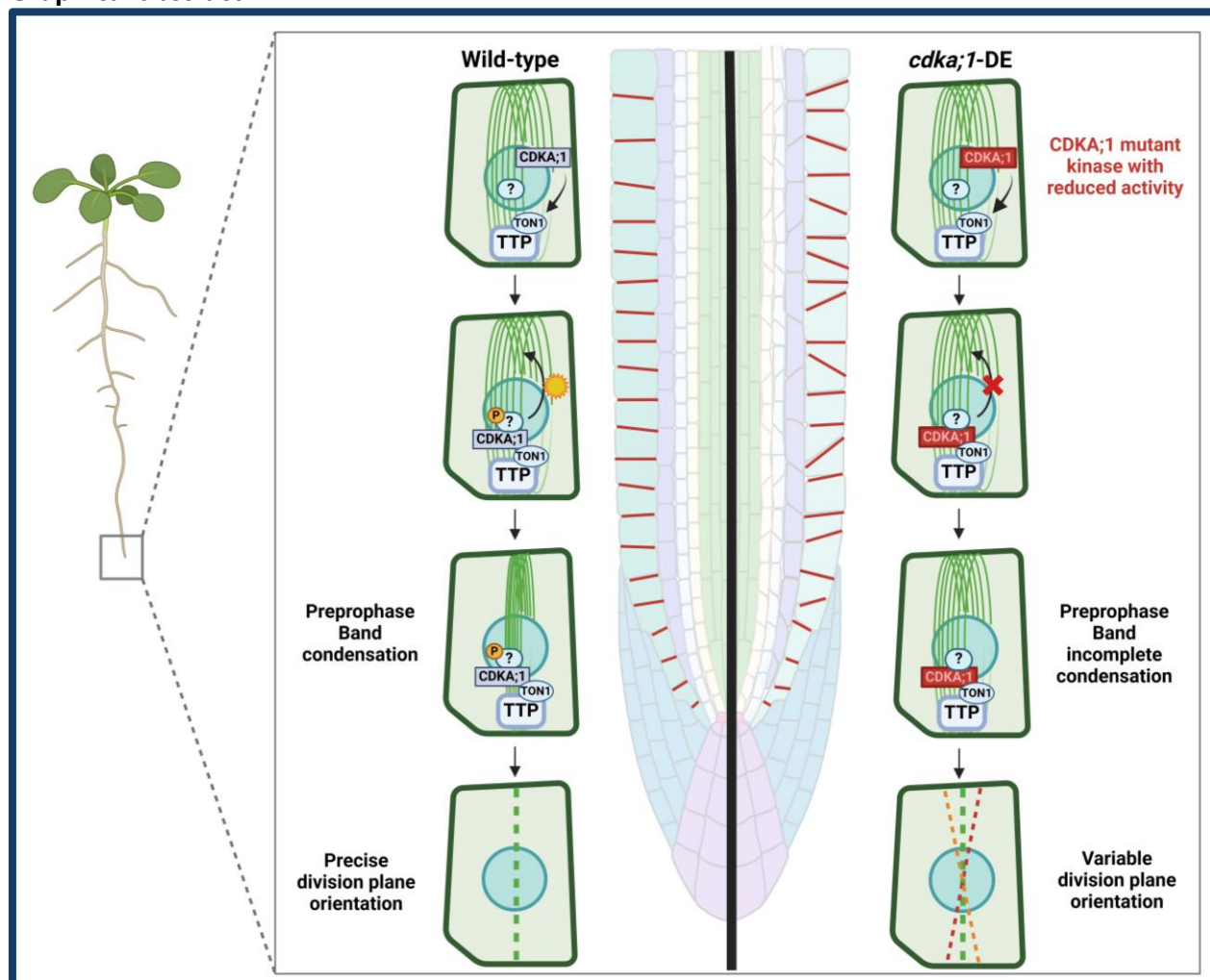
Résumé : La morphogenèse des plantes repose sur la division cellulaire qui requiert d'être régulée temporellement et spatialement. La machinerie du cycle cellulaire gouverne le moment et l'ordre des événements conduisant à la mitose, tandis que le cytosquelette de microtubules s'organise en structures 3D, servant ainsi de support dans l'espace à la réalisation de processus cellulaire [1]. Néanmoins, leur dialogue reste encore peu caractérisé. L'objectif de mon stage était d'initier l'étude de ces interactions. Nous avons focalisé l'étude sur l'anneau de préprophase (PPB) qui est une structure en anneau de microtubules corticaux se formant avant l'entrée en mitose. Le PPB régule l'orientation spatiale des plans de division et sa formation nécessite le complexe protéique TON1/TRM/PP2A (TTP) qui interagit avec les microtubules corticaux [1]. Le régulateur central du cycle cellulaire : la cyclin-dépendent kinase A;1 (CDKA;1), a été observée au PPB transitoirement, peu avant son désassemblage [2], soulevant des questions sur son rôle dans ce processus et l'implication du TTP dans son recrutement. Ces questions ont été abordées par des approches de génétique et de microscopie sur le méristème racinaire d'*A. thaliana*. Premièrement, j'ai caractérisé les dynamiques de localisation de CDKA;1 à l'aide d'une lignée marqueur fluorescente. En contradiction avec des travaux antérieurs, j'ai ainsi démontré que CDKA;1 s'accumule au PPB au début de sa formation, suggérant un rôle autre que dans son désassemblage. Ensuite, l'impact de l'activité kinase de CDKA;1 sur la régulation du PPB a été étudiée en réalisant des immunolocalisations avec marquage des microtubules et des parois cellulaires chez le mutant hypomorphe *cdka;1-DE* [3]. Des défauts de PPB se traduisent

généralement par des défauts d'orientation de division, assez bien approximé dans la racine par les angles formés par les parois transverses de cellules adjacentes et une référence. En outre, les angles de division sont clairement plus variables chez le mutant que le sauvage. Cela est concordant avec l'organisation des microtubules qui révèle des PPB plus larges chez le mutant, révélateur d'un défaut de condensation de l'anneau, donc de maturation. Finalement, j'ai entrepris l'étude des interactions entre le complexe TTP et CDKA;1. Ainsi, CDKA;1 colocalise au PPB avec TRM7 et TON1 et des expériences de BiFC suggèrent une interaction physique entre CDKA;1 et TON1. L'expression d'un marqueur fluorescent de CDKA;1 dans le mutant *ton1* dénué de PPB, ne présente plus d'accumulation de la kinase au cortex de la cellule. CDKA;1 semble donc être recruté au PPB par TON1 et ne peut s'accumuler au cortex de la cellule seule. Dans la continuité de ces travaux, il serait intéressant d'identifier les cibles de CDKA;1 au PPB et leurs sites de régulation par phosphoprotéomique, afin de mieux comprendre les mécanismes menant à la formation de ce mystérieux anneau.

References:

1. Motta MR, Schnittger A (2021) A microtubule perspective on plant cell division. *Current Biology* 31: 547-552
2. Weingartner M, Binarova P, Drykova D, Schweighofer A, David JP, et al. (2001) Dynamic recruitment of Cdc2 to specific microtubule structures during mitosis. *Plant Cell* 13:1929-43
3. Dissmeyer N, Weimer AK, Pusch S, De Schutter K, Alvim Kamei CL, et al. (2009) Control of cell proliferation, organ growth, and DNA damage response operate independently of dephosphorylation of the Arabidopsis Cdk1 homolog CDKA;1. *Plant Cell* 21:3641-54

Graphical abstract:



Central cell cycle regulator CDKA;1 is involved in preprophase band maturation. CDKA;1 is recruited at the PPB shortly after its formation by TON1. There, it supposedly phosphorylates an unknown player that triggers PPB condensation. Thus, fully matured PPB allows precise division plane orientation setup. Made with BioRender.