

# Kontrolle der Zellform bei Pflanzen

Martin Hülskamp

Zellen nehmen im Rahmen ihrer Differenzierung eine für sie charakteristische und oft für ihre Funktion wichtige Zellform an. Untersuchungen an tierischen Modellsystemen und vor allem bei der Hefe haben gezeigt, dass bei der Ausprägung der Zellform drei Schritte unterschieden werden können: Zunächst werden die Wachstumsachsen festgelegt, im einfachsten Fall bedeutet dies die Etablierung einer Polarität entlang einer Achse. Danach werden diese fixiert, beispielsweise durch die Ausrichtung des Zytoskeletts. Das eigentliche Zellwachstum beginnt schließlich mit dem lokalen Einbau von Membran- und Sekretionsvesikeln in die Zellmembran. Bei Pflanzen wird dabei gleichzeitig die extrazelluläre Matrix aufgelockert. Dabei scheinen die zugrunde liegenden Mechanismen in Hefen, Tieren und Pflanzen oft sehr ähnlich zu sein.

Um die Mechanismen in diesen drei Schritten bei Pflanzen zu verstehen, konzentrieren wir uns auf die Untersuchung eines Zelltyps mit außergewöhnlich komplexer und zugleich regulärer Zellform: Die Blatthaare der *Arabidopsis thaliana*. Diese sogenannten Trichome sind einzelne polyplioide Zellen mit einem vorher-sagbaren, an der Blattachse ausgerichteten Verzweigungsmuster (Hülskamp et al., 1994). Dabei ist das Verzweigungsmuster Ausdruck einer mehrfachen Polaritätsänderung der Zelle, beziehungsweise des Anlegens neuer Wachstumsachsen und bietet deshalb exzellente Kriterien zur Untersuchung der Regulation der Zellform (Hülskamp, 2000). Durch die genetische Untersuchung der Blatthaare konnten wir Verzweigungsmutanten isolieren und damit Gene identifizieren, die für die Festlegung der Wachstumsachsen wichtig sind. Über die Isolierung von Mutanten, die generell die Zellform oder das Streckungswachstum betreffen, wurden Gene erkannt, die für die Fixierung der Wachstumsachse und für das lokale Wachstum benötigt werden.

## Festlegung der Wachstumsachsen

Während ihrer Entwicklung ändert die Trichomzelle mehrfach ihre Polarität

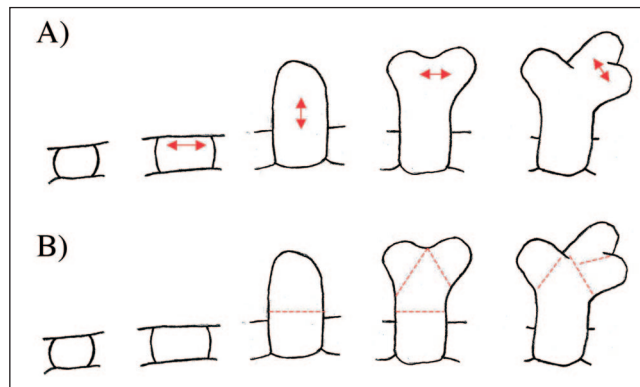


Abbildung 1: Zellpolarität in *Arabidopsis* Trichomen.

A) Schematische Darstellung der Entwicklung von *Arabidopsis* Trichomen. Die Änderungen der Zellpolarität sind durch rote Doppelpfeile hervorgehoben. B) Modell, nach dem die Verzweigungen von *Arabidopsis* Trichomen evolutionär von Zellteilungen abgeleitet werden. In Anlehnung an das Zellteilungsmuster in anderen Spezies sind Zellteilungsebenen gestrichelt eingezeichnet. Änderungen der Richtung der Zellteilungen, führen hiernach zur Initiation neuer Verzweigungen.

(Abbildung 1A). Die erste Änderung führt zum Auswachsen der Zelle aus dem Gewebeverband, die folgenden zur Bildung von zwei Verzweigungen. Einblicke in den zugrunde liegenden Mechanismus erhielten wir über die Analyse von zwei Mutantenklassen: Mutanten, bei denen Trichome mehrzellig sind und Mutanten, in denen die Verzweigungsanzahl verändert ist.

Der Schritt von der Einzelligkeit zur Mehrzelligkeit ist bei Trichomen durch eine Mutation im *SIAMESE* Gen oder durch Überexpression von mitotischen Zyklinen (*CYCB1* und *CYCD3*) auslösbar (Reddy, 2001; Schnittger et al., 2002a; Schnittger et al., 2002b; Walker et al., 2000). Dies spricht dafür, dass Trichome evolutionär von mehrzelligen Trichomen abstammen. Da Verzweigungen in multizellulären Trichomen durch ein bestimmtes Zellteilungsmuster entstehen, liegt die Vermutung nahe, dass der Mechanismus, der die räumliche Anordnung der Verzweigungen bestimmt, auf Prinzipien zurückzuführen ist, die normalerweise die Zellteilungsebenen festlegen (Abbildung 1B). Die molekular- und zellbiologische Untersuchung des Verzweigungsgens *ZWICHEL*, ein Kinesin-Motormolekül, unterstützt diese These (Reddy, 2001). Obwohl die *ZWICHEL* Mutante ausschließlich die Verzweigung von Trichomen betrifft, scheint das *ZWICHEL* Protein eine

Rolle in der Mitose zu spielen. Zum einen bindet das *ZWICHEL* Protein typisch mitotische Strukturen der Zelle, zum anderen führt die Injektion von *ZWICHEL* Antikörpern zu Zellteilungstörungen. Aufgrund dieser Befunde gehen wir von der Arbeitshypothese aus, dass viele der Trichom-Verzweigungsgene etwas mit der Etablierung und Umsetzung von Zellpolarität im Kontext von Zellteilungen zu tun haben.

Derzeit sind mehr als 15 Mutanten bekannt, bei denen die Verzweigungsanzahl betroffen ist. Wir haben uns bisher auf die Untersuchung von vier Verzweigungsmutanten konzentriert. Zwei der Mutanten zeigen eine Reduktion der Verzweigungsanzahl, die mit einem allgemeinen Polaritätsverlust einhergeht und somit zu einem isotropen Wachstum führt. Wir konnten den Phänotyp auf Mutationen in Kofaktoren der Biogenese von Mikrotubuli (*TFCA* und *TFCC*) zurückführen (Kirik et al., 2002a; Kirik et al., 2002b). Diese gehören zu einer Gruppe von Kofaktoren, die daran beteiligt sind,  $\alpha/\beta$  Tubulindimere zu bilden. In diesen Mutanten ist das Mikrotubuli-Zytoskelett grundsätzlich intakt und dessen Organisation nur dann defekt, wenn außergewöhnlich starkes Zellwachstum erfolgt. Wir vermuten deshalb, dass der Verzweigungsphänotyp zustande kommt, weil die Initiation von Verzweigungen eine

schnelle Neubildung von Mikrotubuli erfordert und diese durch einen Mangel an  $\alpha/\beta$  Tubulindimeren behindert wird. Um die räumlich-zeitliche Umorganisation der Mikrotubuli zu beobachten und vor allem um ihre Regulation zu verstehen, entwickeln wir Techniken, die es erlauben, ihre Dynamik *in vivo* zu verfolgen.

In *angustifolia* Mutanten ist die Organisation der Mikrotubuli betroffen, daher kommt das *ANGUSTIFOLIA* Gen hier als Regulator in Betracht (Folkers et al., 1997; Folkers et al., 2002). Genetische Daten und Yeast Two Hybrid Daten zeigen, dass *ANGUSTIFOLIA* mit *ZWICHEL* interagiert, womit *ANGUSTIFOLIA* vermutlich auch mit der Regulation von Zellteilungen zusammenhängt. Die biochemische Funktion von *ANGUSTIFOLIA* ist noch völlig ungeklärt. Das Protein weist hohe Sequenzähnlichkeiten zu CtBPs (c-terminal binding proteins) und BARS (Brefeldin A ribosylated substrate) auf. Erstere sind transkriptionelle Kofaktoren, letztere spielen bei der Funktion des Golgi-Apparats eine Rolle. Die Untersuchung der biochemischen und zellulären Funktion sollte die Entstehung der Verzweigungen und damit den zugrunde liegenden Mechanismus der Polarität klären.

Das *STICHEL* Gen wird als eines der Schlüsselgene der Verzweigung gesehen, weil *stichel* Mutanten zum einen den stärksten Phänotyp haben und zum anderen genetische Daten dafür sprechen, dass *STICHEL* die Verzweigung in einer konzentrationsabhängigen Weise reguliert (Ilgenfritz et al., 2003). Das *STICHEL* Gen kodiert für ein neuartiges Protein, welches eine prominente Domäne mit Sequenzähnlichkeiten zu  $\gamma$ -DNA Polymerasen aufweist. Vorläufige Lokalisierungsdaten des *STICHEL* Proteins sprechen dafür, dass es nicht im Kern zu finden ist, sondern möglicherweise Wachstumsregionen markiert. Damit wäre *STICHEL* eine Schlüsselkomponente eines neuen, an der Etablierung der Zellpolarität beteiligten Signalweges.

## Umsetzen von Polarität in Wachstum

Im zweiten Schritt der Polaritätsausbildung wird die zuvor hergestellte Achse fixiert, beziehungsweise das Wachstum an dieser Achse ausgerichtet. Es spricht vieles dafür, dass Aktin dabei eine maßgebliche Rolle spielt. Zum einen führt die

Applikation von Aktin-Inhibitoren zu einer Störung des direkionalen Streckungswachstums (Mathur et al., 1999), zum anderen führen Mutationen in acht Genen (*DISTORTED* Gene) zu einem ähnlichen morphologischen Phänotyp, der mit einer Störung des Aktin-Zytoskeletts einhergeht (Schwab et al., 2003). Für drei dieser Gene haben wir zeigen können, dass sie für Komponenten des Arp2/3 Komplexes kodieren (Mathur et al., 2003a; Mathur et al., 2003b). Dieser Komplex ist in anderen Systemen für die lokale Initiation neuer Aktinfilamente wichtig, die wiederum zu lokalem Wachstum führt. Wie die lokale Aktivität des Arp2/3 Komplex reguliert wird, ist eine sehr spannende Frage, weil man weiß, dass verschiedene, bei tierischen Systemen oder auch bei Hefe bekannte regulatorische Komponenten in Pflanzen entweder entscheidende Abweichungen aufzeigen (Rho-artige kleine GTPasen) oder ganz fehlen (z.B. WASP). Ebenfalls ist ungeklärt, wie bestimmte Aktinkonfigurationen hergestellt werden und welche Konfigurationen zu lokalem Wachstum führen und welche nicht. Die zellbiologische Untersuchung der arp2/3 Mutanten hat erste Hinweise darauf gegeben, dass es besonders „feinen“ Aktins bedarf, um

Wachstum auszulösen (Mathur et al., *in press*). In nicht-wachsenden Regionen der Zelle findet sich eine hohe Konzentration von anscheinend gebündeltem Aktin. In Wachstumsregionen beobachtet man dagegen eng beieinanderliegende feine Aktinfilamente. Überraschenderweise werden auch Zellkomponenten wie beispielsweise der Golgi Apparat gleichermaßen in beide Regionen transportiert. Daher kommen in der Mutante auch nicht die generellen Transportvorgänge zum Erliegen, sondern lediglich die spezifischen, für das Wachstum relevanten.

## Ausblick

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die meisten der für die Trichomentwicklung entscheidenden Gene auch in anderen Zellen eine wichtige Rolle spielen und dass die hierbei erarbeiteten Prinzipien genereller Natur sind. Gleichzeitig erlaubt uns der genetische Ansatz die Identifizierung von Schlüsselkomponenten und bietet uns damit einen idealen Ausgangspunkt, um die Mechanismen der Zellmorphogenese künftig mit einer Kombination von zellbiologischen, biochemischen und genetischen Methoden aufzuklären.

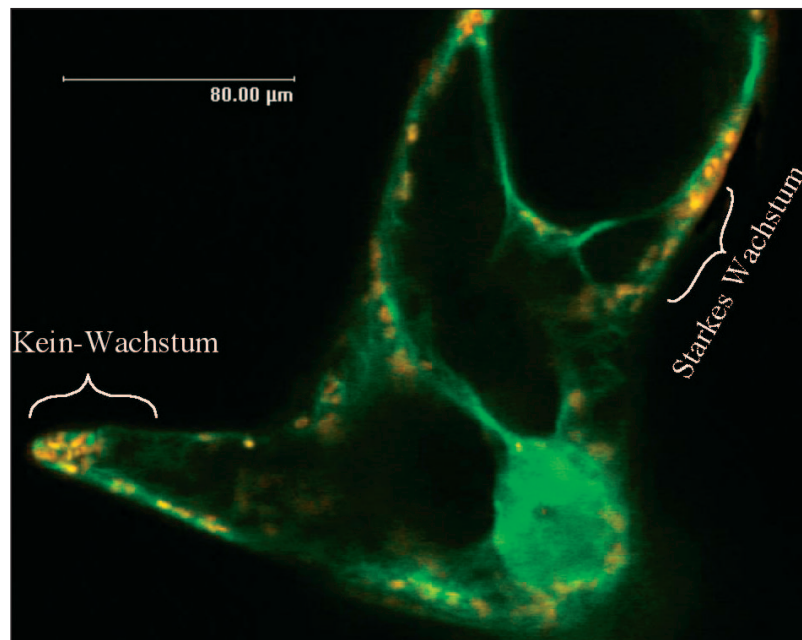


Abbildung 2: *Direktionalität des Zellwachstums.*

*Aktinorganisation (YFP-talin, grün (Mathur et al., 1999)) und der Verteilung vom Golgi (ERD2-GFP, orange (Mathur et al., *in press*)) in für crooked mutanten Trichom. Links ist eine nicht ausgewachsene Verzweigung zu sehen, die in diesem Entwicklungsstadium eine mindestens 10-fache Länge aufweisen sollte und damit als eine nicht wachsende Region angesprochen werden kann. Eine leicht ausgewölbte Region in einer in unmittelbarer Nachbarschaft stark wachsenden Region. Die Dichte an Aktin und Golgi ist sehr ähnlich was dafür spricht, dass der intrazelluläre Transport in diesen beiden Regionen überraschenderweise nicht generell gestört ist, sondern spezifisch die fürs Wachstum wichtigen Transportprozesse gestört sind.*

**Referenzen:**

Folkers, U., Berger, J. and Hülskamp, M. (1997) Cell morphogenesis of trichomes in Arabidopsis: differential control of primary and secondary branching by branch initiation regulators and cell growth. *Development*, **124**, 3779-3786.

Folkers, U., Kirik, V., Schobinger, U., Falk, S., Krishnakumar, S., Pollock, M.A., Oppenheimer, D.G., Day, I., Reddy, A.R., Jürgens, G. and Hülskamp, M. (2002) The cell morphogenesis gene ANGUSTIFOLIA encodes a CtBP/BARS-like protein and is involved in the control of the microtubule cytoskeleton. *EMBO J.*, **21**, 1280-1288.

Hülskamp, M. (2000) How plants split hairs. *Curr Biol*, **10**, R308-310.

Hülskamp, M., Misera, S. and Jürgens, G. (1994) Genetic dissection of trichome cell development in Arabidopsis. *Cell*, **76**, 555-566.

Ilgenfritz, H., Bouyer, D., Schnittger, A., Mathur, J., Kirik, V., Schwab, B., Chua, N.-H., Jürgens, G. and Hülskamp, M. (2003) The Arabidopsis STICHEL Gene is a Regulator of Trichome Branch Number and Encodes a Novel Protein. *Plant Physiology*. *Plant Physiol.*, **131**, 643-655.

Kirik, V., Grini, P.E., Mathur, J., Klinkhammer, I., Adler, K., Bechtold, N., Herzog, M., Bonneville, J.M. and Hülskamp, M. (2002a) The Arabidopsis

TUBULIN-FOLDING COFACTOR A gene is involved in the control of the alpha/beta-tubulin monomer balance. *Plant Cell*, **14**, 2265-2276.

Kirik, V., Mathur, J., Grini, P.E., Klinkhammer, I., Adler, K., Bechtold, N., Herzog, M., Bonneville, J.M. and Hülskamp, M. (2002b) Functional analysis of the tubulin-folding cofactor C in Arabidopsis thaliana. *Curr Biol*, **12**, 1519-1523.

Mathur, J., Mathur, N., Kernebeck, B. and Hülskamp, M. (2003a) Mutations in actin related proteins 2 and 3 affect cell shape development in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, in press.

Mathur, J., Mathur, N., Kirik, V., Kernebeck, B., Srinivas, B.P. and Hülskamp, M. (2003b) Arabidopsis CROOKED encodes for the smallest subunit of the ARP2/3 complex and controls cell shape by region specific fine F-actin formation. *Development*, in press.

Mathur, J., Spielhofer, P., Kost, B. and Chua, N.-H. (1999) The actin cytoskeleton is required to elaborate and maintain spatial patterning during trichome cell morphogenesis in Arabidopsis thaliana. *Development*, **126**, 5559-5568.

Reddy, A.S. (2001) Molecular motors and their functions in plants. *Int Rev Cytol*, **204**, 97-178.

Schnittger, A., Schöbinger, U., Bouyer, D., Weinl, C., Stierhof, Y.-D. and Hülskamp, M. (2002a)

Ectopic D-type cyclin expression induced not only DNA replication but also cell division in Arabidopsis trichomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6410-6415.

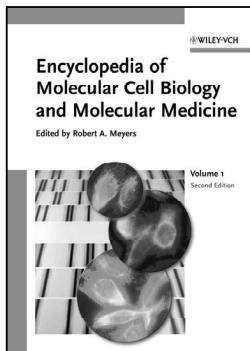
Schnittger, A., Schobinger, U., Stierhof, Y.D. and Hülskamp, M. (2002b) Ectopic B-type cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating Arabidopsis trichomes. *Curr Biol*, **12**, 415-420.

Schwab, B., Mathur, J., Saedler, R., Schwarz, H., Frey, B., Scheidegger, C. and Hülskamp, M. (2003) Regulation of Cell Expansion by the DISTORTED genes in Arabidopsis thaliana: Actin Controls the Spatial Organization of Microtubules. *Molecular Genetics and Genomics*, in press.

Walker, J.D., Oppenheimer, D.G., Concienne, J. and Larkin, J.C. (2000) SIAMESE, a gene controlling the endoreduplication cell cycle in Arabidopsis thaliana trichomes. *Development*, **127**, 3931-3940.

*Anschrift des Autors:*  
 Prof. Dr. Martin Hülskamp  
 Botanisches Institut der Universität zu Köln  
 Gyrhofstr. 15, 50931 Köln  
 martin.huelskamp@uni-koeln.de

# The Nucleus of Knowledge



2005. Approx. 10,000 pages.  
 Hardcover.  
 ISBN 3-527-30542-4  
 Prepublication price  
 approx. € 4144.-  
 valid until March 31, 2004  
 thereafter approx. € 4944.-  
 Publication dates:  
 volumes 1-5 Jan. 2004  
 volumes 6-10 Aug. 2004  
 volumes 11-16 May 2005

ROBERT A. MEYERS, Ramtech Ltd., Tarzana, CA, USA (ed.)  
**Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine**  
 16 Volume Set

"This series is a classic..." -  
 Molecular Medicine Today/Trends in Molecular Medicine

**The insight of 10 Nobel laureates**

The second edition of the preceding "Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine" provides a one-stop working library of the molecular basis of life, disease diagnosis and therapy with a new focus on the integrating cell level.

It was designed in collaboration with a founding board of 10 Nobel laureates. The encyclopedia is published in 16 volumes containing approximately 425 articles. Each article presents an in-depth treatment accompanied by a key word list with definitions and an extensive bipartite bibliography of primary and secondary papers.



<http://meyers-emcbmm.de>

Register now for the free  
**WILEY-VCH Newsletter!**  
[www.wiley-vch.de/home/pas](http://www.wiley-vch.de/home/pas)

WILEY-VCH • P.O. Box 10 11 61 • D-69451 Weinheim, Germany  
 Fax: +49 (0) 62 01 - 60 61 84  
 e-mail: [service@wiley-vch.de](mailto:service@wiley-vch.de) • [www.wiley-vch.de](http://www.wiley-vch.de)



57513052 kn