

## Arp und wie er die Welt der Zellform in Pflanzen sah

Antje Berken<sup>1</sup> und Martin Hülskamp<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund;

<sup>2</sup>Botanisches Institut III der Universität zu Köln

► Ähnlich wie in tierischen Systemen ist das Aktin-Zytoskelett in Pflanzen maßgeblich daran beteiligt, in einzelnen Zellen lokales Wachstum zu steuern. Dazu wird das Aktin-Zytoskelett in den Wachstumsregionen lokal umorganisiert, bzw. werden Aktinfilamente neu gebildet<sup>[1]</sup>. Neuere Arbeiten zur Untersuchung der Regulation der Zellform in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* haben gezeigt, dass der Arp2/3-Komplex eine zentrale Rolle spielt<sup>[2]</sup>. Die Regulation dieses Komplexes weist bei Tieren und Pflanzen einige Gemeinsamkeiten, aber auch signifikante Unterschiede auf.

### Was von tierischen Systemen bekannt ist ...

Der Arp2/3-Komplex, der aus sieben Proteinen (Arp2-3, ARPC1-5) besteht, kann lokal die Bildung neuer Aktinfilamente stimulieren, indem er an bereits existierende

Filamente bindet und eine Verzweigung induziert<sup>[3]</sup>. Zwei Signaltransduktionswege sind für die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes bekannt. Beide beginnen mit der Aktivierung von Rho-GTPasen (Cdc42 bzw. Rac). Diese kleinen GTPasen sind inaktiv in der GDP-gebundenen Form und aktiv in der GTP-gebundenen Form. Akzessorische Proteine kontrollieren den Status: Austauschfaktoren (GEFs) stimulieren den Wechsel von GDP zu GTP, GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) katalysieren die GTP-Hydrolyse, und Dissoziationsinhibitoren (GDIs) verhindern die Aktivierung an der Membran, indem sie die GDP-Form im Zytosol binden<sup>[4]</sup>. Ein GTPase-abhängiger Signalweg reguliert Arp2/3, indem aktiviertes Cdc42 an das sich selbst inhibierende Effektorprotein WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein) bindet und es damit aktiviert. Der andere Signalweg wirkt über Rac und

den pentameren WAVE-Komplex aus PIR, NAP, Abi, WAVE und HSPC300<sup>[5]</sup>. Unklar ist, ob der pentamere WAVE-Komplex Rac abhängig Arp2/3 aktiviert, oder ob durch Bindung von Rac der Komplex dissoziiert, und dann ein WAVE/HSPC300-Dimer Arp2/3 aktiviert.

### Was im pflanzlichen System gleich und was anders ist ...

In Pflanzen scheinen Cdc42 homologe GTPasen und WASP zu fehlen. Der Rac/WAVE-Signalweg ist in seinen Grundzügen vorhanden (Abb. 1). Gefunden wurden Rac-ähnliche Proteine (Rop), die aufgrund signifikanter Unterschiede jedoch als eigene Klasse der Rho-Familie (Rho of plants) betrachtet werden<sup>[6]</sup>. Die Regulation der Rops weist ebenfalls Besonderheiten auf. RopGAPs enthalten ein CRIB-Motiv, das in tierischen Systemen in Rho-Effektoren zu finden ist, aber niemals in GAPs. Ferner war die Aktivierung der Rops bis vor kurzem völlig unklar, da im sequenzierten *Arabidopsis* Genom die Homologa für klassische RhoGEFs fehlen. Erst kürzlich wurde eine neuartige, pflanzenspezifische GEF-Familie (RopGEF) mit einer ungewöhnlichen, katalytischen Domäne beschrieben, die selektiv nur die Rop-GTPasen aktiviert<sup>[7]</sup>.

Die Komponenten des WAVE-Komplexes wurden mittlerweile ebenfalls in *Arabidopsis* identifiziert<sup>[2]</sup>. PIR, NAP und HSPC300 zeigen deutliche Sequenzähnlichkeit zu den tierischen Homologa, während für WAVE und Abi diese Ähnlichkeiten unter 10 % liegen und auf kleinere Bereiche beschränkt sind. Für einige dieser Gene wurde durch Interspezies-Rettung die funktionelle Homologie nachgewiesen. Ähnlich wie in Tieren interagiert PIR mit der aktivierten Form der Rop-GTPase. Wichtige Interaktionen zwischen den Komponenten des WAVE-Komplexes wurden ebenfalls nachgewiesen: PIR bindet an NAP, NAP an Abi, Abi an WAVE, und WAVE bindet an HSPC300. Die Existenz von je vier WAVE- und Abi-Homologa in *Arabidopsis* wirft allerdings die Frage auf, ob multiple WAVE-Komplex Typen mit verschiedener Komposition der Untereinheiten in pflanzlichen Zellen vorliegen.

Der Aktivierungsmechanismus des Arp2/3-Komplexes scheint dem in Tieren zu entsprechen. Das pflanzliche WAVE-Protein bindet, wie auch im tierischen System, an ARPC3 und kann *in vitro* Arp2/3 vom Rind aktivieren<sup>[8]</sup>. Der Arp2/3-Komplex selbst ist ebenfalls vollständig konserviert. Alle sieben Untereinheiten wurden in *Arabidopsis* beschrieben<sup>[9]</sup>. Anders als in Tieren scheint der Komplex in Pflanzen jedoch nicht für das Überleben essenziell zu sein. Null-Mutan-

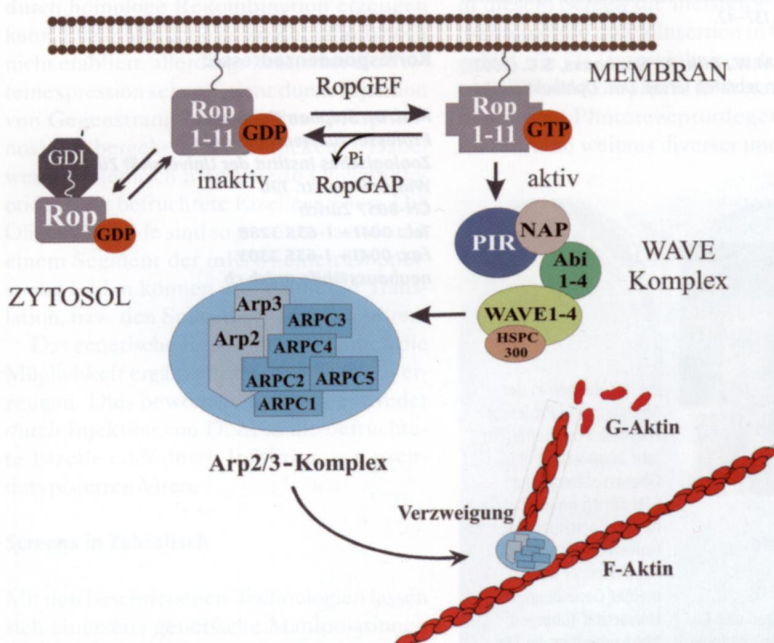
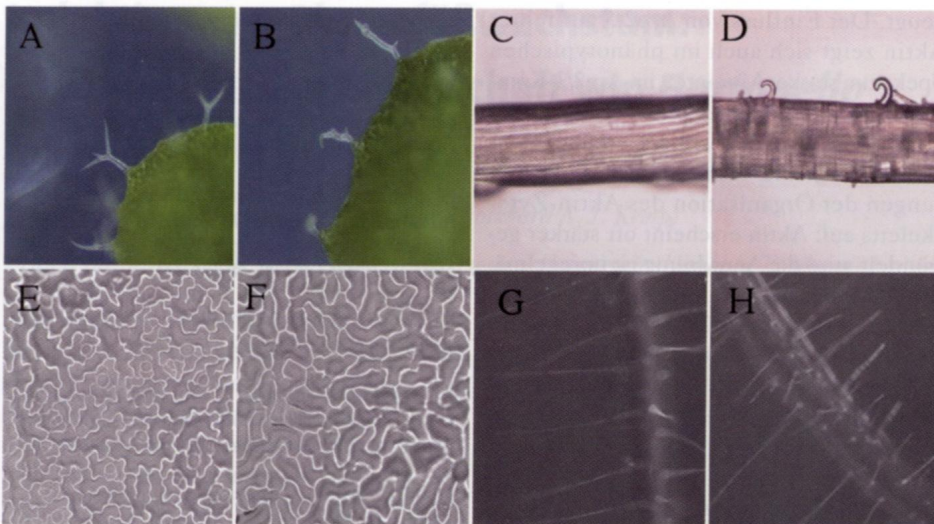


Abb. 1: Modell zur Ausbildung von Aktin-Verzweigungen in Pflanzen. *Arabidopsis* enthält elf Gene für Rop-GTPasen (Rop1-11). Aktives Rop bindet in seiner GTP-Form an das PIR-Protein des pentameren WAVE-Komplexes. Die Untereinheiten PIR, NAP und HSPC300 werden durch singuläre Gene kodiert. Für WAVE und Abi wurden jeweils vier Homologa identifiziert. WAVE interagiert mit ARPC3 und aktiviert den Arp2/3-Komplex, der die Polymerisation von monomeren Aktin (G-Aktin) an bereits existierenden Filamenten (F-Aktin) induziert. Der Prozess wird durch Austauschfaktoren (RopGEF), GTPase aktivierende Proteine (RopGAP) und Dissoziationsinhibitoren (GDI) reguliert, die die Aktivität von Rop an der Membran kontrollieren.



**Abb. 2:** Typische Phänotypen von *Arabidopsis* bei starken Mutationen im Arp2/3-Komplex. **A, C, E, G:** Wildtyp; **B, D, F, H:** *grl*-Mutante (*NAP*-Mutation). **A, B:** Blatthaare; **C, D:** Hypokotyl; **E, F:** nicht-spezialisierte Epidermiszellen; **G, H:** Wurzelhaare. Die Bilder sind der Publikation Zimmermann et al., *Mol. Gen. Genomics* (2004) 272: 290–296, mit freundlicher Genehmigung des Springer-Verlags entnommen (© Springer).

ten in fünf seiner Untereinheiten führen zwar zu einer Reihe von Zellformdefekten, die Vitalität und Fruchtbarkeit der Pflanze

ist aber nicht merklich eingeschränkt. Für die Komponenten ARPC1 und ARPC3 wurden allerdings noch keine Mutanten be-

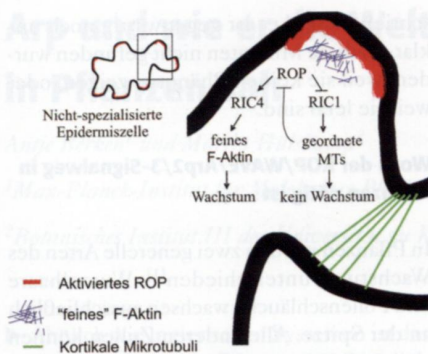
schrieben, und es ist gegenwärtig noch unklar, ob diese Mutanten nicht gefunden wurden, weil sie keinen Phänotyp zeigen, oder weil sie letal sind.

#### Wozu der ROP/WAVE/Arp2/3-Signalweg in Pflanzen nötig ist ...

In Pflanzen werden zwei generelle Arten des Wachstums unterschieden<sup>[1]</sup>. Wurzelhaare und Pollenschläuche wachsen ausschließlich an der Spitze. Alle anderen Zellen können grundsätzlich überall wachsen und werden daher als „diffus“ wachsende Zellen eingestuft. Eine Zwischenstellung nehmen nicht-spezialisierte, epidermale Zellen ein, die viele Ausbuchtungen bilden und damit wie Puzzlestücke aussehen. Es wird angenommen, dass die Bildung einzelner Ausbuchtungen mechanistisch ähnlich wie beim Spitzenwachstum funktioniert.

Alle Mutanten, in denen Komponenten des ROP/WAVE/Arp2/3-Signalweges betroffen sind, beeinträchtigen, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, sowohl Zellen mit Spitzenwachstum als auch diffus wachsende Zellen<sup>[2, 9, 10]</sup>. Den stärksten Phänotyp





**Abb. 3: Koordination der Organisation von Aktin und Mikrotubuli in nicht-spezialisierten Epidermiszellen in Arabidopsis.** In Zellregionen, in denen ROPs aktiv sind, wird durch die eingezeichneten Proteine die Bildung von feinem Aktin induziert und gleichzeitig die Organisation der Mikrotubuli (MTs) verhindert, sodass Ausbuchtungen entstehen. Zwischen diesen wird ein Auswachsen verhindert, indem geordnete Mikrotubuli Zellregionen miteinander verbinden.

►► zeigen Mutanten im Arp2/3-Komplex. In starken Mutanten ist das Wurzelhaarwachstum reduziert, nicht-spezialisierte Epidermiszellen bilden keine Ausbuchtungen mehr aus, und andere diffus wachsende Zellen wie Hypokotylzellen oder Blatthaare entwickeln bizarre, zufällige Formen (Abb. 2). Mutanten in PIR, NAP und HSPC300 zeigen ein ähnliches phänotypisches Spektrum, während die Mutation im WAVE4-Gen einen nur sehr schwachen Phänotyp bewirkt, der im Wesentlichen auf die Blatthaare beschränkt ist. Der Befund, dass die Phänotypen in Arp2/3-Komplex-Mutanten, also an der Basis der Signalkaskade, am stärksten sind und weiter oben im Signalweg weniger stark oder gar nicht zu finden sind, weist auf eine Diversifizierung oder auf Redundanzen hin.

#### Wie der ROP/WAVE/Arp2/3-Signalweg das Aktin-Zytoskelett beeinflusst ...

In Pflanzenzellen sind nicht wachsende Regionen oft mit der Anwesenheit von gebündeltem Aktin korreliert, während in wachsenden Bereichen das stark verzweigte und hochdynamische „feine“ Aktin vorliegt, das offenbar die Akkumulation von Vesikeln mit Zellmaterial vermittelt und damit das Wachstum vorantreibt<sup>[9, 10]</sup>. In den aktiven Wachstumsregionen unterschiedlicher Zelltypen wurden Rop-GTPasen nachgewiesen, die dort die lokale Ausbildung von feinem Aktin bewirken. Es wird angenommen, dass die lokale Rop-Aktivierung über den WAVE-Komplex zur lokalen Aktivierung des Arp2/3-Komplexes führt, der durch Stimulierung der Aktinpolymerisation neue Verzweigungen und damit mehr feines Aktin er-

zeugt. Der Einfluss von Arp2/3 auf feines Aktin zeigt sich auch im phänotypischen Spektrum starker Mutanten im Arp2/3-Komplex. Diese weisen neben Defekten, die auch durch Aktin depolymerisierende Agenzien hervorgerufen werden, auch starke Störungen der Organisation des Aktin-Zytoskeletts auf: Aktin erscheint oft stärker gebündelt, und die Anordnung ist unregelmäßig<sup>[9]</sup>. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, dass der Arp2/3-Weg für die Produktion des feinen Aktins verantwortlich ist während pflanzliche Formine die Ausbildung von gebündelten Aktinkabeln beeinflussen.

#### Wie Aktin und Mikrotubuli koordiniert werden...

Verallgemeinernd kann in Pflanzen der Funktion von Aktin, lokales Wachstum zu stimulieren, die Funktion der Mikrotubuli gegenübergestellt werden. Eine gängige Hypothese besagt, dass Zellulosefibrillen entlang vorhandener kortikaler Mikrotubuli gebildet werden, und damit eine Zellausdehnung in diese Richtung erschwert oder unmöglich wird. Die gegenläufige Wirkung von Aktin und Mikrotubuli macht eine koordinierte Organisation dieser beiden Komponenten erforderlich. Eine neuere Arbeit am Modell der nicht-spezialisierten Epidermiszellen in *Arabidopsis* hat gezeigt, dass die lokale Aktivierung von Rop2 und Rop4 die Bildung von feinem Aktin stimulieren und gleichzeitig die Assoziation und Bündelung der Mikrotubuli verhindern kann<sup>[11]</sup>. Rop2/Rop4 werden in den Ausbuchtungen der Epidermiszellen lokal aktiviert und interagieren dort mit den kleinen, pflanzen-spezifischen Rop-Effektoren RIC4 und RIC1 (RIC: Rop-interactive CRIB-containing proteins). Die Aktivierung von RIC4 führt auf bislang unbekannte Weise zur Akkumulation von feinem Aktin, während die Bindung von Rop2 an RIC1 dessen Assoziation mit den Mikrotubuli verhindert, sodass in den Ausbuchtungen wahrscheinlich der RIC1-abhängigen Organisation der Mikrotubuli entgegengewirkt wird (Abb. 3).

#### Literatur

- [1] Mathur, J. and Hulskamp, M. (2002): Microtubules and microfilaments in cell morphogenesis in higher plants. *Curr. Biol.* 12: R669–R676.
- [2] Szymanski, D. B. (2005): Breaking the WAVE complex: the point of Arabidopsis trichomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 103–112.
- [3] Blanchoin, L., Amann, K. J., Higgs, H. N., Marchand, J. B., Kaiser, D. A. and Pollard, T. D. (2000): Direct observation of dendritic actin filament net-

works nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* 404: 1007–1011.

- [4] Jaffe, A. B. and Hall, A. (2005): RHO GTPases: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 247–269.
- [5] Stradal, T. E., Rottner, K., Disanza, A., Confalonieri, S., Innocenti, M. and Scita, G. (2004): Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.* 14: 303–311.
- [6] Yang, Z. (2002): Small GTPases: Versatile signalling switches in plants. *Plant Cell*: S375–S388.
- [7] Berken, A., Thomas, C. and Wittinghofer, A. (2005): A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. *Nature* 436: 1176–1180.
- [8] Basu, D., Le, J., El-Essal, S. E., Huang, S., Zhang, C., Mallery, E. L., Koliantz, G., Staiger, C. J. and Szymanski, D. B. (2005): DISTORTED3/SCAR2 is a putative Arabidopsis WAVE complex subunit that activates the Arp2/3 complex and is required for epidermal morphogenesis. *Plant Cell* 7: 502–524.
- [9] Mathur, J. (2005): The Arp2/3 complex: giving plant cells a leading edge. *BioEssays* 27: 377–387.
- [10] Mathur, J. (2005): Conservation of boundary extension mechanisms between plants and animals. *J. Cell Biol.* 168: 679–682.
- [11] Fu, Y., Gu, Y., Zheng, Z., Wasteneys, G. and Yang, Z. (2005): Arabidopsis interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell* 120: 687–700.

#### Korrespondenzadressen:

**Dr. Antje Berken**  
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie  
Otto-Hahn-Str. 11  
D-44227 Dortmund  
Tel.: 0231-1332103  
Fax: 0231-1332699  
antje.berken@mpi-dortmund.mpg.de

**Prof. Dr. Martin Hulskamp**  
Botanisches Institut III  
Universität zu Köln  
Gyrhof Str. 15  
D-50931 Köln  
Tel.: 0221-4702473  
Fax: 0221-4705062  
martin.huelskamp@uni-koeln.de