

Diss. ETH Nr 14184

**LRX1, a chimeric LRR/extensin protein required for root
hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*, defines a new
family of cell wall proteins**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

For the degree of Doctor of Natural Sciences

Presented by NICOLAS BAUMBERGER

Dipl. Biol. ETH ZURICH

Born June 12, 1970

Citizen of Lausanne (VD)

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. N. Amrhein, examiner
Prof. Dr. B. Keller, co-examiner

Zürich, 2001

1. Summary

In plants, the cell wall is a major determinant of cell morphogenesis. Cell enlargement depends on the tightly regulated expansion of the wall, which surrounds each cell. The mechanisms controlling qualitatively and quantitatively cell wall enlargement are still poorly understood. A new family of genes, initially discovered by computer analysis, encodes chimeric proteins containing a leucine-rich repeat and an extensin domain. Leucine-rich repeats (LRRs) are known to mediate protein-protein interactions in many eukaryotic cellular processes whereas extensins are typical cell wall structural proteins. LRR/extensins (LRXs) are encoded by a multigenic family of eleven members in *Arabidopsis* and are also present in Solanaceae (tomato) and in monocots (maize). Throughout the entire family, the LRR domain is highly conserved at the protein level whereas the extensin domain shows a wider variability. Expression studies indicate three distinct groups of *LRX* genes with similar expression patterns correlated with a strong homology of the LRR domain. The sequence similarities and chromosomal location of most of the *LRX* genes suggest that the *Arabidopsis LRX* family has evolved by gene duplication during ancient events of polyploidization. The major part of this thesis essentially focuses on the molecular and functional characterization of *LRX1*, the first *Arabidopsis LRX* gene to be identified. *LRX1* is expressed in root hair cells and the protein is specifically localized in the wall of the hair proper in which it is insolubilized during development. *lrx1* null mutants, isolated by a reverse-genetic approach, develop root hairs that frequently abort, swell and branch. The cell wall ultrastructure of the mutant root hairs displays localized defects which might result in the phenotype observed. Complementation and overexpression experiments using modified *LRX1* proteins indicate that the interaction with the cell wall probably requires the extensin domain and is important for *LRX1* function. The phenotypic analysis of double mutants generated between *lrx1* and other root hair mutants indicates that *LRX1* mostly acts in parallel to the other genes involved in root hair morphogenesis and that *LRX1* expression is under tight control during root hair growth. The analysis of a

second *LRX* gene (*LRX2*) was also undertaken. *LRX2* is the closest relative to *LRX1* in the *Arabidopsis* genome and both genes are likely to be paralogues. *LRX2* is mostly expressed in roots, although with a slightly different pattern than *LRX1*. *lrx2* mutants apparently do not differ from wild-type plants under the conditions which were used.

Our results suggest that *LRX1* is an extracellular component of a mechanism regulating root hair morphogenesis and elongation by controlling either polarized growth or cell wall formation and assembly. *LRX* proteins possibly represent a novel family of plant factors involved in cell wall growth.

2. Zusammenfassung

Die Zellwand ist eine entscheidende Komponente der pflanzlichen Entwicklung. Das Wachstum der Zelle ist von einer kontrollierten Vergrößerung der Zellwand, welche jede Zelle umgibt, abhängig. Die Mechanismen, welche diesen Prozess regulieren, sind jedoch schlecht verstanden. Eine neue Genfamilie, ursprünglich durch Computeranalyse des *Arabidopsis* Genoms identifiziert, kodiert für extrazelluläre, chimäre Proteine, welche aus einer leucinreichen, repetitiven und einer Extensin-Domäne bestehen. Leucinreiche, repetitive Motive (LRRs) sind in verschiedenen eukaryotischen Systemen für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich, wohingegen Extensine typische Zellwandproteine mit strukturellen Funktionen sind. LRR/Extensine (*LRXs*) in *Arabidopsis* sind durch eine Familie von elf Genen kodiert, wurden aber auch in Solanaceen (Tomate) und Monokotyledonen (Mais) identifiziert. Innerhalb der *Arabidopsis* Familie der *LRXs* sind die LRR-Domänen auf der Aminosäuren-Ebene stark konserviert, die Extensindomänen jedoch variabel. Sequenzanalyse und Expressionsstudien zeigen, dass es drei verschiedene Untergruppen von *LRX* Genen gibt, deren Mitglieder jeweils ein ähnliches Expressionsmuster zeigen. Auf Grund der Homologien und der Analyse der genetischen Lokalisierung kann angenommen werden, dass die Familie der *LRX* Gene durch Genduplikation und frühe Polyploidisierung entstanden ist. Der überwiegende Teil der vorliegenden Arbeit ist auf die Charakterisierung von *LRX1* konzentriert. *LRX1* ist spezifisch in Wurzelhaaren exprimiert. Das Protein befindet sich in der Zellwand des Wurzelhaares, wo es während der Wurzelhaarentwicklung insolubilisiert wird. *lrx1* Nullmutanten, welche durch reverse Genetik isoliert wurden, zeigen Wurzelhaare, deren Entwicklung oftmals frühzeitig unterbrochen wird, die anschwellen oder sich verzweigen. Die supramolekulare Struktur der Zellwand zeigt Veränderungen, welche für den Phänotyp verantwortlich sein könnten. Komplementations- und Überexpressionsstudien mit modifizierten *LRX1* Proteinen zeigen, dass die Interaktion von *LRX1* mit der Zellwand von grosser Wichtigkeit ist und sehr wahrscheinlich über die Extensindomäne stattfindet. Die phänotypische Analyse

von Doppelmutanten von *LRX1* und anderen Wurzelhaarmutanten weist darauf hin, dass *LRX1* parallel zu anderen Entwicklungsprozessen des Wurzelhaares funktioniert und die Expression von *LRX1* während der Wurzelhaarentwicklung streng reguliert ist. Die Charakterisierung von *LRX2* wurde ebenfalls durchgeführt. *LRX2* zeigt starke Homologien zu *LRX1* und ist wahrscheinlich dessen Paralog. *LRX2* ist ebenfalls in Wurzelhaaren exprimiert, jedoch weicht das Expressionsmuster leicht von demjenigen von *LRX1* ab. Im Gegensatz zu den *lrx1* Mutanten scheinen sich ebenfalls isolierte *lrx2* Mutanten unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht von Wildtyp-Pflanzen zu unterscheiden.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass *LRX1* eine extrazelluläre Komponente eines Mechanismus ist, welcher die Morphogenese von Wurzelhaaren reguliert, indem es entweder deren Spitzenwachstum selbst oder den Aufbau und die Zusammensetzung der Zellwand kontrolliert. *LRX1* ist daher Teil einer neuen Familie von Proteinen, welche möglicherweise generell eine wichtige Rolle in der Entwicklung der pflanzlichen Zellwand spielen.