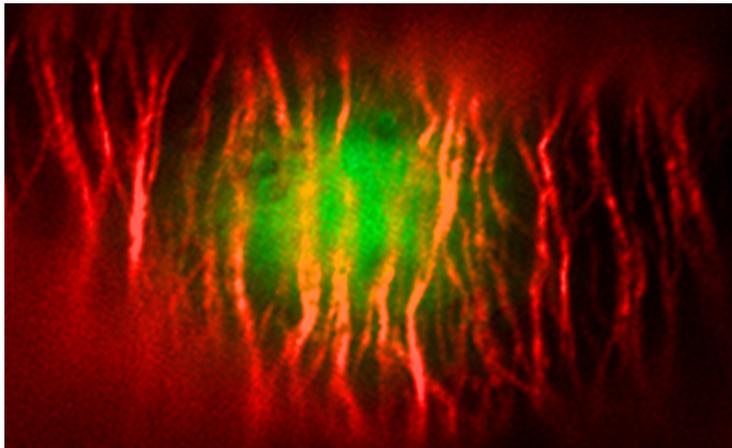


# **Zellbiologische Charakterisierung von NtKCH: Einblicke in die Funktion pflanzenspezifischer KCH-Kinesine**



Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**  
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)- Universitätsbereich

genehmigte  
**Dissertation**  
von

**Jan Klotz**  
aus Bruchsal

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT), Lehrstuhl I für molekulare Zellbiologie, im Zeitraum von Januar 2009 bis Januar 2012 angefertigt.

Dekan:	Prof. Dr. Martin Bastmeyer
Referent:	Prof. Dr. Peter Nick
Korreferent:	Prof. Dr. Reinhard Fischer
Tag der mündlichen Prüfung:	Dienstag, 17. April 2012

*“You can observe a lot just by watching...”*  
*(Lawrence Peter Berra)*

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation, abgesehen von der Benutzung der angegebenen Hilfsmittel, selbständig verfasst habe.

Alle Stellen, die gemäß Wortlaut oder Inhalt aus anderen Arbeiten entnommen sind, wurden durch Angabe der Quelle als Entlehnungen kenntlich gemacht.

Diese Dissertation liegt in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vor.

Karlsruhe, den 12.02.2012

Jan Klotz

**Teile dieser Arbeit sind in folgender Veröffentlichung enthalten:**

**Klotz J, Nick P. 2012.** A novel actin-microtubule cross-linking kinesin, NtKCH functions in cell expansion and division. *New Phytologist* **193**(3): 576-589.

## **Danksagung**

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Peter Nick, der mir diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe ermöglichte und mir für die Bearbeitung und Ausgestaltung dieses spannenden und abwechslungsreichen Themas sehr viel Freiraum für eigene Ideen und Konzepte gewährte. Besonderer Dank gilt auch für die hervorragende Betreuung und das in mich gesetzte Vertrauen.

Prof. Dr. Reinhard Fischer danke ich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

Kerstin Schwarz und Judit Mauer trugen durch Diplomarbeit und F3-Praktikum zu Teilen dieser Arbeit bei. Weiterer Dank gilt unserer ehemaligen Auszubildenden, Franziska Bühler, insbesondere für die tatkräftige Unterstützung bei den Zellskelett-Färbungen. Euch dreien ein großes Dankeschön für eure tolle Arbeit!

Simone Bonnet und Dr. Gregor Rottwinkel danke ich für das detailgenaue Korrekturlesen und die kritische Bewertung dieser Arbeit, sowie für die konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Bei Dr. Jan Maisch, Dr. Kai Eggenberger, Dr. Gregor Rottwinkel und Steffen Durst möchte ich für die zahlreichen Anregungen und den regen Gedankenaustausch bedanken. Alle vier hatten immer ein offenes Ohr für meine Fragen und konnten mir durch ihre konstruktiven und kompetenten Ratschläge während dieser Arbeit oft weiterhelfen. Dr. Jan Maisch möchte ich zudem für die Bereitstellung des pDONR-FABD2-Plasmids danken.

Prof. Dr. Kateřina Schwarzerová möchte ich für die herzliche Aufnahme in ihrer Forschungsgruppe am Institut für Pflanzenphysiologie an der Karls-Universität in Prag danken. Darüber hinaus möchte ich ihr, sowie Prof. Dr. Jan Petrášek, Prof. Dr. Viktor Žárský, Dr. Ondřej Smetana und Jana Krtková für die zwar kurze, aber wunderschöne und sehr lehrreiche Zeit danken, die ich in Prag verbringen durfte.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Botanik I für die tolle Zusammenarbeit und die familiäre Arbeitsatmosphäre danken.

Ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie für ihre gesamte Unterstützung, mit der ihr ein großer Anteil dieser Arbeit gebührt. Allen voran eine ganz besondere Frau, Simone Bonnet. Danke, dass es euch gibt!

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1. Die pflanzliche Entwicklung wird durch die Umwelt bestimmt.....	3
2. Das Zellskelett und seine Bedeutung für die pflanzliche Entwicklung .....	3
2.1. Mikrotubuli .....	4
2.2. Aktinfilamente .....	7
2.3. Die Rolle des Zellskeletts während des pflanzlichen Zellwachstums .....	7
2.4. Die Aufgaben des Zellskeletts während der Zellteilung.....	10
2.5. Die Interaktion zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli.....	12
2.6. Zellskelett-assoziierte Proteine vermitteln die Interaktion zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli .....	13
3. Kinesine .....	14
3.1. Kinesine: Varianz in Form und Funktion .....	16
3.2. Phylogenetische Klassifizierung pflanzlicher Kinesine .....	18
3.3. Die Kinesin-14 Familie.....	20
3.4. Kinesine mit einer Calponin homologen Domäne (KCHs).....	22
3.5. Übernehmen KCHs unterschiedliche Funktionen während der Entwicklung von Pflanzenzellen? .....	23
4. Zielsetzung .....	24
<b>Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
1. Material .....	27
1.1. Standardmedien .....	27
1.2. Verwendete Organismen .....	28
1.3. Verwendete Oligonukleotid-Primer .....	28
1.4. Verwendete Plasmide.....	29
1.5. Antikörper .....	30
1.6. Verwendete Antibiotika .....	31
2. Methoden.....	31
2.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden .....	31

2.2. Identifizierung und Isolierung eines KCH-Homologs aus Tabak.....	36
2.3. <i>In silico</i> Analysen von NtKCH .....	41
2.4. Plasmid-Konstruktion.....	43
2.5. Zellbiologische Methoden .....	44
2.6. Expressionsanalysen.....	49
<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
1. NtKCH, ein neues Mitglied der KCH-Gruppe aus <i>Nicotiana tabacum</i> .....	51
1.1. Identifizierung und Isolierung von NtKCH .....	51
1.2. NtKCH besitzt alle strukturellen Merkmale eines KCHs .....	53
1.3. NtKCH besitzt eine N-terminale Typ-3 CH Domäne.....	55
1.4. Phylogenetische Klassifizierung von NtKCH.....	56
2. Fluoreszenzmikroskopische Lokalisationsstudien .....	57
2.1. Transiente und stabile Transformationen fluoreszenter GFP-NtKCH- Fusionskonstrukte in BY-2 Zellen .....	58
2.2. Lokalisation von NtKCH während der Interphase.....	60
2.3. Intrazelluläre Lokalisation von NtKCH während der Mitose.....	70
2.4. Untersuchungen der Eigendynamik von NtKCH .....	75
2.5. NtKCH trägt als Aktin-Mikrotubuli-Querverbinder zur Organisation des pflanzlichen Zellskeletts bei.....	78
3. Untersuchungen zur biologischen Funktion von NtKCH .....	80
3.1. Semiquantitative Analyse der NtKCH-Transkription im BY-2 Wildtyp.....	80
3.2. Zellphysiologische Untersuchungen an GFP-NtKCH Zellen .....	84
4. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	87
<b>Diskussion .....</b>	<b>88</b>
1. NtKCH, das erste KCH aus <i>Nicotiana tabacum</i> .....	88
2. NtKCH existiert in zwei Populationen .....	90
2.1. NtKCH lokalisiert während der Interphase an kortikale und radiale Mikrotubuli.....	90
2.2. NtKCH bewegt sich <i>minus</i> -End-orientiert entlang der Mikrotubuli .....	91
2.3. Statisches NtKCH um den Zellkern ist an Aktin gekoppelt.....	94
2.4. Lokalisation und dynamische Neuverteilung von NtKCH im Verlauf des Zellzyklus ..	95
3. Mögliche Regulation der Interaktion von NtKCH mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli.....	98
3.1. Interagiert NtKCH direkt mit F-Aktin?.....	98

3.2.	Die Rolle der N-terminalen CH Domäne in der Interaktion mit F-Aktin .....	99
3.3.	Dimerisierung als mögliche Voraussetzung der Aktinfilament-Bindung .....	101
3.4.	Konkurrieren Mikrotubuli und Aktinfilamente um NtKCH? .....	102
4.	Möglich Funktionen von NtKCH .....	106
4.1.	Potenzielle Aufgaben von NtKCH während der Mitose .....	106
4.2.	Übernimmt NtKCH eine sekundäre Funktion während des pflanzlichen Zellelongationswachstums? .....	108
4.3.	Mögliche Funktionen von NtKCH während des Zellwachstums .....	110
4.4.	Übernimmt NtKCH die Rolle der Dyneine während der pflanzlichen Kernmigration? .....	113
4.5.	NtKCH hilft beim Neuaufbau eines mitotischen Aktinfilament-Netzwerks.....	115
4.6.	Arbeitsmodell zur Funktion von NtKCH während der Reorganisation des mitotischen Aktin-Zellskeletts .....	116
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	118
<b>Referenzen .....</b>		<b>122</b>
<b>Anhang .....</b>		<b>137</b>
1.	NtKCH.....	137
1.1.	cDNA-Nukleotidsequenz von NtKCH .....	137
1.2.	Aminosäuresequenz von NtKCH .....	138
1.3.	Biochemische Daten zu NtKCH .....	138
2.	Verwendete Primer .....	138
3.	Abkürzungen der Genotypen und Plasmid-Annotationen .....	142
4.	Bestimmung der PCR-Zyklenzahl zur Expressionsanalyse von NtKCH.....	143
5.	Bestimmung der zellzyklusabhängigen Teilungsaktivität .....	143
6.	Sequenzvergleich zwischen NtKCH und TBK9 .....	144
6.1.	Aminosäuresequenz-Vergleich .....	144
6.2.	Nukleotidsequenz-Vergleich .....	145

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ABD	Aktin-Bindedomäne
ABP1	<i>Auxin-binding protein 1</i>
ADZ	<i>Actin-depleted zone</i>
AMP-PNP	Adenylyl-Imidodiphosphat
As	Aminosäure
AtARK3	<i>Arabidopsis thaliana Armadillo-repeat kinesin 3</i>
AtFRA1	<i>Arabidopsis thaliana fragile fibre 1</i>
AtKinG	<i>Arabidopsis thaliana kinesin G</i>
AtPAKRP2	<i>Arabidopsis thaliana phragmoplast-associated kinesin-related protein 2</i>
BP	Bandpass(-filter)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDS	<i>Coding sequence</i>
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i>
CH Domäne	Calponin homologe Domäne
CIP	Calf Intestine Phosphatase
C-Kinesin	Kinesin mit carboxyterminaler Motordomäne
DIK	Differentialinterferenzkontrast
DmNcd	<i>Drosophila melanogaster non-claret disjunctional</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DsRed	Rot fluoreszierendes Protein aus <i>Discosoma discoideum</i>
dsRNA	<i>Double-stranded ribonucleic acid</i>
EB1	<i>End-binding protein 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FABD2	Aktin-Bindedomäne 2 von Fimbrin
F-Aktin	Filamentäres Aktin
G-Aktin	Globuläres Aktin
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GSP	Genspezifisch
HU	Hydroxyurea
KCBP	<i>Kinesin-like Calmodulin-binding protein</i>
KCH	Kinesin mit Calponin homologer Domäne
KHC	<i>Kinesin heavy chain</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

---

MBD-MAP4	Mikrotubulus-Bindedomäne des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 4
MFP	(Aktin-) Mikrofilament-Puffer
MI	Mitotischer Index
M-Kinesin	Kinesin mit zentral angeordneter Motordomäne
MS (Medium)	Murashige und Skoog (Medium)
MSA	<i>Mitosis activation motif</i>
MSP	Mikrotubuli-Stabilisierungspuffer
NACK1	<i>NPK1-activating kinesin-like protein 1</i>
N-Kinesin	Kinesin mit aminoterminaler Motordomäne
NPK1	<i>Nucleus- and phragmoplast -localized kinesin-related protein kinase 1</i>
N-terminal	Aminoterminal
NtKCH	Kinesin mit einer Calponin homologer Domäne aus <i>Nicotiana tabacum</i>
OD	Optische Dichte
PPB	Präprophase-Band
RACE	<i>Rapid amplification of cDNA-ends</i>
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>
RLM-RACE	<i>RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA-ends</i>
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
S-Phase	Synthese-Phase
T <sub>A</sub>	Optimale Primer-Anlagerungstemperatur
TAMBY2	<i>Transient Agrobacterium-mediated transformation of BY-2</i>
TAP	Tabaksäure-Pyrophosphatase
TBK	<i>Tobacco BY-2 kinesin-like polypeptide</i>
TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
UTR	<i>Untranslated region</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

## **Zusammenfassung**

Das Zellskelett koordiniert, vermittelt und kontrolliert sowohl das Wachstum als auch die Teilung pflanzlicher Zellen. Die Zusammenarbeit von Aktinfilamenten und Mikrotubuli während diesen grundlegenden zellulären Prozessen setzt eine Interaktion beider Komponenten des pflanzlichen Zellskeletts voraus. Diese wird durch spezifische Verbindungsproteine vermittelt, über die bisher jedoch sehr wenig bekannt ist.

Kinesine mit einer Calponin homologen Domäne (KCHs), einer Untergruppe der Kinesin-14 Familie in höheren Pflanzen und Moosen, stehen im Verdacht sowohl mit den Mikrotubuli als auch mit den Aktinfilamenten direkt in Wechselwirkung zu stehen. Somit könnten sie als dynamische Querverbindungsproteine wesentlich zur räumlichen und zeitlichen Organisation des Pflanzenzellskeletts beitragen. Ungewiss war jedoch bisher, welche Rolle sie während des pflanzlichen Elongationswachstums und der Mitose spielen.

Um Informationen über die zellulären Aufgaben und die Funktionsweise dieser speziellen Kinesine zu sammeln, wurde in der hier vorliegende Arbeit, NtKCH ein neues KCH aus *Nicotiana tabacum* identifiziert und isoliert. Dadurch war es zum ersten Mal möglich, ein homologes KCH in zyklischen BY-2 Suspensionszellen zellbiologisch zu charakterisieren. Anhand von *in-vivo* Lokalisationsstudien mit fluoreszenten Fusionskonstrukten und Zellskelettfärbungen konnte die Verteilung sowie die dynamische Neuverteilung des Tabak-KCHs in allen Zellzyklusphasen beschrieben werden. Während der Interphase lokalisierte das Kinesin an kortikale und radiale Mikrotubuli, im Inneren der Zelle gleichzeitig auch an Aktinfilamente. Während der Mitose war NtKCH auf den Mikrotubuli des Präprophase-Bands (PPB) und des Phragmoplasten zu finden. In der Metaphase blieb es hingegen aus der Teilungsebene ausgeschlossen und sammelte sich an den Spindelpolen an. Anhand von Zeitreihen-Untersuchungen konnte das Bewegungsverhalten des Kinesins genauer untersucht werden. Dabei wurden zwei Populationen von NtKCH identifiziert, die erhebliche Unterschiede in ihrer Eigendynamik aufweisen. Auf den Mikrotubuli bewegte sich das Kinesin eindeutig zum *minus*-Ende gerichtet, während an Aktinfilamente gekoppeltes NtKCH statisch war. Behandlungen mit spezifischen Zellskelettgiften zeigten, dass die Lokalisation beider NtKCH-Subpopulationen in direkter Abhängigkeit von der Integrität der Mikrotubuli und der Aktinfilamente steht und deuteten auf eine direkte Interaktion mit beiden Filamentarten hin. Auch Experimente mit gekürzten Fluoreszenzfusionskonstrukten bestätigten dies. Sie verdeutlichten darüber hinaus, dass die Wechselwirkung mit den Mikrotubuli- und den Aktinfilamenten über unterschiedliche Domänen vermittelt wird.

Aus den hier gewonnenen Informationen in Kombination mit bereits bekannten biochemischen Eigenschaften anderer Mitglieder der KCH-Gruppe, wird ein Mechanismus zur Regulation der unterschiedlichen Interaktion von NtKCH mit den Mikrotubuli und den Aktinfilamenten

entwickelt. Als eine Art molekularer Schalter erlaubt dieser Mechanismus, dass NtKCH zwischen einem dynamischen und einem statischen Zustand wechseln kann.

Mithilfe von Expressionsanalysen an synchronisierten BY-2 Kulturen konnte darüber hinaus aufgezeigt werden, dass die Transkription des Kinesins einer zellzyklusabhängigen Regulation unterliegt. Zusammen mit einer zellphysiologischen Charakterisierung von NtKCH-Überexpressionszellen deuten diese gesammelten Ergebnisse auf eine primäre Funktion des Kinesins während der Zellteilung hin. Unser Modell zur Funktion von NtKCH schlägt vor, dass es eine wichtige Rolle in der Reorganisation des Zellskeletts beim Übergang in die Mitose und beim Wiedereintritt in die Interphase spielen könnte.

## **Einleitung**

### **1. Die pflanzliche Entwicklung wird durch die Umwelt bestimmt**

Aufgrund ihrer photosynthetischen Lebensweise sind terrestrische Pflanzen ortsgebunden und können sich, im Gegensatz zu den Tieren, ungünstigen Umweltbedingungen nicht durch Flucht entziehen, sondern sind gezwungen, sich ihrem Habitat anzupassen. Die pflanzliche Entwicklung ist deswegen durch ein hohes Maß an morphologischer Plastizität gekennzeichnet und zu einem Großteil durch die Umwelt bestimmt. Mechanische Belastungen durch Wind und Wetter stellen unkontrollierbaren Umweltfaktoren dar, denen Pflanzen fortwährend ausgesetzt sind und entsprechend denen sie ihre Architektur adaptieren müssen. Die ortsgebundene Lebensweise selbst, sowie die Entwicklung eines flexiblen und gleichzeitig robusten Leitgefäßsystems sind als evolutionäre Anpassungen daran zu sehen. Auf zellulärer Ebene haben sich feste Zellulosewände ausgebildet, die jede Pflanzenzelle umschließen, ihre Form aufrechterhalten und sowohl Stabilität als auch Flexibilität vermitteln. Diese Zellwand verhindert jedoch auch die Zellmigration, ein grundlegender Mechanismus, durch den tierische Zellen sich während der Organogenese in geordneten Gewebeverbänden anordnen. Für die pflanzliche Musterbildung muss demnach die Zellform sowie die relative Lage einer jeden Zelle zu ihrer Nachbarzelle schon vor der Ausbildung der Zellwand festgelegt werden. Dies geschieht mit der Initiation der Teilungsebene während der Mitose, welche bestimmt, wie und wo eine neue Zellwand gebildet wird. Dadurch wird gleichzeitig auch die Polarität der Zelle festgelegt, welche wiederum die Wachstumsrichtung der anschließenden Zellexpansion vorgibt. Sowohl die Bestimmung der Zellpolarität, als auch ihre Aufrechterhaltung während des Wachstums sind somit Grundlagen der pflanzlichen Musterbildung und unterliegen sehr strengen Kontroll- und Regulationsmechanismen, in denen das Zellskelett eine zentrale Rolle spielt (Van Damme *et al.*, 2007; Nick, 2008).

### **2. Das Zellskelett und seine Bedeutung für die pflanzliche Entwicklung**

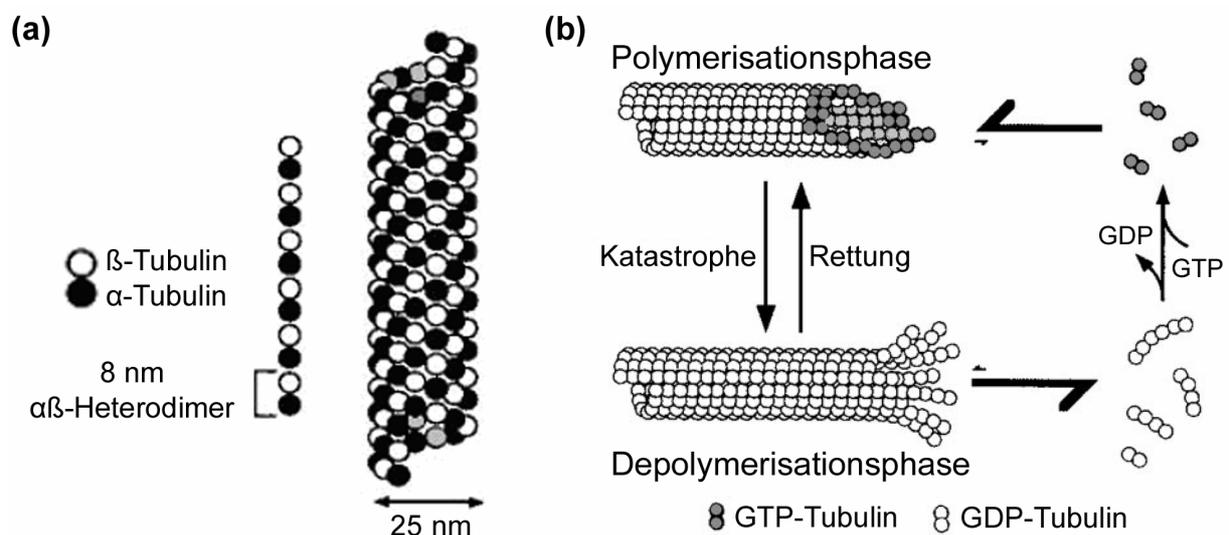
Wie alle eukaryotischen Zellen, sind auch Pflanzenzellen vom Zellskelett, einem dichten Netzwerk aus Proteinfilamenten durchzogen. Es setzt sich aus Aktinfilamenten und den Mikrotubuli zusammen. Die aus tierischen Zellen bekannten Intermediärfilamente konnten in Pflanzen bisher nicht nachgewiesen werden (Kost & Chua, 2002). Das Zellskelett trägt zur Organisation und zur Strukturhaltung bei und übernimmt zahlreiche Aufgaben während der Entwicklung pflanzlicher Zellen. So spielt es eine essenzielle Rolle beim intrazellulären Transport, in der Aufrechterhaltung der zytoplasmatischen Strömung, bei der Positionierung der Zellorganellen, sowie in der interzellulären Kommunikation und bei der Pathogenabwehr (Kost *et al.*, 2002; Kost & Chua, 2002). Wie in den folgenden Kapiteln dargestellt wird,

vermittelt, reguliert und kontrolliert das Zellskelett darüber hinaus direkt das Wachstum und die Teilung pflanzlicher Zellen. Dabei wirkt es insbesondere als sensorisches System, das Veränderungen der Umwelt wahrnimmt und sie in die Wachstums- und Teilungsprozesse integriert. Folglich bestimmt es die Entwicklung der Zelle und trägt gleichzeitig entscheidend zur übergeordneten Musterbildung und Morphogenese der gesamten Pflanze bei. Die Filamente des Zellskeletts unterliegen einer sehr hohen Dynamik und bilden im Verlauf des Zellzyklus spezifische Strukturen höherer Ordnung aus. Sowohl Aktinfilamente als auch Mikrotubuli sind aus kleinen monomeren Proteinbausteinen aufgebaut, die leicht durch das Zytoplasma diffundieren können, und damit eine sehr schnelle Reorganisation, insbesondere auch als Antwort auf externe Stimuli, gewährleisten (Staiger & Doonan, 1993; Kost *et al.*, 1999; Hussey *et al.*, 2004; Nick, 2008).

## 2.1. Mikrotubuli

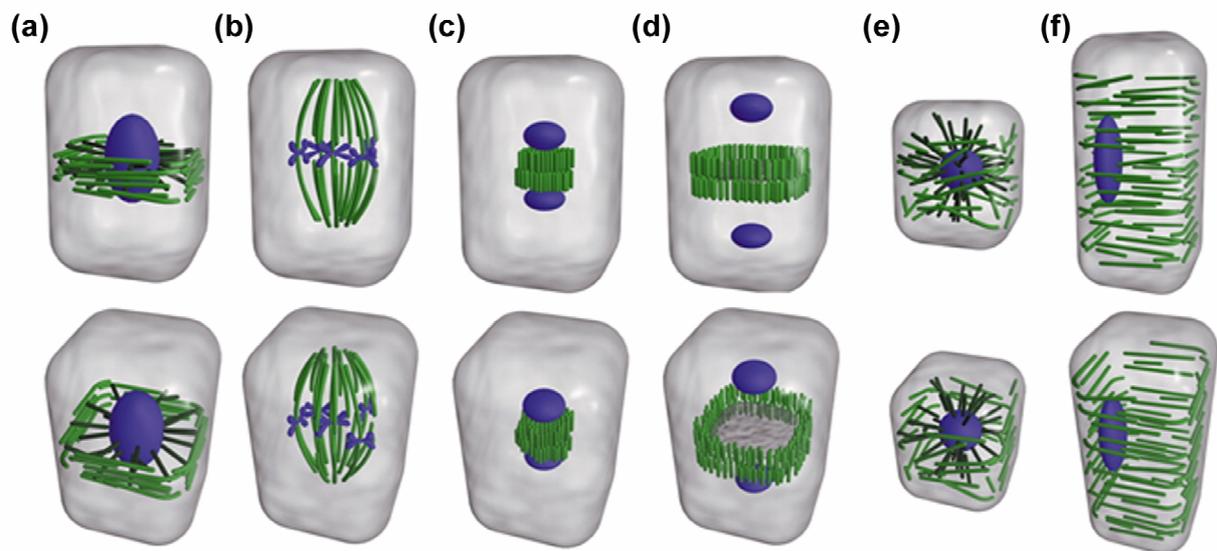
Die Bausteine der Mikrotubuli sind Heterodimere aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, zwei sehr eng miteinander verwandte, globuläre Polypeptide, mit jeweils einem Molekulargewicht von ungefähr 50 kDa (Weisenberg *et al.*, 1968; Burns, 1991). Sie lagern sich immer Kopf-an-Schwanz orientiert zu linearen Protofilamenten aneinander, wobei alle  $\alpha$ -Tubuline zu einem Ende, alle  $\beta$ -Tubuline zum anderen Ende ausgerichtet sind. Jeweils 13 parallel zueinander angeordnete Protofilamente bilden wiederum den Mikrotubulus, eine hohle Röhre mit einem Außendurchmesser von ungefähr 25 nm (Abbildung 1a) (Amos & Klug, 1974; Evans *et al.*, 1985; Desai & Mitchison, 1997). Aufgrund der einheitlichen Orientierung der Tubulin-Dimere weist auch der gesamte Mikrotubulus eine strukturelle Polarität auf, die sich vor allem auf seine dynamischen Eigenschaften auswirkt. An beiden Enden werden Dimere angelagert (Polymerisation) und wieder abgebaut (Depolymerisation), wobei die Polymerisation jedoch bevorzugt am *plus*-Ende mit einem freien  $\beta$ -Tubulin, die Depolymerisation eher am gegenüberliegenden *minus*-Ende stattfindet (Allen & Borisy, 1974). Der Zustand, bei dem ein Fließgleichgewicht zwischen dem Anbau an der einen und dem Abbau an der gegenüberliegenden Seite besteht, wird als *Tretmühlen-Verhalten* bezeichnet (Margolis & Wilson, 1978; 1998). Das dynamische Verhalten eines Mikrotubulus wird durch Hydrolyse des am  $\beta$ -Tubulin gebundenen Guanosintriphosphats (GTP) bestimmt. Dabei besitzt GTP-Tubulin eine höhere Affinität zur Polymerisation an bestehende Filamente als GDP-Tubulin. Die GTP-Hydrolyse wird jedoch nicht für den Aufbau eines Mikrotubulus an sich benötigt, sondern für den scheinbar willkürlichen Wechsel zwischen einer schnellen Depolymerisation (Katastrophe) und langsamer Wiederaufnahme des Polymerwachstums (Rettung) am *plus*-Ende (Abbildung 1b). Ein Phänomen, das als *Dynamische Instabilität* bezeichnet wird (Desai & Mitchison, 1997; Akhmanova & Steinmetz, 2008). Kurz nach dem Einbau von GTP-Tubulin in das Protofilament wird es zu

(GDP+P<sub>i</sub>)-Tubulin hydrolysiert. Die anschließende Abspaltung des Phosphats bewirkt eine Konformationsänderung, wodurch GDP-Tubulin eine gekrümmte Form annimmt und die Bindung zwischen den Dimeren wieder geschwächt wird. Innerhalb der Wand des Mikrotubulus werden die GDP-Tubulin-Protofilamente jedoch durch die lateralen Bindungen in gestreckter Form gehalten. Am *plus*-Ende des Mikrotubulus bleibt dagegen aufgrund der hohen Anbaugeschwindigkeit und der verzögerten Phosphatabspaltung eine GTP/GDP+P<sub>i</sub>-Kappe erhalten, welche die gestreckte Tubulin-Konformation stabilisiert und vor der Depolymerisation schützt (Desai & Mitchison, 1997; Endow & Barker, 2003; Akhmanova & Steinmetz, 2008). Geht diese schützende GTP/GDP+P<sub>i</sub>-Kappe verloren, so können sich die GDP-Tubulin-Protofilamente schlagartig entspannen, was einen springbrunnenähnlichen Zerfall des Mikrotubulus am *plus*-Ende zur Folge hat, wobei sich gebogenen und spiralförmigen Protofilament-Stücken abspalten. Verlust und Wiedergewinn der GTP/GDP+P<sub>i</sub>-Kappe unterliegen einer strikten Kontrolle besonderer Mikrotubuli-assoziiierter Proteine (MAPs), die sich am wachsenden *plus*-Ende ansammeln (<sup>+</sup>TIPs: *Microtubule plus-end tracking proteins*) und die Dynamik des Mikrotubulus regulieren (Akhmanova & Steinmetz, 2008; Mitchison & Kirschner 1984a, b). Die *dynamische Instabilität* erlaubt eine sehr schnelle Neuorganisation des Mikrotubuli-Systems, insbesondere während der Mitose und des Zellwachstums (Desai & Mitchison, 1997).



**Abbildung 1: Aufbau eines Mikrotubulus und das Prinzip der dynamischen Instabilität.** (a)  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten lagern sich Kopf-an-Schwanz zu linearen Protofilamenten zusammen. Jeweils 13 Protofilamente bilden eine hohle Röhre mit einem Durchmesser von 25 nm. (b) Die *dynamische Instabilität* beschreibt den schnellen Wechsel zwischen Polymerisation und Depolymerisation der Mikrotubuli-*plus*-Enden. Während der Polymerisationsphase wird GTP-Tubulin an das wachsende Ende angebaut, zu GDP hydrolysiert und ein Phosphat abgespalten. Die Katastrophe beschreibt den plötzlichen Zerfall zunächst wachsender Mikrotubuli, die Rettung die langsame Wiederaufnahme des Wachstums. Beide Phänomene stehen wahrscheinlich in Zusammenhang mit dem Gewinn und Verlust der GTP/GDP-P<sub>i</sub>-Kappe, welche die polymerisierenden Enden vor dem Abbau schützt. (Abbildung erstellt nach Inoué & Salmon, 1995; Desai & Mitchison, 1997)

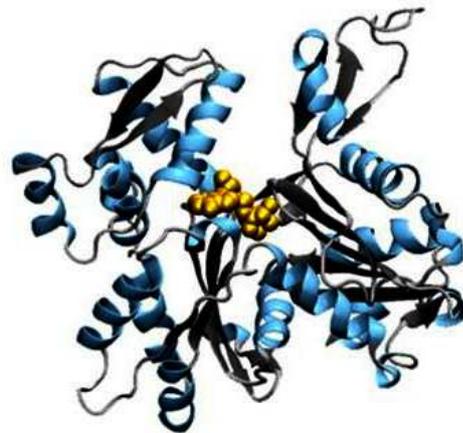
Mikrotubuli bilden im Verlauf des Zellzyklus unterschiedliche Strukturen höherer Ordnung aus (Abbildung 2), auf deren Funktion in späteren Kapiteln näher eingegangen wird. Während der Mitose sind Mikrotubuli wesentlicher Bestandteil des Präprophase-Bands (PPB) und des Phragmoplasten. Zudem bilden sie die für die Kernteilung benötigte Metaphase-Spindel. Sowohl kurz vor und als auch nach der Mitose erscheint ein transientes, perinukleäres Mikrotubuli-Netzwerk, von dem aus radiale Mikrotubuli zum Zellkortex ziehen. Diese bilden sich jedoch sehr schnell wieder zurück. Während der Interphase sind die Mikrotubuli hauptsächlich im Zellkortex zu finden, wo sie parallel zueinander und senkrecht zur Zellachse angeordnet vorliegen (Hasezawa *et al.*, 1998; Wasteneys, 2002; Dhonukshe *et al.*, 2005).



**Abbildung 2: Darstellung der Mikrotubuli-Strukturen im Verlauf des Zellzyklus einer Pflanzenzelle.** Die Mikrotubuli sind grün dargestellt, der Kern bzw. die Chromosomen blau. (a) Schon in der G<sub>2</sub>-Phase kondensieren kortikale Mikrotubuli zum PPB. (b) Während der Metaphase bilden Mikrotubuli die bipolare und acentriolare Kernteilungsspindel. (c) Die Spindel wird gegen Ende der Anaphase durch den Phragmoplast ersetzt. Er besteht aus zwei gegenüberliegenden Gruppen parallel angeordneter Mikrotubuli, die mit ihren *plus*-Enden zur Teilungsebene zeigen. (d) Entlang der Mikrotubuli des Phragmoplasten werden Vesikel zur Ausbildung der Zellplatte (dunkelgrau dargestellt) angeliefert. (e) Nach der Zytokinese sind kurzzeitig perinukleäre und radiale Mikrotubuli zu beobachten. Diese bilden sich jedoch schnell zurück und werden durch das Interphase-typische, kortikale Netzwerk ersetzt. Für nähere Beschreibung siehe Kapitel 2.3 und 2.4. (Abbildung aus Wasteneys, 2002)

## 2.2. Aktinfilamente

Aktin ist ein hoch konserviertes, globuläres Polypeptid (G-Aktin) mit einem Molekulargewicht von 42 kDa. Das insgesamt asymmetrisch gebaute Protein besteht aus zwei Domänen, zwischen denen in einer Spalte, jeweils Bindestellen für ein Adenosintriphosphat (ATP) und ein zweiwertiges Ion lokalisiert sind (Abbildung 3) (Kabsch *et al.*, 1990; Carlier, 1991a). Angetrieben durch ATP-Hydrolyse polymerisieren Aktin-Monomere immer Kopf-an-Schwanz zu perlenkettenartigen Proteinfilamenten, von denen sich wiederum zwei zu einem rechtsgedrehten, helikalen Aktinfilament (Aktin-Mikrofilament) umeinander winden (Wegner, 1976; Holmes *et al.*, 1990). Auch das Aktinfilament weist eine Gesamtpolarität mit unterschiedlichen Polymerisationsraten an beiden Enden auf. So werden am *barbed end* vermehrt Monomere angebaut, am gegenüberliegenden *pointed end* wieder abgebaut (Carlier, 1991b). Während die *dynamische Instabilität* vor allem bei Mikrotubuli auftritt, dominiert bei Aktinfilamenten das *Tretmühlenverhalten* (Wegner, 1976; Desai & Mitchison, 1997).



**Abbildung 3: Proteinstruktur von G-Aktin.** Protein-Kristallstruktur eines G-Aktin-Bausteins. (Abbildung aus Wickstead & Gull, 2011)

Aktinfilamente bilden in Interphasezellen dichte kortikale und perinukleäre Netzwerke und sind darüber hinaus auch vermehrt in radialen, transvakuolären Strängen zu finden. Die Hauptaufgabe der Aktinfilamente besteht während der Interphase in der Aufrechterhaltung der zytoplasmatischen Strömung, dem Transport von Vesikeln und Membranen, sowie der Positionierung der Zellorganellen (Kost & Chua, 2002). So bedingt die Depolymerisation der Aktinfilamente durch entsprechende Gifte die Auflösung der zytoplasmatischen Stränge, wodurch der Zellkern aus seiner fixierten zentralen Lage zum Zellkortex rückt (Katsuta & Shibaoka, 1988; Kost & Chua, 2002). Die Funktionen während der Zellteilung sind noch weitestgehend unklar. Ihre Anordnung und Beteiligung an Prozessen der Kern- und Zellteilung wird in den folgenden zwei Kapiteln näher erörtert.

## 2.3. Die Rolle des Zellskeletts während des pflanzlichen Zellwachstums

Organismen können sich entweder durch Zellteilungen (Teilungswachstum) oder durch Zunahme des Zellvolumens (Expansionswachstum) vergrößern. Bei Pflanzen beschränkt sich das Teilungswachstum auf bestimmte Entwicklungsstadien und Gewebe. Die meisten Pflanzenzellen vergrößern sich stark durch Expansionswachstum. Die treibende Kraft

resultiert dabei aus dem osmotisch regulierten Turgordruck, der entsteht, indem Pflanzenzellen Wasser in ihre Vakuole aufnehmen. Durch die Volumenzunahme der Vakuole, die in den meisten differenzierten Pflanzenzellen oft mehr als 90% des gesamten Zellinhalts einnimmt, wird der Protoplast ungerichtet gegen die feste Zellwand gepresst (Nick, 2008; 2011). Die Zellen können jedoch nur an den Stellen expandieren, an denen die Zellwand ein gewisses Maß an Dehnbarkeit aufweist. Während der Oberflächenvergrößerung wird die Zellwand nicht dünner und auch die Zellmembran des Protoplasten ist nur sehr begrenzt dehnbar, was eine kontinuierliche Neuanklagerung von Zellwandmaterial sowie Plasmamembran an der Stelle der Expansion voraussetzt. Die Bausteine werden in Golgi-Vesikeln angeliefert und anschließend durch Exocytose in die Zellmembran eingebaut. Dadurch wird einerseits die Membran erweitert, andererseits auch gleichzeitig neues Zellwandmaterial, sowie entsprechende Synthesenzyme nach außen abgeben. Man unterscheidet drei Arten des pflanzlichen Expansionswachstums. Das isodiametrische Wachstum, wodurch sich vor allem meristematische Zellen vergrößern. Das Spitzenwachstum, sowie das diffuse Expansionswachstum, welches auch als Längenwachstum oder Elongationswachstum bezeichnet wird (Hussey *et al.*, 2004). Spitzenwachstum tritt ausschließlich in Pollenschläuchen und Wurzelhaaren höherer Pflanzen auf, sowie in Rhizoiden und Protonemata bei Algen und Moosen (Hussey *et al.*, 2004; Van Damme *et al.*, 2007; Nick, 2008; Cai & Cresti, 2010). Die Expansion ist hierbei nur auf einen sehr kleinen Bereich an der Spitze der Zellen beschränkt. Von besonderer Bedeutung hierfür ist der gerichtete Vesikeltransport zur Zellspitze entlang dicker longitudinal ausgerichteter Aktinfilament-Bündel. Zwar organisieren sich auch die Mikrotubuli teilweise in dicken intrazellulären Bündeln, die entlang der Zellachse durch das stark polarisierte Zytoplasma ziehen, jedoch sind die meisten Mikrotubuli in einem kortikalen Netzwerk um die Zelle angeordnet. Aus dem Bereich der Zellspitze sind sie dagegen vollkommen ausgeschlossen (Cai & Cresti, 2010). Wie Behandlungen wachsender Wurzelhaare mit Mikrotubuli-Giften zeigen, haben Mikrotubuli weder einen Einfluss auf die Exocytoserate, noch auf die Größe der Stelle, an der die Golgi-Vesikel in die Membran eingebaut werden (Bibikova *et al.*, 1999; Ketelaar *et al.*, 2003). Die behandelten Zellen sind jedoch oft gewellt und besitzen zufällige Zellverzweigungen. Dies lässt vermuten, dass die Mikrotubuli eine Rolle in der Fokussierung der Exocytosestelle spielen und die Richtung des Spitzenwachstums aufrechterhalten können, indem sie die aktinabhängige Zytoplasmaströmung zur Zellspitze lenken (Bibikova *et al.*, 1999; Hussey *et al.*, 2004). Die meisten pflanzlichen Zellen wachsen durch diffuses Expansionswachstum in die Länge (Van Damme *et al.*, 2007; Nick, 2008). Hierbei ist die Anlieferung der Golgi-Vesikel, vermittelt durch Aktinfilamente, im Gegensatz zum Spitzenwachstum, eher diffus (Nebenführ *et al.*, 2000; Hussey *et al.*, 2004). Von größerer Bedeutung als beim

Spitzenwachstum ist die, durch die Zellwand kontrollierte und gelenkte Ausdehnung des Protoplasten. Die Zellwand ist aus Zellulose-Mikrofibrillen aufgebaut, die in eine Matrix aus Polysacchariden eingebettet vorliegen (Hussey *et al.*, 2004; Nick, 2008; 2011). Wie schon 1948 durch Polarisationsmikroskopie gezeigt wurde, sind die Zellulose-Mikrofibrillen in gestreckten Zellen meist senkrecht zur Zelllängsachse orientiert. Sie wirken demnach als eine Art Korsett, das die Wachstumsrichtung entsprechend einer festgelegten Polaritätsachse vorgibt (Ziegenspeck, 1948). In direktem Zusammenhang mit der Ausrichtung der Mikrofibrillen stehen die kortikalen Mikrotubuli, die in Interphasezellen gleichermaßen angeordnet vorliegen (Green, 1962; Ledbetter & Porter; 1963). So zerstören Mikrotubuli depolymerisierende Substanzen gleichzeitig auch die Anordnung der Zellulose-Mikrofibrillen, wodurch die behandelten Zellen eine runde Form annehmen (Green 1962; Hogetsu, 1978; Baskin *et al.*, 1994). Darüber hinaus verändern Zellwachstumshormone die Orientierung des kortikalen Mikrotubuli-Netzwerks und damit einhergehend auch die Anordnung der Zellulose-Mikrofibrillen (Shibaoka, 1994; Nick *et al.*, 1990). Die Zellulosefibrillen werden durch Zellulose-Synthasen gebildet. Diese ringförmigen Proteinkomplexe mit einem Durchmesser von 25-30 nm und einer zentralen Öffnung bestehen aus sechs Untereinheiten (Kimura *et al.*, 1999). Angeliefert in Golgi-Vesikeln, werden sie durch Exocytose in die Zellmembran eingebaut, innerhalb derer sie sich fortbewegen und kristallisierende Zellulose in den Raum zwischen der Membran und der bestehenden Zellwand abgeben (Nick, 2011). Nach dem so genannten *Guard-Rail*-Modell verursachen membrannaher kortikale Mikrotubuli und bestehende Zellulosefibrillen Falten in der Membran, die als Führungsschienen der Synthase-Komplexe dienen. Die treibende Kraft für die Bewegung resultiert dabei aus dem Kristallisationsprozess der Zellulose (Herth, 1980; Giddings & Staehelin, 1991). Dagegen werden in dem von Heath (1974) postulierten *Monorail*-Modell, kortikale Mikrotubuli als molekulare Schienen genutzt, entlang derer die Zellulose synthetisierenden Enzyme möglicherweise durch molekulare Motorproteine gezogen werden. Nach jahrzehntelangen Kontroversen, welche der beiden Theorien der natürlichen Situation entspricht, konnten im Jahre 2006 durch *live-cell imaging* eindeutige Hinweise geliefert werden, die das *Monorail*-Modell bestätigten. Hierzu wurden eine Fusion des blau fluoreszierenden Proteins (CFP) an  $\alpha$ -Tubulin 1 und eine Fusion des gelb fluoreszierenden Proteins (YFP) an die CESA6-Untereinheit des Zellulose-Synthase-Komplexes in *Arabidopsis thaliana cesa6*-Nullmutanten kotransformiert. An Hypokotylzellen wurde eindrucksvoll gezeigt werden, wie sich die Zellulose synthetisierende Enzym-Komplexe direkt entlang kortikaler Mikrotubuli bewegten. Ob und welche Rolle hierbei Motorproteine spielen, konnte dabei jedoch nicht eindeutig geklärt werden (Paredes *et al.*, 2006).

Aktinfilamente tragen ihren Teil zum Zelllängenwachstum bei, indem sie wahrscheinlich als Orientierungshilfe der kortikalen Mikrotubuli dienen. Zwar ändert sich die Organisation des Aktinfilament-Systems im Verlauf des Elongationswachstums nur geringfügig, doch wird durch die pharmakologische Auflösung des kortikalen Aktin-Netzwerks auch die Anordnung der Zellulose-Mikrofibrillen zerstört, was zu einer Hemmung des Expansionswachstums führt (Seagull, 1990; Kost *et al.*, 2002).

#### **2.4. Die Aufgaben des Zellskeletts während der Zellteilung**

Das pflanzliche Zellskelett koordiniert und kontrolliert das diffuse Expansionswachstum, wobei insbesondere Mikrotubuli sicherstellen, dass die Zellen sich anisotrop, entsprechend einer vorgegebenen Polaritätsachse ausdehnen und in die Länge wachsen. Festgelegt wird die Zellachse jedoch schon während der Mitose. Auch hier spielt das pflanzliche Zellskelett eine fundamentale Rolle (Kost *et al.*, 1999; Hussey *et al.*, 2004; Nick, 2008; 2011). Innerhalb der meisten sich entwickelnden Pflanzengewebe teilen sich die Zellen antiklin zur Organoberfläche und expandieren anschließend senkrecht zur ehemaligen Teilungsebene. Perikline Zellteilung, welche die Entstehung neuer Zellschichten zur Folge hat, beobachtet man meist nur während der Embryogenese und Meristementwicklung. Die Lage und Ausrichtung der Teilungsebene bestimmt folglich nicht nur das morphologische Schicksal der Tochterzellen, sondern ist grundlegend für die pflanzliche Musterbildung (Kost *et al.*, 1999; 2002). Aufgrund der festen Zellulosewand kann die Membran pflanzlicher Zellen nicht einfach wie bei Tierzellen durch einen kontraktiven Aktin-Myosin-Ring von außen nach innen eingeschnürt werden. Stattdessen wird in der Mitte der Zelle eine neue Wand, die Zellplatte, eingezogen, die sich kreisförmig ausdehnt. Die entstehenden Tochterzellen werden von innen nach außen voneinander getrennt (Smith, 1999). Neben der korrekten Aufteilung des genetischen Materials zählen die Ausbildung und die genaue Ausrichtung der Zellplatte zu den wichtigsten Aufgaben des Zellskeletts während der Mitose (Kost *et al.*, 1999; 2002). Schon gegen Ende der S-Phase entwickelt sich das Phragmosom, eine zytoplasmareiche Region um den Kern, deren transvakuoläre Ausläufer in direktem Kontakt mit dem Zellkortex stehen. Innerhalb des Phragmosoms reichern sich radiale und perinukleäre Aktinfilamente sowie radiale Mikrotubuli an. Beide Zellskelettstrukturen haben die Aufgabe, den Kern aus seiner peripheren Lage in die Mitte der Zelle zu bewegen und exakt innerhalb der Zellteilungsebene auszurichten und zu verankern (Katsuta & Shibaoka, 1988; Katsuta *et al.*, 1990; Sano *et al.*, 2005; Van Damme *et al.*, 2007). Vorbestimmt wird die Lage und Ausrichtung der Teilungsebene durch das PPB, das sich gegen Ende der G<sub>2</sub>-Phase bildet. Hierzu kondensieren transvers angeordnete Mikrotubuli und bilden zusammen mit Aktinfilamenten einen schmalen kortikalen Ring, der die Zelle exakt auf Höhe der zukünftigen Teilungsebene umschließt (Traas *et al.*, 1987; Lloyd & Traas,

1988; Staiger & Doonan, 1993; Mineyuki, 1999). In klassischen Zentrifugationsexperimenten an Farn-Protonemata konnten Murata und Wada (1991) zeigen, dass sowohl die Initiierung des PPBs als auch die Entscheidung, wo die Zelle künftig geteilt wird, der Kontrolle des Zellkerns unterstehen. Die Ausrichtung der Teilungsebene wird dagegen durch das PPB vorbestimmt (Murata & Wada, 1991). Da es sich jedoch mit der Auflösung der Kernhülle zu Beginn der Prophase wieder zurückbildet und die Mikrotubuli aus dem Kortex vollkommen verschwinden, muss das PPB Positionssignale im Zellkortex hinterlassen, die nach der Kernteilung zur Ausrichtung der Zellplatte abgelesen werden können (Mineyuki, 1999; Kost *et al.*, 2002; Van Damme *et al.*, 2007). Um welche Art von Signalen es dabei auf molekularer Ebene handelt, ist bisher ungeklärt. Einerseits könnten die radialen Mikrotubuli während der Positionierung des Zellkerns auch den aktinabhängigen Transport von Golgi-Vesikel zum Zellkortex lenken und dadurch an der Stelle des PPB einen endosomalen Gürtel erschaffen, der während der Kernteilung erhalten bleibt und die erforderlichen Lageinformationen beinhaltet (Nebenführ *et al.*, 2000; Dhonukshe *et al.*, 2005). Andererseits werden vermutlich auch lokale Veränderungen der Zellwand oder des kortikalen Aktin-Netzwerks zur Positionsbestimmung genutzt (Panteris, 2008). So ziehen sich nach der Auflösung der Kernhülle auch die Aktinfilamente aus dem Bereich des PPB zurück, während sie in den übrigen kortikalen Regionen zu allen Zeitpunkten der Mitose erhalten bleiben. Diese so genannte „Aktinfreie Zone“ (ADZ: *actin depleted zone*) dient vermutlich als Negativ-Marker der Zellteilungsebene (Liu & Palevitz, 1992; Cleary, 1995; Panteris, 2008). *In-vivo* Untersuchungen an BY-2 Tabakzellen mit einer Fusion des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) an die Aktin-Bindedomäne 2 von Fimbrin (FABD2) zeigen die Bildung zweier peripherer Aktinringe um die ADZ, die vermutlich auch mit der Festlegung der Teilungsebene in Zusammenhang stehen (Sano *et al.*, 2005). Ob und in wie fern die ADZ oder die kortikalen Aktinringe an der Ausrichtung der Zellteilungsebene beteiligt sind, ist bisher unklar und bedarf weiterer Untersuchungen (Panteris, 2008). Gleichzeitig mit dem Aufbau des PPB nimmt die Menge an Mikrotubuli auf der Kernoberfläche drastisch zu. Sie ziehen sich zu Beginn der Prometaphase auf die zukünftigen Spindelpole zurück, von wo aus sie mit ihren *plus*-Enden voran zur Zellmitte ausströmen und die bipolare Kernteilungsspindel ausbilden. Nach der Trennung der Chromosomen zerfällt die Spindel wieder und wird durch den Phragmoplasten zwischen den beiden entstehenden Tochterkernen ersetzt (Kost *et al.*, 2002). Dazu werden teilweise Mikrotubuli aus der ehemaligen Spindel rekrutiert, teilweise aber auch neu polymerisiert (Heese *et al.*, 1998). Das zunächst zylinderartige Gebilde setzt sich aus zwei gegenüberstehenden Gruppen parallel angeordneter Mikrotubuli, sowie ähnlich organisierter Aktinfilamente zusammen. Die Mikrotubuli überlappen in der Teilungsebene mit ihren *plus*-Enden, die Aktinfilamente dagegen nicht (Euteneuer *et al.*, 1982; Heese *et al.*, 1998; Kost *et al.*, 2002).

Durch elektronenmikroskopische und ultrahochauflösende Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass zahlreiche Vesikel indirekt mit den Mikrotubuli isolierter Phragmoplasten assoziiert sind (Kakimoto, 1987). Zudem sammeln sich Golgi-Stapel während der Zytokinese verstärkt in einem zytoplasmaströmungsarmen Bereich dicht um den Phragmoplasten an (Nebenführ *et al.*, 2000). Diese Beobachtungen legen nahe, dass Golgi-Vesikel beladen mit Zellwandmaterial wahrscheinlich durch Motorproteine entlang der Mikrotubuli in die Mitte transportiert werden, wo sie zur Zellplatte verschmelzen (Kost & Chua, 2002). Während sich die Zellplatte dadurch kreisförmig ausdehnt, wächst auch der Phragmoplast und verändert seine Gestalt zu einer ringartigen Struktur. Junge Zellplatten sind in Bezug auf die zukünftige Zellteilungsebene meist noch schräg orientiert. Im Verlauf ihres Reifungsprozesses werden sie, wahrscheinlich durch Aktinfilamente, an die vorbestimmte kortikale Region gezogen, an der sie mit der Membran der Mutterzelle fusionieren (Lloyd & Traas, 1988; Kost *et al.*, 2002; Dhonukshe *et al.*, 2005; Van Damme *et al.*, 2007).

## **2.5. Die Interaktion zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli**

Wie in den bisherigen Kapiteln beschrieben, besteht das pflanzliche Zellskelett aus zwei hoch dynamischen Filamentnetzwerken, die an grundlegenden Entwicklungsprozessen beteiligt sind. Zwar agieren beide Filamentsysteme dabei oft unabhängig voneinander, jedoch erfordern viele dieser Prozesse eine exakte räumliche und zeitliche Koordination und Organisation, die eine Interaktion der Aktinfilamente mit den Mikrotubuli voraussetzt (Collings, 2008; Petrášek & Schwarzerová, 2009). Schon 1972 wurden auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Lilienpollenschläuchen filamentartige Strukturen entdeckt, die sich parallel an die Mikrotubuli anlagerten und mit ihnen über zahlreiche Querverbindungen in Kontakt standen. Aufgrund des Durchmessers dieser Filamente schloss man damals auf Aktinfilamente, was später durch entsprechende Antikörper bestätigt werden konnte (Franke, 1972; Lancelle & Hepler, 1991). Bald darauf wurde klar, dass solche, an Mikrotubuli gekoppelten Aktinfilamente, keinesfalls eine Ausnahme darstellten, die sich auf Pollenschläuche beschränkte und in einer Vielzahl von Zelltypen verschiedener Pflanzenarten vorgefunden werden können (Franke, 1972; Seagull & Heath, 1979; Hardham *et al.*, 1980; Tiwari *et al.*, 1984; Tominaga *et al.*, 1997). Anhand fluoreszenzmikroskopischer Studien an fixierten oder lebenden Zellen gelang es zudem aufzuzeigen, dass Aktinfilamente sehr häufig mit zellzyklusabhängigen Mikrotubuli-Strukturen kolokalisieren. So ist während der Interphase die Ausrichtung des kortikalen Aktinfilament-Netzwerks in vielen unterschiedlichen pflanzlichen Zelltypen deckungsgleich mit derjenigen kortikaler Mikrotubuli (Traas *et al.*, 1987; Sonobe & Shibaoka, 1989; Blancaflor, 2000). Während der Mitose kolokalisieren Aktinfilamente mit den Mikrotubuli des PPBs und des Phragmoplasten, während sie sich in der Metaphase an den Spindelpolen

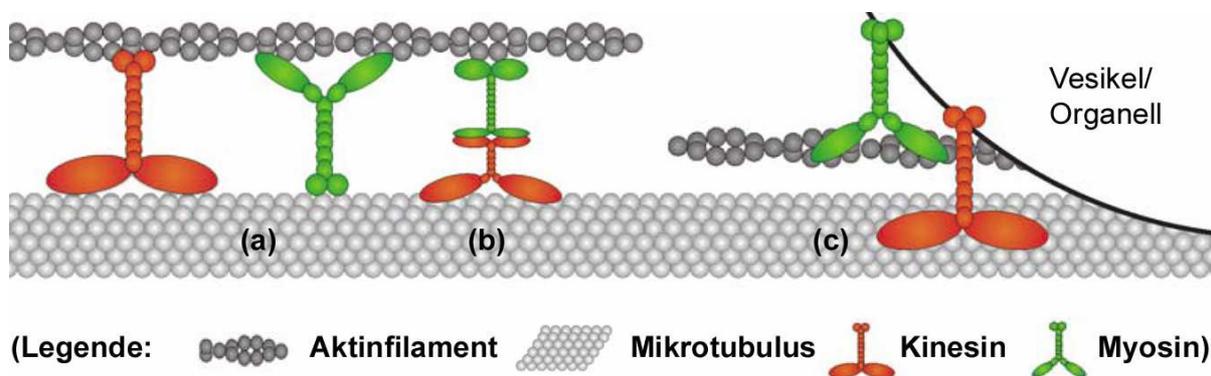
ansammeln, dabei aber wahrscheinlich nicht mit den Spindelmikrotubuli assoziieren (Clayton & Lloyd, 1985; Gunning & Wick, 1985; Traas *et al.*, 1987; Mineyuki, 1999; Panteris, 2008). Zudem konnte in zahlreichen Studien durch Behandlungen mit unterschiedlichen Zellskelettgiften eine direkte Wechselwirkung beider Filamentarten bewiesen werden. So bedingt die Depolymerisation der Mikrotubuli auch gleichzeitig die Auflösung transvers-kortikaler Aktinfilamente in kultivierten Karottenzellen (*Daucus carota*) sowie in epidermalen Wurzelzellen von *A. thaliana* (Traas *et al.*, 1987; Collings & Wasteneys, 2005). Die Behandlung von Maiswurzelzellen mit dem Mikrotubuli stabilisierenden Taxol führt dagegen zu einer Zunahme der Mikrotubuli-assoziierten Aktinfilamente (Chu *et al.*, 1993; Blancaflor, 2000). Dagegen verhindert die Depolymerisation der Aktinfilamente die Reorganisation der Mikrotubuli während der Entwicklung von Baumwollfasern (Seagull, 1990). Dies sind nur einige von zahlreichen Beispielen, die verdeutlichen, dass beide Zellskelettarten in direkter Interaktion miteinander stehen. Darüber hinaus liefern diese Studien zahlreiche Hinweise, dass diese Wechselwirkung in direktem Zusammenhang mit der Kontrolle des Zellwachstums und der Gewebeexpansion steht (Blancaflor, 2000; Collings *et al.*, 2006).

## **2.6. Zellskelett-assoziierte Proteine vermitteln die Interaktion zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli**

Trotz intensiver Studien zur Interaktion zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli, sowie ihrer Auswirkung insbesondere auf die Zellexpansion, ist bisher sehr wenig über die Proteine bekannt, welche diese in Pflanzen vermitteln (Goode *et al.*, 2000; Petrášek & Schwarzerová, 2009). Einer der wenigen Kandidaten, die im Zusammenhang mit der Interaktion des Zellskeletts in Pflanzen stehen könnten, ist das Mikrotubuli-assoziierte 190 kDa Protein (MAP190). Es konnte aus BY-2 Miniprotoplasten zusammen mit Mikrotubuli isoliert werden (Igarashi *et al.*, 2000). MAP190 bleibt während der Interphase innerhalb des Zellkerns eingeschlossen, lokalisiert im Verlauf der Mitose an die Spindel und induziert *in-vitro* eine laterale Bündelung von Aktinfilamenten und Mikrotubuli. Obwohl eine gleichzeitige Interaktion mit beiden Filamentarten aufgrund des experimentellen Ansatzes nicht direkt bewiesen werden konnte, und MAP190 darüber hinaus keine der bekannten Mikrotubulus- und Aktin-Bindedomänen aufweist, könnte es dennoch als Verbindungsprotein innerhalb des Phragmoplasten fungieren. Auch SB401 bindet und bündelt sowohl Aktinfilamente als auch Mikrotubuli *in-vitro* und kolokalisiert an kortikale Mikrotubuli in Pollenschläuchen von *Solanum berthaultii*. SB401-Homologe konnten bisher nur in der Familie der Nachtschattengewächse identifiziert werden (Huang *et al.*, 2007).

Es wurden unterschiedliche Möglichkeiten vorgeschlagen, wie Verbindungsproteine die Interaktion zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli auch in pflanzlichen Zellen vermitteln

könnten (Petrášek & Schwarzerová, 2009) (Abbildung 4). Einerseits könnten bifunktionelle Proteine über unterschiedliche Domänen gleichzeitig an beiden Filamentarten gekoppelt sein. Ein Beispiel aus dem Pflanzenreich liefert hierfür das *A. thaliana*-Formin AtFH4. Das Aktin-Nukleationsprotein, bindet auch Mikrotubuli *in-vitro* und *in-vivo* über eine bis dato unbekannte GOE-Domäne. In Blattzellen von *Nicotiana benthamiana* heftet es Mikrotubuli darüber hinaus wahrscheinlich direkt an das Endoplasmatischen Retikulum und übernimmt dadurch eine Brückenfunktion zwischen intrazellulären Membranen und beiden Komponenten des pflanzlichen Zellskeletts (Deeks *et al.*, 2010). Zur Vermittlung der Interaktion zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli könnten aber auch Proteinkomplexe genutzt werden, in denen mindestens ein Aktin- und ein Mikrotubuli-Bindeprotein involviert sind. Handelt es sich bei diesen Bindeproteinen um molekulare Motoren, so resultieren dynamische Brücken, durch die beide Filamente gegeneinander verschoben werden können (Abbildung 4). So zeigen Zeitreihen-Untersuchungen an *A. thaliana*-Hypokotylzellen, dass sich direkt nach Auswaschen des Aktinfilament-Inhibitors Latrunculin B, kurze Aktinfilamente bilden, die sich entlang der Mikrotubuli bewegen und entsprechend dem Mikrotubuli-Netzwerk ein neues kortikales Aktinfilament-System reorganisieren (Sampathkumar *et al.*, 2011).

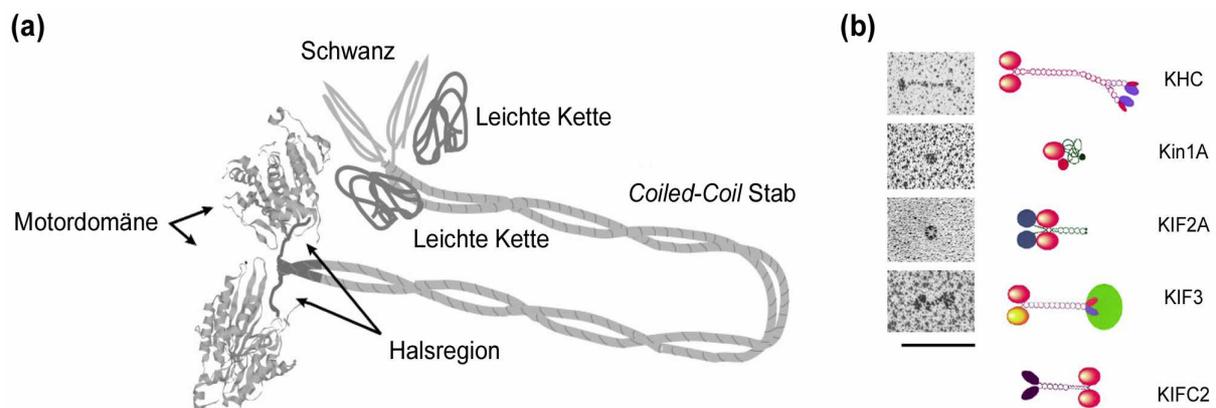


**Abbildung 4: Möglichkeiten der durch Motorproteine vermittelten Interaktion zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli.** (a) An Mikrotubuli oder Aktinfilamente assoziierte Motorproteine binden über verschiedene Domänen gleichzeitig beide Filamentarten und bilden so dynamische Brücken aus. (b) Zwei Motorproteine liegen jeweils nur an ihrer entsprechenden Filamentart assoziiert vor, interagieren jedoch direkt oder indirekt über zusätzliche Proteine miteinander und bilden einen integrierten Motor. (c) Aktin- und Mikrotubuli-Motoren können auch über dieselben Transportgüter miteinander indirekt in Verbindung stehen. (Abbildung aus Petrášek & Schwarzerová, 2009)

### 3. Kinesine

Die Superfamilie der Kinesine umfasst Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine, die in allen eukaryotischen Organismen vorkommen (Hirokawa, 1998). Sie nutzen die frei werdende Energie der ATP-Hydrolyse, um sich unidirektional entlang von Mikrotubuli fortzubewegen oder um die Dynamik der Mikrotubuli zu regulieren. Kinesine übernehmen vielfältige Aufgaben und sind essenziell für Funktion und Morphologie der Zelle. So sind sie Teil des

intrazellulären Transportsystems und befördern verschiedene Zellbestandteile wie Vesikel, Organellen, Proteine, aber auch DNA und RNA. Während der Mitose und Meiose organisieren sie den Aufbau der Teilungsspindel, sind für die polwärts gerichtete Bewegung der Chromosomen sowie der Spindelmikrotubuli zuständig und sorgen dadurch für die Trennung des genetischen Materials (Endow & Barker, 2003). Allen Kinesinen gemeinsam ist eine konservierte Motordomäne aus ungefähr 350 Aminosäuren, welche sowohl die katalytische Tasche für die ATP-Hydrolyse als auch eine Mikrotubulus-Bindestelle beinhaltet. Die Motordomäne wird auch als katalytisches Zentrum bezeichnet, das dem Kinesin erlaubt sich fortzubewegen und Kraft zu entwickeln (Hirokawa *et al.*, 1989). Außerhalb der Motordomäne sind Kinesine in ihrem Aufbau sehr variabel (Woehlke *et al.*, 1997; Hirokawa & Takemura, 2004; Miki *et al.*, 2005). Als konventionelle Kinesine werden die Vertreter der Kinesin-1 Familie bezeichnet, zu denen auch der „Urvater“ der Kinesine, KHC1 (*Kinesin heavy chain 1*), zählt, das 1985 aus Riesenaxonen von Tintenfischen isoliert wurde (Vale *et al.*, 1985). Konventionelle Kinesine sind heterotetramere Komplexe aus zwei schweren und zwei leichten Proteinketten (Kinesin-Dimer), wobei jede der schweren Ketten sich in mehrere Abschnitte unterteilen lässt (Abbildung 5a). Die globuläre Kopfreion besteht im Wesentlichen aus der konservierten Motordomäne, die bei konventionellen Kinesinen am N-Terminus liegt. Sie ist über einen kurzen Halsbereich mit der Stabregion verbunden.



**Abbildung 5: Schematischer Aufbau und Domänenanordnung verschiedener Kinesine.** (a) Bei konventionellen Kinesinen (KHC in (b)) lagern sich jeweils zwei schwere und zwei leichte Polypeptidketten zu einem heterotetrameren Protein zusammen. Eine schwere Kette unterteilt sich jeweils in vier wichtige Abschnitte. Die N-terminale Kopfreion mit der konservierten Motordomäne ist über eine kurze Halsregion (dunkelgrau) und mit dem langen *Coiled-Coil*-Stab verbunden. Er dient der Dimerisierung der schweren Ketten. Der C-terminale Schwanz ist hoch variabel und wird für die Interaktion mit spezifischen Transportgütern genutzt. Hier binden auch die leichten Ketten (Endow & Barker, 2003). (b) Beispiele der variablen Domänenanordnung in verschiedenen Kinesinen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen (links; Maßstab: 100 nm) und schematische Darstellung der Kinesine (rechts). Rote Ovale repräsentieren die Motordomäne. KIF1A ist ein monomeres Kinesin. KIF2A ist ein Kinesin mit zentral angeordneter Motordomäne und bildet Homodimere. Die Motordomäne liegt zwischen der N-terminalen Region (blaue Ovale) und dem C-Terminus (grün). KIF3 lagert sich zu einem Trimer aus einem KIF3A/KIF3B-Heterodimer und einem KAP3 (hellgrünes Oval) zusammen. Auch KIFC2 bildet ein Homodimer. Es trägt die Motordomäne am gegenüberliegenden C-Terminus. (Abbildung erstellt nach Hirokawa & Takemura, 2004)

Die Stabregion selbst besteht aus  $\alpha$ -Helices mit charakteristischen Heptapeptid-Wiederholungen und dient der Dimerisierung der schweren Ketten, wobei sich die  $\alpha$ -helikalen Abschnitte zu einer Doppelwendel (*Coiled-Coil*) zusammenlagern (Fischer, 2002; Endow & Barker, 2003). Am C-Terminus konventioneller Kinesine befindet sich die variable Schwanzregion, an der sich die beiden leichten Ketten anlagern (Diefenbach *et al.*, 1998). Sie ist für die spezifische Interaktion mit unterschiedlichen Transportgütern zuständig und steht im Verdacht die ATPase-Aktivität der Motordomäne zu regulieren (Stock *et al.*, 1999; Seiler *et al.*, 2000).

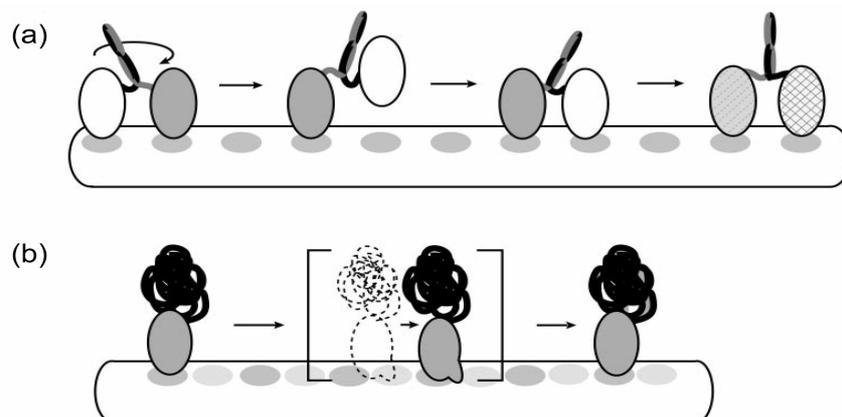
### 3.1. Kinesine: Varianz in Form und Funktion

Die Vielfältigkeit der zellulären Funktionen von Kinesinen spiegelt sich in ihrem variablen Aufbau wider. Nur wenige Mitglieder der Kinesin-Superfamilie entsprechen den konventionellen Kinesinen. Bei den meisten Kinesinen ist die Motordomäne, wie bei konventionellen Kinesinen, am N-Terminus zu finden (N-Kinesine). Viele tragen ihre Motordomäne im C-terminalen Bereich (C-Kinesine), wieder andere in der Mitte der Polypeptidkette (M-Kinesine). Darüber hinaus lagert sich nur ein Teil zu Kinesin-Dimeren zusammen. So treten auch monomere, trimere und tetramere Formen auf (Abbildung 5b) (Fischer, 2002; Hirokawa & Takemura, 2004; Miki *et al.*, 2005). Kinesine können darüber hinaus entsprechend ihrem Bewegungsverhalten auf den Mikrotubuli unterschieden werden. Für jedes Kinesin charakteristisch sind seine Geschwindigkeit, seine Direktionalität und seine Prozessivität (Endow & Barker, 2003; Hirokawa & Takemura, 2004).

Die Prozessivität gibt Auskunft darüber, wie lange sich ein Kinesin auf einem Mikrotubulus kontinuierlich fortbewegt ohne davon abzufallen. Entsprechend dem favorisierten *Hand-über-Hand*-Modell, bewegen sich konventionelle Kinesine durch alternierende Zyklen von ATP-Hydrolyse und Mikrotubuli-Bindung fort, wobei sie pro 8 nm-Schritt ein ATP hydrolysieren (Howard *et al.*, 1989; Howard, 1996; Schnitzer & Block, 1997; Endow & Barker, 2003) (Abbildung 6a). Prozessive Kinesine legen entsprechend diesem Modell mehrere Mikrometer zurück, bevor sie von ihrer „Straße“ abfallen (Howard *et al.*, 1989; Schnitzer & Block, 1997). Nicht prozessive Motorproteine, wie DmNcd (*Drosophila melanogaster non-claret disjunctional*), binden dagegen einen Mikrotubulus und lösen sich sogleich wieder (Pechatnikova & Taylor, 1999; Endow & Barker, 2003). Eine hohe Prozessivität wird insbesondere bei konventionellen Kinesin-Dimeren beobachtet (Svoboda & Block, 1994; Hancock & Howard, 1998). Aber auch KIF1A, das als Monomer auftritt, zeigt eine hohe Prozessivität. *In-vitro* Untersuchungen demonstrieren wie das Kinesin sehr lang an einem Mikrotubulus haften bleibt, darauf diffus hin und her oszilliert und sich in der Summe zum *plus*-Ende bewegt. Diese Bewegung wird wahrscheinlich über eine lysinreiche K-Schleife innerhalb des Motors vermittelt, mit der KIF1A eine eher schwache Bindung mit

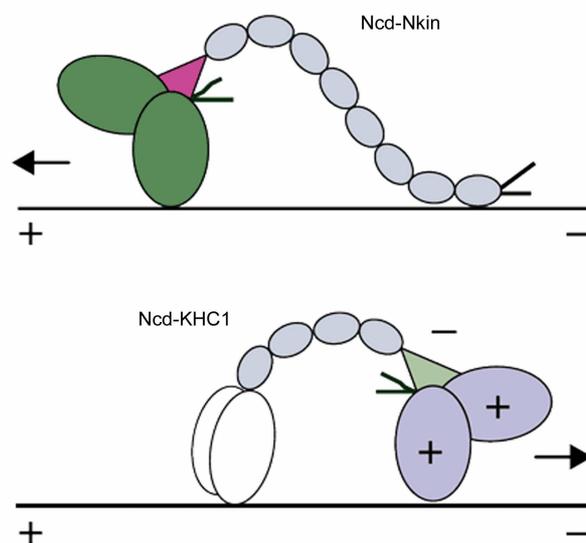
dem negativ geladenen C-Terminus von  $\alpha$ -Tubulin eingeht und somit das Fehlen des zweiten Motorkopfes kompensiert (Abbildung 6b) (Okada & Hirokawa, 2000).

Ein weiteres charakteristisches Merkmal von Kinesinen ist ihre Direktionalität. Diese gibt an, zu welchem der beiden Enden des Mikrotubulus ihre Bewegung gerichtet ist. Die meisten Kinesine laufen wie die konventionellen Kinesine zum dynamischen *plus*-Ende. Jedoch gibt es auch zahlreiche Kinesine, darunter hauptsächlich pflanzliche Vertreter, deren Bewegung zum entgegengesetzten *minus*-Ende orientiert ist (Endow & Barker, 2003; Miki *et al.*, 2005). Eine *minus*-End-Direktionalität wurde experimentell für viele der C-Kinesine nachgewiesen (Walker *et al.*, 1990; Endow *et al.*, 1994; Song *et al.*, 1997; u.a.). Zwar besteht bisher eine absolute Korrelation zwischen der Lage der Motordomäne und der Direktionalität eines Kinesins, jedoch wird die Laufrichtung weder durch die Domänen-Anordnung, noch durch Determinanten innerhalb des Motors festgelegt (Endow, 1999a). Anhand chimärer Proteinkonstrukte, bei denen die Halsregion oder die Motordomäne des *minus*-End-gerichteten DmNcd und des konventionellen, zum *plus*-Ende gerichteten KHC1 jeweils gegenseitig ausgetauscht wurden, konnte gezeigt werden, dass die Halsregion essenziell für die Laufrichtung eines Kinesins ist (Abbildung 7) (Case *et al.*, 1997; Henningsen & Schliwa, 1997; Endow & Waligora, 1998). Bei den zum *plus*-Ende gerichteten Kinesinen liegt die Halsregion C-terminal der konservierten Motordomäne und gliedert sich in eine Halsverbindungsregion aus zwei  $\beta$ -Strängen und dem proximalen Teil des *Coiled-Coil*-Stabs (Endow & Barker, 2003).



**Abbildung 6: Modelle zur ATP-abhängigen, prozessiven Bewegung von Kinesinen.** (a) Entsprechend dem *Hand-über-Hand*-Modell lagern sich konventionelle Kinesine zu Dimeren zusammen und bewegen sich durch alternierende Zyklen der ATP-Hydrolyse und der Mikrotubuli-Bindung fort. Der hintere der beiden Kinesin-Köpfe (weiss) hat dabei ADP gebunden und ist schwach an den Mikrotubulus gebunden. Durch Aufnahme von ATP des vorderen Kopfs (grau) wird dieser fest an der nächsten Tubulin-Einheit verankert, der hintere Kopf dagegen gelöst und um  $180^\circ$  am vorderen Kopf vorbei geschoben. Der nun vorne liegende Kopf tauscht sein ADP gegen ATP und geht folglich selber eine feste Bindung mit der nächsten Mikrotubuli-Einheit ein (grau mit Karos), während der dahinter liegende sein ATP zu  $ATP+P_i$  hydrolysiert, wodurch die Bindung zum Mikrotubulus wieder gelockert wird (grau mit Streifen). (b) Diffuse Fortbewegung von KIF1A. Das monomere Kinesin ist über eine lysinreiche K-Schleife an den Mikrotubulus gebunden. (Abbildung aus Endow & Barker, 2003)

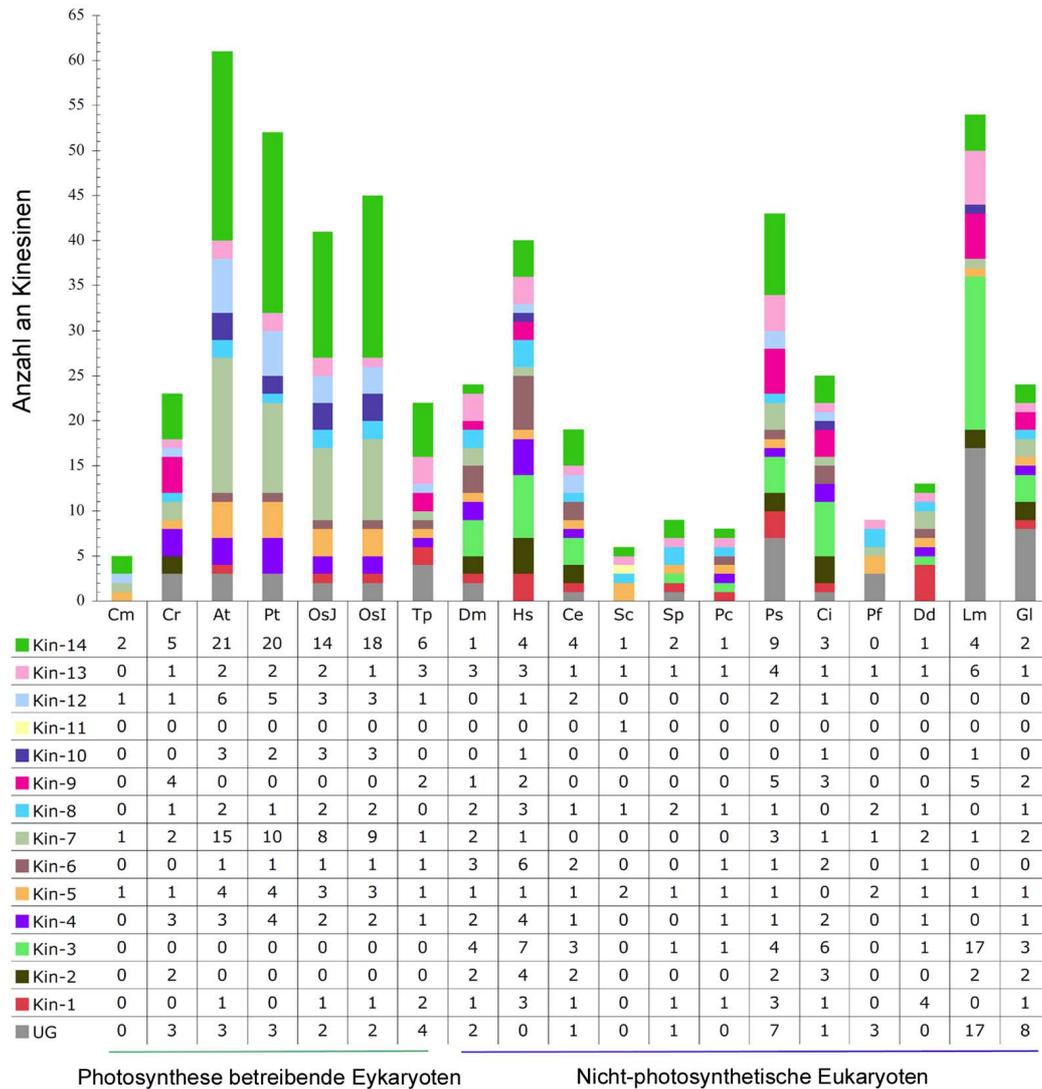
Der Hals *minus*-End-gerichteter Kinesine befindet sich dagegen typischerweise N-terminal vor dem Kinesin-Motor und bildet einen kontinuierlichen *Coiled-Coil* mit der Stabregion in dem das Halsverbindungsstück fehlt (Endow, 1999b). Durch Punktmutationen konnten bestimmt werden, dass die direkt an die Motordomäne angrenzenden Aminosäuren innerhalb des Halses für die Umkehrung der Laufrichtung bei *minus*-End-gerichteten Kinesinen verantwortlich sind (Endow & Waligora, 1998; Endow, 1999b). Entsprechende Determinanten konnte bei konventionellen Kinesinen nicht gefunden werden, sodass davon ausgegangen wird, dass alle Kinesine von Grund auf eine *plus*-End-Direktionalität besitzen, welche bei *minus*-End-gerichteten Kinesinen durch die spezifische Halsregion umgekehrt wird. Die Halsregion der zum *plus*-Ende orientierten Kinesine dient wahrscheinlich der Steigerung der Motor-Prozessivität (Endow, 1999a).



**Abbildung 7: Die Direktionalität eines Kinesins wird durch die Halsregion festgelegt.** Ncd-NKin, ein chimäres Kinesin aus der Motordomäne des *minus*-End-orientierten DmNcd (dunkelgrün) und der Halsregion des konventionellen KHC1 (lila) läuft zum *plus*-Ende des Mikrotubulus. Das komplementäre Konstrukt Ncd-KHC1, das sich aus der KHC1-Motordomäne (hellblau) und der Halsregion von DmNcd zusammensetzt, zeigt dagegen eine *minus*-End-Direktionalität. (Abbildung aus Endow, 1999b)

### 3.2. Phylogenetische Klassifizierung pflanzlicher Kinesine

Die Superfamilie der Kinesine lässt sich aufgrund von Sequenzunterschieden innerhalb der konservierten Motordomäne in 14 Familien untergliedern. Diese werden entsprechend der nach Lawrence standardisierten Nomenklatur als Kinesin-1 bis Kinesin-14 Familie bezeichnet. Zahlreiche Kinesine können jedoch bisher keiner dieser Familien zugeordnet werden und werden dementsprechend als *Orphans* (Waisen) bezeichnet (Lawrence *et al.*, 2004; Richardson *et al.*, 2006). Unter allen bisher vollständig sequenzierten Organismen besitzen höhere Pflanzen mit Abstand die meisten Kinesine.



**Abbildung 8: Anzahl und Verteilung der Kinesine in Photosynthese betreibenden und nicht-photosynthetischen Eukaryoten.** Im Diagramm repräsentiert die y-Achse die Anzahl der Kinesine, die innerhalb der unterschiedlichen, auf der x-Achse aufgetragenen Spezies gefunden wurden. Die verschiedenen Farben heben jeweils die Zugehörigkeit zu einer der 14 Kinesin-Familien hervor. In der dunkelgrau markierten Gruppe (UG: *ungrouped*) sind jeweils Kinesine zusammengefasst, die sich keiner der 14 Familien zuordnen lassen. In der darunter angeordneten Tabelle ist für jede Art die genaue Anzahl an Kinesinen in der entsprechenden Familie aufgeführt. Abkürzungen: Cm, *Cyanidoschyzon merolae*; Cr, *Chlamydomonas reinhardtii*; At, *Arabidopsis thaliana*; Pt, *Populus trichocarpa*; OsJ, *Oryza sativa ssp. Japonica*; OsI, *Oryza sativa ssp. Indica*; Tp, *Thalassiosira pseudonana*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Hs, *Homo sapiens*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Pc, *Phaenerochaete chrysosporium*; Ps, *Phytophthora sojae*; Ci, *Ciona intestinalis*; Pf, *Plasmodium falciparum*; Dd, *Dictyostelium discoideum*; Lm, *Leishmania major*; Gl, *Giardia lamblia*. (Abbildung aus Richardson *et al.*, 2006)

Unangefochtener Spitzenreiter ist dabei *A. thaliana*, deren Genom für insgesamt 61 Kinesin-Gene kodiert (Reddy & Day, 2001a; Richardson *et al.*, 2006). Ungewöhnlich ist jedoch nicht nur die große Anzahl, sondern auch die Aufteilung pflanzlicher Kinesine (Abbildung 8). Trotz der enormen Vielfalt finden sich bei höheren Pflanzen keine Vertreter der Familien 2, 3, 9 und 11. Zudem ist die Kinesin-1 Familie, welche hauptsächlich konventionelle Kinesine einschließt, bei Pflanzen sehr stark unterrepräsentiert. Dagegen fällt die Verteilung der

Kinesine in Blütenpflanzen hauptsächlich zugunsten zweier Familien aus. Allein 21 der insgesamt 61 Kinesine von *A. thaliana* werden der Kinesin-14 Familie und 15 der Kinesin-7 Familie zugeordnet. Nicht sehr verwunderlich ist der evolutionäre Verlust der Kinesin-2 Familie, deren Vertreter hauptsächlich am Transport von Organellen innerhalb von Geißeln und Cilien verantwortlich sind, da höhere Pflanzen keine begeißelte Zellen aufweisen (Richardson *et al.*, 2006). Vertreter der Kinesin-1 und -3 Familie sind dagegen für den Organell-Transport in tierischen Zellen zuständig, was vermuten lässt, dass der Kinesin-abhängige Transport in Pflanzen eine eher untergeordnete Rolle spielt. Dieser wird wahrscheinlich von den an Aktinfilamenten assoziierten Myosin-Motorproteinen übernommen, die bei Pflanzen zahlreich vorhanden sind (Reddy & Day, 2001b).

Mitglieder der Kinesin-7 Familie sind in Tieren unter anderem für die Bewegung der Chromosomen und die Verlängerung der Kinetochor-Mikrotubuli während der Metaphase verantwortlich. Bisher funktionell charakterisierte pflanzliche Vertreter dieser Familie sind an der Zytokinese beteiligt. Die Funktion der Kinesin-9 Familie ist dagegen noch unbekannt, während die Vertreter der Kinesin-11 Familie wahrscheinlich in der Signaltransduktion fungieren (Miki *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2006). Aufgrund der Besonderheiten der Teilung und des Wachstums verfügen Pflanzellen über spezifische Zellskelettstrukturen, wie dem PPB und dem Phragmoplasten. Zudem bilden sie eine bipolare Teilungsspindel aus, obwohl ihnen die Centrosomen zur zentralen Organisation der Mikrotubuli-Enden an den Polen fehlen. Auch die zum *minus*-Ende laufenden Dyneine sind Blütenpflanzen evolutionär wahrscheinlich gleichzeitig mit dem Verlust des Geißel-Apparates abhandengekommen (Lawrence *et al.*, 2001; Richardson *et al.*, 2006). Folglich besteht bei Pflanzen ein großer Bedarf an alternativen, Mikrotubuli-assoziierten Proteinen, welche diese Verluste kompensieren müssen. Vermutlich haben Genduplikationen und die anschließende funktionelle Aufspaltung zu dieser großen Anzahl an Kinesinen in Pflanzen geführt. Insbesondere durch Einverleibung für Kinesine untypischer Domänen sind diese in der Lage, ein breites Spektrum zusätzlicher pflanzenspezifischer Aufgaben zu bewerkstelligen, wozu vor allem die Kontrolle der dynamischen Organisation des Zellskeletts während dem Wachstum und der Teilung gehört (Sharp *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2006).

### 3.3. Die Kinesin-14 Familie

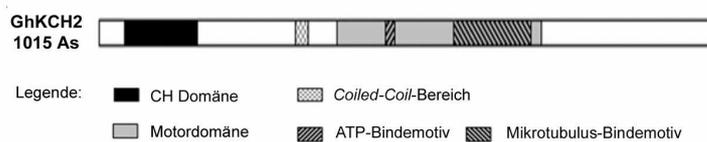
Den „Löwenanteil“ pflanzlicher Kinesine beherbergt die Kinesin-14 Familie. Die sehr heterogene Familie beinhaltet Vertreter aus fast allen eukaryotischen Organismen, welche diverse Funktionen während der Mitose und dem Organelltransport übernehmen (Miki *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2006). Die Kinesin-14 Familie wird auch als „Familie der C-Kinesine“ bezeichnet, da tierische und pilzliche Mitglieder ihre katalytische Domäne durchwegs am C-Terminus tragen und wahrscheinlich alle, obwohl bisher nur für einige

experimentell nachgewiesen, zum *minus*-Ende der Mikrotubuli laufen (Richardson *et al.*, 2006). Für pflanzliche Familie-14 Kinesine ist diese Bezeichnung jedoch nur bedingt zutreffend. Zwar handelt es sich bei einem Großteil um C-Kinesine, jedoch weisen viele auch eine N-terminale, oder eine in der Mitte der Polypeptidkette angeordnete Motordomäne auf. Darüber hinaus sind viele pflanzliche Mitglieder dieser Familie durch zusätzliche, für Kinesine untypische Domänen gekennzeichnet. Allen gemeinsam ist dagegen die N-terminal direkt vor der Motordomäne angeordnete Halsregion (Miki *et al.*, 2005; Richardson *et al.*, 2006). Die Kinesin-14 Familie gliedert sich in zwei Unterfamilien, wobei phylogenetische Untersuchungen eine weitergehende Unterteilung entsprechend der Lage und dem Vorhandensein zusätzlicher Domänen in bis zu acht Gruppen vorschlagen, von denen vermutlich fünf nur pflanzenspezifische Motorproteine beinhalten (Richardson *et al.*, 2006). Alle Kinesine die der Kinesin-14a Unterfamilie untergeordnet werden, tragen ihre Motordomäne am C-Terminus sowie eine davor angeordnete Halsregion mit den Determinanten für eine *minus*-End-Direktionalität (Endow 1999a, b; Miki *et al.*, 2005). Pflanzliche Vertreter wie AtKatA, AtKatB und AtKatC aus *A. thaliana* zeigen sehr enge Verwandtschaft zu ihren Gegenstücken aus Tieren und Pilzen wie dem DmNcd aus *D. melongaster* oder ScKar3 aus *S. cerevisiae*. Sie übernehmen vielfältige Funktionen während der Zellteilung (Mitsui *et al.*, 1993; Richardson *et al.*, 2006; Frey, 2010). Pflanzliche Vertreter der Kinesin-14b Unterfamilie unterscheiden sich dagegen sowohl funktionell als auch strukturell sehr stark von denen aus Tieren und Pilzen, insbesondere durch ihre zusätzlichen Domänen (Richardson *et al.*, 2006). So werden dieser Gruppe die kinesinähnlichen Calmodulin-Bindeproteine, kurz KCBPs, zugeordnet. Sie enthalten neben einer zusätzlichen MyTH4 (*Myosin tail homology 4*) und einer Talin ähnlichen FERM (*Band 4.1, ezrin, radixin, moesin*) Domäne, auch einen 23 Aminosäuren langen Bereich hinter dem C-terminalen Motor, der zur Calmodulin-abhängigen  $Ca^{2+}$ -Bindung genutzt wird (Reddy *et al.*, 1996a, b; Richardson *et al.*, 2006). KCBPs konnten aus unterschiedlichen Pflanzen beschrieben werden, wobei immer nur ein einzelnes Gen gefunden wurde (Reddy *et al.*, 1996a, b; Wang *et al.*, 1996; Bowser & Reddy, 1997). Am besten charakterisiert ist das *minus*-End-gerichtete AtKCBP aus *A. thaliana*. Die Interaktion des Motorproteins mit den Mikrotubuli unterliegt dabei einer Negativregulation durch  $Ca^{2+}$ -Calmodulin (Reddy *et al.*, 1996a; Song *et al.*, 1997; Kao *et al.*, 2000). Nullmutanten von AtKCBP zeigen verkürzte Blatttrichome mit reduzierter Anzahl an Verzweigungen, was auf eine Beteiligung am Zellexpansionswachstum hinweist (Oppenheimer *et al.*, 1997). Zusätzlich deuten Lokalisationsstudien sowie Experimente mit konstitutiv aktiviertem KCBP, auf eine Funktion in der Organisation der Meta- und Anaphasespindel durch Bündelung der Mikrotubuli an den Polen hin (Bowser & Reddy, 1997; Song *et al.*, 1997; Smirnova *et al.*, 1998; Vos *et al.*, 2000).

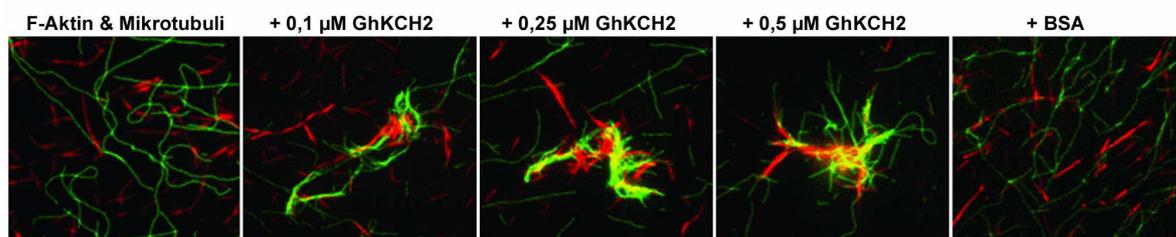
### 3.4. Kinesine mit einer Calponin homologen Domäne (KCHs)

Eine mindestens genauso außergewöhnlich Gruppe wie die KCBPs stellen die Kinesine mit einer Calponin homologen Domäne (KCHs) dar. Sie wurden bisher nur in höheren Pflanzen sowie im Moos *Physcomitrella patens* nachgewiesen (Richardson *et al.*, 2006). AtKatD, der „Urvater“ der KCHs, konnte 1999 aus Blüten von *A. thaliana* isoliert werden und zeigte eine bis dahin vollkommen unbekannte Domänenzusammenstellung (Tamura *et al.*, 1999). Zusätzlich zu einer zentralen Motordomäne und der davor liegender familientypischen Halsregion, besitzen dieser Kinesine eine N-terminale Calponin homologe (CH) Domäne (Abbildung 9a). Das ungefähr 100 Aminosäuren lange Sequenzmotiv wurde erstmals in Calponin entdeckt, einem Aktin-Bindeprotein, das besonders in glatten Muskelzellen von Säugern zu finden ist (Takahashi *et al.*, 1986; North *et al.*, 1994; Gimona *et al.*, 2002). CH Domänen konnten darüber hinaus auch in zahlreichen weiteren Aktin-Binde- und Bündelungsproteinen wie beispielsweise  $\alpha$ -Actinin oder  $\beta$ -Spectrin identifiziert werden. Jedoch bilden in diesen Proteinen zwei hintereinander angeordnete CH Domänen eine Aktin-Bindedomäne (ABD), von denen tierische und pflanzliche Fimbrine sogar zwei mit insgesamt vier CH Motiven aufweisen. Einzelne Domänen sind dagegen charakteristisch für Signalproteine und für eine direkte Bindung der Aktinfilamente wahrscheinlich nicht ausreichend (Gimona *et al.*, 2002; Korenbaum & Rivero, 2002).

(a)



(b)



**Abbildung 9: Schematischer Aufbau GhKCH2 aus *G. hirsutum* und *in-vitro* Quervernetzung von Aktinfilamenten und Mikrotubuli.** (a) Übersicht über die Domänenanordnung von KCHs am Beispiel von GhKCH2. Das 1015 Aminosäuren (As) lange GhKCH2 besitzt eine zentrale Kinesin-Motordomäne mit ATP- und Mikrotubulus-Bindemotiv. Direkt davor liegt eine *Coiled-Coil*-Region. Zusätzlich weisen KCHs eine N-terminale CH Domäne auf, die als potenzielle Aktin-Bindestelle gilt. (b) Gereinigtes rekombinantes GhKCH2 wurde zu einer Mischung aus AlexaFluor@488-Phalloidin gefärbten Aktinfilamenten (in Grün) und Mikrotubuli, die aus Rhodamin konjugiertem Tubulin polymerisiert wurden (rot), gegeben. GhKCH2 bündelt und verbindet konzentrationsabhängig beide Filamentarten miteinander (gelbe Überlagerung der Fluoreszenzsignale). In der Kontrolle mit Rinderalbumin (BSA: *Bovine serum albumin*) konnte keine Quervernetzung beobachtet werden. (Abbildungen aus Xu *et al.*, 2007; 2009)

Aufgrund der fehlenden zweiten CH Domäne wurde die Möglichkeit, dass AtKatD eine direkte Aktin-Bindfähigkeit aufweisen könnte, grundsätzlich ausgeschlossen und experimentell nicht geprüft (Tamura *et al.*, 1999). Ungefähr fünf Jahre danach konnte mit GhKCH1, ein neues Mitglied dieser Kinesin-Gruppe aus *Gossypium hirsutum* isoliert und charakterisiert werden (Preuss *et al.*, 2004). Der ursprünglichen Annahme widersprechend, konnte das Baumwoll-KCH sowohl mit Mikrotubuli als auch Aktinfilamenten *in-vitro* kosedimentiert werden. Da immunfluoreszent gefärbtes GhKCH1 im Kortex von Baumwollfasernzellen mit transvers orientierten Mikrotubuli und mit Aktinfilamenten kolokalisierte, wurde davon ausgegangen, dass es wahrscheinlich Aktinfilamente auch *in-vivo* binden kann und sie mit den Mikrotubuli vernetzt. Zusätzliche Bestätigung lieferten Untersuchungen an GhKCH2, einem weiteren Baumwoll-KCH (Xu *et al.*, 2007). Immunfluoreszenzfärbungen resultierten in dem bereits von GhKCH1 bekannten kortikalen Expressionsmuster. Darüber hinaus konnte das rekombinant gewonnene GhKCH2-Protein Mikrotubuli und Aktinfilamente *in-vitro* nicht nur binden und bündeln, sondern auch miteinander quer vernetzen (Abbildung 9b) (Xu *et al.*, 2009).

### **3.5. Übernehmen KCHs unterschiedliche Funktionen während der Entwicklung von Pflanzenzellen?**

Aufgrund ihrer kortikalen Lokalisation und der entwicklungsabhängigen Transkription wurde für beide Baumwoll-KCHs gleichermaßen eine Funktion in der Organisation des kortikalen Zellskeletts während des Elongationswachstums vorgeschlagen (Preuss *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2009). Jedoch handelt es sich bei Baumwollfasern um einzellige Trichome, deren Entwicklung durch extensives Längenwachstum geprägt ist und die Zellen entsprechend funktionell sehr stark auf die Synthese von Zellulose und der Neubildung der Zellwand spezialisiert sind. Das kortikale Zellskelett erfährt dabei eine drastische Reorganisation, in der die Interaktion zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli wahrscheinlich von besonderer Bedeutung ist (Seagull, 1992; Kim & Triplett, 2001). Es stellte sich demnach die Frage, ob KCHs nur in diesem speziellen Zellsystem als dynamische Verbindungsproteine wirken, oder, ob es sich hierbei um eine generelle Eigenschaft dieser Motorproteine handelt. Hinweise dazu konnte unsere Arbeitsgruppe anhand von Studien zu OsKCH1, einem homologen KCH aus *Oryza sativa* liefern (Frey *et al.*, 2009). Verschiedene Fluoreszenzfusionen von OsKCH1 lokalisieren in Koleoptilenzellen domänenabhängig an transvers-kortikale Mikrotubuli, teilweise jedoch auch an F-Aktin. Die Kolokalisation mit den Aktinfilamenten trat besonders häufig an Stellen auf, an denen sich axiale Aktinfilament-Bündel mit den senkrecht dazu verlaufenden Mikrotubuli überkreuzten. Die Kolokalisation mit F-Aktin konnte zudem auch in zyklischen BY-2 Suspensionszellen durch transiente und stabile Expression fluoreszenter OsKCH1-Fusionen demonstriert werden. Darüber hinaus kosedimentierte das Kinesin

*in-vitro* mit gereinigten Aktinfilamenten und Mikrotubuli. Die dynamische Verbindung zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli scheint demnach nicht nur auf spezialisierte Baumwollzellen begrenzt und könnte allen KCHs gemein sein (Frey *et al.*, 2009). Genauso wie die Baumwoll-KCHs könnte OsKCH1 eine Funktion während des Zelllängenwachstums übernehmen. So zeigten OsKCH1-defiziente *Tos-17*-Mutanten signifikant verkürzte Koleoptilenzellen. Zudem wurde in Wildtyp-Koleoptilen eine nicht unerhebliche Menge an OsKCH1-Transkripten gemessen. Da Koleoptilenzellen nach der Embryogenese ausschließlich Längenwachstum betreiben, könnte OsKCH1 folglich an diesem zellskelettabhängigen Prozess beteiligt sein (Frey *et al.*, 2010). Die stabile Überexpression von GFP-OsKCH1 in BY-2 Suspensionszellen legt jedoch eine zusätzliche Funktion nahe. Die Zellen waren signifikant länger und verhielten sich also genau umgekehrt wie die Koleoptilenzellen der Reis-Nullmutante. Die Überexpressionszellen traten auch verspätet in die Mitose ein, was mit einer zeitlich verzögerten prämitotischen Kernmigration zusammenhing. Es wurde vorgeschlagen, dass der beobachtete Längenzuwachs der BY-2 Überexpressionszellen auf einer verlängerten Expansionsphase gründet und somit ein indirektes Resultat der verzögerten Zellteilung darstellt. Unterstützt wurde diese Hypothese durch die Bestimmung der gewebespezifischen Transkription von OsKCH1 an Wildtyp-Reispflanzen. Die gemessenen mRNA-Mengen waren in teilungsaktiven, meristematischen Geweben um ein Vielfaches höher als in den übrigen Pflanzenorganen. Demnach könnte der primäre Angriffspunkt des Reis-KCHs in der prämitotischen Kernmigration liegen. Eine zusätzliche Funktion während des Wachstums kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Frey *et al.*, 2010). Auch in Hinblick auf GhKCH2 aus Baumwolle wurde über eine zusätzliche Funktion während der Zellteilung spekuliert. Da es durch Immunofluoreszenzfärbungen innerhalb des Phragmoplasten von Wurzelspitzenzellen nachgewiesen werden konnte, wurde eine Beteiligung an der Bildung und Entwicklung dieser mitotischen Zellskelettstruktur angenommen (Xu *et al.*, 2009).

#### 4. Zielsetzung

Kinesine mit einer Calponin homologen Domäne binden *in-vitro* sowohl Mikrotubuli als auch Aktinfilamente und koloalisieren in unterschiedlichen Pflanzenzellen mit beiden Komponenten des Zellskeletts. Als bifunktionale Querverbindungsproteine könnten sie demnach entscheidend zur räumlichen und zeitlichen Koordination des pflanzlichen Zellskeletts beitragen. Bisher ist unklar, zu welchem Zeitpunkt während des Zellzyklus diese Motorproteine gebraucht werden und in welchen zellskelettabhängigen Prozessen ihre Brückenfunktion eine Rolle spielt. Darüber hinaus gibt es bis dato weder Informationen über die Funktionsweise dieser Kinesine noch darüber, wie ihre Wechselwirkung mit den unterschiedlichen Filamenttypen reguliert wird.

Um mögliche Antworten auf diese noch offenen Fragen liefern zu können, soll im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal ein homologes KCH in zyklischen Zellen untersucht und zellbiologisch charakterisiert werden. Als ideales Modellsystem eignen sich hierzu *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2) Suspensionszellen.

Das erste Ziel dieser Arbeit besteht darin, ein homologes KCH in Tabak zu identifizieren und vollständig zu isolieren. Im Anschluss daran sollen mithilfe computergestützter Analysen Informationen über den molekularen Aufbau des neuen Kinesins und über seine phylogenetische Verwandtschaft mit anderen Mitgliedern der Kinesin-Superfamilie gesammelt werden. In einem nächsten Schritt soll der Frage nachgegangen werden, ob das Tabak-KCH genauso wie seine nächsten Verwandten aus anderen Pflanzenarten, sowohl mit Mikrotubuli als auch mit Aktinfilamenten in Wechselwirkung steht. Anhand von *in-vivo* Kollokalisationsstudien mit Fluoreszenzprotein-Fusionen und Immunlokalisationsversuchen soll die intrazelluläre Verteilung des Tabak-KCHs und seine mögliche Assoziation mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli untersucht werden. Zusätzlich soll durch Zellskelett-Inhibitor-Experimente geprüft werden, ob die Wechselwirkung des KCHs mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli in direkter Abhängigkeit von der Integrität der jeweiligen Filamentsysteme steht. Bisher unklar ist zudem, welche Domänen KCHs für die Interaktion mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli nutzen, was durch transiente Transformationen von Fluoreszenzfusionen an verschiedene KCH-Fragmente untersucht werden soll.

Einen detaillierten Einblick in die Funktionsweise des Tabak-KCHs versprechen drei experimentell verschiedene Versuchsansätze:

In den ersten beiden Versuchsansätzen soll bestimmt werden, zu welcher Zellzyklusphase KCHs benötigt werden. Hierzu sollen zunächst anhand von Transkriptionsanalysen an synchronisierten BY-2 Zellkulturen die natürliche Expression des KCHs untersucht werden. Wird die mRNA-Transkription während der Interphase oder der Mitose hochreguliert, so würde dies für eine spezifische Funktion des Proteins während der Zellteilungs- bzw. Wachstumsphase sprechen.

In einem weiteren, dieser Fragestellung dienlichen Ansatz, soll eine KCH-Überexpressionslinie auf mögliche Veränderungen der Teilungsaktivität und des Zellwachstums untersucht werden.

Ein dritter Versuchsansatz soll einen detaillierten Einblick in die Funktionsweise von KCHs auf zellulärer Ebene liefern. Hierzu sollen intensive fluoreszenzmikroskopische Studien durchgeführt werden, um die intrazelluläre Lokalisation des Tabak-KCHs im Verlauf des gesamten Zellzyklus zu dokumentieren. Von besonderem Interesse dabei ist die Frage, ob das Kinesin auf Zellskelettstrukturen zu finden ist, die direkt in der Regulation des Elongationswachstums oder der Kern- und Zellteilung beteiligt sind. Zu diesem Zweck sollen BY-2 Zelllinien erstellt werden, die sowohl Fluoreszenzprotein-Fusionen des Tabak-KCHs als

auch ein fluoreszentes Markerprotein für Aktinfilamente oder Mikrotubuli konstitutiv koexprimieren. Zeitreihen-Untersuchungen dieser transgenen Zelllinien sollen Daten zur zellzyklusabhängigen Neuverteilung sowie über das dynamische Verhalten des Kinesins auf unterschiedlichen Zellskelettstrukturen liefern. Dadurch soll insbesondere der Frage nachgegangen werden, ob KCHs als statische oder dynamische Querverbinder wirken. Besteht die Aufgabe dieser Kinesine darin Aktinfilamente an Mikrotubuli fest zu koppeln, um dadurch die Organisation bestimmter Zellskelettstrukturen aufrechtzuerhalten, oder besitzen KCHs eine Mikrotubuli-abhängige Motoraktivität, wodurch sie in der Lage wären, als eine Art dynamische Brücke aktiv in die Reorganisation des Zellskeletts einzugreifen?

# Material und Methoden

## 1. Material

### 1.1. Standardmedien

Alle verwendeten Medien und Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Medien und Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt (ddH<sub>2</sub>O) und für 15 min bei 1 bar Druck und 121 °C autoklaviert (Autoklav Typ HA300 MIIC, Wolf Laboratories, York, UK). Hitzeempfindliche Lösungen wie Antibiotika wurden steril filtriert (PVDF-Filter mit 0.22 µm Porengröße). Zusätzlich verwendete Lösungen und Substanzen sind in den Kapiteln zu den einzelnen Experimenten getrennt aufgeführt.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Standardmedien und Lösungen**

Medium	Zusammensetzung	
LB Medium (Lennox) pH-Wert 7,0	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	Natriumchlorid (NaCl)	5 g/l
	<sup>1)</sup> Agar-Agar, Kobe I	1,5 % [w/v]
	<sup>2)</sup> Antibiotikum	
Murashige und Skoog (MS) Medium pH-Wert 5,8	Murashige und Skoog Salze (Duchefa, Haarlem, Niederlande)	4,3 g/l
	Saccharose	30 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg/l
	( <i>myo</i> )-Inositol	100 mg/l
	Thiamin	1 mg/l
	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	0,2 mg/l
	<sup>3)</sup> Agar-Agar, dänisch	0,8 % [w/v]
<sup>2)</sup> Antibiotikum		
Paul's Medium pH-Wert 5,8	Murashige und Skoog Salze (Duchefa)	4,3 g/l
	Saccharose	10 g/l
	<sup>4)</sup> Phytigel™ (Sigma-Aldrich)	0,5 % [w/v]
Tris-EDTA (TE)-Puffer pH-Wert 8,0	Tris-HCl	10 mM
	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	1 mM
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH-Wert 7,2	NaCl	1,5 mM
	KCl	2,7 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,5 mM

<sup>1)</sup> für LB Agar; <sup>2)</sup> zur Selektion (siehe Tabelle 6); <sup>3)</sup> für MS Agar; <sup>4)</sup> für Paul's Agar

## 1.2. Verwendete Organismen

### 1.2.1. Bakterienstämme

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>Escherichia (E.) coli</i> One-Shot® TOP-10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK</i> <i>rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>E. coli</i> DH5-α™	F <sup>-</sup> φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1</i> <i>endA1 hsdR17 (rK<sup>-</sup>, mK<sup>+</sup>) phoA supE44 λ thi<sup>-1</sup></i> <i>gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
<i>Agrobacterium (A.)</i> <i>tumefaciens</i> LBA4404	pAL4404, pIG121	Invitrogen; Hoekema <i>et al.</i> , 1983

### 1.2.2. Tabakzellkulturen

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Tabakzellkulturen

Stamm/Name	Genotyp*	Quelle
BY-2 Wt	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bright Yellow 2, Wildtyp	Nagata <i>et al.</i> , 1992
BY-2 free-GFP	<i>N. tabacum</i> L. cv. Bright Yellow 2, P35S, EGFP, Kan <sup>R</sup>	Dr. K. Schwarzerová (Karls-Universität, Prag, Tschechische Republik)
BY-2 GFP-NtKCH	<i>N. tabacum</i> L. cv. Bright Yellow 2, P35S, EGFP, NtKCH, Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
BY-2 GFP- NtKCH/RFP-FABD2	<i>N. tabacum</i> L. cv. Bright Yellow 2, P35S, EGFP, NtKCH, P35S, RFP, FABD2, Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Diese Arbeit

\* Für Beschreibung der Abkürzungen siehe Kapitel 3, Anhang

## 1.3. Verwendete Oligonukleotid-Primer

Alle verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Die Berechnung der optimalen Anlagerungstemperatur ( $T_A$ ) wurde mit der *DNA Calculator*-Software (<http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp>; Stand 2011; Sigma-Aldrich) durchgeführt. Alle Primer sind in den Tabellen 13-16 im Anhang aufgelistet.

## 1.4. Verwendete Plasmide

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Plasmide und Konstrukte

Name	Eigenschaften/ Annotation*	Verwendung	Herkunft
GFP-NtKCH	NtKCH-CDS (bp 1-3003) in pK7WGF2.0	N-terminale Fusion von GFP an NtKCH für stabile Transformation	Diese Arbeit
GFP-NtKCH-tr	NtKCH-CDS (bp 1-3003) in p2FGW7	N-terminale Fusion von GFP an NtKCH für transiente Transformation	Diese Arbeit
MBD-MAP4-DsRed	Mikrotubuli-Bindedomäne von MAP4 in P35S-DsRed2-C1	C-terminale Fusion von DsRed an MBD-MAP4 für transiente Transformation	Marc <i>et al.</i> , 1998
MBD-MAP4-GFP	Mikrotubuli-Bindedomäne von MAP4 in P35S-GFP-C1	C-terminale Fusion von GFP an MBD-MAP4 für transiente Transformation	Marc <i>et al.</i> , 1998
NtKCH-RFP-tr	NtKCH-CDS (bp 1-3003) in p2GWR7	C-terminale Fusion von RFP an NtKCH für transiente Transformation	Diese Arbeit
p2FGW7	f1 <i>ori</i> , P35S, GFP, att1_ccdB_att2, T35S, Amp <sup>R</sup>	<i>Gateway</i> <sup>®</sup> -Zielvektor für transiente Expression; N-terminale Fusion von GFP ans Zielprotein	Karimi <i>et al.</i> , 2002
p2GWR7	f1 <i>ori</i> , P35S, att1_ccdB_att2, RFP, T35S, Amp <sup>R</sup>	<i>Gateway</i> <sup>®</sup> -Zielvektor für transiente Expression; C-terminale Fusion von RFP ans Zielprotein	Dr. R.Y. Tsien; University of California, San Diego, USA; Campbell <i>et al.</i> , 2002
p2RGW7	f1 <i>ori</i> ; P35S, RFP, att1_ccdB_att2, T35S, Amp <sup>R</sup>	<i>Gateway</i> <sup>®</sup> -Zielvektor für transiente Expression; N-terminale Fusion von RFP ans Zielprotein	Dr. R.Y. Tsien; Campbell <i>et al.</i> , 2002
pCR <sup>®</sup> -TOPO <sup>®</sup> (linearisiert)	pUC <i>ori</i> , P <sub>lac</sub> , LacZα_TOPO <sup>®</sup> _LacZα-ccdB, Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	TOPO <sup>®</sup> -TA Klonierung	Invitrogen
pDONR <sup>™</sup> /Zeo	pUC <i>ori</i> , Zeo <sup>R</sup> , P <sub>EM7</sub> , attP1_Cm <sup>R</sup> _ccdB_attP2; <i>rrnB</i> T1/T2	<i>Gateway</i> <sup>®</sup> -Donor Vektor zur Erstellung von <i>Entry</i> -Vektoren	Invitrogen
pENTR_FABD2	As 325-687 der Aktin-Bindedomäne 2 von Fimbrin (FABD2) in pDONR <sup>™</sup> /Zeo	<i>Entry</i> -Klon für Klonierungen in <i>Gateway</i> <sup>®</sup> -Zielvektoren	Maisch <i>et al.</i> , 2009
pH7WGR2.0	RB, P35S, RFP, att1_ccdB_att2, T35S, Hyg <sup>R</sup> , LB, Sm/Sp <sup>R</sup>	<i>Gateway</i> <sup>®</sup> -Zielvektor für stabile Expression; N-terminale Fusion von RFP ans Zielprotein	Dr. R.Y. Tsien; Campbell <i>et al.</i> , 2002

**Verwendete Plasmide -Fortsetzung-**

Name	Eigenschaften/ Annotation*	Verwendung	Herkunft
pK7WGF2.0	RB, P35S, EGFP, att1_ccdB_att2, T35S, Kan <sup>R</sup> , LB, Sm/Sp <sup>R</sup>	Gateway <sup>®</sup> -Zielvektor für stabile Expression; N-terminale Fusion von GFP ans Zielprotein	Karimi <i>et al.</i> , 2005
RFP-FABD2	As 325-687 der Aktin-Bindedomäne 2 von Fimbrin (FABD2) in pH7HGR2	Fusionskonstrukt für stabile Transformation	Diese Arbeit
RFP-NtKCH-fl	NtKCH-CDS (bp 1-3003) in p2RGW7	N-terminale Fusion von RFP an NtKCH für transiente Transformation	Diese Arbeit
RFP-NtKCHΔ1-300	NtKCH bp 301-1001 in p2RGW7	N-terminale Fusion von RFP an NtKCH bp 301-1001 für transiente Transformation	Diese Arbeit
RFP-NtKCHΔ251-1001	NtKCH bp 1-250 in p2RGW7	N-terminale Fusion von RFP an NtKCH bp 1-250 für transiente Transformation	Diese Arbeit
RFP-NtKCHΔ409-1001	NtKCH bp 1-408 in p2RGW7	N-terminale Fusion von RFP an NtKCH bp 1-408 für transiente Transformation	Diese Arbeit
RFP-Tubulin-α3	Tubulin-α3 aus <i>N. tabacum</i> in pB7WGR2	N-terminale Fusion von RFP an Tubulin-α3 für stabile Transformation	Kumagai <i>et al.</i> , 2001

\* Für Beschreibung der Abkürzungen siehe Kapitel 3, Anhang

**1.5. Antikörper****Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Antikörper für die Mikrotubuli-Färbungen**

Bezeichnung	Eigenschaften	Verwendung/ Verdünnung	Herkunft
ATT	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen tyrosiniertes α-Tubulin	Primärer Antikörper für Immunofluoreszenzfärbungen (1:1000 in PBS)	Sigma-Aldrich; Kreis, 1987
DM1A	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen detyrosiniertes α-Tubulin	Primärer Antikörper für Immunofluoreszenzfärbungen (1:1000 in PBS)	Sigma-Aldrich; Breitling & Little, 1986
TRITC-Anti-Maus	Polyklonaler, Tetramethylrhodamin Isothiocyanat (TRITC)-gekoppelter Antikörper aus der Ziege gegen Maus-IgG	Sekundärer Antikörper für Immunofluoreszenzfärbungen (1:200 in PBS)	Sigma-Aldrich

## 1.6. Verwendete Antibiotika

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Abkürzung	Selektionsorganismus	Arbeitskonzentration
Ampicillin	Amp	<i>E. coli</i>	100 mg/l
Cefotaxim (Duchefa)	Cefo	<i>A. tumefaciens</i>	100 mg/l
Hygromycin (Merck, Darmstadt, Deutschland)	Hyg	BY-2 Tabak- Suspensionszellen	30 mg/l
Kanamycin	Kan	<i>E. coli</i> /BY-2 Tabak- Suspensionszellen	50 mg/l
Rifampicin	Rif	<i>A. tumefaciens</i>	50 mg/l
Spectinomycin	Sm/Sp	<i>E. coli</i> / <i>A. tumefaciens</i>	50 mg/l
Streptomycin	Strep	<i>A. tumefaciens</i>	300 mg/l
Zeocin (Invitrogen)	Zeo	<i>E. coli</i>	50 mg/l

## 2. Methoden

### 2.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1. Standard Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde als molekularbiologische Standardmethode sehr häufig angewendet. Die Wahl der Reaktionsansätze und der PCR-Bedingungen variierte entsprechend der jeweiligen Zielsetzung. Für analytische Zwecke wurden PCRs mit Taq DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt, Deutschland) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. In Tabelle 7 ist ein exemplarischer Reaktionsansatz dargestellt. Wurde das Amplifikat im Anschluss an die PCR aufgereinigt und für Klonierungen verwendet oder Sequenzierungen weiter genutzt, kam die *Phusion*<sup>®</sup> DNA-Polymerase (NEB) zum Einsatz. Aufgrund ihrer Korrekturlese- und 3'→5'-Exonuklease-Funktion ist die *Phusion*<sup>®</sup> DNA-Polymerase in der Lage, falsch eingebaute Nukleotide zu erkennen und auszutauschen (*Proofreading*-Funktion), wodurch eine sehr geringe Fehlerrate von  $4,4 \times 10^{-7}$  erzielt wird. Die Zusammensetzung eines entsprechenden Reaktionsansatzes ist in Tabelle 8 aufgelistet. Die vom Hersteller empfohlenen Standard PCR-Bedingungen für Reaktionen mit Taq bzw. *Phusion*<sup>®</sup> DNA-Polymerase sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Sie wurden für jede Reaktion in Abhängigkeit der jeweils eingesetzten DNA-Matrize und Primerpaares angepasst. Die optimale Anlagerungstemperatur ( $T_A$ ) kann den Primertabellen 13-16 im Anhang entnommen werden. Alle PCRs wurden in einem *Cyclone 25*- oder in einem *Primus 96 Advanced*-Thermocycler (beide von Peqlab, Erlangen, Deutschland) durchgeführt.

**Tabelle 7: Reaktionsansatz für analytische PCRs mit Standard Taq-Polymerase (25 µl)**

Bestandteil	Menge
Matrize	x µl
10 x <i>ThermoPol</i> -Puffer (NEB)	2,5 µl
10 mM dNTP-Mix (NEB)	0,5 µl
20 µM Vorwärtsprimer	0,5 µl
20 µM Rückwärtsprimer	0,5 µl
5 U/µl Taq DNA-Polymerase (NEB)	0,2 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 25 µl

**Tabelle 8: PCR-Ansatz mit *Phusion*<sup>®</sup> DNA-Polymerase (50 µl)**

Bestandteil	Menge
Matrize	x µl
5x <i>Phusion</i> <sup>®</sup> HF- oder GC-Puffer* (NEB)	10 µl
10 mM dNTP-Mix (NEB)	1 µl
20 µM Vorwärtsprimer	1 µl
20 µM Rückwärtsprimer	1 µl
2 U/µl <i>Phusion</i> <sup>®</sup> Polymerase (NEB)	0,25 µl
100 % Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 µl
5 M Betain	5 µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 µl

\* GC-Puffer wurde nur bei GC-reichen, schwer amplifizierbaren Matrizen eingesetzt

**Tabelle 9: Standard PCR-Bedingungen für Reaktionen mit Taq und *Phusion*<sup>®</sup> DNA-Polymerase**

DNA-Polymerase	Initial-Denaturierung	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation	Terminations-Elongation
Taq DNA-Polymerase	94 °C 5 min	94 °C 1 min	T <sub>A</sub> 30 s	72 °C 1 min/ kb	72 °C 5 min
<i>Phusion</i> <sup>®</sup> DNA-Polymerase	98 °C 30 s	98 °C 10 s	T <sub>A</sub> 20 s	72 °C 15-30 s/ kb	72 °C 10 min
Zyklenzahl	1		25-30		1

### 2.1.2. Kolonie-PCR

Das Verfahren der Kolonie-PCR wurde eingesetzt, um im Anschluss an BP- und LR-Reaktionen (siehe Kapitel 2.4) positiv rekombinante Bakterienklone zu identifizieren. Durch spezifische Primerpaare, von denen ein Primer im Vektor, der andere im *Insert* bindet, konnten sowohl das Vorhandensein als auch die Orientierung des *Inserts* geprüft werden. Zur Durchführung wurden auf Selektionsplatten gewachsene Bakterienkolonien mit einer sterilen Impföse gepickt und direkt als Matrize in einem PCR-Reaktionsansatz mit Taq DNA-Polymerase (siehe Tabelle 7) verwendet.

**Tabelle 10: PCR-Bedingungen für inverse *touchdown* PCRs**

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initial-Denaturierung	98 °C	30 s	1
Denaturierung	98 °C	10 s	
Hybridisierung	$T_{A1}$	20 s	5
Elongation	72 °C	30 s/kb	
Denaturierung	98 °C	10 s	
Hybridisierung	$T_{A2}$	20 s	5
Elongation	72 °C	30 s/kb	
Denaturierung	98 °C	10 s	
(Hybridisierung	$T_{A3}$ falls <72°C	20 s)	20
Elongation	72 °C	30 s/kb	
Terminations-Elongation	72 °C	10 min	1

### 2.1.3. Inverse *touchdown* PCR

Für die *Gateway*<sup>®</sup> BP-Reaktionen mussten DNA-Fragmente mit entsprechenden *attB*-Rekombinationsstellen mittels PCR erzeugt werden. Da sich die dazu verwendeten Primer aufgrund ihrer Länge und der Sequenzüberhänge in einer Standard PCR schlecht an die Matrize anlagern, wurde in diesen Fällen eine inverse *touchdown* PCR durchgeführt. Durch schrittweise Erhöhung der Temperatur wird dabei die Hybridisierung an die DNA-Matrize erleichtert und somit die Ausbeute spezifischer PCR-Produkte optimiert. Die hierfür verwendeten PCR-Bedingungen sind in Tabelle 10 aufgelistet. Die gewählten Temperaturschritte variierten in Abhängigkeit des jeweils eingesetzten Primerpaares und können den Tabellen 13-16 im Anhang entnommen werden. Falls die Annealingtemperatur  $T_{A3}$  über der Elongationstemperatur von 72 °C lag, wurde der Hybridisierungsschritt bei 72

°C durchgeführt. Für inverse *touchdown* PCRs wurde die *Phusion*<sup>®</sup> DNA-Polymerase (siehe Tabelle 8) verwendet.

#### 2.1.4. Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden auf Gelen aus 1-2 % [w/v] Agarose in 0,5 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (50-fache Stammlösung: 2 M Tris-HCl, 0,57 % [v/v] Essigsäure, 50 mM EDTA; pH-Wert 7,5) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Zum Anfärben der Nukleinsäuren wurde *SYBR*<sup>®</sup> *Safe* (Invitrogen) gemäß den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Sowohl die Proben, als auch der DNA-Größenmarker wurden mit Laufpuffer versetzt (5x Stammlösung: 50 % [v/v] Glycerol, 0,05 % [w/v] Bromphenolblau, 0,05 % [w/v] Xylencyanol) und bei 100-135 V aufgetrennt. Die Nukleinsäurebanden wurden mithilfe eines *Safe Imager*<sup>™</sup>-Blaulichttransilluminators (Invitrogen) sichtbar gemacht und mit einem *Rainbow*-Kamerasystem aufgezeichnet (Hama, Monheim, Deutschland).

#### 2.1.5. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Der DNA- bzw. RNA-Gehalt in Lösung wurde mit einem *NanoDrop1000*-Spektralphotometer (Peqlab) durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dabei wurde auch der  $A_{260}/A_{280}$ - sowie der  $A_{260}/A_{230}$ -Quotient photometrisch bestimmt, um auf eventuelle Verunreinigungen durch Proteine und Lösungsmittel rückschließen zu können.

#### 2.1.6. Nukleinsäure-Isolierung aus Agarosegelen

DNA-Fragmente oder PCR-Produkte wurden mit einem sterilen Skalpell aus Agarosegelen unter Blaulicht ausgeschnitten und anschließend mit dem *peqGold*-Gelextraktions-Kit (Peqlab) entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert und gereinigt. Konzentration und Reinheit der DNA wurden photometrisch bestimmt.

#### 2.1.7. Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Transformationskompetente *E. coli* Bakterien (Tabelle 2) wurden nach der Methode von Sambrook & Russell (2001) mit  $\text{CaCl}_2$  hergestellt. Dazu wurde eine frisch gewachsene Bakterienkolonie in 5 ml LB Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die Vorkultur wurde anschließend 1:1000 in 150 ml frischem LB Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von  $\text{OD}_{600} = 0,6$  wachsen gelassen. Danach wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mithilfe einer *Z383K*-Zentrifuge (Hermle, Wehningen, Deutschland) bei 3000 rpm und 4 °C für 10 min geerntet. Der Zellniederschlag wurde in 100 ml  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (50 mM in  $\text{ddH}_2\text{O}$ ) aufgenommen und für 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm und 4 °C für 10 min wurden die Zellen in 5 ml  $\text{CaCl}_2$ -Lösung mit 15 % [v/v] Glycerin gelöst. Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurden in gekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße

aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

Die chemokompetenten *E. coli* Zellen wurden mithilfe des Hitzeschock-Verfahrens transformiert. Hierzu wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut, mit 2-8 µl einer BP- bzw. LR-Reaktion (Kapitel 2.4) oder mit 50 ng gereinigtem Plasmid vermengt und für 30 min auf Eis ruhen gelassen. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad für 45 s bei 42 °C. Nach einer weiteren Ruhephase auf Eis für 2 min wurde 1 ml LB Medium zu den Zellen gegeben, und der Ansatz für 1 h bei 37 °C auf einem *Thermomixer 5436* (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) geschüttelt. Danach wurden die Zellen auf LB Agar mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion positiver Transformanten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

#### **2.1.8. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Plasmid-DNA wurde im kleinen Maßstab aus 3 ml Flüssigkulturen transformierter *E. coli* Bakterienzellen (in LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum) präpariert, die zuvor über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt wurden („Mini-Präparation“). Die Isolierung und Aufreinigung wurde mithilfe des *Roti-Prep® Plasmid Mini-Kit* (Carl Roth) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Größere Mengen Plasmid-DNA von bis zu 5 µg/µl („Midi-Präparationen“) wurden mit dem *NucleoBond® Plasmid Midi-Kit* (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aus 250 ml Zellkulturen isoliert. Hierfür wurde eine über Nacht angewachsene 3 ml Vorkultur 1:1000 in frischem Flüssigmedium verdünnt und eine weitere Nacht bei 37 °C geschüttelt. Reinheit und Konzentrationen der Präparationen wurden photometrisch bestimmt.

#### **2.1.9. Restriktionsverdau von DNA**

Restriktionsendonukleasen wurden zusammen mit den passenden Puffern von NEB bezogen und entsprechend den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt. Für Restriktionsanalysen von Plasmiden wurden in einem 20 µl-Ansatz typischerweise 500 ng Plasmid-DNA mit 5 U Enzym in entsprechendem Puffer für 1 h verdaut. Die Inkubationstemperatur wurde gemäß dem Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms gewählt.

#### **2.1.10. DNA-Sequenzierungen**

Aufgereinigte Plasmide wurden durch die Firma GATC (Konstanz, Deutschland) sequenziert. Die erhaltenen Daten, wurden mit der *AlignX*-Funktion des *VectorNTI*-Softwarepakets (Version 10.3.0; Invitrogen) analysiert.

### 2.1.11. Isolierung der Gesamt-RNA aus BY-2 Zellen

Zur Aufreinigung von Gesamt-RNA aus BY-2 Suspensionszellen wurden die Zellen zunächst mithilfe eines *Nalgene*<sup>®</sup>-Filters (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark) vom MS Medium abgetrennt und je 100 mg Zellmaterial eingewogen. Die Zellen wurden direkt in flüssigem Stickstoff tief gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70 °C gelagert. Die Proben wurden in einem *TissueLyser* (Quiagen, Hilden, Deutschland) zu feinem Pulver zermahlen. Danach erfolgte die Aufreinigung der Gesamt-RNA mithilfe des *innuPrep Plant RNA-Kit* (Analytikjena, Jena, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers. Störende DNA-Verunreinigungen wurden durch einen zusätzlichen DNase I-Verdau (Qiagen, Hilden, Deutschland) bei 37 °C für 30 min auf der Aufreinigungssäule entfernt. Zur Überprüfung der Integrität wurde jeweils 1 µg RNA-Extrakt auf ein 1 % [w/v] Agarosegel geladen und aufgetrennt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

## 2.2. Identifizierung und Isolierung eines KCH-Homologs aus Tabak

### 2.2.1. Herstellung der BY-2 cDNA-Bibliothek

Zur Herstellung der cDNA-Bibliothek von BY-2 Suspensionszellen (*Nicotiana tabacum*, cv. Bright Yellow-2) wurden während des siebentägigen Kultivierungszyklus alle 24 h Zellproben entnommen und aus jeweils 100 mg Zellmaterial die Gesamt-RNA isoliert. Je Probe wurde 1 µg RNA in einer Reversen Transkription mit M-MuLV Reversen Transkriptase (NEB) und Oligo dT-Primern (Sigma-Aldrich) entsprechend den Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. In Kontrollansätzen wurde die Reverse Transkriptase durch die entsprechende Menge ddH<sub>2</sub>O ersetzt, um auf Verunreinigungen durch genomische DNA rückschließen zu können. Die gewonnene cDNA aller Proben wurde zu gleichen Anteilen zu einer BY-2 cDNA-Bibliothek vereint.

### 2.2.2. Amplifikation einer partiellen KCH-Sequenz durch PCR mit degenerierten

#### Primern

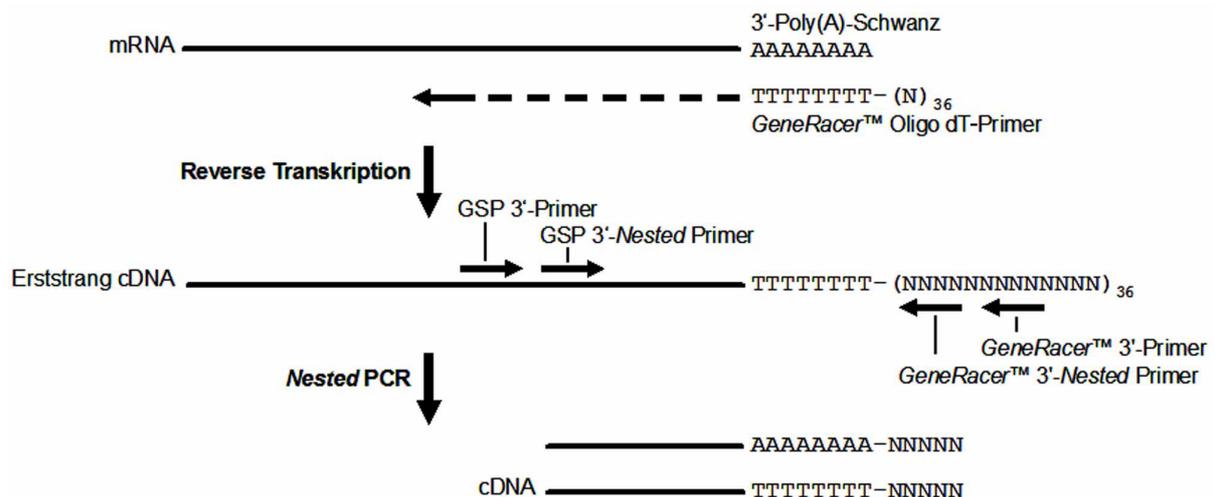
Zur Isolierung des homologen KCH aus Tabak wurden zunächst zahlreiche degenerierte Primer erstellt, indem die Nukleotidsequenzen bekannter KCHs aus *Oryza*, *Arabidopsis*, *Gossypium*, *Vitis* und *Populus* miteinander verglichen und besonders konservierte Bereiche bestimmt wurden. Für die degenerierten Vorwärtsprimer wurden Bindestellen im Sequenzbereich der CH Domäne ausgewählt; für die Rückwärtsprimer dagegen die C-terminale Region hinter der konservierten Kinesin-Motordomäne (für den Aufbau von KCHs siehe Abbildung 9a, Einleitung). In zahlreichen PCR-Ansätzen mit Taq DNA-Polymerase (NEB) wurde versucht, anhand unterschiedlicher Primerkombinationen und durch Optimierung der PCR-Bedingungen, ein spezifisches Amplifikat zu erhalten.

Unter Verwendung der Primer NtKCH\_deg1-fw und NtKCH\_deg1-rv (Tabelle 13, Anhang) gelang es schließlich ein spezifisches, 2078 bp langes Fragment zu amplifizieren.

### 2.2.3. Bestimmung unbekannter cDNA-Enden mithilfe der *RACE*

Die *Rapid amplification of cDNA-ends (RACE)* ist eine auf der PCR basierende Methode zur Vervollständigung partieller cDNA-Sequenzen. Ausgehend von einem bekannten Sequenzabschnitt, kann in der *5'-RACE* das unbekannte 5'-Ende oder in der *3'-RACE* das unbekannte 3'-Ende bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde für die *5'-* bzw. *3'-RACE* das *GeneRacer*-Kit (Invitrogen) verwendet, in dem alle notwendigen Reagenzien und Enzyme enthalten sind. Die Arbeitsschritte wurden entsprechend den vorgegebenen Protokollen durchgeführt (Invitrogen, 2004).

Bei der *3'-RACE* wird zunächst Gesamt-RNA in einer Reversen Transkription in cDNA umgeschrieben, wobei der 3'-Poly(A)-Schwanz als Startpunkt genutzt wird. Hier lagert sich der modifizierte *GeneRacer*<sup>TM</sup> Oligo dT-Primer an (Abbildung 10), der aus einer Folge von 24 Thymin Nukleotiden und einer Ankersequenz aus 36 weiteren Nukleotiden besteht. Die fertige cDNA enthält dadurch einen zusätzlichen bekannten 3'-Überhang, der in der anschließenden PCR als Primerbindestelle dient. Unter Verwendung eines genspezifischen Primers (GSP 3'-Primer), der im bereits bekannten Sequenzbereich der cDNA bindet, und dem *GeneRacer*<sup>TM</sup> 3'-Primer, der sich innerhalb der Ankersequenz anlagert, wird im Folgenden ausschließlich das gesuchte 3'-Ende amplifiziert.



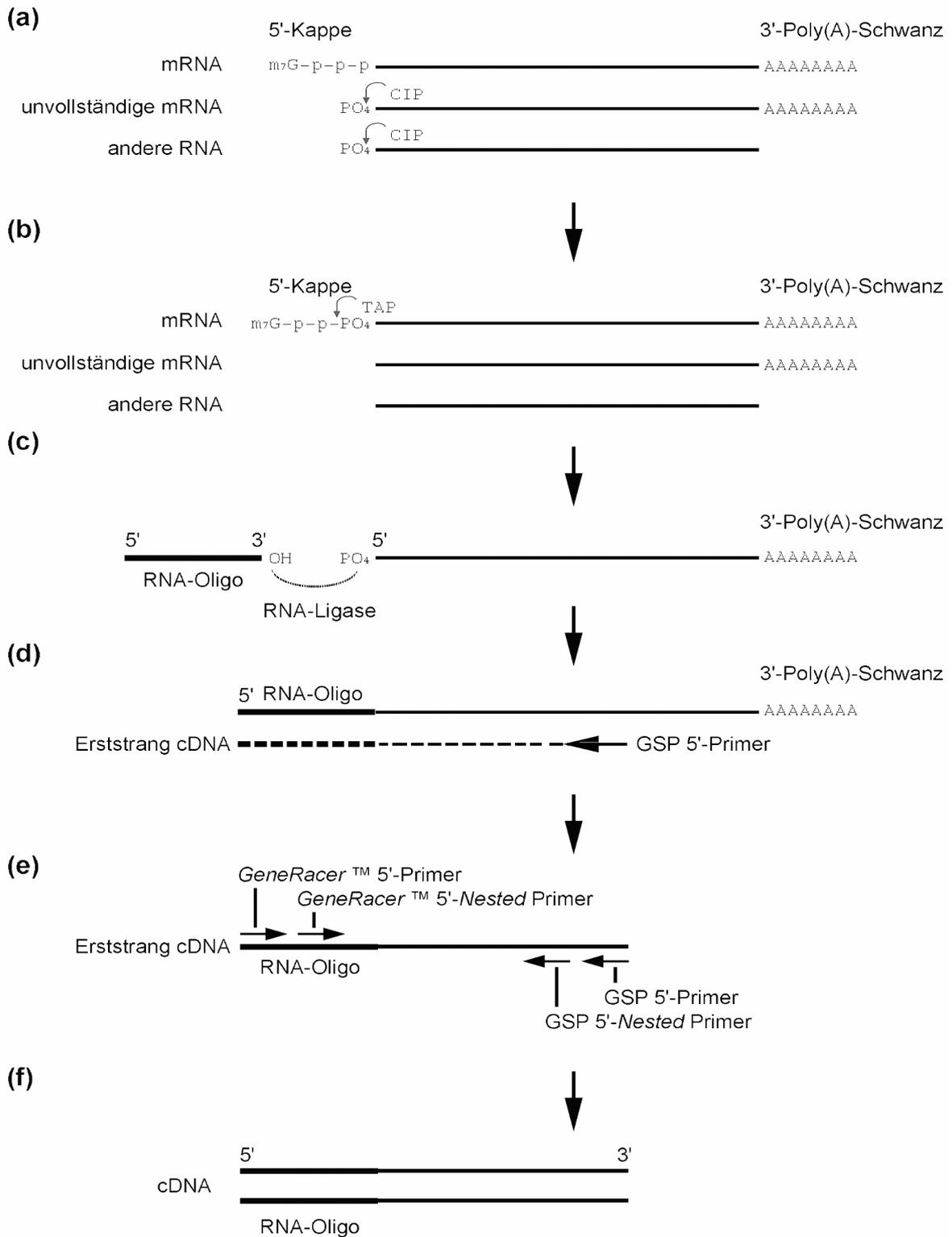
**Abbildung 10: Schematische Darstellung der 3'-RACE.** Bei der 3'-RACE wird zunächst eine Reverse Transkription unter Verwendung eines modifizierten Oligo dT-Primers durchgeführt. Dieser lagert sich an den 3'-Poly(A)-Schwanz der mRNA-Enden, wodurch cDNAs mit einer zusätzlichen bekannten Ankersequenz generiert werden. Unter Verwendung genspezifischer Vorwärtsprimer (GSP 3'-Primer bzw. GSP 3'-Nestet Primer), die im bereits bekannten Sequenzabschnitt binden, sowie Rückwärtsprimer (*GeneRacer*<sup>TM</sup> 3'-Primer bzw. *GeneRacer*<sup>TM</sup> 3'-Nestet Primer), die sich in der Ankersequenz am 3'-Ende anlagern, wird in einer *Nested PCR* spezifisch nur die gesuchte cDNA amplifiziert. (Abbildung erstellt nach Invitrogen, 2004)

Zur Optimierung der Ausbeute und Spezifität der Amplifikation wird eine *Nested* PCR durchgeführt. Dabei dient das Produkt der ersten PCR als Matrize für eine zweite PCR mit Primern (GSP 3'-*Nested* Primer und *GeneRacer*<sup>TM</sup> 3'-*Nested* Primer; siehe Abbildung 10), die an weiter innen liegenden Sequenzbereichen dieser Matrize binden.

Für die Bestimmung unbekannter 5'-mRNA-Enden wird das Verfahren der RNA-Ligase vermittelten *5'-RACE* (*5'-RLM-RACE*) angewandt, das in Abbildung 11 schematisch dargestellt ist. Mithilfe von T4 RNA-Ligase wird hierbei ein RNA-Oligonukleotid mit bekannter Ankersequenz direkt an die 5'-Enden der mRNAs geheftet. Zuvor muss jedoch sichergestellt werden, dass das Oligonukleotid nur an mRNAs mit vollständigen 5'-Enden ligiert wird. Zu diesem Zweck wird die Gesamt-RNA einer Behandlung mit Calf Intestine Phosphatase (CIP) unterzogen, welche selektiv von unvollständigen mRNAs und anderen RNA-Typen alle 5'-Phosphate abspaltet. Vollständige mRNAs weisen eine schützende 7-Methylguanosin-Kappe am 5'-Ende auf und bleiben deswegen von der Behandlung mit CIP unbeeinflusst. In einem zweiten Schritt wird dann die 5'-Kappe vollständiger mRNAs durch Tabaksäure-Pyrophosphatase (TAP) entfernt, wobei ein Phosphatrest erhalten bleibt, der für die anschließende Ligation des RNA-Oligonukleotids an das 5'-Ende gebraucht wird. Ausgehend von einem genspezifischen Rückwärtsprimer, der im bekannten Sequenzabschnitt bindet, wird nun in der Erststrangsynthese einzig und allein die gesuchte mRNA in 5'-Richtung revers transkribiert. In einer anschließenden *Nested* PCR wird das spezifische 5'-cDNA-Ende vervielfältigt, wobei die Vorwärtsprimer (*GeneRacer*<sup>TM</sup> 5'-Primer und *GeneRacer*<sup>TM</sup> 5'-*Nested* Primer) in der angefügten Ankersequenz, die Rückwärtsprimer (GSP 5'-Primer und GSP 5'-*Nested* Primer) im bekannten Sequenzabschnitt binden.

#### **2.2.4. 3'-RACE zur Aufklärung des N-Terminus eines KCHs aus Tabak**

Für die *3'-RACE* wurde Gesamt-mRNA aus Tabak BY-2 Zellproben von Tag eins bis sieben nach der Subkultivierung isoliert und zu gleichen Anteilen in einem RNA-Pool vereint. 2 µg der Gesamt-RNA wurden in einer Reversen Transkription mit *Superscript III*<sup>TM</sup> (Invitrogen) und *GeneRacer*<sup>TM</sup>Oligo dT Primer (Tabelle 13, Anhang), entsprechend dem Protokoll des Herstellers in cDNA umgeschrieben. In einer *Nested* PCR (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9) wurde mit den Primerpaaren GSP 3'-Primer/ *GeneRacer*<sup>TM</sup> 3'-Primer und GSP 3'-*Nested* Primer/ *GeneRacer*<sup>TM</sup> 3'-*Nested* Primer (Tabelle 13, Anhang) das gesuchte 3'-Ende amplifiziert.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der 5'-RLM-RACE.** (a) Durch Behandlung mit Calf Intestine Phosphatase (CIP) und (b) Tabaksäure-Pyrophosphatase (TAP) wird sichergestellt, dass nur mRNAs mit vollständigen 5'-Enden revers transkribiert werden. (c) Darauf folgt die Ligation eines RNA-Oligonukleotids mit bekannter Ankersequenz direkt an das 5'-Ende aller vollständigen mRNAs. (d) Durch die Wahl eines genspezifischen Primers (GSP 5'-Primer) wird in der Erststrangsynthese nur das 5'-Ende der gesuchten mRNA in cDNA umgeschrieben. (e, f) In einer *Nested PCR* wird das spezifische 5'-cDNA-Ende vervielfältigt. (Abbildung erstellt nach Invitrogen, 2004)

### 2.2.5. Vervollständigung der KCH-Sequenz durch 5'-RACE und Erstellung eines NtKCH cDNA-Klons

Das noch fehlende 5'-Ende der Kodierungssequenz (CDS: *Coding sequence*) des KCH wurde über 5'-RACE ermittelt. Dazu wurden 5 µg Gesamt-RNA eines frischen BY-2 RNA-Pools entsprechend den Herstellerprotokollen einer sukzessiven Behandlung mit CIP und TAP unterzogen. Danach wurde das RNA-Oligonukleotid an das 5'-mRNA-Ende ligiert. In der Erststrangsynthese wurde das gesuchte 5'-Ende der mRNA ausgehend vom GSP 5'-RACE Primer (siehe Tabelle 13, Anhang) mittels *Superscript*<sup>®</sup> III in cDNA umgeschrieben. Sie diente als Matrize zur anschließenden Vervielfältigung des 5'-Endes in einer *Nested* PCR mit *Phusion*<sup>®</sup> DNA Polymerase (siehe Tabelle 8; Tabelle 9) und den Primerpaaren GSP 5'-Primer/ *GeneRacer*<sup>™</sup> 5'-Primer und GSP 5'-*Nested* Primer/ *GeneRacer*<sup>™</sup> 5'-*Nested* Primer (siehe Tabelle 13, Anhang). Zwischen den einzelnen Behandlungen wurde die RNA, wie vom Hersteller vorgegeben, über Phenol-Chloroform-Extraktionen gefällt, für die weitere Verwendung in RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und 1 µl der gelösten RNA zur Überprüfung der Integrität auf einem 1 % [w/v] Agarosegel analysiert.

### 2.2.6. TOPO<sup>®</sup>-TA Klonierung

Alle in der PCR mit degenerierten Primern und in der RACE gewonnen Amplifikate wurden auf 1-2 % [w/v] Agarosegelen aufgetrennt, aufgereinigt und mittels TOPO<sup>®</sup>-TA Klonierungen in den Vektor pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> eingebracht.

Durch dieses Verfahren können aus dem Agarosegel gereinigte DNA-Fragmente direkt ohne zusätzliche Restriktion und Ligation in den linearisierten Vektor kloniert werden. Für einen effizienten Einbau müssen jedoch freie Adenin (A)-Überhänge an den Enden der PCR-Produkte verfügbar sein. Taq DNA-Polymerasen generieren diese zusätzlichen Adenine aufgrund ihrer Terminalen Transferase-Aktivität schon während der PCR-Reaktion. Polymerasen mit *Proofreading*-Funktion, wie die *Phusion*<sup>®</sup> DNA-Polymerase, entfernen dagegen jegliche Überhänge an den Amplifikaten. Wurde in der PCR die *Phusion*<sup>®</sup> DNA-Polymerase verwendet, so mussten die fehlenden A-Überhänge durch einen zusätzlichen Inkubationsschritt mit Taq DNA-Polymerase im Anschluss wieder angehängt werden. Hierzu wurde das aufgereinigte PCR-Produkt mit 0,2 mM dATP (NEB), *ThermoPol*-Puffer (NEB) und 1 U Taq DNA-Polymerase (NEB) vermengt und für 20 min bei 72 °C auf einem PCR-Cycler inkubiert. Für die TOPO<sup>®</sup>-TA Klonierung wurden zu 4 µl des gereinigten und in ddH<sub>2</sub>O gelösten PCR-Produkts mit A-Überhängen 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl<sub>2</sub>; Invitrogen) und 1 µl des pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>-Vektors gegeben und der Ansatz für 20 min bei 23 °C inkubiert. Anschließend wurden 2-6 µl des Reaktionsansatzes direkt in *E. coli* (siehe Tabelle 2) transformiert.

### 2.2.7. Sequenzierung der KCH-Sequenz

Alle in pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> klonierten Amplifikate wurden immer jeweils vorwärts und rückwärts sequenziert (GATC, Konstanz, Deutschland). Sequenzabschnitte bis zu einer Länge von 1000 bp konnten dabei vollständig mit den Standardprimer M13-FP und M13-RV (siehe Tabelle 15, Anhang) sequenziert werden, die innerhalb des Sequenzierungsvektors binden. Bei einer Sequenzlänge von mehr als 1000 bp wurden zusätzliche Primer entworfen, die innerhalb des *Inserts* binden. Alle Gensequenzdaten wurden über die *AlignX*-Funktion des *VektorNTI*-Softwarepakets (Invitrogen) verglichen und anhand der überlappenden Sequenzbereiche zu einer Gesamtsequenz zusammengefügt, welche die vollständige CDS des Tabak-KCH beinhaltet. Anschließend wurde die CDS mit den in Tabelle 13 (Anhang) angegebenen Primern, in überlappenden, partiellen Sequenzabschnitten aus frischer BY-2 Gesamt-cDNA (Kapitel 2.2.1) mehrfach amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzinformationen wurden erneut verglichen und zu einer korrigierten Nukleotidabfolge zusammengefügt. Die vollständige Gensequenz des Tabak-KCH wurde mit den Primer NtKCHfl-fw und NtKCHfl-rv (Tabelle 16, Anhang), die jeweils in den untranslatierten Sequenzbereichen kurz vor und nach der CDS binden, aus BY-2 cDNA amplifiziert, in pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup> eingebracht, sequenziert und mit den nun bekannten Sequenzdaten verglichen. Das pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>-NtKCH Plasmid diente als cDNA-Klon für alle weiteren Klonierungsarbeiten. Das isolierte Gen wurde als NtKCH (*Nicotiana tabacum* Kinesin mit Calponin homologer Domäne) bezeichnet. Sowohl die Nukleotid- als auch die Aminosäureabfolge von NtKCH wurde unter der Zugangsnummer JF835913 in der *GenBank*-Datenbank (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>; Stand 2011) abgelegt (für Nukleotid- und Aminosäuresequenzen siehe auch Kapitel 1 im Anhang).

## 2.3. *In silico* Analysen von NtKCH

### 2.3.1. Sekundärstrukturanalyse der NtKCH-Sequenz

Die NtKCH-Aminosäuresequenz wurde einer Sekundärstrukturanalyse mit der *SMART*-Software (<http://smart.embl-heidelberg.de/>; Stand 2010; Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2009) unterzogen, wobei sie auf die Existenz bekannter Sequenz-Motive und Domänen geprüft wurde.

### 2.3.2. Alignments

Alignments von Aminosäuresequenzen wurden mithilfe von *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>; Stand 2010) durchgeführt. Nukleotidsequenzen wurden dagegen mithilfe der *AlignX*-Funktion der *VektorNTI*-Software (Invitrogen) verglichen. Für das Alignment der Kinesin-Motordomänen von NtKCH, AtKatD, GhKCH2 and DmNcd wurde die entsprechenden Aminosäuresequenzen aus der

*Swiss-Prot/TrEMBL*-Datenbank (<http://www.uniprot.org/blast/>; Stand 2010) geladen und in *ClustalW2* verglichen.

### 2.3.3. *Coiled-Coils*-Voraussage

Zur Ermittlung potenzieller *Coiled-Coil*-Bereiche innerhalb der NtKCH-Sequenz wurde eine, dem Lupas-Algorithmus entsprechende Analyse mithilfe der *COILS*-Software ([http://www.ch.embnet.org/software/COILS\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html); Stand 2010; Lupas *et al.*, 1991) durchgeführt. Als Hintergrund wurde die MTIDK-Matrix gewählt. Zur Minimierung falsch-positiver Voraussagen wurde die Analyse jeweils unter Verwendung des 14, 21 und des 28 Aminosäurefensters und bei gewichteter und ungewichteter Matrix wiederholt. Alle Resultate wurden anschließend verglichen und nur Sequenzabschnitte in Betracht gezogen, bei denen alle sechs Analysen sich in ihrer Voraussage der *Coiled-Coil*-Wahrscheinlichkeit um weniger als 30 % unterschieden.

### 2.3.4. Phylogenetische Klassifizierung von NtKCH

Zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums wurde zunächst nach potenziellen Mitgliedern der KCH-Gruppe aus *Arabidopsis thaliana*, *Gossypium hirsutum* und *Oryza sativa* mithilfe von BLAST in der *Swiss-Prot/TrEMBL*-Datenbank gesucht. Als Vorlage diente hierzu die Aminosäuresequenz von AtKatD (Tamura *et al.*, 1999). Die ermittelten Sequenzdaten der KCH-Homologe und von Vertretern der Kinesin-1 und Kinesin-14 Familie wurden über *ClustalW2* miteinander verglichen und anschließend in *PhyML3.0* (<http://atgc.lirmm.fr/phyml>; Stand 2010; Guidon *et al.*, 2010) nach der *Maximum Likelihood*-Schätzmethode ausgewertet. Zusätzlich wurde eine *Bootstrap*-Analyse mit 100 Wiederholungen durchgeführt. Die visuelle Darstellung der Rohdaten als Stammbaum erfolgte mithilfe der *iTOL*-Software (<http://itol.embl.de>; Stand 2010; Letunic & Bork, 2007). Als Wurzel des Stammbaums wurde AtARK1 aus *A. thaliana* gewählt, das bisher keiner der bekannten Kinesin-Familien zugeordnet werden kann und somit eine Außengruppe darstellt (Sakai *et al.*, 2008). Alle verwendeten Protein-Sequenzdaten können mithilfe der folgenden Zugangsnummern aus der *Swiss-Prot/TrEMBL*-Datenbank abgerufen werden: AtARK1 (Q9SV36), AtKatA (Q07970), AtKatB (P46864), AtKatC (P46875), AtKatD (O81635), AtKCBP (Q9FHN8), AtKinG (E1ACC4), AtKP1 (Q8W1Y3), B9EUM5, B9FL70, DmKHC (P17210), DmNcd (P20480), GhKCH1 (Q5MNV6), GhKCH2 (A4GU96), HsKHC (P33176), O22260, O80491, OsKCBP (Q7XPJ0), OsKCH1 (Q0IMS9), Q10MN5, Q9FHD2, Q9SS42, ScKar3 (P17119), XIKHC (A5XAW2).

### 2.3.5. Phylogenetische Klassifizierung der CH Domäne von NtKCH

Zur Klassifizierung der CH Domäne von NtKCH wurde ein ungewurzelter phylogenetischer Stammbaum erstellt. Dazu wurden die Aminosäuresequenzen von GhKCH2, AtKatD, OsKCH1 und verschiedener tierischer Proteine mit CH Domänen aus der *Swiss-Prot/TrEMBL*-Datenbank abgerufen und anhand einer Sekundärstrukturanalyse mit der *SMART*-Software der genaue Sequenzbereich der CH Domäne(n) identifiziert. Die Aminosäureabfolgen der CH Domäne(n) wurden zusammen mit derjenigen von NtKCH über *ClustalW2* verglichen und einer Stammbaumanalyse entsprechend der *Maximum Likelihood*-Methode in *PhyML3.0* unterzogen, wobei keine *Bootstrap*-Analyse durchgeführt wurde. Die visuelle Darstellung der Rohdaten als ungewurzelter Stammbaum erfolgte mithilfe von *iTOL*. Die Aminosäuresequenzen der verwendeten CH Domäne-Proteine können anhand der folgenden Zugangsnummern aus der *Swiss-Prot/TrEMBL*-Datenbank abgerufen werden:  $\alpha$ -Actinin1 (P12814),  $\alpha$ -Actinin2 (P35609),  $\alpha$ -Actinin3 (Q08043),  $\beta$ -Spectrin (P11277),  $\beta$ -Filamin (Q60FE7), Vav2 (P52735), Vav3 (Q9UKW4), SM22 (Q01995), NP25 (Q9UI15), Calponin1 (P51911), Cortexillin1 (Q54HG2).

## 2.4. Plasmid-Konstruktion

### 2.4.1. Herstellung fluoreszenter Protein-Fusionskonstrukte

Es wurden verschiedene fluoreszente Fusionskonstrukte zur transienten und stabilen Expression in BY-2 Tabakzellen mithilfe des *Gateway*<sup>®</sup>-Verfahrens (Invitrogen) erstellt. Neben der vollständigen CDS von NtKCH (NtKCH-fl; As 1-1001), wurden die drei gekürzten Varianten NtKCH $\Delta$ 409-1001 (As 1-408), NtKCH $\Delta$ 251-1001 (As 1-250) und NtKCH $\Delta$ 1-300 (As 301-1001) jeweils in einer inversen *touchdown* PCR mit den in Tabelle 16 (Anhang) angegebenen Primern aus pCR<sup>®</sup>4-TOPO<sup>®</sup>-NtKCH (Kapitel 2.2.7) mit *Phusion*<sup>®</sup>-Polymerase amplifiziert (Tabelle 8; Tabelle 10). Die resultierenden PCR-Produkte mit *attR*-Überhängen wurden auf einem 1 % [w/v] Agarosegel analysiert, vom Gel aufgereinigt und anschließend in einer *Gateway*<sup>®</sup> BP-Reaktion in pDONR<sup>®</sup>/Zeo (Invitrogen) zu *Entry*-Vektoren rekombiniert. Dazu wurden jeweils 50 fmol *attR*-PCR Produkt und pDONR<sup>™</sup>/Zeo in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt, mit 2  $\mu$ l BP-Clonase<sup>®</sup> II-Mix (Invitrogen) und TE-Puffer (pH-Wert 8,0) zu einem 10  $\mu$ l-Ansatz vermengt und über Nacht bei 25 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Rekombinationsreaktion wurde 1  $\mu$ l Proteinase K (2  $\mu$ g/ $\mu$ l; Invitrogen) zugegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. 2  $\mu$ l des Ansatzes wurden mittels Hitzeschock in chemokompetente *E. coli* Zellen (siehe Tabelle 2) transformiert.

Im Anschluss wurde die vollständige NtKCH-CDS aus dem erstellten *Entry*-Vektor jeweils in die transienten Expressionsvektoren p2RGW7, p2FGW7 und p2GWR, sowie in den binären Zielvektor pK7WGF2.0 zur stabilen Transformation mittels *Gateway*<sup>®</sup> LR-Reaktionen übertragen. Die gekürzten Varianten NtKCH $\Delta$ 409-1001, NtKCH $\Delta$ 251-1001 und

NtKCHΔ1-300 wurden nur in den Zielvektor p2RGW eingebracht. Für die *Gateway*<sup>®</sup> LR-Reaktion wurden je 150 ng des entsprechenden *Entry*-Vektors mit der gleichen Menge des entsprechenden Zielvektors und 2 µl LR-Clonase<sup>®</sup> II-Mix (Invitrogen) vermischt und mit TE-Puffer (pH-Wert 8,0) auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Die Rekombinationsreaktion fand über Nacht bei 25 °C statt und wurde danach durch Zugabe von 1 µl Proteinase K (2 µg/µl, Invitrogen) und anschließender Inkubation bei 37 °C für 10 min abgestoppt. Auch hier wurden für die folgende Transformation 2 µl des Reaktionsansatzes verwendet. Für die Erstellung des binären RFP-FABD2-Konstrukts wurde die FABD2-Region von Fimbrin 1 aus *A. thaliana* (AS 325–687) aus pENTR\_FABD2 (Maisch *et al.*, 2009) mittels einer *Gateway*<sup>®</sup> LR-Reaktion wie angegeben in den binären Expressionsvektor pH7WGR2.0 eingebracht. Alle erstellten Plasmide wurden durch analytische Restriktionen und anschließende Sequenzierung durch die Firma GATC überprüft.

## 2.5. Zellbiologische Methoden

### 2.5.1. Kultivierung von BY-2 Zellen

Tabak BY-2 Zellen (*Nicotiana tabacum*, cv. Bright Yellow 2) wurden in modifiziertem Murashige & Skoog Flüssigmedium (MS Medium) kultiviert und wöchentlich umgesetzt (Nagata *et al.*, 1992). Dazu wurden jeweils 1,5 ml der Stammkultur in 30 ml frisches Medium in einen 100 ml-Erlenmeyer Kolben überführt. Die Zellen wurden bei 25 °C im Dunkeln auf einem IKA KS260-Kreisschüttler (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) bei 150 rpm inkubiert. Stabil transformierte GFP-NtKCH und *free*-GFP BY-2 Flüssigkulturen wurden in MS Medium mit 50 mg/l Kanamycin, kotransformierte GFP-NtKCH/RFP-FABD2 Kulturen in MS Medium mit einer Kombination aus 50 mg/l Kanamycin und 30 mg/l Hygromycin gehalten. Zellkalli der transgenen BY-2 Linien wurden zur Erhaltung auf MS Agar mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert und einmal pro Monat umgesetzt.

### 2.5.2. Synchronisierung des Zellzyklus von BY-2 Zellen

Die Synchronisierung von BY-2 Zellen wurde nach einer leicht abgeänderten Methode entsprechend Samuels *et al.* (1998) durchgeführt, wobei Tabak Suspensionszellen sukzessiv mit Hydroxyurea (HU) (Adams & Lindsay, 1967; Kuthanová *et al.*, 2008) und Propyzamid (Akashi *et al.*, 1988) behandelt wurden. Dazu wurden sieben Tage alte Zellen 1:10 in MS Medium mit 4 mM Hydroxyurea (Sigma-Aldrich) verdünnt und unter Standardbedingungen weiter kultiviert. Nach 24 h wurde der Ribonukleotid Reduktase-Inhibitor durch drei aufeinanderfolgende Waschschrte mit MS Medium entfernt. Die Zellen wurden in frischem MS Medium aufgenommen und für 3 h bei 25 °C geschüttelt, bevor 6 µM Propyzamid (Stammlösung: 10 mM in DMSO; Sigma-Aldrich) zugegeben wurde. Nun wurde durch

stündliche Messungen des Mitotischen Index (MI) bestimmt, wie weit die Zellen im Zellzyklus fortgeschritten waren. Bei einem MI  $\geq 60$  % (nach 5-6 h), wurde der Zellzyklus-Inhibitor durch drei weitere Waschschriffe mit MS Medium entfernt und die Zellen in frisches MS Medium ohne Propyzamid überführt.

### 2.5.3. Bestimmung des Mitotischen Index (MI)

Der MI, definiert als relative prozentuale Häufigkeit sich teilender Zellen, wurde mikroskopisch anhand der Kernmorphologie bestimmt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit Carnoy's Lösung ([3:1] 100 % (v/v) EtOH: 100 % (v/v) Essigsäure mit 0,25 % Triton X-100) fixiert und anschließend die Kern-DNA mit Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) in einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  (Stammlösung: 0,5 mg/ml Hoechst in ddH<sub>2</sub>O) angefärbt. Die Zellen wurden direkt im Anschluss unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Für jeden Zeitpunkt wurde unabhängig voneinander dreimal der MI von insgesamt 500 Zellen bestimmt, und daraus jeweils der Mittelwerte sowie der Standardfehler ausgerechnet.

### 2.5.4. Ballistische Transformation von BY-2 Tabak-Suspensionszellen

Die erstellten Überexpressionskonstrukte wurden mithilfe von Partikelbombardements transient in BY-2 Zellen eingebracht. Dazu wurden 120 mg Gold ( $\varnothing$  1,5-3  $\mu\text{m}$ ; Sigma-Aldrich) in 1 ml 100 % EtOH durch gründliches Vortexen gewaschen und bei 4000 rpm in einer *Heracus Pico 17*-Tischzentrifuge (Thermo Fischer Scientific) kurz abzentrifugiert. Der EtOH-Überstand wurde verworfen, das Goldsediment in 1 ml sterilem 40 % [v/v] Glycerin resuspendiert und direkt vor der weiteren Verwendung erneut gründlich gevortext.

Zur Beschichtung der Goldpartikel mit DNA wurde für jede Transformation 1  $\mu\text{g}$  des entsprechenden Plasmids (bei Kotransformationen wurde je Plasmid 1  $\mu\text{g}$  eingesetzt) mit 12,5  $\mu\text{l}$  Goldsuspension in einem 1,5 ml-Gefäß vermengt und unter wiederholtem Vortexen nacheinander 12,5  $\mu\text{l}$  2,5 M CaCl<sub>2</sub> und 5  $\mu\text{l}$  0,1 M Spermidin zugegeben. Anschließend wurde nochmals für 3 min gründlich gevortext und die nun mit DNA beschichteten Goldpartikel kurz bei 4000 rpm abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 125  $\mu\text{l}$  100 % [v/v] EtOH gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 40  $\mu\text{l}$  100 % [v/v] EtOH aufgenommen. Danach wurde die Suspension in 10  $\mu\text{l}$ -Schritten auf einen *Macrocarrier* (BIO-RAD, München, Deutschland) aufgebracht, welcher vor der weiteren Verwendung zur vollständigen Evaporation des EtOH mindestens 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen wurde.

Zur biolistischen Transformation wurden 500  $\mu\text{l}$  einer 3 Tage alten BY-2 Suspensionskultur steril entnommen und auf *PetriSlides* (Millipore, Schwalbach, Deutschland) mit MS Agar übertragen. Die Zellen wurden mit den Plasmid-beschichteten Goldpartikeln durch eine nach *Finer et al.* (1992) konstruierten Partikelkanone mit einem Druck von 1,5 bar im Vakuum bei

-0,8 bar beschossen. Vor der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurden die Zellen zur Expression der Plasmide für 8 h bei 25 °C im Dunkeln in der Thermokammer gehalten.

### 2.5.5. Transformation von *A. tumefaciens*

Um chemokompetente *A. tumefaciens* (siehe Tabelle 2) herzustellen, wurde zunächst eine Vorkultur der Bakterienzellen angesetzt, indem 10 ml LB mit 50 mg/l Rifampicin und 300 mg/l Streptomycin mit einer Zellkolonie angeimpft und für 2 Tage bei 28 °C und 150 rpm geschüttelt wurden. 5 ml der Vorkultur wurden im Folgenden in 100 ml frisches Selektionsmedium überführt und die Kultur bei 28 °C und 150 rpm weiter inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C für 5 min in einer Z383 *Universal*-Zentrifuge (Hermle) geerntet, in 20 ml eiskalter 150 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gelöst und ein weiteres Mal unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Anschließend wurde der Zellniederschlag in 2 ml kalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, in 200 µl Aliquots aufgeteilt und mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Transformation von *A. tumefaciens* wurden die bei -70 °C gelagerten chemokompetenten Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und mit 1 µg des entsprechenden Plasmids vermengt. Danach wurden sie für 30 min auf Eis ruhen gelassen, bevor ein Hitzeschock für 5 min bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt wurde. Nach weiteren 30 min auf Eis wurden die Zellen mit 1 ml LB Medium versetzt und für 4 h auf einem *Thermomixer Comfort* (Eppendorf) bei 28 °C geschüttelt. Die Zellen wurden auf Selektionsplatten (LB-Agar mit 50 mg/l Rifampicin, 300 mg/l Streptomycin, 100 mg/l Spectinomycin) ausplattiert und bei 28 °C für 3 Tage inkubiert.

### 2.5.6. Stabile Transformation von BY-2 Zellen mittels der TAMBY2-Methode

Tabak BY-2 Zellen wurden mithilfe von *A. tumefaciens* mit GFP-NtKCH oder gleichzeitig mit GFP-NtKCH und RFP-FABD2 (bzw. GFP-NtKCH und RFP-Tubublin-α3) stabil kotransformiert. Hierzu wurde die von Buschmann *et al.* (2011) beschriebene TAMBY2 (*Transient agrobacterium-mediated transformation of BY-2*)-Methode angewandt, welche durch einen zusätzlichen Selektionsschritt weiter entwickelt wurde, sodass sie auch für stabile Transformationen anwendbar ist. Hierfür wurden zunächst 8 ml einer sieben Tage alten BY-2 Zellkultur in 100 ml frisches MS Medium überführt und für 3 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Die Hälfte der Zellkultur wurde im Anschluss unter Verwendung eines *Nalgene*<sup>®</sup>-Filters (Thermo Fisher Scientific) zweimal mit Paul's Medium gewaschen und anschließend in 10 ml Paul's Medium aufgenommen, woraus eine fünffach konzentrierte Zellkultur resultierte. 1 µg der binären Plasmid-Konstrukte wurde jeweils, wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben, in chemokompetente *A. tumefaciens* eingebracht und 10 ml Übernachtskulturen (in LB mit entsprechendem Antibiotikum) angesetzt. Von den Kulturen

wurde jeweils 1 ml in 5 ml frisches Selektionsmedium überimpft und bis zur logarithmischen Phase ( $OD_{600} = 0,8$ ) weiter wachsen gelassen. 1 ml der Bakteriensuspension wurde bei 10000 rpm für 1 min zentrifugiert und in 30  $\mu$ l Paul's Medium gelöst. Im Falle der Kotransformation wurden jeweils 0,5 ml der mit GFP-NtKCH transformierten Bakterienkulturen mit 0,5 ml der RFP-FABD2 Kultur vereinigt, abzentrifugiert und in 30  $\mu$ l Paul's Medium gelöst. Zu den Bakteriensuspensionen wurde jeweils 1 ml der fünffach konzentrierten BY-2 Zellen zugegeben und für 5 min bei 25 °C und 150 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Agrobakterien-BY-2-Mischung tropfenweise auf Platten mit Paul's Agar aufgetragen, die dann vorsichtig mit Parafilm verschlossen und im Dunkeln bei 25 °C inkubiert wurden. Nach 3 Tagen wurden die Zellhaufen auf Selektionsplatten aus MS Medium mit 0,8 % [w/v] Agar, 100 mg/l Cefotaxim und entweder 100 mg/l Kanamycin (GFP-NtKCH) oder einer Mischung aus 100 mg/l Kanamycin und 50 mg/l Hygromycin (GFP-NtKCH/RFP-FABD2) umgesetzt und weiter inkubiert, bis nach ungefähr 3 Wochen antibiotikaresistente Kalli erschienen. Diese wurden vereinzelt, bis zu einem Durchmesser von 1 cm wachsen gelassen und anschließend mikroskopisch untersucht. Bei ausreichend starkem Fluoreszenzsignal wurden aus den betreffenden Kalli Flüssigkulturen hergestellt und weiter kultiviert (siehe Kapitel 2.5.1).

### **2.5.7. Immunfluoreszenzfärbung von Mikrotubuli in fixierten BY-2 Zellen**

Die Mikrotubuli von BY-2 Zellen wurden durch indirekte Immunfluoreszenz angefärbt (Nick *et al.*, 2000). Dazu wurden die Zellen zunächst für 30 min in Mikrotubuli-Stabilisierungspuffer (MSP; 50 mM PIPES, 2 mM EGTA, 2 mM  $MgSO_4$ , pH-Wert 6,9) mit 3,7 % [w/v] Paraformaldehyd und anschließend weitere 30 min in MSP mit 3,7 % [w/v] Paraformaldehyd und 0,1 % [v/v] Triton X-100 fixiert. Danach wurde überschüssiger Paraformaldehyd dreimal für 10 min mit MSB ausgewaschen. Zum Anverdau der Zellwand wurde für 7 min mit 1 % [w/v] Macerozym (Duchefa) und 0,2 % [w/v] Pectolyase (Sigma-Aldrich) in MSP inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit MSP, wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen mit 0,5 % [w/v] BSA für 30 min blockiert. Zu den Zellen wurde eine Mischung aus den primären Antikörpern ATT und DM1A (siehe Tabelle 5) gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS für mindestens 10 min entfernt wurden, erfolgte die Bindung des an Tetramethylrhodamin Isothiocyanat (TRITC) gekoppelten sekundären Antikörpers (Tabelle 5) für 1 h bei 37 °C. Erneut wurden überschüssige ungebundene Antikörper zweimal für 10 min mit PBS entfernt. Die Zellen wurden direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

### 2.5.8. Färbung der Aktinfilamente durch TRITC-Phalloidin

Zur Färbung der Aktinfilamente nach Maisch & Nick (2007) wurden die Suspensionszellen jeweils für 10 min in (Aktin-)Mikrofilament-Puffer (MFP: 0,1 M PIPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, pH-Wert 7,0) mit 1,8 % [w/v] Paraformaldehyd und dann in MFP mit 1 % [v/v] Glycerol fixiert. Danach erfolgten zwei Waschschriffe für 10 min mit MFP. Die Zellen wurden in 500 µl PBS resuspendiert und für 30 min mit gleichem Volumen PBS mit 0,66 mM TRITC-Phalloidin (Stammlösung: 6,6 mM in 96 % [w/v] EtOH; Sigma-Aldrich) inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen dreimal für 10 min in PBS gewaschen und unverzüglich mikroskopisch ausgewertet.

### 2.5.9. Behandlungen mit Latrunculin B und Oryzalin

Für die Behandlung mit den Zellskelettgiften wurden 1-2 Tage alte GFP-NtKCH/RFP-FABD2 BY-2 Zellen mit 10 µM Latrunculin B oder 10 µM Oryzalin (Stammlösung jeweils 10 mM in DMSO; Sigma-Aldrich) für 1 h unter Standard-Kultivierungsbedingungen geschüttelt. In Kontrollansätzen wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge DMSO ohne das jeweilige Zellskelettgift für 1 h geschüttelt. Alle Zellen wurden sofort im Anschluss fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

### 2.5.10. Mikroskopie und Bildauswertung

Alle fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden mit dem *Axiolmager Z.1* (Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Das Epifluoreszenzmikroskop ist mit einem *ApoTome* zur Erstellung optischer Schnitte und einer digitalen CCD Kamera (AxioCam MRm) ausgerüstet. Die verwendeten Filtersätze von Zeiss können Tabelle 11 entnommen werden. Für die Aufnahmen wurde entweder ein Objektiv mit 40-facher Vergrößerung oder ein 63-fach *PlanApochromat*-Immersionsölobjektiv verwendet. Die Bilder wurden mit der *AxioVision*-Software (Version 4.8.2.0; Zeiss) bearbeitet.

**Tabelle 11: Verwendete Filtersätze für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen**

Bezeichnung/ Filtersatz/	Fluoreszenzkanal- Name	Anregung (in nm)	Farbteiler (in nm)	Emission (in nm)
38 HE	GFP	BP* 470/40	495	BP* 525/50
43 HE	TRITC/RFP/	BP* 550/25	570	BP* 605/70
46 HE	YFP	BP* 500/25	515	BP* 535/30
47 HE	CFP	BP* 436/25	455	BP* 480/40
49	DAPI	365	395	BP* 445/50

\* BP: Bandpass

### **2.5.11. Bestimmung der NtKCH-Bewegung mittels Kymographen-Analysen**

Zur Bestimmung der Bewegungsgeschwindigkeit von NtKCH *in-vivo* wurden Zeitreihen-Aufnahmen der transgenen GFP-NtKCH Zelllinien mithilfe des *Axiolmager Z1* angefertigt. Die Bilder wurden in schnellstmöglichen Zeitabständen, abhängig von der jeweiligen Belichtungszeit, aufgenommen. Der absolute Zeitabstand zwischen zwei Aufnahmen wurde durch die *AxioVision*-Software (Zeiss) exakt ermittelt und angegeben. Mithilfe des entsprechenden *MultipleKymographs*-Plugins ([www.embl.de/eamnet/html/kymograph.html](http://www.embl.de/eamnet/html/kymograph.html)) wurden mit der *ImageJ*-Software (Version 1.45s; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>; National Institute of Health, Bethesda, USA) Kymographen (Weg-Zeit-Plots) erstellt, anhand derer die Bewegungsgeschwindigkeit aus den Zeitreihen-Aufnahmen ermittelt wurde. Es wurde eine Häufigkeitsverteilung der gemessenen Geschwindigkeiten erstellt, aus der die durchschnittliche Geschwindigkeit sowie der Standardfehler errechnet wurden.

## **2.6. Expressionsanalysen**

### **2.6.1. Probenentnahme für semiquantitative Expressionsanalysen**

Mithilfe semiquantitativer Expressionsanalysen wurde der Frage einer möglichen Abhängigkeit zwischen der NtKCH-Transkription und der Zellteilung nachgegangen. In einem ersten Schritt wurde dabei untersucht, ob sich Transkriptionsunterschiede innerhalb des siebentägigen Kultivierungszyklus feststellen lassen. Zu diesem Zweck wurden 10 ml einer 7 Tage alten Zellkultur in 200 ml frisches MS Medium in einem 500 ml-Kolben umgesetzt und unter Standardbedingungen geschüttelt. Nun wurden eine Woche lang alle 24 h jeweils 10 ml Proben entnommen. 200 µl davon wurden zur Bestimmung des MI genutzt und aus dem Rest der Probe wurde die Gesamt-RNA für die semiquantitative Expressionsanalyse isoliert. Des Weiteren wurde die NtKCH mRNA-Transkription in Abhängigkeit der jeweiligen Phase des Zellzyklus in synchronisierten Zellkulturen bestimmt. Aus einer synchronisierten 200 ml Kultur (siehe Kapitel 2.5.2) wurden hierfür nach 24 h Inkubation mit Hydroxyurea, nach 6 h Inkubation mit Propyzamid und 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h und 4 h nach Auswaschen von Propyzamid, je 10 ml Probe entnommen. Auch hier wurde jeweils der MI bestimmt und die restliche Probe zur Expressionsanalyse verwendet.

Zum Vergleich der NtKCH-Transkription in den BY-2 Überexpressionslinien (GFP-NtKCH; GFP-NtKCH/RFP-FABD2) mit BY-2 Wildtyp-Zellen wurden jeweils Proben an Tag 1, 2, 3 und 7 nach Initiierung von 100 ml Zellkulturen entnommen und in drei unabhängigen Durchläufen der Gehalt an NtKCH-mRNA semiquantitativ bestimmt.

### **2.6.2. Semiquantitative Expressionsanalysen**

Die Menge an NtKCH mRNA-Transkripten in BY-2 Zellen wurden anhand von semiquantitativen Expressionsanalysen bestimmt (Marone *et al.*, 2011). Zu diesem Zweck

wurde je Probe 1 µg der isolierten Gesamt-RNA in einer Reversen Transkription mit M-MuLV Reversen Transkriptase (NEB) und Oligo dT-Primern (Sigma-Aldrich) entsprechend den Herstellerangaben zu cDNA umgeschrieben. In Kontrollansätzen wurde die Reverse Transkriptase durch die entsprechende Menge ddH<sub>2</sub>O ersetzt, um auf Verunreinigungen durch genomische DNA rückschließen zu können. Danach wurde von den cDNA-Proben jeweils 1 µl in einem 25 µl-Ansatz mit Taq DNA-Polymerase (NEB) verwendet (siehe Tabelle 7). Die PCR wurde jeweils mit den mit folgenden Bedingungen durchgeführt: 94 °C, 5 min; 25x [94 °C, 1 min; 56 °C, 30 s; 72 °C, 45 s]; 72 °C, 5 min. Die Zyklenzahl wurde so gewählt, dass die Amplifikate auf Agarosegelen deutlich sichtbar waren und die PCR noch innerhalb der exponentiellen Phase beendet wurde, da nur in diesem Zeitraum eine direkte Korrelation zwischen der Produkt- und Matrizenmenge besteht (Kapitel 4, Anhang). Zur Quantifizierung der NtKCH-mRNA wurde das Primerpaar NtKCH\_squant-fw und NtKCH\_squant-rv (Tabelle 14, Anhang) genutzt, mit dessen Hilfe ein diagnostisches 363 bp-Fragment amplifiziert wurde. Als interner Standard wurde das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPD; GenBank Nummer AJ133422) mit den Primern GAPD-fw and GAPD-rv (Tabelle 14, Anhang) amplifiziert. Alle PCR-Produkte wurden auf 2 % [w/v] Agarosegelen aufgetrennt, von denen digitale Aufnahmen (*Rainbow*-Kamerasystem; Hama) angefertigt wurden. Mittels Grauwertanalyse wurde mit dem Computerprogramm *ImageJ* die Bandenintensität ausgewertet und mit dem GAPD-Standard normalisiert. Für jeden Zeitpunkt der Probenentnahme wurden der Mittelwert und der Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

### **2.6.3. Messung der Zelllänge und -breite während des BY-2 Kultivierungszyklus**

Zur Längen- und Breitenmessung von BY-2 Zellen wurden an allen Tagen des Kultivierungszyklus in einem zeitlichen Abstand von 24 h Proben entnommen und mithilfe des *Axiolmager Z.1* (Zeiss) Differentialinterferenzkontrast (DIK) -Aufnahmen angefertigt. Zu jedem Zeitpunkt wurden in drei unabhängigen Durchgängen jeweils 150 Zellen mithilfe der Längenmessfunktion der *AxioVision*-Software (Zeiss) vermessen und die durchschnittliche Zelllänge und Breite sowie der jeweils entsprechende Standardfehler berechnet.

### **2.6.4. Bestimmung der Teilungsaktivität im Verlauf des Kultivierungszyklus**

Zur Bestimmung der Teilungsaktivität von BY-2 Zellen wurden an allen Tagen des Kultivierungszyklus in drei unabhängigen Messreihen alle 24 h Zellproben entnommen. Der MI wurde, wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben, von je 500 Zellen bestimmt. Für jeden Zeitpunkt wurden der Mittelwert und der Standardfehler der Messwerte bestimmt.

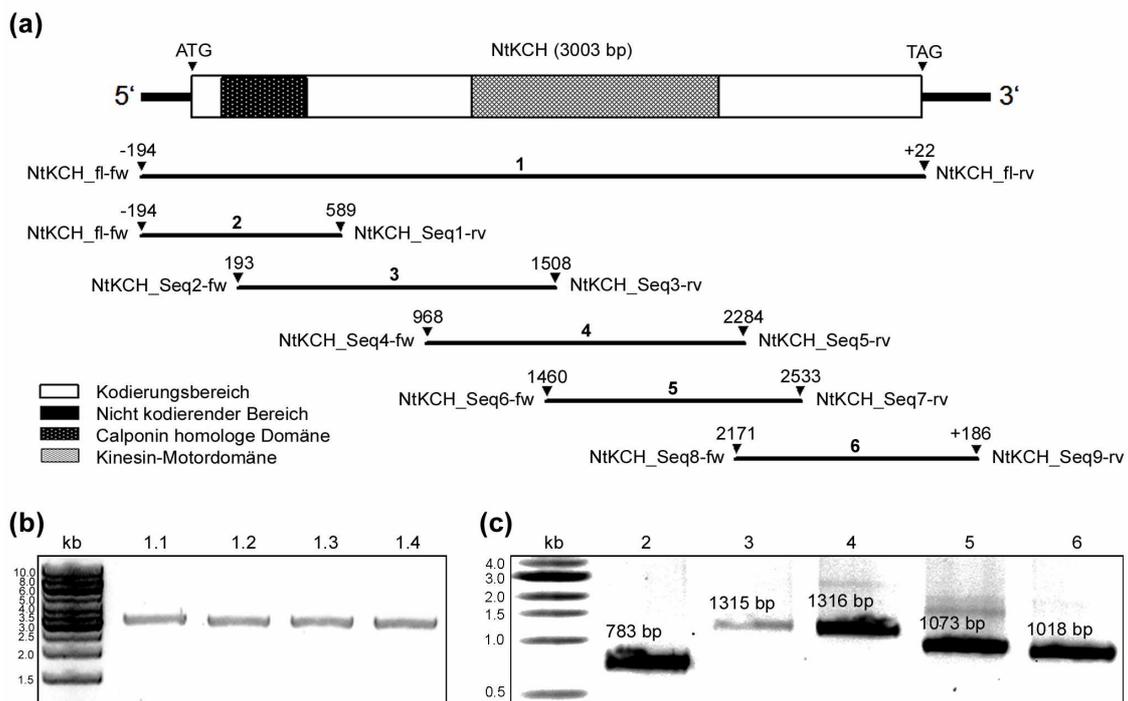
## Ergebnisse

### 1. NtKCH, ein neues Mitglied der KCH-Gruppe aus *Nicotiana tabacum*

#### 1.1. Identifizierung und Isolierung von NtKCH

Zu Beginn dieser Arbeit waren Literaturberichte über vier KCHs verfügbar: AtKatD aus *A. thaliana* sowie GhKCH1 und GhKCH2 aus *G. hirsutum* (Tamura *et al.*, 1999; Preuss *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2007; Stand 2009). Zu OsKCH1 aus *O. sativa* wurden eigene phylogenetische Analysen durchgeführt. Hierbei konnten in zahlreichen unterschiedlichen Blütenpflanzen, sowie in dem Moos *Physcomitrella patens*, KCH homologe Gene identifiziert werden. Auffälligerweise wurden dabei durchweg mehrere KCH-Genkopien innerhalb einer Art gefunden (Frey *et al.*, 2010). Folglich könnten KCHs zum Standardrepertoire höherer Pflanzen zählen und somit könnte auch in *N. tabacum* ein entsprechendes Homolog zu finden sein. Zwar war ein Großteil des Tabakgenoms im Zuge des *Tobacco Genome Initiative*-Projekts (<http://www.pngg.org/tgi/>; Stand 2009) zu diesem Zeitpunkt schon entschlüsselt worden, doch ist die Gen-Annotation bis zum heutigen Tag sehr mangelhaft. So blieben Sequenzhomologie-Suchen in entsprechenden Datenbanken wie *TIGR*, *SOL*, *GenBank* oder *UniProtKB/Swiss-Prot* (<http://plantta.jcvi.org/index.shtml>; <http://solgenomics.net>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; <http://www.uniprot.org/blast/>; Stand: Januar 2009) erfolglos. Im Gegensatz dazu konnte tatsächlich ein passendes Gen direkt aus BY-2 Tabakzellen identifiziert und isoliert werden. Hierfür wurde das Verfahren der Reversen Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) mit degenerierten Primern genutzt. Zur Erstellung entsprechender Oligonukleotide wurden bereits bekannte KCH-cDNA-Sequenzen aus anderen Pflanzenarten, wie *Arabidopsis*, *Gossypium* oder *Vitis* miteinander verglichen und besonders konservierte Bereiche als Bindestellen ausgewählt. Um die Amplifikation falsch-positiver Kinesin-cDNAs zu vermeiden, wurden Primerbindestellen außerhalb der konservierten Motordomäne ausgewählt. Nach zahlreichen PCR-Ansätzen mit unterschiedlichen Primer-Kombinationen, sowie variierenden PCR-Bedingungen, gelang es ein spezifisches Fragment mit einer Länge von ungefähr 2 kb zu amplifizieren. Die gewonnene Nukleotidsequenz wurde mithilfe der *Translate*-Software (<http://web.expasy.org/translate/>; Stand 2009) in die Aminosäureabfolgen aller möglichen Leseraster übersetzt und diese dann jeweils einer Sekundärstrukturanalyse in *SMART* (<http://smart.embl-heidelberg.de/>; Stand 2009) unterzogen. In einem Leseraster konnte eine am 5'-Ende des Fragments gelegene CH Domäne und eine konservierte Kinesin-Motordomäne am 3'-Ende gefunden werden. Eine Homologie-Suche mit der erhaltenen Nukleotidsequenz in *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>; Stand 2009) ergab eine sehr hohe Übereinstimmung von 95 % mit der partiellen, 471 bp langen cDNA-Sequenz von TBK9 (*Tobacco BY-2 kinesin-like polypeptide 9*), welche bei einer Suche nach Kinesin-ähnlichen Proteinen in BY-2 Zellen mit degenerierten Primern gegen konservierte Bereiche innerhalb

der Motordomäne isoliert wurde (GenBank Zugangsnummer: AB053096.1; Matsui *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde eine Sequenzübereinstimmung von 79 % mit der vollständigen cDNA des bereits charakterisierten GhKCH2 aus *G. hirsutum* ermittelt (Xu *et al.*, 2007; 2009). Demnach stellte die hier isolierte Teilsequenz voraussichtlich die verlängerte Variante der TBK9-cDNA dar und kodiert für ein potenzielles KCH aus Tabak. Die bis dahin noch unbekanntenen 5'- und 3'-cDNA-Enden wurden im Anschluss über *RACE* vervollständigt. Damit gelang es die vollständige CDS, einen kurzen Teil der des nicht kodierenden Bereichs (UTR: *Untranslated region*) am 5'-Ende, sowie die gesamte 3'-UTR zu entschlüsseln. Anschließend wurden die genspezifischen Primer NtKCH\_fl-fw und NtKCH\_fl-rv (siehe Tabelle 16, Anhang) erstellt, mit denen die CDS des Kinesins aus unterschiedlichen, unabhängig voneinander erstellten BY-2 cDNA-Bibliotheken amplifiziert und sequenziert wurde (Abbildung 12b). Zusätzlich wurden unterschiedliche Primerpaare entworfen, die innerhalb der CDS binden. Mit ihrer Hilfe konnten überlappende Teilabschnitte der KCH-cDNA amplifiziert und zur anschließenden Sequenzierung isoliert werden konnten (siehe Abbildung 12a, c). Die cDNA kodiert für ein hypothetisches Protein aus 1001 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 110 kDa.

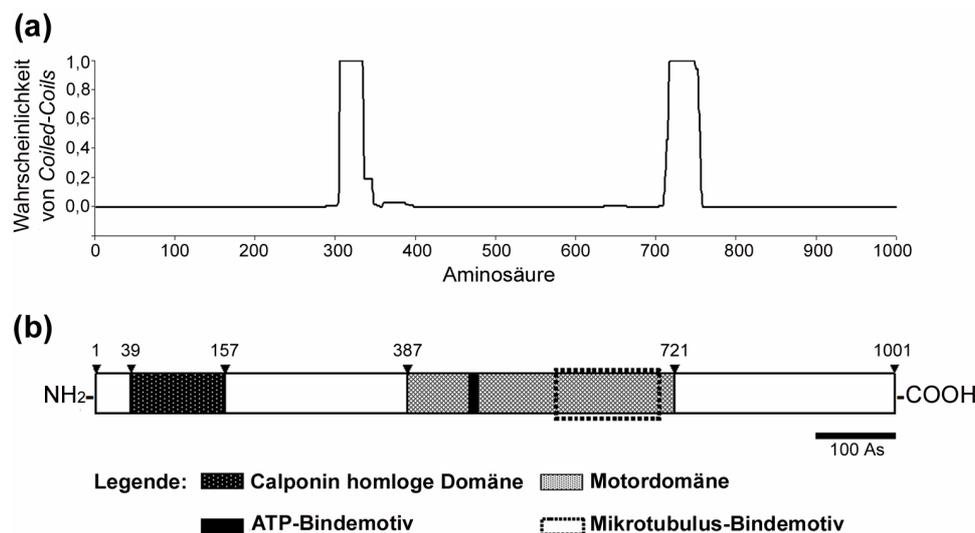


**Abbildung 12: Amplifikation und Sequenz-Bestimmung von NtKCH.** Die cDNA von NtKCH wurde vollständig und in überlappenden Teilabschnitten aus BY-2 Zellen amplifiziert. (a) Übersicht der erstellten Primerpaare zur vollständigen und sequenziellen Amplifikation der CDS. (b) Mithilfe von NtKCH\_fl-fw und NtKCH\_fl-rv (1), die jeweils im 5'- bzw. 3'-UTR der cDNA binden, konnte ein spezifisches 3216 bp-Fragment aus vier unterschiedlichen cDNA-Bibliotheken amplifiziert werden. (c) Mittels der dargestellten Primerpaare (2-6) wurden spezifische, überlappende Teilabschnitte des NtKCH-Gens aus BY-2 Gesamt-cDNA amplifiziert.

Es wurde als NtKCH für *Nicotiana tabacum* Kinesin mit Calponin homologer Domäne bezeichnet und kann unter der Zugangsnummer JF835913 in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; Stand: Oktober 2011) abgerufen werden.

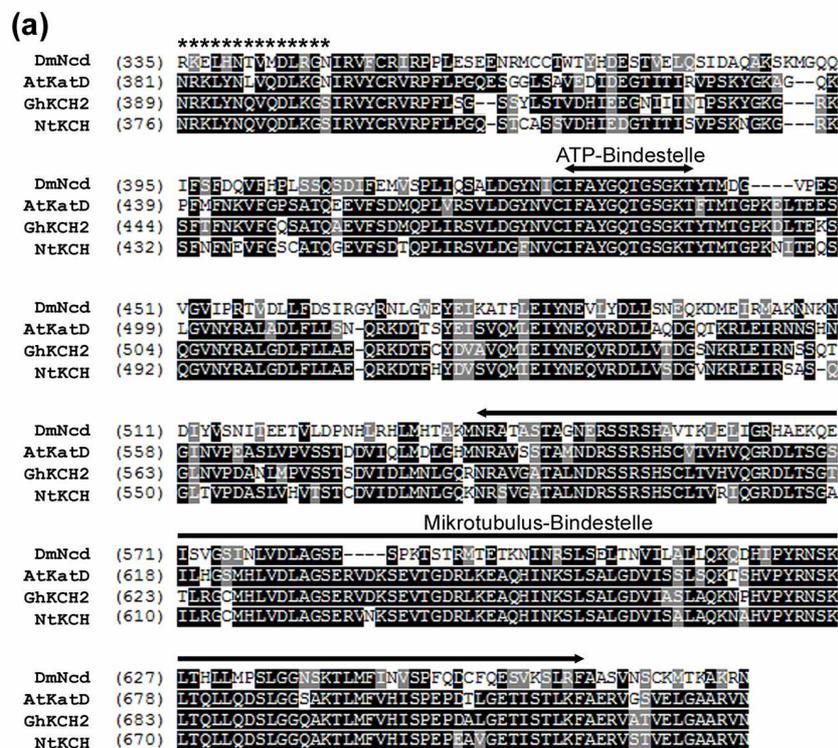
## 1.2. NtKCH besitzt alle strukturellen Merkmale eines KCHs

Im nächsten Schritt wurde der proteinkodierende Bereich der NtKCH-cDNA verschiedenen computergestützten Analysen unterzogen, um nach bereits bekannten Domänen und Sequenzmotiven zu suchen, und um Informationen über den genauen molekularen Aufbau des Proteins zu erhalten. Dabei galt es insbesondere, Hinweise für eine Zugehörigkeit zur KCH-Gruppe zu sammeln. Durch eine Sekundärstrukturanalyse in SMART konnte in der Mitte der Aminosäuresequenz, von Position 387 bis 721, eine unter allen Mitgliedern der Kinesin-Superfamilie hoch konservierte Motordomäne entdeckt werden (Abbildung 13b). Diese beinhaltet zwei besonders konservierte Bereiche. Die Abfolge  $_{467}\text{IFAYGQTGSGKT}_{478}$  entspricht dem Konsensusmotiv einer ATP-Bindetasche.  $_{589}\text{SSRSH}_{593}$ ,  $_{619}\text{DLAGSE}_{624}$  und  $_{662}\text{HVPYR}_{666}$  sind charakteristisch für eine Mikrotubulus-Binderegion (Yang *et al.*, 1989; Xu *et al.*, 2007). Der Vergleich der Motordomänen von NtKCH und GhKCH2 aus Baumwolle zeigte eine Übereinstimmung von 85 % (Abbildung 14a). Die beiden Motorregionen von NtKCH und AtKatD (Tamura *et al.*, 1999) sind noch zu 75 % homolog. Direkt N-terminal an die Motordomäne angrenzend, konnte in der NtKCH-Sequenz eine kurze 14 Aminosäuren umfassende Halsregion identifiziert werden (Abbildung 14a).



**Abbildung 13: Aufbau von NtKCH mit Coiled-Coil-Vorhersage.** (a) Voraussage möglicher Bereichen innerhalb der NtKCH-Sequenz, die zur Coiled-Coil-Bildung neigen. Die horizontale Achse repräsentiert die Aminosäureposition, die vertikale Achse die Wahrscheinlichkeit einer Coiled-Coil-Bildung. Potenzielle Coiled-Coils treten direkt vor (ungefähr bei As 300-360), sowie am Ende (ungefähr bei As 700-750) der Motodomäne auf. (b) Schematische Domänen-Zusammensetzung von NtKCH. Die isolierte cDNA kodiert für ein hypothetisches Polypeptid aus 1001 As mit zentral gelegener, konservierter Kinesin-Motordomäne. Die katalytische Domäne beinhaltet die Konsensusmotive zur Bindung von ATP und Mikrotubuli. Eine zusätzliche charakteristische CH Domäne ist im N-terminalen Bereich zu finden.

Diese weist sehr große Überstimmungen zu den Halsregionen von Kinesinen wie DmNcd (Walker *et al.*, 1990) oder AtKCBP (Song *et al.*, 1997) auf, die zum *minus*-Ende der Mikrotubuli laufen (Abbildung 14b). Im N-terminalen Bereich von NtKCH, an der Aminosäureposition 39 bis 157, wurde darüber hinaus eine CH Domäne gefunden. Die aus BY-2 Zellen isolierte cDNA kodiert somit für ein hypothetisches Protein, das alle charakteristischen Merkmale eines KCHs aufweist (Abbildung 13b). Eine weitere Sequenzanalyse in *COILS* zeigte zudem zwei Bereiche an, die mit hoher Wahrscheinlichkeit *Coiled-Coils* ausbilden. Sie liegen jeweils direkt vor und am C-Terminus der katalytischen Motordomäne (Abbildung 13a). Diese  $\alpha$ -helikalen Strukturen bestehen aus charakteristischen Heptapeptid-Wiederholungen und sind meist direkt an der Bildung von Protein-Dimeren oder -Oligomeren beteiligt (Lupas *et al.*, 1991).



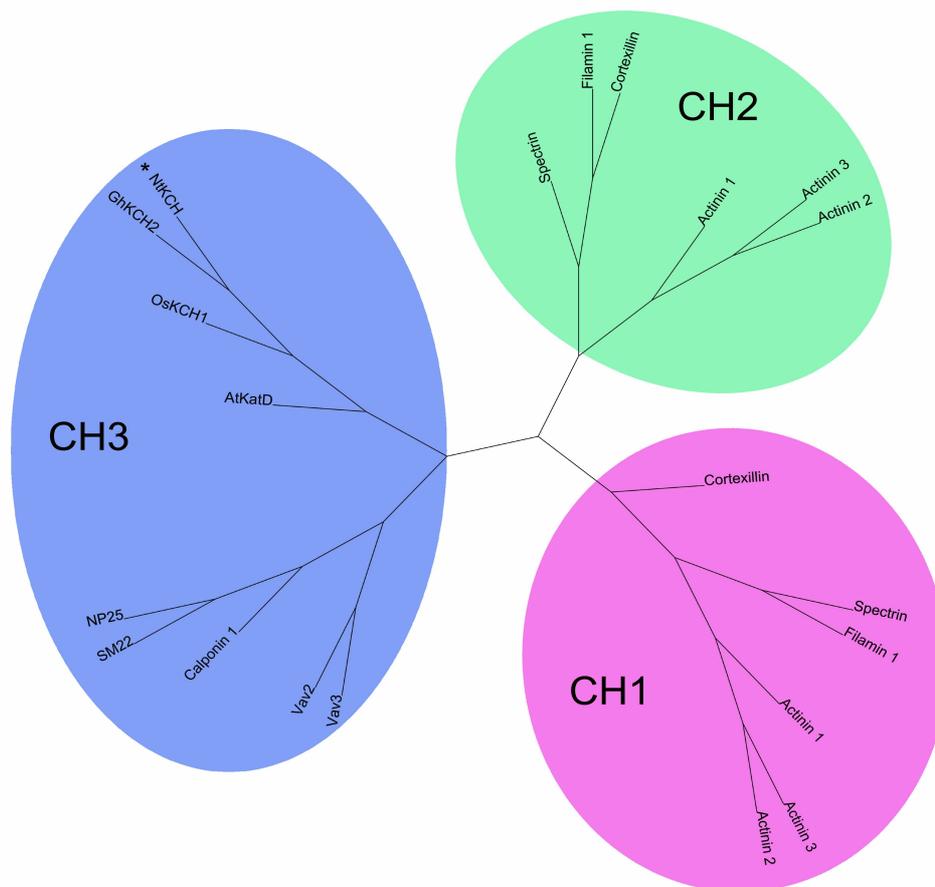
(b)

Kinesin	Halsregion	Position	Quelle
DmNcd	RKELHNTVMDLRGN	335-349	Walker <i>et al.</i> , 1990
ScKar3	RRILHNELQELRGN	373-387	Endow <i>et al.</i> , 1944
AtKCBP	RKRYNTIEDMKGK	875-889	Song <i>et al.</i> , 1997
NtKCH	NRKLYNQVQDLKGS	376-390	Diese Arbeit

**Abbildung 14: Vergleich der Motordomäne und Halsregion von NtKCH.** (a) Vergleich der Motordomänen von GhKCH2, AtKatD und DmNcd. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche grau. Die ATP- und die Mikrotubulus-Bindestellen wurden entsprechend mit Pfeilen über der Sequenz markiert. Die 14 Aminosäuren umfassende Halsregion vor der Motordomäne ist mit Sternchen hervorgehoben. (b) Die Tabelle vergleicht die Halsregion von NtKCH und tierischer sowie pflanzlicher Kinesine mit einer zum *minus*-Ende gerichteten Bewegung. NtKCH besitzt eine partiell konservierte Halsregion (grau unterlegt) mit den typischen Determinanten für *minus*-End-Direktionalität (dick hervorgehoben). Abkürzungen: At, *Arabidopsis thaliana*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Gh, *Gossypium hirsutum*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*.

### 1.3. NtKCH besitzt eine N-terminale Typ-3 CH Domäne

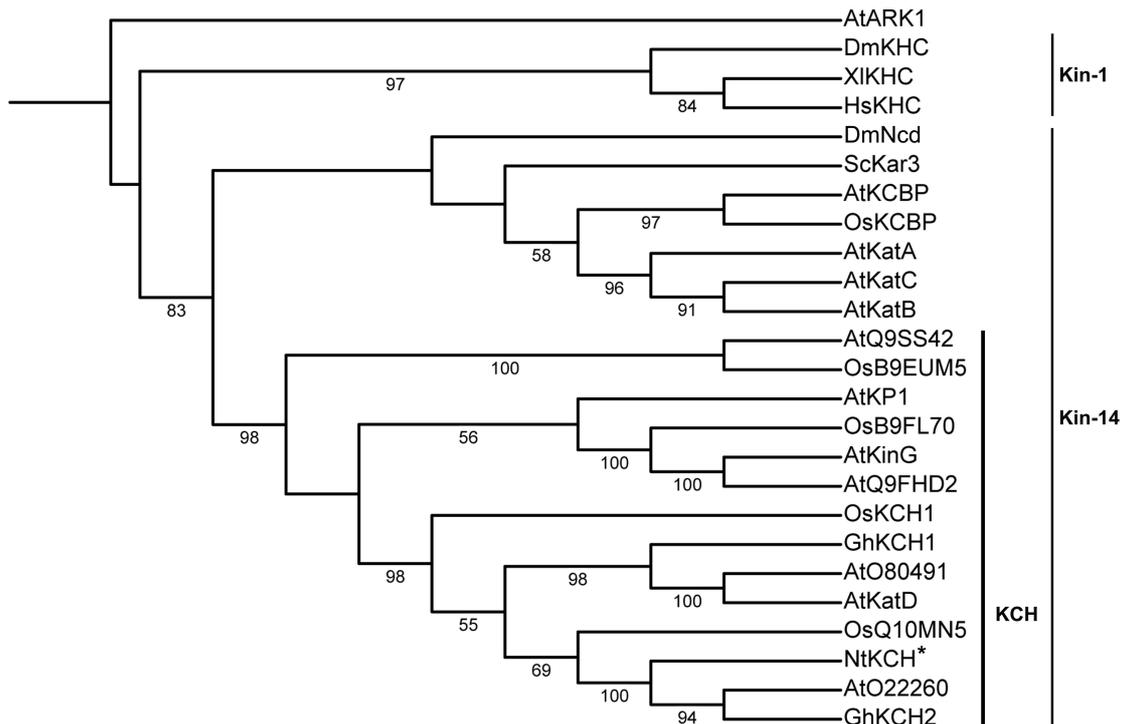
Die ungefähr 100 Aminosäuren umfassenden CH Domänen sind in zahlreichen Aktin-Binde- und Bündelungsproteinen wieder zu finden, wobei meist zwei hintereinander angeordnete CH Domänen eine ABD bilden. Darüber hinaus treten einzelne CH Domänen auch in einer Vielzahl von Signalproteinen auf, die selbst keine direkte Aktin-Bindefähigkeit aufweisen. Anhand von Vergleichen der Aminosäuresequenzklassen sich drei Hauptgruppen der CH Domänen unterscheiden. Typ-1 und Typ-2 CH Domänen bilden zusammen eine ABD. CH Domänen vom Typ-3 weisen *in-vitro* dagegen keine eigenständige Aktin-Bindeeigenschaften auf (Gimona & Mital, 1998; Gimona *et al.*, 2002). Im N-Terminus von NtKCH konnte eine einzelne CH Domäne entdeckt werden. Zur Überprüfung, ob sich die CH Domäne von NtKCH einer dieser drei Hauptgruppen zuordnen lässt wurde ein ungewurzelter phylogenetischer Stammbaum angefertigt. Hierzu wurden die CH Domänen von NtKCH und anderer KCHs mit den CH Domänen verschiedener tierischer Aktin-Bindeproteine und Signalproteine verglichen. Dies sollte Rückschlüsse auf eine mögliche Aktin-Bindefähigkeit des Kinesins erlauben. Wie Abbildung 15 zu entnehmen, spalten sich die unterschiedlichen CH Domänen wie erwartet in drei große Gruppen auf. Die Aktin-Bindeproteine  $\alpha$ -Actinin1 bis 3,  $\beta$ -Spectrin,  $\beta$ -Filamin und Cortexillin sind jeweils in zwei verschiedenen Gruppen vertreten, da sie zwei unterschiedliche CH Domänen vom Typ-1 und -2 in der ABD (siehe oben). Typ-3 CH Domänen sind typisch für Signalproteine wie NP25, Vav2, oder aber auch für Calponin selbst. Sie grenzen sich phylogenetisch deutlich von Typ-1 und -2 CH Domänen ab. NtKCH bildet zusammen mit den hier untersuchten KCHs aus *A. thaliana*, *G. hirsutum* und *O. sativa* eine eigene phylogenetische Gruppe, die sich am ehesten den Typ-3 CH Domänen zuordnen lässt. Dementsprechend sind die CH Domänen pflanzlicher KCHs am engsten mit den Typ-3 CH Domänen tierischer Signalproteine verwandt. Jedoch muss an dieser Stelle vermerkt werden, dass es neben den hier aufgeführten, noch zahlreiche weitere CH Domänen gibt, die sich keiner dieser drei Hauptgruppen zuordnen lassen. Darunter sind beispielsweise die vier hintereinander angeordneten CH Domänen pflanzlicher und tierischer Fimbrine, die wiederum als Aktin-Quervernetzungsproteine bekannt sind. Es ist zu vermuten, dass die CH Domänen der KCHs gemeinsam einen eigenen Typ bilden, der sich evolutionär von den Typ-3 CH Domänen getrennt entwickelt hat und womöglich die intrinsische Aktin-Bindefähigkeit beibehalten haben könnte.



**Abbildung 15: Vergleich der CH Domänen von NtKCH und anderer KCHs mit den CH Domänen tierischer Aktin-Bindeproteine und Signalproteinen.** Typ-1/2 CH Domänen (CH1/2):  $\alpha$ -Actinin1/2/3,  $\beta$ -Spectrin,  $\beta$ -Filamin, Cortexillin1; Typ-3 CH Domäne (CH3): NtKCH, GhKCH2, OsKCH1, Vav2/3, SM22, NP25, Calponin1. Cortexillin1 stammt aus *Dictyostelium discoideum*, alle weiteren tierischen CH Domäne-Proteine aus *Homo sapiens*.

#### 1.4. Phylogenetische Klassifizierung von NtKCH

Mithilfe einer weiteren Stammbaumanalyse wurde die Verwandtschaft von NtKCH zu anderen Kinesinen, insbesondere Vertretern der Kinesin-14 Familie, untersucht. Wie dem gewurzelten Stammbaum in Abbildung 16 zu entnehmen ist, ordnet sich das Tabak-Kinesin eindeutig der KCH-Gruppe zu. Vertreter dieser Kinesin-14 Untergruppe wurden bisher nur für höhere Pflanzen und Moose beschrieben (Richardson *et al.*, 2006). Die zuvor bereits angedeutete, enge Verwandtschaft zwischen NtKCH und GhKCH2 aus Baumwolle wird in der phylogenetischen Auswertung nochmals bestätigt (Xu *et al.*, 2007; 2009). Darüber hinaus ist NtKCH sehr homolog zu AtO22260 (AGI-Nummer: At2g47500), einem bisher nicht charakterisierten, potenziellen KCH aus *A. thaliana*. Zusammen bilden NtKCH, GhKCH2 und AtO22260 einen eigenen Verwandtschaftszweig, was eventuell auf eine gemeinsame Funktionalität hindeuten könnte.



**Abbildung 16: Phylogenetische Verwandtschaft von NtKCH.** Der Stammbaum zeigt die Verwandtschaft von NtKCH (durch ein Sternchen hervorgehoben) zu anderen Mitgliedern der KCH-Gruppe, sowie zu pflanzlichen und tierischen Vertretern der Kinesin-1 (Kin-1) und der Kinesin-14 (Kin-14) Familie. Die angegebenen Werte resultieren aus einer *Bootstrap*-Analyse mit 100 Wiederholungen, wobei nur Werte über 50 % angegeben sind. Abkürzungen: At, *Arabidopsis thaliana*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Gh, *Gossypium hirsutum*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Os, *Oryza sativa*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Hs, *Homo sapiens*; Xl, *Xenopus laevis*.

## 2. Fluoreszenzmikroskopische Lokalisationsstudien

Anhand der isolierten NtKCH-Sequenz war es möglich, *in-vivo* Lokalisationsstudien durchzuführen. In einem ersten Schritt wurden hierzu Fusionskonstrukte des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) mit NtKCH erstellt, die dann entweder transient oder stabil in Tabak BY-2 Zellen eingebracht wurden. Die GFP-NtKCH überexprimierenden Zellen wurden im Anschluss fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Durch die transienten Transformationen konnte getestet werden, ob die erstellten Fusionskonstrukte überhaupt in BY-2 Zellen exprimiert werden. Dabei konnte auch ein erster Eindruck über die Expressionsstärke und die intrazelluläre Verteilung des KCHs während der Interphase gewonnen werden. Zur Dokumentation der Lokalisation des Kinesins zu allen Zeitpunkten des Zellzyklus, vor allem während der Mitose, wurden stabil transformierte BY-2 Zellen verwendet. Diese exprimieren das GFP-NtKCH-Konstrukt unter Kontrolle eines *CaMV-35S*-Promotors konstitutiv. Anhand der transgenen Zellen gelang es auch, Informationen über die Eigendynamik des Kinesins sowie über seine Direktionalität zu sammeln. Durch TRITC-Phalloidin-Färbungen der Aktinfilamente sowie Immunfluoreszenzfärbungen der Mikrotubuli der fixierten GFP-NtKCH Überexpressionszellen wurde geprüft, ob und mit welchen

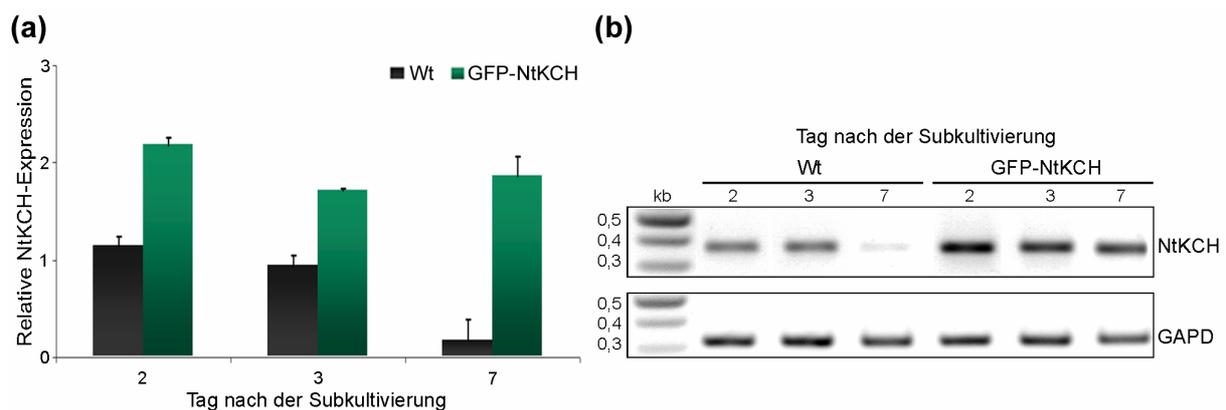
Zellskelettstrukturen das Kinesin kolokalisiert. Es wurde zudem eine weitere stabil transformierte Zelllinie generiert, welche das GFP-NtKCH Konstrukt zusammen mit einem fluoreszenten Aktinfilament-Markerprotein koexprimiert. Diese Linie diente dem direkten *in-vivo* Nachweis der Zellskelettfärbungen an fixierten Zellen und erlaubte darüber hinaus, die von der Zellzyklusphase abhängige Neuverteilung des Kinesins hinsichtlich unterschiedlicher Aktinfilament-Netzwerke in lebenden Zellen mit zu verfolgen. Zudem wurde diese Zelllinie mit verschiedenen Zellskelettgiften behandelt, um zu prüfen, ob die Lokalisation zu Aktinfilamenten und Mikrotubuli in direktem Zusammenhang mit der Integrität dieser Filamente steht. In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde der Frage nachgegangen, welche Domänen von NtKCH die unterschiedliche Lokalisation an Aktinfilamente und/oder Mikrotubuli vermitteln. Hierzu wurden Fusionen des rot fluoreszierenden Proteins (RFP) an die vollständige CDS, sowie an gekürzte Fragmente von NtKCH erstellt, die im Folgenden entweder allein, oder zusammen mit dem Mikrotubuli-Marker MAP4-MBD-GFP transient in BY-2 Zellen geschossen wurden.

## **2.1. Transiente und stabile Transformationen fluoreszenter GFP-NtKCH-Fusionskonstrukte in BY-2 Zellen**

Um einen allgemeinen Überblick über die intrazelluläre Verteilung von NtKCH zu gewinnen, wurden sowohl N- als auch C-terminal GFP-fusionierte NtKCH-konstrukte erstellt. Diese wurden mithilfe von Partikelbombardements in BY-2 Zellen eingebracht. Je nach Lage des Fluoreszenzmarkers kann die Wechselwirkung des Zielproteins mit intrazellulären Interaktionspartnern sterisch behindert werden, was eine diffuse, oft zytoplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins zur Folge hat. Eine solche, unspezifische Lokalisation wurde insbesondere nach der Transformation der C-terminalen GFP-Fusion beobachtet. Auch das N-terminale Fusionskonstrukt war zunächst diffus verteilt, was jedoch nicht auf eine sterische Hinderung, sondern auf die Überexpression des Fusionsproteins zurückzuführen war. Durch die Überexpression waren die Bindestellen intrazellulärer Interaktionspartner mit dem Fusionsprotein übersättigt, sodass dessen Überschuss ungebunden im Zytoplasma vorliegt. Ein solches Überexpressionsartefakt ist meist dann zu beobachten, wenn das Zielprotein unter natürlichen Bedingungen in nur sehr geringen Mengen vorkommt. Im Falle der transienten Transformation der N-terminalen GFP-Fusion (GFP-NtKCH-tr) konnte durch eine Verkürzung der Ruhephase nach den Partikelbombardements von 16 h auf 8 h, das Expressionsniveau soweit herabgesetzt werden, dass ein spezifisches Lokalisationsmuster in Erscheinung trat.

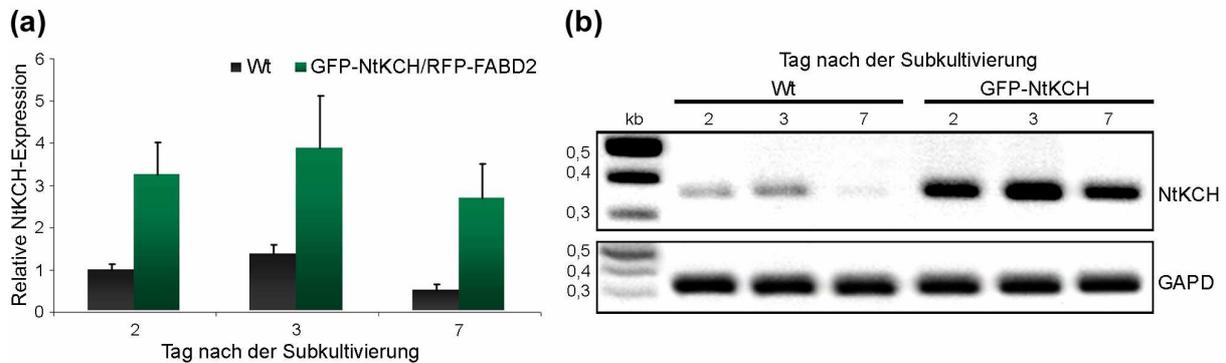
Anhand der transienten transformierten Zellen konnte jedoch nur die intrazelluläre Verteilung während der Interphase untersucht werden, was in der verhältnismäßig geringen Transformationsrate begründet ist, die durch Partikelbombardements erreicht wird. Um die

Lokalisation des Kinesins auch während der Zellteilung untersuchen zu können, wurde eine BY-2 Zelllinie generiert, welche eine GFP-NtKCH Fusion konstitutiv exprimiert. Hierzu wurde ein binäres Vektorkonstrukt erstellt, welches anschließend mithilfe der weiterentwickelten *TAMBY2*-Methode stabil in die Zellen eingebracht wurde. Aufgrund der Erfahrungen mit den transienten Fusionskonstrukten wurde die NtKCH-Sequenz in einen Zielvektor für N-terminale GFP-Fusion (GFP-NtKCH) übertragen. Zur Verifizierung der konstitutiven Überexpression wurde eine semiquantitative Transkriptionsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde der NtKCH-mRNA-Gehalt in den transgenen Zellen an verschiedenen Tagen nach der Subkultivierung gemessen, und mit dem Gehalt des Wildtyps verglichen. Wie Abbildung 17 zeigt, lag die NtKCH-Expression in der GFP-NtKCH Zelllinie an allen Tagen um ein Vielfaches über der Expression im Wildtyp. Am deutlichsten war der Unterschied an Tag sieben des Kultivierungszyklus zu beobachten, an dem NtKCH-mRNA im Wildtyp kaum nachgewiesen werden konnte. In der Überexpressionslinie wurde sie fast genauso stark transkribiert, wie an den Tagen zuvor. Es handelt sich folglich eindeutig um eine Überexpressionslinie. Um herauszufinden, ob und mit welchen Aktinfilamenten das KCH im Verlauf des Zellzyklus kolokalisiert wurde eine zweite transgene Tabak BY-2 Zelllinie erstellt, welche sowohl das GFP-NtKCH Konstrukt als auch eine N-terminale Fusion von RFP an die Aktin-Bindedomäne 2 von Fimbrin (RFP-FABD2) koexprimiert. Auch diese Zelllinie wurde vor der mikroskopischen Auswertung zunächst anhand einer semiquantitativen Transkriptionsanalyse auf die Überexpression des NtKCH-Fusionskonstrukts getestet (Abbildung 18). Das durchschnittliche Transkriptionsniveau von NtKCH in den doppelt transformierten Zellen übertraf an allen gemessenen Tagen das der Wildtyp-Zellen.



**Abbildung 17: GFP-NtKCH Zellen weisen eine deutlich erhöhte NtKCH-Expression gegenüber den Wildtyp-Zellen auf.** (a) Semiquantitative Auswertung der relativen NtKCH-Expression der transgenen GFP-NtKCH Zelllinie im Vergleich zum untransformierten Wildtyp. Das relative Expressionsniveau bezieht sich jeweils auf die Expression an Tag eins im Wildtyp. Die Mittelwerte und Standardfehler errechnen sich jeweils aus drei unabhängigen Probenreihen. (b) Ein repräsentatives Gelbild der NtKCH-Expression (obere Bandenreihe). Die untere Bandenreihe zeigt die Expression von GAPD, welche als Ladekontrolle und interner Standard in den semiquantitativen Auswertungen verwendet wurde.

Der größte Unterschied der NtKCH-Transkription war an Tag drei nach Subkultivierung zu verzeichnen, an dem die Expression im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor vier erhöht war. Die Lokalisationsuntersuchungen beider transgenen Zelllinien werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

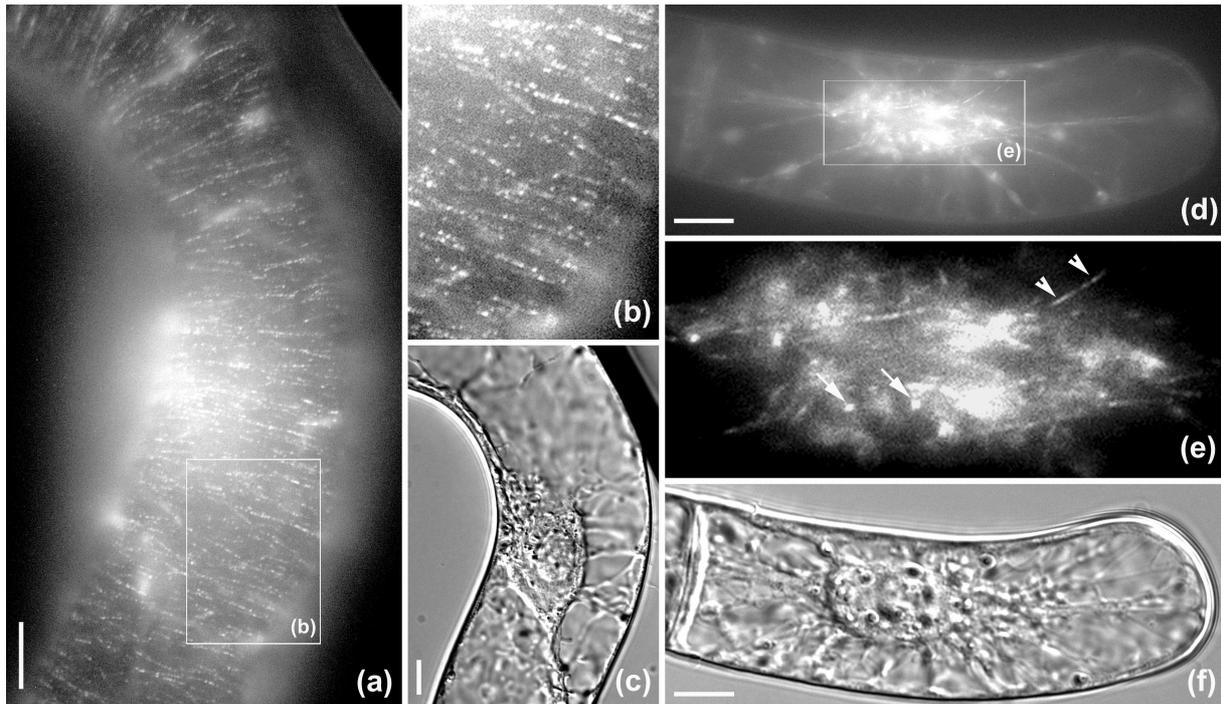


**Abbildung 18: In der GFP-NtKCH/RFP-FABD2 Zelllinie sind deutlich mehr NtKCH-Transkripte nachweisbar als in der Wildtyp-Kontrolle.** (a) Semiquantitative Auswertung der relativen NtKCH-Expression. Verglichen wurde der Wildtyp mit BY-2 Zellen, die das GFP-NtKCH- und das RFP-FABD2-Konstrukt koexprimieren. Das relative Expressionsniveau bezieht sich jeweils auf die Expression an Tag eins im Wildtyp. Die angegebenen Mittelwerte und Standardfehler errechnen sich jeweils aus drei unabhängigen Probenreihen. (b) Ein repräsentatives Gelbild der RT-PCR mit spezifischen Primern gegen NtKCH und den internen GAPD-Standard.

## 2.2. Lokalisation von NtKCH während der Interphase

Im Folgenden wird das Verteilungsmuster von GFP-NtKCH in stabil transformierten BY-2 Zellen beschrieben. Aufnahmen transient transformierter Zellen sind in der Abbildung 22b, c in Kapitel 2.2.3 dargestellt. Die fluoreszenzmikroskopischen Auswertungen aller Interphasezellen ergaben ein identisches Lokalisationsmuster, unabhängig davon, ob GFP-NtKCH transient oder stabil überexprimiert wurde.

Dabei wurde punktförmiges GFP-NtKCH hauptsächlich entlang transvers orientierter, kortikaler Filamente beobachtet (Abbildung 19a, b). Im Zellinneren konzentrierte sich die Verteilung auf den perinukleären Bereich, wobei die GFP-Signale filamentartige Strukturen dekorierten, die zusammen ein dichtes korbähnliches Geflecht um den Zellkern bildeten (Abbildung 19d, e). Einige sehr schwach fluoreszierende Punkte konnten darüber hinaus auf Filamenten gesichtet werden, die vom Kern zur Zellperipherie zogen (Abbildung 19e, Pfeilspitzen). Bei genauerer Betrachtung konnten im Zellinneren zwei Gruppen von GFP-Signalen anhand ihrer Form unterschieden werden. Neben den im Umriss sehr klar definierten, punktförmigen Signalen, die oft dicht hintereinander entlang einzelner Filamente aufgereiht waren (Abbildung 19e, Pfeilspitzen), konnten vor allem direkt um den Zellkern oft großflächige, intensiv fluoreszierende „Flecken“ (Abbildung 19e, Pfeile) beobachtet werden.



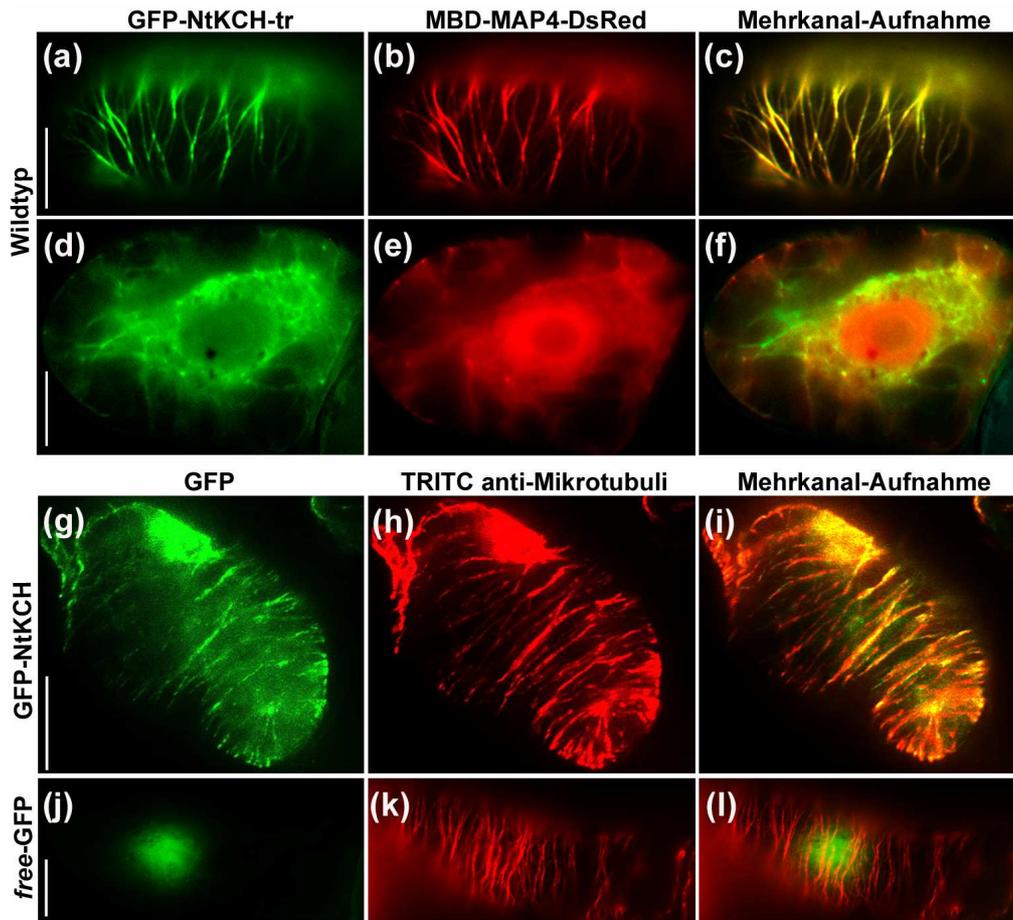
**Abbildung 19: Intrazelluläre Lokalisation von GFP-NtKCH während der Interphase.** Repräsentative Aufnahmen des Zellkortex (a-c) und des perinukleären Bereichs (d-f) von Zellen, die GFP-NtKCH konstitutiv exprimieren. Die entsprechenden DIK-Aufnahmen sind in (b) und (f) dargestellt. Detailaufnahmen sind in (b) und (e) gegeben. Maßstab: 10 µm.

### 2.2.1. NtKCH dekoriert transvers-kortikale Mikrotubuli

Im Folgenden wurde anhand unterschiedlicher experimenteller Vorgehensweisen der Frage nachgegangen, an welche Filamente NtKCH im Zellkortex und im perinukleären Bereich von BY-2 Zellen kolokalisierte. In einem ersten Schritt wurde hierzu das Konstrukt GFP-NtKCH-tr zusammen mit MBD-MAP4-DsRed transient via Partikelbombardement in BY-2 Wildtyp-Zellen eingebracht. MBD-MAP4-DsRed ist eine C-terminale Fusion des rot fluoreszierenden DsRed-Proteins an die Mikrotubulus-Bindedomäne des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 4 (MAP4) und diente der Markierung der Mikrotubuli (Marc *et al.*, 1998). Fluoreszenzaufnahmen erfolgreich transformierter, repräsentativer Zellen sind in den Abbildung 20a-f gegeben. Insbesondere in der Mehrkanal-Aufnahme (Abbildung 20c) erkennbar, kolokalisierte NtKCH während der Interphase eindeutig mit den fluoreszent gefärbten, kortikalen Mikrotubuli. Im Zellinneren assoziierte GFP-NtKCH dagegen meist an Filamente, die vom Mikrotubuli-Marker weitestgehend ausgespart blieben. Das Kinesin konnte dabei innerhalb eines dichten perinukleären Filament-Netzwerks beobachtet werden, dessen Ausläufer innerhalb transvakuolärer Zytoplasmastränge zur Peripherie zogen (Abbildung 20d-f).

Im nächsten Schritt wurden die stabil transformierten GFP-NtKCH Überexpressionszellen fixiert und über indirekte Immunofluoreszenz die Mikrotubuli markiert. Hierzu wurden die primären Antikörper ATT und DM1A, sowie an TRITC gekoppelte, sekundäre Antikörper verwendet. Auch hier waren in Interphasezellen punktartige GFP-Signale entlang der

kortikalen Mikrotubuli zu beobachten (Abbildung 20g-i). In Kontrollversuchen wurde die Antikörperfärbung sowohl an BY-2 Wildtyp-Zellen (nicht gezeigt), als auch an *free*-GFP Zellen (Abbildung 20j-k), welche unfusioniertes GFP exprimieren, wiederholt. Dabei waren im Kortex keine GFP-Signale entlang der Mikrotubuli zu erkennen, was zeigt, dass die zuvor beobachtete Kolo-kalisation von GFP-NtKCH und den kortikalen TRITC gefärbten Mikrotubuli spezifisch ist und nicht auf artifizieller Hintergrundfluoreszenz oder unspezifischen Bindungen beruht.

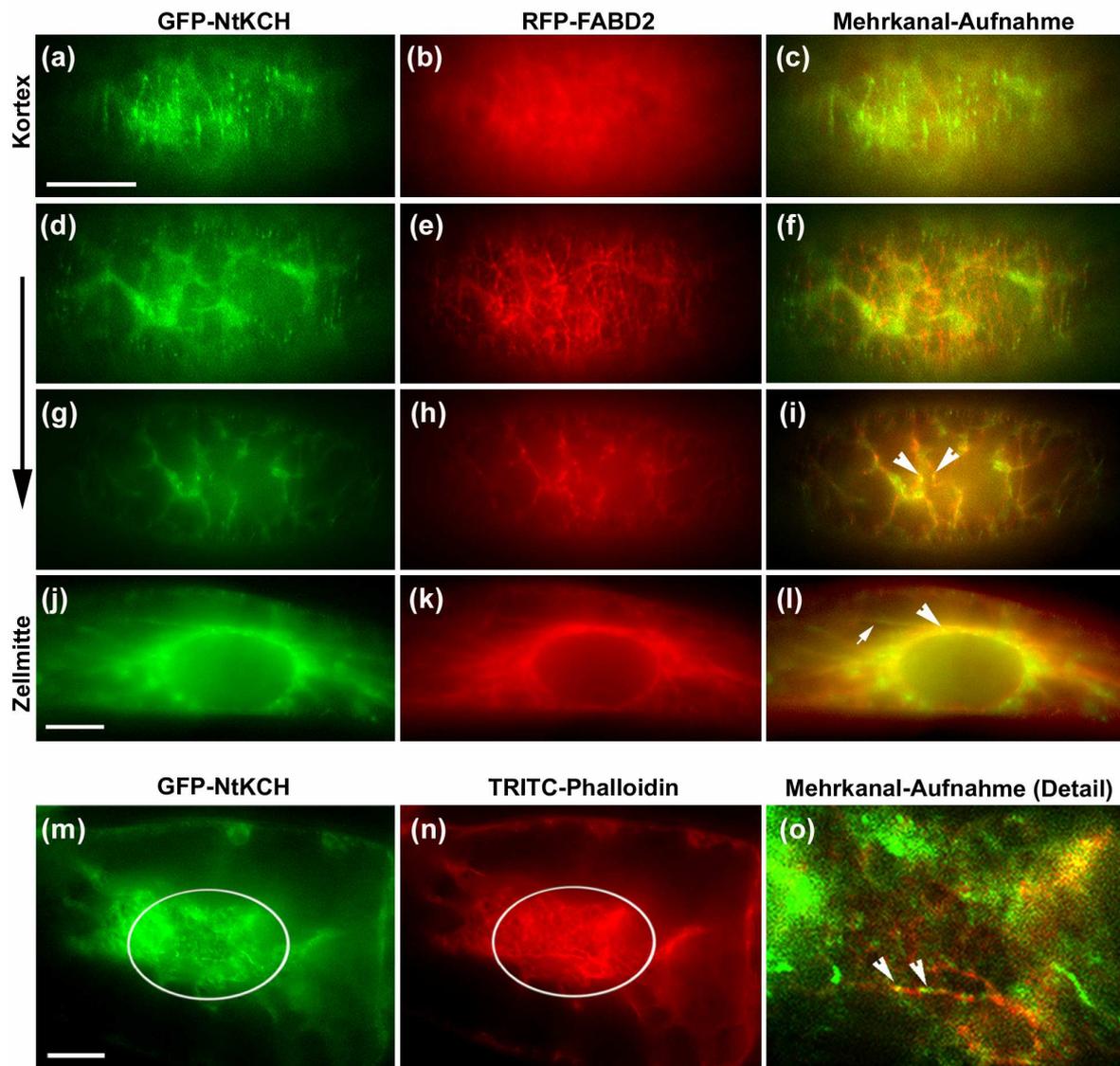


**Abbildung 20: GFP-NtKCH lokalisiert während der Interphase an kortikale Mikrotubuli.** (a-f) BY-2 Wildtyp-Zellen wurden mit GFP-NtKCH-tr (a, d) und MAP4-MBP-DsRed (b, e) kotransformiert. (a-c) Aufnahme des Zellkortex sowie der Medianebene (d-f) kotransformierter Zellen. Die Mehrkanal-Aufnahmen sind in (c) und (f) gegeben. (g-l) Immunofluoreszenzfärbung der Mikrotubuli (h, k) einer fixierten GFP-NtKCH Zelle (g) und einer *free*-GFP (j) exprimierenden Zelle. Die Mehrkanal-Aufnahmen sind in (i) und (l) dargestellt. Zur näheren Beschreibung der Abbildungen siehe Text in Kapitel 2.2.1. Maßstab: 10  $\mu$ m.

### 2.2.2. NtKCH kolokalisiert mit perinukleären Aktinfilamenten

Im nächsten Schritt wurde der Frage nachgegangen, ob das Tabak-KCH auch an Filamente des Aktin-Netzwerks lokalisiert. Hierzu wurde die doppelt transformierte GFP-NtKCH/RFP-FABD2 Zelllinie untersucht. Zunächst wurde geprüft, ob das Kinesin mit den Aktinfilamenten des Zellkortex kolokalisiert. Die in Abbildung 21a-l aufgeführten Fluoreszenzaufnahmen zeigen unterschiedliche Schnittebenen durch GFP-NtKCH/RFP-FABD2 überexprimierende

Zellen. Im äußersten kortikalen Bereich (Abbildung 21a-c) lassen sich die bereits bekannten, punktierten GFP-NtKCH-Signale erkennen, die sich auf den senkrecht zur Zellachse verlaufenden Filamenten aufreihen. Im RFP-Kanal der gleichen Schnittebene war dagegen nur ein diffuses Hintergrundsignal zu beobachten (Abbildung 21b). Erst in einer tieferen optischen Schnittebene wurde das kortikale Aktinfilament-System sichtbar (Abbildung 21e).



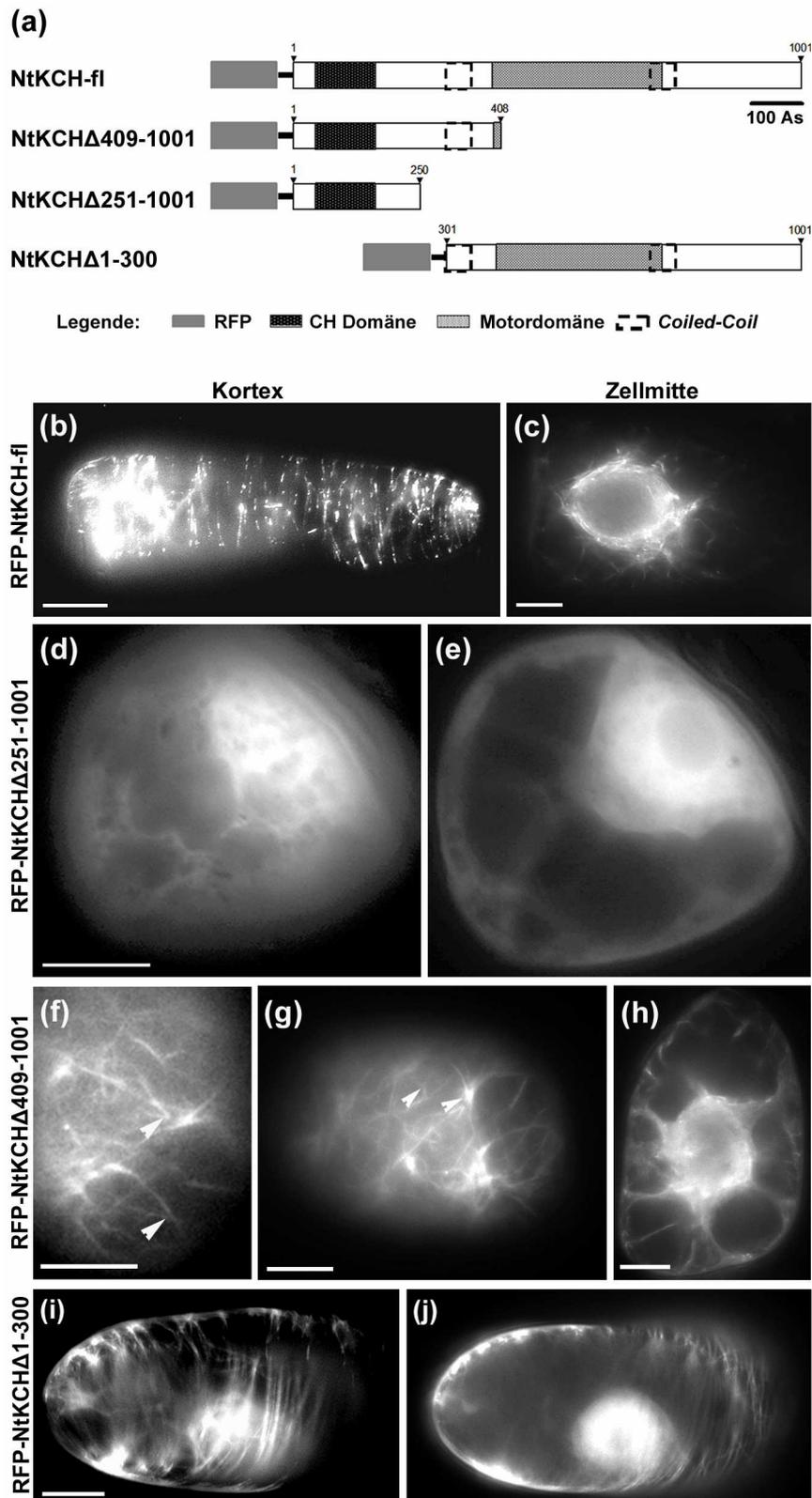
**Abbildung 21: NtKCH lokalisiert ausschließlich an kernnahe Aktinfilamente:** (a-l) Dargestellt sind optische Schnittebenen durch eine BY-2 Zelle, die GFP-NtKCH (a, d, g) und RFP-FABD2 (b, e, h) koexprimiert. Die Mehrkanal-Aufnahmen sind in (c, f, i) gegeben. Die obere Bildreihe (a-c) zeigt die äußerste kortikale Region, die darunter angeordneten Bildreihen (d-f, g-i) tiefer gelegene optische Schnittebenen. Die Pfeile in der Mehrkanal-Aufnahme (i) heben Überlagerungen der GFP- und RFP-Fluoreszenz nahe dem Zellkern hervor. Die Bildreihe (j-k) zeigt die Aufnahme der Medianebene einer zweiten kotransformierten Zelle. In der Mehrkanalaufnahme (l) ist GFP-NtKCH auf perinukleären Aktinfilamenten durch eine Pfeilspitze markiert. Der Pfeil hebt GFP-NtKCH hervor, das auf radialen Filamenten beobachtet wurde, die von der FABD2-RFP-Färbung ausgespart blieben. (m-o) Eine TRITC-Phalloidin-Färbung der Aktinfilamente (n) an GFP-NtKCH Zellen (m) bestätigte die Kolokalisation von NtKCH mit perinukleären Aktinfilamenten (Detail-Aufnahme in (o); Pfeilspitzen). Der ovale Ausschnitt in (m, n) entspricht der Lage des Zellkerns. Maßstab: 10 µm.

Die Mehrkanal-Aufnahme zeigt, dass sich GFP-NtKCH hier nicht an die RFP-FABD2 gefärbten Aktinfilamente anlagert (Abbildung 21f). Im Zellinneren konnten dagegen Kolokalisationsereignisse mit den FABD2 gefärbten Aktinfilamenten beobachtet werden. GFP-NtKCH lokalisierte dabei vereinzelt an F-Aktin innerhalb transvakuolärer Zytoplasmastränge (Abbildung 21i; Pfeilspitzen). Die Aufnahmen der Medianebene einer anderen GFP-NtKCH/RFP-FABD2-Zelle zeigen jedoch, dass GFP-NtKCH hauptsächlich an die perinukleären Aktinfilamente lokalisierte (Abbildung 21l, Pfeilspitze). Diese Fluoreszenzsignale im kernnahen Bereich erschienen besonders intensiv zu leuchten und unterschieden sich deutlich von den Signalen auf radialen und kortikalen Filamenten. Häufig wurde intrazelluläres GFP-NtKCH jedoch auch auf radialen Filamenten beobachtet, die nicht von dem Aktin-Markerprotein RFP-FABD2 gefärbt wurden (Abbildung 21l; Pfeil). Die Kolokalisation von NtKCH mit dem perinukleären Aktinfilament-Netzwerk wurde zusätzlich zu den *in-vivo* Untersuchungen in einer TRITC-Phalloidin färbung an fixierten GFP-NtKCH Überexpressionszellen geprüft (Abbildung 21m-o). Auch hier war das KCH eindeutig auf den mit TRITC gefärbten Aktinfilamenten um den Kern sichtbar (Abbildung 21o; Pfeilspitzen). Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass GFP-NtKCH während der Interphase nicht an Filamente des kortikalen Aktinfilament-Netzwerks lokalisierte. Es konnte hingegen eine deutliche Kolokalisation mit F-Aktin in der Zellmitte nachgewiesen werden. Dabei wurde das Kinesin vereinzelt auf radialen Filamenten innerhalb der transvakuolären Zytoplasmastränge beobachtet. Das meiste an Aktin assoziierte GFP-NtKCH konnte jedoch auf Filamenten beobachtet werden, die ein dichtes, korbähnliches Geflecht um den Kern bildeten.

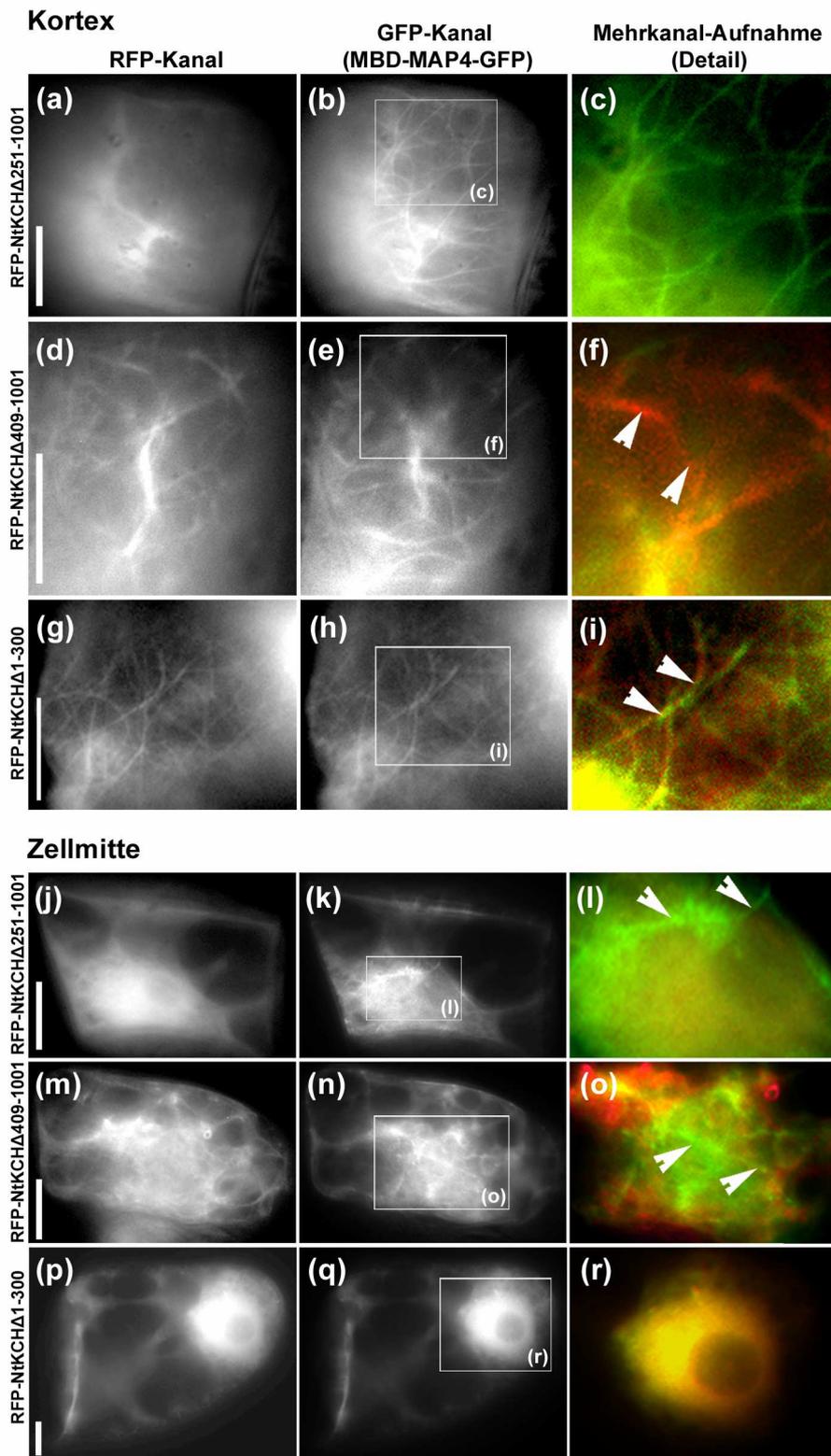
### **2.2.3. Die Lokalisation von NtKCH auf Mikrotubuli und Aktinfilamenten wird durch unterschiedliche Domänen vermittelt**

Wie beschrieben, wurde NtKCH während der Interphase hauptsächlich entlang kortikaler Mikrotubuli aber auch im perinukleären Aktin-Netzwerk beobachtet. Das Kinesin könnte dabei die Mikrotubuli über eine vorhandene Motordomäne binden. Eine Interaktion mit den Aktinfilamenten könnte dagegen über die N-terminal gelegene CH Domäne vermittelt werden. Um zu prüfen, von welchen Domänen die Lokalisation an die verschiedenen Filamentarten abhängig ist, wurde RFP N-terminal an vier verschiedene Längenvarianten von NtKCH fusioniert. Dabei umfasst RFP-NtKCH-tr die gesamte CDS von NtKCH (As 1-1001). RFP-NtKCH $\Delta$ 251-1001 schließt nur einen kurzen Teil des N-Terminus bis zum ersten *Coiled-Coil* ein, während RFP-NtKCH $\Delta$ 1-300 den C-Terminus inklusive der Motordomäne umfasst (Abbildung 22a). Alle Konstrukte wurden entweder einzeln (Abbildung 22b-j) oder zusammen mit dem Mikrotubuli-Marker MBD-MAP4-GFP (Abbildung 23) durch Partikelbombardements in BY-2 Wildtyp-Zellen eingebracht.

Die Kotransformation eines vollständigen NtKCH-Fusionskonstrukts mit MBD-MAP4-Marker wurde bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben und wird deswegen hier nicht erneut aufgeführt. Wie aus Abbildung 22 ersichtlich, entspricht auch die intrazelluläre Verteilung der RFP-Fusion an NtKCH, dem bereits bekannten Muster, wobei punktartige Fluoreszenzsignale an kortikale (Abbildung 22b), sowie an perinukleäre und radiale Filamente im Zellinneren assoziiert vorliegen (Abbildung 22c). Durch die transiente Expression der gekürzten Fusionskonstrukte ergab sich jedoch, in Abhängigkeit des jeweils verwendeten Konstrukts, ein unterschiedliches Lokalisationsmuster. Das kürzeste Konstrukt, RFP-NtKCH $\Delta$ 251-1001, wurde im Gegensatz zum RFP-NtKCH-fl vollkommen zytoplasmatisch exprimiert (Abbildung 22d, e) und kolokalisierte nicht mit Filamenten des Zellskeletts (Abbildung 23a-c, j-l). Anders verhielt sich dagegen RFP-NtKCH $\Delta$ 409-1001, das zusätzlich noch die erste *Coiled-Coil*-Region beinhaltet. Es wurde sowohl im Kortex (Abbildung 22f) als auch im Zellinneren (Abbildung 22g, h) entlang filamentartiger Strukturen vorgefunden. Diese Filamente unterschieden sich jedoch eindeutig von den Mikrotubuli, aufgrund der Y-förmigen Verzweigungen, die charakteristisch für das Aktin-Netzwerk sind (Abbildung 22f, g; Pfeilspitzen). Zudem wurden diese Filamente in kotransformierten Zellen nicht von dem verwendeten Mikrotubuli-Marker erfasst (Abbildung 23d-f, m-o; Pfeilspitzen in f, o), wonach es sich hierbei um Aktinfilamente handelt. Interessanterweise assoziierte RFP-NtKCH $\Delta$ 409-1001 ausnahmslos an alle Interphase-typischen Strukturen des Aktinfilament-Systems, während das vollständige Kinesin in den vorherigen Experimenten nur mit perinukleären und nicht mit kortikalen Aktinfilamenten kolokalisierte. Zudem wurde dieses Konstrukt nicht punktartig exprimiert, sondern bedeckte radiale und kortikale Aktinfilamente auf der gesamten Länge. RFP-NtKCH $\Delta$ 1-300 war dagegen hauptsächlich in der Zellperipherie zu finden, wo es entlang dicker Filamentbündel lokalisierte, bei denen es sich aufgrund ihrer einheitlichen, senkrecht zur Zellachse verlaufenden Anordnung um kortikale Mikrotubuli handelt (Abbildung 22i). Im perinukleären Bereich wurde RFP-NtKCH $\Delta$ 1-300 etwas diffuser exprimiert (Abbildung 22j). Die Kotransformation mit dem Mikrotubuli-Marker zeigte jedoch deutlich, dass das Motordomänen-Konstrukt sowohl mit kortikalen (Abbildung 23g-i; Pfeilspitzen in i), aber teilweise auch an perinukleäre und radiale Mikrotubuli kolokalisierte (Abbildung 23p-r). Auch dieses Konstrukt wurde in den untersuchten Zellen nicht punktartig exprimiert, sondern markierte kortikale Mikrotubuli, genauso wie der eingesetzte MBD-MAP4-Marker, lückenlos auf voller Länge.



**Abbildung 22: Die Bindung von NtKCH an Aktinfilamente oder Mikrotubuli wird über verschiedene Domänen vermittelt.** (a) Übersicht über die vier N-terminalen RFP-Fusionen an vier unterschiedliche Längenvarianten von NtKCH. (b-j) Transiente Expression der Fusionskonstrukte in BY-2 Zellen. Die Bilder in (b, d, f, i) zeigen Aufnahmen des Zellkortex, die Bilder in (c, e, g, h, j) die Zellmitte. Während RFP-NtKCHΔ251-1001 vollkommen zytoplasmatisch exprimiert wird, ist RFP-NtKCHΔ409-1001 auf allen Interphase-typischen Aktinfilament-Strukturen zu beobachten. RFP-NtKCHΔ1-300 mit der zentral angeordneten Kinesin-Motordomäne bedeckt dagegen kortikale Mikrotubuli auf voller Länge. Zur näheren Beschreibung siehe Text in Kapitel 2.2.3. Maßstab: 10 µm.

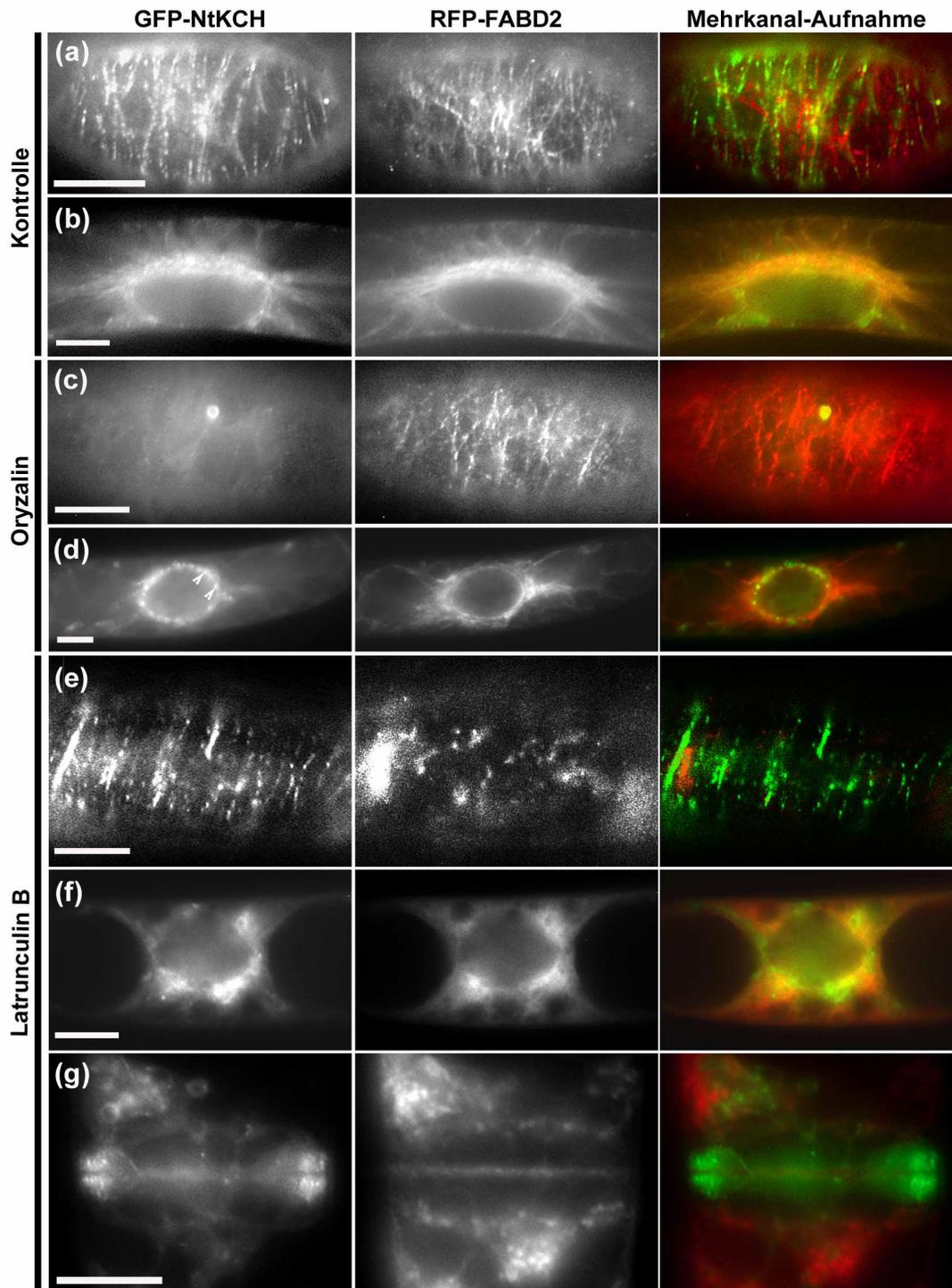


**Abbildung 23: Transiente Kotransformation gekürzter RFP-NtkCH-Fusionen mit MBD-MAP4-GFP in BY-2 Wildtyp-Zellen.** Während RFP-NtkCHΔ251-1001 vollkommen zytoplasmatisch exprimiert wird, lokalisieren RFP-NtkCHΔ409-1001 und RFP-NtkCHΔ1-300 mit unterschiedlichen Filamentarten des Zellskeletts. Die entsprechenden Fluoreszenzkanäle sind über der Abbildung angegeben. Bei Abbildung (c, f, i) handelt es sich um Detail-Ansichten der Mehrkanal-Aufnahmen. Zur näheren Beschreibung der einzelnen Bilder siehe Text in Kapitel 2.2.3. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

#### 2.2.4. Wirkstoffbehandlungen mit Latrunculin B und Oryzalin bestätigen die unterschiedliche Lokalisation von NtKCH an verschiedene Interphase-Zellskelettstrukturen

Den bisherigen Resultaten zufolge lokalisierte NtKCH während der Interphase im Zellkortex mit Mikrotubuli, jedoch nicht mit Aktinfilamenten. Im Zellinnern war dagegen auch eine Kolokalisation des Kinesins mit perinukleären Aktinfilamenten zu beobachten. Um zu testen, ob diese unterschiedliche Lokalisation in direkter Abhängigkeit zur Integrität beider Filamentarten steht, wurden doppelt transformierte GFP-NtKCH/RFP-FABD2 Zellen einer Behandlung mit Oryzalin oder mit Latrunculin B unterzogen. Veränderungen der NtKCH-Verteilung wurden anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das Dinitroanilin-Herbizid Oryzalin ist hoch affin gegenüber freien Tubulin-Dimeren, mit denen es Tubulin-Oryzalin-Komplexe bildet und somit die Neupolymerisation der Mikrotubuli verhindert (Hugdahl & Morejohn, 1993). Latrunculin B, das Gift des marinen Schwamms *Latrunculia magnifica*, hemmt die Aktinfilament-Neupolymerisation, indem es freies monomeres Aktin abfängt (Coué *et al.*, 1987). Aufgrund der sekundenschnellen Bleichung der GFP-NtKCH Fluoreszenz, vor allem der schwachen kortikalen Signale, war eine direkte Untersuchung der Zellgifteffekte anhand von Zeitreihen-Serien nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die Zellen jeweils 1 h mit 10  $\mu$ M Oryzalin bzw. 10  $\mu$ M Latrunculin B inkubiert und direkt im Anschluss untersucht. In Kontrollansätzen wurden die Zellen jeweils mit der gleichen Menge DMSO behandelt, um sicherzustellen, dass das verwendete Lösungsmittel selbst keinen Einfluss auf die NtKCH-Lokalisation hat.

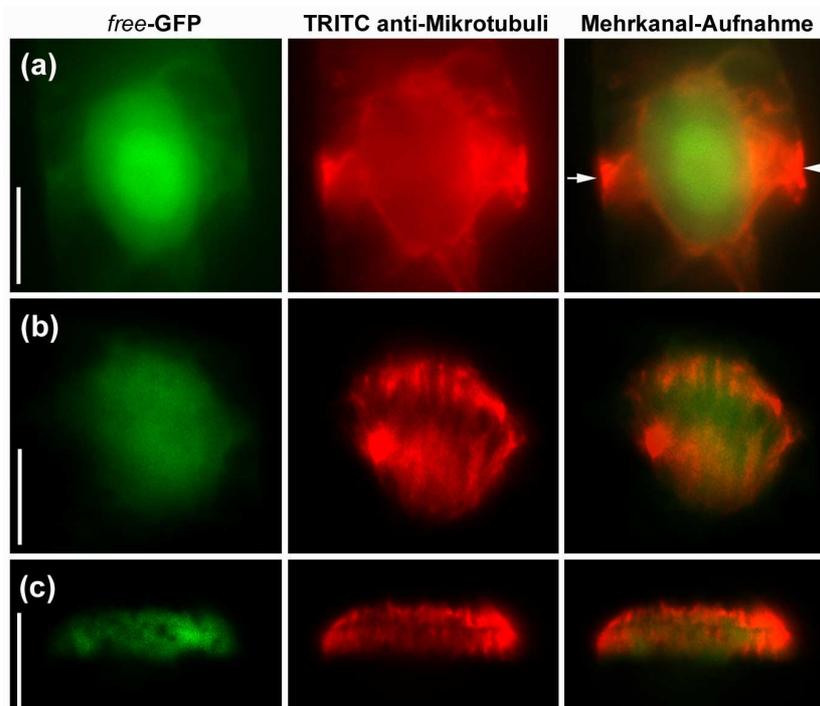
In den Kontrollen konnte weder 1 h nach Zugabe von DMSO, noch nach mehrstündiger Behandlung mit dem Lösungsmittel, eine Veränderung des NtKCH-Expressionsmusters festgestellt werden. Beispielhafte Aufnahmen der Kontrollzellen sind in Abbildung 24a und b gegeben. Die Inkubation mit Oryzalin führte dagegen zu einer schnellen Auflösung kortikaler Mikrotubuli und damit einhergehend auch zum Verschwinden von kortikalem GFP-NtKCH (Abbildung 24c). Sowohl das Aktinfilament-Netzwerk, als auch perinukleäres GFP-NtKCH blieben von der Behandlung mit dem Mikrotubuli-Inhibitor jedoch unbeeinflusst (Abbildung 24d; Pfeilspitzen). Im Gegensatz dazu führte die einstündige Einwirkung von Latrunculin B zu einer vollständigen Auflösung der Aktinfilamente. Im Kortex der koexprimierenden Zellen waren nur noch vereinzelte, punkartige RFP gefärbte Aktinfragmente zu beobachten (Abbildung 24e), während RFP-FABD2 im Bereich um den Kern vollkommen zytoplasmatisch exprimiert wurde (Abbildung 24f). Gleichzeitig mit der Auflösung der perinukleären Aktinfilamente wurden auch die zuvor punkartigen GFP-NtKCH Signale um den Kern diffus und zytoplasmatisch (Abbildung 24f). Kortikales GFP-NtKCH auf den transversen Filamenten blieb trotz der Behandlung mit Latrunculin B weitestgehend erhalten (Abbildung 24e).



**Abbildung 24: Behandlung von GFP-NtKCH/RFP-FABD2 exprimierenden BY-2 Zellen mit Latrunculin B und Oryzalin.** Die entsprechenden Fluoreszenzkanäle sind über den Abbildungen angegeben. (a, b) Weder die Fluoreszenzsignale von GFP-NtKCH, noch von den Aktinfilamenten wurden durch das Lösungsmittel DMSO beeinflusst. (c) Oryzalin führte zum Verschwinden von GFP-NtKCH entlang transvers-kortikaler Filamente. Das Aktinfilament-Netzwerk und perinukleäres GFP-NtKCH (d, Pfeilspitzen) blieben unverändert. (e, f) Im Gegensatz dazu bedingte die Inkubation mit Latrunculin B die Auflösung kortikaler und intrazellulärer Aktinfilamente. (e) Das Aktinfilament-Gift hatte keine Auswirkungen auf kortikales GFP-NtKCH. (f) Als Folge der Latrunculin B-Behandlung wurde die GFP-NtKCH Expression um den Zellkern diffus und zytoplasmatisch. (g) Eine Zelle in der Telophase, die mit dem Aktinfilament-Inhibitor behandelt wurde, bestätigt, dass NtKCH innerhalb des Phragmoplasten nur mit Mikrotubuli assoziiert. Nähere Erläuterungen zu dieser Abbildung können Kapitel 2.3 entnommen werden. Maßstab: 10  $\mu$ m.

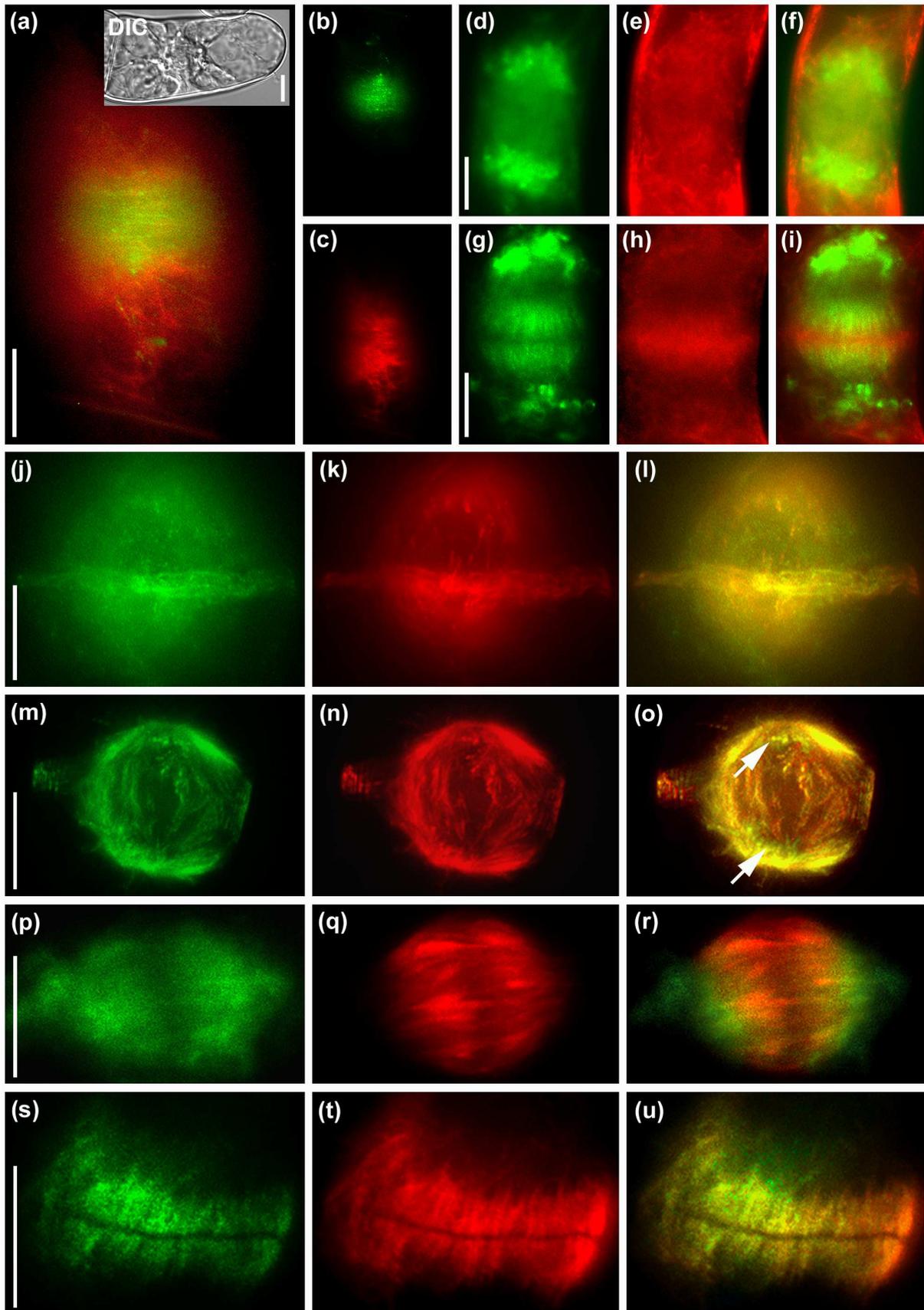
### 2.3. Intrazelluläre Lokalisation von NtKCH während der Mitose

Die erstellten transgenen Tabak BY-2 Zelllinien erwiesen sich als hilfreiche Werkzeuge zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung von NtKCH während der Kern- und Zellteilung. Die doppelt transformierte GFP-NtKCH/RFP-FABD2-Linie wurde dabei genutzt, um Informationen über zellzyklusabhängige Veränderungen der NtKCH-Lokalisation, hinsichtlich des Aktinfilament-Systems zu gewinnen (Abbildung 26a-i). Dagegen dienten indirekte Immunfluoreszenzfärbungen an fixierten GFP-NtKCH Überexpressionszellen der Untersuchung möglicher Koloalisationen des Kinesins mit Mitose spezifischen Mikrotubuli-Strukturen (Abbildung 26j-u). Als Negativ-Kontrollen wurden zusätzlich die Mikrotubuli untransformierter (Ergebnisse nicht gezeigt) und *free-GFP* exprimierender BY-2 Zellen (Abbildung 25) mithilfe an TRITC gekoppelter Antikörper sichtbar gemacht. In den beiden Kontrollen konnte in keiner Phase der Zellteilung eine spezifische Lokalisation des GFP-Signals mit den Mikrotubuli beobachtet werden. Dies war hingegen in den GFP-NtKCH überexprimierenden Zelllinien deutlich der Fall. In den doppelt transformierten Zellen assoziierten punktförmige NtKCH-Fluoreszenzsignale während der Präprophase mit Filamenten, die einen kortikalen Gürtel in der Äquatorialebene der Zelle ausbildeten. Da diese Filamente vollkommen von der fluoreszenten Aktinfilament-Färbung ausgespart blieben, handelte es sich hierbei um Mikrotubuli des PPB (Abbildung 26a-c).



**Abbildung 25: Mikrotubuli-Immunfluoreszenzfärbung an fixierten *free-GFP* Zellen.** (a) Während der Präprophase bildet sich das kortikale PPB (hervorgehoben durch Pfeile). (b) Aufnahme einer Metaphase-Zelle mit voll ausgebildeter Kernteilungsspindel. (c) Während der Telophase tritt der Phragmoplast in Erscheinung, welcher sich vornehmlich aus Mikrotubuli zusammensetzt. Zu keinem Zeitpunkt der Mitose konnte in den Kontrollzellen eine spezifische Lokalisation des GFP-Signals an TRITC gefärbte Mikrotubuli beobachtet werden. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

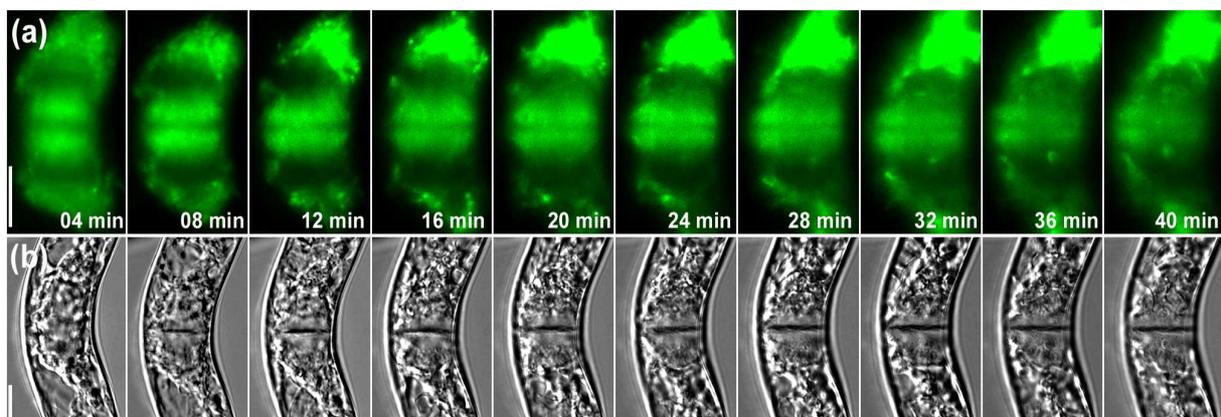
Dies bestätigte sich auch anhand der immunofluoreszent gefärbten GFP-NtKCH Zellen, wobei GFP-NtKCH eindeutig mit den Mikrotubuli des PPB kolokalisierte (Abbildung 26j-l). Zusätzlich waren GFP-Fluoreszenzpunkte auf der Kernhülle (Abbildung 26l) und entlang radialer Mikrotubuli zu beobachten, die während dieser Phase des Zellzyklus vermehrt in Erscheinung traten (Abbildung 26o). Gegen Ende der Präprophase bildete sich das PPB sukzessive zurück, was mit der Auflösung der Kernhülle einherging. Gleichzeitig verschwand auch kortikales GFP-NtKCH, wogegen perinukleäres zunahm. Mit der einsetzenden Bildung der Teilungsspindel verlagerte sich die perinukleäre NtKCH-Expression immer mehr an die zukünftigen Spindelpole (Abbildung 26m-o). Im Bereich der Pole konnten oft auch punktförmige GFP-Signale beobachtet werden, die nicht mit den Mikrotubuli kolokalisierten (Abbildung 26o; Pfeilspitzen). Während der Meta- und Anaphase konnte innerhalb des Kernteilungsbereichs nur eine sehr diffuse GFP-NtKCH Fluoreszenz beobachtet werden. Eine spezifische Lokalisation von GFP-NtKCH an Mikrotubuli der Teilungsspindel war in keiner der untersuchten Zellen erkennbar. Dagegen sammelte sich das Fusionsprotein an den Spindelpolen und überdauerte an diesen Stellen die gesamte Kernteilung (Abbildung 26d-f, p-r). Sobald sich die Teilungsspindel auflöste und gegen Ende der Telophase die Neuordnung der Mikrotubuli zum Phragmoplasten einsetzte, erschienen neben der GFP-Fluoreszenz an den Spindelpolen zusätzliche, punktförmige Signale. Diese lokalisierten auf den Filamenten des Phragmoplasten. Wie aus Abbildung 26u ersichtlich, kolokalisierte GFP-NtKCH dabei selektiv nur an die Mikrotubuli und blieb aus dem Bereich der Zellplatte ausgeschlossen (Abbildung 26g-i). Im Zuge der Latrunculin B-Behandlungen von GFP-NtKCH/RFP-FABD2 exprimierenden Zellen, gelangen auch Aufnahmen von Zellen in der Telophase (Abbildung 24g). Diese zeigten, als Folge der Behandlung, ein fragmentiertes, mitotisches Aktinfilament-Skelett. Die spezifische Lokalisation von GFP-NtKCH an Filamente des Phragmoplasten blieb dabei stets unverändert, was indiziert, dass NtKCH innerhalb des Phragmoplasten ausschließlich an die Mikrotubuli lokalisiert vorliegt.



**Abbildung 26 (Fortsetzung):** (a-i) *In-vivo* Lokalisationsstudien an GFP-NtKCH (b, d, g) und RFP-FABD2 (c, e, h) koexprimierenden BY-2 Zellen. (a, f, i) Mehrkanal-Aufnahmen. (a-c) Eine Aufnahme des kortikalen Bereichs einer koexprimierenden BY-2 Zelle zeigt, wie das PPB mit punktartigem GFP-NtKCH übersät ist (a, b). Die entsprechende DIK-Aufnahme der Zelle ist in (a) gegeben. (d-f) Während der Metaphase beschränkte sich GFP-NtKCH auf die beiden Spindelpole. (d) Im Kernteilungsbereich war dagegen nur ein diffuses Fluoreszenzsignal ersichtlich. (g-i) Während der Telophase assoziierte GFP-NtKCH mit dem Phragmoplasten an Filamente, die nicht durch RFP-FABD2 gefärbt wurden und blieb aus dem Bereich der Zellplatte ausgeschlossen. (j-u) Immunofluoreszenzfärbungen der Mikrotubuli (k, n, q, t) der GFP-NtKCH Zellen (j, m, p, s). (l, o, r, u) Mehrkanal-Aufnahmen. (j-l) Aufnahmen der kortikalen Region einer Zelle in der Präprophase. (m-o) Während der Auflösung der Kernhülle verlagerte sich die NtKCH-Expression an die zukünftigen Spindelpole (o; Pfeile). (q-r) NtKCH kolokalisierte nicht mit den Spindelmikrotubuli. (s-u) In der späten Telophase erschienen neue punktartige NtKCH-Signale auf den TRITC gefärbten Phragmoplast-Mikrotubuli (u). Maßstab: 10  $\mu$ m.

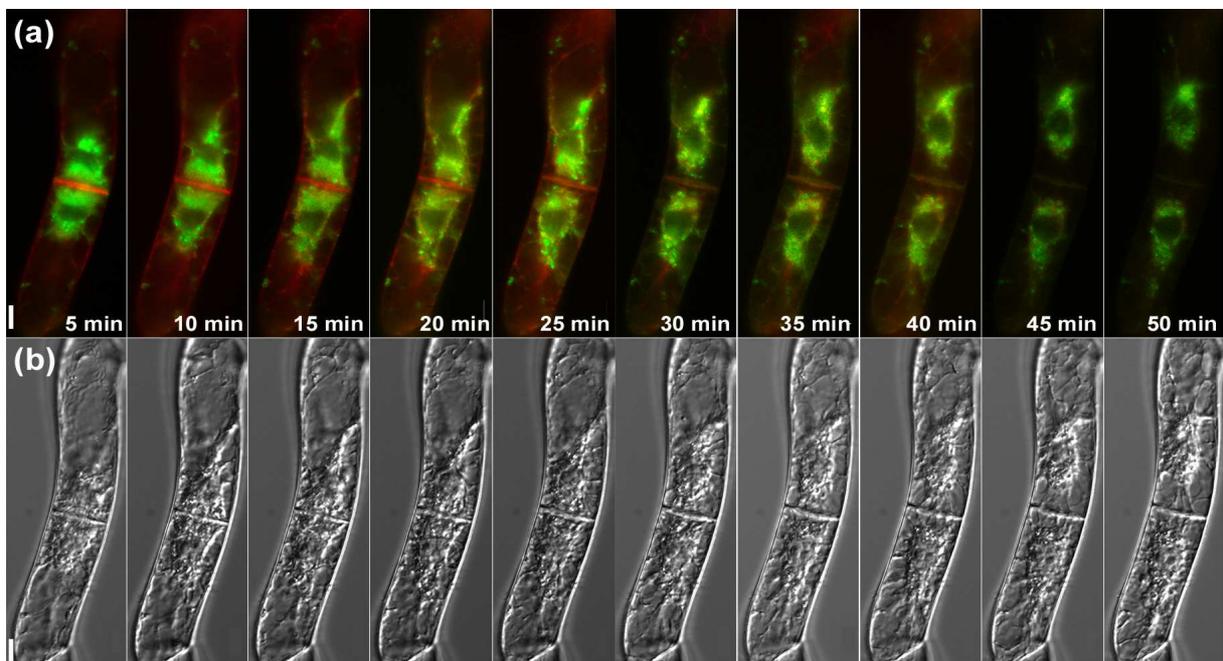
### 2.3.1. Bildung einer neuen Zellwand: Dynamische Neuverteilung von NtKCH während der Zytokinese

Die Zytokinese, also die physische Teilung einer pflanzlichen Zelle beginnt, sobald die getrennten Chromosomen die Spindelpole erreicht haben und die Ausbildung der Tochterkerne eingeleitet wird. Gleichzeitig formen Mikrotubuli der ehemaligen Kernteilungsspindel, zusammen mit neu polymerisierten Mikrotubuli sowie Aktinfilamenten den Phragmoplasten, welcher für die Bildung der Zellplatte benötigt wird. Während dieser Phase erschienen neben den GFP-NtKCH-Ansammlungen an den Spindelpolen, neue punktartige Fluoreszenzsignale, die innerhalb des Phragmoplasten mit den Antikörper gefärbten Mikrotubuli kolokalisierten. Anhand von Zeitreihen-Aufnahmen des GFP-NtKCH der Überexpressions-Zellen konnte die dynamische Neuverteilung des Tabak-KCHs während dieser Zellzyklusphase genauer untersucht werden. In Abbildung 27 ist eine dieser Zeitreihen dargestellt, welche die Lokalisation des Kinesins von der frühen Entstehung des Phragmoplasten bis zur vollständigen Ausbildung der Zellplatte zusammenfasst.



**Abbildung 27: GFP-NtKCH Expression im Verlauf der Phragmoplast-Entwicklung.** Zeitreihen-Aufnahme der Lokalisation von GFP-NtKCH in BY-2 Zellen von der Telophase zum Ende der Zytokinese. 40 min lang wurden alle 4 min Fluoreszenzbilder und die dazugehörigen DIK-Aufnahmen erstellt. Der GFP-Kanal ist in (a) wiedergegeben, die entsprechenden DIK-Aufnahmen in (b). Zur näheren Erläuterung siehe Text in Kapitel 2.3.1. Maßstab 10  $\mu$ m.

Daraus ersichtlich, erscheinen innerhalb der Teilungsebene, gleichzeitig mit der Entstehung des Phragmoplasten, neue GFP-Fluoreszenzsignale, die an Filamente dieser Zellskelettstruktur bis zu ihrer Rückbildung lokalisierten. Die an den Spindelpolen assoziierten NtKCH-Signale verharrten dagegen auch während der Zytokinese in ihrer Position, sodass sie nun asymmetrisch auf den distalen Seiten der entstehenden Tochterkerne angeordnet waren. Interessanterweise nahm die Fluoreszenzintensität dieser Signale stetig zu, während die mit dem Phragmoplasten assoziierten GFP-NtKCH-Signale mit der Rückbildung des Phragmoplasten immer diffuser wurden. Dies konnte anhand von Zeitreihen-Aufnahmen der GFP-NtKCH/RFP-FABD2 koexprimierenden Zellen beobachtet werden. Die Abbildung 28 gibt die Neuverteilung von NtKCH während der späten Zytokinese und der anschließenden Wanderung der Tochterkerne bei Wiedereintritt in die G1-Phase wieder. Gleichzeitig mit dem Abbau des Phragmoplasten wurde auch hier das zunächst punktförmige NtKCH-Signal immer diffuser und sammelte sich um die Tochterzellkerne an. Kurz nach der Zytokinese wandelte sich das diffuse Signal wieder in klar definierte Fluoreszenzpunkte um, die sich nun symmetrisch auf beide Seiten der Kerne verteilten. Aus einer dieser Zeitreihen wurde zusätzlich eine kurze Filmsequenz angefertigt, die auf der beigefügten Zusatz-CD (Film 1, Zusatz-CD) enthalten ist und die Neuverteilung des Kinesins beim Wiedereintritt in die Interphase zusammenfasst.



**Abbildung 28: Zeitreihen-Aufnahmen einer stabil transformierten GFP-NtKCH/RFP-FABD2 Zelle während der späten Zytokinese.** Die Mehrkanal-Aufnahmen der GFP- und RFP-Fluoreszenz sind in (a) gegeben, die entsprechenden DIC-Aufnahmen in (b). Für eine Dauer von 50 min wurden alle 5 min Aufnahmen erstellt. Maßstab: 10  $\mu$ m.

## 2.4. Untersuchungen der Eigendynamik von NtKCH

Allen Mitgliedern der Kinesin-Superfamilie eigen ist eine konservierte Motordomäne. Diese wird einerseits zur Interaktion mit den Mikrotubuli genutzt, andererseits dient sie auch zur Bindung und Hydrolyse von ATP. Viele Kinesine nutzen die bei der ATP-Hydrolyse frei werdende Energie, um sich aktiv entlang der Mikrotubuli fortzubewegen. Da auch NtKCH im Besitz einer solchen katalytischen Domäne ist und nachweislich auf unterschiedlichen Mikrotubuli-Strukturen lokalisiert, wurden im folgenden Abschnitt die möglichen Motoreigenschaften des Kinesins genauer untersucht. Hierzu wurden zahlreiche Zeitreihen-Serien der GFP-NtKCH Überexpressionszellen angefertigt, anhand derer Kymographen (Weg-Zeit-Plots) erstellt wurden. Diese dienten der Messung der Bewegungsgeschwindigkeit von NtKCH. Dabei konnte auch der Frage nachgegangen werden, ob sich Unterschiede im dynamischen Verhalten in Abhängigkeit vom jeweils gebundenen Filamenttyp bzw. der Zellskelettstruktur feststellen lassen. Die erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 29 zusammengefasst.

### 2.4.1. NtKCH auf radialen und kortikalen Filamenten ist beweglich, perinukleäres statisch

Die angefertigten Zeitreihen-Aufnahmen zeigen, wie sich punktförmiges GFP-NtKCH, hintereinander aufgereiht entlang transvers-kortikaler Filamente bewegte (Abbildung 29c, d). Aus den Bildern wurde eine kurze Filmsequenz erstellt, welche die Dynamik von kortikalem GFP-NtKCH noch anschaulicher darstellt (Film 2, Zusatz-CD). Interessanterweise bewegten sich alle Fluoreszenzpunkte entlang desselben Filaments immer in die gleiche Richtung, während sie auf parallel zueinander verlaufenden Filamenten oft in entgegengesetzter Richtung wanderten. Die anhand der Kymographen errechnete, mittlere Bewegungsgeschwindigkeit dieser Fluoreszenzpunkte lag bei  $3,26 \pm 0,09 \mu\text{m}/\text{min}$ . Für die Messung wurden insgesamt 60 kortikale GFP-NtKCH-Punkte ausgewertet und eine Häufigkeitsverteilung erstellt (Abbildung 29a). Zudem wurde eine Tabelle angefertigt, in der die Geschwindigkeit von GFP-NtKCH und anderen Mitgliedern der Kinesin-14 Familie, sowie dem konventionellen DmKHC aus *D. melanogaster* verglichen werden (Abbildung 29b). Im Gegensatz zu konventionellen Kinesinen, wie dem aufgeführten DmKHC, das *in-vitro* bis zu  $46 \mu\text{m}/\text{min}$  zurücklegt, bewegte sich NtKCH sehr langsam. Die *in-vivo* gemessene Geschwindigkeit von NtKCH ist jedoch durchaus vergleichbar mit pflanzlichen, pilzlichen und tierischen Vertretern der Kinesin-14 Familie wie AtKCBP mit  $10 \mu\text{m}/\text{min}$ , ScKar3 mit  $3 \mu\text{m}/\text{min}$  oder DmNcd mit  $8\text{-}10 \mu\text{m}$ . Auch perinukleäres NtKCH wurde kymographisch ausgewertet, zeigte jedoch meist keine oder eine nur sehr langsame Bewegung. In Abbildung 29e ist eine prämitotische Zelle dargestellt in der GFP-NtKCH sehr stark um den Zellkern lokalisiert vorlag.

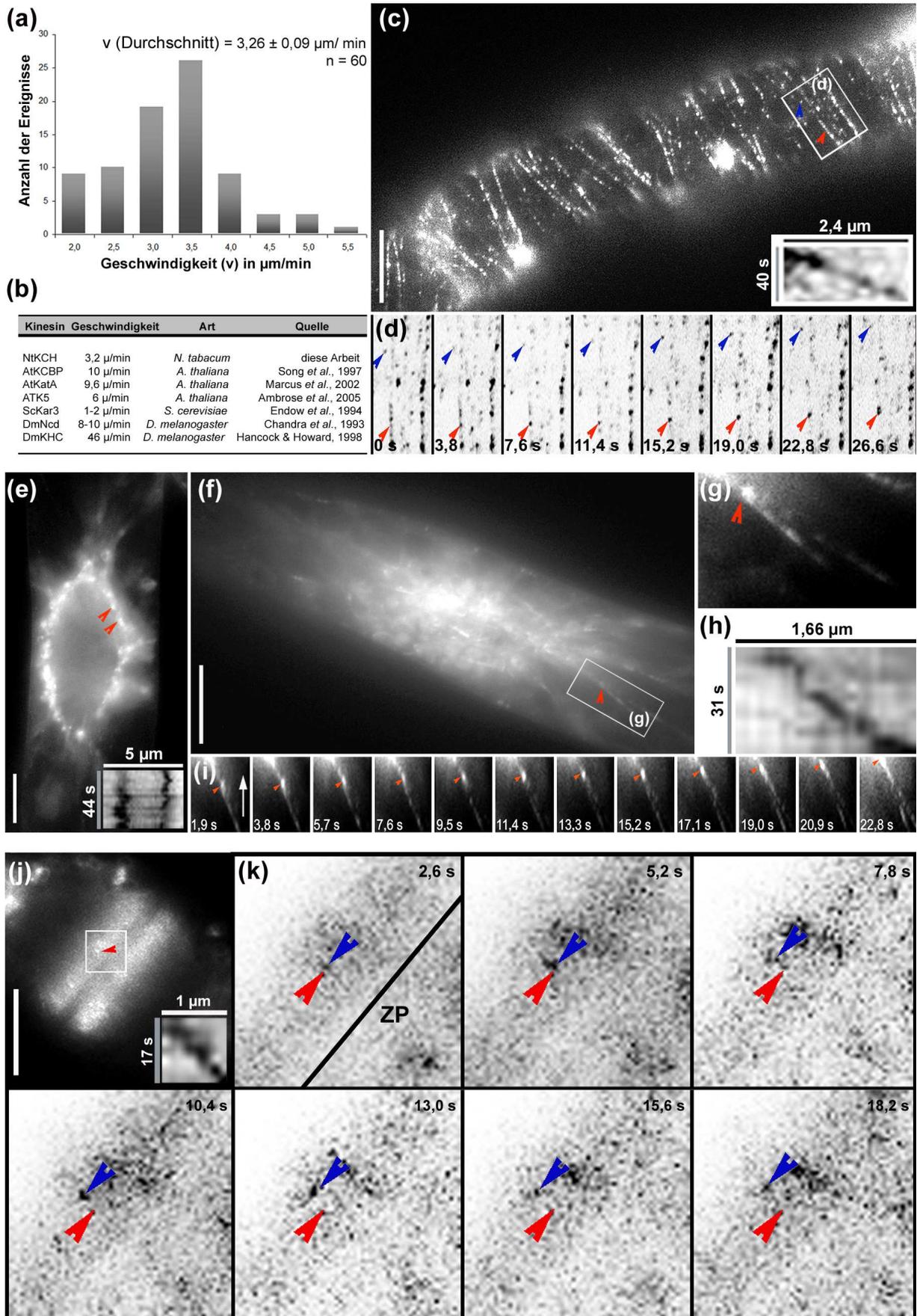


Abbildung 29: Zeitreihen-Aufnahmen und Kymographen-Analysen zur Untersuchung der Eigendynamik von NtKCH.

**Abbildung 29 (Fortsetzung):** (a) Geschwindigkeitsverteilung von GFP-NtKCH auf kortikalen Mikrotubuli. Die horizontale Achse gibt die absolute Geschwindigkeit ( $v$ ) in  $\mu\text{m}/\text{min}$  an, die vertikale Achse die Anzahl der gemessenen Ereignisse. Die durchschnittliche Geschwindigkeit beträgt  $3,26 \pm 0,09 \mu\text{m}/\text{min}$  ( $x \pm \text{Standardfehler}$ ;  $n = 60$ ). (b) Vergleich der *in-vivo* Geschwindigkeit von GFP-NtKCH mit anderen Vertretern der Kinesin-14 Familie, sowie DmKHC aus der Fruchtfliege. (c, d) Bewegungsverhalten von GFP-NtKCH im Zellkortex. Der Kymograph (c) und die Zeitreihen-Aufnahmen (d) veranschaulichen die Bewegung von GFP-NtKCH. Die untersuchten Fluoreszenz-Punkte sind im Übersichtsbild (c) durch eine blaue und eine rote Pfeilspitze hervorgehoben. (e) Medianebene einer GFP-NtKCH exprimierenden Zelle. Helle punktartige Fluoreszenzsignale um den Zellkern (rote Pfeilspitzen) waren statisch, was durch die dargestellten Kymographen verdeutlicht wird. (f-i) Nach innen gerichtete Bewegung von NtKCH entlang radialer Filamente in einer prämitotischen Zelle. (g) Detailansicht des untersuchten GFP-Fluoreszenzpunktes. Zeitreihen-Aufnahmen (i). Der weiße Pfeil im ersten Bild weist in Richtung des Zellkerns. (h) Kymographische Auswertung der nach innen gerichteten NtKCH-Bewegung. (j) Mit dem Phragmoplast assoziiertes GFP-NtKCH läuft von der Zellplatte weg. Die rote Pfeilspitze markiert den, für den Kymographen (j) und die Zeitreihen-Aufnahmen (k) verwendeten Fluoreszenzpunkt. Zur besseren Visualisierung wurden die Bilder der Zeitreihen-Aufnahmen invertiert. Der schräge Balken im ersten Bild gibt die Lage der Zellplatte (ZP) an. Die rote Pfeilspitze markiert die Startposition, die blaue die zurückgelegte Wegstrecke. Maßstab:  $10 \mu\text{m}$ .

Der Kymograph veranschaulicht, dass sich die Position, der mit roten Pfeilspitzen markierten Fluoreszenzpunkte, auch nach 44 s nicht veränderte. Insbesondere gegen Ende der G2-Phase konnte das Kinesin jedoch gleichzeitig auch entlang radialer Filamente beobachtet werden, die von der Kernhülle zur Zellperipherie gespannt waren. Auch diese Fluoreszenzpunkte zeigten eine Eigendynamik (Abbildung 29f-i). Den Messungen zufolge entsprach Ihre Geschwindigkeit derjenigen kortikaler GFP-NtKCH Signale (Kymograph in Abbildung 29h). Wie der Zeitreihe (Abbildung 29i) und der daraus erstellten Filmsequenz (Film 3, Zusatz-CD) entnommen werden kann, bewegte sich radiales NtKCH dabei immer in Richtung des Zellkerns.

Die Untersuchungen an GFP-NtKCH Überexpressionszellen lassen jedoch aufgrund der fehlenden Zellskelett-Gegenfärbung keine direkte Aussage darüber zu, an welchen Filamenten sich NtKCH entlang bewegte. Aufgrund der einheitlich transversen Orientierung der kortikalen Filamente und unter Berücksichtigung der vorhergehenden Kolokalisationsexperimente lässt sich jedoch der Schluss ziehen, dass dynamisches NtKCH im Zellkortex ausschließlich Mikrotubuli als „Straßen“ nutzt. Statisches GFP-NtKCH im kernnahen Bereich lokalisierte hauptsächlich an Aktinfilamente. Fraglich bleibt, auf welchen radialen Filamenten sich NtKCH in Richtung des Kerns bewegte, da das Kinesin hier sowohl an Aktinfilamente als auch an Mikrotubuli lokalisierte.

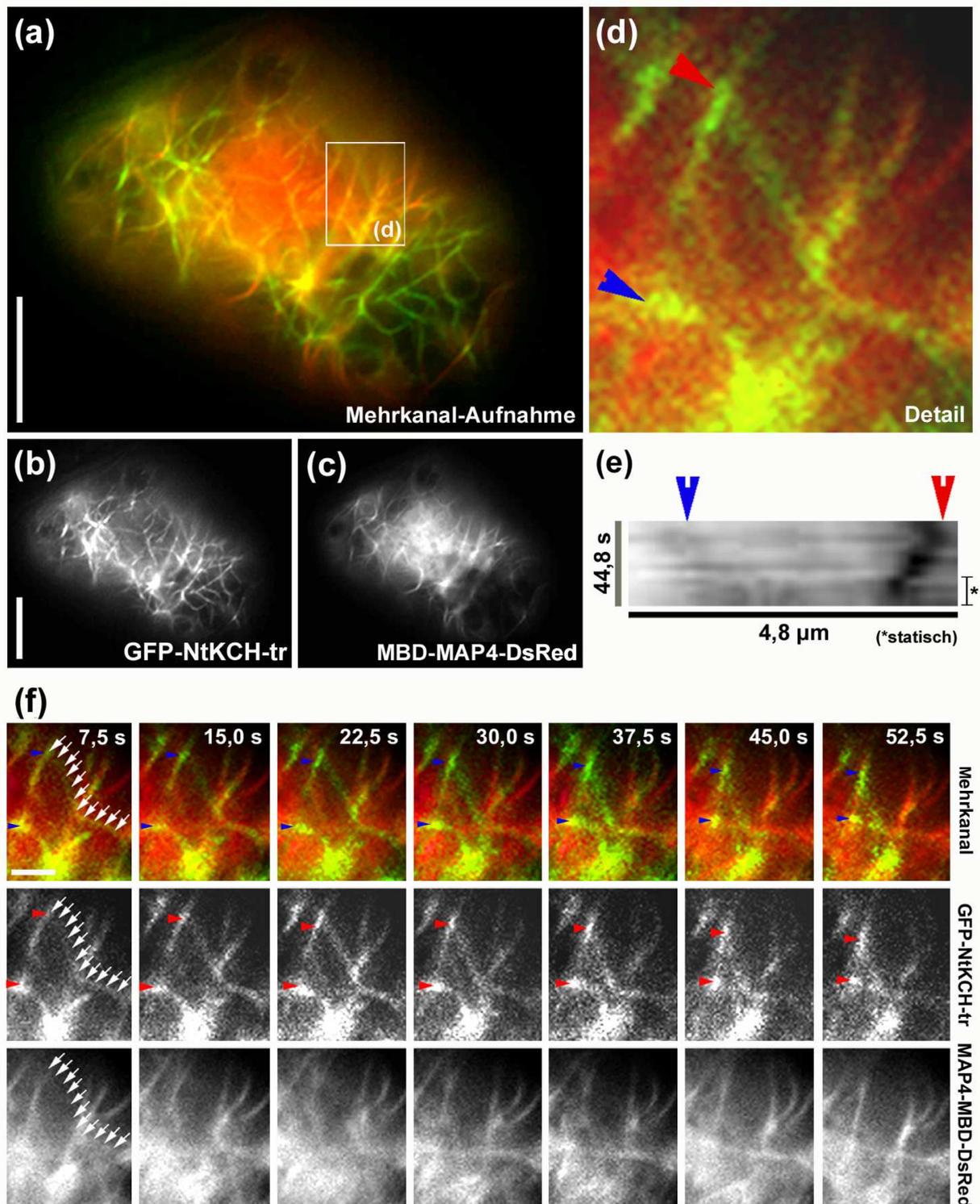
#### 2.4.2. Dynamisches NtKCH entfernt sich von der Zellteilungsebene

Während der Mitose lokalisierte NtKCH spezifisch an die Mikrotubuli des PPB und des Phragmoplasten. Anhand kymographischer Auswertungen konnte festgestellt werden, dass GFP-NtKCH sich auch hier eindeutig bewegte. Die Geschwindigkeiten von GFP-NtKCH auf den beiden mitotischen Strukturen unterschieden sich nicht von der, für kortikales und radiales GFP-NtKCH bestimmten, Geschwindigkeit. In Abbildung 29j, k ist beispielhaft die

Analyse Phragmoplast-assoziiertes GFP-NtKCH-Signale dargestellt. Die Zeitreihen-Aufnahme und die daraus erstellte Filmsequenz (Abbildung 29k; Film 4, Zusatz-CD) machen deutlich, dass sich die GFP-Punkte dabei von der Zellteilungsebene entfernen und in Richtung der entstehenden Tochterkerne bewegen.

## **2.5. NtKCH trägt als Aktin-Mikrotubuli-Querverbinder zur Organisation des pflanzlichen Zellskeletts bei**

Im Zellinneren lokalisierte NtKCH sowohl an FABD2- als auch an MBD-MAP4 gefärbte radiale Filamente. Um der Frage nachzugehen, an welchen Komponenten des Zellskeletts sich das Kinesin innerhalb radialer Zytoplasmastränge vom Kortex in den Bereich des Zellkerns bewegt, wurde GFP-NtKCH ein weiteres Mal zusammen mit MBD-MAP4-DsRed durch Partikelbombardements in BY-2 Zellen eingebracht. Von den transformierten Zellen wurden Zeitreihen-Aufnahmen angefertigt, wobei der Fokus auf die Zellmitte gerichtet war. Insbesondere in der Detailansicht (Abbildung 30b) gut zu erkennen, kolokalisierte NtKCH in der Zellmitte an MBD-MAP4-DsRed gefärbte Mikrotubuli, aber auch an filamentartigen Strukturen, die nicht durch das Markerprotein angefärbt wurden. Der Verlauf eines dieser ungefärbten, von NtKCH vollständig bedeckten Filamente ist in Abbildung 30f durch kleine Pfeile hervorgehoben. Die GFP-Fluoreszenz konzentrierte sich insbesondere an Stellen, an denen sich die Mikrotubuli mit den ungefärbten Filamenten überkreuzten (Abbildung 30b; blaue und rote Pfeilspitzen). In Zeitreihen-Aufnahmen wurde das Bewegungsverhalten dieser intensiven Fluoreszenzpunkte geprüft. Wie der kymographischen Auswertung (Abbildung 30b), der dargestellten Zeitreihe (Abbildung 30c) und der daraus erstellten Filmsequenz (Film 5, Zusatz-CD) zu entnehmen ist, zeigten auch diese Punkte eine Eigenbewegung. Dabei bewegten sich die GFP-Punkte entlang der gefärbten Mikrotubuli. Im Vergleich zu GFP-NtKCH auf kortikalen Mikrotubuli war die gemessene Geschwindigkeit dieser Fluoreszenzpunkte nahe um den Kern um mehr als die Hälfte reduziert. Gegen Ende der Zeitreihe schien die Bewegung gar vollkommen zum Stillstand gekommen zu sein (siehe hierfür insbesondere Kymographen-Auswertung des Fluoreszenzpunktes, der in Abbildung 30b mit einer roten Pfeilspitze markiert ist). Sowohl der Kymograph, als auch die Zeitreihen-Aufnahmen indizieren, dass sich die GFP-Signale entlang der Mikrotubuli aufeinander zu bewegten. Jedoch näherten sich gleichzeitig auch die senkrecht zu den Mikrotubuli verlaufenden Filamente, die ausschließlich durch GFP-NtKCH angefärbt waren und den Aktinfilamenten entsprechen. Folglich dient NtKCH sehr wahrscheinlich als Verbindungsprotein zwischen beiden Filamentarten und vermittelt den Transport von Aktinfilamenten entlang von Mikrotubuli.



**Abbildung 30: NtKCH transportiert filamentartige Strukturen entlang intrazellulärer Mikrotubuli.** (a-c) Übersichtsbild einer mit GFP-NtKCH-tr (b) und MBD-MAP4-DsRed (c) kotransformierten BY-2 Zelle. (a) Mehrkanal-Aufnahme. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . (b) Detail-Ansicht des in der Kymographen-Analyse verwendeten Ausschnitts der Mehrkanal-Aufnahme. (e) Der dargestellte Kymograph zeigt, wie sich zwei Fluoreszenzpunkte (blaue und rote Pfeilspitze) aufeinander zu bewegen. (f) Zeitreihen-Aufnahme des Detail-Ausschnitts der koexprimierenden Zelle. Die Mehrkanal-Aufnahmen sind in der oberen Reihe dargestellt, der GFP-Kanal in der mittleren und der DsRed-Kanal in der unteren. GFP-NtKCH akkumuliert auch auf Filamenten, die nicht durch MAP-MBD-DsRed gefärbt wurden. Der Verlauf eines solchen Filaments wurde beispielhaft mit weißen Pfeilen markiert. Besonders intensive GFP-Fluoreszenzsignale waren an Überkreuzungspunkten dieser Filamente mit den gefärbten Mikrotubuli zu beobachten (blaue und rote Pfeilspitzen). Maßstab: 2  $\mu\text{m}$ .

### 3. Untersuchungen zur biologischen Funktion von NtKCH

Zur weiteren Charakterisierung von NtKCH wurde anhand zellphysiologischer Methoden die biologische Relevanz des Kinesins während dem Elongationswachstum der Teilung pflanzlicher Zellen eingehender untersucht. In den fluoreszenzmikroskopischen Studien wurde GFP-NtKCH während der Interphase auf kortikalen Zellskelettstrukturen vorgefunden, die direkt in das pflanzliche Zelllängenwachstum involviert sind. Im Verlauf der Mitose kolokalisierte das Fusionsprotein zudem mit dem PPB und dem Phragmoplasten, welche beide eine wesentliche Rolle in der Positionierung und Ausbildung der Zellteilungsebene spielen. Das Motorprotein könnte demnach eine direkte Funktion, sowohl beim Wachstum als auch bei der Teilung pflanzlicher Zellen, übernehmen. Den bisherigen Resultaten entsprechend könnte es als bifunktionelles Querverbindungsprotein zwischen den Aktinfilamenten und den Mikrotubuli bei der Organisation des Zellskeletts mithelfen. Jedoch wurden in den aufgeführten Lokalisationsstudien fluoreszente Fusionskonstrukte verwendet, die unter Kontrolle eines *CaMV-35S*-Promotors stehen. Somit werden die Konstrukte zu allen Phasen des Zellzyklus exprimiert werden. Es stellt sich demnach die Frage, ob das Kinesin auch unter natürlichen Bedingungen während der Zellwachstums- und der Teilungsphase überhaupt exprimiert wird und somit eine spezifische Funktion während dieser Phasen ausüben kann. Jedoch war der native Promotor des Kinesins nicht verfügbar, weswegen keine Möglichkeit bestand, die Lokalisation von NtKCH auf natürlichem Expressionsniveau zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde mithilfe semiquantitativer Transkriptionsanalysen die Kultivierungs- und zellzyklusabhängige Transkription von NtKCH in BY-2 Wildtyp-Zellen untersucht.

Zur Prüfung einer möglichen Beteiligung des Kinesins an der Mitose wurden die GFP-NtKCH-Zellen in einem nächsten Schritt phänotypisch charakterisiert. Dabei wurden die Zellen zunächst auf überexpressionsbedingte Veränderungen der Zellteilungsaktivität untersucht. Zudem wurden Zelllänge und Breite der Überexpressionszellen vermessen. Unterschiede gegenüber den Wildtyp-Zellen, insbesondere in der Zelllänge, würden indizieren, dass das KCH an den vom Zellskelett abhängigen Prozessen des Elongationswachstums mitwirkt.

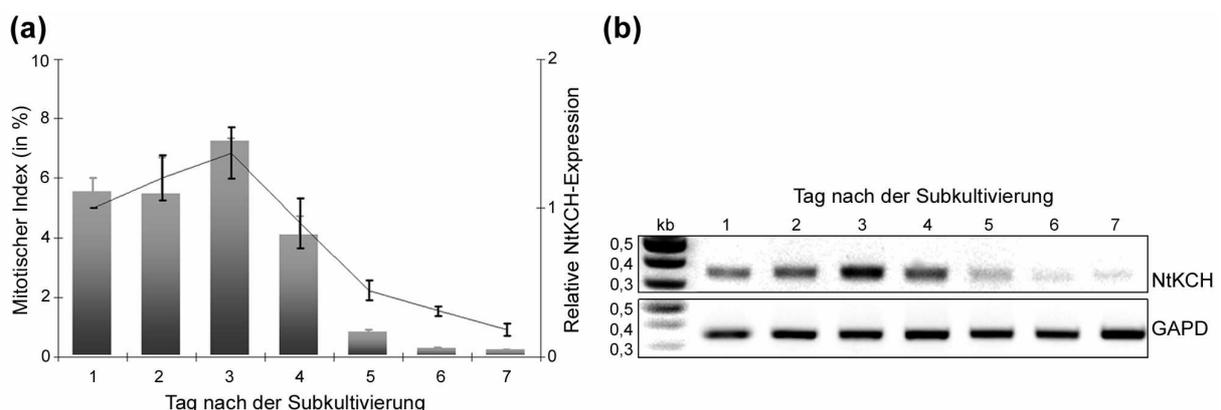
#### 3.1. Semiquantitative Analyse der NtKCH-Transkription im BY-2 Wildtyp

BY-2 Zellkulturen weisen eine sehr hohe Synchronität der Zellteilung auf, wodurch sich innerhalb des einwöchigen Kultivierungszyklus tagesabhängige Unterschiede der Zellteilungsaktivität ergeben. Anhand von semiquantitativen Messungen des mRNA-Gehalts an allen Tagen des Kultivierungszyklus wurde geprüft, ob die Expression von NtKCH mit der variierenden mitotischen Aktivität korreliert. Ferner wurde das zellzyklusabhängige Transkriptionsprofil des Tabak-KCHs an synchronisierten BY-2 Suspensionskulturen

bestimmt. Durch sequenzielle Behandlung mit Hydroxyurea (HU) und Propyzamid lassen sich BY-2 Zellen zusätzlich synchronisieren, wodurch wird erreicht, dass ein Großteil der Zellen einer Kultur gemeinsam die Phasen des Zellzyklus durchlaufen. Durch Probenentnahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten der synchronisierten Kultur ist es möglich, die Transkriptionsaktivität des KCHs in verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu bestimmen. So kann herausgefunden werden, ob die Expression des Kinesins einer zellzyklusabhängigen Regulation unterliegt.

### 3.1.1. Die NtKCH-Transkription nimmt an Tagen mit hoher mitotischer Aktivität zu

BY-2 Suspensionszellen vermehren sich sehr schnell durch alternierende Phasen der Zellelongation und der Zellteilung, wobei die Dauer eines Zellzyklus nur ungefähr 13-21 h beträgt (Nagata *et al.*, 1992). Nach der Subkultivierung in frisches MS Medium und einer anschließenden Verzögerungsphase von ungefähr 24 h, beginnen sich die Zellen synchron zu teilen. Nach einer ersten Teilungswelle geht die Mitoserate zunächst transient zurück, nimmt dann jedoch wieder stetig zu und erreicht in der Mitte der Woche einen zweiten Höhepunkt. Aufgrund der immer stärker zunehmenden Zelldichte und der damit einhergehenden Abnahme der Nährstoffe sinkt die Teilungsaktivität im weiteren Verlauf des Kultivierungszyklus immer weiter, bis sie schließlich am letzten Tag auf null zurückfällt und in der Regel keine Zellteilungsereignisse mehr messbar sind. Die Zellen befinden sich zu diesem Zeitpunkt in der stationären Phase und vergrößern ihr Eigenvolumen nur noch durch Zellexpansionswachstum. In dem durchgeführten Versuch wurden einer Wildtyp Kultur alle 24 h Zellproben entnommen, der MI als Maß der Zellteilungsaktivität bestimmt und der Gehalt an NtKCH-mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR-Analysen ermittelt.



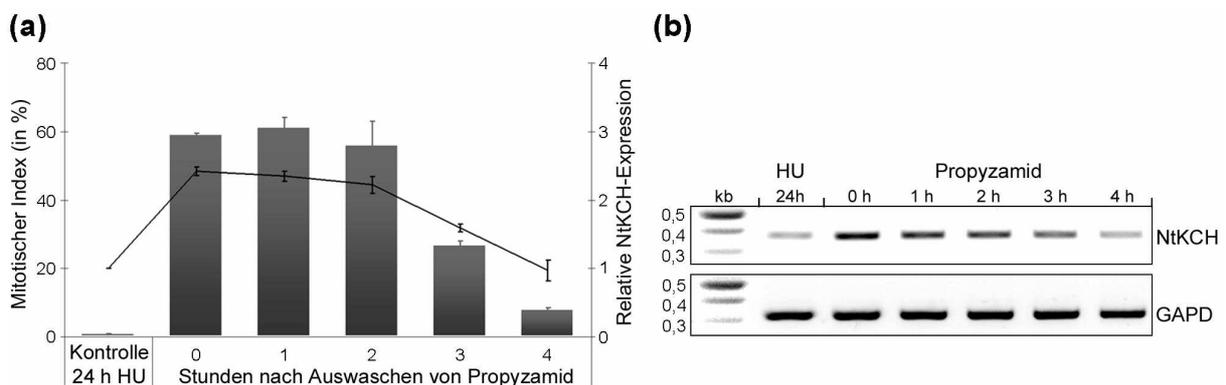
**Abbildung 31: NtKCH-Expression im Verlauf des Kultivierungszyklus von BY-2 Zellen.** Dargestellt ist die durchschnittliche relative NtKCH-Expression in BY-2 Wildtyp-Zellen an Tag eins bis sieben nach der Subkultivierung (schwarze Linie, rechte y-Achse). Die relativen Werte beziehen sich auf Tag eins nach der Subkultivierung. Zusätzlich ist jeweils der entsprechende mittlere MI angegeben (graue Balken, linke y-Achse). Die Mittelwerte und Standardfehler wurden aus jeweils drei unabhängigen Serien errechnet. (b) Ein repräsentatives Gelbild einer RT-PCR Analyse. Die obere Bandenreihe zeigt die NtKCH-Expression, die untere Reihe die Expression des internen Standards GAPD.

Abbildung 31 fasst die relative NtKCH-Expression mit dem jeweils entsprechenden MI (in %) von Tag eins bis sieben nach der Subkultivierung zusammen. Bei den angegebenen Werten handelt es sich jeweils um Durchschnittswerte aus jeweils drei unabhängigen Messreihen. Zusätzlich ist ein beispielhaftes Gelbild einer der drei Expressionsanalysen gegeben. Aus den gewonnenen Daten geht hervor, dass die Transkription von NtKCH an Tag eins bis drei linear, bis zum 1,4-Fachen des Ausgangswertes, anstieg. Im weiteren Verlauf fiel der Gehalt an NtKCH-mRNA exponentiell wieder bis auf ein Minimum an Tag sieben ab. Die Expression des Kinesins stand damit in direkter Korrelation mit der Zellteilungsrate, welche auch an Tag drei ihren Höhepunkt fand und in den folgenden Tagen fast auf null zurückfiel. Interessanterweise sank der mRNA-Gehalt gegen Ende des Kultivierungszyklus langsamer als der MI und ging von Tag fünf bis sieben fast linear zurück. Zudem ließen sich auch am letzten Tag, an dem alle Zellen der Kultur in der stationären Phase angelangt waren, noch geringe Mengen der NtKCH-mRNA nachweisen, was insbesondere aus dem dargestellten repräsentativen RT-PCR Gelbild (Abbildung 31b) ersichtlich ist. Folglich steht die Transkription von NtKCH in direktem Zusammenhang mit der tagesabhängigen Teilungsaktivität der BY-2 Zellen, aber geringe Mengen an NtKCH-Transkripten konnten auch detektiert werden, wenn nahezu keine Teilungsaktivität innerhalb der Zellkultur nachweisbar war. Aufgrund der relativ niedrigen Teilungssynchronität (ein MI von 8 % wurde nicht überschritten), waren die Transkriptionsunterschiede zwar deutlich messbar, aber doch gering. Zudem stellte sich die Frage, ob die noch messbaren Mengen NtKCH-mRNA an Tag sieben darauf basieren, dass sich an diesem Tag doch noch Zellen vereinzelt teilen, oder ob das Kinesin auch in der stationären Phase exprimiert wird und folglich während des Zellwachstums benötigt wird.

### **3.1.2. In synchronisierten BY-2 Zellen steigt die NtKCH-Transkription zu Beginn der Mitose an**

Um die zellzyklusabhängige Regulation der KCH-Expression eindeutiger darstellen zu können, wurde die mRNA-Transkription in einem zweiten Schritt an synchronisierten BY-2 Zellen untersucht. Dazu wurden die Suspensionszellen hintereinander mit HU und mit Propyzamid behandelt. Hierdurch konnte eine sehr hohe Synchronität der Teilung mit einem MI von bis zu 70 % erreicht werden. Es wurden Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzyklus entnommen und der MI und die Menge an NtKCH-Transkripten semiquantitativ bestimmt. Aus drei unabhängigen Messreihen wurden die durchschnittliche relative NtKCH-Expression bezogen auf das Expressionsniveau 24 h nach der Behandlung mit HU, sowie der durchschnittliche MI errechnet (Abbildung 32a). Ein exemplarisches RT-PCR Gelbild ist in Abbildung 32b dargestellt. 24 h nach Behandlung mit HU lag der MI bei genau 0 %. Der potente Ribonukleotid-Reduktase Inhibitor HU (Adams & Lindsay, 1967;

Kuthanová *et al.*, 2008) verhindert die Verdoppelung der Kern-DNA, hält somit die Zellen effektiv vom Eintritt in die S-Phase zurück (S-Phase Block) und unterband damit vollständig die Teilungsaktivität der Kultur. Nach Auswaschen des Hemmstoffs durchliefen alle Zellen gemeinsam die S-Phase, wurden bald darauf jedoch durch Zugabe von Propyzamid ein zweites Mal blockiert. Propyzamid ist ein reversibles Herbizid, das selektiv nur die Neupolymerisation von Spindelmikrotubuli verhindert (Akashi *et al.*, 1988). 5-6 h nach Zugabe von Propyzamid befanden sich dadurch 60 % aller Zellen in der Prophase der Mitose. Nach Auswaschen des Inhibitors stieg die Zellteilungsrate weiterhin leicht an, bis sie 1-2 h später ihren Höhepunkt von 65-70 % erreicht hatte. Danach ging der MI sukzessive zurück, bis 4 h, nachdem der Mitose-Hemmstoff ausgewaschen worden war, der Großteil aller Zellen wieder in die Interphase eingetreten war. Wie aus der Abbildung 32a ersichtlich, korrelierte die Menge an NtKCH-Transkripten auch in diesem Experiment mit der Teilungsaktivität der synchronisierten BY-2 Zellen. Zu Beginn der Mitose war eine sehr starke Zunahme der NtKCH-Transkription zu verzeichnen. Die relative Expression betrug fast das 2,5-Fache der Expression während des S-Phase-Blocks. Nach dem Auswaschen des Propyzamids sank die Menge der NtKCH-Transkripte stetig, obwohl der MI zunächst weiter anstieg. 4 h danach hatte dann die NtKCH-Transkription jedoch das während des S-Phase-Blocks gemessene Ausgangsniveau wieder erreicht. Auch hier wird deutlich, dass die Expression des Tabak-KCH in direkter Abhängigkeit zur Zellteilung steht. Jedoch nahm auch in den synchronisierten Zellen die Transkriptionsaktivität langsamer ab als der MI. Zudem waren geringe Mengen NtKCH-mRNA auch dann nachweisbar, wenn die Zellteilung zu 100 % blockiert war (Abbildung 32b).



**Abbildung 32: Zellzyklusabhängige NtKCH-Expression in synchronisierten BY-2 Tabakzellen.** (a) Relative NtKCH-Expression (schwarze Linie, rechte y-Achse) und der entsprechende MI (graue Balken, linke y-Achse) nach der Behandlung mit HU für 24 h, sowie 0 h und in Zeitabständen von jeweils 1 h nach Auswaschen von Propyzamid. Die relativen Werte beziehen sich auf die gemessene Werte nach 24 h Behandlung mit HU. Aus drei unabhängigen Analysen wurde der Mittelwert, sowie der Standardfehler bestimmt. (b) Exemplarisches RT-PCR Gelbild einer Expressionsanalyse. Die obere Zeile zeigt die NtKCH-, die untere Zeile die GAPD-Banden.

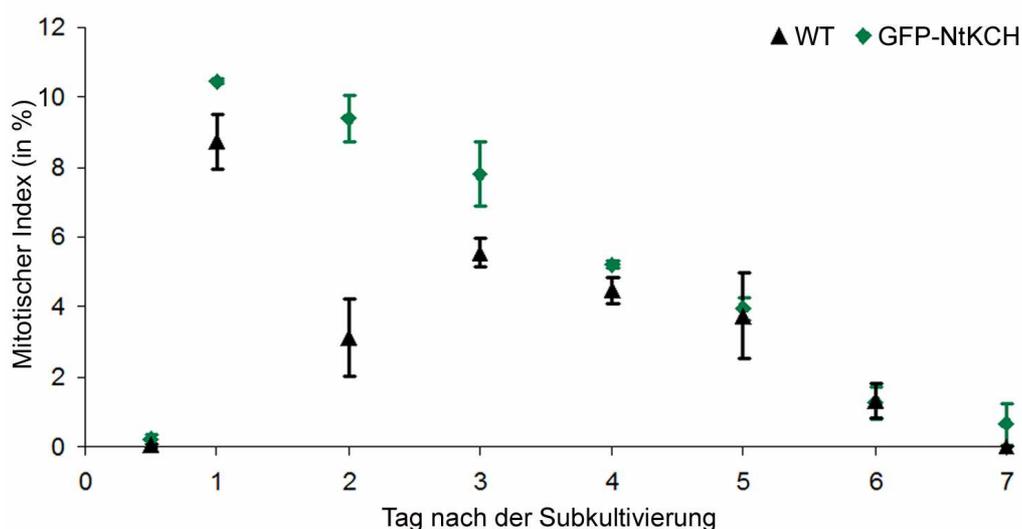
Dies zeigt, dass die Expression einer zellzyklusabhängige Regulation unterliegt, wobei die NtKCH-Transkription zu Beginn der Mitose sehr stark hoch reguliert wird. Geringe Mengen des Kinesins werden jedoch auch während der Interphase transkribiert, was eine zusätzliche Beteiligung von NtKCH während am Zellwachstum vorschlägt.

### 3.2. Zellphysiologische Untersuchungen an GFP-NtKCH Zellen

Sowohl die Lokalisation als auch das zellzyklusabhängige Transkriptionsprofil von NtKCH deuten auf eine spezifische Funktion während der pflanzlichen Zellteilung hin, schließen eine sekundäre Beteiligung am Zellwachstum jedoch nicht grundlegend aus. Ist das Kinesin in einen oder gleichzeitig in beide Prozesse involviert, so könnte die Überexpression von NtKCH in BY-2 Zellen zu Veränderungen der Zellmorphologie bzw. der Zellteilungsrate führen. Aus diesem Grund wurde die GFP-NtKCH Überexpressionslinie einer klassischen zellphysiologischen Charakterisierung unterzogen, bei der sowohl die vom kultivierungszyklusabhängige Teilungsaktivität als auch die Zelllänge und Breite bestimmt und mit Wildtyp-Zellen verglichen wurde.

#### 3.2.1. GFP-NtKCH Zellen weisen eine erhöhte Teilungsaktivität auf

Um herauszufinden, ob die Überexpression von NtKCH zu Veränderungen der Zellteilungsaktivität im Verlauf des Kultivierungszyklus führt, wurden zunächst 12 h nach der Subkultivierung und darauf folgend, alle 24 h, zeitgleich Proben aus einer BY-2 Wildtyp und einer GFP-NtKCH Zellkultur entnommen und direkt im Anschluss der MI von jeweils 500 Zellen bestimmt (Abbildung 33).



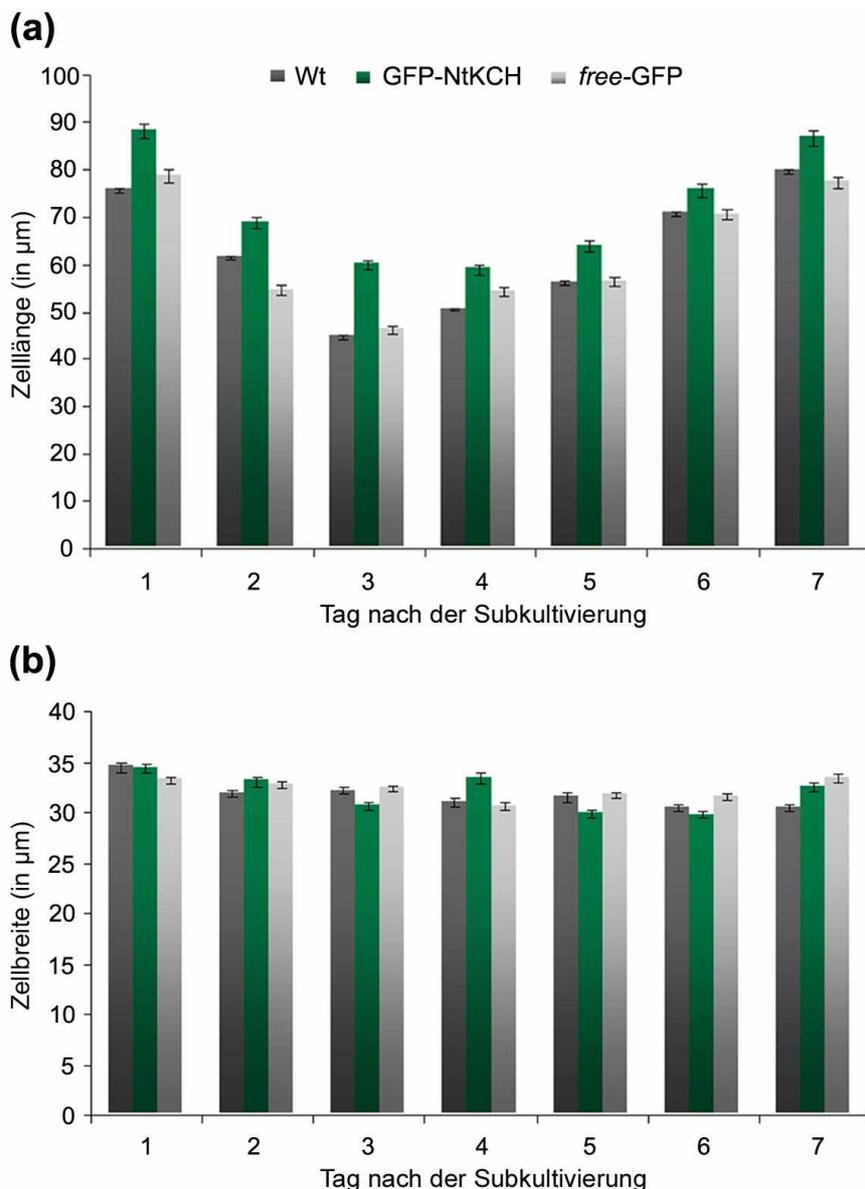
**Abbildung 33: GFP-NtKCH Zellen weisen gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte mitotische Aktivität auf.** Zeitlicher Verlauf der Zellteilungsaktivität in GFP-NtKCH- und BY-2 Wildtyp-Zellen während des Kultivierungszyklus. Das Schaubild gibt je Messpunkt den durchschnittlichen MI, sowie den errechneten Standardfehler aus Messreihen wieder.

Der Verlauf der Teilungsaktivität der Wildtyp-Zellen entsprach dabei dem bereits aus den Expressionsanalysen bekannten Muster, wobei sich die Zellen 24 h nach Umsetzen in frisches MS Medium sehr synchron mit einem MI von ungefähr 8 % zu teilen begannen. Nach einem transienten Rückgang stieg die Mitoserate wieder auf einen zweiten Höhepunkt an Tag drei des Kultivierungszyklus an. An den darauf folgenden Tagen fiel sie wieder bis auf ein Minimum an Tag sieben. In der GFP-NtKCH-Linie zeigte sich dagegen ein unterschiedlicher Verlauf der tagesabhängigen Teilungsaktivität. Sehr auffällig dabei war, dass die Zellteilungsrate und damit die Synchronität der Teilung bis an Tag vier gegenüber den Wildtyp-Zellen erhöht waren. Erst am fünften Tag erreichte der MI der GFP-NtKCH Zellen wieder das Niveau des Wildtyps. Zudem war der in der Wildtyp-Zellkultur festgestellte, kurzzeitige Einbruch der Teilungsrate an Tag zwei bei den Überexpressionszellen nicht vorhanden. Da sich auch nach der ersten Mitosewelle fast genauso viele GFP-NtKCH Zellen weiter teilten, schien die Mitose durch die Überexpression des Kinesins insgesamt beschleunigt. In Hinblick auf den gesamten Zellzyklus könnte eine gesteigerte Teilungsaktivität auch indirekt aus einem erhöhten Zellwachstum resultieren. Zellen, die schneller wachsen, können sich auch schneller teilen. Dann würde jedoch die Teilung der Überexpressionszellen aufgrund der insgesamt rapiden Zunahme der Zelldichte früher zum Erliegen kommen als in der Wildtyp-Kultur. Dies war jedoch nicht der Fall, was den Schluss zulässt, dass das primäre Angriffsziel von NtKCH nicht das Elongationswachstum, sondern die Zellteilung ist, welche durch die Überexpression des Kinesins gefördert wird.

### **3.2.2. Überexpressionszellen weisen verstärktes Elongationswachstum auf**

Der Vergleich der kultivierungszyklusabhängigen Mitoserate von GFP-NtKCH und BY-2 Wildtyp-Zellen zeigte, dass NtKCH wahrscheinlich primär eine Rolle während der Teilung von BY-2 Zellen spielt. Zur Klärung, ob die Überexpression des fluoreszenten NtKCH-Fusionskonstrukts auch Auswirkungen auf das Zellwachstum hat, wurden die GFP-NtKCH Zellen zu allen Tagen des Kultivierungszyklus vermessen und mit dem Wildtyp verglichen. Als weitere Referenz wurde eine Kultur der *free-GFP* Zelllinie mit gemessen, um sicherzustellen, dass mögliche Unterschiede des Wachstums allein auf der Überexpression von NtKCH gründen und nicht auf dem daran gekoppelten GFP. Wie den beiden Schaubildern in Abbildung 33 entnommen werden kann, zeigten sich in allen untersuchten Kulturen im Verlauf des Kultivierungszyklus große Unterschiede in der Zelllänge, während die Zellbreite weitestgehend unverändert blieb. Die längsten Zellen konnten an Tag eins und sieben nach der Subkultivierung beobachtet werden, während an Tag drei die kürzesten Zelllängen gemessen wurden. Das Zellwachstum steht also, wie erwartet, in antagonistischer Korrelation zur Zellteilung. Mit steigender Teilungsaktivität zu Beginn der Kultivierungswoche dominieren frisch geteilte, kurze Zellen. Gegen Ende der Woche erlaubt der Rückgang der Mitoserate dagegen einen starken Längenzuwachs. Darüber hinaus veranschaulichen beide

Schaubilder, dass die BY-2 Zellen im Zuge des Expansionswachstums hauptsächlich in der Länge und nicht in der Breite zunehmen. Der Vergleich der verschiedenen Zelllinien zeigte, dass die GFP-NtKCH Überexpressionszellen zu allen gemessenen Zeitpunkten länger als beide Referenzlinien waren. Dieser Unterschied war am dritten Tag am deutlichsten wahrzunehmen. Zwar ließ sich auch beim Vergleich der *free*-GFP Zellen Unterschiede in der Zelllänge gegenüber dem Wildtyp erkennen, jedoch waren diese geringfügig und variierten im Verlauf des Kultivierungszyklus nicht signifikant. Die Zellbreite blieb dagegen in allen Zelllinien an allen Tagen des Kultivierungszyklus mehr oder minder gleich.



**Abbildung: GFP-NtKCH Überexpressionszellen zeigen gegenüber den Referenzlinien ein erhöhtes Zelllängenwachstum.** (a) Zelllänge des BY-2 Wildtyps (dunkelgrau), der *free*-GFP Zellen (hellgrau) sowie der GFP-NtKCH Zellen (grün) an allen Tagen des Kultivierungszyklus. (b) Zellbreite der untersuchten Zelllinien im Verlauf des Kultivierungszyklus. In den beiden Schaubildern sind jeweils die Durchschnittswerte mit dem entsprechenden Standardfehler von 450 Zellen angegeben, die in drei unabhängigen Durchgängen zu je 150 Zellen vermessen wurden.

#### 4. Zusammenfassung der Ergebnisse

- Unter Anwendung des Verfahrens der RT-PCR mit degenerierten Primern und *RACE* konnte NtKCH, das bisher erste KCH aus *Nicotiana tabacum* isoliert werden.
- Das Kinesin weist nicht nur alle strukturellen Merkmale eines KCHs auf, sondern konnte auch anhand einer Stammbaumanalyse eindeutig dieser pflanzenspezifischen Kinesin-14 Untergruppe phylogenetisch zugeordnet werden, wobei auch eine enge Verwandtschaft mit GhKCH2 aus *G. hirsutum* und AtO22260 aus *A. thaliana* festgestellt wurde.
- Durch *in-vivo* Lokalisationsstudien und Zellskelettfärbungen an fixierten Zellen konnte das intrazelluläre Verteilungsmuster und die dynamische Neuverteilung von NtKCH zu allen Phasen des Zellzyklus beschrieben werden. Während der Interphase lokalisierte das Kinesin hauptsächlich an kortikale, teilweise auch an radiale und perinukleäre Mikrotubuli. Während der Mitose wurde es auf den Mikrotubuli des PPB und des Phragmoplasten, jedoch nicht innerhalb der Teilungsspindel beobachtet. Darüber hinaus konnte eine Kolo-kalisation mit perinukleären Aktinfilamenten festgestellt werden.
- Die unterschiedliche Lokalisation an verschiedene Zellskelettstrukturen war empfindlich gegenüber Aktin- und Mikrotubuli-Depolymerisationsgiften und wurde über verschiedene Bindedomänen vermittelt. So nutzt NtKCH seine konservierte Motordomäne zur Interaktion mit den Mikrotubuli. Die Bindung von F-Aktin verläuft dagegen über den N-terminalen Bereich, wobei jedoch die CH Domäne allein nicht ausreicht und eine zusätzliche Region vor der Motordomäne benötigt wird.
- Mittels Zeitreihen-Aufnahmen und Kymographen-Analysen gelang es, zwei verschiedene NtKCH-Populationen mit unterschiedlichen Motoreigenschaften zu identifizieren. Während sich NtKCH auf Mikrotubuli sehr langsam in Richtung der *minus*-Enden bewegte, war NtKCH auf Aktinfilamenten statisch. Darüber hinaus konnte *in-vivo* mitverfolgt werden, wie NtKCH Aktinfilamente an Mikrotubuli koppelt und sie daran entlang transportiert.
- Die Expressionsanalysen an synchronisierten BY-2 Zellen zeigten einen drastischen Anstieg der NtKCH-Transkription während der Mitose. Geringe Mengen an mRNA konnten jedoch auch während der Interphase nachgewiesen werden. Zudem zeigten GFP-NtKCH überexprimierende BY-2 Zellen gegenüber dem Wildtyp eine gesteigerte Teilungsaktivität sowie eine deutliche Zunahme der Zelllänge.

## **Diskussion**

### **1. NtKCH, das erste KCH aus *Nicotiana tabacum***

In dieser Arbeit gelang es NtKCH, das erste Mitglied der KCH-Gruppe aus *Nicotiana tabacum* zu isolieren. Anhand von Gensequenzen bereits bekannter KCHs aus anderen Pflanzen konnten degenerative Primer erstellt werden. Mit deren Hilfe gelang es, ein spezifisches cDNA-Fragment aus BY-2 Zellen zu amplifizieren, das anschließend mithilfe der *RACE* vervollständigen wurde. Die Methode der *RACE* weist zahlreiche Vorteile gegenüber konventionellen *Screening*-Methoden von cDNA-(Klon-)Banken auf. Dazu zählt einerseits, dass hierbei Gesamt-RNA bzw. cDNA direkt als Ausgangsmaterial verwendet wird. Die gesuchten cDNA-Enden können somit direkt aus dem homologen System amplifiziert und in Vektoren kloniert werden. In kürzester Zeit ist es dadurch möglich eine Vielzahl passender cDNA-Klone direkt herzustellen, die Nukleotidsequenz mehrfach zu überprüfen und somit auch mögliche Basenfehler, die auf der Reversen Transkription oder der PCR basieren, zu korregieren. Es entfällt also die sehr kosten-, zeit- und arbeitsintensive Herstellung von cDNA-Banken, wofür Gesamt-cDNA zunächst in Plasmide eingebracht und heterolog in Bakterien oder Hefen vermehrt werden muss. Mit den herkömmlichen *Screening*-Methoden können oft nur wenige passende Klone isoliert werden. Vor allem sehr gering transkribierte Gene sind in den cDNA-Banken meist nur unvollständig oder gar nicht enthalten. Die *RACE* beinhaltet dagegen einen zusätzlichen, spezifischen Amplifikationsschritt, wodurch vor allem auch sehr seltene mRNAs direkt isoliert werden können (Frohmann *et al.*, 1988; Frohmann, 1984).

Trotz aller Vorteile birgt diese Methode jedoch auch Gefahren in sich. Sowohl in der 5'- als auch bei der 3'-*RACE* wird während der Reversen Transkription, ausgehend von den angefügten Adaptersequenzen, zunächst die gesamte mRNA in cDNA umgeschrieben. Auch in der anschließenden *Nested-PCR* lagern sich die Adapter-Primer unspezifisch an alle cDNAs an. Die Spezifität der Amplifikation wird einzig und allein durch die Primer erhöht, die innerhalb des bekannten Sequenz-Abschnitts binden sollen. Somit besteht die Gefahr, dass eine andere als die gesuchte cDNA amplifiziert und so ein falsches Genende isoliert wird. In der anschließenden Auswertung kann es beim Zusammenfügen der erhaltenen cDNA-Enden mit dem bereits bekannten Sequenzbereich zur Erstellung einer nicht existierenden, chimären cDNA kommen, die aus zwei verschiedenen Genen besteht. Um solchen Missdeutungen entgegen zu wirken, wurde die hier isolierte CDS von NtKCH mehrfach vollständig aus unabhängig voneinander erstellter Gesamt-cDNA amplifiziert und sequenziert. In einer noch wichtigeren Kontrolle wurde die NtKCH-CDS mit neuen Primerpaaren in überlappenden Sequenzabschnitten vervielfältigt und diese anschließend erneut mehrfach sequenziert. Die isolierte Sequenz kodiert demnach nicht für ein artifizielles, chimäres PCR-Produkt, sondern für ein in BY-2 Zellen aktiv transkribiertes Gen.

Schon während der Isolation wurde anhand einer *BLAST*-Homologiesuche die 471 bp lange TBK9-Sequenz entdeckt, die mit der NtKCH-Nukleotidsequenz zu 95 % übereinstimmt. Diese partielle cDNA wurde zusammen mit zehn weiteren TBKs durch RT-PCR mit degenerativen Primern gegen konservierte Bereiche der Kinesin-Motordomäne aus synchronisierten BY-2 Zellen isoliert (Matsui *et al.*, 2001). Beim direkten Vergleich der Nukleotidsequenzen von NtKCH und TBK9 konnten insgesamt 24 Unterschiede festgestellt werden. Daraus ergaben sich sechs abweichende Aminosäuren, von denen jedoch vier in ihren biochemischen Eigenschaften sehr ähnlich waren (die Vergleiche der Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen sind im Anhang unter Kapitel 6 aufgeführt). Folglich könnte es sich bei NtKCH und TBK9 um ein und dasselbe Gen handeln. Fraglich ist jedoch, worauf die geringfügigen Sequenzunterschiede zurückzuführen sind. Von allen isolierten TBKs wurde nur TBK5 vollständig sequenziert und in späteren Untersuchungen an BY-2 Protoplasten näher charakterisiert (Matsui *et al.*, 2001; Goto & Asada, 2007). Es wäre möglich, dass die TBK9-cDNA, nicht wie hier geschehen, mehrfach isoliert und sequenziert wurde, und demnach fehlerhaft ist. Darauf deuten auch die damals durchgeführten Northern-Blot-Analysen hin. TBK9-mRNA konnte in synchronisierten, mitotischen BY-2 Zellen nicht nachgewiesen werden, wogegen NtKCH-Transkripte in den hier gezeigten Analysen zu allen Zellzyklusphasen detektiert werden konnten. Auf RT-PCR basierende Expressionsanalysen sind wegen des zusätzlichen Amplifikationsschritts viel sensitiver als Northern-Blot-Analysen (Marone *et al.*, 2001; Hermey, 2010), wodurch das Fehlen der TBK9-Expression durch die unterschiedlichen Analyseverfahren erklärt werden könnte. Die damals durchgeführten DNA Dot-Blot-Analysen zeigten auch, dass die verwendete TBK9-Hybridisierungssonde Kreuzreaktionen mit TBK1 und TBK10 ermöglichte und wahrscheinlich zu unspezifisch war (Matsui *et al.*, 2001). Da zur Herstellung solcher Sonden die isolierte cDNA als Matrize dient, lässt dies wiederum darauf schließen, dass das partielle TBK9 Fragment selbst Fehler aufweist, wodurch die festgestellten Sequenzunterschiede zwischen NtKCH und TBK9 erklärt werden könnten. Somit stellt die hier isolierte NtKCH-Sequenz wahrscheinlich die verlängerte und korrigierte Version von TBK9 dar. In den hier durchgeführten Expressionsanalysen wurde eine zellzyklusabhängige Regulation der NtKCH-Transkription gezeigt. Während dieser Untersuchungen konnte auch festgestellt werden, dass NtKCH insgesamt in relativ geringen Mengen transkribiert wird.

Anhand phylogenetischer Untersuchungen, die im Zusammenhang mit der Charakterisierung von OsKCH1 aus Reis durchgeführt wurden, konnten in allen analysierten Blütenpflanzen mehrerer für KCHs kodierende Gene gefunden werden, die sich insgesamt in vier verschiedene Verwandtschaftszweige aufspalteten (Frey *et al.*, 2010). Zudem konnten neben TBK9 auch TBK1, TBK2 und TBK11 einer phylogenetischen Gruppe mit AtKatD aus *A. thaliana* zugeordnet werden (Tamura *et al.*, 1999; Matsui *et al.*, 2001). Folglich ist NtKCH

zwar das erste vollständig isolierte KCH aus *N. tabacum*, wohl aber nicht das einzige. Da es sich bei den TBKs nur um cDNA-Fragmente der konservierten Motordomäne handelt, müsste geprüft werden, ob auch diese potenziellen Kinesine eine N-terminale CH Domäne aufweisen. Dieser Frage könnte in einem zukünftigen experimentellen Ansatz mit den hier erstellten degenerierten Forwärtsprimern gegen die CH Domäne und Rückwärtsprimern, die innerhalb der bekannten TBK-Sequenzbereiche binden, auf den Grund gegangen werden. Anschließend könnten diese Kinesine vollständig isoliert, charakterisiert und somit geklärt werden, ob diese Motorproteine funktionelle Homologe von NtKCH darstellen. Redundante Proteine zu NtKCH aus anderen Blütenpflanzen könnten das ebenfalls durch RT-PCR und RACE isolierte GhKCH2 aus Baumwolle (Xu *et al.*, 2007; 2009), sowie das bisher nicht charakterisierte AtO22260 aus *A. thaliana* darstellen. Beide zeigen eine sehr enge phylogenetische Verwandtschaft zu NtKCH.

## 2. NtKCH existiert in zwei Populationen

### 2.1. NtKCH lokalisiert während der Interphase an kortikale und radiale

#### Mikrotubuli

In transient und stabil transformierten BY-2 Zellen wurde GFP-NtKCH während der Interphase im Zellkortex beobachtet, wo es sich punktförmig, entlang parallel zueinander und senkrecht zur Zellachse orientierter Filamente aufreichte. Allein diese charakteristische Filamentanordnung, die bereits 1963 von Ledbetter & Porter beschrieben wurde (Ledbetter & Porter, 1963), ließ auf kortikale Mikrotubuli schließen, was sich auch in den durchgeführten Kolokalisationsexperimenten bestätigte. So wurde eine eindeutige Kolokalisation von NtKCH mit Antikörper gefärbten, kortikalen Mikrotubuli in fixierten GFP-NtKCH Zellen festgestellt. Die Kontrollfärbungen am Wildtyp und an *free*-GFP exprimierenden BY-2 Zellen machten deutlich, dass es sich hierbei um eine spezifische Kolokalisation handelt, die nicht auf artifizieller Hintergrundfluoreszenz gründet. Einen zusätzlichen *in-vivo* Beweis lieferte die transiente Koexpression von GFP-NtKCH-tr und MBD-MAP4-DsRed. Zudem war das kortikale GFP-Signal in den koexprimierenden GFP-NtKCH/RFP-FABD2 Zellen sehr sensitiv gegenüber dem Mikrotubuli depolymerisierenden Oryzalin. Dagegen löste die Behandlung mit Latrunculin B zwar das kortikale Aktin-Netzwerk auf, hatte jedoch keinerlei Einfluss auf die Lokalisation von GFP-NtKCH im Kortex. Eine präferenziellen Lokalisation an kortikale Mikrotubuli wurde bereits von KCHs aus anderen pflanzlichen Systemen berichtet, deren intrazelluläre Verteilung entweder mithilfe fluoreszenter Überexpressionskonstrukte (Frey *et al.*, 2009; Buschmann *et al.*, 2011; Umezu *et al.*, 2011) oder mittels Antikörperfärbungen gegen das jeweilige KCH untersucht wurde (Preuss *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2009). Vor allem die Immunofluoreszenzfärbungen unterstützen die Annahme, dass es sich auch bei NtKCH nicht

um eine artifizielle Lokalisation handelt und lassen darauf schließen, dass KCHs generell an das kortikale Mikrotubuli-Netzwerk lokalisieren. Zudem konnten in den hier durchgeführten Expressionsanalysen an synchronisierten BY-2 Zellen eindeutig NtKCH-Transkripte während der Interphase nachgewiesen werden. Demnach wird das Protein wahrscheinlich auch unter natürlichen Bedingungen zu dieser Zellzyklusphase exprimiert. Im Verlauf der Interphase konnte GFP-NtKCH jedoch auch innerhalb transvakuolärer Zytoplasmastränge beobachtet werden. Entsprechend den *in-vivo* Kollokalisationsversuche war das Kinesin hier hauptsächlich auf radialen Mikrotubuli zu finden, die sich gegen Ende der G2-Phase vermehrt ausbildeten.

## 2.2. NtKCH bewegt sich *minus*-End-orientiert entlang der Mikrotubuli

Mithilfe von Zeitreihen-Serien wurde das Bewegungsverhalten von NtKCH in lebenden Zellen analysiert. Dynamisches GFP-NtKCH konnte während der Interphase auf kortikalen, teilweise aber auch auf radialen Mikrotubuli beobachtet werden. Während der Zellteilung war dynamisches NtKCH auf dem PPB und dem Phragmoplasten zu finden. Diese beobachtete Dynamik könnte einerseits auf einer aktiven Eigenbewegung des Fusionsproteins, andererseits aber auch auf einem Transport durch andere (Motor-) Proteine beruhen. Alle Mitglieder der Kinesin-Superfamilie verfügen über eine konservierte Motordomäne, die variabel am N- oder C-terminalen Ende, aber auch zentral gelegen sein kann (Hirokawa & Takemura, 2004; Richardson *et al.*, 2006). Eine Sekundärstrukturanalyse mit der SMART-Software identifizierte bei NtKCH eine zentrale Kinesin-Motordomäne mit charakteristischen Bindemotiven für ATP und Mikrotubuli. Zudem lokalisierte transient exprimiertes RFP-NtKCH $\Delta$ 1-300 ausschließlich an Mikrotubuli. Obwohl in dieser Arbeit nicht direkt biochemisch nachgewiesen, lassen Kosedimentationsversuche mit den Motordomänen anderer KCH-Mitglieder darauf schließen (Tamura *et al.*, 1999; Preuss *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2007; Frey *et al.*, 2009; Umezu *et al.*, 2011), dass auch NtKCH über seine Kinesin-Motordomäne direkt in Interaktion mit Mikrotubuli steht. Die Wechselwirkung von Kinesinen mit den Mikrotubuli über die konservierte Motordomäne ist abhängig von ATP. Dabei wird die Bindung an eine Tubulin-Untereinheit durch ATP-Anlagerung verstärkt und in Folge der Hydrolyse und Abspaltung von ADP wieder geschwächt (Vale *et al.*, 1985; Endow & Barker, 2003). Bei Anwesenheit von 5'-Adenylyl-Imidodiphosphat (AMP-PNP), einem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogen, bilden sich dagegen stabile Kinesin-Mikrotubuli-Komplexe. Liegt eine ATP-abhängige Mikrotubuli-Bindung vor, so kann in Kosedimentationsversuchen mehr Kinesin durch Zugabe von AMP-PNP sedimentiert werden, als mit ATP, ADP oder keinen Nukleotiden (Lasek & Brady, 1985; Vale *et al.*, 1985; Tamura *et al.*, 1999). Die Motordomänen von AtKatD und GhKCH2 konnten durch AMP-PNP in erheblich größeren Mengen mit

gereinigten Mikrotubuli kosedimentiert werden, wodurch für beide KCHs eine ATP-abhängige Mikrotubuli-Bindung demonstriert wurde (Tamura *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2007). Jedoch konnte die Motordomäne von GhKCH2 auch ohne Zugabe von AMP-PNP, ATP oder ADP mit Mikrotubuli kosedimentiert werden, was auf eine zusätzliche ATP-unabhängige Mikrotubuli-Bindestelle innerhalb hinweist (Xu *et al.*, 2007). Umgekehrt konnte auch die ATPase-Aktivität der Motordomäne verschiedener KCHs durch Erhöhung der Mikrotubuli-Konzentration stimuliert werden. So wurde beispielsweise die basale ATPase-Aktivität von GhKCH2 durch Zugabe von Taxol-stabilisierten Mikrotubuli um den Faktor 30 erhöht (Xu *et al.*, 2007), die von OskCH1 dagegen um den Faktor 70 (Umezumi *et al.*, 2011). Diese Werte stehen jedoch in keinem Verhältnis zur Mikrotubuli-aktivierten ATPase-Aktivität konventioneller Kinesine, die maximal das 1000-Fache des Ausgangswerts annehmen kann (Umezumi *et al.*, 2011). Folglich ist die Bindung von KCHs über die Motordomäne ATP- und Mikrotubuli-abhängig und erfüllt somit alle Voraussetzungen zur aktiven Fortbewegung (Endow & Barker, 2003), welche für AtKinG, einem weiteren KCH aus *A. thaliana* bereits aufgezeigt werden konnte (Buschmann *et al.*, 2011). Dementsprechend bewegt sich wahrscheinlich auch NtKCH aktiv entlang der Mikrotubuli. Die Kinesin-Bewegung nach dem *Hand-über-Hand*-Modell setzt jedoch die Bildung von Dimeren voraus (Hancock & Howard, 1998). Diese konnte für OskCH1 bereits durch Größenausschluss-Chromatographie und bimolekularer Fluoreszenzkomplementation gezeigt werden (Frey *et al.*, 2009). Typische Bereiche zur Dimerisierung sind Sequenzmotive mit charakteristischen Heptapeptid-Wiederholungen (Lupas *et al.*, 1991), die außer bei AtKatD, in bisher allen KCHs direkt vor und hinter der katalytischen Domäne identifiziert wurden (Tamura *et al.*, 1999; Preuss *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2007; Frey *et al.*, 2009). Auch NtKCH weist an diesen Stellen Sequenz-Motive auf, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zur *Coiled-Coil*-Bildung neigen. Danach wäre auch für NtKCH eine Fortbewegung gemäß dem für konventionelle Kinesine vorgeschlagenen Modell möglich. Jedes Kinesin besitzt dabei eine charakteristische Bewegungsgeschwindigkeit, die typischerweise zwischen 6-90  $\mu\text{m}/\text{min}$  liegt (Hirokawa & Takemura, 2004). Spitzengeschwindigkeiten wurden bisher nur bei tierischen Kinesinen N-terminal gelegener Motordomäne beobachtet und zum *plus*-Ende der Mikrotubuli orientiert sind. So konnte für das hier aufgeführte DmKHC eine durchschnittliche Geschwindigkeit von 46  $\mu\text{m}/\text{min}$  gemessen werden (Hancock & Howard, 1998). Die Durchschnittsgeschwindigkeit von NtKCH beträgt  $3,26 \pm 0,09 \mu\text{m}/\text{min}$  und ist im Vergleich zum genannten DmKHC verhältnismäßig gering. Bei NtKCH handelt es sich um ein pflanzliches Kinesin mit zentral angeordneter Motordomäne. Daten zum dynamischen Verhalten von M-Kinesinen sind bisher nur von den tierischen KIF2-Kinesinen bekannt. Die meisten davon haben ihre Fähigkeit zur aktiven Fortbewegung verloren und nutzen die Energie aus der ATP-Hydrolyse stattdessen, um die Depolymerisation der Mikrotubuli-Enden

zu fördern (Ogawa *et al.*, 2004). Trotzdem gleiten KIF2-Kinesine ähnlich wie KIF1A, wahrscheinlich ATP-unabhängig durch elektrostatische Anziehung zu den Mikrotubuli *plus*-Enden um dort ihre Dynamik zu regulieren (Hirokawa & Takemura, 2004; Ogawa *et al.*, 2004). So konnte für KIF2A eine Bewegung von 28  $\mu\text{m}/\text{min}$  gemessen werden (Noda *et al.*, 1995). Bisher untersuchte Pflanzenkinesine weisen eine noch geringere Dynamik auf. So erreicht AtFRA1, das bis dato schnellste konventionelle Pflanzenkinesin, nur 24  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Zhu & Dixit, 2011). Selbst verglichen hiermit beträgt die Geschwindigkeit von NtKCH nur einen Bruchteil, was auch konform mit der geringen Mikrotubuli-abhängigen ATPase-Aktivität anderer KCHs ist (Xu *et al.*, 2007; Umezu *et al.*, 2011). Wie der Vergleich zeigt (Abbildung 29b, Ergebnisse), passt die für NtKCH gemessene Geschwindigkeit dagegen sehr gut zu den *minus*-End-gerichteten Kinesinen mit C-terminaler Motordomäne. Dabei muss beachtet werden, dass alle hier aufgeführten Werte der Vergleichskinesine *in-vitro* gemessen wurden. Diese können sich von der realen Geschwindigkeit in lebenden Zellen unterscheiden, da beispielsweise große Frachten direkten Einfluss auf die Geschwindigkeit von Kinesinen haben können (Svoboda & Block, 1994; Valentine & Block, 2009).

NtKCH zählt zur Kinesin-14 Familie, deren Mitglieder vermutlich alle zum *minus*-Ende der Mikrotubuli wandern (Richardson *et al.*, 2006). Für das an GFP gekoppelte AtKinG konnte bereits anhand konfokaler Zeitreihen-Aufnahmen eine retrograde Direktionalität demonstriert werden, wobei die Mikrotubuli-Enden anhand ihres Wachstumsverhaltens unterschieden wurden (Buschmann *et al.*, 2011). Die in dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse führen zur Annahme, dass auch NtKCH zum *minus*-Ende der Mikrotubuli läuft. Dafür spricht einerseits die geringe Bewegungsgeschwindigkeit von NtKCH selbst, die bisher nur bei tierischen und pflanzlichen Kinesinen mit *minus*-End-Direktionalität gemessen wurden. Darüber hinaus besitzt NtKCH direkt vor der Motordomäne eine familientypische Halsregion, welche die charakteristischen Determinanten *minus*-End-gerichteter Kinesine aufweist (Endow, 1999b). Zudem bewegte sich das Kinesin in den Zeitreihen-Aufnahmen auf radialen Mikrotubuli ausschließlich in Richtung des Zellkerns. Diese sind mit ihren *minus*-Enden an der Kernoberfläche verankert, welche bei Pflanzenzellen wahrscheinlich ein zentrales Mikrotubuli-Organisationszentrum darstellt (Vantard *et al.*, 1990; Lambert, 1993; Stoppin *et al.*, 1994; Yoneda *et al.*, 2004; Nick, 2008). Das letzte und wahrscheinlich stichhaltigste Argument für eine reverse Direktionalität liefert die Bewegung auf den Phragmoplast-Mikrotubuli. Dabei entfernte sich punktartiges GFP-NtKCH stets von der Teilungsebene weg. Da die Mikrotubuli innerhalb eines Phragmoplasten alle mit ihren *plus*-Enden zur Teilungsebene gerichtet sind (Euteneur *et al.*, 1982), läuft NtKCH folglich zu den entgegengesetzten *minus*-Enden.

### 2.3. Statisches NtKCH um den Zellkern ist an Aktin gekoppelt

In dieser Arbeit konnte eine transgene BY-2 Zelllinie generiert werden, mit deren Hilfe es erstmalig gelang, die Lokalisation eines KCHs hinsichtlich aller Aktinfilament-Strukturen im Verlauf des Zellzyklus zu untersuchen. Kollokationen von GFP-NtKCH und den RFP-FABD2 gefärbten Aktinfilamenten waren insbesondere während der Interphase zu beobachten. Vor allem gegen Ende der G<sub>2</sub>-Phase und beim Wiedereintritt in die G<sub>1</sub>-Phase sammelte sich GFP-NtKCH auf perinukleären und vereinzelt auch auf kernnahen, radial verlaufenden Aktinfilamenten an, wo es meist sehr intensiv fluoreszierend in Erscheinung trat. In der Zellperipherie konnten dagegen keine Überlagerungen der GFP- und RFP-Fluoreszenz festgestellt werden. GFP-KCH war hier ausschließlich auf den Mikrotubuli zu beobachten, die eindeutig oberhalb des kortikalen Aktin-Netzwerks angeordnet waren. Darüber hinaus blieb kortikales GFP-NtKCH von der Auflösung des Aktinfilament-Systems vollkommen unbeeinflusst, während im kernnahen Bereich punktartiges GFP-NtKCH nach der Behandlung mit Latrunculin B diffus und zytoplasmatisch lokalisiert war. Genau gegenläufige Resultate konnten durch die Behandlung mit dem Mikrotubuli-Gift Oryzalin erzielt werden.

Auch GhKCH1 und GhKCH2 lokalisierten im Kortex von Baumwollfaserzellen hauptsächlich an Mikrotubuli, wobei auch vereinzelte Kollokationen mit transvers-kortikalen Aktinfilament beobachtet wurden (Preuss *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2009). Ein ähnliches Expressionsmuster wurde auch für die Expression von GFP-OsKCH1 in Reiskoleoptilen beschrieben (Frey *et al.*, 2009). Dabei traten Kollokationsereignisse vorzugsweise an Stellen auf, an denen sich longitudinal ausgerichtete Aktinfilamente mit den senkrecht dazu verlaufenden Mikrotubuli überkreuzten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NtKCH in der Zellperipherie eindeutig nicht mit Aktinfilamenten kollokalierte, wodurch die Frage aufkommt, worauf dieses unterschiedliche Expressionsmuster verschiedener KCHs begründet ist. Einerseits könnten unterschiedliche Mitglieder dieser Kinesin-Gruppe nur mit spezifischen Aktinfilament-Strukturen interagieren. Allerdings war die Lokalisation von GhKCH1 und GhKCH2 identisch und NtKCH ist entsprechend den hier durchgeführten phylogenetischen Untersuchungen sehr nah verwandt mit GhKCH2, nicht aber mit GhKCH1. Eine weitere Ursache könnte in dem hier gewählten experimentellen Ansatz liegen. Sowohl GFP-NtKCH als auch RFP-FABD2 stehen unter Kontrolle eines CaMV-35S-Überexpressionspromotors und bei beiden Fusionsproteinen spielt wahrscheinlich die CH Domäne eine wichtige Rolle in der Aktinfilament-Bindung. Es drängt sich der Verdacht auf, dass durch die Überexpression von RFP-FABD2 alle für GFP-NtKCH reservierten Bindestellen auf den kortikale Aktinfilamenten besetzt sind, wodurch es nicht mehr daran lokalisieren kann. Gegen einen solchen Verdrängungseffekt spricht jedoch, dass GFP-NtKCH auch in den BY-2 Zellen, die zusätzlich mit MBD-MAP4-DsRed kotransformiert wurden, kortikal ausschließlich auf den

Mikrotubuli zu finden war. Zudem konnte die gleiche intrazelluläre Verteilung von GFP-NtKCH auch bei GFP-AtKinG beobachtet werden, das entweder mit dem fluoreszenten Tubulinmarker RFP-Tubulin- $\alpha 6$  oder mit dem Aktinfilamentmarker DsRed-Talin in BY-2 Zellen überexprimiert wurde (Buschmann *et al.*, 2011). Interessanterweise stimmte auch die Verteilung von GFP-OsKCH1 während der Interphase mit derjenigen von NtKCH überein, aber nur, wenn es heterolog in BY-2 Zellen eingebracht wurde, während es in homologen Koleoptilenzellen auch an kortikale Aktinfilamente assoziierte (Frey *et al.*, 2009). Reiskoleoptilenzellen sind ähnlich wie Baumwollfaserzellen auf schnelles Elongationswachstum ausgelegt, wobei die Organisation des kortikalen Zellskeletts von besonderer Bedeutung ist (Seagull, 1992; Nick, 2008). Zyklische BY-2 Zellen zeigen dagegen gleichermaßen Teilungs- und Zellstreckungswachstum. Somit könnte die Interaktion mit unterschiedlichen Aktinfilament-Strukturen in direkter Abhängigkeit des jeweiligen Zellsystems stehen.

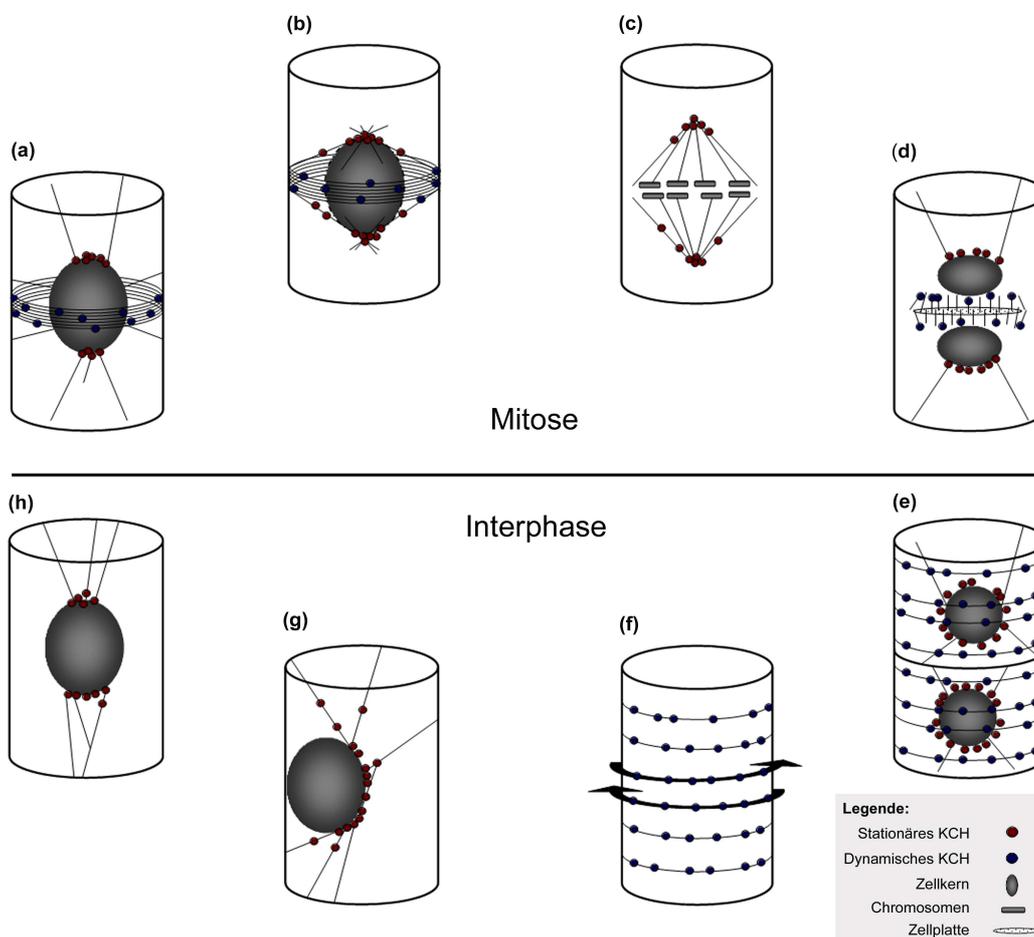
Unabhängig davon deuten die Ergebnisse insgesamt darauf hin, dass KCHs in der Lage sind zwischen verschiedenen Aktinfilament-Strukturen zu unterscheiden. Dies impliziert wiederum eine zelluläre Regulation, welche die differentielle Bindung unterschiedlicher Elemente des Zellskeletts steuert. Anhand von Zeitreihen-Aufnahmen und Kymographen-Auswertungen konnte festgestellt werden, dass an F-Aktin assoziiertes GFP-NtKCH im Gegensatz zu dem auf den Mikrotubuli statisch war. Das Kinesin scheint folglich in zwei unterschiedlichen Subpopulationen zu existieren, die sich sowohl in ihrer zellulären Lokalisation, als auch in ihrem dynamischen Verhalten unterscheiden.

#### **2.4. Lokalisation und dynamische Neuverteilung von NtKCH im Verlauf des Zellzyklus**

Die GFP-NtKCH/RFP-FABD2 Zellen wurden insbesondere auch genutzt, um die Verteilung von NtKCH in Relation zu verschiedenen Aktinfilament-Strukturen während der Mitose zu untersuchen. Darüber hinaus wurde der Versuch unternommen, eine weitere BY-2 Zelllinie zu generieren, die neben dem GFP-NtKCH auch einen Mikrotubuli-Marker (MAP4-MBD-DsRed oder RFP-Tubulin- $\alpha 3$ ) koexprimiert. Trotz der erfolgreichen Kotransformation war jedoch die Expression in den antibiotikaresistenten Kalli asymmetrisch zugunsten eines der beiden Fusionsproteine verschoben. Es konnte keine Zellpopulation isoliert werden, die beide Fusionen auf gleichem Niveau exprimierte, wodurch eine direkte *in-vivo* Untersuchung der NtKCH-Verteilung hinsichtlich unterschiedlicher Mikrotubuli-Organisationen während der Mitose nicht möglich war. Alternativ wurden die GFP-NtKCH Zellen fixiert und einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung gegen Mikrotubuli unterzogen. Als Kontrollen wurden die Färbungen an BY-2 Wildtyp-Zellen und *free*-GFP Zellen wiederholt, wobei keine spezifische Kolokalisation des GFP an Mikrotubuli-Strukturen wie dem PPB, der Spindel oder des Phragmoplasten festgestellt werden konnte.

Auf Grundlage der gewonnenen Daten, wurde ein Modell erstellt, welches die intrazelluläre Verteilung GFP-NtKCH und seine unterschiedliche Lokalisation an unterschiedlichen Mikrotubuli- und Aktinfilament-Strukturen zu allen Phasen des Zellzyklus wiedergibt und dabei auch die Informationen zur Eigendynamik des Kinesins mit einbezieht (Abbildung 34). Das Modell impliziert, dass NtKCH in zwei Subpopulationen koexistiert, die sich sowohl in ihren Motoreigenschaften als auch in ihrer Interaktion mit Aktinfilamenten unterscheiden. Sowohl dynamisches als auch statisches NtKCH wurde über den gesamten Zellzyklus hinweg beobachtet. Wie bereits erläutert, dekorierte dynamisches GFP-NtKCH während der Interphase das kortikale Mikrotubuli-Netzwerk (Abbildung 34f). Statisches NtKCH war dagegen auf dem perinukleären Zellskelett zu finden, wo es auch mit den Aktinfilamenten in Kontakt stand (Abbildung 34g, h). Obwohl das intensiv fluoreszierende, perinukleäre GFP-NtKCH selbst keine Eigendynamik aufwies, wurde es im Verlauf des Zellzyklus an unterschiedliche Bereiche auf der Kernoberfläche neu verteilt, was anhand des dargestellten Modells hervorgehoben werden soll. Diese Neuverteilung könnte in direktem Zusammenhang mit dem Aktinfilament-Netzwerk stehen. Während der G1-Phase, in der der Zellkern meist in nächster Nähe zur Zellmembran zu finden war, sammelte sich GFP-NtKCH besonders an der zur Zellmitte ausgerichteten Kernseite an, wo auch das meiste perinukleäre Aktin beobachtet werden konnte (Abbildung 34g; vergleiche hierzu auch Abbildung 21j-l, Ergebnisse). Diese asymmetrische Verteilung änderte sich, sobald der Kern in Richtung der Zellmitte wanderte. GFP-NtKCH wurde dabei zunächst in der gesamten Kernhülle verteilt und verlagerte sich während der G2-Phase an die künftigen Spindelpole, an denen es die gesamte Kernteilung über verharrte (Abbildung 34h, a-d). Dynamisches GFP-NtKCH trat in der frühen G2-Phase sowohl im Zellkortex als auch auf radialen Filamenten auf. Den transienten Kotransformationen entsprechend lokalisierte das Kinesin hier vornehmlich an Mikrotubuli, welche von der Kernhülle direkt im Kontakt mit dem Zellkortex stehen, und zu diesem Zeitpunkt verstärkt gebildet werden. Während kortikales GFP-NtKCH beim Eintritt in die Präprophase nur noch auf den Mikrotubuli des PPB zu finden war und danach vollständig aus dem Zellkortex verschwand, nahm die Expression von statischem NtKCH um den Kern zu. Den Immunofärbungen an fixierten GFP-NtKCH Zellen zufolge sitzt das Kinesin hier auf Mikrotubuli, welche die Kernhülle umschließen, sammelte sich jedoch besonders an den künftigen Spindelpolen an, wo es auch an Aktinfilamente gekoppelt ist (Abbildung 34b; vergleiche hierzu auch Abbildung 26o, Ergebnisse). Während der Metaphase konnte keine spezifische Kolo-kalisation von GFP-NtKCH mit den Spindel-Mikrotubuli festgestellt werden (Abbildung 34c). Anders dagegen in der Telophase, in der neue punktartige GFP-NtKCH Signale auf den Filamenten des Phragmoplasten zu beobachten waren (Abbildung 34d). Die Mikrotubuli-Färbungen an GFP-NtKCH-Zellen, die Studien an den GFP-NtKCH/RFP-FABD2 Zellen, sowie die Wirkstoffbehandlungen mit

Latrunculin B zeigten, dass NtKCH hier nur an Mikrotubuli assoziierte. Zudem entwickelte GFP-NtKCH auf dem Phragmoplasten eine deutliche Eigendynamik, die stets zu den entstehenden Tochterkernen gerichtet war. Gleichzeitig mit der Rückbildung des Phragmoplasten wurde daran assoziiertes GFP-NtKCH immer diffuser, verlagerte sich zu den neu entstehenden Kernen und wandelte sich dort wieder in statische, punktförmige Signale um. Da statisches NtKCH, das an den Spindelpolen überdauert hatte und durch die Kernteilung zwangsläufig asymmetrisch auf die distalen Seiten der Tochterkerne geschoben wurde, waren mit Abschluss der Zytokinese wieder auf beide gegenüberliegende Seiten der Tochterkerne Ansammlungen von GFP-NtKCH zu finden. Diese verteilten sich bald darauf gleichmäßig im gesamten perinukleären Bereich (Abbildung 34e).



**Abbildung 34: Modell zur dynamischen Neuverteilung von NtKCH im Verlauf des Zellzyklus.**

Das Modell gibt die Lokalisation von NtKCH zu allen Phasen des Zellzyklus wieder. Vorausgesetzt wird die Koexistenz zweier NtKCH-Populationen, die sich sowohl in ihrer Dynamik, als auch in ihrer intrazellulären Lokalisation unterscheiden. Während dynamisches NtKCH auf kortikalen Mikrotubuli, sowie innerhalb des PPB und des Phragmoplasten zu finden ist, konzentriert sich statisches NtKCH im perinukleären Bereich, in dem es wahrscheinlich auch mit Aktinfilamenten interagiert. Die nähere Beschreibung ist Kapitel 2.4 zu entnehmen.

Die gleichzeitig mit dem Verschwinden von dynamischem GFP-NtKCH einhergehende Zunahme an statischem NtKCH, sowohl zu Beginn der Mitose als auch beim Wiedereintritt in die Interphase, legen nahe, dass beide NtKCH-Populationen zu diesen Zellzyklusphasen ineinander umgewandelt werden. In den folgenden Kapiteln wird deswegen diskutiert, wie dieser Wandlungsprozess reguliert werden könnte. Den hier gewonnenen Lokalisationsdaten gemäß könnte die unterschiedliche Wechselwirkung mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli dabei eine wichtige Rolle spielen.

### **3. Mögliche Regulation der Interaktion von NtKCH mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli**

#### **3.1. Interagiert NtKCH direkt mit F-Aktin?**

Während der fluoreszenzmikroskopischen Auswertungen der doppelt transformierten BY-2 Zellen konnte eine eindeutige Kolo-kalisation von GFP-NtKCH mit den RFP-FABD2 gefärbten Aktinfilamenten festgestellt werden, die sich auf den Bereich nahe dem Zellkern begrenzten. Aufgrund der verwendeten Überexpressionskonstrukte könnte es sich dabei auch um artifizielle Überlagerungen der Fluoreszenzsignale handeln. Jedoch kolo-kalisiert alle bisher charakterisierten KCHs mit verschiedenen Aktinfilament-Strukturen, auch bei Verwendung spezifischer Antikörper (Preuss *et al.*, 2004; Frey *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009; Buschmann *et al.*, 2011). Anhand dieser Lokalisationsstudien ist es jedoch nicht möglich, eine konkrete Aussage darüber zu treffen, ob NtKCH in direktem physikalischen Kontakt mit F-Aktin steht. Ein möglicher *in-vivo* Interaktionsnachweis könnte über bimolekulare Fluoreszenzkomplementation oder Förster-Resonanzenergietransfer-Studien verlaufen, wodurch sich jedoch auch nur bestimmen lassen würde, ob NtKCH und F-Aktin im selben Proteinkomplex vorliegen (Bhat *et al.*, 2006; Ohad *et al.*, 2007).

Zur genaueren Prüfung einer möglichen Interaktion wurden die koexprimierenden GFP-NtKCH/RFP-FABD2 Zellen mit spezifischen Zellskelettgiften behandelt, wobei festgestellt werden konnte, dass die Lokalisation NtKCH an die Aktinfilamente direkt von deren Integrität abhängig war. Auch diese Versuche lieferten weitere Indizien, aber keinen endgültigen Beweis, dass das Kinesin direkt an F-Aktin gekoppelt ist. Das Aktinfilament-System trägt wesentlich zur intrazellulären Organisation pflanzlicher Zellen bei und hält die Integrität des Zytoplasmas aufrecht (Kost & Chua, 2002). Zudem steht es in direkter Wechselwirkung mit den Mikrotubuli (Collings, 2008). Dementsprechend muss die zytoplasmatische Lokalisation kernnaher GFP-NtKCH-Signale nach der Behandlung mit Latrunculin B nicht zwangsläufig auf der Auflösung der Aktinfilamente gründen, sondern könnte auch eine indirekte Folge der damit einhergehenden Veränderung der intrazellulären Ordnung und der Organisation der Mikrotubuli darstellen.

Einen stichhaltigeren Hinweis auf eine direkte Interaktion lieferte dagegen die transiente Transformation von RFP-NtKCH $\Delta$ 409-1001, sowie dessen Kotransformation mit dem Mikrotubuli-Marker MBD-MAP4-GFP. Das gekürzte Fusionskonstrukt der N-terminalen Hälfte von NtKCH färbte ausschließlich Strukturen, die anhand der charakteristischen, Y-förmigen Verzweigungen eindeutig als Aktinfilamente identifiziert wurden. Verantwortlich für diese Verzweigungen ist der unter allen Eukaryoten konservierte Arp2/3-Protein-Komplex, die sich seitlich an Aktinfilamente anlagert und die Neupolymerisation von Filamenten fördert, welche in einem typischen Winkel von 70° aus einem bereits bestehenden Filament abzweigen (Mullins *et al.*, 1998; Amann & Pollard, 2001; Pollard & Borisy, 2003). Darüber hinaus wurde in den aufgeführten Kotransformationen mit MBD-MAP4-GFP keines dieser Filamente durch den fluoreszenten Mikrotubuli-Marker angefärbt, was zusätzlich bestätigte, dass es sich hierbei um Aktinfilamente handeln muss. Fraglich bleibt, ob diese potenzielle Bindung direkt verläuft oder zusätzliche Adapterproteine erforderlich macht. Jedoch konnten N-terminale Proteinfragmente verschiedener KCHs bereits direkt mit gereinigten Aktinfilamenten kosedimentiert werden (Preuss *et al.*, 2004; Frey *et al.*, 2009; Umezu *et al.*, 2011) und das vollständige, rekombinant hergestellte GhKCH2 bewies *in-vitro* eindeutige Aktin-Binde- und Bündelungseigenschaften (Xu *et al.*, 2009). Trotz der hier fehlenden proteinbiochemischen Nachweise kann davon ausgegangen werden, dass wahrscheinlich auch NtKCH die Fähigkeit besitzt F-Aktin über die N-terminale Hälfte ohne zusätzliche Adapter-Proteine direkt zu binden.

### 3.2. Die Rolle der N-terminalen CH Domäne in der Interaktion mit F-Aktin

Innerhalb der N-terminalen Hälfte von NtKCH findet sich die namensgebende CH Domäne. Dieses Sequenzmotiv wurde ursprünglich in Calponin identifiziert, einem Aktin-Bindeprotein, dass sich insbesondere in glatten Muskelzellen anreichert (Takahashi *et al.*, 1986; North *et al.*, 1994). Dieses Sequenzmotiv wurde in zahlreichen Aktin-Binde- und Bündelungsproteinen wie  $\alpha$ -Actinin,  $\beta$ -Spectrin oder tierischen und pflanzlichen Fimbrinen als Teil der Aktin-Bindedomäne (ABD) gefunden (de Arriuda *et al.*, 1990; Castresana & Saraste, 1995; Gimona *et al.*, 2002). Folglich liegt die Vermutung nahe, dass auch KCHs ihre CH Domäne zur direkten Bindung von F-Aktin nutzen. Dieser Sachverhalt stellt sich jedoch nicht ganz so einfach dar. Bisher besitzen alle Proteine, die Aktinfilamente direkt über CH Domänen binden, eine ABD, die sich aus mindestens zwei hintereinanderliegende und durch eine kurze Verbindungsregion voneinander getrennte CH Domänen zusammensetzt (Gimona *et al.*, 2002; Sjöblom *et al.*, 2008). Proteine wie  $\alpha$ -Actinin,  $\beta$ -Spectrin und Filamin sind zur Dimerisierung befähigt, wodurch sie Aktinfilamente miteinander verbinden und bündeln können. Fimbrine sind dagegen monomere Aktinfilament-Bündler und verfügen demnach über zwei ABD-Module (de Arriuda *et al.*, 1990; Gimona *et al.*, 2002). Beide CH

Domänen innerhalb einer ABD weisen geringfügige Sequenzunterschiede auf, welche sich in ihrer unterschiedlichen Affinität und ihrer Fähigkeit F-Aktin eigenständig zu binden bemerkbar machen. Allen bisherigen Untersuchungen zufolge können Typ-1 CH Domänen Aktinfilamente eigenständig *in-vitro* binden, während die dahinter angeordneten Typ-2 CH Domänen dazu nicht in der Lage sind. Jedoch ist die Affinität einer einzelnen Typ-1 CH Domäne zehnmal niedriger, als die einer vollständigen ABD, weswegen davon ausgegangen wird, dass die zweite CH Domäne indirekt Interaktion mit den Aktinfilamenten verstärkt (Gimona *et al.*, 2002). Einzelne CH Domänen wurden in zahlreichen Struktur- und Signalproteinen wie Vav, IQGAP, SM22, oder EB1 identifiziert, die F-Aktin nicht direkt binden (Sjöblom *et al.*, 2008). Diese CH Domänen weisen erhebliche Sequenzunterschiede zu Typ-1/2 CH Domänen auf und können F-Aktin *in-vitro* nicht binden, weswegen sie als Typ-3 CH Domänen klassifiziert wurden (Gimona *et al.*, 2002). Auch Calponin selbst besitzt eine einzelne N-terminale Typ-3 CH-Domäne, die jedoch weder Einfluss auf Fähigkeit, noch auf die Art der Aktinfilament-Bindung hat, die wahrscheinlich über eine Region innerhalb des C-Terminus vermittelt wird (Gimona & Mital, 1998).

Auch KCHs steht nur eine einzelne CH Domäne zur Verfügung, weswegen eine Interaktion mit F-Aktin für AtKatD grundlegend ausgeschlossen wurde (Tamura *et al.*, 1999). Dem gegenüber stehen die hier vorliegenden, sowie die Ergebnisse aus Untersuchungen von GhKCH1, GhKCH2 und OsKCH1 (Preuss *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2009; Frey *et al.*, 2010). Ein großes Rätsel bleibt also, wie es KCHs gelingt F-Aktin mit einer unvollständigen ABD zu binden. Der hier durchgeführte Vergleich zeigte, dass die CH Domänen verschiedener KCHs eine starke Ähnlichkeit zu den Typ-3 CH Domänen aufweisen. Diese CH Domänen bildeten eine eigene phylogenetische Gruppe, was vermuten lassen könnte, dass sie sich evolutionär von den Typ-3 CH Domänen getrennt entwickelt haben und eine eigenständige Aktin-Bindfähigkeit entsprechend den Typ-1 CH Domänen beibehalten haben könnten. Doch wurde diese Hypothese insbesondere durch die Versuche mit den gekürzten NtKCH-Fluoreszenzfusionen widerlegt. RFP-NtKCH $\Delta$ 251-1001, welches nur den vorderen N-terminalen Teil mit der CH Domäne umfasste, wurde vollkommen zytoplasmatisch exprimiert. Demnach ist auch die CH Domäne von NtKCH alleine nicht ausreichend um Aktinfilamente zu binden. RFP-NtKCH $\Delta$ 409-1001 lokalisierte dagegen ausschließlich an F-Aktin, was bedeutet, dass zur Bindung zusätzlich der Bereich zwischen der CH Domäne und der konservierten Kinesin-Motordomäne notwendig ist. Wird die CH Domäne für die Bindung der Aktinfilamente also überhaupt gebraucht? Oder wird diese vollständig über den dahinter liegenden Bereich vermittelt? Die Antwort könnten Untersuchungen von Xu *et al.* (2009) liefern, in denen gekürzte Varianten von GhKCH2 transient in Protoplasten von *A. thaliana* geschossen wurden. Lokalisiertes eines der mit GFP fusionierten Fragmente an intrazelluläre Filamente, so wurden im Anschluss durch Behandlung mit Zellskelettgiften

getestet, ob es sich dabei um Aktinfilamente handelte. Auch in diesen Versuchen lokalisierten fluoreszente Fusionen an die eigenständige CH Domäne von GhKCH2 ausschließlich im Zytoplasma. Genauso auch die Region zwischen der CH Domäne und der Kinesin-Motordomäne. Folglich ist die CH Domäne wahrscheinlich auch bei NtKCH zwar notwendig, reicht alleine jedoch nicht aus um eine Bindung an Aktinfilamente zu vermitteln, was umgekehrt auch für die Region zwischen der CH- und Motordomäne gilt.

### 3.3. Dimerisierung als mögliche Voraussetzung der Aktinfilament-Bindung

Da NtKCH zur Interaktion mit den Aktinfilamenten zusätzlich die Region kurz vor der katalytischen Motordomäne benötigt, stellt sich die Frage, welche Aufgabe diesem Bereich bei der F-Aktin-Bindung zukommt. Durch eine *in silico* Analyse in *COILS* wurde direkt vor der Motordomäne von NtKCH ein kurzer Bereich identifiziert, der zur Bildung von *Coiled-Coils* neigt (As 300-360). Darüber hinaus konnten durch Sekundärstrukturanalysen in *SMART* und *ProSite* (<http://prosite.expasy.org/>; Stand Oktober, 2011) keine weiteren kanonischen Domänen oder Sequenzmotive innerhalb dieses Abschnitts gefunden werden. *Coiled-Coil*-Regionen ermöglichen die Bildung von Protein-Dimeren oder Oligomeren. Da eine einzelne CH Domäne für die Bindung an F-Aktin nicht genügt, könnte demnach die Bildung von Dimeren die Voraussetzung erfüllen, dass zwei CH Domänen in räumliche Nähe zueinander kommen und somit eine aktive ABD hergestellt wird (Frey *et al.*, 2009). Zudem wäre eine Ansammlung von NtKCH in Dimeren oder Oligomeren auch eine plausible Erklärung für die hier beobachteten, intensiv fluoreszierenden GFP-NtKCH Punkte im perinukleären Bereich. Untersuchungen an tierischen Proteinen zeigen, dass zwei CH Domänen vom gleichen Typ, die durch Dimerisierung zueinander kommen, zur Mikrotubuli-Bindung genutzt werden (Sjöblom *et al.*, 2008). Darunter beispielsweise tierische und pilzliche Vertreter der EB1-Familie, welche eine N-terminale CH Domäne besitzen und über Homodimerisierung an die *plus*-Enden der Mikrotubuli binden und ihre Neubildung fördern können (Slep *et al.*, 2005; Sjöblom *et al.*, 2008). Gekürztes EB1 ohne die C-terminale Dimerisierungsdomäne konnte die Neubildung der Mikrotubuli *in-vitro* nicht mehr anregen, während ein chimäres Konstrukt der CH Domäne von EB1 und einer artifiziellen Dimerisierungsdomäne diese Fähigkeit wieder zurück erlangte. Zudem lokalisierten GFP-Fusionen der CH Domäne von EB1 *in-vivo* nur dann an die *plus*-Enden der Mikrotubuli, wenn die Möglichkeit zur Dimerisierung gegeben war (Slep & Vale, 2007). Ein weiteres Beispiel liefert der Ncd80-Komplex, welcher in verschiedenen tierischen Zellen die Kinetochore mit den Spindel-Mikrotubuli verbindet (Ciferri *et al.*, 2007). Die an die Mikrotubuli bindende Einheit dieses Komplexes besteht aus Ncd80 und Nuf2. Beide Untereinheiten dimerisieren über eine lange *Coiled-Coil*-Region, wodurch ihre N-terminalen CH Domänen zusammenkommen, was die Bindung an Mikrotubuli ermöglicht. Der Vergleich der Proteinstrukturen des Ncd80-Nuf2-Komplexes und

der ABD von  $\alpha$ -Actinin zeigte, dass die Unterschiede der Aktin- und Mikrotubuli-Bindfähigkeit hauptsächlich auf die jeweilige Nahtstelle der beiden CH Domänen zurückzuführen ist (Ciferri *et al.*, 2008). Somit bilden zwei gleiche CH Domänen, die hintereinander auf derselben Polypeptidkette liegen eine ABD, während zwei unterschiedliche, die durch Homo- oder Heterodimerisierung zueinanderfinden, als Mikrotubuli-Bindedomäne genutzt werden (Sjöblom *et al.*, 2008).

Jedoch lokalisierte RFP-NtKCH $\Delta$ 409-1001 mit der CH Domäne und dem ersten *Coiled-Coil* direkt vor der Motordomäne ausnahmslos an Aktinfilament-Strukturen. Eine mögliche Dimerisierung von NtKCH wird also vermutlich nur zur Motordomänen-abhängigen Bewegung auf den Mikrotubuli genutzt. Dafür sprechen auch die Beobachtungen, die im Zuge der Untersuchungen von GhKCH2 gemacht wurden (Xu *et al.*, 2009). Zusätzlich zu den bereits erwähnten, fluoreszenten GhKCH2-Fragmenten, wurden weitere Varianten getestet, die sowohl die CH Domäne als auch Teilabschnitte des Zwischenbereichs umfassten. Je länger hierbei der Bereich im Anschluss an die CH Domäne war, desto mehr Aktinfilamente wurden angefärbt. Aber auch das Konstrukt mit einem sehr kurzen Abschnitt direkt hinter der CH Domäne, der weit von der ersten *Coiled-Coil*-Region vor der Motordomäne entfernt lag, lokalisierte an F-Aktin (Xu *et al.*, 2009). Somit ist der Bereich zwischen der CH und der katalytischen Motordomäne essenziell für die Bindung an F-Aktin und eine Dimerisierung an sich wahrscheinlich irrelevant. Eine eindeutige Klärung wäre jedoch nur anhand von Proteinstrukturanalysen von NtKCH und der Aktin-Binderegion möglich.

### 3.4. Konkurrieren Mikrotubuli und Aktinfilamente um NtKCH?

Es konnten zwei unterschiedliche Populationen von NtKCH identifiziert werden, die zu allen Phasen des Zellzyklus präsent waren und sich sowohl in ihrer Eigendynamik als auch in ihrer subzellulären Lokalisation und Interaktion mit verschiedenen Zellskelettstrukturen unterschieden. Dies setzt wiederum einen intrazellulären Regulationsmechanismus voraus. NtKCH wurde in synchronisierten Tabakzellen schon zu einem frühen Zeitpunkt der Mitose transkriptionell hoch reguliert. Der periodische Anstieg mitotischer Proteine wird am Übergang von der G2- in die M-Phase wird meist über Mitose-Aktivierungsmotive (MSA) vermittelt, die in der rund 1000 Basenpaare umfassenden Promotorregion vor dem Start-Codon zu finden sind (Itoh *et al.*, 1998). MSA-Elemente wurden bisher in vielen für die Mitose spezifischen Kinesinen, wie auch in AtO22260 identifiziert (Vanstraelen *et al.*, 2006), was vermuten lässt, dass genauso auch NtKCH mindestens eines dieser *cis*-Elemente innerhalb seines intrinsischen Promotors aufweist, über das die Expression auf Ebene der mRNA gesteuert wird.

Während der Mitose lokalisierte NtKCH an die Mikrotubuli des PPB und des Phragmoplasten, jedoch nicht an die Teilungsspindel. Trotzdem konnte auch während der Metaphase ein diffuses GFP-NtKCH Fluoreszenzsignal im Bereich der Teilungsebene beobachtet werden, was vermuten lässt, dass NtKCH hier abgelagert wird, damit es kurz nach der Kernteilung an die Phragmoplast-Mikrotubuli binden kann. Diese selektive Bindung könnte aus unterschiedlichen Affinitäten des Kinesins zu den mitotischen Strukturen resultieren, welche wiederum auf Unterschiede der Mikrotubuli zurückzuführen sein könnten. Ursache hierfür könnten posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung, Glutamylierung, Phosphorylierung und Tyrosinierung sein (Hammond *et al.*, 2008). So beeinflusst beispielsweise die Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin die Mikrotubuli-Bindung von Kinesin-1 (KHC) sowie den davon abhängigen Transport in neuronalen Zellen (Reed *et al.*, 2006). UncA, ein Mitglied der Kinesin-3 Familie aus *Aspergillus nidulans* heftet sich dagegen präferentiell nur an detyrosinierte Mikrotubuli und nicht an die tyrosinierten Spindelmikrotubuli (Zekert & Fischer, 2009). Darüber hinaus führt die irreversible Tyrosinierung von  $\alpha$ -Tubulin durch Zugabe von Nitrotyrosin zur Hemmung der Zellteilung und falsch orientierter Zellplatten in BY-2 Zellen, wahrscheinlich, indem die Interaktion spezifischer Motorproteine mit den Phragmoplast-Mikrotubuli verhindert wird (Jovanovic *et al.*, 2010). Für zukünftige Untersuchungen wäre es interessant mit spezifischen Antikörpern gegen tyrosinierte oder detyrosinierte Mikrotubuli herauszufinden, ob die Lokalisation von NtKCH in direktem Zusammenhang mit dieser posttranslationalen Modifikation der Mikrotubuli steht.

Die Interaktion mit den Mikrotubuli kann aber auch durch Modifikationen des Kinesins selbst reguliert werden. Eine wichtige Rolle nehmen in tierischen Zellen hierbei die Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CDKs) ein. So wird die Mikrotubuli-Bindfähigkeit verschiedener tierischer Mitglieder der Kinesin-4, -5, -6 und -7 Familie während der Metaphase durch reversible Phosphorylierung aktiviert (Vanstraelen *et al.*, 2006). Auch in Pflanzen unterliegt der Zellzyklus und die zeitlich unterschiedliche Aktivität verschiedener mitotischer Proteine einer strikten Kontrolle, in der CDKs und ihre regulatorischen Cyclin-Untereinheiten eine essenzielle Rolle spielen (Hemerly *et al.*, 1999). Allein in 14 von 23 Kinesinen, deren Transkription in *A. thaliana* während der Mitose ansteigt, konnten passende Phosphorylierungsstellen für die CDKA gefunden werden. Jedoch wurde bisher kein direkter Beweis für eine Interaktion pflanzlicher Kinesine mit den CDKs geliefert (Vanstraelen *et al.*, 2006). Einen konkreten Hinweis darauf, dass auch in Pflanzen die Aktivität mitotischer Kinesin über CDKs gesteuert wird, geben Untersuchungen zu NACK1 (*NPK1-activating kinesin-like protein 1*) (Sasabe *et al.*, 2011). Das N-Kinesin aus Tabakzellen ist für die dynamische Reorganisation der Mikrotubuli während der lateralen Expansion des Phragmoplasten verantwortlich und interagiert direkt mit NPK1 (*Nucleus- and phragmoplast-localized kinesin-related protein 1*). NACK1 und NPK1 werden in der frühen

Metaphase durch Phosphorylierung an der gegenseitigen Wechselwirkung gehemmt und bleiben somit bis nach der Spindelphase inaktiv. Erst danach wird die Phosphorylierung aufgehoben, wodurch NACK1 seine Funktion auf den Phragmoplast-Mikrotubuli ausführen kann und über die Interaktion mit NPK1 gleichzeitig auch eine MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*)-Signalkaskade in Gang setzt, welche für die Vollendung der Zytokinese benötigt wird (Sasabe *et al.*, 2011). Folglich könnte auch NtKCH zu Beginn der Mitose translatiert und erst kurz nach der Metaphase durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung aktiviert werden. Durch (De-)Phosphorylierung oder anderen posttranslationalen Modifikationen könnte auch die Bindung an unterschiedliche Aktinfilament- und Mikrotubuli-Strukturen während der Interphase reguliert werden. Die hier durchgeführten Studien mit gekürzten NtKCH-Fusionen schlagen eine intramolekulare Regulation vor, welche aber eine zusätzliche Steuerung durch posttranslationale Modifikationen nicht ausschließt.

RFP-NtKCH $\Delta$ 409-1001 und RFP-NtKCH $\Delta$ 1-300 wurden, im Gegensatz zu den vollständigen NtKCH-Konstrukten, nie punktförmig exprimiert, sondern färbten die Mikrotubuli bzw. die Aktinfilamente auf voller Länge. Somit besteht zwischen beiden Elementen des Zellskeletts wahrscheinlich eine Konkurrenz um freies NtKCH. Fehlt die Motordomäne, also die Möglichkeit mit den Mikrotubuli zu interagieren, so bindet NtKCH ausschließlich an F-Aktin. Die umgekehrte Situation tritt ein, wenn die N-terminale Aktin-Binderegion deletiert ist. Dies gibt jedoch keine ausreichende Erklärung, warum NtKCH während der Interphase im Zellkortex ausschließlich auf Mikrotubuli zu finden war, wogegen es in der Zellmitte auch mit Aktinfilamenten in Wechselwirkung stand. Die Antwort könnten Untersuchungen der *in-vitro* Bindeaffinitäten von OsKCH1 liefern (Frey, 2010). Darin konnte gezeigt werden, dass das vollständige, rekombinant hergestellte Protein eine höhere Affinität zu F-Aktin besitzt als zu den Mikrotubuli. Der Komplex aus F-Aktin und dem N-terminalen Teil von OsKCH1 besaß jedoch eine geringere Dissoziationskonstante als der Komplex mit dem Gesamtprotein. Dagegen konnten zwischen dem Gesamtprotein und der Motordomäne keine Unterschiede in der Affinität zu den Mikrotubuli festgestellt werden (Frey, 2010). Folglich könnte die von der Motordomäne abhängige Interaktion mit den Mikrotubuli die Bindung von NtKCH an F-Aktin sterisch hindern, während jedoch umgekehrt, die Bindung an Aktinfilamente keinen Einfluss auf die Affinität zu den Mikrotubuli hätte. Also würde NtKCH an Stellen, wie dem perinukleären Bereich, an denen vermehrt F-Aktin auftritt, zwar bevorzugt daran binden, die Verknüpfung zu den Mikrotubuli bliebe dadurch aber unbeeinflusst und das Kinesin könnte hier mit beiden Filamenttypen gleichzeitig interagieren. Während der Interphase ist der Großteil der Mikrotubuli auf den Zellkortex beschränkt, sodass NtKCH hier nur mit diesem Filamenttyp in Wechselwirkung stehen würde. Dies würde auch erklären, warum NtKCH $\Delta$ 409-1001 an allen für die Interphase typischen Aktinfilament-Strukturen lokalisierte,

RFP-NtKCH dagegen nur an perinukleäre Filamente. Jedoch bilden Aktinfilamente auch im Kortex ein dichtes Netzwerk auf dem NtKCH nie detektiert wurde. Die kortikalen Aktinfilamente liegen unterhalb der Mikrotubuli und sind somit, im Gegensatz zu perinukleärem und transvakuolärem F-Aktin, räumlich von den Mikrotubuli getrennt, was auch anhand der koexprimierenden GFP-NtKCH/FABD2 Überexpressionszellen gezeigt werden konnte. Toxine, die Aktinfilamente depolymerisieren, beeinflussen gleichzeitig auch die Anordnung der Mikrotubuli, was bedeutet, dass auch im Kortex Kontaktbereiche zwischen den beiden Zellskelett-Systemen bestehen müssen (Seagull, 1990; Blancaflor, 2000; Collings, 2008). Diese könnten sich jedoch auf bestimmte Kontaktbereiche beschränken. So wäre es möglich, dass NtKCH auch im Kortex an diesen Stellen mit beiden Filamentarten interagiert. Da die Motordomäne von OsKCH1 auch einen direkten Einfluss auf die Affinität zu F-Aktin zeigte (Frey, 2010), könnte die Bindung an das Aktinfilament-Netzwerk aufgrund des hohen kortikalen Mikrotubuli-Aufkommens während der Interphase vollständig intramolekular unterdrückt werden.

Offen bleibt, wie die unterschiedliche Dynamik des Kinesins reguliert wird. Die Regulation der Motoraktivität könnte in direktem Zusammenhang mit der Bindung an F-Aktin stehen, wobei die CH Domäne womöglich eine wichtige Rolle spielt. Für diese Annahme sprechen Untersuchungen der CH Domäne von Calponin, welche sowohl die ATPase-Aktivität der an Aktinfilamente assoziierten Myosin-Motorproteine als auch die von Kinesinen, wie DmNcd *in-vitro* hemmen kann (Winder & Walsh, 1990; Fattoum *et al.*, 2003). Somit könnte die Motoraktivität von NtKCH im Grundzustand durch die CH Domäne intramolekular inhibiert werden. Durch die Bindung an F-Aktin könnte diese Hemmung aufgehoben werden, wodurch das Kinesin zwar an alle Mikrotubuli gebunden vorläge, aber nur an Stellen, an denen es gleichzeitig in Kontakt mit den Aktinfilamenten kommt, aktiviert werden würde (Preuss *et al.*, 2004). Allerdings lassen die hier gesammelten Ergebnisse zur Eigendynamik von NtKCH auf das genaue Gegenteil schließen. An Mikrotubuli assoziiertes NtKCH war dynamisch, während es auf F-Aktin keine Eigenbewegung zeigte. Folglich könnte sich NtKCH von Grund auf entlang der Mikrotubuli bewegen, was jedoch durch die Bindung von F-Aktin über die CH Domäne unterdrückt wird. Dieses Modell ist auch konform mit neusten proteinbiochemischen Analysen zu OsKCH1, in denen eine intramolekulare Hemmung der ATPase-Aktivität des Kinesins durch F-Aktin *in-vitro* nachgewiesen werden konnte (Umezū *et al.*, 2011). Dabei wurde die durch Mikrotubuli stimulierte ATPase-Aktivität zweier rekombinant hergestellter OsKCH1-Fragmente in Abhängigkeit von *in-vitro* polymerisiertem F-Aktin miteinander verglichen. Das erste Fragment beinhaltete den Bereich von der CH-Domäne bis zum Ende der Kinesin-Motordomäne. Das Zweite bestand ausschließlich aus der Motordomäne. Bei beiden Konstrukten konnte die basale ATPase-Aktivität durch Zugabe von Mikrotubuli erhöht werden. Die gleichzeitige Anwesenheit von

F-Aktin führte dagegen bei dem CH Domäne-Motor-Konstrukt zu einer Reduktion der Mikrotubuli-stimulierten ATPase-Aktivität um rund 20%, während die basale ATPase-Aktivität unbeeinflusst blieb. Interessanterweise wurde jedoch auch die ATPase-Aktivität des Motorkonstrukts ohne die CH Domäne durch F-Aktin geringfügig gehemmt, was eine zusätzliche Aktinfilament-Bindung innerhalb des Motorbereichs vermuten lässt. Diese zusätzliche Binderegion innerhalb der Motordomäne könnte bei der Auswahl der Aktinfilament-Strukturen mithelfen und die Hemmung der Motoraktivität nur dann verstärken, wenn die richtigen Filamente gefunden wurden.

Aus den hier gesammelten Informationen über die Lokalisation und Eigendynamik von NtKCH, in Kombination mit den gegenwärtig präsenten biochemischen Daten zu OsKCH1 könnte ein entsprechendes Arbeitsmodell zur unterschiedlichen Interaktion mit beiden Komponenten des pflanzlichen Zellskeletts folgendermaßen aussehen:

Während der Interphase findet sich dynamisches NtKCH hauptsächlich auf den Mikrotubuli, die im Zellkortex verstärkt auftreten und weitestgehend vom kortikalen Aktinfilament-Netzwerk räumlich getrennt sind. Gegen Ende der G2-Phase entstehen radiale Mikrotubuli, an denen sich das Kinesin aufgrund seiner retrograden Direktionalität zum Zellkern bewegt. Schon innerhalb der Zytoplasmastränge liegen beide Filamentarten dicht beieinander, sodass hier ebenfalls F-Aktin gebunden wird. Durch die Wechselwirkung mit den Aktinfilamenten wird die ATPase-Aktivität der Motordomäne über die CH Domäne intramolekular gehemmt. Denkbare wäre, dass durch die Aktinfilament-Bindung, die zur Bewegung auf den Mikrotubuli notwendige Dimerisierung von NtKCH aufgehoben wird. Um den Zellkern sind beide Filament-Netzwerke eng miteinander verwoben, sodass die Motoraktivität hier vollkommen zum Erliegen kommt und NtKCH um den Kern gefangen wird. Dieser *Capture* (Einfang) -Mechanismus schließt eine zusätzliche Regulation durch weitere Interaktionspartner nicht grundsätzlich aus.

## **4. Möglich Funktionen von NtKCH**

### **4.1. Potenzielle Aufgaben von NtKCH während der Mitose**

Mithilfe semiquantitativer Expressionsanalysen gelang es das Transkriptionsprofil von NtKCH eindeutig darzustellen. Dabei konnte eine direkte Korrelation zwischen der NtKCH-Transkription und der Zellteilungsaktivität im Verlauf des Kultivierungszyklus von BY-2 Zellen festgestellt werden. Außerdem konnte in synchronisierten Zellen ein Transkriptionsanstieg zu Beginn der Mitose gemessen werden. Zusammen mit der Lokalisation von GFP-NtKCH auf dem PPB und dem Phragmoplasten deutet dies auf eine primäre Funktion von NtKCH während der Zellteilung hin. Dies ist nicht sehr verwunderlich, da bisher die meisten charakterisierten pflanzlichen Kinesine in Prozesse der Mitose involviert sind (Vanstraelen *et al.*, 2006). So werden in synchronisierten Suspensionszellkulturen von

*A. thaliana* allein 23 der insgesamt 61 Kinesine kodierenden Gene während der Mitose hoch reguliert. Sieben davon können der Kinesine-14 Familie zugeordnet werden. Darunter auch das sehr eng mit NtKCH verwandte AtO22260 (Menges *et al.*, 2003; Menges *et al.*, 2005; Vanstraelen *et al.*, 2006). Die meiste NtKCH-mRNA wurde in den BY-2 Zellen direkt nach dem Auswaschen von Propyzamid gemessen, also zu einem Zeitpunkt, an dem sich der Großteil der Kultur in der Prophase befand, was eine Funktion in einer frühen Phase der Mitose andeutet. Gegen Ende der G2-Phase lokalisierte GFP-NtKCH an die Mikrotubuli innerhalb des PPB und könnte demnach diese kortikalen Filamente organisieren. Obwohl das PPB essenziell für die Ausrichtung der Zellteilungsebene ist und somit die Morphologie und die gesamte Musterbildung einer Pflanze entscheidend mitbestimmt, wurde bisher nur von wenigen Kinesinen berichtet, die direkt an der Organisation des PPB mitwirken (Vanstraelen *et al.*, 2006). Das *Armadillo-repeat kinesin 3* (AtARK3) wurde spezifisch nur in Schließzellen und deren Vorläuferzellen (Meristemoiden) von *A. thaliana* exprimiert und lokalisierte als GFP-Fusion unter Kontrolle seines natürlichen Promotors ausschließlich an Mikrotubuli des PPB. Kurz nach der Auflösung der Kernhülle wurde es jedoch sehr schnell wieder abgebaut (Malcos & Cyr, 2011). Auch NtKCH-Transkripte akkumulierten zu Beginn der Mitose, gingen mit dem Eintritt in die Metaphase zwar leicht zurück, wurden aber erst gegen Ende der Mitose fast vollständig abgebaut. Dabei muss beachtet werden, dass die Chromosomen während der Metaphase kondensiert und deswegen transkriptionsinaktiv sind. Das heißt, dass Proteine, die während oder direkt nach der Zellteilung benötigt werden, schon zu einem frühen Zeitpunkt der Mitose transkribiert werden müssen. Es bleibt also fraglich, ob NtKCH eine spezifische Funktion innerhalb des PPB ausübt. Der langsame Abbau der mRNA während der Kernteilung und die Lokalisation von GFP-NtKCH innerhalb des Phragmoplasten lassen vermuten, dass NtKCH vor allem zu einem späten Zeitpunkt während der Zytokinese oder beim Wiedereintritt in die Interphase benötigt wird. Dagegen konnte GFP-NtKCH in keiner der Überexpressionszellen auf den Mikrotubuli der Spindel beobachtet werden, was eine Beteiligung an Trennung der Chromosomen unwahrscheinlich macht. Dies ist auch konform mit der mitotischen Verteilung fluoreszenter AtKinG-Überexpressionskonstrukte. Nur in vereinzelt Zellen lokalisierte GFP-AtKinG innerhalb der Spindel, die dann jedoch eine sehr stark veränderte Morphologie zeigte, was auf überexpressionsbedingte Bündelungseffekte zurückzuführen war (Buschmann *et al.*, 2011). Da jedoch die Spindeln der GFP-OsKCH1 überexprimierenden Zellen (Frey *et al.*, 2010), sowie der hier untersuchten GFP-NtKCH Zellen keinerlei Auffälligkeiten zeigten, ist es eher unwahrscheinlich, dass KCHs für die Organisation der Spindelmikrotubuli benötigt werden. Aufgrund der Lokalisation an den Spindelpolen wäre jedoch eine Bündelungsfunktion der Mikrotubuli-*minus*-Enden denkbar. So zeigten rekombinantes OsKCH1 und GhKCH2 eine eindeutige Mikrotubuli-Bündelungsaktivität (Xu *et al.*, 2009; Frey, 2010). Zudem könnte

NtKCH die *minus*-Enden der Mikrotubuli mit F-Aktin an den Polen verankern und somit die Orientierung des Kernteilungs-Apparats aufrechterhalten. So wurde GFP-NtKCH insbesondere an den frühen Spindelpolen auf Filamente gesichtet, die nicht durch die Antikörper gegen Mikrotubuli gefärbt wurden.

Viele der bisher charakterisierten pflanzlichen Kinesine wurden innerhalb des Phragmoplasts beobachtet. Jedoch konnte keinem eine direkte Beteiligung am gerichteten Vesikeltransport zur Bildung der Zellplatte aufgezeigt werden (Vanstraelen *et al.*, 2006). Als einziger Kandidat kommt nur das *plus*-End-Kinesin AtPAKRP2 (*A. thaliana phragmoplast-associated kinesin-related protein 2*) in Frage, welches sich auf dem Phragmoplast, vor allem im Bereich der Zellplatte anreicherte. Diese Lokalisation war zudem sehr empfindlich gegenüber dem Vesikeltransport-Inhibitor Brefeldin A (Lee *et al.*, 2001; Vanstraelen *et al.*, 2006). NtKCH hat dagegen wahrscheinlich nichts mit dem Transport von Golgi-Vesikel zur Mitte des Phragmoplasten zu tun, da es aus dem Bereich der Zellplatte vollkommen ausgeschlossen blieb und sich *minus*-End-gerichtet von der ehemaligen Teilungsebene entfernte. Im Gegensatz zu GhKCH2 (Xu *et al.*, 2009), konnte jedoch auch keine Kolo-kalisation von GFP-NtKCH mit den Aktinfilamenten des Phragmoplasten beobachtet werden, was gegen eine Funktion in der Organisation des Phragmoplasts durch Querverbindung von Mikrotubuli und Aktinfilamenten spricht. Die Lokalisation und die Bewegungsrichtung indizieren eher eine Rolle in der Phragmoplast-Expansion oder in der Organisation der Mikrotubuli an den ehemaligen Spindelpolen, wie es beispielsweise auch für AtKCBP vorgeschlagen wurde (Bowser & Reddy, 1997).

#### **4.2. Übernimmt NtKCH eine sekundäre Funktion während des pflanzlichen Zellelongationswachstums?**

Zu Beginn der Mitose konnte ein beträchtlicher Anstieg der NtKCH-Transkription beobachtet werden, was zeigte, dass die Expression des Kinesins einer strikten, zellzyklusabhängigen Regulation unterliegt und auf eine primäre Funktion während der Mitose hinweist. Jedoch konnten auch in stationären BY-2 Zellkulturen, die vollständig in der G1-Phase blockiert waren, geringe, aber deutlich messbare Mengen an NtKCH-mRNA nachgewiesen werden. Dies liefert Grund zur Annahme, dass NtKCH eine zusätzliche Funktion während Interphase übernimmt. GFP-NtKCH Zellen zeigten an allen Tagen des Kultivierungszyklus eine erhöhte Teilungsaktivität und somit eine höhere Synchronität der Zellteilung. Die Überexpressionszellen waren deutlich länger als die Wildtyp-Zellen. Die *free*-GFP-Kontrolle schloss dabei die Möglichkeit aus, dass das GFP selbst sich Wachstums fördernd wirkt, sodass nur die Überexpression von NtKCH für den beobachteten Zellwachstumsphänotyp verantwortlich sein kann. Wie bei allen Eukaryoten unterliegt die pflanzliche Zellteilung einer strikten, genetisch vorbestimmten Kontrolle. Jedoch besitzen Pflanzen eine hohe

morphologische Plastizität und können ihre Entwicklung an die bestehenden Umweltgegebenheiten anpassen. Dies impliziert, dass sie ihren Zellzyklus an das von äußeren Faktoren bestimmte Wachstum adaptieren können (Hemerly *et al.*, 1999). Diese Anpassungsfähigkeit wurde durch Versuche an Tabakpflanzen verdeutlicht, die eine funktionslose CDK aus *A. thaliana* heterolog überexprimierten, die normalerweise den Eintritt in die Mitose vorantreibt. Die Pflanzen blieben den Erwartungen widersprechend in ihrer Gesamtmorphologie vollkommen unauffällig. Bei genauerer Betrachtung stellte sich jedoch heraus, dass die Gewebe dieser Pflanzen aufgrund des mutierten CDK-Gens aus weniger, dafür aber aus längeren Zellen aufgebaut waren. Dies zeigt, dass die Veränderungen der Teilungsrate durch eine antagonistische Zunahme des Zelllängenwachstums vollkommen kompensiert wurden (Hemerly *et al.*, 1995). Bezogen auf die zyklischen BY-2 Suspensionszellen könnte dieser Wachstums-Teilungs-Antagonismus einfach dadurch erklärt werden, dass Zellen mit verminderter Zellteilung mehr Zeit zum Wachsen haben und deswegen größer sind. Jedoch stellt sich dieser Sachverhalt nicht ganz so trivial dar. So fördert das Pflanzenhormon Auxin sowohl das Zellwachstum als auch die Teilung. Folglich müsste auch die Überexpression des Auxin-Rezeptors ABP1 (*Auxin-binding protein 1*) beide Prozesse fördern. Da jedoch durch die Überexpression von ABP1 Pflanzen mit Riesenzellen resultierten, was gleichzeitig durch eine Reduktion der Teilung kompensiert wurde, impliziert dies, dass Auxin die Zellteilung über einen zweiten, von ABP1-unabhängigen Signalweg kontrolliert (Jones *et al.*, 1998; Campanoni & Nick, 2005). Bezogen auf die beobachteten Phänotypen der GFP-NtKCH Überexpressionszellen, bei denen sowohl Teilung als auch Wachstum erhöht waren, bedeutet dies, dass einerseits das Wachstums-Teilungs-Gleichgewicht entkoppelt ist, andererseits aber auch, dass NtKCH in beide dieser Signalwege eingreift. Dabei könnte die Interaktion des Kinesins mit den Aktinfilamenten eine wichtige Rolle spielen, da die Organisation des Aktinfilament-Netzwerks selbst direkt in die von auxinabhängige Kontrolle des pflanzlichen Zellwachstums und der Teilung eingreift (Waller *et al.*, 2002; Maisch & Nick, 2007). Aktinfilamente sind in langsam wachsenden epidermalen Koleoptilenzellen als dicke longitudinale ausgerichtete Bündel organisiert, die sich bei beschleunigtem Wachstum in ein feines Netzwerk aufspalten. Der Übergang zwischen beiden Organisationsformen kann beispielsweise durch Licht, aber auch durch Zugabe von exogenem Auxin gefördert werden (Waller & Nick, 1997; Wang & Nick, 1998). Die Behandlung mit dem Vesikeltransport-Inhibitor Brefeldin A bewirkt dagegen die Bildung dicker Aktinbündel (Waller *et al.*, 2002). Nach einem entsprechenden Modell werden Auxin-Transporter in Abhängigkeit des Aktinfilament-Systems zur Zellmembran befördert, wodurch der polare Auxin-Transport verstärkt wird. Umgekehrt hat aber auch Auxin selbst einen direkten Einfluss auf die Reorganisation dieser Filamente und fördert somit in einer positiven Rückkopplungsschleife seinen eigenen polaren Transport (Waller *et al.*, 2002;

Nick *et al.*, 2009). Der polare Auxintransport und das Aktin-Zellskelett sind jedoch auch essenziell für die Synchronität der Zellteilung (Maisch & Nick, 2007). So verändert die Bündelung von F-Aktin durch Überexpression von Talin die Teilungssynchronität in BY-2 Suspensionszellen, die durch zusätzliche Zugabe von exogenem Auxin wieder hergestellt werden kann. NtKCH, das wahrscheinlich direkt an F-Aktin bindet und somit eine wichtige Funktion in der Organisation des Aktinfilament-Netzwerks spielen könnte, trägt wahrscheinlich indirekt zu beiden auxinabhängigen Signalwegen bei und könnte dadurch gleichzeitig zellteilungs- und wachstumsfördernd wirken. Welche spezifische Rolle es innerhalb dieser Signalwege einnimmt, bleibt trotzdem ungeklärt.

### 4.3. Mögliche Funktionen von NtKCH während des Zellwachstums

Dem beobachteten Phänotyp der GFP-NtKCH Überexpressionszellen entsprechend, könnte NtKCH direkt in das Zelllängenwachstum involviert sein. Wie bereits alle bisher charakterisierten KCHs, lokalisierte auch NtKCH während der Interphase hauptsächlich an kortikale Mikrotubuli. Nach dem derzeit favorisierten *Monorail*-Modell dienen diese Mikrotubuli als Schienen für die Zellulose synthetisierenden CESA-Komplexe und sind somit direkt an der Ausrichtung der Zellulose-Mikrofibrillen in der Zellwand beteiligt, welche wiederum die Richtung der Zellexpansion vorgeben (Heath, 1974; Paredez *et al.*, 2006; Nick, 2008; 2011). Die Synthase-Komplexe könnten dabei durch Motorproteine an den Mikrotubuli entlang gezogen werden, was insbesondere auch den Kinesinen eine direkte Funktion an der Orientierung der Zellulose und somit am Elongationswachstum zuspricht. So zeigten Mutanten des AtFRA1-Kinesins (*A. thaliana fragile fiber 1*) eine vollkommen zerstörte Anordnung der Zellulose-Mikrofibrillen in der Sekundärwand interfaszikulärer Faserzellen, während das Mikrotubuli-Netzwerk vollkommen normal war (Zhong *et al.*, 2002). Auch NtKCH könnte als Vehikel der CESA-Komplexe dienen und folglich direkt zum Zellwachstum beitragen. Dabei ist fraglich, ob NtKCH, das während der Interphase nur in sehr geringen Mengen exprimiert wurde, an der Zellwand-Synthese beteiligt sein kann. Zudem bewegten sich fluoreszente YFP-Fusionen der CESA6-Untereinheit *in-vivo* mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 0,33  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Paredez *et al.*, 2006), was deutlich unterhalb der für NtKCH gemessenen Geschwindigkeit liegt. Neueste Untersuchungen zeigen, dass AtFRA1 mit ungefähr 24  $\mu\text{m}/\text{min}$  das bisher schnellste und prozessivste Kinesin in Pflanzen darstellt, was auch die zunächst vermutete Beteiligung am Transport der Zellulose synthetisierenden Enzyme in Frage stellt (Zhu & Dixit, 2011). Wahrscheinlich werden die Zellulose-Synthase-Komplexe vollkommen unabhängig von Motorproteinen durch die Kraft der Polymerisation und Kristallisation der Polyglycanketten angetrieben, wofür auch spricht, dass sich die fluoreszent markierte CESA6-Untereinheit trotz der Auflösung der Mikrotubuli in der

Plasmamembran weiter bewegen konnte (Paredes *et al.*, 2006). Für AtFRA1 wurde deswegen vorgeschlagen, dass es in Vesikel verpackte CESA-Bausteine oder Zellwandmaterial entlang kortikaler Mikrotubuli zu den vorgesehenen Stellen transportiert (Zhu & Dixit, 2011). Aufgrund der Eigenbewegung wäre auch für NtKCH eine solche Transportfunktion möglich, dem allerdings erneut das Argument der sehr geringen Expression während der Interphase entgegengesetzt werden könnte. Zudem ist eine Transportfunktion aufgrund der langsamen Bewegung von NtKCH äußerst fraglich. Wahrscheinlicher dagegen wäre eine Beteiligung an der Organisation des kortikalen Zellskeletts, wie es beispielsweise auch für GhKCBP postuliert wurde. Es lokalisierte in Baumwollfaserzellen insbesondere an kortikale Mikrotubuli (Preuss *et al.*, 2003). AtKCBP weist eine zusätzliche ATP-unabhängige Mikrotubulus-Bindestelle außerhalb der Motordomäne auf (Narasimhulu & Reddy, 1998) und zeigt eindeutige Binde- und Bündelungseigenschaften (Kao *et al.*, 2000). Somit könnten KCBPs kortikale Mikrotubuli bündeln und gegeneinander ausrichten (Preuss *et al.*, 2003). Proteinbiochemische Analysen lassen vermuten, dass auch GhKCH2, eine zusätzliche Nukleotid-unabhängige Mikrotubuli-Bindedomäne besitzt. Zudem bündelte das rekombinant aufgereinigte Protein eindeutig Mikrotubuli und vernetzte sie *in-vitro* mit Aktinfilamenten (Xu *et al.*, 2009). Folglich könnten KCHs zur Organisation des kortikalen Zellskeletts während der Interphase beitragen, indem sie die Mikrotubuli bündeln, an bestimmten Fixpunkten mit den kortikalen Aktinfilamenten verbinden und so ihre transverse Ausrichtung stabilisieren. Umgekehrt könnten KCHs jedoch auch zur Organisation der Aktinfilamente entsprechend den Mikrotubuli dienen. So assoziierte GFP-NtKCH in den hier untersuchten, mit MBD-MAP4-DsRed kotransformierten BY-2 Zellen, an Mikrotubuli, teilweise aber auch an Filamente, die nicht durch den Mikrotubuli-Marker gefärbt wurden. Besonders intensive GFP-NtKCH Signale waren dabei an den Überkreuzungspunkten der unterschiedlich gefärbten Filamentarten zu beobachten. Es konnte mitverfolgt werden, wie Filamente, die nur mit GFP-NtKCH dekorierten waren, entlang der mit MBD-MAP4 gefärbten Mikrotubuli bewegt wurden. Folglich könnten NtKCH nicht nur der Fixierung, sondern auch dem direkten Transport von Aktinfilamenten dienen, welche dadurch entsprechend den Mikrotubuli ausgerichtet werden. Jedoch wurde eine Kolo-kalisation von NtKCH mit F-Aktin ausschließlich innerhalb der Zelle beobachtet. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass NtKCH nur zu bestimmten Zeitpunkten benötigt wird, in denen eine Umgestaltung bzw. ein Neuaufbau des kortikalen Zellskeletts stattfindet. In Reiskoleoptilen und Baumwollfaserzellen kolo-kalisierten KCHs verstärkt mit kortikalen Aktinfilamenten (Preuss *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2009; Frey *et al.*, 2009), in zyklischen BY-2 oder *A. thaliana* Suspensionzellen dagegen ausschließlich mit kernnahem F-Aktin (Frey *et al.*, 2009; Buschmann *et al.*, 2011). Sowohl bei Reiskoleoptilenzellen als auch bei Baumwollfasernzellen spielt die ständige Reorganisation des Zellskeletts eine wichtige Rolle

(Seagull, 1992; Nick, 2001). In zyklischen BY-2 Zellen ist die Ausrichtung des kortikalen Zellskeletts während der Interphase mehr oder minder statisch. Eine extreme Umgestaltung findet jedoch an den Übergängen zwischen der Interphase und der Mitose statt (Katsuta & Shibaoka, 1988; Katsuta *et al.*, 1990; Yoneda & Hasezawa, 2003; Yoneda *et al.*, 2005). So reorganisiert sich das kortikale Mikrotubuli-Netzwerk, das kurz vor der Kernteilung vollkommen verschwindet, direkt nach dem Wiedereintritt in die G1-Phase. Dazu sammelt sich freies Tubulin aus dem Phragmoplasten zunächst im Bereich der Tochterkerne an, von wo aus neue Mikrotubuli radial zum Zellkortex auswachsen (Granger & Cyr, 2000; Hasezawa *et al.*, 2000; Yoneda & Hasezawa, 2003). Bei Untersuchungen von GFP-Tubulin exprimierenden BY-2 Zellen konnten helle Fluoreszenzflecken an Stellen detektiert werden, an denen die radialen Mikrotubuli den Zellkortex erreichen. Davon ausgehend werden wahrscheinlich neue kortikale Mikrotubuli gebildet, die zunächst parallel zur Zellachse auswachsen und sich anschließend transvers umorientieren (Kumagai *et al.*, 2001; Yoneda & Hasezawa, 2003). Diese Reorganisation steht in direktem Zusammenhang mit verschiedenen Aktinfilament-Strukturen. So blieb durch die Auflösung der Aktinfilamente mit Bistheonellide A auch die Neubildung kortikaler Mikrotubuli aus. Zudem verharrte GFP-Tubulin in 80 % der behandelten Zellen an der Position des ehemaligen Phragmoplasten, wonach die Aktinfilamente für die Bildung der postmitotischen, perinukleären Mikrotubuli verantwortlich sind. In den restlichen 20 % der Zellen formten die Mikrotubuli dagegen einen zusätzlichen Phragmoplasten in direkter Nähe zum Zellkern, wonach die Aktinfilamente auch benötigt werden, um die Mikrotubuli zum Kortex zu geleiten (Yoneda *et al.*, 2004). Dort angekommen folgen die zunächst parallel angeordneten Mikrotubuli wahrscheinlich der Orientierung des zuvor gebildeten, kortikalen Aktinfilament-Netzwerks (Hasezawa *et al.*, 1998; Kumagai *et al.*, 2001).

NtKCH lokalisierte innerhalb des Phragmoplasten und wanderte während der Zytokinese in die beiden Bereiche der Tochterkerne ein. Dort könnte es eine wichtige Rolle in der Neugestaltung des perinukleären Mikrotubuli-Netzwerks spielen. Es könnte jedoch auch als Querverbindungsprotein an der Reorientierung der kortikalen Mikrotubuli mithelfen. Anschließend wird NtKCH nur noch für die Fixierung des kortikalen Aktin-Zellskeletts benötigt, was auch die geringe Expression während der Interphase erklären würde. Somit könnte NtKCH eine Funktion in der Neuordnung des Zellskeletts während des Wiedereintritts in die Interphase spielen, während es danach nur noch eine stabilisierende Funktion einnimmt. Eine entsprechende Funktion wäre auch kurz vor der Mitose denkbar.

#### 4.4. Übernimmt NtKCH die Rolle der Dyneine während der pflanzlichen Kernmigration?

Einer der ersten Vorboten der pflanzlichen Mitose ist die Wanderung des Zellkerns aus einer lateralen Position nahe der Plasmamembran hin zur Zellmitte. Hier wird er exakt entsprechend der Lage der Teilungsebene ausgerichtet. Dieser Migrationsprozess beginnt bei Eintritt in die S-Phase und erfordert ein enges Zusammenspiel zwischen den Aktinfilamenten und den Mikrotubuli (Katsuta *et al.*, 1990; Sano *et al.*, 2005; Nick, 2008; 2011). Der Kern ist hierzu durch zytoplasmatische Stränge mit der Zelloberfläche verbunden, in denen hauptsächlich radiale Aktinfilamente verlaufen (Sano *et al.*, 2005). Durch Behandlung mit Cytochalasin B, nicht aber durch Propyzamid fällt der Kern wieder an seine laterale Position zurück. Dementsprechend sind die Aktinfilamente und nicht die Mikrotubuli für die Verankerung und Positionierung des Zellkerns während der Interphase verantwortlich sind (Katsuta & Shibaoka, 1988). Gegen Ende der G2-Phase erscheinen innerhalb der Zytoplasmastränge ebenfalls radiale Mikrotubuli (Katsuta *et al.*, 1990; Dhonukshe *et al.*, 2005). Wie durch *in-vivo* Untersuchungen mit GFP-Fusionen an das *plus*-End-Bindeprotein AtEB1 in BY-2 Zellen gezeigt wurde, entspringen Mikrotubuli an der Kernoberfläche und strömen mit ihren wachsenden Enden voran zum Zellkortex, den sie wahrscheinlich nach der Lage des PPB abtasten, um den Kern exakt in der Teilungsebene ausrichten zu können (Dhonukshe *et al.*, 2005). Aktinfilament depolymerisierende Gifte haben während dieses kurzen Zeitraums zwischen Präprophase und Prophase keinen direkten Einfluss auf die Position des Zellkerns, während Mikrotubuli-Gifte wie Oryzalin oder Propyzamid den Kern aus seiner Verankerung lösen. Jedoch erst durch Auflösung beider Filamentarten fällt der Kern wieder an den Kortex (Katsuta *et al.*, 1990; Dhonukshe *et al.*, 2005).

GFP-OsKCH1 überexprimierende BY-2 Zellen zeigten gegenüber Wildtyp-Zellen einen verzögerten Eintritt in die Mitose. Durch Messung der Kernposition nach Initiation eines neuen Kultivierungszyklus konnte eine verspätete Kernmigration als Ursache dafür festgestellt werden. GFP-OsKCH1 sammelte sich zu Beginn der Zellteilung hauptsächlich auf der Kernhülle, sowie entlang radialer Filamente. Zudem trat es in Kollokalisationsexperimenten vornehmlich an Überkreuzungen zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli auf. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde für OsKCH1 eine direkte Beteiligung an der Kernmigration vorgeschlagen (Frey *et al.*, 2010; Nick, 2011). Da bisher sehr wenige Details darüber bekannt sind, wie genau der pflanzliche Zellkern an seine vorbestimmte Position gerückt wird, wurden die aus *Saccharomyces cerevisiae* sehr gut beschriebenen Mechanismen zu Rate gezogen, um ein Funktionsmodell für OsKCH1 zu erstellen (Frey *et al.*, 2010; Frey, 2010). In *S. cerevisiae* wandert der Zellkern aus der Mutterzelle in die Halsverbindungsregion zur Tochterzelle (Sprosszelle) ein, sodass anschließend die

Chromosomen gerecht aufgeteilt werden können. Die Bewegung erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Schritten, wobei der Kern beim Eintritt in die S-Phase vor den Eingang der Halsregion positioniert wird, in die er dann kurz vor der Anaphase einwandert (DeZwaan *et al.*, 1997; Adames & Cooper, 2000). Beide Prozesse beruhen auf zwei unterschiedlichen, teilweise ineinandergreifenden Mechanismen, in denen Astral-Mikrotubuli eine Schlüsselfunktion einnehmen (Palmer *et al.*, 1992; Sullivan & Huffacker, 1992; Yamamoto & Hiraoka, 2003). Ein weiterer wichtiger Akteur ist das zytoplasmatische Dynein, ein zum *minus*-Ende laufendes Motorprotein. Im ersten Wirkmechanismus resultiert die Bewegung des Kerns allein aus der Depolymerisation und Polymerisation der über Adapterproteine und F-Aktin am Kortex befestigten Astral-Mikrotubuli. Das Hefedynein übernimmt dabei wahrscheinlich eine regulatorische Funktion, indem es in Zusammenarbeit mit dem Kinesin Kip2p den Prozess der (De-)Polymerisation Mikrotubuli an den distalen Enden kontrolliert. Im zweiten Mechanismus verankert das Dynein die Astral-Mikrotubuli im Kortex an lateralen Stellen der Mutterzelle und der Sprosszelle. Durch Aktivierung seiner Motorfunktion läuft es in Richtung der Mikrotubuli-Enden an den Spindelpolkörperchen und kann aber, da es selbst fixiert ist, nicht weg, wodurch die Mikrotubuli zum Kortex gezogen werden und daran entlang gleiten. Durch die entgegengesetzten Zugkräfte kann der Kern so in den Halsbereich einwandern. Ähnlich Mechanismen greifen bei der Kernmigration in filamentären und dimorphen Pilzen, wie *Aspergillus nidulans* oder *Ustilago maydis*, aber auch in tierischen Zellen, wobei in allen Fällen Dyneine eine zentrale Rolle einnehmen (Adames & Cooper, 2000; Sheemann *et al.*, 2003; Yamamoto & Hiraoka, 2003). Pflanzen dagegen besitzen keine Dyneine (Lawrence *et al.*, 2001). Da die grundlegenden Prinzipien auch in Pflanzen erhalten geblieben sein könnten, wurde vorgeschlagen, dass die *minus*-End-orientierten KCHs, als funktionelle Homologe der Dyneine fungieren könnten. In Analogie zur Hefe wurde für OsKCH1 einerseits ein *Sliding*-Modell postuliert. Dabei fixiert inaktives OsKCH1 die *minus*-Enden radialer Mikrotubuli wahrscheinlich über Aktinfilamente an der Kernoberfläche, wogegen aktiviertes OsKCH1 im Zellkortex den aus Hefen beschriebenen Gleitmechanismus der Mikrotubuli vermittelt. In einem alternativen *Pushing/Pulling*-Modell dient OsKCH1 nur der passiven Verankerung der Mikrotubuli am Kern und am Kortex, wobei die Zugkräfte ausschließlich aus der Verkürzung und Verlängerung der Mikrotubuli resultieren würden (Frey *et al.*, 2010).

NtKCH zeigte eine ähnliche prämitotische Verteilung wie OsKCH1 und könnte eine dementsprechende Funktion während der Migration des Zellkerns übernehmen. Die Untersuchungen der Dynamik von NtKCH lassen jedoch erhebliche Zweifel daran aufkommen, dass das Kinesin direkt darin involviert ist. So wurden zwei NtKCH-Populationen bestimmt, die sich in ihrer Assoziation mit unterschiedlichen Filamentarten und ihren Motoreigenschaften unterschieden. Entsprechend dem *Sliding*-Modell müssten die

Kraft erzeugenden Motoren, die den Zellkern durch Zug an den Mikrotubuli bewegen, selbst im Kortex fixiert und somit statisch sein. Kortikales NtKCH war jedoch dynamisch und bewegte sich auch noch kurz vor der Mitose entlang der Mikrotubuli des PPB, wodurch es für einen Gleitmechanismus im Kortex nicht verantwortlich sein kann. Alternativ könnte intrazelluläres NtKCH, das an den perinukleären Aktinfilamenten befestigt ist, Zugkräfte auf die radialen Mikrotubuli ausüben. Dies würde aber wenig Sinn ergeben, da in direkter Nähe zum Kern jegliche Bezugspunkte zum Auffinden der Zellmitte fehlen. Also bliebe nur noch eine passive Verankerungsfunktion übrig, wobei NtKCH die Mikrotubuli-*minus*-Enden über F-Aktin an der Kernhülle befestigen könnte. Dieser Annahmen ist jedoch entgegenzusetzen, dass Aktinfilamente keine Rolle für die prämitotische Kernpositionierung zu spielen scheinen. Entgegen den Untersuchungen von Katsuta *et al.* (1990) würde durch die Auflösung der Aktinfilamente der Zellkern sonst auch vor der Mitose aus seiner fixen Position in der Teilungsebene fallen.

Folglich ist eine direkte Beteiligung von NtKCH an der prämitotischen Migration im Sinne der für OsKCH1 vorgeschlagenen Mechanismen sehr fraglich. Zwischen den beiden KCHs zeigten sich erhebliche Unterschiede. So war OsKCH1 mehr oder minder statisch und wurde nie auf mitotischen Strukturen wie dem PPB oder dem Phragmoplasten beobachtet. GFP-OsKCH1 überexprimierende BY-2 Zellen traten verspätet in die Mitose ein, wohingegen bei GFP-NtKCH-Zellen ein vorgezogener Mitose-Eintritt und eine erhöhte Teilungssynchronität bestimmt wurden (Frey *et al.*, 2010). Beide KCHs übernehmen wahrscheinlich unterschiedliche Aufgaben, wofür auch spricht, dass in allen bisher vollständig sequenzierten Pflanzen immer mehrere KCH-kodierende Gene gefunden wurden (Richardson *et al.*, 2006).

#### **4.5. NtKCH hilft beim Neuaufbau eines mitotischen Aktinfilament-Netzwerks**

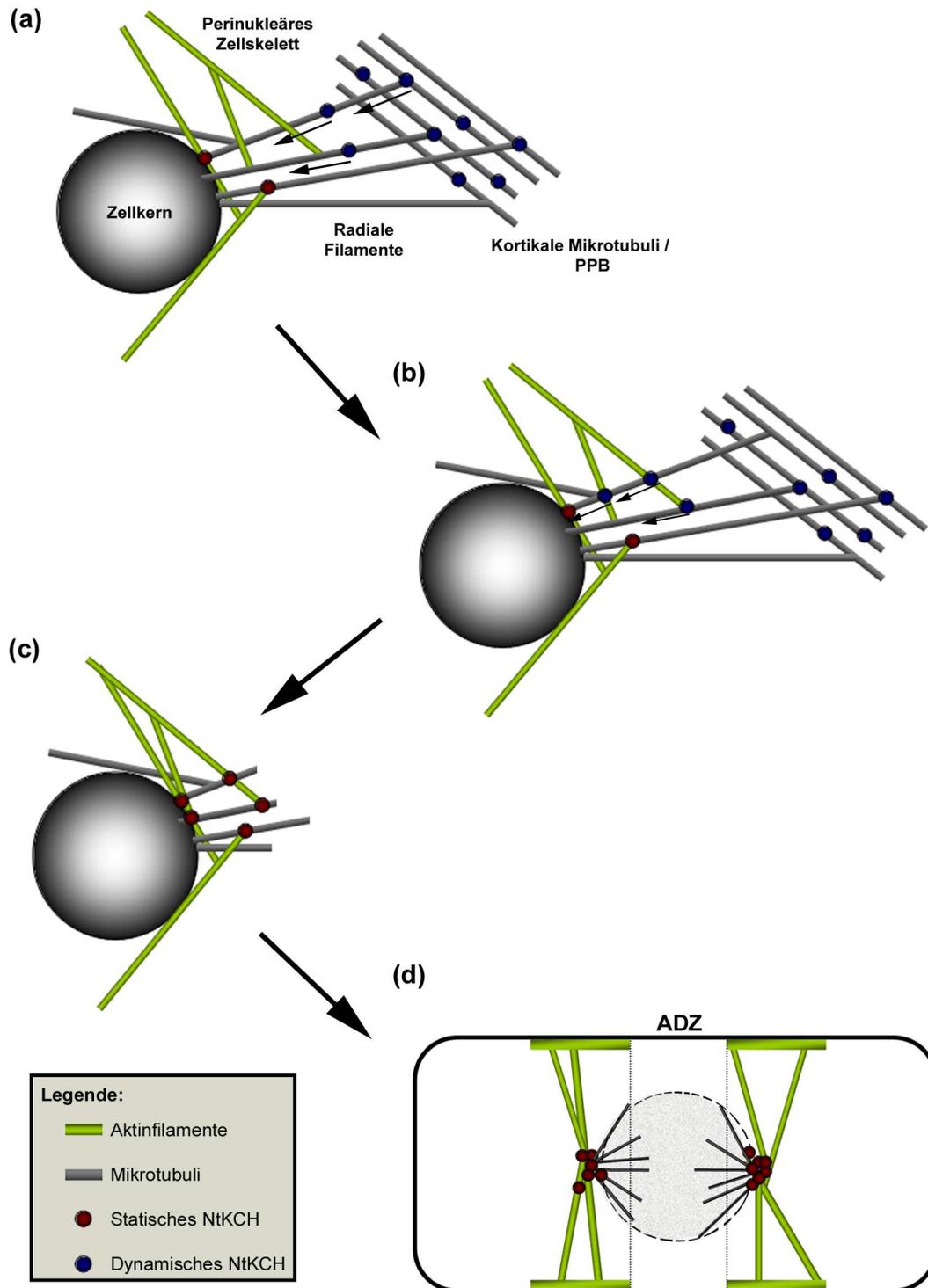
Entgegen OsKCH1 ist das Homolog aus Tabak wahrscheinlich nicht direkt in die prämitotische Kernmigration involviert. Die gesammelten Informationen deuten eher auf eine indirekte Beteiligung hin. Während eines sehr kurzen Zeitraums vor der Mitose wird die Ausrichtung des Zellkerns in die Hände radialer Mikrotubuli gegeben. Mit der Rückbildung des PPB verschwinden die Mikrotubuli vollständig aus dem Zellkortex und den zytoplasmatischen Strängen (Katsuta *et al.*, 1990). F-Aktin zieht sich dagegen nur aus dem Bereich der Zellteilungsebene zurück und sammelt sich in zwei, dem PPB sehr ähnlichen, kortikalen Ringen auf Höhe der Spindelpole an (Sano *et al.*, 2005). Es wurde vorgeschlagen, dass diese Ringe über direkte Verbindungen mit F-Aktin an den Spindelpolen in Kontakt stehen, wodurch das mitotische Aktin-Zellskelett die Orientierung der Spindel aufrechterhält (Lloyd & Traas, 1988; Panteris *et al.*, 2007; Panteris, 2008). Entsprechend einem von Katsuta *et al.* (1990) vorgeschlagenem Modell, könnten prämitotische Mikrotubuli als eine Art

Gerüst dienen, das zur Ausbildung des mitotischen Aktin-Netzwerks genutzt wird. Dieser Prozess setzt jedoch Mikrotubuli-assoziierte Proteine voraus, die auch in der Lage sind Aktinfilamente zu binden (Katsuta *et al.*, 1990). NtKCH verfügt über diese Fähigkeit. Es wird schon gegen Ende der G2-Phase transkriptionell sehr stark hoch reguliert und akkumuliert an der Kernhülle, wo es an beiden Filamentarten lokalisiert. Darüber hinaus wurde das Kinesin auf radialen Mikrotubuli beobachtet, an denen es sich immer in Richtung des Kerns bewegte und dabei auch Filamente transportierte, die nicht durch den Mikrotubuli-Marker gefärbt wurden. Folglich erfüllt NtKCH alle notwendigen Voraussetzungen, um beim Aufbau des mitotischen Aktinfilament-Netzwerks mitzuwirken. Dabei könnte dynamisches NtKCH dem Transport von Aktinfilamenten zur Zellmitte dienen, statisches NtKCH könnte dagegen die Aktinfilamente mit den Mikrotubuli-*minus*-Enden an der Kernoberfläche befestigen. Dies würde auch die unterschiedlichen NtKCH-Populationen erklären. Als molekularer Schalter für den lokalisationsabhängigen Wechsel zwischen der dynamischen und statischen NtKCH-Form könnte der in Kapitel beschriebene *Capture*-Mechanismus genutzt werden.

#### **4.6. Arbeitsmodell zur Funktion von NtKCH während der Reorganisation des mitotischen Aktin-Zellskeletts**

Ausgehend von den hier gesammelten Informationen über NtKCH, sowie unter Einbeziehung der proteinbiochemischen Eigenschaften anderer Mitglieder der KCH-Gruppe, wurde das in Abbildung 35 zusammengefasste Arbeitsmodell erstellt. Es beschreibt, wie NtKCH an der Reorganisation des prä- und postmitotischen Zellskeletts mitwirken könnte.

Dabei wandert NtKCH während der G2-Phase aus dem Zellkortex entlang radialer Mikrotubuli in die Region um den Zellkern ein (Abbildung 35a). Auf seinem Weg zur Zellmitte fängt das Kinesin F-Aktin ein und befördert es innerhalb der transvakuolären Zytoplasmastränge zur Kernhülle (Abbildung 35b). Durch die Interaktion mit den Aktinfilamenten (und/oder anderen Regulatoren) wird die Motoraktivität des Kinesins herab gesetzt, sodass die Bewegung direkt um den Kern aufgrund des hohen Aufkommens an Aktinfilamenten vollkommen zum Erliegen kommt. Dadurch wird es innerhalb des perinukleären Zellskeletts gefangen und dient dort der Fixierung der Aktinfilamente an die Mikrotubuli, welche nun die Positionierung des Zellkerns in der Teilungsebene übernehmen (Abbildung 35c). Dadurch wird gleichzeitig mit dem Kern auch das Aktinfilament-Netzwerk exakt in der Teilungsebene neu ausgerichtet. Mit der Auflösung der Kernhülle reorganisieren sich die Mikrotubuli um den Kern und ziehen sich an die künftigen Spindelpole zurück. Da F-Aktin über NtKCH an die Mikrotubuli gebunden bleibt, wird es mit zu den Polen gezogen. Während der folgenden Kernteilung übernimmt nun das umgestaltete Aktin-Zellskelett wieder die Aufrechterhaltung des Spindel-Apparats, indem es wahrscheinlich direkt in Kontakt mit den kortikalen Aktin-Ringen steht.



**Abbildung 35: Arbeitsmodell zur Funktion von NtKCH während der Reorganisation des mitotischen Aktin-Zellskeletts.** (a) Während der Prophase der Mitose wird dynamisches NtKCH aus dem Kortex zum Zellkern rekrutiert. Dabei läuft das Kinesin *minus*-End-gerichtet entlang radialer Mikrotubuli. (b) Innerhalb der transvakuolären Zytoplasmastränge interagiert das Kinesin auch mit Filamenten des Aktin-Netzwerks und transportiert sie in den perinukleären Raum. (c) Durch die Wechselwirkung mit F-Aktin und/oder anderen Interaktionspartnern werden die Motoreigenschaften des Kinesins negativ beeinflusst, wodurch NtKCH statisch wird und der Fixierung und Neugestaltung des mitotischen Aktin-Zellskeletts dient. (d) NtKCH verbindet Mikrotubuli-*minus*-Enden mit F-Aktin an den Spindelpolen. Die Position des Spindel-Apparats könnte über F-Aktin aufrechterhalten werden, das in direktem Kontakt mit den kortikalen Aktin-Ringen um die ADZ steht. Die Erklärung der Symbole kann der Legende in der Abbildung entnommen werden.

NtKCH könnte hier wahrscheinlich zur Fixierung der Spindel-Mikrotubuli genutzt werden (Abbildung 35d). Insbesondere der sehr langsame Rückgang der NtKCH-Transkription während der Mitose könnte darauf hinweisen, dass das Kinesin ein zweites Mal, wahrscheinlich beim Wiedereintritt in die Interphase erforderlich ist. NtKCH könnte dazu aber auch schon vor oder während der Spindelphase translatiert und in einem inaktiven Zustand in der Zellteilungsebene abgelegt werden. Erst direkt nach Abbau der Spindel würde das Kinesin dann aktiviert werden, könnte an die Phragmoplast-Mikrotubuli binden und sich daran entlang zu den entstehenden Tochterkernen bewegen. Auch die beobachtete Dynamik auf den Phragmoplast-Mikrotubuli lässt sich erneut sehr gut mit dem *Capture*-Mechanismus erklären. In der ADZ, welche insbesondere den Bereich der Teilungsebene mit einschließt, herrscht ein geringeres F-Aktin-Aufkommen als im übrigen Zytoplasma. Die Motoraktivität von NtKCH kann hier durch Aktinfilamente folglich nicht beeinflusst werden, wodurch es sich ungehindert auf den Mikrotubuli bewegen kann. Möglicherweise wird der Phragmoplast dabei nur als „Straße“ genutzt, um zielgerichtet in die neuen perinukleären Bereiche einzuwandern. Dort hat sich jedoch schon wieder ein neues perinukleäres Aktinfilament-Netzwerk gebildet, wodurch die Bewegung erneut gestoppt wird. Auch hier könnte NtKCH bei der Umgestaltung und Neuorientierung der Aktinfilamente um den Kern mithelfen. Mit der Reorganisation der kortikalen Mikrotubuli zu Beginn der Interphase trat auch GFP-NtKCH wieder in der Zellperipherie in Erscheinung. Es wäre denkbar, dass statisches NtKCH an den *plus*-Enden radialer Mikrotubuli, die direkt nach der Zytokinese transient von der Kernhülle auswachsen, zur Peripherie befördert wird. Sobald im Kortex neue Mikrotubuli gebildet werden, könnte es bei der Neuorientierung dieser Filamente entsprechend dem zuvor gebildeten Aktinfilament-Netzwerk dienen.

Nach diesem Arbeitsmodell würde NtKCH eine Funktion während der räumlichen und zeitlichen Organisation des Zellskeletts übernehmen, die sowohl vor der Mitose als auch danach von Bedeutung ist. Eine solche doppelte Funktion wäre auch vereinbar mit den phänotypischen Ausprägungen der GFP-NtKCH Überexpressionszellen. Ein schnellerer Aufbau des mitotischen Aktinfilament-Netzwerks zu einer frühen Phase der Mitose würde dabei den vorzeitigen Eintritt in die Zellteilung begünstigen, während die beschleunigte Reorganisation des Zellskeletts bei Eintritt in die Interphase das Expansionswachstum vorantreibt.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Mit NtKCH konnte in dieser Arbeit das bisher erste KCH aus *N. tabacum* vollständig isoliert und zellbiologisch charakterisiert werden. Zyklische BY-2 Zellen wurden als Modellsystem genutzt, um mithilfe fluoreszenter Überexpressionskonstrukte die intrazelluläre Verteilung des Kinesins während des gesamten Zellzyklus zu beschreiben. NtKCH lokalisierte auf

verschiedenen Mikrotubuli-Strukturen, aber auch auf Aktinfilamenten. Mithilfe einer doppelt transformierten Zelllinie gelang es die dynamische Neuverteilung des KCHs hinsichtlich aller zellzyklusabhängigen Aktinfilament-Strukturen *in-vivo* darzustellen. Von der Verteilung des Kinesins auf mitotischen Mikrotubuli-Strukturen waren anhand der Immunofärbungen an fixierten Zellen jedoch nur Momentaufnahmen möglich. Um die unterschiedliche Interaktion mit beiden Filamentarten vollständig verstehen zu können, wird es in Zukunft wichtig sein, die Lokalisation von NtKCH auf dynamischen Mikrotubuli in lebenden Zellen darzustellen. Eine dazu dienlich BY-2 Zelllinie, die neben GFP-NtKCH auch ein Mikrotubuli-Markerprotein koexprimiert, könnte einerseits zum direkten *in-vivo* Nachweis der bisherigen Beobachtungen an fixierten Zellen verwendet werden, andererseits auch weitere essenzielle Informationen zur Funktionsweise von NtKCH liefern. Damit könnten beispielsweise die Fragen geklärt werden, wie NtKCH bei Wiedereintritt in die Interphase in den Zellkortex gelangt und welche Rolle das Kinesin in der Reorganisation der perinukleären oder kortikalen Mikrotubuli spielt.

Bisher noch offenen Fragen hinsichtlich der Funktion, der Regulation und der Interaktion des Kinesins mit F-Aktin könnten anhand spezifischer Antikörper gegen NtKCH geklärt werden. Western-Blot-Analysen würden einen genaueren Einblick in die zellzyklusabhängige Expression auf Proteinebene geben, wodurch vor allem auch geprüft werden könnte, zu welcher Phase das Kinesin während der Mitose gebraucht wird. Darüber hinaus könnten diese Antikörper genutzt werden, um die Lokalisation des Kinesins auf natürlichem Expressionsniveau zu untersuchen und potenzielle überexpressionsbedingte Verdrängungseffekte vollkommen auszuschließen. Anhand der gekürzten Fluoreszenzfusionen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass NtKCH über seine Motordomäne wahrscheinlich direkt mit den Mikrotubuli interagiert, während der N-terminalen Teil zur Bindung an F-Aktin dienen könnte. Auch die Wirkstoffbehandlungen mit verschiedenen Zellskelettgiften bestätigten, dass NtKCH vermutlich als dynamische Brücke beide Filamentarten miteinander verknüpft und dadurch zur Organisation des pflanzlichen Zellskeletts beitragen könnte. Eine zukünftige Aufgabe wird darin bestehen, die Interaktion mit beiden Zellskelett-Komponenten sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* nachzuweisen. Viel interessanter wäre zu erfahren, wie NtKCH an Aktinfilamente bindet und welche Rolle der CH Domäne dabei zu Teil kommt. Durch Studien mit zusätzlichen, gekürzten Fluoreszenzfusionen könnte dazu die Aktinfilament-Bindedomäne näher eingegrenzt werden. Eine vollständige Klärung der Bindung wäre allerdings nur durch Röntgenstrukturanalysen oder durch Kernspinnresonanz-Spektroskopie von NtKCH bzw. der F-Aktin-Bindedomäne möglich.

NtKCH zeigte auf den Mikrotubuli eine eindeutige Motoraktivität, während es auf F-Aktin statisch war, wonach das Kinesin in zwei unterschiedliche Populationen zu existieren scheint.

Der vorgestellte *Capture*-Mechanismus könnte als molekularer Schalter für den Wandel zwischen beiden Formen genutzt werden. Ein zukünftiges Ziel wird darin bestehen, dieses Modell *in-vitro* zu rekonstruieren. Auch hierzu könnten Proteinstrukturanalysen wichtige Informationen liefern, ob und wie die Motordomäne die Auswahl und die Bindung verschiedener Aktinfilament-Strukturen beeinflusst. Umgekehrt könnte auch geklärt werden, wie die CH-Domäne regulatorisch in die ATP-abhängige Interaktion mit den Mikrotubuli eingreift. Ein weiterer Ansatz könnte über *in-vitro* Motilitätstests, wie beispielsweise dem *Single-molecule fluorescence Imaging* (Zhu & Dixit, 2011), verlaufen. Diese Methode erlaubt das Bewegungsverhalten einzelner rekombinant hergestellter, GFP-gekoppelter Kinesine auf den Mikrotubuli mittels *Total internal reflection*-Mikroskopie direkt zu analysieren. Dabei können nicht nur Geschwindigkeit, Direktionalität, Prozessivität sowie eine mögliche Dimerisierung geprüft, sondern insbesondere auch die Reaktion der Motoraktivität von NtKCH auf F-Aktin getestet werden. Eine in Hinblick auf den *Capture*-Mechanismus wichtige Frage ist eine mögliche Regulation von NtKCH durch zusätzliche Interaktionspartner. Diese könnten einerseits Einfluss auf die unterschiedliche Wechselwirkung mit dem pflanzlichen Zellskelett, andererseits auch auf die vom Zellzyklus abhängige Aktivität des Kinesins haben. Hierzu könnten heterologen Tabak-cDNA Banken mithilfe des *Yeast-two-hybrid*-Systems nach möglichen Interaktionspartnern durchsucht werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit potenzielle Assoziationspartner durch Koimmunopräzipitation direkt aus BY-2 Zellen zu isolieren und anschließend massenspektroskopisch zu identifizieren. Dabei müssten nicht unbedingt Antikörper gegen das Kinesin etabliert werden, sondern es könnte beispielsweise auch das an NtKCH gekoppelte GFP als Antigen Verwendung finden.

Die Expressionsanalysen und zellphysiologischen Untersuchungen der GFP-NtKCH Zellen lassen darauf schließen, dass NtKCH wahrscheinlich primär in Prozesse während der Mitose involviert ist, vermutlich jedoch auch eine sekundäre Funktion während des Zellwachstums übernimmt. Die *in-vivo* Lokalisationsstudien schlagen eine Beteiligung an der Neugestaltung des Zellskeletts zu Beginn der Mitose sowie beim Wiedereintritt in die Interphase vor. Eine Klärung dieses Sachverhalts ist anhand von RNA-Interferenz möglich. Dabei wird durch Überexpression spezifischer Vektor-Konstrukte, die zur Entstehung doppelsträngiger RNA führen, die Expression eines bestimmten Gens posttranskriptionell unterdrückt. Erste Vorarbeiten dazu, in denen Konstrukte sowohl zur konstitutiven als auch zur induzierbaren RNA-Interferenz erstellt und in BY-2 Suspensionszellen eingebracht wurden, wurden in einem parallel zu dieser Arbeit laufenden Projekt bereits in Angriff genommen.

Anhand von NtKCH konnten neue Daten zur biologischen Relevanz und Funktionsweise dieser pflanzenspezifischen Kinesin-Gruppe gewonnen werden. Viele Fragen zu den molekularen Details, insbesondere über die unterschiedliche Interaktion mit beiden Filamentarten des pflanzlichen Zellskeletts, blieben dabei jedoch ungeklärt. In dieser Arbeit

wurden aber auch zahlreiche Ansatzpunkte geliefert, an die in zukünftigen Forschungsprojekten angeknüpft werden kann, um das Rätsel dieser außergewöhnlichen Kinesine vollends zu enthüllen.

## Referenzen

- Adames NR, Cooper JA. 2000.** Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* **149**(4): 863-874.
- Adams RL, Lindsay JG. 1967.** Hydroxyurea reversal of inhibition and use as a cell-synchronizing agent. *Journal of Biological Chemistry* **242** (6): 1314-1317.
- Akashi T, Izumi K, Nagano E, Enomoto M, Mizuno K, Shibaoka H. 1988.** Effects of propyzamide on tobacco cell microtubules in vivo and in vitro. *Plant Cell Physiology* **29**(6): 1053-1062.
- Akhmanova A, Steinmetz MO. 2008.** Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Cell Biology* **9**: 309-319.
- Allen C, Borisy GG. 1974.** Structural polarity and directional growth of microtubules of *Chlamydomonas* flagella. *Journal of Molecular Biology* **90**(2): 381-402.
- Amann KJ, Pollard TD. 2001.** The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nature Cell Biology* **3**(3): 306-310.
- Ambrose JC, Li W, Marcus A, Ma H, Cyr R. 2005.** A minus-end directed kinesin with plus-end tracking protein activity is involved in spindle morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **16**:1584-1592
- Amos L, Klug A. 1974.** Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *Journal of Cell Science* **14**(3): 523-549.
- Baskin TI, Wilson JE, Cork A, Williamson RE. 1994.** Morphology and microtubule organization in *Arabidopsis* roots exposed to oryzalin or taxol. *Plant Cell Physiology* **35**(6): 935-942.
- Bhat RA, Lahaye T, Panstruga R. 2006.** The visible touch: in planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods* **2**: 12.
- Bibikova TN, Blancaflor EB, Gilroy S. 1999.** Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **17**(6): 657-665.
- Blancaflor EB. 2000.** Cortical actin filaments potentially interact with cortical microtubules in regulating polarity of cell expansion in primary roots of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Growth Regulation* **19**(4): 406-414.
- Bowser J, Reddy AS. 1997.** Localization of a kinesin-like calmodulin-binding protein in dividing cells of *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Journal* **12**(6): 1429-1437.
- Breitling F, Little M. 1986.** Carboxy-terminal regions on the surface of tubulin and microtubules. Epitope locations of YOL1/34, DM1A and DM1B. *Journal of Molecular Biology* **189**(2): 367-370.
- Burns RG. 1991.** Alpha-, beta-, and gamma-tubulins: sequence comparisons and structural constraints. *Cytoskeleton* **20**(3): 181-189.
- Buschmann H, Green P, Sambade A, Doonan JH, Lloyd CW. 2011.** Cytoskeletal dynamics in interphase, mitosis and cytokinesis analysed through *Agrobacterium*-mediated transient transformation of tobacco BY-2 cells. *New Phytologist* **190**: 258-267.

- Cai G, Cresti M. 2010.** Microtubule motors and pollen tube growth-still an open question. *Protoplasma* **247**(3-4): 131-143.
- Campanoni P, Nick P. 2005.** Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiology* **137**(3): 939-948.
- Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. 2002.** A monomeric red fluorescent protein. *PNAS* **99**(12): 7877-7882.
- Carlier MF. 1991a.** Actin: protein structure and filament dynamics. *Journal of Biological Chemistry* **266**(1): 1-4.
- Carlier MF. 1991b.** Nucleotide hydrolysis in cytoskeletal assembly. *Current Opinion in Cell Biology* **3**(1): 12-17.
- Case RB, Pierce DW, Hom-Booher N, Hart CL, Vale RD. 1997.** The directional preference of kinesin motors is specified by an element outside of the motor catalytic domain. *Cell* **90**(5): 959-966.
- Castresana J, Saraste M. 1995.** Does Vav bind to F-actin through a CH domain? *FEBS Letters* **374**(2): 149-151.
- Chandra R, Salmon ED, Erickson HP, Lockhart A, Endow SA. 1993.** Structural and functional domains of the *Drosophila* *ncd* microtubule motor protein. *Journal of Biological Chemistry* **268**(12): 9005-9013.
- Chu B, Kerr P, Carter JV. 1993.** Stabilizing microtubules with taxol increases microfilament stability during freezing of rye root tips. *Plant, Cell and Environment* **16**: 883-889.
- Ciferri C, Musacchio A, Petrovic A. 2007.** The Ndc80 complex: hub of kinetochore activity. *FEBS Letters* **581**(15): 2862-2869.
- Ciferri C, Pasqualato S, Screpanti E, Varetti G, Santaguida S, Dos Reis G, Maiolica A, Polka J, De Luca JG, De Wulf P, Salek M, Rappsilber J, Moores CA, Salmon ED, Musacchio A. 2008.** Implications for kinetochore-microtubule attachment from the structure of an engineered Ndc80 complex. *Cell* **133**(3): 427-439.
- Clayton L, Lloyd CW. 1985.** Actin organization during the cell cycle in meristematic plant cells. Actin is present in the cytokinetic phragmoplast. *Experimental Cell Research* **156**(1): 231-238.
- Cleary AL. 1995.** F-actin redistributions at the division site in living *Tradescantia* stomatal complexes as revealed by microinjection of rhodamine-phalloidin. *Protoplasma* **185**(3-4): 152-165.
- Collings DA, Lill AW, Himmelspach R, Wasteneys GO. 2006.** Hypersensitivity to cytoskeletal antagonists demonstrates microtubule-microfilament cross-talk in the control of root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **170**(2): 275-290.
- Collings DA, Wasteneys GO. 2005.** Actin microfilament and microtubule distribution patterns in the expanding root of *Arabidopsis thaliana*. *Canadian Journal of Botany* **83**(6): 579-590.

- Collings DA. 2008.** Crossed-wires: interactions and cross-talk between the microtubule and microfilament networks in plants. In: Nick P, ed. *Plant Microtubules: Development and Flexibility*: Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 47-49.
- Coué M, Brenner SL, Spector I, Korn ED. 1987.** Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Letters* **213**(2): 316-318.
- de Arruda MV, Watson S, Lin CS, Leavitt J, Matsudaira P. 1990.** Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins. *Journal of Cell Biology* **111**(3): 1069-1079.
- Deeks MJ, Fendrych M, Smertenko A, Bell KS, Oparka K, Cvrčková F, Žárský V, Hussey PJ. 2010.** The plant formin AtFH4 interacts with both actin and microtubules, and contains a newly identified microtubule-binding domain. *Journal of Cell Science* **123**:1209-1215.
- Desai A, Mitchison TJ. 1997.** Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**: 83-117.
- DeZwaan TM, Ellingson E, Pellman D, Roof DM. 1997.** Kinesin-related KIP3 of *Saccharomyces cerevisiae* is required for a distinct step in nuclear migration. *Journal of Cell Biology* **138**(5): 1023-1040.
- Dhonukshe P, Mathur J, Hulskamp M, Gadella TWJ. 2005.** Microtubule plus-ends reveal essential links between intracellular polarization and localized modulation of endocytosis during division-plane establishment in plant cells. *BMC Biology* **3**: 11.
- Diefenbach RJ, Mackay JP, Armati PJ, Cunningham AL. 1998.** The C-terminal region of the stalk domain of ubiquitous human kinesin heavy chain contains the binding site for kinesin light chain. *Biochemistry* **37**(47): 16663-16670.
- Endow SA 1999a.** C-terminal motor kinesin proteins. In: Kreis T, Vale R eds. *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins*. Oxford: Oxford University Press, 403-408.
- Endow SA. 1999b.** Determinants of molecular motor directionality. *Nature Cell Biology* **1**(6): E163-167.
- Endow SA, Barker DS. 2003.** Processive and nonprocessive models of kinesin movement. *Annual Review of Physiology* **65**: 161-175.
- Endow SA, Kang SJ, Satterwhite LL, Rose MD, Skeen VP, Salmon ED. 1994.** Yeast Kar3 is a minus-end microtubule motor protein that destabilizes microtubules preferentially at the minus ends. *Embo Journal* **13**(11): 2708-2713.
- Endow SA, Waligora KW. 1998.** Determinants of kinesin motor polarity. *Science* **281**(5380): 1200-1202.
- Euteneuer U, Jackson WT, McIntosh JR. 1982.** Polarity of spindle microtubules in *Haemanthus* endosperm. *Journal of Cell Biology* **94**(3): 644-653.
- Evans L, Mitchison T, Kirschner M. 1985.** Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *Journal of Cell Biology* **100**: 1185-1191.
- Fattoum A, Roustan C, Smczynski C, Der Terrossian E, Kassab R. 2003.** Mapping the microtubule binding regions of calponin. *Biochemistry* **42**(5): 1274-1282.

- Finer JJ, Vain P, Jones MW, McMullen MD. 1992.** Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Reports* **11**: 323-328.
- Fischer R, Mertens D. 2002.** Kinesine: Motoren in der Zelle. *Biologie in unserer Zeit* **5**(32): 311-318.
- Franke WW, Herth W, Van der Woude WJ, Morre DJ. 1972.** Tubular and filamentous structures in pollen tubes: possible involvement as guide elements in protoplasmic streaming and vectorial migration of secretory vesicles. *Planta* **105**: 317-341.
- Frey N, Klotz J, Nick P. 2009.** Dynamic bridges: a calponin-domain kinesin from rice links actin filaments and microtubules in both cycling and non-cycling cells. *Plant Cell Physiology* **50**(8): 1493-1506.
- Frey N, Klotz J, Nick P. 2010.** A kinesin with calponin-homology domain is involved in premitotic nuclear migration. *Journal of Experimental Botany* **61**(12): 3423-3437.
- Frey N. 2010.** *Dynamic bridges: an unconventional rice kinesin links actin and microtubules.* Karlsruhe, BW, Deutschland.
- Frohman MA, Dush MK, Martin GR. 1988.** Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *PNAS* **85**(23): 8998-9002.
- Frohman MA. 1994.** On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends). *PCR Methods and Applications* **4**(1): S40-58.
- Giddings TH, Staehelin, LA. 1991.** Microtubule-mediated control of microfibril deposition: a re-examination of the hypothesis. In: Lloyd CW, ed. *The cytoskeletal basis of plant growth and form.* London: Academic Press, 85-99.
- Gimona M, Djinovic-Carugo K, Kranewitter WJ, Winder SJ. 2002.** Functional plasticity of CH domains. *FEBS Letters* **513**(1): 98-106.
- Gimona M, Mital R. 1998.** The single CH domain of calponin is neither sufficient nor necessary for F-actin binding. *Journal of Cell Science* **111**(13): 1813-1821.
- Goode BL, Drubin DG, Barnes G. 2000.** Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Current Opinion in Cell Biology* **12**(1): 63-71.
- Goto Y, Asada T. 2007.** Excessive expression of the plant kinesin TBK5 converts cortical and perinuclear microtubules into a radial array emanating from a single focus. *Plant Cell Physiology* **48**(5): 753-761.
- Granger CL, Cyr RJ. 2000.** Microtubule reorganization in tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-MBD. *Planta* **210**(3): 502-509.
- Green PB. 1962.** Mechanism for plant cellular morphogenesis. *Science* **138**(3548): 1404-1405.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010.** New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**(3): 307-321.
- Gunning BE, Wick SM. 1985.** Preprophase bands, phragmoplasts, and spatial control of cytokinesis. *Journal of Cell Science-Supplement* **2**: 157-179.

- Hammond JW, Cai D, Verhey KJ. 2008.** Tubulin modifications and their cellular functions. *Current Opinion of Cell Biology* **20**(1): 71-76.
- Hancock WO, Howard J. 1998.** Processivity of the motor protein kinesin requires two heads. *Journal of Cell Biology* **140**(6): 1395-1405.
- Hardham AR, Green PB, Lang JM. 1980.** Reorganization of cortical microtubules and cellulose deposition during leaf formation in *Graptopetalum paraguayense*. *Planta* **149**(2): 181-195.
- Hasezawa S, Sano T, Nagata T. 1998.** The role of microfilaments in the organization and orientation of microtubules during the cell cycle transition from M phase to G1 phase in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* **202**: 105-114.
- Hasezawa S, Ueda K, Kumagai F. 2000.** Time-sequence observations of microtubule dynamics throughout mitosis in living cell suspensions of stable transgenic *Arabidopsis*-direct evidence for the origin of cortical microtubules at M/G1 interface. *Plant Cell Physiology* **41**(2): 244-250.
- Heath IB. 1974.** A unified hypothesis for the role of membrane bound enzyme complexes and microtubules in plant cell wall synthesis. *Journal of Theoretical Biology* **48**(2):445-449.
- Heese M, Mayer U, Jurgens G. 1998.** Cytokinesis in flowering plants: cellular process and developmental integration. *Current Opinion in Plant Biology* **1**(6): 486-491.
- Hemerly AS, de Almeida Engler J, Bergounioux C, Van Montagu M, Engler G, Inzé D, Ferreira P. 1995.** Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *Embo Journal* **14**(16): 3925-3936.
- Hemerly AS, Ferreira PCG, Montagu MV, Inzé D. 1999.** Cell cycle control and plant morphogenesis: is there an essential link? *BioEssays* **21**(1): 29-37.
- Henningsen U, Schliwa M. 1997.** Reversal in the direction of movement of a molecular motor. *Nature* **389**(6646): 93-96.
- Hermey G. 2010.** *Molekularbiologische Techniken. Der Experimentator: Neurowissenschaften.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Herth W. 1980.** Calcofluor white and Congo red inhibit chitin microfibril assembly of *Poteroochromonas*: evidence for a gap between polymerization and microfibril formation. *Journal of Cell Biology* **87**(2): 442-450.
- Hirokawa N, Pfister KK, Yorifuji H, Wagner MC, Brady ST, Bloom GS. 1989.** Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell* **56**(5): 867-878.
- Hirokawa N, Takemura R. 2004.** Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. *Experimental Cell Research* **301**(1): 50-59.
- Hirokawa N. 1998.** Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**(5350): 519-526.

- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA. 1983.** A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**: 179-180.
- Hogetsu T, and Shibaoka, H. 1978.** Effects of colchicine on cell shape and microfibril arrangement in the wall of *Closterium acerorum*. *Planta* **140**: 15-18.
- Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. 1990.** Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**(6288): 44-49.
- Howard J, Hudspeth AJ, Vale RD. 1989.** Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature* **342**(6288): 154-158.
- Howard J. 1996.** The movement of kinesin along microtubules. *Annual Review of Physiology* **58**: 703-729.
- Hu TX, Yu M, Zhao J. 2010.** Comparative transcriptional profiling analysis of the two daughter cells from tobacco zygote reveals the transcriptome differences in the apical and basal cells. *BMC Plant Biology* **10**: 167.
- Huang S, Jin L, Du J, Li H, Zhao Q, Ou G, Ao G, Yuan M. 2007.** SB401, a pollen-specific protein from *Solanum berthaultii*, binds to and bundles microtubules and F-actin. *Plant Journal* **51**(3): 406-418.
- Hugdahl JD, Morejohn LC. 1993.** Rapid and reversible high-affinity binding of the dinitroaniline herbicide oryzalin to tubulin from *Zea mays* L. *Plant Physiology* **102**: 725-740.
- Hussey PJ, Deeks MJ, Hawkins TJ, Ketelaar T. 2004.** Polar cell growth and the cytoskeleton biology. In: Lindsey K ed. *Polarity in plants: Annual Plant reviews*. Blackwell Publishing.
- Igarashi H, Orii H, Mori H, Shimmen T, Sonobe S. 2000.** Isolation of a novel 190 kDa protein from tobacco BY-2 cells: possible involvement in the interaction between actin filaments and microtubules. *Plant Cell Physiology* **41**(8): 920-931.
- Inoué S, Salmon ED. 1995.** Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Molecular Biology of the Cell* **6**(12): 1619-1640.
- Invitrogen. 2004.** *Instruction Manual: GeneRacer™ Kit For full-length, RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RLM-RACE)*. Catalog nos. L1500-01; L1500-02; L1502-01; L1502-02 (Version L).
- Ito M, Iwase M, Kodama H, Lavisse P, Komamine A, Nishihama R, Machida Y, Watanabe A. 1998.** A novel cis-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription. *Plant Cell* **10**(3): 331-341.
- Jones AM, Im KH, Savka MA, Wu MJ, DeWitt NG, Shillito R, Binns AN. 1998.** Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1. *Science* **282**(5391): 1114-1117.
- Jovanovic AM, Durst S, Nick P. 2010.** Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine. *Journal of Experimental Botany* **61**(3): 901-909.
- Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC. 1990.** Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**(6288): 37-44.

- Kakimoto T. 1987.** Actin filaments and microtubules in the preprophase band and phragmoplast of tobacco cells. *Protoplasma* **140**: 151-156.
- Kao YL, Deavours BE, Phelps KK, Walker RA, Reddy AS. 2000.** Bundling of microtubules by motor and tail domains of a kinesin-like calmodulin-binding protein from *Arabidopsis*: regulation by Ca(2+)/Calmodulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **267**(1): 201-207.
- Karimi M, De Meyer B, Hilson P. 2005.** Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Science* **10**(3): 103-105.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A. 2002.** GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**(5): 193-195.
- Katsuta J, Hashoguchi Y, Shibaoka H. 1990.** The role of the cytoskeleton in positioning of the nucleus in premitotic tobacco BY-2 cells. *Journal of Cell Science* **95**: 413-422.
- Katsuta J, Shibaoka H. 1988.** The roles of the cytoskeleton and the cell wall in nuclear positioning in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiology* **29**(3): 403-413.
- Ketelaar T, de Ruijter NC, Emons AM. 2003.** Unstable F-actin specifies the area and microtubule direction of cell expansion in *Arabidopsis* root hairs. *Plant Cell* **15**(1): 285-292.
- Kim HJ, Triplett BA. 2001.** Cotton fiber growth in planta and in vitro. Models for plant cell elongation and cell wall biogenesis. *Plant Physiology* **127**(4): 1361-1366.
- Kimura S, Laosinchai W, Itoh T, Cui X, Linder CR, Brown RM. 1999.** Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *Plant Cell* **11**(11): 2075-2086.
- Korenbaum E, Rivero F. 2002.** Calponin homology domains at a glance. *Journal of Cell Science* **115**(18): 3543-3545.
- Kost B, Bao YQ, Chua NH. 2002.** Cytoskeleton and plant organogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **357**(1422): 777-789.
- Kost B, Chua NH. 2002.** The plant cytoskeleton: vacuoles and cell walls make the difference. *Cell* **108**(1): 9-12.
- Kost B, Mathur J, Chua NH. 1999.** Cytoskeleton in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **2**(6): 462-470.
- Kreis TE. 1987.** Microtubules containing detyrosinated tubulin are less dynamic. *Embo Journal* **6**(9): 2597-2606.
- Kumagai F, Yoneda A, Tomida T, Sano T, Nagata T, Hasezawa S. 2001.** Fate of nascent microtubules organized at the M/G1 interface, as visualized by synchronized tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-tubulin: time-sequence observations of the reorganization of cortical microtubules in living plant cells. *Plant Cell Physiology* **42**(7): 723-732.
- Kuthanová A, Fischer L, Nick P, Opatrný Z. 2008.** Cell cycle phase-specific death response of tobacco BY-2 cell line to cadmium treatment. *Plant, Cell and Environment* **31**(11): 1634-1643.
- Lambert AM. 1993.** Microtubule-organizing centers in higher plants. *Current Opinion in Cell Biology* **5**(1): 116-122.

- Lancelle SA, Hepler PK. 1991.** Association of actin with cortical microtubules revealed by immunogold localization in *Nicotiana* pollen tubes. *Protoplasma* **165**: 167-172.
- Lasek RJ, Brady ST. 1985.** Attachment of transported vesicles to microtubules in axoplasm is facilitated by AMP-PNP. *Nature* **316**(6029): 645-647.
- Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, Cleveland DW, Dawson SC, Endow SA, Goldstein LS, Goodson HV, Hirokawa N, Howard J, Malmberg RL, McIntosh JR, Miki H, Mitchison TJ, Okada Y, Reddy AS, Saxton WM, Schliwa M, Scholey JM, Vale RD, Walczak CE, Wordeman L. 2004.** A standardized kinesin nomenclature. *Journal of Cell Biology* **167**(1): 19-22.
- Lawrence CJ, Morris NR, Meagher RB, Dawe RK. 2001.** Dyneins have run their course in plant lineage. *Traffic* **2**(5): 362-363.
- Ledbetter MC, Porter KR. 1963.** A "microtubule" in plant cell fine structure. *Journal of Cell Biology* **19**(1): 239-250.
- Lee YR, Giang HM, Liu B. 2001.** A novel plant kinesin-related protein specifically associates with the phragmoplast organelles. *Plant Cell* **13**(11): 2427-2439.
- Letunic I, Bork P. 2007.** Interactive tree of life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* **23**(1): 127-128.
- Letunic I, Doerks T, Bork P. 2009.** SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research* **37**: D229-232.
- Liu B, Palevitz BA. 1992.** Organization of cortical microfilaments in dividing root cells. *Cytoskeleton* **23**(4): 252-264.
- Lloyd & Traas. 1988.** The role of F-actin in determining the division plane of carrot suspension cells. Drug studies. *Development* **102**:211-221.
- Lupas A, Van Dyke M, Stock J. 1991.** Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* **252**(5009): 1162-1164.
- Maisch J, Fišerová J, Fischer L, Nick P. 2009.** Tobacco Arp3 is localized to actin-nucleating sites *in vivo*. *Journal of Experimental Botany* **60**(2): 603-614.
- Maisch J, Nick P. 2007.** Actin is involved in auxin-dependent patterning. *Plant Physiology* **143**(4): 1695-1704.
- Malcos JL, Cyr RJ. 2011.** An ungrouped plant kinesin accumulates at the preprophase band in a cell cycle-dependent manner. *Cytoskeleton* **68**: 247-258.
- Marc J, Granger CL, Brincat J, Fisher DD, Kao T, McCubbin AG, Cyr RJ. 1998.** A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *Plant Cell* **10**(11): 1927-1940.
- Marcus AI, Ambrose JC, Blickley L, Hancock WO, Cyr RJ. 2002.** *Arabidopsis thaliana* Protein, ATK1, is a minus-end directed kinesin that exhibits non-processive movement. *Cytoskeleton* **52**: 144-150.
- Margolis RL, Wilson L. 1978.** Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state *in vitro*. *Cell* **13**(1): 1-8.

**Margolis RL, Wilson L. 1998.** Microtubule treadmilling: what goes around comes around. *BioEssays* **20**(10): 830-836.

**Marone M, Mozzetti S, De Ritis D, Pierelli L, Scambia G. 2001.** Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biological Procedures Online* **3**: 19-25.

**Matsui K, Collings D, Asada T. 2001.** Identification of a novel plant-specific kinesin-like protein that is highly expressed in interphase tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* **215**: 105-115.

**Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JA. 2005.** Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant Journal* **41**(4): 546-566.

**Menges M, Hennig L, Gruissem W, Murray JA. 2003.** Genome-wide gene expression in an *Arabidopsis* cell suspension. *Plant Molecular Biology* **53**(4): 423-442.

**Miki H, Okada Y, Hirokawa N. 2005.** Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends in Cell Biology* **15**(9): 467-476.

**Mineyuki Y. 1999.** The Preprophase band of microtubules: its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *International Review of Cytology* **187**: 1-49.

**Mitchison T, Kirschner M. 1984a.** Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**(5991): 237-242.

**Mitchison T, Kirschner M. 1984b.** Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. *Nature* **312**(5991): 232-237.

**Mitsui H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Nishikawa K, Takahashi H. 1993.** Identification of a gene family (kat) encoding kinesin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* and the characterization of secondary structure of KatA. *Molecular Genetics and Genomics* **238**(3): 362-368.

**Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. 1998.** The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *PNAS* **95**(11): 6181-6186.

**Murata T, Wada M. 1991.** Effects of centrifugation on preprophase-band formation in *Adiantum protonemata*. *Planta* **183**(3): 391-398.

**Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S. 1992.** Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology* **132**: 1-30.

**Narasimhulu SB, Reddy AS. 1998.** Characterization of microtubule binding domains in the *Arabidopsis* kinesin-like calmodulin binding protein. *Plant Cell* **10**(6): 957-965.

**Nebenführ A, Frohlick JA, Staehelin LA. 2000.** Redistribution of golgi stacks and other organelles during mitosis and cytokinesis in plant cells. *Plant Physiology* **124**(1): 135-151.

**Nick P. 2001.** Role of the microtubular cytoskeleton in coleoptile Phototropism. In: Häder DP, Breure AM, eds. *Photomovement: Comprehensive Series in Photosciences*. München: Elsevier, 813-832.

- Nick P. 2008.** Control of Cell Axis. In: Nick P, ed. *Plant Microtubules*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 23-46.
- Nick P. 2011.** Mechanics of the cytoskeleton. In: Wojtaszek P, ed. *Mechanical Integration of Plant Cells and Plants*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 53-90.
- Nick P, Bergfeld R, Schäfer E, Schopfer P. 1990.** Unilateral reorientation of microtubules of the outer epidermal wall during photo- and gravitropic curvature of maize coleoptiles and sunflower hypocotyls. *Planta* **181**: 162-168.
- Nick P, Han MJ, An G. 2009.** Auxin stimulates its own transport by shaping actin filaments. *Plant Physiology* **151**(1): 155-167.
- Nick P, Heuing A, Ehmann B. 2000.** Plant chaperonins: a role in microtubule-dependent wall formation. *Protoplasma* **211**: 234-244.
- Noda Y, Sato-Yoshitake R, Kondo S, Nangaku M, Hirokawa N. 1995.** KIF2 is a new microtubule-based anterograde motor that transports membranous organelles distinct from those carried by kinesin heavy chain or KIF3A/B. *Journal of Cell Biology* **129**(1): 157-167.
- North AJ, Gimona M, Cross RA, Small JV. 1994.** Calponin is localised in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells. *Journal of Cell Science* **107**: 437-444.
- Ogawa T, Nitta R, Okada Y, Hirokawa N. 2004.** A common mechanism for microtubule destabilizers: M-type kinesins stabilize curling of the protofilament using the class-specific neck and loops. *Cell* **116**: 591-602.
- Ohad N, Shichrur K, Yalovsky S. 2007.** The analysis of protein-protein interactions in plants by bimolecular fluorescence complementation. *Plant Physiology* **145**(4): 1090-1099.
- Okada Y, Hirokawa N. 2000.** Mechanism of the single-headed processivity: diffusional anchoring between the K-loop of kinesin and the C terminus of tubulin. *PNAS* **97**(2): 640-645.
- Oppenheimer DG, Pollock MA, Vacik J, Szymanski DB, Ericson B, Feldmann K, Marks MD. 1997.** Essential role of a kinesin-like protein in *Arabidopsis* trichome morphogenesis. *PNAS* **94**(12): 6261-6266.
- Palmer RE, Sullivan DS, Huffaker T, Koshland D. 1992.** Role of astral microtubules and actin in spindle orientation and migration in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* **119**(3): 583-593.
- Panteris E, Galatis B, Quader H, Apostolakos P. 2007.** Cortical actin filament organization in developing and functioning stomatal complexes of *Zea mays* and *Triticum turgidum*. *Cytoskeleton* **64**(7): 531-548.
- Panteris E. 2008.** Cortical actin filaments at the division site of mitotic plant cells: a reconsideration of the 'actin-depleted zone'. *New Phytologist* **179**(2): 334-341.
- Paredes AR, Somerville CR, Ehrhardt DW. 2006.** Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* **312**(5779): 1491-1495.
- Pechatnikova E, Taylor EW. 1999.** Kinetics processivity and the direction of motion of Ncd. *Biophysical Journal* **77**(2): 1003-1016.

- Petrášek J, Schwarzerová K. 2009.** Actin and microtubule cytoskeleton interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **12**(6): 728-734.
- Pollard TD, Borisy GG. 2003.** Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**(4): 453-465.
- Preuss ML, Delmer DP, Liu B. 2003.** The cotton kinesin-like calmodulin-binding protein associates with cortical microtubules in cotton fibers. *Plant Physiology* **132**(1): 154-160.
- Preuss ML, Kovar DR, Lee YR, Staiger CJ, Delmer DP, Liu B. 2004.** A plant-specific kinesin binds to actin microfilaments and interacts with cortical microtubules in cotton fibers. *Plant Physiology* **136**(4): 3945-3955.
- Reddy AS, Day IS. 2001a.** Kinesins in the *Arabidopsis* genome: a comparative analysis among eukaryotes. *BMC Genomics* **2**(1): 2.
- Reddy AS, Day IS. 2001b.** Analysis of the myosins encoded in the recently completed *Arabidopsis thaliana* genome sequence. *BMC Genome Biology* **2**(7).
- Reddy AS, Narasimhulu SB, Safadi F, Golovkin M. 1996a.** A plant kinesin heavy chain-like protein is a calmodulin-binding protein. *Plant Journal* **10**(1): 9-21.
- Reddy AS, Safadi F, Narasimhulu SB, Golovkin M, Hu X. 1996b.** A novel plant calmodulin-binding protein with a kinesin heavy chain motor domain. *Journal of Biological Chemistry* **271**(12): 7052-7060.
- Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, Verhey KJ. 2006.** Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Current Biology* **16**(21): 2166-2172.
- Richardson DN, Simmons MP, Reddy AS. 2006.** Comprehensive comparative analysis of kinesins in photosynthetic eukaryotes. *BMC Genomics* **7**: 18.
- Sakai T, van der Honing H, Nishioka M, Uehara Y, Takahashi M, Fujisawa N, Saji K, Seki M, Shinozaki K, Jones MA, Smirnov N, Okada K, Wasteneys GO. 2008.** Armadillo repeat-containing kinesins and a NIMA-related kinase are required for epidermal-cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **53**(1): 157-171.
- Sambrook J, Russell DW. 2001.** *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sampathkumar A, Lindeboom JJ, Debolt S, Gutierrez R, Ehrhardt DW, Ketelaar T, Persson S. 2011.** Live cell imaging reveals structural association between the actin and microtubule cytoskeleton in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 2302-2313.
- Samuels AL, Meehl J, Lipe M, Staehelin LA. 1998.** Optimizing conditions for tobacco BY-2 cell cycle synchronization. *Protoplasma* **202**: 232-236.
- Sano T, Higaki T, Oda Y, Hayashi T, Hasezawa S. 2005.** Appearance of actin microfilament 'twin peaks' in mitosis and their function in cell plate formation, as visualized in tobacco BY-2 cells expressing GFP-fimbrin. *Plant Journal* **44**(4): 595-605.
- Sasabe M, Boudolf V, De Veylder L, Inzé D, Genschik P, Machida Y. 2011.** Phosphorylation of a mitotic kinesin-like protein and a MAPKKK by cyclin-dependent kinases (CDKs) is involved in the transition to cytokinesis in plants. *PNAS* **108**(43): 17844-17849.

- Schnitzer MJ, Block SM. 1997.** Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature* **388**(6640): 386-390.
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. 1998.** SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *PNAS* **95**(11): 5857-5864.
- Seagull RW, Heath IB. 1979.** The effects of tannic acid on the *in vivo* preservation of microfilaments. *European Journal of Cell Biology* **20**(2): 184-188.
- Seagull RW. 1990.** The effects of microtubule and microfilament disrupting agents on cytoskeletal arrays and wall deposition in developing cotton fibres. *Protoplasma* **159**: 44-59.
- Seagull RW. 1992.** A quantitative electron microscopic study of changes in microtubule arrays and wall microfibril orientation during *in vitro* cotton fiber development. *Journal of Cell Science* **101**: 561-577
- Seiler S, Kirchner J, Horn C, Kallipolitou A, Woehlke G, Schliwa M. 2000.** Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal conventional kinesin. *Nature Cell Biology* **2**(6): 333-338.
- Sharp DJ, Rogers GC, Scholey JM. 2000.** Microtubule motors in mitosis. *Nature* **407**(6800): 41-47.
- Sheeman B, Carvalho P, Sagot I, Geiser J, Kho D, Hoyt MA, Pellman D. 2003.** Determinants of *S. cerevisiae* dynein localization and activation: implications for the mechanism of spindle positioning. *Current Biology* **13**(5): 364-372.
- Shibaoka H. 1994.** Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: alterations in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **45**: 527-544.
- Sjöblom B, Ylanne J, Djinovic-Carugo K. 2008.** Novel structural insights into F-actin-binding and novel functions of calponin homology domains. *Current Opinion in Structural Biology* **18**(6): 702-708.
- Slep KC, Rogers SL, Elliott SL, Ohkura H, Kolodziej PA, Vale RD. 2005.** Structural determinants for EB1-mediated recruitment of APC and spectraplakins to the microtubule plus end. *Journal of Cell Biology* **168**(4): 587-598.
- Slep KC, Vale RD. 2007.** Structural basis of microtubule plus end tracking by XMAP215, CLIP-170, and EB1. *Molecular Cell* **27**(6): 976-991.
- Smirnova EA, Reddy AS, Bowser J, Bajer AS. 1998.** Minus end-directed kinesin-like motor protein, Kcbp, localizes to anaphase spindle poles in *Haemanthus* endosperm. *Cytoskeleton* **41**(3): 271-280.
- Smith LG. 1999.** Divide and conquer: cytokinesis in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* **2**(6): 447-453.
- Song H, Golovkin M, Reddy AS, Endow SA. 1997.** In vitro motility of AtKCBP, a calmodulin-binding kinesin protein of *Arabidopsis*. *PNAS* **94**(1): 322-327.
- Sonobe S, Shibaoka H. 1989.** Cortical fine actin filaments in higher plant cells visualized by rhodamine-phalloidin after pretreatment with m-maleimidobenzoyl N-hydroxysuccinimide ester. *Protoplasma* **148**: 80-86.

- Staiger C, Doonan J. 1993.** Cell division in plants. *Current Opinion in Cell Biology* **5**(2): 226-231.
- Stock MF, Guerrero J, Cobb B, Eggers CT, Huang TG, Li X, Hackney DD. 1999.** Formation of the compact conformation of kinesin requires a COOH-terminal heavy chain domain and inhibits microtubule-stimulated ATPase activity. *Journal of Biological Chemistry* **274**(21): 14617-14623.
- Stoppin V, Vantard M, Schmit AC, Lambert AM. 1994.** Isolated plant nuclei nucleate microtubule assembly: the nuclear surface in higher plants has centrosome-like activity. *Plant Cell* **6**(8): 1099-1106.
- Sullivan DS, Huffaker TC. 1992.** Astral microtubules are not required for anaphase B in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* **119**(2): 379-388.
- Svoboda K, Block SM. 1994.** Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell* **77**(5): 773-784.
- Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T. 1986.** Isolation and characterization of a 34,000-dalton calmodulin- and F-actin-binding protein from chicken gizzard smooth muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **141**(1): 20-26.
- Tamura K, Nakatani K, Mitsui H, Ohashi Y, Takahashi H. 1999.** Characterization of katD, a kinesin-like protein gene specifically expressed in floral tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **230**(1): 23-32.
- Tiwari SC, Wick SM, Williamson RE, Gunning BE. 1984.** Cytoskeleton and integration of cellular function in cells of higher plants. *Journal of Cell Biology* **99**: 63s-69s.
- Tominaga M, Morita K, Sonobe S, Yokota E, Shimmen T. 1997.** Microtubules regulate the organization of actin filaments at the cortical region in root hair cells of *Hydrocharis*. *Protoplasma* **199**: 83-92.
- Traas JA, Doonan JH, David JR, Shaw PJ, Watts J, Lloyd CW. 1987.** An actin network is present in the cytoplasm throughout the cell cycle of carrot cells and associates with the dividing nucleus. *Journal of Cell Biology* **105**: 387-395.
- Umezumi N, Umeki N, Mitsui T, Kondo K, Maruta S. 2011.** Characterization of a novel rice kinesin O12 with a calponin homology domain. *Journal of Biochemistry* **149**(1): 91-101.
- Vale RD, Reese TS, Sheetz MP. 1985.** Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **42**(1): 39-50.
- Valentine MT, Block SM. 2009.** Force and premature binding of ADP can regulate the processivity of individual Eg5 dimers. *Biophysical Journal* **97**(6): 1671-1677.
- Van Damme D, Vanstraelen M, Geelen D. 2007.** Cortical division zone establishment in plant cells. *Trends in Plant Science* **12**(10): 458-464.
- Vanstraelen M, Inzé D, Geelen D. 2006.** Mitosis-specific kinesins in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* **11**(4): 167-175.
- Vantard M, Levilliers N, Hill AM, Adoutte A, Lambert AM. 1990.** Incorporation of *Paramecium* axonemal tubulin into higher plant cells reveals functional sites of microtubule assembly. *PNAS* **87**(22): 8825-8829.

- Vos JW, Safadi F, Reddy AS, Hepler PK. 2000.** The kinesin-like calmodulin binding protein is differentially involved in cell division. *Plant Cell* **12**(6): 979-990.
- Walker RA, Salmon ED, Endow SA. 1990.** The *Drosophila* claret segregation protein is a minus-end directed motor molecule. *Nature* **347**(6295): 780-782.
- Waller F, Nick P. 1997.** Response of actin microfilaments during phytochrome-controlled growth of maize seedlings *Protoplasma* **200**: 154-162.
- Waller F, Riemann M, Nick P. 2002.** A role for actin-driven secretion in auxin-induced growth. *Protoplasma* **219**: 72-81.
- Wang QY, Nick P. 1998.** The auxin response of actin is altered in the rice mutant Yin-Yang. *Protoplasma* **204**: 22-33.
- Wang W, Takezawa D, Narasimhulu SB, Reddy AS, Poovaiah BW. 1996.** A novel kinesin-like protein with a calmodulin-binding domain. *Plant Molecular Biology* **31**(1): 87-100.
- Wasteneys GO. 2002.** Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *Journal of Cell Science* **115**(7): 1345-1354.
- Wegner A. 1976.** Head to tail polymerization of actin. *Journal of Molecular Biology* **108**(1): 139-150.
- Weisenberg RC, Borisy GG, Taylor EW. 1968.** The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Biochemistry* **7**(12): 4466-4479.
- Wickstead B, Gull K. 2011.** The evolution of the cytoskeleton. *Journal of Cell Biology* **194**(4): 513-525.
- Winder SJ, Walsh MP. 1990.** Smooth muscle calponin. Inhibition of actomyosin MgATPase and regulation by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **265**(17): 10148-10155.
- Woehlke G, Ruby AK, Hart CL, Ly B, Hom-Booher N, Vale RD. 1997.** Microtubule interaction site of the kinesin motor. *Cell* **90**(2): 207-216.
- Xu T, Qu Z, Yang X, Qin X, Xiong J, Wang Y, Ren D, Liu G. 2009.** A cotton kinesin GhKCH2 interacts with both microtubules and microfilaments. *Biochemical Journal* **421**(2): 171-180.
- Xu T, Sun X, Jiang S, Ren D, Liu G. 2007.** Cotton GhKCH2, a plant-specific kinesin, is low-affinitive and nucleotide-independent as binding to microtubule. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **40**(5): 723-730.
- Yamamoto A, Hiraoka Y. 2003.** Cytoplasmic dynein in fungi: insights from nuclear migration. *Journal of Cell Science* **116**(22): 4501-4512.
- Yang JT, Laymon RA, Goldstein LS. 1989.** A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding analyses. *Cell* **56**(5): 879-889.
- Yoneda A, Akatsuka M, Hoshino H, Kumagai F, Hasezawa S. 2005.** Decision of spindle poles and division plane by double preprophase bands in a BY-2 cell line expressing GFP-tubulin. *Plant Cell Physiology* **46**(3): 531-538.

**Yoneda A, Akatsuka M, Kumagai F, Hasezawa S. 2004.** Disruption of actin microfilaments causes cortical microtubule disorganization and extra-phragmoplast formation at M/G1 interface in synchronized tobacco cells. *Plant Cell Physiology* **45**(6): 761-769.

**Yoneda A, Hasezawa S. 2003.** Origin of cortical microtubules organized at M/G1 interface: recruitment of tubulin from phragmoplast to nascent microtubules. *European Journal of Cell Biology* **82**(9): 461-471.

**Zekert N, Fischer R. 2009.** The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules. *Molecular Biology of the Cell* **20**: 673-684.

**Zhong R, Burk DH, Morrison WH, 3rd, Ye ZH. 2002.** A kinesin-like protein is essential for oriented deposition of cellulose microfibrils and cell wall strength. *Plant Cell* **14**(12): 3101-3117.

**Zhu C, Dixit R. 2011.** Single molecule analysis of the *Arabidopsis* FRA1 kinesin shows that it is a functional motor protein with unusually high processivity. *Molecular Plant* **4**(5): 879-885.

**Ziegenspeck H. 1948.** Die Bedeutung des Feinbaus der pflanzlichen Zellwand für die physiologische Anatomie. *Mikroskopie* **3**(3-4): 72-85.

# Anhang

## 1. NtKCH

### 1.1. cDNA-Nukleotidsequenz von NtKCH

```

1  atggcggcct atggagcatt gtctgtggta gaggatgttc ttcagcagca tggcaataac
61  ccatcaaaaa atccttgatctt ggtggatgcc cgtaaagcag aggaagctgc aataaagagg
121  tatcaagcag cagcatggct gaggaagata gttggaattg tgggagctaa aaatttgcca
181  gctgaacctt ctgaggaaga attcaggcct ggtttaagga gtggaatgat cctttgcaat
241  gtactcaata aaattcaacc tggagctgtg cccaaggttg ttgaaagtcc atgtgactct
301  gcagttatct cagatggagc tgccctttct gcataccagt actttgagaa tgttagaaat
361  tttttggttg ctgtgcaaga attggggatt cctttgtttg aggcctctga tctcgagcag
421  ggaggaaaa catcaaggat tgtgaattgt gttttgggac ttaaacttta cagcgaatgg
481  aagcaagaag gtggtacagg agtctggaaa ttcggtggaa atataaaatc caatgcactc
541  gtgaaacaaa ttgtgctgaa aaattctgag ccattcaciaa gttctttgtc aaggaatatg
601  tatgagaaac ctataaatgg tgcatacaatt gaagctggaa aaaacaaaac ggccagctct
661  tccttgagca tgcttgctcg tgcaattcta actgataaga ggcccgaaga ggttcctaata
721  cttgtggagt cgggtgttgaa taagggtgtt caggaatttg agcatcgcgt tgcaagcaaa
781  attgaactga gtaaagcaac tacagatgat tcaactggtt cttgtggtaa caaatccacc
841  ttgagatata cttctgacag tgcaaagggt gaccaaagaa atgtgatcat agagaagaaa
901  gaggactcct tgccaaatga agaacttgaa agaagataca tgaagcaata cgccattggt
961  gaccaacagc aaagtgacat taagaacctg aagcaaactc ttttgactac caaagcgggt
1021  atgcaattca tgcagatgaa gtttcatgag gaaatgcata atattggcat gcacataaat
1081  ggcctagctc atgcagcttc tggttatcat agagttcttg aagaaaatcg caagctttat
1141  aatcaagttc aggatcttaa aggaagcata agggtttact gtcgagtaag accctttttg
1201  cccgggcaat ctacttgtgc tagttctgtg gatcacatag aagatggcac cattacaata
1261  agtgttccgt caaagaacgg aaaagggcga aagtctttca acttcaatga agtatttgga
1321  tcctgtgcta ctcaaggcga ggtgttttct gatacacaa cactgataag atcagttctt
1381  gatggcttca atgtctgcat ttttgcttat ggccaaacag gatcaggaaa aacctataca
1441  atgacggggc ctagaatat cacagaacaa agtcaaggag taaactatag ggctttaggg
1501  gatctattcc ttctcgcaga acaagaaaag gataccctcc actatgatgt gtctgtacag
1561  atgatcgaga tatacaatga gcaagtagg gatctcctag tttctgatgg tgtaaacaaa
1621  agattagaaa tccgtagtgc ttctcaagga ctaactgtac cagatgcaag cttggttcat
1681  gtaacttcaa cttgcgacgt tattgatctg atgaatttgg ggcaaaaagaa tcggttcagtg
1741  ggtgcaacag cactcaatga ccgcagtagc cgctcccaca gttgcctaac tgttcgtatt
1801  cagggacgag acttgacttc tggagctatt cttcgtgggt gtatgcattt ggttgatctt
1861  gcaggaagtg agagagtcaa caaatctgaa gtaacaggag ataggcttaa ggaggctcag
1921  cacattaaca agtctctttc agctttgggt gatgttatct ctgcccttgc ccaaaaagaat
1981  gcacatgtcc cataccgtaa cagcaaactt actcagctac tgcaagactc actaggaggg
2041  caagccaaaa ctctgatggt tgttcacata agccctgaac ctgaagctgt aggagaaaca
2101  attagcacac ttaaatttgc agaacgtggt tctactgttg aactaggcgc tgcacgagta
2161  aataaagact ctgcagatgt caaagagctc aaagaacaga ttgcaactct taaagctgcc
2221  ttggcaaaaa aagaagagga gtcagttccc atgcagcata taatgagcag tccgtgtaac
2281  atgcagccat caccctttca atctaatacca cagaaaagag agaaattggc cgattcacac
2341  atccagagga gaccgatgga cgatgtaggc aatatagagg tatttagtaa ttctgagttc
2401  agacaaaaga cgcaaagctt tgatcttgat gagttactag gaaattcccc ttctggcca
2461  ccagtcgaca gtccttgtga aaactatggt ggatatgata aagacatggg cacgggtgag
2521  tgggtagaca aagtcatggt gaacaaacaa gactctatca agatcaatgg agtgggaaag
2581  ccctttggat gttgggaaac tgaaaaaggc atgtgtgatg tctttgctca gaaatatctt
2641  tcggaatcat ctaaattatt atgccaagaa aaatcgggta atcttttccc attgagtgac
2701  cactttaaca ttactcctgc tgatgatctt gaagaatttg atgccacgac cagtgattca
2761  tctgagccag atctgctttg gcaattcaat aattccaaac tgaacaactt cacctatggg
2821  aacgagtcaa agatccagag atcaaatgca aagcatgcaa agagcccaga aacaaggaac
2881  atggttaaca aagtaggggc ttgcocatca cgaaagacaa atggaattgg ccacacacct
2941  ctacggaatg ggaggcaggc cgtgccaact gaaatgaagc gaaaagcagg aaacaggaag
3001  tag

```

## 1.2. Aminosäuresequenz von NtKCH

```

1  MAAYGALSVV  EDVLQQHGNN  PSKNLDLVDA  RKAEEAAIKR  YQAAAALRKI
51  VGIVGAKNLP  AEPSEEEFRL  GLRSGMILCN  VLNKIQPGAV  PKVVESPCDS
101 AVISDGAALS  AYQYFENVRN  FLVAVQELGI  PLFEASDLEQ  GGKSSRIVNC
151 VLGLKSYSEW  KQEGGTGVWK  FGGNIKSNAS  VKQIVRKNSE  PFTSSLSRNM
201 YEKPINGASI  EAGKNKTASS  SLSMLVRAIL  TDKRPEEVPN  LVESVLNKVV
251 QEFEHRVASK  IELSKATTDD  STGSCGNKST  LRYTSDSAKV  DQRNVLIEKK
301 EDSLPNEELE  RRYMKQYAIV  DQQQSDIKNL  KQTLTLLTKAG  MQFMQMKFHE
351 EMHNIGMHIN  GLAHAASGYH  RVLEENRKLY  NQVQDLKGS  RVYCRVRPFL
401 PGQSTCASSV  DHIEDGTITI  SVPSKNGKGR  KSFNFNEVFG  SCATQGEVFS
451 DTQPLIRSVL  DGFNVCIFAY  GQTGSGKTYT  MTGPKNITEQ  SQGVNYRALG
501 DFLLLAEQRK  DTFHYDVSQ  MIEIYNEQVR  DLLVSDGVNK  RLEIRSASQG
551 LTVPDASLVH  VTSTCDVIDL  MNLGQKNRSV  GATALNDRSS  RSHSCLTVRI
601 QGRDLTSGAI  LRGCMHLVDL  AGSERVKNSE  VTGDRLKEAQ  HINKSLSALG
651 DVISALAQKN  AHVPYRNSKL  TQLLQDSLGG  QAKTLMFVHI  SPEPEAVGET
701 ISTLKFAERV  STVELGAARV  NKDSADV KEL  KEQIATL KAA  LAKKEEESVP
751 MQHIMSSPCN  MQPSPFQSNP  QKREKLADSH  IQRRPMDVVG  NIEVFSNSEF
801 RQKTQSFDDL  ELLGNPSWP  PVDSPCENYV  GYDKDMGTGE  WVDKVMVNKQ
851 DSIKINGVGK  PFGCWESEKG  MCDVFAQKYL  SESSKLLCQE  KSGNLFPLSD
901 HFNITPADDL  EEFDATTSDS  SEPDLLWQFN  NSKLNFTYG  NESKIQRSNA
951 KHAKSPETRN  MVNKVGPSPS  RKTNGIGHTP  LRNGRQAVPT  EMKRKAGNRK
1001 *

```

## 1.3. Biochemische Daten zu NtKCH

Tabelle 12: Biochemische Analyse von NtKCH mit Vector VNTI-Software (Invitrogen)

Analyse	Länge	Molekulargewicht	Molekularer Extinktionskoeffizient	1A [280] entspricht	1A[280] 1 mg/ml	Isoelektrischer Punkt	Ladung bei pH 7,0
<b>Gesamtes Protein</b>	1001 As	110533 Da	9,047 pMol	1,58 mg/ml	0,63 AU	8,01	4,5

## 2. Verwendete Primer

Tabelle 13: Primer zur Isolierung von NtKCH

Bezeichnung	Nukleotidabfolge (5' → 3')	Verwendung/ Bindestelle	O*	T <sub>A</sub>
<b>Degenerierte Primer zur Isolierung des 2078 bp-Fragments von NtKCH</b>				
NtKCH_deg1-fw	GAG GAA GAA TTT AGG CTT GG	NtKCH-Isolierung/ bp 193-212 der NtKCH-CDS	fw	52 °C
NtKCH_deg1-rv	CTT ATA TGT CTG ATT GGG ACC	NtKCH-Isolierung/ bp 2244-2264 der NtKCH-CDS	rv	52 °C

**Primer zur Isolierung von NtKCH -Fortsetzung-**

Bezeichnung	Nukleotidabfolge (5'→3')	Verwendung/ Bindestelle	O*	T <sub>A</sub>
<b>Primer für die 5'- und 3'-RACE</b>				
<i>GeneRacer</i> <sup>TM</sup> Oligo dT-Primer (Invitrogen)	GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC GGC ATG ACA GTG -24x(T)	3'-RACE Oligo dT-Primer/ mRNA Poly(A)-Schwanz	rv	–
<i>GeneRacer</i> <sup>TM</sup> 5'-Nested Primer (Invitrogen)	GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA	5'-RACE PCR/ bp 15-40 des <i>GeneRacer</i> <sup>TM</sup> RNA-Oligos	fw	63 °C
<i>GeneRacer</i> <sup>TM</sup> 5'-Primer (Invitrogen)	CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA	5'-RACE PCR/ bp 1-23 des <i>GeneRacer</i> <sup>TM</sup> RNA-Oligos	fw	1. 63 °C 2. 70 °C 3. 72 °C
<i>GeneRacer</i> <sup>TM</sup> RNA- Oligo (Invitrogen)	CGA CUG GAG CAC GAG GAC ACU GAC AUG GAC UGA AGG AGU AGA AA	5'-RACE Oligo/ Ligation ans 5'- Ende von mRNAs	–	–
<i>GeneRacer</i> <sup>TM</sup> 3'-Nested Primer (Invitrogen)	CGC TAC GTA ACG GCA TGA CAG TG	3'-RACE Nested PCR/ bp 14-36 des <i>GeneRacer</i> <sup>TM</sup> Oligo dT-Primers	rv	63 °C
<i>GeneRacer</i> <sup>TM</sup> 3'-Primer (Invitrogen)	GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G	3'-RACE PCR/ bp 1-25 des <i>GeneRacer</i> <sup>TM</sup> Oligo dT-Primers	rv	1. 63 °C 2. 70 °C 3. 72 °C
GSP 3'-Nested Primer	GCA ACT CTT AAA GCT GCC TTG GCA AA	3'-RACE Nested PCR/ bp 2203- 2228 der NtKCH- CDS	fw	63 °C
GSP 3'-Primer	GAT GAA CTA GGC GCT GCA CGA GTA A	3'-RACE PCR/ bp 2137-2161 der NtKCH-CDS	fw	1. 61 °C 2. 70 °C 3. 72 °C
GSP 5'-Nested Primer	TGC TTG CAA CGC GAT GCT CAA ATT CC	5'-RACE Nested PCR/ bp 753-778 der NtKCH-CDS	rv	63 °C
GSP 5'-Primer	CAG CTT CAA TTG ACG CAC CGT TTT TAG G	5'-RACE PCR/ bp 610-637 der NtKCH-CDS	rv	1. 63 °C 2. 70 °C 3. 72 °C

**Primer zur überlappenden Amplifikation und Sequenzierung der NtKCH-CDS**

NtKCH_seq1	GCAAAGAACTTGTGAATGG	bp 571-589 der NtKCH-CDS	rv	58 °C
NtKCH_seq2	GAGGAAGAATTTAGGCTTGG	bp 193-212 der NtKCH-CDS	fw	56 °C
NtKCH_seq3	AATAGATCGCCTAAAGCC	bp 1491-1508 der NtKCH-CDS	rv	59 °C

**Primer zur Isolierung von NtKCH -Fortsetzung-**

Bezeichnung	Nukleotidabfolge (5'→3')	Verwendung/ Bindestelle	O*	T <sub>A</sub>
NtKCH_seq4	AGCAAAGTGACATTAAGAACC	bp 968-988 der NtKCH-CDS	fw	57 °C
NtKCH_seq5	GCATGTTACACGGACTG	bp 2268-2284 der NtKCH-CDS	rv	56 °C
NtKCH_seq6	TCACAGAACAAAGTCAAGG	bp 1460-1478 der NtKCH-CDS	fw	56 °C
NtKCH_seq7	CTTTGTCTACCCACTCACC	bp 2515-2533 der NtKCH-CDS	rv	56 °C
NtKCH_seq8	CTGCAGATGTCAAAGAGC	bp 2171-2188 der NtKCH-CDS	fw	56 °C
NtKCH_seq9	GAACATTACACGCAATGG	bp +168 bis +186 der 3'-UTR von NtKCH	rv	57 °C

\*O: Orientierung: fw = vorwärts; rv= rückwärts

**Tabelle 14: Übersicht der Primer zur semiquantitative Expressionsanalyse**

Bezeichnung	Nukleotidabfolge (5'→3')	Verwendung/ Bindestelle	T <sub>A</sub>
NtKCH_squant-fw	CTG CAG ATG TCA AAG AGC	Detektion von NtKCH/ bp 2171-2188	57 °C
NtKCH_squant-rv	CTT TGT CTA CCC ACT CAC C	Detektion von NtKCH/ bp 2515-2533	57 °C
GAPD-fw (Hu <i>et al.</i> , 2010)	CTG GAG AAA GAA GCT ACC TAC GAT GAA A	Detektion von GAPD/ bp 883-910	57 °C
GAPD-rv (Hu <i>et al.</i> , 2010)	CAG ACT CCT CAC AGC AGC ACC ACT A	Detektion von GAPD/ bp 1178-1202	57 °C

**Tabelle 15: Übersicht der Kontroll-Sequenzierungsprimer**

Bezeichnung	Nukleotidabfolge (5'→3')	Herkunft	T <sub>A</sub>
M13-FP	TGTAACGACGGCCAGT	Standardsequenzierungsprimer von GATC	60 °C
M13-RV	CAGGAAACAGCTATGACC	Standardsequenzierungsprimer von GATC	56 °C
pEGFP_C2-FP	GATCACATGGTCTGCTG	Standardsequenzierungsprimer von GATC	56 °C
RFP-fw	TACAAGACCGACATCAAGC	Sequenzierungsprimer für pH7WGR2.0 und p2RGW7 (diese Arbeit)	56 °C
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Standardsequenzierungsprimer von GATC	56 °C

Tabelle 16: Übersicht der Klonierungsprimer

Bezeichnung	Nukleotidabfolge (5'→3')	Verwendung	T <sub>A</sub>
NtKCH_fl-fw	CCT GTT TAT CCT CTC TGA CC	Amplifikation der NtKCH-CDS für Klonierung in pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup>	56 °C
NtKCH_fl-rv	AGC AGC TTA GTT CAC ATC C	Amplifikation der NtKCH-CDS für Klonierung in pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup>	56 °C
NtKCH_Entry-fw	<u>GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG</u> <u>CTG CAT GGC GGC CTA TGG AGC ATT GTC</u> TG	Amplifikation der NtKCH-CDS für Klonierung in pDONR <sup>™</sup> /Zeo für N-terminale Fusionskonstrukte	1. 63 °C 2. 66 °C 3. 69 °C
NtKCH_Entry-rv	<u>GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC</u> <u>TGG GTC CTA CTT CCT GTT TCC TGC TTT</u> TCG C		
NtKCH_Entry2-rv	<u>GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC</u> <u>TGG GTC CTT CCT GTT TCC TGC TTT TCG</u> CTTC	Amplifikation der NtKCH-CDS ohne STOP-Codon für Klonierung in pDONR <sup>™</sup> /Zeo für C-terminale Fusionskonstrukte	1. 63 °C 2. 66 °C 3. 69 °C
NtKCH_Entry Δ409-1001 fw	<u>GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG</u> <u>CTG CAT GGC GGC CTA TGG AGC ATT GTC</u> TG	Amplifikation von NtKCHΔ409-1001 für Klonierung in pDONR <sup>™</sup> /Zeo	1. 66 °C 2. 70 °C 3. 72 °C
NtKCH_Entry Δ409-1001 rv	<u>GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC</u> <u>TGG GTC CTA ACT AGC ACA AGT AGA TTG</u> CCC GGGC		
NtKCH_Entry Δ251-1001 fw	<u>GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG</u> <u>CTG CAT GGC GGC CTA TGG AGC ATT GTC</u> TG	Amplifikation von NtKCHΔ251-1001 für Klonierung in pDONR <sup>™</sup> /Zeo	1. 60 °C 2. 64 °C 3. 67 °C
NtKCH_Entry Δ251-1001 rv	<u>GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC</u> <u>TGG GTC CTA AAC AAC CTT ATT CAA CAC</u> CGA CTCC		
NtKCH_Entry Δ1-300 fw	<u>GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG</u> <u>CTG CAT GGA GGA CTC CTT GCC AAA TGA</u> AGA AC	Amplifikation von NtKCHΔ1-300 für Klonierung in pDONR <sup>™</sup> /Zeo	1. 60 °C 2. 64 °C 3. 67 °C
NtKCH_Entry Δ1-300 rv	<u>GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC</u> <u>TGG GTC CTA CTT CCT GTT TCC TGC TTT</u> TCG C		

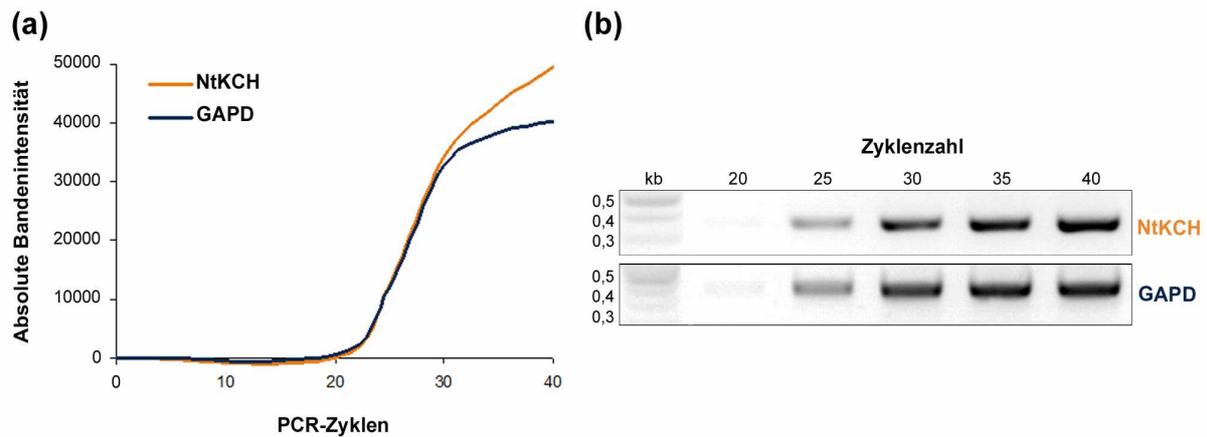
\* Die *attB*-Stellen für Gateway<sup>®</sup> BP-Reaktion sind unterstrichen

### 3. Abkürzungen der Genotypen und Plasmid-Annotationen

Tabelle 17: Abkürzungen der Genotypen der verwendeten Organismen/ Plasmid-Annotation

Abkürzung	Beschreibung
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
attP1_Cm <sup>R</sup> _ccdB_attP2	Rekombinationskassette für BP-Reaktion mit attP-Stellen, ccdB-Todgen und Chloramphenicol-Resistenz
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
EGFP	<i>Enhanced</i> GFP
Hyg <sup>R</sup>	Hygromycin-Resistenz
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
LacZα_TOPO <sup>®</sup> _LacZα-ccdB	TOPO <sup>®</sup> -Klonierungs-Kassette mit LacZ-Gen und ccdB-Todgen
LB	<i>Left border</i> -Sequenz
ori	<i>Origin of replication</i> (Replikationsursprung)
P35S	CaMV-35S-Promotor
P <sub>EM7</sub>	EM7-Promotor
P <sub>lac</sub>	Lac-Promotor
RB	<i>Right border</i> -Sequenz
rrnB T1/T2	Zwei hintereinander liegende rrnB-Terminatoren
Sm/Sp <sup>R</sup>	Spectinomycin-Resistenz
T35S	CaMV-35S-Terminator
Zeo <sup>R</sup>	Zeocin-Resistenz

#### 4. Bestimmung der PCR-Zyklenzahl zur Expressionsanalyse von NtKCH



**Abbildung 36: Bestimmung der PCR-Zyklenzahl zur semiquantitativen Expressionsanalyse von NtKCH.** In je 100  $\mu$ l PCR-Ansätzen mit Taq DNA-Polymerase wurden die diagnostischen NtKCH- und GAPD-Fragmente 40 Zyklen lang amplifiziert. Nach 20, 25, 30, 35 und 40 Zyklen wurden die Reaktionen kurzzeitig abgestoppt und jeweils 10  $\mu$ l Proben entnommen. (b) Die Proben wurden im Anschluss auf einem 2 % [w/v] Agarosegel aufgetrennt. Die Gelbilder wurden digitalisiert und durch eine Grauwertanalyse in *ImageJ* ausgewertet. (a) Die absoluten Bandenintensitäten (Y-Achse) wurden gegen die entsprechende Zyklenzahl (X-Achse) aufgetragen. Das Schaubild verdeutlicht, dass sich die Amplifikationen zwischen 20 und 30 Zyklen innerhalb der exponentiellen Phase befinden. Folglich wurden für die semiquantitativen RT-PCR 25 Zyklen gewählt.

#### 5. Bestimmung der zellzyklusabhängigen Teilungsaktivität

**Tabelle 18: Datentabelle zur Bestimmung des MI in GFP-NtKCH und BY-2 Wildtyp-Zellen**

Versuchsreihe		Tag nach der Subkultivierung								MI (in %; n = 500)
		0,5	1	2	3	4	5	6	7	
GFP-NtKCH	I.	0,27	10,60	8,40	6,63	5,25	3,50	0,38	0,13	
	II.	0,40	10,40	9,20	7,20	5,40	3,80	1,40	0,00	
	III.	0,00	10,40	10,60	9,60	5,00	4,60	2,00	1,80	
	<b>Mittelwert</b>	<b>0,22</b>	<b>10,47</b>	<b>9,40</b>	<b>7,81</b>	<b>5,22</b>	<b>3,97</b>	<b>1,26</b>	<b>0,64</b>	
	Standardabweichung	0,20	0,12	1,11	1,58	0,20	0,57	0,82	1,01	
Standardfehler	0,12	0,07	0,64	0,91	0,12	0,33	0,47	0,58		
BY-2 Wildtyp	I.	0,13	7,20	4,80	4,88	4,25	4,25	1,63	0,00	
	II.	0,00	9,20	3,60	6,20	4,00	1,40	0,40	0,00	
	III.	0,00	9,80	1,00	5,60	5,20	5,60	2,00	0,00	
	<b>Mittelwert</b>	<b>0,04</b>	<b>8,73</b>	<b>3,13</b>	<b>5,56</b>	<b>4,48</b>	<b>3,75</b>	<b>1,34</b>	<b>0,00</b>	
	Standardabweichung	0,08	1,36	1,94	0,66	0,63	2,14	0,84	0,00	
Standardfehler	0,04	0,79	1,12	0,38	0,37	1,24	0,48	0,00		

Tabelle 19: Gesamtauswertung der kultivierungszyklusabhängigen Zelllänge und Breite

Zelllinie	Auswertung	Tag nach der Subkultivierung							
		1	2	3	4	5	6	7	
BY-2 GFP-NtKCH	<b>Mittelwert</b>	88,09	68,62	59,90	58,86	63,78	75,62	86,50	Durchschnittliche Zelllänge (in µm; n = 450)
	Standardabweichung	32,22	25,76	21,69	22,17	23,81	29,38	34,75	
	Standardfehler	1,52	1,21	1,02	1,05	1,12	1,39	1,64	
BY-2 Wildtyp	<b>Mittelwert</b>	75,59	61,44	44,53	50,53	55,99	70,68	79,51	
	Standardabweichung	29,63	22,99	16,85	17,63	22,45	24,02	27,95	
	Standardfehler	1,40	1,08	0,79	0,83	1,06	1,13	1,32	
BY-2 free-GFP	<b>Mittelwert</b>	78,52	54,55	46,12	54,10	56,26	70,35	77,12	
	Standardabweichung	29,12	21,17	15,49	19,08	17,20	21,88	25,51	
	Standardfehler	1,37	1,00	0,73	0,90	0,81	1,03	1,20	
BY-2 GFP-NtKCH	<b>Mittelwert</b>	34,35	33,06	30,63	33,40	29,87	29,78	32,56	Durchschnittliche Zellbreite (in µm; n = 450)
	Standardabweichung	8,17	10,03	8,03	12,75	8,11	7,33	9,09	
	Standardfehler	0,38	0,47	0,38	0,60	0,38	0,35	0,43	
BY-2 Wildtyp	<b>Mittelwert</b>	34,48	31,86	32,17	30,99	31,50	30,44	30,44	
	Standardabweichung	10,81	6,84	7,29	7,65	9,64	7,39	7,77	
	Standardfehler	0,51	0,32	0,34	0,36	0,45	0,35	0,37	
BY-2 free-GFP	<b>Mittelwert</b>	33,20	32,74	32,42	30,63	31,64	31,56	33,38	
	Standardabweichung	7,83	6,58	6,45	7,21	5,76	7,07	7,75	
	Standardfehler	0,37	0,31	0,30	0,34	0,27	0,33	0,37	

## 6. Sequenzvergleich zwischen NtKCH und TBK9

### 6.1. Aminosäuresequenz-Vergleich

		467	516
NtKCH	(467)	IFAYGQTGSGKTYTMTGPKNITEQSQGVNYRALGDLFLLAEQRKDTFHYD	
TBK9	(1)	IFAYGQTGSGKTYTMTGPKNITEQSQGVNYRALGDLFLLADQRKDTFHYD	
Consensus	(467)	IFAYGQTGSGKTYTMTGPKNITEQSQGVNYRALGDLFLLADQRKDTFHYD	
		517	566
NtKCH	(517)	VSVQMIEIYNEQVRDLLVSDGVNKRLEIRSASQGLTVPDASLVHVTSTCD	
TBK9	(51)	VSVQMIEIYNEQVRDLLVSDGVNKRLEIRSASQGLSVPDASLLRVTSTCD	
Consensus	(517)	VSVQMIEIYNEQVRDLLVSDGVNKRLEIRSASQGLSVPDASLL VTSTCD	
		567	616
NtKCH	(567)	VIDLMNLGQKNRSVGATALNDRSSRSHSCLTVRIQGRDLTSGAILRGCMH	
TBK9	(101)	VIDLMNLGQKNRSVGATALNDRSSRSHSCLTVHVQGRDLTSGAILRGCMH	
Consensus	(567)	VIDLMNLGQKNRSVGATALNDRSSRSHSCLTV IQGRDLTSGAILRGCMH	
		617	
NtKCH	(617)	LVDLAGS	
TBK9	(151)	LVDLAGS	
Consensus	(617)	LVDLAGS	

ähnliche/ gleiche Aminosäure

## 6.2. Nukleotidsequenz-Vergleich

		1399		1448
NtKCH	(1399)	ATTTT	TGCTTATGGCCAAACAGGATCAGGAAAAACCTAT	ACAATGACGGG
TBK9	(1)	ATATTC	GCATATGGACAAACAGGATCAGGAAAAACCTAC	ACAATGACGGG
Consensus	(1399)	AT TT GC	TATGG CAAACAGGATCAGGAAAAACCTA	ACAATGACGGG
		1449		1498
NtKCH	(1449)	GCCTAAGAATAT	CACAGAACAAAGTCAAGGAGTAAACTATAGGGCTTTAG	
TBK9	(51)	GCCTAAGAATAT	TACAGAACAAAGTCAAGGAGTAAACTATAGGGCTTTAG	
Consensus	(1449)	GCCTAAGAATAT	ACAGAACAAAGTCAAGGAGTAAACTATAGGGCTTTAG	
		1499		1548
NtKCH	(1499)	GCGATCTATTCCTTCTCGCAGAA	CAAAGAAAAGGATACCTTCCACTATGAT	
TBK9	(101)	GCGATCTATTCCTTCTCGCAGAT	CAAAGAAAAGGATACCTTCCACTATGAT	
Consensus	(1499)	GCGATCTATTCCTTCTCGCAGA	CAAAGAAA GATACCTTCCACTATGAT	
		1549		1598
NtKCH	(1549)	GTGTCTGTACAGATGATCGAGATATA	ACAATGAGCAAGTTAGGGATCTCCT	
TBK9	(151)	GTGTCTGTACAGATGATCGAGATATA	ACAATGAGCAAGTTAGGGATCTCCT	
Consensus	(1549)	GTGTCTGTACAGATGATCGAGATATA	ACAATGAGCAAGTTAGGGATCTCCT	
		1599		1648
NtKCH	(1599)	AGTTTCTGATGGTGTAACAAAAG	ATTAGAAATCCGTAGTGCTTCTCAAG	
TBK9	(201)	AGTTTCTGATGGTGTAACAAAAG	GTTAGAAATCCGTAGTGCTTCTCAAG	
Consensus	(1599)	AGTTTCTGATGGTGTAACAAAAG	TTAGAAATCCGTAGTGCTTCTCAAG	
		1649		1698
NtKCH	(1649)	GACTA	ACTGTACCAGATGCAAGCTTGTTTCATGTA	ACTTCAACTTGCGAC
TBK9	(251)	GATTA	AGTGTACCAGATGCAAGCTTGCTTCGTGTA	ACTTCAACTTGCGAC
Consensus	(1649)	GA TAA	TGTACCAGATGCAAGCTTG TTC TGTA	ACTTCAACTTGCGAC
		1699		1748
NtKCH	(1699)	GTTATTGATCTGATGAATTTGGGG	CAAAGAATCGTTCAGTGGGTGCAAC	
TBK9	(301)	GTTATTGATCTGATGAATCTAGGG	CAAAGAATCGTTCAGTGGGTGCGAC	
Consensus	(1699)	GTTATTGATCTGATGAAT T GGG	CAAAGAATCGTTCAGTGGGTGC AC	
		1749		1798
NtKCH	(1749)	AGCACTCAATGACCGCAGTAGCCGCTC	CACAGTTGCCTAACTGTTTCGTA	
TBK9	(351)	AGCACTCAACGACCGCAGTAGCCGCTC	TACAGTTGCCTAACTGTTTCATG	
Consensus	(1749)	AGCACTCAA GACCGCAGTAGCCGCTC	CACAGTTGCCTAACTGTT T	
		1799		1848
NtKCH	(1799)	TTCAGGGACGAGACTTGACTTCTGGAG	CTATTCTTCGTGGTTGTATGCAT	
TBK9	(401)	TTCAAGGACGAGACTTGACTTCTGGAG	CTATTCTTCGTGGTTGTATGCAT	
Consensus	(1799)	TTCA GGACGAGACTTGACTTCTGGAG	CTATTCTTCGTGGTTGTATGCAT	
		1849		1869
NtKCH	(1849)	TTGGTTGATCTTGCA	GGAAGT	
TBK9	(451)	TTGGTTGACCTTGCC	GGAAGC	
Consensus	(1849)	TTGGTTGA CTTGC	GGAAG	

gleiche Nukleotide