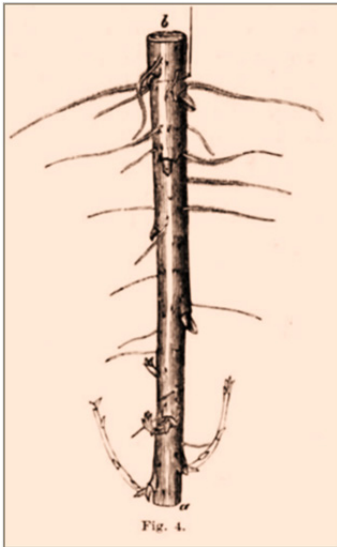
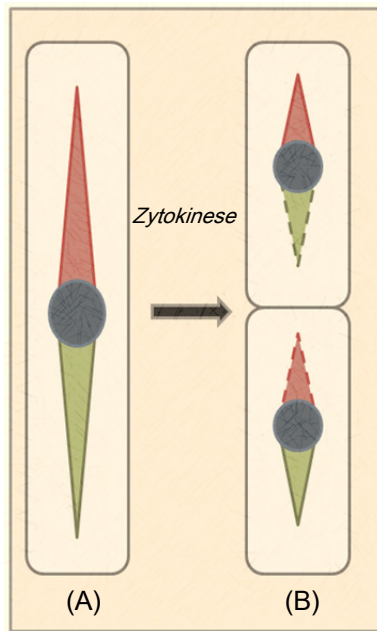

Abbildung 1-1 Weidenzweigversuch von H. Vöchting



Abgeschnittener Weidenzweig invertiert an einem Seil aufgehängt. (a) apikales Ende mit Knospen, (b) basales Ende mit Wurzeln.

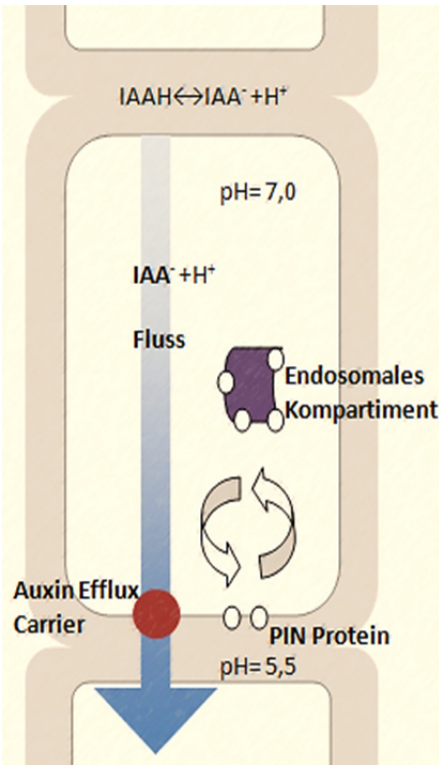
Mit diesem Versuch lieferte Vöchting den Beweis für Polarität in Pflanzengeweben. Die abgeschnittenen Weidenzweige haben alle die gleiche polare Regeneration, selbst wenn der Weidenzweig gedreht wird. Aus Vöchting (1878).

Abbildung 1-2 Zellpolarität - der „Kompass“, den jede Pflanzenzelle in sich trägt



Skizze einer Zelle, die sich nach der Zytokinese in zwei gleich große Tochterzellen teilt. Die dahinterstehende Frage ist, wie die Polarität an die Tochterzelle übertragen wird. Die Zelle selbst besitzt eine Polarität (durch einen Kompass dargestellt). Nach der Zellteilung (Pfeil) wird diese an die Tochterzellen (B) weitergegeben. Ein Zellpol wird von der Mutterzelle (A) vererbt, der andere muss neu gebildet werden (gestrichelte Linie).

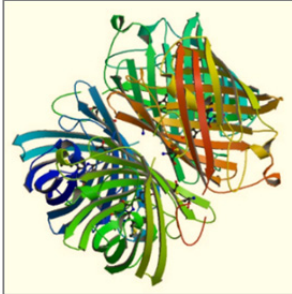
Abbildung 1-3 Polarer Auxintransport



An der Zellwand (grau) herrscht ein saures Milieu, dadurch nimmt Auxin (IAA^-) ein Proton (H^+) auf und wird neutral ($IAAH$). Das Molekül gelangt passiv, ohne Hilfe einer Ionenpumpe, durch die Plasmamembran (dunkelgrau) in die Zelle (weiß). Innerhalb der Zelle herrscht ein höherer pH-Wert ($pH=7$) als außerhalb ($pH=5,5$), wodurch das Molekül ionisiert wird (IAA^-). Die Plasmamembran ist für Ionen weniger durchlässig als für neutrale Moleküle. Durch die Ionenfalle kann das Auxin nicht wieder selbständig hinaus diffundieren. Auxin-Efflux-Carrier (als roter Kreis dargestellt) an der unteren Seite der Zelle sorgen für den Abtransport von Auxin. Es ist bekannt, dass die PIN Proteine (pin-formed proteins) ebenfalls am Abtransport beteiligt sind (Chen, 2000); sie zirkulieren zwischen Zytosol und Membran (Steinmann, 1999).

Der Auxinfluss ist durch einen blauen Pfeil dargestellt. Skizziert nach Maisch, 2007.

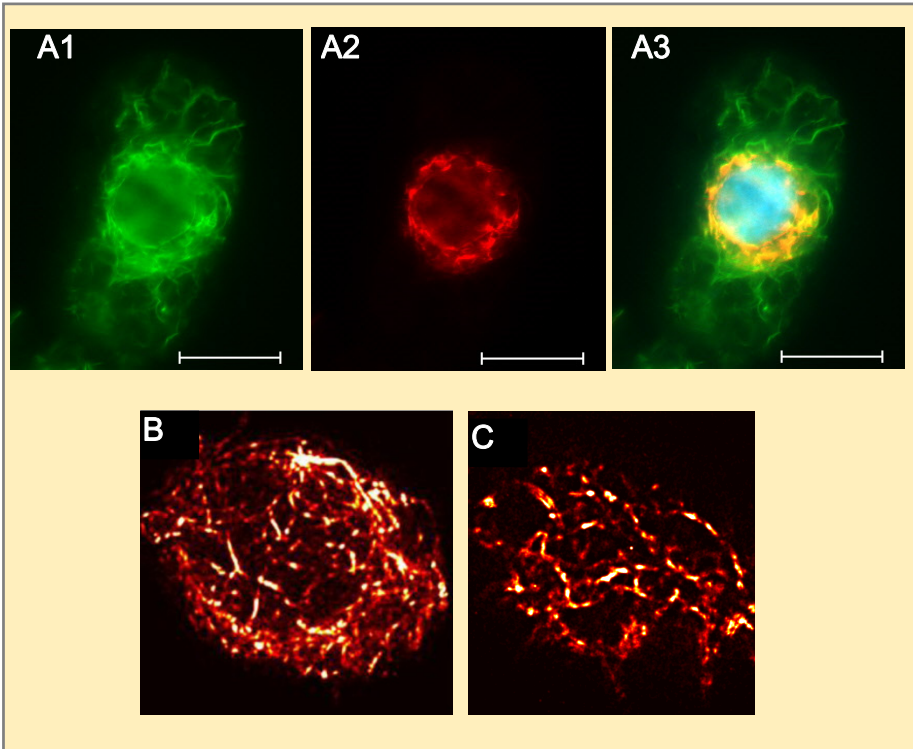
Abbildung 1-4 Das photoschaltbare rot-fluoreszierende Protein psRFP im „An“-Zustand



Durch Licht der Wellenlänge 561 nm macht das Tetramer eine Konformationsänderung von trans- zur cis-Konformation durch. Die Auflösung beträgt 1,8 Å.

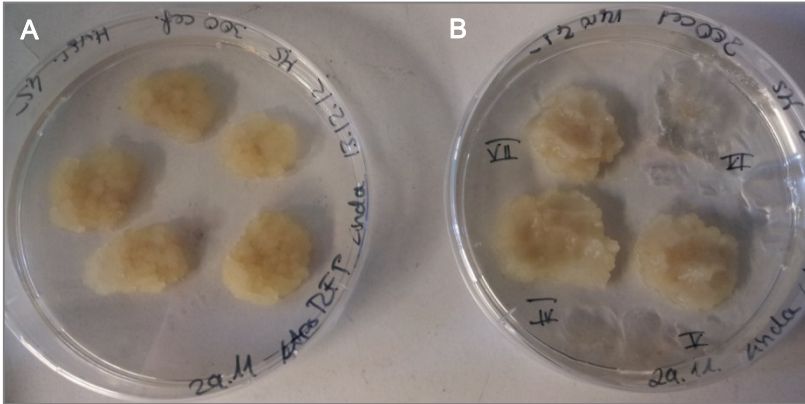
Aus RCSB Protein Data Bank, mit Jmol von EMBL betrachtet (3CFF, <http://www.rcsb.org/pdb/>, November, 2013).

Abbildung 1-5 Visualisierung der Aktinfilamente von BY-2 Lifeact::psRFP Zellen durch stabil exprimiertes Lifeact::psRFP bzw. Alexa Fluor[®] 488 Phalloidin



(A1)-(A3) Lifeact::psRFP Zelle; grüner Kanal: Alexa Fluor[®] 488 Phalloidin (A1); roter Kanal: Lifeact::psRFP (A2); (A3) Überlagerung von (A1) und (A2), das gelbe Signal kennzeichnet die Kolokalisation. Maßstabsbalken: 20 µm. (B) und (C) Hochauflösende PALM (photoactivated localization microscopy) Bildprojektion des *nuclear baskets* von BY-2 Lifeact::psRFP Zellen. Das feine Aktinnetzwerk ist y-förmig verzweigt und ausschließlich nur um den Kern zu beobachten. Maßstabsbalken in (B): 3 µm, in (C): 2 µm. Aus Durst *et al.*, 2014.

Abbildung 2-1 Kalli der transgenen Tabakkultur Lifeact::psRFP kultiviert auf MS-Platten (0,8 % Agar)

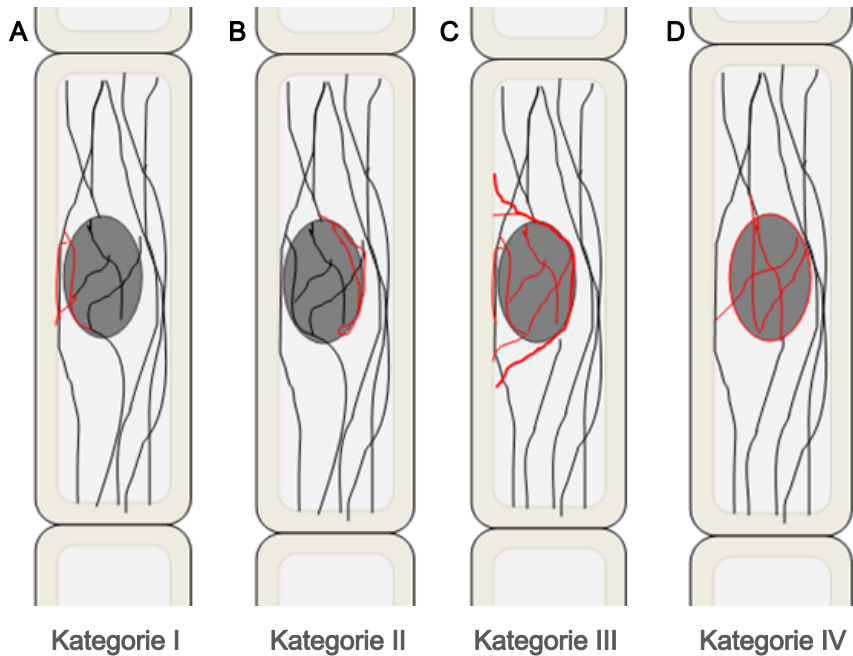


(A) 18 Tage alte Kalli, die noch zu klein sind, um in Flüssigmedium anzuwachsen. (B) 25 Tage alte Kalli, deren Oberfläche teilweise mit einem Spatel abgekratzt (IV, V, VII) oder die gänzlich zur Subkultivierung entfernt wurden (VI).

Tabelle 2-1 Übersicht der verwendeten Hemmstoffe

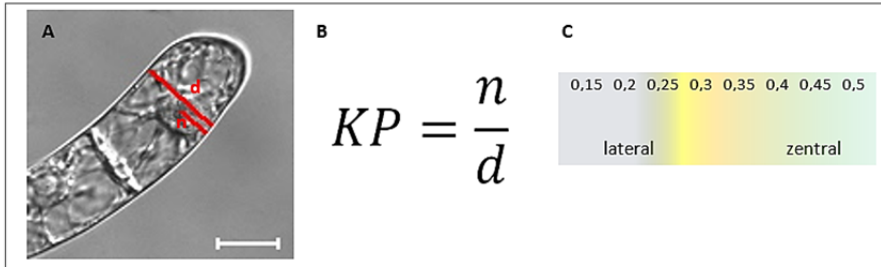
Hemmstoff- gruppe	Hemmstoff	Konzentration	Stammlösung
1			
Auxine und Phytotropine	1-Naphtyl- essigsäure (NAA)	10 μ M	10 mg/ml in 70 % Ethanol
	2,4-Dichlor- phenoxy- essigsäure (2,4-D)	10 μ M	10 mg/ml in 70 % EtOH
	Indol-3-Essigsäure (IAA)	10 μ M	100 mM in 70 % EtOH
	2,3,5- Trijodbenzoesäure (TIBA)	10 μ M	10 mM in DMSO
	1-N-Naphthyl- Phthalamidsäure (NPA)	10 μ M	10 mM in DMSO
2	Phalloidin	1 μ M	1 mM in 96 % (v/v) EtOH
3	2,3- Butandionmono- xim (BDM)	2,5 mM	0,5 M in d H ₂ O
Myosin- inhibitoren	Blebbistatin	20 μ M	10 mM in DMSO

Abbildung 2-2 Kategorisierung der verschiedenen Signalpositionen



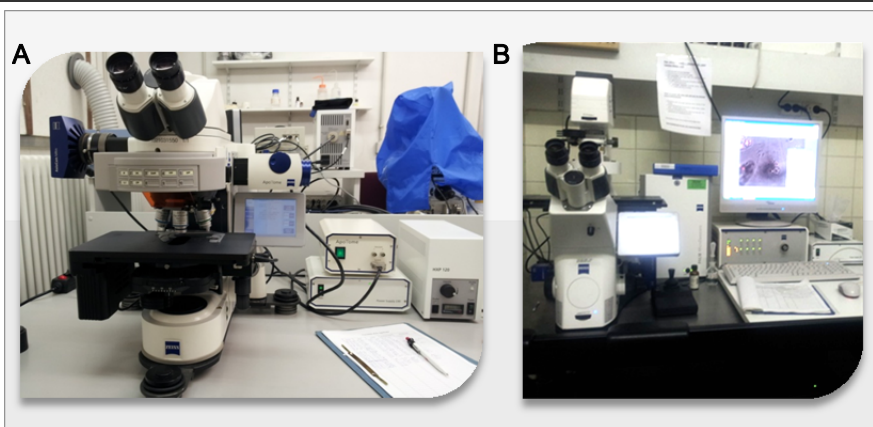
Von links nach rechts sind die vier Kategorien der unterschiedlichen Signalpositionen schematisch dargestellt. In rot (grau) ist das markierte Aktin zu sehen, der Kern ist oval in schwarz dargestellt.

Abbildung 2-3 Bestimmung der Kernposition nach Frey *et al.* (2010)



(A) Messung der Zellbreite (d) und des Abstands von der Zellwand bis zum Kernmittelpunkt (n). (B) Formel zur Errechnung der Kernposition (KP). (C) Kategorisierung der Kernposition. Maßstabsbalken: 20 μm .

Abbildung 2-4 Verwendete Mikroskope



(A) Axiomager.Z1 zur Untersuchung der Transformanten. (B) AxioObserver.Z1 für Langzeitaufnahmen.

Abbildung 3-1 Kategorisierung in vier unterschiedliche Lifeact::psRFP Signalpositionen

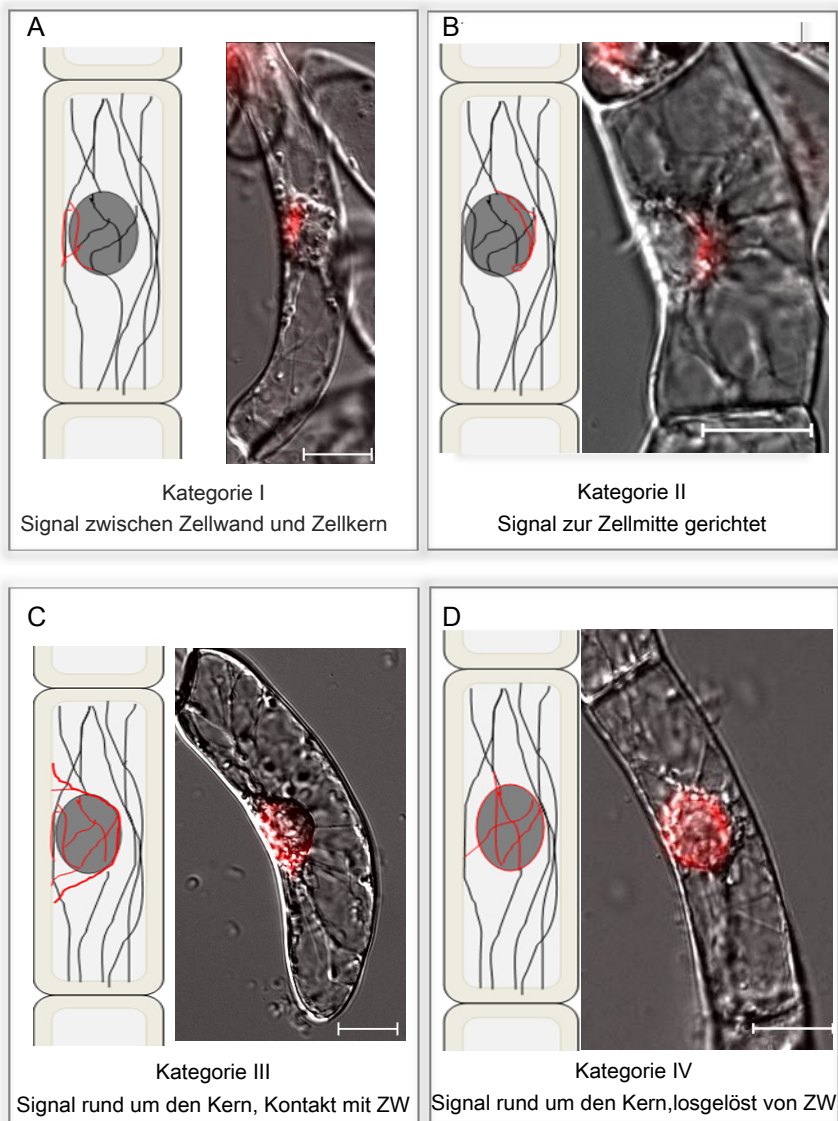
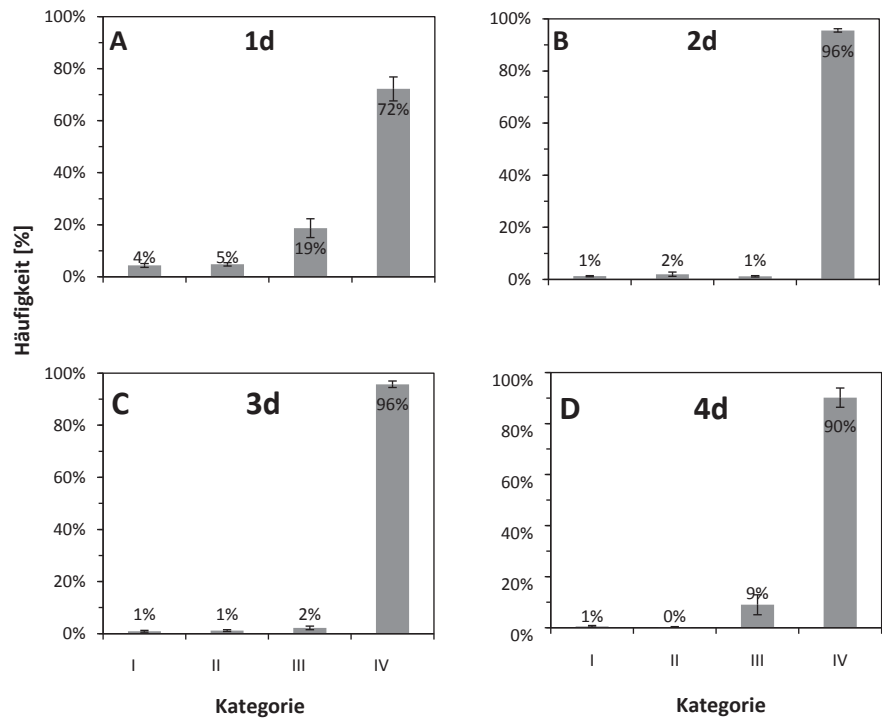
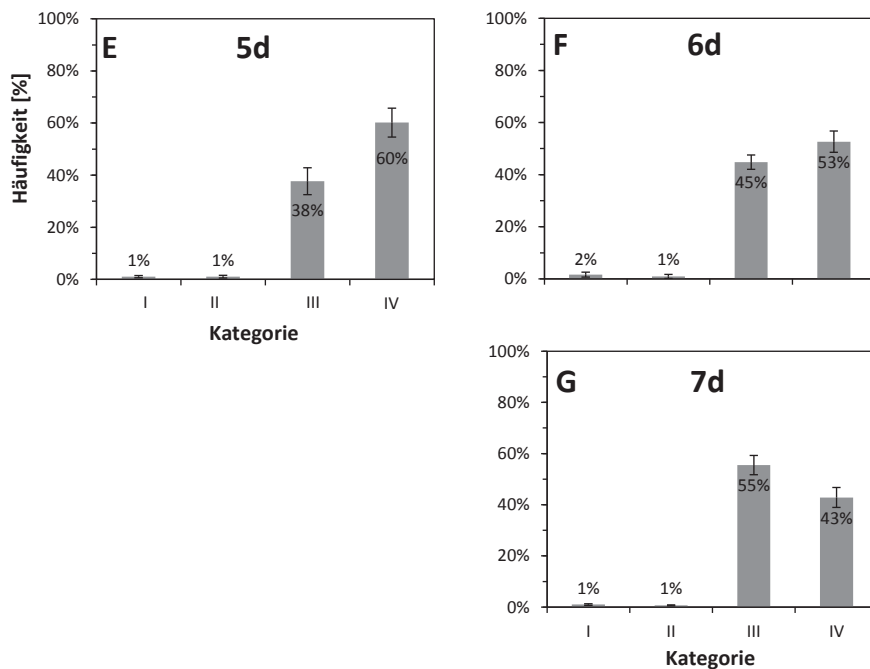


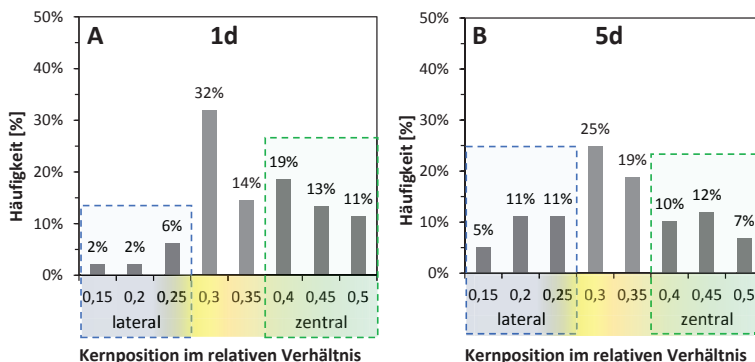
Abbildung 3-2 Auswertung der Signalpositionen der transgenen Tabakzelllinie BY-2 Lifeact::psRFP





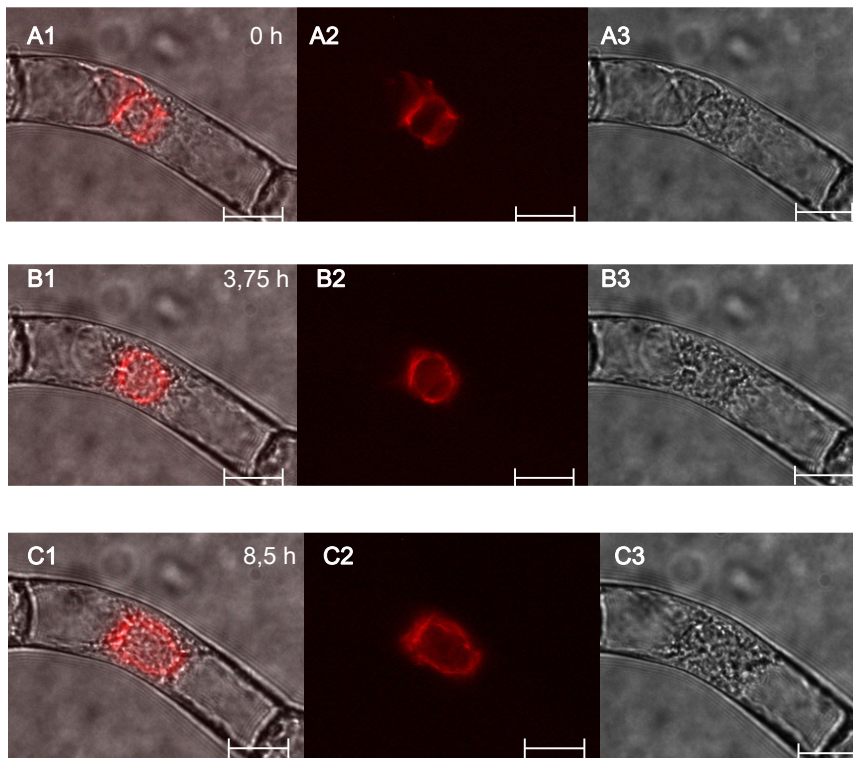
(A) Signalpositionen an Tag 1, (B) an Tag 2, (C) Tag 3, (D) Tag 4, (E) Tag 5, (F) Tag 6, (G) Tag 7 im Kulturzyklus. Die x-Achse stellt die vier Kategorien dar, die y-Achse zeigt, wie häufig die jeweilige Kategorie auftritt. Es wurden insgesamt 2000 Zellen pro Tag ausgewertet. Der Standardfehler ergibt sich aus vier unabhängige experimentelle Serien.

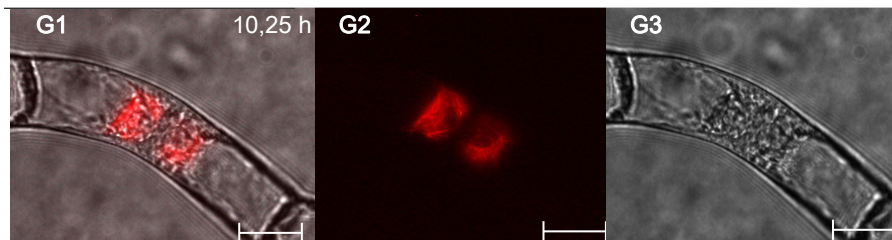
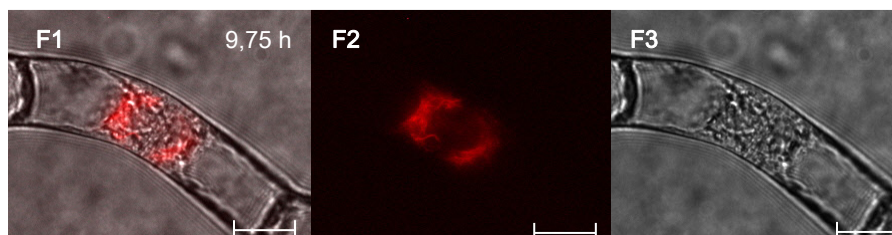
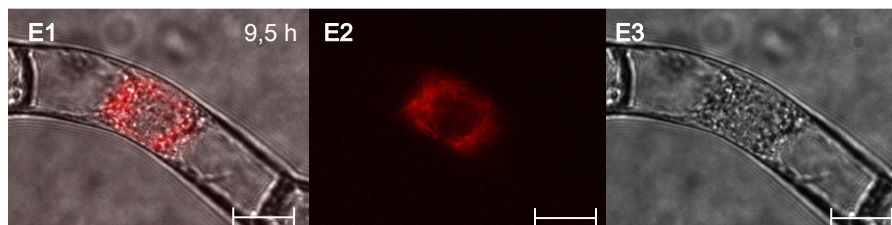
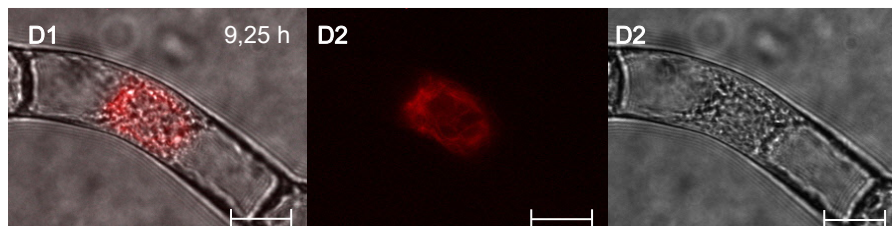
Abbildung 3-3 Auswertung der Kernpositionen der transgenen Tabakzelllinie BY-2 Lifeact::psRFP

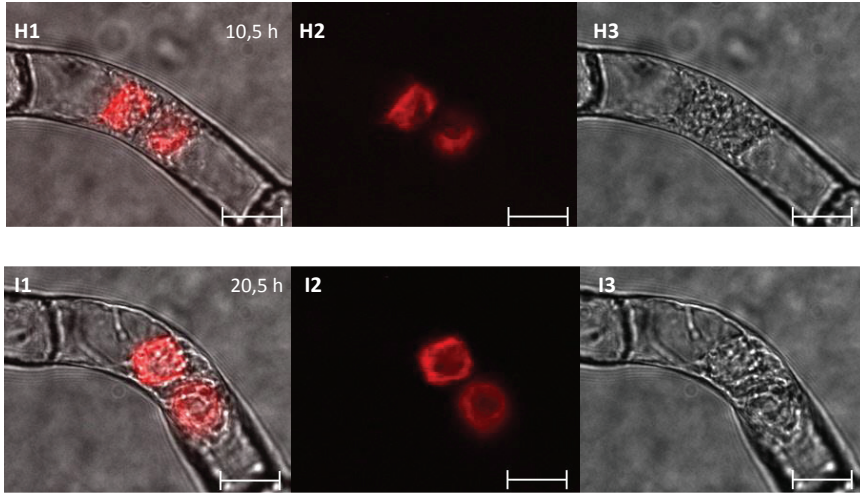


(A) Kernposition (KP) an Tag 1. (B) KP an Tag 5. Die x-Achse zeigt die Klassen von 0,15 bis 0,5 an und damit die Lage des Kerns in Bezug zur Zellwand. Die y-Achse zeigt, wie häufig die jeweilige Klasse auftritt. Bei einem Verhältnis von 0,4-0,5 liegt der Kern zentral (grün (hellgrau) hinterlegt), bei Werten 0,15-0,25 lateral (blau (dunkelgrau) hinterlegt), bei den Werten von 0,3-0,35 liegt der Kern weder zentral und lateral (gelb (hellgrau)) (siehe 2.4.2, S. 22).

Abbildung 3-4 Reorientierung des perinukleären Aktinnetzwerks während der Zellteilung

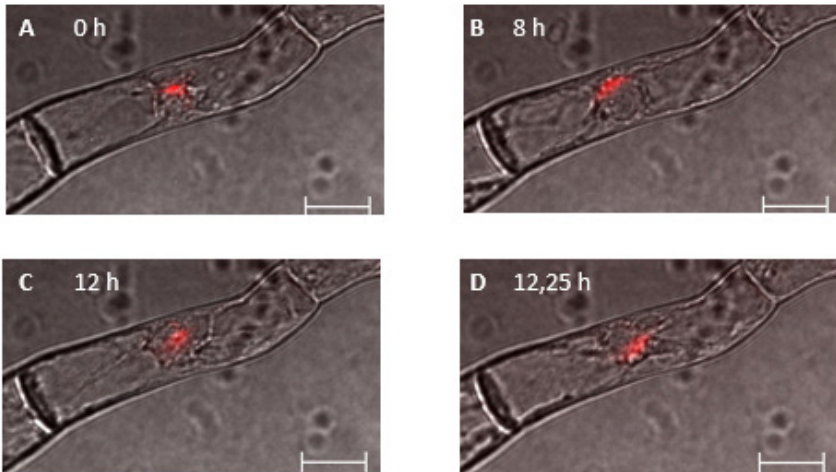






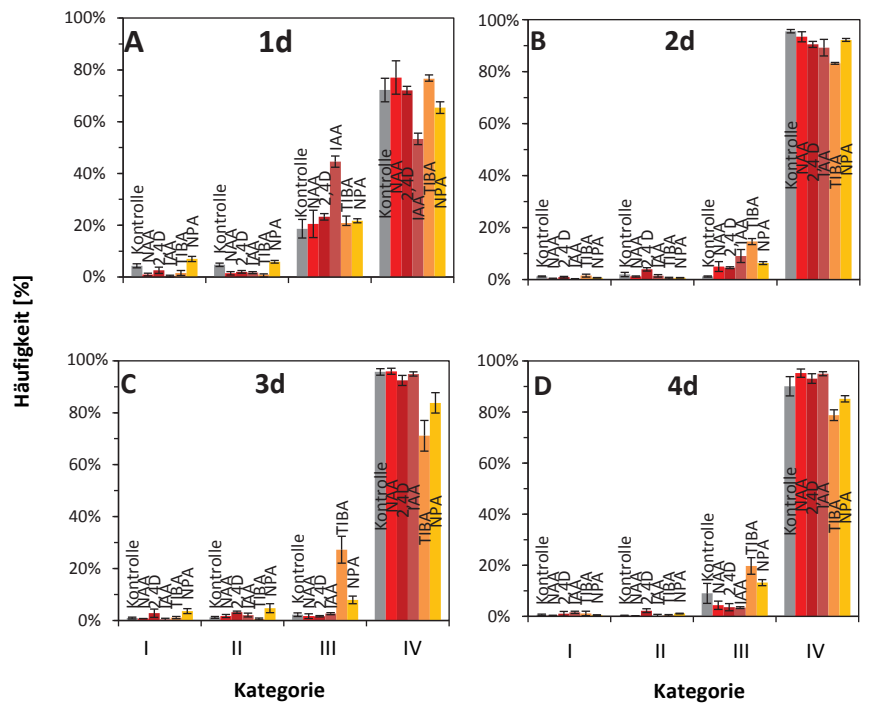
(A-I) Aufnahmen einer Zelle während der Zellteilung an neun unterschiedlichen Zeitpunkten: (A) 0 h, (B) 3,75 h, (C) 8,5 h, (D), 9,25 h, (E) 9,5 h, (F) 9,75 h, (G) 10,25 h, (H) 10,5 h, (I) 20,5 h. Von links nach rechts sind die verschiedenen Kanäle zu sehen: (A1-I1) Überlagerung des DIC-Kanals mit dem roten Kanal, (A2-I2) roter das psRFP-Signal detektierender Kanal, (A3-I3) Aufnahme mit dem DIC Modul. In (E2) weisen die Pfeile auf eine Art „Sollbruchstelle“ im *nuclear basket* hin. Maßstabsbalken: 20 μm .

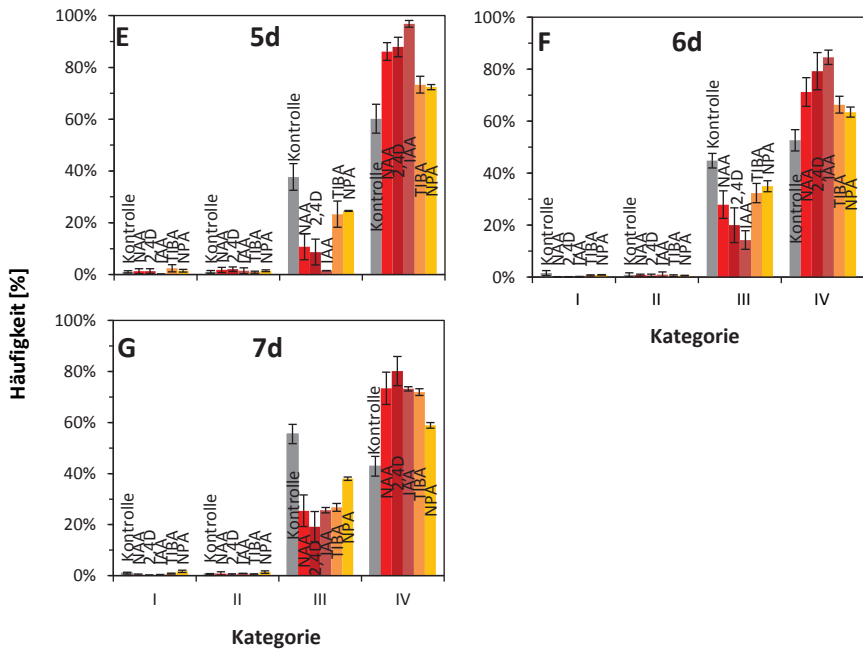
Abbildung 3-5 Fixe Position des markierten perinukleären Aktinnetzwerks in einer G0-Phasenzelle



Aufnahmen einer Zelle an vier unterschiedlichen Zeitpunkten: (A) 0 h, (B) 8 h, (C) 12 h, (D) 12,25 h. Die Aufnahmen zeigen eine Überlagerung des DIC Kanals mit dem roten Kanal zur Detektion des roten psRFP-Signals. Maßstabsbalken: 20 μm .

Abbildung 3-6 Auswertung der Signalpositionen nach Zugabe von jeweils 10 μM Auxinen und Phytotropinen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

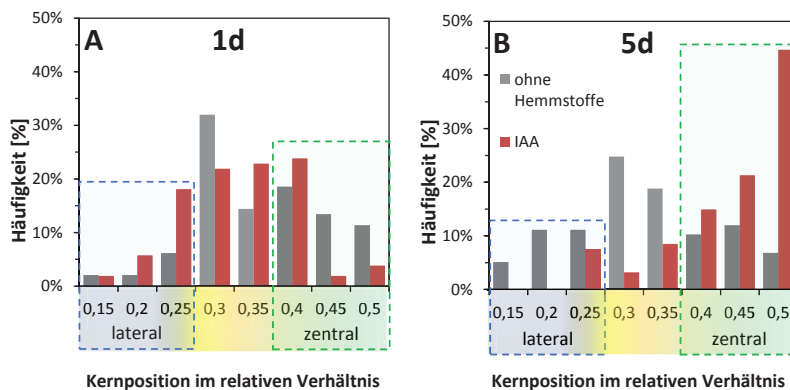




(A) Signalpositionen an Tag 1, (B) an Tag 2, (C) Tag 3, (D) Tag 4, (E) Tag 5, (F) Tag 6, (G) Tag 7 im Kulturzyklus. Die x-Achse stellt die vier Kategorien dar. Die y-Achse zeigt, wie häufig die jeweilige Kategorie auftritt. Es wurden insgesamt 1500 Zellen pro Tag ausgewertet. Der Standardfehler ergibt sich aus drei unabhängige experimentelle Serien.

Referenzwert ohne Hemmstoffe (Kontrolle): grauer Balken, Hemmstoffe von links nach rechts: NAA (hellrot), 2,4-D (dunkelrot), IAA (bordeauxrot), TIBA (orange), NPA (gelb).

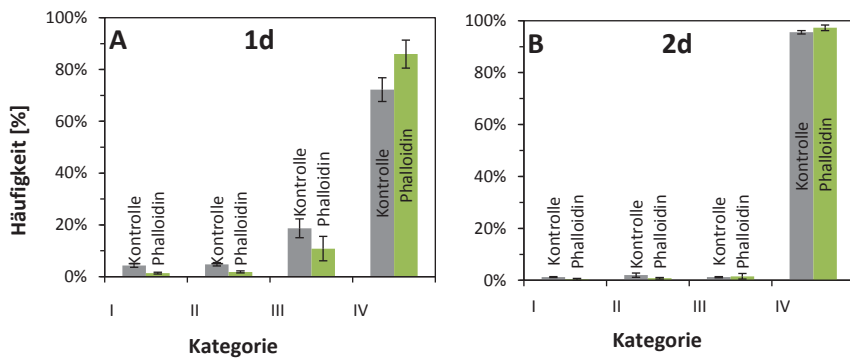
Abbildung 3-7 Auswertung der Kernpositionen nach Zugabe von 10 μM Indol-3-Essigsäure (IAA) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

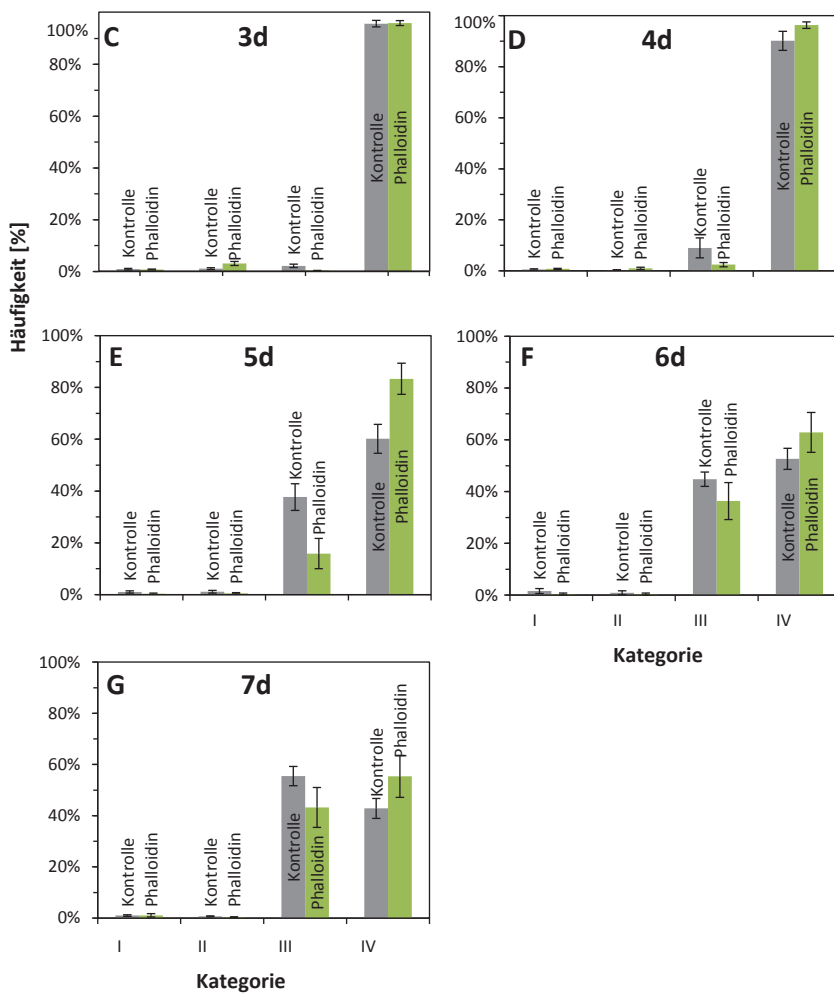


(A) KP an Tag 1, (B) KP an Tag 5 im Kulturzyklus. Die x-Achse zeigt die Klassen von 0,15 bis 0,5 und damit die Lage des Kerns in Bezug zur Zellwand. Die y-Achse zeigt, wie häufig die jeweilige Klasse auftritt. Es wurden insgesamt 100 Zellen pro Tag ausgewertet. Zentrale Lage des Kerns: Feld grün (hellgrau) hinterlegt, laterale Lage: blau (dunkelgrau) hinterlegt.

Referenzwert ohne Hemmstoffe: (hell)grauer Balken, KP nach Zugabe von IAA: bordeauxroter (dunkelgrauer) Balken.

Abbildung 3-8 Auswertung der Signalpositionen nach Zugabe von 1 μM Phalloidin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

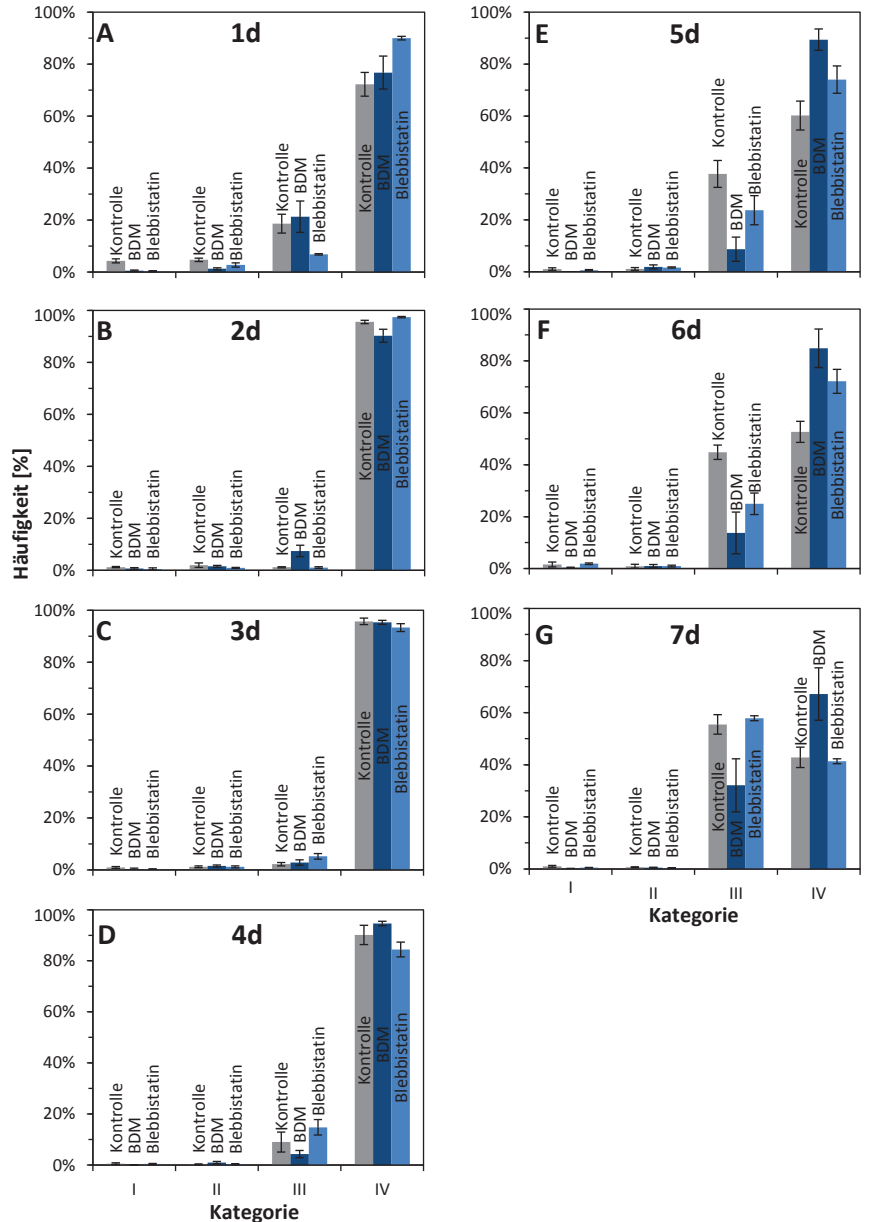




(A) Signalpositionen an Tag 1, (B) an Tag 2, (C) Tag 3, (D) Tag 4, (E) Tag 5, (F) Tag 6, (G) Tag 7 im Kulturzyklus. Die x-Achse stellt die vier Kategorien dar. Die y-Achse zeigt, wie häufig die jeweilige Kategorie auftritt. Es wurden insgesamt 1500 Zellen pro Tag ausgewertet. Der Standardfehler ergibt sich aus drei unabhängige experimentelle Serien.

Referenzwert ohne Hemmstoffe (Kontrolle): (dunkel) grauer Balken, Werte nach Phalloidinzugabe: grüner (hellgrauer) Balken.

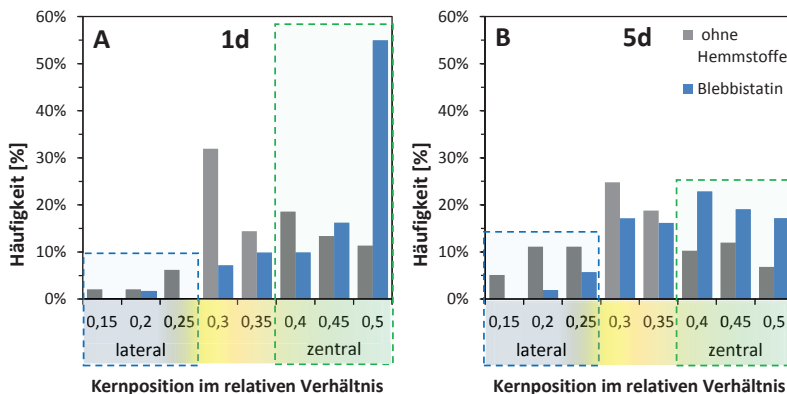
Abbildung 3-10 Auswertung der Signalpositionen nach Zugabe von 2,5 mM BDM bzw. 20 µM Blebbistatin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle



(A) Signalpositionen an Tag 1, (B) an Tag 2, (C) Tag 3, (D) Tag 4, (E) Tag 5, (F) Tag 6, (G) Tag 7 im Kulturzyklus. Die x-Achse stellt die vier Kategorien dar. Die y-Achse zeigt, wie häufig die jeweilige Kategorie auftritt. Es wurden insgesamt 1500 Zellen pro Tag ausgewertet. Der Standardfehler ergibt sich durch drei unabhängige experimentelle Serien.

Referenzwert ohne Hemmstoffe (Kontrolle): grauer Balken, BDM: dunkelblaue (dunkelgraue) Balken, Blebbistatin: hellblauer (hellgrauer) Balken

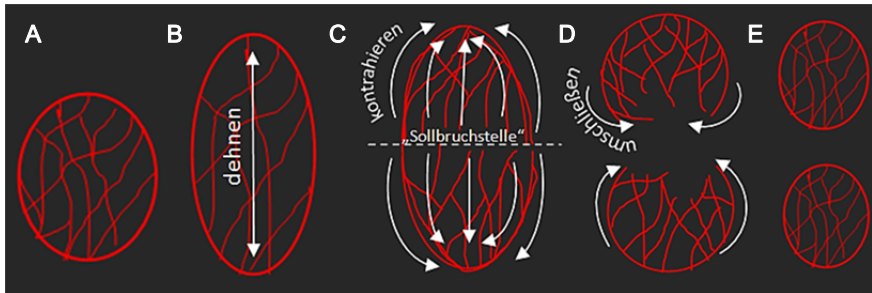
Abbildung 3-11 Auswertung der Kernpositionen nach Zugabe von 20 μM Blebbistatin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle



(A) KP an Tag 1, (B) KP an Tag 5 im Kulturzyklus. Die x-Achse zeigt die Klassen von 0,15 bis 0,5 an und damit die Lage des Kerns in Bezug zur Zellwand. Die y-Achse zeigt, wie häufig die jeweilige Klasse auftritt. Es wurden insgesamt 100 Zellen pro Tag ausgewertet. Zentrale Lage des Kerns: Feld grün hinterlegt, laterale Lage: blau hinterlegt.

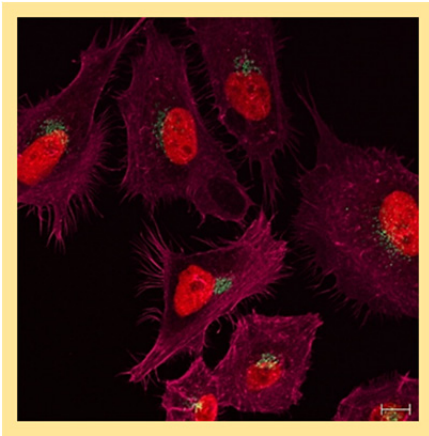
Referenzwert: (hell) grauer Balken, Blebbistatin: blauer (dunkelgrauer) Balken.

Abbildung 4-1 Reorientierung des perinukleären Aktinnetzwerks, welches ein *nuclear basket* formt



Nuclear basket vor (A-B), während (C-D) und nach (E) der Zellteilung. Die weißen Pfeile verdeutlichen die Reorientierung des Netzwerks.

Abbildung 4-2 Visualisierung der Lamina in transgenen HeLa LaminA GFP Zellen



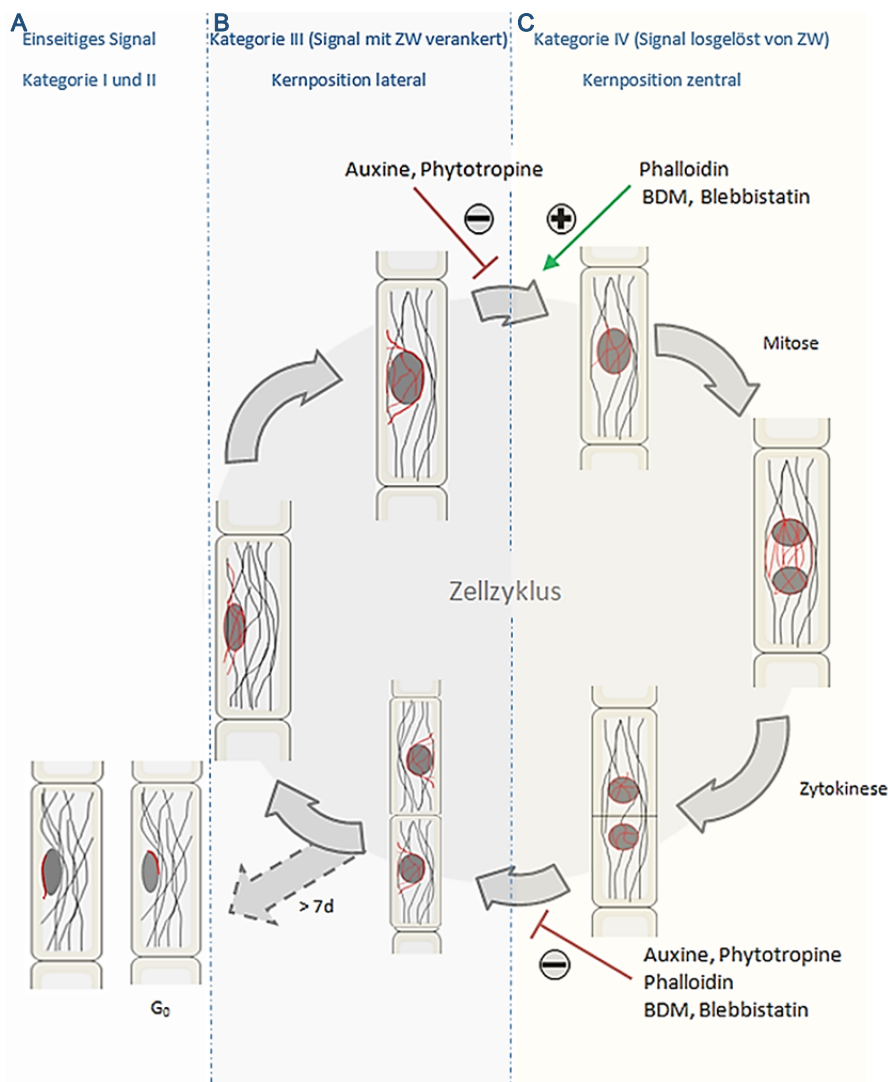
Antikörperfärbung von Lamin A: Rabbit anti-LaminA/C (primärer AK) und Anti-Rabbit mit Cy3 (sekundärer AK), rot (hellgrau).

Aktinfilamente: Phalloidin AlexaFluor® 647, bordeauxrot (dunkelgrau). Golgi Apparat: Mouse anti-GM130 (primärer AK) Anti-Mouse mit AlexaFluor® 488 (sekundärer AK), grün (weiß).

Maßstabsbalken: 10 µm.

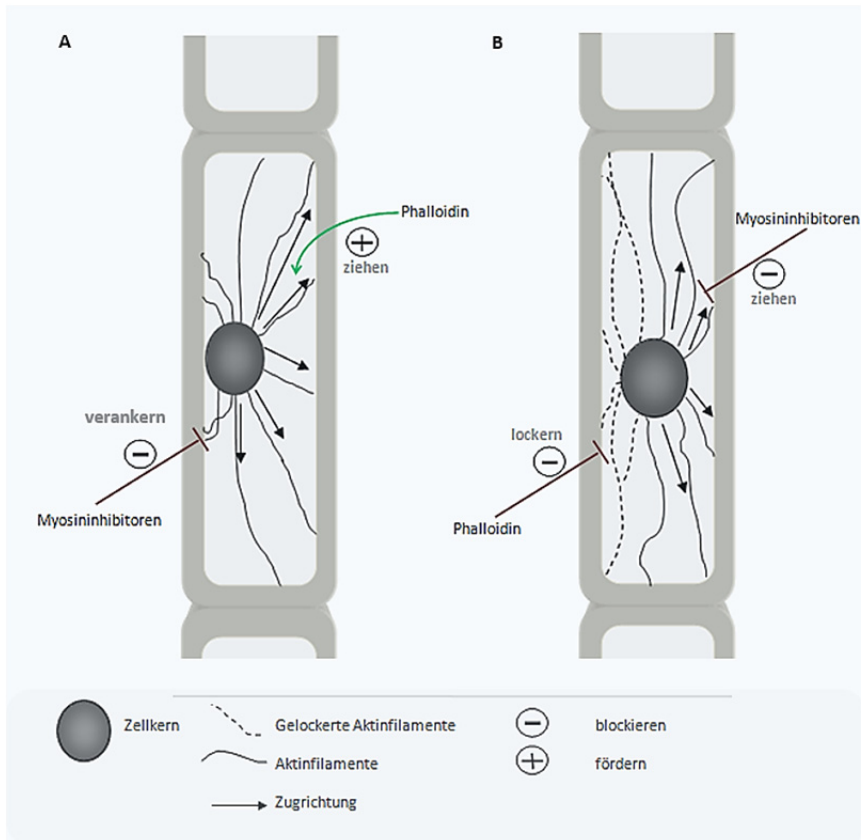
Aufgenommen am Zoologisches Institut, Abteilung Zell- und Neurobiologie, KIT, Modul 5208 F2, 2012.

Abbildung 4-3 Effekte der Hemmstoffe auf die Lage des *nuclear baskets* während des Zellzyklus von BY-2 Lifeact::psRFP Zellen



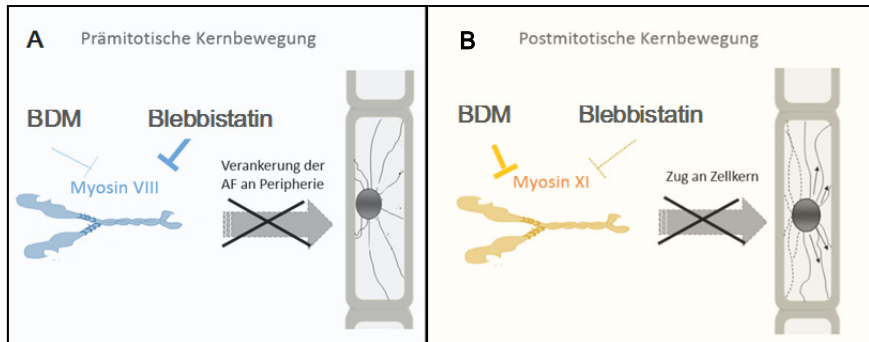
Nukleus: dunkelgrau, Aktinnetzwerk: schwarz, durch Lifeact::psRFP markiertes perinukleäres Aktinnetzwerk: rot (grau), wobei dessen Lage in Kategorie (A) einseitiger Signalposition, (B) Signal mit Zellwand (ZW) verankert, (C) Signal losgelöst von Zellwand unterteilt werden kann. Pluszeichen: Übergang wird durch Zugabe des jeweiligen Hemmstoffs gefördert, Minuszeichen: Übergang wird durch Zugabe des Hemmstoffs verzögert.

Abbildung 4-4 Effekte von Phalloidin und Myosininhibitoren auf die prä- und postmitotische Kernbewegung



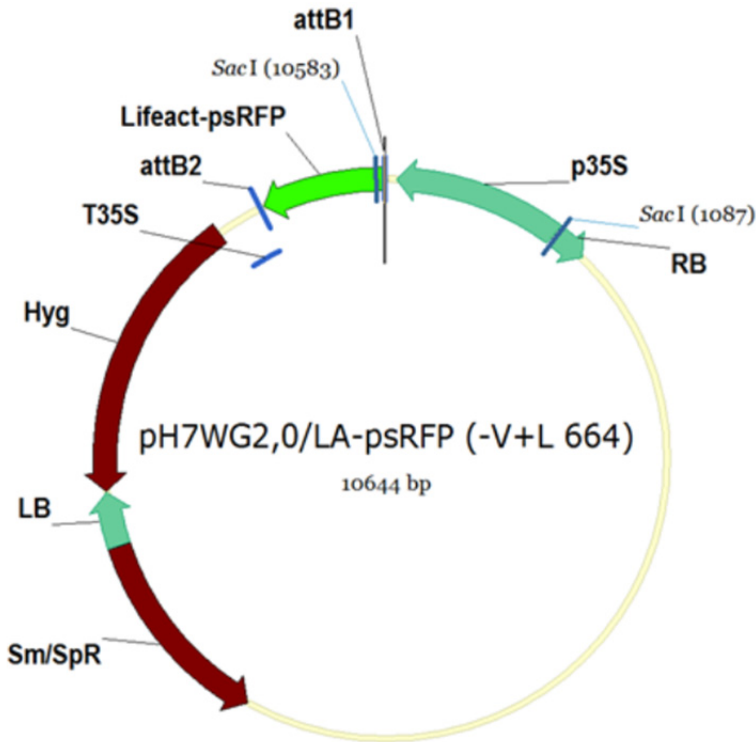
(A) Zellkern wird von der Peripherie zur Zellmitte bewegt, (B) Zellkern wird aus Zentrum an den Zellrand bewegt. Der Kern (dunkelgrau) ist an Aktinfilamenten (schwarz) aufgehängt. Hemmstoffe (Phalloidin und Myosininhibitoren) greifen in die aktinvermittelte Kernbewegung ein, indem sie hemmend (rot, minuszeichen) oder fördernd (grün, pluszeichen) auf einer Seite innerhalb der Zelle wirken.

Abbildung 4-5 Unterschiedliche Effekte von BDM und Blebbistatin auf die prä- und postmitotische Kernbewegung



(A) Wirkung der Myosininhibitoren während der prämitotischen Kernbewegung auf Myosin VIII, welches für die Verankerung der Aktinfilamente (AF) verantwortlich ist. (B) Wirkung der Myosininhibitoren während der postmitotischen Kernbewegung auf Myosin XI, welches für den Zug am Zellkern verantwortlich ist. Dicker Pfeil: starke Hemmung durch BDM oder Blebbistatin; dünner Pfeil: schwache Hemmung.

Abbildung 6-1 pH7WG2 LA-psRFP Vektor



Zunächst wurde die Sequenz der codierenden Gene über PCR mithilfe von oligonukleotide Primer mit Gatewayspezifischen Flanken (attB1-Lifeact-pa-RP) amplifiziert. Anschließend wurde die Genregion in den binären Vector pH7WG2 (Karami *et al.*, 2002) gebracht (Durst, 2012).

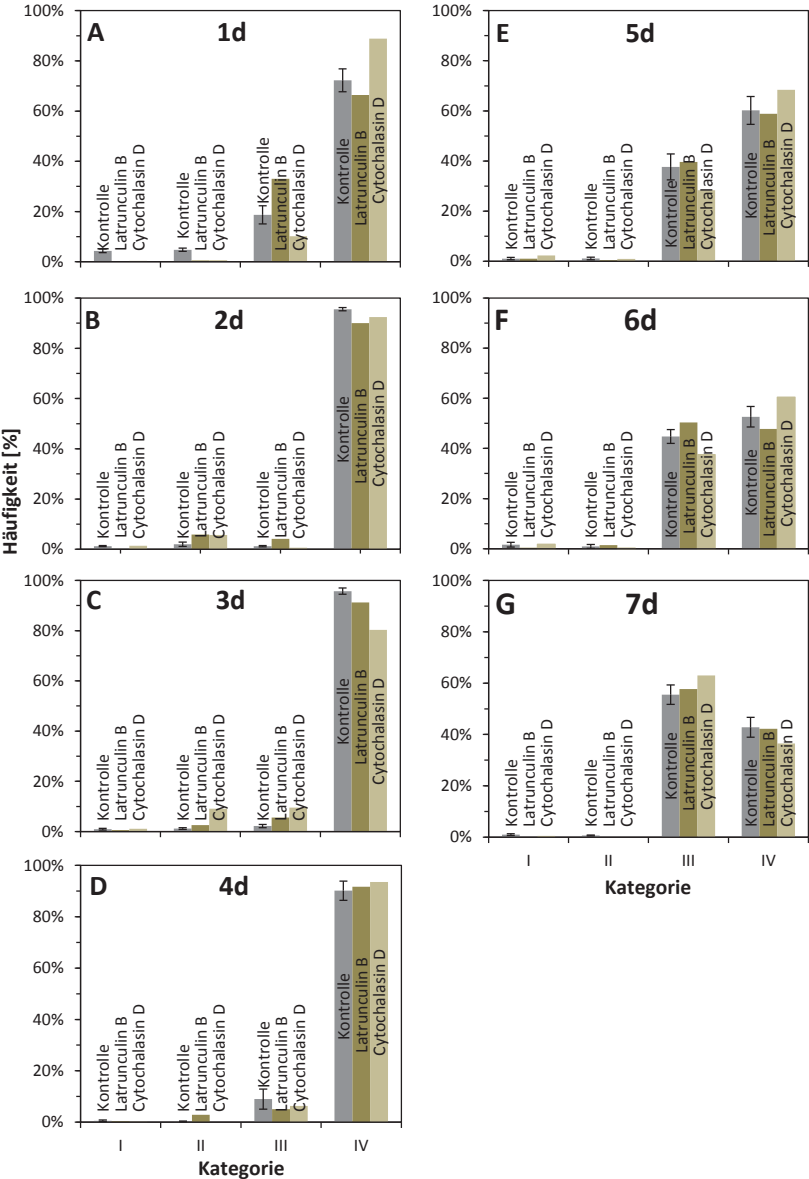
H: Hygromycinresistenz in der Pflanze, 7: t35S Terminator, WG: attR2, ccdB, attR1 Orientierung, 2: p35S Promotor

Tabelle 6-1 Übersicht der weiteren Hemmstoffe

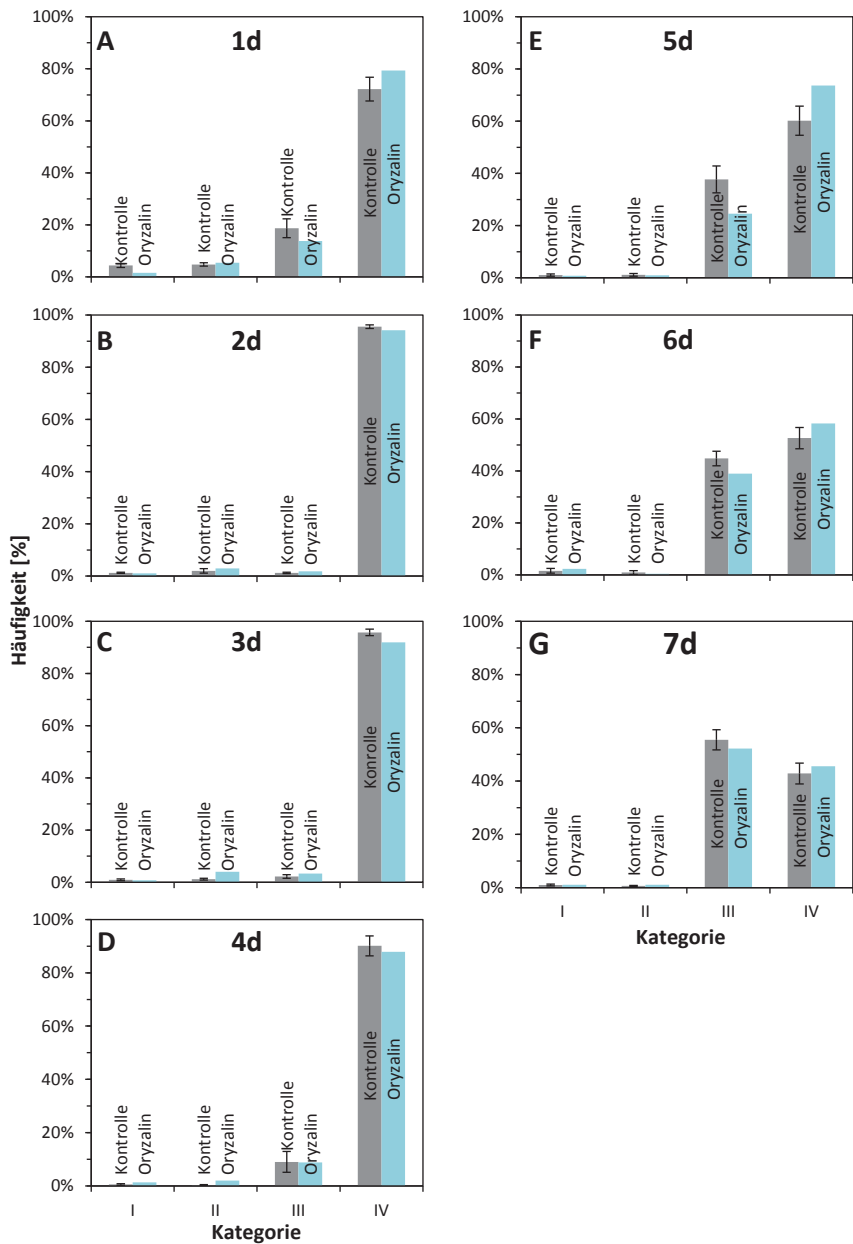
Hemmstoff- gruppe	Hemmstoff	Konzentration	Stamm- lösung
Zu 2	 Latrunculin B (LatB)	75 nM	2,5 mM in 96 % (v/v) EtOH
Aktindynamik	 Cytochalasin D (CytD)	1 µM	20 mM in DMSO
4 Mikrotubuli- hemmstoffe	 Oryzalin	50 nM	1 mM in DMSO
5	 Caffein	250 µM	50 nM in Me- thanol
Zellteilungs- inhibitoren	 Pertussistoxin (PTX)	5 ng/ml	1 µg/ ml in DMSO
	 2-Butanol	0,05 %	9,99 %

Abbildung 6-2 Auswertung der Signalpositionen weiterer Hemmstoffe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

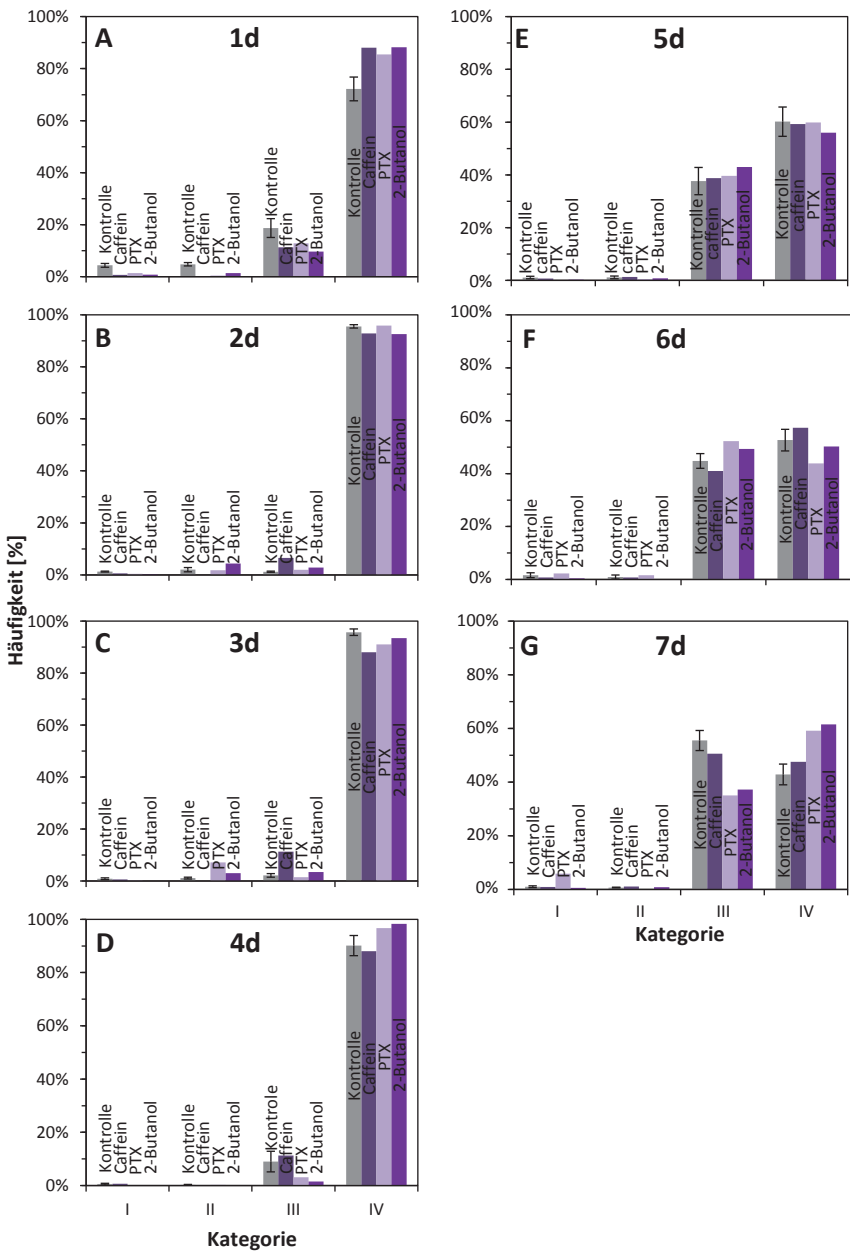
6.2 a) Hemmstoffe Aktindynamik



6.2 b) Hemmstoffe Mikrotubuli



6.2 c) Hemmstoffe Zellteilung



6.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

1-1	Weidenzweigversuch von H. Vöchting.....	2
1-2	Zellpolarität- der „Kompass“ den jede Pflanzenzelle in sich trägt.....	3
1-3	Polarer Auxintransport.....	8
1-4	Das photoschaltbare rot-fluoreszierende Protein psRFP im „An“-Zustand	11
1-5	Visualisierung der Aktinfilamente von BY-2 Lifeact::psRFP Zellen durch stabil exprimiertes Lifeact::psRFP bzw. AlexaFluor ® 488 Phalloidin	12
2-1	Kalli der transgenen Tabakkultur Lifeact::psRFP kultiviert auf MS-Platten (0,8 % Agar)	18
2-2	Kategorisierung der verschiedenen Signalpositionen.....	21
2-3	Bestimmung der Kernposition nach Frey et al.(2010)	22
2-4	Verwendete Mikroskope	23
3-1	Kategorisierung in vier unterschiedliche Lifeact::psRFP Signalpositionen	29
3-2	Auswertung der Signalpositionen der transgenen Tabakzelllinie BY-2 Lifeact::psRFP	31
3-3	Auswertung der Kernpositionen der transgenen Tabakzelllinie BY-2 Lifeact::psRFP	34
3-4	Reorientierung des perinukleären Aktinnetzwerks während der Zellteilung	36
3-5	Fixe Position des markierten perinukleären Aktinnetzwerks in einer G0-Phasenzelle.....	39
3-6	Auswertung der Signalpositionen nach Zugabe von jeweils 10 µM Auxinen und Phytotropinen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle	44

3-7	Auswertung der Kernpositionen nach Zugabe von 10 μ M Indol-3-Essigsäure (IAA) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.....	46
3-8	Auswertung der Signalpositionen nach Zugabe von 1 μ M Phalloidin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle	49
3-9	Auswertung der Kernpositionen nach Zugabe von 1 μ M Phalloidin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle	52
3-10	Auswertung der Signalpositionen nach Zugabe von 2,5 mM BDM bzw. 20 μ M Blebbistatin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle	56
3-11	Auswertung der Kernpositionen nach Zugabe von 20 μ M Blebbistatin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle	58
4-1	Reorientierung des perinukleären Aktinnetzwerks	66
4-2	Visualisierung der Lamina in transgenen HeLa LaminA GFP Zellen.....	68
4-3	Effekte der Hemmstoffe auf die Lage des nuclear baskets während des Zellzyklus von BY-2 Lifeact::psRFP Zellen	71
4-4	Effekte von Phalloidin und Myosininhibitoren auf die prä- und postmitotische Kernbewegung.....	75
4-5	Unterschiedliche Effekte von BDM und Blebbistatin auf die prä- und postmitotische Kernbewegung.....	77
6-1	pH7WG2 LA-psRFP Vektor	90
6-2	Auswertung der Signalpositionen weiterer Hemmstoffe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.....	93

Tabellen

2-1	Übersicht der verwendeten Hemmstoffe	19
6-1	Übersicht der weiteren Hemmstoffe	91

Die Aufprägung und Vererbung der Zellpolarität
Analyse der Kernmigration anhand der Aufdeckung
eines Kernkorbs aus Aktinfilamenten

Brochhausen, L.

2015, XVIII, 97 S. 27 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-658-08179-9