Identifizierung der interagierenden Kompartimente der Klasse–XI–Myosine von *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Daniela Rödel

geboren am 30.10.1982 in Leipzig

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen

2. Prof. Dr. Bettina Hause

3. PD Dr. Frantisek Baluska

Halle (Saale), 09.06.2015

„Der Gelehrte studiert die Natur nicht, weil das etwas Nützliches ist.
Er studiert sie, weil er daran Freude hat, und er hat Freude daran, weil sie so schön ist.
Wenn die Natur nicht so schön wäre, so wäre es nicht der Mühe wert, sie kennen zu lernen,
und das Leben wäre nicht wert, gelebt zu werden.„
(Henri Poincaré, 1854-1912)

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung und Zielstellung **1**

1. Einleitung **2**

1.1. Bewegung 2

1.2. Bewegung in der Zelle 2

1.3. Motorproteine 3

1.4. Myosine 4

1.4.1. Klasse-V-Myosine 7

1.5. Myosine in Pflanzen 8

1.5.1. Klasse-VIII-Myosine 8

1.5.2. Klasse-XI-Myosine 8

2. Zielstellung **12**

II. Ergebnisse **13**

3. Generierung des benötigten molekularen Werkzeugs **14**

3.1. Generierung eines Vektorsets für *N*-terminale FP-Fusionen 15

3.2. Generierung eines Vektorsets für C-terminale FP-Fusionen 16

3.3. Mikroskopischer Test der FP-Kombinationen für *Co*-Lokalisationsexperimente 17

3.4. Generierung eines Markervektorsets 20

4. Untersuchung der Klasse-XI-Myosine von *Arabidopsis thaliana* **23**

4.1. Klonierung der Myosin-*tail*-Konstrukte 23

4.2. Analyse der Myosin-*tail*-Konstrukte mittels biol. Transformation von *A. th.* . 26

4.2.1. Myosin-*tail*-Konstrukte mit cytosolischer Lokalisierung 26

4.2.2. Myosin-*tail*-Konstrukte mit distinkter Lokalisierung 27

4.2.3. Subzelluläre Lokalisierung des Myosin-*tail*-Konstruktes XI-I*tail* 30

4.2.4. Subzelluläre Lokalisierung des Myosin-*tail*-Konstruktes XI-D*tail* . . . 32

4.3. Analyse der Myosin-*tail*-Konstrukte mittels biol. Transformation von *P. sat.* . 34

4.4. Analyse der Myosin-*tail*-Konstrukte anhand von *Co*-Lokalisationsstudien . . . 37

4.5. Generierung transgener, Myosin-*tail*-Konstrukt-überexprimierender Pflanzen 41

4.5.1. Mikroskopische Analyse 43

4.5.2. Biochemische Analyse 50

III. Diskussion **56**

5. Molekulares Werkzeug **57**

5.1. Das Vektorset erleichtert die geplanten Klonierungen und schafft einheitliche experimentelle Bedingungen . . . 57

5.2. Nach dem mikroskopischen Test standen zwei Fluoreszenzproteinkombinationen für *Co*-Lokalisationsexperimente zur Verfügung . . . 57

5.3. Das Markervektorset ermöglicht *Co*-Lokalisationsstudien . . . 58

6. Die Klasse-XI-Myosine aus *Arabidopsis thaliana* **59**

6.1. Welche *Cargo*-Spezifität besitzt jedes einzelne *Arabidopsis thaliana*-Klasse-XI-Myosin, wenn es transient in *Arabidopsis thaliana* überexprimiert wird? . . . 59

6.1.1. Nicht alle erhaltenen Sequenzen stimmen mit Vorhersage überein . . . 59

6.1.2. Biol. Trafo. eignet sich zur Untersuchung der *Cargo*-Spezifität . . . 61

6.1.3. Einige der *Cargos* konnten identifiziert werden . . . 62

6.1.4. Identifizierte *Cargos* stimmen nicht mit in der Literatur beschriebenen überein . . . 63

6.2. Gibt es Funktionshomologien der Klasse-XI-Myosine aus *Arabidopsis thaliana* zu Klasse-XI-Myosinen in anderen Pflanzenspezies? . . . 65

6.3. Arbeiten die Klasse-XI-Myosine gewebespezifisch? . . . 65

6.3.1. Vier Myosin-*tail*-Konstrukt-überexprimierende Pflanzenlinien zeigen Fluoreszenz . . . 66

6.3.2. Daten zur gewebespezifischen Expression korrelieren nicht mit den subzellulären Lokalisierungen in den transgenen Pflanzen . . . 67

6.3.3. Phänotyp der Myosin-XI-G*tail*-überexprimierenden Pflanzen bedingt durch subzelluläre Lokalisierung des Myosin-Konstrukts . . . 69

6.4. Lassen sich Myosin-*tail*-Proteine aus transgenen *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen isolieren und biochemisch charakterisieren? . . . 69

6.5. Warum sind die Klasse-XI-Myosine so zahlreich in Pflanzen? . . . 70

IV. Material und Methoden **72**

7. Material **73**

7.1. Chemikalien . . . 73

7.2. Geräte und Zubehör . . . 73

7.3. Pflanzenmaterial . . . 73

7.4. Bakterienstämme . . . 74

7.5. Kulturmedien . . . 74

7.6. Antibiotika . . . 74

7.7. Enzyme . . . 74

7.8. Molekularbiologische Kits . . . 75

7.9. Größenstandards . . . 75

7.10. Antikörper . . . 75
7.11. Membranen . . . 76
7.12. Nukleotide und Oligonukleotide . . . 76
7.13. Vektoren . . . 78
7.13.1. Vorliegende Vektoren . . . 78
7.13.2. Für diese Arbeit erstellte Vektoren . . . 78
7.14. Datenverarbeitung . . . 81
7.14.1. Software . . . 81
7.14.2. Weitere Software . . . 82
7.14.3. Mikroskophardware und Steuerungssoftware . . . 82

8. Methoden **83**
8.1. Molekularbiologische Methoden . . . 83
8.2. Arbeiten mit Pflanzenmaterial . . . 83
8.2.1. Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana* auf Erde . . . 83
8.2.2. Kultivierung von *Pisum sativum* auf Erde . . . 83
8.2.3. Sterilisation von Samen . . . 83
8.2.4. Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Sterilkultur . . . 83
8.2.5. Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels *FloralDip* . . . 84
8.2.6. Selektion transgener Pflanzen auf Erde . . . 84
8.2.7. Selektion transgener Pflanzen auf MS-Medium . . . 84
8.2.8. Transiente Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* . . . 84
8.2.9. Transiente Transformation mittels Partikelbeschuss . . . 85
8.3. Mikroskopische Methoden . . . 86
8.3.1. Vakuuminfiltration und Präparation des Blattmaterials . . . 86
8.3.2. Epifluoreszenzmikroskopie . . . 86
8.3.3. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie . . . 87
8.3.4. Bildbetrachtung und -bearbeitung . . . 87
8.4. Proteinbiochemische Methoden . . . 87
8.4.1. SDS-PAGE . . . 87
8.4.2. hrCN-PAGE . . . 87
8.4.3. Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial . . . 87
8.4.4. Coomassie-Colloidal-Färbung . . . 88
8.4.5. Western-Analyse . . . 88
8.4.6. Ponceau S-Färbung . . . 89

V. Anhang **90**

9. Literaturverzeichnis **91**

10. Abkürzungsverzeichnis **98**

Zusammenfassung

In der Erforschung der Myosin-Superfamilie mit derzeit 35 bekannten Klassen sind die pflanzlichen Myosine ein bisher sehr wenig untersuchtes Teilgebiet.

In höheren Pflanzen gibt es Myosine der Klasse VIII und Klasse XI. Es gibt Hinweise, dass die Myosinen der Klasse VIII Funktionen bei der Zell-Zell-Interaktion und der Zellteilung haben. Die Myosine der Klasse XI sind sehr wahrscheinlich für den schnellen Organelltransport und damit für die Entstehung der Cytoplasmaströmung zuständig. Die exakten *Cargo*-Spezifitäten der dreizehn Klasse-XI-Myosine im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*, d. h. welche Frachten (Organell, Vesikel *etc.*) transportiert werden, waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur in Ansätzen bekannt.

Aus diesem Grund war ein Ziel die *Cargo*-Spezifität der *Arabidopsis thaliana*-Klasse-XI-Myosine *in vivo* in *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen. Dazu wurden sogenannte chimäre *tail*-Konstrukte aller Klasse-XI-Myosine bestehend aus einem Fluoreszenzprotein *C*-terminal fusioniert mit der *coiled-coil*- und der *Cargo*-Bindedomäne jeweils eines Myosins erstellt. Einerseits wurden diese eingesetzt, um die subzelluläre Lokalisierung mittels biolistischer Transformation zu untersuchen, andererseits wurden auf Basis dieser *tail*-Konstrukte transgene *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen generiert, um anhand biochemischer Analysen mögliche Interaktionspartner der *tail*-Konstrukte zu ermitteln.

Die Experimente zur subzellulären Lokalisierung, *Co*-Lokalisierungsstudien und Erstellung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen zeigten, dass die *tail*-Konstrukte der Klasse-XI-Myosine vesikuläre Strukturen markieren. Die Untersuchung der subzellulären Lokalisierung in Epidermiszellen der Laubblattoberseite von *Arabidopsis thaliana* lieferten das Ergebnis, dass fünf der *tail*-Konstrukte unspezifisch im Cytosol akkumulieren, sieben an vesikulären Strukturen lokalisieren und ein Myosin an filamentöse Strukturen bindet. Den Myosin-*tail*-Konstrukten der Myosine MyaI, XI-D und XI-I konnten anhand der *Co*-Lokalisierungsstudien mit geeigneten Markern Oleosomen, Golgi bzw. Tubulin als *Cargo* zugeordnet werden.

Die Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen war erfolgreich und es konnten für vier Myosin-*tail*-Konstrukte fluoreszierende Pflanzen erhalten werden. Alle vier untersuchten Myosin-*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzen zeigten vesikuläre Strukturen markiert. Weitere Untersuchungen an den transgenen *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen lieferten Hinweise, dass eine Gewebsspezifität der Myosin-*Cargo*-Interaktion vorliegt.

Die *tail*-Konstrukte konnten aus den transgenen Pflanzen nativ als Dimere isoliert und mittels Western-Analyse identifiziert werden. Eine 2D-Auftrennung und Analyse möglicher gebundener Proteine bedarf weiterer Optimierung und auch die Untersuchung zur *Cargo*-Spezifität kann mit zusätzlichen, geeigneten Markern weitere Identifizierungen zum Ergebnis haben.

Teil I.

Einleitung und Zielstellung

1. Einleitung

1.1. Bewegung

„Alles Leben ist Bewegung, Bewegung ist Leben“ - Leonardo da Vinci

Aphorismen, wie dieser, lassen sich zahlreiche finden und sie beschreiben Bewegung als eines der Merkmale von Leben. Auch die Definitionen von Leben, welche man in Lehrbüchern findet, führen Bewegung als eines der entscheidenden Merkmale lebender Organismen auf. „Diese sind: *Stoffwechsel, Wachstum, Vermehrung, Reizbarkeit* [...] und [...] auch *Bewegung*" (Linder und Bayrhuber, 1998); auch Straßburger *et al.* (2002) zählen zu den klassischen Lebensmerkmalen, wie Ernährung, Reizaufnahme und -beantwortung, Fortpflanzung und Evolution die Bewegung hinzu.

Ein Lebewesen kann seine Lage durch aktive und passive Bewegung verändern. Dabei ist nur die aktive Bewegung zielgerichtet. Diese gezielten Bewegungen sind mannigfaltig und (lebens)wichtig, denn ein Lebewesen muss auf alle veränderten Umwelteinflüsse, sowohl biotische, abiotische, positive als auch negative, reagieren.

Bewegungen können nicht nur vom Lebewesen als Ganzes, in Form von Orts- bzw. Lageänderung, vollführt werden sondern finden auch auf zellulärer Ebene statt, z. B. in Form von Organellbewegung und Cytoplasmaströmung (Shimmen, 2007).

Ein Lebewesen ist also in der Lage bis in die letzte Zelle auf sämtliche Umwelteinflüsse zu reagieren. Dazu sind vorrangig schnelle Bewegungsvorgänge notwendig, welche durch Proteinen hervorgerufen werden, die chemische Energie in mechanische umwandeln. Diese Proteine werden Motorproteine genannt.

1.2. Bewegung in der Zelle

Die aktiven Bewegungen in der Zelle werden, wie bereits erwähnt, durch Motorproteine gewährleistet. Sie transportieren biologische Frachten, sogenannte *Cargos*, entlang eines Widerlagers, dem Cytoskelett, durch die Zelle. *Cargo* können einzelne Makromoleküle sein, aber auch ganze Organellen.

Auf Grund der Tatsache, dass Bewegungen die Zelle Energie kosten, steht außer Frage, dass sie für die Zelle von enormer Bedeutung sind. Trotz intensiver Forschung sind viele Fragen, z. B. wie die Transportprozesse im Einzelnen ablaufen, wann ein Motorprotein welches *Cargo* zu transportieren hat und welche Interaktionspartner gegebenenfalls dafür nötig sind, noch weitestgehend unbeantwortet. Besonders pflanzliche Motorproteine und ihre Wirkmechanismen sind noch sehr unerforscht. Dabei ist eines der großen Ziele herauszufinden, wie die Organellbewegung und damit die Cytoplasmaströmung auf molekularer Ebene ablaufen.

1.3. Motorproteine

Motorproteine kommen ubiquitär in Eukaryoten (Vale, 2003a) vor und lassen sich in drei Gruppen unterteilen: Kinesine, Dyneine und Myosine.

Die drei Motorproteinfamilien gleichen sie sich in ihrem generellen Aufbau. Sie besitzen alle eine sogenannte Kopf- und Schwanzregion (vgl. Abb. 1.1). Die Kopfregion enthält jeweils die Cytoskelettbindestelle und eine ATPase-Domäne, welche die zur Bewegung benötigte Energie durch Spaltung von ATP bereitstellt. Die Interaktion mit dem *Cargo* wird durch die Schwanzregion vermittelt (Kolomeisky und Fisher, 2007).

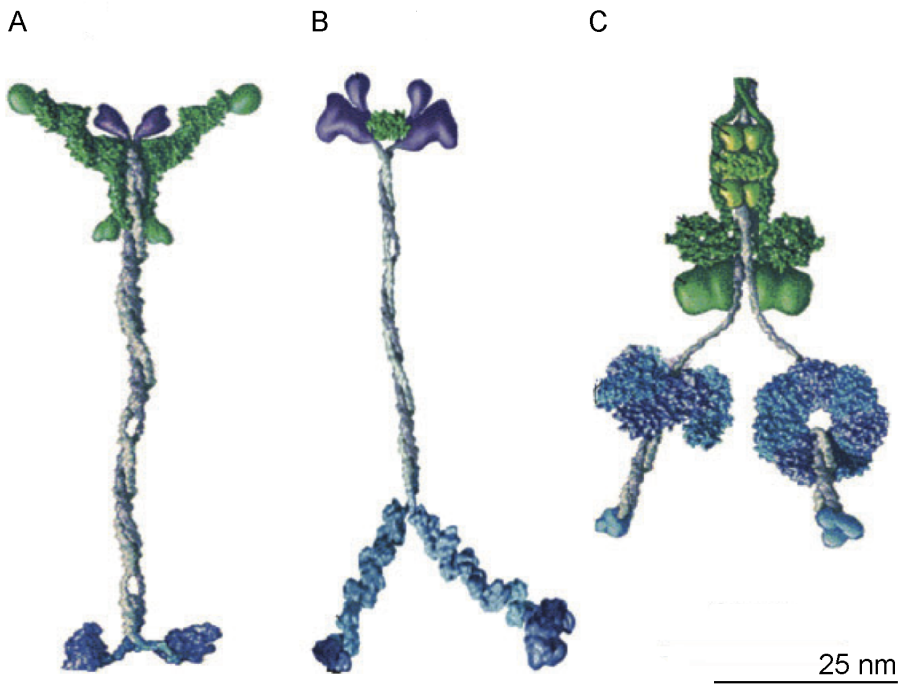

Abbildung 1.1.: Schematischer Aufbau eines (A) konventionellen Kinesins, (B) Klasse-V-Myosins und (C) cytoplasmatischen Dyneins. Die *Cargo*-Bindedomänen (Schwanzregion) sind violett, die *coiled-coil*-Domänen (Dimerisierungsdomänen) grau, die *neck*-Domänen, welche zur Assoziation mit leichten Ketten fähig sind, sind hellblau und die Motordomänen (Kopfregion) dunkelblau dargestellt. Assozierte Proteine sind grün eingefärbt. Der Größenbalken entspricht einer Länge von 25 nm. Entnommen aus Kolomeisky und Fisher (2007) und geändert nach Vale (2003a).

Der überwiegende Teil der Motorproteine arbeitet als Dimer im sogenannten *hand-over-hand*-Mechanismus prozessiv. Der *hand-over-hand*-Mechanismus beschreibt, wie sich die Motorproteine auf den Filamenten bewegen. Dabei bleibt immer die Motordomäne eines Monomers gebunden, während sich die Motordomäne des anderen löst und durch Konformationsänderung im gesamten Dimer einen „Schritt“ vor das gebundene Monomer macht (Vale, 2003a). Dies erweckt den Eindruck als „laufen“ diese auf dem Filament entlang.

Ein kleiner Teil der Motorproteine bindet als Monomer an das *Cargo* (siehe z. B. Abb. 1.5). Um das *Cargo* zu transportieren, binden es mehrere Monomere und eine ununterbrochene Bewegung wird durch zeitversetztes Lösen der Monomere vom Filament gewährleistet und es entsteht der Eindruck von Prozessivität (Dunn *et al.*, 2007).

Die verschiedenen Motorproteinfamilien bewegen sich entlang verschiedener Cytoskelett-

filamente, entweder entlang der Aktin- oder der Tubulinfilamente[1]. Kinesine und Dyneine bewegen sich an Mikrotubuli in unterschiedlicher Orientierung. Kinesine transportieren *Cargos* in Richtung (+)-Ende und Dyneine in Richtung (−)-Ende der Mikrotubuli. Lediglich Myosine bewegen sich entlang der Aktinfilamente in Richtung deren (+)-Ende und sind von den drei Motorproteinfamilien diejenigen, welche ihr *Cargo* mit der größten Geschwindigkeit (Kamiya, 1981; Shimmen und Yokota, 1994) durch die Zelle bewegen können. Sie bewegen sich mit einer Geschwindigkeit von bis zu 100 µm/s (Shimmen und Yokota, 2004) und haben mit bis zu 36 nm die größte Schrittlänge (Walker *et al.*, 2000) aller Motorproteine. Daraus ergibt sich, dass Myosine zu etwa 2800 „Schritten“ pro Sekunde fähig sind. Myosine sind die „Sprinter“ unter den Motorproteinen und für den „Langstreckentransport“ zuständig, während Kinesine und Dyneine die exakte Positionierung und Verankerung der Organellen übernehmen (Cai und Cresti, 2012). Myosine gelten zudem als Auslöser der Cytoplasmaströmung (Pollard und Weihing, 1974; Wolke *et al.*, 2007) durch ihren schnellen Organell- bzw. *Cargo*-Transport, welcher zur unmittelbaren Reaktion auf veränderte Bedingungen notwendig ist. Vor allem in Pflanzen war dieser Transport zu Beginn der experimentellen Phase dieser Arbeiten beinahe unerforscht. Zwar wußte man, welche Myosine in pflanzlichen Zellen existieren, aber wie der Transport im Speziellen abläuft und durch welches Myosin welche Organellen bewegt werden, war bis dahin nahezu unbekannt.

1.4. Myosine

Myosine bilden eine sehr große Familie mit mehr als 30 Klassen und werden in konventionelle und unkonventionelle Myosine eingeteilt. Konventionelle Myosine gehören der Gruppe II an und sind jene, welche in tierischen Organismen die Muskeln aufbauen. Alle weiteren Myosine werden als unkonventionell bezeichnet und übernehmen vielfältige Aufgaben innerhalb der Zellen. Einige Myosinklassen kommen in allen eukaryotischen Organismen vor, wie z. B. die kanonischen Klassen I und II[2], andere Myosine konnten bisher nur in einer Spezies nachgewiesen werden, z. B. Klasse XIII-Myosine nur in der Grünalge *Acetabularia cliftonii* und Klasse IV-Myosine nur in der Amöbe *Acanthamoeba castellani* (Berg *et al.*, 2001).

In Abbildung 1.2 ist eine fiktive Zelle zu sehen, in welcher einige der zahlreichen Aufgaben, die von den verschiedenen Myosinen und Myosinklassen übernommen werden, dargestellt sind. Es konnte gezeigt werden, dass Myosine eine wichtige Rolle bei Endozytose, Endosomentransport, Golgi-Transport und Exocytose spielen. Auch bei der Phagozytose und der Entstehung der Pseudopodien von *Dictyostelium* übernehmen sie entscheidende Aufgaben. Weiterhin haben sie Funktion bei der Ausprägung verschiedener Strukturen, wie z. B. dendritische *Spines* von Purkinjezellen, Filopodien, Rhabdomeren von *Drosophila*-Augen, Stereozilien des Innenohrs und am Bürstensaum der Darmzotten (Mikrovilli). Myosine sind aber auch am Aktinabbau beteiligt und konnten an Mikrotubuli mit bisher ungeklärter Funktion nachgewiesen werden

[1] Das Cytoskelett umfasst des Weiteren Intermediärfilamente. Diese dienen hauptsächlich der Stabilität von Zellen und kommen in Pflanzen nur in geringem Maße vor.

[2] Die Klassen I und II konnten bisher in allen eukaryotischen Organismen außer in pflanzlichen nachgewiesen werden.

(Mermall *et al.*, 1998).

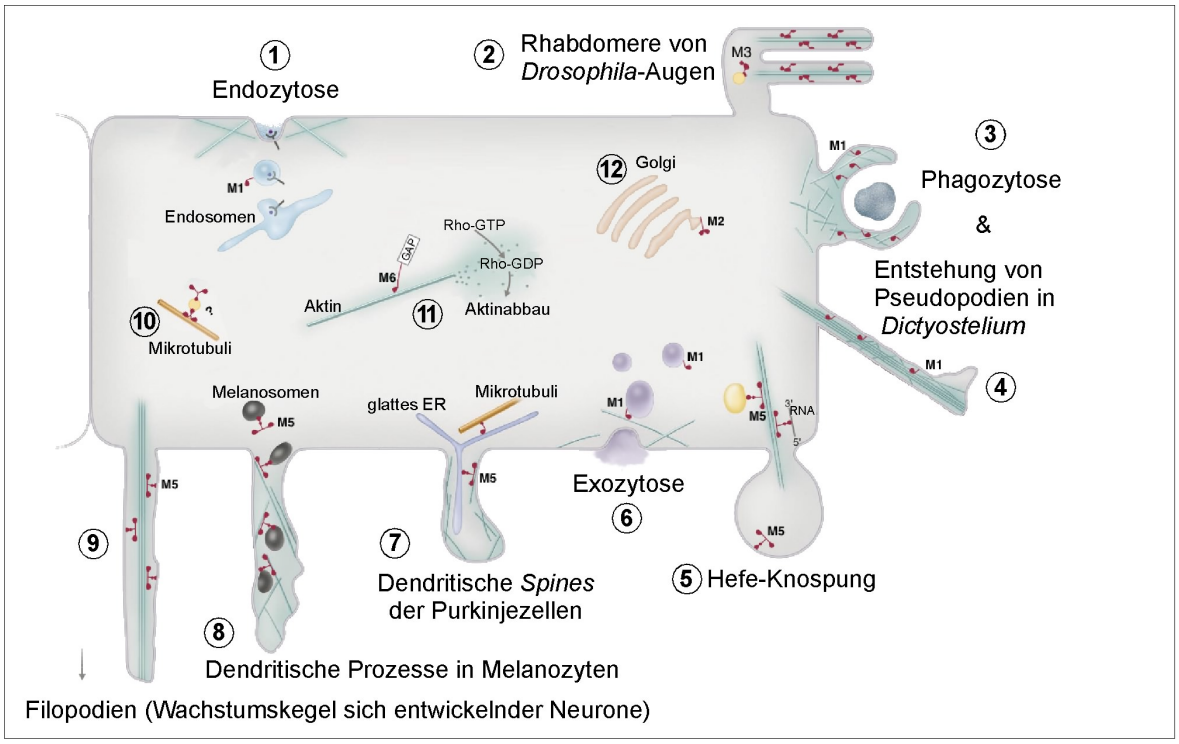

Abbildung 1.2.: Myosine und ihre Funktionen in einer fiktiven Zelle. Myosinen wurden Funktionen bei Endozytose (**1**), an Rhabdomeren von *Drosophila*-Augen (**2**), bei der Phagozytose (**3**) und der Entstehung von Pseudopodien in *Dictyostelium* (**4**), bei Hefe-Knospung (**5**), bei Exozytose (**6**), an dendritischen *Spines* der Purkinjezellen (**7**), bei dendritischen Prozessen in Melanozyten (**8**), am Wachstumskegel sich entwickelnder Neurone (**9**), an Mikrotubuli (**10**), beim Aktinabbau (**11**) und beim Golgi-Transport (**12**) nachgewiesen. Abkürzungen: M1-M6 - Myosine der verschiedenen Klassen (Nummerierung entspricht nicht der Myosinklasse); ER - Endoplasmatisches Retikulum; GAP - GTPase aktivierendes Protein; Rho-GDP - Rho-Guanosindiphosphat; Rho-GTP - Rho-Guanosintriphosphat; *RNA* - = RNS (Ribonukleinsäure). Die Darstellung ist nicht maßstabsgetreu. Abbildung entnommen aus und geändert nach Mermall *et al.* (1998).

Bis heute konnten 2269 Myosine von 328 Arten identifiziert werden (Odronitz und Kollmar, 2007). Arbeiten, wie jene von Hodge und Cope (2000), Richards und Cavalier-Smith (2005) und Odronitz und Kollmar (2007), zeigen, dass es ein „Ur-Myosin" gegeben haben muss, welches nur aus der Motordomäne bestand und aus welchem die heute exisitierenden Myosine hervorgegangen sind. Derzeit sind die Myosine auf Basis von Sequenzvergleichen ihrer Motordomänen in 35 Klassen eingeteilt (Odronitz und Kollmar, 2007). Erweitert man den Vergleich der Myosine untereinander auf die anderen Domänen, wird deutlich, dass einige der existierende Myosinklassen auseinander hervorgegangen sein müssen und das andere ausgehend vom „Ur-Myosin" eine unabhängige Evolution durchliefen.

In Abbildung 1.3 sind 17 der 35 bekannten Myosin-Klassen phylogenetisch geordnet dargestellt. Für die Erstellung dieses phylogenetischen Stammbaums wurden die Motordomänen auf Sequenzhomologien analysiert und in die entsprechenden Klassen eingeordnet (Hodge und Cope, 2000). Die eben beschriebene Diversifizierung und Gruppenbildung wird in diesem Diagramm deutlich. Aus der schematischen Darstellung der Domänen der verschiedenen Myosinklassen in Abbildung 1.4 kann man unter anderem ableiten, dass einzelne Klassen starke Homologien in allen Domänen aufweisen. So haben die pflanzlichen Klasse-XI-Myosine und die tierischen Klasse-V-Myosinen (beide rot eingerahmt) eine nahezu identische Domänenabfolge.

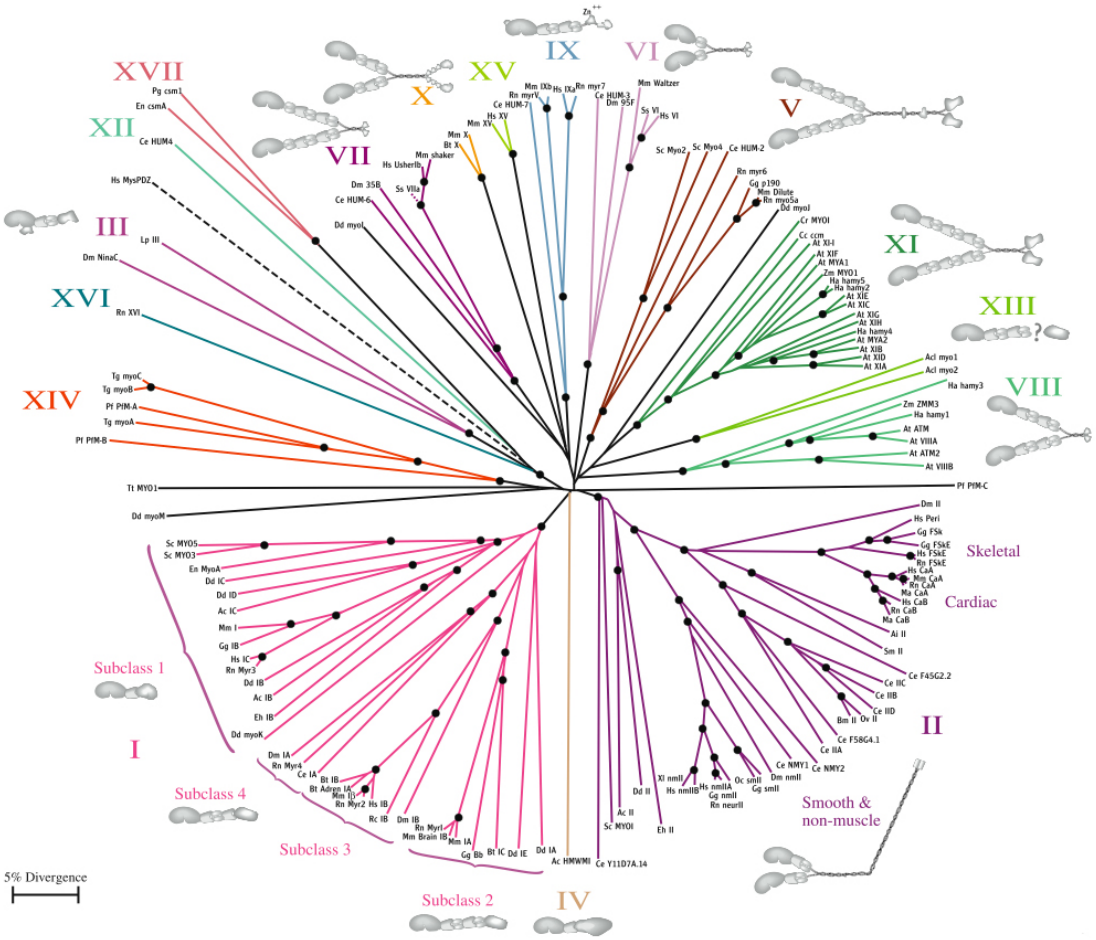

Abbildung 1.3.: Phylogenetischer Stammbaum der Myosin-Superfamilie. Es sind 17 der bekannten 35 Myosinklassen dargestellt, welche anhand der Sequenzhomologie ihrer Motordomänen ermittelt wurden (unverändert,wie von den Autoren Hodge und Cope (2000) erbeten).

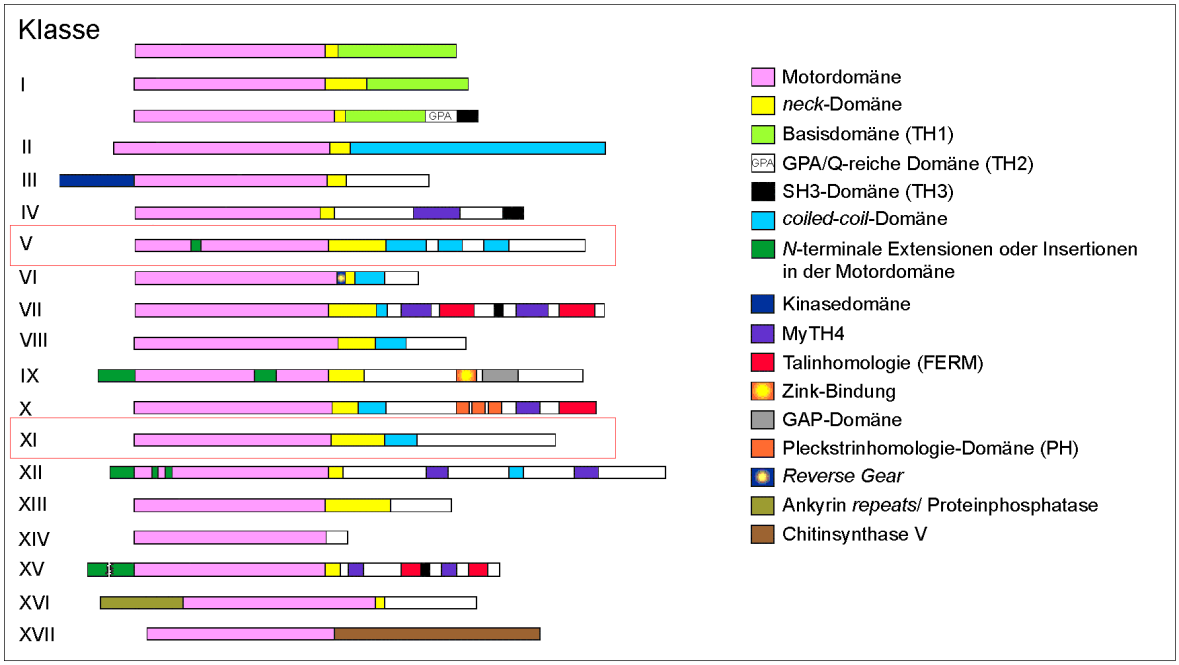

Abbildung 1.4.: Überblick über die Domänen-Anordnung von 17 Myosin-Klassen. Entnommen von „The Myosin Homepage" (Cope *et al.*, 2006), geändert nach Mooseker und Cheney (1995); Kreis und Vale (1999); Sellers (2000).

1.4.1. Klasse-V-Myosine

Die Klasse V ist eine gut untersuchte Myosinklasse und umfasst Myosine aus tierischen Organismen und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Larson, 1996).

Die Klasse-V-Myosine wurden vor allem in *Saccharomyces cerevisiae* bereits intensiv auf ihre *Cargo*-Spezifität hin untersucht. Das Bild, welches sich aus den Erkenntnissen der Untersuchungen des Hefesystems ergibt, macht deutlich, dass einzelne Myosine verschiedene *Cargos* zu verschiedenen Zeiten binden können. In Hefe lassen sich nur zwei Myosine der Klasse V finden, diese transportieren jedoch Endosomen, Melanosomen, Vakuolen und Peroxisomen als *Cargo* (zusammengefasst in Li und Nebenführ, 2008b). Auch beim *mRNA*-Transport, Membranfluss und der Zellpolarität wird ihnen eine wichtige Rolle zugesprochen (Reck-Peterson *et al.*, 2000). Des Weiteren konnten in diversen biochemischen Studien Interaktionspartner verschiedener Klasse-V-Myosine identifiziert werden. Die Klasse-V-Myosine mit bekannten Interaktionspartnern wurden von Li und Nebenführ (2008b) in einer schematischen Übersicht zusammengefasst (siehe Abb. 1.5).

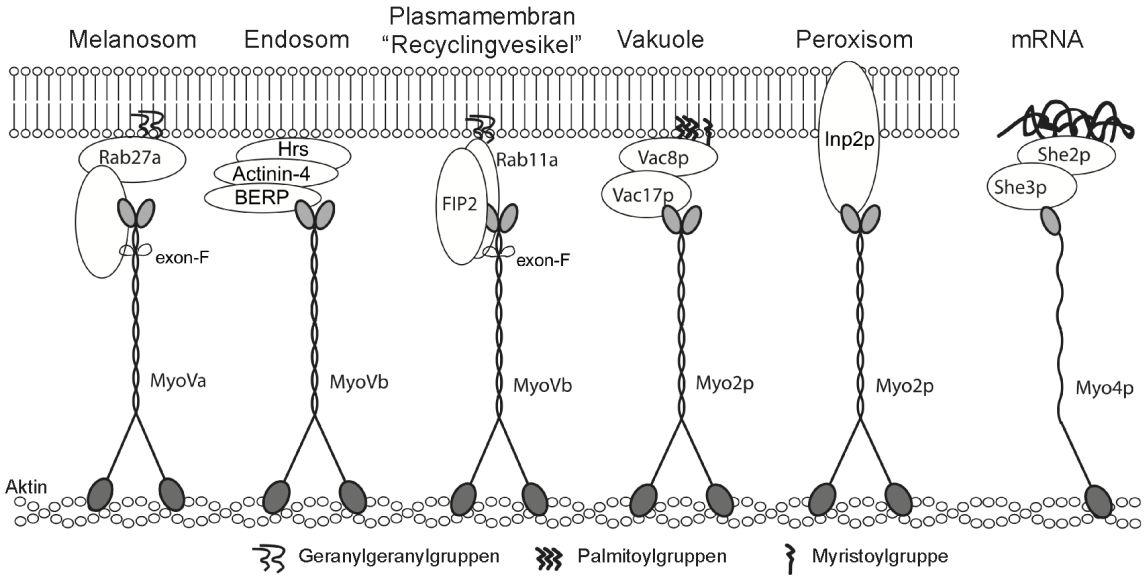

Abbildung 1.5.: *Cargo*-Interaktionspartner-Beziehung ausgewählter Klasse-V-Myosine. Dargestellt sind verschiedene Klasse-V-Myosine mit ihren spezifischen *Cargos* und den dazu bekannten Interaktionspartnern (geändert nach Li und Nebenführ, 2008b).

Wie in 1.4 beschrieben, haben die Klasse-XI-Myosine der Pflanzen und die tierischen Klasse-V-Myosinen sich ausgehend von einem „Ur-Myosin“ entwickelt und sind stark homolog. Im Gegensatz zu den Klasse-V-Myosinen wurden die pflanzlichen Klasse-XI-Myosinen bisher wenig untersucht und so ist wenig über deren Funktion bekannt. Die vorliegende Arbeit soll das Wissen über die Transportaufgaben der Klasse-XI-Myosine vergrößern und in den folgenden Abschnitten werden bekannten Fakten über die Klasse-XI-Myosine beschrieben, um den Ausgangspunkt dieser Arbeit zu verdeutlichen.

1.5. Myosine in Pflanzen

In pflanzlichen Organismen wurden bisher drei Myosin-Klassen gefunden, die Klassen VIII, XI und XIII. Die Myosine der Klassen VIII und XI sind in höheren Pflanzen zu finden (Sparkes, 2010), während die Klasse XIII nur in der Grünalge *Acetabularia clifftonii* nachgewiesen werden konnte (Thompson und Langford, 2002). Aus diesem Grund soll auf die Klasse XIII in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden.

1.5.1. Klasse-VIII-Myosine

Erstmals wurde 1993 ein Myosin der Klasse VIII von Knight und Kendrick-Jones aus *Arabidopsis thaliana* isoliert und charakterisiert. Es war das erste *"myosin-like protein"*, das jemals aus einer pflanzlichen Zelle isoliert wurde. Dieses erste *Arabidopsis*-Myosin wurde als ATM bezeichnet, für *Arabidopsis thaliana*-Myosin und konnte keiner Klasse zugeordnet werden. Zu diesem Zeitpunkt waren erst 7 Klassen bekannt und Knight und Kendrick-Jones (1993) schlugen auf Grund der zu anderen Motordomänen abweichenden Homologien ATM als erstes Klasse-VIII-Myosin vor.

Anhand der ermittelten Aminosäuresequenz wurden die Domänen von ATM identifiziert. Knight und Kendrick-Jones (1993) fanden dabei heraus, dass ATM über vier IQ-Motive (siehe Abschnitt 1.5.2.1) und eine *coiled-coil*-Region verfügt. Die Sequenzanalysen zum *C*-terminalen Teil des Myosins ergaben jedoch vorläufig keine eindeutigen Ergebnisse.

Nachdem die vollständige genomische Sequenz von *Arabidopsis thaliana* verfügbar war, wurden weitere Myosine der Klasse VIII identifiziert. Man fand heraus, dass es insgesamt vier Klasse-VIII-Myosine in *Arabidopsis thaliana* gibt (Reddy und Day, 2001). Immunolokalisationsuntersuchungen ergaben, dass sie am Zellwandaufbau nach der Zellteilung beteiligt sind, an den Plasmodesmata Aufgaben bei der Zell-Zell-Interaktion übernehmen und auch bei der Endozytose eine wichtige Rolle spielen (Reichelt *et al.*, 1999). Die Klasse-VIII-Myosine spielen eine eher untergeordnete Rolle in Bezug auf den Organelltransport.

1.5.2. Klasse-XI-Myosine

Die Anzahl der Klasse-XI-Myosine ist im Vergleich zu den Klasse-VIII-Myosinen deutlich höher. So findet man in *Arabidopsis thaliana* dreizehn Klasse-XI-Myosine, aber nur vier Klasse-VIII-Myosine (Reddy und Day, 2001). Auch in anderen Arten bleibt dieses Verhältnis gewahrt; Reis (*Oryza sativa*) besitzt zwölf Klasse-XI-Myosine und zwei Klasse-VIII-Myosine (Jiang und Ramachandran, 2004) und die Westliche Balsam-Pappel (*Populus trichocarpa*) enthält zehn Klasse-XI-Myosine und vier Klasse-VIII-Myosine (Odronitz und Kollmar, 2007), woraus sich eine mögliche Funktionshomologie erahnen lässt.

Das erste Klasse-XI-Myosin wurde 1994 von Kinkema und Schiefelbein aus *Arabidopsis thaliana* isoliert und als MyaI bezeichnet, für *Myosin from Arabidopsis* I. Die Motordomäne dieses Myosins weist eine 45%ige Übereinstimmung zu jener von ATM1 (Knight und Kendrick-Jones, 1993) auf. Der *C*-terminale Teil unterscheidet sich grundlegend, die Anzahl der IQ-Motive

ist ebenfalls verschieden[3], weshalb die Autoren eine Einordung in eine neue Myosin-Klasse vorschlugen (siehe 1.5.2.1). Weiterhin unterbreiteten die Autoren den Vorschlag *Arabidopsis thaliana* zu einem Modellorganismus für die Untersuchung pflanzlicher Myosine zu machen, da durch die bisherigen Analysen der Grundstein dafür bereits gelegt werden konnte. So wurden bis heute zahlreiche Experimente mit *Arabidopsis*-Myosinen der Klasse XI durchgeführt (siehe 1.5.2.2) und die untersuchten Myosine systematisch benannt. Die ersten beiden entdeckten Vertreter wurden MyaI und MyaII genannt, alle weiteren wurden alphabetisch mit XI-A bis XI-K bezeichnet (Reddy und Day, 2001).

1.5.2.1. Aufbau der Klasse-XI-Myosine

Schon mit der Entdeckung des ersten Klasse-XI-Myosins MyaI (Kinkema und Schiefelbein, 1994) konnte eine große Homologie zu den Myosinen der Klasse V festgestellt werden. Die Motordomäne von MyaI zeigt im Aminosäuresequenzvergleich zu allen bekannten Motordomänen die größte Übereinstimmung zu den Klasse-V-Myosinen. Sie sind zu 46% identisch und auch die anderen Domänen weisen im Vergleich die größte Homologie zu den Klasse-V-Myosinen auf (Knight und Kendrick-Jones, 1993). Für MyaI und Myo2p[4] wurde zudem anhand bioinformatischer Analysen gezeigt, dass sich deren *Cargo*-Bindedomänen in ihrem strukturellen Aufbau gleichen (Li und Nebenführ, 2007).

In Abbildung 1.6 ist der schematische Aufbau eines Klasse-V-Myosins gezeigt. Es umfasst die Motordomäne, die *neck*-Domäne, die *coil-coiled*-Domäne und die *Cargo*-Bindedomäne. Da Klasse-V- und Klasse-XI-Myosine homolog sind, wird dieses Model in dieser Arbeit stellvertretend auch für die Klasse-XI-Myosine verwendet.

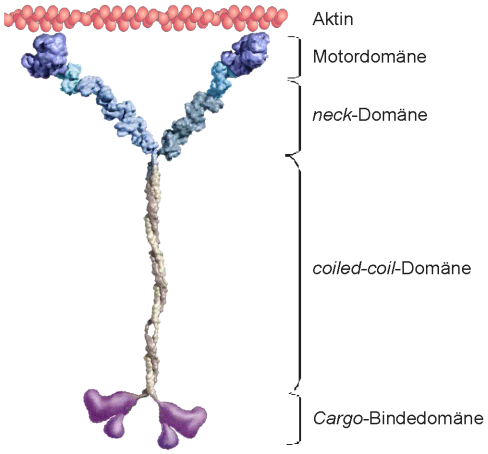

Abbildung 1.6.: Schematischer Aufbau eines Klasse-V- (bzw. Klasse-XI-Myosins). Dargestellt ist ein Dimer eines Klasse-V-Myosins (geändert nach Vale (2003a)) mit Motordomäne, *neck*-Domäne, *coiled-coil*-Domäne und *Cargo*-Bindedomäne. Da nach Kinkema und Schiefelbein (1994) Klasse V und XI der Myosine stark homolog sind, wird das für die Klasse V vorgeschlagene Modell (Vale, 2003a) in dieser Arbeit stellvertretend für Klasse XI verwendet.

Neben den typischen Myosindomänen, Motor-, *coiled-coil*- und *Cargo*-Bindedomäne, besitzen die Klasse-V-Myosine genau sechs sogenannte IQ-Motive *C*-terminal zur Motordomäne. Der Name „IQ-Motiv" stammt von der in ihnen enthaltenen Sequenz „IQXXXRGXXXR". Die

[3] ATM enthält vier IQ-Motive während MyaI sechs IQ-Motive besitzt.
[4] Myo2p ist eines der beiden Klasse-V-Myosine aus *Saccharomyces cerevisiae.*

Funktion der IQ-Motive ist die Bindung von sogenannten leichten Ketten, vor allem von Calmodulin. In Abwesenheit von Calcium binden die IQ-Motive Calmodulin, senken daraus folgend die ATPase-Aktivität der Motordomäne und somit die Motilität des Myosins (Coluccio und Bretscher, 1987; Collins *et al.*, 1990). Die aus den IQ-Motiven bestehende Domäne wird auch als *neck*-Domäne bezeichnet und besteht auch bei MyaI, wie bei den Klasse-V-Myosinen, aus sechs aufeinanderfolgenden IQ-Motiven. Heute weiß man, dass die Anzahl der IQ-Motive in *Arabidopsis thaliana*-Klasse-XI-Myosinen zwischen vier und sechs variiert (Reddy und Day, 2001).
Die, den IQ-Motiven *C*-terminal folgende, *coiled-coil*-Domäne ist aus α-Helices aufgebaut und sorgt dafür, dass diese Helices umeinander gewunden aus zwei Myosinmonomeren spontan das funktionstüchtige Dimer aufbauen (Desnos *et al.*, 2007). Nur im dimerisierten Zustand können Myosine prozessiv am Aktinfilament im sogenannten *hand-over-hand*-Mechanismus (siehe 1.3) „entlanglaufen" (Vale, 2003b). Die *coiled-coil*-Domäne beinhaltet des Weiteren häufig eine sogenannte PEST-Sequenz. PEST-Sequenzen sind Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threonin-reiche Regionen, welche für einen schnellen proteolytischen Abbau sorgen (Ishikawa *et al.*, 2003; Yokota und Shimmen, 2011). Die Lage dieser PEST-Sequenzen könnte auf eine mögliche physiologische Bedeutung in der Trennung der Motordomäne und der *Cargo*-Bindedomäne eine Bedeutung haben, dies ist aber noch ungeklärt (Reck-Peterson *et al.*, 2000).

Die am *C*-Terminus gelegene *Cargo*-Bindedomäne ist für die Bindung des *Cargos* zuständig. Sie wird auch als *tail*-Domäne bezeichnet oder als *globular tail*, auf Grund ihres globulären Aufbaus (Reck-Peterson *et al.*, 2000). Das Grundgerüst dieser globulären Struktur bilden auch in diesem Fall α-Helices, welche sich zu zwei Bündeln zusammenlagern und somit zwei Subdomänen bilden. Diese müssen in einer bestimmten Konformation vorliegen, um an *Cargos* binden zu können (Li und Nebenführ, 2008b).

1.5.2.2. Funktionen der Klasse-XI-Myosine

Wie in Abschnitt 1.4.1 und in 1.5.2.1 bereits beschrieben, sind die Klasse-XI-Myosine homolog zu den Klasse-V-Myosine. Auf Grund dieser Homologie könnte man davon ausgehen, dass sie auch homologe Funktionen übernehmen. Da sich aber die Anzahl der Vertreter von Klasse-V-Myosine, in *Saccharomyces cerevisiae* gibt es nur zwei Vertreter, und die Anzahl der Klasse-XI-Myosine (vgl. 1.5.2) stark unterscheiden, stellt sich die Frage, ob im pflanzlichen System für jedes *Cargo* ein spezielles Myosin verantwortlich ist oder ob sie gegebenenfalls weitere Funktionen übernehmen.

Zu Beginn dieser Arbeit existierten bereits Hinweise, dass Klasse-XI-Myosine biologische Frachten durch die Zelle transportieren können. Für die Erfüllung von Transportaufgaben benötigen die Myosine einerseits die Motordomäne, um an das Aktin binden zu können und unter ATP-Hydrolyse daran entlang zu laufen, andererseits brauchen sie die *Cargo*-Bindedomäne, um das *Cargo* binden zu können. Die Motordomäne ist in Struktur und Funktion bereits gut verstanden (Mooseker, 1995; Ruppel und Spudich, 1996), im Gegensatz zur *Cargo*-Bindedomäne.

Des Weiteren war bekannt, dass die *Cargo*-Bindung unabhängig von der Aktin-Bindung ist

und dass ein Klasse-XI-Myosinkonstrukt, welches die *coiled-coil*- und die *Cargo*-Bindedomäne umfasst, schon zur Bindung an das *Cargo* fähig ist (Reck-Peterson *et al.*, 2000; Reisen und Hanson, 2007). Bei der Überexpression solcher verkürzter Proteine ist ein dominant negativer Effekt auf den Organelltransport zu beobachten (Avisar *et al.*, 2009, 2008; Sparkes *et al.*, 2008). Derartig aufgebaute Konstrukte wurden als *tail*-Konstrukte bezeichnet. Da einzelnen Klasse-XI-Myosinvertretern in diesen Studien indirekt eine Funktion beim Organelltransport zugeordnet werden konnte, stellte sich die Frage nach den konkreten *Cargos*.

In diversen Lokalisationsstudien konnten für einige, aber nicht alle der verschiedenen *Arabidopsis thaliana*-Klasse-XI-Myosine subzelluläre Lokalisierungen bestimmt werden. Dabei wurden *tail*-Konstrukte mit Peroxisomen, Golgi-Vesikeln, Mitochondrien und anderen vesikulären Strukturen in *Nicotiana benthamiana* nachgewiesen (Li und Nebenführ, 2007; Reisen und Hanson, 2007; Sparkes *et al.*, 2008; Avisar *et al.*, 2009). In *Arabidopsis thaliana* wurden hauptsächlich Lokalisationen an Peroxisomen gefunden und eines der untersuchten Konstrukte markierte Golgi-Vesikel (vgl. Tabelle 1.1).

Kompartiment	Myosin	Methode / angewendet in	Referenz
Peroxisomen	MyaI	BT+ BiFC, *A. th.*	Li und Nebenführ (2007),Li und Nebenführ (2008a)
	MyaII	AI / *N. benth.*	Reisen und Hanson (2007)
		BT+ BiFC, *A. th.*	Li und Nebenführ (2007)
	XI-I	BT+ BiFC, *A. th.*	Li und Nebenführ (2007)
	XI-K	BT+ BiFC, *A. th.*	Li und Nebenführ (2007)
Golgi-Vesikel	MyaI	BT, *A. th.*	Li und Nebenführ (2007)
	XI-J	AI / *N. benth.*	Reisen und Hanson (2007)
Chloroplasten	XI-F	AI / *N. benth.*	Sattarzadeh *et al.* (2009)
Mitochondrien	XI-J	AI / *N. benth.*	Reisen und Hanson (2007)
Kernhülle	XI-I	AI / *N. benth.*	Avisar *et al.* (2009)

Tabelle 1.1.: Bisher in der Literatur beschriebene subzelluläre Lokalisierungen. Aufgeführt sind die in der Literatur bis heute beschriebenen subzellulären Lokalisierungen der Klasse-XI-Myosine von *Arabidopsis thaliana* mit Angaben zur angewendeten Untersuchungsmethode und dem Organismus in welchem die Analyse durchgeführt wurde. Abkürzungen: AI - Infiltration mit transformierten *Agrobacterium tumefaciens*; *A. th.* - *Arabidopsis thaliana*; BiFC - Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation; BT - Biolistische Transformation; *N. benth.* - *Nicotiana benthamiana*.

Eine weitere Studie konnte zeigen, dass ein gegen MyaII gerichteter Antikörper in *Arabidopsis thaliana* mit Peroxisomen *co*-lokalisiert (Hashimoto *et al.*, 2005). Da dieser Antikörper aber zusätzliche Lokalisierungen an weiteren Kompartimenten zeigte, konnte nicht geklärt werden, ob es sich dabei um weitere *Cargos* von MyaII handelte oder um Kreuzreaktionen des Antikörpers mit einer weiteren Isoform der Klasse-XI-Myosine.

Obwohl zu Beginn der theoretischen und praktischen Arbeiten zu dieser Dissertation nennenswerte Erfolge in der Lokalisierung von Myosinen in heterologen Systemen erzielt wurden, war die *Cargo*-Spezifität und die Funktion der einzelnen Klasse-XI-Myosinvertreter höherer Pflanzen und im Speziellen in der Modellpflanze *Arabisopsis thaliana* noch weitgehend unverstanden. Und da man nicht auf Grund der recht ähnlichen Anzahl und des homologen Aufbaus der Myosine verschiedener Pflanzen davon ausgehen kann, dass es nicht entscheidende Unterschiede gibt, wurden in der vorliegenden Arbeit, im Gegensatz zu den Ansätzen anderer Autoren, die Klasse-XI-Myosine von *Arabidopsis thaliana* im homologen System untersucht.

2. Zielstellung

Um der Funktion der einzelnen Klasse-XI-Myosine näher zu kommen, sollten in einer ersten Untersuchung die mit den Myosinen interagierenden Organellen mittels chimären Fluoreszenzproteinfusionen identifiziert werden und anschließend die Grundlagen zur biochemischen Charakterisierung und Isolierung von potentiellen Myosinbindekomplexen gelegt werden. In diesem Zusammenhang wurden folgende Fragen gestellt:

1. Welche *Cargo*-Spezifität besitzt jedes einzelne der dreizehn *Arabidopsis thaliana*-Klasse-XI-Myosine, wenn es transient in *Arabidopsis thaliana* überexprimiert wird?

2. Gibt es Funktionshomologien der Klasse-XI-Myosine aus *Arabidopsis thaliana* zu Klasse-XI-Myosinen in anderen Pflanzenspezies?

3. Arbeiten die Klasse-XI-Myosine gewebespezifisch?

4. Lassen sich Myosin-*tail*-Proteine aus transgenen *Arabidopsis thaliana*-Myosin-*tail*-Konstrukt überexprimierenden Pflanzen isolieren und biochemisch charakterisieren?

Zur Beantwortung dieser Fragen werden viele Myosin- und auch Reporterkonstrukte benötigt. Aus diesem Grund wird im ersten Teil der Ergebnisse die Generierung des benötigten molekularen Werkzeugs beschrieben und im zweiten, wesentlichen Teil die Daten zur Beantwortung der gestellten Fragen dargelegt.

Teil II.

Ergebnisse

3. Generierung des benötigten molekularen Werkzeugs

Für die mikroskopgestützte Identifizierung der mit den *Arabidopsis thaliana*-Klasse-XI-Myosinen interagierenden Kompartimente im authentischen System, sprich in *Arabidopsis thaliana,* benötigt man sowohl eine pflanzliche Expressionskassette, als auch einen geeigneten Reporter. Aus diesem Grund wurde vor den eigentlichen Experimenten ein Vektorset erstellt, welches beide Voraussetzungen erfüllt. Dieses Set basiert auf dem sogenannten pRT-Ω/Not/Asc (Überlacker und Werr, 1996), welcher bei seiner geringen Größe von 3,5 kb einen dreifachen 35S-Promotor aus dem *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV, Blumenkohl-Mosaikvirus), eine Ω-leader-Sequenz aus dem Tabak-Mosaikvirus (TMV) und ein Polyadenylierungssignal (Poly-A-Signal, ebenfalls aus CaMV) in sich vereint. Der Vektor pRT-Ω/Not/Asc wird im Folgenden als pRT100mod[1] bezeichnet und hat sich bereits für die transiente Transformation von Pflanzenmaterial mittels *particle bombardement* (siehe 8.2.9) als geeignet erwiesen (Baudisch, 2006). Ein Nachteil des pRT100mod ist, dass seine *multiple cloning site* (MCS) nur Schnittstellen für die drei Restriktionsendonukleasen *Not*I, *Xba*I und *Bam*HI enthält, welche in den *Arabidopsis thaliana*-Klasse-XI-Myosinen häufig vorkommen und daher zur Klonierung eher ungeeignet sind.

Des Weiteren ist es von Vorteil, wenn ein Reporter bereits in der Expressionskassette enthalten ist, um den Aufwand für die Klonierung der Myosin-Reporterfusionen so gering wie möglich zu halten. Da Analysen an lebendem Gewebe geplant waren, fiel die Wahl auf Fluoreszenzproteine (FP) als geeignete Reporter. Es wurden FP-enthaltende pRT100mod-Varianten mit einerseits N- und andererseits C-terminaler generiert, um neben N-terminal zum Fluoreszenzprotein fusionierten Myosin*tail*-Konstrukten andere C-terminale FP-Fusionen schnell klonieren zu können. Diese C-terminalen Fusionierungen können nötig sein, wenn bestimmte Marker-FP-Konstrukte, wie sie in Abschnitt 3.4 beschrieben sind, erstellt werden sollen.

In den folgenden Abschnitten werden die generierten pRT100mod-Varianten detailliert beschrieben.

[1] „mod“ steht für modifiziert

3.1. Generierung eines Vektorsets für *N*-terminale FP-Fusionen

Zu Beginn der Arbeiten lag vom pRT100mod (siehe Abb. 3.1 A) bereits eine Variante vor, welche die codierende Sequenz eines Fluoreszenzproteins enthielt. Es ist der sogenannte Vektor pRT100mod::AcGFP::MCS (vergleiche Abb. 3.1 C), welcher von Dr. Martin Schattat geplant und während der vorangegangenen Diplomarbeit (Rödel, 2007) erstellt wurde. Das in dem Vektor enthaltene Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP) stammt aus der Gürtelqualle *Aequorea coerulescens* und ist in seinen Eigenschaften dem „ursprünglichen" GFP aus *Aequorea victoria* (AvGFP, Prasher *et al.* (1992)) sehr ähnlich, liegt aber im Gegensatz zu diesem nur als echtes Monomer in der Zelle vor (Veith und Veith, 2005) und sorgt damit nicht für eventuelle unerwünschte Dimerisierungsartefakte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei weitere Fluoreszenzproteine (TagRFP, eCFP und eYFP) gewählt, um für spätere *Co*-Lokalisationsstudien geeignete Kombinationsmöglichkeiten zu schaffen. Dabei eignet sich das TagRFP, eine Mutante des rot-fluoreszierenden Proteins aus der Seeanemone *Entacmaea quadricolor* (Merzlyak *et al.*, 2007), auf Grund seiner spektroskopischen Eigenschaften für *Co*-Lokalisationsstudien in Kombination mit AcGFP. Eine weitere geeignete Kombination zweier Fluoreszenzproteine ist die Kombination von eCFP und eYFP. Es handelt sich bei eCFP um eine cyan fluoreszierende Variante und bei eYFP um eine gelb fluoreszierende Variante des Proteins GFP aus *Aequorea victoria* (Gurskaya *et al.*, 2003). Die Eignung der beiden Kombinationsvarianten (AcGFP/TagRFP & eCFP/eYFP) auf Grund ihrer spektroskopischen Eigenschaften wird in Abschnitt 3.3 beschrieben.

Die codierenden Sequenzen, bis auf das jeweilige Stop-Codon, der ausgewählten Fluoreszenzproteine wurden jeweils anstelle des AcGFPs in den pRT100mod kloniert. Dazu wurde aus dem pRT100mod::AcGFP::MCS das AcGFP mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Bsh*TI und *Kpn*2I ausgeschnitten. Da diese Restriktionsendonukleasen zueinander kompatible Enden bilden, ergab sich durch anschließende Ligation zusätzlich zu den geplanten pRT100mod::FP::MCS-Varianten der pRT100mod::MCS (siehe Abb. 3.1 B), welcher im Vergleich zum pRT100mod zwanzig statt drei Restriktionsendonukleaseschnittstellen in seiner MCS beinhaltet. Der pRT100mod::MCS stellt ein weiteres nützliches Hilfsmittel für andere Klonierungen dar.

In das mit *Bsh*TI-&-*Kpn*2I-geschnittene und dephosphorylierte Plasmid wurde jeweils eines der ebenfalls mit *Bsh*TI und *Kpn*2I geschnittenen Fragmente der Fluoreszenzfarbstoffgene eingesetzt. Für die Fluoreszenzproteine eCFP und eYFP konnte die codierende Sequenz jeweils direkt aus den Plasmiden pECFP-N1 bzw. pEYFP-N1 (siehe Tab. 7.10) ausgeschnitten werden. Für das Fluoreszenzprotein TagRFP war eine PCR nötig, um bei der Amplifikation die Restriktionsendonukleaseschnittstellen mit Hilfe von geeigneten Oligonukleotiden (siehe Tab. 7.9) an die codierende Sequenz anzufügen.

Eine Übersicht über den Aufbau der entstandenen pRT100mod::FP::MCS-Varianten und des Ausgangsplasmid ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die dazugehörigen Vektorkarten befinden sich als pdf-Dateien auf dem Datenträger im Anhang.

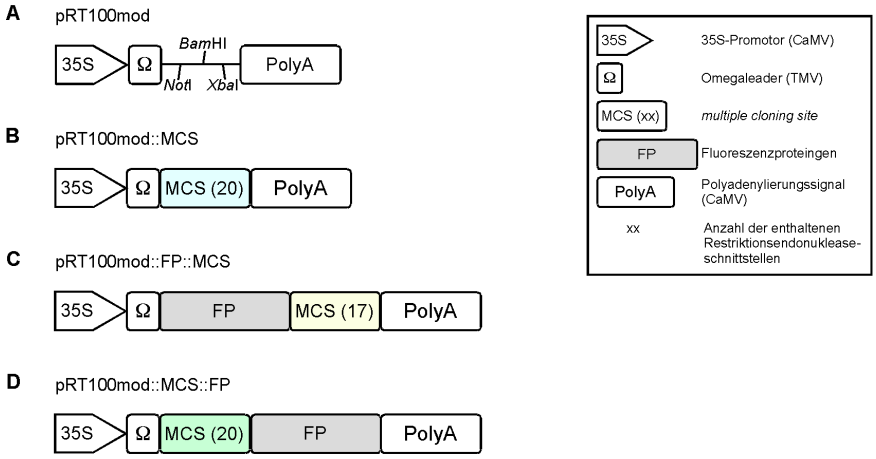

Abbildung 3.1.: Schematische Übersicht über die erstellten pRT100mod-Varianten. **A** - Ausgangsplasmid: pRT100mod (Überlacker und Werr, 1996); **B** - pRT100mod::MCS; **C** - pRT100mod::FP::MCS; **D** - pRT100mod::MCS::FP. Verschiedene MCS sind verschiedenfarbig dargestellt.

3.2. Generierung eines Vektorsets für *C*-terminale FP-Fusionen

Für die geplante Erstellung Fluoreszenzprotein-markierter *tail*-Konstrukte der Klasse-XI-Myosine sind die in Abschnitt 3.1 beschriebenen pRT100mod::FP::MCS-Varianten das geeignete Expressionssystem. Um später auch *Co*-Lokalisationexperimente mit geeigneten Kompartimentmarkern durchführen und die gleiche Expressionskassette nutzen zu können, war es nötig eine Kombination von Fluoreszenzproteingen mit MCS am 5'-Ende zu generieren, da die Kompartimentmarker nicht zwangsläufig alle funktionstüchtig *C*-terminal an ein Fluoreszenzprotein fusioniert werden können.

Aus diesem Grund wurden, zu den bis dahin erstellten pRT100mod::FP::MCS-Varianten (siehe Abb. 3.1 C), pRT100mod::MCS::FP-Varianten geplant. Diese wurden unter Zuhilfenahme des zu diesem Zweck erstmals eingesetzten pRT100mod::MCS generiert. Mit Hilfe der darin enthaltenen Restriktionsendonukleaseschnittstellen *Bam*HI und *Xba*I wurden die Fluoreszenzproteingene jeweils an das 3'-Ende der MCS kloniert. Die Fluoreszenzproteingene wurden aus den Vektoren pAcGFP-N1, pECFP-N1, pEYFP-N1 und pTagRFP-N mit Hilfe von PCR amplifiziert und durch geeignete Oligonukleotide (siehe Tab. 7.9) mit den Restriktionsendonukleaseschnittstellen versehen. Durch jeweilige Ligation der mit *Bam*HI- und *Xba*I-geschnittenen PCR-Produkte in den ebenfalls mit *Bam*HI- und *Xba*I-geschnittenen pRT100mod::MCS entstanden die vier pRT100mod::MCS::FP-Varianten (siehe Abb. 3.1 D). Die dazugehörigen Vektorkarten sind ebenfalls als pdf-Datei auf dem Datenträger im Anhang befindlich.

3.3. Mikroskopischer Test der Fluoreszenzproteinkombinationen für *Co*-Lokalisationsexperimente

Seit der ersten Klonierung des GFPs aus *Aequorea victoria* (AvGFP) 1992 (Prasher *et al.*, 1992) ist die Anwendung von Fluoreszenzproteinen stetig gewachsen, sei es als Reporterprotein für *in vivo*-Markierungen von Organellen oder Proteinen, als Reportergen für Gentherapiestudien oder in sogenannten FRET-(*fluorescence resonance energy transfer*)-Experimenten (Veith und Veith, 2005; Bell *et al.*, 2007). Neben AvGFP gibt es heute ein ganzes Spektrum an Fluoreszenzproteinen sowohl aus anderen Organismen, als auch Mutanten des AvGFPs (Wenck, 2011), welche es erlauben verschiedenste Kombinationen dieser zu benutzen, um gleichzeitig mehrere unterschiedliche Strukturen zu markieren. Bei der Verwendung mehrerer Fluoreszenzproteine gleichzeitig muss sichergestellt werden, dass diese optisch einwandfrei voneinander unterschieden werden können. In Abbildung 3.2 sind verschiedene Fluoreszenzproteine mit ihren Anregungs- und Emissionsspektren abgebildet. Es ist zu erkennen, dass diese sich zum Teil sehr stark überlagern. Regt man das GFP aus dem Beispiel in einem Wellenlängenbereich von 450-490 nm an, regt man gleichzeitig CFP, YFP und zu einem kleinen Teil auch das rotfluoreszierende Protein tdTomato (Shaner *et al.*, 2004) an. Außerdem überlagern sich die Emissionsspektren, so dass unabhängig von der gleichzeitigen Anregung verschiedener FP in einem bestimmten Wellenlängenbereich gleichzeitig Fluoreszenz von mehr als einem Fluoreszenzprotein detektiert werden kann. Dieser Vorgang wird „*Crosstalk*" genannt. Man muss also Kombinationen so wählen, dass sich die Anregungs- und Emissionsspektren der Fluoreszenzproteine möglichst wenig überlagern und geeignete optische Instrumente einsetzen, um die Signale bestmöglich von einander zu separieren und geeignete Kontrollen mitführen.

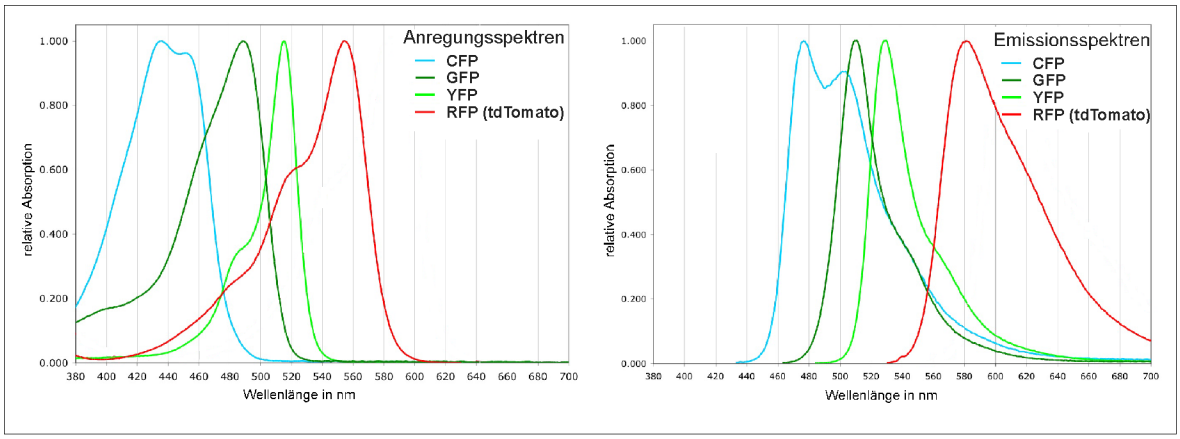

Abbildung 3.2.: Anregungs- und Emissionsspektren verschiedener Fluoreszenzproteine. Die Grafik wurde entnommen und geändert nach der Homepage „The Nebenführ Lab" (Nebenführ, 2010).

Mit den zur Verfügung stehenden Fluoreszenzproteinen sind die beiden Kombinationen AcGFP/TagRFP und eCFP/eYFP denkbar. Für den Praxistest der Kombinationsmöglichkeiten muss man die Anregungs- und Emissionsmaxima der Fluoreszenzproteine genau beachten, um die geeigneten mikroskopischen Einstellungen einsetzen zu können:

Fluoreszenzprotein	Anregungsmaximum	Emissionsmaximum
eCFP	433 nm	475 nm
AcGFP	480 nm	505 nm
eYFP	514 nm	527 nm
TagRFP	555 nm	584 nm

Tabelle 3.1.: Übersicht über die Anregungs- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluoreszenzproteine

Um die theoretisch möglichen Kombinationsmöglichkeiten praktisch zu testen und um sogenannten „*Crosstalk*" auszuschließen, wurden die gewählten Fluoreszenzproteinkombinationen mit den zur Verfügung stehenden optischen Geräte (siehe Tab. 7.15) analysiert. In Abbildung 3.3 sind mikroskopische Aufnahmen jedes verwendeten Fluoreszenzproteins zu sehen. Es wurde dabei immer eine Aufnahme des jeweiligen Fluoreszenzproteins mit den Einstellung (siehe Tab. 7.15) für GFP, CFP, RFP und YFP gemacht.

Im Fall des AcGFPs ist zu erkennen, dass es, neben der erwarteten Darstellbarkeit im GFP-Kanal, sowohl mit den Konfigurationen für CFP, als auch für YFP ein schwaches Signal ergibt. Lediglich im RFP-Kanal ist kein Signal zu detektieren. Für das TagRFP ergibt sich, dass es außer im RFP-Kanal lediglich noch im YFP-Kanal darstellbar ist. Die Kombination aus AcGFP und TagRFP ist demnach eine geeignete Kombination ohne das Auftreten des sogenannten „*Crosstalks*".

Das eCFP kann mit den gewählten Einstellungen im CFP-Kanal und zusätzlich im GFP-Kanal dargestellen werden; im RFP- und YFP-Kanal kann dagegen kein Signal detektiert werden. Für eYFP ist ein Signal der transformierten Zelle im YFP-, GFP- und RFP-Kanal zu erkennen, hingegen nicht im CFP-Kanal. Da eCFP nicht im YFP-Kanal und eYFP nicht im CFP-Kanal dargestellt werden kann, ist die Kombination aus eCFP und eYFP eine weitere geeignete Möglichkeit für *Co*-Lokalisationsstudien. Da zwischen schwachen TagRFP-Signalen und der in grünen, pflanzlichen Geweben vorkommenden Chlorophyllfluoreszenz ein starker „*Crosstalk*" zu Stande kommen kann, ist die Kombination von TagRFP und AcGFP weniger gut geeignet als jene von eCFP und eYFP, welche somit die bevorzugte Kombination für diese Arbeit darstellt.

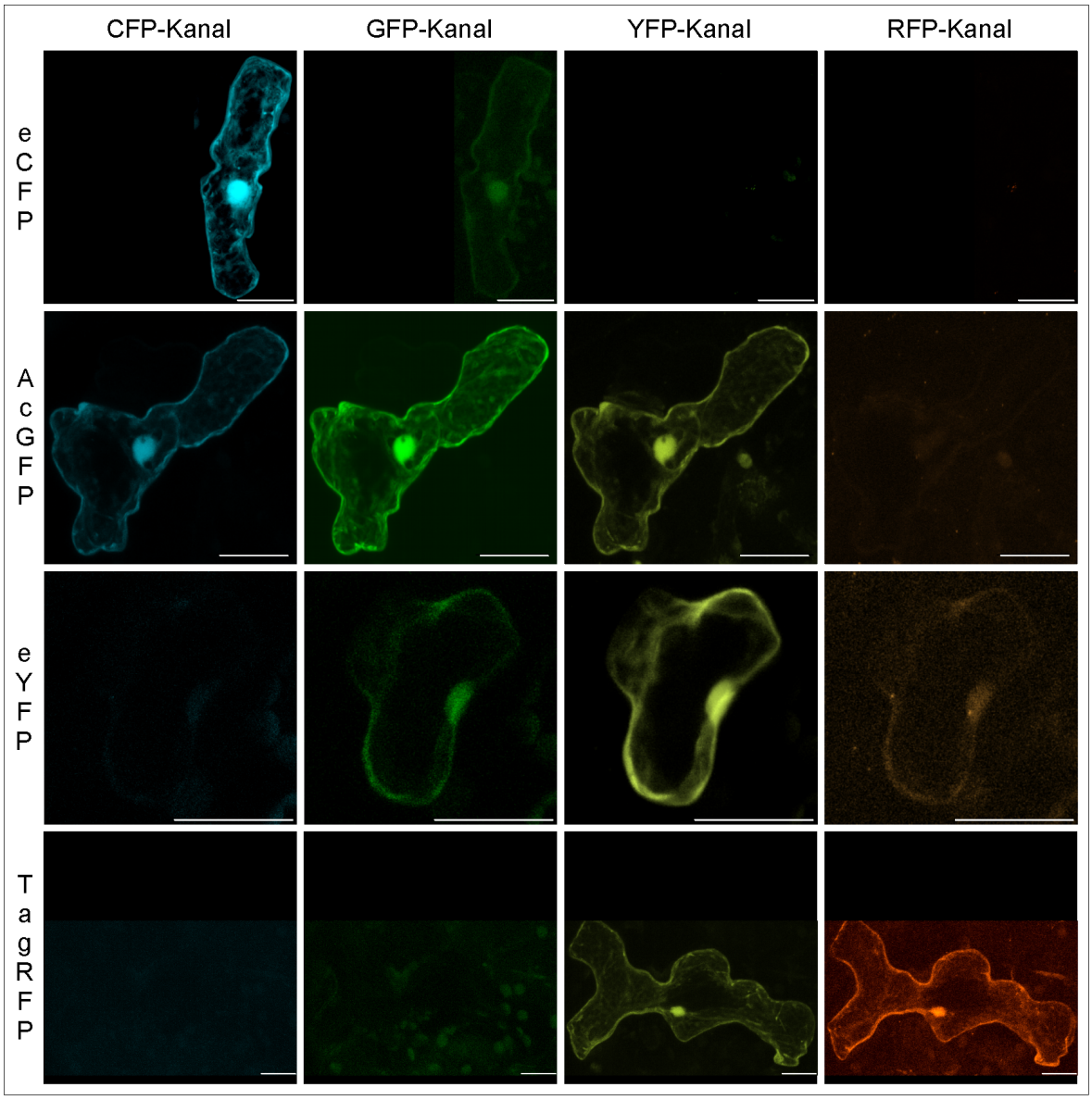

Abbildung 3.3.: Detektierbarkeit aller eingesetzten FP mit den verschiedenen, verwendeten optischen Einstellungen. Es ist jeweils eine durch biolistische Transformation transient transformierte Zelle der oberen Blattepidermis von *Arabidopsis thaliana,* untersucht mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie, in Maximumprojektion abgebildet. Zur Transformation wurde jeweils eine der generierten pRT100mod::FP::MCS-Varianten verwendet. Die Verteilung des jeweiligen FPs erstreckt sich über das Cytoplasma und den Zellkern, wie es für unfusionierte FP üblich ist. Abgebildet ist jeweils jedes verwendete Fluoreszenzprotein aufgenommen mit allen eingesetzten Fluoreszenzkonfigurationen. eCFP ist dabei mit den Einstellungen für CFP und GFP zu beobachten. AcGFP ist mit den Einstellungen für GFP, CFP und YFP detektierbar. eYFP kann in den Kanälen für YFP, GFP und RFP abgebildet werden. Und TagRFP lässt sich mit den Konfigurationen für RFP und YFP darstellen. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 20 µm.

3.4. Generierung eines Markervektorsets

Nach der Fertigstellung des Vektorsets (siehe 3.1 und 3.2) wurde dieses eingesetzt, um einerseits die *tail*-Konstrukte der Klasse-XI-Myosine *N*-terminal mit einem FP zu versehen und andererseits um ein weiteres Set an Vektoren zu generieren. Die geplanten Experimente beinhalteten *Co*-Lokalisationsstudien der Myosin-*tail*-Konstrukte mit verschiedenen Kompartimenten, welche nur mit geeigneten Markern durchführbar sind. Das notwendige Markervektorset wurde basierend auf den pRT100mod-Varianten erstellt, um in den *Co*-Transformationsexperimenten die selben Vorraussetzungen und die gleiche Expressionskassette, wie bei den Myosin-*tail*-Konstrukten, zu haben.

In der Literatur sind schon viele sogenannte Marker beschrieben, z. B. für ER, Golgi, Chloroplasten, Peroxisomen, Plasmamembran, Tonoplast, Tubulin, Aktin, Mitochondrien, Oleosomen, Endosomen *etc.*. In einem Übersichtsartikel von Dhanoa *et al.* (2006) sind alle bis zu damaligen Zeitpunkt bekannten Marker aufgelistet. Explizit für *Arabidopsis* wurden Marker von Nelson *et al.* (2007) beschrieben. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf einige Ausgewählte, wie Peroxisomen, Mitochondrien, Endosomen, Golgi, Oleosomen und Tubulin, welche nach ihrer Klonierung in eine der pRT100mod-FP-Varianten auf ihre Eignung zur biolistischen Transformation von *Arabidopsis thaliana* getestet wurden.

Die Marker, welche in „*A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in* Arabidopsis *and other plants*“ (Nelson *et al.*, 2007) beschrieben sind, lagen zu Beginn der Arbeiten in den von den Autoren veröffentlichten Vektoren vor. Mit Hilfe des Vektors, der die Information für einen Peroxisomenmarker trägt, wurden die Vektoren pRT100mod::PTS1::eCFP und pRT100mod::PTS1::eYFP von Bianca Baudisch erstellt. In Abbildung 3.4 A ist das Ergebnis der Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit dem generierten pRT100mod::PTS1::eCFP dargestellt. Es sind Signale zu erkennen, welche in Größe und Form vergleichbar mit jenen aus der Publikation Nelson *et al.* (2007) sind. Der pRT100mod::PTS1::eCFP wurde daraufhin in folgenden *Co*-Lokalisationsstudien als Peroxisomen-Marker eingesetzt.

Ein weiterer Marker, welcher von den Autoren (Nelson *et al.*, 2007) vorgestellt wurde, ist ein Mitochondrienmarker basierend auf den ersten 29 Aminosäuren der Cytochrom C-Oxidase IV (ScCOX4) aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dieser wurde ebenfalls von Bianca Baudisch in die pRT100mod::MCS::FP-Varianten umkloniert. Die Tests nach biolistischer Transformation von *Arabidopsis thaliana* ergaben allerdings, im Gegensatz zu den Ergebnissen der Autoren (Nelson *et al.*, 2007), dass eine Akkumulation des Konstrukts im Cytoplasma erfolgt und lediglich in etwa jeder zehnten Zelle punktförmige Signale zu beobachten sind (Daten nicht gezeigt). Dieser Marker ist demnach ungeeignet für diese Arbeit.

Auch der pRT100mod::c1(1-77)::eCFP, welcher die Information der ersten 77 Aminosäuren des Cytochrom C1 aus *Solanum tuberosum* (Kartoffel) trägt und in *Pisum sativum* sowohl in Mitochondrien, als auch in Plastiden importiert wird (Rödiger, 2010), war nicht für die Markierung von Mitochondrien und Plastiden[2] in *Arabidopsis thaliana* geeignet und

[2] Auf einen Marker für Plastiden wurde in dieser Arbeit verzichtet, da diese auf Grund ihrer Form, Größe und Chlorophyllfluoreszenz identifiziert werden können.

führte lediglich zu einer cytosolichen Lokalisation, d. h. er markiert Cytoplasma und den Zellkern (Daten nicht gezeigt). Weitere Bemühungen einen geeigneten Mitochondrienmarker für *Arabidopsis* zu finden, blieben bis zum Abschluss der praktischen Arbeiten ohne Erfolg.[3]

Im folgenden wurde versucht ein Endosomenmarker zu generieren. Dabei wurden nach den Angaben der Autoren Ueda *et al.* (2001) und Uemura *et al.* (2004) zwei *Arabidopsis thaliana*-Endosomenmarker in die pRT10mod::MCS::FP-Varianten kloniert. Die beiden Markerproteine AtVamp727 und Ara6 vermögen nicht als chimäres Fusionsprotein mit einem der vorhandenen Fluoreszenzproteine distinkte Strukturen zu markieren (Daten nicht gezeigt).

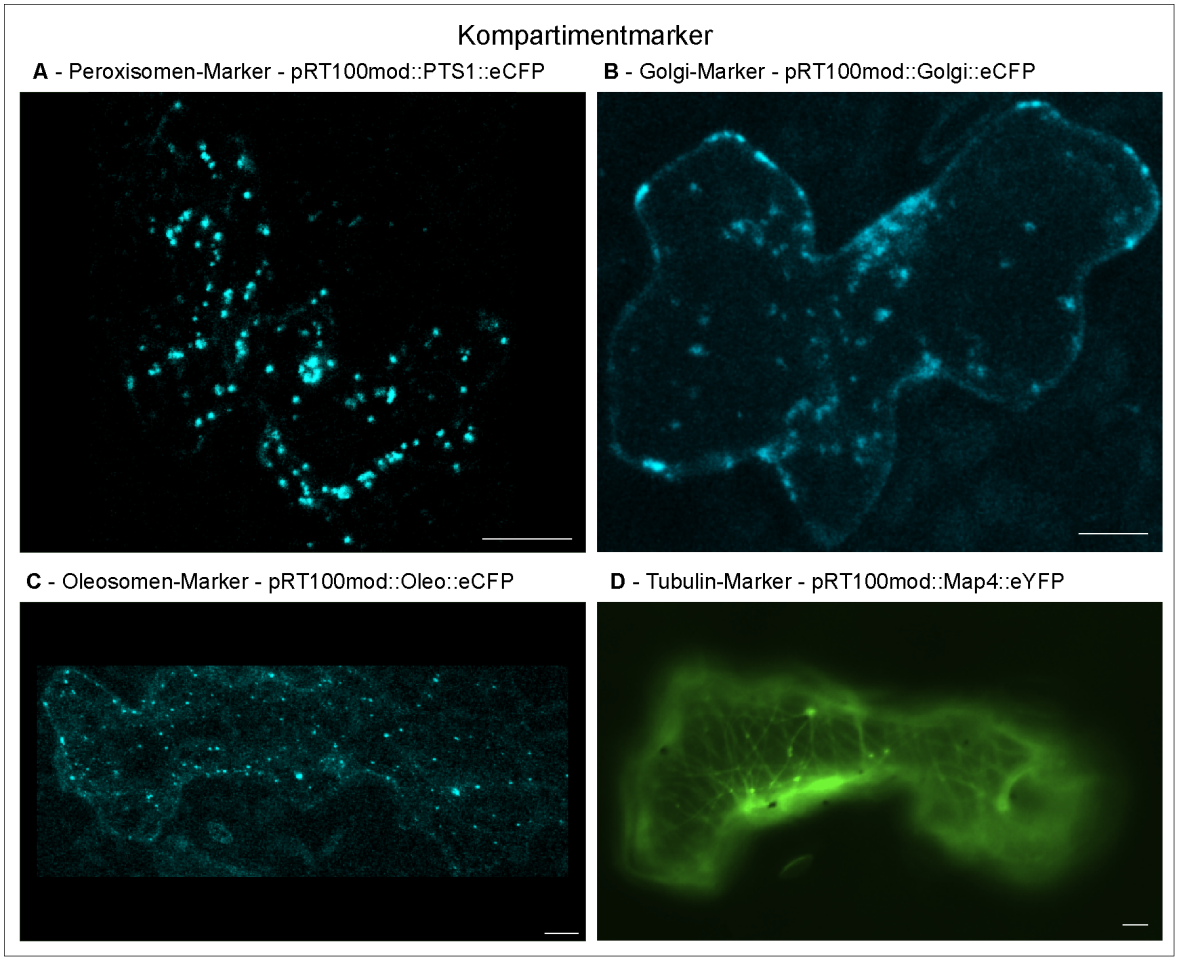

Abbildung 3.4.: Übersicht über die eingesetzten Kompartimentmarker. Es ist jeweils eine durch biolistische Transformation transient transformierte Zelle der oberen Blattepidermis von *Arabidopsis thaliana,* untersucht mit Epifluoreszenzmikroskopie (**D**) bzw. konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie in Maximumprojektion (**A-C**), abgebildet. Zur Transformation wurde jeweils eine der generierten pRT100mod::Marker::eCFP-Varianten (**A**-C) bzw. pRT100mod::Marker::eYFP-Varianten (**D**) verwendet. **A:** Die *Arabidopsis thaliana*-Zelle wurde mit pRT100mod::PTS1::eCFP transformiert. **B:** Die Zelle wurde mit pRT100mod::Golgi::eCFP transformiert. **C:** Der pRT100mod::Oleo::eCFP wurde zu Transformation dieser Zelle verwendet. **D:** Es ist eine *Arabidopsis thaliana*-Zelle zu sehen, welche mit pRT100mod::eYFP::Map4 transformiert wurde. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 10 µm.

Die Suche nach einem geeigneten Golgi-Marker war erfolgreich. Es konnte sowohl der Marker, welcher von Nelson *et al.* (2007) vorgestellt wurde, als auch jener, welcher in dem Artikel von Pagny *et al.* (2003) beschrieben ist, in die pRT100mod::MCS::FP-Varianten eingebracht werden.

[3] Der Einsatz von Farbstoffen, wie etwa MitoTracker®, um Mitochondrien *in vivo* anzufärben, blieb ebenfalls erfolglos.

Die entstanden pRT100mod::Golgi::FP-Vektoren wurden zur biolistischen Transformation von *Arabidopsis thaliana* genutzt. In allen transformierten Zellen sind punktförmige Signale zu sehen. Abbildung 3.4 B zeigt eine der transformierten Zellen. Diese wurde mit dem pRT100mod::Golgi2::eCFP, basierend auf dem von Pagny *et al.* (2003) beschriebenen Golgi-Marker, transformiert.

Da die beiden in dieser Arbeit generierten Golgi-Marker-Vektoren im *Co*-Lokalisationstest in *Arabidopsis thaliana* [4] die selben Strukturen mit einem Fluoreszenzsignal versehen (Daten nicht gezeigt), ist davon auszugehen, dass beide Golgi-Vesikel markieren.

Oleosomen sind Organellen zur Lipidspeicherung umgeben von einem Monolayer in welchen die sogenannten Oleosine eingelagert sind. Zur Herstellung eines Oleosomenmarkers wurde ein Oleosin, wie bei Wahlroos *et al.* (2003) beschrieben, in die pRT100mod::MCS::FP-Varianten kloniert. Der pRT100mod::Oleo::eCFP wurde zur Transformation der in Abbildung 3.4 C dargestellten *Arabidopsis thaliana*-Zelle verwendet. Man sieht viele unterschiedlich große, punktförmige Strukturen, welche CFP-Fluoreszenzsignale tragen, wie sie auch von den Autoren Wahlroos *et al.* (2003) beobachtet wurden. Die im Artikel gezeigte Zelle trägt ebenfalls viele unterschiedlich große, punktförmige, GFP-fluoreszenzmarkierte Strukturen. Die beiden Zellen sind nur bedingt miteinander vergleichbar, weil sie von zwei verschiedenen Pflanzenspezies stammen, aber da sich die Erscheinungsbilder gleichen, wurde der generierte Oleosomenmarker in dieser Arbeit eingesetzt.

Der letzte Marker, welcher im Rahmen der experimentellen Arbeiten eingesetzt wurde, ist ein Tubulinmarker mit Namen Map4. Map4 stammt von *microtubule-associated protein* 4 und ist demnach ein Protein, welches an Mikrotubuli assoziiert gefunden werden kann. In Abbildung 3.4 D ist eine *Arabidopsis thaliana*-Zelle zu sehen, welche mit pRT100mod::eYFP::Map4 transformiert worden ist. Es sind über die ganze Zelle Filamente markiert, wie in der Zelle einer Ackerbohnen (*Vicia faba*), welche von Marc *et al.* (1998) beobachtet wurde. Die pRT100mod::FP::Map4-Varianten[5] wurde als Tubulinmarker im Rahmen dieser Arbeit genutzt.

Anhand der hier vorgestellten Marker wird deutlich, dass Vortest nötig und sinnvoll sind, da nicht alle das gewünschte bzw. erwartet Ergebnis lieferten und zur transienten Transformation von *Arabidopsis thaliana*-Zellen geeignet sind (vgl. Mitochondrienmarker).

[4] Dafür wurden die Zellen gleichzeitig mit pRT100mod::Golgi1::eCFP (basierend auf Nelson *et al.* (2007)) und pRT100mod::Golgi2:eYFP (basierend auf Pagny *et al.* (2003)) transformiert.

[5] Es wurden alle vier möglichen pRT100mod::FP::Map4-Varianten erstellt.

4. Untersuchung der Klasse-XI-Myosine von *Arabidopsis thaliana*

4.1. Klonierung der Myosin-*tail*-Konstrukte

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist für die Untersuchung der *Cargo*-Spezifität eines Myosins ein Konstrukt, bestehend aus der *coiled-coil*- und der *globular-tail*-Domäne, genannt *tail*-Konstrukt, hinreichend. Aus diesem Grund und da dies bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit (Rödel, 2007) gezeigt werden konnte, werden in der vorliegenden Arbeit die *Arabidopsis thaliana*-Klasse-XI-Myosine auf ihre *Cargo*-Spezifität anhand derartiger *tail*-Konstrukte analysiert. Zur Untersuchung der *Cargo*-Spezifität bzw. der damit verbundenen subzellulären Lokalisierung *in vivo* werden jene eYFP-Myosin-*tail*-Konstrukte eingesetzt, welche in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt sind. Es ist ein Myosin-Dimer (A), ein Myosin-Monomer (B), ein eYFP-Myosin-*tail*-Monomer (C) und auch ein zu erwartendes eYFP-Myosin-*tail*-Dimer (D) abgebildet.

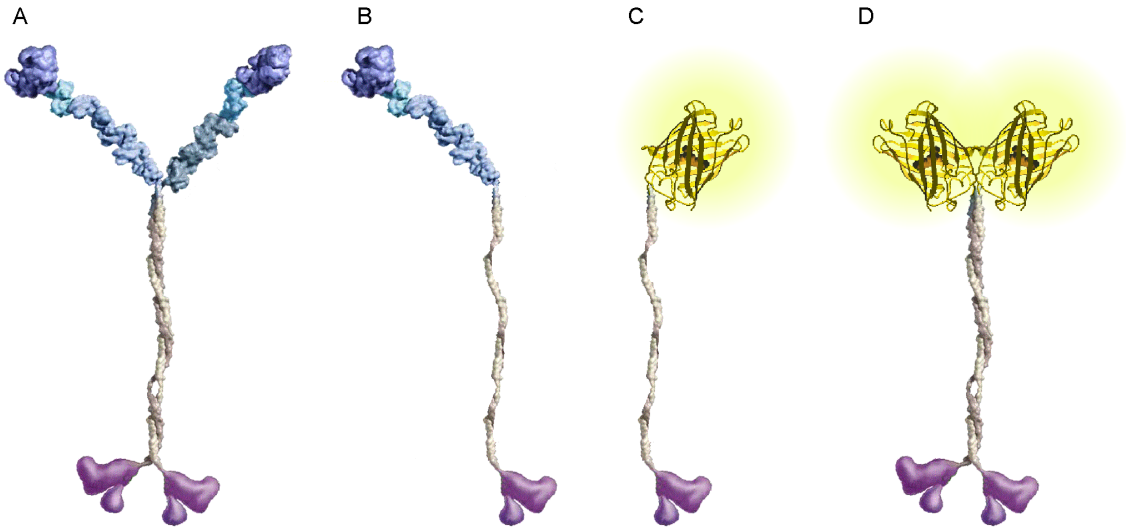

Abbildung 4.1.: Schematische Darstellung von Klasse-XI-Myosinen und eYFP-*tail*-Konstrukten. In **A** ist ein Myosin-XI-Dimer, in **B** ein Myosin-XI-Monomer, in **C** ein eYFP-Myosin-*tail*-Monomer und in **D** ein eYFP-Myosin-*tail*-Dimer dargestellt. Die Proportionen zwischen eYFP und Myosin-*tail* stimmen nicht überein, sie dienen nur der Veranschaulichung der Konstrukte. Die Abbildung wurde nach Vale (2003a) gestaltet. Die Darstellung des eYFPs entspricht der Struktur des eGFP (pdb:2Y0G) aus der Proteindatenbank pdb.

Zu Beginn der Arbeiten mussten von allen 13 bekannten *Arabidopsis thaliana*-Klasse-XI-Myosinen (Reddy und Day, 2001) die *tail*-Konstrukte kloniert werden. Dazu wurde aus *Arabidopsis thaliana mRNA* isoliert und durch reverse Transkription *cDNA* hergestellt. Diese wurde eingesetzt, um über PCR mit den passenden Oligonukleotiden (siehe Tab. 7.9) die

tail-Konstrukte zu amplifizieren und mit Restriktionsendonukleaseschnittstellen zu versehen, welche zur Klonierung in den pRT100mod::eYFP::MCS *in frame* geeignet waren. Bei der Klonierung der *tail*-Konstrukte wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass neben der *coiled-coil*- und der *globular-tail*-Domäne zusätzlich ein IQ-Motiv mit amplifiziert wurde, welches als eine Art "Linker" zwischen Fluoreszenzprotein und *tail* dient. Dadurch soll eventuellen Faltungsartefakten vorgebeugt werden, welche möglicherweise die Dimerisierung zweier *tail*-Konstrukte (siehe Abb. 4.1 D) verhindern könnten.

Die Amplifizierung der *tail*-Domänen, die darauf folgende Klonierung in den pRT100mod::-eYFP::MCS und die anschließende Sequenzierung[1] ergab, dass für elf der dreizehn Klasse-XI-Myosine die Vorhersage[2] zutreffend ist (siehe Tab. 4.1) und lediglich zwei *tail*-Konstrukte davon abweichen (siehe Tab. 4.2).

Myosin-*tail*-Konstrukt	Gencode	Referenz	Sequenzvorhersage
MyaI*tail*	AT1g17580	Theologis *et al.* (2000)	bestätigt
MyaII*tail*	AT5g43900	Tabata *et al.* (2000)	bestätigt
XI-A*tail*	AT1g04600	Theologis *et al.* (2000)	bestätigt
XI-B*tail*	AT1g04160	Theologis *et al.* (2000)	bestätigt
XI-C*tail*	AT1g08730	Theologis *et al.* (2000)	bestätigt
XI-D*tail*	AT2g33240	Lin *et al.* (1999)	abweichend, siehe Tab. 4.2
XI-E*tail*	AT1g54560	Theologis *et al.* (2000)	bestätigt
XI-F*tail*	AT2g31900	Lin *et al.* (1999)	bestätigt
XI-G*tail*	AT2g20290	Lin *et al.* (1999)	bestätigt
XI-H*tail*	AT4g28710	Mayer *et al.* (1999)	bestätigt
XI-I*tail*	AT4g33200	Mayer *et al.* (1999)	bestätigt
XI-J*tail*	AT3g58160	Salanoubat *et al.* (2000)	abweichend, siehe Tab. 4.2
XI-K*tail*	AT5g20490	Tabata *et al.* (2000)	bestätigt

Tabelle 4.1.: Übersicht über die Klasse-XI-Myosin-*tail*-Konstrukte und deren Sequenzübereinstimmung bezüglich der Vorhersage. Aufgeführt sind die Namen der Myosin-*tail*-Konstrukte, deren Gencode, die dazugehörige Referenz und die Übereinstimmung ihrer Sequenz zur Vorhersage.

Die *tail*-Domänen der Myosine XI-D und XI-J weisen Abweichungen in ihrer Sequenz bezüglich der Vorhersage auf. So konnten für XI-D zwei Varianten amplifiziert werden, welche beide nicht mit der Vorhersage übereinstimmen und somit auch zu Unterschieden auf Proteinebene führen (siehe Tab. 4.2).

Das erhaltene Konstrukt XI-D2*tail* wurde auch von Avisar *et al.* (2009) gefunden. Die Autoren diskutieren diese Variante als *Splicing*-Variante. Durch differentielles *Splicen* wäre erklärbar, warum in diesem Bereich mehrere Sequenzvariationen erhalten wurden.

Die *tail*-Domäne für XI-J wurde mehrfach aus *cDNA* unterschiedlicher Organe von *Arabidopsis thaliana* (col 5-13) amplifiziert. Die verschiedenen Versuche hatten alle zum Ergebnis, dass zehn Nukleotide im Vergleich zur Vorhersage fehlen, es deshalb eine Leserasterverschiebung gibt und das resultierende Protein statt der vorhergesagten Länge von 1243 Aminosäuren nur 1176 Aminosäuren aufweist. Der Unterschied von 67 Aminosäuren hat Auswirkungen auf den

[1] Die Referenzsequenzen wurden mit Hilfe der Gencodes und NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) ermittelt.

[2] Die zum Zeitpunkt der Sequenzierung in NCBI gefundenen Sequenzen waren Vorhersagen basierend auf den Arbeiten von Theologis *et al.* (2000); Lin *et al.* (1999); Salanoubat *et al.* (2000); Mayer *et al.* (1999); Tabata *et al.* (2000).

strukturellen Aufbau des resultierenden Proteins. Diese sind in Abbildung 4.2 zu sehen.

Myosin-*tail*-Konstrukt	Gencode°	Vorhersage	erhaltene Sequenz
XI-D1*tail*	AT2g33240.1	1255QKSLDLFVFMYLFQP1269	1255QP1256
XI-D2*tail*	AT2g33240.1	1255QKSLDLFVFMYLFQP1269	1255QVSFTRPPP1263*
XI-J*tail*	AT3g58160.1	1139NRLLYSMSDQFSQLKSILR SPSMSASTMASAPVVRDDLAD SSENSEASSSDSDFTFPAPSPSS DNFSTFNPNQLQVIVQDLSTT EAKGTESYDSDKEGGFEDY F1243	1139NSVFQVVIFYVGPI LATEVHLEISFYVSFNN GLSASCA1176

Tabelle 4.2.: Übersicht über die von der Vorhersage abweichenden Klasse-XI-Myosin-*tail*-Domänen und deren tatsächlichen Sequenzen. Aufgeführt sind die Namen der Myosin-*tail*-Domänen, deren Gencode, die Aminosäuresequenz der Vorhersage im abweichenden Bereich und die tatsächliche Aminosäuresequenz der Myosin-*tail*-Domänen in diesem Bereich. In rot sind die übereinstimmenden und in schwarz die abweichenden Aminosäuren dargestellt. Das erhaltene Konstrukt XI-D2*tail* (*) entspricht in seiner Sequenz jenem, welches Avisar *et al.* (2009) bei ihren Analysen für XI-D anstelle der Vorhersage erhielten. (°) Der Gencode wurde um die NCBI-Versionsnummer (.1) erweitert, zur genauen Definition der Proteinsequenz.

In 4.2 A ist das vorhergesagte, authentische Protein dargestellt, welches laut der Vorhersage von SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*, siehe 7.13), eine Motordomäne gefolgt von sechs IQ-Motiven, zwei *coiled-coil*-Bereichen und zwei sogenannten *low-complexity*-Bereichen aufweist. Diese *low-complexity*-Bereiche zeichnen sich durch eine geringe Diversität in ihrer Aminosäuresequenz aus (Coletta *et al.*, 2010) und sind in Myosinen bekannt dafür helikale Strukturen auszubilden (Nandi und Ramachandran, 2003). Über die genaue Funktion der *low-complexity*-Bereiche bei Myosinen ist jedoch nichts bekannt. Allgemein gilt, dass *low-complexity*-Regionen die Fähigkeit eines Proteins erhöhen Assozitiationen zu anderen Proteinen einzugehen (Coletta *et al.*, 2010).

Der Aufbau der beiden Proteine ist nahezu identisch, allerdings fehlen die *low-complexity*-Bereiche bei dem Domänenmodell für das erhaltene Protein XI-J (siehe 4.2 B). Demnach könnten dem vorliegenden, zu untersuchenden XI-J*tail*-Konstrukt die nötigen *Cargo*-Bindestellen fehlen.

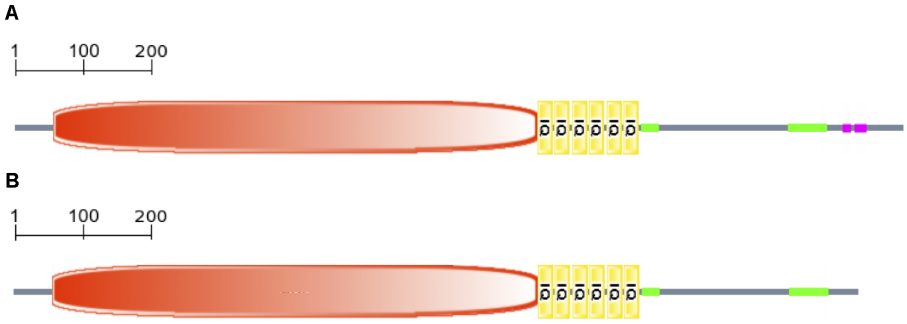

Abbildung 4.2.: Darstellung der mit SMART vorhergesagten Domänen für das Klasse-XI-Myosin XI-J. Die Motordomänen sind in rotorange, die IQ-Motive in gelb, die *coiled-coil*-Bereiche in grün und die *low-complexity*-Bereiche in pink dargestellt. **A** zeigt das Protein mit den Domänen, welches auf Basis der vorhergesagten Sequenz mit SMART berechnet wurde. **B** zeigt das Protein mit Domänen, welches auf Basis der tatsächlich gefundenen Sequenz (siehe 4.2) mit SMART berechnet wurde. Im Vergleich zu A sind keine *low-complexity*-Bereiche vorhanden.

Nach Klonierung und Sequenzierung standen 14 statt erwarteter 13 *tail*-Konstrukte zur weiteren Analyse bereit, deren Ergebnisse in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

4.2. Analyse der Myosin-*tail*-Konstrukte mittels biolistischer Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Es war geplant, die vierzehn erhaltenen Myosin-*tail*-Konstrukte auf ihre subzelluläre Lokalisierung im authentischen System zu untersuchen. Die Methode der Wahl dafür war die biolistische Transformation von *Arabidopsis thaliana*. Bei dieser Methode wird Plasmid-*DNA*, welche die kodierenden Sequenzen der zu untersuchenden Konstrukte enthält, auf Goldkügelchen präzipitiert und mit Heliumdruck in das pflanzliche Gewebe geschossen, welches wenige Stunden später mikroskopisch untersucht werden kann.

Die biolistische Transformation hat einerseits den Vorteil, dass es sich um eine einfache, schnelle Methode handelt, die es erlaubt innerhalb von zwölf Stunden zu einem Ergebnis zu kommen. Andererseits birgt die Methode den Nachteil, dass nur die Epidermis des Laubblattes sicher zu transformieren ist und somit lediglich in diesem Gewebe die subzelluläre Lokalisierung untersucht werden kann. Dennoch kann die Methode erste Hinweise die *Cargo*-Spezifität der Myosin-*tail*-Konstrukte betreffend liefern.

Es wurden demnach alle vierzehn FP-Myosin-*tail*-Konstrukte nach biolistischer Transformation der Laubblattoberseite von *Arabidopsis thaliana* auf ihre Lokalisation in Epidermiszellen mit Hilfe konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie untersucht.Die dabei erhaltenen Lokalisationen sind in zwei Kategorien einteilbar, welche in den folgenden zwei Abschnitten genauer beschrieben werden. Es gibt Myosin-*tail*-Konstrukte, welche distinkte Strukturen markieren und demnach sicher eine *Cargo*-Spezifität aufweisen. Es gibt allerdings auch Myosin-*tail*-Konstrukte, die keine definierten Strukturen markieren und demnach scheinbar keine *Cargo*-Spezifität in Epidermiszellen der Laubblattoberseite haben.

4.2.1. Myosin-*tail*-Konstrukte mit cytosolischer Lokalisierung

Die Myosin-*tail*-Konstrukte der Myosine XI-A, XI-F, XI-G, XI-H und XI-J sind nach transienter Expression diffus im Cytosol bzw. diffus im Cytosol UND im Zellkern zu detektieren. Das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-J ist, wie schon bei der Klonierung, ein Sonderfall und zeigt je eine dieser beiden Verteilungen im ungefähren Verhältnis von 1:1.

In Abbildung 4.3 ist stellvertretend für jedes der oben genannten Myosin-*tail*-Konstrukte eine der beobachteten Zellen abgebildet. Man sieht, dass es sich um die cytosolische Verteilung handelt, da der sogenannte Cytoplasmasaum, welcher durch die Verdrängung des Cytosols durch die Vakuole an die Plasmamembran entsteht, starke Fluoreszenzsignale aussendet und der Raum, den die Vakuole einnimmt, ausgespart ist und somit keine Fluoreszenzsignale emittiert. Bei XI-A, XI-G und XI-J kann man zusätzlich die Vakuolen durchspannende Cytoplasmafäden anhand der Fluoreszenz erkennen. Das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-J, welches nur im Cytosol lokalisiert, akkumuliert zudem um den Zellkern, so dass dieser durch das Ausgespartsein ebenfalls sichtbar wird.

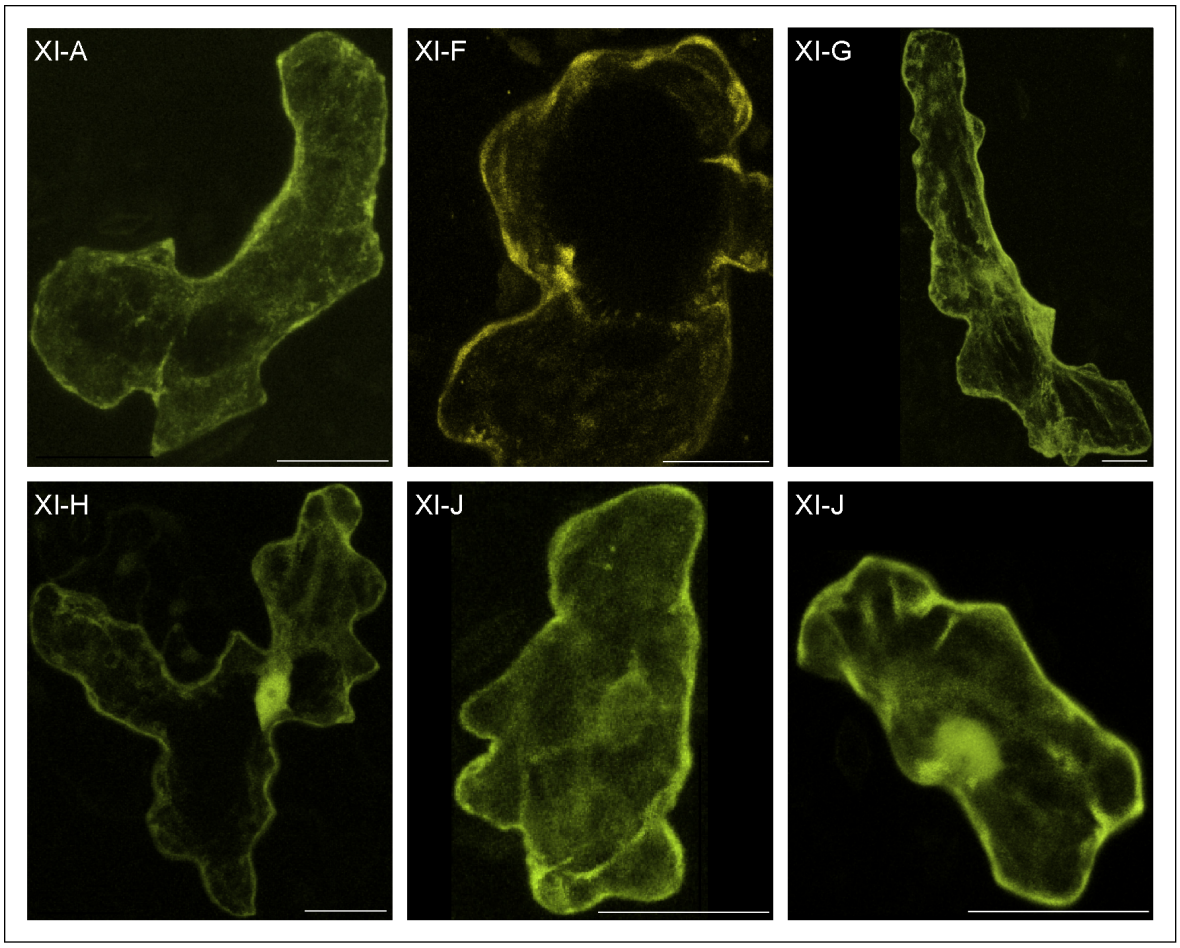

Abbildung 4.3.: Cytosolische Lokalisation von eYFP-Myosin-*tail*-Konstrukten. Es ist jeweils eine durch biolistische Transformation transient transformierte Zelle der oberen Blattepidermis von *Arabidopsis thaliana,* untersucht mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie, in Maximumprojektion abgebildet. Zur Transformation wurde jeweils eine der generierten pRT100mod::eYFP::XI-x*tail*-Varianten verwendet. Die Verteilung der eYFP-Myosin-*tail*-Konstrukte erstreckt sich für die Myosine XI-A, XI-F, XI-G und XI-H über das Cytoplasma. Für das eYFP-Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-J wurden zwei Verteilungen beobachtet. Einerseits war es nur im Cytoplasma zu detektieren, andererseits sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern, wie es für unfusionierte FP üblich ist. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 20 µm.

4.2.2. Myosin-*tail*-Konstrukte mit distinkter Lokalisierung

Neben den fünf cytosolisch lokalisierten Myosin-*tail*-Konstrukten gibt es noch neun weitere *tail*-Konstrukte, die untersucht wurden. Sie lokalisieren an distinkten Strukturen in Zellen der oberen Laubblattepidermis von *Arabidopsis thaliana.*

Das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-I zeigt eine subzelluläre Lokalisierung, welche vergleichbar mit filamentösen Strukturen ist. Da dies ein unerwartetes Ergebnis darstellt, wird es im Abschnitt 4.2.3 separat abgehandelt. Auch die Myosin-*tail*-Konstrukte des Myosins XI-D sind, wie schon bei der Klonierung (siehe Tab. 4.2), bei der Untersuchung mittels biolistischer Transformation ein „Spezialfall“ und werden ebenfalls in einem gesonderten Abschnitt (4.2.4) näher betrachtet.

Die verbleibenden sechs Myosin-*tail*-Konstrukte markieren punktförmige Strukturen und stellen somit das eigentlich erwartete Resultat bei der Untersuchung der *Cargo*-Spezifität dar. Die Myosin-*tail*-Konstrukte der Myosine MyaI, MyaII, XI-B, XI-C, XI-E und XI-K

zeigen diese Lokalisation an Punkten und haften demnach an Vesikel an. In Abbildung 4.4 ist jeweils eine der beobachteten, transformierten Zellen pro Myosin-*tail*-Konstrukt abgebildet. Es ist zu erkennen, dass sich die Signale in Größe, Form und Anzahl von Myosin zu Myosin unterscheiden. Die Bilder wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Signalgrößen auf die gleiche Größe skaliert.

Für alle Myosin-*tail*-Konstrukte, außer für XI-C*tail*, fällt auf, dass zusätzliche eine Akkumulation im Cytosol vorhanden ist. Dies könnte auf die transiente Expression unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors zurückzuführen sein.

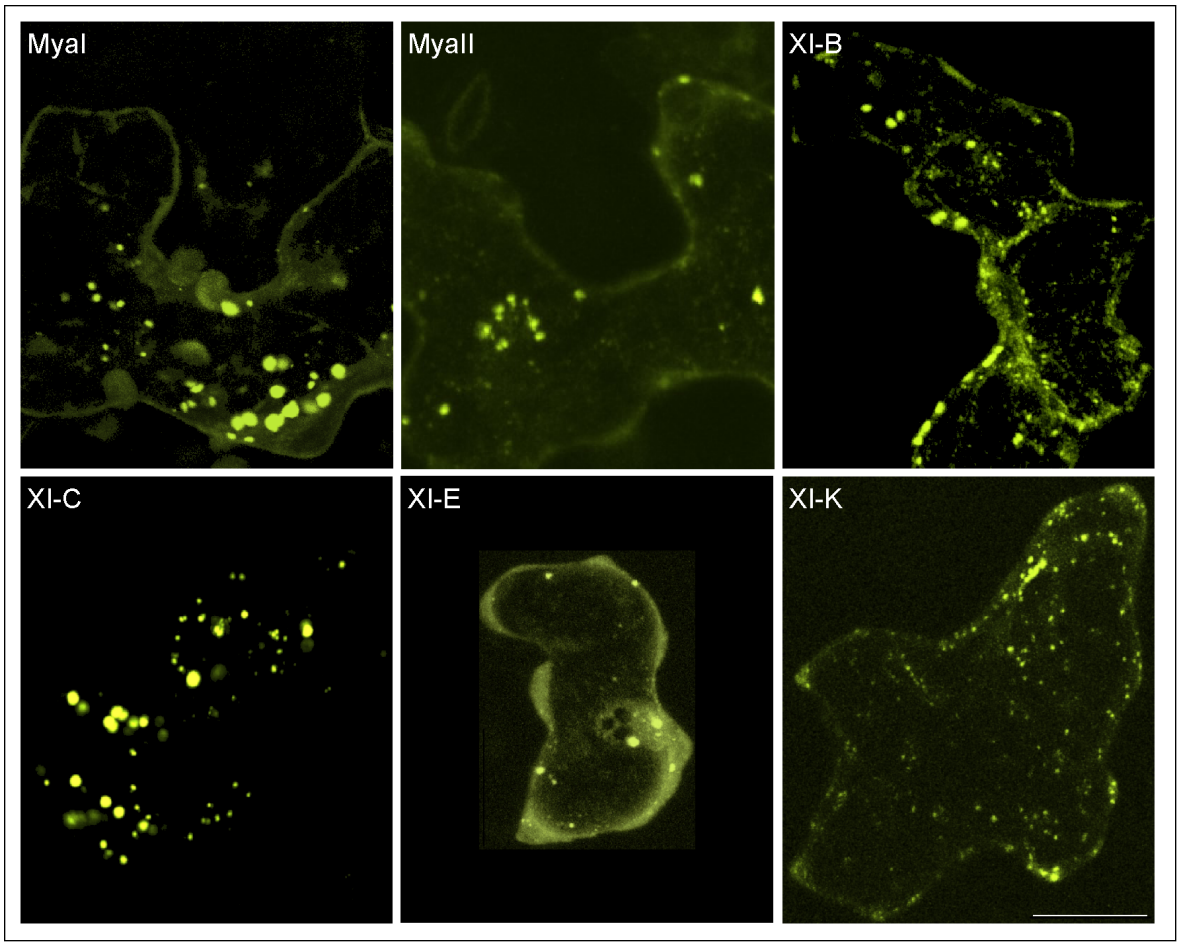

Abbildung 4.4.: Lokalisation von eYFP-Myosin-*tail*-Konstrukten in Form von punktförmigen Signalen. Es ist jeweils eine durch biolistische Transformation transient transformierte Zelle der oberen Blattepidermis von *Arabidopsis thaliana,* untersucht mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie, in Maximumprojektion abgebildet. Zur Transformation wurde jeweils eine der generierten pRT100mod::eYFP::XI-x*tail*-Varianten verwendet. Die Verteilung der eYFP-Myosin-*tail*-Konstrukte erstreckt sich für die Myosine MyaI, MyaII, XI-B, XI-C, XI-E und XI-K jeweils punktförmig über die gesamte Zelle, dabei unterscheiden sich die Größen, Formen und Anzahl der Signale von Konstrukt zu Konstrukt. Für das eYFP-Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-E ist auch eine Akkumulation im Cytoplasma, möglicherweise bedingt durch die Überexpression, zu finden. Der Größenbalken entspricht für alle gezeigten Zellen, zur besseren Vergleichbarkeit der Signalgrößen, einer Länge von 20 µm, wodurch nicht jede Zelle vollständig abgebildet werden kann.

Die von eYFP-MyaI*tail* hervorgerufenen Signale haben augenscheinlich zwei unterschiedliche Größen, was die Hypothese unterstreicht, dass ein Myosin auf Grund der zwei Subdomänen innerhalb der *Cargo*-Bindedomäne (Li und Nebenführ, 2008b) mehr als eine Spezies von Vesikeln als *Cargo* haben kann. Dies ist aber nicht gleichbedeutend damit, dass ein Myosin-

Dimer gleichzeitig mehrere *Cargos* transportiert.

Außerdem sieht man einige Chloroplasten des Palisadengewebes in der Aufnahme der eYFP-MyaI*tail* exprimierenden Zelle durchscheinen, dies ist allerdings ein auf deren Autofluoreszenz zurückzuführendes Artefakt, welches durch die Aufnahmebedingungen bzw. den physiologischen Zustand des Gewebes nach der biolistischen Transformation hervorgerufen wird.

Die Signale, welche durch das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins MyaII entstehen, sind diffuser und es ist nicht zu erkennen, wie viele verschiedene *Cargos* es zu markieren vermag. Allerdings kann man erkennen, dass etliche markierte Strukturen sich kreisförmig angeordnet haben. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um eine Anordnung um den Zellkern.

Das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-B lokalisiert zum einen an relativ großen, ovalen Strukturen, zum anderen scheint es sehr kleine Strukturen zu markieren. Durch die Akkumulation des Konstrukts im Cytosol ist dies eher zu vermuten, als deutlich zu erkennen. Um zu klären, ob weitere, kleine Strukturen markiert sind, müsste man zusätzliche Experimente durchführen, eventuell in Form einer Zeitserie nach der biolistischen Transformation.

Auch das Konstrukt für das Myosin XI-C markiert, wie das MyaI-Konstrukt, *Cargos* zweier unterschiedlicher Größen, wiederum relativ kleine und wesentlich größere. Es fällt weiterhin auf, dass das Konstrukt nicht im Cytosol akkumuliert, dafür die Signale sehr intensiv und somit klar und deutlich zu erkennen sind. Dies kann eventuell darauf zurückzuführen sein, dass für das Konstrukt sehr viele *Cargo*-Bindestellen und/oder dazugehörige Interaktionspartner vorhanden sind oder dass das Konstrukt möglicherweise sehr schnell abgebaut wird.

Das eYFP-XI-E*tail*-Konstrukt reichert sich sehr stark im Cytoplasma an, so dass wiederum nicht zu erkennen ist, ob sehr kleine Strukturen markiert sind, wie es beim Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosin XI-B der Fall ist. Ansonsten wären nur sehr wenige, zählbare Strukturen mit sehr unterschiedlichen Größen und Umrissen zu beobachten. Allerdings sieht man bei dieser Zelle sehr deutlich, dass die Plastiden ausgespart sind, in Form von drei „Löchern“ im Fluoreszenzsignal des Cytoplasmas.

Die letzte abgebildete Zelle wurde mit dem Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-K transformiert. Das Konstrukt akkumuliert ein wenig im Cytosol, dennoch ist zu erkennen, dass sehr viele, sehr kleine Vesikel GFP-Signale tragen. Zusätzlich sind größere Strukturen markiert. Auch dieses Myosin scheint demnach verschiedene *Cargos* zu haben.

Da die Myosin-*tail*-Konstrukte der Myosine MyaI, MyaII, XI-B, XI-C, XI-E und XI-K definierte Strukturen markieren, gilt es herauszufinden, um welche Vesikel es sich handelt. Dazu wurden *Co*-Lokalisationsexperimente durchgeführt, deren Ergebnisse in Abschnitt 4.4 beschrieben werden.

4.2.3. Subzelluläre Lokalisierung des Myosin-*tail*-Konstruktes des Myosins XI-I

Das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-I zeigte nach biolistischer Transformation von *Arabidopsis thaliana* als einziges eine Lokalisation an filamentösen Strukturen. In Abbildung 4.5 A ist eine Epidermiszelle der Laubblattoberseite zu sehen, welche das Myosin-*tail*-Konstrukt eYFP-XI-I*tail* transient exprimiert. Man erkennt streifenförmige Signale, welche die gesamte Zelle „überspannen“, und auch wenige, an einer Stelle konzentrierte, punktförmige Fluoreszenzsignale. Durch das Mikroskop sieht man, dass sich die filamentösen Strukturen nur an der Zellperipherie beobachten lassen und sehr, sehr schwache Fluoreszenzsignale emittieren, wodurch die Dokumentation erheblich erschwert wird. Aus diesem Grund erscheint auch die Hintergrundfluoreszenz sehr stark.

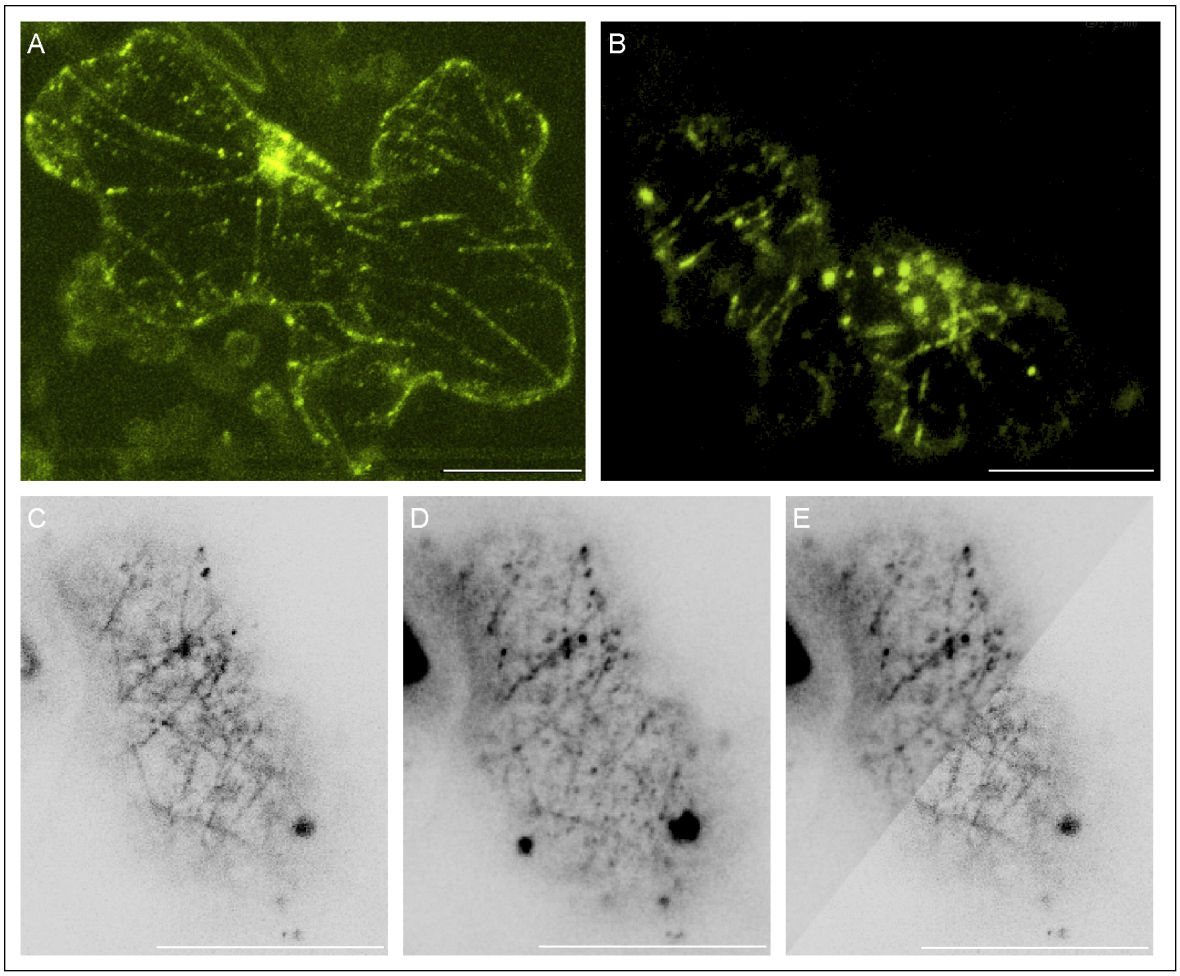

Abbildung 4.5.: Subzelluläre Lokalisierung des Myosin-*tail*-Konstruktes des Myosins XI-I. Es ist jeweils eine durch biolistische Transformation transient transformierte Zelle der oberen Blattepidermis von *Arabidopsis thaliana* (**A**, **C**, **D** und **E**) bzw. *Pisum sativum* (**B**), untersucht mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie, in Maximumprojektion abgebildet. Zur Transformation wurde jeweils der pRT100mod::eYFP::XI-I*tail* (**A** und **B**) verwendet bzw. wurde eine *Co*-Transformation von pRT100mod::eYFP::XI-I*tail* mit pRT100mod::eCFP::Map4 durchgeführt (**C**-**E**). **A** Es ist eine transformierte *Arabidopsis thaliana*-Zelle zu sehen, in welcher sich die Verteilung des eYFP-XI-I*tail*-Konstruktes über filamentöse Strukturen erstreckt. **B** In *Pisum sativum* ist ebenfalls eine Lokalisation an filamentartigen Strukturen zu erkennen, neben einer punktförmigen Verteilung. **C-E** Es sind s/w-Bilder einer mit pRT100mod::eYFP::XI-I*tail* (**D**) und pRT100mod::eCFP::Map4 (**C**) *co*-transformierten *Arabidopsis thaliana*-Zelle gezeigt. In **E** ist eine Zusammensetzung der beiden Bilder **C** und **D** dargestellt, um zu zeigen, dass beide Konstrukte die selben Filamente markieren. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 20 µm.

Bei den markierten Strukturen könnte es sich um Filamente wie Aktin oder Tubulin handeln. Dies ist unerwartet, denn Myosine binden mit ihrer Motordomäne an das Aktingerüst der Zelle. Es hat demnach seine Cytoskelett-Bindestelle am *N*-Terminus, der bei den Myosin-*tail*-Konstrukten fehlt (vgl. Rödel (2007)). Es erscheint somit eher wenig sinnvoll, dass der *Cargo*-bindende *C*-Terminus ebenfalls an das Cytoskelett bindet. Um dieses unerwartete Ergebnis erklärbar zu machen, wurden zwei weitere Experimente durchgeführt.

Zum einen wurde *Pisum sativum* (Erbse) an Stelle von *Arabidopsis thaliana* biolistisch mit dem Konstrukt transformiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.5 B zu sehen. Die Epidermiszelle der Laubblattoberseite von *Pisum sativum* weist wesentlich mehr punktförmige Signale auf, aber es sind auch deutlich filamentöse Strukturen markiert. Es handelt sich demnach nicht um ein auf *Arabidopsis thaliana* beschränktes Phänomen bzw. Artefakt.

Zum anderen wurde ein *Co*-Lokalisationsexperiment durchgeführt. Da sich Myosine an Aktin entlang bewegen und eine Funktion der *N*- und gleichzeitig *C*-terminalen Bindung schwer nachvollziehbar erscheint, wurde Aktin als *Cargo* erst einmal ausgeschlossen und die *Co*-Lokalisationsstudie mit einem Tubulinmarker durchgeführt. Dazu wurde *Arabidopsis thaliana* gleichzeitig biolisitsch mit pRT100mod::eYFP::XI-I*tail* und pRT100mod::eCFP::Map4 transformiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.5 C-E sichtbar. Da die Fluoreszenzsignale wiederum sehr schwach waren, sind die Bilder invertiert und schwarz-weiß abgebildet. Um die *Co*-Lokalisation besser sichtbar zu machen, wurden die Bilder nicht übereinandergelegt sondern diagonal geteilt und zusammengesetzt abgebildet (vgl. Abb. 4.5 E). Es zeigt sich, dass die beiden Konstrukte die selben Filamente markieren und somit eine *Co*-Lokalisation besteht. Das Konstrukt eYFP-XI-I*tail* markiert somit Tubulin.

Die hell-leuchtenden, punktförmigen Signale sind möglicherweise auf die Überexpression zurückzuführen, da Tubulin-markierende Konstrukte dazu neigen[3].

[3]persönliche Mitteilung Dr. Andreas Houben, Abteilung Cytogenetik und Genomanalyse - IPK Gatersleben

4.2.4. Subzelluläre Lokalisierung der Myosin-*tail*-Konstrukte des Myosins XI-D

Bei der Klonierung des Myosin-*tail*-Konstrukts für das Myosin XI-D gab es, wie in Abschnitt 4.1 dargestellt, Abweichungen von der Vorhersage und schlussendlich zwei verschiedene zu untersuchende Konstrukte. Diese beiden Konstrukte wurden, wie alle generierten Myosin-*tail*-Konstrukte, unter den gleichen, standardisierten Bedingungen zur biolistischen Transformation der Oberseite von *Arabidopsis thaliana*-Laubblättern eingesetzt. Die beiden Myosin-*tail*-Konstrukte zeigen dabei in den untersuchten Epidermiszellen zwei unterschiedliche Verteilungsmuster.

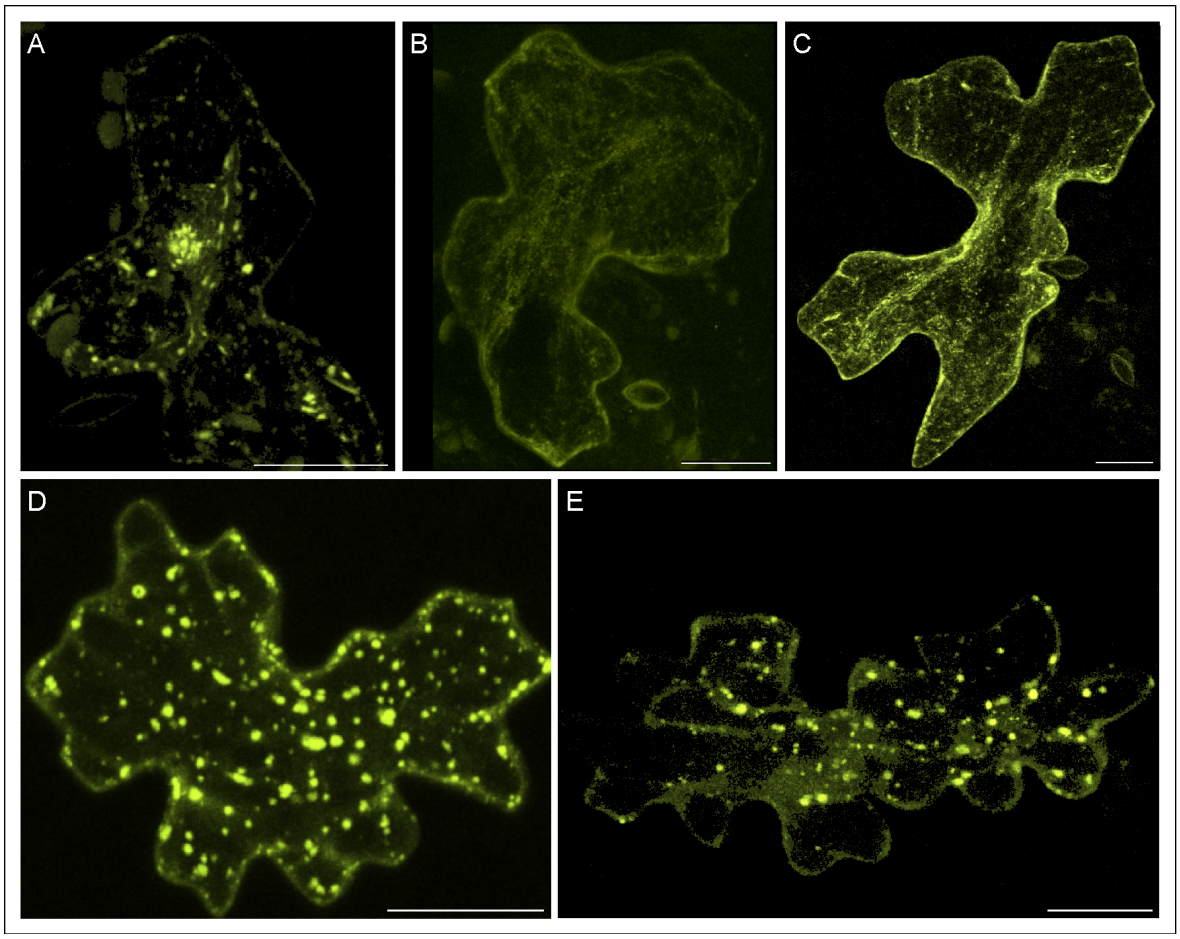

Abbildung 4.6.: Subzelluläre Lokalisierungen der Myosin-*tail*-Konstrukte des Myosins XI-D. Es ist jeweils eine durch biolistische Transformation transient transformierte Zelle der oberen Blattepidermis von *Arabidopsis thaliana* (A - C) bzw. *Pisum sativum* (D und E), untersucht mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie, in Maximumprojektion abgebildet. Zur Transformation wurde der pRT100mod::eYFP::XI-D1*tail* (A, B und D) bzw. pRT100mod::eYFP::XI-D2*tail* (C und E) verwendet. **A** Es ist eine transformierte *Arabidopsis thaliana*-Zelle zu sehen, in welcher die punktförmigen Verteilung der Signale des eYFP-XI-*D1tail*-Konstruktes zu erkennen ist. **B/C** Die eYFP-XI-*Dtail*-Konstrukte sind in diesen transformierten *Arabidopsis thaliana*-Zellen über das gesamte Cytoplasma verteilt. **D/E** In *Pisum sativum* lokalisieren die eYFP-XI-*Dtail*-Konstrukte jeweils an rundlichen Strukturen. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 20 µm.

Das Myosin-*tail*-Konstrukt eYFP-XI-D1*tail* markiert in etwa gleichem Verhältnis entweder punktförmige Strukturen oder ist diffus im Cytoplasma verteilt, wie in Abbildung 4.6 A und B zu sehen ist. Es ist also neben eYFP-XI-J*tail* das einzige Myosin-*tail*-Konstrukt, welches im gleichen Gewebe zwei unterschiedliche Lokalisationen zeigt. Das XI-D2*tail*-Konstrukt konnte

lediglich mit einem Verteilungsmuster beobachtet werden. Es war immer diffus im Cytoplasma zu finden, wie Abbildung 4.6 C zeigt.

Da es sich bei den beiden *tail*-Konstrukten höchstwahrscheinlich um verschiedene *Splicing*-Produkte handelt, stellt sich die Frage, ob dies eine Gewebespezifität als Ursache hat. Um dies zu klären, müssen weitere Gewebe untersucht werden. Dazu ist die Generierung transgener Pflanzen mit Hilfe der *tail*-Konstrukte erforderlich, da mittels Biolistik nur die obere Epidermis der Laubblätter zuverlässig transformierbar ist. Es wurden auf Grundlage der vierzehn Myosin-*tail*-Konstrukte transgene *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen erstellt. Das Ergebnis dieser Arbeiten wird in einem separaten Abschnitt beschrieben (siehe 4.5).

Wie für das Myosin-*tail*-Konstrukt eYFP-XI-I*tail* beschrieben, wurden auch die *tail*-Konstrukte XI-D1 und XI-D2 auf ihr Verhalten in *Pisum sativum* getestet. Bei dem Experiment verhielten sich die beiden XI-D*tail*-Konstrukte identisch und zeigten die gleiche Lokalisierung, wie die Abbildungen 4.6 D und E veranschaulichen. In beiden Fällen sind Vesikel markiert, welche vergleichbar sind in Größe, Struktur und auch Anzahl. Geringe Unterschiede sind darauf zurückzuführen, dass es sich um zwei verschiedene Zellen aus zwei verschiedenen Laubblättern handelt.

Auf Grund der Ergebnisse der Untersuchungen an eYFP-XI-I*tail* und eYFP-XI-D1/2*tail* in *Pisum sativum* wurden schließlich alle Myosin-*tail*-Konstrukte in Erbse untersucht, wie im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

4.3. Analyse der Myosin-*tail*-Konstrukte mittels biolistischer Transformation von *Pisum sativum*

Nachdem alle Myosin-*tail*-Konstrukte mittels biolistischer Transformation von *Arabidopsis thaliana* untersucht worden waren, warfen die Resultate der zusätzlichen Analyse zweier Myosin-*tail*-Konstrukte (siehe 4.2.3 und 4.2.4) in *Pisum sativum* die Frage auf, ob die restlichen Myosin-*tail*-Konstrukte ebenfalls abweichende Lokalisierungen in dieser zweiten Pflanzenspecies aufweisen. Daraufhin erfolgte die Analyse aller Myosin-*tail*-Konstrukte in *Pisum sativum*.

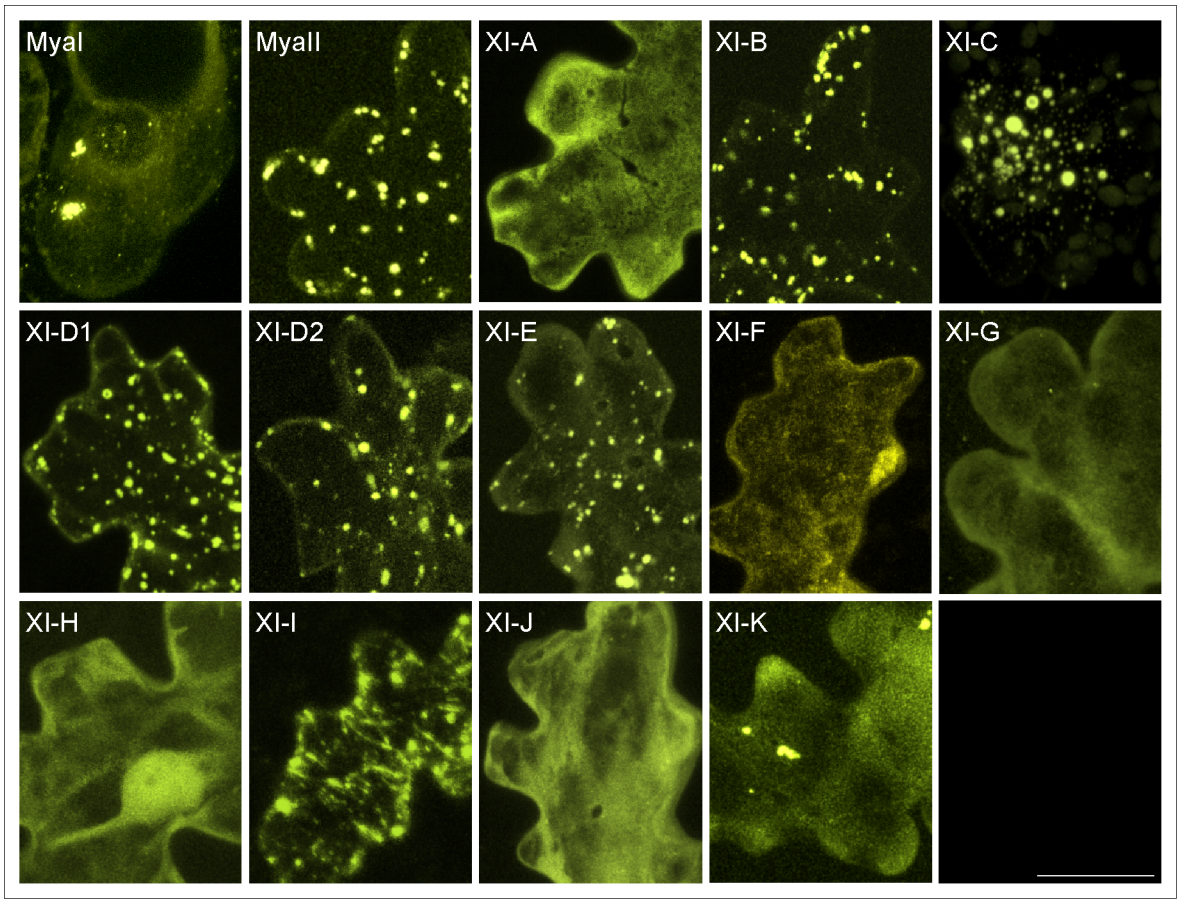

Abbildung 4.7.: Subzelluläre Lokalisierung der eYFP-Myosin-*tail*-Konstrukte in *Pisum sativum*. Es ist jeweils eine durch biolistische Transformation transient transformierte Zelle der oberen Blattepidermis von *Pisum sativum,* untersucht mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie, in Maximumprojektion abgebildet. Zur Transformation wurde jeweils eine der generierten pRT100mod::eYFP::XI-x*tail*-Varianten verwendet. Die Verteilung der eYFP-Myosin-*tail*-Konstrukte erstreckt sich für die Myosine MyaI, MyaII, XI-B, XI-C, XI-D1, XI-D2, XI-E und XI-K jeweils punktförmig über die gesamte Zelle, dabei unterscheiden sich die Größen, Formen und Anzahl der Signale von Konstrukt zu Konstrukt. Für die eYFP-Myosin-*tail*-Konstrukte der Myosine MyaI und XI-K ist zusätzlich eine Akkumulation im Cytoplasma zu finden. Das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-I lokalisiert an punktförmigen und auch an filamtösen Strukturen. Die Myosin-*tail*-Konstrukte der Myosine XI-A, XI-G und XI-J sind diffus im Cytoplasma zu finden und XI-F und XI-H zusätzlich im Nukleus. Der Größenbalken entspricht für alle gezeigten Zellen, zur besseren Vergleichbarkeit der Signalgrößen, einer Länge von 20 µm, wodurch nicht jede Zelle vollständig abgebildet werden kann.

Einerseits geschah dies, da die zwei XI-D*tail*-Konstrukte abweichende Ergebnisse im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana* zeigten, andererseits ist Erbse ein schnell Biomasse-produzierender, ebenfalls gut untersuchter Modellorganismus, für welchen beispielsweise Organellpräparationen gut protokolliert sind (z. B. Rödiger *et al.* (2010)). Dies ist wiederum bei späteren

Untersuchungen zur Identifikation der Interaktionspartner bei der Myosin-*Cargo*-Bindung von Vorteil.

In Abbildung 4.7 sind die Ergebnisse der biolistischen Transformation der Laubblattoberseite von *Pisum sativum* mit den Myosin-*tail*-Konstrukten zu sehen. Die *tail*-Konstrukte der Myosine XI-A, XI-G und XI-J sind ausschließlich im Cytoplasma zu detektieren, die *tail*-Konstrukte von XI-F und XI-H sind zusätzlich noch im Nukleus lokalisiert. Für das Myosin XI-J ergibt sich somit ein anderes Resultat als in *Arabidopsis thaliana.* Darin konnte es entweder im Cytoplasma oder im Cytoplasma & im Zellkern lokalisiert gefunden werden. Dagegen ist es in *Pisum sativum* lediglich im Cytoplasma zu beobachten. Der umgekehrte Fall trifft auf das Myosin-*tail*-Konstrukt eYFP-XI-F*tail* zu. In *Arabidopsis thaliana* akkumuliert es nur im Cytosol, in *Pisum sativum* zusätzlich im Nukleus. Da dies beides Lokalisierungen sind, bei denen man davon ausgehen kann, dass sie auf das Nicht-Vorhandensein des entsprechenden *Cargos* zurückzuführen sind, werden sie als marginal betrachtet.

Das Myosin-*tail*-Konstrukt eYFP-XI-I*tail* markiert, wie schon in Abschnitt 4.2.3 beschrieben, filamentöse Strukturen, welche für *Arabidopsis thaliana* als Tubulin identifiziert werden konnten[4]. In Abschnitt 4.2.4 wurde bereits gezeigt, dass die beiden Myosin-XI-D*tail*-Konstrukte, anders als in *Arabidopsis*, gleichermaßen an punktförmigen Strukturen lokalisieren.

Die übrigen Myosin-*tail*-Konstrukte (MyaI, MyaII, XI-B, XI-C, XI-E und XI-K) markieren punktförmige Strukturen und akkumulieren zusätzlich in unterschiedlichem Maße im Cytosol. Besonders stark reichern sich die Myosin-*tail*-Konstrukte der Myosine MyaI, XI-E und XI-K im Cytoplasma an. Dies wird wiederum auf die konstitutive Expression und den physiologischen Zustand der Zellen zurückzuführen sein.

Myosin-*tail*-Konstrukt	lokalisiert in *Arabidopsis thaliana* im/an	lokalisiert in *Pisum sativum* im/an
MyaI*tail*	Vesikel	Vesikel
MyaII*tail*	Vesikel	Vesikel
XI-A*tail*	Cytoplasma	Cytoplasma
XI-B*tail*	Vesikel	Vesikel
XI-C*tail*	Vesikel	Vesikel
XI-D1*tail*	Vesikel oder Cytoplasma	Vesikel
XI-D2*tail*	Cytoplasma	Vesikel
XI-E*tail*	Vesikel	Vesikel
XI-F*tail*	Cytoplasma	Cytoplasma und Nukleus
XI-G*tail*	Cytoplasma	Cytoplasma
XI-H*tail*	Cytoplasma und Nukleus	Cytoplasma und Nukleus
XI-I*tail*	Tubulin	Tubulin
XI-J*tail*	Cytoplasma oder Cytoplasma und Nukleus	Cytoplasma
XI-K*tail*	Vesikel	Vesikel

Tabelle 4.3.: Vergleichende Übersicht der Lokalisationen der Myosin-*tail*-Konstrukte in *Arabidopsis thaliana* und *Pisum sativum* nach biolistischer Transformation der oberen Blattepidermis. Große Unterschiede sind in roter Schrift, geringfügige Unterschiede in blauer Schrift und gleiche Lokalisierung in schwarzer Schrift gedruckt.

[4] Für *Pisum sativum* wurden ebenfalls *Co*-Lokalisierungsstudien durchgeführt, deren Ergebnis auch eine *Co*-Lokalisierung zeigten, aber deren Darstellbarkeit wesentlich schlechter war als jene für *Arabidopsis thaliana*, woraufhin die Ergebnisse hier nicht gezeigt werden.

Im Wesentlichen sind demnach die Lokalisationen in *Pisum sativum* und *Arabidopsis thaliana* identisch. Zur besseren Visualisierung sind in Tabelle 4.3 alle Lokalisationen noch einmal vergleichend aufgeführt. Konstrukte, welche punktförmigen Strukturen markierten, werden als „an Vesikeln“ lokalisiert bezeichnet.

Auch wenn die Myosin-*tail*-Konstrukte sowohl in *Arabidopsis thaliana,* als auch in *Pisum sativum* gleichermaßen punktförmige Strukturen markieren, kann man nicht davon ausgehen, dass in jedem Fall das gleiche *Cargo* transportiert wird. Es sind durchaus Unterschiede möglich, wie Abbildung 4.8 belegt. Es sind zwei jeweils mit pRT100mod::eYFP::MyaI*tail* und pRT100mod::Oleo::eCFP biolistisch *co*-transformierte Epidermiszellen der Laubblattoberseite einerseits von *Arabidopsis thaliana* (A & A’) und andererseits von *Pisum sativum* (B & B’) abgebildet. Die Laubblätter wurden vor der mikroskopischen Analyse mit CCCP behandelt (genaue Vorgehensweise siehe 8.3.1), um die aktive, intrazelluläre Bewegung anzuhalten, denn mit dem vorhandenen konfokalen Mikroskop war es nicht möglich, gleichzeitig die CFP- und YFP-Fluoreszenz aufzunehmen. Um zu gewährleisten, dass bei der seriellen Aufnahme der CFP- und YFP-Bilder die Signale zwischenzeitlich keine Ortsänderung durchgeführt haben, war diese Behandlung unumgänglich.

Die Pfeile, welche nach links unten zeigen, deuten auf Oleosomen und die Pfeile, welche nach rechts oben gerichtet sind, markieren vom Myosin-Konstrukt gelabelte Strukturen. Im Fall der *Arabidopsis thaliana*-Zelle zeigen die Pfeile auf Strukturen, die gleichermaßen vom YFP- (A) als auch vom CFP-Konstrukt (A’) angefärbt sind. Das Myosin-*tail*-Konstrukt von MyaI *co*-lokalisiert folglich mit Oleosomen in *Arabidopsis thaliana.* Im Gegensatz dazu weisen die Pfeile in den Bildern der *Pisum sativum*-Zelle jeweils entweder auf Signale aus dem YFP- (B) oder auf Signale aus dem CFP-Kanal (B’). Demnach liegt keine *Co*-Lokalisation vor und das Myosin-*tail*-Konstrukt bindet in Erbse keine Oleosomen.

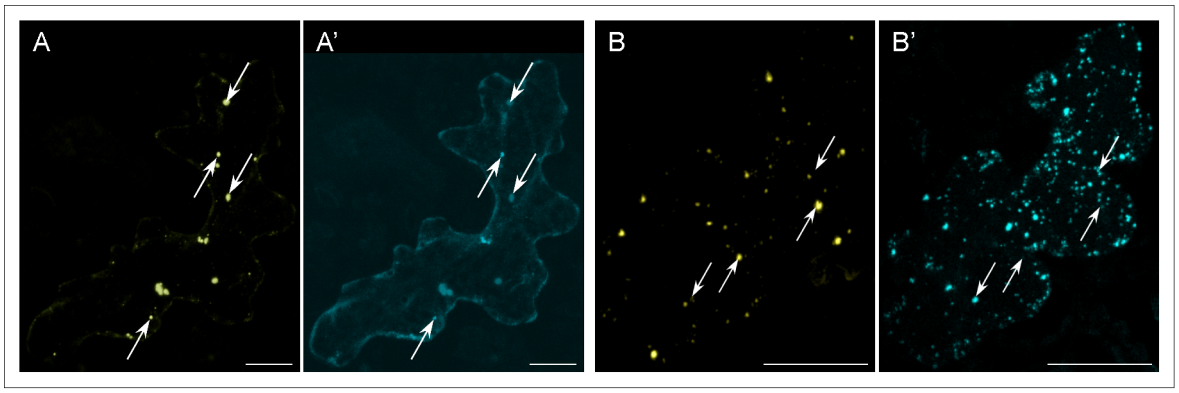

Abbildung 4.8.: *Co*-Lokalisationsstudien zum Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins MyaI in *Arabidopsis thaliana* und *Pisum sativum*. Es ist jeweils eine durch biolistische Transformation transient transformierte, mit CCCP behandelte Zelle der oberen Blattepidermis von *Arabidopsis thaliana* (**A**) bzw. *Pisum sativum* (**B**), untersucht mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie, in Maximumprojektion abgebildet. Zur Transformation wurde der pRT100mod::eYFP::MyaI*tail* mit pRT100mod::Oleo::eCFP eingesetzt. Es ist der YFP-Kanal (**A** & **B**) und der CFP-Kanal (**A’** & **B’**) zu sehen. Die Signale im YFP-Kanal stammen vom Myosin-Konstrukt, die Signale im CFP-Kanal vom Oleosomen-Marker. Pfeile nach links unten deuten auf Oleosomen und Pfeile nach rechts oben zeigen auf vom Myosin-Konstrukt markierte Strukturen. **A** Die Myosin-Konstrukt-Signale (**A**) und die Signale der Oleosomen (**A’**) sind an den selben Orten zu finden. Beide Konstrukte *co*-lokalisieren demzufolge in *Arabidopsis thaliana.* **B** In der transformierten Zelle liegen die vom Myosin-Konstrukt markierten Strukturen (**B**) und jene vom Oleosin-Konstrukt markierten (**B’**) an verschiedenen Stellen. Das Myosin-Konstrukt *co*-lokalisiert in *Pisum sativum* nicht mit Oleosomen. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 20 µm.

Die subzelluläre Lokalisierung der Myosin-*tail*-Konstrukte in *Pisum sativum* kann Hinweise auf das *Cargo* der Myosine geben. Allerdings sollte man auf Grund der Ergebnisse der *Co*-Lokalisationsstudien zum Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins MyaI bedenken, dass das *Cargo* in *Arabidopsis thaliana* nicht das selbe sein muss. Für weitere Versuche zur Identifikation der Interaktionspartner bei der Myosin-*Cargo*-Bindung der Myosin-*tail*-Konstrukte von *Arabidopsis thaliana* ist die Isolation von Organellen aus *Pisum sativum* daher leider eher ungeeignet.

4.4. Analyse der Myosin-*tail*-Konstrukte anhand von *Co*-Lokalisationsstudien

Nachdem alle Myosin-*tail*-Konstrukte auf ihre subzelluläre Lokalisierung in Epidermiszellen der Laubblattoberseite von *Arabidopsis thaliana* untersucht worden waren und gezeigt werden konnte, dass acht der vierzehn Konstrukte distinkte Strukturen markieren, wurden diese weiter analysiert, um herauszufinden, welche Strukturen es sind. Dazu wurden *Co*-Lokalisationsexperimente mit den in Abschnitt 3.4 beschriebenen Kompartimentmarkern durchgeführt. Die Experimente erfolgten in *Arabidopsis thaliana*, da es sich um das authentische System handelt und bereits Unterschiede zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Pisum sativum* in den Einzeltransformationsexperimenten gezeigt werden konnten (siehe Abb. 4.8).

Jene Konstrukte, welche im Cytoplasma bzw. Cytoplasma und Zellkern lokalisierten, wurden nicht weiter untersucht, da sie keine definierten Strukturen markieren. Dies deutet darauf hin, dass kein passendes *Cargo* in der Zelle enthalten ist. Für das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-I wurde bereits in Abschnitt 4.2.3 gezeigt, dass es sich bei den markierten Strukturen um Tubulin handelt. Aus dem Grund wird in diesem Abschnitt nicht erneut darauf eingegangen.

Die *Co*-Lokalisationsexperimente wurden für alle Konstrukte gleichermaßen durchgeführt. Es wurden Laubblätter von *Arabidopsis thaliana* biolistisch mit einer der pRT100mod::eYFP::XI-x*tail*-Varianten und jeweils einem der generierten pRT100mod::Marker::eCFP-Konstrukte transformiert. In Abbildung 4.9 sind beispielhaft die Ergebnisse der *Co*-Lokalisationsstudie für das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins MyaII gezeigt. Es wurden *Co*-Lokalisationsexperimente mit Kompartimentmarkern für Golgi-Vesikel (B), Peroxisomen (C) und Oleosomen (D) durchgeführt. Die Laubblätter wurden vor der mikroskopischen Analyse mit CCCP behandelt (siehe 8.3.1) und einige der Signale aus den beiden Kanälen wurden nachträglich mit Pfeilen versehen, um vergleichen zu können, ob *Co*-Lokalisation vorhanden ist oder nicht.

Man erkennt anhand der Abbildungen 4.9 B, C und D, dass die Pfeile jeweils nur in einem Kanal Strukturen markieren, somit hat das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins MyaII weder eine *Co*-Lokalisation mit Golgi-Vesikeln noch mit Peroxisomen noch mit Oleosomen. Des Weiteren fällt bei genauerer Betrachtung der einzelnen YFP-Aufnahmen auf, dass die Zahl der vom Myosin-*tail*-Konstrukt markierten Strukturen stark variiert. Auch die Formen der Strukturen differieren. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Myosin-*Cargo*-Interaktion stark vom physiologischen Zustand der Zelle abhängt.

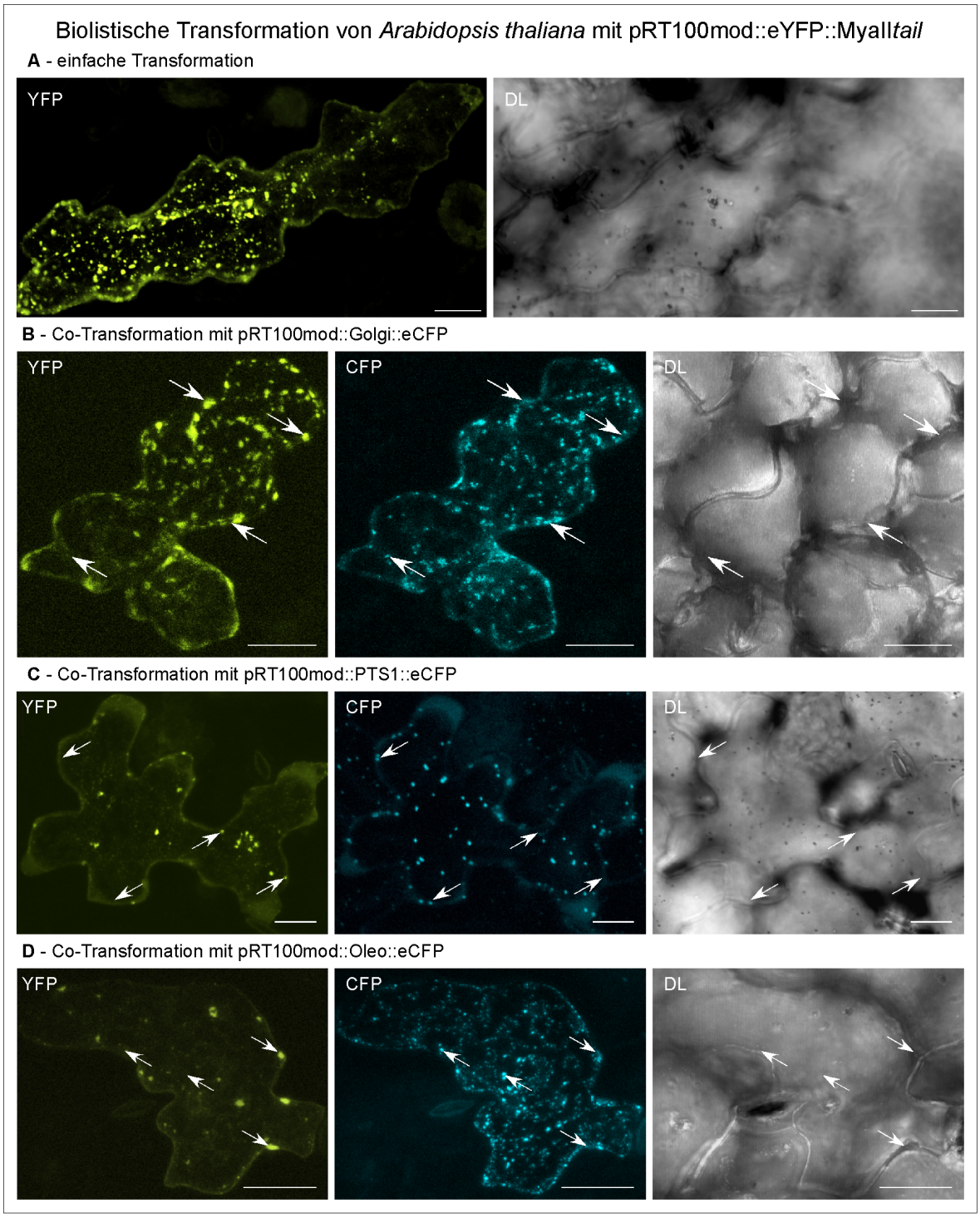

Abbildung 4.9.: *Co*-Lokalisationsstudien zum Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins MyaII. Es ist jeweils eine durch biolistische Transformation transient transformierte, mit CCCP behandelte Zelle der oberen Blattepidermis von *Arabidopsis thaliana,* untersucht mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie, in Maximumprojektion abgebildet. Es sind Aufnahmen des YFP-Kanals (YFP), des Durchlichtkanals (DL) und bei *Co*-Transformationen zusätzlich des CFP-Kanals (CFP) zu sehen. Zur Transformation wurde der pRT100mod::eYFP::MyaII*tail* (A) verwendet und zur *Co*-Transformation wurde dieser mit pRT100mod::Golgi::eCFP (B), mit pRT100mod::PTS1::eCFP (C) bzw. mit pRT100mod::Oleo::eCFP (D) eingesetzt. **A** In der transformierten Zelle zeigt das Myosin-*tail*-Konstrukt, wie schon in Abb. 4.4 zu sehen, eine punktförmige Verteilung. **B** Die Signale im YFP-Kanal stammen vom Myosin-Konstrukt, die Signale im CFP-Kanal vom Golgi-Marker. Die Pfeile markieren jeweils Strukturen aus einem der beiden Kanäle. Es ist erkennbar, dass diese nicht die selben Strukturen markieren, somit *co*-lokalisiert das Myosin-Konstrukt nicht mit Golgi-Vesikeln. **C** Die Myosin-Konstrukt-Signale (YFP) und die Signale der Peroxisomen (CFP) sind beispielhaft durch Pfeile markiert und nicht identisch. Die Konstrukte *co*-lokalisieren demzufolge nicht. **D** In der transformierten Zelle sind die vom Myosin-Konstrukt markierten Strukturen in gelb zu sehen und jene vom Oleosin-Konstrukt in cyan. Die Pfeile markieren einerseits Myosin- andererseits Oleosomenstrukturen. Es ist zu erkennen, dass beide Signale an verschiedenen Stellen liegen. Das Myosin-Konstrukt *co*-lokalisiert nicht mit Oleosomen. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 20 µm.

Die Untersuchungen am Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins MyaII zeigen, wie die Ergebnisse der Mehrzahl der *Co*-Lokalisationsstudien, dass Peroxisomen, Oleosomen und Golgi-Vesikel von diesen *tail*-Konstrukten nicht markiert werden. Auf das Zeigen der dazugehörigen Bilder soll hier verzichtet werden.

In der folgenden Tabelle 4.4 ist aufgeführt, welche Myosin-*tail*-Konstrukte mit welchen Kompartimentmarkern getestet wurden und zu welchem Ergebnis dies führte. Ein „-“ bedeutet, dass keine *Co*-Lokalisation nachgewiesen werden konnte. Ein „x“ hingegen symbolisiert das Vorhandensein von *Co*-Lokalisation.

Myosin-*tail*-Konstrukt	Oleosomen	Golgi	Peroxisomen
MyaI*tail*	x	-	-
MyaII*tail*	-	-	-
XI-B*tail*	-	-	-
XI-C*tail*	-	-	-
XI-D1*tail*	-	x	-
XI-E*tail*	-	-	-
XI-K*tail*	-	-	-

Tabelle 4.4.: Übersicht der Ergebnisse der *Co*-Lokalisationsstudien der Myosin-*tail*-Konstrukte in *Arabidopsis thaliana* nach biolistischer Transformation der oberen Laubblattepidermis. Zeichenerklärung „-“ keine *Co*-Lokalisation; „x“ = *Co*-Lokalisation

Das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins MyaI konnte an Oleosomen lokalisiert beobachtet werden und das Myosin-*tail*-Konstrukt 1 des Myosins XI-D markiert zumindest zu einem Teil Golgi-Vesikel. In Abbildung 4.10 sind die dazugehörenden Aufnahmen zu sehen.

In Abbildung 4.10 A ist eine mit pRT100mod::eYFP:MyaI*tail* und pRT100mod::Oleo::eCFP *co*-transformierte Zelle zu sehen. Es ist zu erkennen, dass das Myosin-*tail*-Konstrukt (YFP) punktförmige Strukturen markiert und nahezu nicht im Cytoplasma akkumuliert. Das Oleosin-Konstrukt hingegen reichert sich stark im Cytoplasma an, aber die Oleosomen sind dennoch gut zu erkennen. Wie die Pfeile, welche einerseits auf zwei Oleosomen und anderseits auf zwei vom Myosin-Konstrukt markierte Strukturen weisen, verdeutlichen, sind die beiden Konstrukte an den selben Strukturen zu finden. Damit ist *Co*-Lokalisation des Myosin-*tail*-Konstrukts des Myosins MyaI mit Oleosomen nachgewiesen.

In Abbildung 4.10 B ist exemplarisch eine Zelle abgebildet, welche das Myosin-*tail*-Konstrukt eYFP-XI-D1*tail* und einen Golgi-eCFP-Marker *co*-exprimiert. Beide Konstrukte markieren punktförmige Strukturen und akkumulieren im Cytoplasma. Die Pfeile, die nach links unten ausgerichtet sind, deuten auf Golgi-Vesikel und jene Pfeile, welche nach rechts oben weisen, zeigen die vom Myosin-*tail*-Konstrukt markierten Strukturen. Es ist zu erkennen, dass jeweils ein Teil der Strukturen Signale von beiden Konstrukten trägt. Es besteht teilweise *Co*-Lokalisation, d. h. nicht jedes Golgi-Vesikel wird auch von eYFP-XI-D1*tail* markiert und eYFP-XI-D1*tail* hat mindestens noch ein weiteres, bisher nicht identifiziertes *Cargo*.

Wie aus Tabelle 4.4 ersichtlich wird, waren die *Co*-Lokalisationsstudien hauptsächlich in dem Sinne erfolgreich, dass zumindest das Wissen darüber vermehrt werden konnte, welche *Cargos* die Myosin-*tail*-Konstrukte nicht haben. Zwei Myosin-*tail*-Konstrukten konnten *Cargos*

zugeordnet werden. Da aber insgesamt nur drei Kompartimentmarker zur Verfügung standen, sind die *Co*-Lokalisationsstudien als längst noch nicht abgeschlossen zu betrachten. Mitochondrien konnten auf Grund des Mangels eines geeigneten Markers nicht untersucht werden. Des Weiteren wurden Plastiden nicht untersucht, da anhand deren Größe und Autofluoreszenz ein Ausschluss der *Co*-Lokalisation mit den markierten Strukturen möglich gewesen ist. Es bieten sich somit noch viele Möglichkeiten für weitere *Co*-Lokalisationsstudien, wenn die geeigneten Kompartimentmarker zur Verfügung stehen. Es können noch Untersuchungen an Mitochondrien und den zahlreichen weiteren vesikulären Strukturen innerhalb einer Pflanzenzelle, wie etwa Endosomen, (kleinere) Vakuolen, Glyoxisomen *etc.*, durchgeführt werden.

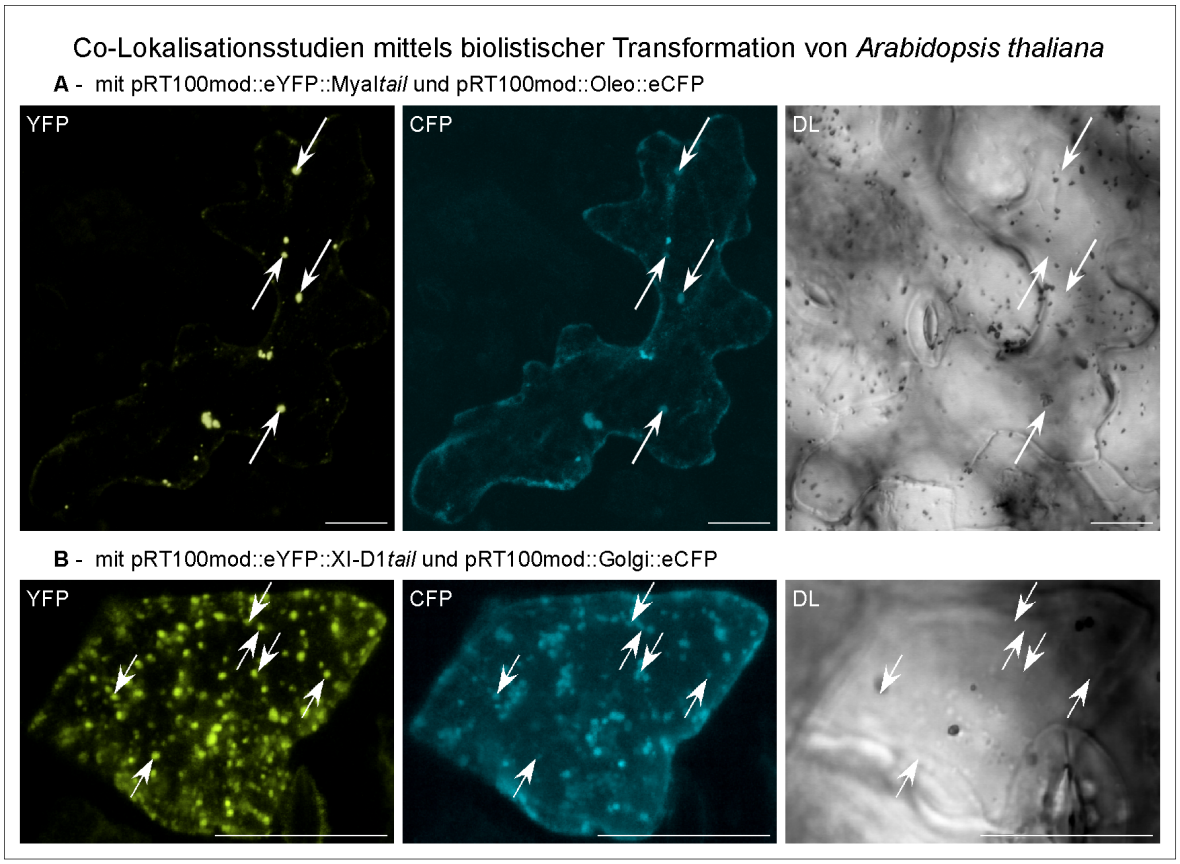

Abbildung 4.10.: *Co*-Lokalisationsstudien zu den Myosin-*tail*-Konstrukten der Myosine MyaI und XI-D1. Es ist jeweils eine durch biolistische Transformation transient transformierte, mit CCCP behandelte Zelle der oberen Blattepidermis von *Arabidopsis thaliana,* untersucht mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie, in Maximumprojektion abgebildet. Es sind Aufnahmen des YFP-Kanals (YFP), des CFP-Kanals (CFP) und des Durchlichtkanals (DL) zu sehen. Zur *Co*-Transformation wurde der pRT100mod::eYFP::MyaI*tail* mit pRT100mod::Oleo::eCFP (A) bzw. pRT100mod::eYFP::XI-D1*tail* mit pRT100mod::Golgi::eCFP (B) verwendet. **A** In der transformierten Zelle sind die vom Myosin-Konstrukt eYFP-MyaI*tail* markierten Strukturen in gelb zu sehen und jene vom Oleosin-Konstrukt in cyan. Die Pfeile markieren einerseits Myosin- andererseits Oleosomenstrukturen. Es ist zu erkennen, dass beide Signale an den selben Stellen zu sehen sind. Das Myosin-Konstrukt *co*-lokalisiert mit Oleosomen. **B** Die Signale im YFP-Kanal stammen vom Myosin-Konstrukt eYFP-XI-D1*tail*, die Signale im CFP-Kanal vom Golgi-Marker. Die Pfeile markieren jeweils Strukturen in einem Kanal und es ist erkennbar, dass das Myosin-Konstrukt zum Teil mit Golgi-Vesikeln *co*-lokalisiert. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 20 µm.

4.5. Generierung transgener, Myosin-*tail*-Konstrukt-überexprimierender Pflanzen

Nachdem die Myosin-*tail*-Konstrukte in *Arabidopsis thaliana* auf ihre subzelluläre Lokalisierung nach biolistischer Transformation von Epidermisgewebe hin untersucht worden waren, stellte sich für einige Kandidaten heraus, dass sie lediglich unspezifisch im Cytoplasma akkumulierten. Dies lässt vermuten, dass das passende *Cargo* oder der nötige Interaktionspartner zur Bindung des *Cargos* in der oberen Epidermis des Laubblattes nicht vorhanden ist. Da dies aber das einzige zuverlässig biolistisch zu transformierende Gewebe von den vielen Geweben einer Pflanze ist, wurden mit Hilfe aller Myosin-*tail*-Konstrukte transgene *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen generiert.

Dazu wurden AcGFP-XI-x*tail*-Konstrukte unter Kontrolle des 35S-Promotors (CaMV, siehe Abschnitt 3) verwendet, welche in ein *T-DNA*-Plasmid (pCB302, siehe Tab. 7.10) kloniert wurden, welches wiederum mittels *Agrobacterium tumefaciens* und *FloralDip* (siehe 8.2.5) zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* genutzt wurde. Danach erfolgte die Selektion (siehe 8.2.6 und 8.2.7) auf Transgenität und anschließend die mikroskopische Analyse der transgenen Pflanzen.

Von jeder der vierzehn auf Erde angezogenen Pflanzenlinien konnten transgene Pflanzen gefunden werden. Allerdings ergab die mikroskopische Analyse der Primärblätter, dass lediglich drei Linien GFP-Fluoreszenzsignale in diesem Gewebe emittierten. Von den Linien, welche die Myosin-*tail*-Konstrukte der Myosine XI-G und XI-H überexprimieren, wurden etliche F1-Nachkommen erhalten. Diese zeigten jeweils das gleiche mikroskopische Bild. Das Ergebnis der mikroskopischen Untersuchung dieser Pflanzen ist in Abschnitt 4.5.1 b und 4.5.1 c beschrieben.

Für das Myosin-*tail*-Konstrukt AcGFP-XI-B*tail* konnten auf Erde zwei überexprimierende Pflanzen selektiert werden. Leider zeigte nur eine der beiden auch GFP-Fluoreszenzsignale im Mikroskop. Da nur ein AcGFP-XI-B*tail*-überexprimierender, fluoreszierender F1-Nachkomme auf Erde angezogen werden konnte und auch sonst nur zwei weitere Pflanzenlinien mit GFP-Fluoreszenzsignalen für weitere Analysen zur Verfügung standen, erfolgte im nächsten Schritt die Aussaat und Selektion auf einem Saccharose-haltigen Pflanzenanzuchtsmedium (MS-Medium, siehe 7.2). Dabei konnten wiederum von allen getesten zwölf Pflanzenlinien transgene Pflanzen erhalten werden. Die Linien der Myosine XI-G und XI-H wurden nicht getestet und selektiert, da von beiden genügend F1-Nachkommen zur Verfügung standen.

Von den zu untersuchenden transgenen Pflanzen der auf MS-Medium selektierten Pflanzenlinien zeigten wiederum nur zwei GFP-Fluoreszenz. Abermals konnte ein transgener, fluoreszierender das Myosin-XI-B*tail*-Konstrukt überexprimierender F1-Nachkomme gefunden werden. Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung dieser ist in Abschnitt 4.5.1 a dokumentiert.

Die zweite Pflanzenlinie, von deren F1-Nachkommen zumindest ein kleiner Teil GFP-Fluoreszenz zeigte, exprimiert das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins MyaII. Die Resultate dazu sind ebenfalls in Abschnitt 4.5.1 a nachzulesen.

Um eine übersichtliche Darstellung der Ergebnisse der Selektion und Mikroskopie der transgenen Pflanzen zu haben, sind in Tabelle 4.5 die gesamten, eben beschriebenen Resultate

numerisch zusammengefasst.

	Anzucht auf Erde		Anzucht auf MS-Medium	
Myosin-*tail*-Konstrukt	transgen*	fluoreszierend″	transgen*	fluoreszierend″
MyaI*tail*	2	0	11	0
MyaII*tail*	7	0	52	5
XI-A*tail*	10	0	2	0
XI-B*tail*	2	1	1	1
XI-C*tail*	2	0	38	0
XI-D1*tail*	4	0	1	0
XI-D2*tail*	1	0	2	0
XI-E*tail*	2	0	1	0
XI-F*tail*	18	0	6	0
XI-G*tail*	42	16	nicht getestet	nicht getestet
XI-H*tail*	31	7	nicht getestet	nicht getestet
XI-I*tail*	65	0	22	0
XI-J*tail*	9	0	18	0
XI-K*tail*	2	0	1	0

Tabelle 4.5.: Übersicht über das Screeningergebnis der generierten Myosin-*tail*-Konstrukt-überexprimierenden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen. Es ist gegenübergestellt, wie viele transgene Pflanzen einerseits nach Anzucht auf Erde und andererseits nach Anzucht auf MS-Medium erhalten wurden. Des Weiteren ist aufgeführt, wie viele von den erhaltenen, transgenen Pflanzen (*) letztendlich auch GFP-Fluoreszenz (″) zeigen.

Die Anzahl der erhaltenen transgenen Pflanzen, sowohl nach Anzucht auf Erde, als auch nach Anzucht auf MS-Medium, bezieht alle durchgeführten Aussaatversuche ein, die sich je nach Konstrukt auf drei bis fünf Aussaaten belaufen. Die Summe der transgenen und auch GFP-Fluoreszenzsignale emittierenden Pflanzen beläuft sich gleichermaßen auf alle in den verschiedenen Aussaatversuchen selektierten Kandidaten.

Es fällt auf, dass sehr viele Transgene, welche das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-I überexprimieren, selektiert werden konnten, wobei nicht ein einziger davon GFP-Fluoreszenz zeigte. Das Myosin-*tail*-Konstrukt konnte nach biolistischer Transformation in Epidermiszellen an Tubulin lokalisiert gefunden werden (siehe Abschnitt 4.2.3). Ist dies die Lokalisierung in allen Geweben bzw. Zellen, was durchaus problematisch für die Zellen sein kann, könnte die Expression unterbunden oder der Abbau beschleunigt sein. Eine genauere Diskussion dazu ist unter 6.3.1 gegeben.

Des Weiteren konnten auf MS-Medium-Platten 38 35S-AcGFP-XI-C*tail*-Pflanzen positiv selektiert werden, von welchen wiederum keine einzige GFP-Fluoreszenzsignale emittierte. Auf Erde hingegen überlebten nur zwei die BASTA-Selektionsbehandlung. Die möglichen Gründe dafür werden ebenfalls in Abschnitt 6.3.1 diskutiert.

In den folgenden Abschnitten werden die GFP-Fluoreszenzsignal-emittierenden Pflanzenlinien 35S-AcGFP-XI-B*tail,* 35S-AcGFP-XI-G*tail,* 35S-AcGFP-XI-H*tail* und 35S-AcGFP-MyaII*tail* ausführlich beschrieben.

4.5.1. Mikroskopische Analyse der transgenen, Myosin-*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzen

Nach der Selektion der *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen auf Transgenität und den ersten mikroskopischen Untersuchungen erfolgten detailliertere, optische Analysen der F1-Nachkommen der vier Pflanzenlinien 35S-AcGFP-MyaII*tail*, 35S-AcGFP-XI-B*tail,* 35S-AcGFP-XI-G*tail* und 35S-AcGFP-XI-H*tail*, welche GFP-Fluoreszenzsignale emittierten.

a) Analyse der 35S-AcGFP-MyaII*tail*- und 35S-AcGFP-XI-B*tail*-überexprimierenden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

Von den vier untersuchten Pflanzenlinien markierten nur Nachkommen der beiden 35S-AcGFP-MyaII*tail*- bzw. 35S-AcGFP-XI-B*tail*-überexprimierenden Pflanzenlinien in jedem untersuchten Gewebe punktförmige Strukturen. Interessanterweise sind die Signale auch noch in seneszenten Pflanzen zu beobachten (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 4.11 sind Aufnahmen einerseits von der Laubblattoberseite, andererseits von Wurzeln adulter 35S-AcGFP-XI-B*tail*- bzw. 35S-AcGFP-MyaII*tail*-überexprimierender Pflanzen gezeigt.

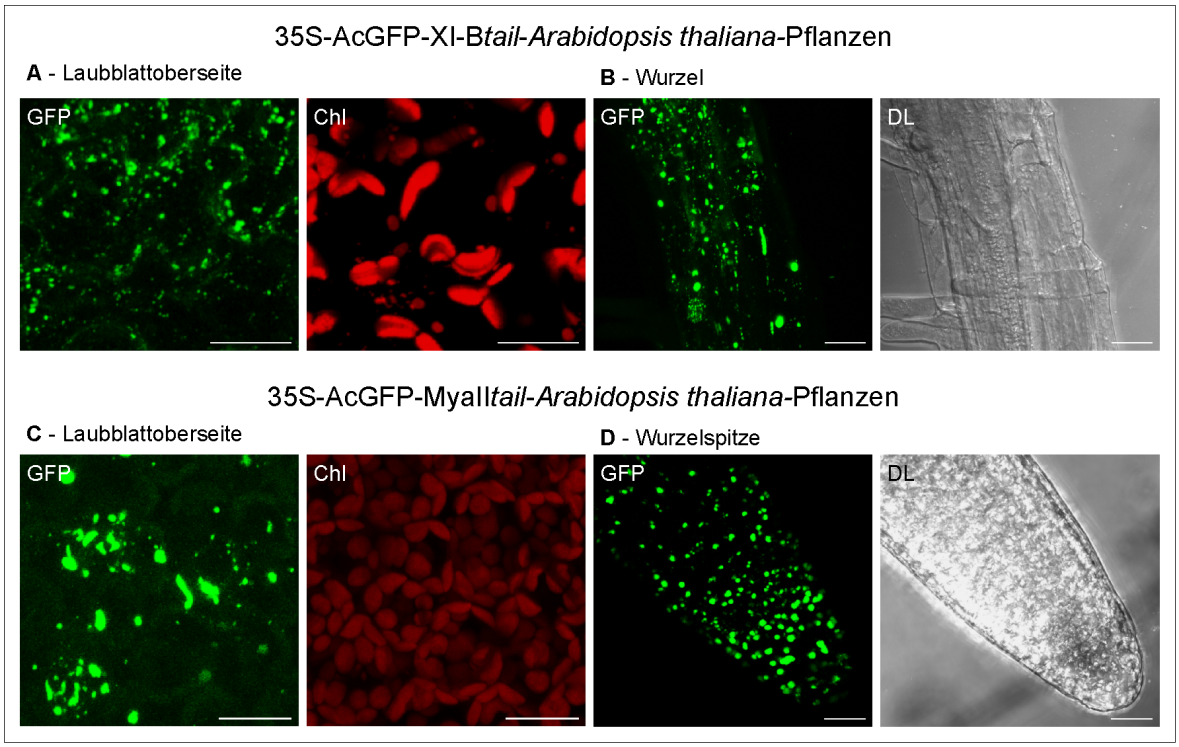

Abbildung 4.11.: Analyse des mikroskopischen Erscheinungsbildes der 35S-AcGFP-MyaII*tail*- bzw. 35S-AcGFP-XI-B*tail*-überexprimierenden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen. Im oberen Panel sind Mikroskopbilder der 35S-AcGFP-XI-B*tail*-Pflanzen zu sehen und im unteren Panel Mikroskopbilder der 35S-AcGFP-MyaII*tail*-Pflanzen. In **A** und **C** ist jeweils ein Ausschnitt zu sehen, der die obere Epidermis der Laubblätter abgebildet zeigt. In **B** und **D** sind Aufnahmen der Wurzel gezeigt. Es ist in allen GFP-Aufnahmen zu erkennen, dass beide Myosin-*tail*-Konstrukte in den untersuchten Geweben punktförmige Strukturen markieren. **GFP** zeigt Aufnahmen im GFP-Kanal, **Chl** Aufnahmen im Chlorophyllkanal und **DL** stellt das dazugehörige Durchlichtbild dar. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 20 µm.

Das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-B markiert im Laubblatt (Abb 4.11 A) verschie-

den große Strukturen, die meisten davon haben runde Silhouetten. Ein anderer Teil wirkt weniger distinkt und es scheint in manchen Zellen eine leichte cytoplasmatische Akkumulation des Konstrukts zu geben. In den Wurzeln (Abb 4.11 B) zeigt sich ein ähnliches Bild. Runde Strukturen verschiedener Größe tragen die vom *tail*-Konstrukt hervorgerufenen Fluoreszenzsignale. Die diffusen Signale sind in den Wurzeln nicht zu finden.

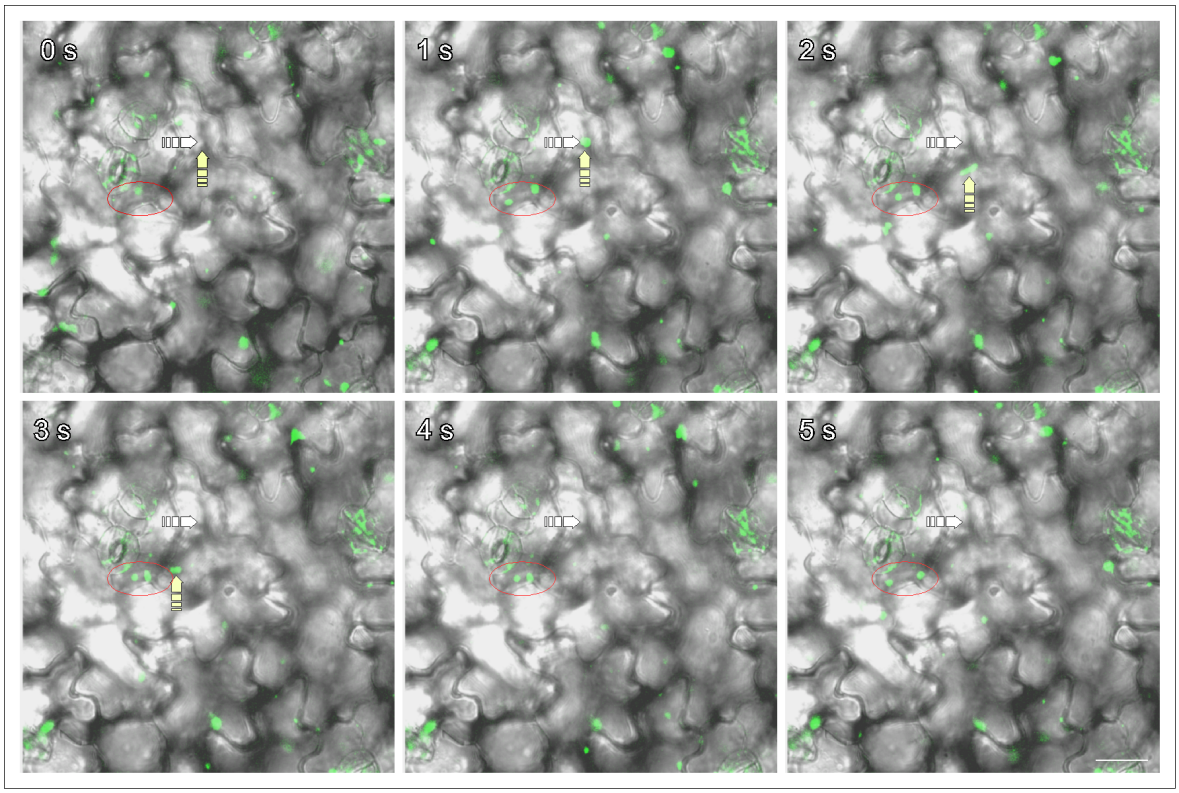

Abbildung 4.12.: Analyse der mikroskopischen Bewegungen in einer 35S-AcGFP-MyaII*tail*-überexprimierenden *Arabidopsis thaliana*-Pflanze. Es sind Aufnahmen der oberen Blattepidermis mit Hilfe konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie zu den Zeitenpunkten 0, 1, 2, 3, 4 und 5 s gemacht wurden. Es ist jeweils eine Bildkombination aus GFP- und DL-Kanal gezeigt. Der weiße Pfeil markiert den Ausgangspunkt eines Vesikels, der gelbe Pfeil den Punkt zum aktuellen Zeitpunkt. Nach 3 s ist der Vesikel aus der Fokusebene verschwunden. Die rote Ellipse markiert einen Bereich der Epidermis, in welchem weitere Bewegungen zu beobachten sind. Der Größenbalken entspricht einer Länge von 20 µm.

Das konstitutiv überexprimierte AcGFP-Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins MyaII bewirkt, dass im Laubblatt (Abb 4.11 C) sehr viele, unterschiedlich große und verschieden geformte Strukturen GFP-Fluoreszenz emittieren. Es handelt sich teilweise um sehr große, sehr stark fluoreszierende Strukturen, welche für Aggresomen[5] gehalten werden könnten. Die von dem Myosin-*tail*-Konstrukt ausgehenden Signale bewegen sich aber sehr schnell und im Mikroskop sind Vorgänge zu beobachten, welche an Membranfluss erinnern. Daher kann es sich nicht um Aggresomen handeln, denn diese bewegen sich nicht. In Abbildung 4.12 ist die Bewegung der

[5] Aggresomen sind von Cytoplasma eingeschlossene, aggregierte Fremdproteine, welche in der Nähe des Kerns lokalisiert sind (García-Mata *et al.*, 1999). Aggresomen zeichnen sich dadurch aus, dass sie sehr stark fluoreszieren, eine „rauhe“ Oberfläche haben und dass sehr wenige (meistens ein bis zwei) pro Zelle vorhanden sind. Die Bildung von Aggresomen scheint ein genereller Mechanismus der Zelle zu sein, wenn Proteine (Fremd- oder Eigenproteine) nicht schnell genug abbauen werden können bzw. eine Fehlfaltung aufweisen (Muqit *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2004).

vom *tail*-Konstrukt markierten Strukturen dargestellt. Dazu wurde von einen Blattausschnitt eine Zeitserie angefertigt. Es wurden vom Startpunkt (0 s) ausgehend Bilder nach einer, zwei, drei, vier und fünf Sekunden aufgenommen und in diesen Ausschnitte markiert, durch Pfeile bzw. eine elliptische Einrahmung, um die Veränderung nachvollziehbar zu machen.[6]

In den Wurzeln (Abb 4.11 D) sind die Signale, die vom MyaII*tail*-Konstrukt ausgehen, in etwa gleich groß und gleichmäßig rund. Dies spricht dafür, dass dieses Myosin-*tail*-Konstrukt in unterschiedlichen Geweben unterschiedliche *Cargos* hat.

Die beiden Myosin-*tail*-Konstrukte der Myosine XI-B und MyaII markieren in allen Geweben der Pflanze und in jedem Wachstumsstadium der Pflanze punktförmige Strukturen. Es ist nun von Interesse herauszufinden um welche Organellen es sich handelt. Dazu wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen[7] durchgeführt. Leider blieben diese bislang ergebnislos.

b) Analyse der 35S-AcGFP-XI-H*tail*-überexprimierenden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

Das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-H zeigte nach biolistischer Transformation von *Arabidopsis thaliana* eine cytosolische Lokalisation, d. h. es akkumulierte im Cytoplasma und im Zellkern (vgl. Abb. 4.3). Auch bei der Untersuchung der transgenen *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen deutete sich eine generelle, unspezifische Akkumulation des AcGFP-Konstrukts im Epidermiscytoplasma der Laubblätter an (siehe Abb. 4.13 A). Allerdings zeigten sich vesikuläre Strukturen in den Stomata (siehe Abb. 4.13 A').

Im Verlauf der genaueren, mikroskopischen Analyse dieser konnte festgestellt werden, dass sich die GFP-markierten Strukturen in den Stomata mit zunehmendem Alter der Pflanzen immer weiter verlieren und daraus eine Lokalisierung im Cytoplasma resultiert.

Daraufhin wurden juvenile, gerade erst entfaltet Laubblätter untersucht und es zeigte sich, wie in Abbildung 4.13 B zu sehen, dass in allen Zellen punktförmige Signale zu finden sind. Dies lässt vermuten, dass es sich bei diesem Myosin-*tail*-Konstrukt um das Konstrukt eines Myosins handelt, welches in im Wachstum befindlichen Zellen exprimiert wird.

Einen weiteren Hinweis zur Unterstützung dieser Vermutung liefert das Ergebnis der mikroskopischen Untersuchung der Wurzel von 35S-AcGFP-XI-H*tail*-überexprimierenden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen. Das Myosin-*tail*-Konstrukt wird nur in den Wurzelspitzen exprimiert und in wenigen Zellen nahe dem Wurzelspitzenmeristem sind vesikuläre Strukturen markiert (siehe Abb. 4.13 C). Je weiter man sich von der Wurzelspitze entfernt, umso weniger distinkt ist die Lokalisierung des *tail*-Konstrukts, wird zur cytoplasmatischen Lokalisation und verliert sich dann vollständig.

[6] Auf dem Datenträger (Ordner: Filme - Datei: Film-MyaII-Pflanze) im Anhang befindet sich der Film als Videodatei.

[7] Die Experimente wurden freundlicherweise von Dr. Dr. Gerd Hause am Universitätsbiozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

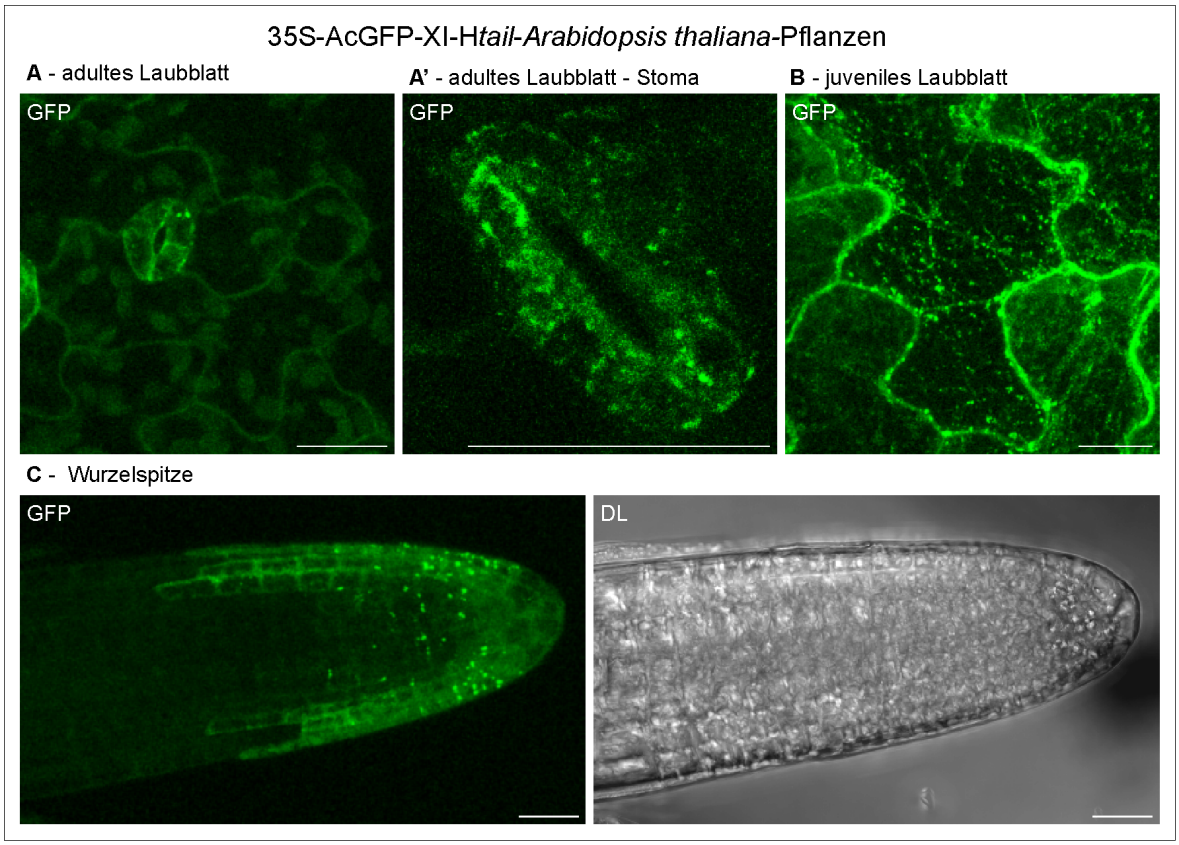

Abbildung 4.13.: Analyse des mikroskopischen Erscheinungsbildes der 35S-AcGFP-XI-H*tail*-überexprimierenden Pflanzen. Im oberen Panel sind Mikroskopbilder der obere Epidermis von adulten (**A**) bzw. juvenilen (**B**) Laubblättern abgebildet, wobei **A**' die vergrößtere Aufnahme eines Stomas von einem adulten Laubblatt zeigt. In **C** sind Aufnahmen der Wurzelspitze gezeigt. In den GFP-Aufnahmen **A'**, **B** und **C** sind punktförmige Strukturen durch das Myosin-*tail*-Konstrukt markiert. **GFP** zeigt Aufnahmen im GFP-Kanal und **DL** stellt das dazugehörige Durchlichtbild dar. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 20 µm.

Zur Identifizierung der markierten Vesikel waren die Wurzelspitzen einerseits zu fragil für die Vorbereitung zur elektronenmikroskopischen Untersuchung, andererseits war es nicht möglich eine biolistische Transformation durchzuführen, da die Transformationseffizienz und -rate verschwindend gering ist. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Laubblätter führte, wie auch schon bei den 35S-AcGFP-XI-B*tail*- bzw. 35S-AcGFP-MyaII*tail*-überexprimierenden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen zu keinem Ergebnis.

c) Analyse der 35S-AcGFP-XI-G*tail*-überexprimierenden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

Die letzten zur Analyse bereitstehenden Pflanzen waren jene der 35S-AcGFP-XI-G*tail*-überexprimierenden Pflanzenlinie.

Nach biolistischer Transformation zeigte das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-G eine Lokalisierung im Cytoplasma der oberen Epidermis des Laubblattes (vgl. Abb. 4.3). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der ersten mikroskopischen Untersuchung der F1-Nachkommen der transgenen Pflanzenlinie. Im rechten Teil der Abbildung 4.14 A ist die Aufnahmen einer Epidermiszelle eines adulten Laubblattes zu sehen. Die Umrisse der Zelle sind durch die Lokalisierung des Myosin-*tail*-Konstrukts im Cytoplasmasaum besonders gut zu erkennen. Weitere Strukturen sind nicht fluoreszenzmarkiert, daraus lässt sich ableiten, dass das Konstrukt wiederum nur unspezifisch im Cytoplasma akkumuliert.

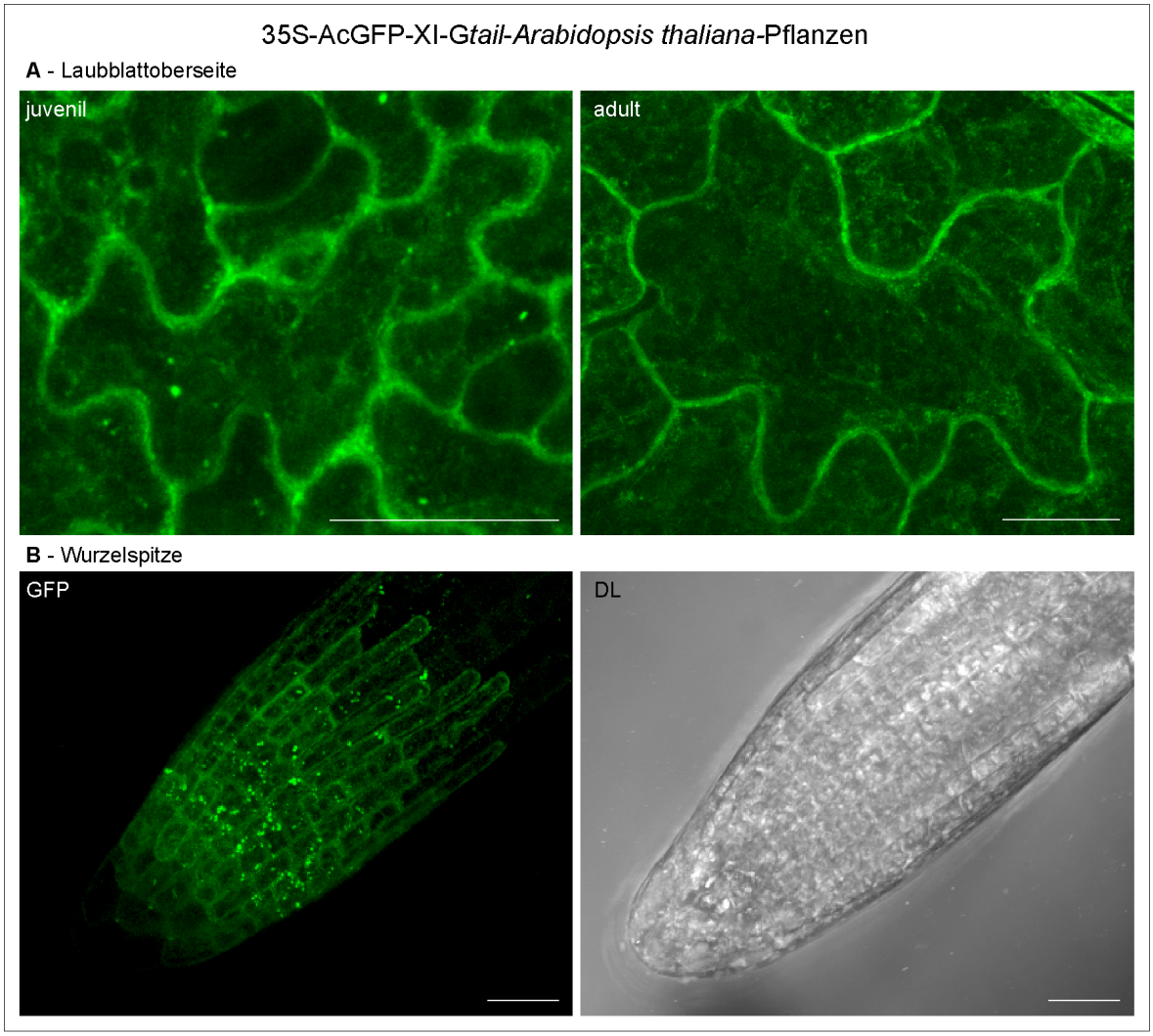

Abbildung 4.14.: Analyse des mikroskopischen Erscheinungsbildes der 35S-AcGFP-XI-G*tail*-überexprimierenden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen. A zeigt die obere Epidermis adulter bzw. juveniler Laubblätter. Es ist zu erkennen, dass nur im jungen Laubblatt distinkte Strukturen markiert sind. Im adulten Laubblatt hingegen ist nur noch eine cytosolische Lokalisation des Konstrukts zu beobachten. In **B** sind Aufnahmen der Wurzelspitze gezeigt. Erkennbar sind punktförmige Strukturen, die durch das Myosin-*tail*-Konstrukt markiert werden. **GFP** zeigt Aufnahmen im GFP-Kanal und **DL** stellt das dazugehörige Durchlichtbild dar. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 20 µm.

Ein weiteres Organ, welches mikroskopisch analysiert wurde, ist die Wurzel (siehe Abb. 4.14 B). Dabei fiel auf, dass das Konstrukt nur in der Streckungszone der Wurzel exprimiert wird und in dieser auch vesikuläre Strukturen markiert. Daneben reichert es sich wiederum stark im Cytoplasma an. Vergleicht man dieses Fluoreszenzmuster mit dem der Wurzelspitze der 35S-AcGFP-XI-H*tail*-überexprimierenden Pflanzen (siehe Abb. 4.13 C), stellt man fest, dass beide zwar ausschließlich in der Wurzelspitze exprimiert werden und dort distinkte Strukturen markieren können, aber es sich definitiv um zwei verschiedene Gewebe handelt.

Nach der Feststellung, dass das *tail*-Konstrukt in der Streckungszone der Wurzeln disktinkte Strukturen markiert, wurden junge, gerade entfaltete Laubblätter näher betrachtet. Bei der Mikroskopie dieser konnten ebenfalls punktförmige GFP-Fluoreszenzsignale detektiert werden. Es handelt sich dabei um wenige, zählbare Signale pro Zelle, welche verschiedene Größen, aber alle eine runde Form aufweisen.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der 35S-AcGFP-XI-G*tail*-überexprimierenden Pflanzen führte, wie bei allen anderen beschriebenen Pflanzenlinien, zu keinem Ergebnis.

Ein weitere Aspekt, der bei den Untersuchungen der Pflanzen auffiel, ist der vom Wildtyp abweichende makroskopische Phänotyp.

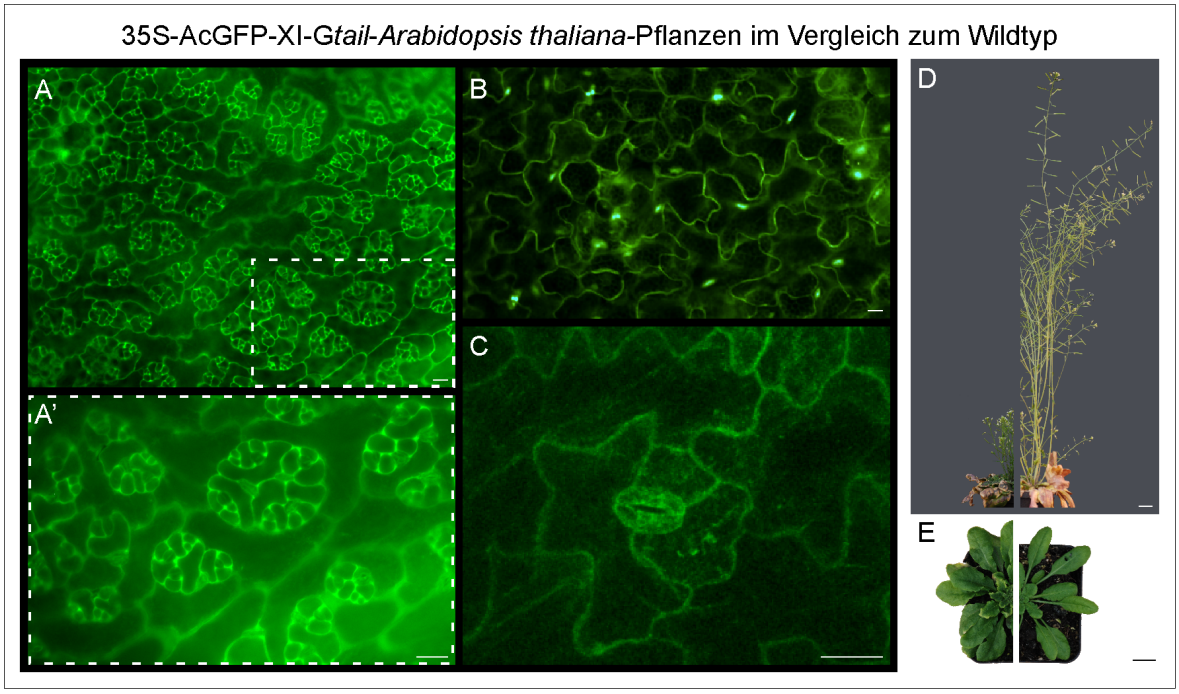

Abbildung 4.15.: Phänotypische Ausprägung der 35S-AcGFP-XI-G*tail*-überexprimierenden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen nach Anzucht auf Erde. A zeigt die 200fache Vergrößerung der oberen Blattepidermis einer 35S-AcGFP-XI-G*tail* überexprimierenden Pflanze nach Anzucht auf Erde, aufgenommen mit einem Epifluoreszenzmikroskop. **A'** stellt die Vergrößerung eines Ausschnittes des selben Bildes dar. **B** Es ist ein Ausschnitt aus der oberen Blattepidermis einer 35S-AcGFP-MCS-überexprimierenden Pflanze nach Anzucht auf Erde aufgenommen mit einem Epifluoreszenzmikroskop in 200facher Vergrößerung zu sehen. **C** zeigt die 630fache Vergrößerung der oberen Blattepidermis einer 35S-AcGFP-XI-G*tail*-überexprimierenden Pflanze nach Anzucht auf MS-Medium, aufgenommen mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie in Maximumprojektion. **D** Im linken Teil des Bildes ist eine blühende 35S-AcGFP-XI-G*tail*-überexprimierenden Pflanze und im rechten Teil des Bildes eine blühende Wildtyppflanze zu sehen. Beide Pflanzen haben das gleiche Alter. **E** Im linken Teil des Bildes ist eine 35S-AcGFP-XI-G*tail*-überexprimierende Pflanze und im rechten Teil des Bildes eine Wildtyppflanze zu sehen. Beide Pflanzen wurden jeweils zur gleichen Zeit ausgesät und fotografiert. Der Größenbalken der Mikroskopbilder entspricht einer Länge von 20 µm; der Größenbalken der Fotografien entspricht einer Länge von 2 cm.

Die 35S-AcGFP-XI-G*tail*-überexprimierenden Pflanzen wachsen auf Erde deutlich langsamer als der Wildtyp. Die F1-Nachkommen bleiben auch über die Ausbidlung der Blüte hinaus gedrungener als der Wildtyp, wie in Abbildung 4.15 D und E zu sehen ist. Für diese Abbildung sind Wildtyppflanzen und die F1-Nachkommen der 35S-AcGFP-XI-G*tail*-überexprimierenden Pflanzen identischen Alters vergleichend abgelichtet worden. In Abbildung 4.15 D fällt auf, dass die Blüten des Wildtyps (rechter Bildteil) vier bis fünf mal länger sind als jene der XI-G*tail*-Pflanzen (linker Bildteil). Und auch die Blattrosetten, welche in Abbildung 4.15 E gezeigt sind, unterscheiden sich. Die Blattrosette des Wildtyps (rechter Bildteil) sieht auf den ersten Blick zarter und kleiner aus. Schaut man jedoch genauer hin, dann sieht man, dass die Laubblätter längere Petioli (Stiele) haben und auch die Lamina (Blattspreite) ebenmäßiger ist.

Die Blattrosette der 35S-AcGFP-XI-G*tail*-überexprimierenden Pflanzen (linker Bildteil) ist gedrungener. Man sieht fast keinen Petiolus. Die Lamina lagert bei genauerem Hinsehen vermehrt Anthocyane ein und die jungen, gerade entfalteten Laubblätter bilden am Rand bereits Bereiche aus, welche an seneszente Laubblätter erinnern. Das 35S-AcGFP-XI-G*tail*-Konstrukt hindert die Pflanze scheinbar in ihrem natürlichen Wuchs.

Mikroskopisch betrachtet zeigt sich ebenfalls ein vom Wildtyp abweichendes Bild. Der übliche puzzleförmige Aufbau der Epidermis (Abb. 4.15 B) ist nicht mehr zu erkennen. Die Epidermis der 35S-AcGFP-XI-G*tail*-überexprimierenden Pflanzen (Abb. 4.15 A und A') sieht aus, als ob eine Art „Inselbildung“ stattgefunden hat und sich extrem viele Stomata bilden wollten.

Zieht man die 35S-AcGFP-XI-G*tail*-überexprimierenden Pflanzen auf MS-Medium an, dann entwickeln sie den natürlichen Wuchs des Wildtyps und behalten diesen auch nach Umsetzung auf Erde bei. Auch das mikroskopische Bild entspricht dann wieder dem des Wildtyps (Abb. 4.15 C).

4.5.2. Proteinbiochemische Analyse der transgenen, Myosin-*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzen

Nach den mikroskopischen Analysen der 35S-AcGFP-XI-x*tail*-überexprimierenden Pflanzen, welche GFP-Fluoreszenzsignale emittierten, schlossen sich proteinbiochemische Analysen dieser Pflanzen an.

Um die Ergebnisse richtig deuten zu können, muss man wissen, welche Molekulargewichte die AcGFP-XI-x*tail*-Konstrukte haben. Die Molekulargewichte wurden mit Hilfe der Aminosäuresequenzen der Konstrukte errechnet, einerseits für Monomere, andererseits für Dimere. Da vorerst unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet wurde, sollten die mit Hilfe des αGFP-Antikörpers zu detektierenden Signale in einem Größenbereich zu finden sein, der den Molekulargewichten der Monomere entspricht. Da man auf Grund des Aufbaus der *tail*-Konstrukte erwartet, dass *in vivo* Dimere ausgebildet werden, wurden zusätzlich die Molekulargewichte der Dimere errechnet. Außerdem könnten diese, entgegen der Erwartungen, ebenfalls detektiert werden. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 4.6 aufgelistet.

tail-Konstrukt	MG - Monomer	MG - Dimer
AcGFP-XI-B*tail*	98,6 kDa	197,2 kDa
AcGFP-XI-G*tail*	88,3 kDa	176,6 kDa
AcGFP-XI-H*tail*	99,6 kDa	199,2 kDa
AcGFP-MyaII*tail*	102,6 kDa	205,2 kDa

Tabelle 4.6.: Errechnete Molekulargewichte der AcGFP-Myosin-*tail*-Konstrukte. Es sind die errechneten Molekulargewichte (MG) der AcGFP-Myosin-*tail*-Konstrukte als Monomer und als Dimer in Kilodalton (kDa) angegeben.

a) Proteinbiochemische Analyse unter denaturierenden Bedingungen

In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob sich aus den Pflanzen die AcGFP-XI-x*tail*-Konstrukte isolieren lassen. Dazu wurden Gesamtproteinextrakte aus Laubblättern der Pflanzen hergestellt (siehe 8.4.3) und diese über eine Gradienten-SDS-PAGE (siehe 8.4.1) aufgetrennt. Das erhaltene SDS-Polyacrylamidgel wurde anschließend für den Blot auf eine PVDF-Membran genutzt und diese zur Western-Analyse (siehe 8.4.5) mit αGFP-Antikörpern eingesetzt (siehe Tab. 7.7).

In Abbildung 4.16 sind die Ergebnisse der Western-Analyse zu sehen. Es sind der ECL-Film (Abb. 4.16 B), die Ponceau S gefärbte PVDF-Membran (Abb. 4.16 C) und Bilder beider übereinander gelegt (Abb. 4.16 A) abgebildet. Es wurden Gesamtproteinextrakte der Pflanzenlinien 35S-AcGFP-XI-B*tail,* 35S-AcGFP-XI-G*tail,* 35S-AcGFP-XI-H*tail* und 35S-AcGFP-MyaII*tail* zur Untersuchung eingesetzt. Zusätzlich wurde als Kontrolle eine 35S-AcGFP-MSC-überexprimierende Pflanzenlinie analysiert. Diese Pflanzenlinie exprimiert das Reporterprotein AcGFP des Leervektors pRT100mod::AcGFP::MCS und wird als 35S-AcGFP-MCS-überexprimierend bezeichnet.

Auf dem Film ist jeweils eine starke Bande pro aufgetragenem Proteinextrakt erkennbar. Das Bandenmuster auf der Ponceau S gefärbten Membran unterscheidet sich von Spur zu Spur lediglich durch das unterschiedliche Laufverhalten, bedingt durch den sogenannten

Smiling-Effekt, abhängig von der Lage der Spur auf dem Gel. Auf der Membran sind keine distinkten Banden auf der Laufhöhe der Signale zu erkennen, welche vergleichbar wären mit jenen, welche nach der ECL-Entwicklung mit dem αGFP-Antikörper detektiert wurden.

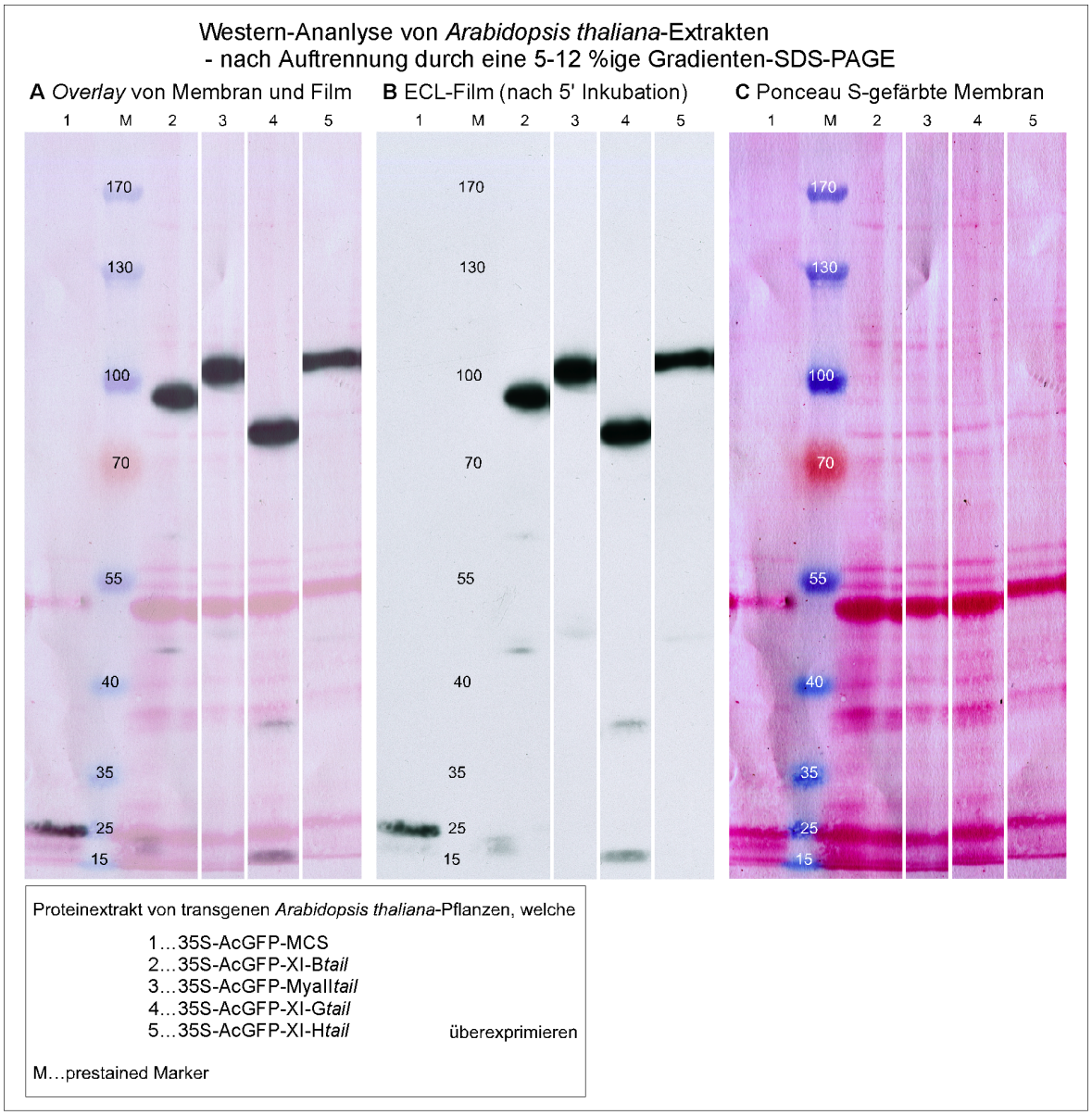

Abbildung 4.16.: Western-Analyse von *Arabidopsis thaliana*-Laubblattextrakten nach Auftrennung durch eine Gradienten-SDS-PAGE. Es wurden Proteinextrakte aus Blattmaterial von transgenen *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen durch eine 5-12 %ige SDS-Gradienten-PAGE aufgetrennt. Die verwendeten Pflanzen exprimieren die *tail*-Konstrukte 35S-AcGFP-XI-B*tail*- (2), 35S-AcGFP-MyaII*tail*- (3), 35S-AcGFP-XI-G*tail*- (4) und 35S-AcGFP-XI-H (5). Als Kontrolle wurde eine 35S-AcGFP-MCS-überexprimierende Pflanze (1) verwendet. Die erwarteten Größen der überexprimierten Proteine, welche mit einem GFP-Antikörper nachgewiesen wurden, betragen 26,9 kDa (1), 98,6 kDa (2), 102,6 kDa (3), 88,3 kDa (4) und 99,6 kDa (5). **A** zeigt die Übereinanderlagerung von Ponceau S gefärbter Membran und ECL-Film, um zu zeigen, dass die mit dem αGFP-Antikörper detektierten Signale nicht auf der Membran zu erkennen sind. Es gibt keine distinkten Banden an diesen Stellen. **B** ist der ECL-Film, welcher nach fünf Minuten Inkubation erhalten wurde und **C** ist die Ponceau S gefärbte Membran. Es sind in allen Fällen, außer auf Spur 5, zusätzlich Abbauprodukte im niederiger molekularen Bereich zu erkennen.

In Spur 1 wurde der Proteinextrakt einer 35S-AcGFP-MCS-überexprimierenden Pflanze aufgetrennt. Die Signale auf der Ponceau S gefärbten Menbran sind relativ schwach, aber

man erkennt deutlich die Signale der kleinen und großen Untereinheit der RuBisCo bei 15 und 53 kDa. Auf dem ECL-Film ist ein Signal bei etwa 25 kDa zu sehen. Dies entspricht dem Molekulargewicht des AcGFP von 27 kDa. Ein weiteres Signal ist nicht detektiert wurden, die Kontrolle kann somit als solche verwendet werden.

Der Proteinextrakt, welcher in Spur 2 aufgetragen ist, stammt von einer 35S-AcGFP-XI-B*tail*-überexprimierenden Pflanze. In dem Größenbereich von etwa 95 kDa ist auf dem ECL-Film eine starke Bande erschienen. Dies entspricht dem AcGFP-XI-B*tail*-Konstrukt, welches eine erwartete Größe von 98,6 kDa hat. Weiterhin werden bei ca. 60, 45 und 20 kDa schwache Banden detektiert, welche vermutlich Abbauprodukte des AcGFP-XI-B*tail*-Konstrukts sind.

Der dritte untersuchte Proteinextrakt (Spur 3) wurde von Blattmaterial einer 35S-AcGFP-MyaII*tail*-überexprimierenden Pflanze angefertigt. Die erwartete Größe des 35S-AcGFP-MyaII*tail*-Konstrukts beträgt 102,6 kDa und auf dem ECL-Film ist erwartungsgemäß eine Bande in diesem Größenbereich detektiert. Auch in diesem Fall ist ein Abbauprodukt des Konstrukts nachweisbar, etwa bei einer Größe von 62 kDa.

Der Proteinextrakt der 35S-AcGFP-XI-G*tail*-überexprimierenden Pflanze ist in Spur 4 aufgetrennt. Das AcGFP-XI-G*tail*-Konstrukt ist mit einer errechneten Größe von 88,3 kDa das kleinste der vier AcGFP-*tail*-Konstrukte. Die dazugehörige Bande konnte in einem Größenbereich von etwa 80 kDa nachgewiesen werden, als „kleinste“ der vier detektierten Signale. Das AcGFP-XI-G*tail*-Konstrukt hat zwei Degradationsprodukte mit einer Größe von ca. 38 und 15 kDa.

Die letzte analysierte Pflanzenlinie ist die 35S-AcGFP-XI-H*tail*-Überexprimierende. In Spur 5, in welcher der Proteinextrakt dieser aufgetragen ist, konnte ein Signal bei etwas mehr als 102 kDa erhalten werden. Das AcGFP-XI-H*tail*-Konstrukt hat eine Größe von 99,6 kDa. Damit liegt das Signal etwas höher als erwartet, allerdings kann dies auf das Laufverhalten des Konstrukts zurückzuführen sein. Im Fall des XI-H*tail*-Konstrukts konnten keine Abbauprodukte gefunden werden.

Die Analyse der 35S-AcGFP-XI-x*tail*-überexprimierenden Pflanzen unter denaturierenden Bedingungen ergab demzufolge, dass sich alle vier AcGFP-XI-x*tail*-Konstrukte als Monomere nachweisen lassen.

b) Proteinbiochemische Analyse unter nativen Bedingungen

Nachdem der Nachweis der Monomere unter denaturierenden Bedingungen erfolgt war, wurde versucht die Myosin-Dimere aus Blattmaterial unter nativen Bedingungen (siehe 8.4.3) zu extrahieren. Es wurden wiederum die vier Pflanzenlinien, welche die Myosin-*tail*-Konstrukte 35S-AcGFP-XI-B*tail,* 35S-AcGFP-XI-G*tail,* 35S-AcGFP-XI-H*tail* bzw. 35S-AcGFP-MyaII*tail* überexprimieren, untersucht. In Abbildung 4.17 ist das Ergebnis der Western Analyse (siehe 8.4.5) nach nativer Auftrennung (siehe 8.4.2) zu sehen.

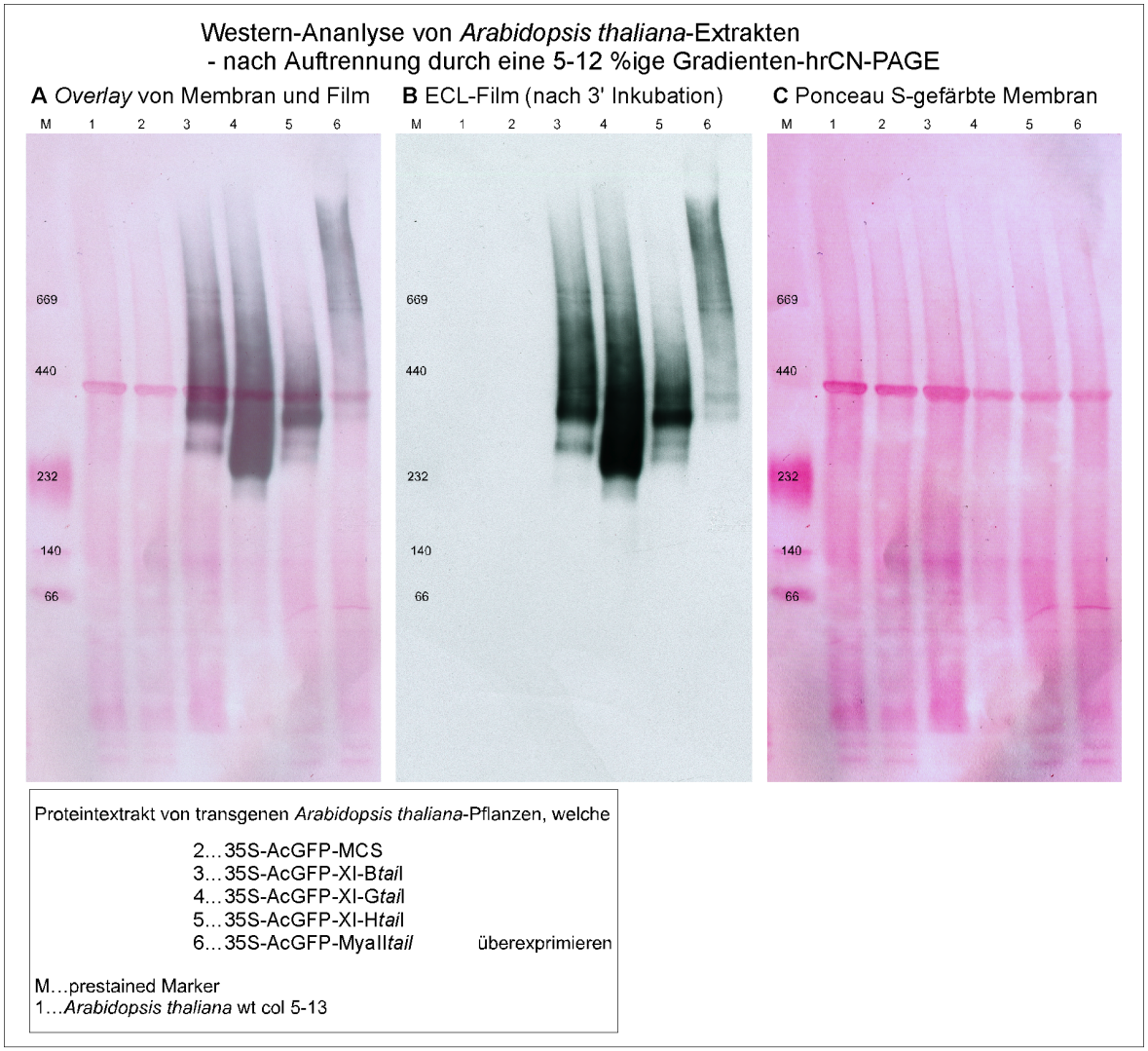

Abbildung 4.17.: Western-Analyse von *Arabidopsis thaliana*-Laubblattextrakten nach Auftrennung durch eine Gradienten-hrCN-PAGE. Es wurden Proteinextrakte aus Blattmaterial von transgenen *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen durch eine 5-12 %ige Gradienten-hrCN-PAGE aufgetrennt. Die verwendeten Pflanzen exprimieren die *tail*-Konstrukte 35S-AcGFP-XI-B*tail* (3), 35S-AcGFP-XI-G*tail* (4), 35S-AcGFP-XI-H*tail* (5) und 35S-AcGFP-MyaII*tail* (6). Als Kontrollen wurden der Wildtyp (wt) (1) und eine 35S-AcGFP-MCS-überexprimierende Pflanze (2) verwendet. Die erwarteten Größen der überexprimierten Proteine, welche mit einem GFP-Antikörper nachgewiesen wurden, betragen 26,9 kDa (2), 197,2 kDa (3), 176,6 kDa (4), 199,2 kDa (5) und 205,2 kDa (6). **A** zeigt die Übereinanderlagerung von Ponceau S gefärbter Membran und ECL-Film, um zu zeigen, dass die mit dem GFP-Antikörper detektierten Signale nicht auf der Membran zu erkennen sind. Es gibt keine distinkten Banden an diesen Stellen. **B** ist der ECL-Film, welcher nach drei Minuten Inkubation erhalten wurde und **C** ist die Ponceau S gefärbte Membran. Es sind in allen Fällen die Signale oberhalb der erwarteten Größe zu finden. Es ist weiterhin zu erkennen, dass es jeweils einen „Schmier“ in den höhermolekularen Bereichen gibt.

Es ist, wie schon Abbildung 4.16, der ECL-Film (Abb. 4.17 B), die Ponceau S gefärbte Membran (Abb. 4.17 C) und ein übereinandergelegtes Bild (Abb. 4.17 A) beider gezeigt.

Auf der Ponceau S gefärbten Membran sieht man keinen Unterschied zwischen den einzelnen Spuren und keine zusätzlichen, distinkten Banden in irgendeiner Spur. Es tritt eine starke Bande knapp unter 440 kDa auf. Dabei handelt es sich wiederum um RuBisCo, als Heterohexadecamer bestehend aus acht großen und acht kleinen Untereinheiten. Diese hat rein rechnerisch eine Größe von 540 kDa. Auf Grund der gewählten Reagenzien und der Auftrennung über die Gradienten-hrCN-PAGE ist das Laufverhalten derart verändert, dass die RuBisCo bei ca. 440 kDa zu finden ist.

In diesem Experiment wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Einerseits wurde der Wildtyp (Spur 1) mit aufgearbeitet, andererseits eine 35S-AcGFP-MCS-überexprimierende Pflanze (Spur 2) analysiert. Man sieht in beiden Fällen kein detektierbares Signal auf dem ECL-Film. Für den Wildtyp entspricht dies den Erwartungen, hingegen für die 35S-AcGFP-MCS-überexprimierende Pflanze nicht. Es sollte ein Signal bei 26,9 kDa geben. Die letzte Bande des Marker zeigt den Bereich um 66 kDa an und liegt im unteren Drittel der Trennstrecke. Der Bereich um 30 kDa müsste demnach in der Trennstrecke enthalten und nicht aus dem Gel eluiert sein. Da die gewählten Bedingungen das Laufverhalten der Proteine beeinflussen, wie für die RuBisCo gezeigt, können sie auch auf das Migrationsverhalten des AcGFP beschleunigend wirken und das Reporterprotein kann aus dem Gel eluiert sein. Der Proteinextrakt der 35S-AcGFP-MCS-überexprimierenden Pflanze (Spur 2) ist in diesem Fall keine Positivkontrolle, da kein Signal detektiert werden konnte. Das Experiment wurde allerdings mehrfach durchgeführt und dabei wurde das erwartete Signal detektiert, so dass es prinzipiell eine Positivkontrolle darstellt. Der Proteinextrakt des Wildtyp kann als Negativkontrolle verwendet werden.

Ab der dritten Spur wurden Laubblattproteinextrakte der 35S-AcGFP-XI-x*tail*-überexprimierenden Pflanzen aufgetrennt. Auf dem ECL-Film sieht man in Spur 3 ein Signal bei ca. 270 kDa und ein starkes Signal bei ca. 320 kDa mit einem langen „Schmier“ in den hochmolekularen Bereich. Das dazugehörige AcGFP-Konstrukt des Myosins XI-B hat als Dimer eine Größe von 197,2 kDa und müsste demnach unterhalb des Detektierten liegen.

In Spur 4 ist das Gesamtlaubblattprotein einer 35S-AcGFP-XI-G*tail*-überexprimierenden Pflanze aufgetragen. Man sieht einen sehr starken „Schmier“ ab ca. 230 kDa ins Höhermolekulare. Das *tail*-Konstrukt-Dimer des Myosins XI-G hat eine errechnete Größe von 176,6 kDa und ist, wie bereits erwähnt, das kleinste der vier Konstrukte. Der „Schmier“ fängt in einem Bereich von ca. 230 kDa an. Damit liegt er unterhalb aller anderen detektierten Signale. Dies gibt einen Hinweis, dass nicht unspezifisches Protein detektiert wurde, sondern Proteine, die AcGFP-XI-G*tail* enthalten. Auch die Signale der anderen *tail*-Konstrukte konnten entsprechend ihrer erwarteten Größen angeordnet nachgewiesen werden. So konnte das 35S-AcGFP-XI-H-*tail*-Dimer mit einer errechneten Größe von 199,2 kDa in einem Bereich von ca. 270 kDa nachgewiesen werden. Das ist vergleichbar sowohl in der Größe, als auch im Bereich, in dem es detektiert wurde, mit dem Konstrukt des Myosins XI-B. Auch im Proteinextrakt der 35S-AcGFP-XI-H*tail*-überexprimierenden Pflanze trat ein „Schmier“ ins Hochmolekulare auf, auch wenn dieser deutlich kürzer ausfällt. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die beiden Konstrukte mit unterschiedlichen Proteinen interagieren.

Der Proteinextrakt der 35S-AcGFP-MyaII*tail*-überexprimierenden Pflanze zeigt das schwächste Signal, welches zusätzlich ab ca. 400 kDa in den sehr hochmolekularen Bereich „schmiert“. Es ist eine schwache Bande bei etwa 420 kDa zu sehen. Das entspricht nahezu dem Doppelten des errechneten Wertes von 205,2 kDa für die Größe des Dimers.

Das Laufverhalten aller AcGFP-Myosin-*tail*-Konstrukte wird wiederum durch die Extraktions- und Trennbedingungen beeinflusst sein und es könnten zusätzlich Interaktionspartner an der *Cargo*-Bindedomäne haften, welche den „Schmier“ ins Hochmolekulare verursachen.

In nachfolgenden Experimenten wurde versucht eine 2D-Trennung der Proteinextrakte anzufertigen. Allerdings war es bis zum Abschluss der experimentellen Arbeiten nicht möglich Signale auf dem SDS-Polyacrylamid-Gel der zweiten Dimension nachzuweisen. Es sind an dieser Stelle weitere Optimierungen und Untersuchungen denkbar und durchführbar.

Teil III.

Diskussion

5. Molekulares Werkzeug

5.1. Das Vektorset erleichtert die geplanten Klonierungen und schafft einheitliche experimentelle Bedingungen

Vor den eigentlichen Experimenten zur Untersuchung der Klasse-XI-Myosine von *Arabidopsis thaliana* wurde ein Vektorset erstellt. Es wurden Varianten des Plasmids pRT100mod (vgl. Abb. 3.1) erstellt, die eines von vier Fluoreszenzproteingenen (siehe Abschnitt 3.1) und entweder *N*- oder *C*-terminal daran angefügt eine MCS enthielten.

Der Vektor pRT100mod (siehe Abschnitt 3) enthält die nötige pflanzliche Expressionskassette unter Kontrolle eines konstitutiven 35S-Promotors und die Fluoreszenzproteine stellen die nötigen Reporter für die Mikroskopie dar. Da die gewählten Fluoreszenzproteine alle echte Monomere bilden (Veith und Veith, 2005; Merzlyak *et al.*, 2007), können unerwünschte Dimerisierungs- bzw. Oligomerisierungsartefakte ausgeschlossen werden. Ein weiterer Vorteil des Einsatzes von Fluoreszenzproteinen stellt die schnelle Detektierbarkeit mittels üblicher Fluoreszenzmikroskope dar und dass sich das resultierende Bild in den meisten Fällen gut deuten lässt.

Nach der Herstellung des Vektorsets stand das nötige molekulare Werkzeug zur Verfügung, um den gewünschten, geringen Klonierungsaufwand zu haben und die Bedingungen während der Experimente zu standardisieren. Der pRT100mod bietet dabei den Vorteil, dass er mit ca. 3,5 kb sehr klein ist und sich gut eignet für die Klonierungen. Der enthaltene 35S-Promotor liefert einerseits eine starke Expression des gewünschten Zielproteins in den transformierten Pflanzenzellen. Dies kann aber andererseits einen Nachteil bedeuten, wenn das Zielprotein auf Grund der starken Expression im Cytosol akkumuliert und dadurch die eigentliche Lokalisation „überdeckt“ wird. Um dies zu umgehen, könnte man weitere Promotoren, wie induzierbare oder native einsetzen, aber um den Klonierungsaufwand angemessen und eine generelle, standardisierte Funktionalität der Experimente zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit der pRT100mod und die generierten Varianten verwendet.

5.2. Nach dem mikroskopischen Test standen zwei Fluoreszenzproteinkombinationen für *Co*-Lokalisationsexperimente zur Verfügung

Im Anschluss an die Erstellung des Vektorsets wurde ein Test mit den pRT100mod-Varianten (vgl. Abb. 3.1) und den darin enthaltenen Fluoreszenzproteinen durchgeführt, um die Funktionalität dieser zu prüfen und zu sehen, ob sich mindestens zwei dieser Fluoreszenzproteine mit

den vorhandenen Geräten optisch einwandfrei voneinander trennbar darstellen lassen. D. h. es wurde untersucht, ob unerwünschter *Crosstalk* auftritt bzw. dass dies ausgeschlossen werden kann. Alle gewählten Fluoreszenzproteine waren funktionstüchtig und es ergaben sich zwei mögliche Kombinationen (AcGFP+TagRFP bzw. eCFP+eYFP) für die durchzuführenden *Co*-Lokalisationsstudien, wodurch auch für diese einheitliche Bedingungen geschaffen wurden.

Am Ende der Klonierung des Vektorsystems waren für die geplanten Experimente immer die gleichen Bedingungen geschaffen, d. h. gleiches Expressionsystem mit gleichem Reporter und damit gleiche „Expressionsstärke“ bei gleicher Plasmidzahl pro Zelle, soweit das nach biolistischer Transformation von lebendem Gewebe zu sagen möglich ist.

5.3. Das Markervektorset ermöglicht *Co*-Lokalisationsstudien

Die pRT100mod::FP-Varianten (vgl. Abb. 3.1) bildeten die Grundlage, um ein Markervektorset zu generieren.

Es gelang pRT100mod::Marker::FP-Varianten für Oleosomen, Golgi-Vesikel, Tubulin und Peroxisomen zu erstellen (siehe Abschnitt 3.4), wodurch *Co*-Lokalisationsstudien mit den Myosin-Konstrukten möglich sind, wiederum unter einheitlichen Ausgangsbedingungen.

Es konnte kein brauchbarer Mitochondrien-Marker kloniert werden. Die zwei getesteten der bereits publizierten Mitochondrien-Marker (Nelson *et al.*, 2007; Rödiger *et al.*, 2011) waren nicht für die Markierung von *Arabidopsis thaliana*-Mitochondrien geeignet. Dies kann einerseits durch die Kombination mit den Fluoreszenzproteinen bedingt sein, andererseits auf die Transformationsmethode und/oder das untersuchte Gewebe zurückzuführen sein.

Das verwendete Cytochrom C1-Konstrukt stammt aus Kartoffel und wurde von Rödiger *et al.* (2011) in *Pisum sativum* nach biolistischer Transformation untersucht. Da der gleiche Vektor und die gleiche Transformationsmethode verwendet wurden, wird die cytosolische Lokalisierung in *Arabidopis thaliana* höchstwahrscheinlich speziesbedingt sein.

Das verwendete Cytochrom C-Oxidase IV-Konstrukt (ScCOX4) stammt aus *Saccharomyces cerevisiae*. Da es sich dabei um Hefe und somit um keinen pflanzlichen Organismus handelt, ist es weniger verwunderlich, dass es keinen Import in die *Arabidopsis thaliana*-Mitochondrien gibt. Zwar konnten die Autoren Nelson *et al.* (2007) transgene *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen mit Hilfe dieses Markers erstellen, aber für die biolistische Transformation war er ungeeignet, da nur in etwa jeder zehnten transformierten Zelle Mitochondrien markiert wurden. Für zukünftige *Co*-Lokalisationsstudien könnte die Suche nach einem geeigneten Mitochondrienmarker fortgesetzt werden.

Die Suche nach geeigneten Marker-Konstrukten ist als nicht abgeschlossen zu betrachten und bietet für weitere Arbeiten vielzählige Möglichkeiten.

6. Die Klasse-XI-Myosine aus *Arabidopsis thaliana*

Als Ausgangspunkt der Untersuchung der Klasse-XI-Myosine von *Arabidopsis thaliana* im Rahmen dieser Arbeit standen vier Fragen zur Beantwortung:

1. Welche *Cargo*-Spezifität besitzt jedes einzelne der dreizehn *Arabidopsis thaliana*-Klasse-XI-Myosine, wenn es transient in *Arabidopsis thaliana* überexprimiert wird?
2. Gibt es Funktionshomologien der Klasse-XI-Myosine aus *Arabidopsis thaliana* zu Klasse-XI-Myosinen in anderen Pflanzenspezies?
3. Arbeiten die Klasse-XI-Myosine gewebespezifisch?
4. Lassen sich Myosin-*tail*-Proteine aus transgenen *Arabidopsis thaliana*-Myosin-*tail*-Konstrukt überexprimierenden Pflanzen isolieren und biochemisch charakterisieren?

Die Diskussion der zur Beantwortung dieser Fragen durchgeführten Experimente wird im Folgenden chronologisch zu den Experimenten und in Bezug auf die einzelnen Fragen abgehandelt.

6.1. Welche *Cargo*-Spezifität besitzt jedes einzelne der dreizehn *Arabidopsis thaliana*-Klasse-XI-Myosine, wenn es transient in *Arabidopsis thaliana* überexprimiert wird?

Um diese Frage zu beantworten, wurden *tail*-Konstrukte der einzelnen Klasse-XI-Myosine erstellt und überprüft, welche dann zur biolistischen Transformation von *Arabidopsis thaliana* eingesetzt wurden. Es wurde außerdem getestet, ob mit der gewählten Methode das erwartete Ergebnis beobachtbar ist.

6.1.1. Nicht alle Sequenzen der erhaltenen Myosin-*tail*-Konstrukte weisen Übereinstimmung zur Vorhersage auf

Es konnten *tail*-Konstrukte aller dreizehn Klasse-XI-Myosine von *Arabidopsis thaliana* erstellt werden. Von diesen weichen zwei in ihrer Sequenz von der Vorhersage ab. Es handelt sich dabei um die *tail*-Konstrukte der Myosine XI-D und XI-J.

Für das Myosin XI-D konnten zwei *tail*-Konstrukte erstellt werden, bei welchen es sich vermutlich um alternative *Splicing*-Produkte handelt. Das Myosin-*tail*-Konstrukt XI-D2 wurde

in dieser Form auch von Avisar *et al.* (2009) gefunden. Schaut man sich die Aminosäuresequenzen der Vorhersage und der erhaltenen Konstrukte vergleichend an, ist zu erkennen, dass eine Veränderung immer im gleichen Bereich auftritt und es durch die Veränderung keine Leserasterverschiebung gibt:

	Sequenz
Vorhersage	1255QKSLDLFVFMYLFQP1269
XI-D1	1255Q P1256
XI-D2	1255QVSFTRPP P1263

Tabelle 6.1.: Sequenzvergleich der verschiedenen Myosin-XI-D-Varianten. Aufgeführt sind die Aminosäuresequenzen der Vorhersage und der erhaltenen XI-D-Varianten im abweichenden Bereich. In rot sind die übereinstimmenden und in schwarz die abweichenden Aminosäuren dargestellt.

Es ist bekannt, dass bei Myosinen differenzielles *Splicing* auftreten kann (Peremyslov *et al.*, 2011; Jiang und Ramachandran, 2004) und dass Myosine durchaus mehrere, verschiedene *Cargos* haben können (Dunn *et al.*, 2007; Golomb *et al.*, 2008). Durch das *Splicing* könnten mehrere, verschiedene *Cargo*-Spezifitäten generiert werden. Es gibt aber auch weitere Möglichkeiten dies zu erreichen, dafür wären allerdings posttranslationale Modifikationen der Myosine nötig.

Auch nach mehrfachen Klonierungsversuchen mit *cDNA* aus verschiedenen Geweben von *Arabidopsis thaliana* (col 5-13) wurde für das Myosin XI-J eine Sequenz, welcher 10 Nukleotide im Vergleich zur Vorhersage fehlen, gefunden. Auf Grund dieser fehlenden Nukleotide kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters und das resultierende Protein ist um 67 Aminosäuren kürzer als das Vorhergesagte. Es ist nicht einfach eine plausible Erklärung dafür zu finden, denn das erhaltene eYFP-XI-J*tail*-Konstrukt akkumuliert scheinbar unspezifisch in den Epidermiszellen und scheint damit ein funktionsloses Produkt bzw. ein Konstrukt ohne *Cargo*-Spezifität zu sein. Wie in Abb. 4.2 gezeigt, fehlt dem resultierenden Protein die *low complexity*-Domäne, was evtl. dazu führt, dass die *Cargo*-Bindung nicht zustande kommt. Man müsste weitere Gewebe untersuchen, um herauszufinden, ob das Konstrukt in diesen auch unspezifisch im Cytosol akkumuliert. Hierzu wurden auf Basis des *tail*-Konstrukts transgene Pflanzen erstellt (vgl. 4.5). Leider gelang es nicht, transgene und auch fluoreszierende das XI-J*tail*-Konstrukt überexprimierende Pflanzen zu finden, um dies zu klären.

Eine andere Arbeitsgruppe konnte ein XI-J-Konstrukt in *Nicotiana benthamiana* an Golgi-Vesikeln und Mitochondrien lokalisiert nachweisen (Reisen und Hanson, 2007). Eine weitere Arbeitsgruppe kam zu dem Ergebnis, dass das Myosin XI-J diffus im Cytoplasma von *Nicotiana benthamiana* zu finden ist (Avisar *et al.*, 2009). Beide Gruppen geben an, dass die von ihnen erhaltene Sequenz für XI-J mit der Vorhersage übereinstimmt. Da es sich bei *Nicotiana benthamiana* nicht um das authentische System handelt, sind die Ergebnisse nur eingeschränkt vergleichbar. Man müsste diese Konstrukte in *Arabidopsis thaliana* untersuchen, um einen Vergleich ziehen zu können. Will man herausfinden, ob es sich bei dem für diese Arbeit generierten XI-J*tail*-Konstrukt um eine Mutation innerhalb der vorliegenden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzenlinie handelt, könnte man eine weitere *Arabidopsis thaliana*-Pflanzenlinie vom Ökotyp col 5-13 nutzen, um von dieser *cDNA* zu synthetisieren und ein neues XI-J-

Konstrukt zu amplifizieren.[1] Entspricht das Konstrukt der Vorhersage wüsste man, dass es sich bei der vorliegenden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzenlinie nicht mehr um den ursprünglichen Ökotypen col 5-13 handelt. Ergibt sich aber, dass wiederum zehn Nukleotide fehlen, handelt es sich nicht um eine Mutation innerhalb der vorliegenden Linie. Daraus folgend sollte geklärt werden, wodurch das Fehlen der Nukleotide bedingt ist und welche Funktion das verkürzte Protein hat.

6.1.2. Die biolistische Transformation ist eine geeignete Methode zur Untersuchung der *Cargo*-Spezifität

Die biolistische Transformation ist eine Methode, welche es ermöglicht schnell und einfach lebendes Gewebe zu transformieren. Bei der biolistischen Transformation der Laubblattoberseite von *Arabidopsis thaliana* ist allerdings nur die obere Epidermis zuverlässig transformierbar. Dies ist lediglich eines der unzähligen pflanzlichen Gewebe und somit liefern die Ergebnisse lediglich Hinweise zur *Cargo*-Spezifität.

Die subzelluläre Lokalisierung der erstellten vierzehn Myosin-*tail*-Konstrukte wurde in mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten beobachtet und ließ sich für alle Konstrukte jeweils verifizieren, d.h. es wurde bei jedem Konstrukt mehrmals die gleiche Lokalisierung beobachtet. Einerseits konnten unspezifische Lokalisierungen, andererseits Lokalisierungen an distinkten Strukturen beobachtet werden.

Die unspezifischen Lokalisierungen, bei welchen die Fluoreszenzsignale im Cytoplasma oder im Cytoplasma und im Zellkern beobachtet werden konnten, deuten daraufhin, dass entweder die Fusion aus Myosin-*tail*-Konstrukt und Fluoreszenzprotein nicht korrekt vorlag und somit nur die Lokalisierung eines unfusionierten Fluoreszenzproteins[2] zu beobachten ist oder dass das entprechende *Cargo* nicht vorhanden bzw. sehr klein ist. Es ist nicht davon auszugehen, dass es sich um einen Fehler bei der Expression der Fusion handelt, da einerseits die Sequenzierung die Korrektheit der Konstrukte ergab[3] und andererseits in den meisten Fällen (siehe Tab. 4.3) eine Lokalisierung nur im Cytoplasma und nicht zusätzlich im Zellkern zu beobachten war, wie es für ein unfusioniertes Fluoreszenzprotein zu erwarten wäre. Es ist wahrscheinlicher, dass das entsprechende *Cargo* bzw. der nötige Interaktionspartner zur Bindung des *Cargos* in den Zellen der oberen Laubblattepidermis von *Arabidopsis thaliana* nicht vorhanden ist. Weiterhin ist denkbar, dass das *Cargo* derart winzig ist, dass es scheint, als würde die Myosin-*tail*-FP-Fusion unspezifisch im Cytoplasma akkumulieren, obwohl das *Cargo* gebunden ist. Es sind Myosine beschrieben, welche Einzelmoleküle transportieren (Li und Nebenführ, 2008b). Der Nachweis dessen könnte eventuell über eine zweidimensionale proteinchemische Auftrennung von Extrakten aus den Myosin-*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzen erfolgen.

Die Myosin-*tail*-Konstrukte, deren Fluoreszenzsignale punktförmige Strukturen zeigten, sind vermutlich an vesikulären Strukturen lokalisiert. Man könnte aber auch davon ausgehen, dass

[1] Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht auf Grund der Vielzahl der zur Verfügung stehenden Konstrukte, welche distinkte Strukturen markieren.

[2] Die Lokalisierung eines unfusionierten Fluoreszenzproteins erstreckt sich über Cytoplasma und Zellkern, wie in Abb. 3.3 zu sehen ist.

[3] Der Abbau des *tail*-Konstrukts bzw. ein partieller Abbau der Fusion kann nicht ausgeschlossen werden, da dies allerdings nicht zu beweisen ist, wird auf eine Erklärung diesbezüglich verzichtet.

es sich um Akkumulation der überexprimierten Proteine zu sogenannten Aggresomen handelt. Dies ist einerseits auszuschließen, da einige der Strukturen identifiziert werden konnten (vgl. Abschnitt 4.4), andererseits ist Bewegung der punktförmigen Strukturen zu beobachten. In Abbildung 6.1 ist eine Zeitserie einer *Arabidopsis thaliana*-Epidermiszelle zu sehen, welche mit Hilfe von biolistischer Transformation mit dem pRT100mod::eYFP::MyaII*tail* transformiert wurde. Die Pfeile zeigen, wie sich an verschiedenen Stellen die Signale über die Zeit betrachtet bewegen. Dies ist zusätzlich ein Beweis dafür, dass nicht nur überexprimierte *tail*-Konstrukte an den Vesikeln binden, sondern auch die authentischen Myosine, welche den Transport bewerkstelligen und somit die Bewegung hervorrufen. Es sind demnach unzählige Bindestellen oder Rezeptoren für Myosine auf der Oberfläche der Vesikel vorhanden. Und ein Vesikel wird folglich nicht nur von einem Motorprotein transportiert. Ob allerdings die Geschwindigkeit, mit welcher die Vesikel transportiert werden, durch die Überexpression der transportunfähigen[4] *tail*-Konstrukte verringert ist, wurde nicht untersucht. Es gibt bereits Publikationen, in welchen beschrieben ist, dass die Geschwindigkeit des Organelltransports durch die Überexpression von Myosin-*tail*-Konstrukten (Sparkes *et al.*, 2008) beeinflusst wird.

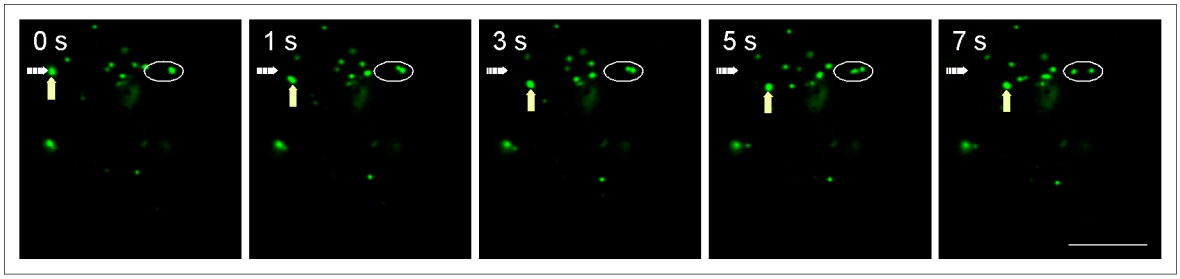

Abbildung 6.1.: Analyse der mikroskopischen Bewegungen von 35S-eYFP-MyaII*tail*-markierten Strukturen nach biolistischer Transformation. Es sind Aufnahmen einer Zelle der oberen Blattepidermis von *Arabidopsis thaliana* nach biolistischer Transformation mit pRT100mod::AcGFP::MyaII*tail* mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie zu den Zeiten 0, 1, 3, 5 und 7 s im GFP-Kanal gemacht wurden. Der weiße Pfeil markiert den Ausgangspunkt eines Vesikels, der gelbe Pfeil den Punkt zum aktuellen Zeitpunkt. Die Ellipse markiert einen weiteren Bereich der Epidermis in welchem ebenfalls Bewegung zu beobachten ist. Der Größenbalken entspricht einer Länge von 20 µm.

6.1.3. Einige der markierten *Cargos* konnten mit Hilfe von *Co*-Lokalisationsstudien identifiziert werden

Von den vierzehn zu analysierenden Myosin-*tail*-Konstrukten konnten acht an distinkten Strukturen lokalisiert gefunden werden (vgl. Tab. 4.3). Das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-I markiert filamentöse Strukturen, während die restlichen sieben *tail*-Konstrukte vesikelartige Fluoreszenzsignale in den Epidermiszellen von *Arabidopsis thaliana* hervorrufen. Mit Hilfe von *Co*-Lokalisationsstudien wurde versucht die Identität der Strukturen aufzuklären. Dazu standen vier chimäre Fluoreszenzprotein-Marker-Konstrukte zur Verfügung (vgl. Abschnitt 3.4 und 5.3).

Das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins MyaI konnte mit Oleosomen *co*-lokalisiert gefunden werden, das *tail*-Konstrukt des Myosins XI-D (XI-D1*tail*) markiert Golgi-Vesikeln und das des Myosins XI-I Tubulin.

[4] Die Myosin-*tail*-Konstrukte haben keine Motordomäne und können das *Cargo* nur binden, aber nicht transportieren.

Es ist ungewöhnlich, dass ein Motorprotein, welches sich an Aktin bewegt, Tubulin als *Cargo* hat. Doch es gibt zwei mögliche Erklärungen für dieses Phänomen. Einerseits könnte es als eine Art Stabilisator für das Cytoskelett der Zelle dienen (Peremyslov *et al.*, 2010), andererseits ist denkbar, dass das Myosin XI-I ein *Cargo* „übernimmt“, welches zuvor von Dynein oder Kinesin transportiert wird und die Lokalisation am Tubulin nur während der „Wartezeit“ vorherrscht. Um dies zu klären, wäre es wichtig herauszufinden, ob die punktförmigen Strukturen, welche in den mit dem Myosin-XI-I*tail*-Konstrukt transformierten Zellen neben den filamentösen Strukturen zu beobachten sind, anhand von *Co*-Lokalisationsstudien zu identifizieren sind oder ob diese tatsächlich nur Überexpressionsartefakte sind.

Des Weiteren war es nicht zu erwarten, dass eines der Myosin-*tail*-Konstrukte in der oberen Epidermis von *Arabidopsis thaliana*-Laubblättern an Oleosomen lokalisiert gefunden werden konnte. Oleosomen dienen der Fettspeicherung in Speicherorganen, wie etwa Ölsamen (Huang, 1996) und man könnte davon ausgehen, dass sie in Laubblättern normalerweise nicht verhanden sind. Dennoch wird beschrieben, dass sie in allen pflanzlichen und sogar in einigen tierischen Geweben gefunden werden können (Frandsen *et al.*, 2001) und auch die Autoren der Publikation, in welcher der verwendete Marker ursprünglich beschrieben ist, konnten Oleosomen in den Epidermiszellen von *Nicotiana benthamiana* beobachten (Wahlroos *et al.*, 2003). Es kann also davon ausgegangen werden, dass MyaI in *Arabidopsis thaliana* tatsächlich Oleosomen transportiert.

Zur Identifizierung der übrigen vesikelartigen Strukturen sind weitere *Co*-Lokalisationsexperimente mit weiteren Markern nötig. Um Hinweise zu bekommen, um welche Strukturen es sich handeln könnte, könnte man die beobachteten Signale vermessen und anhand der Größe Rückschlüsse ziehen, welche *Co*-Lokalisationsexperimente sinnvoll wären.

6.1.4. Die identifizierten *Cargos* zeigen keinerlei Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen *Cargos*

Durch die *Co*-Lokalisationsstudien konnten drei der Klasse-XI-Myosine von *Arabidopsis thaliana* je ein *Cargo* zugeordnet werden. In der oberen Epidermis der Laubblätter von *Arabidopsis thaliana* transportiert das Myosin MyaI Oleosomen, das Myosin XI-D unter anderem Golgi-Vesikel und das Myosin XI-I ist an Tubulin gebunden zu finden. Vergleicht man dieses Ergebnis nun mit in der Literatur beschriebenen *Cargos* ist keinerlei Übereinstimmung zu finden.

In Tabelle 6.2 sind die bisher für die Klasse-XI-Myosine von *Arabidopsis thaliana* gefundenen *Cargos* aufgelistet. Zusätzlich sind Angaben zum Aufbau der untersuchten Konstrukte, die verwendete Analysemethode und der Organismus in welchem die Untersuchungen stattfanden aufgeführt. In Tabelle 6.2 sind aber auch die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate der *Co*-Lokalisationsstudien eingefügt und auch der Aufbau der Konstrukte ist zur besseren Vergleichbarkeit mit den Literaturdaten gezeigt.

Schaut man sich die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse für das Myosin MyaI an, dann wurde es hauptsächlich an Peroxisomen und in wenigen Fällen auch an Golgi-Vesikeln lokalisiert gefunden. In zwei Fällen wurde bimolekulare Fluoreszenzkomplementation verwendet,

um die subzelluläre Lokalisierung zu untersuchen. Die unterschiedlichen Methoden und die verwendeten Konstrukte können zu den differierenden Ergebnissen geführt haben. Allerdings wurde in drei weiteren Fällen ebenfalls die biolistische Transformation von *Arabidopsis thaliana,* Ökotyp Columbia col 0, angewendet. Lässt man die unterschiedlichen Ökotypen außer Acht, ist der einzige Unterschied im Aufbau der Konstrukte zu finden. Es handelt sich in beiden Fällen um chimäre Konstrukte mit einem Fluoreszenzprotein, aber die in dieser Arbeit verwendeten Myosin-*tail*-Konstrukte umfassen die *coiled-coil*-, die *Cargo*-Bindedomäne und eines der IQ-Motive. Die von Li und Nebenführ (2007) verwendeten Konstrukte hingegen basieren lediglich auf der *Cargo*-Bindedomäne. Eine Dimerisierung der chimären Konstrukte ist somit nicht möglich und kann zu den abweichenden Ergebnissen geführt haben.

Kompartiment	Myosin	Konstrukt	Methode / angewendet in	Referenz
Peroxisomen	MyaI	FP-MyaI(AS 1099–1301)	BT, *A. th.*	Li und Nebenführ (2007)
		FP-MyaI(AS 1283–1520)	BT, *A. th.*	Li und Nebenführ (2007)
		YC-MyaI(AS 1099–1301) + YN-MyaI(AS 1283–1520)	BT+ BiFC, *A. th.*	Li und Nebenführ (2007)
		YC-MyaI(AS 867–1520) + YN-MyaI(AS 867–1520)	BT+ BiFC, *A. th.*	Li und Nebenführ (2008a)
	MyaII	FP-MyaII(AS 1053–1505)	AI / *N. benth.*	Reisen und Hanson (2007)
		FP-MyaII(AS 1279–1505)	BT, *A. th.*	Li und Nebenführ (2007)
		YC-MyaII(AS 1099–1297) + YN-MyaII(AS 1279–1505)	BT+ BiFC, *A. th.*	Li und Nebenführ (2007)
	XI-I	XI-I(AS 1115–1290) + XI-I(AS 1280–1522)	BT+ BiFC, *A. th.*	Li und Nebenführ (2007)
	XI-K	XI-K(AS 1124–1325) + XI-K(AS 1307–1545)	BT+ BiFC, *A. th.*	Li und Nebenführ (2007)
Golgi-Vesikel	MyaI	FP-MyaI(AS 1283–1520)*	BT, *A. th.*	Li und Nebenführ (2007)
	XI-D1	eYFP-XI-D(AS 872–1757)“	BT, *A. th.*	vorliegende Arbeit
	XI-J	FP-XI-J(AS 874-1242)°	AI / *N. benth.*	Reisen und Hanson (2007)
Chloroplasten	XI-F	FP-XI-F(AS 1272–1313)	AI / *N. benth.*	Sattarzadeh *et al.* (2009)
Mitochondrien	XI-J	FP-XI-J(AS 874-1242)°	AI / *N. benth.*	Reisen und Hanson (2007)
Kernhülle	XI-I	FP-XI-I(AS 752–1523)	AI / *N. benth.*	Avisar *et al.* (2009)
	XI-I	FP-XI-I(AS 881–1523)	AI / *N. benth.*	Avisar *et al.* (2009)
Oleosomen	MyaI	eYFP-MyaI(AS 848–1520)	BT, *A. th.*	vorliegende Arbeit
Tubulin	XI-I	eYFP-XI-I(AS 861–1523)	BT, *A. th.*	vorliegende Arbeit

Tabelle 6.2.: Bisher in der Literatur und in dieser Arbeit beschriebene subzelluläre Lokalisierungen. Aufgeführt sind die bis heute beschriebenen subzellulären Lokalisierungen der Klasse-XI-Myosine von *Arabidopsis thaliana* mit Angaben zum Aufbau der untersuchten Konstrukte, der angewendeten Untersuchungsmethode und dem Organismus in welchem die Analyse durchgeführt wurde. Zeichenerklärung: *etwa 20 % der beobachteten Zellen zeigten eine Lokalisierung an Golgi-Vesikeln, die restlichen zeigten die oben genannte Lokalisierung an Peroxisomen; “Die Angaben der Aminosäuren beziehen sich auf die nach der Sequenzierung korrigierten Gesamtlänge des Proteins; °die *Co*-Lokalisationsstudie wurde mit einer Kombination von GFP und YFP-Konstrukten durchgeführt. Abkürzungen: AI - Infiltration mit transformierten *Agrobacterium tumefaciens*; *A. th.* - *Arabidopsis thaliana*; BiFC - Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation; BT - Biolistische Transformation; FP- Fluoreszenzprotein; *N. benth.* - *Nicotiana benthamiana*; YC - *C*-Terminus von YFP; YN - *N*-Terminus von YFP.

Das Myosin XI-I wurde von zwei Arbeitsgruppen untersucht. Von Li und Nebenführ (2007) wurden wiederum Konstrukte verwendet, die die *Cargo*-Bindedomäne umfassen und zur bimolekulare Fluoreszenzkomplementation eingesetzt. Deren erhaltene Lokalisierung an

Peroxisomen ist wiederum nicht mit den vorliegenden Ergebnissen vergleichbar, auf Grund des verschiedenen Konstruktdesigns und der unterschiedlichen, angewendeten Methoden. Die Autoren Avisar *et al.* (2008) konnten zwei Konstrukte des Myosins XI-I, welche zu den in dieser Arbeit verwendeten vergleichbar sind, an der Kernhülle lokalisiert finden. Da in diesem Fall die Infiltration mit transformiertem *Agrobacterium tumefaciens* von *Nicotiana benthamiana* angewendet wurde, ist erneut ein Vergleich nicht möglich.

Für das Myosin XI-D wurden bisher keine *Cargos* in der Literatur beschrieben, somit kann kein Vergleich gezogen werden.

6.2. Gibt es Funktionshomologien der Klasse-XI-Myosine aus *Arabidopsis thaliana* zu Klasse-XI-Myosinen in anderen Pflanzenspezies?

Die beschriebenen Myosin-*tail*-Konstrukte (vgl. Abschnitt 4.1) wurden aus *cDNA* von *Arabidopsis thaliana* amplifiziert und zunächst im authentischen System untersucht. Auf Grund der Ergebnisse für die Konstrukte von XI-I und XI-D wurden diese in einer weiteren dikotyledonen Pflanze, *Pisum sativum* (Erbse), analysiert (siehe Abschnitt 4.2.3 und 4.2.4). Im Anschluss daran erfolgte die biolistische Transformation aller zur Verfügung stehenden Myosin-*tail*-Konstrukte in Erbse. Es zeigten sich kaum Unterschiede in der subzellulären Lokalisierung der Konstrukte im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana* (siehe Tab. 4.3).

Pisum sativum ist bisher nicht vollständig sequenziert, daher kennt man die genaue Anzahl der Klasse-XI-Myosine in Erbse nicht. Es ist aber davon auszugehen, dass sich deren Anzahl auch im Bereich von zehn bis fünfzehn bewegt, da die Anzahl aus vollständig sequenzierten höheren Pflanzen in diesem Bereich liegt[5]. Durch diese Annahme und anhand des Ergebnisses für das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-I, welches sowohl in *Arabidopsis,* als auch in Erbse an Tubulin lokalisiert, kann man vermuten, dass die Mehrzahl der *Arabidopsis*-Myosine zu jenen aus Erbse homolog ist und die gleiche Aufgabe übernimmt. Beispiele, wie die des Myosin-*tail*-Konstrukts des Myosins MyaI, zeigen allerdings auch, dass die markierten Strukturen nicht unbedingt die gleiche Identität haben müssen (vgl. Abb. 4.8). So markiert das MyaI*tail*-Konstrukt in *Arabidopsis thaliana* Oleosomen, in *Pisum sativum* zeigte sich jedoch keine *Co*-Lokalisation mit Oleosomen.

6.3. Arbeiten die Klasse-XI-Myosine gewebespezifisch?

Die biolistische Transformation eignet sich, wie bereits beschrieben, um Epidermiszellen von Laubblättern zuverlässig zu transformieren. Für Untersuchungen an weiteren Geweben und zur Beantwortung der dritten und auch vierten Ausgangsfrage dieser Arbeit wurden auf Basis der erstellten Myosin-*tail*-Konstrukte transgene *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen generiert (siehe Abschnitt 4.5).

[5] *Oryza sativa* besitzt zwölf und *Populus trichocarpa* zehn Klasse-XI-Myosine.

6.3.1. Vier der Myosin-*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzenlinien weisen distinkte Fluoreszenzsignale auf

Es konnten von allen vierzehn *tail*-Konstrukten transgene Pflanzen erstellt und selektiert werden. Insgesamt wurden 352 Myosin-*tail*-Konstrukt-überexprimierende Pflanzen aus zahlreichen Anzuchtversuchen unter verschiedenen Bedingungen erhalten. Von diesen zeigten 30 Pflanzen zu der selektionsbedingten BASTA-Resistenz auch Fluoreszenzsignale, wobei diese zu vier verschiedenen der vierzehn möglichen Pflanzenlinien gehörten (vgl. Tab. 4.5).

Schaut man sich die Tabelle 4.5 genauer an, fällt auf, dass bei den Pflanzen, welches das Myosin-*tail*-Konstrukt des Myosins XI-I überexprimieren sollten, zwar sehr viele Transgene (65 Pflanzen) selektiert werden konnten, von diesen aber keine einzige Fluoreszenz zeigte. Auch für die Pflanzen, welche 35S-AcGFP-XI-C*tail* in ihr Genom inseriert haben, konnten zumindest auf MS-Medium-Platten 38 Pflanzen angezogen werden. Diese zeigten ebenfalls keine Fluoreszenz. Die beiden Konstrukte von XI-I und XI-C müssen demnach einen starken, dominant negativen Effekt auf die Pflanzen haben.

Für das *tail*-Konstrukt XI-I konnte gezeigt werden, dass es an Tubulin lokalisiert (siehe Abschnitt 4.2.3). Sollte das Konstrukt auch in den damit erstellten transgenen Pflanzen an Tubulin lokalisiert sein, würde das für die Pflanzen bedeuten, dass der Transport entlang der Tubulin-Filamente stark eingeschränkt wäre. Der gesamte Kinesin- und Dynein-Transport wäre behindert und mit erheblichen Einschränkungen für die Pflanze verbunden. Das Konstrukt müsste demnach schnell abgebaut werden, damit die Pflanzen ungehindert wachsen können.

Dem *tail*-Konstrukt des Myosins XI-C konnte kein *Cargo* zugeordnet werden, aber auch in diesem Fall muss dessen Überexpression einen stark dominant negativen Effekt haben, so dass das Konstrukt abgebaut wird bevor man seine Fluoreszenz beobachten kann.

Alles in allem zeigte etwa jede achte bis neunte transgene Pflanze in der mikroskopischen Analyse Fluoreszenz. Da dies weit unter dem theoretisch Möglichen liegt, müssen die meisten der eingebrachten Konstrukte einen dominant negativen Effekt auf die Pflanzen haben und Mechanismen in der Pflanze aktivieren, welche die konstitutiv überexprimierten Konstrukte schnell wieder abbauen, da es sich um für die Pflanzen schädliche Proteine handelt oder sie durch deren Expression in ihrem Wachstum gehemmt werden. Aus diesem Grund empfiehlt es sich noch einmal trangene Pflanzen mit den *tail*-Konstrukten zu generieren, aber unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors. Dadurch können die Pflanzen ohne Einschränkung wachsen und erst nach Zugabe des Induktors wird die Expression der Konstrukte ausgelöst und nach dessen Abbau wieder abgeschalten. In diesem Zeitfenster kann man sich dann die Fluoreszenz anschauen und im Anschluss können die Pflanzen ungehindert weiter wachsen.

Des Weiteren wären erneute elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Myosin-*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzen denkbar, da die bisher durchgeführten ergebnislos blieben. Man könnte außerdem versuchen die fluoreszenzmarkierten Vesikel aus den Myosin-*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzen zu isolieren und auf diesem Weg zu identifizieren.

6.3.2. Daten zur gewebespezifischen Expression der Myosine korrelieren nicht in jedem Fall mit den beobachteten subzellulären Lokalisierungen in den transgenen Pflanzen

Die Myosin-*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzen, in welchen Fluoreszenzsignale beobachtet werden konnten, haben in jeder untersuchten Linie vesikelartige Strukturen markiert, wenn auch nicht in allen Geweben, da für die Klasse-XI-Myosine gezeigt werden konnte, dass sie ihre *Cargos* gewebespezifisch transportieren (Peremyslov *et al.*, 2012). Da die authentischen Myosine gewebespezifisch exprimiert werden (Prokhnevsky *et al.*, 2008; Sparkes, 2011), könnte ein Vergleich mit *MicroArray*-Daten zur gewebespezifischen Expression Hinweise liefern, in welchen Geweben eine *Cargo*-Spezifität zu erwarten ist. In Abbildung 6.2 ist eine Übersicht über die Ergebnisse einer *DNA-MicroArray*-Untersuchung von Peremyslov *et al.* (2011) zu sehen, in welcher die Expressionslevel der verschiedenen Myosine in den verschiedenen Geweben analysiert wurden.

Das Myosin MyaII wird demnach in allen Geweben exprimiert. Die Myosin-MyaII*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzen haben punktförmige Strukturen in allen Geweben fluoreszenzmarkiert. Diese Beobachtung und die Expressionsdaten stimmen somit überein. Für die Myosine XI-B und XI-H hingegen sieht es anders aus. Das Myosin XI-B wird, den Expressionsdaten nach, nur in Pollen exprimiert, aber in den Myosin-XI-B*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzen sind Fluoreszenzsignale vesikelartiger Strukturen in allen Geweben zu finden. Die umgekehrte Situation ist für das Myosin XI-H aufgetreten. Dieses sollte in allen Geweben stark exprimiert werden. Die transgenen, das Myosin-XI-H*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzen hingegen zeigen nur in den Wurzelspitzen und in juvenilen Laubblättern punktförmige Fluoreszenzsignale, welche auf eine *Cargo*-Spezifität hindeuten. Kommen die Pflanzen ins adulte Stadium verliert sich diese und die Fluoreszenzsignale werden unspezifischer bis hin zum kompletten Abbau des Produkts. Für diese zwei Beispiele stimmen die Erwartung und das Ergebnis der Lokalisierung nicht überein. Für XI-H, welches in allen Geweben spezifisch exprimiert werden sollte, würde man in allen Geweben distinkte Strukturen markiert erwarten. Für XI-B, welches nur in Pollen spezifisch exprimiert wird (laut Peremyslov *et al.* (2011)), würde man hingegen keine Lokalisierung an distinkten Strukturen erwarten. Dies lässt darauf schließen, dass die spezifische Expression eines Myosins und das Vorhandensein seines *Cargos* bzw. des spezifischen Rezeptors und/oder Interaktionspartners unabhängig voneinander exprimiert sind.

Die Beobachtungen, welche anhand der Myosin-XI-G*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzen gemacht wurden, werden im folgenden Unterpunkt (6.3.3) separat diskutiert.

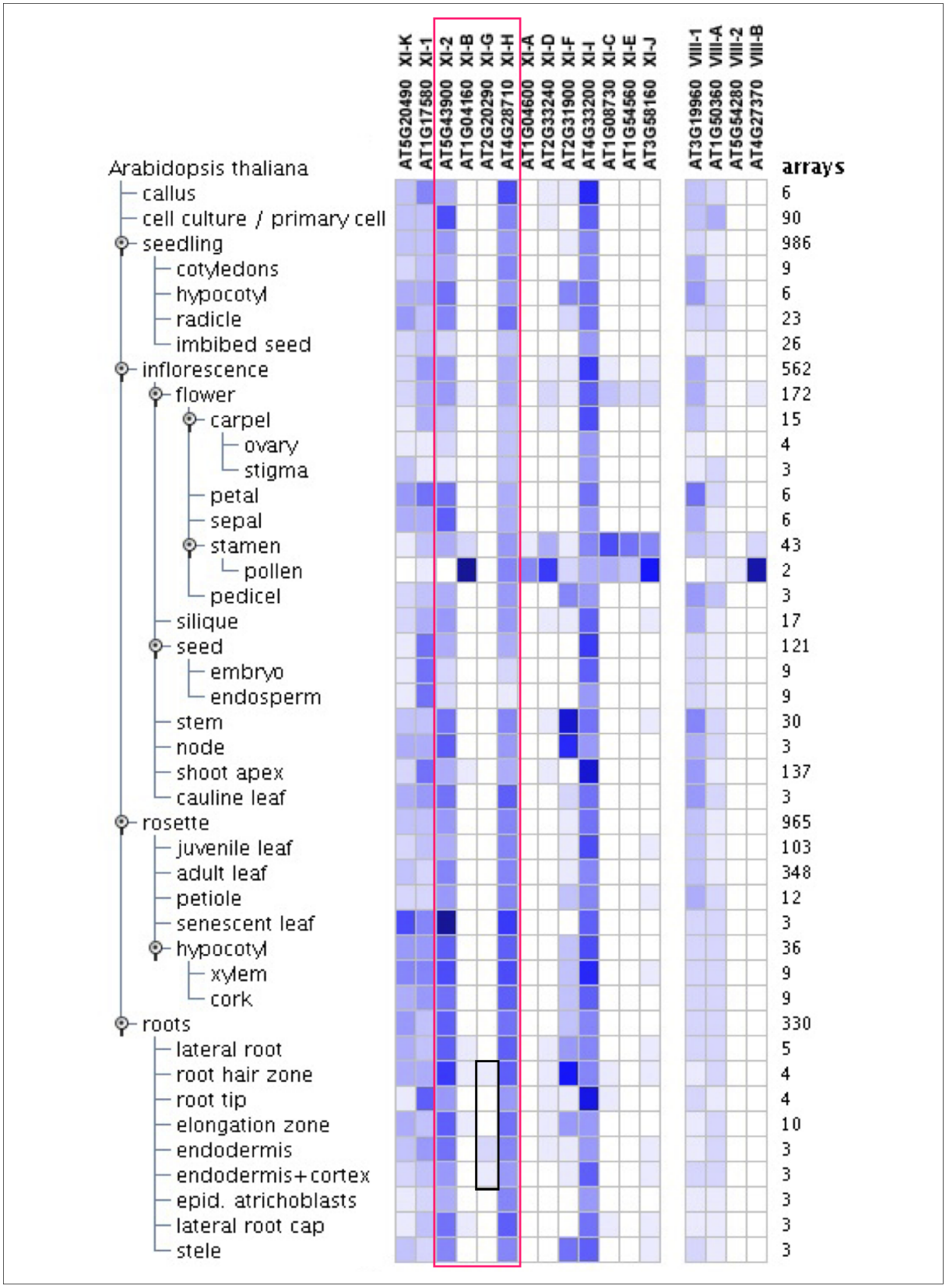

Abbildung 6.2.: Gewebespezifische Expression der Myosine in *Arabidopsis thaliana*. Die Abbildung wurde entnommen von und geändert nach Peremyslov *et al.* (2011). Es wurden alle *Arabidopsis thaliana*-Myosine auf ihre gewebespezifische Expression mit Hilfe von *DNA-MicroArrays* untersucht und mit Hilfe des Genvestigator *Meta-Profile-Analysis*-Werkzeugs (https://www.genevestigator.com) analysiert. Die Myosine wurden nach Klassen sortiert und die verschieden stark blau eingefärbten Kästchen bedeuten, dass das entsprechende Myosin in diesem Gewebe oder Organ in verschiedener Stärke (je blauer desto stärker) spezifisch exprimiert wird. Rot umrandet sind die Myosine, welche in dieser Arbeit erfolgreich zur Generierung transgener 35S-AcGFP-XI-x*tail*-Pflanzen eingesetzt werden konnten. Für das Myosin XI-G sind die spezifischen Gewebe extra in schwarz eingerahmt.

6.3.3. Der Phänotyp der Myosin-XI-G*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzen wird bedingt durch die subzelluläre Lokalisierung des Myosin-XI-G*tail*-Konstrukts

Die Fluoreszenzsignale der Myosin-XI-G*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzen sahen auf den ersten Blick unspezifisch aus, da in den adulten Laubblättern nur eine cytosolische Lokalisierung zu beobachten war. Hingegen in jungen Laubblättern und den Wurzelspitzen konnten distinkte Strukturen beobachtet werden. Die Fluoreszenzsignale in diesen im Streckungswachstum befindlichen Geweben sind an vesikelartigen Strukturen zu finden. Dieses Resultat stimmt zumindest für die Wurzeln mit den *MicroArray*-Daten überein (vgl. Abb. 6.2 schwarz eingerahmter Bereich). XI-G wird in den Wurzeln exprimiert und das dazugehörige *tail*-Konstrukt markiert in Wurzeln erwartungsgemäß Vesikel, wenn es auch nicht in der Wurzelspitze exprimiert werden sollte (*root tip* und *elongation zone* haben keine Blaufärbung im Gegensatz zu *root hair zone* und *endodermis* (+*cortex*)). Allerdings markiert es auch in jungen, sich gerade entfaltenden Laubblättern Vesikel, wo es nicht spezifisch exprimiert werden sollte, laut der Daten[6] von Peremyslov *et al.* (2011). Ein weiterer, zu den mikroskopischen Ergebnissen passender Aspekt ist, dass die Myosin-XI-G*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzen einen Phänotyp aufweisen, welcher durch kleinere und gedrungenere Pflanzen bestimmt ist. Es ist davon auszugehen, dass dieser durch die Überexpression des XI-G*tail*-Konstrukts hervorgerufen wird. Das Konstrukt bindet an Vesikel von Zellen, welche sich im Streckungsgewebe befinden. Durch die Überexpression scheinen nahezu alle Myosinbindungsstellen auf den Vesikeln durch die transportunfähigen *tail*-Konstrukte abgesättigt zu sein. In diesen Geweben ist eher wenig Bewegung der markierten Vesikel zu beobachten. Die Überexpression ist nicht letal für die Pflanze, hat aber einen inhibierenden Effekt, welcher sich in dem Phänotyp äußert und das Streckungswachstum einschränkt, so dass die Pflanzen gedrungener sind, kürzere Blütenstände ausbilden und schnell seneszente Laubblätter bekommen.

Für die Untersuchung des *tail*-Konstrukts des Myosins XI-G wären transgene Pflanzen mit dem Konstrukt unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors eventuell nicht von Nutzen, da von diesen höchstwahrscheinlich vordergründlich die adulten Laubblätter untersucht würden und darausfolgend nur eine cytosolische Lokalisierung des Konstrukts beobachtet würde, welche wiederum einfach als unspezifisch abgetan würde.

6.4. Lassen sich Myosin-*tail*-Proteine aus transgenen *Arabidopsis thaliana*-Myosin-*tail*-Konstrukt überexprimierenden Pflanzen isolieren und biochemisch charakterisieren?

Neben der makro- und mikroskopischen Untersuchung der Myosin-*tail*-Konstrukt-überexprimierenden Pflanzen wurde eine biochemische Analyse durchgeführt. Es war möglich die Monomere der AcGFP-Myosin-*tail*-Konstrukte unter denaturierenden Bedingungen zu isolieren.

[6] Diese Daten sollten ebenfalls kritisch betrachtet werden.

Alle vier möglichen *tail*-Konstrukte konnten dabei erhalten werden und ließen sich nach dem errechneten Molekulargewicht auftrennen (vgl. Abb. 4.16).

Die Aufreinigung unter nativen Bedingungen hatte zum Ergebnis, dass in jedem Extrakt Signale basierend auf dem Nachweis mit Hilfe des GFP-Antikörpers detektiert werden konnten (vgl. Abb. 4.17). Einerseits sind diese Signale in einem Bereich zu finden, der oberhalb des errechneten Molekulargewichts für das Dimer zweier AcGFP-Myosin-*tail*-Konstrukte liegt, andererseits war für keinen Extrakt eine definierte Bande zu detektieren, sondern immer ein diffuses Signal ("Schmier") im höhermolekularen Bereich. Es handelte sich um eine Aufreinigung unter nativen Bedingungen, daher ist davon auszugehen, dass assozierte Proteine mit angereichert wurden. Dies wäre der gewünschte Effekt, denn so könnten die Interaktionspartner der Myosine identifiziert werden. Es war aber nicht möglich in den anschließend durchgeführten Experimenten nach einer Auftrennung in der zweiten Dimension Signale der AcGFP-Myosin-*tail*-Konstrukte zu detektieren. So konnten bisher keine Interaktionspartner identifiziert werden. In zukünftigen Experimenten müssten die Bedingungen dementsprechend optimiert werden.

Es ist auch denkbar *pull-down*-Experimente durchzuführen oder Experimente mit sogenannten GPF-*traps* (Rothbauer *et al.*, 2008), um die Myosin-*tail*-Konstrukte und ihre möglichen Interaktionspartner zur Bindung ihres *Cargos* aufzureinigen und zu identifizieren.

6.5. Warum sind die Klasse-XI-Myosine so zahlreich in Pflanzen?

Myosine sind in allen eukaryotischen Zellen zu finden. Die bestuntersuchten Myosine, welche für den Organelltransport verantwortlich sind, sind die Klasse-V-Myosine, welche in tierischen Zellen und Hefe zu finden sind. In *Saccharomyces cerevisiae* gibt es zwei Vertreter der Klasse-V-Myosine, Myo2p und Myo4p (Haarer *et al.*, 1994), und in humanen Zellen drei, MyoVa, MyoVb, und MyoVc (Trybus, 2008). Die pflanzlichen Homologen der Klasse XI haben deutlich mehr Vertreter. Wie bereits mehrfach erwähnt, gibt es in *Arabidopsis thaliana* dreizehn, in *Oryza sativa* zwölf und in *Populus trichocarpa* zehn Klasse-XI-Myosine. Das bedeutet, dass in Pflanzen etwa viermal so viele verschiedene Myosine vorhanden sind, um den Organelltransport zu bewerkstelligen. Für die tierischen Klasse-V-Myosine wurde gezeigt, dass sie einerseits verschiedene *Cargos* transportieren können und andererseits auch Gewebespezifität aufweisen (Rodriguez und Cheney, 2002). Auch den pflanzlichen Myosinen der Klasse XI konnten verschiedene *Cargos* nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 6.1.4). Andererseits konnte man beweisen, dass beim *knock-out* eines Myosins ein anderes dessen Aufgabe übernimmt (Hashimoto *et al.*, 2005; Ojangu *et al.*, 2007; Peremyslov *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich zu zeigen, dass die Klasse-XI-Myosine in *Arabidopsis thaliana* eine Gewebespezifität aufweisen (vgl. Abschnitt 4.5.1 und 4.5.1).

Die Klasse–V- und Klasse-XI-Myosine besitzen somit beide eine *Cargo*- und eine Gewebespezifität. Der Unterschied in der Anzahl ist damit nicht zu erklären. Ursprünglich gab es, das nimmt man an, nur ein Ur-Myosin, von welchem die Myosin-Evolution ausging (vgl. Abschnitt 1.4). Auf Grund der großen Homologien aller Klasse-XI-Myosine von *Arabidopsis thaliana* ist die Entstehung der Varianten wahrscheinlich auf Genduplikationen zurückzuführen,

welche bei den pflanzlichen Organismen generell zu der größeren Anzahl geführt haben könnten. Außerdem wäre dies eine mögliche Erklärung für die Funktionsübernahme durch ein Myosin nach dem *knock-out* eines anderen Myosins.

Ein weiterer Aspekt ist das Vorhandensein eines zusätzlichen Organells in pflanzlichen Zellen im Vergleich zu nicht pflanzlichen Zellen, welcher eine größere Anzahl von verschiedenen Motorproteinen notwendig machen könnte. Bisher ist es noch nicht gelungen den Mechanismus aufzuklären, durch welchen die Plastiden transportiert werden. Obwohl es deutliche Hinweise gibt, dass Aktin daran beteiligt ist, konnte die Rolle der Myosine in diesem Mechanismus nicht aufgeklärt werden (Suetsugu *et al.*, 2010; Wada, 2013; Kong und Wada, 2014).

Teil IV.

Material und Methoden

7. Material

7.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien in p.a.-Qualität wurden von den Firmen BD (Heidelberg), BIOLINE (Luckenwalde), Bio-Rad (Hercules, CA), Difco (Detroit, USA), Duchefa Biochemie (Brüssel), Fluka BioChemika (Buchs), Invitrogen (Karlsruhe), KMF Laborchemie Handels GmbH (Lohmar), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Dreisenhofen) bezogen.

7.2. Geräte und Zubehör

Mikroskope:

- Carl Zeiss (Jena) Axioskop 2 mit einer HBO 100-Fluoreszenzbeleuchtung (Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe, 100 W)
- Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM510, Carl Zeiss (Jena)

Biolistische Schussapparatur:

- angefertigt von der technischen Abteilung der Universität Freiburg

SemiDry-Blot Apparatur:

- *Panther™ Semidry electroblotter* (Owl Separation Systems, SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg))

7.3. Pflanzenmaterial

Es wurde *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Ökotyp Columbia (col 5-13), *Pisum sativum* L., var. Feltham First und *Nicotiana benthamiana* Domin eingesetzt.

7.4. Bakterienstämme

Bezeichnung	Stamm	Resistenz / Genotyp	Referenz
Agrobacterium tumefaciens	GV3101::pMP90	Rif^R & $Gent^R$ / Ti-Plasmid: pMP90 (pTiC58 ΔT-*DNA*), Nopalintyp, entwaffnet	Koncz und Schell (1986)
Escherichia coli	DH5α	Nalidixinsäure/ *fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*	Bethesda Research Laboratories (Galthersburg, MD, USA)

Tabelle 7.1.: Bakterienstämme

7.5. Kulturmedien

Spezies	Medium	Rezept
Escherichia coli	LB	1 % (w/v) Bakto-Trypton; 1 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt pH 7,5
	Festmedium	LB + 1,2 % (w/v) Bakto-Agar
Agrobacterium tumefaciens	YEB	0,5 % (w/v) Bakto-beef-Extrakt; 0,1 % (w/v) Bakto-Hefe-Extrakt; 0,5 % (w/v) Saccharose; 0,5 % (w/v) Bakto-Pepton; 0,2 % 1 M $MgSO_4$ pH 7,2
	AIM	10 mM $MgCl_2$; 5 mM MES pH 5,3; 150 µM Acetosyringon
Arabidopsis thaliana	MS-Medium	2,2 g/l MS; 15 g/l Saccharose

Tabelle 7.2.: Medien zur Bakterien- und Pflanzenkultivierung

7.6. Antibiotika

Antibiotikum	Resistenz	Stammlösung	Arbeitskonzentration	Herkunft
Ampicillin	Amp^R	100 mg/ml	100 µg/ml	Serva (Heidelberg)
Carbenicillin	Amp^R	100 mg/ml	100 µg/ml	Serva (Heidelberg)
Cefotaxim	Cef^R	250 mg/ml	500 µg/ml	Duchefa Biochemie (Brüssel)
Gentamycin	$Gent^R$	10 mg/ml	20 µg/ml	Duchefa Biochemie (Brüssel)
Kanamycin	Kan^R	100 mg/ml	50 µg/ml	Serva (Heidelberg)
Phosphinothricin	PPT^R	8 mg/ml	8 µg/ml	Duchefa Biochemie (Brüssel)
Rifampicin	Rif^R	50 mg/ml (Methanol)	50 µg/ml	Fluka BioChemika (Buchs)
Tetracyclin	Tet^R	5 mg/ml (Ethanol)	5 µg/ml	Duchefa Biochemie (Brüssel)

Tabelle 7.3.: Antibiotika

7.7. Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt am Main) sowie Roche (Mannheim) bezogen.

Folgende Enzyme wurden von den entsprechenden Firmen verwendet:

Enzym	Herkunft
Taq-*DNA*-Polymerase	Biomaster (Windeck)
Phusion Hot Start High Fidelity DNA Polymerase	NEB (Frankfurt am Main)
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Fermentas (St. Leon-Rot)
T4-*DNA*-Ligase	Promega (Mannheim)
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega (Mannheim)
DNase I (RNase-frei)	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Micrococcal Nuclease	Fermentas (St. Leon-Rot)

Tabelle 7.4.: Enzyme

7.8. Molekularbiologische Kits

Anwendung	Bezeichnung	Herkunft
Sequenzierung von *DNA*	ABI PRISM®dRhodamine	Applied Biosystems (Darmstadt)
Isolation von Plasmid-*DNA* (Miniprep)	NucleoSpin®Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)
Isolation von Plasmid-*DNA* (Midiprep)	NucleoBond®PC 100	Macherey-Nagel (Düren)
Reinigung von *DNA*-Fragmenten	NucleoSpin® Extract	Macherey-Nagel (Düren)
Isolation von *RNA*	TRIZOL®Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)

Tabelle 7.5.: Molekularbiologische Kits

7.9. Größenstandards

Art	Bezeichnung	Herkunft
DNA-Größenstandards	1 kB *DNA* Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
	HyperLadder I	Bioline (Luckenwalde)
Protein-Größenstandards	HMW Native Marker Kit	GE-Healthcare (Freiburg)
	PageRuler™	Fermentas (St. Leon Rot)

Tabelle 7.6.: Größenstandards

7.10. Antikörper

Antikörper	Bemerkung	Verdünnung	Herkunft
αGFP	monoklonal, aus Maus	1:10000	Clontech (Saint-Germain-en-Laye)
αMouseIgG-HRP	monoklonal, aus Esel	1:10000	Dianova (Hamburg)

Tabelle 7.7.: Antikörper

7.11. Membranen

Anwendung	Bezeichnung	Herkunft
Proteintransfer	Immobilon-P (PVDF-Membran)	Millipore (Schwalbach am Taunus)

Tabelle 7.8.: Membranen

7.12. Nukleotide und Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von MWG BiotechAG (Ebersberg), der Oligo(dT)$_{18}$-Primer wurde von Fermentas (St. Leon-Roth) und die Desoxyribonukleotide wurden von Roche (Mannheim) bezogen.

Tabelle 7.9.: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
XIA-Kpn2I-for	GAAATCCGGAATTACTACTCAATGTGGCTGGAGAGTG
XIA-Acc65I-rev	ATATGGTACCTCATTCCTTGAGAAAGAGGAAGTTAGG
XIA-Seq-for	GAAACTGAAAATCAAAAGC
XIA-Seq-rev	CGACTTCACTGCTTGCCCC
XIB-Kpn2I-for4	GCAGTCCGGAGCATGGAGAGGAAAAG
XIB-Acc65I-rev	ATATGGTACCCTAGTGCAAGAATACG
XIB-seq-for	GAAAATGAAAAGTTGAAGG
XIB-seq-rev	CCAGACTTTACAAATTCTCC
XIC-Kpn2I-for	AAATTCCGGAGTCCTATCTCAGACACGATGGAGAGGC
XIC-Acc65I-rev	ATATGGTACCTCACTCAGAGACTGGCAATAAGAAGC
XIC-Seq-for	GAAGCTCAAGAGTCTCTCG
XIC-Seq-rev	CCATTACTAAATGAACAAC
XID-Kpn2I-for2	AACGTCCGGAGCAGCGATTACCACTCAAT
XID-Acc65I-rev	ATATGGTACCTCATTCCTTCAGAAAGTGG
XID-seq-for	TGGAAATGATTCACCAAACG
XID-seq-rev	GGAATGTTTGGCAGAAAATC
XIE-Bst119I-for	CTTTTTCGAACAAGAAGCTTAAGAAAGGAGTGATCC
XIE-Acc65I-rev	ATATGGTACCTTAGTCAGAACATGGCAATAGAAAGC
XIE-seq-for	ATGAAGCTCAAGAGTCTAGC
XIE-seq-rev	CGTCTTAACAGAAGACTATT
XIF-Kpn2I-for	AAAATCCGGATTAGCATTACAATGTCTATGG
XIF-Acc65I-rev	ATATGGTACCTTATTCCGGCAATGTCTGG
XIF-seq-for	TCAGAAAATGAAACTCTTCG
XIF-seq-rev	GCTTGTTGACAATGTTCTGC
XIG-Kpn2I-for	CGAGTCCGGAAAGGTATCGCTCTTAAAGGAAGTG
XIG-Acc65I-rev	ATATGGTACCCTAATGTAAGAATATGAAAGATGG
XIG-seq-for	GTTCAAATGATTGGTTCTGC

Fortsetzung siehe nächste Seite

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
XIH-Kpn2I-for3	ATATTCCGGAATGATTCAGAGTCATTGTCGC
XIH-Acc65I-rev	ATATGGTACCTTATATCAAGAAACTGAAAGCTGGG
XIH-seq-for	AAAAATTCGAGGAGAGAAGC
XIH-seq-rev	GGACATTGATGAACGAGAAT
XI-I-Bsp119I-for	ACCGTTCGAAATCTATTATTGCTATTCAGTGTCG
XI-I-Bsp120I-rev	ATATGGGCCCTCAAATGATCTGCTTTG
XI-I-seq-for	AGCTTCTCAATGCTAAAACC
XI-I-seq-rev	CGAAGAAGAAGACTGTTGA
XIJ-Kpn2I-for	ATTCTCCGGAAAATTAACCACTAGGGCAGC
XIJ-Acc65I-rev	ATATGGTACCTCAAAAGTAATCTTCG
XIK-Kpn21-for2	TAAGTCCGGAGCACGAGACACAGGAGCC
XIK-Acc65I-rev2	ATATGGTACCTTACGATGTACTGCCTTCTT
XIK-seq-for	GGCAGAAGCTAGAAATTCC
XIK-seq-rev	CCATATTTGTCATCCCAGTA
MyaI*tail*-Hind3-for	AAGCTTCCGCATTCTCATATTACACAAG
MyaI*tail*-Acc65I-rev	GGTACCTCAATCTGACCTTTCCAACAAG
MyaI-Ü-GPF-seq-rev	CCATTTTCAGCATTCTAAGC
*tail*m1-seq-for2	CTTATCAGAGTGCCTTGGTCC
MyaII-Kpn2I-for	AACCTCCGGAGCAATAATAATTCAGACTTGG
MyaII-Acc65I-rev	ATATGGTACCTTAGTGCAAGAATACAAATGC
MyaII-seq-for	CACTGGAAATGAAAATCG
MyaII-seq-rev	CGCAGAAGGAGACTGTTG
pRT100mod-35S-rev	GGATAGTGGGATTGTGCGTCAT
pRT100mod-PolA-for	GGTTTCGCTCATGTGTTGAGCA
pRT-35S-SbfI-for	CATGCCTGCAGGTCAACATGG
pRT-PolA-SalI-rev	CATGGTCGACTCACTGGATTTTGG
pAcGFP-C-f-Not1	GCGGCCGCTGGTTTAGTGAACC
pAcGFP-C-r-XbaI	TCTAGATCAGTTATCTAAATCCGG
EC+YFP-BshTI-for	ATATACCGGTATGGTGAGCAAGGGC
EC+YFP-Kpn2I-rev	TATATCCGGACTTGTACAGCTCGT
TagRFP-BshTI-for	ATATACCGGTATGGTGTCTAAGGGC
TagRFP-Kpn2I-rev	TATATCCGGAATTAAGTTTGTGCCC
C+G+YFP-BamHI-for	ATATGGATCCATGGTGAGCAAGGGC
C+G+YFP-XbaI-rev	ATATTCTAGATTACTTGTACAGCTC
TagRFP-BamHI-for	ATATGGATCCATGGTGTCTAAGGGC
TagRFP-XbaI-rev	ATATTCTAGATCAATTAAGTTTGTG
AcGFP-Ende-for	CCACTACCTGTCCACCCAGAGC
EC+YFP-Ende-Seq-for	CCACTACCTGAGCACCCAGTCC
TagRFP-Ende-for	CCTCAAGATGCCCGGCGTCT
	Fortsetzung siehe nächste Seite

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
FP-Anfang-Seq-rev	CGCCCTCGCCCTCG
Golgi2-Acc65I-for	ATATGGTACCATGAGTAAACGGAATCC
Golgi2-xyl-BamHI-rev	ATATGGATCCCGGTGAAAACGACGATGAG
Map4-Kpn2I-for	ATATTCCGGAATGTCCCGGCAAGAAGAAGCAAAGG
Map4-Acc65I-rev	ATATGGTACCTCAGATCCCGGGCCCACCTCCTGC
Oleosin-Acc65I-for	ATATGGTACCATGGCGGATACAGCTAGAGG
Oleosin-lang-BamHI-rev	ATATGGATCCAGTAGTGTGCTGGCCACC

7.13. Vektoren

7.13.1. Vorliegende Vektoren

Bezeichnung	Resistenz	Referenz
pRT-Ω/Not/Asc	Amp^R	Töpfer *et al.* (1987), Überlacker und Werr (1996); (pRT-Ω/Not/Asc wird in dieser Arbeit pRT100mod genannt)
pRT100mod::PTS1::eCFP	Amp^R	Peroxisomenmarker für *in vivo*-Analysen, Konstrukt-Klonierung: B. Baudisch
pBIN20::G-ck	Kan^R	(Nelson *et al.*, 2007)
pCAMBIA3000::35S-GFP-Map4	in Bakterien Kan^R in Pflanzen PPT^R	Jaideep Mathur
pAcGFP-C1	Kan^R	Clontech (Saint-Germain-en-Laye)
pECFP-N1	Kan^R	Clontech (Saint-Germain-en-Laye)
pEYFP-N1	Kan^R	Clontech (Saint-Germain-en-Laye)
pTagRFP-N	Kan^R	Evrogen (Moskau)
pCatGFP::MyaItotal	Amp^R	AG Professor Menzel (Universität Bonn, Institut für Zelluläre und Molekulare Botanik, Kirschallee 1)
pCatGFP::MyaI*tail*m1	Amp^R	AG Professor Menzel (Universität Bonn, Institut für Zelluläre und Molekulare Botanik, Kirschallee 1)
pCB302	in Bakterien Kan^R in Pflanzen PPT^R	Schneider und Beck (1987)
pGreenII0129	in Bakterien Kan^R in Pflanzen Hyg^R	Hellens *et al.* (2000)
pGreenII0129::FNR-EGFP	in Bakterien Kan^R in Pflanzen Hyg^R	Konstrukt-Klonierung: B. Baudisch, J. Marques, B. Knop

Tabelle 7.10.: Vorliegende Vektoren

7.13.2. Für diese Arbeit erstellte Vektoren

Tabelle 7.11.: Erstellte Vektoren. B: Resistenz in Bakterien, P: Resistenz in Pflanzen

Bezeichnung	Resistenz	Anwendung
pRT100mod::MCS	Amp^R	Ausgangsplamid für Klonierungen
pRT100mod::MCS::AcGFP	Amp^R	Ausgangsplamid für Klonierungen, Mikroskopiereferenz

Fortsetzung siehe nächste Seite

Bezeichnung	Resistenz	Anwendung
pRT100mod::MCS::eCFP	Amp^R	Ausgangsplamid für Klonierungen, Mikroskopiereferenz
pRT100mod::MCS::eYFP	Amp^R	Ausgangsplamid für Klonierungen, Mikroskopiereferenz
pRT100mod::MCS::TagRFP	Amp^R	Ausgangsplamid für Klonierungen, Mikroskopiereferenz
pRT100mod::AcGFP::MCS	Amp^R	Ausgangsplamid für Klonierungen, Mikroskopiereferenz
pRT100mod::eCFP::MCS	Amp^R	Ausgangsplamid für Klonierungen, Mikroskopiereferenz
pRT100mod::eYFP::MCS	Amp^R	Ausgangsplamid für Klonierungen, Mikroskopiereferenz
pRT100mod::TagRFP::MCS	Amp^R	Ausgangsplamid für Klonierungen, Mikroskopiereferenz
pCB302::35S::AcGFP::MCS	B: Kan^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen &
	P:PPT^R	Infiltration von *Nicotiana benthamiana* (Referenz)
pCB302::35S::eCFP::MCS	B: Kan^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen &
	P:PPT^R	Infiltration von *Nicotiana benthamiana* (Referenz)
pCB302::35S::eYFP::MCS	B: Kan^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen &
	P:PPT^R	Infiltration von *Nicotiana benthamiana* (Referenz)
pCB302::35S::TagRFP::MCS	B: Kan^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen &
	P:PPT^R	Infiltration von *Nicotiana benthamiana* (Referenz)
pRT100mod::AcGFP::Map4	Amp^R	Tubulinmarker für *in vivo*-Analysen
pRT100mod::eCFP::Map4	Amp^R	Tubulinmarker für *in vivo*-Analysen
pRT100mod::eYFP::Map4	Amp^R	Tubulinmarker für *in vivo*-Analysen
pRT100mod::TagRFP::Map4	Amp^R	Tubulinmarker für *in vivo*-Analysen
pRT100mod::Golgi1::eCFP	Amp^R	Golgimarker für *in vivo*-Analysen
pRT100mod::Golgi1::eYFP	Amp^R	Golgimarker für *in vivo*-Analysen
pRT100mod::Golgi2::eCFP	Amp^R	Golgimarker für *in vivo*-Analysen
pRT100mod::Golgi2::eYFP	Amp^R	Golgimarker für *in vivo*-Analysen
pRT100mod::Oleo::eCFP	Amp^R	Oleosomenmarker für *in vivo*-Analysen
pRT100mod::Oleo::eYFP	Amp^R	Oleosomenmarker für *in vivo*-Analysen
pRT100mod::AcGFP::XI-A*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eCFP::XI-A*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eYFP::XI-A*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pCB302::35S::AcGFP::XI-A*tail*	B: Kan^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen &
	P:PPT^R	Infiltration von *Nicotiana benthamiana*
pRT100mod::AcGFP::XI-B*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eCFP::XI-B*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eYFP::XI-B*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pCB302::35S::AcGFP::XI-B*tail*	B: Kan^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen &
	P:PPT^R	Infiltration von *Nicotiana benthamiana*
pRT100mod::AcGFP::XI-C*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eCFP::XI-C*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eYFP::XI-C*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
		Fortsetzung siehe nächste Seite

Bezeichnung	Resistenz	Anwendung
pCB302::35S::AcGFP::XI-C*tail*	B: Kan^R P:PPT^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen & Infiltration von *Nicotiana benthamiana*
pRT100mod::AcGFP::XI-D1*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eCFP::XI-D1*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eYFP::XI-D1*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pCB302::35S::AcGFP::XI-D1*tail*	B: Kan^R P:PPT^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen & Infiltration von *Nicotiana benthamiana*
pRT100mod::AcGFP::XI-D2*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eCFP::XI-D2*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eYFP::XI-D2*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pCB302::35S::AcGFP::XI-D2*tail*	B: Kan^R P:PPT^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen & Infiltration von *Nicotiana benthamiana*
pRT100mod::AcGFP::XI-E*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eCFP::XI-E*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eYFP::XI-E*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pCB302::35S::AcGFP::XI-E*tail*	B: Kan^R P:PPT^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen & Infiltration von *Nicotiana benthamiana*
pRT100mod::AcGFP::XI-F*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eCFP::XI-F*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eYFP::XI-F*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pCB302::35S::AcGFP::XI-F*tail*	B: Kan^R P:PPT^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen & Infiltration von *Nicotiana benthamiana*
pRT100mod::AcGFP::XI-G*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eCFP::XI-G*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eYFP::XI-G*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pCB302::35S::AcGFP::XI-G*tail*	B: Kan^R P:PPT^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen & Infiltration von *Nicotiana benthamiana*
pRT100mod::AcGFP::XI-H*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eCFP::XI-H*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eYFP::XI-H*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pCB302::35S::AcGFP::XI-H*tail*	B: Kan^R P:PPT^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen & Infiltration von *Nicotiana benthamiana*
pRT100mod::AcGFP::XI-I*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eCFP::XI-I*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eYFP::XI-I*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pCB302::35S::AcGFP::XI-I*tail*	B: Kan^R P:PPT^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen & Infiltration von *Nicotiana benthamiana*

Fortsetzung siehe nächste Seite

Bezeichnung	Resistenz	Anwendung
pRT100mod::AcGFP::XI-J*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eCFP::XI-J*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eYFP::XI-J*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pCB302::35S::AcGFP::XI-J*tail*	B: Kan^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen &
	P:PPT^R	Infiltration von *Nicotiana benthamiana*
pRT100mod::AcGFP::XI-K*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eCFP::XI-K*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eYFP::XI-K*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pCB302::35S::AcGFP::XI-K*tail*	B: Kan^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen &
	P:PPT^R	Infiltration von *Nicotiana benthamiana*
pRT100mod::AcGFP::MyaI*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eCFP::MyaI*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eYFP::MyaI*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pCB302::35S::AcGFP::MyaI*tail*	B: Kan^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen &
	P:PPT^R	Infiltration von *Nicotiana benthamiana*
pRT100mod::AcGFP::MyaII*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eCFP::MyaII*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pRT100mod::eYFP::MyaII*tail*	Amp^R	Für *in vivo*-Analysen nach biolistischer Transformation
pCB302::35S::AcGFP::MyaII*tail*	B: Kan^R	Generierung transgener *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen &
	P:PPT^R	Infiltration von *Nicotiana benthamiana*

7.14. Datenverarbeitung

7.14.1. Software

Software	Anwendung
Lasergene DNAstar EditSeq	Umwandlung von *DNA*- in Proteinsequenz
Lasergene DNAstar PrimerSelect	Primerdesign
Lasergene DNAstar MegAlign und SeqMan	*DNA*-Sequenzanalyse
Lasergene DNAstar MapDraw	Bau von Genkarten bzw. Vektorkarten
CLC Sequence Viewer 6	*DNA*-Sequenzanalyse
EnzymeX 3	Restriktionsendonukleasensuche
LSM510 Systemsoftware	Bilddokumentation (konfokale Mikroskopie)
LSM Image Browser	Bildbetrachtung und -bearbeitung
ImageJ (Version 1.40g)	Bildbetrachtung und -bearbeitung
Adobe Photoshop CS (Version 8.0)	Bildbearbeitung
Canvas (Version 10.6.7)	Bildbearbeitung
Papers (Version 1.9.7)	Literaturrecherche und -verwaltung
BibDesk (Version 1.5.4)	Literaturrecherche und -verwaltung

Tabelle 7.12.: Software

7.14.2. Weitere Software

Internetseite	Anwendung
www.ncbi.nlm.nih.gov	Suche nach *cDNA*-Sequenzen
www.genevestigator.ethz.ch/at	Angaben zu Expressionsraten der Myosine
smart.embl-heidelberg.de	SMART -*Simple Modular Architecture Research Tool* zur Vorhersage von Domänen aus Proteinsequenzen

Tabelle 7.13.: Verwendete Internetseiten

7.14.3. Mikroskophardware und Steuerungssoftware

	Epifluoreszenz Setup 1	Epifluoreszenz Setup 2
Mikroskop	Axioskop 2 (aufrecht)	Axioskop 2 (aufrecht)
Kamerasystem	Axiocam HRc	JVC KY-F75 3-Chip
Software	Axiovision, Zeiss	DISKUS (Ingenieurbüro Hilgers)
Filterset: HE CFP (47 HE - Carl Zeiss, Jena)	Ex. 436 / 25 nm Farbteiler 455 nm LP Em. 480 / 40 nm	
Filterset: EndowGFP (AHF F41-017)	Ex. 470 / 40 nm Farbteiler 495 nm LP Em. 525 / 50 nm	
Filterset: HC YFP Filterset (Bandpass) (AHF F36-528)	Ex. 500 / 24 nm Farbteiler 520 nm LP Em. 542 / 27 nm	
Filterset: Dualband CFP/YFP HC (AHF F56-416)	Ex. 416 / 501 nm Farbteiler 440 / 520 nm Em. 464 / 547 nm	

Tabelle 7.14.: Mikroskophardware, Steuersoftware und Filtersätze. Ex.: Anregungswellenlänge; Em.*:* Emissionswellenlänge; AHF: AHF Analysentechnik (Tübingen)

LSM Setup	Laser	Mikroskop
AcGFP	Ex. 488 nm Em. 505 - 530 nm Bandpass	Zeiss LSM510 invert
Chlorophyll	633 nm 650 nm Langpass	
DIC	633 nm	
dsRed2	Ex. 543 nm Em. 560 - 615 nm Bandpass	
ECFP	Ex. 458 nm Em. 475 - 525 nm Bandpass	
EYFP	Ex. 514 nm Em. 530 - 600 nm Bandpass	
TagRFP	Ex. 514 nm Em. 560 - 615 nm Bandpass	

Tabelle 7.15.: LSM-Konfigurationen. Ex.: Anregungswellenlänge; Em.*:* Emissionswellenlänge;

8. Methoden

8.1. Molekularbiologische Methoden

Für den Umgang mit *DNA*, *RNA* und Bakterien wurden Standardmethoden nach Sambrook und Russell (2001) verwendet.

8.2. Arbeiten mit Pflanzenmaterial

8.2.1. Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana* auf Erde

Die Aussaat der Wildtyp-Samen erfolgte auf gesiebter Erde (ED73, Firma Platz). Nach dem Auskeimen und dem Erscheinen der ersten Sekundärblätter wurden die Keimlinge in einzelne Töpfe auf ein Erde:Vermikulit-Gemisch (3:1) umgesetzt. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte unter Kurztagbedingungen (8 h Licht (ca. 120 $\mu Einstein/m^2s$) – 16 h Dunkel-Rhythmus) und bei einer Temperatur von ca. 20 °C.
Zur Blüten- und Samenbildung wurden die *Arabidopsis*-Pflanzen unter Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkelheit) bei 25 °C weiter kultiviert.

8.2.2. Kultivierung von *Pisum sativum* auf Erde

Die Wildtyp-Samen wurden auf Erde (ED73, Firma Platz) ausgesät. Die Keimung und Kultur der Pflanzen erfolgte unter Langtagbedingungen (12 h Licht (120 $\mu Einstein/m^2s$) – 12 h Dunkel-Rhythmus) und bei einer Temperatur von ca. 20 °C.

8.2.3. Sterilisation von Samen

Die gesiebten Samen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 1 ml Hypochlorit-Lösung (5 % Ca-Hypochlorit; 0,1 % Triton X-100) zugegeben. Nach 15 Minuten Inkubation wurde der Überstand abgenommen und dreimal mit je 1 ml sterilem Leitungswasser gewaschen. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend über Nacht in der Sterilbank zum Trocknen stehen gelassen.

8.2.4. Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Sterilkultur

Sterile Samen wurden auf MS-Festmedium-Platten ausgelegt, mit sterilem Leitungswasser angefeuchtet und mit einem sterilisierten Glasstab gleichmäßig verteilt. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte in Lichtregalen bei 120 $\mu Einstein/m^2s$ und ca. 20 °C unter Kurztagbedingungen (8 h Licht/16 h Dunkelheit).

8.2.5. Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels *FloralDip*

Die stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach der von Clough und Bent (1998) beschriebenen Methode des *FloralDip*.

8.2.6. Selektion transgener Pflanzen auf Erde

Die Aussaat der Samen erfolgte auf gesiebter Erde (ED73, Firma Platz). Nach dem Auskeimen und dem Erscheinen der ersten Sekundärblätter wurden die Keimlinge mit BASTA-Lösung (Phosphinotricin) als Selektionsmittel für die durch den pCB302-Vektor eingebrachte *T-DNA* behandelt. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte unter Kurztagbedingungen (8 h Licht (ca. 120 $\mu Einstein/m^2s$) – 16 h Dunkel-Rhythmus) und bei einer Temperatur von ca. 20 °C. Nach dreimaliger BASTA-Behandlung (jeweils im Abstand von einer Woche) ließen sich die Transformanten (grün, Ausbildung von Sekundärblättern) von den Nicht-Transformanten (tot) unterscheiden. Die Transformanten wurden nun in einzelne Töpfe auf ein Erde:Vermikulit-Gemisch (3:1) umgesetzt. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte unter Kurztagbedingungen (8 h Licht (ca. 120 $\mu Einstein/m^2s$) – 16 h Dunkel-Rhythmus) und bei einer Temperatur von ca. 20 °C.

8.2.7. Selektion transgener Pflanzen auf MS-Medium

Die Samen der mit *FloralDip* transformierten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurden sterilisiert und auf MS-Festmedium-Platten mit 250 µg/ml Cefotaxim, welches das Wachstum von Agrobakterien inhibiert, und 8 µg/ml Phosphinotricin (BASTA), als Selektionsmarker für die durch den pCB302-Vektor eingebrachte *T-DNA*, ausgelegt. Nach 2 Wochen ließen sich die Transformanten („normaler“ Wuchs) von den Nicht-Transformanten (gelblich, ohne Wurzeln im Agar) unterscheiden. Die Transformanten wurden nun auf neue MS-Festmedium-Platten pikiert und für weitere 2 Wochen in Sterilkultur gehalten bis sie auf Erde umgesetzt wurden.

8.2.8. Transiente Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101::pMP90 wurde durch Elektroporation transformiert und nach Anzucht auf selektiven Agarplatten in Flüssigkultur bis zu einer OD_{600} von 1,0 kultiviert. Nach der Zellernte erfolgte die Resuspension Bakterien in AIM und die optische Dichte bei 600 nm wurde auf 0,8 eingestellt. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung mit Hilfe einer Einwegspritze in den Interzellularraum von 10 Wochen alten *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen eingebracht. Die infiltrierten Bereiche wurde mit einem Stift vorsichtig umrandet, um ein Wiederfinden zu ermöglichen. Die Pflanzen wurden daraufhin unter den üblichen Kultivierungsbedingungen wachsen gelassen. Die behandelten Blattbereiche wurden nach 48 Stunden mikroskopisch untersucht.

	Rezept
Agrobakterium-Infiltrationsmedium (AIM)	10 mM $MgCl_2$ 5 mM MES pH 5,3 150 µM Acetosyringon

Tabelle 8.1.: Agrobakterium-Infiltrationsmedium (AIM)

8.2.9. Transiente Transformation mittels Partikelbeschuss

Die im Folgenden beschriebene Methode der biolistischen Transformation (*particle bombardement*) wurde nach einem Protokoll durchgeführt, welches von Dr. Bianca Baudisch während ihrer Diplomarbeit (Baudisch, 2006) in unserer Arbeitsgruppe etabliert wurde. Die dazu verwendete biolistische Schussapparatur wurde von der technischen Abteilung der Universität Freiburg angefertigt.

Material:

Material	Anmerkung	Konzentration
Agar-Platten	Micro-Agar	2 % (w/v)
Plasmid-*DNA*	pRT100mod::FP::Konstrukt	300 ng/µl
Gold-Partikel	0,6 µm Durchmesser	60 µg/µl
$CaCl_2$	in sterilem ddH_2O	2,5 M
Spermidin (free base)	in sterilem ddH_2O	0,1 M

Durchführung:

Präparation des Pflanzenmaterials:

- *Arabidopsis thaliana*: Es wurden vollständig entfaltet Blätter von 8 bis 10 Wochen angezogenen Pflanzen verwendet.
- *Pisum sativum*: Zur Transformation wurden 7-10 Tage alte, bereits geöffnete Blätter verwendet.

  Die Blätter wurden zentral auf Micro-Agar-Platten aufgelegt.

Präzipitationsansatz für einen Schuss (2,5 µl):

Lösung	a) einfache Transformation	b) Transformation mit zwei Plasmidlösungen
Gold (60 µg/µl)	3,3 µl	3,3 µl
Plasmid-*DNA*-Lösung 1 (300 ng/µl)	1,3 µl	1,3 µl
Plasmid-*DNA*-Lösung 2 (300 ng/µl)	-	1,3 µl
$CaCl_2$ (2,5 M)	4 µl	4 µl
Spermidin (0,1 M; free base)	1 µl	1 µl

Der Präzipitationsansatz wurde sorgfältig gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (RT, 30 s, 16000 x g) wurden 7,1 µl (von a) bzw. 8,4 µl (von b) des Überstands verworfen und das Pellet in den restlichen 2,5 µl (von a) bzw. 5 µl (von b) resuspendiert. Der Schussansatz wurde auf den Träger geladen und die Agarplatte mit dem Blattmaterial zentral, 8 cm unterhalb des Trägers in der biolistischen Kammer positioniert. Nun wurde ein Vakuum von 0,2 bar angelegt, die Partikel mit Hilfe eines Heliumdruckes von 12 bar beschleunigt und in das Blattgewebe geschossen.
Die Agarplatten wurden mit Parafilm™ verschlossen. Das Pflanzengewebe wurde bis zur mikroskopischen Analyse für 12-14 Stunden bei Raumtemperatur dunkel inkubiert.

8.3. Mikroskopische Methoden

8.3.1. Vakuuminfiltration und Präparation des Blattmaterials

Vor der mikroskopischen Untersuchung wurde das Blattmaterial mit Leitungswasser vakuuminfiltriert, um die Luft aus den Interzellularräumen zu verdrängen, wodurch eine störungsfreie Betrachtung des Blattmaterials erst möglich wird. Die Vakuuminflitration wurde in 2 ml Reaktionsgefäßen mit Hilfe einer 10 ml Einwegspritze durchgeführt.

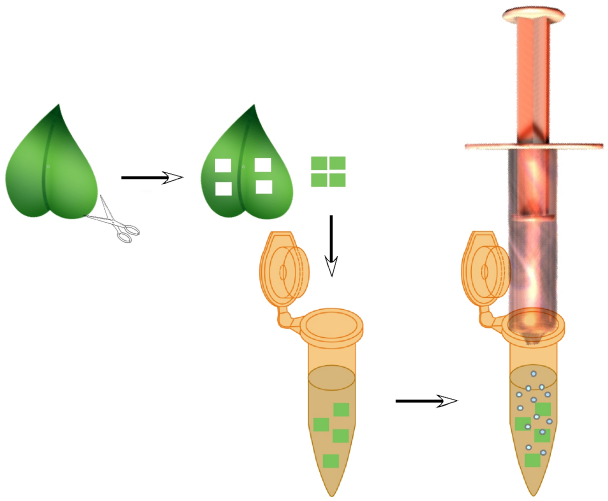

Abbildung 8.1.: Schematische Übersicht über die Vakuuminfiltration

Für *Co*-Lokalisationsstudien wurde das Blattmaterial in 200 µM CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon) statt in Leitungswasser infiltriert. Die Behandlung mit dem mitochondrialen Entkoppler hat ein sofortiges, reversibles Erliegen jeglicher aktiven Bewegung in der Zelle zur Folge.

8.3.2. Epifluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopischen Bilder wurden mittels einer 3 CCD-Kamera (JVC, Modell KY-F70BU) aufgenommen und im Programm DISKUS dargestellt bzw. mit einer Axiocam HRc aufgenommen und mit der Axiovision-Software (Zeiss) dargestellt. Dabei wurde jeweils der

Fluoreszenzmodus (Beleuchtung HBO 100) und der DIC-Modus (*differential interference contrast*, Hellfeldbeleuchtung) eines Blattbereiches abgebildet.

8.3.3. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die mikroskopischen Bilder entstehen bei diesem Verfahren durch Abtasten des Präparats mit Hilfe eines Lasers und der Detektion der emittierten Signale durch einen Photomultiplier. Die Verrechnung der Signale und Interpretation erfolgt durch einen Computer, wobei ein Bild in Falschfarben entsteht.

8.3.4. Bildbetrachtung und -bearbeitung

Die Bildbetrachtung und -bearbeitung erfolgte mit Hilfe der Programme LSM Image Browser, ImageJ (Version 1.40g), Adobe Photoshop CS (Version 8.0) und Canvas (Version 10.6.7).

8.4. Proteinbiochemische Methoden

8.4.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die durchgeführte SDS-PAGE orientiert sich an der Methode von Laemmli (1970). Dabei wurden Gradientengele mit verschiedenen Konzentrationen an PAA (z. B. 5-12 %) verwendet.

8.4.2. Native Gelelektrophorese - *"High resolution clear native electrophoresis"* (hrCN-PAGE)

Die durchgeführte hrCN-PAGE orientiert sich an der Methode von Wittig *et al.* (2007). Dabei wurden PAA-Gele mit einem Gradienten von 5-12 % PAA verwendet.

8.4.3. Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

a) für die Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen

Für die Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen wurden jeweils 150 mg frisches Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 50 µl 2x-Lämmli-Probenpuffer (Laemmli, 1970) aufgenommen. Danach wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C gekocht, anschließend auf Eis gekühlt und unmittelbar vor der Auftragung des Überstands für eine SDS-PAGE 5 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm zentrifugiert.

b) für die Auftrennung unter nativen Bedingungen

Für die Auftrennung unter nativen Bedingungen wurden jeweils 150 mg frisches Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 50 µl eiskaltem Probenpuffer 1 aufgenommen. Danach wurden die Proben für 45 Minuten bei 4 °C in einer *Beckman Coulter™Avanti™J-25 Centrifuge* mit einem JA18.1-Rotor bei 42100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 10 % v/v Probenpuffer 2 versetzt. Die Proben wurden daraufhin erneut in einer Tischzentrifuge bei 4 °C und 13000 rpm für eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand

wurde abgenommen, mit 50 % v/v eiskalter, 50 %iger Glycerinlösung versetzt und bis zur Auftragung für eine hrCN-PAGE auf Eis gelagert.

Zusammensetzung der Probenpuffer:

Probenpuffer 1	BisTris; pH 7	100 mM
	DDM	0,5 %
	ε-Aminocapronsäure	125 mM
	AEBSF	1 mM
	$CaCl_2$	2 mM
	Micrococcal Nuclease	4 µl/ml
	ddH_2O	ad 1 ml
Probenpuffer 2	DOC	0,5 %
	DDM	0,1 %
	Ponceau	0,5 %
	ddH_2O	ad 100 µl

8.4.4. Coomassie-Colloidal-Färbung

Die Färbung von Proteinen in PAA-Gelen nach der PAGE wurde nach dem Protokoll von Neuhoff *et al.* (1985) durchgeführt.

8.4.5. Western-Analyse

Transfer:

Der Transfer der Proteine aus den Polyacrylamidgelen auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P®, Millipore (Schwalbach/Ts.)) erfolgte mit Hilfe einer *SemiDry*-Blot Apparatur (*Panther™ Semidry electroblotter*, Owl Separation Systems) und entsprechend der Gebrauchsanleitung des *Semi-Dry Blotting Buffer*-Kits (SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)). Dabei wurde der Transfer über einen Zeitraum von 1,5 h bei 1 mA/cm^2 durchgeführt.

ECL-Entwicklung:

10 x PBS	NaCl	750 mM
	KCl	30 mM
	Na_2HPO_4	45 mM
	KH_2PO_4	15 mM
Lösung I	PBS	1x
	Tween 20	0,1 % (v/v)
	Magermilchpulver	5 % (w/v)
Lösung II	PBS	1x
	Tween 20	0,1 % (v/v)
ECL-Entwicklerlösung	1 M Tris/HCl pH 8,5	500 µl
	250 mM Luminol (in DMSO)	50 µl
	90 mM Coumarinsäure (in DMSO)	22 µl
	30 % H_2O_2 (8,8 M)	3 µl
	mit ddH_2O auf 10 ml auffüllen	

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde die Membran kurz mit ddH_2O gewaschen und anschließend in Lösung I für 2 h inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen (Blockierung). Danach erfolgte eine zweistündige Inkubation mit dem gegen das Zielprotein gerichteten primären Antikörper (in Lösung I, Konzentration siehe Tab. 7.7). Nach 4mal fünfminütigem Waschen mit Lösung I erfolgte die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (in Lösung I, Konzentration siehe Tab. 7.7), an dem eine Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt war. Im Anschluss wurde die Membran 4mal 5 min mit Lösung II gewaschen. Die ECL-Entwicklerlösung wurde vor jeder Entwicklung frisch hergestellt, wobei die Stammlösungen von Luminol und Coumarinsäure bei –20 °C gelagert wurden. Nach einminütiger Inkubation der Membran mit der Entwicklerlösung konnte die durch die Meerrettichperoxidase vermittelte Chemilumineszenz auf einem ECL-Film (Hyperfilm®-ECL, GE-Healthcare) nachgewiesen werden. Je nach erwarteter Signalintensität wurde der ECL-Film zwischen 3 und 60 min in einer Filmkassette auf die Membran aufgelegt.

8.4.6. Ponceau S-Färbung

Die Färbung von Proteinen auf PVDF-Membranen wurde mit einer 1 %igen, wässrigen Ponceau S-Lösung durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde dabei für eine Minute in der Ponceau S-Lösung bei RT inkubiert und danach mit Wasser wieder entfärbt.

Teil V.

Anhang

9. Literaturverzeichnis

Avisar, D., Abu-Abied, M., Belausov, E., Sadot, E., Hawes, C., Sparkes, I., Apr 2009. A comparative study on the involvement of 17 arabidopsis myosin family members on the motility of golgi and other organelles. Plant Physiol.

Avisar, D., Prokhnevsky, A., Makarova, K., Koonin, E., Dolja, V., Jan 2008. Myosin xi-k is required for rapid trafficking of golgi stacks, peroxisomes and mitochondria in leaf cells of nicotiana benthamiana. Plant Physiol.

Baudisch, B., 2006. Subzelluläre lokalisierung chimärer egfp-derivate nach transienter transformation verschiedener pflanzenspecies. Master's thesis, Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Bell, P., Vandenberghe, L. H., Wu, D., Johnston, J., Limberis, M., Wilson, J. M., Jan 2007. A comparative analysis of novel fluorescent proteins as reporters for gene transfer studies. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 55 (9), 931–939.

Berg, J. S., Powell, B. C., Cheney, R. E., Apr 2001. A millennial myosin census. Mol Biol Cell 12 (4), 780–94.

Cai, G., Cresti, M., Jan 2012. Are kinesins required for organelle trafficking in plant cells? Front Plant Sci 3, 170.

Clough, S. J., Bent, A. F., Dec 1998. Floral dip: a simplified method for agrobacterium-mediated transformation of arabidopsis thaliana. Plant J 16 (6), 735–43.

Coletta, A., Pinney, J. W., Solís, D. Y. W., Marsh, J., Pettifer, S. R., Attwood, T. K., Jan 2010. Low-complexity regions within protein sequences have position-dependent roles. BMC Syst Biol 4, 43.

Collins, K., Sellers, J. R., Matsudaira, P., Apr 1990. Calmodulin dissociation regulates brush border myosin i (110-kd-calmodulin) mechanochemical activity in vitro. J Cell Biol 110 (4), 1137–47.

Coluccio, L. M., Bretscher, A., Jul 1987. Calcium-regulated cooperative binding of the microvillar 110k-calmodulin complex to f-actin: formation of decorated filaments. J Cell Biol 105 (1), 325–33.

Cope, Hodge, Roberts, Morriswood, 2006. The myosin homepage.
URL `http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/myosin.html`

Desnos, C., Huet, S., Darchen, F., Aug 2007. 'should i stay or should i go?': myosin v function in organelle trafficking. Biol Cell 99 (8), 411–23.

Dhanoa, P., Sinclair, A., Mullen, R., Mathur, J., Jan 2006. Illuminating subcellular structures and dynamics in plants: a fluorescent protein toolbox. Can. J. Bot.

Dunn, B. D., Sakamoto, T., Hong, M.-S. S., Sellers, J. R., Takizawa, P. A., Sep 2007. Myo4p is a monomeric myosin with motility uniquely adapted to transport mrna. J Cell Biol 178 (7), 1193–206.

Frandsen, G., Mundy, J., Tzen, J., Jul 2001. Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. Physiol Plantarum 112 (3), 301–307.

García-Mata, R., Bebök, Z., Sorscher, E. J., Sztul, E. S., Sep 1999. Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic gfp-chimera. J Cell Biol 146 (6), 1239–54.

Golomb, L., Abu-Abied, M., Belausov, E., Sadot, E., Jan 2008. Different subcellular localizations and functions of arabidopsis myosin viii. BMC Plant Biol 8, 3.

Gurskaya, N. G., Fradkov, A. F., Pounkova, N. I., Staroverov, D. B., Bulina, M. E., Yanushevich, Y. G., Labas, Y. A., Lukyanov, S., Lukyanov, K. A., Jul 2003. A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa aequorea coerulescens and its fluorescent mutants. Biochem J 373 (Pt 2), 403–8.

Haarer, B. K., Petzold, A., Lillie, S. H., Brown, S. S., Apr 1994. Identification of myo4, a second class v myosin gene in yeast. J Cell Sci 107 (Pt 4), 1055–64.

Hashimoto, K., Igarashi, H., Mano, S., Nishimura, M., Shimmen, T., Yokota, E., May 2005. Peroxisomal localization of a myosin xi isoform in arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol 46 (5), 782–9.

Hellens, R., Mullineaux, P., Klee, H., Oct 2000. Technical focus:a guide to agrobacterium binary ti vectors. Trends Plant Sci 5 (10), 446–51.

Hodge, T., Cope, M. J., Oct 2000. A myosin family tree. J Cell Sci 113 Pt 19, 3353–4.

Huang, A. H., Apr 1996. Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. Plant Physiol 110 (4), 1055–61.

Ishikawa, K., Catlett, N. L., Novak, J. L., Tang, F., Nau, J. J., Weisman, L. S., Mar 2003. Identification of an organelle-specific myosin v receptor. J Cell Biol 160 (6), 887–97.

Jiang, S., Ramachandran, S., Jan 2004. Identification and molecular characterization of myosin gene family in oryza sativa genome. Plant and cell physiology 45 (5), 590–599.

Kamiya, N., Jan 1981. Physical and chemical basis of cytoplasmic streaming. Annual Review of Plant Physiology.

Kinkema, M., Schiefelbein, J., Jun 1994. A myosin from a higher plant has structural similarities to class v myosins. J Mol Biol 239 (4), 591–7.

Knight, A. E., Kendrick-Jones, J., May 1993. A myosin-like protein from a higher plant. J Mol Biol 231 (1), 148–54.

Kolomeisky, A. B., Fisher, M. E., Jan 2007. Molecular motors: a theorist's perspective. Annu Rev Phys Chem 58, 675–95.

Koncz, C., Schell, J., Jan 1986. The promoter of tl-dna gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of agrobacterium binary vector. Mol Gen Genet 204 (3), 383–396.

Kong, S.-G., Wada, M., Apr 2014. Recent advances in understanding the molecular mechanism of chloroplast photorelocation movement. Biochim Biophys Acta 1837 (4), 522–30.

Kreis, T., Vale, R., 1999. Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins. The Guidebook Series. Oxford University Press.

Laemmli, U. K., Aug 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. Nature 227 (5259), 680–5.

Larson, R. E., Mar 1996. Myosin-v: a class of unconventional molecular motors. Braz J Med Biol Res 29 (3), 309–18.

Li, J., Nebenführ, A., May 2007. Organelle targeting of myosin xi is mediated by two globular tail subdomains with separate cargo binding sites. J Biol Chem.

Li, J., Nebenführ, A., Apr 2008a. Interdependence of dimerization and organelle binding in myosin xi. Plant J 55 (3), 478 –490.

Li, J., Nebenführ, A., Jan 2008b. The tail that wags the dog: The globular tail domain defines the function of myosin v/xi. Traffic.

Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S., Shea, T. P., Benito, M. I., Town, C. D., Fujii, C. Y., Mason, T., Bowman, C. L., Barnstead, M., Feldblyum, T. V., Buell, C. R., Ketchum, K. A., Lee, J., Ronning, C. M., Koo, H. L., Moffat, K. S., Cronin, L. A., Shen, M., Pai, G., Aken, S. V., Umayam, L., Tallon, L. J., Gill, J. E., Adams, M. D., Carrera, A. J., Creasy, T. H., Goodman, H. M., Somerville, C. R., Copenhaver, G. P., Preuss, D., Nierman, W. C., White, O., Eisen, J. A., Salzberg, S. L., Fraser, C. M., Venter, J. C., Dec 1999. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant arabidopsis thaliana. Nature 402 (6763), 761–8.

Linder, H., Bayrhuber, H., 1998. Biologie: Lehrbuch für die Oberstufe. Metzler.

Marc, J., Granger, C., Brincat, J., Fisher, D., Kao, T., McCubbin, A., Cyr, R., Nov 1998. A gfp-map4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. Plant Cell 10 (11), 1927–40.

Mayer, K., Schüller, C., Wambutt, R., Murphy, G., Volckaert, G., Pohl, T., Düsterhöft, A., Stiekema, W., Entian, K. D., Terryn, N., Harris, B., Ansorge, W., Brandt, P., Grivell, L., Rieger, M., Weichselgartner, M., Simone, V. D., Obermaier, B., Mache, R., Müller, M., Kreis, M., Delseny, M., Puigdomenech, P., Watson, M., Schmidtheini, T., Reichert, B., Portatelle, D., Perez-Alonso, M., Boutry, M., Bancroft, I., Vos, P., Hoheisel, J., Zimmermann, W., Wedler, H., Ridley, P., Langham, S. A., McCullagh, B., Bilham, L., Robben, J., der Schueren, J. V., Grymonprez, B., Chuang, Y. J., Vandenbussche, F., Braeken, M., Weltjens, I., Voet, M., Bastiaens, I., Aert, R., Defoor, E., Weitzenegger, T., Bothe, G., Ramsperger, U., Hilbert, H., Braun, M., Holzer, E., Brandt, A., Peters, S., van Staveren, M., Dirske, W., Mooijman, P., Lankhorst, R. K., Rose, M., Hauf, J., Kötter, P., Berneiser, S., Hempel, S., Feldpausch, M., Lamberth, S., den Daele, H. V., Keyser, A. D., Buysshaert, C., Gielen, J., Villarroel, R., Clercq, R. D., Montagu, M. V., Rogers, J., Cronin, A., Quail, M., Bray-Allen, S., Clark, L., Doggett, J., Hall, S., Kay, M., Lennard, N., McLay, K., Mayes, R., Pettett, A., Rajandream, M. A., Lyne, M., Benes, V., Rechmann, S., Borkova, D., Blöcker, H., Scharfe, M., Grimm, M., Löhnert, T. H., Dose, S., de Haan, M., Maarse, A., Schäfer, M., Müller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Fartmann, B., Granderath, K., Dauner, D., Herzl, A., Neumann, S., Argiriou, A., Vitale, D., Liguori, R., Piravandi, E., Massenet, O., Quigley, F., Clabauld, G., Mündlein, A., Felber, R., Schnabl, S., Hiller, R., Schmidt, W., Lecharny, A., Aubourg, S., Chefdor, F., Cooke, R., Berger, C., Montfort, A., Casacuberta, E., Gibbons, T., Weber, N., Vandenbol, M., Bargues, M., Terol, J., Torres, A., Perez-Perez, A., Purnelle, B., Bent, E., Johnson, S., Tacon, D., Jesse, T., Heijnen, L., Schwarz, S., Scholler, P., Heber, S., Francs, P., Bielke, C., Frishman, D., Haase, D., Lemcke, K., Mewes, H. W., Stocker, S., Zaccaria, P., Bevan, M., Wilson, R. K., de la Bastide, M., Habermann, K., Parnell, L., Dedhia, N., Gnoj, L., Schutz, K., Huang, E., Spiegel, L., Sehkon, M., Murray, J., Sheet, P., Cordes, M., Abu-Threideh, J., Stoneking, T., Kalicki, J., Graves, T., Harmon, G., Edwards, J., Latreille, P., Courtney, L., Cloud, J., Abbott, A., Scott, K., Johnson, D., Minx, P., Bentley, D., Fulton, B., Miller, N., Greco, T., Kemp, K., Kramer, J., Fulton, L., Mardis, E., Dante, M., Pepin, K., Hillier, L., Nelson, J., Spieth, J., Ryan, E., Andrews, S., Geisel, C., Layman, D., Du, H., Ali, J., Berghoff, A., Jones, K., Drone, K., Cotton, M., Joshu, C., Antonoiu, B., Zidanic, M., Strong, C., Sun, H., Lamar, B., Yordan, C., Ma, P., Zhong, J., Preston, R., Vil, D., Shekher, M., Matero, A., Shah, R., Swaby, I. K., O'Shaughnessy, A., Rodriguez, M., Hoffmann, J., Till, S., Granat, S., Shohdy, N., Hasegawa, A., Hameed, A., Lodhi, M., Johnson, A., Chen, E., Marra, M., Martienssen, R., McCombie, W. R., Dec 1999. Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant arabidopsis thaliana. Nature 402 (6763), 769–77.

Mermall, V., Post, P. L., Mooseker, M. S., Jan 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. Science 279 (5350), 527–33.

Merzlyak, E. M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M. E., Shcheglov, A. S., Fradkov, A. F., Gaintzeva, A., Lukyanov, K. A., Lukyanov, S., Gadella, T. W. J., Chudakov, D. M., Jul 2007. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. Nat Methods 4 (7), 555–7.

Mooseker, M., Jan 1995. Molecular motors, membrane movements and physiology: emerging roles for myosins. Current opinion in cell biology.

Mooseker, M. S., Cheney, R. E., Jan 1995. Unconventional myosins. Annu Rev Cell Dev Biol 11, 633–675.

Muqit, M. M. K., Davidson, S. M., Smith, M. D. P., MacCormac, L. P., Kahns, S., Jensen, P. H., Wood, N. W., Latchman, D. S., Jan 2004. Parkin is recruited into aggresomes in a stress-specific manner: over-expression of parkin reduces aggresome formation but can be dissociated from parkin's effect on neuronal survival. Hum Mol Genet 13 (1), 117–35.

Nandi, T., Ramachandran, S., 2003. Low complexity sequences in proteins: New perspectives for sequence and structure from comparative genomics. In: Book of Abstracts: Albany 2003. Vol. Conversation 13.

Nebenführ, A., 2010. The nebenführ lab.
URL `http://www.bio.utk.edu/cellbiol/default.htm`

Nelson, B. K., Cai, X., Nebenführ, A., Sep 2007. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in arabidopsis and other plants. Plant J 51 (6), 1126–36.

Neuhoff, V., Stamm, R., Eibl, H., Jan 1985. Clear background and highly sensitive protein staining with coomassie blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. Electrophoresis 6 (9), 427–448.

Odronitz, F., Kollmar, M., Jan 2007. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. Genome Biol 8 (9), R196.

Ojangu, E.-L., Järve, K., Paves, H., Truve, E., Apr 2007. Arabidopsis thaliana myosin xik is involved in root hair as well as trichome morphogenesis on stems and leaves. Protoplasma 230 (3-4), 193–202.

Pagny, S., Bouissonnie, F., Sarkar, M., Follet-Gueye, M. L., Driouich, A., Schachter, H., Faye, L., Gomord, V., Jan 2003. Structural requirements for arabidopsis beta1,2-xylosyltransferase activity and targeting to the golgi. Plant J 33 (1), 189–203.

Peremyslov, V., Prokhnevsky, A., Avisar, D., Dolja, V., Jan 2008. Two class xi myosins function in organelle trafficking and root hair development in arabidopsis thaliana. Plant Physiol.

Peremyslov, V. V., Klocko, A. L., Fowler, J. E., Dolja, V. V., Jan 2012. Arabidopsis myosin xi-k localizes to the motile endomembrane vesicles associated with f-actin. Front Plant Sci 3, 184.

Peremyslov, V. V., Mockler, T. C., Filichkin, S. A., Fox, S. E., Jaiswal, P., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Dolja, V., Jan 2011. Expression, splicing, and evolution of the myosin gene family in plants. Plant physiology.

Peremyslov, V. V., Prokhnevsky, A. I., Dolja, V. V., Jun 2010. Class xi myosins are required for development, cell expansion, and f-actin organization in arabidopsis. The Plant cell.
URL `http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Retrieve&list_uids=20581304&dopt=abstractplus`

Pollard, T. D., Weihing, R. R., Jan 1974. Actin and myosin and cell movement. CRC Crit Rev Biochem 2 (1), 1–65.

Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., Cormier, M. J., Feb 1992. Primary structure of the aequorea victoria green-fluorescent protein. Gene 111 (2), 229–33.

Prokhnevsky, A. I., Peremyslov, V. V., Dolja, V. V., Dec 2008. Overlapping functions of the four class xi myosins in arabidopsis growth, root hair elongation, and organelle motility. Proc Natl Acad Sci USA 105 (50), 19744–9.

Reck-Peterson, S. L., Provance, D. W., Mooseker, M. S., Mercer, J. A., Mar 2000. Class v myosins. Biochim Biophys Acta 1496 (1), 36–51.

Reddy, A. S., Day, I. S., Jan 2001. Analysis of the myosins encoded in the recently completed arabidopsis thaliana genome sequence. Genome Biol 2 (7), RESEARCH0024.

Reichelt, S., Knight, A. E., Hodge, T. P., Baluska, F., Samaj, J., Volkmann, D., Kendrick-Jones, J., Sep 1999. Characterization of the unconventional myosin viii in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. Plant J 19 (5), 555–67.

Reisen, D., Hanson, M. R., Jan 2007. Association of six yfp-myosin xi-tail fusions with mobile plant cell organelles. BMC Plant Biol 7, 6.

Richards, T. A., Cavalier-Smith, T., Aug 2005. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. Nature 436 (7054), 1113–8.

Rödel, D., 2007. Subzelluläre lokalisierung der myosin-xi-proteine von arabidopsis thaliana. Master's thesis, Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Rödiger, A., 2010. Untersuchungen zur organellspezifität des proteintransports in eukaryotischen pflanzenzellen am beispiel von cytochrom c1. Ph.D. thesis, Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Rödiger, A., Baudisch, B., Klösgen, R. B., May 2010. Simultaneous isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of plant tissue. J Plant Physiol 167 (8), 620–4.

Rödiger, A., Baudisch, B., Langner, U., Klösgen, R. B., Jul 2011. Dual targeting of a mitochondrial protein: the case study of cytochrome c1. Molecular plant 4 (4), 679–87.

Rodriguez, O. C., Cheney, R. E., Mar 2002. Human myosin-vc is a novel class v myosin expressed in epithelial cells. J Cell Sci 115 (Pt 5), 991–1004.

Rothbauer, U., Zolghadr, K., Muyldermans, S., Schepers, A., Cardoso, M. C., Leonhardt, H., Feb 2008. A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. Mol Cell Proteomics 7 (2), 282–9.

Ruppel, K. M., Spudich, J. A., Jan 1996. Structure-function analysis of the motor domain of myosin. Annual Review of Cell and Developmental Biology 12, 543–573.

Salanoubat, M., Lemcke, K., Rieger, M., Ansorge, W., Unseld, M., Fartmann, B., Valle, G., Blöcker, H., Perez-Alonso, M., Obermaier, B., Delseny, M., Boutry, M., Grivell, L. A., Mache, R., Puigdomènech, P., Simone, V. D., Choisne, N., Artiguenave, F., Robert, C., Brottier, P., Wincker, P., Cattolico, L., Weissenbach, J., Saurin, W., Quétier, F., Schäfer, M., Müller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Benes, V., Wurmbach, E., Drzonek, H., Erfle, H., Jordan, N., Bangert, S., Wiedelmann, R., Kranz, H., Voss, H., Holland, R., Brandt, P., Nyakatura, G., Vezzi, A., D'Angelo, M., Pallavicini, A., Toppo, S., Simionati, B., Conrad, A., Hornischer, K., Kauer, G., Löhnert, T. H., Nordsiek, G., Reichelt, J., Scharfe, M., Schön, O., Bargues, M., Terol, J., Climent, J., Navarro, P., Collado, C., Perez-Perez, A., Ottenwälder, B., Duchemin, D., Cooke, R., Laudie, M., Berger-Llauro, C., Purnelle, B., Masuy, D., de Haan, M., Maarse, A. C., Alcaraz, J. P., Cottet, A., Casacuberta, E., Monfort, A., Argiriou, A., flores, M., Liguori, R., Vitale, D., Mannhaupt, G., Haase, D., Schoof, H., Rudd, S., Zaccaria, P., Mewes, H. W., Mayer, K. F., Kaul, S., Town, C. D., Koo, H. L., Tallon, L. J., Jenkins, J., Rooney, T., Rizzo, M., Walts, A., Utterback, T., Fujii, C. Y., Shea, T. P., Creasy, T. H., Haas, B., Maiti, R., Wu, D., Peterson, J., Aken, S. V., Pai, G., Militscher, J., Sellers, P., Gill, J. E., Feldblyum, T. V., Preuss, D., Lin, X., Nierman, W. C., Salzberg, S. L., White, O., Venter, J. C., Fraser, C. M., Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Kato, T., Asamizu, E., Sasamoto, S., Kimura, T., Idesawa, K., Kawashima, K., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shinpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Tabata, S., Consortium, E. U. C. . A. S., for Genomic Research, I., Institute, K. D. R., Dec 2000. Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant arabidopsis thaliana. Nature 408 (6814), 820–2.

Sambrook, J., Russell, D. W., Jan 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, volume 1-3.

Sattarzadeh, A., Krahmer, J., Germain, A. D., Hanson, M. R., Nov 2009. A myosin xi tail domain homologous to the yeast myosin vacuole-binding domain interacts with plastids and stromules in nicotiana benthamiana. Molecular Plant 2 (6), 1351–8.

Schneider, K., Beck, C. F., Jan 1987. New expression vectors for identifying and testing signal structures for initiation and termination of transcription. Meth Enzymol 153, 452–61.

Sellers, J. R., Mar 2000. Myosins: a diverse superfamily. Biochim Biophys Acta 1496 (1), 3–22.

Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E., Tsien, R. Y., Dec 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from discosoma sp. red fluorescent protein. Nat Biotechnol 22 (12), 1567–72.

Shimmen, T., Jan 2007. The sliding theory of cytoplasmic streaming: fifty years of progress. J Plant Res 120 (1), 31–43.

Shimmen, T., Yokota, E., Jan 1994. Physiological and biochemical aspects of cytoplasmic streaming. International Review of Cytology.

Shimmen, T., Yokota, E., Feb 2004. Cytoplasmic streaming in plants. Curr Opin Cell Biol 16 (1), 68–72.

Sparkes, I., Jul 2011. Recent advances in understanding plant myosin function: Life in the fast lane. Molecular plant.

Sparkes, I., Teanby, N., Hawes, C., May 2008. Truncated myosin xi tail fusions inhibit peroxisome, golgi, and mitochondrial movement in tobacco leaf epidermal cells: a genetic tool for the next generation. J Exp Bot.

Sparkes, I. A., Jun 2010. Motoring around the plant cell: insights from plant myosins. Biochem Soc Trans 38 (3), 833–8.

Straßburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A. F. W., Sitte, P., Weiler, E. W., Kadereit, J. W., Bresinsky, A., Körner, C., 2002. Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. Vol. 35. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg * Berlin.

Suetsugu, N., Dolja, V. V., Wada, M., Oct 2010. Why have chloroplasts developed a unique motility system? Plant signaling & behavior 5 (10).

Tabata, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., Kotani, H., Kato, T., Asamizu, E., Miyajima, N., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakayama, S., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shinpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., Sato, S., de la Bastide, M., Huang, E., Spiegel, L., Gnoj, L., O'Shaughnessy, A., Preston, R., Habermann, K., Murray, J., Johnson, D., Rohlfing, T., Nelson, J., Stoneking, T., Pepin, K., Spieth, J., Sekhon, M., Armstrong, J., Becker, M., Belter, E., Cordum, H., Cordes, M., Courtney, L., Courtney, W., Dante, M., Du, H., Edwards, J., Fryman, J., Haakensen, B., Lamar, E., Latreille, P., Leonard, S., Meyer, R., Mulvaney, E., Ozersky, P., Riley, A., Strowmatt, C., Wagner-McPherson, C., Wollam, A., Yoakum, M., Bell, M., Dedhia, N., Parnell, L., Shah, R., Rodriguez, M., See, L. H., Vil, D., Baker, J., Kirchoff, K., Toth, K., King, L., Bahret, A., Miller, B., Marra, M., Martienssen, R., McCombie, W. R., Wilson, R. K., Murphy, G., Bancroft, I., Volckaert, G., Wambutt, R., Düsterhöft, A., Stiekema, W., Pohl, T., Entian, K. D., Terryn, N., Hartley, N., Bent, E., Johnson, S., Langham, S. A., McCullagh, B., Robben, J., Grymonprez, B., Zimmermann, W., Ramsperger, U., Wedler, H., Balke, K., Wedler, E., Peters, S., van Staveren, M., Dirkse, W., Mooijman, P., Lankhorst, R. K., Weitzenegger, T., Bothe, G., Rose, M., Hauf, J., Berneiser, S., Hempel, S., Feldpausch, M., Lamberth, S., Villarroel, R., Gielen, J., Ardiles, W., Bents, O., Lemcke, K., Kolesov, G., Mayer, K., Rudd, S., Schoof, H., Schueller, C., Zaccaria, P., Mewes, H. W., Bevan, M., Fransz, P., Institute, K. D. R., Harbor, C. S., in St Louis Sequencing Consortium, W. U., Consortium, E. U. A. G. S., Dec 2000. Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant arabidopsis thaliana. Nature 408 (6814), 823–6.

Tanaka, M., Kim, Y. M., Lee, G., Junn, E., Iwatsubo, T., Mouradian, M. M., Feb 2004. Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. J Biol Chem 279 (6), 4625–31.

Theologis, A., Ecker, J. R., Palm, C. J., Federspiel, N. A., Kaul, S., White, O., Alonso, J., Altafi, H., Araujo, R., Bowman, C. L., Brooks, S. Y., Buehler, E., Chan, A., Chao, Q., Chen, H., Cheuk, R. F., Chin, C. W., Chung, M. K., Conn, L., Conway, A. B., Conway, A. R., Creasy, T. H., Dewar, K., Dunn, P., Etgu, P., Feldblyum, T. V., Feng, J., Fong, B., Fujii, C. Y., Gill, J. E., Goldsmith, A. D., Haas, B., Hansen, N. F., Hughes, B., Huizar, L., Hunter, J. L., Jenkins, J., Johnson-Hopson, C., Khan, S., Khaykin, E., Kim, C. J., Koo, H. L., Kremenetskaia, I., Kurtz, D. B., Kwan, A., Lam, B., Langin-Hooper, S., Lee, A., Lee, J. M., Lenz, C. A., Li, J. H., Li, Y., Lin, X., Liu, S. X., Liu, Z. A., Luros, J. S., Maiti, R., Marziali, A., Militscher, J., Miranda, M., Nguyen, M., Nierman, W. C., Osborne, B. I., Pai, G., Peterson, J., Pham, P. K., Rizzo, M., Rooney, T., Rowley, D., Sakano, H., Salzberg, S. L., Schwartz, J. R., Shinn, P., Southwick, A. M., Sun, H., Tallon, L. J., Tambunga, G., Toriumi, M. J., Town, C. D., Utterback, T., Aken, S. V., Vaysberg, M., Vysotskaia, V. S., Walker, M., Wu, D., Yu, G., Fraser, C. M., Venter, J. C., Davis, R. W., Dec 2000. Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant arabidopsis thaliana. Nature 408 (6814), 816–20.

Thompson, R. F., Langford, G. M., Nov 2002. Myosin superfamily evolutionary history. Anat Rec 268 (3), 276–89.

Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., Steinbiss, H. H., Jul 1987. A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. Nucleic Acids Res 15 (14), 5890.

Trybus, K., Jan 2008. Myosin v from head to tail. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS).

Überlacker, B., Werr, W., Jan 1996. Vectors with rare-cutter restriction enzyme sites for expression of open reading frames in transgenic plants. Molecular Breeding.

Ueda, T., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., Nakano, A., Sep 2001. Ara6, a plant-unique novel type rab gtpase, functions in the endocytic pathway of arabidopsis thaliana. EMBO J 20 (17), 4730–41.

Uemura, T., Ueda, T., Ohniwa, R. L., Nakano, A., Takeyasu, K., Sato, M. H., Apr 2004. Systematic analysis of snare molecules in arabidopsis: dissection of the post-golgi network in plant cells. Cell Struct Funct 29 (2), 49–65.

Vale, R. D., Feb 2003a. The molecular motor toolbox for intracellular transport. Cell 112 (4), 467–80.

Vale, R. D., Nov 2003b. Myosin v motor proteins: marching stepwise towards a mechanism. J Cell Biol 163 (3), 445–50.

Veith, D., Veith, M., Jan 2005. Biologie fluoreszierender proteine: Ein regenbogen aus dem ozean. Biologie in unserer Zeit.

Wada, M., Sep 2013. Chloroplast movement. Plant Sci 210, 177–82.

Wahlroos, T., Soukka, J., Denesyuk, A., Wahlroos, R., Korpela, T., Kilby, N. J., Feb 2003. Oleosin expression and trafficking during oil body biogenesis in tobacco leaf cells. Genesis 35 (2), 125–32.

Walker, M. L., Burgess, S. A., Sellers, J. R., Wang, F., Hammer, J. A., Trinick, J., Knight, P. J., Jun 2000. Two-headed binding of a processive myosin to f-actin. Nature 405 (6788), 804–7.

Wenck, A., 2011. Application of reef coral fluorescent proteins to plant biotechnology. clontech.takara-bio.co.jp.

Wittig, I., Karas, M., Schägger, H., Jul 2007. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. Mol Cell Proteomics 6 (7), 1215–25.

Wolke, U., Jezuit, E. A., Priess, J. R., Jun 2007. Actin-dependent cytoplasmic streaming in c. elegans oogenesis. Development 134 (12), 2227–36.

Yokota, E., Shimmen, T., Jan 2011. Plant myosins. The Plant Cytoskeleton.

10. Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
35S	viraler Promotor aus TMV
3D	dreidimensional
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm (10^{-6} g)
µl	Mikroliter (10^{-6} l)
µM	Mikromolar
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Aceto-syringon	3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-aceto-phenon
AcGFP	grün fluoreszierendes Protein aus *Aequorea coerulescens*
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonyl-fluorid
AG	Arbeitsgruppe
AIM	*Agrobakterium*-Infiltrationsmedium
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
A. tume-faciens	*Agrobacterium tumefaciens*
A. th.	*Arabidopsis thaliana*
AvGFP	grün fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*
bp	Basenpaar(e)
BDM	2,3-Butandion-2-Monoxim
biol. Trafo.	biolistische Transformation
bzw.	beziehungsweise
CCD-Kamera	*Charge-coupled Device*-Kamera
cDNA	*complementary DNA*
c	Konzentration
C	Cytosin
Cef	Cefotaxim
CFP	*cyan fluorescent protein, Derivat des* grün fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*
C-Terminus	Carboxyterminus
C-terminal	am Carboxyterminus
ca.	circa
Ca-Hypo-chlorit	Calciumhypochlorit
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CaMV	*Cauliflower Mosaic Virus* (Blumenkohl-Mosaikvirus)
CatGFP	eine Form des GFPs mit „CAT"-Sequenz (mehrfach) in *cDNA*-Sequenz
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CLSM	*confocal laser scanning microscopy*
dest.	destilliert
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
DDM	n-Dodecyl-ß-maltosid
DIC	differentieller Interferenzkontrast
d. h.	das heißt
DMF	*N,N*-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	= DNS (Desoxyribonukleinsäure)

DNase	Desoxyribonuklease
DOC	Desoxycholsäure
dsRed2	Variante des rot fluoreszierenden Proteins drFP583 aus *Discosoma sp.*
DTT	Dithiothreitol
eCFP	*enhanced cyan fluorescent protein,* Derivat des grün fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*
ECL	*enhanced chemiluminescence*
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	*enhanced green flurescent protein*, grün fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	*et alii* (lat., und andere)
EtOH	Ethanol
etc.	*et cetera* (lat., und die übrigen Dinge)
eYFP	*enhanced yellow fluorescent protein,* Derivat des grün fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*
FNR-eGFP	N-terminales Fusionsprotein aus den ersten 100 AS der Ferrodoxin-NADPH-Oxido-reduktase und dem *enhanced green flurescent protein*
FP	Fluoreszenzprotein
FRET	*fluorescence resonance energy transfer*
g	Gramm
g	Gravitationskoonstante (bei Zentrifugationen)
G	Guanin
Gent	Gentamycin
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
hrCN-PAGE	*high resolution clear native* PAGE
HRP	*horseradish peroxidase* (Merrettichperoxidase)
Hyg	Hygromycin
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
λ	Wellenlänge Lambda
l	Liter
LB	LURIA Broth, ein Bakteriennährmedium
LBA4404	ein *Agrobacterium*stamm
LP	Langpassfilter
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
M	Molar
Map4	*microtubule-associated protein 4*
mA/cm^2	Milliampere pro Quadratzentimeter
MCS	*multiple cloning site*
MES	2-(*N*-Morpholino)-ethansulfonsäure
mg	Milligramm (10^{-3} g)
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
ml	Milliliter (10^{-3} l)
MLU	Martin-Luther-Universität

mM	Millimolar
mRNA	*messenger-RNA*, Boten-*RNA*
MS	Murashige und Skoog Medium
MuM	Material und Methoden
N-Terminus	Aminoterminus
N-terminal	am Aminoterminus
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
N. benth.	*Nicotiana benthamiana*
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
ng	Nanogramm (10^{-9} g)
nm	Nanometer (10^{-9} m)
nt	Nukleotid(e)
OD_λ	optische Dichte bei Wellenlänge λ
Oligo-dT	Oligodesoxythymidin
ORF	offenes Leseraster (*open reading frame*)
p.a.	für die Analyse (*pro analysis*)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Poly-A-	Polyadenyl-
PPT	Phosphinothricin
P. sat.	*Pisum sativum*
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rif	Rifampicin
RNA	= RNS (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMART	*Simple Modular Architecture Research Tool*
s/w-Bilder	Schwarz-Weiß-Bilder
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TagRFP	ein rot-fluoreszierendes Protein
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer, ein Elektrophoresepuffer
T-DNA	Transfer-*DNA*
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
Tet	Tetracyclin
Ti-Plasmid	Tumor induzierendes Plasmid
TMV	Tabak-Mosaikvirus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
tRNA	transfer *RNA*
U/min	Umdrehung pro Minute
UTR	*untranslated region*
UV	Ultraviolett
var	Untereinheit einer Art (von „*variety*“)
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
wt	Wildtyp
YEB	*Yeast Extract Broth*, Nährmedium für Agrobakterien
YFP	*yellow fluorescent protein,* Derivat des grün fluoreszierendes Protein aus *Aequorea victoria*
z. B.	zum Beispiel

Drei- und Einbuchstabencode der Aminosäuren

Alanin	(Ala)	A	Methionin	(Met)	M
Cystein	(Cys)	C	Asparagin	(Asn)	N
Asparaginsäure	(Asp)	D	Prolin	(Pro)	P
Glutaminsäure	(Glu)	E	Glutamin	(Gln)	Q
Phenylalanin	(Phe)	F	Arginin	(Arg)	R
Glycin	(Gly)	G	Serin	(Ser)	S
Histidin	(His)	H	Threonin	(Thr)	T
Isoleucin	(His)	I	Valin	(Val)	V
Lysin	(Lys)	K	Tryptophan	(Trp)	W
Leucin	(Leu)	L	Tyrosin	(Tyr)	Y
beliebige AS	(Xaa)	X			

Abbildungsverzeichnis

1.1. Einleitung - Myosin, Kinesin & Dynein 3
1.2. Einleitung - Myosine und ihre Funktionen in einer imaginären Zelle 5
1.3. Einleitung - Myosinstammbaum 6
1.4. Einleitung - Übersicht: Myosindomänenanordnung 6
1.5. Einleitung - *Cargo*-Interaktionspartner-Beziehung von Klasse-V-Myosinen . . 7
1.6. Einleitung - Aufbau eines Klasse-V-/XI-Myosin 9

3.1. Ergebnisse - pRT100mod-Varianten 16
3.2. Ergebnisse - Anregungs- und Emissionsspektren verschiedener Fluoreszenzproteine 17
3.3. Ergebnisse - Filtertest 19
3.4. Ergebnisse - Kompartimentmarker 21

4.1. Ergebnisse - Darstellung von Klasse-XI-Myosinen und eYFP-*tail*-Konstrukten 23
4.2. Ergebnisse - Vorhergesagte Domänen XI-J 25
4.3. Ergebnisse - Myosine mit cytosolischer Lokalisation 27
4.4. Ergebnisse - Myosine mit Lokalisation an Vesikeln 28
4.5. Ergebnisse - Lokalisierung von eYFP-XI-I*tail* 30
4.6. Ergebnisse - Lokalisierungen von eYFP-XI-D*tail*1/2 32
4.7. Ergebnisse - Lokalisierung der Myosine in *Pisum sativum* 34
4.8. Ergebnisse - *Co*-Lokalisationsstudien zu eYFP-MyaI*tail* in *A. th.* und *P. sat.* 36
4.9. Ergebnisse - *Co*-Lokalisationsstudien zu eYFP-MyaII*tail* 38
4.10. Ergebnisse - *Co*-Lokalisationsstudien zu eYFP-MyaI*tail* und eYFP-XI-D1*tail* 40
4.11. Ergebnisse - Transgene MyaII*tail*- und XI-B*tail*-*A. th.*-Pflanzen unter dem Mikroskop 43
4.12. Ergebnisse - Mikroskopische Bewegung in MyaII*tail*-*A. th.*-Pflanzen 44
4.13. Ergebnisse - Transgene XI-H*tail*-*A. th.*-Pflanzen unter dem Mikroskop 46
4.14. Ergebnisse - Transgene XI-G*tail*-*A. th.*-Pflanzen unter dem Mikroskop 47
4.15. Ergebnisse - Phänotyp der XI-G*tail*-*A. th.*-Pflanzen nach Anzucht auf Erde . 48
4.16. Ergebnisse - Western-Analyse transgener Myosin-Pflanzen (denaturiert) . . . 51
4.17. Ergebnisse - Western-Analyse transgener Myosin-Pflanzen (nativ) 53

6.1. Diskussion - Mikroskopische Bewegung von MyaII*tail*-markierten Strukturen nach biol. Trafo. 62
6.2. Diskussion - Gewebespezifische Expression der *Arabidopsis thaliana*-Myosine . 68

8.1. MuM - Vakuuminfiltration 86

Tabellenverzeichnis

1.1. Einleitung - In der Literatur beschriebene subzelluläre Lokalisierungen 11

3.1. Ergebnisse - Anregungs- und Emissionsmaxima der verwendeten FP 18

4.1. Ergebnisse - Übereinstimmung der Myosin-*tail*-Konstrukte zur Vorhersage . . 24
4.2. Ergebnisse - Übersicht über die von der Vorhersage abweichenden Myosin-*tail*-Konstrukt-Sequenzen 25
4.3. Ergebnisse - Lokalisationen der *tail*-Konstrukte in *A. th.* und *P. sat.* 35
4.4. Ergebnisse - Ergebnisübersicht der *Co*-Lokalisationsstudien 39
4.5. Ergebnisse - Screening der trangenen Pflanzen 42
4.6. Ergebnisse - Molekulargewichte der AcGFP-Myosin-*tail*-Konstrukte 50

6.1. Diskussion - Sequenzvergleich der verschiedenen Myosin-XI-D-Sequenzen . . . 60
6.2. Diskussion - In der Literatur beschriebene subzelluläre Lokalisierungen 64

7.1. MuM - Bakterienstämme 74
7.2. MuM - Kulturmedien 74
7.3. MuM - Antibiotika 74
7.4. MuM - Enzyme 75
7.5. MuM - Molekularbiologische Kits 75
7.6. MuM - Größenstandards 75
7.7. MuM - Antikörper 75
7.8. MuM - Membranen 76
7.9. MuM - Oligonukleotide 76
7.10. MuM - Vorliegende Vektoren 78
7.11. MuM - Erstellte Vektoren 78
7.12. MuM - Software 81
7.13. MuM - Verwendete Internetseiten 82
7.14. MuM - Mikroskophardware/Settings 82
7.15. MuM - LSM-Konfiguration 82

8.1. MuM - Pflanzenmethoden - AIM 85

Datenanhang

Publikationen

Posterpräsentationen:

- „Characterisation of organelle-myosin complexes in plants.“ Student-organised International Symposium of the DFG Graduate School 1216 on “Intra- and Intercellular Transport and Communication” (Marburg, 25. - 27. September 2008)
- „Characterisation of organelle-myosin complexes in plants.“ LEOPOLDINA – SYMPOSIUM "Molecular genetics of chloroplasts and mitochondria" (Berlin, 21. - 23. September 2009)

Vorträge:

- „Subcellular localisation of class XI myosins of *Arabidopsis thaliana*.“ “7. Mitteldeutsches Pflanzenphysiologie-Treffen”, Halle, 23.- 24. Januar 2009
- „Characterisation of organelle-myosin complexes in plants.“ “Tagung der deutschen Botanischen Gesellschaft“, Leipzig, 6. - 10. September 2009
- „Characterisation of organelle-myosin complexes in plants.“ XIII. Annual Meeting of the German Section of the International Society for Endocytobiology, Berlin, 23. - 25. September 2009

Artikel:

- Rödel D, Schattat M H and Klösgen R B „Subcellular localisation of class XI myosins in *Arabidopsis thaliana*“ (in Vorbereitung)

Danksagung

Nach vielen Tagen, Wochen, Monaten, Jahren des Experimentierens, Mikroskopierens und Schreibens ist endlich diese Arbeit endstanden. Auf den vorangegangen Seiten sind alle wissenschaftlichen Fakten zusammengefasst, doch auf dieser Seite befindet sich das Wichtigste und das wahrscheinlich Meistgelesene:

Es haben mich viele Personen, jede auf ihre Weise, beim Gelingen dieser Arbeit unterstützt

und für all jene steht dieses:

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit „Identifizierung der interagierenden Kompartimente der Klasse–XI–Myosine von *Arabidopsis thaliana*“ erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Daniela Rödel

Halle (Saale), Dezember 2014

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Daniela Rödel
Anschrift:	Fünfte Vereinsstraße 13 06110 Halle (Saale)
Geburtsdatum:	30.10.1982
Geburtsort:	Leipzig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Ausbildung

seit 02/2013	Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Dr. Schattat am Institut für Biologie – Pflanzenphysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2007 - 07/2011 und 09/2012 - 12/2012	Wissenschaftliche Mitarbeiterin /Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Prof. Klösgen am Institut für Biologie – Pflanzenphysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg - bearbeitetes Thema: "Subzelluläre Lokalisierung der Klasse-XI-Myosine von *Arabidopsis thaliana*"
11/2006 - 08/2007	Diplomarbeit "Subzelluläre Lokalisierung der Myosin-XI-Proteine von *Arabidopsis thaliana*"
10/2002 – 09/2007	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg - Abschluss: Diplom-Biochemiker
08/1995 – 06/2002	Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium in Merseburg Abschluss: Abitur
08/1993 – 06/1995	Robert-Schumann-Gymnasium in Leipzig
09/1989 – 07/1993	Grundschule in Leipzig OT Rückmarsdorf

Halle (Saale), Dezember 2014 Daniela Rödel