

**Gewebsspezifische Expression von Mitogen-aktivierten
Proteinkinasen und Signalübertragung an das Mikrotubuli-
Zytoskelett in *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

zur

Erlangung der Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Martina Beck

aus

Neuwied

Bonn 2009

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrichs-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: PD Dr. Jozef Samaj
2. Referent: Prof. Dr. Diedrik Menzel

Tag der Promotion: --.--. 2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Erscheinungsjahr: 2010

1. Einleitung	1
1.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	1
1.2 MAPK in <i>A. thaliana</i>	3
1.3 Kontrolle der Zellform und Zellteilung durch Mikrotubuli	5
1.4 Mikrotubuli assoziierendes Protein (MAP) 65	8
1.5 MAPK und Zytoskelett	11
1.6 MAP3K Mutante: <i>anp2xanp3</i>	13
1.7 Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Pflanzen Material und Phänotyp Analyse	16
2.2 Herstellung der GFP Fusionskonstrukte und der transgenen Pflanzen	16
2.3 Transiente Expression	17
2.3.1 Partikelbeschuß.....	17
2.3.2 Agrobakterieninfiltration.....	18
2.4 Herstellung der Promotor GUS Konstrukte	18
2.5 GUS Färbung	19
2.6 Antikörper und Reagenzien	19
2.7 “Whole-mount” Immunmarkierung	20
2.8 in vivo Mikroskopie von Mikrotubuli	22
2.9 RNA Extraktion und RT-PCR	22
2.10 Proteinisolation und Immunoblot	23
3. Ergebnisse	24
3.1 Expressionsanalysen von MAPK in pflanzlichen Organen und Geweben	24
3.1.1 Organspezifische Expressionsanalyse von MAPK.....	24
3.1.2 Gewebsspezifische Expressionsanalyse von MAPK anhand stabiler Promotor-GUS Linien.....	25
3.1.2.1 Analyse der <i>Prom_{MPK3}::GUS</i> Linie.....	26
3.1.2.2 Analyse der <i>Prom_{MPK4}::GUS</i> Linie.....	27
3.1.2.3 Analyse der <i>Prom_{MPK6}::GUS</i> Linie.....	29
3.1.3 RT-PCR Analyse von MAPK nach abiotischem Streß.....	31
3.2 Morphologische Analyse von <i>anp2xanp3</i> und <i>mpk4</i>	32
3.2.1 Analyse des Wurzelwachstums und des Wurzelhaar Phänotyps von <i>anp2xanp3</i> und <i>mpk4</i> Mutanten.....	33
3.3 Zytologische Analysen von <i>anp2xanp3</i> und <i>mpk4</i>	37
3.3.1 Immunmarkierung von MT in <i>anp2xanp3</i> und <i>mpk4</i>	37
3.3.2 MT in transgenen <i>GFP-MBD-anp2xanp3</i> und <i>GFP-MBD-mpk4</i> Linien.....	39
3.3.3 <i>in vivo</i> Lokalisierung von MAP65-1.....	43
3.3.4 Immunmarkierung von MAP65-1 in <i>anp2xanp3</i> und <i>mpk4</i>	44
3.4 Organisation des Zytoskeletts während des Zell Zyklus	45
3.4.1 MT-Markierung in meristematischen Zellen der Wurzel.....	46
3.4.2 Zytokinetische Defekte in <i>anp2xanp3</i> und <i>mpk4</i>	47
3.4.3 Lokalisierung von MAP65-1 an PPB und Phragmoplast.....	51
3.4.4 Immunmarkierung von MAPK in meristematischen Zellen.....	53
3.4.5 Beteiligung von endozytotischen Vesikeln und Aktin an der Bildung der Zellplatte.....	55
3.4.6 Verteilung von MT und Aktinfilamenten in der Streckungszone und Spitze der Wurzel von <i>A. thaliana</i>	57

3.5 in vivo Lokalisierung von MAPK in pflanzlichen Zellen	63
4. Diskussion	70
4.1 Gewebsspezifische Expression von MPK3, MPK4 und MPK6.....	70
4.2 Phänotypische Ähnlichkeiten zwischen anp2xanp3- und mpk4-Mutanten ist bedingt durch Defekte des kortikalen MT Zytoskletts	74
4.3 Zytokinetische Defekte in anp2xanp3- und mpk4-Mutanten	77
4.4 Darstellung von MT und Aktin in anp2xanp3 und mpk4	79
4.5 Intrazelluläre Lokalisierung von MAPK durch GFP-Reporter	83
5. Zusammenfassung	87
6. Literaturverzeichnis	89
7. Anhang	100
7.1 Primer und PCR-Programme	100
7.1.1 Tabelle der MAPK Gene aus <i>A. thaliana</i>	100
7.1.2 Tabelle der verwendeten Primer	100
7.1.3 PCR-Programm der One Step RT-PCR.....	101
7.1.4 PCR Programm zur Amplifikation der cDNA.....	101
7.1.5 PCR Programm zur Amplifikation der Promotoren	101
7.2 Lösungen und Puffer	102
7.2.1 Kulturmedien und Sterilisationslösungen	102
7.2.2 Lösungen für molekularbiologisches Arbeiten	103
7.2.3 Lösungen für Immunmarkierung	104
7.2.4 Lösungen für Proteinextraktion und Immunoblot.....	105
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	107
Abkürzungsverzeichnis	110
Publikationen	112
Lebenslauf	<i>Fehler! Textmarke nicht definiert.</i>

1. Einleitung

Als sessile Organismen sind Pflanzen nicht in der Lage vor veränderten Umwelteinflüssen zu fliehen. Sie müssen sich durch Modifikationen ihrer Stoffwechselaktivitäten und durch Feinabstimmungen ihrer Wachstumsreaktionen und Aktivierung von Abwehrmechanismen möglichst schnell auf neue Umweltreize einstellen, um auch bei ungünstigen Bedingungen an ihrem Standort überleben zu können. Daher mussten sie Mechanismen entwickeln, um Stressfaktoren frühzeitig zu erkennen und möglichst schnell ihre Physiologie, Wachstum und Entwicklung auf diese neuen Bedingungen anzupassen. Die Anpassung benötigt eine schnelle und dynamische Regulation von enzymatischen Aktivitäten und die Modifizierung der Gen-Expression. Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen ist eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen in allen Organismen und wird für die intrazelluläre Steuerung und Regulierung von Proteinaktivitäten genutzt. Diese Proteinphosphorylierungen werden von Kinasen ausgeführt, die zumeist in Signalkaskaden angeordnet sind. Nach Schätzungen werden etwa 30 % aller Proteine in einer eukaryotischen Zelle phosphoryliert. Im Pflanzengenom kodieren ca. 5 % der Gene für Kinasen (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Von diesen pflanzlichen Kinasen sind ungefähr 10 % an Mitogen-aktivierten Proteinkinase Kaskaden beteiligt.

1.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

MAPK Kaskaden sind Proteinkomplexe, die eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung und Signalmodulation spielen. Sie ermöglichen es, extrazelluläre Reize (Signale) in intrazelluläre Antworten zu übersetzen. Eine MAPK Kaskade besteht in der Regel aus drei Komponenten, der MAPK-Kinase-Kinase (MAP3K), der MAPK-Kinase (MAP2K) und der MAPK (Abb. 1.1). Da alle drei Komponenten Proteinkinasen sind, besteht die Weiterleitung des Signals in einer geregelten Abfolge von Proteinphosphorylierungen. Dabei steht die MAP3K am Anfang der Kaskade und sie aktiviert eine MAP2K durch Phosphorylierung des S/T-X₃₋₅S/T Motiv, welche dann eine MAPK an Threonine und Tyrosin im T-X-Y Motiv phosphoryliert. Die MAPK am Ende der Kaskade vermittelt das Ausgangssignal, indem sie ihrerseits die verschiedensten Zielsubstrate phosphorylieren kann (Abb. 1.1). Eine MAPK-Kaskade ist oftmals in Form von strukturellen Modulen organisiert, die mit Hilfe von so genannten Gerüst („Scaffold“) Proteinen zusammengehalten werden. In Pflanzen ist jedoch

bisher nur eine MAP3K bekannt, der eine Funktion als „scaffold“ Protein zugeschrieben werden konnte (Nakagami et al. 2004).

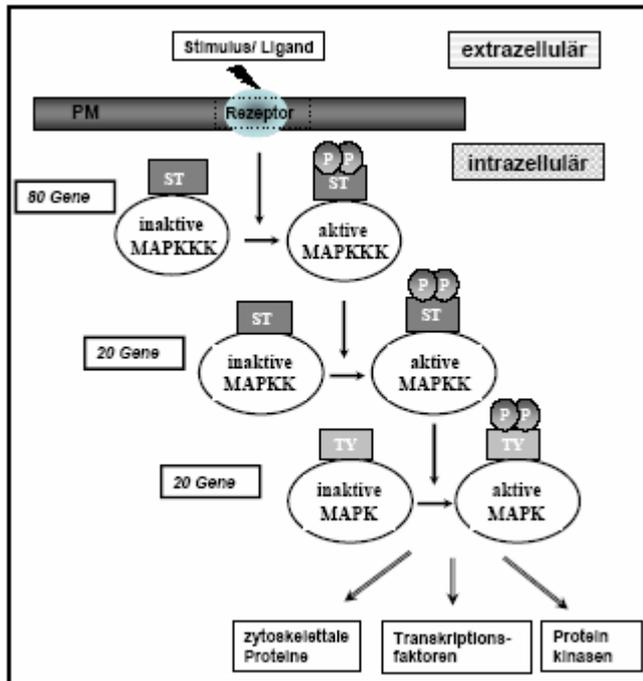


Abbildung 1.1: Aufbau eines typischen MAPK Moduls in *A. thaliana*

Ein Rezeptor erhält ein extrazelluläres Signal und überträgt dieses zu einer MAPKKK, welches zu deren Phosphorylierung und Aktivierung führt. Eine folgende Phosphorylierungskaskade über MAPKK und MAPK endet in der Phosphorylierung spezifischer Zielproteine. In *A. thaliana* konnten bisher 80 MAPKKK Gene, 20 MAPKK Gene und 20 MAPK Gene identifiziert werden. PM= Plasmamembran; S=Serin; T= Threonin; Y= Tyrosin; P= Phosphat

Tierische MAPK werden in mindestens drei Hauptgruppen eingeteilt, nämlich den extrazellulär-Signal regulierten Kinasen (ERK), den p38 MAP Kinasen und den c-Jun N-terminal Kinasen (JNK) (Junttila et al. 2008). Phylogenetisch werden alle pflanzlichen MAPK der tierischen pERK Gruppe zugeordnet (MAPK Group 2002, Hamel et al. 2006). Bezeichnend für Pflanzen ist die besonders hohe Anzahl von Genen, die für die verschiedenen MAPK-Kaskade Komponenten kodieren. Allein im Genom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* konnten mindestens 20 potentielle MAPK identifiziert werden (MAPK Group, 2002), wohingegen in Säugern nur 13 MAPK und in Hefe bisher nur 6 MAPK Gene dieser Familie zugeordnet werden konnten (Hirt 2000). Man vermutet, dass der Grund hierfür in der Tatsache liegt, dass Pflanzen mit ihrer sessilen Lebensweise Signale aus der Umwelt nicht durch neuromuskulär gesteuertes Verhalten beantworten können. Zu den Zielsubstraten der MAPK gehören u.a. nukleäre Transkriptionsfaktoren, zytoskelettale Proteine oder andere Proteinkinasen. Jedoch sind immer noch viele Zielsubstrate unbekannt, da die Substratspezifität eines MAPK Moduls von seiner Zusammensetzung aus den Einzelkomponenten inklusive der Scaffold-Proteine abhängt, und sich dadurch viele Kombinationsmöglichkeiten ergeben. Alleine für zwei MAPK aus *Arabidopsis thaliana* (MPK3 und MPK6) konnten bisher mehr als 87 potentielle Substrate identifiziert werden

(Feilner et al. 2005). Neue Microarray-Analysen identifizierten sogar über 570 mögliche Substrate für 10 der bekannten 20 MAPK (Popescu et al. 2009). Dabei wird bei diesen Studien auch immer wieder auf eine überlappende Teilmenge von Substraten hingewiesen, die von mehreren Kinasen phosphoryliert werden können (Feilner et al. 2005; Popescu et al. 2009). Neben der Aktivierung des Moduls durch äußere Reize, wird die Aktivität des gesamten Moduls durch Scaffold Proteine und Phosphatasen in ihrer Fähigkeit Signale weiter zu geben gesteuert und reguliert. So können die Module durch Scaffold Proteine an subzellulären Domänen/Membranen gebunden werden, und durch Umsteuerung zu anderen Membrankompartimenten wechseln. Die mit den MAPK Modulen assoziierten Phosphatasen dienen zur Deaktivierung der MAPK und können somit die Signalweitergabe beenden.

1.2 MAPK in *A. thaliana*

In höheren Pflanzen zählen MAPK zu einer der am besten charakterisierten Familie von Signalproteinen (Hirt 2000). Besonders hervorzuheben sind drei MAPK, MPK3, MPK4 und MPK6, sie zählen zu den am meist untersuchten MAPK in *Arabidopsis thaliana*. Jedes dieser Proteine scheint an mehreren stressinduzierten Signalwegen beteiligt zu sein (Abb. 1.2), und gleichzeitig kommt es zu einer signifikanten funktionellen Redundanz zwischen diesen drei MAPK

<u>Aktivierung durch</u>	
MPK3	H ₂ O ₂ , O ₃ , ABA, Ethylen, Osmotischer Stress, PAMPs
MPK4	H ₂ O ₂ , O ₃ , Osmotischer Stress, Kälte, Salz, PAMPs,
MPK6	H ₂ O ₂ , O ₃ , Ethylen, Osmotischer Stress, Jasmonatsäure, PAMPs

Abbildung 1.2: Aktivierung von MPK3, MPK4 und MPK6 durch abiotische und biotische Stimuli

Mehrere MAPK können durch dieselben Stresse aktiviert werden. (PAMP-pathogen-associated-molecular pattern) Modifiziert nach Colcombet und Hirt, 2008

Biochemische und genetische Analysen wurden bisher für jede dieser MAPK angefertigt und diese machen klar, dass die Signalweitergabe von MPK3, MPK4 und MPK6 hoch komplex ist (Mishra et al. 2006). Die biochemischen Studien verweisen darauf, dass unterschiedliche Stressbehandlungen zur Aktivierung von verschiedenen Kombinationen der drei MAPK Isoformen führen. Werden beispielsweise Pflanzen dem Sauerstoffradkalbildner, H₂O₂ ausgesetzt oder empfangen ein PAMP (Pathogen-associated molecular Pattern), dann

reagieren sie darauf durch schnelle Aktivierung der MPK3-, MPK4- und MPK6-Kinaseaktivität (Ichimura et al. 2006, Nakagami et al. 2006, Suarez-Rodriguez et al. 2007). Die Aktivierung von MPK4 durch diese Signale ist abhängig von der „upstream Kinase“ (MAPKKK) MEKK1, währenddessen die Aktivierung von MPK3 und MPK6 nur im PAMP induzierten Signalweg auch über MEKK1 Aktivierung erfolgt, derweil der H₂O₂-induzierte Signalweg unabhängig von MEKK1 erfolgt (Ichimura et al. 2006, Nakagami et al. 2006, Suarez Rodriguez et al. 2007). Diese Ergebnisse zeigen, dass bestimmte Stimuli zwar zur Aktivierung aller drei MAPK führen können, dies aber über mindestens zwei unterschiedliche Wege erfolgen kann (Abb. 1.3).

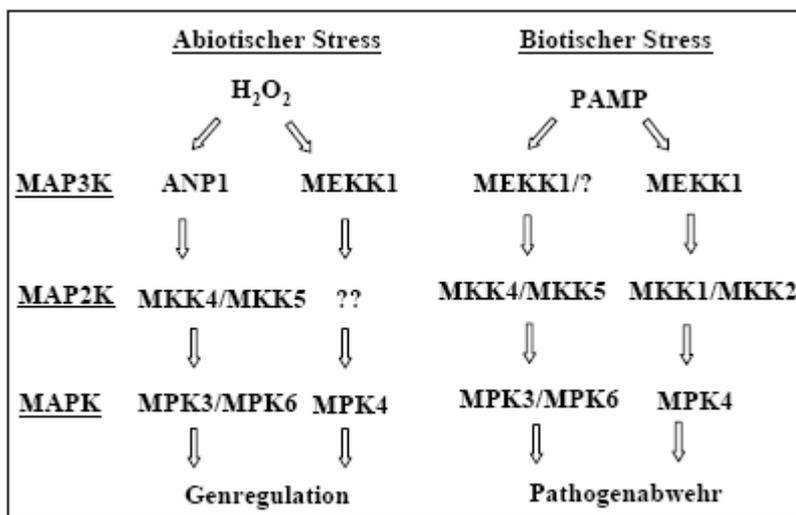


Abbildung 1.3: Darstellung von MAPK Modulen in *A.thaliana*

Induzierter Stress durch H₂O₂ führt zur Aktivierung von zwei getrennten Signalwegen und endet in der Aktivierung unterschiedlicher MAPK. Biotischer Stress durch PAMP aktiviert dieselben MAP3K, diese dann aber unterschiedliche MAP2K und MAPK phophorylieren. Modifiziert nach Colcombet und Hirt, 2008

Genetische Studien an Mutanten und RNAi Linien vervollständigen die vielschichtige Beteiligung der MAPK an entwicklungsabhängigen und pathogenabwehrenden Prozessen auf. So werden die *mpk4* null Mutanten phänotypisch durch einen Zwergenphänotyp, gekennzeichnet, bedingt durch die konstitutive Aktivierung des SAR Signalweges (Systemische erlangte Resistenz) (Petersen et al. 2000, Brodersen et al. 2006). In den Mutanten konnte ein erhöhter Salicylsäurespiegel festgestellt werden, dies führt zur konstituiven Expression von PR-(pathogen related) Genen, die normalerweise in der Pathogenabwehr erst durch Salicylsäure induziert werden. Somit gilt MPK4 als ein negativer Regulator der Salicylsäure-vermittelten Pathogenabwehr. Von Salicylsäure unabhängig kann Pathogenabwehr in Pflanzen durch Jasmonsäure und Ethylen ausgelöst werden (Pieterse und

van Loon, 1999). Dabei zeigt sich, dass MPK4 für die Expression von Jasmonsäure induzierten Abwehrgenen erforderlich ist, und deshalb gilt diese MAP-Kinase als wichtiger Regulator für die pflanzliche Pathogenabwehr (Petersen et al. 2000, Brodersen et al. 2006). Im Gegensatz dazu, sind abiotische Stressantworten, hervorgerufen durch erhöhte Salinität oder erhöhte Temperatur, in der Mutante nicht beeinträchtigt. Einzelmutanten von MPK3 und MPK6 weisen keinen offensichtlichen Phänotypen auf, was auf eine funktionale Redundanz zwischen diesen beiden MAPK hinweist. Der Versuch der Herstellung von Doppelmutante scheiterte daran, dass sie sich als letal erwiesen (Wang et al. 2007). Durch den Einsatz von Dexamethason-induzierte Promotoren konnten jedoch Doppelmutanten hergestellt werden, die zu späteren Entwicklungszeitpunkten phänotypische Auffälligkeiten aufwiesen. Dabei zeigte sich, dass MPK3 und MPK6 an der Regulierung des Stomatamusters beteiligt sind (Wang et al. 2007). Der Verlust von MPK3/MPK6 Aktivität führt zur Bildung von Stomata-Klustern, währenddessen die Überaktivität der beiden MAPK zum gänzlichen Verlust von Stomata führt. Interessanterweise weisen MKK4/5 RNAi Linien den gleiche Stomata Phänotyp auf und lassen vermuten, dass sie als MAP2K „upstream“ von MPK3/MPK6 funktionieren. Als beteiligte MAP3K in dieser Kaskade konnte Yoda identifiziert werden (Bergmann et al. 2004). Zusätzlich zur Stomataentwicklung im jungen Blatt ist MPK6 in die Bildung von Infloreszenz, Antheren und Embryoentwicklung involviert (Bush und Krysan, 2007). MPK3, MPK4 und MPK6 können also nicht nur abiotischen und biotischen Stressantworten zugeordnet werden, sondern sind auch essentiell an der Signalgebung im Rahmen von Entwicklungsprozessen beteiligt. Zur Zeit stellt sich jedoch die Frage, warum für MPK3, MPK4, MPK6 eine Beteiligung an so vielen Prozessen der Signalverarbeitung nachweisbar ist und welche Funktionen dann die 17 weiteren MAPK, die im Genom von Arabidopsis vorhanden sind, innehaben. Viele der Studien, die auf *in vitro* Kinase Versuchen beruhen, müssen nicht bedingt die *in vivo* Bedingungen und Abläufe wiedergeben. Daher sollten viele der Ergebnisse kritisch betrachtet werden, um zu einem differenzierten Bild der Signalgebung in Pflanzen zu gelangen.

1.3 Kontrolle der Zellform und Zellteilung durch Mikrotubuli

In Pflanzen wurden Mikrotubuli (MT) zum ersten Mal 1963 im kortikalen Zytoplasma durch Ledbetter und Porter beschrieben. Mittlerweile weiß man, dass sie für viele zelluläre Prozesse während des Zellwachstums und der Entwicklung unabdingbar sind (Lloyd, 1994; Cyr, 1994;

Cyr und Palevitz, 1995; Nick, 2007). MT sind hoch dynamische Polymere, aufgebaut aus α - und β -Tubulin-Heterodimeren, welche einem ständigen Wechsel zwischen Polymerisation und Depolymerisation unterliegen. Dieses wird als dynamische Instabilität beschrieben, ein Prozess, der sich *in vitro* simulieren läßt (Amos und Schlieper, 2005; Ehrhardt und Shaw, 2006; Sedbrook und Kaloriti, 2008). Manche MT entspringen von weit auseinander liegenden MT-Bildungsstellen (MTOCs) (Chan et al. 2003), die aus einem Ring von γ Tubulin und einem α/β -Tubulin Polymerisationskeim bestehen und aus denen der Mikrotubulus polymerisiert (Binarova et al. 2006; Pastuglia et al. 2006). Das Ausschalten der beiden γ Tubulin Gene in Arabidopsis führt zu einer Verminderung der kortikalen MT und zu starken anisotropen Wachstumsdefekten, die sich in radialer Expansion der Zellen manifestierten (Binarova et al. 2006; Pastuglia et al. 2006). Während der Interphase liegen MT im kortikalen Bereich meist quer zur Wachstumsrichtung vor, nach Abschluss der Zellstreckung richten sie sich longitudinal aus oder bilden ein ungeordnetes Netzwerk (Cyr 1994, Williamson et al. 1996;). Pharmakologische und genetische Studien belegen, dass die kortikalen MT eine zentrale Rolle spielen beim anisotropen Wachstum von pflanzlichen Zellen. Die Verwendung von Mikrotubuli depolymerisierenden bzw. Polymer-stabilisierenden Drogen führt zur Veränderung der Zellform, beispielsweise zu stark angeschwollenen Zellen oder mehrfach verzweigten Wurzelhaaren (Anthony and Hussey, 1999; Bibikova et al. 1999; Furutani et al. 2000; Hashimoto, 2002). In Zellen, die in die Mitose und nachfolgende Zytokinese eingehen, übernehmen MT eine wichtige Rolle bei der Festlegung der Zellteilungsebene, sowie der räumlichen Separierung der Chromosomen und anschließenden Zellplattenbildung. Dafür besitzen Pflanzen zwei besondere MT-Strukturen, die bei Pilzen und Tieren nicht zu finden sind. Dazu zählt das Prä-Prophase-Band (PPB), welches die Zellteilungsebene festlegt und der zytokinetische Phragmoplast, der die Zellplatte herstellt und so die Zytokinese ermöglicht. In sich teilenden Zellen beginnt die Mitose mit der Bildung des PPB, einem dichten kortikalen Ring aus MT, der sich um den meist mittig liegenden Zellkern ausbildet (Guning und Wick, 1985) (Abb. 1.4). Das PPB scheint verantwortlich zu sein für die Festlegung der Zellteilungsachse und die spätere Ausrichtung der Zellplatte, wird jedoch in der beginnenden Mitose bereits wieder abgebaut (Jürgens et al. 2005). Die MT bilden dann die mitotische Spindel, welche für die Separation der Chromatiden verantwortlich ist (Abb. 1.4). Nachfolgend entsteht der Phragmoplast aus den Resten der Kernspindel, der für die Koordinierung der Zellwandbildung zwischen den Tochter-Zellkernen verantwortlich ist (Jürgens et al. 2005). Dieser formt sich am Ende der Telophase aus zwei Stapeln anti-paralleler MT. Die Mittelzone wird als freier Raum gekennzeichnet, in denen sich jedoch die plus Enden der

gegenüberliegenden MT Stapel überlappen. Der Phragmoplast wächst von der Mitte ausgehend zu den seitlichen Zellwänden und steuert somit die gerichtete Fusionierung der Zellplatte mit den Mutterzellwänden (Abb. 1.4). Die Tochterwand-Bildung erfolgt mit Hilfe von Vesikeln, die Polysaccharid-Material zur Mittelebene liefern. Dabei handelt es sich möglicherweise um sekretorische post-Golgi-Vesikel, oder um rezyklierende endozytotische Vesikeln, die zum Aufbau der Zellplatte beitragen (Dhonukshe et al. 2006, Dhonukshe et al. 2007). Die Vesikel fusionieren zu einer callosehaltigen Zellplatte, die die Grundlage der späteren Zellwand bildet. Die zielgerichtete Vesikelbewegung, die nötig ist, um die Zellplatte aufzubauen, wird durch den Phragmoplasten ermöglicht. Die Position der neuen Zellwand korrespondiert mit der Position des PPBs zu Beginn der Mitose (Jürgens et al. 2005). Welche Proteine an der Festlegung der Zellteilungsebene beteiligt sind, ist noch nicht völlig bekannt. Bisher konnte in Arabidopsis für die sogenannte TAN-Protein im Zusammenspiel mit Kinesin-Isoformen (POK) eine Beteiligung an der Positionierung der Zellplatte nachgewiesen werden (Müller et al. 2009). Nach erfolgreicher Expansion des Phragmoplasten und nachfolgender Fusion der Zellplatte mit der parentalen Plasmamembran verschwinden die Phragmoplasten-MT und es bildet sich wieder das für Interphasezellen typische, kortikale MT-Netzwerk aus. Eine wichtige Rolle im Rahmen der Zellteilung wird auch dem Aktinzytoskelett zugeschrieben. Dies lässt sich z.B. durch Inhibitor Behandlungen zeigen, die zu morphologisch veränderten Zellen führen. Dabei kommt es jedoch nicht zu einem Stop der Zellplattenexpansion, sondern zu einer Entartung oder sogar zum Abbruch der Zytokinese, weil die sich wellenförmig verändernde Zellplatte den Anschluß an die parentale Plasmamembran nicht findet (Baluška et al. 2001; Cleary, 2001, Hoshino et al. 2003; Sano et al. 2005). Aktinfilamente können im PPB und am Phragmoplasten lokalisiert werden und es wird angenommen, dass sie dort an der Formation und Organisation dieser Strukturen beteiligt sind. Nach dem Abbau des PPBs erscheint eine "Aktin depleted zone" (ADZ), die durch fehlende Aktinmarkierung auffällt, genau in dem zuvor eingenommenen Bereich vom PPB (Müller et al. 2009).

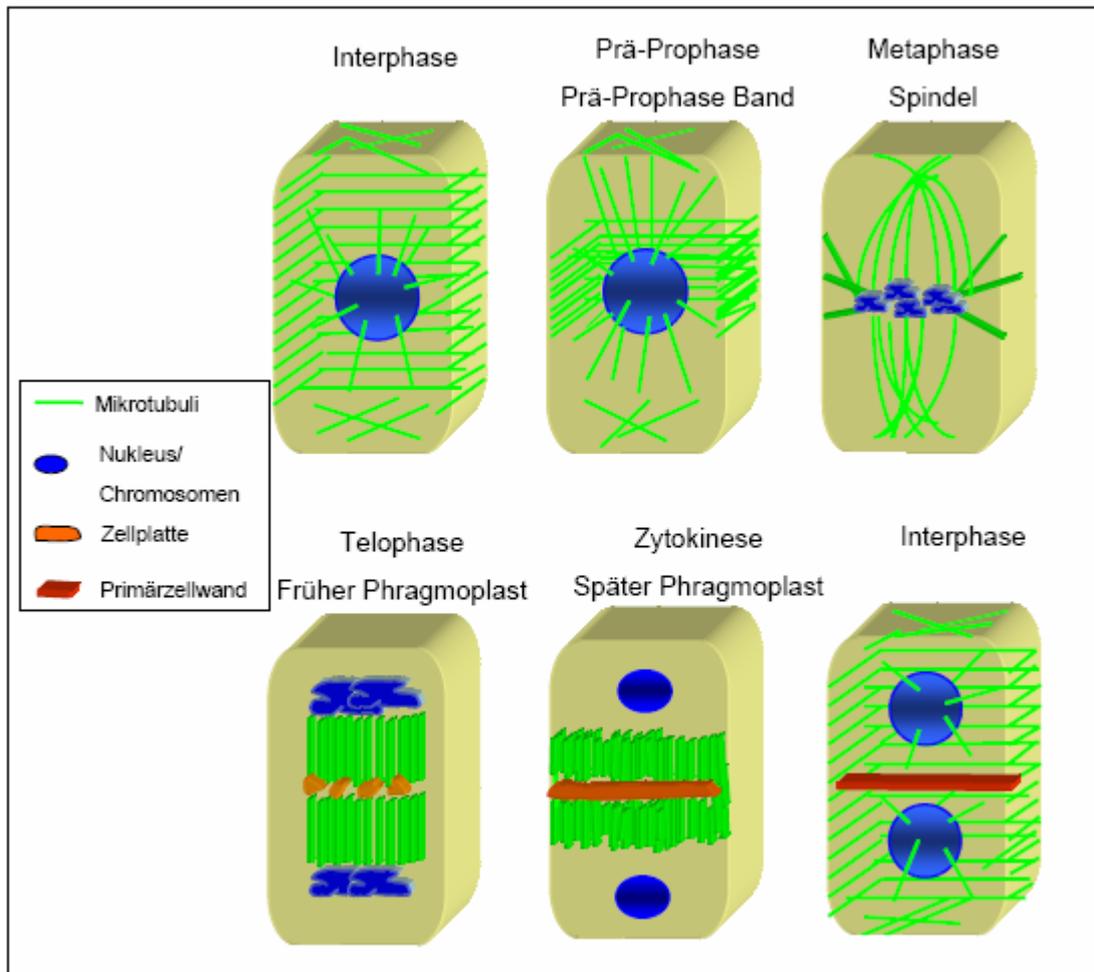


Abbildung 1.4: Modell der MT Organisation während Mitose und Zytokinese in Pflanzenzellen

In der Interphase liegen MT transversal zur Wachstumsrichtung im Kortex der Zelle vor. Während der Prä-Prophase bildet sich im Kortex das PPB aus gebündelten MT ringförmig um den Nukleus. Die Chromatidentrennung erfolgt in der Metaphase durch die mitotische Spindel. Während der Anaphase werden die Chromatiden zu den entgegengesetzten Zellpolen gezogen (nicht dargestellt). Der Phragmoplast entsteht im Anschluß an die Telophase aus zwei gegenüberliegenden Stapeln dicht gepackter MT und bildet in der freien Mittelzone die junge Zellplatte aus, die dann später die Primärwand bildet und für die korrekte Trennung der neu gebildeten Tochterzellen verantwortlich ist. Nach erfolgter Zytokinese löst sich der Phragmoplast auf und das kortikale MT-Netzwerk der Interphasenzellen entsteht wieder.

1.4 Mikrotubuli assoziierendes Protein (MAP) 65

Im Kontext des Zellwachstums und der Zellentwicklung ist das dynamische Verhalten von MT von besonderer Bedeutung. Dafür muss es Mechanismen geben, die die MT-Organisation und ihre Dynamik über Raum und Zeit kontrollieren. Diese Funktionen werden ermöglicht durch MT-assoziierte Proteine (MAP) und weiteren regulatorischen Proteine, die

zum einen die Affinität von MAPs zur MT-Oberfläche modulieren, zum anderen durch Austausch von Tubulin Untereinheiten in die dynamische Organisation von MT-Populationen eingreifen (Sedbrook, 2004; Sedbrook und Kaloriti, 2008). Eine der am besten charakterisierten MAP-Familien in Pflanzen ist die MAP65-Familie. Das Mikrotubuli-assoziierte Protein MAP65 konnte erstmals 1993 biochemisch aus Tabakgewebekulturen isoliert und analysiert werden (Chang-Lie und Sonobe, 1993). Der Name basiert auf dem geschätzten Molekulargewicht nach den ersten Analysen dieser Proteinfamilie aus *Nicotiana tabacum* (Chang-Lie und Sonobe, 1993) und *Daucus carota* Zellkulturen (Chan et al. 1999). Die weiteren Charakterisierungen, die anhand der cDNA und Proteinstruktur erfolgten (Smertenko et al. 2000, 2004; Hussey et al. 2002), identifizierten es als ein funktionales Mitglied einer divergenten Proteinfamilie, zu der Ase1p aus *Saccharomyces cerevisiae* (Pellman et al. 1995) und PRC1 aus *Homo sapiens* gehören (Jiang et al. 1998). Im tierischen und auch pilzlichen Genom findet man nur ein bis zwei Homologe der MAP65 Familie, dabei konnten bisher 9 Gene im Arabidopsis Genom identifiziert und zur Familie der MAP65 Proteine zugeordnet werden (Hussey et al. 2002). Ihre vorhergesagte molekulare Masse variiert zwischen 54-80 kDa. Die Sequenzähnlichkeit innerhalb ihrer Aminosäurestruktur beträgt zwischen 25-78 %, und diese Diversität spiegelt sich in unterschiedlichen Aktivitäten und biochemischen Eigenschaften wider. Jedoch werden allen Isoformen in Pflanzen MT-bündelnde und MT-polymerisierende Eigenschaften zugesprochen. MAP65 aus *Daucus carota* und MAP65-1 aus *A. thaliana* bündeln MT mit 25 nm Abstand (Chan et al. 1999; Smertenko et al. 2004). Der strukturelle Aufbau, der am besten untersuchten Isoform in Arabidopsis, MAP65-1, zeigt, dass zwei MT-bindende Domänen in der C-terminalen Hälfte des Proteins vorkommen (Smertenko et al. 2004). Die Sequenz der einen Domäne ist hoch konserviert bei allen Mitgliedern der Ase1p/PRC1/MAP65 Familie (Schuyler et al. 2003), währenddessen die zweite Domäne am Ende des C-Terminus nicht konserviert ist. Diese Region ist gekennzeichnet durch ein „coiled coil“-Motiv und einigen Phosphorylierungsstellen für unterschiedliche Kinasen. Der Nachweis der Phosphorylierbarkeit konnte für Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) erbracht werden (Sasabe et al. 2006; Smertenko et al. 2006). Durch die Phosphorylierung dieser Domäne bei MAP65-1 kommt es zur Schwächung der Bindung zu MT (Smertenko et al. 2004) (Abb. 1.5). Jedoch können beide Domänen im C-Terminus unabhängig voneinander an MT binden. Um MT erfolgreich zu bündeln, wird aber eine Dimerisierung erforderlich, die durch Domänen in der N-terminalen Hälfte des Proteins erfolgen (Smertenko et al. 2004).

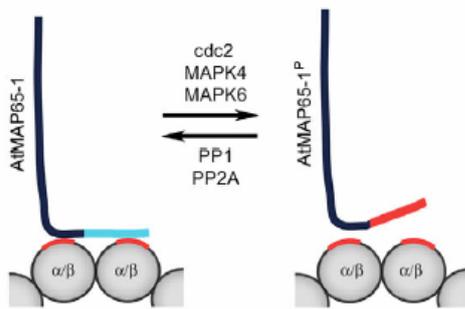


Abbildung 1.5: Schema der Interaktion zwischen AtMAP65-1 und der Mikrotubulus-Oberfläche. In dem Modell sind zwei MT-Interaktionsdomänen für die Bindung nötig, aber nur die C-terminale Domäne (blau) wird durch die Phosphorylierung so verändert, dass die Bindung an die MT-Oberfläche geschwächt wird (rot). (nach Smertenko et al. 2006)

Immunmarkierungen mit spezifischen Antikörpern gegen die verschiedenen MAP65 Isoformen von *A. thaliana*, sowie *in vivo* Lokalisierungen mit GFP Fusionsproteinen verweisen auf die unterschiedlichen Bindungsorte von MAP65 Proteinen an mikrotubulären Strukturen innerhalb der Zellen und während des Zellzyklus (Van Damme et al. 2004, Smertenko et al. 2008, Li et al. 2009) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Intrazelluläre Lokalisierung von MAP65 Isoformen aus *A. thaliana* in pflanzlichen Zellen (zusammengestellt aus Van Damme et al. 2004, Smertenko et al. 2008, Li et al. 2009)

MAP65 Isoform	Interphase	Mitose	Zytokinese
AtMAP65-1	kortikale MT	PPB und Spindel	Mittelzone des Phragmoplasten
AtMAP65-2	kortikale MT	PPB und Spindel	Phragmoplast
AtMAP65-3	kortikale und endoplasmatische MT	PPB	Mittelzone des Phragmoplasten und reifende Zellplatte
AtMAP65-4	endoplasmatische MT	Spindelpole während der Metaphase	
AtMAP65-5	kortikale MT		früher Phragmoplast und neu synthetisierte Zellplatte
AtMAP65-6	Mitochondrien		
AtMAP65-7	<i>nicht bekannt</i>	<i>nicht bekannt</i>	<i>nicht bekannt</i>
AtMAP65-8	kortikale MT	Spindelpole während der Metaphase	äußere Bereiche des Phragmoplasten
AtMAP65-9	<i>nicht bekannt</i>	<i>nicht bekannt</i>	<i>nicht bekannt</i>

Die unterschiedlichen Lokalisierungen lassen auf spezifische Funktionen dieser Isoformen während des Zellwachstums und Zellteilung schließen, jedoch konnte dies bisher noch nicht für alle Isoformen aufgeklärt werden. Phänotypische Veränderungen in der *pleiade*-Mutante von *A. thaliana*, die das MAP65-3 Gen betreffen, belegen einen direkten, funktionalen Zusammenhang zwischen dieser MAP65-Isoform und der Zytokinese (Müller et al. 2002, 2004). Offensichtlich führt das Fehlen dieser MAP65-3 Isoform zu abnormalen Phragmoplasten gefolgt von fehlerhafter Zytokinese, was eine Häufung von multinukleären Zellen nach sich zieht und schließlich zu einer abnormalen Wurzelentwicklung führt (Müller et al. 2004, Smertenko et al. 2004).

1.5 MAPK und Zytoskelett

Bisher liegen nur wenige Informationen über die mögliche Beteiligung von MAPK an der Zytoskelett Organisation in Pflanzen vor. Allerdings ist in Tabak eine vollständige MAPK Kaskade beschrieben worden, die an der zytoskelettalen Organisation beteiligt ist. Dieser Signalweg ist elementar für die Zytokinese in Tabak (Ishikawa et al. 2002, Nishihama et al. 2002, Tanaka et al. 2004). Er startet mit **NPK1** (MAP3K) (Nishihama et al. 2001; Nishihama und Machida, 2000, 2001; Soyano et al. 2002; Takahashi et al. 2004), diese aktiviert **NQK1** (MAP2K), welche ihrerseits für die Phosphorylierung von **NRK1** (MAPK) verantwortlich ist (Takahashi et al. 2004). Diese Kaskade wird auch als **NACK-PQR** Signalweg beschrieben, wobei NACK für die zwei beteiligten Kinesine NACK1 und NACK2 steht. Die Einzelkomponenten des Signalweges konnten jeweils am Phragmoplasten lokalisiert werden. Die Expression einer Kinase-negativen Variante von NPK1 führt zur Bildung von multinukleären Zellen und fehlerhafter Zytokinese (Soyano et al. 2002). Bisher wurde gezeigt, dass neben den NACK-Kinesinen zwei mögliche Zielproteine der MAPK-Kaskade, nämlich die Tabak MAP65-1 a und 1b Isoformen, an den MT dynamischen Prozessen während der Phragmoplastenexpansion beteiligt sind. Mittlerweile konnten die zu diesem Signalweg homologen MAPK-Elemente auch in Arabidopsis identifiziert und zugeordnet werden (Abb. 1.6). ANP (Arabidopsis-related NPK1 Protein) entspricht NPK1 (Krysan et al. 2002), AtMKK6 ist das Ortholog zu NQK1 (Soyano et al. 2003, Menges et al. 2008), und AtMPK13 stellt vergleichbar zu NRK1 das Schlußglied der Kaskade dar (Melikant et al. 2004).

	Zytokinese in Tabak NACK-PQR Signalweg	Homologe in <i>A. thaliana</i>
MAP3K	NPK1 	ANP
MAP2K	NQK1 	AtMKK6
MAPK	NRK1 	AtMPK13
Zielprotein	MAP65-1a/b 	?? 

Abbildung 1.6: Vergleich des Tabak NACK-PQR Signalweges mit dem homologen MAPK-Modul in *A. thaliana*.

Des Weiteren konnte für einige andere MAPK immerhin der Hinweis auf ihre Lokalisierung an MT-Strukturen erbracht werden, deshalb erscheint ihre Beteiligung an der Regulierung von MT durchaus möglich. In meristematischen Zellen der Wurzel von *Medicago sativa* konnte SIMK (salt-induced MAPK) im PPB und im Phragmoplasten nachgewiesen werden, beides Zellstrukturen mit hoher MT-Dichte (Baluška et al. 2000; Šamaj et al., 2004a). Eine weiteren MAPK aus *Medicago sativa*, MMK3, befindet sich im jungen Phragmoplasten an den MT, relokalisiert aber in der Phase der Phragmoplastenexpansion zur Zellplatte in der Mittelzone (Bögge et al. 1999). Die Ko-Lokalisierung von SIMK mit mitotischen MT konnte durch die Stabilisierung der Mikrotubuli mittels Taxol noch verstärkt werden (Baluška et al. 2000; Šamaj et al. 2004a). Andererseits konnte durch die Zerstörung von MT nach Kälteeinwirkung oder nach Behandlung mit dem Inhibitor Oryzalin, die Aktivierung von weiteren Stress-aktivierten MAPK (SAMK und HAMK) gezeigt werden (Sangwan et al. 2002). Daraus lässt sich für beide MAPK eine Rolle bei der Regulierung der MT-Dynamik in *Medicago sativa* ableiten. Für *A. thaliana* liegen bisher noch keine Daten zur Lokalisierung von MAPK an mitotischen oder kortikalen MT vor. Jedoch wurde in einer kürzlich erschienen Arbeit eine MAPK vorgestellt, die zusammen mit einer Phosphatase an der Regulierung der kortikalen MT in *A. thaliana* beteiligt ist (Walia et al. 2009). Das Ausschalten dieser MAPK, MPK18, führt zu einer Stabilisierung der kortikalen MT und geht einher mit einer erhöhten Resistenz der Keimlinge gegen MT-zerstörende Inhibitoren wie z.B. Oryzalin (Walia et al. 2009). Die Autoren konnten jedoch keine direkte Lokalisierung an MT feststellen, vielmehr zeigte ein GFP-Fusionsprotein dieser MAPK eine rein zytoplasmatische Expression. Pharmakologische Studien weisen zudem auch auf eine Beteiligung von MAPK an der dynamischen Organisation des Aktinfilament-Netzwerkes hin, möglicherweise durch eine direkte Regulierung von Aktin-bindenden Proteinen. In

Tabak konnte der Nachweis für eine solche mögliche Interaktion durch zwei MAPK erbracht werden: Die Autoren zeigten, dass Profilin 2, ein Aktin-bindendes Protein, durch SIPK und p45^{Ntf4} *in vitro* phosphoryliert werden kann (Limmongkon et al. 2004). Durch Zerstörung des Aktin-Zytoskelettes, verursacht durch Latrunculin B, wurden die Medicago MAPK-Homologe, SIMK und SAMK, aktiviert (Sangwan et al. 2002, Samaj et al. 2002). Interessanterweise führt die Anwendung von Jasplakinolide, einem Aktin-stabilisierenden Hemmstoff, nur zur Aktivierung von SIMK (Samaj et al. 2002) und nicht von SAMK (Sangwan et al. 2002). Weitere Studien an SIMK in Medicago Wurzelhaaren haben gezeigt, dass die korrekte Lokalisierung der MAPK und ihre Aktivierung abhängig sind vom intakten Zustand des Aktin-Zytoskeletts (Samaj et al. 2002).

1.6 MAP3K Mutante: *anp2xanp3*

Die ANP Gene (Arabidopsis-related NPK1 Proteins) wurden ursprünglich aufgrund ihrer Homologie zu den Tabak NPK Genen isoliert (Banno et al. 1993, Nishihama et al. 1997, Nakashima et al. 1998). Nishihama et al. konnten 2001 zeigen, dass das NPK1 Gen an der Zytokinese in Tabak beteiligt ist. Kovtun et al. (2000) wies zudem die Beteiligung von ANP1 an der Signalgebung bei oxidativem Stress und an Auxin Signalwegen nach, und zwar unter Aktivierung von MPK3 und MPK6. Allerdings wiesen die Einzelmutanten von ANP1, ANP2 und ANP3 keinen erkennbaren Phänotyp auf, was auf funktionale Redundanz zwischen den homologen Mitgliedern schließen lässt. Durch Kreuzungsansätze sollten Doppel und Tripelmutanten erzeugt werden, jedoch konnte funktional nur mit Doppelmutanten gearbeitet werden, da Tripelmutanten nicht generierbar waren (Krysan et al. 2002). Als Doppelmutante mit dem auffälligsten Phänotyp erwies sich *anp2xanp3*, die sich nicht nur durch eine Reduktion ihrer Gesamtgröße und damit auch des Hypokotyls auszeichnet, sondern auch durch irregulär geformte epidermale Zellen im Hypokotyl. Des Weiteren weist sie zytokinetische Defekte wie unvollständige Querwände und mehrkernige Zellen in den untersuchten Wurzel- und Hypokotylzellen auf (Abb. 1.7). Dieser Phänotyp lässt auf eine mögliche Störung im MT-Netzwerk schließen und macht die Mutante zu einem wichtigen Untersuchungsobjekt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen MAPK Signalgebung und MT zu finden. Zusätzlich erbrachten Mikroarraydaten die Erkenntnis, dass in der Doppelmutante, *anp2xanp3*, Pathogen- und Stress-verwandte Gene hochreguliert sind (Krysan et al. 2002). *Anp1xanp2* Doppelmutanten erscheinen normal während ihrer

Entwicklung und bildet keinen offensichtlichen Phänotypen aus. *Anp1xanp3* Doppelmutanten schließlich zeigen nur Defekte in ihren Blütenorganen.

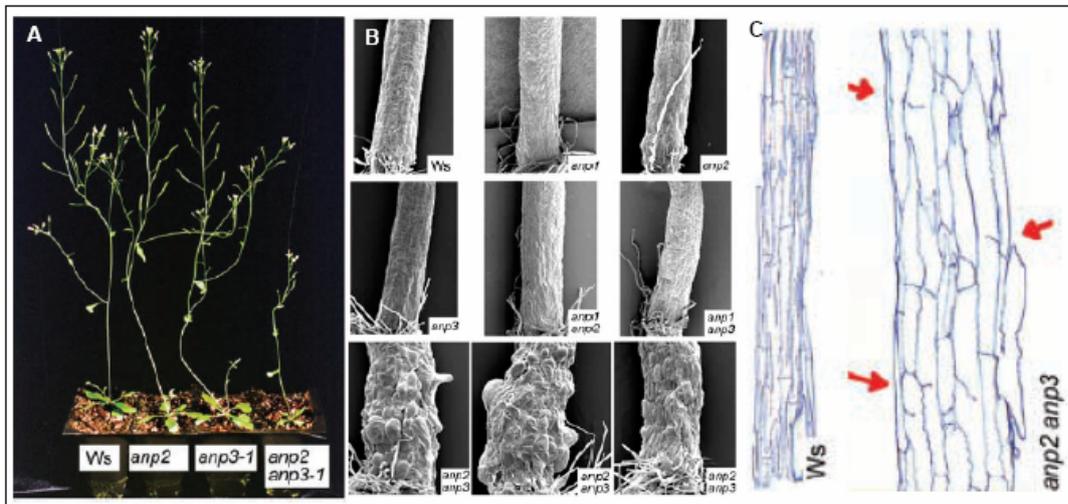


Abbildung 1.7: Publizierter Phänotyp der *anp2xanp3* Doppelmutante von Krysan et al. (2002)

A: Reduzierte Größe der *anp2xanp3* Doppelmutante im Vergleich zu WT und Einzelmutanten

B: Zelluläre Defekte der Epidermis im Hypokotyl (untere Reihe zeigt Doppelmutanten)

C: Zellteilungsdefekte in der Doppelmutante: longitudinale Schnitte des Hypokotyls von WT und *anp2xanp3*, Pfeile verweisen auf Zellwandreste.

1.7 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen drei MAPK aus *A. thaliana* näher charakterisiert werden. Wie bereits bekannt ist, sind MPK3, MPK4 und MPK6 an vielen abiotischen und biotischen, sowie entwicklungspezifischen Signalwegen beteiligt. Durch Promotor GUS Konstrukte soll die gewebespezifische Expression dieser MAPK in der Wurzel näher analysiert werden. Die Applikation von abiotischen Stressbedingungen soll Aufschluss über veränderte Expressionsmuster in der Promotoraktivität der MAPK geben, sowie mögliche transkriptionelle Regulierungen aufzeigen. Durch Ko-Lokalisation soll die Assoziierung zwischen Zytoskelettelementen und MAPK in WT Pflanzen und MAPK Mutanten untersucht werden, um einen möglichen Zusammenhang zwischen MAPK Signalgebung und dem Zytoskelett in *A. thaliana* zu finden. Morphologische und zellbiologische Analysen werden an der *mpk4* Mutante durchgeführt, da sie die einzig bekannte Einzelmutante einer MAPK in Pflanzen ist, die einen starken Phänotyp und Wachstumsdefekte aufweist. Als weitere Mutante wird die *anp2xanp3* Doppelmutante näher untersucht, da sie, wie oben beschrieben, morphologische Abnormalitäten im Hypokotyl, radiale Expansion der Epidermiszellen und zytokinetische Defekte zeigt, die auf mögliche Beeinträchtigung im MT-Netzwerk hindeuten. Die intrazelluläre Lokalisierung der MAPK in Arabidopsis soll sowohl durch

Immunmarkierung am fixierten Objekt nachgewiesen werden, als auch *in vivo* durch GFP-Fusionsproteine nach transienter und stabiler Transformation.

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzen Material und Phänotyp Analyse

Columbia 0 (Col 0) und Wassilevskaya (Ws) Ökotypen von *Arabidopsis thaliana* L. Heynh wurden verwendet. Homozygote Doppelmутanten der MAPKKK Gene *ANP2* und *ANP3* (*anp2xanp3*) wurden verwendet in Ws-Hintergrund (Krysan et al. 2002). Homozygote Mutanten des *MPK4* Gens (*mpk4*) im Col 0 Hintergrund (SALK T-DNA Insertionslinie: SALK_056245) wurden aus Samen von mit sich selbst gekreuzten heterozygoten Pflanzen selektiert. Die Selektion der homozygoten Pflanzen erfolgte aufgrund ihres Phänotypes und vermittelter Kanamycin Resistenz (Nakagami et al. 2006). Mutanten- und Wildtyp-Samen wurden auf 0,4 % Phytigel in ½ MS Medium, ohne Vitamine, pH 5,8 für 5-14 Tage herangezogen. Zuvor erfolgte eine Sterilisation der Samenoberfläche mit 3 2% Na-Hypochlorid in 0,1 % v/v Triton X100 Lösung für 15 min und anschließend eine gründliche Reinigung der Samen mit sterilem, destilliertem Wasser. Die Pflanzen wurden bei 22 °C und einer Lichtperiode von 16 h/8 h (Licht/Dunkel) in einer Klimakammer herangezogen. Keimlinge von *anp2xanp3* und *mpk4* Mutanten, sowie der entsprechenden WT, wurden mithilfe eines Leica MZ FLIII Stereo Mikroskops, gekoppelt mit einer KY-F70B CCD-Kamera (JVC), aufgenommen. Die Bildanalysen erfolgten mit der Diskus Software (Carl Hilgers, Königswinter, Germany). Keimlinge wurden nach Anomalien in Wurzel und Hypokotyl abgesucht. Die morphologischen Unterschiede bei Wurzelepidermiszellen und Wurzelhaaren wurden dokumentiert. Wurzellänge- und Wurzelbreite-Messungen erfolgten ebenfalls mit der Diskus Software.

2.2 Herstellung der GFP Fusionskonstrukte und der transgenen Pflanzen

Die kodierende Sequenz von MPK3 (**At3g45640**), MPK4 (**At4g01370**) und MPK6 (**At2g43790**) wurde aus cDNA von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia 0 mit iProof Polymerase (BioRad) amplifiziert. Die verwendeten Primer und PCR Programme sind im *Anhang 7.1* aufgeführt. Durch eingefügte Restriktionsschnittstellen für BamHI und SpeI konnte die kodierende Sequenz in den Vektor *pCAT-GFPm1* (Voigt et al. 2005) ligiert werden. Die Ligation erfolgte im Leserasters der GFP Sequenz, so dass daraus die Konstrukte *35S::GFP-MPK3*, *35S::GFP-MPK4* und *35S::GFP-MPK6* resultierten. Für MPK3 und MPK4 wurden zusätzlich C-terminale Fusionskonstrukte erstellt. Dabei erfolgte die Ligation der kodierenden Sequenz in den Vektor *pCatGFP* über eine NcoI Schnittstelle. Zur

Generierung stabiler *A. thaliana* Linien musste die Expressionskassette in den binären Vektor *pCB302* (Xiang et al., 1999). ligiert werden. Dafür wurde die Expressionskassette von *35S::GFP-MPK3*, *35S::GFP-MPK4* und *35S::MPK3-GFP*, *35S::MPK4-GFP* mit Sse8387I ausgeschnitten und in die PstI Schnittstelle des Vektors eingebracht. Die Ligation der Expressionskassette von *35S::GFP:MPK6* erfolgte über die HindIII Schnittstelle in den Vektor. Die Konstrukte wurden dann per Elektroporation (Cangelosi et al. 1991) in den *A. tumefaciens* Stamm GV3101 transformiert. Transgene Pflanzen wurden durch die „floral dip“ Methode (Clough und Bent, 1998) erzeugt und positive Transformanten konnten durch vermittelte BASTA-Resistenz selektiert werden.

2.3 Transiente Expression

2.3.1 Partikelbeschuß

Es wurden Goldpartikel mit einem Durchmesser von 1 µm verwendet. Die Goldsuspension wurde bei Raumtemperatur mindestens 5 min bei stärkster Stufe auf dem Vortex geschüttelt. Dann wurden 12,5 µl Goldsuspension mit 1 µl DNA (1 µg/µl, bei Ko-Lokalisierungen wurden beide DNAs zusammen gegeben), 12,5 µl CaCl₂ (2,5 M) und 5 µl Spermidin (0,1 M) unter ständigem Schütteln auf dem Vortex miteinander vermischt. Nach 3 min wurden die Goldpartikel, in der Pico-Zentrifuge durch kurzes Beschleunigen auf 3000 rpm, abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Goldpartikel im Sediment in 125 µl Ethanol (EtOH) aufgenommen. Die Goldsuspension wurde wie zuvor abzentrifugiert und das Sediment in 37,5 µl 100 % EtOH resuspendiert. Pro Ansatz konnten drei Schüsse mit je 10 µl Goldsuspension durchgeführt werden. Die Macrocarrier wurden vor Benutzung mit 100 % EtOH desinfiziert. Auf die trockenen Macrocarrier konnte 10 µl Goldsuspension pipettiert werden. Nach Verdunsten des Alkohols wurde der Macrocarrier in die Halterung gedrückt. Die Stopping screens wurden ebenfalls mit EtOH desinfiziert und nur ausgetauscht, wenn unterschiedliche Plasmide verwendet wurden. Die Probenkammer wurde auf 25 mm Hg Luftdruck evakuiert, die verwendeten „rupture discs“ zerplatzen bei einem Druck von 1350 psi. Der Abstand zwischen „stopping screens“ und Probe betrug 6 cm. Es wurde auf die innere Epidermis von *Allium cepa* Zwiebelschuppen geschossen. Die Proben wurden nach dem Beschuß für 16-24 h im Dunkeln bei RT gelagert. Anschließend wurde von der Epidermis der Schuppeninnenseite ein Explantat angefertigt und am Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Olympus FV 1000; Olympus, Hamburg) untersucht. Die verwendeten

Plasmide GFP-MAP65-1 (Andrei Smertenko) und DsRedMBD (Boris Voigt) wurden zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Agrobakterieninfiltration

Nicotiana benthamiana wurde unter den in 2.1 beschriebenen Bedingungen in einer Klimakammer für 6-8 Wochen angezogen. Mit einer Kolonie des *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101, welcher die entsprechenden GFP-Konstrukte unter der Kontrolle des CaMV35S-Promoter (35S) enthielt, wurden 3 ml YEB-Medium mit Rifampicin und Kanamycin angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 180 rpm geschüttelt. Ein Aliquot von 500 µl Kultur wurde entnommen, pelletiert, in 2 ml Infiltrationsmedium (200 mM Zitronensäuremonohydrat, 2 % (w/v) Saccharose, 200 µM Acetosyringon, pH 5,2) (Wydro et al. 2006) resuspendiert und die OD₆₀₀ auf 0,1 eingestellt. Nach 1-2 h Inkubation bei RT wurde die Bakteriensuspension mit einer 1 ml Einmalspritze ohne Nadel aufgenommen und nach Aufsetzen der Spritzenöffnung auf die Blattunterseite unter leichtem Druck in junge, voll expandierte Blätter von 6-8 Wochen alten *N. benthamiana* Pflanzen infiltriert. Die so behandelten Blätter verblieben währenddessen an den Versuchspflanzen. Nach der Behandlung wurden die Pflanzen für 24-48 h in die Klimakammer gestellt. Transfizierte *N. benthamiana* Blätter wurden mit dem Konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Olympus FV 1000; Olympus, Hamburg) untersucht. Die GFP Fluoreszenz wurde mit einem Argon Laser angeregt und nach Durchlaufen eines 500-530 nm Bandpass Filters detektiert. Die mCherry Fluoreszenz wurde mit der 543 nm Laserlinie angeregt und zwischen 560 und 620nm detektiert. Es wurden Serien von konfokalen optischen Schnitten mit 0,65 µm Abstand angefertigt und mit der Bearbeitungssoftware des Olympus FV100 (Olympus) dargestellt und projiziert.

2.4 Herstellung der Promotor GUS Konstrukte

Die 1,5-2 kbp große, putative Promotor Sequenz „upstream“ vom ATG-Startcodon der entsprechenden MAPK Gene **At3g45640** (AtMPK3), **At4g01370** (AtMPK4), **At2g43790** (AtMPK6), wurden aus genomischer DNA von *Arabidopsis thaliana* Col 0 amplifiziert. Die passenden Primer und die für die Amplifikation verwendeten PCR Programme sind im *Anhang 7.1* zusammengefasst. Durch eingefügte Restriktionsschnittstellen von BamHI und SmaI erfolgte die Insertion der amplifizierten Sequenz in den ΔGUS Vektor (Topping et al. 1994). Positive Klone wurden sequenziert, und anschließend wurde die DNA für die

Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 verwendet. Transgene Pflanzen mit stabil integrierten Fremdgenen wurden durch die „floral dip“ Methode (Clough und Bent, 1998) generiert. Die positiven Transformanten konnten durch Kanamycin-Resistenz selektiert werden.

2.5 GUS Färbung

Transgene Pflanzen der T1 und T2 Generation wurden auf ½ MS Agarose Platten ergänzt mit 25 µg/ml Kanamycin selektioniert und für die GUS Färbung verwendet. Die Färbung erfolgte nach der Methode von De Block und Debrouwer (1992) mit 1 mM 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Glucuronid (X-Gluc) in GUS Puffer (100 mM Natrium Phosphat, pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.5 mM Kalium-Ferrocyanid, 0.5 mM Kalium-Ferricyanid, 0.1 %v/v Triton X100) bei 37 °C für 2-18 h. Um die Penetration der Färbelösung in tiefere Gewebeschichten zu verbessern, wurde zu Beginn eine 1 h Vakuuminkubation durchgeführt. Nach erfolgreicher Färbung wurden die Keimlinge in eine 1:1 Lösung Ethanol/ Essigsäure überführt. Dies diente zum Abstoppen der Färbereaktion und zur Entfernung des Chlorophylls aus dem Blattgewebe. Die Pflanzen wurden mit dem Stereo Mikroskop (Leica MZ FLIII) untersucht und dokumentiert (s. 2.1)

2.6 Antikörper und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von Sigma, Roth und Serva bezogen, Ausnahmen werden gekennzeichnet. Die verwendeten Antikörper für Westernblots und Immunfluoreszenzmarkierungen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Primär-Antikörper	Verdünnung	Sekundär-Antikörper	Verdünnung
Anti-tubulin (YOL1/34) (SeroTec)	1:300-1:500 (WM)	Anti rat IgG, AlexaFluor488-Conjugate (Molecular Probes) (JacksonImmunoResearch)	1:500 (WM)
Anti-Actin (Sigma)	1:100 (WM)	Anti mouse IgG, AlexaFluor488-Conjugate (Molecular Probes) AlexaFluor564-Conjugate. (JacksonImmunoResearch)	1:500 (WM)
Anti-MPK3 (Sigma)	1:350 (WM)	Anti rabbit IgG, AlexaFluor546-Conjugate (Molecular Probes)	1:500 (WM)
Anti-MPK4 (Sigma)	1:350 (WM)	Anti rabbit IgG, AlexaFluor546-Conjugate (Molecular Probes)	1:500 (WM)
Anti-MPK6 (Sigma)	1: 350 (WM)	Anti rabbit IgG , AlexaFluor546-Conjugate (Molecular Probes)	1:500 (WM)
Anti-Map65-1	1:100 (WM)	Anti rabbit IgG, Alexa Fluor546-	1:500 (WM)

(A.Smertenko)		Conjugate (Molecular Probes)	
Anti-GFP (Roche)	1: 300 (IB)	Anti mouse IgG, AP-Conjugate (Molecular Probes)	1:500 (WM)
Fluorochrome	Verdünnung	Färbung von	Inkubationszeit
AM-Dye (1 mM) (Biotium)	1:2000	Plasmamembran, Endosomen und Endomembranen, geeignet für fixiertes Pflanzenmaterial	30 min-60 min
FM-Dye (5 mg/ml) (=SynptoRed v. Sigma)	1:2000	Plasmamembran, Endosomen und Endomembranen, geeignet für lebendes Pflanzenmaterial	30 min- 60 min
DAPI(10 mM)	1: 1000	Nukleus, Chromosomen	10 min-15 min

2.7 “Whole-mount” Immunmarkierung

Eine technische Verbesserung zu den publizierten „whole-mount“ Protokollen (Collings und Wasteneys, 2005, Sauer et al. 2006), die in der Arbeitsgruppe etabliert wurde und maßgeblich für die gute Anwendbarkeit und kaum vorhandene Schädigung der Wurzeln verantwortlich ist, ist der Einsatz von Färbenetzen. In den publizierten Protokollen finden die Färbe- und Waschschrte meist auf Objektträgern statt. Dieses ist zum einen schwer zu handhaben, da Keimlinge leicht durch die applizierten Lösungen vom Objektträger schwimmen und zum anderen kann das Absaugen und erneute Applizieren von Lösungen die dünne Wurzel mechanisch schädigen. Um diese Nachteile zu vermeiden, wurden kleine Plastikröhren aus 1,5 ml Reaktionsgefäßen hergestellt, die an einer Seite mit 0,2mm Nylon-Gaze verklebt wurden. Der Durchmesser dieser Gefäße ist so bestimmt, dass sie in die Vertiefungen von 24 Loch (24-well) Mikrotiterplatten passen. Lösungen können nun in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten vorgegeben werden und die Netzen werden einfach von Vertiefung zu Vertiefung überführt (Abb. 2.1). Dabei werden die Keimlinge während der Immunmarkierung keinem mechanischen Stress ausgesetzt. Es können 10-15 Keimlinge gleichzeitig in einem Netzchen inkubiert werden und dies mit einem Minimumvolumen des Antikörpers von 500µl.

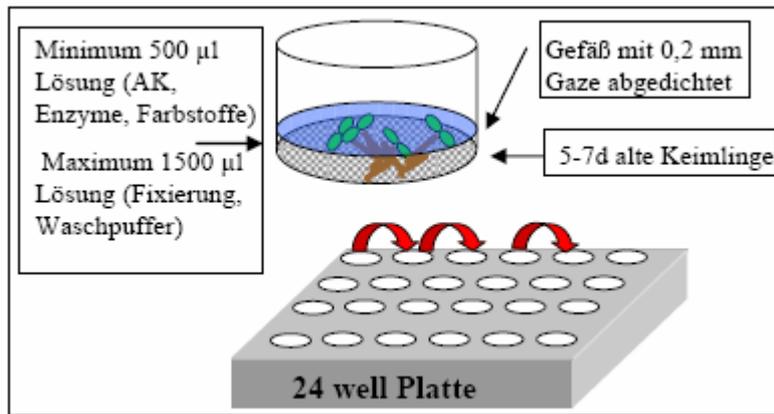


Abbildung 2.1: Darstellung der „whole-mount“

Immunmarkierung

In speziell angefertigten Färbenetzchen können 10-15 Keimlinge gleichzeitig inkubiert werden. Die Lösungen werden in 24-well Mikrotiterplatten vorgegeben..

5-7 Tage alte Keimlinge wurden *in vacuo* mit 1,5 % v/v Paraformaldehyd und 0,5 % v/v Glutaraldehyd in $\frac{1}{2}$ MTSB Puffer (50 mM K-PIPES, 5 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mM EGTA, pH 6.8). für 1 h fixiert. Anschließend erfolgten Waschschrte mit $\frac{1}{2}$ MTSB, sowie PBS für je 10 min. Die freien Aldehygruppen wurden durch mehrmaliges Waschen mit 0,1 % w/v NaBH_3 in PBS reduziert. Um die Zellwand für Antikörper passierbar zu machen, wurde sie mit einem Cocktail aus 2% w/v Driselase (Sigma), 2% w/v Cellulase Onozuka R1 (Calbiochem) und 1% w/v Pectoylase (Seishin Pharmaceuticals) in PBS für 30min bei 37°C anverdaut. Nach erneuten Waschschrten mit PBS/Glycin (0,75 % w/v Glycin) wurde die Zellmembran mit 10% v/v DMSO und 2% v/v Nonidet P40 in PBS für 1 h permeabilisiert. Die Proben wurden im Anschluß insgesamt vier Mal für je 10 min in PBS gewaschen. Die Reduzierung von unspezifischen Bindungen erfolgte mit 2 % w/v BSA in PBS für 1 h und danach folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, ebenfalls in 2 % w/v BSA/PBS, über Nacht bei 4 °C. Nach sechsmaligen Waschen mit PBS wurde der Fluorochrom-markierte Sekundärantikörper in 2 % w/v BSA/ PBS verdünnt und auf die Keimlinge gegeben. Nach 1½ h bei 37 °C und weiteren 1½ h bei Raumtemperatur wurde der Sekundärantikörper durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Wahlweise erfolgte eine DNA-Markierung mit 10 µM DAPI in PBS für 15 min. Die Keimlinge konnten nun in einem Tropfen „Mounting“ Medium (0,1 % w/v Para-Phenylendiamin in 90 % v/v Glycerin in PBS) auf Objektträger fixiert und untersucht werden. Für spätere mikroskopische Analysen konnten diese Präparate bis zu 3 Monate bei -20 °C gelagert werden. Doppelmarkierungen mit zwei Primärantikörpern erfolgten simultan, wenn es die Sekundärantikörper ermöglichten (keine Kreuzreaktion bei rabbitIgG/ratIgG oder rabbitIgG/ mouseIgG). Bei Doppelmarkierungen mit Primärantikörpern aus Ratte und Maus erfolgten die Inkubationen für jedes Antikörperpaar sequentiell. Als Sekundärantikörper eigneten sich anti-ratIgG-Alexa488 und anti-mouseIgG-Alexa546 von „Jackson Immuno Research“ am besten, weil sie die geringste Kreuzreaktivität aufwiesen

(Smertenko et al. 2008). Die Proben wurden am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop FV1000 (Olympus, Hamburg) untersucht und dokumentiert. Alexa488 Fluoreszenz wurde aufgenommen durch Anregung mit der 488 nm Linie des Argon Lasers und einem 500-535 nm Band Pass Emissionsfilter. Alexa546 Fluoreszenz wurde angeregt mit der 543 nm Laserlinie und detektiert zwischen 560-660 nm. DAPI-Fluoreszenz wurde mit 405 nm angeregt und bei 450-470 nm detektiert. Die Aufnahme der einzelnen Kanäle erfolgte immer im sequentiellen Modus, so dass die Detektion von falsch positiven Signalen ausgeschlossen werden konnte. Es wurden Serien von konfokalen optischen Schnitten mit 0,65 µm Abstand angefertigt und mit der Bearbeitungssoftware des Olympus FV100 (Olympus) dargestellt und projiziert. Weitere Bildanalysen und -bearbeitungen erfolgten zusätzlich mit der Software Adobe Photoshop 6.0.

2.8 in vivo Mikroskopie von Mikrotubuli

Um *in vivo* die Mikrotubuli Organisation zu beobachten, wurden *anp2xanp3*-Pflanzen und heterozygote *mpk4* Pflanzen, sowie WT-Pflanzen im entsprechenden Ws und Col 0 Hintergrund mit einem *35S::GFP:MBD* Konstrukt durch die „floral dip“ Methode (Clough und Bent, 1998) stabil transformiert. Bei dem *35S::GFP:MBD* Konstrukt handelt es sich um die MT-bindende Domäne des MT-assoziiierenden Proteins MAP4, welches gesteuert unter einem 35SCaMV Promotor an GFP gebunden ist (Marc et al. 1998). Fluoreszierende Pflanzen der T1- und T2-Generation wurden unter dem Auflichtfluoreszenzbinokular (Leica MZ FLIII) selektioniert und auf Objektträger gebracht. Die Objektträger wurden zu einfachen Inkubationskammern umfunktioniert, in dem das Deckglas, durch eine Schicht Parafilm erhöht, auf dem Objektträger zu liegen kam und somit die Keimlinge nicht zerdrückte. Die Mikroskopie wurde am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop FV1000 (Olympus, Hamburg) durchgeführt. GFP wurde mit der 488 nm Laserlinie des Argon Lasers angeregt und zwischen 500-530 nm detektiert. Die Bildanalysen und -bearbeitungen erfolgten mit den Programmen Olympus FV10-ASW 1.7 und Adobe Photoshop 6.0

2.9 RNA Extraktion und RT-PCR

Gesamt RNA wurde von Arabidopsis Keimlingen (WT und Mutanten) mit dem „Plant RNA Extraction Kit“ (Analytik Jena) nach Anleitung des Herstellers isoliert. Die Menge der isolierten RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die Reinheit der RNA wurde

gleichzeitig durch die Messung des Quotienten von 280 nm/260 nm bestimmt. In die RT-PCR wurde die gleiche Menge von 100 ng RNA pro Probe eingesetzt. Für die Durchführung der RT-PCR wurde das SuperScriptIII One-Step RT-PCR System mit Platinum Taq Polymerase (Invitrogen) verwendet. Die verwendeten Primer und PCR-Programme sind im *Anhang 7.1* gelistet. Nach Auftrennung der PCR-Proben auf 1 % Agarosegelen mit Ethidiumbromid (10 ng/ml) wurde die Lage der Banden dokumentiert. Die Bandenstärken wurden durch Berechnung der Graustufenwerte mit Hilfe des ImageJ Programms bestimmt. Die berechneten Graustufenwerte für *Actin2*, welches als Kontroll-Gen diente, wurden auf 100 % gesetzt und die Graustufenwerte der MAPK dazu ins Verhältnis gesetzt. Der Berechnung liegen Werte aus drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlich durchgeführter Zyklenzahl zugrunde.

2.10 Proteinisolation und Immunoblot

Infiltriertes Blattmaterial wurde unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert. Danach wurden ca. 100 mg Material mit 1x Laemmli-Probenpuffer versetzt (1 µl Puffer/mg Probe) und unter Schütteln auf dem Vortex gelöst. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 96 °C für 5 min, kurze Abkühlung durch Eintauchen in flüssigem Stickstoff und erneutes Erhitzen bei 96 °C. Der Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Die Probe wurde nun für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand bis zum Beladen des SDS-Gels auf Eis gestellt oder bei -20 °C gelagert. SDS Polyacrylamidgele wurden nach den Herstellerangaben von BioRad durchgeführt. Es wurde ein 12%iges Trenngel verwendet, das mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet war. Bei 100 V wurden die Proteine für 1,5 h-2 h im Gel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDV Membran geblottet (ü. Nacht bei 25 V). Die Blockierung der Membran wurde in TBS-T Puffer (TBS+0,1 % (v/v)TritonX100) mit 4 % (w/v)BSA/ 4 % (w/v) Milchpulver (Milchpulver: Neuform) für 1 h bei RT durchgeführt. Der Primärantikörper wurde in TBS-T Puffer +1 %BSA angesetzt, die Inkubation erfolgte für 1,5 h bei RT. Nach drei Wachsritten für je 10 min mit TBS-T Puffer, wurde der Sekundärantikörper ebenfalls in TBS-T Puffer + 1 % (w/v) BSA appliziert. Nach Entfernen des Antiköpers durch erneutes Waschen mit TBS-T Puffer, konnte der Farbnachweis mittels NBT/BCIP (Sigma) erfolgen. Nach Bildung des gefärbten Präzipitates auf der Membran wurde die Reaktion mit 1 % Essigsäure gestoppt.

3. Ergebnisse

In der folgenden Arbeit wird *Arabidopsis thaliana* als experimentelles Modellsystem verwendet. Diese unscheinbare Pflanze aus der Familie der Brassicaceae zählt zu einem der am besten untersuchten Modelle in der Pflanzenbiologie. Zu den Vorteilen zählen das komplett sequenzierte Genom, die Verfügbarkeit von Mutantenlinien, die problemlose Einsetzbarkeit von Methoden zur transienten und stabilen Transformation, die Verfügbarkeit spezifischer Antikörper darunter auch solche gegen MAPK und zytoskelettale Proteine und die Möglichkeit durch etablierte Immunmarkierungsprotokolle detaillierte zellbiologische Untersuchungen durchführen zu können. Insbesondere die Wurzel eignet sich sehr gut für zellbiologische Untersuchungen, da sie aufgrund ihrer geringen Größe und Dicke als Ganzes unter dem Mikroskop analysiert werden kann. Deshalb können auch die zentral gelegenen Gewebe *in vivo* aber auch an fixiertem Material in ihrer Gesamtheit betrachtet werden. Durch die Verwendung von speziellen Mikroskopierkammern lassen sich zudem leicht Farbstoffe und chemische Lösungen applizieren ohne die Wurzeln zu schädigen. Da die Wurzel als Organ nicht nur zur Aufnahme von Wasser und Nährstoffen dient, sondern auch in vielfältiger Weise mit Faktoren im Erdreich in Berührung kommt, zB. chemische Reize bis hin zu toxischen Substanzen, Umweltreize bis hin zu Stressbedingungen, mikrobielle Interaktion bis hin zu Pathogenbefall, nicht zuletzt mechanische Reize, besitzt die Wurzel sensible sensorische Systeme und Signalübertragungsmechanismen, in die unter anderem auch die MAP-Kinasen integriert sind. Deshalb ist für die vorliegende Arbeit die Wurzel ein besonders wichtiges Untersuchungsobjekt.

3.1 Expressionsanalysen von MAPK in pflanzlichen Organen und Geweben

3.1.1 Organspezifische Expressionsanalyse von MAPK

Zur Überprüfung der RNA Expression der drei ausgewählten MAPK, nämlich MPK3, MPK4 und MPK6, wurde eine organspezifische RT-PCR durchgeführt. Dafür wurden Wurzeln, Blätter, Stängel und Blüten von auf Erde angezogenen, 35 Tage alten *Arabidopsis*-Pflanzen geerntet und die Gesamt-RNA extrahiert. Die RT-PCR zeigte, dass alle untersuchten MAPK in den verschiedenen Pflanzenorganen exprimiert werden (Abb. 3.1). Wobei MPK3 von den drei untersuchten MAPK am schwächsten in der Blüte exprimiert wird, sowie MPK4 das stärkste Vorkommen in Stängel und im Wurzelgewebe zeigt. MPK6 liegt recht gleichmäßig

verteilt in Blüten, Blättern und Stängeln vor, wird jedoch deutlich schwächer in der Wurzel exprimiert.

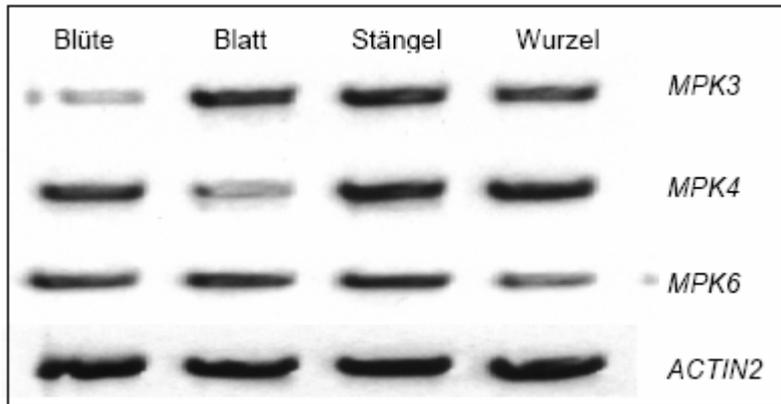


Abbildung 3.1: Organspezifische Expressionsanalyse von MAPK
RT-PCR von *MPK3*, *MPK4*, *MPK6* in unterschiedlichen Pflanzenorganen von *A. thaliana* (30 Zyklen). Alle MAPK werden in den untersuchten Organen exprimiert, jedoch in unterschiedlicher Expressionsstärke. *Actin2* wurde als Kontroll-Gen verwendet.

3.1.2 Gewebsspezifische Expressionsanalyse von MAPK anhand stabiler Promotor-GUS Linien

Um Informationen über die gewebespezifische Expression von *MPK3*, *MPK4* und *MPK6* zu erhalten, wurde die 1,5-2 kBp lange 5'-Region vor dem prognostizierten Startcodon aus genomischer DNA amplifiziert und vor das *GUS*-Reportergen kloniert (Abb. 3.2). Mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transfektion wurden stabile *A. thaliana* Linien generiert, die für die Analyse der Promotoraktivität herangezogen wurden. Für die Untersuchung der stabilen PromGUS Linien wurden Keimlinge auf Kanamycin-haltigen ½ MS Platten selektiert und nur kanamycinresistente Keimlinge wurden für die histochemische GUS Färbung und nachfolgende Analysen verwendet.

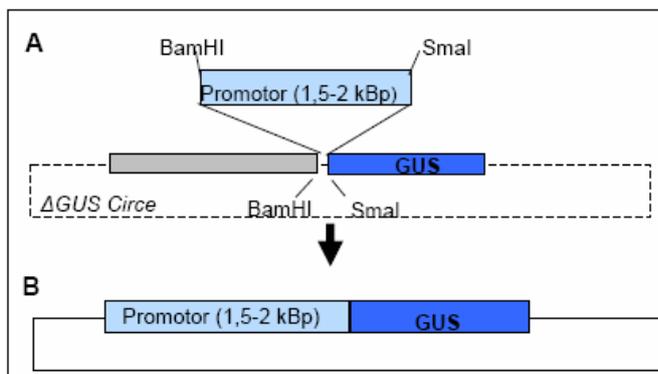


Abbildung 3.2: Klonierungsschema vom Prom_{MAPK}::GUS Vektor

(A) (B) Die putative Promotorsequenz der entsprechenden MAPKs wurde durch eingefügte Schnittstellen in den ΔGUS Circe Vektor kloniert

3.1.2.1 Analyse der *Prom_{MPK3}::GUS* Linie

Die Aktivität des Promotors von MPK3 lässt sich deutlich in der Wurzel und den Kotyledonen der untersuchten Keimlinge nachweisen (Abb. 3.3). Betrachtet man die Wurzel und die Wurzelspitze im Detail, so erkennt man eine Färbung im Bereich des Apikalmeristems (Abb.3 A), nicht jedoch in der angrenzenden Kalyptra (Abb. 3.3 A, D). Die weiter basalwärts anschließenden Bereiche bleiben frei von jeglicher Färbung (Abb. 3.3 D). Erst die Seitenwurzelpromordien in den höher basalwärts gelegenen Bereichen zeigen wieder eine Markierung durch das GUS-Reaktionsprodukt (Abb. 3.3 E). In diesen Bereichen findet sich auch eine erhöhte GUS Aktivität im angrenzenden, vaskulären Gewebe (Abb. 3.3 E, F, G). Des Weiteren treten im Meristem von älteren Sekundärwurzeln einzelne Zellen deutlich markiert hervor (Abb. 3.3 F), in jüngeren Sekundärwurzeln ist jedoch der gesamte meristematische Bereich durch eine erhöhte Promotoraktivität gekennzeichnet (Abb. 3.3 G). In den oberirdischen Organen treten auch eindeutig spezifisch markierte Bereiche hervor, dazu gehören eine Zone im basalen Bereich des Hypokotyls sowie die Leitbündel und die Mesophyllzellen der Kotyledonen (Abb. 3.3 A). In der Blattepidermis treten die Stomata deutlich abgegrenzt hervor, mit starker Markierung der beiden Schließzellen (Abb. 3.3 B). Im Apikalmeristem des Sprosses lässt sich ebenfalls eine Promotoraktivität von MPK3 erkennen.

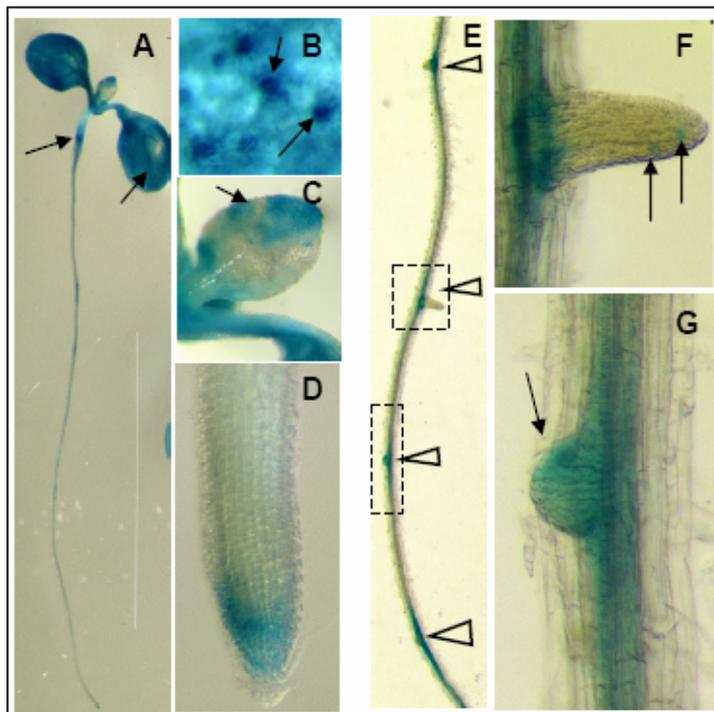


Abbildung 3.3: Gewebe- und zellspezifische Aktivität von *Prom_{MPK3}::GUS* in *Arabidopsis* Keimlingen

(A) Übersicht eines 7 Tage alten Keimlings, starke Promotoraktivität in den Kotyledonen und Leitbündeln (Pfeil), Hypokotyl mit starker Markierung im basalen Teil (Pfeil) (B) Detail von Stomata in Kotyledonen mit erhöhter GUS Aktivität (C) Detail des Apikalmeristems mit Färbung (Pfeil) (D) Detail der Wurzelspitze, Markierung der meristematischen Zone, Kalyptra und Transitionszone ohne Markierung (E) Promotoraktivität im Bereich der auswachsenden Seitenwurzeln (Pfeilspitzen), dazwischen liegendes Wurzelgewebe zeigt keine Aktivität (F) Detail einer auswachsenden Seitenwurzel, nur einzelne Zellen weisen Promotoraktivität auf (Pfeile), starke Färbung im angrenzenden Gewebe des Zentralzylinders (G) Detail eines Seitenwurzelpromordiums, Promotoraktivität ist im meristematischen Bereich sichtbar (Pfeil), sowie im angrenzenden Gewebe des Zentralzylinders.

Um die Auswirkung von abiotischen Stressen auf die Promotoraktivität der GUS Linien zu untersuchen, wurden 6-7 Tage alte Keimlinge unterschiedlichen, stressinduzierenden Lösungen ausgesetzt. Dadurch wurden hyperosmotische (Saccharose 150 mM, 350 mM), hypoosmotische (Aqua dest.) und oxidative (H_2O_2 15 mM) Stressformen erzeugt. Die Keimlinge wurden für 15 min bzw. 30 min diesen Stressbedingungen ausgesetzt und anschließend gefärbt. Bei oxidativem Streß, der durch 30minütige Inkubation in einer 15 mM H_2O_2 Lösung induziert wurde, erhöht sich die Promotoraktivität in der Wurzelspitze deutlich. Die Färbung tritt nun in der gesamten Spitze auf und geht von dort in die Bereiche des jungen Zentralzylinders über (Abb. 3.4 A). Die oberirdischen Organe lassen jedoch keine auffälligen Unterschiede bei oxidativem Stress erkennen (Abb. 3.4 B). Die weiteren Stress-Behandlungen führen zu keiner auffälligen Änderung in der Promotoraktivität der untersuchten Keimlinge (Daten nicht gezeigt).

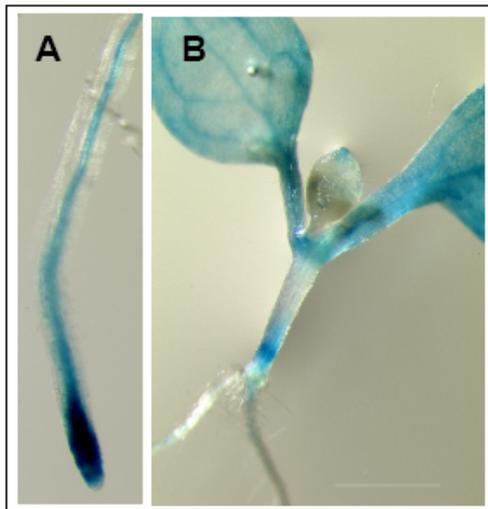


Abbildung 3.4: GUS Aktivität von $\text{Prom}_{\text{MPK3}}::\text{GUS}$ nach oxidativem Streß

Inkubation eines 7 Tage alten Keimlings für 30 min mit 15 mM H_2O_2 (A) Zunahme der Promotoraktivität in der Wurzelspitze und im Zentralzylinders der Wurzel (B) Kotyledonen weisen keine veränderte Markierung nach oxidativem Streß auf.

3.1.2.2 Analyse der $\text{Prom}_{\text{MPK4}}::\text{GUS}$ Linie

In den oberirdischen Bereichen der untersuchten Linien weisen die Kotyledonen eine Markierung der Leitbündel und der Mesophyllzellen auf (Abb. 3.5 A). Besonders deutlich treten in der Epidermis gefärbte Stomata hervor (Abb. 3.5 A). Dieses Muster findet sich ebenso deutlich in der Epidermis des Hypokotyls wieder (Abb. 3.5 C). Die Epidermiszellen des Hypokotyls einschließlich der Trichome sind frei von einer GUS Färbung (Abb. 3.5 B,C). Die Promotoraktivität in der Wurzel beschränkt sich bei der untersuchten $\text{Prom}_{\text{MPK4}}::\text{GUS}$ Linie auf das Wurzelmeristem und einen Bereich in der frühen Wurzelhaarzone (Abb. 3.5 D). Letztere zeigt eine Markierung der Epidermiszellen, sowie eine klare GUS Färbung in den ausgewachsenen Wurzelhaaren. (Abb. 3.5 E). Ferner sind in den Trichoblasten, die frühen

Ausbuchtungen der auswachsenden Wurzelhaare, deutlich blau gefärbt (Abb. 3.5 F). Die meristematische Region der Hauptwurzel zeigt eine charakteristische Färbung (Abb. 3.5 H), dabei findet sich eine Markierung in den lateralen Gewebeschichten, der zentrale Bereich dazwischen bleibt ungefärbt (Abb. 3.5 H). Ebenso weisen die Seitenwurzelpromordien und die auswachsenden Seitenwurzeln eine Promotoraktivität auf (Abb. 3.5 I, J). In den Seitenwurzelpromordien ist die Aktivität auf das Meristem begrenzt (Abb. 3.5 I), wo hingegen in auswachsenden Seitenwurzeln der meristematische Bereich ausgespart ist und die Aktivität sich auf den angrenzenden Zentralzylinder erstreckt (Abb. 3.5 J).

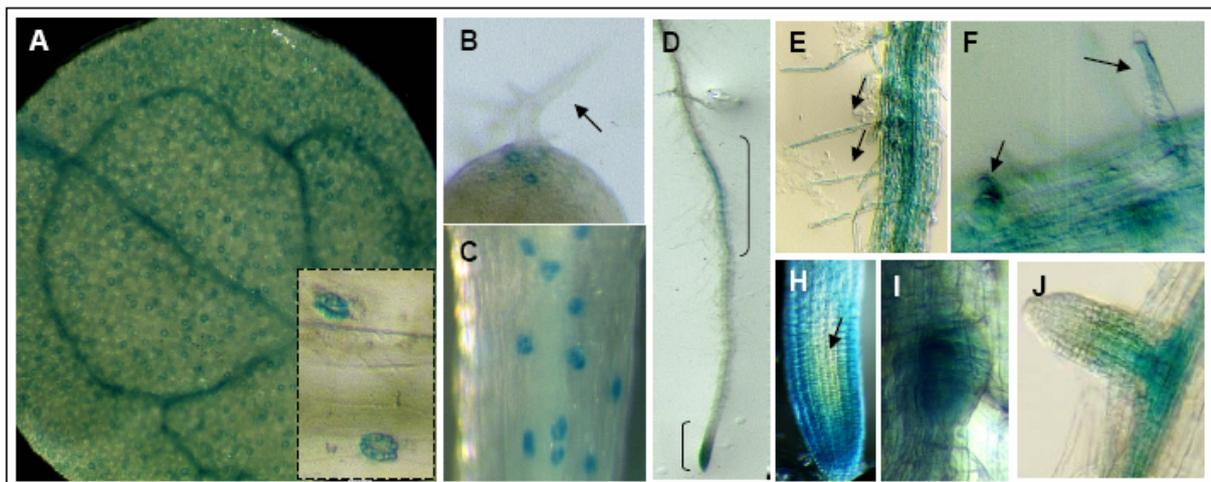


Abbildung 3.5: Gewebe- und zellspezifische Aktivität von $Prom_{MPK4}::GUS$ in *Arabidopsis* Keimlingen

(A) Kotsyledonen Promotoraktivität im Bereich der Leitbündel, schwache Markierung des Mesophylls, deutliche Färbung der Stomata (Box) (B) keine Färbung der Trichome. (C) im Hypokotyl prominente Markierung der Stomata, Epidermiszellen frei von Markierung. (D) Übersichtsaufnahme der Wurzel; Markierung des Meristems und des Zentralzylinders im Bereich der Wurzelhaarzone. (E) Färbung der epidermalen Zellen und der Wurzelhaare (Pfeile). (F) Detail von Wurzelhaaransatz und wachsendem Wurzelhaar (Pfeile) mit deutlicher Färbung. (H) Wurzelmeristem; Promotoraktivität in den lateralen Bereichen der Spitze, mittlerer Bereich bleibt ausgespart. (I) Markierung der Seitenwurzelpromordien und (J) Seitenwurzeln

Werden die $Prom_{MPK4}::GUS$ Keimlinge oxidativem (H_2O_2 , Abb. 3.6 A-D), hypoosmotischem (Aqua dest., Abb. 3.6 E-G), oder hyperosmotischem (Saccharose, Abb. 3.6 H-K) Stress ausgesetzt, so kommt es zu einer Erhöhung der Promotoraktivität in der gesamten Wurzel (Abb. 3.6). Erst nach längerer Dauer von oxidativem und hyperosmotischem Stress (30 min) wird auch der Promotor in anderen Organen wie Hypokotyl und Kotsyledonen aktiviert (Abb. 3.6 A-D, H-K). Bei hypoosmotischem Stress zeigt sich keine Auswirkung auf die Aktivität in den Kotsyledonen, die Färbung bleibt klar abgegrenzt im Übergang vom Hypokotyl zur Wurzel (Abb. 3.6 E-G)

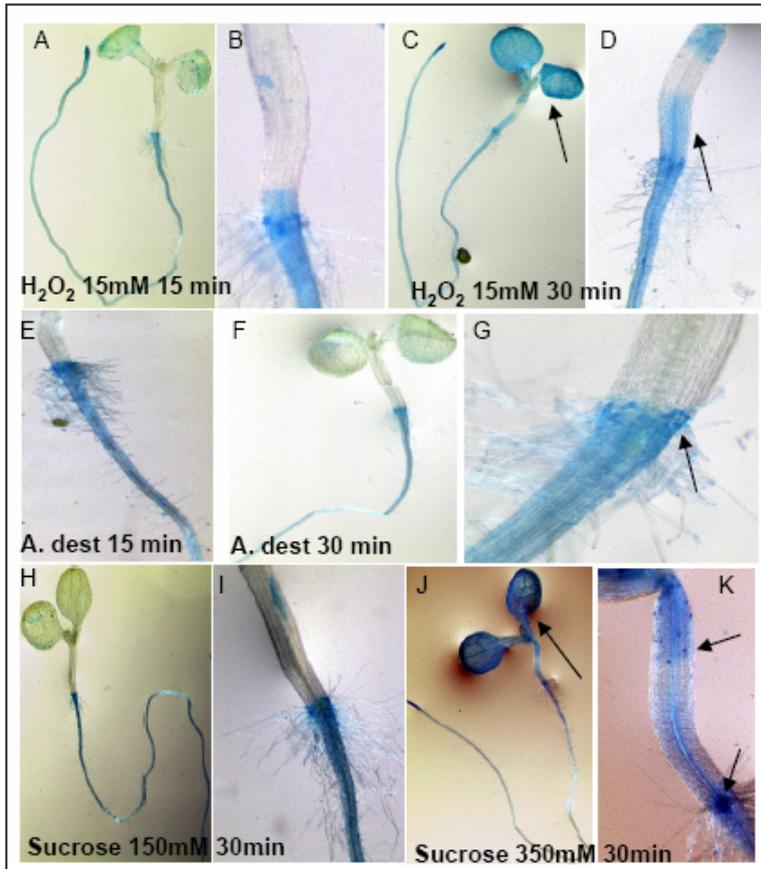


Abbildung 3.6: GUS Aktivität von Prom_{MPK4}::GUS nach abiotischem Streß

7 Tage alte Keimlinge nach unterschiedlichen Behandlungen zur Induzierung von abiotischem Stress.

(A-D) oxidativer Streß führt zur Aktivierung des Promotors in der gesamten Wurzel, nach 30 min Färbung der Kotyledonen (C) und des Hypokotyls (D).

(E-G) hypoosmotischer Stress induziert den Promotor in der Wurzel, (F) auch nach 30 min keine Markierung des Hypokotyls. (G) klare Abgrenzung der Färbung in Übergang von Wurzel zu Hypokotyl (Pfeil).

(H-K) hyperosmotischer Streß aktiviert konzentrationsabhängig die Promotor-aktivität im Hypokotyl und Kotyledonen. (H-I) Bei niedriger Saccharose-konzentration bleibt die Färbung auf Wurzel begrenzt. (J-K) Die Erhöhung der Saccharose Konzentration steigert die Promotoraktivität in Kotyledonen (J) und Hypokotyl (K, Pfeile)

3.1.2.3 Analyse der Prom_{MPK6}::GUS Linie

In der Übersicht von Prom_{MPK6}::GUS Keimlingen ist eine Aktivität im Bereich der Wurzelspitze und in der Übergangszone zwischen Wurzel und Hypokotyl zu erkennen (Abb. 3.7 A). Im Detail lässt sich die Färbung im Apikalbereich der Wurzel auf zwei unterschiedliche Regionen begrenzen. Zum einen findet sich eine Aktivität im meristematischen Bereich und in der Wurzelhaube (Abb. 3.7 B), zum anderen wird eine weitere Region markiert, die der Transitionszone zugeordnet werden kann (Abb. 3.7 B). In den Bereichen der auswachsenden Sekundärwurzeln werden die Primordien der Seitenwurzeln durch eine starke GUS Färbung sichtbar, in den gerade auswachsenden Seitenwurzeln wird die gesamte Spitze inklusive Meristem deutlich markiert (Abb. 3.7 C). Die oberirdischen Organe sind nur schwach gefärbt. Hervorzuheben ist eine deutliche Färbung in der Übergangszone von Wurzel zu Hypokotyl (Abb. 3.7 D). In den Epidermiszellen und Mesophyllzellen der Kotyledonen ist keine Aktivität nachweisbar, jedoch treten vereinzelt, stark markierte Stomata in den Kotyledonen hervor (Abb. 3.7 E). In Primärblättern ist diese Stomatamarkierung nicht mehr vorhanden, hier scheint der Promotor

nur auf das Sprossmeristem-Primordium und einige Blatt-Primordien begrenzt zu sein (Abb. 3.7 F).

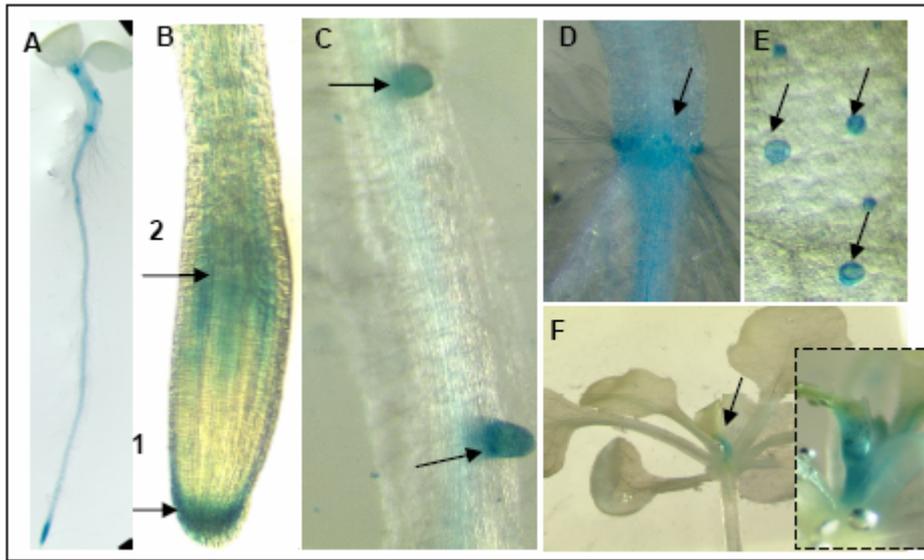


Abbildung 3.7 : Gewebe- und zellspezifische Aktivität von Prom_{MPK6}::GUS in *Arabidopsis* Keimlingen

(A) Übersichtsaufnahme eines 7 Tage alten Keimlings, Markierung des Wurzelmeristems, Färbung der Übergangzone von Wurzel zu Hypokotyl, Kotyledonen ohne Markierung. (B) Detail des Apikalbereiches: Promotoraktivität in Kalyptra und angrenzenden Zellen des Meristems (Pfeil 1), sowie der Transitionszone (Pfeil 2) (C) Seitenwurzeln weisen eine GUS Färbung auf (Pfeile). (D) Übergang Wurzel zu Hypokotyl mit Promotoraktivität. (E) Detail von Stomata in Kotyledonen, keine Färbung der Epidermiszellen. (F) Primärblätter ohne Markierung, Blatt- bzw. Sprossprimordium gefärbt (Box).

Nach oxidativem Streß durch Inkubation in einer 15 mM H₂O₂ Lösung, wird die Aktivität des MPK6-Promotors in der Wurzelspitze unterdrückt. Die zuvor deutlich markierten zwei Bereiche in der Wurzelspitze, sind als solches nicht mehr zu erkennen. Der Bereich der Transitionszone weist keinerlei Markierung mehr auf. Ebenso zeigt sich auch der Bereich der meristematischen Zone deutlich schwächer markiert als in Kontrollpflanzen (Abb. 3.8 A). Werden die Pflanzen jedoch einem hyperosmotischen Streß ausgesetzt, in diesem Fall hervorgerufen durch Inkubation in 150 mM bzw. 350 mM Saccharose-Lösung für 15-30 min, steigt die Promotoraktivität in der Wurzel an und zwar abhängig von der Konzentration und Inkubationszeit der verwendeten Saccharoselösung (Abb. 3.8 B-D). Nach 15minütiger Inkubation in 150 mM Saccharoselösung weist weder die Wurzelspitze noch das basalwärts folgende Gewebe der Wurzel eine signifikante Änderung der Markierung in Vergleich zu Kontrollpflanzen auf (Abb. 3.8 B,B'). Verlängert sich jedoch die Inkubationszeit auf 30 min, erfolgt eine Erhöhung der Promotoraktivität in der Wurzelspitze, dort vor allen im Bereich der Transitions- und Elongationszone (Abb. 3.8 C). Ebenso tritt nun zum ersten Mal eine Markierung des Zentralzylinders auf (Abb. 3.8 C'). Erhöht sich der osmotische Streß durch Inkubation mit 350 mM Saccharoselösung für 30 min, so kommt es zu einer durchgängigen

Markierung in der Wurzelspitze, die vorher klar getrennten zwei Bereiche treten noch stärker markiert hervor, jedoch ist nun eindeutig das Gewebe dazwischen ebenfalls gefärbt (Abb. 3.8 D). Des Weiteren lässt sich eine Erhöhung der GUS Aktivität in der gesamten Wurzel inklusive der Wurzelepidermis feststellen (Abb. 3.8 D'). In den oberirdischen Organen kommt es im untersuchten Zeitraum zu keinen Veränderungen der Promotoraktivität, weder nach Zugabe von Peroxid noch von Saccharose.

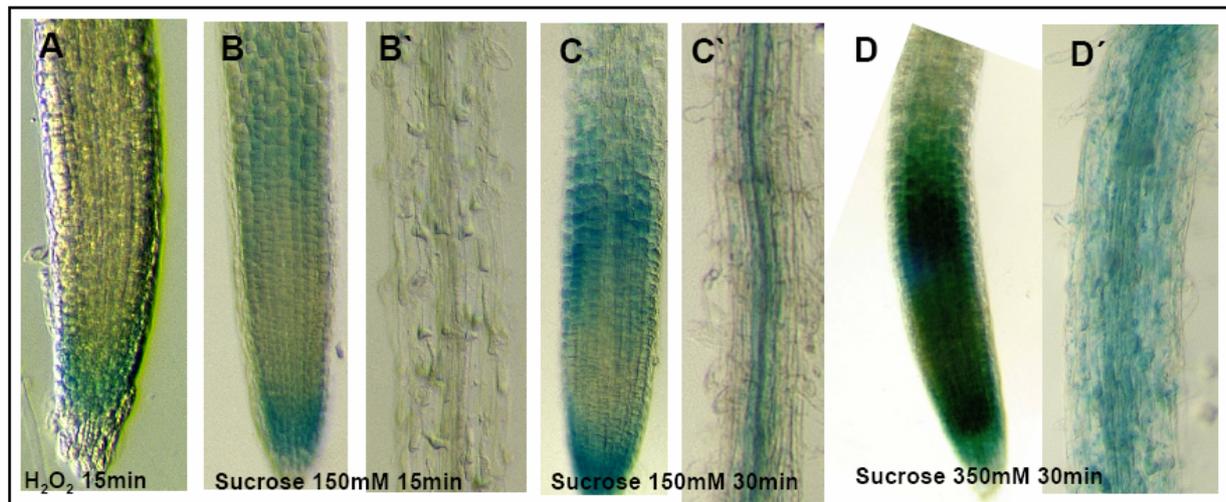


Abbildung 8 : Aktivität von Prom_{MPK6}::GUS Linien nach abiotischem Streß

Wurzelspitzen und Wurzelepidermis nach unterschiedlichen Behandlungen zur Induzierung von abiotischem Stress. (A) Oxidativer Streß führt zu einer Unterdrückung der Promotoraktivität, der Bereich der Transitionszone weist keine Färbung mehr auf, die meristematische Zone ist nur schwach markiert. (B)-(D) hyperosmotischer Streß durch Saccharoselösung. (B-B') Markierung der Wurzelspitze und der Transitionszone, Epidermis zeigt keine Markierung. (C-C') Nach 30 min Inkubation mit 150 mM Saccharoselösung zeigt Wurzelspitze verstärkte Promotoraktivität, sowie eine Markierung im Zentralzylinder. (D-D') 350 mM Saccharoselösung für 30 min führt zu einer stark erhöhten Aktivität des Promotors in der Wurzelspitze, auch die zuvor ausgesparte Region ist nun relativ stark gefärbt. Eine deutliche Färbung der Epidermiszellen ist erkennbar.

3.1.3 RT-PCR Analyse von MAPK nach abiotischem Streß

Zur Überprüfung der Promotoraktivitätsdaten in den vorangegangenen Abschnitten wurden WT Keimlinge (Col 0) ebenfalls abiotischem Stress ausgesetzt. Dafür wurden 14 Tage alte Keimlinge, die auf ½ MS Agarplatten angezogen wurden, für 30 min mit Leitungswasser, Aqua dest., H₂O₂ (15 mM) und Saccharose (350 mM) inkubiert. Als Kontrollpflanzen dienten gänzlich unbehandelte Pflanzen. Anschließend wurde die RNA aus den Wurzeln isoliert und in eine RT-PCR eingesetzt. Es wurde das Transkript von MPK3, MPK4 und MPK6 amplifiziert, als Kontrollgen diente *Actin2* (Abb. 3.9 A). Zur genaueren Darstellung wurde die Bandenstärke mittels einer Grauwertmessung analysiert und Mittelwerte aus unabhängigen PCRs und unterschiedlicher Zyklenanzahl berechnet. Die ermittelten Werte wurden zu den

Werten von *Actin2* als Kontrollgen (100 %) ins Verhältnis gesetzt und graphisch dargestellt (Abb. 3.9 B). Die RT-PCR Analysen weisen deutliche transkriptionelle Unterschiede zwischen den drei MAPK nach 30min abiotischem Stress auf. Bereits die Applikation von Wasser führt zu einem Anstieg des Transkripts in allen drei MAPK. Die jeweils höchste Expression konnte nach 30minütigem Saccharosestress detektiert werden. Für MPK3 konnte für alle Stressbedingungen ein deutlicher transkriptioneller Anstieg nachgewiesen werden. Bei MPK4 und MPK6 fiel der Anstieg geringer aus.

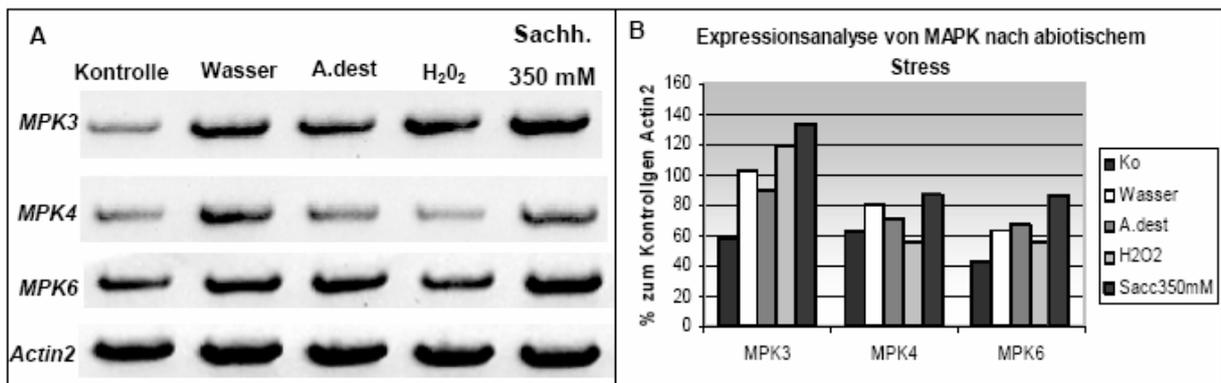


Abbildung 3.9: Expressionsanalyse von MAPK nach abiotischem Stress

(A) exemplarische Darstellung einer RT-PCR mit 26 Zyklen. Amplifiziert wurden *MPK3*, *MPK4*, *MPK6* aus Wurzel RNA. *Actin2* diente als Kontrolle. (B) graphische Darstellung von Bandenstärken, ermittelt durch Grauwertanalysen. Mittelwerte aus drei unabhängigen PCRs mit unterschiedlicher Zyklenzahl werden zu Aktin ins Verhältnis gesetzt. Die Werte von Aktin wurden auf 100% gesetzt (nicht dargestellt)

3.2 Morphologische Analyse von *anp2xanp3* und *mpk4*

In dieser Arbeit soll die Beteiligung von MAPK nicht nur an Stressreaktionen sondern auch an der Ausprägung der Wurzelmorphologie und speziell der Wurzelhaarentwicklung untersucht werden. Es wurden zwei bereits publizierte Mutanten untersucht. Zum einen *anp2xanp3*, die durch den Knock-Out zweier MAPKKK Gene, *ANP2* und *ANP3*, gekennzeichnet ist (Krysan et al. 2002). Diese Doppelmutante weist zytokinetische Effekte und einen Zwergwuchs auf (s. Einleitung 1.6). Und zum anderen wurde mit der *mpk4* Mutante gearbeitet, bei der es sich um eine T-DNA Insertionslinie handelt. Diese Mutante zeigt ein extrem reduziertes Wachstum (Abb. 3.10 A) (Nakagami et al. 2006) und erhöhte Pathogenresistenz, verbunden mit einer erhöhten Salicylsäure-Konzentration und konstitutiver Expression von Pathogen-verwandten (PR) Genen (Petersen et al. 2000; Brodersen et al. 2006). Bisher wurden an dieser Mutante keine morphologischen oder detaillierte zytologischen Analysen durchgeführt. Da es sich um eine homozygot infertile Mutante

handelt, wurde mit heterozygoten Samenlinien gearbeitet. Dabei konnten ca. 25% der Keimlinge durch den publizierten Phänotyp identifiziert werden und nur diese Keimlinge wurden für die folgenden Experimente verwendet. Der Phänotyp konnte 4 Tage nach Keimung eindeutig zugeordnet werden. Eine RT-PCR mit der RNA dieser *mpk4* Mutanten bewies, dass es sich hierbei um homozygote Knock-Out Mutanten handelte, da kein *MPK4* Gen Transkript nachweisbar war. (Abb. 3.10 B)

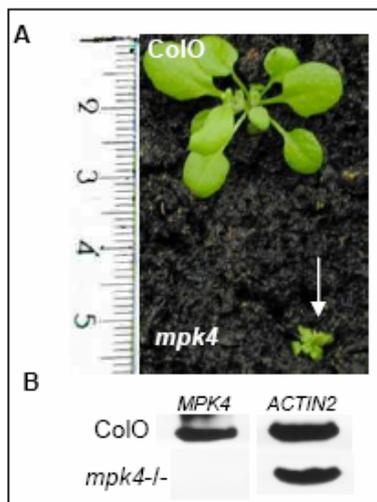


Abbildung 3.10: *mpk4* Zwergenphänotyp und RT-PCR Analyse

(A) 21 Tage alte Pflanzen auf Erde, Wachstumsvergleich von Col 0 Kontrollpflanzen mit *mpk4* Mutante. Die Mutante ist durch einen extremen Zwergenphänotyp geprägt. (B) RT-PCR zeigt die fehlende Expression des *MPK4* Gens in homozygoten Pflanzen. *Actin2* wurde als Kontrollgen verwendet.

Da beide Mutanten in zwei unterschiedlichen *A. thaliana* Ökotypen generiert wurden, wurde für alle folgenden Experimente die entsprechenden Wildtyppflanzen den Mutanten gegenüber gestellt, also für die *anp2xanp3* Mutante der Wassilijewska (Ws) Ökotyp und für die *mpk4* Mutante der Columbia 0 (Col 0) Ökotyp.

3.2.1. Analyse des Wurzelwachstums und des Wurzelhaar Phänotyps von *anp2xanp3* und *mpk4* Mutanten

Für die detaillierten Untersuchungen der Wurzeln beider Mutanten wurden die Pflanzen auf vertikal stehenden $\frac{1}{2}$ MS Platten angezogen. Das Wachstum erfolgte unter gleich bleibenden klimatischen Verhältnissen. Kontrollpflanzen und Mutanten wurden immer gleich behandelt und wenn möglich auf derselben Platte angezogen, um mögliche artifizielle Wachstumsveränderungen auszuschließen. Die Wurzellängen von Kontrollpflanzen und Mutanten wurden über mehrere Tage täglich gemessen und der Mittelwert der erzielten Wurzellängen wurde graphisch dargestellt (Abb. 11). Hierbei wird deutlich, dass beide Mutanten durch ein reduziertes Wurzelwachstum im Vergleich zu den untersuchten Kontrollpflanzen auffallen. *anp2xanp3* Mutanten erreichen nach 6 Tagen ca. 75% der Wurzellänge der entsprechenden Kontrollpflanzen. *mpk4* Mutanten haben eine noch viel kürzere Wurzel, sie erreicht nach 6

Tagen nur $\frac{1}{3}$ der Länge der Kontrollpflanze und zeichnen sich auch durch eine sehr viel geringere Zuwachsrate aus (Abb. 3.11).

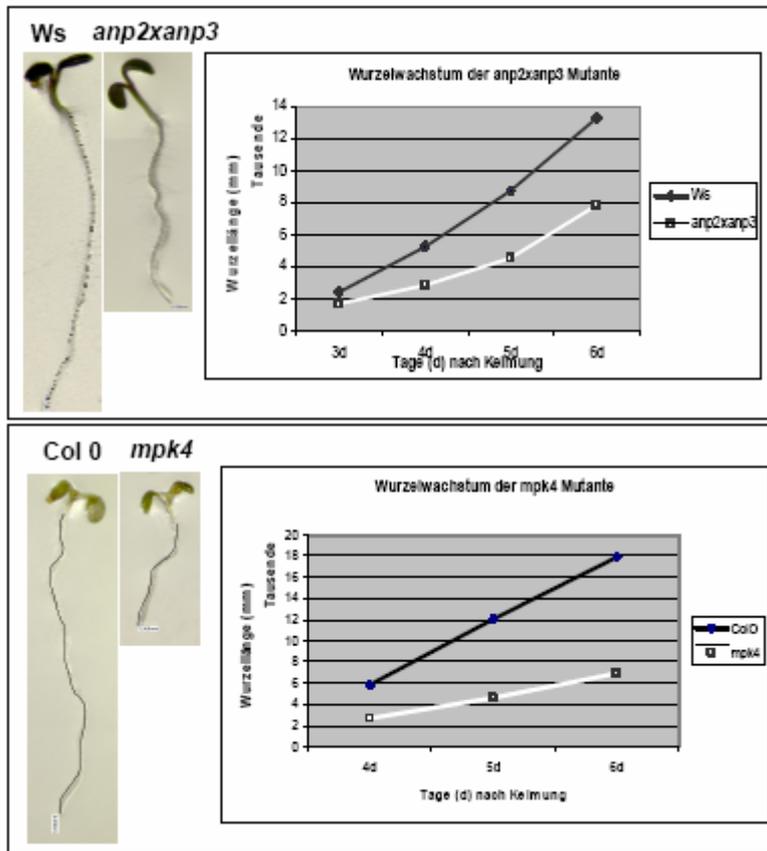


Abbildung 3.11: Graphische Darstellung des Wurzelwachstums von *anp2xanp3* und *mpk4*

Dargestellt ist die Wurzellänge in μm als Mittelwert von 30 Pflanzen. Bei *anp2xanp3* erfolgten die Messungen 3 Tage bis 6 Tage nach Keimung. Die Mutante zeigt ab Tag 5 ein bis zu $\frac{1}{3}$ reduziertes Längenwachstum im Vergleich zum WT. *mpk4* kann erst 4d nach Keimung gemessen werden, da vorher der Phänotyp nicht erkennbar ist. Das Wachstum ist deutlich verlangsamt im Vergleich zum WT und erreicht höchstens $\frac{1}{3}$ der Wurzellänge des WTs nach 6 Tagen.

Detaillierte Analysen der Wurzel und der Wurzelhaare zeigen eine deutlich auftretende Veränderung in der Morphologie der Wurzelhaare und der Wurzelepidermiszellen. Die Wurzelhaare sind stark verzweigt und durch aberrante Formen gekennzeichnet, wie z.B. eine verdickte Basis und fingerförmige Auswüchse. Die sonst glatte Oberflächenkontur der Wurzel (Abb. 3.12), ist in den Mutanten durch stark aufgewölbte Epidermiszellen gestört (Abb. 3.12). Auch die normalerweise klare Anordnung der länglich verlaufenden Zellreihen ist in den Mutanten als solches kaum erkennbar. Die Zellreihen verlaufen in den Mutanten deutlich ungeordnet und unsymmetrisch.

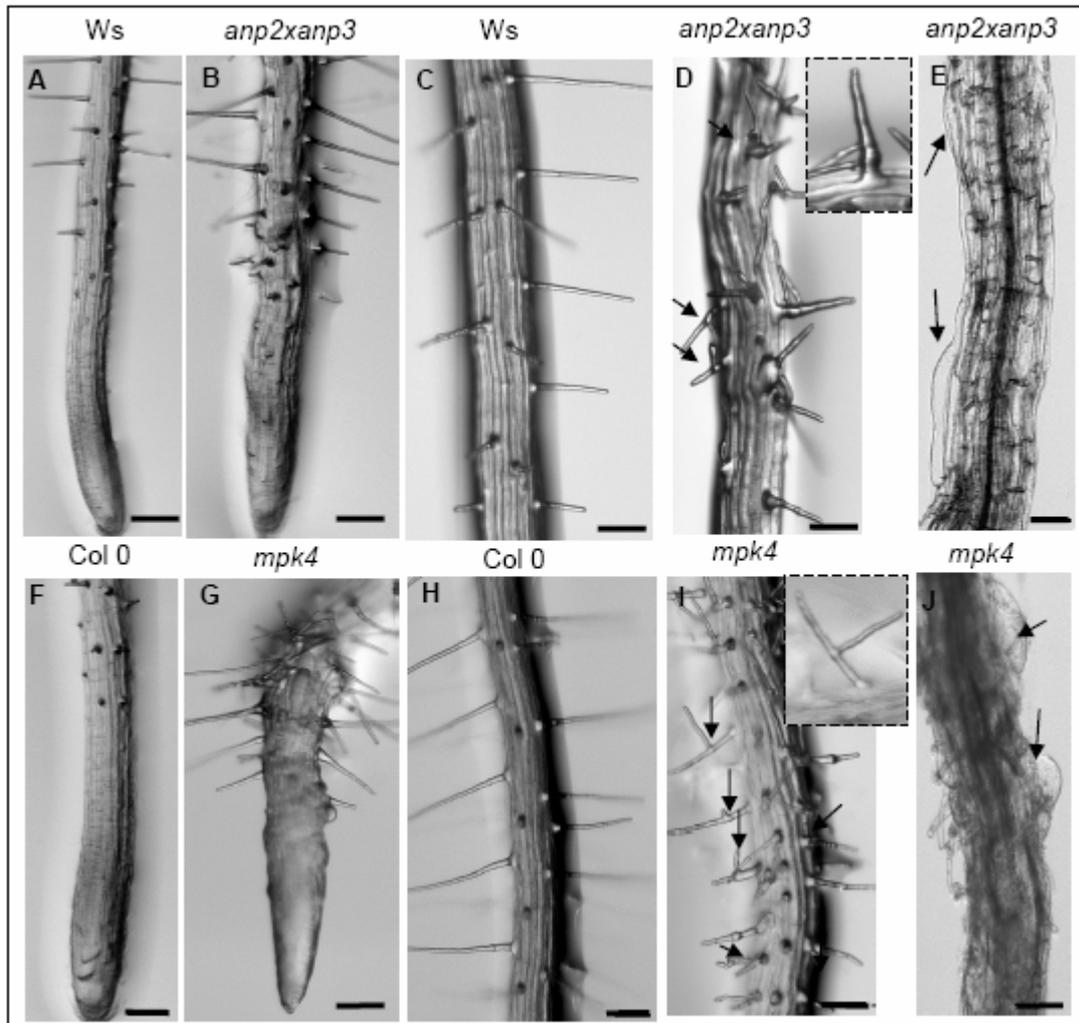


Abbildung 3.12: Wurzel und Wurzelhaar Phänotyp von *anp2xanp3* und *mpk4*

(A)-(J) Wurzelspitze und Wurzelhaarzone von WT und Mutanten Wurzeln. (A, C, F, H) Die WTs zeigen eine glatte Oberfläche der Wurzelspitze und Wurzelepidermis, sowie regelmäßig angeordnete Wurzelhaare. (B, G) Beide Mutanten weisen verdickte und unregelmäßige Wurzelspitzen auf im Vergleich zum WT (A, F). (D, I) Mutanten zeigen irregulär verlaufende Epidermiszellen und verzweigte Wurzelhaare (Pfeile) (Detail: Box). (E, J) Radiales Anschwellen von Wurzelepidermiszellen in beiden Mutanten (Pfeile).

Zeitraffer-Aufnahmen der Wurzelhaarzone zeigen das Entstehen der verzweigten Wurzelhaare in den Mutanten. Verfolgt man das Wachstum der Wurzelhaare in der *anp2xanp3* Mutante über einen Zeitraum von 90 min, so können mehrere charakteristische Merkmale des Wurzelhaarphänotyps dokumentiert werden. Es zeigen sich zum einen stark expandierte epidermale Zellen, die jedoch noch befähigt sind, Wurzelhaare auszubilden (Abb. 3.13). Des Weiteren wird deutlich, dass es bei der Ausbildung der verzweigten Wurzelhaare erst zum Stillstand des Wachstums der primären Spitze kommt, dann bildet sich im basalen Bereich des Wurzelhaars eine zweite Spitze, die dann auswächst (Abb. 3.13). Das polare Spitzenwachstum als solches scheint somit nicht gestört zu sein. Es kommt nur zu einem

bestimmten Zeitpunkt zu einer Verschiebung des Spitzenwachstums an eine neue Stelle. Nicht nur verzweigte Wurzelhaare bilden sich, sondern auch ektopisch auswachsende Wurzelhaare werden im Zeitraffer deutlich (Abb. 3.13 C, D).

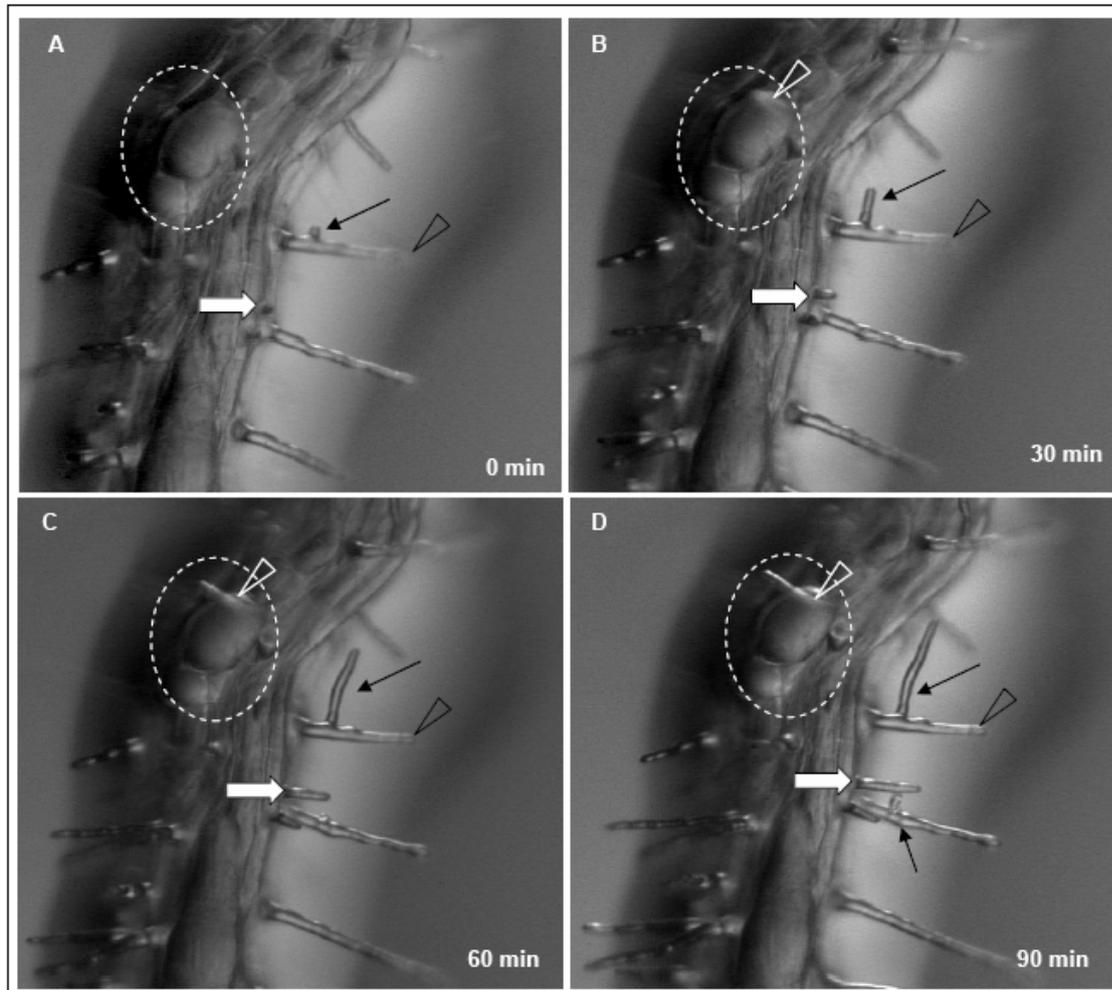


Abbildung 3.13: Zeitliche Bildfolge aus der Wurzelhaarzone der *anp2xanp3* Mutante

Darstellung des Wurzelhaarwachstums in 30 min Abständen. **Kreis:** stark expandierte epidermale Zelle mit auswachsendem Wurzelhaar (Pfeilspitze). **Schwarzer Pfeil:** markiert auswachsende zweite Wurzelhaarspitze, das Spitzenwachstum der neu auswachsenden Spitze ist nicht gestört, jedoch stoppt das Wachstum der ersten Wurzelhaarspitze (schwarze Pfeilspitze). **Weißer Blockpfeil:** markiert ektopisch auswachsendenes Wurzelhaar

Die Anzahl der verzweigten Wurzelhaare in beiden Mutanten ist im Vergleich zu den Kontrollpflanzen stark erhöht (Abb. 3.14). Bei *anp2xanp3* Mutanten können bis zu 50% abnormale Wurzelhaare gezählt werden, in der *mpk4* Mutante erhöht sich die Anzahl der verzweigten und abnormalen Wurzelhaare auf 70%. Als abnormale Wurzelhaare werden solche mit verdickter Basis definiert.

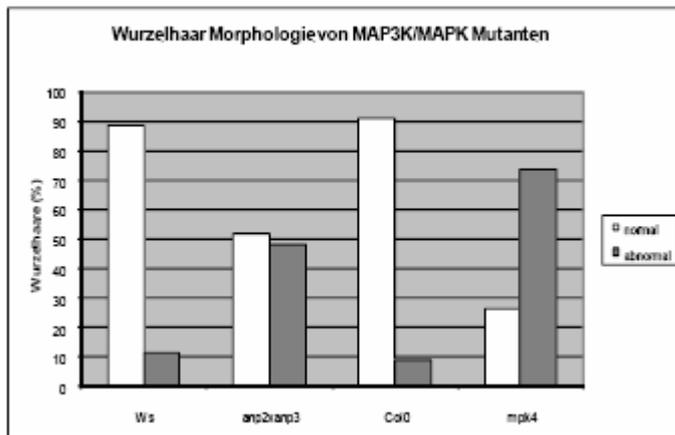


Abbildung 3.14: Graphische Darstellung des Wurzelhaar Phänotyps von *anp2xanp3* und *mpk4*

Dargestellt in % ist die Anzahl der verzweigten oder abnormal geformten Wurzelhaare in Mutanten im Vergleich zum entsprechenden WT. *mpk4* zeigt über 70 % und *anp2xanp3* ca. 50 % verzweigte und abnormale Wurzelhaare, die entsprechenden Kontrollen nur 9 % bzw. 11 %.

Durch das radiale Anschwellen der Wurzelepidermiszellen in beiden Mutanten sind die Wurzeln auch in ihrem Durchmesser beeinflusst. *anp2xanp3* Mutanten zeigen einen durchschnittlichen 44%igen Zuwachs in der gemessenen Wurzeldicke im Vergleich zu Kontrollpflanzen, bei den *mpk4* Mutanten betrug die Wurzeldicke sogar durchschnittlich 76 % mehr als in Kontrollpflanzen (Abb. 3.15).

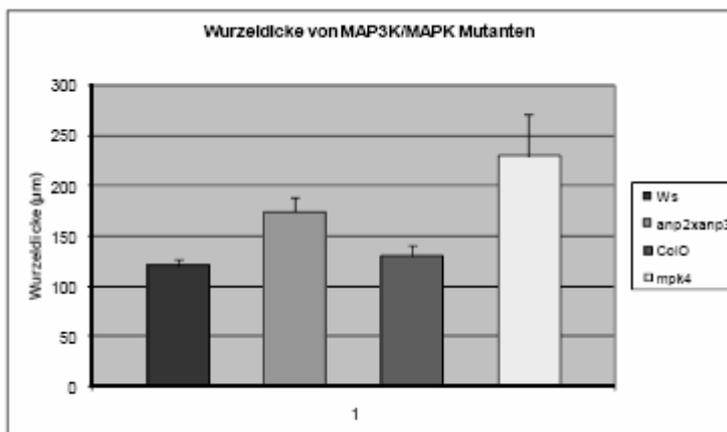


Abbildung 3.15: Graphische Darstellung der Wurzeldicke von *anp2xanp3* und *mpk4*

Dargestellt in µm ist der Mittelwert der Wurzeldicke von 30 gemessenen Pflanzen, jeweils Mutante und entsprechender WT. Beide Mutanten weisen eine Zunahme der Wurzeldicke auf im Vergleich zum WT. Am stärksten ausgeprägt in *mpk4*.

3.3 Zytologische Analysen von *anp2xanp3* und *mpk4*

3.3.1 Immunmarkierung von MT in *anp2xanp3* und *mpk4*

anp2xanp3 und *mpk4* Keimlinge sind wie in Abschnitt 2.1 beschrieben durch auffällige morphologische Zellveränderungen gekennzeichnet. Das radiale Anschwellen der epidermalen Zellen, sowie der auftretende Wurzelhaarphänotyp mit verzweigten Wurzelhaaren lassen auf eine mögliche Veränderung im MT-Zytoskelett in diesen Zellen schließen, da MT in pflanzlichen Zellen wichtig sind für die Determinierung und für die

spätere Aufrechterhaltung der Zellform. Um mögliche Veränderungen sichtbar zu machen wurden in beiden Mutanten die MT immunzytochemisch markiert. Dafür wurde die sogenannte "whole-mount labeling"-Methode verwendet, dabei können die Keimlinge als Ganzes strukturell intakt gefärbt und mikroskopiert werden (siehe Math.-Meth. 2.7). Die Immunmarkierung ist im Apikalbereich der Wurzel am stärksten und noch bis in die frühe Elongationszone gut zu beobachten. In den weiter basalwärts liegenden, ausdifferenzierten Zellen lässt sich aufgrund der großen ausgebildeten Zellsaftvakuolen meist keine hinreichend gute Fixierung und Markierung erreichen. In Kontrollpflanzen bilden MT im Bereich der Wurzelspitze ein feines und meist ungerichtetes angeordnetes Netzwerk aus (Abb. 3.16 A, C). Die meristematischen Zellen liegen in geordneten Zellreihen übereinander. In der meristematischen Region befinden sich zytokinetisch aktive Zellen, in denen Spindeln und Phragmoplasten klar markiert werden (Abb. 3.16 A, C). Bei den Mutanten ist eine Störung im kortikalen MT Netzwerk deutlich erkennbar. Dies äußert sich vor allen Dingen in einer starken Bündelung der MT im Kortex der Zellen (Abb. 3.16. B, D). Eine Bündelung erfolgt vor allen in solchen Zellen, die durch radiale Schwellung und irreguläre Zellformen auffallen. Durch die irregulären Zellformen verliert die Wurzelspitze ihre typische gleichmäßige Kontur. Geordnete Zellreihen sind kaum vorhanden. Des Weiteren werden atypische mitotische Strukturen sichtbar (Abb. 15).

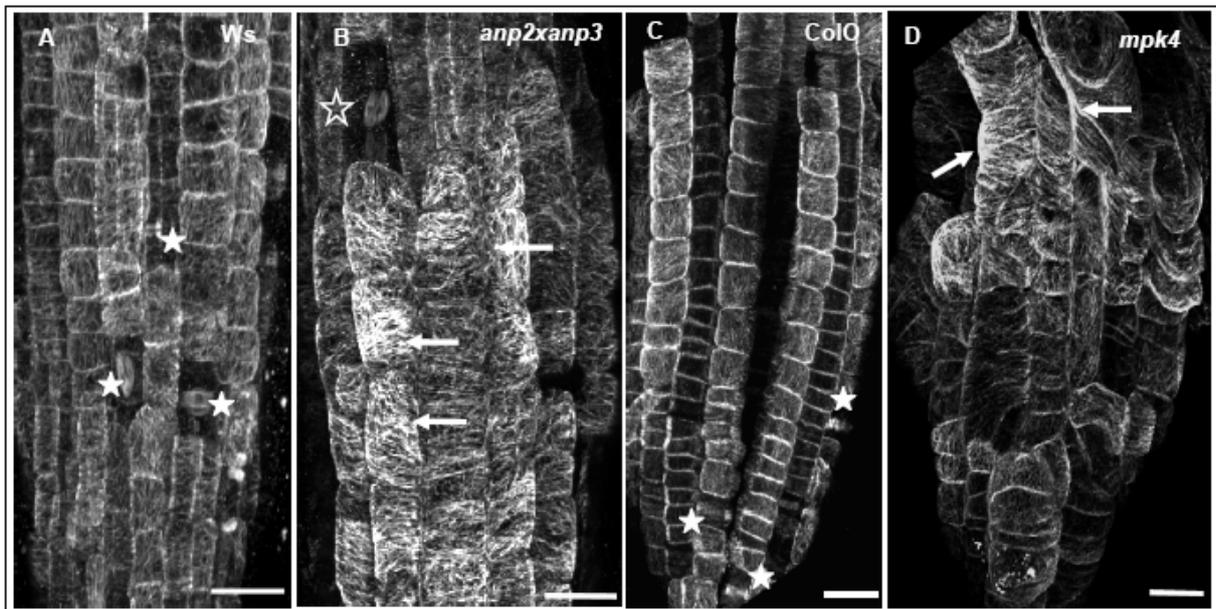


Abbildung 3.16: Immunmarkierung von MT in *anp2xanp3* und *mpk4*

KLSM Aufnahmen von Wurzelspitzen. (A, C) Die Rhizodermis des WTs besteht aus gleichmäßigen Zellreihen mit feinem MT Netzwerk im kortikalen Bereich. Mitosestadien wie Spindeln sind in einzelnen Zellen zu erkennen (A, C, Stern). (B, D) Beide Mutanten zeigen ausgeprägte MT Bündel im kortikalen Bereich (Pfeile), sowie ungeordnete und stark radial expandierte Zellen. Akkumulation von Spindeln in einer Zelle (B, Stern). Maßstab: 20µm

3.3.2 MT in transgenen *GFP-MBD-anp2xanp3* und *GFP-MBD-mpk4* Linien

Um die in Abschnitt 3.1 beschriebenen MT-Störungen mit einer weiteren unabhängigen Methode zu bestätigen und MT auch in anderen Geweben als der Wurzelspitze *in vivo* zu visualisieren, wurden transgene Linien generiert, bei denen die Mutanten mit einer GFP-fusionierten Mikrotubuli-bindenden Domäne (MBD) aus dem tierischen MAP4-Gen transfiziert wurden. Obwohl hier eine Domäne aus einem tierischen Mikrotubuli-assoziierten Protein (MAP4) zum Einsatz kommt, ist dieses Konstrukt auch in Pflanzen für die Visualisierung der MT geeignet (Marc et al. 1998). Transgene Linien konnte für die *anp2xanp3*-Mutante und für die *mpk4* Mutante etabliert werden und somit konnten nun *in vivo* MT dokumentiert und analysiert werden. Parallel zur Herstellung der *GFP-MBD* Mutanten Linien, wurden auch Ws und Col 0 als WT Kontrollen mit demselben *GFP-MBD* Konstrukt transfiziert. Bei diesen Kontrollpflanzen verlaufen MT in noch wachsenden Wurzelepidermiszellen parallel angeordnet und leicht quergestellt zur Wachstumsrichtung. (Abb. 3.17 C, I). In ausgewachsenen epidermalen Zellen, sowie in Trichoblasten und Wurzelhaaren bilden MT ein ungerichtet organisiertes Netzwerk aus (Abb. 3.17 A, G). In den untersuchten Epidermiszellen der Mutanten verlaufen die MT ungeordnet und weisen eine starke Bündelung bzw. Verdichtung in der Zellperipherie auf (Abb. 3.17 D-F, H, J). Zusätzlich weicht auch hier die Zellform der Epidermiszellen maßgeblich von denen des WTs ab. Die Zellen der Mutante sind ungleichmäßig angeschwollen (Abb. 3.17 F, H) und enthalten Reste von abortiven Querwänden, die ins Zellinnere hereinragen (Abb. 3.17 D-E). Die detaillierten Aufnahmen von MT in Wurzelhaaren weisen auch hier maßgeblich auf Defekte in der MT Anordnung hin. In den für die Mutante typischen verzweigten Wurzelhaaren, bilden MT starke Bündel aus, die sich vom basalen Teil bis in die Wurzelhaarspitzen ziehen (Abb. 3.17 B).

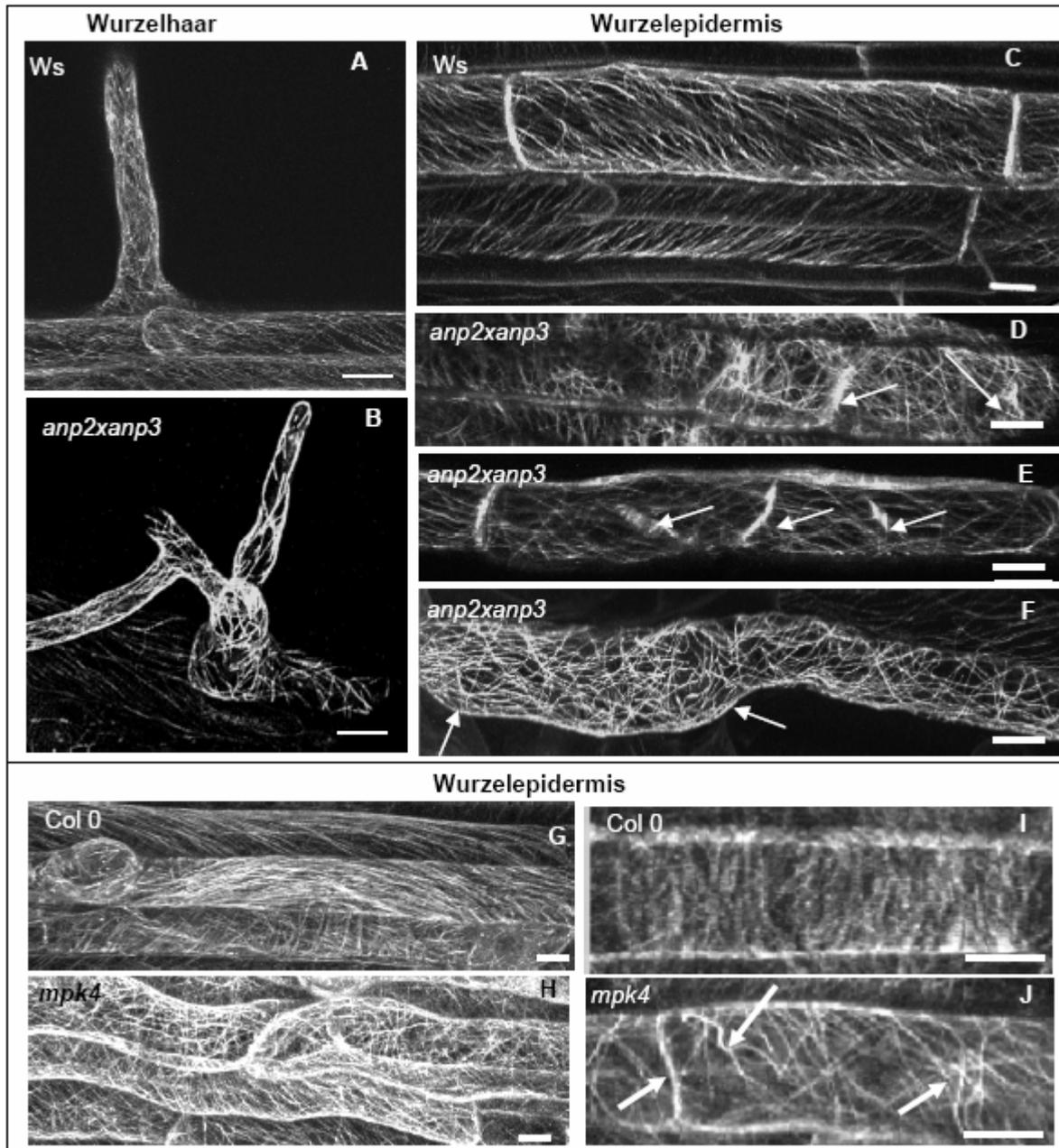


Abbildung 3.17: *in vivo* Lokalisierung von MT in *anp2xanp3* und *mpk4* Wurzeln

KLSM Aufnahmen von MT in Ws und *anp2xanp3* sowie Col 0 und *mpk4* visualisiert durch *35S::GFP-MBD*. (A) Wurzelhaar von Ws Keimling; feines, ungeordnetes MT Netzwerk. (B) Wurzelhaar von *anp2xanp3* Keimling; mehrfach verzweigtes Haar mit dicken kortikalen MT Bündeln. (C) Wurzelepidermis von Ws Keimlingen; parallel quer zur Wachstumsrichtung verlaufende MT im Kortex, gleichmäßige Zellform der epidermalen Zellen. (D-F) Wurzelepidermis von *anp2xanp3* Keimling. (D) ungeordnetes MT Netzwerk mit Akkumulation von MT im kortikalen Bereich (Pfeile), (E, Pfeile) sowie in der Mittelebene der Zelle (F) Ausbildung von Bündeln im Kortex, (F, Pfeile) sowie untypische Ausbuchtungen der epidermalen Zellen (G) Wurzelepidermiszellen von Col 0 Keimlingen, feines kortikales MT Netzwerk mit gleichmäßiger Form der epidermalen Zellen (H) Wurzelepidermis von *mpk4* Keimlingen, MT durchziehen ungeordnet den Kortex, Ausbildung unregelmäßiger Zellformen (I) Col 0: Detail einer wachsenden Epidermiszellen mit parallel, transversalen kortikalen MT (I) *mpk4*: Detail einer jungen Epidermiszelle mit ungeordnet verlaufenden MT, Bildung von MT Bündeln und atypischen wellenförmigen MT (Pfeile) Maßstab: 20µm (A, B), 10µm (C-J).

Betrachtet man das Hypokotyl der *anp2xanp3* und *mpk4* Keimlinge im Vergleich zu WT-Keimlingen fallen extrem unregelmäßige Zellformen mit radial angeschwollenen epidermalen Zellen auf (Abb. 18 A, B, I, J). In WT-Pflanzen zeichnen sich Hypokotylzellen durch eine einheitliche wabenförmige Zellstruktur aus (Abb. 3.18 A, G), in denen feine MT transversal zur Wachstumsrichtung verlaufen (Abb. 3.18 C). Die gleichmäßige Form des Hypokotyls ist in den Zellen der *anp2xanp3* und der *mpk4* Mutante stark gestört und gekennzeichnet durch geschwollene epidermale Zellen (Abb. 3.18 B, J). In diesen Zellen verlaufen die MT nicht nur stark gebündelt, sondern zeigen irreguläre, wellenförmige und schlaufenähnliche Formationen (Abb. 3. 18 C, H). Schaut man sich die Epidermiszellen der Kotyledonen an, so wird auch dort ein ähnliches Bild sichtbar. In Epidermiszellen der WT- Pflanzen findet man ein feines ungeordnetes MT Netzwerk, welches sich klar von den radial und eng parallel verlaufenden MT in den Schließzellen der Stomata unterscheidet (Abb. 3.18 E, K). Hierbei zeigt sich auch deutlich, wie die räumliche Anordnung der MT zur Aufrechterhaltung unterschiedlicher Zellformen beiträgt. In den Mutanten findet wieder eine starke Umorientierung des MT-Netzwerkes statt. In Epidermiszellen werden starke MT Bündel sichtbar. Die Zellformen und Zellgrößen der Epidermiszellen und Schließzellen sind klar beeinträchtigt (Abb. 3.18 F, L). Zusätzlich findet sich bei der *mpk4* Mutante in einigen Fällen eine atypische Klusterbildung von Stomatazellen (Abb. 3. 18 L), die nicht der normalen „one cell spacing“ Regel von Stomata zu Epidermiszellen folgt. In WT-Pflanzen befindet sich zwischen zwei ausdifferenzierten Stomata mindestens eine Epidermiszelle (Abb. 3. 18 E).

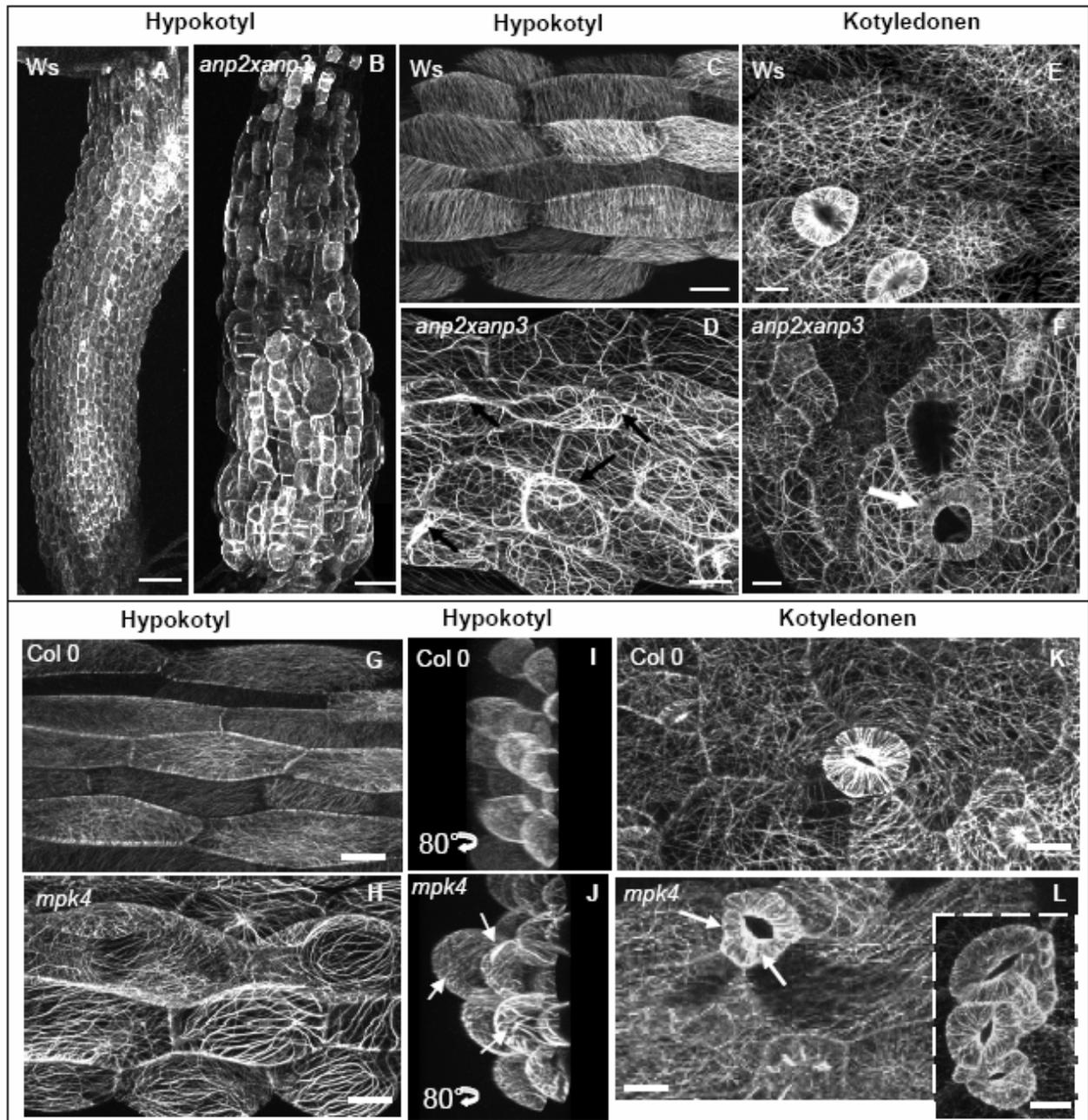


Abbildung 3.18: *in vivo* Lokalisierung von MT in oberirdischen Organen der *anp2xanp3* und *mpk4* Mutante KLSM Aufnahmen von MT in WT und *anp2xanp3* visualisiert durch das *35S::GFPMBD* Konstrukt.

(A) Übersicht über das Hypokotyl von WT Keimling (B) Übersicht über das Hypokotyl eines *anp2xanp3* Keimlings; mit deutlich geschwollenen und unregelmäßig geformten epidermalen Zellen. (C) Detailaufnahme des Hypokotyls von WT Keimlingen; gleichmäßige, wabenförmige Zellen mit transversal ausgerichteten MT. (D) Detailaufnahmen des Hypokotyls von *anp2xanp3* Keimlingen; keine wabenförmige Zellstruktur mehr erkennbar, dafür starke Bündelung der MT im kortikalen Bereich (Pfeile), mit irregulären wellen- und schlaufenförmigen MT. (E) Detailaufnahme der Kotyledonen von WT Keimling, Epidermiszellen sind durch ungeordnetes MT Netzwerk gekennzeichnet, Stomata weisen parallel verlaufende MT auf (F) Detailaufnahmen der Kotyledonen von *anp2xanp3* Keimling, extreme Bündelung von MT im kortikalen Bereich der Epidermiszellen, Stomata in ihrer Zellform stark vergrößert.

Maßstab: 50µm (A,B) 20µm (C-F). (G,I) Projektion aus 52 optischen Schnitten in 0.65µm Abstand, z = 33.8µm (H,J) Projektion aus 96 optischen Schnitten in 0.65µm Abstand, z = 62µm

3.3.3 *in vivo* Lokalisierung von MAP65-1

In tierischen wie pflanzlichen Zellen wird die Dynamik von MT hauptsächlich durch Mikrotubuli-assoziiierende Proteine (MAP) reguliert. Einige MAPs sind an stabilisierenden, andere an destabilisierenden Prozessen beteiligt. Stabilisierende MAPs zeichnen sich durch eine Mikrotubuli-bindende Domäne aus. In *A. thaliana* tritt dabei vor allem die MAP65-Familie hervor, die mit ihren neun identifizierten Isoformen (Hussey, et al 2002) an wichtigen dynamischen Prozessen beteiligt ist (s. *Einleitung 1.4*). Die Fähigkeit von MAPs an MT zu binden kann durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung beeinflusst werden. In neuesten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass MPK4 und MPK6 in der Lage sind, eine der neun bekannten MAP65 Isoformen von Arabidopsis, nämlich MAP65-1, zu phosphorylieren (Smertenko et al. 2006). Des Weiteren wurde in der gleichen Arbeit gezeigt, dass die Fähigkeit des Bündelns von MT abhängig ist vom Phosphorylierungsstatus der entsprechenden MAP65 Isoform. Liegt die Isoform unphosphoryliert vor, so werden die Bündelungseigenschaften verstärkt (Smertenko et al. 2006). Zusätzlich wurde gezeigt, dass MAP65-1 hauptsächlich an kortikalen MT lokalisiert ist. Somit schien diese Isoform ein geeigneter Kandidat zu sein, die auftretenden kortikalen MT Bündelungen in den MAPK Mutanten zu verursachen. Um diese Modellvorstellung zu überprüfen, sollten als erstes die bündelnden Eigenschaften von MAP65-1 *in vivo* mithilfe eines GFP Fusionsproteins untersucht werden. Bei der transienten Expression in Zwiebelepidermiszellen kommt es zu einer eindeutigen Lokalisierung von GFP-MAP65-1 an den kortikalen MT (Abb. 3.19 A). In den Bereichen von einzeln verlaufenden MT bindet GFP-MAP65-1 nur an bestimmten Abschnitten der MT und es zeigt sich eine unterbrochene/punktierte Markierung des Proteins entlang dieser MT. Nur an gebündelten MT findet sich eine Lokalisierung von GFP-MAP65-1 entlang der gesamten Länge der MT (Abb. 3.18 A). Bei der Überexpression des Proteins in Tabakblattepidermiszellen, die nach längerer Expressionszeit in transient transformierten Geweben regelmäßig zu beobachten ist, werden die bündelnden Eigenschaften von MAP65-1 besonders deutlich. Aufnahmen von Blattgewebe einen Tag nach der Infiltration beweisen die Anlagerung von GFP-MAP65-1 an bestimmte Abschnitte von tubulären Strukturen im Kortex (Abb. 3. 19 B). Betrachtet man jedoch das infiltrierte Gewebe 2 Tage nach der Infiltration, so werden von GFP-MAP65-1 MT-ähnliche Bündel visualisiert, die den kortikalen Bereich der Epidermiszellen durchziehen (Abb. 3.19 B).

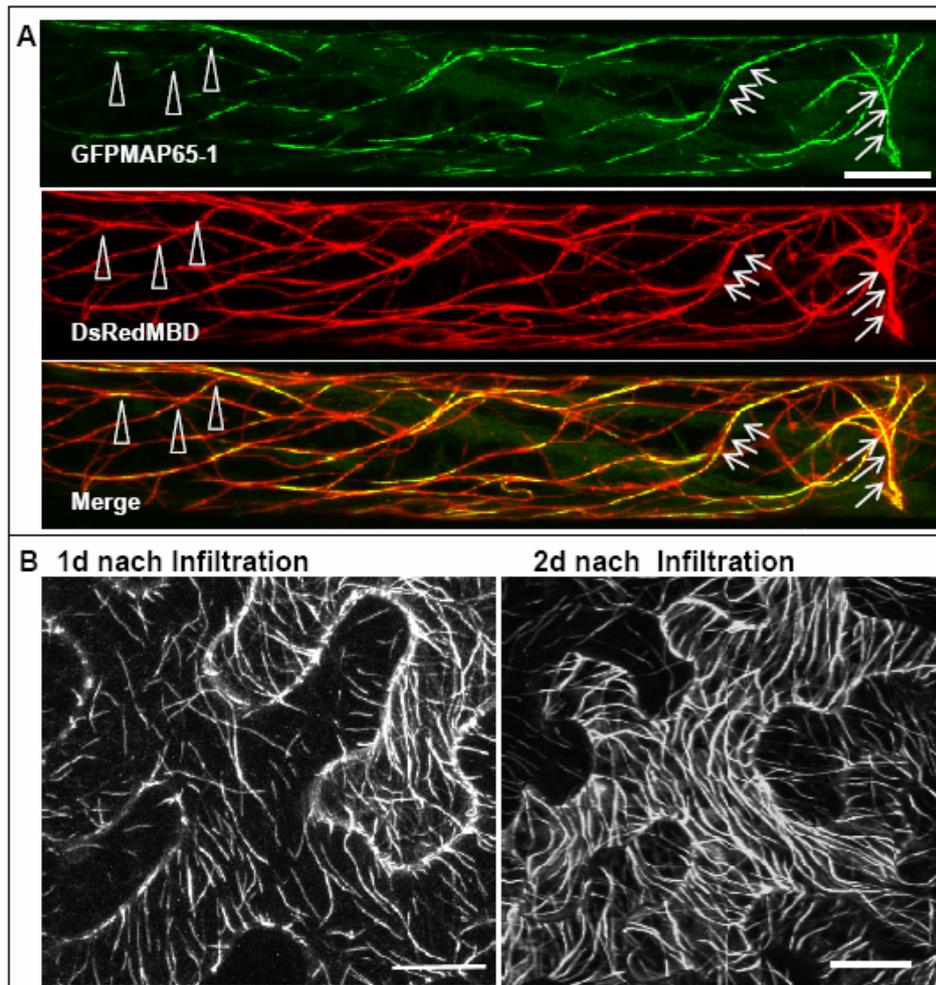


Abbildung 3.19: Transiente Expression von GFP-MAP65-1 in pflanzlichen Zellen

(A) Ko-Lokalisierung von GFP-MAP65-1 mit DsRed-MBD in Epidermiszellen von *Allium cepa* nach „particle bombardment“. GFP-MAP65-1 (grün) bindet an kortikale MT (rot). In Bereichen von MT Bündeln kommt es zur durchgängigen Markierung von GFP-MAP65-1 entlang der MT (A, Pfeile). An anderen MT kommt es zu einer unterbrochenen Dekorierung von GFP-MAP65-1 entlang der MT (A; Pfeilspitzen) (B) Lokalisierung von GFP-MAP65-1 in *N. benthamiana* Blattepidermiszellen nach Agrobakterien-vermittelter Transfektion. 1 Tag nach Infiltration werden Abschnitte im kortikalen Bereich von dem Fusionsprotein markiert. 2 Tage nach Infiltration zeigt sich ein dichtes, kortikales Netzwerk mit durchgängiger GFP-MAP65-1 Lokalisierung. Maßstab: 20µm

3.3.4 Immunmarkierung von MAP65-1 in *anp2xanp3* und *mpk4*

Um die Verteilung von MAP65-1 an den kortikalen MT in beiden Mutanten näher zu untersuchen, wurden Immunmarkierungen mit einem spezifischen Antikörper gegen die *A. thaliana* Isoform MAP65-1 durchgeführt. Die Immunmarkierung bestätigte eindeutig Unterschiede in der Proteinverteilung von MAP65-1 zwischen Kontrolle und Mutanten. In den Kontrollpflanzen kommt es zu einer teilweisen unterbrochenen Dekorierung der MT durch MAP65-1 (Abb. 3.20 A, D). Nur in den Bereichen, in denen MT Bündel auftreten, befindet sich MAP65-1 entlang der gesamten MT-Länge (Abb. 3.20 A). Vergleicht man dazu

die Markierung in *anp2xanp3* und *mpk4*, so findet sich dort in fast allen Zellen eine durchgehende Bindung von MAP65-1 an die kortikalen MT (Abb. 3.20 B, E). Besonders auffallend ist die erhöhte Markierung von MAP65-1 an den kortikalen Bereichen in stark geschwollenen Zellen. Diese Bereiche zeichnen sich zusätzlich durch eine Akkumulation von MT Bündeln aus (Abb. 3.20 C; F). Die veränderte Lokalisierung von MAP65-1 ist in der *mpk4* Mutante deutlich stärker ausgeprägt als in der *anp2xanp3* Mutante.

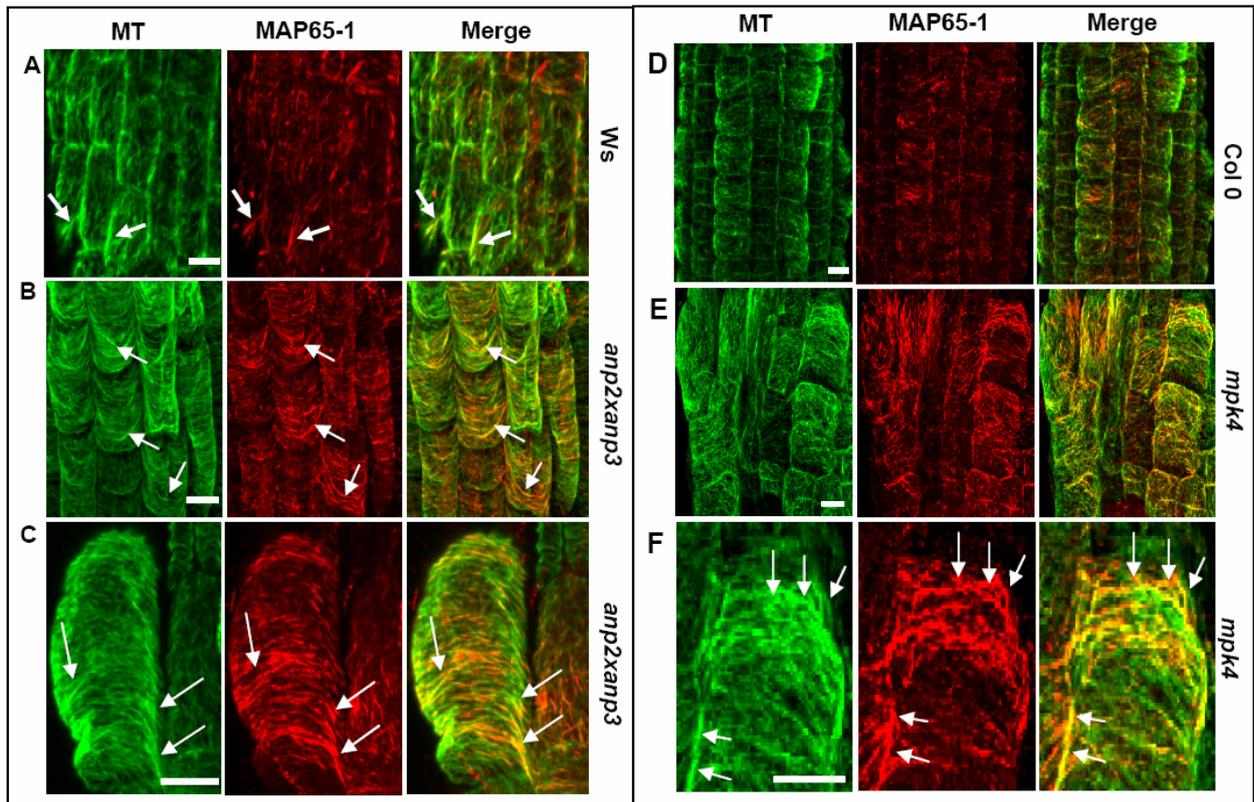


Abbildung 3.20: Immunmarkierung von MT und MAP65-1 in *anp2xanp3* und *mpk4*

KLSM Aufnahmen von epidermalen Zellen der Wurzelspitze, dargestellt in grün sind MT, in rot sichtbar die Lokalisierung von MAP65-1 (A,D) In WT Keimlingen ist ein feines MT-Netzwerk erkennbar mit unterbrochener MAP65-1 Markierung in den kortikalen Bereichen. Nur in Bereichen mit MT Bündeln kommt es zu einer durchgängigen MAP65-1 Lokalisierung entlang der MT. (A, Pfeile) (B, C, E, F) In beiden Mutanten zeigt sich eine prominente Markierung von MAP65-1 entlang der MT Bündel. (C, F) Deutlich hervortretend in geschwollenen Zellen mit MT Bündeln im Kortex und erhöhter Bindung von MAP65-1 in diesen Bereichen (C, F, Pfeile)

Maßstab 10µm (A, B, D, E) 5µm (C, F)

3.4 Organisation des Zytoskeletts während des Zell Zyklus

Pflanzen besitzen besondere MT Anordnungen, dazu gehören die kortikalen MT und endoplasmatischen MT in Interphasezellen. Mitotische aktive Zellen, die in den Zellzyklus eintreten, zeigen das Prä-Prophase Band (PPB), welches in Höhe des Zellkerns unterhalb der

Plasmamembran im kortikalen Zytoplasma um die Zelle herumläuft. Die Spindel baut sich auf, wenn das PPB bereits wieder verschwunden ist, und aus den Resten der Telophasespindel geht dann, als letzte besondere MT-Struktur, der Phragmoplast hervor. Der ebenso wie die Spindel aus zwei ineinander greifenden, gegensätzlich orientierten MT-Einheiten besteht. Die Methode des „whole-mount labeling“ von *A. thaliana* Wurzeln eignet sich nicht nur für die Dokumentation der kortikalen MT Netzwerke (s. *Ergebnis 3.3*), sondern kann auch für die detaillierten Analysen von Mitosestadien im Wurzelmeristem von *A. thaliana* genutzt werden. Um die Probleme der Antikörperpenetration in tiefere Gewebeschichten zu umgehen, wurden bisher für die Analysen von Mitosestadien meist Zellkulturzellen verwendet. Diese Zellen sind zwar mitotisch aktiv, liegen jedoch artifiziell vereinzelt und nicht im Gewebeverband vor. Durch Verbesserungen des „whole-mount“ Protokolls, besonders in Bezug auf die Darstellung der empfindlichen Zytoskelettelemente (s. *Mat .u. Meth 2.7*), konnten nun nicht nur in Kontrollpflanzen die MT und das Aktinzytoskelett erfolgreich markiert werden, sondern das Protokoll ermöglichte auch die detaillierte Untersuchung beider Mutanten nach weiteren, möglichen Defekten im Aufbau des Zytoskeletts.

3.4.1 MT-Markierung in meristematischen Zellen der Wurzel

Die einzelnen Phasen der Mitose, in denen es gerade im MT-Netzwerk zu essentiellen Umgestaltungen kommt, konnten durch Immunmarkierungen mit Tubulin-Antikörpern in den teilungsaktiven Wurzelspitzen gut dokumentiert werden (Abb. 3.21, Übersicht und Detail).

So zeichnen sich Interphasezellen durch kortikale MT aus, die an den longitudinalen Wänden quer zur Wachstumsrichtung orientiert sind. Im Zytoplasma befinden sich die endoplasmatischen MT, die dort ein feines Netzwerk bilden und sich vom Nukleus radial in Zellperipherie ausbreiten. Durch die Bildung des Prä-Prophase Bandes (PPB) wird die Zellteilungsebene festgelegt, dabei kommt es zur Bündelung von MT in einer ringförmigen Struktur, in deren Mitte der Nukleus liegt. Vom Nukleus ziehen sich während dieser Phase MT zu den transversalen Zellwänden. Durch den Eintritt in die Metaphase werden die kortikalen MT abgebaut und es entsteht die Metaphasespindel. Während des Übergangs von Metaphasespindel zur Anaphase werden die Chromatiden an die entgegengesetzten Pole der Zelle gezogen. An den Polen der Spindel werden MT sichtbar, die vom Spindelpol zur Zellwand verlaufen. Gegen Ende der nun einsetzenden Telophase bildet sich der Phragmoplast. Der Bereich zwischen den beiden MT-Pallisaden ist von Fluoreszenz ausgespart und markiert den Bereich der sich bildenden Zellplatte. Vom Phragmoplasten

ziehen sich feine MT in die Zellperipherie. Nach erfolgreicher Zytokinese lösen sich die Phragmoplasten MT auf und es entstehen zwei Tochterzellen, in denen die kortikalen MT wieder transversal angeordnet sind und die endoplasmatischen MT vom Nukleus radial zur Peripherie verlaufen.

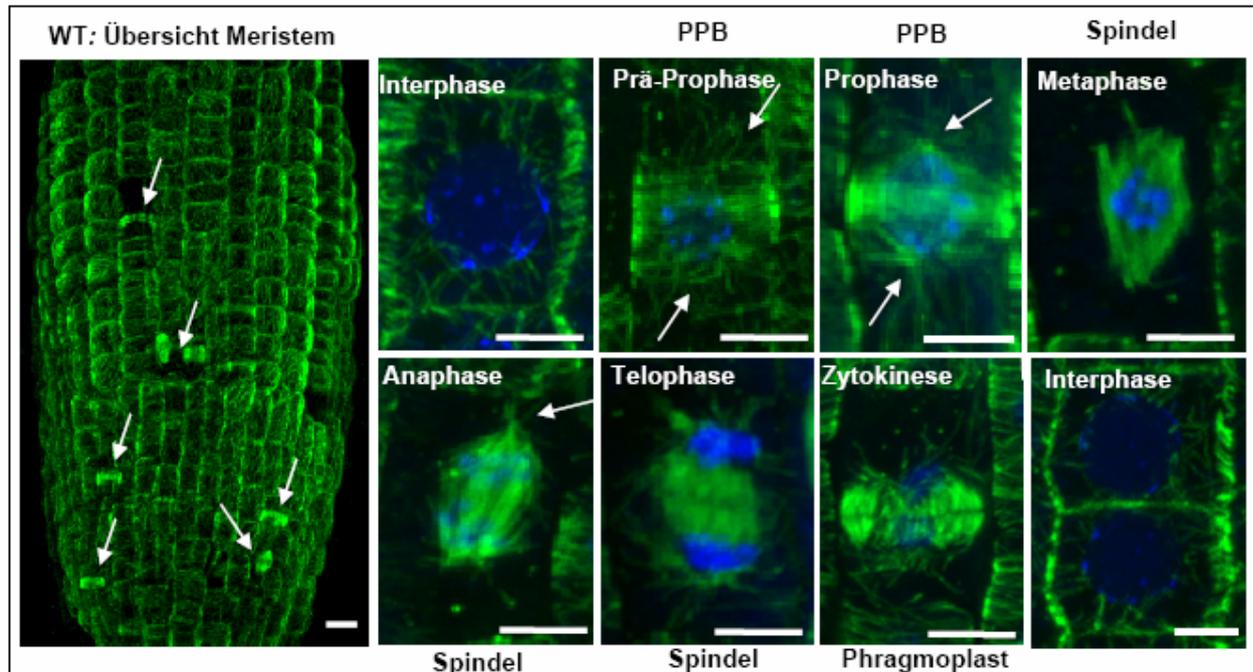


Abbildung 3.21: Immunmarkierung von MT und DAPI Färbung von Nuklei in meristematischen Zellen
 WT-Keimling; Übersicht über den Apikalbereich einer Wurzel markiert mit Tubulin Antikörper (grün) und DAPI (blau). Feines kortikales MT Netzwerk in Interphasezellen, mitotisch-aktive Meristemzellen verteilt in der Wurzelspitze. Detailaufnahmen von Interphasezellen und Mitose- und Zytokinesestadien. Maßstab 10µm (Übersicht) 5µm (Detail)

Auf die zytologischen Defekte in beiden Mutanten wurde im Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2. schon hingewiesen. Da *anp2xanp3* als zytokinetische Mutante publiziert wurde und die MT für die Zytokinese in Pflanzen wichtig sind, wurden beide Mutanten auf zytokinetische Defekte hin untersucht. Bei den ersten Analyse von optischen Schnitten durch die Mittelebene der Wurzel wird der Verlust der Zellordnung deutlich, der sich in beiden Mutanten durch großlumige, oftmals mehrkernige Zellen äußert (Abb. 3.22. B, F). Im Extrem treten bis zu acht Kerne in einer Zelle auf (Abb. 3.22 F). In diesen Zellen vergrößert sich das Zellvolumen bis zum 10fachen im Vergleich zu einkernigen Kontrollzellen. Des Weiteren weisen diese mehrkernigen Zellen ins Zellinnere hereinragende Zellwandreste auf, die auf eine fehlerhafte Zytokinese hindeuten. Durch die Anfärbung der Plasmamembran mit dem Styryl Farbstoff (FM-Dye 4-64) werden Zellwandreste und schief orientierte Zellplatten abgebildet (Abb. 3.22 D, H), die auf eine unvollständig abgelaufene Zytokinese hinweisen und somit die

Mehrkernigkeit erklären. Die eigentliche Karyogenese scheint in beiden Mutanten nicht beeinträchtigt zu sein.

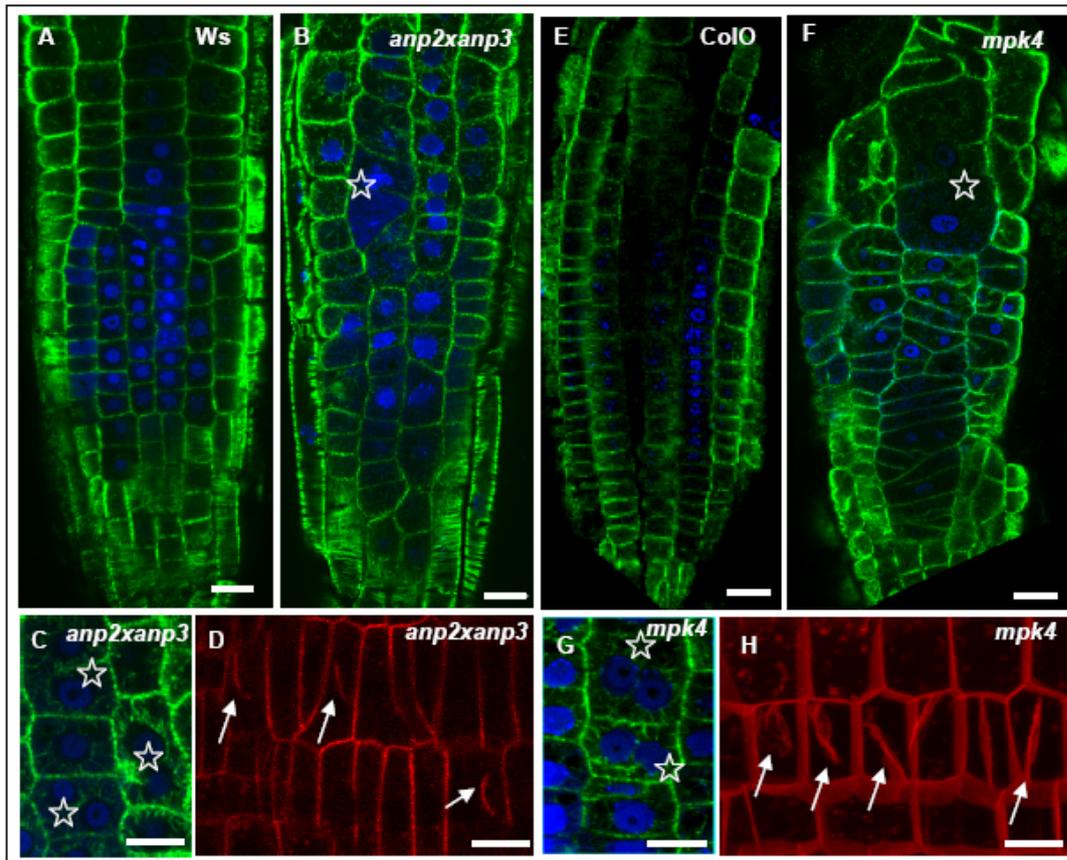


Abbildung 3.22: Immunmarkierung von MT und FM 4-64 Färbung in *anp2xanp3* und *mpk4*

KLSM Aufnahmen von einzelnen optischen Mittelschnitten durch Wurzelspitzen. (A, C) WT zeigt gerade angeordnete Zellreihen mit klar definierten und gerade verlaufenden Zellgrenzen. (B, F) Bei den Mutanten ist die Ausrichtung der Zellreihen ungeordnet. Im Vergleich zum WT sind großlumige, mehrkernige Zellen vorhanden (Sterne). (C, G) Detailansicht von binukleären Zellen. (D, H) FM-4-64 Markierung in Mutanten; abortive Zellplatten, mit schiefer Orientierung und/oder wellenförmiger Struktur (Pfeile) Maßstab: 10µm (H) Projektion von 8 optischen Schnitten in 0.65 µm Abstand: z= 5.2 µm

Betrachtet man Mitose- und Zytokinesstadien in den Mutanten, die durch Immunmarkierung mit anti-Tubulin dargestellt werden, so zeigt sich eine Häufung gleicher Stadien in direkt angrenzenden Zellen. In Abbildung 3.23 ist dies am Beispiel von PPB-Stadien in *anp2xanp3* Keimlingen dargestellt. Eine solche Synchronisation von Mitose- und Zytokinesstadien in benachbarten Zellen ist in WT-Pflanzen nie zu finden. Nebeneinander liegende Zellen können zwar gleichzeitig mitotisch aktiv sein, befinden sich jedoch immer in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus (Abb. 3.23)

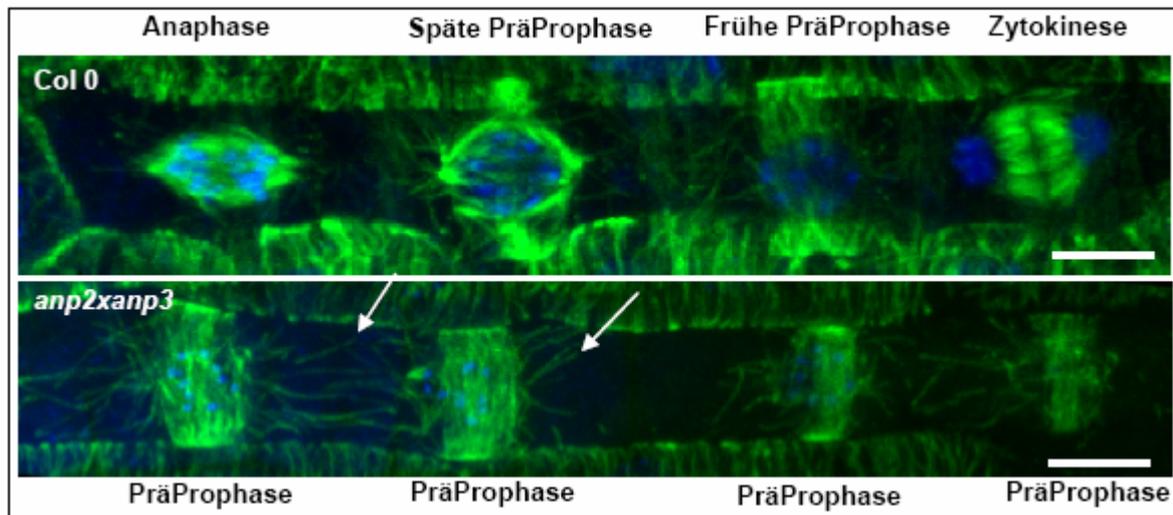


Abbildung 3.23: Immunmarkierung von MT im Meristem von WT und *anp2xanp3*

Aufnahme von 4 nebeneinander liegenden Zellen, die sich in der Zellteilung befinden. **Col 0**: Beim WT werden 4 unterschiedliche Mitose-Stadien sichtbar. ***anp2xanp3***: In der Mutante sind alle Zellen im gleichen Stadium (Prä-Prophase). Deutlich zu sehen, MT die sich strahlenförmig vom Nukleus ausdehnen (Pfeile) Maßstab: 5µm
Projektion aus 15 optischen Schnitten in 0.65µm Abstand: $z = 9.75 \mu\text{m}$

Des Weiteren sind viele der Spindeln und Phragmoplasten nicht senkrecht zur Teilungsebene angeordnet, sondern in einem beliebigen Winkel schief zur Teilungsebene ausgerichtet (Abb. 3.24 A, D). Im Aufbau zeigen diese PPBs und Spindeln jedoch keinen auffälligen Unterschied zu WT-Pflanzen. Auch die Phragmoplasten in den Zellen der Mutanten lassen einen durchaus regulären Aufbau mit zwei MT-Stapeln und der freigelassenen Mittelzone erkennen. Jedoch bleiben sie asymmetrisch nur an einer Seite mit einer Längswand verbunden und scheinen somit nicht die normale Expansion zu durchlaufen (Abb. 3.24 B, E, F). Darüber hinaus konnten bis zu acht Phragmoplasten in einer Zelle beobachtet werden, die jeweils nur mit einer Seite die Mutterzellwand erreicht hatten und dann möglicherweise ihre Entwicklung einstellten (Abb. 3.24 E). Dieses Phänomen würde die in die Zelle hineinragenden Zellwandreste erklären, die immer wieder in den beiden Mutanten im meristematischen Gewebe beobachtet werden können.

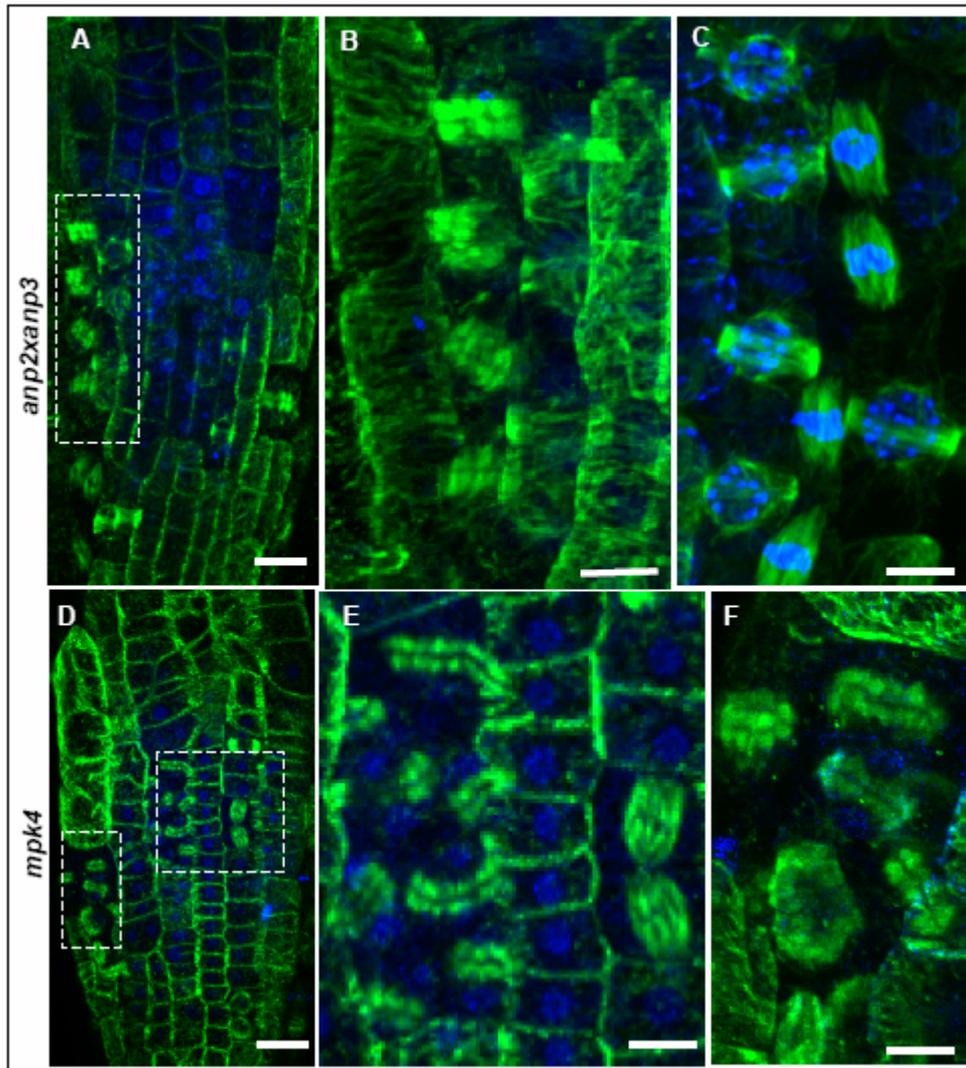


Abbildung 3.24: Immunmarkierung von MT im Meristem von *anp2xanp3* und *mpk4*

(A, D) Übersichten von Wurzelspitzen beider Mutanten. Deutlich erkennbar das gehäufte, gruppenweise Auftreten von mitotischen und zytokinetischen Stadien (Box). (B) Detail aus (A) Mehrere schief gestellte Phragmoplasten in nebeneinander liegenden Zellen. (C) Detail von 5 PPBs und 4 Spindeln nebeneinander liegend und schräg zur Teilungsebene orientiert. (E, F) Detail aus (D) Akkumulation von abnormal orientierten Phragmoplasten, sowie 2 Spindeln in einer Zelle. Maßstab: 10µm (A,D) 5µm (B,C,E,F)

Da Immunmarkierungen an fixierten Präparaten keine dynamischen Prozesse wiedergeben können, wurden *in vivo* Beobachtungen an Pflanzen der transformierten GFP-MBD *anpxanp3* Linie durchgeführt. Dies ermöglichte die zeitliche Analyse von Mitose und Zytokinese relevanten Stadien in der Mutante. Dabei zeigte sich, dass es zu einer generellen Verzögerung im Ablauf der Mitose und Zytokinese kommt. Normalerweise durchläuft eine Zelle, bis sie in die nächste Mitose eintritt, einen kompletten Zellzyklus in ca. 60 min. Bei der Mutante dauert der Zellzyklus bis zu 90 min und wird nicht mit einer vollständigen Zytokinese abgeschlossen. Der Phragmoplast expandiert ungleichmäßig, und löst sich auf bevor er beide

Mutterzellwände erreicht hat (Abb. 3.25 A-F). Dadurch bedingt kann die Zellplatte nicht mit den Mutter-Zellwänden fusionieren und es entstehen unvollständige Zellwände, die in die Zellen hereinragen. Zusätzlich konnten aberrante Strukturen wie in Abbildung 3.25 (G-L) aufgenommen werden. Dabei zeigten sich zwei Spindel Strukturen, die miteinander verbunden in der Zelle vorliegen (Abb. 3.25 H-J). Dabei handelt es sich um eine Metaphase Spindel und eine abnorm geformte phragmoplastenartige Telophasespindel. Es kommt hierbei sogar zur Auflösung der Spindel MT ohne eine Phragmoplastenbildung erkennen zu lassen.

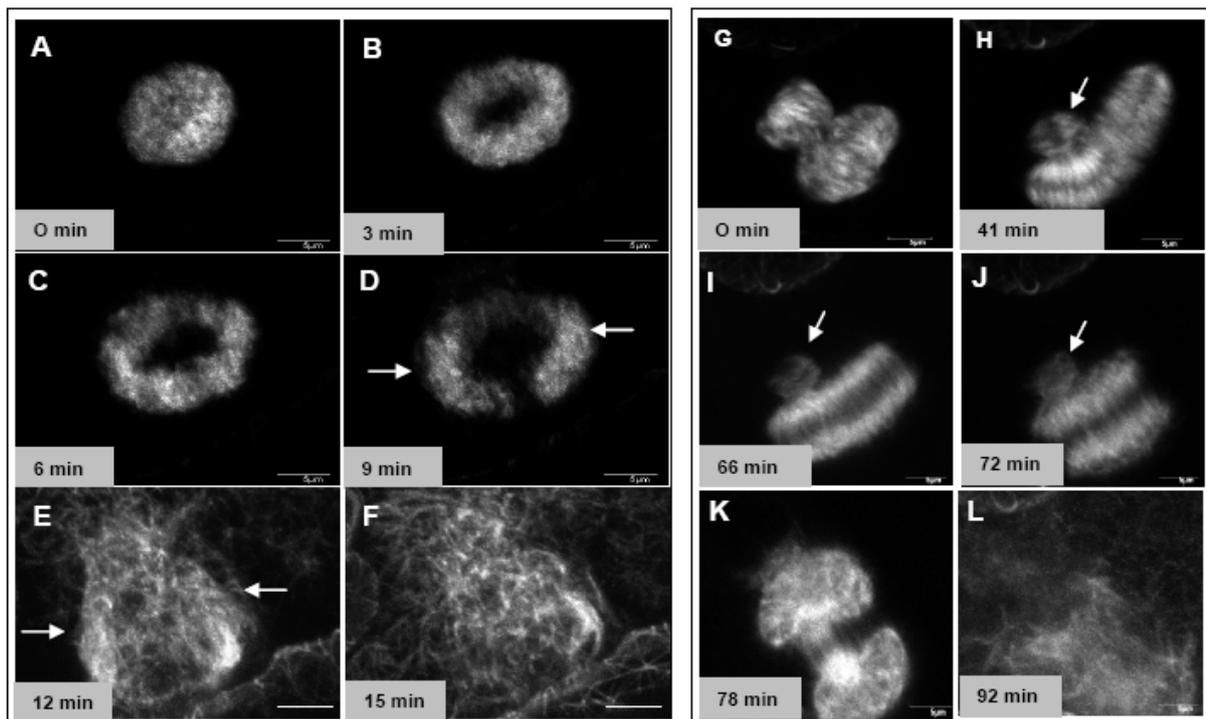


Abbildung 3.25: *in vivo* Aufnahmen von Zellteilungsstadien in *GFPMBD anp2xanp3* Keimlingen
 KLSM-Aufnahmen von Kotyledonen (A-F) Zeitserie eines expandierenden Phragmoplasten, Auflösung der Phragmoplasten MT in kortikale MT (E,F), bevor er die Zellwände zur Fusion erreicht (D;E Pfeile). (G-L) Zeitserie von zwei nebeneinander liegenden Spindeln, einer Metaphasespindel (Pfeil) und einer abnorm geformten Telophasespindel. (K-L) Die Spindel MT lösen sich auf, bevor es zur Phragmoplastenbildung kommt Maßstab: 5µm

3.4.3 Lokalisierung von MAP65-1 an PPB und Phragmoplast

Es ist bekannt, dass MAP65-1 in Arabidopsis Zellkulturen, nicht nur an kortikalen MT zu finden ist, sondern auch an PPB und Phragmoplasten auftritt (s. Einleitung 1.4). Diese Strukturen zeichnen sich nicht nur durch eine hohe Dynamik, sondern auch durch eine extreme Bündelung von MT aus. Da bei beiden Mutanten die kortikalen MT stark gebündelt vorliegen, einhergehend mit einer verstärkten Lokalisierung von MAP65-1 genau in diesen Bereichen, wurde die Verteilung von MAP65-1 in den meristematischen Zellen näher

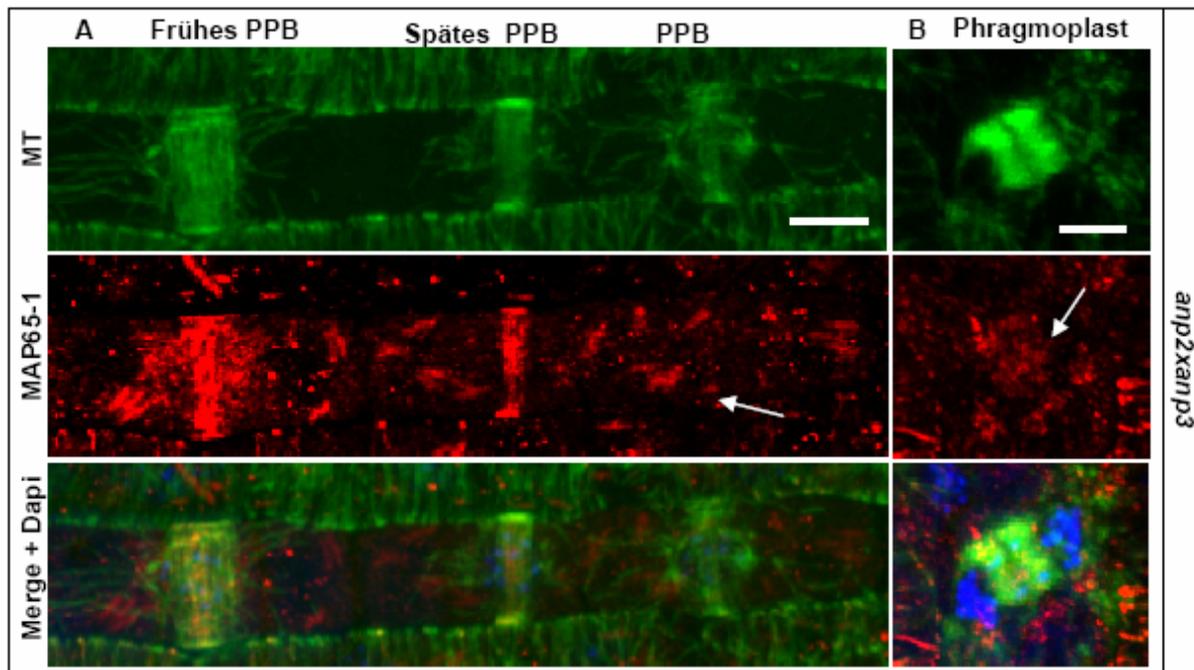


Abbildung 3.27: Immunmarkierung von MT und MAP65-1 in meristematischen Zellen von *anp2xanp3*
 Zunahme des MAP65-1 Signals bei stärker werdender Bündelung der MT während unterschiedlicher PPB Phasen. Ko-Lokalisierung von MT und MAP65-1. Schwache MAP65-1-Fluoreszenz im Phragmoplasten.
 Maßstab: 5µm (A-B) Projektion aus 8-11 optischen Schnitten in 0.65µm Abstand. z = 5-11 µm

3.4.4 Immunmarkierung von MAPK in meristematischen Zellen

WT Pflanzen wurden mit Antikörpern gegen MPK4 und MPK6 aus *A. thaliana* markiert. Um zytokinetische MT sichtbar zu machen, erfolgte eine gleichzeitige Färbung mit einem Tubulin-Antikörper. Die Markierung mit MPK4 bestätigte ein erhöhtes Proteinvorkommen im Zytoplasma von Zellen, die in die Prä-Prophase eintreten (Abb. 3.28 A). In diesen Zellen kommt es zur Bildung des PPBs durch MT und dies scheint mit einer verstärkten MPK4 Menge im Zytoplasma zu korrelieren. Während der späten Telophase und beginnenden Zytokinese lokalisiert MPK4 am Phragmoplasten (Abb. 3.28 B). Diese Lokalisierung verschwindet jedoch als solches, wenn der Phragmoplast expandiert ist und die eigentliche Zytokinese stattgefunden hat. In diesem Stadium befindet sich MPK4 in der Mittelzone des sich auflösenden Phragmoplasten, wo sich die Zellplatte bildet (Abb. 3.28 C). Die Spezifität des Antikörpers wurde durch einen Kontrollansatz mit der homozygoten *mpk4* Mutante überprüft. Dabei konnte an Phragmoplasten keinerlei Markierung nachgewiesen werden (Abb. 3.28 D). Weiterhin zeigt sich in der Übersicht, dass es zu keiner MPK4 spezifischen Markierung in der Wurzelspitze kommt (Abb. 3.28 E).

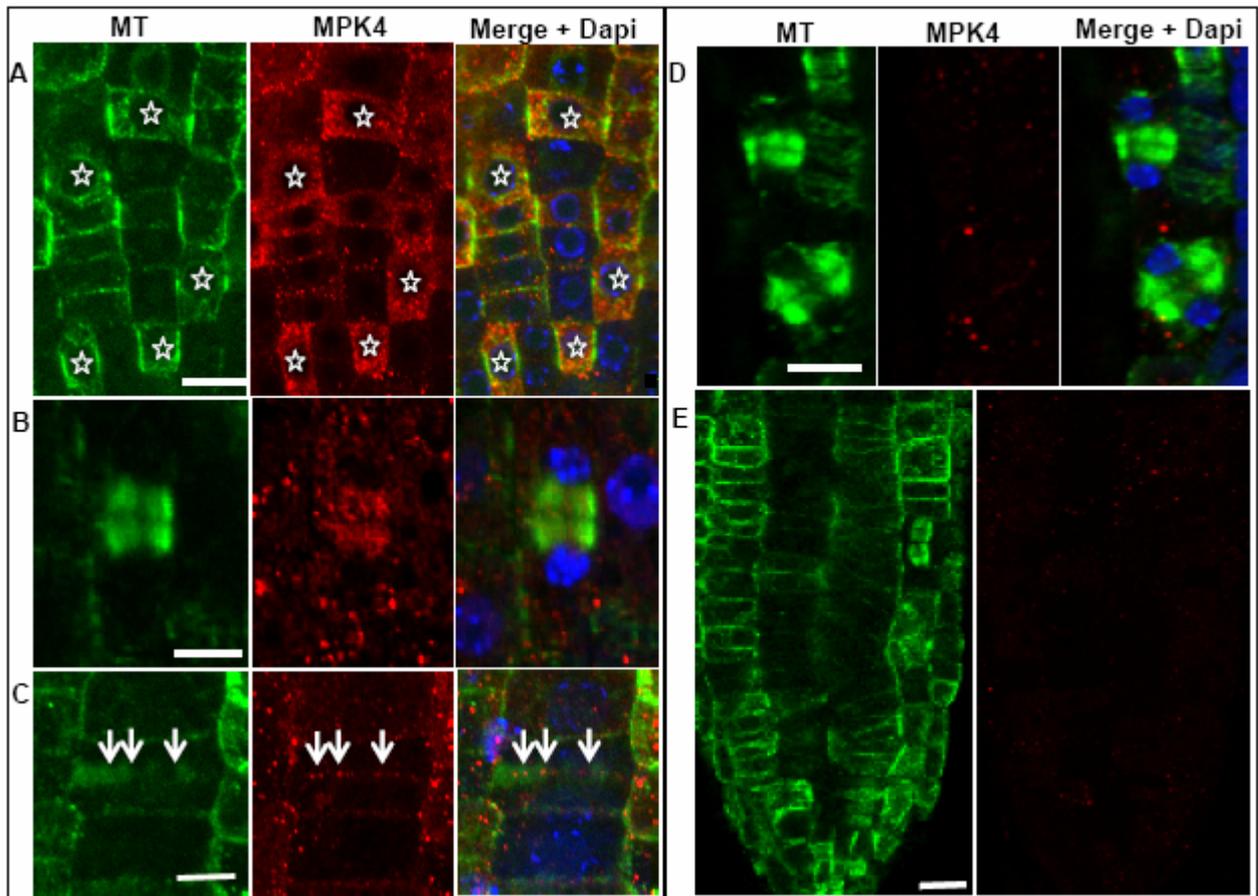


Abbildung 3.28: Immunmarkierung von MPK4 in meristematischen Zellen

(A) Erhöhtes Signal von MPK4 im Zytoplasma von WT Wurzelzellen in der Prä-Prophase (Sterne), (B) Deutliche Markierung von MPK4 entlang des Phragmoplasten (C) In älteren Phragmoplasten lokalisiert MPK4 in punktförmigen Strukturen im Bereich der Zellplatte. (D-E) Antikörpermarkierung mit MPK4 in homozygoten *mpk4* Keimlingen (D) Keine Markierung an den Phragmoplasten erkennbar, (E) sowie keinerlei MPK4 spezifische Markierung in der gesamten Wurzelspitze. Maßstab 5µm

Des Weiteren konnte auch MPK6 eindeutig an zytokinetischen Strukturen nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich eine klare Markierung des PPBs und der Phragmoplasten (Abb. 3.29 A). Bei komplett expandierten Phragmoplasten nimmt die Proteinmenge am Phragmoplasten ab (Abb. 3.29 B). An Mitosespindeln konnte kein MPK6 Signal nachgewiesen werden (Abb. 3.29 B).

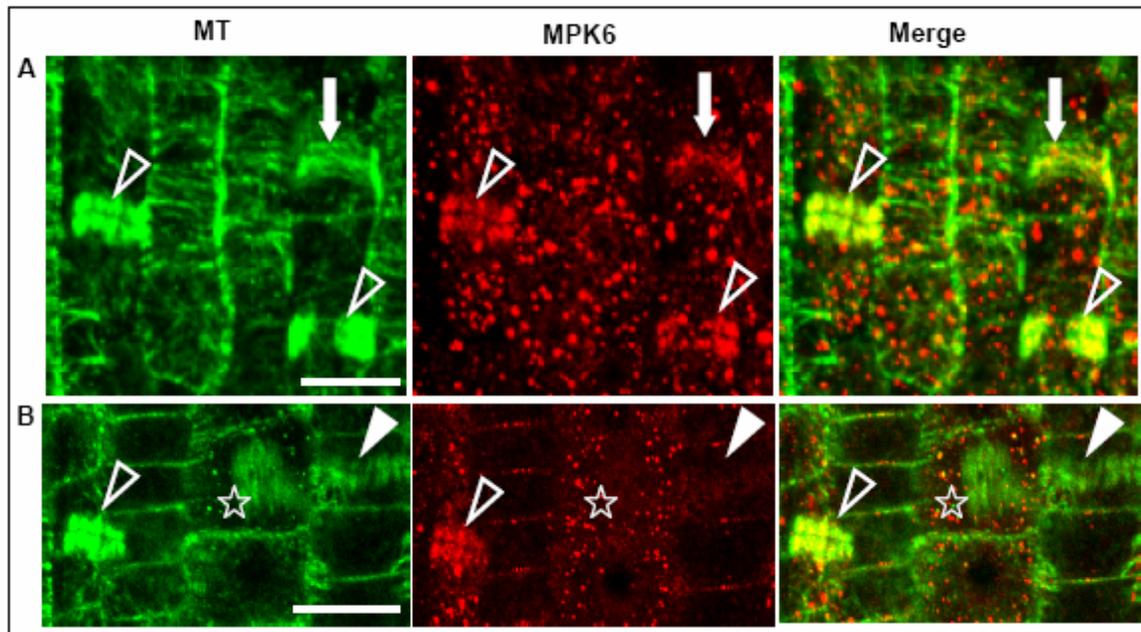


Abbildung 3.29: Immunmarkierung von MPK6 in meristematischen Zellen

(A) Deutliche Markierung von MPK6 entlang des Phragmoplasten (Pfeilspitzen) und PPB (Blockpfeil) (B) In älteren Phragmoplasten verringert sich das Signal von MPK6 (Pfeilspitze, weiß) im Vergleich zur Markierung an jungen Phragmoplasten (Pfeilspitze, ausgespart). An mitotischen Spindeln ist kein MPK6 Signal nachweisbar (Stern). Maßstab: 10µm

3.4.5 Beteiligung von endozytotischen Vesikeln und Aktin an der Bildung der Zellplatte

In fixiertem Pflanzenmaterial lässt sich nach Vorinkubation mit einer fixierbaren Variante des Styryl-Farbstoffes (AM 4-65) die Markierung von Plasmamembran und sekretorischen Vesikeln erreichen. AM 4-65 unterscheidet sich von dem *in vivo* Fluorochrom, FM 4-64, durch eine zusätzliche Aminogruppe, die eine vernetzende Aldehydfixierung ermöglicht, ohne die Fluoreszenzeigenschaften des Fluorochroms zu beeinträchtigen. Sein Emissionsmaximum liegt bei 630 nm, so dass er gleichzeitig mit kurzwelligeren Fluoreszenzmolekülen wie Alexa 488 und/oder DAPI zusammen eingesetzt werden kann. Pflanzen wurden für 30 min in AM 4-65 inkubiert und anschließend fixiert. Um eine gleichzeitige Markierung des Aktinzytoskeletts zu erzielen, erfolgte eine zusätzliche Markierung mit einem pflanzenspezifischen Aktin-Antikörper. Betrachtet man im Detail die Stadien der Zellplattenbildung in sich teilenden Zellen, so zeigt sich besonders eine prominente Ansammlung von Vesikeln im Bereich der Zellplatte (Abb. 3.30 A). Aktinfilamente akkumulieren klar in der Zone der Zellplatte (Abb. 3.30 A). Rotiert man eine z-Projektion um einen Winkel von 20°, so lässt sich die Zellplatte 3-dimensional im Raum stehend zwischen den teilenden Zellen erkennen (Abb. 3.30 B). Dadurch wird deutlich, dass sich die

Aktinfilamente als Ring um die Zellplatte legen (Abb. 3.30 B). Das Innere der Zellplatte weist keine Aktinmarkierung auf. In *anp2xanp3* Keimlingen findet sich an Zellplatten, die mit einer Seite schon an der Mutterzellwand fusioniert vorliegen, eine diffuse Aktinmarkierung im Bereich der in die Zelle ragenden Zellplatte (Abb. 3.30 C). Ein gleichmäßig ausgebildeter Aktinring, um die Zellplatte wird nicht sichtbar.

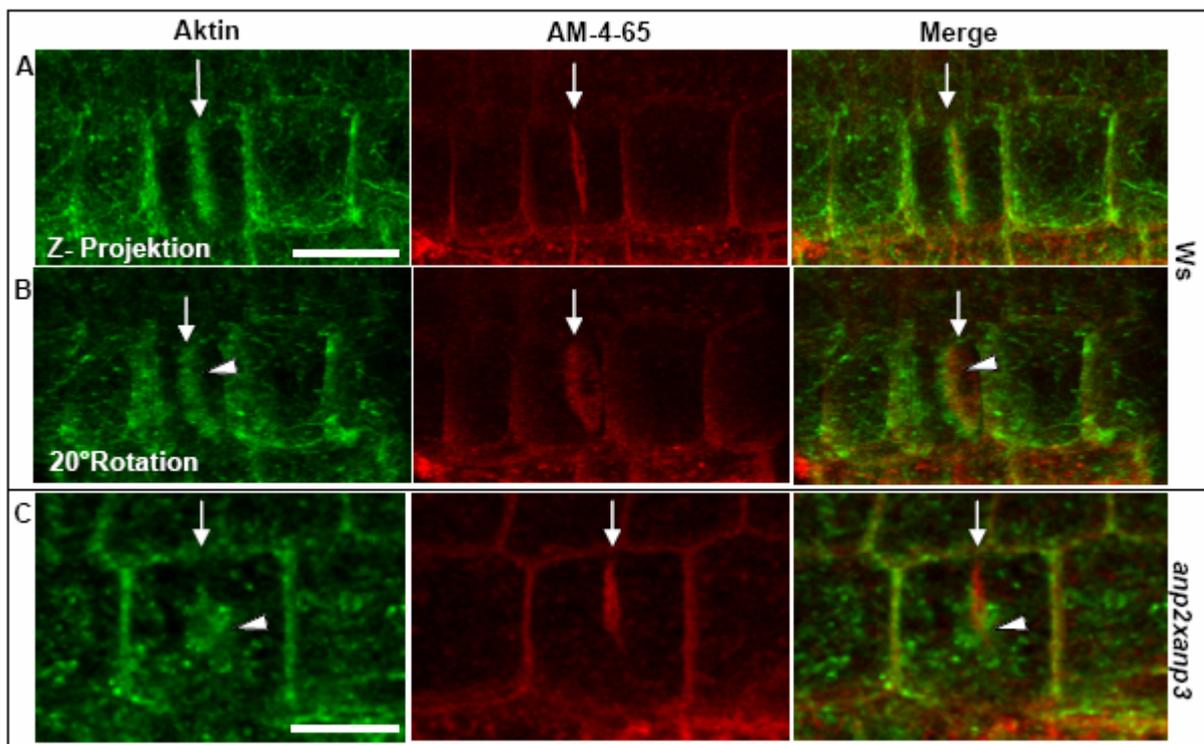


Abbildung 3.30: Immunmarkierung von Aktin und AM 4-65 Färbung

Dargestellt in grün ist Aktin und in rot sind Zellplatten markiert durch AM 4-65 (A,B) Zellplatte in WT Pflanzen, deutliche Akkumulation von Vesikeln im Bereich der wachsenden Zellplatte (Pfeil), Aktin bildet einen Ring um die Zellplatte (Pfeilspitze) (C) Zellplatte in *anp2xanp3*, verbunden mit einer Mutterzellwand (Pfeil), Aktin findet sich akkumuliert an der in die Zelle ragende Zellplatte (Pfeilspitze). Ein Aktinring ist nicht ausgebildet. Maßstab: 5µm (A-C) Projektion aus 12 optischen Schnitten in 0.65µm Abstand. z = 8 µm

Die Markierung durch AM 4-65 zeigt in den Zellen der Transitionszone eine prominente Färbung der Querwände, im Inneren werden endozytierte Vesikel als distinkte Punkte sichtbar (Abb. 3.31 A, B). An der Plasmamembran lassen sich perlenschnurartig aufgereihete Vesikel erkennen (Abb. 3.31 B). Das Aktinzytoskelett in diesem Gewebe stellt sich als feines leicht diffuses Netzwerk dar (Abb. 31 A, B). In den Mutanten wird ein deutlicher Unterschied in der AM 4-65 Färbung, sowie in der Struktur des Aktinzytoskeletts erkennbar. Die prominente Markierung der Querwände fehlt (Abb. 3.31 C), und die Zellen weisen eine schwächere und gleichmäßige Färbung der Zellmembranen auf. Auffällig sind auch die stark markierten Aktinbündel, die in den besonders großlumigen und irregulär expandierten Zellen

hervortreten (Abb. 3.31 C). Diese Zellen zeigen zusätzlich eine Akkumulation von Endosomen, speziell in der Nähe der stark gebündelten Aktinfilamente (Abb. 3.31 D). Diese Unterschiede zum WT treten in beiden Mutanten auf. Hier wird beispielhaft nur die Situation in der *mpk4* Mutante gezeigt.

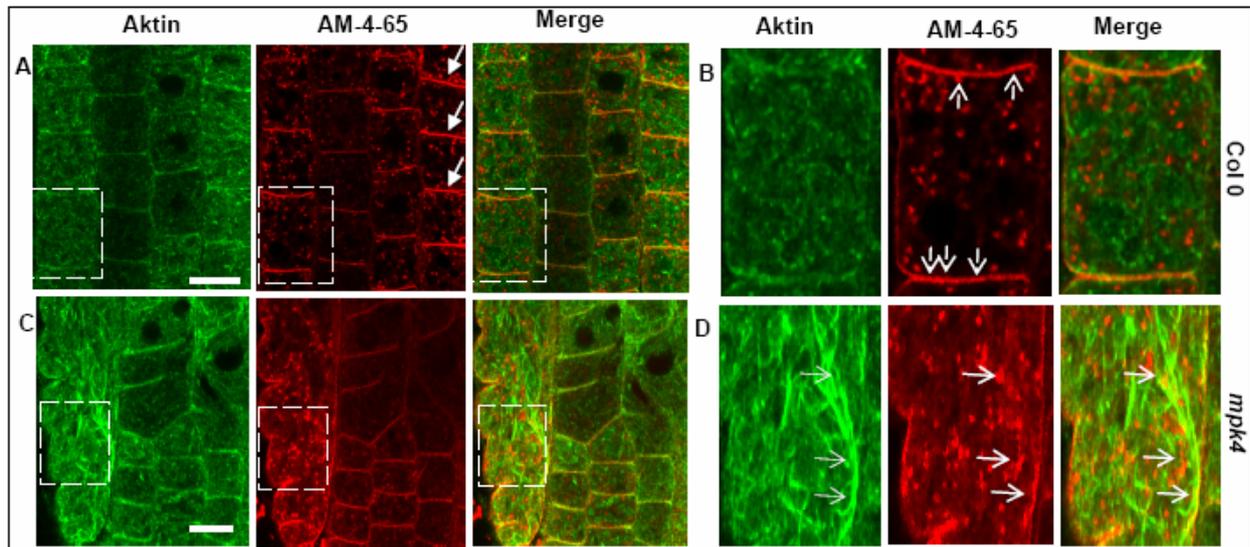


Abbildung 3.31: Immunmarkierung von Aktin und AM 4-65 Färbung in der Transitionszone
 Dargestellt in grün ist Aktin und in rot sind PM und endozytierte Vesikel markiert durch AM 4-65 (A) Transitionszone in WT Pflanzen, deutliche Markierung der PM-Querwände (Pfeil). Aktin bildet feines Netzwerk. (B) Detail aus (A) Kortikales feines Aktin. An Querwänden vesikuläre Strukturen angefärbt durch AM 4-65 (Pfeile). Gleichmäßige Verteilung von endozytierten Vesikeln im Zellinneren. (C) Transitionszone in *mpk4*, gleichmäßige Markierung der Plasmamembran durch AM 4-65. Aktinbündel in radial expandierten Zellen sichtbar (D) Detail aus (C), Aktinbündel im Kortex (Pfeile), in diesen Bereichen Ansammlung von AM 4-65 gefärbten endozytierten Vesikeln (Pfeile). Maßstab:10µm

3.4.6 Verteilung von MT und Aktinfilamenten in der Streckungszone und Spitze der Wurzel von *A. thaliana*

In elongierenden Wurzelepidermiszellen können MT als transversales, antiklin zur Wachstumsrichtung verlaufendes, kortikales Netzwerk beobachtet werden. Aktinfilamente liegen als longitudinal verlaufende Bündel im Kortex vor (Abb. 3.32 A-C). In optischen Schnitten durch die Mittelebene solcher Zellen, begrenzen sich die MT auf den kortikalen Bereich. MT liegen parallel nebeneinander in den Längswänden, die Querwände weisen nur ein geringes MT Vorkommen auf (Abb. 3.32 D). Im zytoplasmatischen Bereich können keine MT lokalisiert werden, dieser wird jedoch von Aktinfilamenten durchzogen (Abb. 3.32 D, E). Die Querwände, die ausgespart sind von MT, werden klar durch eine Aktinmarkierung hervorgehoben (Abb. 3.32 E). Darüber hinaus sind Vakuolen von Aktinfilamentbündel

umgeben. Aktinfilamente umschließen den Nukleus und bilden dort einen Aktinkäfig aus, an denen weitere Aktinfilamente verbunden sind und durch die Zelle laufen (Abb. 3.32G).

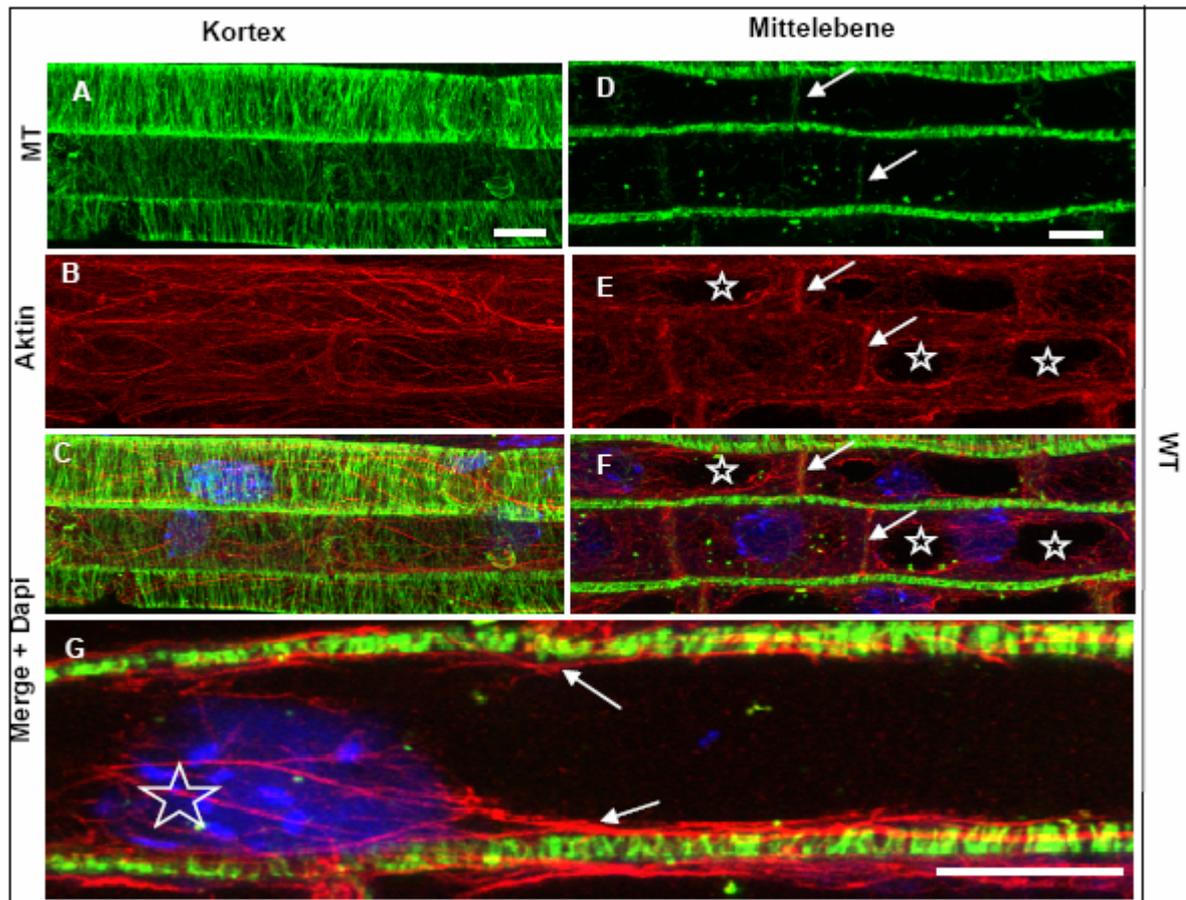


Abbildung 3.32: Immunmarkierung von MT und Aktin in der Elongationszone von WT Wurzeln

(A–C) Kortikale Aufnahmen von Epidermis: MT (grün) und Aktin (rot), Zellkerne (DAPI, blau). MT parallel zur Wachstumsrichtung ausgerichtet, Aktin durchzieht longitudinal den Kortex in langen Bündeln. (D–F) Aufnahmen der Mittelebene. (D) MT nur im Kortex vorkomend. Keine Markierung im Zytoplasma, sowie nur schwach an den Querwänden. (E) Aktinmarkierung von Filamenten im Zytoplasma. Um Vakuolen deutliche Aktinbündel (Stern). Klare Markierung der Querwände durch Aktin (Pfeile). (G) Detail von Nukleus. Aktinfilamente bilden Aktinkäfig um Zellkern (Stern), Langgestreckte Aktinfilamente im Kortex (Pfeil). Maßstab (A–F) 10µm; (G) 5µm (A–C) Projektion aus 26 optischen Schnitten in 0.65 µm Abstand: z= 17 µm (D–G) Projektion aus 7 optischen Schnitten in 0.65 µm Abstand: z=4,5 µm

Die Ergebnisse der Zytoskelettuntersuchungen beider Mutanten, *anp2xanp3* und *mpk4*, verdeutlichen, dass nicht nur das MT Netzwerk gestört vorliegt, sondern dass es auch zu eklatanten Veränderungen im Aktinzytoskelett kommt. In den Zellen der Streckungszone werden dicke Aktinbündel im Kortex sichtbar, die an einigen Stellen extrem verdichtet vorkommen (Abb. 3.33 B). Sie durchziehen nicht nur longitudinal den Kortex, wie es in Kontrollpflanzen typisch ist, sondern weisen eine wellenförmige und ungerichtete Orientierung auf. Die Darstellung der Mittelebene lässt auch dort verdichtete Aktinbereiche erkennen, wobei Aktinbündel markiert werden, die sich durch das Zytoplasma ziehen (Abb.

3.33 E). Um Zellkerne werden verstärkt zusammengeballten Aktinbündel markiert (Abb.3.33 G).

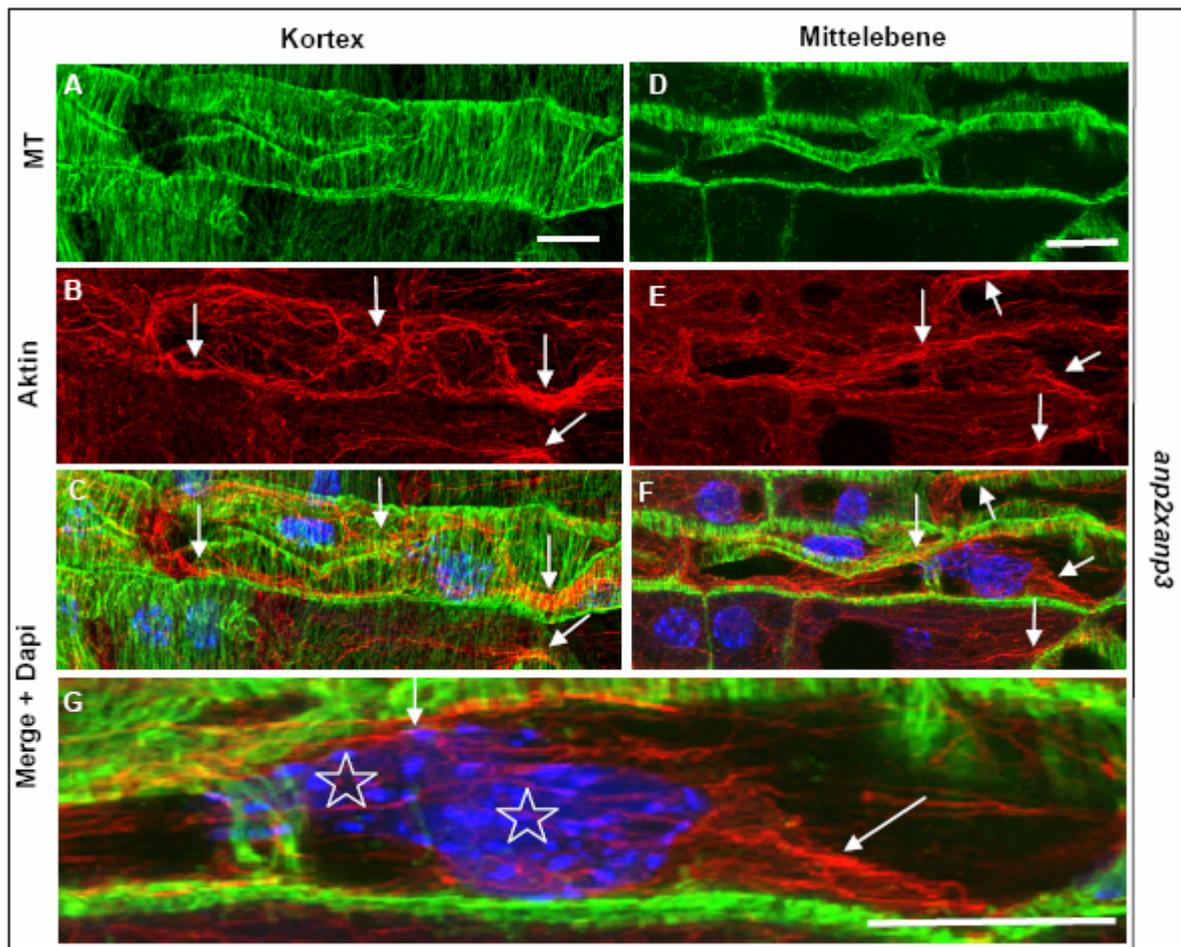


Abbildung 3.33: Immunmarkierung von MT und Aktin in der Elongationszone von *anp2xanp3* Wurzeln (A–C) Kortikale Aufnahmen von Epidermis: MT (grün,)Aktin (rot), Zellkerne (DAPI, blau). MT transversal zur Wachstumsrichtung ausgerichtet, Aktin durchzieht ungerichtet den Kortex in dicken Bündeln. Stellenweise extrem verdichtete Aktinbereiche (Pfeile). (D–F) Aufnahmen der Mittelebene. (D) MT nur im Kortex vorhanden. Keine Markierung im Innern der Zelle. (E) Aktinmarkierung von Filamentbündeln im Zellinneren (Pfeile). (G) Detail von zwei Zellkernen in einer Zelle, Aktinfilamente bilden Aktinkäfig um Zellkerne (Sterne) mit extrem verdichtetem Aktin im angrenzenden Zytoplasma (Pfeil). Maßstab (A-F) 10 μ m; (G) 5 μ m (A-C): Projektion aus 23 optischen Schnitten in 0.65 μ m Abstand: $z=15$ μ m, (D-G) Projektion aus 10 optischen Schnitten in 0.65 μ m Abstand: $z=6,5$ μ m

Meristematische Zellen weisen einen wichtigen Unterschied in Verteilungsmuster dieser beiden Zytosklettelemente auf. Eine prominente MT Markierung findet sich hier zwar auch im Kortex der transversalen Wände, jedoch umgeben MT auch den Nukleus und durchziehen das Zytoplasma (Abb. 3.34 B). Diese zytoplasmatischen MT sind im Bereich der Streckungszone nicht mehr vorhanden. Für das Aktinzytoskelett ergeben sich ebenfalls Unterschiede zwischen elongierenden und meristematischen Zellen. Anders als in den elongierenden Zellen bilden die Aktinfilamente im Meristem keinen Käfig um den Zellkern

aus, sondern liegen als feines Netzwerk im Zytoplasma verstreut vor (Abb. 3.34 B). Zwischen den MT und dem Aktinnetzwerk im Zellinnern kommt es jedoch zu keiner direkten Ko-Lokalisierung. Beide Netzwerke liegen als individuell getrennte Elemente im Zytoplasma vor. Bei beginnender Mitose werden MT im Kortex abgebaut und im Spindelapparat aufgebaut, während Aktinfilamente durchgängig zytoplasmatisch vorhanden sind (Abb. 3.34 C, D). Es ist sogar eine Verstärkung der Aktinmarkierung unterhalb der Plasmamembran während der Zellteilung zu beobachten, so dass mitotische Zellen als hell markierte „Boxen“ hervortreten (Abb. 3.34 A, D). MT in PPBs, Spindeln und Phragmoplasten lassen sich eindeutig identifizieren. Aktinfilamente werden nicht im PPB beobachtet, und treten auch nicht in Metaphasespindeln auf. Jedoch sind sie prominent in der Mittelzone der Telophasespindel und des Phragmoplasten vertreten (Abb. 3.34 C, D). Aktinfilamente scheinen diffus entlang des Phragmoplasten zu binden. Die typische Struktur der MT Markierung mit zwei MT Stapeln und ausgesparter Mittelzone ist durch Aktin nicht zu erkennen (Abb. 3.34 D).

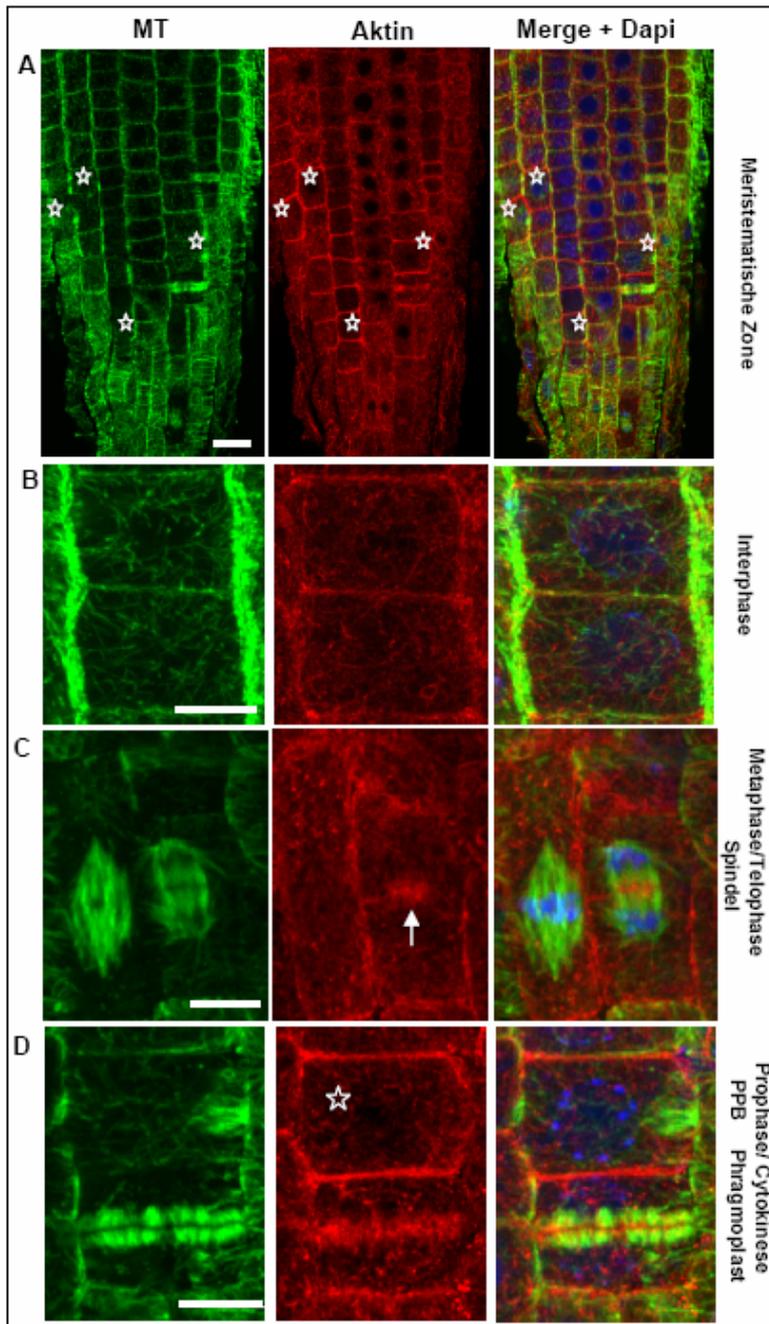


Abbildung 3.34: Immunmarkierung von MT und Aktin in der meristematischen Zone von WT Keimlingen

(A) Übersicht über eine Wurzelspitze. Mitosestadien wie PPB, Spindel und Phragmoplasten werden deutlich durch Tubulin Antikörper markiert (Sterne), Aktin weist feines Netzwerk auf, mitotisch aktive Zellen werden von Aktin umrandet (Stern). (B) Detail Interphasezellen (Schnittebene). MT durchziehen das Zytoplasma. Aktinfilamente bilden von MT getrenntes zytoplasmatisches Netzwerk. (C) MT bilden Metaphase und Telophase Spindel aus. Abbau der kortikalen MT in diesen Zellen. Aktin bleibt weiter in Zytoplasma vorhanden. Keine Lokalisierung an der Metaphasespindel, jedoch deutliche Markierung in der Mittelzone der Telophase Spindel (Pfeil) (D) Zytokinese: MT bilden aus zwei dicht gebündelten MT Palisaden den Phragmoplasten mit ausgesparten Mittelzone. Aktin markiert diffus den Phragmoplasten inklusive Mittelzone (Pfeil). Zelle mit beginnender PPB-Bildung weist starke Aktinmarkierung unterhalb der Plasmamembran in beiden Teilhälften auf, wobei die PPB-Zone ausgespart bleibt (Stern). Maßstab (A) 10µm, (B-D) 5µm (A-D) Projektion aus 8-16 optischen Schnitten in 0.65µm Abstand. z = 5-11 µm

Während im Innern der Zellen keine sichtbare Überlappung zwischen Aktin und MT auftritt, weisen einige Regionen im Kortex ähnlich verlaufende Muster der beiden zytoskelettalen Elemente auf (Abb. 3.35) und es kommt zur partiellen Ko-Lokalisierung der beiden Zytosklettelemente (Abb. 3.35 D-F).

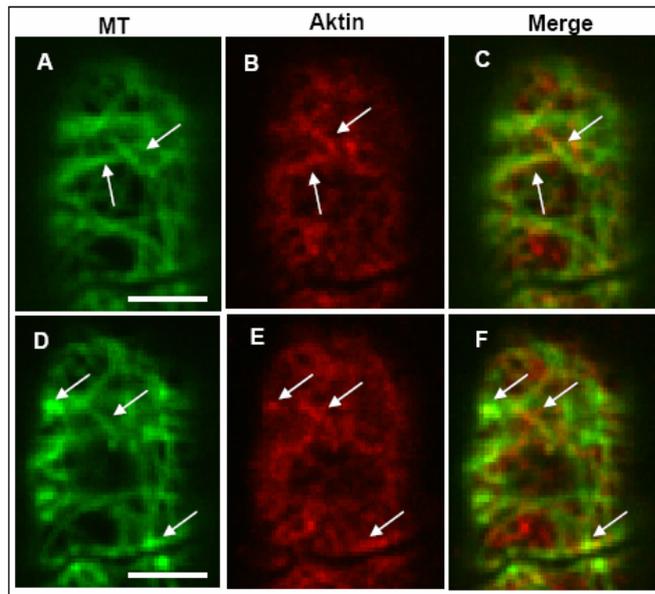


Abbildung 3.35: Immunmarkierung von MT und Aktin im Kortex von Interphasezellen
 KLSM Aufnahmen von MT (grün) und Aktin (rot) (A-C) Einzelner optischer Schnitt im äußersten Kortex einer Epidermiszelle, Pfeile markieren Bereiche in denen MT und Aktin entlanglaufen (D-F) Aufnahme derselben Zelle eine Schnittebene (0,65 μm) tiefer. Ko-Lokalisation von MT und Aktin an einigen Bereichen (Pfeile) Maßstab: 5 μm

Bei beiden Mutanten konnten Aktin und MT gleichzeitig in der meristematischen Zone dargestellt werden. Exemplarisch werden hier Aufnahmen der *mpk4* Mutante gezeigt. Ähnliche Defekte sind jedoch auch in *anp2xanp3* deutlich erkennbar (Vergleich zu Streckungszone, Abb. 3.33). Optische Schnitte durch die Mittelebene der Wurzel der *mpk4* Mutante nach Markierung der MT und Aktinfilamente weisen eine deutliche Akkumulation der Aktinfilamente im Zytoplasma von Interphasezellen auf. Diese Bereiche sind auch gleichzeitig durch erhöhte MT-Markierung gekennzeichnet (Abb. 3.36 A). Betrachtet man detailliert die kortikalen Zellbereiche, so kennzeichnen sich die durch dicke MT-Bündel mit jeweils darunter entlang verlaufenden, verdichteten Aktinstrukturen (Abb. 3.36 B). Detailansichten des zytoplasmatischen Bereiches bei jüngeren Interphasezellen zeigen eine deutliche Aktinverdichtungen unterhalb der Plasmamembran (Abb. 3.36 D). Schon bei geringer Vergrößerung der Wurzelspitze fallen die zuvor schon beschriebenen zytokinetischen Defekte auf, zu denen zum einen die mehrkernigen Zellen und zum anderen die schief orientierten und häufig in Gruppen auftretenden Mitose bzw. Zytokinesestadien zählen (Abb. 3.36 C). Aktin befindet sich, ähnlich wie bei den WT-Pflanzen, diffus lokalisiert entlang der Mittelzone des Phragmoplasten (Abb. 3.36 C), Spindeln werden nicht durch Aktin markiert.

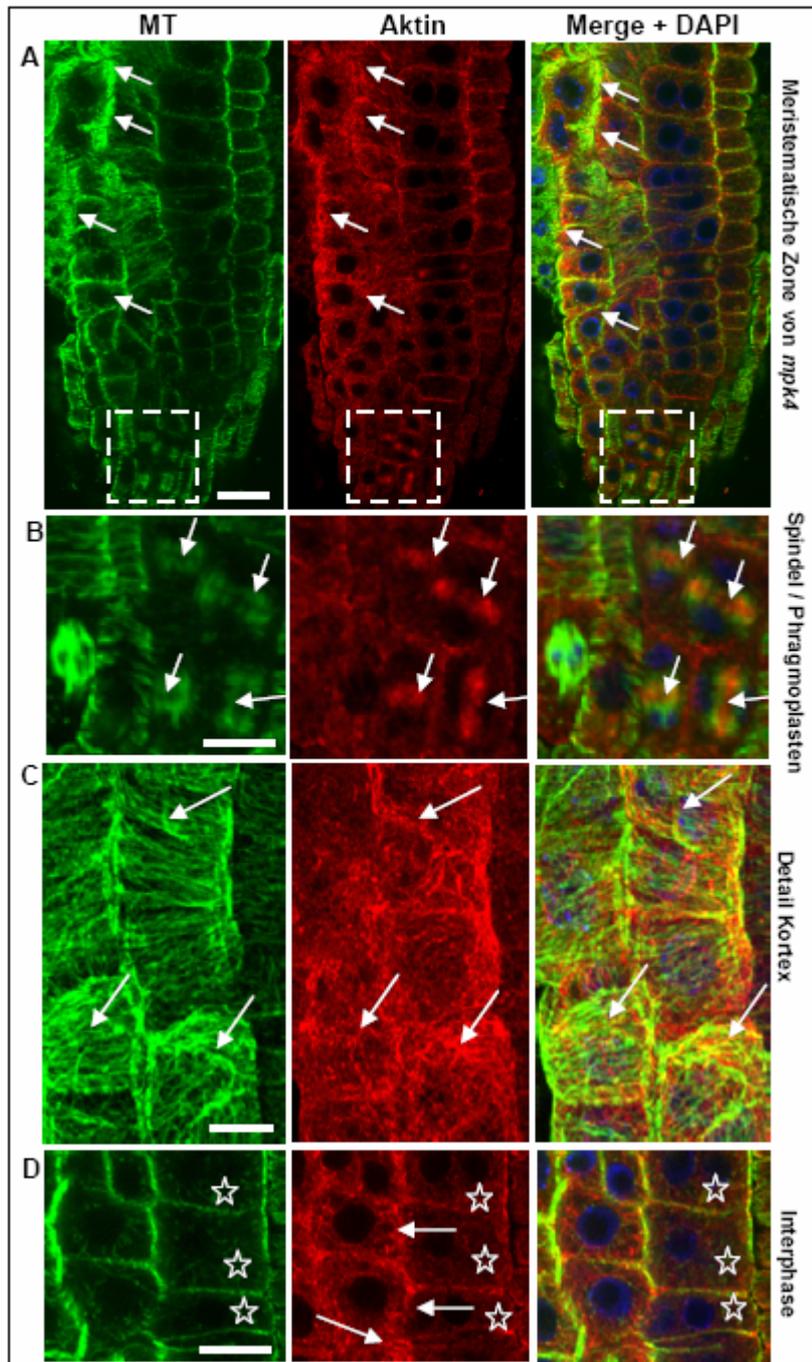


Abbildung 3.36: Immunmarkierung von MT und Aktin in der meristematischen Zone von *mpk4*

(A) Übersicht über eine Wurzelspitze. Mitose- und Zytokinesestadien sind durch MT markiert (Box), Aktin deutlich an Phragmoplasten lokalisiert, Akkumulation von Aktin und MT in Interphasezellen (Pfeile). (B) Detail des kortikalen Bereiches, MT-Bündelung im Kortex mit verdichteten Aktinbereichen (Pfeile). (C) Detail von Spindel und Phragmoplasten. Vier schief orientierten Phragmoplasten erkennbar. Lokalisierung von Aktin an Mittelzone (Pfeile). (D) Detail von Interphasezellen. Endoplasmatische MT sichtbar, Aktin liegt akkumuliert im Zytoplasma unterhalb der Plasmamembran (Pfeile). für Mutanten typische mehrkernige Zellen (Sterne) Maßstab (A) 10µm, (B-C) 5µm (A-C) Projektion aus 8-13 optischen Schnitten in 0.65µm Abstand. z = 5-9 µm (D) einzelner optischer Schnitt

3.5 *in vivo* Lokalisierung von MAPK in pflanzlichen Zellen

Um die genaue Lokalisierung von MAPK in pflanzlichen Zellen zu studieren, wurden GFP Fusionsproteine hergestellt, wobei der O(pen)R(eading)F(rame) der cDNA der entsprechenden MAPK N-terminal, sowie C-terminal an GFP fusioniert wurde (Abb. 3.37 A,C). Das Fusionsprotein stand unter Kontrolle eines zweifach verstärkten 35S Promotors aus dem Cauliflower-Mosaik-Virus (CaMV). Die Ligation in einen binären Vektor ermöglichte

durch Agrobakterien-vermittelte Transformation zum einen die transiente Expression in Tabakblätter als auch die stabile Expression in *A. thaliana*. Bisherige Untersuchungen mit GFP-Reporterkonstrukten bewiesen die Lokalisierung von MPK4 im Zytoplasma und im Nukleus der analysierten pflanzlichen Zellen (Andreasson et al. 2005). Das Augenmerk dieser Forschungen lag jedoch auf den oberirdischen Pflanzenteilen, so dass bisher über die Lokalisierung von MPK4 in Wurzelgewebe noch keine genauen Angaben vorliegen. Ein Fusionsprotein von YFP-MPK6 exprimiert unter dem nativen Promotor konnte den Phänotyp der MPK6 Mutante aufheben (Krysan et al. 2006), so dass man dabei von einem funktionalen Protein ausgehen kann. Auf der Basis dieser Erkenntnis wurde in der vorliegenden Arbeit nur das N-terminale Fusionskonstrukt für MPK6 hergestellt. Für MPK3 und MPK4 wurden GFP-Fusionskonstrukte mit beiden Orientierungen kloniert (Abb. 3.40), um im Falle von sterischen Beeinträchtigungen die Erfolgchancen zu verbessern. In der Literatur sind für MPK4 sowohl N- als auch C-terminale Fusionsproteine beschrieben worden, für MPK3 liegen noch keine Erkenntnisse vor. Um sicherzustellen, dass das GFP-Fusionsprotein auch exprimiert wird, wurde eine Überprüfung mittels eines Immunoblots durchgeführt. Hierbei wird mit einem GFP-Antikörper eine prominente Bande in der erwarteten Höhe bei 70kDa nachgewiesen (Abb. 3.37 C, MPK3 (43kDa), MPK4 (43kDa); MPK6 (45 kDa) + GFP (28kDa)). Dabei zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Detektion von GFP-MPK4 und GFP-MPK6. Während das Fusionsprotein GFP-MPK6 als prominente Bande in der erwarteten Größe von ~70kDa nachweisbar ist, so zeigt sich bei GFP-MPK4 eine hohe Anzahl von Abbauprodukten und nur eine einzige schwache Bande in der richtigen Höhe des Fusionsproteins. Das Fusionskonstrukt wurde dennoch für die Generierung einer stabilen Pflanzenlinie verwendet, jedoch konnte in diesen Linien keine ausreichende Fluoreszenz detektiert werden. Die Fusionsproteine MPK4-GFP, GFP-MPK3 und MPK3-GFP kennzeichneten sich ebenfalls durch eine schwache Expression nach Agrobakterien-vermittelter Transfektion in Tabak Blättern. Nur in vereinzelt Zellen konnte eine Fluoreszenz wahrgenommen werden, die Fusionsproteine ließen sich mittels Immunoblot nicht detektieren und wurden somit auch nicht zur Herstellung stabiler Pflanzenlinien verwendet. Im Gegensatz dazu konnte mit GFP-MPK6 eine stabile transgene Pflanzenlinie generiert werden, die eine gute Expression des Fusionsproteins zeigt.

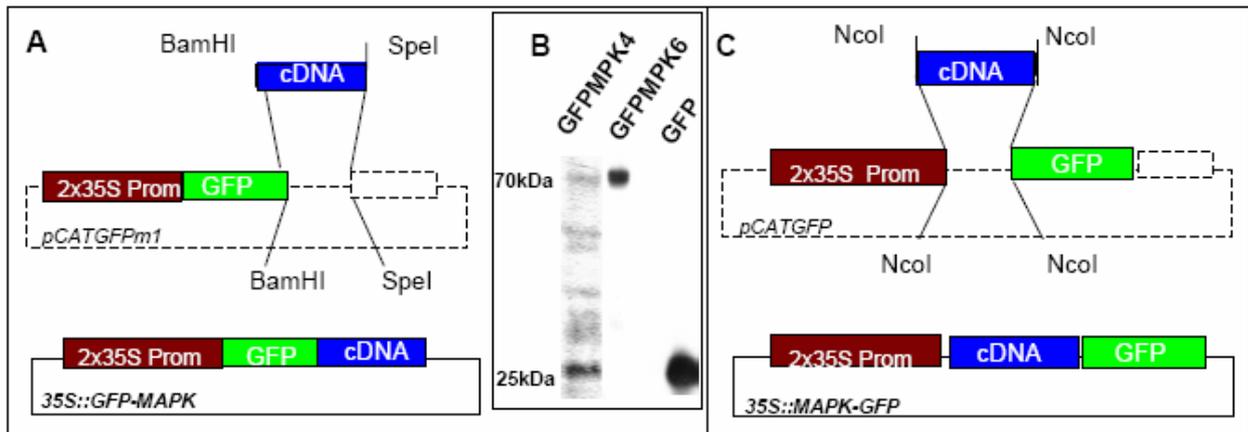


Abbildung 3.37: Klonierungsschema von 35S:: GFP-MAPK und 35S::MAPK-GFP und Nachweis des Fusionsproteins

(A) (C) Die cDNA der entsprechenden MAPK wurde durch eingefügte Schnittstellen in den GFP Expressionsvektor *pCATGFPm1* bzw. *pCATGFP* kloniert.

(B) Immunoblot Analyse von *N. benthamiana* Blattmaterial, 2 Tage nach Infiltration mit 35S::GFP-MPK4, 35S::GFP-MPK6 bzw. 35S::GFP. Nachweis des Fusionsproteins auf einer Höhe von 70kDa, sowie der GFP Kontrolle bei 28kDa durch Verwendung eines GFP Antikörpers. Abbauprodukte des Fusionsproteins treten bei GFP-MPK4 auf.

Die transiente Expression von GFP-MPK6 in *N. benthamiana* Blättern zeigt, dass das Fusionsprotein im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert ist (Abb. 3.38 A). Jedoch kann es auch akkumuliert in punktförmigen Strukturen nachgewiesen werden, die sich im Zytoplasma bewegen (Abb. 3.38 A). In der stabil transformierten Pflanzenlinie von *A. thaliana* zeigt sich ein ähnliches Bild nach den ersten mikroskopischen Untersuchungen von Wurzelepidermiszellen. Auch in den stabilen Pflanzenlinien liegt das Fusionsprotein im Zytoplasma, sowie im Nukleus (im Bild nicht gezeigt) vor (Abb. 3.38 B). Des Weiteren kommt es auch hier zu einer starken Akkumulation von GFP-Fluoreszenz in runden, vesikelartigen Strukturen (Abb. 3.38 B).

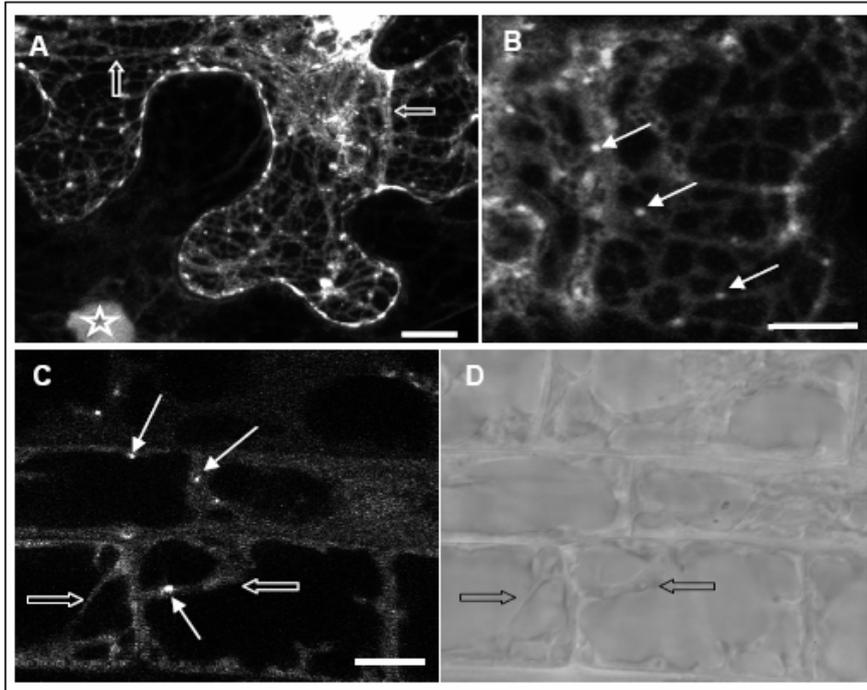


Abbildung 3.38: GFP-MPK6 in pflanzlichen Zellen

(A) Transiente Expression von GFP-MPK6 in *N. benthamiana* Blattepidermiszellen, 2 Tage nach Infiltration. Das Fusionsprotein ist im Zytoplasma (Zytoplasmastränge markiert durch Blockpfeile) und im Nukleus lokalisiert (Stern). (B) Erhöhte GFP Fluoreszenz liegt in punktförmigen Strukturen im Zytoplasma vor (weiße Pfeile)(C) Stabile Expression von GFP-MPK6 in *A. thaliana* Wurzelepidermiszellen. GFP Fluoreszenz im Zytoplasma (Blockpfeile) und im Zytoplasma liegende prominent markierte vesikelähnliche Strukturen (weiße Pfeile). (D) DIC Kanal von (C) mit markierten Zytoplasmasträngen (schwarze Blockpfeile). Maßstab: (A)(C): 10µm, Maßstab (B) : 5µm

Jens Müller konnte aber kürzlich durch Ko-Immunmarkierungen mit spezifischen Organellmarkern am fixierten Präparat den Nachweis erbringen, dass es sich bei den punktförmigen Strukturen, um Trans-Golgi Kompartimente handelt, an denen MPK6 innerhalb der Zelle lokalisiert ist (Müller 2009 und unveröffentlichte Ergebnisse).

Dieses Ergebnis kann in der vorliegenden Arbeit durch Verwendung des GFP-MPK6-Reporters in Kombination mit dem TGN-Marker, VTI12-mCherry, bestätigt werden (Abb. 3.39). VTI12-mCherry markiert bewegliche TGN Kompartimente im Zytoplasma (Geldner et al, 2009), die mit den GFP-MPK6 positiven Vesikeln ko-lokalisieren.

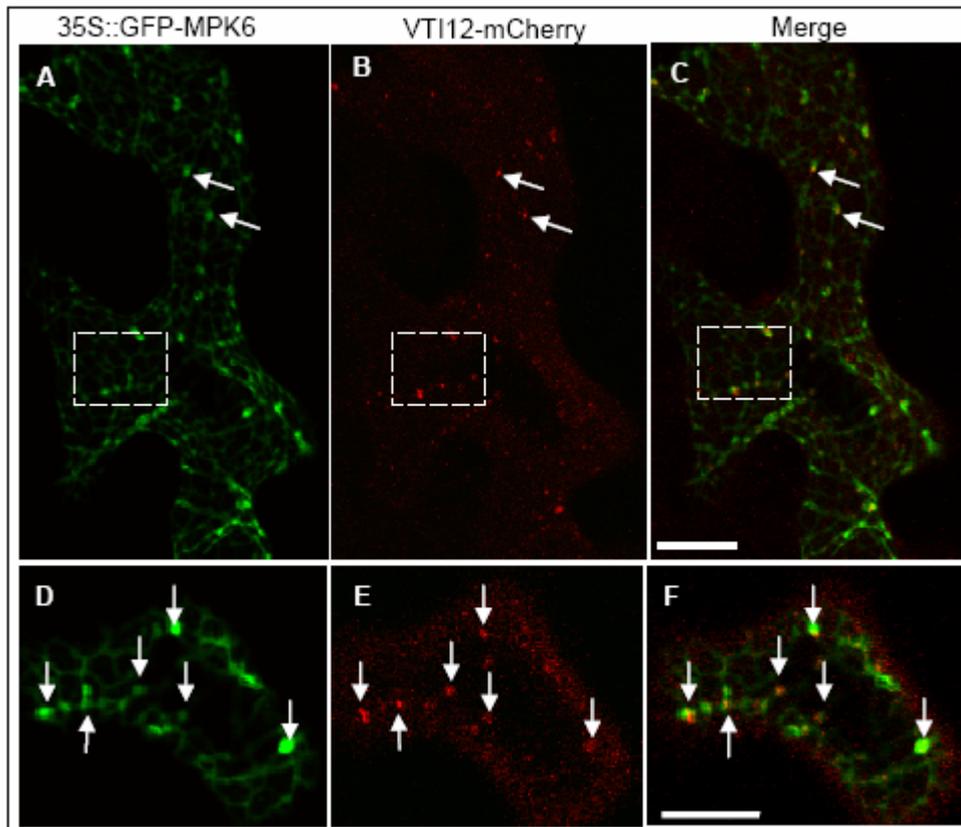


Abbildung 3.39: GFP-MPK6 und VTI12-mCherry in *N. benthamiana*

(A)-(C) Transiente Expression von *35S::GFP:MPK6* (grün) in *N. benthamiana* Blattepidermiszellen zusammen mit TGN-Marker VTI12-mCherry (rot), 2 Tage nach Infiltration. (C) Ko-Lokalisierung, Pfeile markieren Spots, die von GFP-MPK6 und TGN-Marker markiert werden (D-F) Detailaufnahme, GFP-MPK6 akkumuliert in punktförmigen Strukturen, die von TGN Marker im roten Kanal markiert werden (Pfeile)
 Maßstab: (A-C) 20µm, (D-F) 10µm

Die transiente Expression von GFP-MPK4 (N-terminal) und MPK4-GFP (C-terminal) in *N. benthamiana* Blättern zeigt, dass das Fusionsprotein im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert ist (Abb. 3.40 A). Für GFP-MPK4 kann eine schwache aber signifikante Markierung in punktförmigen Strukturen nachgewiesen werden, die sich ebenso wie im Fall von GFP-MPK6 im Zytoplasma bewegen (Abb. 3.40 B, C-C''). Der Zellkern ist sehr stark markiert, während der Nukleolus negativ hervorsteht (Abb. 3. 40 D, E).

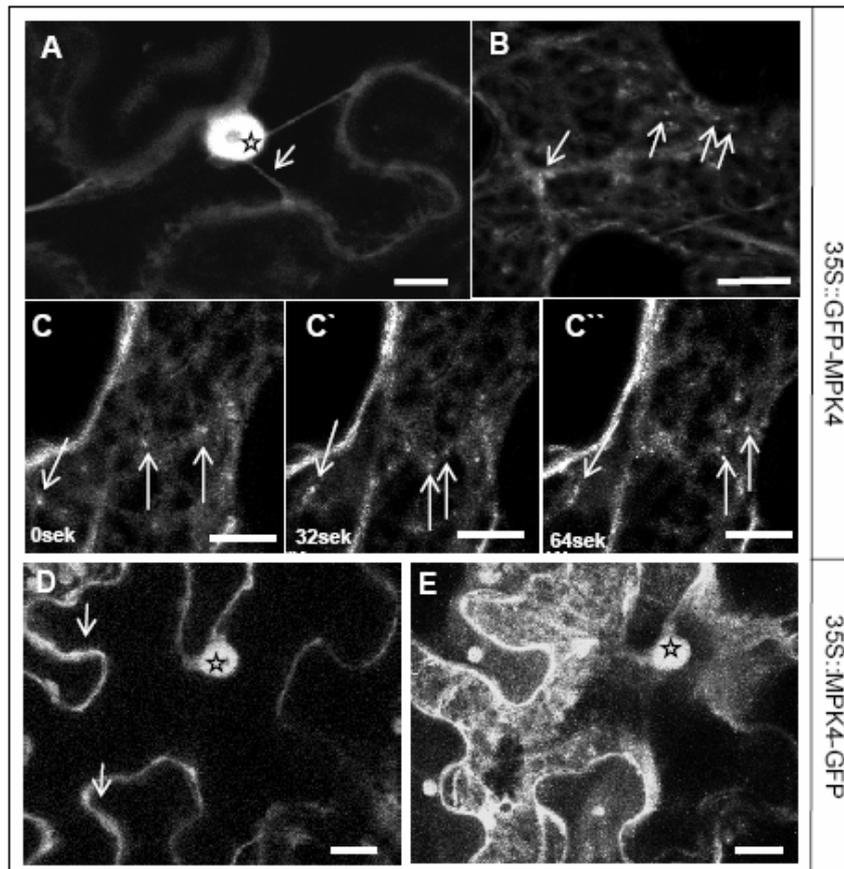


Abbildung 3.40: GFP-MPK4 und MPK4-GFP in *N. benthamiana* Blattepidermiszellen

Transiente Expression von GFP-MPK4 und MPK4-GFP in *N. benthamiana* Blattepidermiszellen, 2 Tage nach Infiltration. (A) GFP-MPK4 ist im Zytoplasma (Zytoplasmastränge markiert durch Pfeile) und im Nukleus lokalisiert (Stern). (B) Erhöhte GFP Fluoreszenz kann in punktförmigen Strukturen im Zytoplasma aufgenommen werden (Pfeile) (C-C'') Zeitaufnahme der punktförmig markierten Strukturen im Zytoplasma (D, E) MPK4-GFP markiert den Nukleus (Stern) und das Zytoplasma (Pfeile) Maßstab: 10µm

Eine ähnliche intrazelluläre Lokalisierung läßt sich auch für die Fusionsproteine GFP-MPK3 und MPK3-GFP zeigen. Beide Proteine befinden sich im Nukleus und im Zytoplasma der untersuchten Epidermiszellen (Abb. 3.41). Es werden jedoch keine eindeutigen Vesikel oder weitere Strukturen durch die Fusionsproteine markiert.

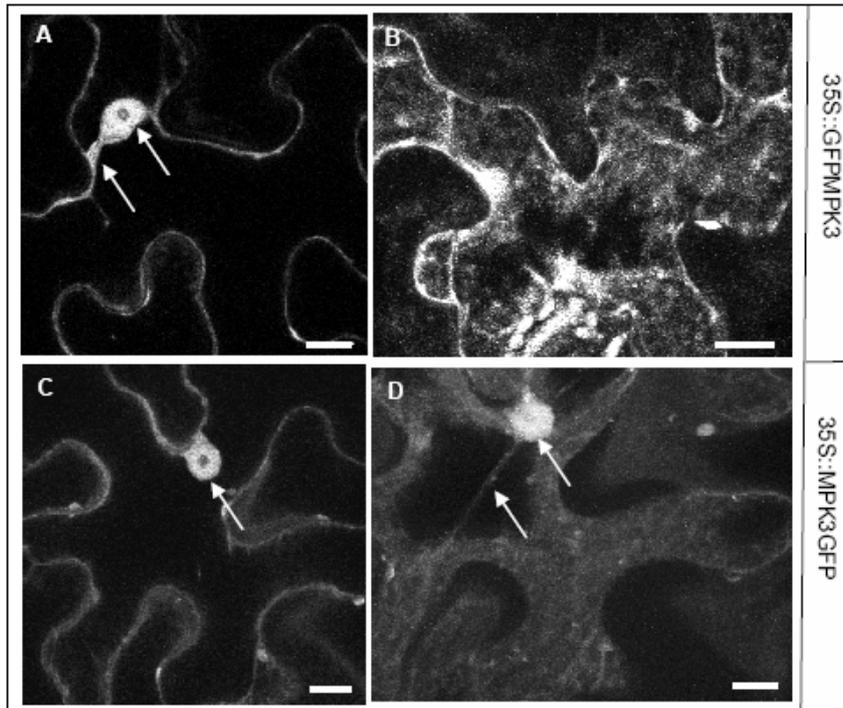


Abbildung 3.41: GFP-MPK3 und MPK3GFP in *N. benthamiana* Blattepidermiszellen

Transiente Expression von (A)(B) GFP-MPK3 und (C)(D) MPK3-GFP in *N. benthamiana*

Blattepidermiszellen, 2 Tage nach Infiltration. (A)(C) Deutliche Markierung des Nukleus und Zytoplasmastrang (Pfeile) (B)(D) Zytoplasmatische Lokalisierung im Kortex
Maßstab: 10µm

4. Diskussion

4.1 Gewebsspezifische Expression von MPK3, MPK4 und MPK6

Um die mögliche Beteiligung der MAP-Kinasen, MPK3, MPK4 und MPK6 an entwicklungsabhängigen und stress-induzierenden Prozessen in pflanzlichen Organen nachzuweisen, wurden stabile GUS-Promotor Linien generiert, die Einblicke in die gewebsspezifische Aktivität der Promotoren lieferten. Dabei zeigte sich, dass die Aktivität der MAPK auf bestimmte Gewebebereiche und spezifischen Zelltypen begrenzt ist. In einigen Bereichen wie dem Wurzelmeristem, den Seitenwurzeln und den Kotyledonen kommt es zu überlappenden Aktivitäten von zwei bzw. allen drei MAPK. Für andere Zonen konnte jedoch spezifisch die Aktivität einer bestimmten MAPK nachgewiesen werden, wie in der Transitionszone für MPK6 oder in der Wurzelhaarzone für MPK4. Für MPK4 liegen bereits Daten über die Promotoraktivität im vaskulären Gewebe und in den Spaltöffnungen von Blättern vor (Petersen et al. 2000). Diese Ergebnisse decken sich mit den hier gemachten Beobachtungen an den von mir erstellten MPK4-GUS Linien. Obwohl einige Kotyledonen schon recht früh eine Expression im gesamten Blattgewebe zeigen, tritt die spezifische Markierung der Stomata immer sehr deutlich hervor, und dies ist nicht begrenzt auf die Kotyledonen, sondern schließt auch die Stomata des Hypokotyls mit ein. In der *mpk4* Mutante treten irregulär geformte Stomata auf, und in einigen Bereichen bilden sie dicht gedrängte Gruppen. Ein ähnlich auffälliger Stomataphänotyp ist bisher bei der *mpk4* Mutante nicht beschrieben worden. Dies impliziert, dass MPK4 für die Entwicklung von Stomata von Bedeutung ist, was für MPK3 und MPK6 bereits stark vermutet wird. Besonders offensichtlich scheint dies bei der MPK3/MPK6-Doppelmutante zu sein, die ein extrem gestörtes Stomatamuster aufweist (Wang et al. 2007). Die hier vorgelegten gewebsspezifischen Expressionsdaten unterstützen diese Annahme. Durch die Lokalisierung der Prom_{MPK3}GUS-Aktivität kann zum ersten Mal gezeigt werden, dass MPK3 in den Kotyledonen und besonders stark in den Stomata exprimiert wird. Die Expression ist jedoch nicht auf die Epidermis beschränkt, sondern findet sich auch in den Mesophyllzellen der Kotyledonen. Interessanterweise ist die Aktivität von MPK6 in den Kotyledonen auf einige Stomata begrenzt und verschwindet in späteren Folgeblättern ganz. In den Stomata des Hypokotyls tritt gar keine Aktivität auf.

Dieses Muster der GUS Aktivität suggeriert, dass MPK6 entwicklungsabhängig sehr früh an der Festlegung der Stomatamuster beteiligt ist, während MPK3 konstitutiv im Blatt exprimiert wird und die Signalgebung für die Entwicklung der Stomata mitreguliert. Dieses Phänomen, dass bei paralogen Genpaaren das eine konstitutiv exprimiert wird, und das andere auf Transkriptionsebene spezifisch reguliert wird, um möglicherweise entwicklungspezifische Signale zu verstärken, wurde auch bei einigen MAPK gefunden, die nach biotischem Stress aktiviert werden (Menges et al. 2009).

Über die Expression von MAPK in der Wurzel gibt es bisher wenige gesicherte Erkenntnisse. Lediglich für MPK4 und MPK6 liegen Protein-Expressionsstudien vor, die für beide MAPK eine erhöhte Expression in Wurzel und Wurzelspitze aufzeigen, und zusätzlich für MPK4 eine erhöhte Expression in den Seitenwurzeln (Bush und Krysan et al. 2007, Su et al. 2007). Durch die Analysen der PromGUS-Linien konnten die Aktivitäten der drei MAPK in der Wurzel gewebespezifisch zugeordnet werden (Abb. 4.1). So weisen alle drei eine erhöhte Expression in der Seitenwurzel auf, jedoch in unterschiedlichen Zonierungen innerhalb der Seitenwurzeln (Abb. 4.1) Spezifisch für MPK4 ist der Nachweis der Promotoraktivität in der Wurzelhaarzone, sowie in den äußeren Bereichen des Wurzelmeristems. Beide Zonen weisen in der *mpk4* Mutante klare Defekte auf, die sich zum einen in einer extremen Wurzelhaarmorphologie und zum anderen in abortiven Zytokineseformen äußern. Neueste detaillierte Untersuchungen der *mpk6* Mutante zeigen auch, dass diese Mutante Defekte in der Zellsymmetrie aufweist, die genau in den Geweben auftreten die durch die GUS-Aktivität gekennzeichnet sind (Müller, 2009) So treten im Apikalmeristem und in der Transitionszone deutliche zytokinetische Defekte in Erscheinung, die sich in misorientierten Teilungsstadien der Zellen in der Wurzelrinde aber auch in der Nähe des ruhenden Zentrums in der Wurzelspitze zeigen (Müller, 2009) Für die *mpk3* Mutante liegen noch keine zellbiologischen Analysen vor. Es wäre besonders interessant zu überprüfen, ob MPK3 eine Rolle bei der Seitenwurzelentwicklung spielt, denn die Promotor GUS Linie von MPK3 hatte eine auffällige Expression in den Bereichen der Seitenwurzelprimordien und jungen Seitenwurzeln gezeigt.

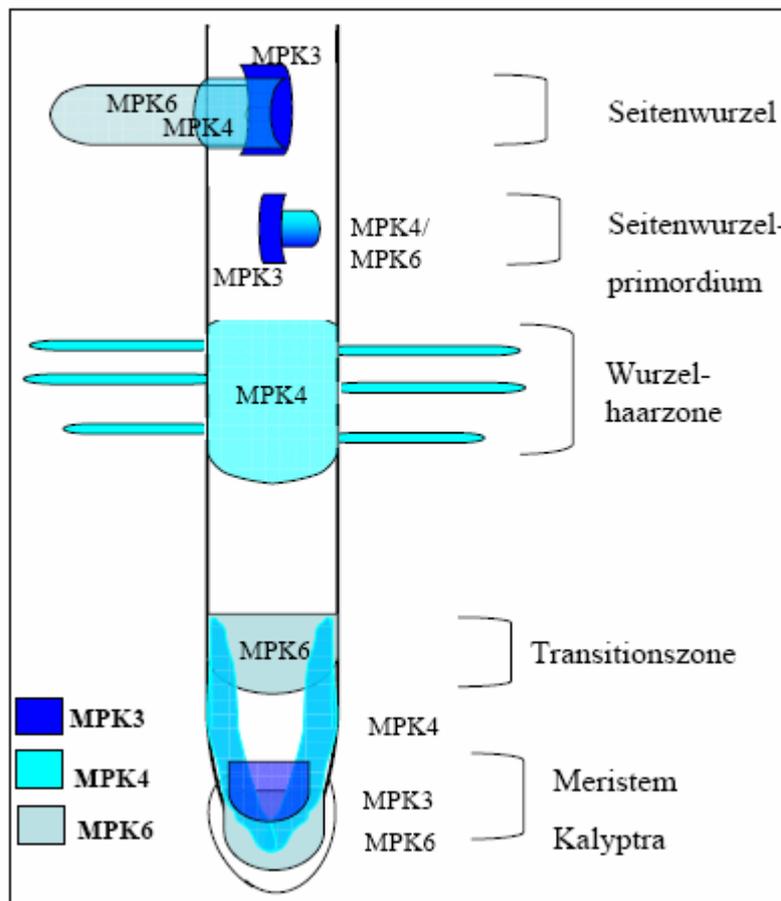


Abbildung 4.1: Schema der Promotor Aktivität von MPK3, MPK4 und MPK6 in der Wurzel von *A. thaliana*

Darstellung der Wurzel mit gewebespezifischer Expression der MAPK, zusammengestellt aus den Markierungen der stabilen Promotor-GUS-Linien.

MPK3 und MPK6 weisen eine überlappende Aktivität in der Wurzelspitze auf, wobei die MPK6 Aktivität sich noch auf angrenzende Kalyptrazellen ausbreitet. MPK4 Aktivität erstreckt sich in der Wurzelspitze im äußeren Bereich bis zur Transitionszone. In der Transitionszone findet sich MPK6 Promotoraktivität, gefolgt von MPK4 in der Wurzelhaarzone. In den Bereichen der Seitenwurzelprimordien liegt die Aktivität von MPK3, MPK4 und MPK6 in den Bereichen des Meristems, sowie zusätzlich von MPK3 in der angrenzenden Region des Zentralzylinders. In auswachsenden Seitenwurzeln befinden sich MPK4 und MPK6 in der meristematischen Region, MPK3 ist begrenzt auf den angrenzenden Zentralzylinder

Obwohl Signalwege hauptsächlich auf Proteinniveau über posttranskriptionale Modifikationen reguliert werden, kann jedoch zusätzlich die Regulierung von Signalwegen auch über eine Änderung der Genexpression beteiligter Komponenten erfolgen. Dies konnte speziell für MAPK gezeigt werden. So wird MPK3 nicht nur durch verschiedene biotische Stressauslöser transkriptional induziert (Mizoguchi et al. 1996, Desikan et al. 2001), sondern auch zusammen mit MPK4 durch abiotischen Stress zB. durch genotoxische Strahlenbelastung (UV-Strahlung) induziert (Ulm et al. 2002): Interessanterweise konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass das Transkript von MPK6 konstitutiv exprimiert vorliegt und die Transkriptmenge sich durch den ausgesetzten genotoxischen Stress nicht ändert. Somit erfolgt eine Regulierung des Transkripts spezifisch für bestimmte MAPK, dies muss jedoch nicht einhergehen mit einer frühen Aktivierung dieser MAPK und ihrer Beteiligung im Signalweg. Das MPK6 Protein wird bereits nach 10 minütiger UV-Strahlung phosphoryliert weist jedoch über den untersuchten Zeitraum von 3 h keine Unterschiede in der Menge des Transkriptes auf (Ulm et al. 2002). Dies lässt darauf schließen, dass MPK6 konstitutiv exprimiert als erstes auf genotoxischen Stress reagiert und früh aktiviert werden kann, und dass MPK3 und MPK4 erst später an weiteren Signalwegen beteiligt werden.

Dieses Phänomen der transkriptionellen Regulierung sollte nun in Bezug gesetzt werden mit gewebespezifischen Änderungen der Expression von MAPK. Die Untersuchungen an den stabilen Promotor-GUS-Linien der MAPK sollten die möglichen gewebespezifischen Änderungen der MAPK-Aktivität nach abiotischem Stress näher charakterisieren. Bezeichnend für alle drei MAPK war, dass die Stressantwort als erstes im Wurzelgewebe zu einer Induktion der Promotoraktivität führte und dies nicht einhergeht mit einer Induktion der Promotoraktivität in den oberirdischen Organen. Das Stressantworten durch transkriptionale Aktivierung der MAPK unterschiedlich sind in Spross und Wurzel, wurde in einem großen Mikroarrayexperiment ebenfalls bestätigt (Menges et al. 2009) Bei diesem Experiment wurden für 114 MAPK-Gene, die transkriptionale Regulation nach spezifischen Stressbehandlungen aufgezeigt (Menges et al. 2009).

Es zeigte sich bei den Analysen der Promotor-GUS Linien, dass abiotischer Stress nicht nur zu einer Verstärkung der Promotoraktivität im Gewebe kommt, sondern dass sich die Aktivität auch auf zuvor nicht markierte Bereiche ausweitet. Bei der Behandlung der Prom_{MPK6}GUS-Linie mit Saccharose zeigte sich eine deutliche konzentrations- und zeitabhängige Aktivierung der Promotoraktivität, die sich auch auf angrenzende Gewebe ausbreitete. Durch die RT-PCR Analysen konnte dieses auch mit einer erhöhten Transkriptmenge in Korrelation gebracht werden. Die Transkript Daten belegen für alle hier untersuchten MAPK, dass abiotischer Stress im Wurzelgewebe die mRNA Menge beeinflusst. Um detailliertere Aussagen über die unterschiedlichen Expressionsstärken zu treffen, ist es angedacht, diese Daten mit einer durchgeführten „Real-time“ PCR zu verifizieren und zu quantifizieren. Bei dieser Methode erfolgt die Quantifizierung der Fluorophor markierten DNA mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen nach jedem PCR-Zyklus Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu und ergibt durch Vergleichsmessungen mit definierten Standards, in der Regel konstant exprimierte und nicht regulierte Referenzgene, genaue Daten über die Expressionsstärke der untersuchten PCR-Produkte.

Generell zeigt sich, dass alle drei MAPK in den Bereichen, in denen es zu einer frühen Expression kommt, sie dort auch an entwicklungspezifischen Prozessen beteiligt sind. Die gewebeabhängige Kontrolle der transkriptionellen Regulation scheint somit eine wichtige Rolle in der Spezifität der MAPK-Signalgebung zu spielen. Wie diese Spezifität jedoch vermittelt wird, ist noch nicht bekannt.

4.2 Phänotypische Ähnlichkeiten zwischen *anp2xanp3*- und *mpk4*-Mutanten ist bedingt durch Defekte des kortikalen MT Zytoskletts

Vergleicht man die morphologischen Merkmale beider Mutanten, so ist offensichtlich, dass sie ähnliche Defekte aufweisen, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß und zwar treten alle beschriebenen Defekte deutlich verstärkt in der *mpk4* Mutante auf. Beide Mutanten zeigen ein verlangsamtes Wurzelwachstum und abnormale Wurzelformen, die zum einen bedingt sind durch gestörte Wachstumsmuster der epidermalen Zellen, zum anderen durch extrem abnormale Wurzelhaarformen, wie Mehrfachverzweigungen und angeschwollene Haarbasis. Zusätzlich zur Wurzel fielen auch in anderen vegetativen Geweben ähnliche Abnormalitäten auf, einschließlich stark geschwollener epidermale Zellen des Hypokotyls, sowie irregulär geformter Stomata und Epidermiszellen der Kotyledonen. Die Defekte der Wurzelhaare lassen sich möglicherweise mit Blick auf den Mechanismus des polaren Spitzenwachstums erklären. Das polare Spitzenwachstum (Wurzelhaarwachstum) wird moduliert durch eine Anzahl von zellulären Prozessen. Dazu gehören das dynamische Verhalten des Zytoskeletts, der spitzenfokussierte Ca^{2+} -Gradient und die gerichtete Vesikel/Membran Fusion, die in der Wurzelspitze das Wurzelhaarwachstum vorantreibt. Diese Prozesse unterliegen einer strengen Regulation durch ein Netzwerk von Signalmolekülen wie Reaktive Sauerstoff (Oxygen) Spezies (ROS), Guanosin-Nukleotid-bindende Proteine (kleine GTPasen), Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) und Phosphatidyl-Inositole (Šamaj et al. 2004 b). Der Phänotyp der *anp2xanp3* Mutante (MAP3K) und der *mpk4* Mutante (MAPK) erinnert an Wurzelhaare nach Behandlung mit MT-stabilisierenden Drogen (Bibikova et al. 1999, Sieberer et al. 2005) und an Mutantenlinien mit reduzierter alpha-Tubulin Expression (Bao et al. 2001). Durch MT-depolymerisierende bzw. stabilisierende Drogen verlieren Wurzelhaare ihre geradlinig fokussierte Zellform und bilden einen wellenförmigen Schlauch aus. In mehreren Fällen wird nicht nur die Direktionalität des Wurzelhaares gestört, sondern durch eine Re-Lokalisierung des Ca^{2+} Gradienten entsteht eine neue Wachstumsspitze, und als Folge bilden sich zwei bis mehrfach verzweigte Wurzelhaare (Bibikova et al., 1999). Dieses Phänomen ließ sich deutlich in der *anp2xanp3* Mutante nachweisen bei der Beobachtung des Wurzelhaarwachstums. Dabei zeigte sich, dass es zu einer Verschiebung der spitzenfokussierten Prozesse kommt, welches sich in dem Wachstumsstop der primären Wurzelhaarspitze äußert, währenddessen es dann zum Auswuchs einer weiteren Wurzelhaarspitze im basalen Teil des Wurzelhaares kommt. Die Verwendung von MT-Drogen induziert ebenfalls das Anschwellen von Zellen in der Streckungszone der Wurzel (Baskin et al. 1994, Blancaflor et al. 1998), ebenfalls ein

Phänomen, welches deutlich in beiden Mutanten zu beobachten ist. Dies führt zu der Hypothese, dass ANP2/ANP3 und MPK4 in einer Kaskade beteiligt sein könnten, die wichtig ist für die Regulation der MT-Dynamik und MT-Struktur. Die weiteren Untersuchungen des MT-Zytoskeletts durch Immunmarkierung in der vorliegenden Arbeit bestätigen die gestörte MT-Organisation in den kortikalen Bereichen der beiden Mutanten. Die stark gebündelten MT gehen einher mit dem Verlust der Zellform und ist in beiden Mutanten deutlich zu erkennen, jedoch am stärksten in der *mpk4* Mutante. Die Ergebnisse über die MT-Verteilung in den Zellen der GFP-MBD*anp2xanp3*-Linie und der GFP-MBD*mpk4*-Linie bestätigen die Hypothese der gestörten MT-Organisation in allen Zelltypen. Die Mutanten weisen extrem gebündelte, wellenförmige und weitgehend unorientierte MT in kortikalen Bereichen aller untersuchten epidermalen Zellen auf. MT spielen eine Schlüsselrolle in der Festlegung der Zellform, hauptsächlich durch Beeinflussung des Musters in dem Zellwandmaterial in expandierenden Zellen abgelagert wird (Smith, 2003). Die Dynamik und die Organisation der kortikalen MT wird von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAP) kontrolliert (Hussey et al. 2002; Sedbrook, 2004; Sedbrook und Kaloriti, 2008). Mindestens eine der neun bekannten Isoformen der MAP65-Familie in Arabidopsis, die Isoform MAP65-1 assoziiert mit kortikalen MT (Smertenko et al. 2004; Van Damme et al. 2004). Diese Isoform wurde als MT-vernetzendes MAP beschrieben, welches in der Lage ist, MT untereinander antiparallel zu verknüpfen (Chan et al. 1999, Li et al. 2007 a, Gaillard et al. 2008) und mehrere Studien konnten die bündelnden Eigenschaften von MAP65-1 für kortikale MT beweisen (Smertenko et al. 2004, Mao et al. 2006). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit zur MT-Bündelung abhängig ist vom jeweiligen Phosphorylierungsstatus des MAP65-1 Proteins (Smertenko et al. 2006). Für die Phosphorylierung kommen mehrere Proteinkinasen in Frage, darunter auch die beiden Mitogen-aktivierten Proteinkinasen, MPK4 und MPK6. Das Ausmass der Phosphorylierung ist nicht nur wichtig für die Kontrolle der MAP65-Aktivität, sondern ist auch für die korrekte Lokalisierung des Proteins nötig (Smertenko et al. 2006). Die Expression einer nicht phosphorylierbaren Form von MAP65-1 führte zu einer übermäßigen Bündelung von MT (Smertenko et al. 2006, Li et al. 2007 b), die durch das verstärkte Anhaften von MAP65-1 an MT verursacht wird. Im Gegensatz dazu weist ein phosphomimetisches Analog von MAP65-1 eine signifikant geringere Affinität zur MT-Oberfläche auf, verglichen mit dem WT Protein (Smertenko et al. 2006). In beiden Mutanten, *anp2xanp3* und *mpk4*, lassen sich Veränderungen in der MAP65-1 Lokalisierung feststellen, die diesem Erscheinungsbild ähneln. Die hier durchgeführten Immunfluoreszenzuntersuchungen mit einem spezifischen Antikörper gegen MAP65-1

zeigen, dass es im Vergleich zum Wildtyp zu einer klaren Umverteilung in der MAP65-1 Lokalisierung kommt. Dies geht einher mit den oben angesprochenen MT-Bündelungen in den kortikalen Bereichen. In *anp2xanp3* und *mpk4* findet sich MAP65-1 gleichmäßig verteilt entlang von MT, anders als bei WT Pflanzen, die ein ungleichmäßiges Verteilungsmuster zeigen. Eine artifizielle Überexpression von MAP65-1 in Suspensionszellen von *A. thaliana* führte zu einer extremen Bündelung der kortikalen MT (Mao et al. 2006). Dazu passt die Beobachtung, dass die Differenzierung von Mesophyll Suspensionskulturzellen aus *Zinnia elegans* zu Tracheenelementen, die an die Bündelung der kortikalen MT gekoppelt ist (Roberts et al. 2004), einher geht mit einer zeitweilig erhöhten Expression von MAP65-1 (Mao et al. 2006). Biochemische Analysen beider Mutanten zeigen, dass es zu einer starken Anreicherung des MAP65-1 Proteins im Vergleich zum WT kommt (George Komis, unveröffentlichte Daten). Untersuchungen des Phosphorylierungsstatus beweisen, dass die phosphorylierte Form des MAP65-1 Proteins nur in geringer Menge in den Mutanten vorliegt, währenddessen die nicht phosphorylierte Form angereichert ist (George Komis, unveröffentlichte Daten). Diese Daten unterstützen die hier gemachten Beobachtungen, dass die extreme MT-Bündelung in *anp2xanp3* und *mpk4* zurückzuführen ist auf MAP65-1 Überakkumulation und einer geringeren Phosphorylierung. Als Mittelglied (MAP2K) dieser MAPK Kaskade könnte MKK6 eine Rolle spielen, was man zusätzlich zu seiner Homologie zu NQK1 auch aus genontologischen Analysen schließen kann. So fanden Menges und Mitarbeiter (Menges et al. 2008), dass MKK6 beteiligt ist an MT-abhängigen Prozessen der Zytoskelett-Organisation. Dies gilt auch für ANP2, das ausserdem an zytoskelett - abhängigen Transportphänomenen, an der Steuerung des Zellzyklus mitwirkt (Menges et al. 2008)

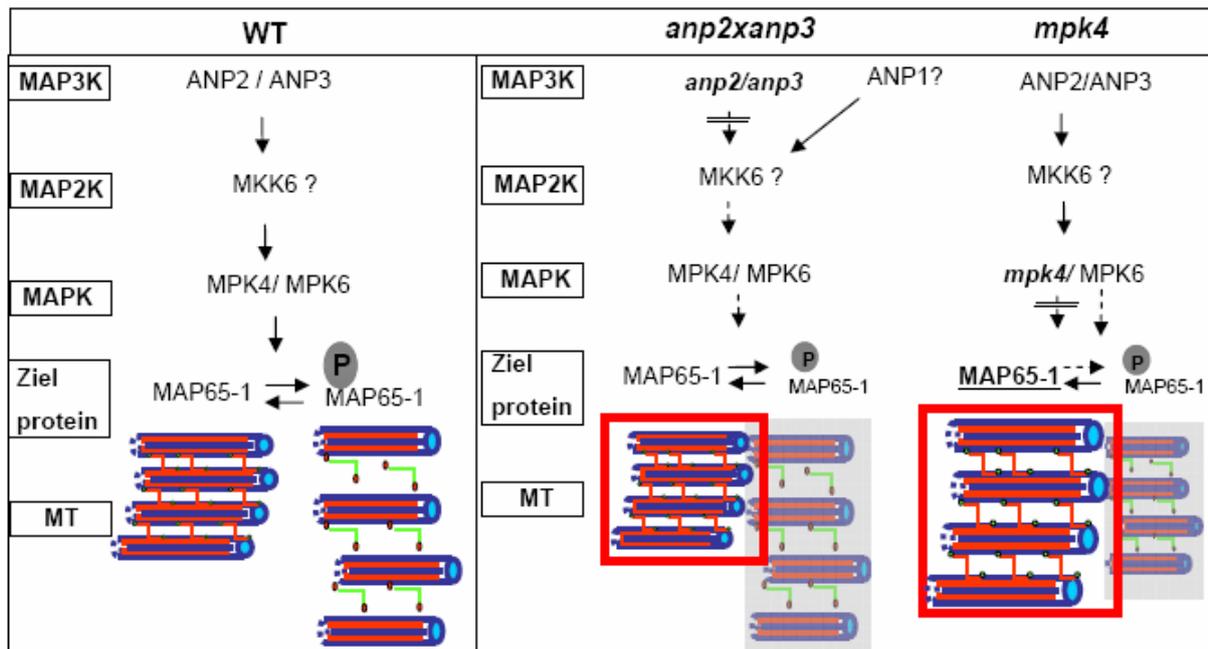


Abbildung 4.2: Modell einer möglichen MAPK Kaskade, die die Dynamik von MT beeinflusst durch die Regulation von MAP65-1

(WT) ANP2 und ANP3 werden aktiviert und steuern eine oder mehrere unbekannte MAP2K an, die ihr Signal an MPK4 oder MPK6 weitergeben. Als Zielprotein wird MAP65-1 phosphoryliert und verliert somit seine Affinität zu MT. (*anp2xanp3*) Das Ausschalten der *ANP2/ANP3* Gene führt zu einer unvollständigen Signalkaskade, welche eine geringere Phosphorylierungsaktivität von MAP65-1 entfaltet. Die unphosphorylierte Form von MAP65-1 liegt im Überschuss vor und kann mehr MT bündeln. (*mpk4*) Das Fehlen von *MPK4* führt zu einer verstärkten Bündelung von MT, sehr wahrscheinlich zurückzuführen auf ein größeres Ungleichgewicht zwischen der phosphorylierten Form von MAP65-1 und der unphosphorylierten Form.

4.3 Zytokinetische Defekte in *anp2xanp3*- und *mpk4*-Mutanten

In der *anp2xanp3*-Mutante wurden die zytokinetischen Defekte bereits beschrieben (Kryan et al. 2002), die hier in vollem Umfang bestätigt werden und erstmals mit einer Störung im MT-Netzwerk in Bezug gesetzt werden können. Die Mutantenlinie *anp2xanp3* ist gekennzeichnet durch viele zytokinetische Auffälligkeiten, wie mehrkernige Zellen, Zellwandreste aus unvollendeten Teilungsstadien, unregelmäßig expandierte Phragmoplasten und schief orientierte Zellplatten. Diese zytokinetischen Abnormalitäten konnten zudem erstmals in der *mpk4* Mutante nachgewiesen werden und zwar deutlich verstärkt. All diese beschriebenen Defekte verweisen darauf, dass in beiden Mutanten der Mechanismus gestört sein muss, der Zellwachstum und Zellteilung kontrolliert. Da in Pflanzen die kortikalen MT für die Aufrechterhaltung der Zellform von großer Bedeutung sind, und MT des Weiteren auch für die mitotischen und zytokinetischen Prozesse die entscheidenden strukturgebenden

Zellkomponenten sind, liegt es nahe, dass für den hier beschriebenen, zytokinetischen Phänotypen eine Störung der Dynamik des MT-Netzwerkes verantwortlich sein könnte. MOR1 ist ein Mitglied einer anderen Familie von MT-assoziierten Proteinen in Pflanzen, der MAP215 Familie, das für die Aufrechterhaltung der kortikalen MT-Organisation in Interphasezellen benötigt wird. Jedoch ist das Protein nicht nur an kortikalen MT lokalisiert, sondern befindet sich während der Zytokinese auch in der Überlappungszone des Phragmoplasten (Twell et al. 2002). In der *mor1* Mutante wird dies deutlich, da nicht nur das kortikale MT Netzwerk gestört ist, sondern es zusätzlich zu drastischen Veränderungen während der Zytokinese kommt. In der Mutante sind Spindeln und Phragmoplasten kurz und abnormal geformt und bestehen für längere Zeit als die im WT. Da MOR-1 wichtig ist zur Regulierung der MT Länge, wird angenommen, dass dadurch die Form und Orientierung von Spindeln und Phragmoplasten beeinträchtigt ist. Dieser Defekt führt zu falsch ausgerichteten oder unvollendeten Zellplatten und dadurch zu vielkernigen Zellen (Kawamura et al. 2006). Die Proteine der MOR- und MAP65-Familien haben also offensichtlich überlappende Funktionen, denn z.B. führt das Fehlen der MAP65-3 Isoform zu abnormalen Phragmoplasten und fehlerhafter Zytokinese. Dies hat eine Häufung von multinukleären Zellen zur Folge, was letztendlich zu einer abnormalen Wurzelentwicklung führt (Müller et al. 2004, Smertenko et al. 2004). Diese Studien beweisen, dass MT-assoziierte Proteine eine wichtige Rolle für die dynamischen Organisationen der MT während der Zytokinese spielen. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen, muß man nun folgern, dass MAPK ihrerseits in dieses Regelwerk eingreifen. Das gilt nicht nur für ANP2/ANP3 sondern auch für MPK4 und MPK6. Beide MAPK sind an den zytokinetischen MT, wie PPB und Phragmoplast lokalisiert ähnlich wie MAP65-1 (Abb. 3). Das sind alles Bereiche, die durch eine MT-Bündelung gekennzeichnet sind. Die Tatsache, dass MAPK in Pflanzen prinzipiell in der Lage sind, MT zu beeinflussen oder mit MT Subpopulationen zu interagieren ist bereits beschrieben worden. So ist z.B. SIMK (stress induced MAP kinase) aus *Medicago*, ein Homolog der Arabidopsis-MPK6, an zytokinetischen MT wie PPB und Phragmoplasten lokalisiert (Šamaj et al. 2004 a). Des Weiteren können andere MAPK wie MMK3 aus *Medicago* und NtF6 aus Tabak am Phragmoplasten in teilungsaktiven Zellen gefunden werden (Calderini et al. 1998, Bögre et al. 1999). Obwohl der direkte Beweis noch aussteht, ist doch sehr wahrscheinlich, dass ANP2/ANP3 und MPK4 sowie MPK6 zusammen in einer Kaskade angeordnet sind, die durch Phosphorylierung von MAP65-1 nicht nur die Dynamik der kortikalen MT, sondern auch das zytokinetische MT-System beeinflusst.

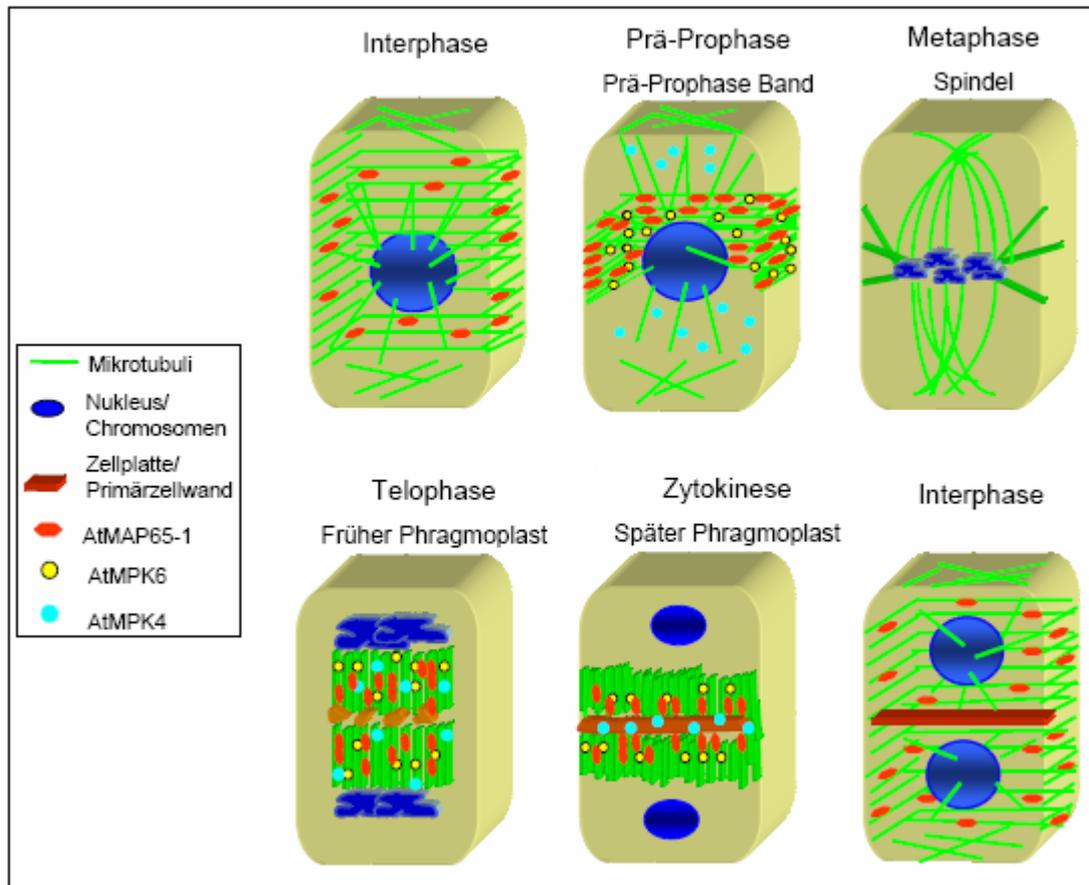


Abbildung 4.3: Modell der Lokalisierung von MAP65-1 und MAPK an MT Strukturen während der Zytokinese

In der Interphase liegen MT transversal zu Wachstumsrichtung vor, MAP65-1 lokalisiert entlang einiger MT. Während der Prä-Prophase kommt es zur Bindung von MAP65-1 entlang des PPB, gleichzeitig kommt es auch zur Bindung von MPK6 an MT des PPB. MPK4 akkumuliert im Zytoplasma. Während der Metaphase zeigt sich keine Bindung von MAP65-1 oder MPK4/MPK6 an die mitotische Spindel. In der Telophase und während der Entstehung des frühen Phragmoplasten relokalisieren MAP65-1, sowie MPK4 und MPK6 entlang der MT, die den Phragmoplasten aufbauen. Im späteren Phragmoplasten bleibt die Lokalisierung von MAP65-1 und MPK6 entlang der antiparallelen MT-Palisaden bestehen, MPK4 befindet sich in der Ebene der neu gebildeten Zellplatte. In den frisch geteilten Zellen, entsteht wieder das kortikale MT-Netzwerk mit der ursprünglichen MAP65-1 Lokalisierung.

4.4 Darstellung von MT und Aktin in *anp2xanp3* und *mpk4*

Die Darstellung des Aktin-Netzwerkes in Wurzeln von *A. thaliana* mittels Immunmarkierung galt bisher als methodische Herausforderung. Bisher wurden eine Reihe unterschiedlicher Techniken eingesetzt, um Aktinfilamente in fixierten Wurzeln zu untersuchen. Dazu gehört die Immunmarkierung von Wachs-Schnitten (Reichelt et al. 1999, Vitha et al. 2000, Baluška

et al. 2001) oder Butylmethylacrylat-Schnitten von kryofixierten Wurzeln (Baskin et al. 1996), die Verwendung von fluorochrom-konjugiertem Phalloidin an permeabilisierten Wurzelstücken (Nishimura et al. 2003), die Antikörpermarkierung an fixierten und permeabilisierten Wurzelstücken (Gilliand et al. 2003, Hu et al. 2003) und die „Freeze-Shattering“-Methode (Braun et al. 1999). Jedoch birgt jede dieser verwendeten Methoden Nachteile, und die meisten haben sich für die Darstellung des empfindlichen Aktin-Netzwerkes in Arabidopsis-Wurzeln als unzureichend erwiesen.

Eine weitere Möglichkeit, das Aktin-Zytoskelett in Pflanzen darzustellen, ist die Transformation mit GFP-Reporter-Konstrukten in *A. thaliana*, die unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors exprimiert werden. Mehrere Aktin-Reporter-Konstrukte sind bisher beschrieben worden. Sie basieren auf der Fusion zwischen einem Aktin-bindenden Protein, bzw. der Aktin-Bindedomäne aus diesem Protein, und GFP in seinen verschiedenen Varianten. Dazu gehören zB. GFP-Talin (Kost et al. 1998, 2000; Ketelaar et al. 2004, Sheahan et al. 2004), GFP-AtVLN1 (Villin) (Klahre et al. 2000) und GFP::fABD2 (Aktin-binding-domain von Fimbrin) (Voigt et al. 2005), oder Lifeact-GFP/YFP (Vidali et al. 2009, Era et al. 2009). Der Vorteil der *in vivo*-Reporter ist die Möglichkeit der Darstellung von dynamischen Prozessen in Pflanzen. Jedoch hat auch diese Methode seine Nachteile. Je nach Art des verwendeten Promotors können Aktinfilamente oft nicht in allen Geweben dargestellt werden, oder es kann zu artifiziellen Bündelungen der Aktinfilamente durch die verwendeten GFP-Reporter kommen (Ketelaar et al. 2004, Sheahan et al. 2004). Des Weiteren kann es durch den Einsatz des Lasers zu photochemisch-oxidativem Stress kommen oder auch zu mechanischem Stress durch das Auflagegewicht des Deckglases. Dadurch bedingt können Reaktionen der Pflanze eintreten, die eine Umgestaltung des Aktin-Netzwerks zur Folge haben. Vorausgesetzt chemische Fixierung führt zu einem optimalen Ergebnis, und die weitere Handhabung der Präparate verursacht keine Beschädigung, dann liefert die Immunmarkierung bei Anwendung hochauflösender Scans im Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop die beste optische Qualität mit der Option der dreidimensionalen Darstellung. Außerdem können beliebige Kombinationen von Doppel- und Dreifachmarkierungen durchgeführt werden, was in der Summe zu einem sehr detaillierten Bild der Zytoskelett- und Membranorganisation in den Wurzeln von *A. thaliana* führt. In der vorliegenden Arbeit kann die Fixierung und Handhabung von Arabidopsis Keimlingen soweit optimiert werden, dass dieses Ziel weitgehend erreicht wird. Der wichtigste Schritt für die Erhaltung des Zytoskeletts beginnt mit der Fixierung des Gewebes. In den bisher üblichen Protokollen werden Konzentrationen von 1 % Glutaraldehyd und 4 % Formaldehyd für die Vorfixierung

verwendet (z.B. Collings und Wasteneys, 2005). Dies wird im optimierten Protokoll reduziert auf 0,5 % für Glutaraldehyd und 1,5 % für Paraformaldehyd. Dadurch werden die Proteinepitope geschont, was eine bessere Antikörperbindung gewährleistet. Die anschließende Reduktion der Aldehyde durch Natriumborhydrid ist unabdingbar, ebenso eine lange Inkubation mit spezifischen Enzymen für den Zellwandverdau. Es hat sich herausgestellt, dass eine Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C mit einem Mix aus drei Zellulasen (Driselase, Cellulase, Pectoylase) nicht unterschritten werden sollte. Dieser Schritt ist wichtig für die gute Penetration der Antikörper in tiefe Gewebeschichten und somit für die Darstellung des Zytoskeletts in allen Zelltypen der Wurzelspitze und Elongationszone. Ein ganz wichtiger Punkt ist die Vermeidung von mechanischen Schäden und die Erhöhung der Reproduzierbarkeit durch Verwendung feiner Netzchen, in denen die Präparate von einer Inkubationslösung in die nächste überführt werden (s. *Mat. und Meth.* 2.7) Mit diesen Modifikationen im Protokoll der „whole-mount“ Markierung lassen sich nun beide Zytosklettelemente in WT und Mutanten Keimlingen markieren und vergleichen.

In teilungsaktiven Zellen können beide Zytosklettelemente visualisiert werden. Dabei zeigen sich wichtige Unterschiede in der Organisation der MT und der Aktinfilamente in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus. Während die kortikalen MT beim Eintreten in die Prophase abgebaut werden und nur noch Spindel MT in der Zelle vorliegen, verdichtet sich das Aktinnetzwerk im Kortex und ersetzt damit sehr wahrscheinlich die kortikalen MT. Während der frühen Bildung des Phragmoplasten findet sich Aktin entlang der Mittelzone der beiden MT-Stapel. Es bildet einen äußeren Ring, der den Phragmoplasten umgibt und wahrscheinlich als Zugkraft fungiert, um den Phragmoplasten an die äußeren Zellwände zu ziehen. Dies wird durch die Verwendung von Aktinhibitor Studien bestätigt, bei denen sich die Zellplatten danach durch wellenförmige oder schräg gestellte Formen auszeichnen (Baluska et al. 2001, Cleary, 2001; Hoshino et al. 2003; Sano et al. 2005, Zhang et al. 2009). Die benötigte Kraft für die Zellplattenexpansion wird sehr wahrscheinlich über ein actomyosin System vermittelt, da zum einen die Inhibition der Myosinaktivität ebenfalls zu einer gestörten Zellplattenentwicklung führt (Molchan et al. 2002), zum anderen eine Myosin VIII Isoform an den äußeren Enden der Zellplatte lokalisiert ist (Reichelt et al. 1999). In der *anp2xanp3* Mutante zeigt sich auch eine klare Misorientierung des Aktinnetzwerkes an einer einseitig fusionierten Zellplatte. Die Aktinfilamente bilden keinen Ring um die Zellplatte aus, sondern akkumulierten an dem ins Zellinnere ragenden Teil der Zellplatte.

Ein wichtiger Unterschied zwischen WT und Mutanten zeigt sich auch in der Aktinverteilung im Zytoplasma von Interphasezellen und wachsenden Zellen in der Streckungszone. Während

Aktin in WT Pflanzen im Zytoplasma ein feines dichtes Netzwerk ausbildet, kommt es bei beiden Mutanten zu stark gebündelten und akkumulierten Bereichen von Aktin im Zytoplasma. Über welches Regelglied das MAPK Signal an das Aktin-Zytosklett weitergegeben wird, müßte durch biochemische und genetische Experimente weiter untersucht werden. Bekannt ist, dass Profilin, ein Aktin-bündelndes Protein, durch MAPK phosphoryliert werden kann (Limmongkon et al. 2002). Dies wurde kürzlich auch durch Verwendung einer phosphorylierungsinaktiven Form von Profilin bestätigt, die eine erhöhte Bindungsaffinität zu Aktin aufweist (Jozef Šamaj, unveröffentlichte Daten). Die transiente Expression dieser Variante in Zwiebelschuppen-Epidermiszellen konnte akkumuliert an Aktinfilamentbündeln nachgewiesen werden (Jozef Šamaj, unveröffentlichte Daten).

Inwieweit jedoch die hier untersuchten MAPK die Dynamik des Ab- und Aufbaus des Aktin-Zytoskeletts und der Aktin-bündelnde Prozesse beeinflussen können, ist noch nicht bekannt.

Die Zerstörung von Aktinfilamenten führt zum Anschwellen der Wurzelspitze durch isotrope Zellexpansion (Baskin und Bivens, 1995, Blancaflor, 2000). Dies zeigt, dass neben den MT auch das Aktin-Zytoskelett eine Rolle bei der Regulierung der Zellform und der Wachstumsrichtung spielt. Vermutlich interagieren beide Zytoskelett-Elemente bei diesen Prozessen, denn man kann u.a. in elongierenden Zellen beobachten, dass sich unter der Ebene der transversal verlaufenden MT eine Schicht transversal angeordneter Aktinfilamente befindet (Collings und Allen, 2000). Genetische Studien an *A. thaliana* sprechen ebenfalls für eine Beteiligung der Aktinfilamente an der Kontrolle der Zellexpansion in Wurzeln. Die *act2-2D* Mutante weist kürzere Aktinbündel in Wurzelepidermiszellen auf, was sich in reduziertem Streckungswachstum und Defekten in der Initiation und Elongation von Wurzelhaaren äußert (Nishimura et al. 2003). Mutationen, die das *ACT7* Gen betreffen, führen zu reduziertem Wurzelwachstum, einer spiraligen Verdrehung der Zellsäulen und irregulären Zellteilungen (Gilliland et al. 2003). Ebenso dramatisch sind die Effekte von Über- oder Unterexpression Aktin-bindender Proteine, wie z.B. Profilin, ADF (Actin depolymerizing Factor), und CAP (Cyclase associated Protein) und beeinflussen direkt das Längenwachstum der Wurzeln (Ramachandran et al. 2000; Dong et al. 2001; Barrero et al. 2002). Dass beide Zytoskelett-Elemente in Pflanzen miteinander interagieren und dies besonders in den kortikalen Regionen der Zellen, ist sehr wahrscheinlich. Zum einen zeigen dies Studien an der *mor1* Mutante, die nicht nur Hypersensitivität gegenüber MT-zerstörende Drogen aufweist, sondern auch gegenüber Aktin-zerstörenden Drogen (Collings et al. 2006). Deshalb geht man von einem „cross-talk“ zwischen Aktinfilamenten und MT aus, ohne dass schon bekannt wäre, wie das zustande kommt (Collings et al. 2006). Zum anderen zeigen *in vivo*-Aufnahmen von

CFP/YFP-markierten MT und Aktinfilamenten in Bereichen des Kortex eine Interaktion zwischen diesen beiden Elementen (Jaideep Mathur, <http://www.illuminatedcell.com/Cytoskeletalsystem.html>), was auch in der vorliegenden Arbeit durch die Immunmarkierung gezeigt werden kann (Abb. 3.35).

In beiden Mutanten sind auch deutliche Übereinstimmungen in der Lage und Orientierung der MT und Aktinfilamente feststellbar, gerade in solchen Bereichen in denen beide Zytoskelettelemente gebündelt im Kortex vorliegen. Die Vermutung, dass es in diesen Bereichen aufgrund der räumlichen Nähe zu einer Interaktion zwischen beiden Elementen kommt, liegt nahe. Ob dies jedoch eine Folge der fehlenden MAPK Signalgebung in den Mutanten ist, ist noch ungeklärt. Die Generation von stabilen MAPK-Mutanten Linien, die das *in vivo* Reporterkonstrukt *GFP::fABD2* zur Visualisierung von Aktinfilamenten in Pflanzen (Voigt et al. 2005) exprimieren, können in Zukunft dazu beitragen einen Einblick in diese Prozesse zu gewähren.

4.5 Intrazelluläre Lokalisierung von MAPK durch GFP-Reporter

Die MAPK, MPK3, MPK4 und MPK6 wurden für *in vivo* Untersuchungen mit GFP fusioniert und in pflanzlichen Zellen exprimiert. Die Problematik bei der Generierung eines jeden GFP-Fusionskonstruktes liegt in der möglichen sterischen Behinderung wichtiger Proteindomänen durch das GFP, was zu fehlerhafter Aktivität oder Lokalisierung des Fusionsproteins führen kann.

Die MAPK des ERK Typs bestehen aus zwei Domänen, einer N-terminalen Domäne, die hauptsächlich aus beta-Faltblattstrukturen aufgebaut ist, aber auch zwei alpha-Helices enthält, und einer C-terminalen Domäne, die meist alpha-helikal geformt ist, und zusätzlich vier kurze beta-Faltblätter besitzt. Die C-terminale Domäne beinhaltet mehrere Aminosäure-Reste, die an katalytischen Reaktionen beteiligt sind (Turjanski et al. 2007). Ein flexibler Linker unterstützt die korrekte Orientierung zwischen der N- und C-terminalen Domäne und ist somit essentiell für die enzymatische Aktivität. MAPK binden ihre „upstream“ Regulatoren und „downstream“ Zielproteine über Oberflächeninteraktionen, durch „Docking“-Motive, welche außerhalb der katalytischen Domäne liegen (Biondi und Nebreda, 2003, Tanoue und Nishida, 2003). Diese „Docking“-Motive sind entscheidend für die Bestimmung der Substratspezifität der MAPK (Biondi und Nebreda, 2003, Tanoue und Nishida, 2003; Dimitri et al. 2005; Ho et al. 2006). Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit zwischen den MAPK ist es noch

unklar, wie die hohe Substratspezifität erzielt wird. Erste Hinweise geben vergleichende Studien, in denen unterschiedliche MAPK-Komplexe miteinander verglichen wurden. Sie zeigen, dass Veränderungen in der Aminosäure-Zusammensetzung in dem „Docking“-Motiv die Selektivität der Bindung zu Substraten beeinflusst (Turjanski et al. 2007). Des Weiteren tragen dynamische Änderungen der Konformation, die eintreten, nachdem MAPK an „scaffold“ Proteine oder Zielproteine gebunden haben, ebenfalls zur Signalspezifität des MAPK-Komplexes bei. Diese Konformationsänderungen können auch dafür verantwortlich sein, dass ihre katalytische Domäne angreifbar wird für MAP2Ks, Phosphatasen oder Transkriptionsfaktoren (Zhou et al. 2006). Diese hohe Spezialisierung in der Regulierung der MAPK durch Domänen im N-, sowie im C-terminalen Bereich, erschwert die Erstellung von funktionalen GFP-Fusionskonstrukten. Für MPK3 und MPK4 wurden deshalb zwei Varianten von Fusionskonstrukten hergestellt, zum einen wurde GFP N-terminal am Protein fusioniert und zum anderen erfolgte die Fusion am C-Terminus der MAPK.

Bisherige intrazelluläre Lokalisierungen bei *A. thaliana* zeigten für MPK4 eine Lokalisierung im Zytoplasma und im Zellkern von Mesophyll Zellen (Andreasson et al. 2005). Die Arbeitsgruppe konnte auch die Funktionalität des Fusionsproteins durch Komplementierung der *mpk4* Mutante mit MPK4-GFP beweisen. In weiteren Arbeiten wurde die gewebespezifische Expression des Fusionsproteins unter dem nativen Promotor ermittelt. Dabei zeigte sich für GFP-MPK4 die höchste Expression in Seitenwurzeln und in der Wurzelspitze (Su et al. 2007). Die Expression der in dieser Arbeit erstellten Konstrukte von 35S::GFP-MPK4 und 35S::MPK4-GFP in Tabakblättern führt ebenfalls zu einer Markierung des Zytoplasmas und des Nukleus, gleichzeitig werden bei dem N-terminalen Fusionskonstrukt, 35S::GFP-MPK4, im Zytoplasma punktförmig, bewegliche Strukturen markiert. Diese Markierung kommt bei Verwendung des C-terminalen Konstruktes, 35S::MPK4-GFP, nicht zustande. Die Überprüfung dieses Ergebnisses durch Untersuchung der Proteinzusammensetzung im Gesamthomogenat, zeigt zwar eine sehr schwache Bande auf der erwarteten Höhe für 35S::GFP-MPK4, aber darüber hinaus mehrere Abbauprodukte.

Vergleicht man die *in vivo*-Lokalisationsergebnisse der GFP-Konstrukte mit der Immunmarkierung von MPK4, so werden eklatante Unterschiede erkennbar. Der Antikörper, der spezifisch gegen *A. thaliana* MPK4 gerichtet ist, markiert in Wurzelzellen dicht gepackte, punktförmige Strukturen im Zytoplasma und spezifisch die Plasmamembran (Müller, 2009). Demgegenüber wird durch das Fusionskonstrukt 35S::GFP-MPK4 ähnliche punktförmige Strukturen nur schwach markiert, während das Hauptvorkommen des Proteins diffus im Zytoplasma und im Nukleus angezeigt wird. Eine Plasmamembran-Markierung ist mit beiden

Fusionskonstrukten nicht erkennbar. Es ist davon auszugehen, dass das GFP Domänen sterisch blockiert, die ansonsten wichtig wären für die korrekte intrazelluläre Lokalisierung der MAPK. Dies scheint auch der Fall zu sein, bei den GFP-Fusionsproteinen von MPK3.

Für MPK3 lagen bisher noch keine *in vivo* Daten über intrazelluläre Lokalisierungen in Pflanzen vor. Diese Lücke kann auch durch die vorliegenden Ergebnisse nicht geschlossen werden. Nach transienter Expression in *N. benthamiana* treten die N- und C-terminalen GFP-Fusionsproteine von MPK3 zwar im Zytoplasma und im Nukleus der Blattepidermiszellen auf. Die Effizienz der Expression ist allerdings sehr schwach, selbst nach mehreren Tagen der Expression, aufgrund dessen lässt sich im Gesamthomogenat von transformiertem Blattgewebe per Immunoblot kein Fusionsprotein nachweisen. Jedoch in der Immunfluoreszenz an Arabidopsis Wurzelgewebe treten wieder distinkte Lokalisierungen dieser MAPK an punktförmigen Strukturen im Zytoplasma auf, sowie an der Plasmamembran (Müller, 2009).

Für MPK6 wurde nur das N-terminale Fusionskonstrukt erstellt, weil bereits bekannt ist, dass an den N-Terminus fusioniertes Fluoreszierendes-Protein die Funktionalität nicht beeinflusst (Bush und Krysan et al. 2007). In Homogenaten aus transformiertem Tabak-Blattgewebe kann das Fusionsprotein als eine prominente Bande auf der Höhe von 70 kDa nachgewiesen werden, so dass man bei den Lokalisierungen auch nicht von Artefakten durch Abbauprodukte ausgehen muß. Die Expressionsstärke ist ausreichend hoch, sowohl bei transient transformierten Tabakblättern, als auch bei stabil transformierte *A. thaliana* Linien, um die Lokalisierung des Fusionsproteins gut zu dokumentieren. GFP-MPK6 tritt nicht nur im Zytoplasma und im Nukleus auf, sondern in vesikelartigen Strukturen im Zytoplasma. Die Lokalisierung von MAPK an vesikelartigen Strukturen konnte schon für SIMK, dem MPK6 Homolog aus *Medicago*, gezeigt werden (Šamaj et al. 2002). Dabei zeigten sich die markierten Vesikel in Wurzelhaaren von *Medicago sativa*, allerdings konnte die Identität dieser Strukturen noch nicht geklärt werden.

Für MPK6 in *A. thaliana* können diese Vesikel jedoch eindeutig als TGN-Vesikel identifiziert werden. Hinweise auf die Lokalisierung von MPK6 an vesikelartigen Organellen in *A. thaliana* hatte kürzlich schon Jens Müller (Müller 2009) durch Immunmarkierung geliefert. Diese Vesikel konnten ko-lokalisiert mit TGN Markern nachgewiesen werden. Dies konnte zudem durch biochemische Analysen bekräftigt werden. Sie belegten das MPK6 zu über 40% Prozent an mikrosomalen Membranen gebunden vorliegt, so dass sich der Rest auf den Zellkern und die rein zytosolische Proteinfraction verteilt (Müller, 2009).

Diese Daten von Jens Müller konnten nun mit einer weiteren unabhängigen Methode bestätigt werden, indem das Fusionsprotein 35S::GFP-MPK6 *in vivo* sauber mit dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN)-Marker, VTI12 (Geldner et al.2009), ko-lokalisiert. Somit scheint MPK6 an drei Orten in der Zelle vorzukommen, diffus im Zytoplasma, an TGN-Vesikeln und im Kern. Man kann deshalb davon ausgehen, dass MPK6 an der Regulation sekretorischer Prozesse beteiligt ist.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sind drei MAPK aus *A. thaliana* näher charakterisiert wurden. Wie bereits bekannt ist, sind MPK3, MPK4 und MPK6 an vielen abiotischen und biotischen, sowie entwicklungsspezifischen Signalwegen beteiligt. Durch Promotor GUS-Konstrukte dieser MAPK wurde die gewebespezifische Expression vor allem in der Wurzel analysiert. Alle drei MAPK sind in distinkten Geweben der Wurzel aktiv und können in ihrer Promotoraktivität und Gewebespezifität durch Applikation von abiotischen Stressen beeinflusst werden.

Der Zusammenhang zwischen MAPK Signalgebung und dem Zytoskelett in *A. thaliana* wurde durch die zellbiologische Analyse von ausgewählten MAPK Mutanten studiert. Dafür wurden zwei MAPK/MAP3K Mutanten morphologisch und zellbiologisch näher charakterisiert. Dabei handelt es sich zum einen um die *mpk4* Mutanten Linie. Sie ist die einzig bekannte Einzelmutante einer MAPK, die auffällt durch einen starken Phänotyp bedingt durch Wachstumsdefekte. Als MAP3K Mutante wurde die *anp2xanp3* Mutante gewählt. Diese Mutante ist als zytokinetische Mutante beschrieben, weist jedoch noch zusätzlich morphologische Abnormalitäten der epidermalen Zellen auf. Vergleicht man die morphologischen Merkmale beider Mutanten, so ist es offensichtlich, dass sie einem bestimmten Grad ähnliche Defekte aufweisen, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Beide Mutanten Arabidopsis Linien zeigen ein verlangsamtes Wurzelwachstum, gekennzeichnet durch Zwergwuchs. Beide Mutanten sind gekennzeichnet durch abnormale Wurzelformen, die zum einen bedingt sind durch gestörtes Wachstumsmuster der epidermalen Zellen, zum anderen durch extrem abnormale Wurzelhaarformen wie mehrfach verzweigte und geschwollene Wurzelhaare. Zusätzlich zur Wurzel fielen auch in anderen vegetativen Geweben ähnliche Abnormalitäten auf, einschließlich abnormale epidermale Zellen des Hypokotyls und Stomata und Epidermiszellen der Kotyledonen. Die morphologischen Änderungen wiesen auf mögliche Fehler im kortikalen Microtubuli (MT) Netzwerk hin. Per Immunmarkierung konnten bei beiden Mutanten gezeigt werden, dass die kortikalen MT extrem gebündelt vorliegen. Dies konnte *in vivo* durch neu generierte GFP-MBD*anp2xanp3* und GFP-MBD*mpk4* Linien noch unabhängig bestätigt werden. Als Zielprotein der MAPK Signalkaskade konnte MAP65-1 nachgewiesen werden. Ein MT-bündelndes Protein, welches in den Mutanten akkumuliert an den kortikalen MT nachzuweisen ist. Des Weiteren wurden zytokinetische Defekte in beiden Mutanten offensichtlich, die sich durch mehrkernige Zellen, schief orientierte Spindeln und Phragmoplasten und Zellwandreste äußerten. Im Detail ließen sich die mehrkernigen Zellen und Zellwandreste auf Phragmoplasten zurückführen, die sich durch fehlerhafte Expansion kennzeichneten. Doppelmarkierungen mit

MPK4 oder MPK6 und MT, sowie MAP65-1 und MT konnten eindeutig beide MAPK und MAP65-1 an zytokinetischen Präprophase Bändern (PPB) und Phragmoplasten lokalisieren. Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung der MAPK an der Regulierung von MAP65-1 während der Mitose und Zytokinese hin. Zusätzlich zum MT-Zytoskelett wurde noch das Aktin-Zytoskelett visualisiert, welches in beiden Mutanten ebenfalls verändert vorliegt.

Um *in vivo* die Beteiligung von MAPK an intrazellulären Prozessen näher zu untersuchen, wurden GFP-Konstrukte aller drei MAPK erstellt und in Pflanzenzellen exprimiert. Die Fusionsproteine sind nicht nur wie vermutet im Zytoplasma und im Nukleus lokalisiert, sondern befinden sich zusätzlich im Zytoplasma an vesikelähnlichen Strukturen. Für *35S::GFP:MPK6* konnten diese Vesikel als *trans*-Golgi network (TGN) Vesikel identifiziert werden.

6. Literaturverzeichnis

Amos LA, Schlieper D. (2005) Microtubules and maps. *Adv Protein Chem.*; **71**: 257-98.

Andreasson E, Jenkins T, Brodersen P, Thorgrimsen S, Petersen NH, Zhu S, Qiu JL, Micheelsen P, Rocher A, Petersen M, Newman MA, Bjørn Nielsen H, Hirt H, Somssich I, Mattsson O, Mundy J (2005) The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J.* **24**: 2579–2589.

Anthony, R.G., and Hussey, P.J. (1999). Double mutation in *Eleusine indica* alpha-tubulin increases the resistance of transgenic maize calli to dinitroaniline and phosphorothioamidate herbicides. *Plant J.* **18**: 669-674. PMID: 10417718

Baluška F, Ovecka M, Hirt H (2000) Salt stress- and cell cycle phase-dependent changes in expression and subcellular localization of the alfalfa mitogen-activated protein kinase SIMK. *Protoplasma* **212**: 262-267.

Baluska F, Jasik J, Edelmann HG, Salajová T, Volkmann D. (2001) Latrunculin B-induced plant dwarfism: Plant cell elongation is F-actin-dependent. *Dev Biol.* **231**(1):113-24

Bao Y, Kost B, Chua NH. (2001) Reduced expression of alpha-tubulin genes in *Arabidopsis thaliana* specifically affects root growth and morphology, root hair development and root gravitropism. *Plant J.* **28**(2):145-57

Baskin TI, Wilson JE, Cork A, Williamson RE. (1994) Morphology and microtubule organization in *Arabidopsis* roots exposed to oryzalin or taxol. *Plant Cell Physiol.* **35**(6):935-42

Baskin TI, Miller DD, Vos JW, Wilson JE, Hepler PK. (1996) Cryofixing single cells and multicellular specimens enhances structure and immunocytochemistry for light microscopy. *J Microsc.* **182**:149-6

Baskin TI, Wilson JE. (1997) Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules. *Plant Physiol.* **113**(2):493-502

Banno H, Hirano K, Nakamura T, Irie K, Nomoto S, Matsumoto K, Machida Y (1993) NPK1, a tobacco gene that encodes a protein with a domain homologous to yeast BCK1, STE11, and Byr2 protein kinases. *Mol Cell Biol.* **13**(8):4745-52

Barrero, R.A., Umeda, M., Yamamura, S., and Uchimiya, H. (2002) *Arabidopsis* CAP regulates the actin cytoskeleton necessary for plant cell elongation and division. *Plant Cell*, **14**: 149–163.

Bergmann DC, Lukowitz W, Somerville CR. (2004) Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science.* **304**(5676):1494-7

Bibikova T.N., Blancaflor E.B., Gilroy S. (1999). Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **17**: 657-665.

- Binarová P, Cenklová V, Procházková J, Daskocilová A, Volc J, Vrlík M, Bögre L.** (2006) Gamma-tubulin is essential for acentrosomal microtubule nucleation and coordination of late mitotic events in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **18(5)**:1199-212
- Biondi R.M. and Nebreda A.R.** (2003) Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions *Biochem. J.* **372** (1–13)
- Blancaflor EB, Jones DL, Gilroy S.** (1998) Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize *Plant Physiol.* **118(1)**:159-72
- Blancaflor EB.** (2000) Cortical actin filaments potentially interact with cortical microtubules in regulating polarity of cell expansion in primary roots of maize (*Zea mays* L.). *J Plant Growth Regul.* **19(4)**:406-14
- Block, M. de and Debrouwer, D.** (1992) *In situ* enzyme histochemistry on plastic-embedded plant material. The development of an artefact-free 3-glucuronidase assay. *Plant J.* **2**: 261-266.
- Bögre L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollaschek C., Barker P., Huskisson N.S., Hirt H., Heberle-Bors E.** (1999). A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* **11**: 101-113
- Braun M, Buchen B, Sievers A.** (1999) Ultrastructure and cytoskeleton of *Chara* rhizoids in microgravity. *Adv Space Res.* **24**:707-11.
- Brodersen P, Petersen M, Bjørn Nielsen H, Zhu S, Newman MA, Shokat KM, Rietz S, Parker J, Mundy J** (2006) *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J.* **47(4)**:532-46.
- Bush SM, Krysan PJ** (2007) Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *J. Exp. Bot.* **58**: 2181-91.
- Calderini O, Bögre L, Vicente O, Binarova P, Heberle-Bors E, Wilson C** (1998) A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *J. Cell Sci.* **111**: 3091-3100.
- Cangelosi GA, Best EA, Martinetti G, Nester EW.** (1991) Genetic analysis of *Agrobacterium*. *Methods Enzymol.* **204**:384-97.
- Chan J., Jensen C.G., Jensen L.C., Bush M., Lloyd C.W.** (1999). The 65-kDa carrot MT-associated protein forms regularly arranged filamentous cross-bridges between MTs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 14931-14936.
- Chan J, Calder GM, Doonan JH, Lloyd CW.** (2003) EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol.* **5(11)**:967-71.
- Chang-Jie J, Sonobe S.** (1993) Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher-plant microtubule-associated protein. *J Cell Sci.* **105 (Pt 4)**:891-901.

- Cleary AL.** (2001) Plasma membrane-cell wall connections: roles in mitosis and cytokinesis revealed by plasmolysis of *Tradescantia virginiana* leaf epidermal cells. *Protoplasma*. **215(1-4)**:21-34
- Clough SJ, Bent AF.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. **16**: 735-743.
- Colcombet J, Hirt H** (2008) *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem. J*. **413**: 217-226.
- Collings, D.A., and Allen, N.S.** (2000). Cortical actin interacts with the plasma membrane and microtubules. *In* Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions. *Edited by* C.J. Staiger, F. Baluška, D. Volkmann, and P.W. Barlow. Kluwer Academic, Dordrecht. pp. 145–163.
- Collings DA, Wasteneys GO.** (2005) Actin Microfilament and Microtubule Distribution Patterns in the Expanding Root of *Arabidopsis thaliana*. *Can J Bot* **83**: 579-590
- Collings D.A., Lill A.W., Himmelspach R., Wasteneys G.O.** (2006). Hypersensitivity to cytoskeletal antagonists demonstrates microtubule-microfilament cross-talk in the control of root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*. **170**: 275-290.
- Cyr RJ.** (1994) Microtubules in plant morphogenesis: role of the cortical array. *Annu Rev Cell Biol*. **10**:153-80.
- Cyr RJ, Palevitz BA.** (1995) Organization of cortical microtubules in plant cells. *Curr Opin Cell Biol*. **7(1)**:65-71.
- Desikan R, Hancock J, Ichimura K, Shinozaki K, Neill SJ** (2001) Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol*. **126**: 1579–1587.
- Dimitri CA, Dowdle W, MacKeigan JP, Blenis J, Murphy LO** (2005) Spatially separate docking sites on ERK2 regulate distinct signaling events in vivo. *Curr Biol*. **15(14)**:1319-24
- Dhonukshe P, Baluska F, Schlicht M, Hlavacka A, Samaj J, Friml J, Gadella TW Jr** (2006) Endocytosis of cell surface material mediates cell plate formation during plant cytokinesis. *Dev. Cell* **10**: 137-50.
- Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof YD, Friml J** (2007) Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.*, **17**: 520-527.
- Dong, C.-H., Xia, G.-X., Hong, Y., Ramachandran, S., Kost, B., and Chua, N.-H.** (2001) ADF proteins are involved in the control of flowering and regulate F-actin organization, cell expansion, and organ growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **13**: 1333–1346.
- Ehrhardt DW, Shaw SL** (2006) Microtubule dynamics and organization in the plant cortical array. *Annu Rev Plant Biol*. **57**:859-75.

Era A, Tominaga M, Ebine K, Awai C, Saito C, Ishizaki K, Yamato KT, Kohchi T, Nakano A, Ueda T. (2009) Application of Lifeact reveals F-actin dynamics in *Arabidopsis thaliana* and the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant Cell Physiol.* **50(6)**:1041-8.

Feilner T, Hultschig C, Lee J, Meyer S, Immink RG, Koenig A, Possling A, Seitz H, Beveridge A, Scheel D, Cahill DJ, Lehrach H, Kreutzberger J, Kersten B (2005) High Throughput Identification of Potential *Arabidopsis* Mitogen-activated Protein Kinases Substrates. *Mol. Cell Proteomics* **4**: 1558-1568.

Furutani I, Watanabe Y, Prieto R, Masukawa M, Suzuki K, Naoi K, Thitamadee S, Shikanai T, Hashimoto T. (2000) The SPIRAL genes are required for directional control of cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Development.* **127(20)**:4443-5

Gaillard J., Neumann E., Van Damme D., Stoppin-Mellet V., Ebel C., Barbier E., Geelen D., Vantard M. (2008). Two MT-associated Proteins of *Arabidopsis* MAP65s Promote Anti-Parallel MT Bundling. *Mol. Biol. Cell* **19**: 4534-4544

Geldner N, Dénervaud-Tendon V, Hyman DL, Mayer U, Stierhof YD, Chory J. (2009) Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multi-color marker set. *Plant J* **59(1)**:169-78.

Gilliland, L.U., Pawloski, L.C., Kandasamy, M.K., and Meagher, R.B. (2003) *Arabidopsis* actin gene *ACT7* plays an essential role in germination and root growth. *Plant J.* **33**: 319–328.

Gunning BE, Wick SM (1985) Preprophase bands, phragmoplasts, and spatial control of cytokinesis. *J Cell Sci Suppl.* **2**:157-79.

Hamel LP, Nicole MC, Sritubtim S, Morency MJ, Ellis M, Ehlting J, Beaudoin N, Barbazuk B, Klessig D, Lee J, Martin G, Mundy J, Ohashi Y, Scheel D, Sheen J, Xing T, Zhang S, Seguin A, Ellis BE (2006) Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends Plant Sci.* **11**: 192-198

Hashimoto T. (2002) Microtubules and cell elongation *Tanpakushitsu Kakusan Koso.***47**:1620-5.

Hirt H. (2000) MAP kinases in plant signal transduction. *Results Probl Cell Differ.* **27**:1-9.

Ho DT, Bardwell AJ, Grewal S, Iverson C, Bardwell L. (2006) Interacting JNK-docking sites in MKK7 promote binding and activation of JNK mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* **281(19)**:13169-79.

Hoshino H, Yoneda A, Kumagai F, Hasezawa S. (2003) Roles of actin-depleted zone and preprophase band in determining the division site of higher-plant cells, a tobacco BY-2 cell line expressing GFP-tubulin. *Protoplasma* **222(3-4)**:157-65.

Hu, Y., Zhong, R., Morrison, W.H., III, and Ye, Z.-H. (2003) The *Arabidopsis* *RHD3* gene is required for cell wall biosynthesis and actin organization. *Planta*, **217**: 912–921.

Hussey P.J., Hawkins T.J., Igarashi H., Kaloriti D., Smertenko A. (2002). The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant MT-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Mol. Biol.* **50**: 915-924.

Ichimura K., Casais C., Peck S.C., Shinozaki K., Shirasu K. (2006). MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **281**: 36969-36976.

Ishikawa M., Soyano T., Nishihama R., Machida Y. (2002). The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase contains a functional nuclear localization signal at the binding site for the NACK1 kinesin-like protein. *Plant J.* **32**: 789-798.

Jiang W, Jimenez G, Wells NJ, Hope TJ, Wahl GM, Hunter T, Fukunaga R. (1998) PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis. *Mol Cell.* **2(6)**:877-85

Junttila MR, Li SP, Westermarck J (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J.* **22**: 954-965.

Jürgens G. (2005) Cytokinesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol.* **56**:281-99.

Kawamura E, Himmelspach R, Rashbrooke MC, Whittington AT, Gale KR, Collings DA, Wasteneys GO. (2006) MICROTUBULE ORGANIZATION 1 regulates structure and function of microtubule arrays during mitosis and cytokinesis in the *Arabidopsis* root. *Plant Physiol.* **140(1)**:102-14.

Ketelaar, T., Anthony, R.G., and Hussey, P.J. (2004) GFP-mTalin causes defects in actin organisation and cell expansion in *Arabidopsis* and inhibits ADF's actin depolymerising activity *in vitro*. *Plant Physiol.* **136**: 3990–3998.

Klahre, U., Friederich, E., Kost, B., Louvard, D., and Chua, N.-H. (2000) Villin-like actin-binding proteins are expressed ubiquitously in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **122**: 35–47.

Kost, B., Spielhofer, P., and Chua, N.-H. (1998) A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments *in vivo* and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *Plant J.* **16**: 393–401.

Kost, B., Spielhofer, P., Mathur, J., Dong, C.-H., and Chua, N.-H (2000) Non-invasive F-actin visualization in living plant cells using a GFP-mouse talin fusion protein. *In Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions. Edited by C.J. Staiger, F. Baluška, D. Volkmann, and P.W. Barlow* Kluwer Academic, Dordrecht. pp. 637–659.

Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G., Sheen J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 2940-2945.

Krysan P.J., Jester P.J., Gottwald J.R., Sussman M.R. (2002). An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *Plant Cell* **14**: 1109-1120.

- Ledbetter MC, Porter KR.** (1964) Morphology of Microtubules of Plant Cell. *Science*. **144(3620)**:872-874.
- Li H., Mao T., Zhang Z., Yuan M.** (2007 a). The AtMAP65-1 cross-bridge between MTs is formed by one dimer. *Plant Cell Physiol*. **48**: 866-874.
- Li H., Yuan M., Mao T.** (2007 b). AtMAP65-1 binds to tubulin dimers to promote tubulin assembly. *J. Biochem. Mol. Biol*. **40**: 218-25.
- Li H, Zeng X, Liu ZQ, Meng QT, Yuan M, Mao TL** (2009) Arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-2 acts as a microtubule stabilizer. *Plant Mol Biol*. **69(3)**:313-24.
- Limmongkon A, Giuliani C, Valenta R, Mittermann I, Heberle-Bors E, Wilson C** (2004) MAP kinase phosphorylation of plant profilin. *Biochem Biophys Res Commun*. **324**: 382-6.
- Lloyd C.** (1994) Why should stationary plant cells have such dynamic microtubules? *Mol Biol Cell*. **5(12)**:1277-80.
- MAPK group** (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci*. **7**: 301–308.
- Mao G., Buschmann H., Doonan J.H., Lloyd CW.** (2006). The role of MAP65-1 in MT bundling during *Zinnia* tracheary element formation. *J. Cell Sci*. **119**: 753-758.
- Marc J., Granger C.L., Brincat J., Fisher D.D., Kao Th., McCubbin A.G., Cyr R.J.** (1998). A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells *Plant Cell* **10**: 1927-1940.
- Melikant B., Giuliani C., Halbmayer-Watzina S., Limmongkon A., Heberle-Bors E., Wilson C.** (2004). The *Arabidopsis thaliana* MEK AtMKK6 activates the MAP kinase AtMPK13. *FEBS Lett*. **576**: 5-8.
- Menges M., Dóczy R., Okrész L., Morandini P., Mizzi L., Soloviev M., Murray J.A., Bögre L.** (2008) Comprehensive gene expression atlas for the *Arabidopsis* MAP kinase signalling pathways. *New Phytol*. **179**: 643-662.
- Mishra NS, Tuteja R, Tuteja N** (2006) Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch. Biochem. Biophys*. **452**: 55-68.
- Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K, Shinozaki K.** (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93(2)**:765-9
- Molchan TM, Valster AH, Hepler PK.** (2002) Actomyosin promotes cell plate alignment and late lateral expansion in *Tradescantia* stamen hair cells. *Planta*. **214(5)**:683-93.

Müller J. (2009) Subcellular localization and characterisation of MAPKs, and cytoskeleton adaptation to stress in *Arabidopsis* roots. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

Müller S, Fuchs E, Ovecka M, Wysocka-Diller J, Benfey PN, Hauser MT (2002) Two new loci, PLEIADE and HYADE, implicate organ-specific regulation of cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **130(1)**:312-24

Müller S., Smertenko A., Wagner V., Heinrich M., Hussey P.J., Hauser M.T. (2004). The plant MT-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Curr. Biol.* **14**:412-7

Müller S, Wright AJ, Smith LG. (2009) Division plane control in plants: new players in the band. *Trends Cell Biol.* **19(4)**:180-8.

Nakagami H, Kiegerl S, Hirt H (2004) OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signalling through direct MAPK interaction. *J. Biol. Chem.* **279**: 26959-26966.

Nakagami H., Soukupová H., Schikora A., Zárský V., Hirt H. (2006). A Mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **281**: 38697-38704.

Nakashima M, Hirano K, Nakashima S, Banno H, Nishihama R, Machida Y. (1998) The expression pattern of the gene for NPK1 protein kinase related to mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) in a tobacco plant: correlation with cell proliferation. *Plant Cell Physiol.* **39(7)**:690-700.

Nick P. (2007) The plant cytoskeleton - new jobs for a versatile network. *Protoplasma* **230(4)**:3-125-7

Nishihama R., Banno H., Kawahara E., Irie K., Machida Y. (1997). Possible involvement of differential splicing in regulation of the activity of *Arabidopsis* ANP1 that is related to mitogen-activated protein kinase kinase kinases (MAPKKKs). *Plant J.* **12**: 39-48.

Nishihama R., Machida Y. (2000). The MAP kinase cascade that includes MAPKKK-related protein kinase NPK1 controls a mitotic proces in plant cells. *Results Probl. Cell Differ.* **27**: 119-130.

Nishihama R., Ishikawa M., Araki S., Soyano T., Asada T., Machida Y. (2001). The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes Dev.* **15**: 352-363.

Nishihama R., Machida Y. (2001). Expansion of the phragmoplast during plant cytokinesis: a MAPK pathway may MAP it out. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 507-512

Nishihama R., Soyano T., Ishikawa M., Araki S., Tanaka H., Asada T., Irie K., Ito M., Terada M., Banno H., Yamazaki Y., Machida Y. (2002). Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. *Cell* **109**: 87-99.

Nishimura, T., Yokota, E., Wada, T., Shimmen, T., and Okada, K. (2003) An *Arabidopsis* *ACT2* dominant-negative mutation, which disturbs F-actin polymerization, reveals its distinctive function in root development. *Plant Cell Physiol.* **44**: 1131–1140.

Pastuglia M, Azimzadeh J, Goussot M, Camilleri C, Belcram K, Evrard JL, Schmit AC, Guerche P, Bouchez D. (2006) Gamma-tubulin is essential for microtubule organization and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **8(6)**:1412-25.

Pellman D, Bagget M, Tu YH, Fink GR, Tu H. (1995) Two microtubule-associated proteins required for anaphase spindle movement in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* **130(6)**:1373-85.

Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H.B., Lacy M., Austin M.J., Parker J.E., Sharma S.B., Klessig D.F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A.B., Mundy J. (2000). *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**: 1111-1120

Pieterse CM, van Loon LC. (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* **4(2)**:52-58.

Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar SP (2009) MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev.* **23**: 80-92.

Ramachandran, S., Christensen, H.E.M., Ishimaru, Y., Dong, C.- H., Chao-Ming, W., Cleary, A.L., and Chua, N.-H. (2000). Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance and flowering in *arabidopsis*. *Plant Physiol.* **124**: 1637–1647.

Reichert, S., Knight, A.E., Hodge, T.P., Baluska, F., Samaj, J., Volkmann, D., and Kendrick-Jones, J. (1999) Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. *Plant J.* **19**: 555–567.

Roberts A.W., Frost A.O., Roberts E.M., Haigler C.H. (2004). Roles of microtubules and cellulose microfibril assembly in the localization of secondary-cell-wall deposition in developing tracheary elements. *Protoplasma* **224**: 217-229.

Šamaj, J., Ovecka, M., Hlavacka, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Lenart, P., Salaj, J., Volkmann, D., Bögre, L., Baluška, F., Hirt, H. (2002) Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO J.*, **21**, 3296-3306.

Samaj J, Baluska F, Hirt H. (2004 a) From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity *J Exp Bot.* **55(395)**:189-98.

Samaj J, Baluska F, Menzel D. (2004 b) New signalling molecules regulating root hair tip growth. *Trends Plant Sci.* **9(5)**:217-20.

Sangwan V., Orvar B.L., Beyerly J., Hirt H., Dhindsa R.S. (2002). Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant J.* **31**: 629-38.

- Sano T, Higaki T, Oda Y, Hayashi T, Hasezawa S.** (2005) Appearance of actin microfilament 'twin peaks' in mitosis and their function in cell plate formation, as visualized in tobacco BY-2 cells expressing GFP-fimbrin. *Plant J.* **44(4):**595-605
- Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y., Sonobe S., Igarashi H., Itoh T.J., Hidaka M., Machida Y.** (2006). Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of MT bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes Dev.* **20:** 1004-1014.
- Sauer M., Paciorek T., Benková E., Friml J.** (2006). Immunocytochemical techniques for whole-mount in situ protein localization in plants. *Nat. Protoc.* **1:** 98-103.
- Schuyler SC, Liu JY, Pellman D.** (2003) The molecular function of Ase1p: evidence for a MAP-dependent midzone-specific spindle matrix. *Microtubule-associated proteins. J Cell Biol.* **160(4):**517-28
- Sedbrook J.C.** (2004). MAPs in plant cells: delineating microtubule growth dynamics and organization. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7:** 632-640.
- Sedbrook J.C., Kaloriti D.** (2008). Microtubules, MAPs and plant directional cell expansion. *Trends Plant Sci.* **13:** 303-310.
- Sheahan, M.B., Staiger, C.J., Rose, R.J., and McCurdy, D.W.** (2004) A green fluorescent protein fusion to actin binding domain 2 of *Arabidopsis thaliana* fimbrin highlights new features of a dynamic actin cytoskeleton in live plant cells. *Plant Physiol.* **136:** 3968–397
- Sieberer B.J., Ketelaar T., Esseling J.J., Emons A.M.** (2005) Microtubules guide root hair tip growth. *New Phytol.* **167:** 711-719.
- Smertenko A, Saleh N, Igarashi H, Mori H, Hauser-Hahn I, Jiang CJ, Sonobe S, Lloyd CW, Hussey PJ.** (2000) A new class of microtubule-associated proteins in plants. *Nat Cell Biol.* **2(10):**750-3
- Smertenko A.P., Chang H.Y., Wagner V., Kaloriti D., Fenyk S., Sonobe S., Lloyd C., Hauser M.T., Hussey P.J.** (2004) The *Arabidopsis* MT-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its MT bundling activity. *Plant Cell* **16:** 2035-2047.
- Smertenko A.P., Chang H.Y., Sonobe S., Fenyk S.I., Weingartner M., Bögre L., Hussey P.J.** (2006) Control of the AtMAP65-1 interaction with MTs through the cell cycle. *J. Cell Sci.* **119:** 3227-3237.
- Smertenko A.P., Kaloriti D., Chang H.Y., Fiserova J., Opatrny Z., Hussey P.J.** (2008) The C-Terminal Variable Region Specifies the Dynamic Properties of *Arabidopsis* Microtubule-Associated Protein MAP65 Isoforms. *Plant Cell* **20:** 3346-3358.
- Smith LG.** (2003) Cytoskeletal control of plant cell shape: getting the fine points. *Curr Opin Plant Biol.* **6(1):**63-73.

- Soyano T., Ishikawa M., Nishihama R., Araki S., Ito M., Ito M., Machida Y.** (2002) Control of plant cytokinesis by an NPK1-mediated mitogen-activated protein kinase cascade. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **357**: 767-775.
- Soyano T., Nishihama R., Morikiyo K., Ishikawa M., Machida Y.** (2003) NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes Dev.* **17**: 1055-1067.
- Su S.H., Suarez-Rodriguez M.C., Krysan P.** (2007) Genetic interaction and phenotypic analysis of the *Arabidopsis* MAP kinase pathway mutations mekk1 and mpk4 suggests signalling pathway complexity. *FEBS Lett.* **581**: 3171-3177.
- Suarez-Rodriguez M.C., Adams-Phillips L., Liu Y., Wang H., Su S.H., Jester P.J., Zhang S., Bent A.F., Krysan P.J.** (2007) MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol.* **143**: 661-669.
- Takahashi Y., Soyano T., Sasabe M., Machida Y.** (2004) A MAP kinase cascade that controls plant cytokinesis. *J. Biochem.* **136**: 127-32.
- Tanaka H., Ishikawa M., Kitamura S., Takahashi Y., Soyano T., Machida C., Machida Y.** (2004) The AtNACK1/HINKEL and STUD/TETRASPORE/AtNACK2 genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. *Genes Cells* **9**: 1199-1211.
- Tanoue T, Nishida E.** (2003) Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal.* **15**(5):455-62.
- Topping JF, Agyeman F, Henricot B, Lindsey K.** (1994) Identification of molecular markers of embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* by promoter trapping. *Plant J.* **5**(6):895-903
- Twell D, Park SK, Hawkins TJ, Schubert D, Schmidt R, Smertenko A, Hussey PJ** (2002) MOR1/GEM1 has an essential role in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. *Nat Cell Biol.* **4**(9):711-4
- Turjanski AG, Vaqué JP, Gutkind JS.** (2007) MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene.* **26**(22):3240-53.
- Ulm R, Ichimura K, Mizoguchi T, Peck SC, Zhu T, Wang X, Shinozaki K, Paszkowski J.** (2002) Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *EMBO J.* **21**(23):6483-93
- Van Damme D., Van Poucke K., Boutant E., Ritzenthaler C., Inzé D., Geelen D.** (2004). In vivo dynamics and differential MT-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiol.* **136**: 3956-3967.
- Vidali L, Rounds CM, Hepler PK, Bezanilla M.** (2009) Lifeact-mEGFP reveals a dynamic apical F-actin network in tip growing plant cells. *PLoS One.* **4**(5):e5744

- Vitha, S., Baluška, F., Jasik, J., Volkmann, D., and Barlow, P.W.** (2000) Steedman's wax for F-actin visualization. *In* Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions. *Edited by* C.J. Staiger, F. Baluška, D. Volkmann, and P.W. Barlow. Kluwer Academic, Dordrecht. pp. 619–636.
- Voigt B, Timmers AC, Samaj J, Müller J, Baluska F, Menzel D** (2005) GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of Arabidopsis seedlings. *Eur J Cell Biol.* **84(6):**595-608
- Walia A, Lee JS, Wasteneys G, Ellis B.** (2009) Arabidopsis mitogen-activated protein kinase MPK18 mediates cortical microtubule functions in plant cells. *Plant J.* Apr 11 (Epub ahead of print)
- Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S.** (2007) Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis. *Plant Cell.* **19(1):**63-73.
- Williamson T, Gordon-Weeks PR, Schachner M, Taylor J** (1996) Microtubule reorganization is obligatory for growth cone turning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93(26):**15221-6
- Zhang Y, Baluška F, Menzel D, Ren H** (2009) Dynamics and roles of phragmoplast actin filaments in cell plate formation during cytokinesis of tobacco BY-2 cells. *Chinese Science Bulletin* **54**, 2051-2061
- Zhou T, Sun L, Humphreys J, Goldsmith EJ.** (2006) Docking interactions induce exposure of activation loop in the MAP kinase ERK2. *Structure.* **14(6):**1011-9.

7. Anhang

7.1 Primer und PCR-Programme

7.1.1 Tabelle der MAPK Gene aus *A. thaliana*

Gen	Bp Anzahl	AS Anzahl	
AtMPK3 (At3g45640)	1112	370	cDNA
AtMPK4 (At4g01370)	1130	376	cDNA
AtMPK6 (At2g43790)	1188	396	cDNA
AtMPK3 (At3g45640)	2016		Promotor
AtMPK4 (At4g01370)	1545		Promotor
AtMPK6 (At2g43790)	1808		Promotor

7.1.2 Tabelle der verwendeten Primer

	Primer Sequenz	Restriktions- schnittstelle	Annealing Temperatur
MPK3 forward	5`gc gga tcc atg aac acc ggc ggt ggc3`	BamHI	56°C
MPK3 reverse	5`gc act agt cta acc gta tgt tgg ctt gag3`	SpeI	
MPK3 forward	5`gca cca tgg atg aac acc ggc ggt `3	NcoI	56°C
MPK3 reverse	5`gca cca tgg aac cgt atg ttg gat tga g `3	NcoI	
MPK4 forward	5`gc gga tcc atg tcg gcg gag agt tgt ttc 3`	BamHI	56°C
MPK4 reverse	5`gc act agt tca cac tga gtc ttg agg 3`	SpeI	
MPK4 forward	5`gca cca tgg atg tcg gcg gag agt tgt `3	NcoI	56°C
MPK4 reverse	5`gca cca tgg aca ctg agt ctt gag gat tga a `3	NcoI	
MPK6 forward	5`gc gga tcc atg gac ggt ggt tca agg 3`	BamHI	

MPK6 reverse	5`gc act agt cta ttg ctg ata ttc tgg att g 3`	SpeI	58°C
PromMPK3 forward	5` gc gga tcc cat acg att att tag agg 3`	BamHI	54°C
ProMPK3 reverse	5`gc ccc ggg ttc tct ctc aat tga tc 3`	SmaI	
PromMPK4 forward	5` gc gga tcc gaa gaa gaa caa tgc tgc 3`	BamHI	58°C
PromMPK4 reverse	5` gc ccc ggg cgg agc aaa att cct cac 3`	SmaI	
PromMPK6 forward	5` gc gga tcc caa gat cca atg tgt cac 3`	BamHI	58°C
PromMPK6 reverse	5` gc ccc ggg gac cgg taa aga tga aag c 3`	SmaI	
Actin2 forward	5`gc gga tcc atg gct gag gct gat gat att caa cc 3`		56°C
Actin2 reverse	5`cg tta gac cat gga aca ttt tct gtg aac gat tcc 3`		

7.1.3 PCR-Programm der One Step RT-PCR

One Step RT-PCR	Temperatur	Zeit
Reverse Transkriptase	55°C	30min
Denaturierung	94°C	2min
Denaturierung	94°C	15sek
Annealing	55°C	30sek
Extension	68°C	1min
Final Extension	68°C	5min
26-30 Zyklen		

7.1.4 PCR Programm zur Amplifikation der cDNA

PCR cDNA	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	2min
Denaturierung	95°C	30sek
Annealing	s.6.1.2.	30sek
Extension	72°C	1min
Final Extension	72°C	10min
35 Zyklen		

7.1.5 PCR Programm zur Amplifikation der Promotoren

PCR Promotoren	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	2min

Denaturierung	95°C	30sek
Annealing	s.6.1.2.	30sek
Extension	72°C	2min
Final Extension	72°C	10min
32 Zyklen		

7.2 Lösungen und Puffer

7.2.1 Kulturmedien und Sterilisationslösungen

LB-Medium

NaCl	10 g
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Aqua dest.	ad 1 l

pH 7, autoklaviert

für Agarfestmedium inklusive 15 g/l Bacto-Agar

½ MS-Medium

MS-Medium ohne Vitamine	2,3 g
Saccharose	10 g
Aqua dest.	ad 1 l

pH 6, autoklaviert

für Agarfestmedium inklusive 4 g/l Phytigel

YEB-Medium

Rinderextrakt	5 g
Hefeextrakt	1 g
Pepton	5 g
Saccharose	5 g
Aqua dest.	ad 1 l

pH 7,2 mit NaOH, autoklaviert

MgCl ₂ (0,1 M)	14 ml
Rifampicin (50 mg/ml)	2 ml
Kanamycin (50 mg/ml)	500 µl
für Agarfestmedium inklusive 15 g/l Bacto-Agar	

Inokulationsmedium

YEB-Medium	250 ml
Saccharoselösung (0,5 %)	250 ml
Tween20 (10 %)	2,5 ml

Sterilisationslösung für Samen

Natriumhypochlorid	10 %
TritonX-100	0,1 %
in Aqua dest. (MilliQ)	

7.2.2 Lösungen für molekularbiologisches Arbeiten

Probenpuffer für Agarosegelelektrophorese

Bromphenolblau	0,25 %
Xylene Cyanole FF	0,25 %
Ficoll 400	15 %
in Aqua dest. (MilliQ)	

TAE (Tris acetate electrophoresis) Puffer

Tris	242 g
EDTA 0,5 M, pH 8,0	100 ml
Essigsäure 100 %	57,1 ml
Aqua dest. (MilliQ)	ad 1 l
pH 7,8- pH 8 mit Essigsäure eingestellt	

TELT-Lösung

Tris/HCl pH 8,0	50 mM
EDTA	62,5 mM

LiCl	2,5 mM
TritonX-100	0,4 %

TE

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

7.2.3 Lösungen für Immunmarkierung

PBS

0,14 M NaCl	8,0 g
2,7 mM KCl	0,2 g
6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	1,15 g
1,5 mM KH ₂ PO ₄	0,2 g
add Aqua dest.	1 l

pH 7,3

MTSB (1x)

50 mM PIPES	15,1 g (PIPES free acid MW = 302,4)
5 mM MgSO ₄ 7H ₂ O	1,23 g
5 mM EGTA	10 ml von 0,5 M Stocklösung

auffüllen auf 1000 ml mit Aqua dest.

pH 6,9 (mit KOH)

EGTA (0,5 M Stocklösung)

EGTA	3,8 g
Aqua dest.	10 ml

Zugabe von KOH (fest) bis Lösung klar

pH 8

Fixierlösung (1,5 % (v/v) Paraformaldehyd, 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd in ½ MTSB)

Paraformaldehyd (8 %)	1 ml
Glutaraldehyd (25 %)	100 µl
0,5x MTSB	4 ml

Permeabilisierungspuffer (10 % DMSO / 2 % Nonidet P-40 in PBS)

DMSO	10 ml
Nonidet-P40	2 ml
PBS	88 ml

Reduktionspuffer

NaBH ₄	50 mg
PBS	50 ml

Mounting Medium

p-Phenylenediamine	100 mg
Glycerol	90 %
PBS	10 %

pH 8,0, mit Carbonat/Bicarbonate oder Tris eingestellt
Lagerung bei -20 °C

7.2.4 Lösungen für Proteinextraktion und Immunoblot**12 % Trenngel**

Acrylamid/Bis (30 %/2,67)	4 ml
1,5mMTrisHCl, pH 8,8	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
10 % AmmoniumPersulfat	50 µl
TEMED	5 µl
Aqua dest.	3,35 ml

4 % Sammelgel

Acrylamid/Bis (30 %/2,67)	1,3 ml
Aqua dest.	6,1 ml
0,5 mMTrisHCl, pH 6,8	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
10 % AmmoniumPersulfat	50 µl
TEMED	5 µl

4x Probenpuffer nach Lämml

0,5M Tris-HCl, pH 6,8	1,0ml (Endkonzentration: 62,5mM)
Glycerol	1,6ml (Endkonzentration: 20%)
10% SDS	1,6ml (Endkonzentration: (2%)
β -Mercaptoethanol	0,4ml (Endkonzentration: 5%)
0,5% (w/v) Bromphenolblau	0,4ml (Endkonzentration: 0,06%)
Aqua dest.	3,0ml

SDS-Laufpuffer (10x)

250 mM Tris	30 g
1,92 M Glycin	144 g
10 % SDS	10 g

auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen

Blotpuffer (1x)

20 mM Tris	9,68 g
150 mM Glycin	45,05 g
10 % Methanol	400 ml

auf 4 Liter mit Aqua dest. auffüllen

TBS-Puffer (10x)

100 mM Tris/HCl (pH7,4)	12,1 g
1,5 mM NaCl	87,6 g

auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen

TBS-T Puffer

Tween20 (0,1 %)	500 μ l
TBS Puffer	500 ml

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1.1:** Aufbau eines typischen MAPK Moduls in *A. thaliana*
- Abbildung 1.2:** Aktivierung von MPK3, MPK4 und MPK6 durch abiotische und biotische Stimuli
- Abbildung 1.3:** Darstellung von MAPK Modulen in *A. thaliana*
- Abbildung 1.4:** Modell der MT Organisation während Mitose und Zytokinese in Pflanzenzellen
- Abbildung 1.5:** Schema der Interaktion zwischen AtMAP65-1 und der Mikrotubulus-Oberfläche
- Abbildung 1.6:** Vergleich des Tabak NACK-PQR Signalweges mit dem homologen MAPK-Modul in *A. thaliana*.
- Abbildung 1.7:** Publizierter Phänotyp der *anp2xanp3* Doppelmutante von Krysan et al. (2002)
- Abbildung 2.1:** Darstellung der „whole-mount“ Immunmarkierung
- Abbildung 3.1:** Organspezifische Expressionsanalyse von MAPK
- Abbildung 3.2:** Klonierungsschema vom Prom_{MAPK}::GUS Vektor
- Abbildung 3.3:** Gewebe- und zellspezifische Aktivität von Prom_{MPK3}::GUS in *Arabidopsis* Keimlingen
- Abbildung 3.4:** GUS Aktivität von Prom_{MPK3}::GUS nach oxidativem Streß
- Abbildung 3.5:** Gewebe- und zellspezifische Aktivität von Prom_{MPK4}::GUS in *Arabidopsis* Keimlingen
- Abbildung 3.6:** GUS Aktivität von Prom_{MPK4}::GUS nach abiotischem Streß
- Abbildung 3.7:** Gewebe- und zellspezifische Aktivität von Prom_{MPK6}::GUS in *Arabidopsis* Keimlingen
- Abbildung 3.8:** Aktivität von Prom_{MPK6}::GUS Linien nach abiotischem Streß
- Abbildung 3.9:** Expressionsanalyse von MAPK nach abiotischem Stress
- Abbildung 3.10:** *mpk4* Zwergenphänotyp und RT-PCR Analyse
- Abbildung 3.11:** Graphische Darstellung des Wurzelwachstums von *anp2xanp3* und *mpk4*
- Abbildung 3.12:** Wurzel und Wurzelhaar Phänotyp von *anp2xanp3* und *mpk4*
- Abbildung 3.13:** Zeitliche Bildfolge aus der Wurzelhaarzone der *anp2xanp3* Mutante
- Abbildung 3.14:** Graphische Darstellung des Wurzelhaar Phänotyps von *anp2xanp3* und *mpk4*
- Abbildung 3.15:** Graphische Darstellung der Wurzelstärke von *anp2xanp3* und *mpk4*
- Abbildung 3.16:** Immunmarkierung von MT in *anp2xanp3* und *mpk4*
- Abbildung 3.17:** *in vivo* Lokalisierung von MT in *anp2xanp3* und *mpk4* Wurzeln
- Abbildung 3.18:** *in vivo* Lokalisierung von MT in oberirdischen Organen der *anp2xanp3* und *mpk4* Mutante

- Abbildung 3.19:** Transiente Expression von GFP-MAP65-1 in pflanzlichen Zellen
- Abbildung 3.20:** Immunmarkierung von MT und MAP65-1 in *anp2xanp3* und *mpk4*
- Abbildung 3.21:** Immunmarkierung von MT und DAPI Färbung von Nuklei in meristematischen Zellen
- Abbildung 3.22:** Immunmarkierung von MT und FM 4-64 Färbung in *anp2xanp3* und *mpk4*
- Abbildung 3.23:** Immunmarkierung von MT im Meristem von WT und *anp2xanp3*
- Abbildung 3.24:** Immunmarkierung von MT im Meristem von *anp2xanp3* und *mpk4*
- Abbildung 3.25:** *in vivo* Aufnahmen von Zellteilungsstadien in *GFPMBD anp2xanp3* Keimlingen
- Abbildung 3.26:** Immunmarkierung von MT und MAP65-1 in meristematischen Zellen
- Abbildung 3.27:** Immunmarkierung von MT und MAP65-1 in meristematischen Zellen von *anp2xanp3*
- Abbildung 3.28:** Immunmarkierung von MPK4 in meristematischen Zellen
- Abbildung 3.29:** Immunmarkierung von MPK6 in meristematischen Zellen
- Abbildung 3.30:** Immunmarkierung von Aktin und AM 4-65 Färbung
- Abbildung 3.31:** Immunmarkierung von Aktin und AM 4-65 Färbung in der Transitionszone
- Abbildung 3.32:** Immunmarkierung von MT und Aktin in der Elongationszone von WT Wurzeln
- Abbildung 3.33:** Immunmarkierung von MT und Aktin in der Elongationszone von *anp2xanp3* Wurzeln
- Abbildung 3.34:** Immunmarkierung von MT und Aktin in der meristematischen Zone von WT Keimlingen
- Abbildung 3.35:** Immunmarkierung von MT und Aktin im Kortex von Interphasezellen
- Abbildung 3.36:** Immunmarkierung von MT und Aktin in der meristematischen Zone von *mpk4*
- Abbildung 3.37:** Klonierungsschema von *35S::GFP-MAPK* und *35S::MAPK-GFP* und Nachweis des Fusionsproteins
- Abbildung 3.38:** GFP-MPK6 in pflanzlichen Zellen
- Abbildung 3.39:** GFP-MPK6 und VTI12-mCherry in *N. benthamiana*
- Abbildung 3.40:** GFP-MPK4 und MPK4-GFP in *N. benthamiana* Blattepidermiszellen
- Abbildung 3.41:** GFP-MPK3 und MPK3GFP in *N. benthamiana* Blattepidermiszellen
- Abbildung 4.1:** Schema der Promotor Aktivität von *MPK3*, *MPK4* und *MPK6* in der Wurzel von *A. thaliana*
- Abbildung 4.2:** Modell einer möglichen MAPK Kaskade, die die Dynamik von MT beeinflusst durch die Regulation von MAP65-1
- Abbildung 4.3:** Modell der Lokalisierung von MAP65-1 und MAPK an MT Strukturen

während der Zytokinese

Tabelle 1: Intrazelluläre Lokalisierung von MAP65 Isoformen aus *A. thaliana* in pflanzlichen Zellen

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
CaMV	Cauliflower-Mosaik-Virus
cDNA	komplementäre DNA
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia 0
C-Terminus	Carboxylterminus eines Proteins
DIC	Differentieller Interphase Kontrast
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DsRed	Discosoma spec. rotes fluoreszierendes Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	extracellular signal-regulated kinases
ET	Ethylen
FM4-64	N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide
G	Guanin
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
GUS	β-Glucoronidase
JA	Jasmonsäure
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
kDa	Kilodalton
KLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
MAPK; MPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase

MAPKK; MAP2K	Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase
MAPKKK; MAP3K	Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase
MBD	Mikrotubuli bindende Domäne
mRNA	messenger RNA
MS-Medium	Murashige und Skoog-Medium
MT	Mikrotubuli
MTSB	Microtubuli stabilisierender Puffer
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
OD	optische Dichte
p	Plasmid
p. A	pro Analysis
PAGE	Polyacrylamide Gel Elektrophorese
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PM	Plasmamembran
PPB	PräProphase Band
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SA	Salicylsäure
SDS	Natrium Dodecylsulfat
SIMK	Stress induzierte MAPK
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris Acetat Elektrophorese-Puffer
TBS	Tris buffered saline
T-DNA	Transfer DNA
TGN	trans-Golgi Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Ws	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Wassilijewska
WT	Wildtyp
YEB	yeast extract beef medium

Publikationen

Zheng M, **Beck M**, Müller J, Chen T, Wang X, Wang F, Wang Q, Wang Y, Baluska F, Logan DC, Samaj J, Lin J (2009) Actin turnover is required for myosin-dependent mitochondrial movements in Arabidopsis root hairs. *PLoS One*. **4(6)**:e5961

Hoefler R, Briesen I., Pinot F., **Beck M.**, Schreiber L., Franke R. (2008) The Arabidopsis cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid ω -hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis *J. Exp. Bot.* **59(9)**:2347-60

Šamaj J, Müller J, **Beck M**, Böhm N, Menzel D (2006) Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends in Plant Science* **11**: 594-600

Grommes C., Landreth G, Sastre M, **Beck M**, Feinstein D, Jacobs A, Schlegel U, Heneka MT (2006) Inhibition of in vivo glioma growth and invasion by PPAR γ agonist treatment *Mol Pharmacol.* **70(5)**:1524-33.

Kraus JA, Wenghoefer M, Glesmann N, Mohr S, **Beck M**, Schmidt MC, Schroder R, Berweiler U, Roggendorf W, Diete S, Dietzmann K, Heuser K, Muller B, Fimmers R, von Deimling A, Schlegel U. (2001) TP53 gene mutations, nuclear p53 accumulation, expression of Waf/p21, Bcl-2, and CD95 (APO-1/Fas) proteins are not prognostic factors in de novo glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* **52(3)**:263-72.

Kraus JA, Lamszus K, Glesmann N, **Beck M**, Wolter M, Sabel M, Krex D, Klockgether T, Reifenberger G, Schlegel U (2001) Molecular genetic alterations in glioblastomas with oligodendroglial component. *Acta Neuropathol* **101(4)**:311-20

Kraus JA, Glesmann N, **Beck M**, Krex D, Klockgether T, Schackert G, Schlegel U. (2000) Molecular analysis of the PTEN, TP53 and CDKN2A tumor suppressor genes in long-term survivors of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* **48(2)**:89-94.

Manuskripte in Vorbereitung:

Beck M, Komis G, Müller J, Menzel D, Samaj J (2009) ANP2/ANP3 and MPK4 control the organization of microtubules during diffuse and tip cell growth in Arabidopsis thaliana (**in preparation**)

Müller J, **Beck M**, Mettbach U, Komis G, Hause G, Menzel D, Šamaj J (2009) Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development and localizes to pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane (**submitted**)

ERKLÄRUNG

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit in allen Teilen selbst und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Diese oder eine ähnliche Arbeit ist noch keiner anderen Stelle als Dissertation eingereicht worden.

Ich habe früher noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Bonn, den

