

**Untersuchungen zur Funktion  
der Annexine 1 bis 4 aus Arabidopsis  
mit Hilfe fluoreszierender Reporter**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Hendrik Richter**

aus

Bonn

Bonn 2014



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

1. Gutachter: Prof. Dr. Diedrik Menzel
  2. Gutachter: PD Dr. Frantisek Baluska
- Tag der Promotion: 30.04.2014  
Erscheinungsjahr: 2014





# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Calcium-Bindedomänen .....</b>	<b>2</b>
1.1.1 EF-Hand .....	2
1.1.2 Negativ geladene Proteinoberfläche als Bindedomäne .....	2
1.1.3 C2-Bindedomäne .....	3
1.1.4 Annexin-Domäne .....	3
<b>1.2 Pflanzliche Annexine.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Annexine als Calciumtransporter .....	5
1.2.2 Calciumabhängigkeit und Membranbindung.....	6
1.2.3 Oligomerisierung von Annexinen .....	8
1.2.4 Lokalisation von Annexinen.....	10
1.2.5 Reaktionen auf Umwelteinflüsse.....	11
1.2.5.1 Reaktion auf Licht .....	13
1.2.5.2 Metallstress.....	14
1.2.5.3 Pathogenabwehr.....	14
1.2.6 Oxidativer Stress .....	15
1.2.7 Posttranslationale Modifikationen .....	17
1.2.8 Interaktion von Annexinen mit dem Aktinzytoskelett.....	18
1.2.9 Mögliche Funktionen von Annexinen .....	19
<b>1.3 Zielsetzung .....</b>	<b>22</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>23</b>
2.1.1 Lebendmaterial .....	23
2.1.2 Genetisches Material .....	23
2.1.3 Lösungen und Puffer.....	23
2.1.4 Inhibitoren, Farbstoffe und Antikörper .....	23
2.1.4.1 Inhibitoren .....	23
2.1.4.2 Farbstoffe.....	24
2.1.4.3 Antikörper.....	24
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.2.1 Erstellen der GFP Fusionskonstrukte und der transgenen Pflanzen.....	25
2.2.2 Transiente Expression.....	27
2.2.2.1 Partikelbeschuss.....	27

2.2.2.2 Agrobakterieninfiltration .....	28
2.2.3 Wachstumsbedingungen .....	29
2.2.3.1 Wachstumsbedingungen für mikroskopische Untersuchungen .....	29
2.2.3.2 Wachstumsbedingungen für Trockentoleranztest.....	30
2.2.4 Lufttrocknung mit anschließender Rehydrierung .....	30
2.2.5 Erzeugung eines Gravitations- und Hypergravitationsstimulus.....	31
2.2.6 Inhibitor- und Farbstoffbehandlung .....	32
2.2.7 Proteinaufreinigung und Immunoblot .....	32
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Annexin1 .....</b>	<b>35</b>
3.1.1 <i>In-vivo</i> Lokalisation von AtAnx1/GFP Fusionsproteinen .....	35
3.1.2 Kolokalisation von AtAnx1-GFP mit DsRed-HDEL.....	40
3.1.3 GFP-link-AtAnx1 Überexpression in <i>A. thaliana</i> .....	41
<b>3.2 Annexin2.....</b>	<b>42</b>
3.2.1 Überexpression von AtAnx2-GFP in <i>A. thaliana</i> .....	42
3.2.2 Lokalisation von AtAnx2-GFP in <i>A. thaliana</i> nach Schwerkraftreizung .....	43
<b>3.3 Annexin3.....</b>	<b>46</b>
<b>3.4 Annexin4.....</b>	<b>48</b>
3.4.1 <i>In-vivo</i> Lokalisation von GFP fusioniertem AtAnx4 unter Kontrollbedingungen ....	48
3.4.2 Färbungen und Inhibitorbehandlungen von GFP-AtAnx4 Überexpressionslinien	50
3.4.3 Koexpression von Organellmarkern mit GFP-AtAnx4.....	57
<b>3.5 Trockenstressbehandlungen Annexin Überexpressionslinien.....</b>	<b>61</b>
3.5.1 Lufttrocknung von 35S:GFP-AtAnx1, 2 und 4-Pflanzen.....	61
3.5.2 Behandlung von GFP-AtAnx1-Pflanzen mit Abscisinsäure.....	70
3.5.3 Langzeit trockenexperiment mit GFP-AtAnx4-Pflanzen.....	71
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>73</b>
<b>4.1 Lokalisation der Annexine AtAnx1 bis 4 und ihre möglichen Funktionen .....</b>	<b>73</b>
4.1.1 Lokalisation und Funktionen der GFP-AtAnx1 Fusionsproteine .....	73
4.1.1.1 Lokalisation von AtAnx1 unter Kontrollbedingungen .....	73
4.1.1.2 Kolokalisation von AtAnx1 mit dem endoplasmatischen Retikulum .....	75
4.1.1.3 Expressionmuster des endogenen Promotors von AtAnx1 .....	76
4.1.1.4 Physiologische Effekte der GFP-link-AtAnx1 Überexpression .....	77
4.1.2 Lokalisation und Funktion des AtAnx2-GFP Fusionsproteins .....	78
4.1.2.1 Lokalisation von AtAnx2-GFP unter Kontrollbedingungen.....	78
4.1.2.2 Relokalisation von AtAnx2 nach Lageveränderung .....	79
4.1.3 Lokalisation und Funktion des Fusionsproteins AtAnx3-GFP .....	80
4.1.4 Lokalisation und Funktion des Fusionsproteins GFP-AtAnx4 .....	81
4.1.4.1 N-Terminus AtAnx4 .....	83
4.1.4.2 Kolokalisation von AtAnx4 mit Chloroplasten .....	83

---

4.1.4.3 Kolokalisation von AtAnx4 mit dem ER .....	84
4.1.4.4 Kolokalisation von AtAnx4 mit Aktin und aktinabhängige Bewegung .....	86
4.1.4.5 Kolokalisation von AtAnx4 mit anderen Organellen und Mikrotubuli .....	88
4.1.5 Trockenstressbehandlungen Annexin Überexpressionslinien .....	89
4.1.5.1 Relokalisation von AtAnx1 und AtAnx2 nach Trockenstress-Behandlung.....	89
4.1.5.2 Abscisinsäurebehandlung von 35S:GFP-AtAnx1-Pflanzen .....	93
4.1.5.3 Physiologische Auswirkungen der Überexpression von GFP-AtAnx4.....	94
4.1.6 Ausblick .....	95
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>107</b>
7.1 Primer: .....	107
7.2 PCR Programme .....	108
7.3 Linker .....	108
7.4 Lösungen und Puffer .....	111

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Faltungsmodell von AnxGh1.....	4
Abbildung 2: Röhrenform von AnxGh1 an <i>in-vitro</i> -erzeugten Membranen.....	9
Abbildung 3: <i>in-vivo</i> Lokalisation von AtAnx2-GFP unter Prom <sub>AtAnx2</sub> in der Wurzelspitze.....	13
Abbildung 4: Mögliche Funktionen von pflanzlichen Annexinen.....	19
Abbildung 5: Schematisches Model von Annexinen als Bestandteil des Membranreparatursystems.....	20
Abbildung 6: Lokalisation von AnxA1-GFP nach Membranläsion in BS-C-1-Zellen.....	21
Abbildung 7: Herstellung des pGwp (pCatGFP, without promoter) und des Vektors pGwp inklusive prom <sub>AtAnx1</sub> : AtAnx1-GFP.....	27
Abbildung 8: Übersicht der Klonierungsschemata für die erstellten Fusionskonstrukte.....	34
Abbildung 9: Westernblots von Annexin/GFP–Fusionsproteinen und unfusioniertem GFP.....	34
Abbildung 10: Lokalisation von unfusioniertem GFP und AtAnx1-GFP in Lauchepidermiszellen <i>in-vivo</i> .....	35
Abbildung 11: <i>In-vivo</i> Lokalisation von GFP-I-AtAnx1 (35S-Promotor) im <i>Arabidopsis</i> - Blattgewebe.....	36
Abbildung 12: <i>In-vivo</i> Lokalisation von GFP, GFP-AtAnx1 und prom <sub>AtAnx1</sub> :AtAnx1-GFP in unbehandelten Pflanzen.....	38
Abbildung 13: <i>In-vivo</i> Lokalisation von GFP-AtAnx1 und prom <sub>AtAnx1</sub> :AtAnx1-GFP in Wurzelhaaren.....	39
Abbildung 14: Kolokalisation von AtAnx1-GFP mit dem ER in Epidermiszellen von Tabakblättern.....	40
Abbildung 15: Vergleich von drei Wochen alten Pflanzen die unfusioniertes GFP bzw. GFP-link- AtAnx1 exprimieren.....	41
Abbildung 16: <i>In-vivo</i> Lokalisation von AtAnx2-GFP in stabil transformierten <i>Arabidopsis</i> - Pflanzen.....	43
Abbildung 17: AtAnx2-GFP exprimierende Pflanze (35S-Promotor) nach 30 min 90° Lageveränderung in der Wurzelspitze.....	44
Abbildung 18: AtAnx2-GFP Überexpressionspflanze nach 30 min Zentrifugation mit 7fach g in der Wurzelspitze.....	45
Abbildung 19: <i>In-vivo</i> Lokalisation von AtAnx3-GFP in Blättern von Tabak und <i>Arabidopsis</i> - Pflanzen.....	47
Abbildung 20: Transiente Expression von 35S:GFP-AtAnx4 <sub>NT</sub> in Tabakepidermiszellen.....	48
Abbildung 21: <i>In-vivo</i> Lokalisation von GFP-AtAnx4 in Blattepidermiszellen und der Wurzelhaube.....	49
Abbildung 22: Zeitserie (270 s) einer <i>in-vivo</i> Lokalisation von GFP-AtAnx4 in Tabakzellen.....	50
Abbildung 23: <i>In-vivo</i> Lokalisation von GFP-AtAnx4 und durch Mitotracker gefärbte Mitochondrien in Zellen der Wurzeldifferenzierungszone.....	51
Abbildung 24: <i>In-vivo</i> Lokalisation von GFP-AtAnx4 und durch FM4-64 gefärbte BFA- Kompartimente und Plasmamembranen.....	52
Abbildung 25: Lokalisation von GFP-AtAnx4-Strukturen im Hypokotyl nach Behandlung für 1 h in 5 % Glycerin.....	53
Abbildung 26: Lokalisation vom GFP-AtAnx4 im Zentralzylinder von stabil transformierten <i>Arabidopsis</i> -Wurzeln.....	54
Abbildung 27: <i>In-vivo</i> Lokalisation von GFP-AtAnx4 in Zellen des Zentralzylinders von stabil transformierten <i>Arabidopsis</i> -Wurzeln nach 1 h Latrunculin B-Behandlung.....	55
Abbildung 28: <i>In-vitro</i> Lokalisation von stabil transformiertem GFP-AtAnx4 in Blattepidermiszellen stabil transformierter <i>A.thaliana</i> -Pflanzen gefärbt mit Phalloidin–	

---

TRITC.....	57
Abbildung 29: <i>In-vivo</i> Kolo­kalisierung von GFP-AtAnx4 und DsRed-ABD2.....	58
Abbildung 30: <i>In-vivo</i> Kolo­kalisierung von GFP-AtAnx4 und dem ER (35S:DsRed-HDEL) in Tabakblätter.....	60
Abbildung 31: GFP, GFP-AtAnx1 und AtAnx2-GFP Lokalisation nach 30 s Lufttrocknung in der Wurzelspitze.....	62
Abbildung 32: Lokalisation von GFP (unfusioniert), GFP-AtAnx1 und AtAnx2-GFP nach Rehydrierung in der Wurzelspitze (siehe auch Kap. 2.2.4).....	64
Abbildung 33: Mit BFA behandelte und FM4-64 angefärbte Wurzelspitzen von stabil mit GFP- AtAnx1 transformierte <i>A.thaliana</i> -Pflanzen.....	66
Abbildung 34: Mit BFA behandelte und FM4-64 angefärbte Wurzelspitzen von stabil mit AtAnx2- GFP transformierten <i>A. thaliana</i> -Pflanzen.....	66
Abbildung 35: Mit BFA behandelte und mit FM4-64 gefärbte Wurzelspitzen von stabil transformierten GFP-AtAnx1 Keimlingen nach Lufttrocknung mit anschließender Rehydrierung.....	67
Abbildung 36: Mit BFA behandelte und mit FM4-64 gefärbte Wurzelspitzen von stabil transformierten AtAnx2-GFP Keimlingen nach Lufttrocknung mit anschließender Rehydrierung.....	68
Abbildung 37: Wurzellängenzuwachs von unbehandelten und behandelten Überexpressionslinien.....	69
Abbildung 38: GFP-AtAnx1 Lokalisation in der Wurzelspitze und der Differenzierungszone in stabil transformierten Pflanzen nach 1 h ABA-Behandlung.....	70
Abbildung 39: Trockenstressversuch mit 6 Wochen alten <i>A.thaliana</i> -Pflanzen.....	72
Abbildung 40: Mögliche Interaktionen von tierischen Annexinen mit Aktin.....	87
Abbildung 41: Mögliche Funktionen von AtAnx4.....	88



# 1. Einleitung

Wie alle Organismen haben auch Pflanzen sehr komplexe Systeme entwickelt, um Umweltreize wahrzunehmen und in interne molekulare Signale umzuwandeln. Diese Signale werden weitergeleitet und lösen je nach Reiz und Zelltyp spezifische Antworten aus. Auf zellulärer Ebene sind Endomembranen mit ihren peripheren und integralen Membranproteinen, aber auch zytosolische Domänen und Elemente des Zytoskeletts wichtig für die Signaltransduktion. Ebenso wichtig sind Phytohormone und sekundäre Botenstoffe (second messengers), um Informationen innerhalb eines Organismus bis in die einzelnen Zellen hinein weiterzuleiten. Zu den sekundären Botenstoffen in intrazellulären Signalketten gehören auch Mineralstoffe wie z. B. Calcium, welches in gelöster Form von Pflanzen über die Wurzeln aufgenommen und nach der Aufnahme über das Xylem im gesamten Organismus verteilt wird (Ebrahimi und Bhatla 2012).

Mit Hilfe von Membrantransportern bzw. Ionenkanälen werden die gelösten Calciumionen über die Plasmamembran in die Zellen transportiert, wo sie hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum (ER) aber auch in den Mitochondrien, Chloroplasten und Dictyosomen gespeichert werden. Calcium kann über die Änderung seiner Konzentration im Zytoplasma an verschiedenen Signalwegen und Aktivierungsvorgängen beteiligt sein. Dies erfordert von der Zelle eine Überwachung und präzise Regulation des Calciumlevels (Hepler 2005). Veränderungen in der zytoplasmatischen Calciumkonzentration können von der Zelle anschließend durch Calcium-abhängige Proteine registriert und in spezifische Signale umgewandelt werden (Kudla et al. 2010). Die Bindung von Calcium an diese Proteine geschieht hierbei über verschiedene Bindedomänen.

## 1.1 Calcium-Bindedomänen

### 1.1.1 EF-Hand

Die EF-Hand ist die am häufigsten vorkommende Calcium-Bindedomäne in Proteinen. Der Name dieser Domäne leitet sich von ihrer dreidimensionalen Struktur ab, welche an eine Hand mit gestrecktem Zeigefinger und abgewinkeltem Daumen erinnert. Die Domäne wurde zuerst als Schlaufe (englisch: Loop) zwischen den beiden alpha-Helices E und F im kristallisierten Parvalbumin beschrieben (Kretsinger und Nockolds 1973) und tritt mindestens paarweise auf. Das Helix-Loop-Helix Motiv umfasst ca. 30 Aminosäuren. Davon bilden 12 Aminosäuren die Calcium-bindende Loop-Region mit je zwei Asparagin (Asn) und Aspartat (Asp)-Resten. Das Calciumion wird von der Struktur umschlossen und verändert die Konformation des Bindeproteins so, dass andere Bindungspartner die Veränderung registrieren und darauf reagieren können.

Die EF-Hand Domäne ist in vielen verschiedenen Proteinen zu finden und besitzt eine sehr hohe Variabilität in der Aminosäuresequenz. Die hohe Variabilität und die große Zahl potentiell interagierender Proteine führen zu einer Reihe von unterschiedlichen Aufgaben, welche durch EF-Hand-Proteine ausgeführt werden können (Gifford et al. 2007).

### 1.1.2 Negativ geladene Proteinoberfläche als Bindedomäne

Neben der EF-Hand Domäne gibt es eine geringere Anzahl von weiteren Calcium-Bindemotiven. Ein Beispiel hierfür findet man beim Calsequestrin, einem luminalen Protein des sarkoplasmatischen Retikulums im gestreiften Muskel (Yano und Zarain-Herzberg 1994), welches Calcium über eine negativ geladene Oberfläche bindet. Calsequestrin wurde zuerst in tierischen Zellen entdeckt, ein ähnliches Protein wurde aber auch in *Streptanthus tortuosus* (Brassicaceae) als essentielles Protein im Lumen des ER gefunden (Chou et al. 1989). Durch die Aufnahme von Calcium in das ER kann die zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf einem niedrigen Grundniveau gehalten werden. Nach



dem Eintreffen eines Signals reagiert Calsequesterin kurzfristig, indem Calcium abgegeben und über Kanäle in der ER Membran in das Zytoplasma abgegeben wird.

### 1.1.3 C2-Bindedomäne

C2-Bindedomänen bestehen aus 8  $\beta$ -Faltblattstrukturen, welche ein  $\beta$ -Sandwich bilden. Calcium bindet hierbei in einer Vertiefung zwischen der ersten und der letzten Schleife. C2-Domänen sind häufig an katalytische Domänen von peripheren Membranproteinen gebunden, welche über die Calciumbindung mit ihren Substraten interagieren können. Beispiele für Proteine mit C2-Bindedomäne sind die Proteinkinase C oder die Phosphatidylinositol-3-Kinase aber auch das regulatorische Protein Synaptotagmin. Diese Proteine sind Bestandteile von membranständigen Signaltransduktionsketten (Rizo und Sudhof 1998; Schapire et al. 2008). Im Falle des Synaptotagmin konnte gezeigt werden, dass es einen wichtigen Bestandteil des Membranreparatursystems in Wurzelgeweben (*A. thaliana*) darstellt (Schapire et al. 2008, 2009).

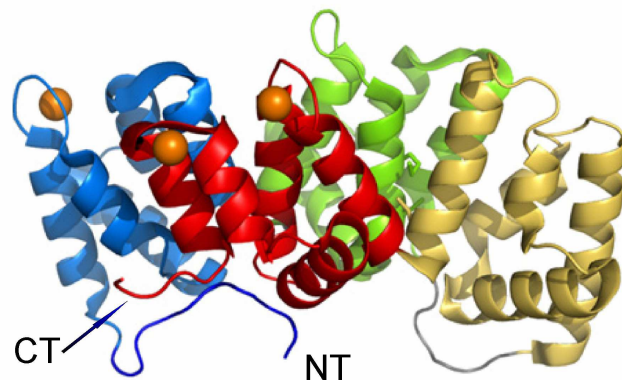
### 1.1.4 Annexin-Domäne

Ein weiteres Beispiel für eine Calcium-Bindedomäne ist die Annexin-Domäne. Eine Annexin-Domäne besteht aus vier so genannten Annexin-Wiederholungen, welche eine dicht gepackte alpha-helikale Scheibe bilden (Abb. 1). Calcium wird bei dieser Domäne an der konvexen Außenseite gebunden. Da Calciumionen dem Protein eine positiv geladene Oberfläche verleihen, kann dieses nun an negativ geladene Lipide binden. Die meisten Annexine haben 4 Annexin-Wiederholungen, obwohl vereinzelt auch bis zu 8 Wiederholungen auftreten (tierisches Annexin A6) (Cornely et al. 2011).

## 1.2 Pflanzliche Annexine

Annexine können auf allen Ebenen der Signaltransduktion direkt oder indirekt wirken, was mit der Bindung an Calcium zusammenhängen kann. Sie wurden zuerst in tierischen Geweben entdeckt und hatten Namen wie Synexin,

Lipocortin u. s. w. (Creutz et al. 1978; Gerke und Moss 2002), was den Zusammenhang verdeutlichen sollte, in welchem sie entdeckt wurden. Erst später wurde, mit Hilfe von genetischen Analysen, eine Verwandtschaft der unabhängig voneinander entdeckten Annexine festgestellt (Crumpton und Dedman 1990). In Pflanzen wurden Annexine das erste Mal 1989 beschrieben (Boustead et al. 1989) und seitdem in vielen Signalwegen identifiziert.



**Abbildung 1: Faltungsmodele von AnxGh1.**

Rot = Annexin-Wiederholung 1, Gelb = Annexin-Wiederholung 2, Grün = Annexin-Wiederholung 3, Blau = Annexin-Wiederholung 4. Orange Kugeln = Calcium in der jeweiligen Bindungstasche. (Mit PyMOL erstellt) modifiziert nach (Konopka-Postupolska et al. 2011);

Pflanzliche Annexine bestehen aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne. Im Vergleich zu der N- und C-terminalen Domäne bei tierischen Annexinen ist der N-Terminus des Proteins recht kurz (5-50 Aminosäuren). Die restlichen AS der Annexine werden als C-terminale Domäne bezeichnet. Innerhalb der C-terminalen Domäne gibt es 4 Annexin-Wiederholungen, welche Typ I und Typ III – Strukturen besitzen können. Die Bindung an Calcium erfolgt über diese Strukturen, wobei Typ I – Bindestellen als Bindemotiv eine G-X-G-T Aminosäure(AS)-Sequenz innerhalb der auch als Endonexinsequenz bezeichneten Annexindomäne besitzen. Endonexin ist ein mit Annexin verwandtes Protein in dem die Annexin-Domänen erstmals beschrieben wurden (Schlaepfer und Haigler 1987).

Pflanzliche Annexin-Wiederholungen bestehen aus jeweils 5 Helices (A-E) (Hofmann und Huber 2003) und sind mutmaßlich, anders als bei tierischen Annexinen, nicht alle in der Lage Calcium zu binden. Für das Annexin GhAnx1

aus der Baumwolle wurde bereits gezeigt, dass nur Wiederholung 1 und 4 in der Lage sind Calcium zu binden (Abb. 1) (Hu et al. 2008). In der Wiederholung 2 wird eine benötigte saure Seitengruppe durch ein Histidin ersetzt, was die Bindefähigkeit für Calcium herabsetzt. Trotz einer sauren Seitengruppe in Wiederholung 3 fehlt hier eine Endonexin-Sequenz, was die Ursache für die fehlende Calcium-Bindung darstellen könnte. Inwieweit dieses Ergebnis auf andere pflanzliche Annexine übertragbar ist, muss noch experimentell überprüft werden.

Die Entdeckung einer Calcium-unabhängigen Membranbindung von tierischen Annexinen führte zu der Theorie dass auch pflanzliche Annexine Calcium-unabhängig an Membranen binden können. Diese Theorie konnte später bestätigt werden. Verantwortlich dafür ist eine durch Phosphorylierung einzelner Aminosäuren verursachte Einfaltung des N-Terminus (Schlaepfer und Haigler 1987).

Durch einen Abfall des zytoplasmatischen pH-Wertes können Annexine über ein verändertes Membranpotential ebenfalls an Membranen relokalisieren. Das positiv geladene Protein folgt in diesem Fall, von einer negativen Ladung angezogen, dem pH-Gradienten (menschliches Annexin 5) (Smith et al. 2009).

Ob dieses Ergebnis auf pflanzliche Annexine übertragbar ist und welche der möglichen Mechanismen hier von Bedeutung sind, müssen detaillierte Forschungen zeigen.

### 1.2.1 Annexine als Calciumtransporter

Alle Experimente, welche für Annexinen eine Calcium-transportierende Funktion postulieren, wurden in *in-vitro* Systemen durchgeführt. Eine Bestätigung *in-vivo* fehlt bisher (Hofmann et al. 2000; Laohavisit et al. 2009).

Obwohl experimentelle Daten vorliegen, die eine Rolle von Annexinen als Calciumtransporter stützen (Gorecka et al. 2007), gibt es Zweifel, dass Annexine ursächlich als Calciumtransporter fungieren (Konopka-Postupolska et al. 2011). In Zusammenhang mit einer Calciumtransportfunktion wurde in *Arabidopsis* bisher vor allem das erste der acht *Arabidopsis*-Annexine untersucht. Bei einem Experiment welches AtAnx1 mit einem Calciumtransport in Verbindung bringt, wurde mit Hilfe der "Patch-Clamp" Methode der Ionenfluss

über eine Membran gemessen. Nach der Zugabe von AtAnx1 aus *Arabidopsis* war der Ionenfluss erhöht (Gorecka et al. 2007). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in *Atanx1* Knockout-Mutanten der Calciuminflux (und der Kaliuminflux) in Wurzelhaaren und in Wurzelepidermiszellen nach Zugabe von ROS gestört war (Laohavisit et al. 2012). Und auch in einem Kältestressexperiment wurde nach einer Kältebehandlung und anschließender Annexinzugabe ein erhöhter Calciumfluss über eine Membran festgestellt (Breton et al. 2000).

Gegen eine Funktion als Calciumtransporter spricht hingegen, dass die Porengröße in nativen, gefalteten Annexinen ist zu klein, um als Calciumkanal fungieren zu können. Möglich wären für Monomere eine theoretische Leitfähigkeit von maximal 4-5 pS (piko Sievert) (Konopka-Postupolska et al. 2011). Es wurden in früheren Experimenten jedoch bis zu 30 pS in "Patch-Clamp"-Versuchen gemessen (Burger et al. 1994).

Eine Möglichkeit wäre hier, dass die Bildung von Annexin-Oligomeren (Ringstruktur) oder Konformationsänderungen im Annexin (Erweiterung der Pore) einen Ionenfluss durch Membranen verursachen. Dass Annexine als Calciumtransporter im eigentlichen Sinne fungieren ist nach dem aktuellen Stand der Forschung zwar möglich, aber nicht wahrscheinlich (Konopka-Postupolska et al. 2011).

### **1.2.2 Calciumabhängigkeit und Membranbindung**

Verschiedene Annexine zeigen aufgrund unterschiedlicher Sequenzen und Bindungspartner unterschiedliche Verhaltensweisen bei spezifischen Calcium-Konzentrationen. Für tierische Annexine wurde z. B. gezeigt, dass tierisches AnxA2 in Zellen der glatten Muskulatur nach einem ersten Calciumsignal (bis 300 nM) an "Lipid Rafts" gebunden hatte. Nach einer Konzentrationsänderung (bis 600 nM) hatte anschließend ein zweites Annexin (AnxA6) an den Komplex gebunden (Babiychuk und Draeger 2000; Draeger et al. 2005). Anscheinend ist hier eine präzise Regulation der Membranbindung für die Funktion dieser Annexine notwendig.

In Pflanzen können hohe Calciumkonzentrationen, z. B. in spitzenwachsenden Systemen, wie Wurzelhaaren oder Pollenschläuchen, mit hohen

Annexinkonzentrationen einhergehen (Blackbourn et al. 1992; Clark et al. 1995; Clark et al. 2005a). Auf welche Weise Calcium die erhöhte Annexinkonzentration verursacht, lässt sich jedoch noch nicht erklären. Dass Calcium die Membranbindung von Annexin direkt beeinflussen kann wurde in mehreren Veröffentlichungen gezeigt (Blackbourn et al. 1992; Dabitz et al. 2005; Gorecka et al. 2005). Die benötigten Calciumkonzentrationen reichen, abhängig von der Lipidzusammensetzung und dem pH-Wert, von nanomolar zu submillimolar.

Die Abhängigkeit vom pH-Wert kann bei der Membranbindung von Annexinen mitunter auch ein wichtiger Faktor sein. Beispielsweise konnten Blackbourn und Mitarbeiter zeigen, dass die benötigte Calciumkonzentration für eine Membranbindung der Annexin-ähnlichen Proteine p35, p34 und p23 aus Mais bei saurem pH-Wert niedriger war (Blackbourn et al. 1992). Für das Annexin B12 aus *Hydra vulgaris* wurde gezeigt, dass es bei pH >6,5 zytosolisch lokalisiert ist, zwischen pH 4 und pH 6,5 membrangebunden ist und bei einem pH-Wert <4 in der Membran integriert vorliegt (Hegde et al. 2006). Diese Beobachtungen waren Calciumunabhängig und könnten eine weitere Bindungsart neben der Calciumvermittelten Membranbindung darstellen. Sollten sich diese *in-vitro* gewonnenen Ergebnisse *in-vivo* bestätigen, ergibt sich für die Regulation der Membranbindung von Annexinen ein sehr komplexes Bild.

### 1.2.3 Oligomerisierung von Annexinen

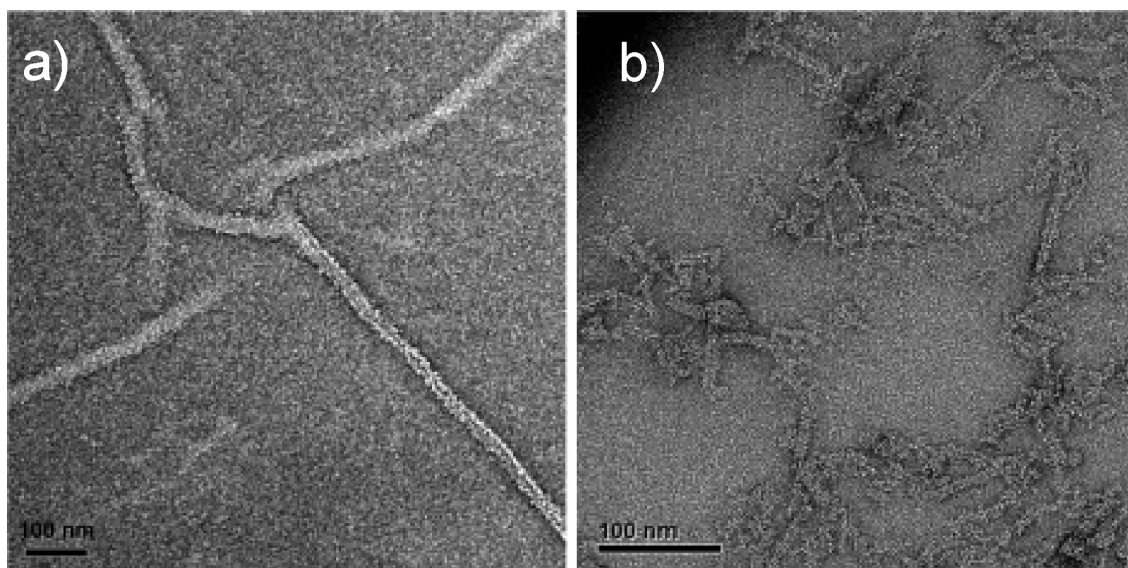
Die pflanzlichen Annexine Anx23 (Ca38; *Capsicum annuum*), Anx24 (Ca32), GhAnx1 und GhAnx2 (*Gossypium hirsutum*) zeigen, trotz ähnlicher Sequenzen, bei unterschiedlichen Bedingungen (Unbehandelt, 100 mM NaCl, 20% Tween und 10 mM Ca<sup>2+</sup>; jeweils pH 8.0) unterschiedliche Oligomerisierungsgrade. Alle 4 pflanzlichen Annexine können z. B. als Dimer oder auch als Trimer vorliegen. Anx23, Anx24 und GhAnx1 liegen unter den getesteten Bedingungen nicht nur als Monomer sondern auch als Trimer vor. GhAnx2 in der monomeren und in der dimeren Form.

Im Vergleich dazu wurde auch das tierische Annexin AnxA5 untersucht. Dieses liegt unter allen getesteten Bedingungen ausschließlich als Monomer vor, was ein wichtiger Hinweis ist, dass sich pflanzliche Annexine in ihrer Funktion stark von tierischen unterscheiden können (Hofmann et al. 2002). Ein weiteres Beispiel ist hier das pflanzliche GhAnx1 aus der Baumwolle, welches schon als Trimer beschrieben wurde (s. o.), und in 2 mM Calciumlösung *in-vitro* als röhrenartige Struktur an Membranen beobachtet wurde (Abb. 2a und b) (Dabitz et al. 2005). Obwohl unklar ist ob sich diese Strukturen schon im Medium gebildet hatten oder sich an der Membran zu langen Röhren zusammenlagerten, konnte ein ähnliches Verhalten bei tierischen Annexinen bisher nicht beobachtet werden.

Weitere Hinweise, dass eine Oligomerisation für die Funktion vieler Annexine wichtig ist zeigt sich bei Untersuchungen zu dem AtAnx1 Homooligomer. Die Oligomere werden bei einem niedrigen pH-Wert ausgebildet und werden schlechter abgebaut als das Monomer, wenn AtAnx1 mit Detergenz-resistenten Membranen assoziiert ist. Was für eine Integration von AtAnx1 in die Membranen spricht. Gleichzeitig ist die Leitfähigkeit für Calcium nach Annexinzugabe bei niedrigem pH erhöht, was ebenfalls ein Effekt der Oligomerisierung sein könnte (Gorecka et al. 2007). In *Arabidopsis thaliana* ist bereits bekannt, dass AtAnx4 sowohl Homo- als auch Heterooligomere mit AtAnx1 bildet. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und/oder bei saurem pH bildet AtAnx1 Homooligomere (Gorecka et al. 2005; Gorecka et al. 2007; Huh et al. 2010). Ein weiteres Beispiel für einen Funktionsgewinn ist die Heterooligomerisierung von AtAnx1 mit AtAnx4, wodurch der Heteromerkomplex zum

negativen Regulator für das Schließen des Spaltöffnungsapparats wird. So war die Überexpressionslinie (AtAnx4) nach einer Abscisinsäure (ABA)-induzierten Trockenstressantwort nicht mehr in der Lage, die Spaltöffnungen vollständig zu schließen (Huh et al. 2010). Im Gegensatz zu einer Überexpression besitzt die "doppel-Knockout"-Pflanze (*Atanx1/Atanx4; Arabidopsis thaliana*) eine verminderte Fähigkeit Stomata zu öffnen.

Eine mögliche Begründung könnte die nachgewiesene Nähe der beiden Annexine zum ER sein (Huh et al. 2010), da das ER über den Efflux von Calcium das Öffnen und Schließen von Stomata beeinflussen kann (Siegel et al. 2009). Die Konsequenzen, die sich aus der Oligomerisierung von Annexinen ergeben sind noch wenig untersucht. Man kann jedoch annehmen, dass sich daraus neue, bzw. erweiterte Funktionen für den oligomeren Komplex ergeben, die die einzelnen Monomere nicht erfüllen.



**Abbildung 2: Röhrenform von AnxGh1 an *in-vitro*-erzeugten Membranen.**

EM-Aufnahmen von fädigen, membranboundenen Annexinstrukturen. **a)** Längliche Röhren an einer künstlichen DIOPC / DOPS (Dioleoylphosphatinoitolcholin / Dioleoylphosphatinoitolserin) Membran. **b)** Kurze, membranboundene, stark verzweigte Oligomere (Dabitz et al. 2005). Maßstab: 100 nm.

### 1.2.4 Lokalisation von Annexinen.

Die intrazelluläre Lokalisation kann für jede der Annexin-Isoformen in Abhängigkeit vom Zelltyp und dem Entwicklungsstadium unterschiedlich sein (siehe auch Abb. 4). Pflanzliche Annexine wurden nachgewiesen:

- im Zellkern (*Prunus persica*, Pfirsich Annexin) (Clark et al. 1998)
- in Nukleosomen (*Medicago sativa*, AnxMs2) (Kovacs et al. 1998)
- an der Kernhülle (*Medicago truncatula*, AtAnx1) (De Carvalho-Niebel et al. 1998)
- an Chloroplasten (*Spinacia oleracea*, Spinat Annexin) (Seigneurin-Berny et al. 2000)
- in den Chloroplasten (*A.thaliana*, AtAnx1) (Peltier et al. 2002; Friso et al. 2004; Kleffmann et al. 2004; Peltier et al. 2006; Renault et al. 2006)
- an Mikrosomen (AtAnx1) (Lee et al. 2004)
- am Endoplasmatischen Retikulum (AtAnx1, AtAnx4) (Huh et al. 2010)
- an Aktin (*Solanum lycopersicum* Annexin) (Calvert et al. 1996) (*Mimosa pudica* Annexin) (Hoshino et al. 2004)
- in der Plasmamembran (AtAnx1) (Santoni et al. 1998; Alexandersson et al. 2004) (AtAnx4) (Alexandersson et al. 2004)
- am Tonoplasten (AtAnx1) (Carter et al. 2004)
- am Golgi-Apparat und an Golgi-entspringenden Vesikeln (*Prunus persica*, Pfirsich Annexin) (Clark et al. 1992)
- In der Zellwand (von Protoplasten sekretiert; AtAnx1 und AtAnx2) (Kwon et al. 2005; Bayer et al. 2006)

Diese Beobachtungen zeigen, dass Annexine prinzipiell an jedes Organell bzw. Membrankompartiment gebunden sein können oder aber frei im Zytoplasma vorliegen können. Dadurch ergibt sich eine Vielfalt von Möglichkeiten, die die experimentelle Überprüfung von Einzelfunktionen sehr schwierig macht.



### 1.2.5 Reaktionen auf Umwelteinflüsse

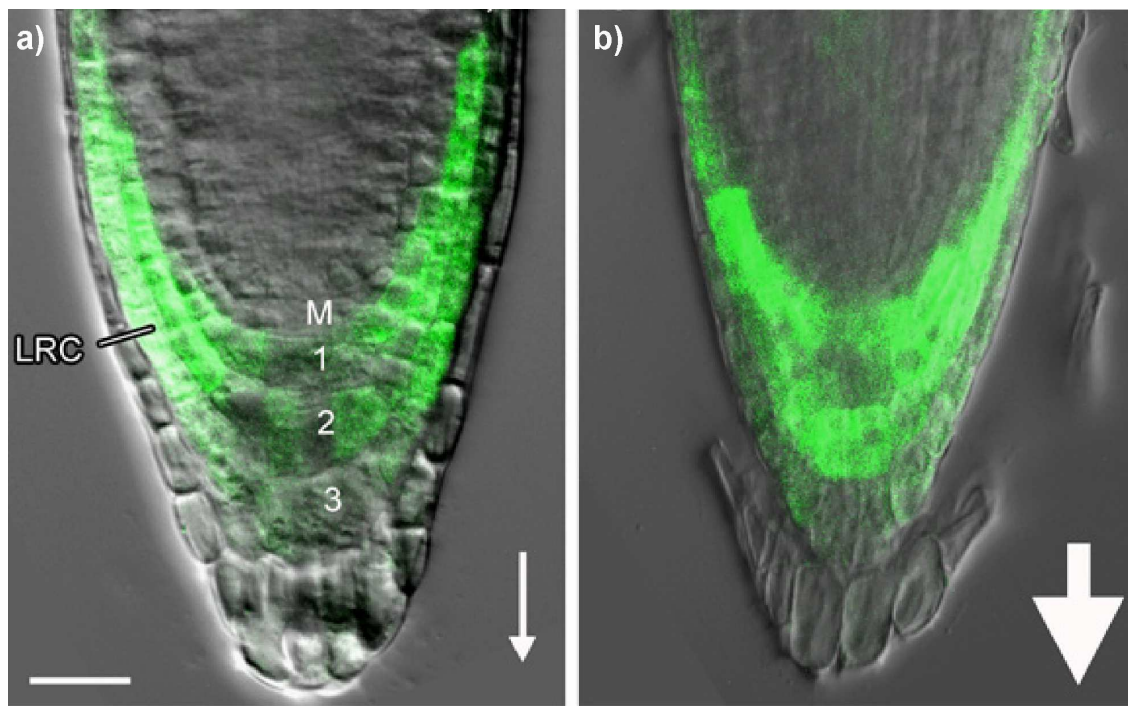
Die oben beschriebene Komplexität wird weiterhin dadurch gesteigert, dass sich die jeweiligen Zustandsformen der Annexine in der Zelle je nach Entwicklungsstand und aus der Umwelt eintreffenden biotischen und abiotischen Signalen ändern können. Auch in *Arabidopsis* reagieren Annexine auf unterschiedliche Bedingungen. AtAnx2 wurde zum Beispiel nach einem Gravitationsstimulus (Lageveränderung um 90°) an der Außenmembran der Epidermiszellen des Hypokotyls (dem Gravitationsvektor zugewandt) nachgewiesen. Nach dem gleichen Stimulus wurde AtAnx1 in den schnell wachsenden, äußeren Zellen der Wurzelspitze (dem Gravitationsvektor abgewandt) an der Außenwand nachgewiesen (Clark et al. 2005b).

Auch die Menge von AtAnx2 wurde in bestimmten Zellen durch den Gravitationsvektor verändert. Es konnte gezeigt werden, dass in den zentralen Zellen der Wurzelhaube AtAnx2-GFP (unter endogenem Promoter exprimiertes GFP-Fusionsprotein) nach einem Hypergravitationsstimulus (7fach g, 30 min) eine stärkere Expression zeigte als unbehandelte Pflanzen (Abb. 3) (Tan et al. 2011).

Ein weiterer Stress der eine Auswirkung auf die Menge von AtAnx2 hat ist Salzstress. Die Reaktion auf Salzstress (250 mM NaCl, 2 h) wurde auch für die anderen sieben *Arabidopsis* Annexine auf mRNA-Ebene getestet (Cantero et al. 2006). Nach der Stressbehandlung war die mRNA Menge von AtAnx2 vermindert, und die von AtAnx1 und AtAnx4 bis 8 erhöht (Cantero et al. 2006). Für die *A. thaliana* Knockoutmutante *Atanx4* konnte gezeigt werden, dass bei Salzstress (75 mM NaCl im Nährmedium) die Keimungsrate gegenüber dem Wildtyp verringert war. Die Keimungsrate der *Atanx2* Knockoutmutante ähnelte bei gleichen Bedingungen hingegen der des Wildtyps (Lee et al. 2004). Dass weniger AtAnx2 und mehr AtAnx4 für eine Toleranz gegen Salzstress benötigt wird, deckt sich auch mit den von Cantero und Mitarbeiter erhobenen Daten (s. o.). Weiterhin bewirkte das Absenken der Temperatur auf 4 °C für 2 h die Erhöhung der Expression der *A. thaliana* Annexine AtAnx1, 3, 4, 5, 7 und 8 auf mRNA-Ebene (Clark et al. 2005a; Cantero et al. 2006), während die Expression von AtAnx2 und AtAnx6 verringert war (Cantero et al. 2006). In Weizen und in Reis wurden ebenfalls Annexine gefunden, welche nach Kältestress stärker

exprimiert waren (Breton et al. 2000; Hashimoto et al. 2009). Dies spricht für eine allgemeine Annexin-Funktion in der Kältestressabwehr oder Signaltransduktion.

Annexine scheinen auch bei der Reaktion auf Trockenstress eine wichtige Rolle zu spielen. Während die mRNA-Menge von AtAnx2 und AtAnx4 nach Austrocknung vermindert war, war die mRNA-Menge von AtAnx1, 3, 5, 6 und 8 erhöht (Cantero et al. 2006). Wie bereits erwähnt sind die Annexine AtAnx1 und AtAnx4 wichtig für die Regulation der Öffnung der Stomata (siehe Kap. 1.2.4) (Huh et al. 2010). In den beschriebenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zum Wildtyp nur halb so viele Pflanzen der AtAnx4 Überexpressionsmutante überlebt hatten. Im Gegensatz dazu überlebten prozentual mehr Pflanzen den applizierten Trockenstress bei einem Knockout von *Atanx1* und *Atanx4* sowie insbesondere bei einem Doppel-Knockout von *Atanx1/Atanx4*. In der zugrunde liegenden Veröffentlichung wurde außerdem die Apertur der Stomata nach Zugabe von Abscisinsäure (ABA) bei *Atanx4* Überexpressionsmutanten gemessen und mit der der Doppel-Knockoutmutante *Atanx1/Atanx4* verglichen. Während bei der Doppel-Knockoutmutante die Spaltöffnungen nach der Zugabe von ABA verengt waren, waren sie bei der Überexpressionsmutante unter Kontrollbedingungen und unter ABA-Zugabe erweitert (siehe Kap. 1.2.4) (Huh et al. 2010). Wahrscheinlich macht die Überexpression und die damit verbundene Unfähigkeit die Stomata zu schließen die Pflanzen sensibler gegen Trockenstress, während die durch den Knockout geschlossenen Stomata *A. thaliana* die Toleranz gegenüber Trockenstress erhöhen.



**Abbildung 3: *in-vivo* Lokalisation von AtAnx2-GFP unter Prom<sub>AtAnx2</sub> in der Wurzelspitze.**

Stabil transformierte, prom<sub>AtAnx2</sub>:Anx2-GFP exprimierende Linien unter Kontroll- und Stressbedingungen. **a)** Unbehandelte (normaler Gravitationsvektor) AtAnx2-GFP exprimierende Pflanze. In den zentralen Zellen der Wurzelhaube ist lediglich eine schwache Aktivität des putativ nativen Promoters zu erkennen. **b)** Wurzel welche einem Gravitationsstimulus von 7fach g über 30 min ausgesetzt wurde. Die zentralen Zellen der Wurzelhaube exprimieren das Fusionskonstrukt unter dem nativen Promoter in gleicher Stärke wie die äußeren Zellschichten (Tan et al. 2011). Maßstab: 20 µm.

### 1.2.5.1 Reaktion auf Licht

Neben den bereits aufgeführten Stimuli hat auch Licht, sowohl in Bezug auf die Intensität als auch Qualität Auswirkungen auf die Aktivität von Annexinen. Dabei spielt der unter anderem durch Licht aktivierte Transkriptionsfaktor "Long Hypokotyl" (HY5) eine Rolle als negativer Regulator der Expression von AtAnx1 und 4 (Lee et al. 2007). Interessanterweise konnte für AtAnx4 gezeigt werden, dass dieses in belichteten Wurzeln verstärkt exprimiert wird (im Vergleich zu nicht belichteten Wurzeln) (Huh et al. 2010). Ob HY5 hier nur im Hypokotyl wirkt und welche Transkriptionsfaktoren in diesem Fall Annexine in der Wurzel regulieren wurde jedoch noch nicht untersucht.

Licht hat außerdem einen Einfluss auf die Trockenstressreaktion. Eine Belichtung von 16 h täglich (16 h hell, 8 h dunkel) führte bei AtAnx1 Überexpressionslinien zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Trockenstress (Huh et al. 2010). Eine tägliche Belichtungsdauer von 8 h (8 h hell, 16 h dunkel)

bedingte hingegen eine erhöhte Toleranz gegenüber Trockenstress (Konopka-Postupolska et al. 2009).

### 1.2.5.2 Metallstress

Auch veränderte Metallsalzkonzentrationen oder eine veränderte Phosphatkonzentration können Auswirkungen auf die mRNS-Menge und indirekt auf die Expressionsstärke verschiedener Annexine haben.

Zu den Metallen welche in hohen Konzentrationen Veränderungen auf mRNS oder zumindest Protein-Ebene auslösen, gehört unter anderem Kadmium. Kadmiumüberschuss erhöht die Expression von AtAnx1 (Konopka-Postupolska et al. 2009). Weiterhin wird durch Kupferstress die Expression von AtAnx3 und AtAnx4 erhöht (Weber et al. 2006), während AtAnx1 unbeeinflusst bleibt (Kung et al. 2006). Stress, der durch eine erhöhte Konzentration von Zink im Boden hervorgerufen wird, geht einher mit einer Erhöhung der Expression der Homologe von AtAnx1 und AtAnx2 aus *Thlaspi caerulescens* (Tuomainen et al. 2010).

Obwohl die auf Metallstress bezogenen Daten teilweise nicht in direktem Zusammenhang zueinander stehen, ist eine Beteiligung an der Toleranz von Stress welcher durch Metalle induziert wird als Funktion von Annexinen möglich.

### 1.2.5.3 Pathogenabwehr

Zu relevanten Umwelteinflüssen, welche Auswirkungen auf die Aktivität von Annexinen haben, gehören Pathogen-Angriffe oder Besiedelungen mit Symbionten. Diese Interaktionen lösen bei Pflanzen Antworten aus, welche auch die Regulation der Annexine betreffen. Das Annexin MtAnx1 aus *Medicago truncatula* wird ausschließlich nach der Aktivierung eines Nod-Faktors transkribiert und dieses Ereignis ist auf die Wurzel beschränkt (De Carvalho-Niebel et al. 1998; De Carvalho-Niebel et al. 2002). Weiterhin erhöht eine Infektion von Keimlingen der Pfirsichpflanze (*Prunus persica*) mit Mykorrhiza die Abundanz von Pfirsich-Annexinen in der Wurzel (Repetto et al. 2003).

In *Arabidopsis* ist bisher für die Annexine AtAnx1, 2 und 4 eine Involvierung in Pathogenantworten bekannt. AtAnx1 wurde nach biotischem Stress, durch Infektion mit *Golovinomyces orontii* (ein Pilz der ausschließlich epitheliale Zellen von *A. thaliana* befällt), um den Faktor 27,9 im Vergleich zum Kontrollwert erhöht (Chandran et al. 2010). Die in der Pathogenabwehr wichtige Salicylsäure reguliert die Expression von AtAnx1 positiv aber die von AtAnx2, sowie von AtAnx4 negativ (Kiba et al. 2005). Jasmonsäure, dessen Ausschüttung unter anderem mit biotischem Stress in Verbindung steht, induziert jedoch eine erhöhte Expression von AtAnx2 (Kiba et al. 2005). Nach Infektion von *Arabidopsis thaliana* durch *Pseudomonas syringae*, der 1902 als Pathogen des gemeinen Flieders (*Syringa vulgaris*) entdeckt wurde, wird die Expression von AtAnx1 herauf reguliert (Truman et al. 2007). Nach einer Infektion durch *Pseudomonas fluorescens* wird stattdessen die Abundanz von AtAnx4 herunter reguliert (Marathe et al. 2004).

Mechanische Verwundung ohne Pathogeneinfluss induziert die Expression von AtAnx1 und AtAnx4 gleichermaßen (Yan et al. 2007; Konopka-Postupolska et al. 2009) und in *Brassica juncea* wird die Expression des Annexins BjAnx3 nach Verwundung induziert (Jami et al. 2009).

Bisher ist unklar, zu welchem Zweck die eine Annexin-Isoform herauf und die andere, unter annähernd gleichen Bedingungen, herunter reguliert wird.

### 1.2.6 Oxidativer Stress

In der Vergangenheit sind immer wieder Veröffentlichungen erschienen, welche eine Verbindung zwischen oxidativem Stress und Annexinen herstellen. Im Detail sind diese Ergebnisse allerdings von sehr unterschiedlicher Natur (Laohavisit und Davies 2011).

Das bereits erwähnte BjAnx3 aus *Brassica juncea* (siehe Unterkapitel: 1.2.6.3) wird nach Verwundung und einer damit verbundenen Erhöhung der ROS-Aktivität durch eine gesteigerte Expression in seiner Abundanz erhöht (Jami et al. 2009).

Von den 8 in *Arabidopsis* bekannten Annexinen ist bisher nur für AtAnx1 eine Verbindung zum ROS-Signalweg gezeigt worden. AtAnx1 wurde in eine *Escherichia Coli*  $\Delta$ oxyR Mutante transformiert, die durch eine verminderte

Fähigkeit zum Abbau von ROS charakterisiert ist und dort überexprimiert. AtAnx1 schützte diese anschließend vor einer erhöhten Wasserstoffperoxidkonzentration (350  $\mu\text{M}$  im Nährmedium) (Gidrol et al. 1996). Auch in der K36 Leukämie-Zelllinie konnte AtAnx1 diese nach Transformation und Überexpression vor Wasserstoffperoxid-induziertem ROS-Stress schützen. Sowohl in den *E. coli*-Zellen als auch in Leucocytenzellen wurde die ROS-schützende Funktion von AtAnx1 dadurch bestätigt, dass die mit AtAnx1 transformierten Zellen viel höhere Peroxidkonzentrationen tolerieren konnten (Gidrol et al. 1996; Kush und Sabapathy 2001). In *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass eine *Atanx1*-Knockoutmutante in Blattepidermiszellen bei Zugabe von ABA vermehrt Wasserstoffperoxid anreichert. Ursächlich war laut Konopka-Postupolska und Mitarbeiter, dass ABA die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  induziert und das entstandene  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht mehr durch AtAnx1 abgebaut werden kann. Diese enzymatische Aktivität konnte *in-vitro* unter Verwendung von rekombinantem AtAnx1 bestätigt werden (Konopka-Postupolska et al. 2009). Des Weiteren induziert  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit zunehmender Konzentration eine Homo-Dimerisierung von AtAnx1 (siehe auch Kap. 1.2.4), sodass bei 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  der gesamte Pool von AtAnx1 als Dimer vorliegt. Die Peroxidasefunktion von AtAnx1 ist hierbei von einer Phosphorylierung abhängig und kann so wahrscheinlich reguliert werden (*in-vitro*) (Gorecka et al. 2005).

Eine Reihe von anderen Annexinen in Pflanzen wird ebenfalls mit ROS-Stress/-Signalen in Verbindung gebracht. Dazu zählen z. B. die Annexine ZmAnx33 und 35 aus *Zea mays*, die bei erhöhter Wasserstoffperoxidkonzentration oligomerisieren (Gorecka et al. 2005) und *in-vitro* eine Peroxidasefunktion zeigen (Mortimer et al. 2008). Für AnxBj1, GhAnx1 und GhAnx24 konnte ebenfalls eine Peroxidaseaktivität *in-vitro* nachgewiesen werden (Laohavisit et al. 2009). Dabei ist auffällig, dass die Peroxid-spaltende Aktivität von ZmAnx33/35 und AtAnx1 sogar höher ist als die der HRP (Horseradish Peroxidase) (Mortimer et al. 2008; Konopka-Postupolska et al. 2009). Trotz der starken Peroxidaseaktivität der untersuchten pflanzlichen Annexine wird für diese, zusätzlich zu einer Abwehrfunktion, auch eine Signal-initiiierende oder Signal-transduzierende Funktion diskutiert (Konopka-Postupolska et al. 2011).

### 1.2.7 Posttranslationale Modifikationen

Zu den bereits bekannten Modifikationen tierischer Annexine zählt neben der Phosphorylierung, S-Glutathionylierung und Transglutaminierung auch die Myristoylierung (Ando et al. 1991; Wice und Gordon 1992; Rothhut 1997; Sullivan et al. 2000). In pflanzlichem Gewebe (*A. thaliana*) wurde zusätzlich eine S-Nitrosylierung beschrieben (Lindermayr et al. 2005). Posttranslationale Modifikationen können, bis auf wenige Ausnahmen, prinzipiell an allen zugänglichen Stellen eines Proteins angefügt werden, allerdings müssen bestimmte Voraussetzungen, je nach Art der Modifikation, erfüllt sein. Welche Stellen dies in der Praxis sind, kann meist nur durch *in-vitro* Mutagenese und eine anschließende Funktionsüberprüfung festgestellt werden. Für pflanzliche Annexine sind nur die S-Nitrosylierung und die Phosphorylierung als posttranslationale Modifikationen bekannt (Gorecka et al. 2005; Lindermayr et al. 2005).

Für AtAnx1 konnte festgestellt werden, dass dieses in *E. coli* transformiert und exprimiert eine niedrigere Peroxidaseaktivität zeigte als AtAnx1 welches in *N. benthamiana* transformiert und exprimiert wurde. Genau wie das in *E. coli* exprimierte AtAnx1 zeigte AtAnx1 welches in *N. benthamiana* transformiert, exprimiert und mit einer alkalischen Phosphatase behandelt wurde eine geringe Aktivität. Wahrscheinlich war die Aktivität des aus *E. coli* isolierten AtAnx1 geringer da in *E. coli* keine Kinase vorhanden ist, die die notwendige Phosphorylierung anfügt, während die phosphorylierte Form aus *N. benthamiana* durch die verwendete Phosphatase dephosphoryliert wurde. Die Phosphorylierung von AtAnx1 wäre in diesem Fall wichtig für die Peroxidasefunktion von AtAnx1 (Gorecka et al. 2005).

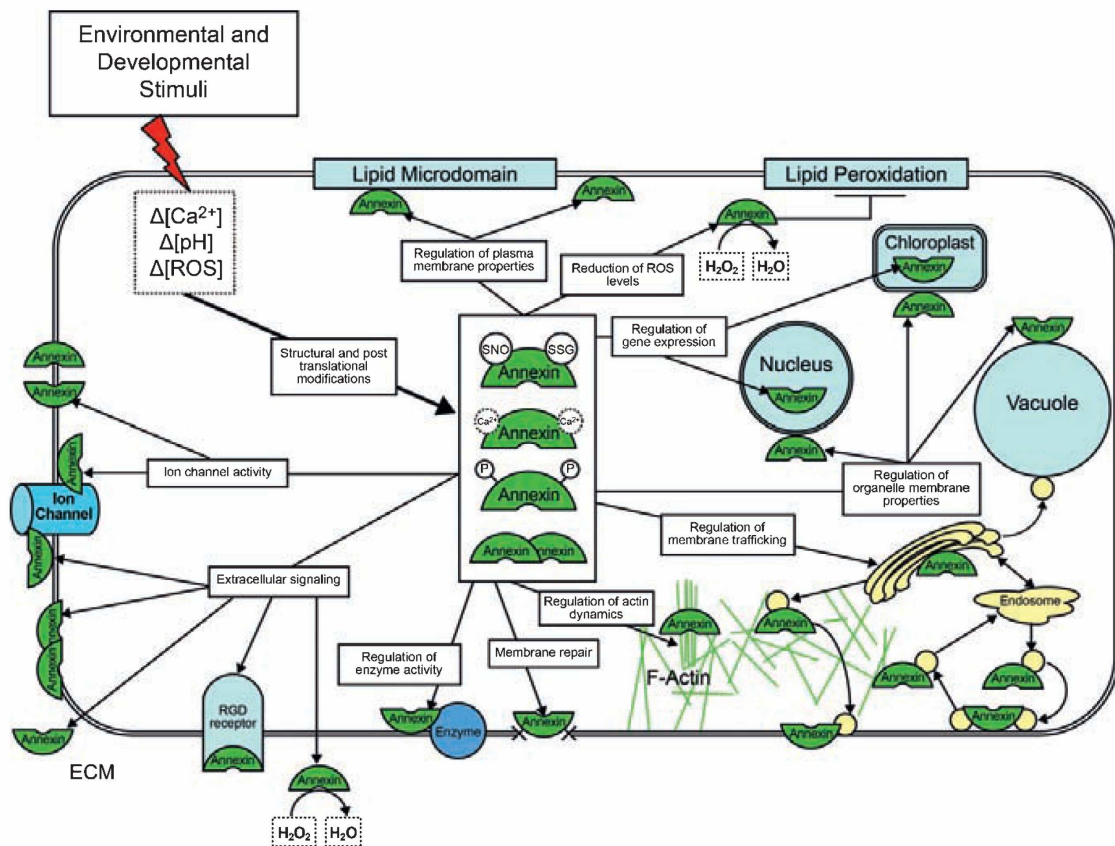
Die veröffentlichten Ergebnisse zu der Funktion von Annexinen in Redoxstress-Signalwegen zeigen, dass die Frage ob und welche posttranslationalen Modifikationen an welchen Annexinen angefügt werden und welche Funktionen diese Modifikationen haben noch weiterer Forschung bedarf.

### 1.2.8 Interaktion von Annexinen mit dem Aktinzytoskelett

Das Aktinzytoskelett erfüllt in Pflanzen wichtige Aufgaben, welche sich teilweise von denen des tierischen Aktinzytoskeletts unterscheiden können. Unter anderem ist es in Pflanzen wichtig für die Endo- und Exozytose, den Organelltransport, die Zellteilung, die Zellstreckung und die Signaltransduktion (Samaj et al. 2004; Samaj et al. 2005; Voigt et al. 2005). Damit ist das Aktin-Myosinsystem notwendig für eine Vielzahl von Aufgaben. Auch Annexine sind zeitweise in ihrer Funktionsweise vom Aktin-Myosinsystem abhängig. Die Bindung an Aktin ist für tierische Annexine bereits beschrieben worden (Gerke und Moss 2002). In Einzelfällen ist die Aktinbindung auch für pflanzliche Annexine gezeigt worden. Annexine welche in Calciumabhängigkeit Aktin binden sind die Annexine p34 und p35 aus der Tomate (Calvert et al. 1996), zwei nicht näher charakterisierte Annexine aus der Zucchini (Hu et al. 2008) und ein nicht näher charakterisiertes Annexin aus der Mimose (Hoshino et al. 2004). Das Annexin aus der Mimose bündelt Aktin *in-vitro* und ist in diesem Zusammenhang an der Nastienbewegung beteiligt (Hoshino et al. 2004). Bislang ist die Art der Aktinbindung allerdings noch nicht bekannt. Theoretisch könnte ein IRI-Motif (Isoleucin-Arginin-Isoleucin) ursächlich für die Bindung sein, wie es für das erste bekannte Annexin aus der Tomate postuliert wurde (Lim et al. 1998). Demgegenüber steht, dass einige Annexine mit IRI-Motif auch nach eingehenden Untersuchungen keine Aktinbindungen zeigten (Mais: (Blackbourn et al. 1992); Baumwolle: (Hoshino et al. 2004); Paprika: (Delmer und Potikha 1997)). Ein Beispiel für eine noch nicht bestätigte Interaktion ist das Annexin SP32 aus *Nicotiana tabacum*. Dieses wurde über Antikörpermarkierung in BY2-Zellen in der Nähe von Aktinfaserenden lokalisiert (Proust et al. 1999). Da trotz vieler Untersuchungen die Erkenntnisse zu der Interaktion zwischen pflanzlichen Annexinen und Aktin auf molekularer Ebene begrenzt sind, ist eine direkte Einflussnahme durch Annexine auf das Aktinzytoskelett eher unwahrscheinlich. Indirekt wäre eine Stimulation oder Deaktivierung von Aktin-abhängigen Prozessen, z. B. über die Regulation der Calciumkonzentration, aber durchaus möglich.



### 1.2.9 Mögliche Funktionen von Annexinen



**Abbildung 4: Mögliche Funktionen von pflanzlichen Annexinen.**

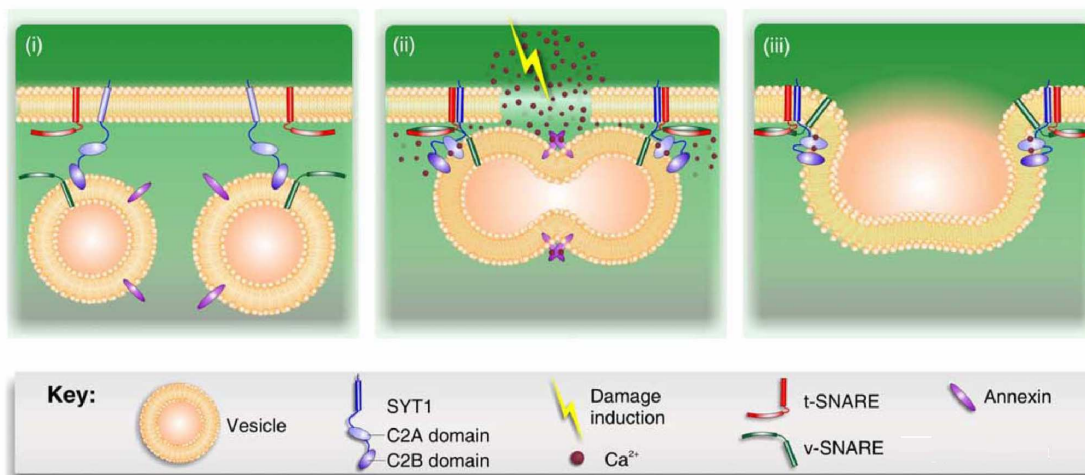
Schematische Darstellung von möglichen Funktionen der Annexine, wobei verschiedene Annexine in verschiedenen Signalwegen und unter verschiedenen Stressbedingungen unterschiedliche Funktionen erfüllen können (Clark et al. 2012).

Obwohl viele Details zu den biochemischen Eigenschaften von Annexinen bekannt sind, sind das Verständnis ihrer Funktionsweise und das ihrer Interaktion mit anderen Proteinen nur lückenhaft. Eine ausführliche Übersicht an welchen Funktionen Annexine beteiligt sein könnten wurde durch Clark und Mitarbeiter erstellt (Abb. 4) (Clark et al. 2012).

Teile der in dieser Übersicht zusammengestellten Interaktionswege sind an isolierten Beispielen im Pflanzenreich untersucht worden, wie z. B. die Bündelung von Aktin im Falle des Annexins aus der Mimose, den Einfluss von Calcium (Hoshino et al. 2004), die Bindung an bestimmte Membran-Mikrodomänen (Babychuk und Draeger 2000; Lefebvre et al. 2007) und die Kopplung mit Ionenkanälen (Breton et al. 2000; Gorecka et al. 2007), die Posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung (Gorecka et al. 2005),

die Interaktion mit ROS (siehe Kap. 1.2.9) (Gidrol et al. 1996; Kush und Sabapathy 2001). Wesentlich komplexer sind die Zusammenhänge im Falle der Trockenresistenz (Kap. 1.2.6) (Cantero et al. 2006), des Salzstress (Lee et al. 2004) oder der Regulation der Stoma-Bewegung (Huh et al. 2010) sowie bei der Pathogenabwehr (Chandran et al. 2010).

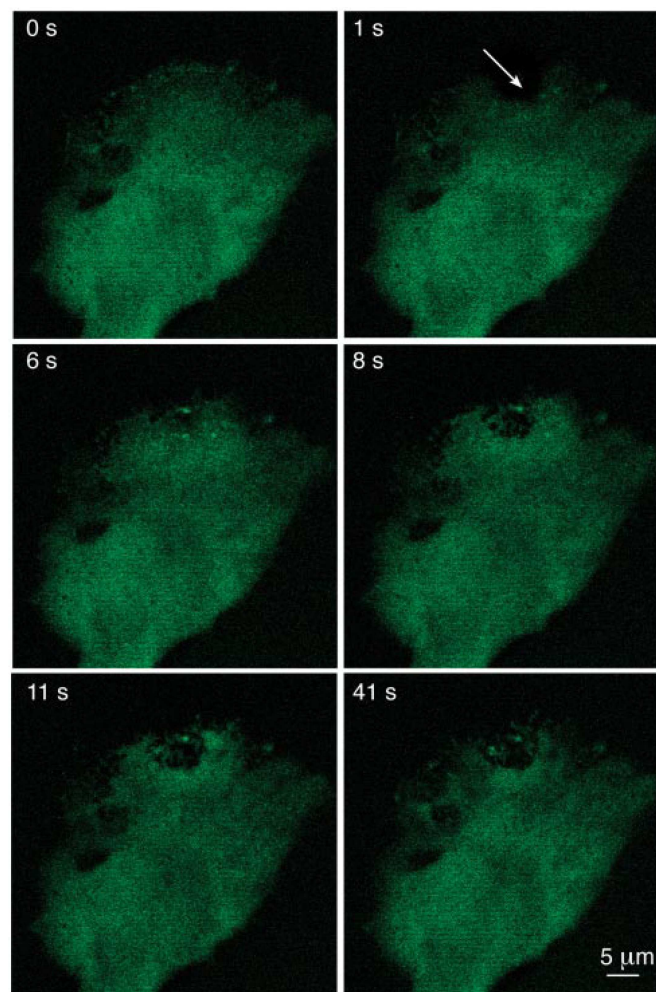
Besonders aufschlussreich im Zusammenhang mit einer Endosymbionteninteraktion ist die Reaktion der pflanzlichen Wirtszellen auf die Infektion durch den Nematoden *Heterodera schichtii*. Dieser Organismus infiziert *A. thaliana* Wurzeln und sekretiert dabei ein Annexin mit einer 33%igen Homologie zu AtAnx1 in die synzytiale Wirtszelle der befallenen Wurzel. Transformiert man *Arabidopsis* Keimlingen mit dem Gen für dieses Nematoden-Annexin, erhöht sich die Anfälligkeit der Wirtszelle gegenüber der Nematode (Patel et al. 2010). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass das Annexin MtAnx1 aus *Medicago truncatulla* nach Infektion mit dem Symbionten *Rhizobium meliloti* hochreguliert wird (De Carvalho-Niebel et al. 1998). Daher könnten spezielle Annexine eine Funktion bei der Interaktion mit Symbionten erfüllen, welche hier durch die Nematode *Heterodera schichtii* eventuell ausgenutzt wird.



**Abbildung 5: Schematisches Modell von Annexinen als Bestandteil des Membranreparatursystems.**

Zu sehen ist die Verschmelzung zweier Vesikel mit der Plasmamembran. (i) Annexin-gebundene Vesikel werden über Synaptotagmin 1 an die Plasmamembran rekrutiert. (ii) Ein Riss in der Membran bedingt einen Calciuminflux, welcher wiederum Annexine zur Dimerisierung bringt und die Vesikel verschmelzen lässt. (iii) Im letzten Schritt verschmelzen die Vesikel mit der Plasmamembran und schließen so den Riss. Modifiziert nach: (Schapire et al. 2009).

Eine andere sehr interessante Hypothese ist die Beteiligung von Annexinen an der Reparatur von Membranläsionen im Zusammenwirken mit Vesikelfusionsprozessen (Abb. 5 siehe Kap. 1.1.3) (Hoshino et al. 1995; Schapire et al. 2009). Ähnliche Zusammenhänge konnten bereits für das menschliche Annexin A1 gezeigt werden (Abb. 6) (McNeil et al. 2006).



**Abbildung 6: Lokalisation von AnxA1-GFP nach Membranläsion in BS-C-1-Zellen.**

Transient transformierte, epitheliale Nierenzelle der Grünen Meerkatze (*Chlorocebus*; BS-C-1) Die Zellen wurden mit einem Laser verwundet (1s - Pfeil). Schon nach wenigen Sekunden kann eine Umlagerung von AnxA1-GFP an die Stelle der Verwundung beobachtet werden.

### 1.3 Zielsetzung

*Arabidopsis thaliana* ist der am besten charakterisierte pflanzliche Modellorganismus. Viele wichtige Daten zu Annexinen wurden in Experimenten mit *A. thaliana* erhoben. So konnte unter anderem eine Oligomerisation und eine Membranbindung von Annexinen in *Arabidopsis* gezeigt werden. Da viele der bereits veröffentlichten Ergebnisse *in-vitro* gewonnen wurden, lag in der vorliegenden Dissertation der Schwerpunkt auf Methoden, welche eine Untersuchung von Annexinen *in-vivo* ermöglichen.

Ziel dieser Dissertation war es, für AtAnx1 bis AtAnx4 aus *Arabidopsis thaliana* bereits publizierte, durch *in-vitro* Versuche gewonnene, Ergebnisse anhand von *in-vivo* Versuchen näher zu präzisieren, zu ergänzen und zu bestätigen. Dazu sollten GFP Fusioniskonstrukte erstellt und mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops *in-vivo* visualisiert werden. Die bei diesen Versuchen erhobenen Daten sollten Aufschluss über die Beteiligung von Annexinen bei Lufttrocknung, Langzeittrockenstress oder Gravitationsreizen *in-vivo* geben. Weiterhin sollte eine Beteiligung von AtAnx1 im Abscisinsäure-Signalweg und die Aktinabhängigkeit und Aktinbindung von AtAnx4 überprüft werden.

Da die Zelluläre Lokalisation der Annexine AtAnx1 bis 4 nicht eindeutig geklärt ist, sollte anhand von Kolokalisationsexperimenten mögliche Verbindungen zu verschiedenen Zellkompartimenten näher untersucht werden. Im Speziellen sollte die Kolokalisation von AtAnx1 und AtAnx4 mit dem endoplasmatischen Retikulum, die Kolokalisation von AtAnx4 mit filamentösem Aktin sowie die Verbindung zu Mitochondrien, Chloroplasten und Endozytosevesikeln untersucht werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit sollten die Untersuchungen an stabil transformierten Wurzeln sein, da hier Farbstoffe besonders schnell in die Zellen eindringen können und *Arabidopsis*wurzeln sich aufgrund ihres geringen Durchmessers gut als Mikroskopieobjekte eignen. Zudem stellen das Apikalmeristem der Wurzel und die in der Wurzelhaube organisierte Gravitationsperzeption besondere Modellsysteme dar.

Die Erforschung der Lokalisation von Annexinen *in-vivo* in verschiedenen Geweben und unter spezifischen Umweltbedingungen sollte weitere Einblicke in die Funktion von Annexinen liefern.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Lebendmaterial

Als Ausgangsmaterial für die stabil zu transformierenden Pflanzen wurden Columbia 0 (Ökotyp Col 0, L. Heyn) verwendet. Für die transiente Expression wurden entweder *Allium porrum* oder *Nicotiana benthamiana* verwendet. Die verwendeten Bakterienstämme waren *Escherichia coli* (DH10B) und *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101).

#### 2.1.2 Genetisches Material

Verwendete Vektoren waren: pCatGFP und der Binäre Vektor pCB302. Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt. Der Vektor pCatGFP enthält bereits einen konstitutiven Promotor. Dieser Promotor (35S) stammt aus dem "Cauliflower Mosaic Virus" (CFMV) und ist ursprünglich für die Transcription eines 35S schweren Konstrukts zuständig. Von pCatGFP abgewandelte Vektoren sind im Text beschrieben (Kap. 2.2.1).

#### 2.1.3 Lösungen und Puffer

Siehe Kapitel 7.6.

#### 2.1.4 Inhibitoren, Farbstoffe und Antikörper

##### 2.1.4.1 Inhibitoren

Inhibitor	Konzentration	Inhibiert	Inkubationszeit
Brefeldin A	50 $\mu$ M	Sekretion	30-60 min
Latrunculin B	1,5 $\mu$ M	Aktin-Zytoskelett	30-60 min
Jasplakinolid	1 $\mu$ M	Aktin-Zytoskelett	30-60 min
Glycerin	2 % (v/v)	Unbekannt	30-60 min

### 2.1.4.2 Farbstoffe

Fluochrome	Verdünnung	Färbung von	Inkubationszeit
FM4-64 (5mg/ml; := Synapto-Red v. Sigma), Vitalfarbstoff	1:2000 (2,5µg/ml) = 3,3 mM	Plasmamembran, Endosomen und Endomembranen	30-60 min
Mitotracker Vitalfarbstoff	2 µM	Mitochondrien	30-60 min
Phalloidin-TRITC	1 µM	F-Aktin	60-120 min

### 2.1.4.3 Antikörper

Antikörper	Konzentration	Sekundärantikörper	Konzentration
Anti-GFP(Roche)	1:300	Anti-Maus-Peroxidase Konjugat	1:500

Für die Markierung von Aktinfilamenten mit Phalloidin-TRITC musste die Pflanze in Aktinpuffer (0,1 M PIPES (pH 6,8 mit NaOH), 2 % Glycerin, 0,3 M Mannitol, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM EGTA) inkubiert werden, um das Aktinzytoskelett zu stabilisieren und die Membran für den Farbstoff durchgängig zu machen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Erstellen der GFP Fusionskonstrukte und der transgenen Pflanzen

Zum Erstellen der Fusionskonstrukte wurde die vollständige, kodierende Sequenz der Proteine AtAnx1 (At1G35720.1), AtAnx2 (At5g65020.1), AtAnx3 (At2G38760.1) und AtAnx4 (At2G38750.1) aus der cDNS von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia 0 (Col 0) mit Hilfe der "Phusion Polymerase" (Finnzymes) amplifiziert. Um das Fusionskonstrukt aus dem N-Terminus (AS 1-30) von AtAnx4 erstellen zu können, wurde ebenfalls "copy" Desoxyribonukleinsäure (cDNS) aus *A. thaliana* verwendet. Die Sequenz von AtAnx1 wurde, um die Expression unter der Kontrolle des endogenen Promoters beobachten zu können, zusätzlich aus der genomischen DNS (gDNS) von *A. thaliana*, zusammen mit dem putativ nativen Promoter (2518 bp) amplifiziert. Die verwendeten Primer, PCR Programme und die verwendeten Linker sind im Anhang (Kap. 7.3) aufgelistet.

Zum Erstellen der Konstrukte wurden 3 verschiedene Vektoren verwendet, welche sich alle aus dem pCatGFP Vektor (Reichel et al. 1996) herleiten. Zum einen wurde der Vektor pCatGFP in seiner Ursprungsform verwendet. Hier wurden die amplifizierten Gene mit NcoI Schnittstellen flankiert und in den Vektor ligiert. Die hierdurch erhaltenen Fusionskonstrukte waren 35S:AtAnx1-GFP, 35S:AtAnx2-GFP und 35S:AtAnx3-GFP. Der nächste Vektor, welcher verwendet wurde, war pCatGFPm1. Um die Gene in diesen Vektor zu ligieren, wurden von Voigt et al. Schnittstellen für SpeI und BamHI eingefügt (Voigt et al. 2005). Die hier erhaltenen Konstrukte waren 35S:GFP-AtAnx1, 35S:GFP-linker-AtAnx1 (im Folgenden als GFP-I-AtAnx1 bezeichnet), 35S:GFP-linker-AtAnx4 (im Folgenden als GFP-AtAnx4 bezeichnet) und 35S:GFP-linker-AtAnx4<sub>NT</sub>.

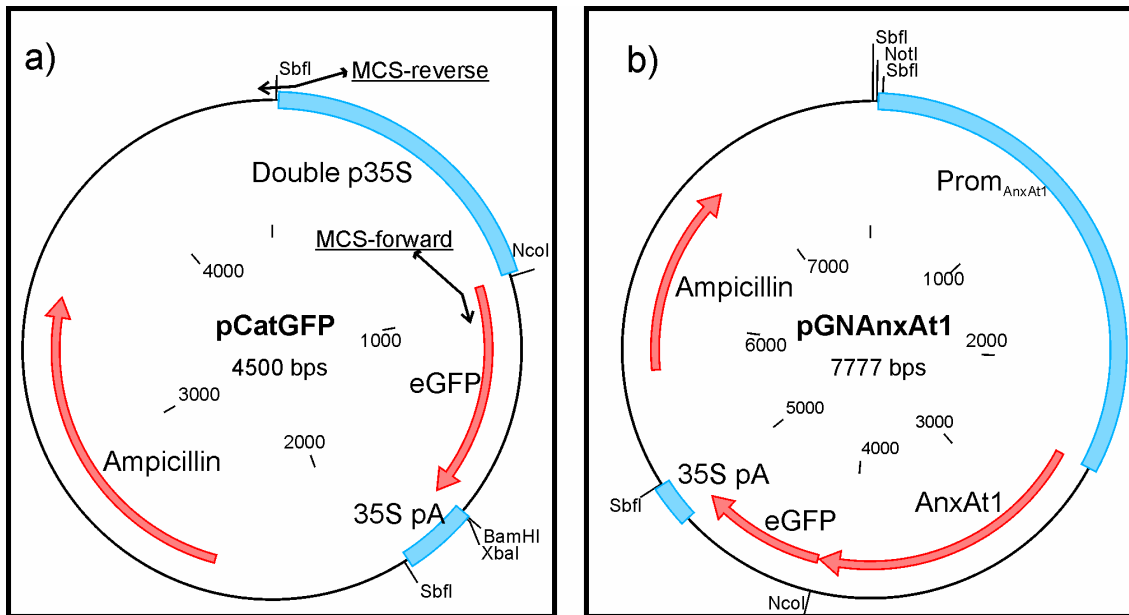
Der hier verwendete 35S-Promoter wurde 1985 von Odell und Mitarbeiter aus dem "Cauliflower-Mosaic-Virus" (CFMV) isoliert und ist ursprünglich für die Transkription eines Transkriptes mit dem Sedimentierungskoeffizienten 35S verantwortlich (Odell et al. 1985).

(Im Folgenden als GFP-AtAnx4<sub>NT</sub> bezeichnet) In den letzten aus pCatGFP

erstellten Vektor wurden vor dem 35S-Promotor und vor der GFP-Sequenz flankierende Primer erstellt, mit welchen sich der Vektor plus GFP ohne Promoter amplifizieren ließ. Vor GFP wurde hier eine multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site = MCS; siehe Anhang: 8.4) eingefügt. Anschließend wurden die in der MCS enthaltenen Schnittstellen für NotI und NcoI ebenfalls an die genomische Sequenz von AtAnx1 (inklusive endogenem Promoter) angefügt und mit dem Vektor ligiert. Der erzeugte Vektor hatte nun nur noch den endogenen Promoter von AtAnx1. Das erzeugte Fusionskonstrukt war Prom<sub>AtAnx1</sub>: AtAnx1-linker-GFP (Abb. 7; im Folgenden als prom<sub>AtAnx1</sub>:AtAnx1-GFP bezeichnet).

Um die erhaltenen Konstrukte stabil in *A. thaliana* (Ökotyp Col 0) transformieren zu können, wurden die Expressionskassetten in den binären Vektor pCB302 (Xiang et al. 1999) kloniert. Die Expressionskassetten wurden mit SbfI herausgeschnitten und, in den zuvor mit PstI geschnittenen pCB302, ligiert. Die Konstrukte wurden dann durch die Methode der Elektroporation (Cangelosi et al. 1991) in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 transformiert. Mit den transformierten Bakterien wurden durch die "Floral Dip" Methode stabile transgene Pflanzen erstellt, welche durch die auf dem Vektor pCB302 enthaltene BASTA Resistenz selektiert werden konnten.





**Abbildung 7: Herstellung des pGwp (pCatGFP, without promoter) und des Vektors pGwp inklusive prom<sub>AtAnx1</sub>: AtAnx1-GFP.**

**a)** pCatGFP mit verwendeten Primern zum entfernen des 35S-Promoters und erstellen der MCS. **b)** pGwp inklusive prom<sub>AtAnx1</sub>: AtAnx1-linker-GFP.

## 2.2.2 Transiente Expression

### 2.2.2.1 Partikelbeschuss

Für den Partikelbeschuss wurden Goldpartikel mit 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser verwendet. Die Goldpartikel wurden für 5 min auf dem Vortexer bei Raumtemperatur und höchster Stufe inkubiert. Damit die DNS an die Goldpartikel binden konnte, wurden nacheinander 12,5  $\mu\text{l}$  Goldpartikel, 1  $\mu\text{l}$  DNS (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 12,5  $\mu\text{l}$  Calciumchlorid (2,5 M) und 5  $\mu\text{l}$  Spermidin unter ständigem Schütteln auf dem Vortexer pipettiert.

Nach 3 min wurden die Goldpartikel bei 3.000 rpm in einer Heraeus Zentrifuge kurz abzentrifugiert. Zum Waschen der Goldpartikel und Entfernen der ungebundenen DNS wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 125  $\mu\text{l}$  EtOH gewaschen. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und der Überstand wieder abgenommen. Das Pellet wurde in 37,5  $\mu\text{l}$  EtOH aufgenommen und konnte nun in 3 Proben à 10  $\mu\text{l}$ , auf vorher mit 100 % EtOH gewaschene "Macrocarrier", pipettiert werden. Nachdem der Alkohol sich verflüchtigt hatte, wurden die "Carrier" in eine Haltevorrichtung gedrückt. Die verwendeten "stopping screens" wurden ebenfalls in EtOH gewaschen,

während die verwendeten "rupture discs" (brechen bei einem Druck von 1350 psi) in Isopropanol gewaschen wurden. Das zum Partikelbeschuss verwendete Präparat, Epidermis von *Allium porrum*, wurde im Abstand von 6 cm zum "stopping screen" positioniert.

Nach dem Einsetzen aller Komponenten in die Partikelkanone (PDS 1000, Biorad) wurde die Probenkammer mit einer Vakuumpumpe bis auf 25 mm Hg Luftdruck evakuiert. Anschließend wurde die DNS durch Hochdruckhelium von dem "Carrier", welcher durch den "stopping screen" aufgehalten wurde, auf die Probe geschossen. Die mit der DNS beschossenen Proben wurden bei RT für 16 h im Dunkeln gelagert. Anschließend wurde die innere Epidermis abgezogen und das Explantat am Konfokalen "Laser Scanning" Mikroskop (Olympus FV 1000, Olympus, Hamburg) mit 600-facher Vergrößerung (10x60) mikroskopiert.

### 2.2.2.2 Agrobakterieninfiltration

Für die transiente Transformation in Tabakblättern wurden *Nicotiana benthamiana* Pflanzen bei 22 °C und einem Tag/Nacht Rhythmus von 16 h/8 h für 6-8 Wochen angezogen. Das für die Transformation bestimmte Konstrukt wurde in 3 ml YEB-Medium mit Kanamycin (1 µl pro 1 ml Medium) und Rifampicin (1 µl pro 2 ml Medium) angeimpft und unter Schütteln (200 rpm) bei 28 °C für 24 h inkubiert. Von der gewachsenen Kultur wurde 1 ml abgenommen und die enthaltenen *Agrobacterium tumefaciens* Gv3101 für 5 min bei 3500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Infiltrationsmedium (200 mM Zitronensäuremonohydrat, 2 % (w/v) Saccharose, 200 µM Acetosyringon, pH 5,2; Wydro et al. 2006) aufgenommen. Die OD<sub>600</sub> wurde durch Verdünnen der Lösung auf 0,3 eingestellt. Bei RT wurde die Lösung für 2 h geschwenkt und anschließend mit einer 1 ml Einwegspritze ohne Nadel aufgezogen und unter Druck in die Blattunterseite von jungen, gut gewässerten Blättern induziert. Bei Kolokalisierungen wurden vor dem Induzieren beide Bakterienkulturen 1 zu 1 vermischt.

Die Blätter wurden für 48-72 h inkubiert und anschließend abgenommen und wie in Kapitel 2.2.2.1 mikroskopiert. Zur Detektion der GFP Fluoreszenz wurden die Fusionsproteine mit einem Argon Laser angeregt und das ausgestrahlte Licht durch einen 500-530 nm Bandpass Filter gefiltert. Die Ds-Red Fusions-

proteine wurden mit einem Helium Neon Laser angeregt. Das emittierte Licht wurde durch einen 560-620 nm Filter gefiltert und detektiert. Für Serien von konfokalen optischen Schnitten („Z-stacks“) wurden, falls nicht anders angegeben, Schrittgrößen von 1 µm gewählt. Zur Aufnahme, Darstellung und Projektion wurde die Bearbeitungssoftware Olympus FV10-ASW 2.0a (Olympus) verwendet. Die verwendeten GV3101 Bakterien mit den Fusionskonstrukten DsRed-HDEL (Endoplasmatisches Reticulum-Retensionssignal), mCh-MBD („microtubule binding domain“), DsRed-ABD2 („actin binding domain“) und DsRed-ST (Synaptotagmin) waren im Labor vorhanden.

### **2.2.3 Wachstumsbedingungen**

#### **2.2.3.1 Wachstumsbedingungen für mikroskopische Untersuchungen**

Die zum Mikroskopieren verwendeten Pflanzen wurden unter den in 2.2.2.2 beschriebenen Bedingungen auf 0,6 % Phytigel in ½ MS-Medium, ohne Vitamine, pH 5,8 für 7 d angezogen. Für Kontrollversuche wurden mit 35S:GFP stabil transformierte *Arabidopsis thaliana* L. Heyn. Pflanzen verwendet. Um Kontaminationen zu vermeiden wurden die Samen vor dem Aussähen für 15 min unter Schütteln mit Sterilisationslösung (2 % Na-Hypochlorid in 0,1 % (v/v) Triton X100) sterilisiert. Anschließend wurden die Samen mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach 7 d wurden die Keimlinge entweder entnommen und in die verschiedenen Inkubationslösungen überführt, oder direkt in der Petrischale behandelt (Gravitationsstimulus). Die behandelten Keimlinge wurden wie in Kapitel 2.2.2.1 untersucht. Das Aufnehmen, Bearbeiten und Analysieren der Bilder erfolgte durch die Programme Olympus FV10-ASW 2.0a (Olympus) und Photoshop CS (Adobe).

### 2.2.3.2 Wachstumsbedingungen für Trockentoleranztest

*A. thaliana* wurden für 6 Wochen angezogen. Nach 6 Wochen wurden die Pflanzen für 10 Tage nicht gewässert. Als Kontrolle wurden wie in 2.2.3.1 beschrieben 35S:GFP *Arabidopsis thaliana* verwendet. Der Status der Pflanzen wurde nach 10 Tagen ohne Wasser per Fotografie dokumentiert.

### 2.2.4 Lufttrocknung mit anschließender Rehydrierung

Keimlinge wurden wie unter 3.3.1 beschrieben angezogen. Anschließend wurden die Keimlinge, mit Hilfe einer Pinzette, aus der Petrischale entnommen und für 30 s unter der Sterilbank getrocknet. Die getrockneten Keimlinge wurden in  $\frac{1}{10}$  MS-Medium rehydriert, wieder auf festes  $\frac{1}{2}$  MS-Medium aufgebracht und für weitere 24 h unter den in 2.2.2.2 beschriebenen Bedingungen angezogen.

Zur Bestimmung des Längenzuwachses der mit Lufttrocknung und anschließender Rehydrierung behandelten Pflanzen wurden die Wurzellängen gemessen, und nach 24 h erneut bestimmt. Die Wurzeln wurden mit dem Binokular MZFL III von Leica mikroskopiert, mit einer JVC KY-F70MU CCD-Kamera aufgenommen und mit der Diskus Bildverarbeitungssoftware (Carl Hilgers, Königswinter, Germany) wurden die Wurzellängen abgemessen. Als Negativkontrolle wurden 35S:GFP Keimlinge verwendet, welche nur kurzzeitig von dem festen  $\frac{1}{2}$  MS-Medium abgenommen und anschließend wieder aufgesetzt wurden.

Die gemessenen Wurzelwachstumsgeschwindigkeiten (mm pro 24 h) wurden statistisch ausgewertet. Hierbei wurde mit Hilfe des errechneten Mittelwertes und der errechneten Konfidenzintervalle ( $\alpha = 0,001$ ) überprüft ob die Lufttrocknung mit anschließender Rehydrierung eine Auswirkung auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Wurzeln hatte.

Die Konfidenzintervalle wurden anhand der Formel: "Mittelwert  $\pm$  die standardisierte Zufallsvariable \*  $(1 - \alpha/2)$  \* (Standardabweichung/Wurzel aus der Anzahl der gemessenen Werte)" errechnet. Der zu erwartende Mittelwert liegt für  $\alpha = 0,001$  mit 99,9 % Wahrscheinlichkeit im Konfidenzintervall. Liegt ein Wert außerhalb dieses Konfidenzintervalls so ist die Nullhypothese (der Wert ist

gleich dem Mittelwert der gemessenen Werte) zu 0,1 % richtig.

Zur Kontrolle der Lokalisation der verschiedenen Reporterkonstrukte auf zellulärer Ebene wurden Keimlinge nach den Behandlungen, wie in 2.2.3.1 beschrieben, mikroskopiert und das Bildmaterial dokumentiert. Wobei die mit Trockenstress behandelten Keimlinge als Kontrolle des getrockneten Zustandes in Paraffinöl mikroskopiert wurden, um die Lokalisation der Fusionsproteine vor der Rehydrierung zu ermitteln.

### **2.2.5 Erzeugung eines Gravitations- und Hypergravitationsstimulus**

Der Gravitationsstimulus wurde durch eine einmalige Lageveränderung der Phytigelplatten mit den darauf angezogenen Versuchspflanzen um 90° erzeugt. Die Wurzeln wurden nach 30 min konfokalmikroskopisch analysiert (siehe Kapitel 2.2.3.1).

Hypergravitation wurde erzeugt, indem die Versuchspflanzen bei 7 g für 30 min zentrifugiert wurden. Hierzu wurden die Petrischalen mit den darauf wachsenden Keimlingen (Bedingungen wie in 2.2.3.1) auf einen rotierenden Arm gespannt. Der Abstand der Wurzelspitzen zur Rotationsachse betrug 19 cm und die Rotationsgeschwindigkeit wurde auf 180 rpm eingestellt. Damit ergibt sich bei einer Winkelgeschwindigkeit von  $\omega = n \cdot \pi / 30 = 180 \cdot \pi / 30 = 18,8 / \text{s}$  und einem Radius von 0,19 m die Zentripetalbeschleunigung von  $r \cdot \omega^2 = 67,5 \text{ m} / \text{s}^2$ , was wiederum dem 6,88-fachen der Erdbeschleunigung entspricht. Durch Adhäsionskräfte mit dem Nährmedium konnten die Pflanzen ihre Position während der Behandlung beibehalten.

### 2.2.6 Inhibitor- und Farbstoffbehandlung

Die unter Kontrollbedingungen (siehe Kap. 2.2.3.1) gewachsenen Pflanzen wurden in den Inhibitoren und Farbstoffen (gelöst in  $1/10$  MS-Medium; Konzentration nach Angabe) inkubiert (siehe Kap. 2.1.5).

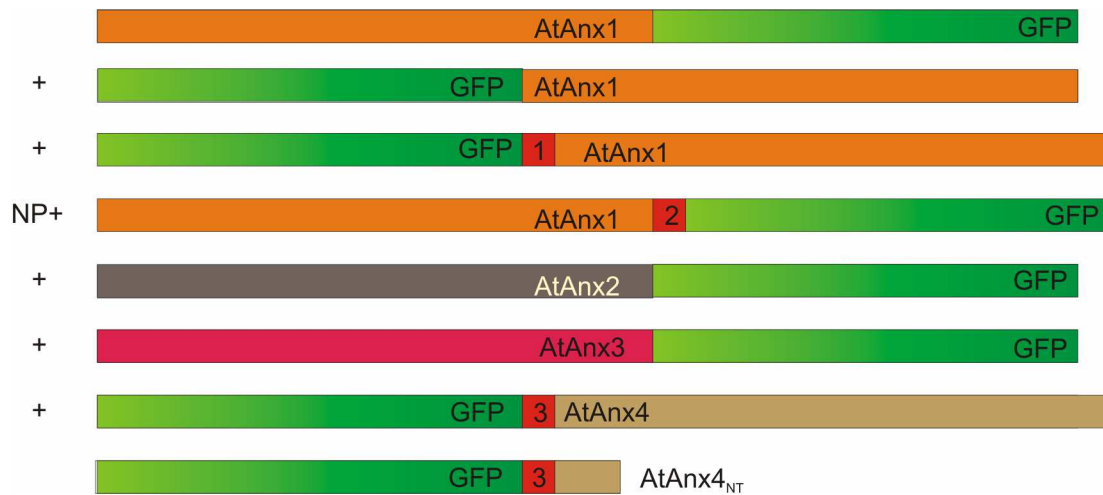
### 2.2.7 Proteinaufreinigung und Immunoblot

100 g Blattgewebe von 4 Wochen alten, stabil transformierten *A. thaliana* wurde unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörstert und mit Laemmli-Probenpuffer versetzt. Unter Schütteln wurden die Proben bei 95 °C für 5 min inkubiert. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und erneut bei 95 °C erhitzt. Ungelöste Bestandteile wurden bei 15.000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Polyacrylamidgele wurden nach Herstellerangaben (BioRad) gegossen, wobei im Sammelgel 4 % und dem Trenngel 12 % Acrylamid enthalten waren. Bei 100 V wurden die Proteine innerhalb von 2 h im Gel aufgetrennt.

Die Proteinbanden wurden anschließend für 1 h bei 20 V und RT auf eine PVDF Membran geblottet. Nach dem Transfer wurde die Blotting-Membran für 1 h in TBS-T Blockierungslösung (TBS + 0,1 % (v/v) Triton X100, 4 % (w/v) BSA und 4 % (w/v) Milchpulver (Neuform)) bei RT inkubiert. Es folgten 3 Waschrinne von je 5 min in TBS-T. Der primäre GFP Antikörper (Roche) wurde in TBS-T gelöst (1:2000) und der Blot mit dem Antikörper für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden wieder 3 Waschrinne durchgeführt. Der sekundäre Peroxidase-konjugierte Anti-mouse Antikörper (Roche; 1:5000; "horseradisch peroxidase") wurde in TBS-T gelöst und der Blot darin für 1 h bei RT inkubiert. Der Blot wurde erneut gewaschen und in Chemilumineszenz (ECL) Detektionslösung geschwenkt. Dann wurde in der Dunkelkammer ein lichtempfindlicher Film (Amersham Hyperfilm ECL), durch eine Klarsichtfolie getrennt, auf die Blottingmembran gelegt, für 5 min belichtet und dann entwickelt.

### 3. Ergebnisse

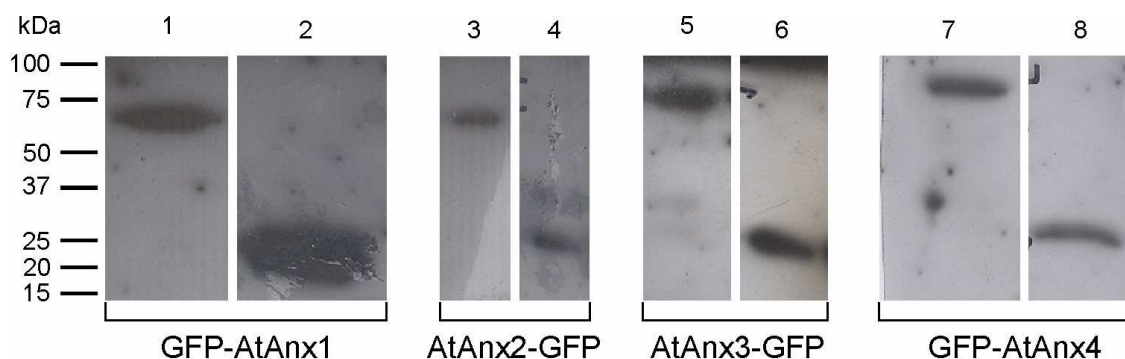
In dieser Arbeit wurden GFP-Fusionskonstrukte der *Arabidopsis* Annexine AtAnx1, 2, 3 und 4 erstellt, um sie als Lebendreporter für die intrazelluläre Lokalisation der Annexine zu verwenden. Annexine sind in der Regel zytosolisch lokalisiert und können unter bestimmten Bedingungen an Membranen binden (siehe Kap. 1.2.3) (Konopka-Postupolska et al. 2011). Um Änderungen der Lokalisation und mögliche markierte Strukturen bestimmen zu können, wurden die transformierten Pflanzen und Pflanzenzellen unter Normal- und unter Stressbedingungen konfokalmikroskopisch untersucht. Dabei wurden sie mit verschiedenen Inhibitoren vorbehandelt und mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen simultan gefärbt. Ferner wurden andere fluoreszierende Fusionsproteine koexprimiert, die als Reporter für Zytoskelettelemente und Membrankompartimente verwendet wurden (Kap. 2.1.5.2 und 2.2.2.2). GFP-AtAnx1, war als Konstrukt ebenfalls schon im Labor vorhanden (Richter 2008). Sechs von acht in dieser Arbeit hergestellten Fusionskonstrukte wurden stabil in *A. thaliana* transformiert (Abb. 8). Dabei wurde von jedem Annexin (AtAnx1 bis AtAnx4) ein GFP-Fusionskonstrukt stabil transformiert. Für AtAnx1 wurden zwei weitere GFP-Fusionskonstrukte stabil transformiert, um den Einfluss der GFP-Fusion auf die Lokalisation von Annexinen zu überprüfen. AtAnx1 wurde in vier verschiedenen Versionen mit GFP fusioniert. Zur Überprüfung des endogenen Expressionsmusters wurde eine zusätzliche Version des AtAnx1-GFP Genkonstruktes unter die Kontrolle des nativen AtAnx1-Promotors gestellt. AtAnx2 und 3 wurden jeweils ohne Linkersequenz N-terminal an GFP fusioniert. Der komplette Leserahmen von AtAnx4 sowie dessen N-Terminus (Aminosäure 1-30) wurden C-terminal mit GFP fusioniert (Abb. 8). Die verwendeten drei Linkersequenzen sind im Anhang (Kap. 7.3) aufgeführt.



**Abbildung 8: Übersicht der Klonierungsschemata für die erstellten Fusionskonstrukte.**

Klonierungsschemata der für die vorliegende Arbeit erstellten Konstrukte: 35S:AtAnx1-GFP, 35S:GFP-AtAnx1 (schon im Labor vorhanden), 35S:GFP-I-AtAnx1, Prom<sub>AtAnx1</sub>:AtAnx1-GFP, 35S:AtAnx2-GFP, 35S:AtAnx3-GFP, 35S:GFP-AtAnx4, 35S:GFP-AtAnx4<sub>NT</sub>. "1-3" = Linkersequenzen. "+" = Stabil transformiert. "NP" = Putativer endogener Promotor 2518 bp (Genomische DNS).

Die überexprimierten GFP-Fusionsproteine mit AtAnx1, 2, 3 und 4 wurden aufgereinigt, per Westernblot auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Hilfe eines Antikörpers gegen GFP und verstärkter Chemilumineszenz (ECL) zur Bestätigung der erfolgreichen Fusion und Expression detektiert (Abb. 9). Zur Kontrolle wurde jeweils unfusioniertes GFP aufgetragen. Die Konstrukte wurden hierzu transient in Tabakblätter transformiert und die korrespondierenden Fusionsproteine anschließend aus dem Gesamtextrakt nachgewiesen (siehe Kap. 2.2.7.)



**Abbildung 9: Westernblots von Annexin/GFP-Fusionsproteinen und unfusioniertem GFP.**

**Spur 1:** GFP-AtAnx1 (Größe 36,2 kDa + GFP = 63,1 kDa); **Spur 2:** GFP (26,9 kDa) Kontrolle zu 1; **Spur 3:** AtAnx2-GFP (Größe 36,2 kDa + GFP = 63,1 kDa); **Spur 4:** GFP (26,9 kDa) Kontrolle zu 3; **Spur 5:** AtAnx3-GFP (Größe 36,2 kDa + GFP = 63,1 kDa); **Spur 6:** Kontrolle zu 5 (GFP = 26,9 kDa). **Spur 7:** GFP-AtAnx4 (Größe 36,2 kDa + GFP = 63,1 kDa); **Spur 8:** Kontrolle zu 7 (GFP = 26,9 kDa).

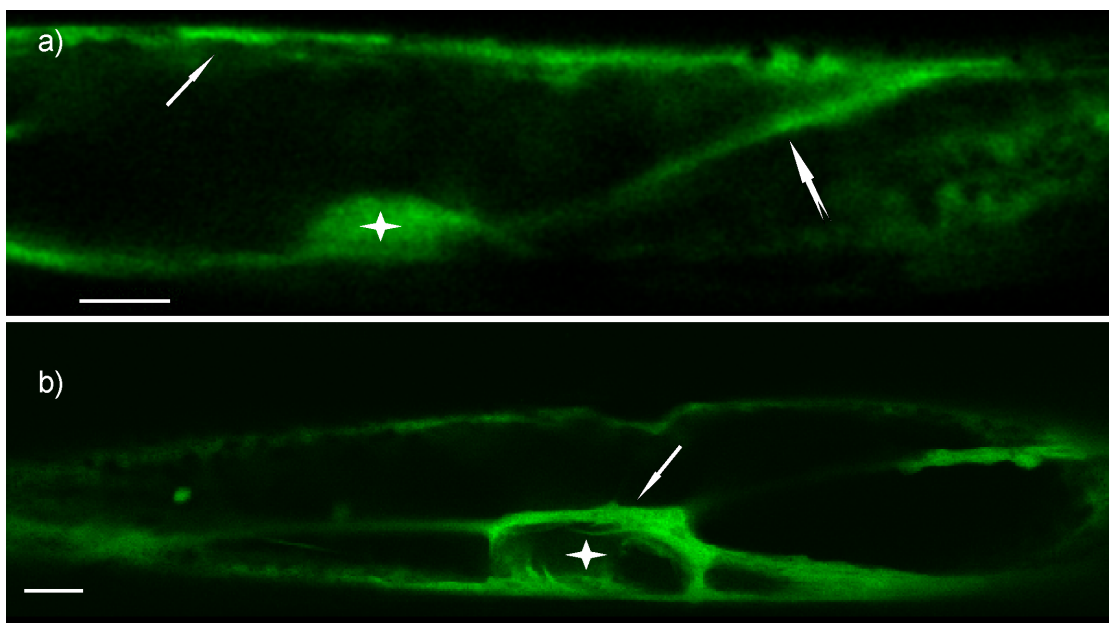
Die Größen des Proteinmarker sind in kilo Dalton angegeben.



## 3.1 Annexin1

### 3.1.1 *In-vivo* Lokalisation von AtAnx1/GFP Fusionsproteinen

Von AtAnx1 wurden folgende Fusionskonstrukte erstellt (Klonierungsschema siehe Abb. 8): 35S:GFP-AtAnx1, 35S:GFP-I-AtAnx1, 35S:AtAnx1-GFP und  $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$ . Die Lokalisation von AtAnx1 (mit fusioniertem GFP) wurde in transient transformierten Lauchepidermiszellen (35S:AtAnx1-GFP; Abb. 10), in transient transformierten Tabakblättern ( $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$ ; Abb. 14) oder in stabil durch Agrobakterium-Infektion transformierten *A. thaliana* Pflanzen überprüft (35S:GFP-AtAnx1; 35S:GFP-I-AtAnx1;  $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$ ; Abb. 11-13).

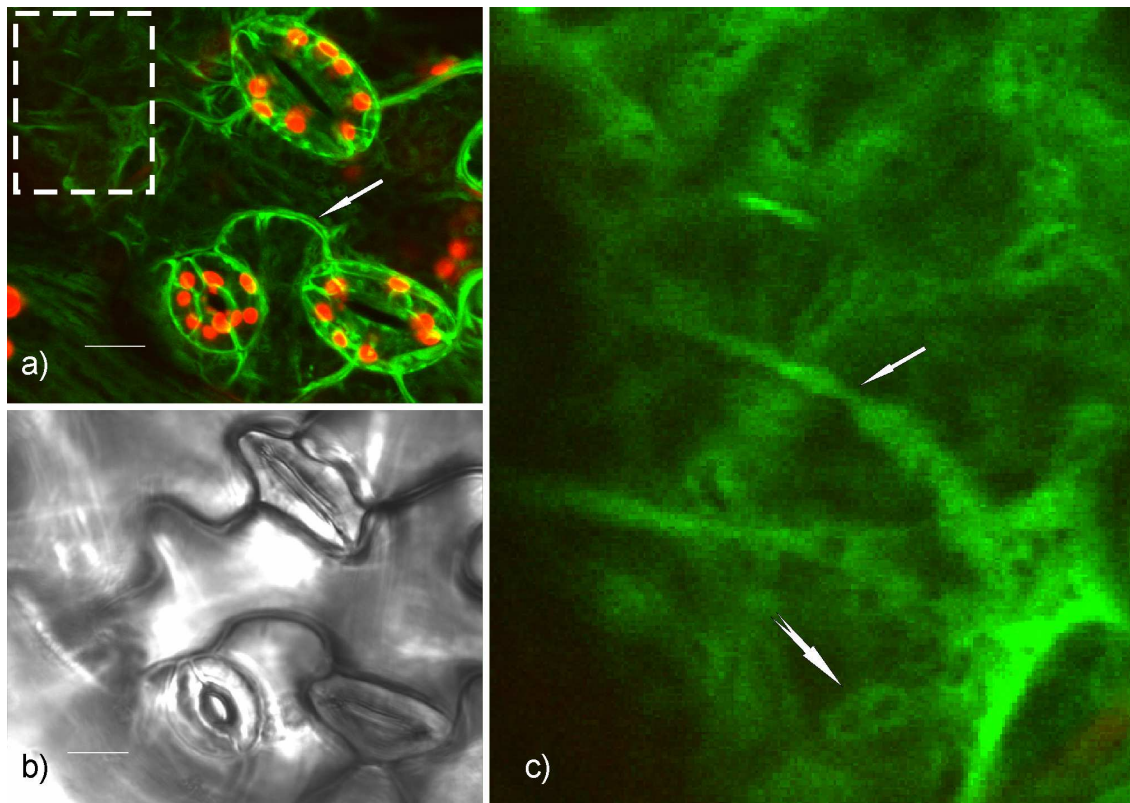


**Abbildung 10: Lokalisation von unfusioniertem GFP und AtAnx1-GFP in Lauchepidermiszellen *in-vivo*.**

Transiente Expression in Lauchepidermiszellen. **a)** 35S:GFP exprimierende Epidermiszelle als Kontrolle. Das unfusionierte GFP ist im kortikalen Zytoplasmabelag (Pfeil) und in transvakuolären Zytoplasmasträngen (gespaltener Pfeil) sowie im Nukleus (Stern) lokalisiert. **b)** 35S:AtAnx1-GFP, Das Fusionsprotein zeigt eine zu unfusioniertem GFP vergleichbare Lokalisation mit dem Unterschied, dass das Innere des Zellkerns (Stern) unmarkiert bleibt, während das perinukleäre Zytoplasma (Pfeil) besonders stark markiert ist. **a) und b):** Einzelschnitte. Maßstab: 10 µm. GFP-Signal in grün.

Während unfusioniertes GFP in zytoplasmatischen Strängen, im Cortex und im Nukleus lokalisiert ist (Abb. 10a), führte die transiente Expression des Fusionskonstruktes GFP-AtAnx1 unter der Kontrolle des 35S-Promotors zu

einer ausschließlich zytoplasmatischen Lokalisation (Abb. 10b). Das Fusionsprotein aus GFP und AtAnx1 war in zytoplasmatischen Strängen, im kortikalen Zytoplasmabelag, im perinuklearem Zytoplasma (AtAnx1-GFP, Abb. 10b) und als zytoplasmatischer Saum um kleinere Vesikel lokalisiert (Beispielhaft: GFP-I-AtAnx1, Abb. 11b, gespaltener Pfeil).



**Abbildung 11: In-vivo Lokalisation von GFP-I-AtAnx1 (35S-Promotor) im *Arabidopsis*-Blattgewebe.**

Stabil transformiertes Überexpressionskonstrukt 35S:GFP-I-AtAnx1 in *A. thaliana* Blattepidermiszellen. **a)** Dargestellt ist die Lokalisation von 35S:GFP-I-AtAnx1 im Zytoplasma, in zytoplasmatischen Strängen und dem Zellkortex (Pfeil). **b)** Durchlichtkanal zu dem in a) gezeigten Ausschnitt, Einzelbild. **c)** Vergrößerung und stärkere Belichtung des in a) umrandeten Ausschnittes. Lokalisation wie in a) beschrieben. Besonders deutlich sind die Zytoplasmastränge (Pfeil) und ein Zytoplasmasaum um vesikuläre Strukturen zu erkennen (gespaltener Pfeil). **a) und c):** Z-Projektion: 8 Bilder, Fokus-Schrittlänge 1  $\mu\text{m}$ . Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . Chloroplastenautofluoreszenz in rot, GFP-Signal in grün.

Zusätzlich zur Expression von AtAnx1 unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors wurde auch die Expression der genomischen Variante untersucht. Diese enthält beide Introns sowie ein 2518 bp langes Stück am 5'-Ende vor dem Transkriptionsstart, welches den Promotor mit einschließen sollte. Dieses Konstrukt (unter der Kontrolle des putativen endogenen Promotors<sub>AtAnx1</sub>; siehe

auch Kap. 2.2.1) wird nach transienter Transformation im Tabakblatt (Abb. 14d) stark exprimiert und ist wie die bereits beschriebenen Fusionsproteine AtAnx1-GFP (Abb. 10) und GFP-I-AtAnx1 (Abb. 11) zytoplasmatisch.

Da fusioniertes GFP die Aktivität von Proteinen beeinflussen kann und der N-terminus von Annexinen generell eine vielseitig modifizierbare Domäne mit vielen potentiellen Bindungspartnern darstellt (Schlaepfer und Haigler 1987), wurden verschiedene Fusionskonstrukte von AtAnx1 mit GFP erstellt.

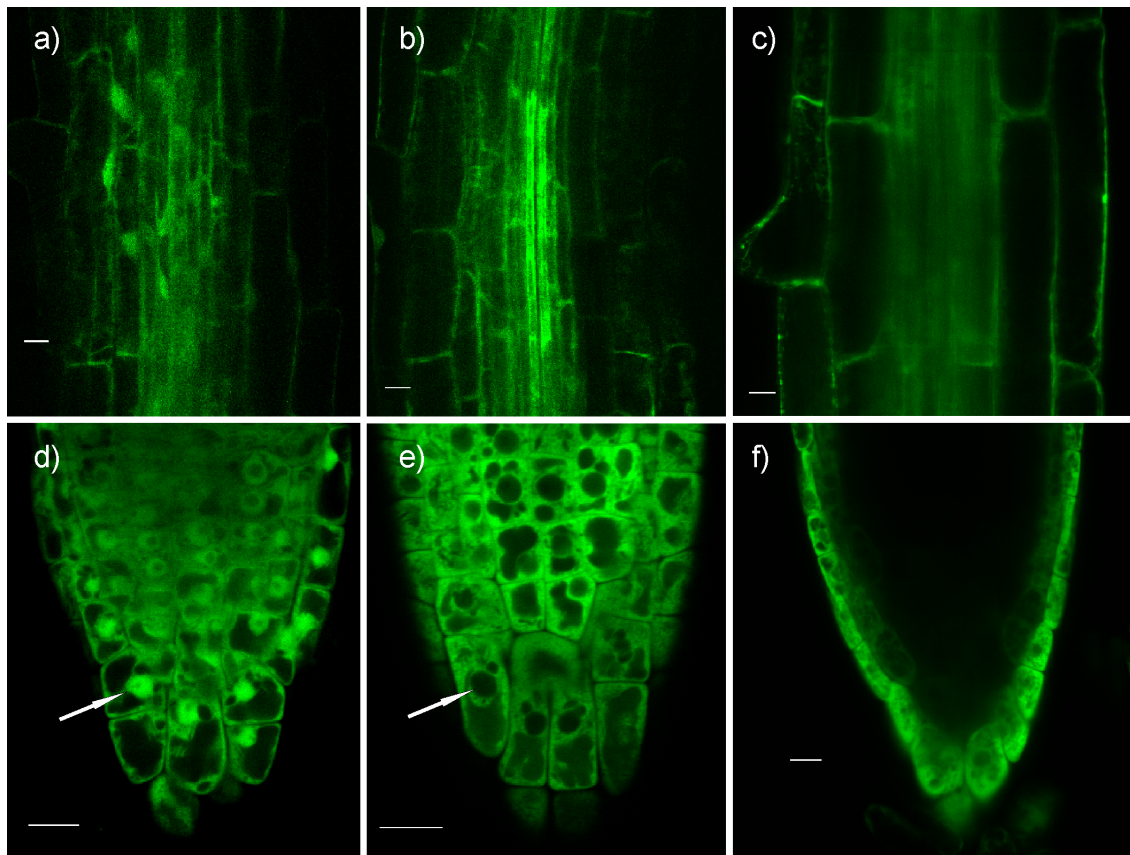
Die Expressionsstärke der Konstrukte variierte je nach Gewebe. Während in überexprimierenden Pflanzen GFP-AtAnx1 (unter der Kontrolle des 35S-Promotors) im Zentralzylinder der Wurzel besonders stark exprimiert war (Abb. 12b), war der Promotor im inneren Gewebe der Wurzel oberhalb des Apikalmeristems vereinzelt nur schwach aktiv (Abb. 34a).

Ob als Vorlage von AtAnx1 genomische oder cDNS verwendet wurde, hatte nur geringen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation in unbehandelten Pflanzen (s. u.). Auch die Fusionsrichtung (am N- oder C-terminalen Ende von GFP) sowie die Verwendung einer Linkersequenz zwischen der GFP- und AtAnx1-Sequenz hatten nur geringe Auswirkungen auf die Lokalisation der Fusionsproteine (Abb. 10 bis 14). Für alle Proteine konnte eine zytoplasmatische Lokalisation beobachtet werden. Nur in Wurzelhaaren der  $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$ -Pflanzen wurde durch das Fusionsprotein ein scharf gezeichnetes, netzartiges Muster, das an das ER erinnert, markiert (Abb. 13b). Im Gegensatz dazu ist die Lokalisation von GFP-AtAnx1 in Wurzelhaaren diffus (Abb. 13a)

Zudem sollte das Expressionsmuster des putativ endogenen Promotors $_{\text{AtAnx1}}$  untersucht werden. Die Expressionsstärke im Zentralzylinder war verglichen mit der des 35S-Promotors schwächer (Abb. 12). Ansonsten konnte unter dem endogenen Promotor $_{\text{AtAnx1}}$  in allen Geweben, außer der Wurzelspitze, eine gleichbleibende Expression beobachtet werden.

In der Wurzel war das Expressionsmuster des nativen Promotorkonstruktes im Vergleich zum 35S-Promotor verändert. Während der 35S-Promotor im Inneren der Wurzelspitze eine hohe Aktivität zeigte (Abb. 13d und e), konnte für den nativen Promotor $_{\text{AtAnx1}}$  im Inneren der Wurzelspitze keine Aktivität beobachtet werden (12f). Es wurde jedoch durch den Promotor $_{\text{AtAnx1}}$  in den äußeren 2 Zellschichten AtAnx1-GFP exprimiert. Während die Rhizodermis und die

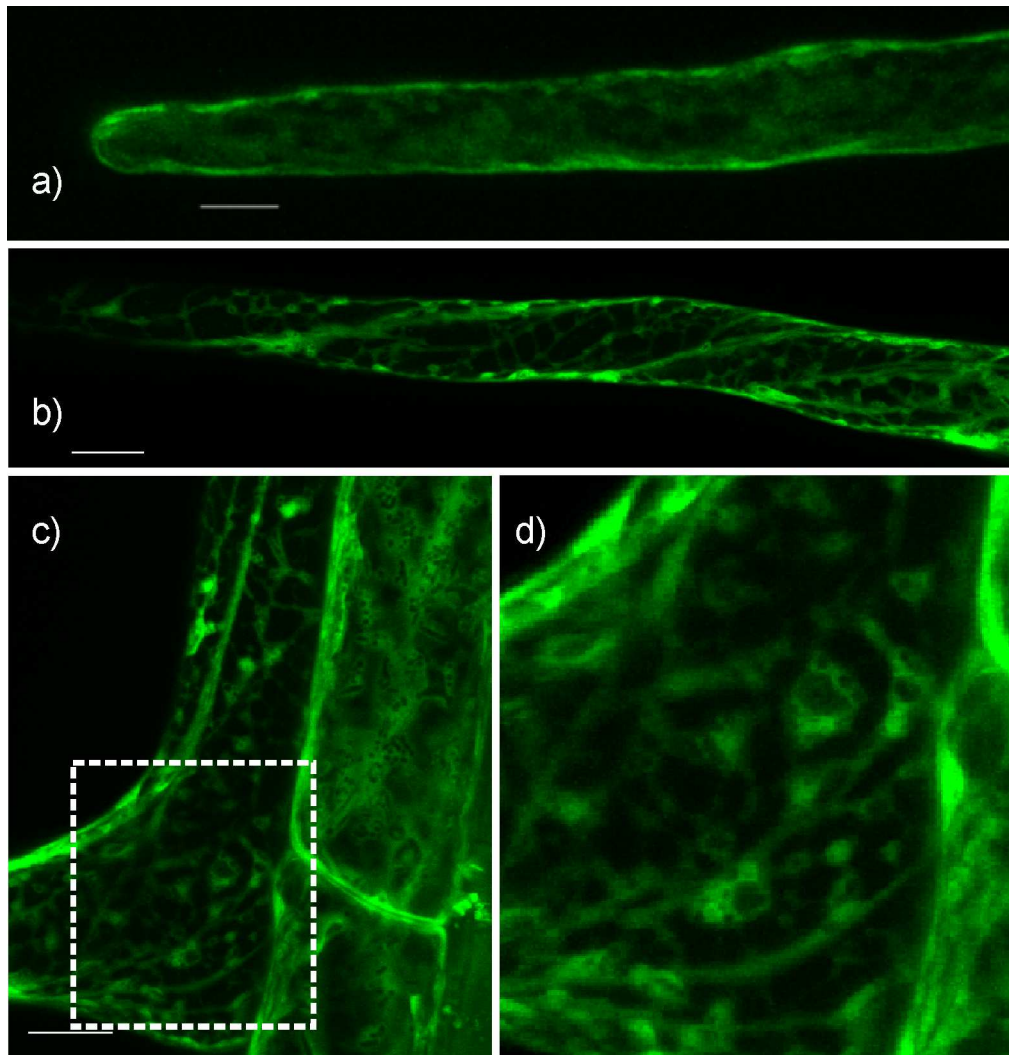
äußerste Wurzelhaubenschicht ein starkes Signal zeigten, war demnach in der 2. Zellschicht darunter nur noch ein schwaches Signal zu erkennen (Abb. 12f).



**Abbildung 12: In-vivo Lokalisation von GFP, GFP-AtAnx1 und  $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$  in unbehandelten Pflanzen.**

Mit 35S:GFP, 35S:GFP-AtAnx1 oder  $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$  stabil transformierte *A. thaliana* Keimlinge. **a)** Übersicht von einem medianen Wurzellängsschnitt einer GFP Überexpressionspflanze. Die Expression von unfusioniertem GFP ist im Zentralzylinder besonders hoch. Die Vakuolen der Wurzelrinde sind durch das zytoplasmatische GFP nicht angefärbt. **b)** Übersicht von einem medianen Wurzellängsschnitt einer GFP-AtAnx1 Überexpressionspflanze. GFP-AtAnx1 ist, wie in e), im Zytoplasma lokalisiert. Im Zentralzylinder ist hier, wie in a), bedingt durch den 35S-Promotor die Expression besonders stark. **c)** Übersicht über einen medianen Wurzellängsschnitt einer mit  $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$  transformierten *Arabidopsis*. Der verwendete Promotor ist im Zentralzylinder weniger aktiv als in den äußeren Zellschichten oder als der in a) und b) verwendete 35S-Promotor **d)** GFP Lokalisation in der Wurzelhaube. Angefärbt sind das Zytoplasma und der Nukleus (Pfeil). Die Expressionsstärke im Inneren der Wurzelspitze ist, bedingt durch natürliche Schwankungen der Promotoraktivität, etwas geringer. **e)** GFP-AtAnx1-Signal einer Überexpressionspflanze innerhalb der Wurzelspitze. Angefärbt ist das Zytoplasma, nicht aber der Nukleus (Pfeil). Die Expressionsstärke ist im Vergleich zu c), durch natürlich auftretende Schwankungen der Promotoraktivität, etwas erhöht. **f)** Aktivität des putativ nativen Promotors von AtAnx1 in der Wurzelspitze. Das Fusionsprotein ist promotorbedingt in der äußeren Zellschicht der Wurzelspitze stark sowie in der darunter liegenden Schicht schwach exprimiert. Im Vergleich zu e) ist der Promotor in den inneren Geweben viel schwächer. Das exprimierte Protein unter endogenem Promoter ( $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$ ) ist hier, wie das in e), zytoplasmatisch lokalisiert. **a) bis f):** Einzelschnitte. Maßstab: 10 µm. GFP-Signal in grün.

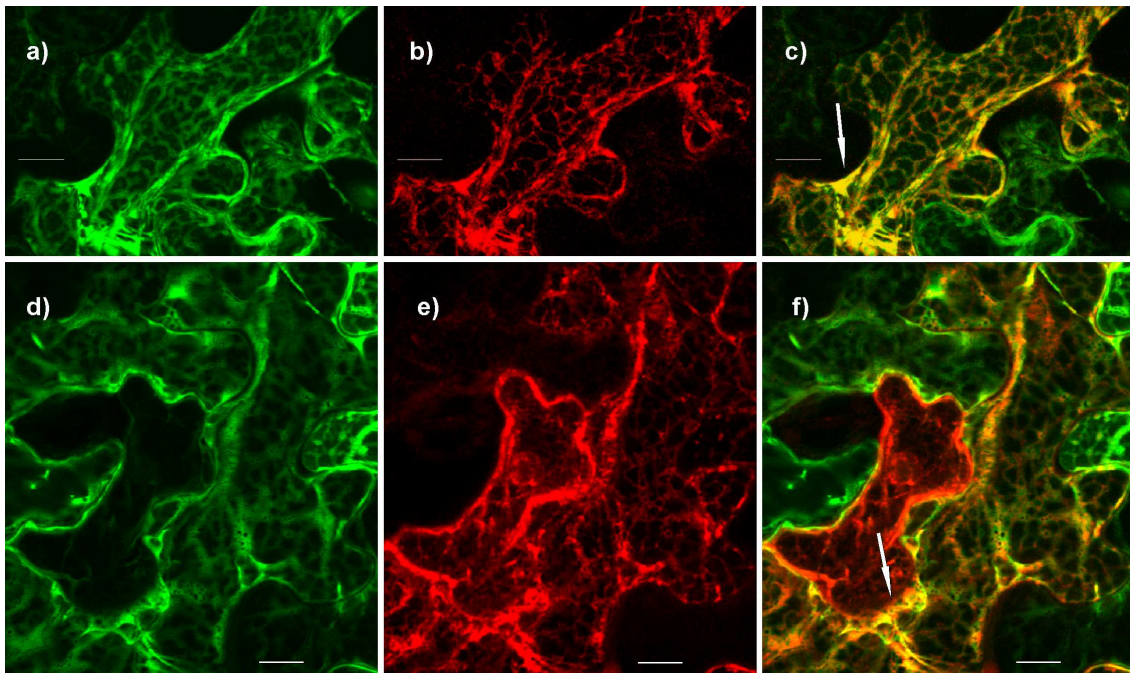




**Abbildung 13: *In-vivo* Lokalisation von GFP-AtAnx1 und  $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$  in Wurzelhaaren**

Mit 35S:GFP-AtAnx1 oder  $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$  stabil transformierte *A. thaliana* Keimlinge. **a)** Die Expression von 35S:GFP-AtAnx1 zeigte in stabil transformierten Wurzelhaarzellen ein diffuses zytoplasmatisches Signal. **b)** Durch das stabil transformierte Fusionsprotein AtAnx1-GFP (genomisch unter Kontrolle des endogenen AtAnx1 Promotors) wurde in Wurzelhaaren ein scharf gezeichnetes Netzwerk, das dem Aussehen des ER's ähnelt, markiert. **c)** Wurzelhaarzelle mit angrenzender Wurzelrindenzelle: Durch das Fusionsprotein AtAnx1-GFP wird wie in b) ein scharf gezeichnetes Netzwerk markiert. Das gleiche Protein markiert in anderen Zellen der Wurzel diffus das Zytoplasma (rechte Zelle). **d)** Vergrößerung des in c) umrandeten Bereichs. **a) bis d):** Z-Projektionen a): 20 Bilder, Fokus-Schrittlänge 2  $\mu\text{m}$ . b): 15 Bilder, Fokus-Schrittlänge 1  $\mu\text{m}$ . c) und d): 11 Bilder, Fokus-Schrittlänge 2  $\mu\text{m}$ . **a) bis d):** Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . GFP-Signal in grün.

### 3.1.2 Kolokalisation von AtAnx1-GFP mit DsRed-HDEL



**Abbildung 14: Kolokalisation von AtAnx1-GFP mit dem ER in Epidermiszellen von Tabakblättern.**

**a)** Zytoplasmatisches Signal in einer Epidermiszelle nach Expression von unfusioniertem 35S:GFP. **b)** Expression des ER-Markers 35S:DsRed-HDEL. **c)** Überlagerungsbild von a) und b). In manchen Bereichen des Zellkortex zeigt die Überlagerung eine Kolokalisation (Pfeil). **d)** 35S:prom<sub>AtAnx1</sub>-AtAnx1-GFP exprimierende Tabakzelle. Angefärbt ist das Zytoplasma. **e)** Expression des ER-Markers DsRed-HDEL. **f)** Überlagerungsbild aus d) und e). Das ER-Signal überlagert im Kortex mit dem zytoplasmatischen AtAnx1-GFP-Signal (Pfeil). **a) bis c)** Z-Projektion: 13 Bilder, Fokus-Schrittlänge 1 µm. **d) bis f)** Z-Projektion: 3 Bilder, Fokus-Schrittlänge 1 µm. **a) bis f)** Maßstab 10 µm. GFP-Signal in grün, DsRed-Signal in rot.

Um sicherzustellen, dass die teilweise an das ER erinnernde Lokalisation von AtAnx1 (plus N- oder C-terminal fusioniertes GFP) zytoplasmatisch ist, wurde AtAnx1-GFP mit dem endoplasmatischen Retikulum kolokalisiert (ER-Retentionssignal mit DsRed fusioniert; DsRed-HDEL; Abb. 14d bis f). Als Kontrolle wurde das zytoplasmatische GFP mit DsRed-HDEL koexprimiert (Abb. 14a bis c). Es konnte beobachtet werden, dass sowohl das zytoplasmatische GFP (Abb. 14c, Pfeil) als auch AtAnx1-GFP in manchen kortikalen, zytoplasmareichen Bereichen der Zelle mit dem Fusionsprotein DsRed-HDEL kolokalisiert (Abb. 14f, Pfeil). Es scheint, dass sich zumindest ein Teil des AtAnx1-GFP-Proteins in der Nähe oder im Lumen des ERs befindet.

### 3.1.3 GFP-link-AtAnx1 Überexpression in *A. thaliana*

Da fusioniertes GFP die Funktion von Proteinen beeinträchtigen kann wurde ein weiteres Konstrukt erstellt, in dem AtAnx1 und GFP durch einen Linker aus 8 Aminosäuren (GSTKSRRK) miteinander verbunden sind.

Die Überexpression von AtAnx1 (mit oder ohne fusioniertes GFP) wurde bisher mit keiner Beeinträchtigung des Wachstums in Verbindung gebracht (Konopka-Postupolska et al. 2009; Huh et al. 2010). Die für diese Arbeit erstellte Überexpressionsline 35S:GFP-link-AtAnx1 zeigte hingegen ein verlangsamtes Wachstums (Abb. 15). Dieser Defekt konnte nur für die mit 35S:GFP-link-AtAnx1 transformierte Pflanze beobachtet werden und nicht für andere AtAnx1 (mit oder ohne fusioniertes GFP) überexprimierende Pflanzen. Zu beobachten war außerdem, dass die Färbung der Blätter der GFP-link-AtAnx1-Pflanze intensiver war als die der 35S.GFP-Pflanze (Abb. 20).



**Abbildung 15: Vergleich von drei Wochen alten Pflanzen die unfusioniertes GFP bzw. GFP-link-AtAnx1 exprimieren.**

Während die 35S:GFP Pflanzen nach 3 Wochen (16 h hell, 8 h dunkel) ein normales Wachstum zeigten, waren GFP-link-AtAnx1 überexprimierenden Pflanzen unter gleichen Bedingungen deutlich im Wachstum verlangsamt und zeigten eine stärkere Färbung der Blätter.

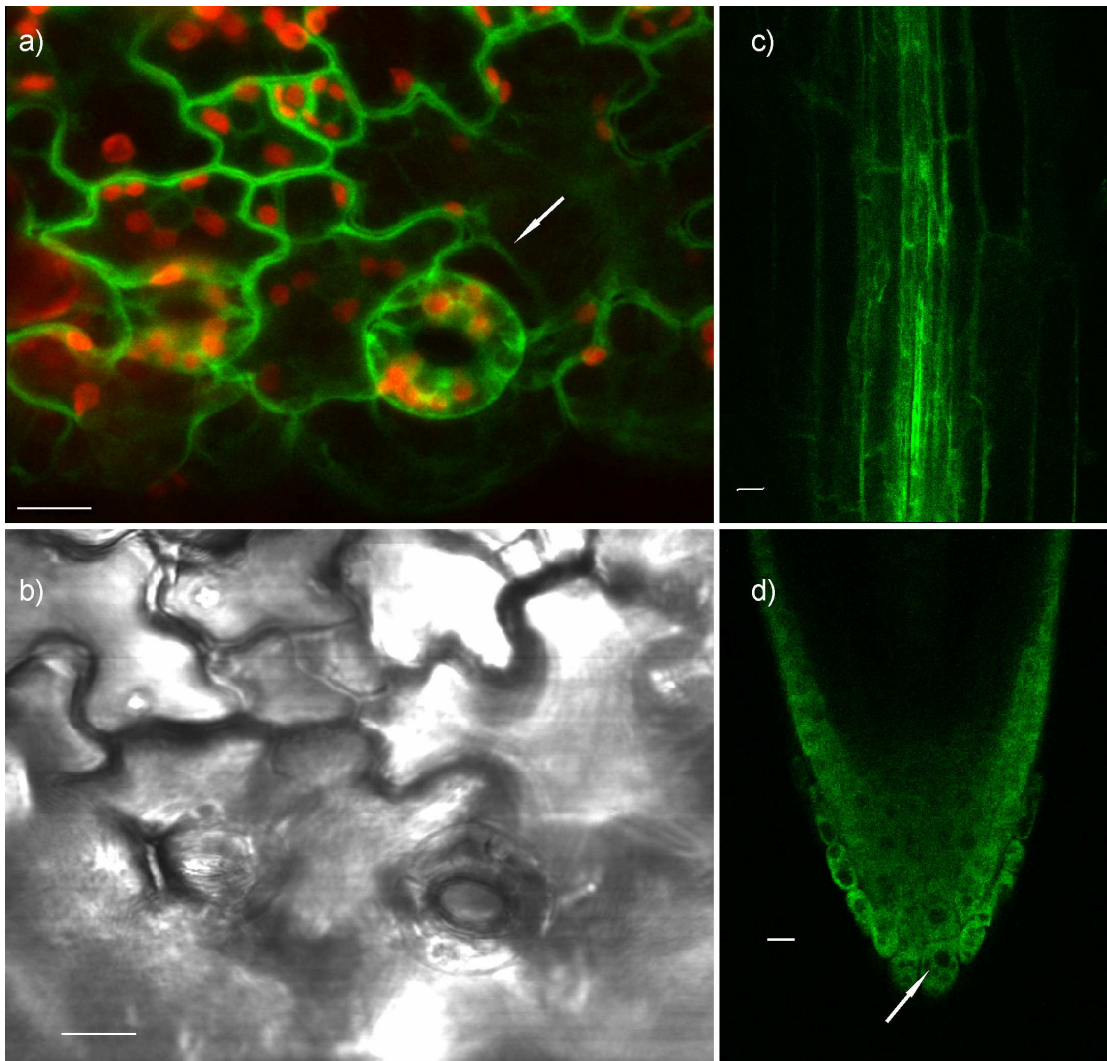
## 3.2 Annexin2

### 3.2.1 Überexpression von AtAnx2-GFP in *A. thaliana*

Genau wie für das erste Annexin aus *Arabidopsis* sind für das zweite Annexin bislang wenige *in-vivo* Untersuchungen durchgeführt worden (siehe Kap. 1.2.6) (Clark et al. 2005b; Tan et al. 2011). Um die Auswirkungen von spezifischen Bedingungen auf die Lokalisation von AtAnx2 *in-vivo* zu testen, wurde in dieser Arbeit das Lebendreporterkonstrukt 35S:AtAnx2-GFP erstellt und stabil in *Arabidopsis* transformiert. Die konfokalmikroskopische Analyse zeigt, dass auch AtAnx2-GFP (genau wie AtAnx1 an GFP fusioniert) in unbehandelten Pflanzen zytoplasmatisch lokalisiert ist (Abb. 16).

Annexin2 ist wie unfusioniertes GFP in zytoplasmatischen Strängen (Abb. 16a -Pfeil) und im Zytoplasma um die Vakuole und kleinere Organellen herum organisiert (Abb. 16d), wohingegen der Nukleus von dem Fusionsprotein nicht markiert wird (Abb. 16d -Pfeil). Im Zentralzylinder ist die Lokalisation ebenfalls rein zytoplasmatisch (Abb. 16c).





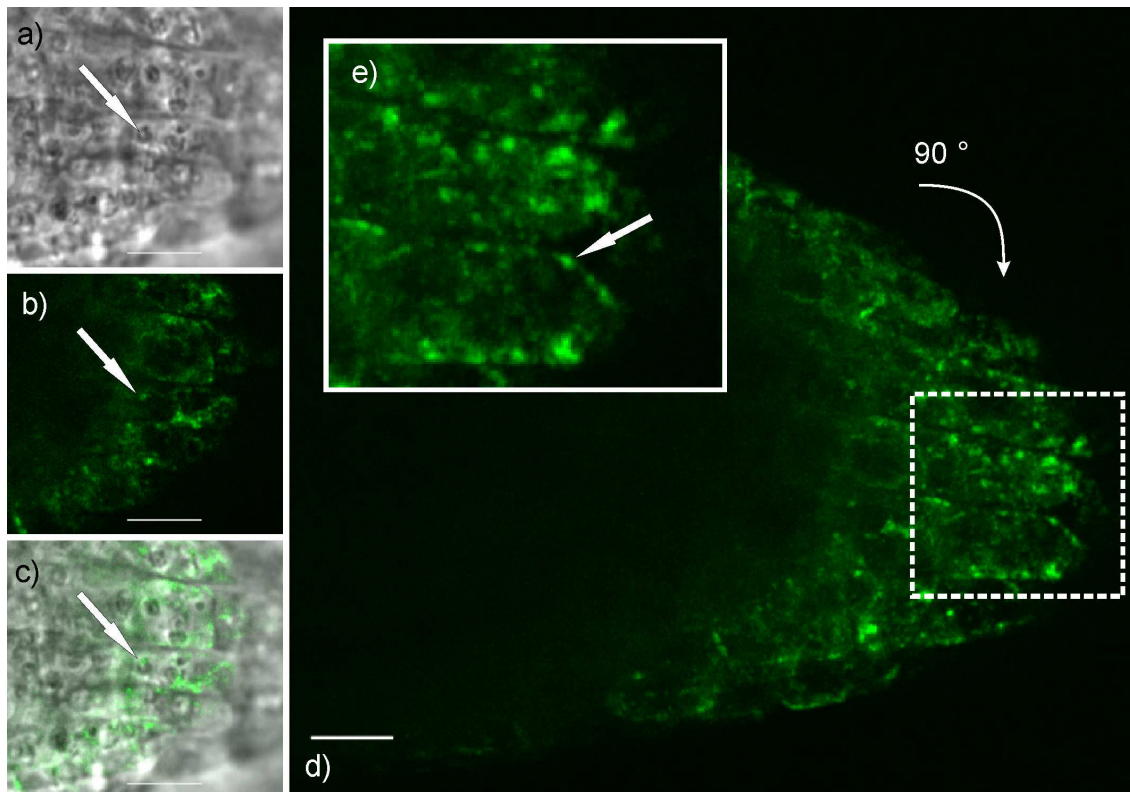
**Abbildung 16:** *In-vivo* Lokalisation von AtAnx2-GFP in stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen.

**a)** Das kortikale Zytoplasma und zyttoplasmatische transvakuoläre Stränge (Pfeil) sind markiert. **b)** Durchlichtkanal der in a) gezeigten Projektion. **c)** Zyttoplasmatisch lokalisiertes AtAnx2-GFP in der Differenzierungszone der Wurzel. Ein besonders starkes zyttoplasmatisches Signal konnte in den Zellen des Zentralzylinders beobachtet werden. **d)** Zyttoplasmatisch lokalisiertes AtAnx2-GFP in der Wurzelspitze. Der Nucleus ist nicht markiert (Pfeil). Das Protein ist besonders stark in den Zellen der Wurzelhaube exprimiert. **a) bis d)** Das Expressionsmuster ist bedingt durch den verwendeten 35S-Promotor. **a) bis d)** Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . GFP-Signal in grün, Chloroplastenautofluoreszenz in rot.

### 3.2.2 Lokalisation von AtAnx2-GFP in *A. thaliana* nach Schwerkraftreizung

Da bereits 2005 von Clark und Mitarbeitern gezeigt werden konnte, dass AtAnx2 nach einer Lageveränderung um  $90^\circ$  eine Relokalisation an die Außenmembran der schnellwachsenden Epidermiszellen im Hypokotyl zeigt

(Clark et al. 2005b), wurden diese Bedingungen hier ebenfalls an den mit AtAnx2-GFP transformierten Pflanzen getestet (Abb. 17). Im Hypokotyl konnte hier jedoch keine Relokalisation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt, da keine zusätzlichen Informationen enthalten sind), anders als in Zellen der Wurzelhaube (Abb. 17).

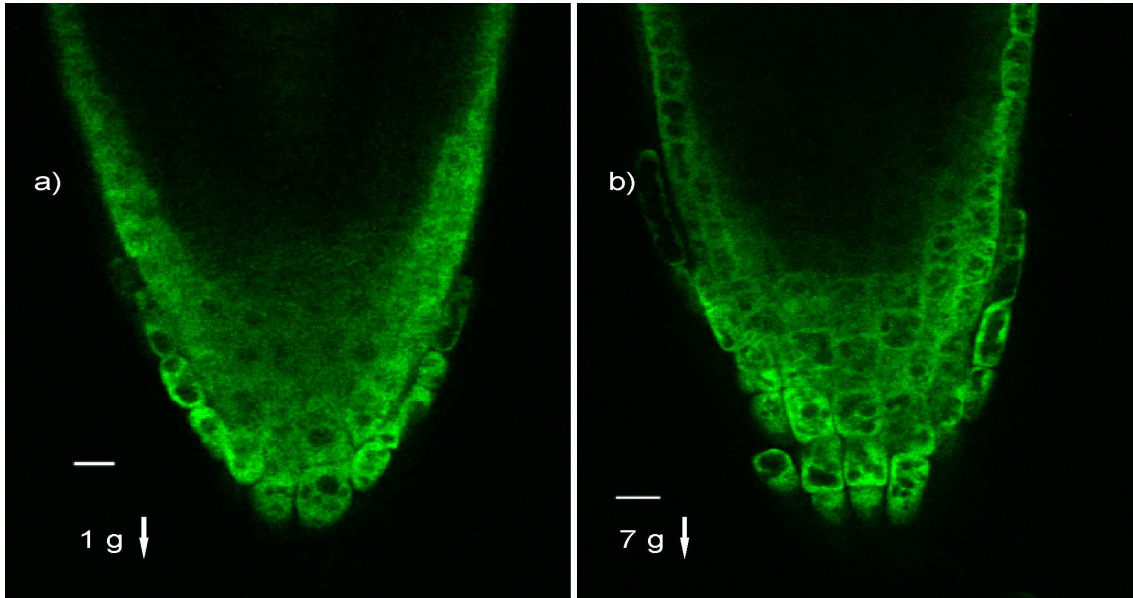


**Abbildung 17: AtAnx2-GFP exprimierende Pflanze (35S-Promotor) nach 30 min 90° Lageveränderung in der Wurzelspitze.**

**a)** Durchlichtkanal von dem in **b)** gezeigten Ausschnitt. Zu sehen sind unter anderem amyloplasten-ähnliche Organellen der Wurzelhaubenzellen (Pfeil). **b)** Einzelbild aus der Z-Projektion in **d)**, AtAnx2-GFP-Signal. Es sind verbundene oder vereinzelt granuläre Strukturen zu erkennen (Pfeil). **c)** Überlagerungsbild von **a)** und **b)**. Einzelne der in **b)** gezeigten punktförmigen Strukturen koloalisieren mit amyloplasten-ähnlichen Organellen (Pfeil). **d)** Z-Projektion aus 5 Aufnahmen mit einem Fokusabstand von 3 µm von einer behandelten (30 min, 90°) Wurzelhaube. Zu sehen sind wie in **b)** granuläre, teilweise verbundene Strukturen. Die geringe Expression oberhalb der Wurzelhaube ist durch natürliche Schwankungen in der Promotoraktivität bedingt. **e)** Vergrößerung des in **d)** umrandeten Bereichs. Zu sehen ist zusätzlich (zu der Lokalisation im Zelllumen) die teilweise kortikale Lage der markierten Strukturen (Pfeil). **b) bis e)** Maßstab: 10 µm. GFP-Signal in grün.

In der Wurzelhaube änderte sich das Signal des exprimierten AtAnx2-GFP (nach Lageveränderung um 90°) von diffus, zytoplasmatisch (Abb. 17d) zu granulär. Es konnte zum einen eine Agglomeration an amyloplastähnlichen und granulären Strukturen im Zellinneren (Abb. 17c), zum anderen eine Lokalisation

an Strukturen im Zellkortex beobachtet werden (Abb. 17d). Die Strukturen waren nur in Zellen der Wurzelhaube markiert und zeigten keine Bewegung. Die Identität dieser Zellorganellen konnte hier nicht näher bestimmt werden.



**Abbildung 18: AtAnx2-GFP Überexpressionspflanze nach 30 min Zentrifugation mit 7fach g in der Wurzelspitze.**

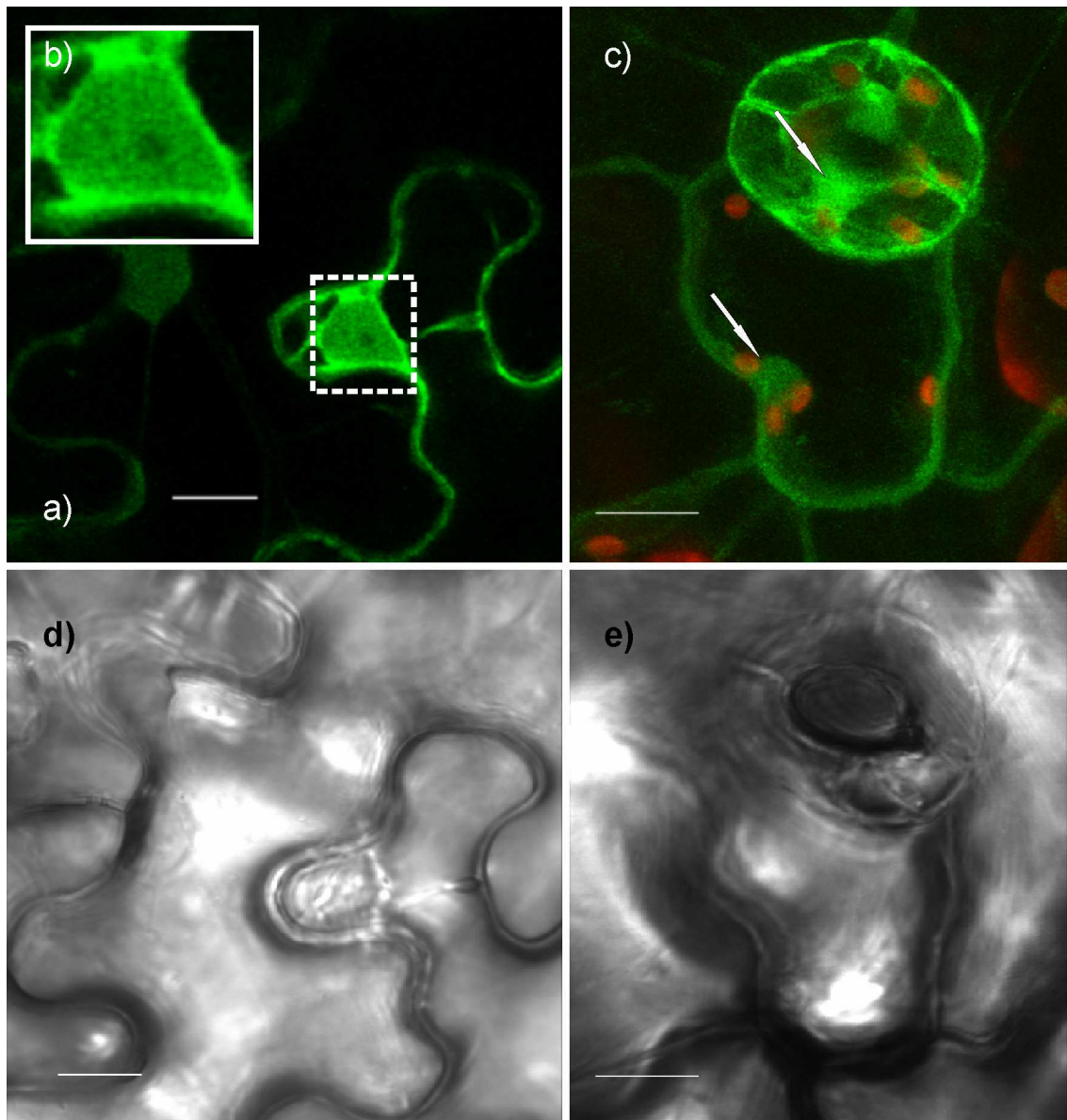
**a)** Wurzelspitze bei normaler Erdschwere in normaler Lage. Diffuse Markierung im Zytoplasma in unterschiedlicher Stärke. Die äußeren Zellen der Wurzelhaube waren stärker markiert als die Zellen im Inneren, was durch die natürlichen Aktivitätsschwankungen des Promotors bedingt war. **b)** Wurzelspitze nach Zentrifugation für 30min mit 7fach g. Markiert ist das Zytoplasma in nach innen abnehmender Stärke ähnlich dem Expressionsmuster in a). **a) und b)** Maßstab: 10 µm. GFP-Signal in grün.

Tan und Mitarbeiter (2011) berichteten für eine unter einem nativen Promotor exprimierende AtAnx2-GFP-Pflanze, dass nach einer 30 minütigen Inkubation bei siebenfacher Erdbeschleunigung, im zentralen Bereich der 2. und 3. Wurzelhaubenzellschicht, das AtAnx2-GFP Signal erhöht ist (siehe Kapitel 1.2.6, Abb. 3) (Tan et al. 2011). Dieses Ergebnis kann hier anhand der erstellten 35S:AtAnx2-GFP-Pflanze nicht bestätigt werden. Die Überexpressionslinie (35S:AtAnx2-GFP) zeigte nach 30 minütiger Inkubation bei siebenfacher Erdbeschleunigung keine Umlagerung oder Akkumulation von Fusionsprotein im zentralen Bereich der Wurzelhaube (Abb. 18). Auch wenn die Kontrolle ein leicht schwächeres Signal zeigt, so liegt dieser Unterschied noch innerhalb der Schwankungen des 35S-Promotors in unbehandelten Pflanzen (vergl. Abb. 16 und 35).

### 3.3 Annexin3

Um Rückschlüsse auf eine mögliche Lokalisation von AtAnx3 ziehen zu können, wurde die cDNS von AtAnx3, zusammen mit der Sequenz von GFP und der des 35S-Promotors, in den Vektor pCB302 kloniert (Klonierungsschema: Abb. 8). Anschließend wurde das Konstrukt: 35S:AtAnx3-GFP zum einen transient in Tabak, zum anderen stabil in *Arabidopsis* exprimiert. Durch das Fusionsprotein wurden der kortikale Zytoplasmabelag und das perinukleäre Zytoplasma sowie das Innere des Zellkerns markiert (jedoch nicht der Nukleolus; Abb. 19). Die Markierung des perinukleären Zytoplasmas hingegen war mit der von GFP-AtAnx1 und AtAnx2-GFP vergleichbar (Abb. 10b und Abb. 18a). Die Lokalisation in einem stabil transformierten *A. thaliana*-Keimling war auf zellulärer Ebene identisch mit GFP-AtAnx1 und AtAnx2-GFP, bis auf den Unterschied, dass AtAnx3-GFP ebenfalls den Zellkern markierte (Abb. 19).





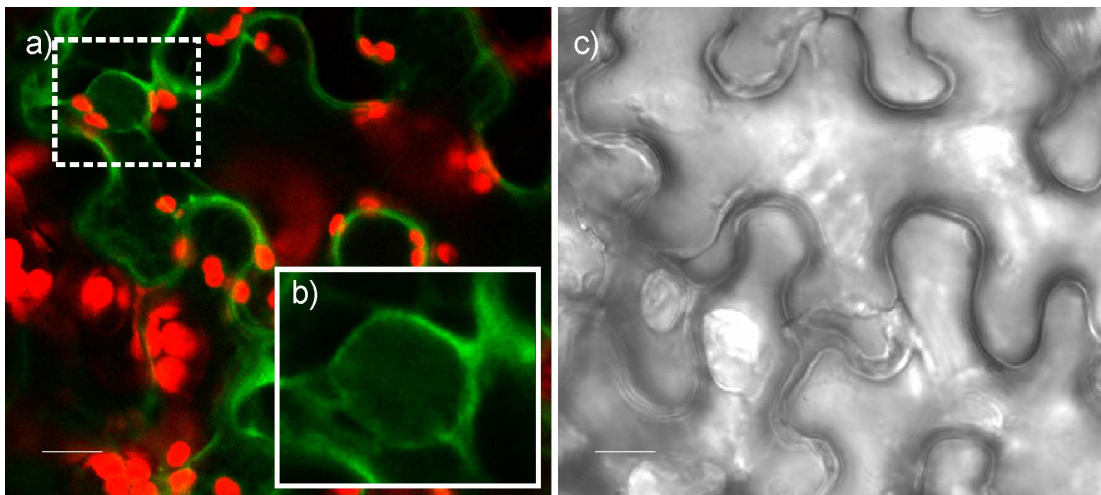
**Abbildung 19: *In-vivo* Lokalisation von AtAnx3-GFP in Blättern von Tabak und *Arabidopsis*-Pflanzen.**

**a)** Transient exprimiertes AtAnx3-GFP unter Kontrolle des 35S-Promotor in Tabak-epidermiszellen. AtAnx3-GFP ist im Zytoplasma, im perinukleären Zytoplasma und im Nucleus lokalisiert. **b)** Der Nucleolus wird von AtAnx3-GFP markiert, nicht aber der Nucleolus. **c)** Eine schwache Expression wurde in Blattepidermiszellen der stabil transformierten Arabidopsislinie 35S:AtAnx3-GFP beobachtet. Markiert ist, wie in a), das Zytoplasma, und der Zellkern (Pfeile). **d)** Durchlichtkanal zu a). **e)** Durchlichtkanal zu c). **a), b,) d) und e)** Einzelbilder. **c)** Z-Projektion, 6 Bilder, Fokus-Schrittlänge 3  $\mu\text{m}$ . **a) bis e)** Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . GFP-Signal in grün Chloroplastenautofluoreszenz in rot.

## 3.4 Annexin4

### 3.4.1 *In-vivo* Lokalisation von GFP fusioniertem AtAnx4 unter Kontrollbedingungen

Um bestimmen zu können welche Lokalisation AtAnx4 auf zellulärer Ebene zeigt und welche Domänen von AtAnx4 für diese Lokalisation von Bedeutung sind, wurden 2 verschiedene GFP-Fusionskonstrukte erstellt (Klonierungsschema siehe: Abb. 8): 35S:GFP-AtAnx4 und 35S:GFP-AtAnx4<sub>NT</sub>. Der N-Terminus von AtAnx4 (AS: 1-30) wurde über einen "Linker" an GFP fusioniert und anschließend in Tabak transient exprimiert. Die Lokalisation des GFP-AtAnx4<sub>NT</sub> ist zytoplasmatisch und nicht nukleär (Abb. 20).

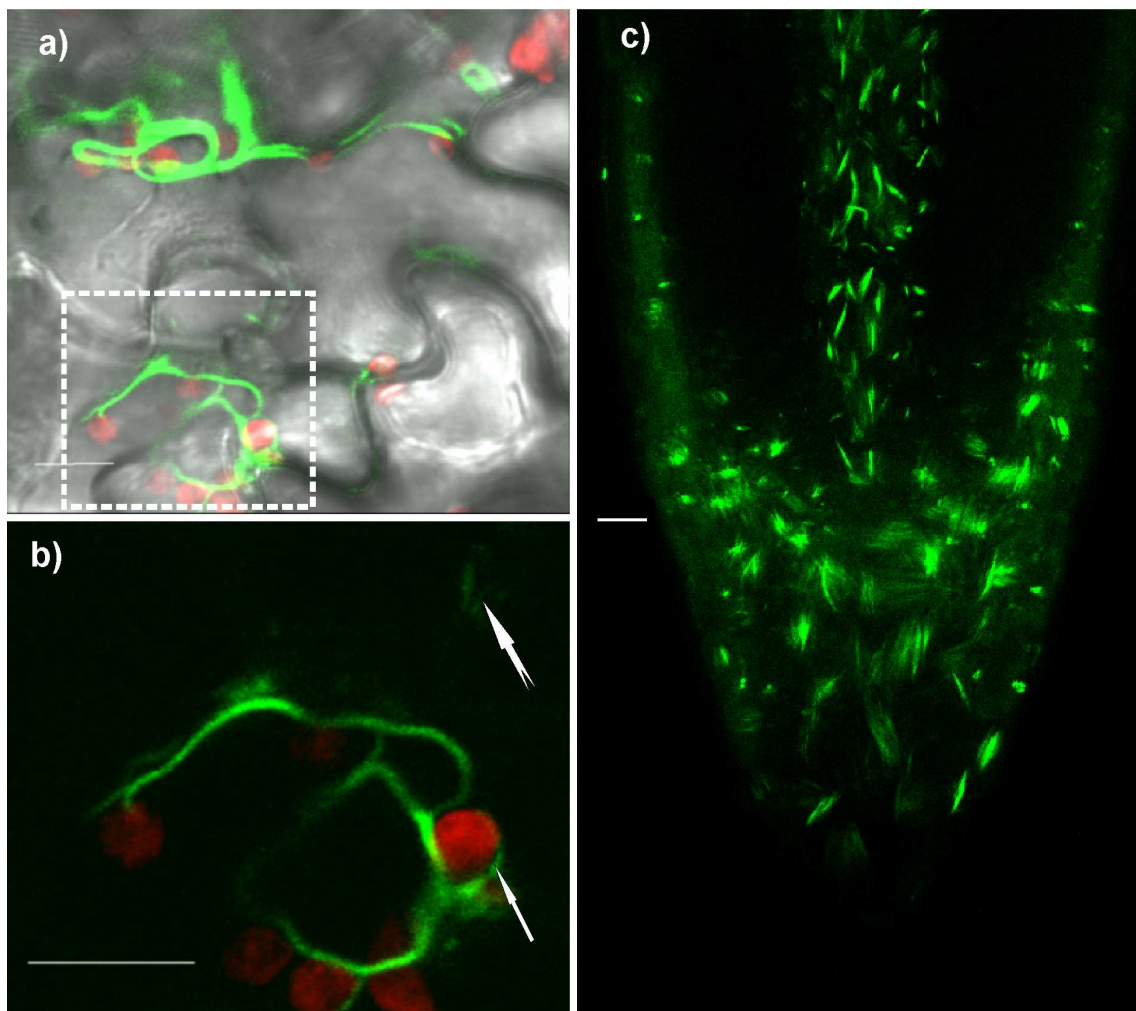


**Abbildung 20: Transiente Expression von 35S:GFP-AtAnx4<sub>NT</sub> in Tabakepidermiszellen.**

**a)** Markiert ist das Zytoplasma im Kortex und in zytoplasmatischen Strängen sowie um den Nukleus. **b)** Der Nukleus selbst ist nicht markiert. **c)** Durchlichtkanal des in a) gezeigten Bereichs. **a) bis c)** Einzelbilder. Maßstab: 10 µm. GFP-Signal in grün, Chloroplastenautofluoreszenz in rot.

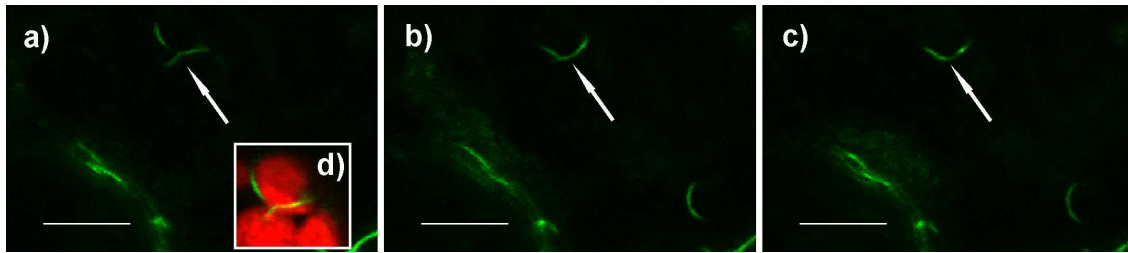
Wenn das gesamte Protein als Fusion mit GFP exprimiert wurde (GFP-AtAnx4), konnten kleine Strukturen (ca. 1 µm) und auffällige, zum Teil sehr lange Fäden (über 50 µm) im Zytoplasma erkannt werden (Abb. 21). Diese Fäden können Schlaufen und Ringe bilden (Abb. 28), verzweigt sein (Abb. 21b) oder miteinander verschmelzen (Abb. 22). Das Verschmelzen von einzelnen

Filamenten zu einem größeren Filamentstrang konnte nur vereinzelt beobachtet werden. Die verschmelzenden Filamente waren hierbei an der Oberfläche des gleichen Chloroplasten gebunden (Abb. 22).



**Abbildung 21: *In-vivo* Lokalisation von GFP-AtAnx4 in Blattepidermiszellen und der Wurzelhaube.**

**a)** Überlagerungsbild des Durchlichtkanals, der Chloroplastenautofluoreszenz und des GFP-AtAnx4-Signals. GFP-AtAnx4 bildet oder bindet nach transientser Transformation in Tabak fadenförmige Strukturen von unterschiedlicher Länge und Durchmesser im Zytoplasma. **b)** Die Chloroplasten liegen innerhalb der Epidermiszellen oftmals in Clustern vor (unten Mitte). GFP-AtAnx4 kann lange (50  $\mu\text{m}$  und länger) oder kurze (ca. 1  $\mu\text{m}$ ; gespaltener Pfeil) Strukturen markieren. Chloroplasten und GFP-AtAnx4 liegen oft in räumlicher Nähe (Pfeil). Die längeren Strukturen liegen hier verzweigt und in unterschiedlichen Durchmessern vor. **c)** Unbehandelte Wurzelspitze einer GFP-AtAnx4 exprimierenden Pflanze. Markiert sind mittelgroße Filamente und in den äußeren Wurzelhaubenzellen ebenfalls schwach das Zytoplasma. **a) bis c)** Einzelschnitte. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . GFP-Signal in grün, Chloroplastenautofluoreszenz in rot.



**Abbildung 22: Zeitserie (270 s) einer *in-vivo* Lokalisation von GFP-AtAnx4 in Tabakzellen.**

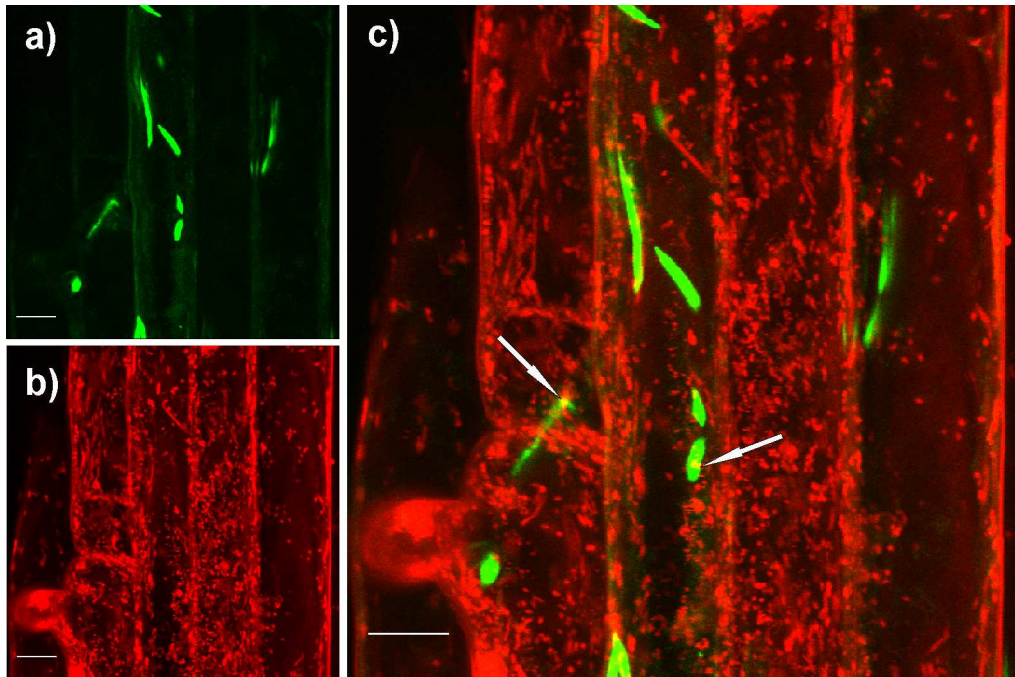
Transient (35S-Promotor) transformierte Tabakepidermiszellen. Unterschiedliche Zeitpunkte der Verschmelzung zweier mit GFP-AtAnx4 Filamente (Pfeile). **a)** und **d)**: 0 s; **b)**: 135 s; **c)**: 270 s. **a)** 2 räumlich nahe, kurze Filamente (Pfeil) liegen um Chloroplasten. Zur besseren Übersicht sind die Chloroplasten in **d)** abgebildet. **b)** Die markierten Filamente nähern sich aneinander an und überlagern an den Enden (Pfeil). **c)** Die Filamente verschmelzen (Pfeil) und bewegen sich als Einzelstrang weiter. **d)** Die Filamente befinden sich zum Teil auf der Oberfläche von Chloroplasten. **a) bis d)** Einzelschnitte. Maßstab: 10µm. GFP-Signal in grün, Chloroplastenautofluoreszenz in rot.

### 3.4.2 Färbungen und Inhibitorbehandlungen von GFP-AtAnx4 Überexpressionslinien

Um zu überprüfen ob und mit welchen Zellorganellen das Fusionsprotein GFP-AtAnx4 interagiert, wurden verschiedene Zellorganellen und Strukturen markiert und eine Kolokalisation mit GFP-AtAnx4 überprüft.

In GFP-AtAnx4 exprimierenden Wurzeln wurden Mitochondrien hierzu mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Da GFP-AtAnx4 im grünen Kanal fluoresziert wurde ein im roten Kanal fluoreszierender Farbstoff (Mitotracker) gewählt. Eine partielle Kolokalisation von GFP-AtAnx4 markierten Strukturen mit Mitochondrien konnte beobachtet werden (Abb. 23c, Pfeile). Es zeigte sich, dass Mitochondrien in Zellen der Differenzierungszone auch vereinzelt fädige Strukturen bildeten, diese kolokalisierten aber nicht mit den deutlich dickeren GFP-AtAnx4 Filamenten. Eine generelle Markierung von Mitochondrien durch GFP-AtAnx4 konnte so ausgeschlossen werden (Abb. 23).

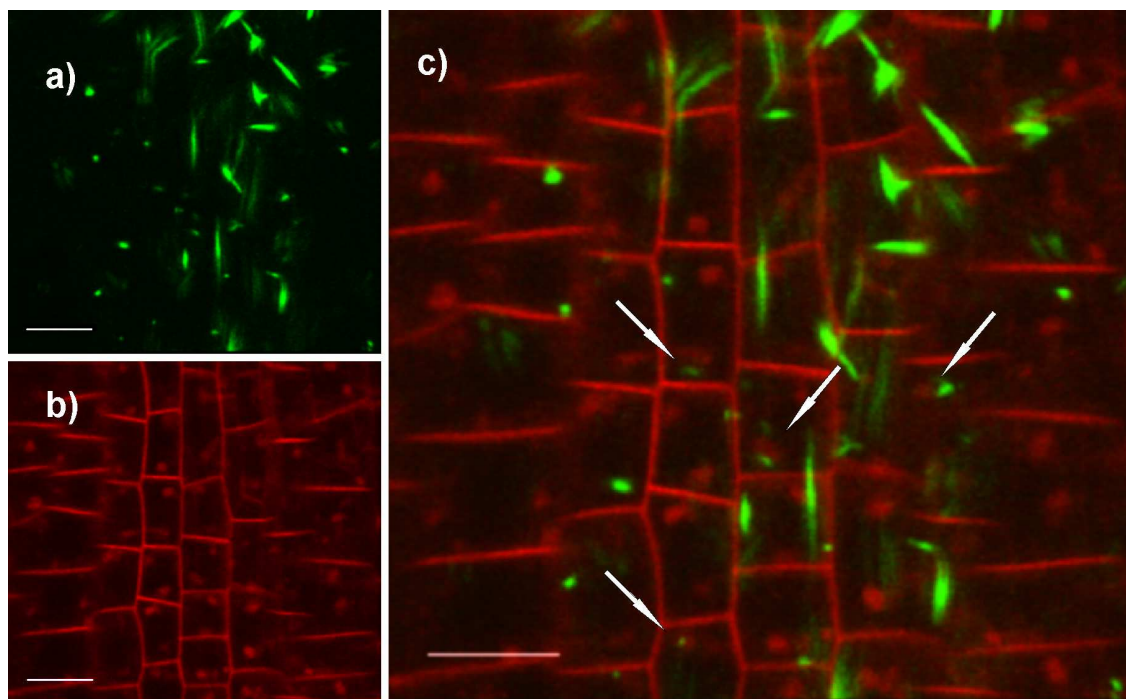




**Abbildung 23: *In-vivo* Lokalisation von GFP-AtAnx4 und durch Mitotracker gefärbte Mitochondrien in Zellen der Wurzeldifferenzierungszone.**

Stabil transformierte *A. thaliana* mit konstitutiv exprimiertem GFP-AtAnx4 Fusionsprotein. **a)** GFP-AtAnx4 exprimierende Zentralzylinderzellen. Die von GFP-AtAnx4 markierten Strukturen lagen als lange Fäden, in unterschiedlicher Stärke, unverzweigt vor. Teilweise waren in manchen Zellen auch kleine punktförmige Strukturen markiert (Mitte unten). **b)** Mitochondrien wurden durch den Farbstoff Mitotracker angefärbt (siehe Kap. 2.1.5). Sie waren deutlich dünner als die GFP-markierten Filamente und nur selten fädig. Teilweise lagen die angefärbten Mitochondrien im Zellkortex besonders dicht aneinander. **c)** Überlagerungsbild von a) und b). An manchen Stellen kommt es zur Überlagerung der Signale von GFP-AtAnx4 und den angefärbten Mitochondrien (Pfeile). **a) bis c)** Z-Projektion: 10 Bilder, Fokus-Schrittlänge 3  $\mu\text{m}$ . Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . GFP-Signal in grün, Mitotracker-Signal in rot.

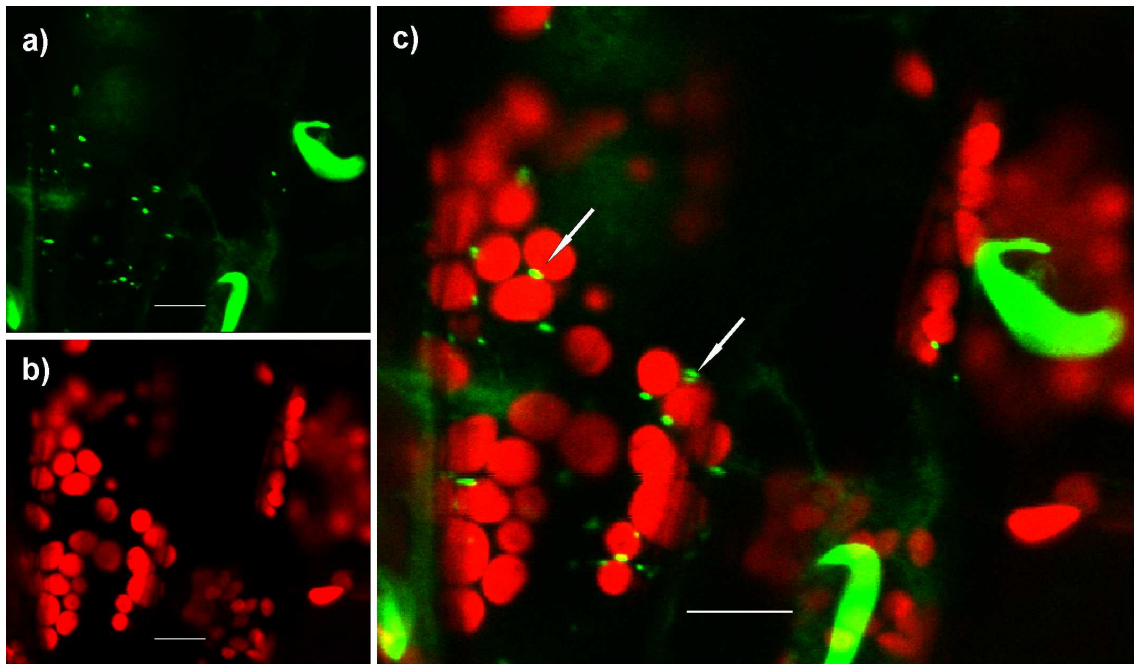
Weiterhin wurde durch die Zugabe von Brefeldin A (BFA) und dem Farbstoff FM4-64 eine mögliche Kollokalisierung von GFP-AtAnx4 mit Endozytosekompartimenten überprüft (Abb. 24). BFA lässt retrograde Endozytosevesikel akkumulieren (Takac et al. 2012), während FM4-64 sich zunächst nur in die Plasmamembran integriert und dann im Zuge der Endozytose in die Zelle aufgenommen wird (Gaffield und Betz 2006). Nach BFA-Hemmung ist der Fluoreszenzfarbstoff deshalb zeitnah in den so genannten BFA-Kompartimenten nachweisbar. Hierbei konnte eine mitunter eine räumliche Nähe von FM4-64 gefärbten BFA-Kompartimenten und GFP-AtAnx4 markierten Strukturen beobachtet werden.



**Abbildung 24: In-vivo Lokalisation von GFP-AtAnx4 und durch FM4-64 gefärbte BFA-Kompartimente und Plasmamembranen.**

Stabil transformierte *A. thaliana* mit konstitutiv exprimiertem GFP-AtAnx4 Fusionsprotein in jungen Zellen des Zentralzylinders. **a)** GFP-AtAnx4 exprimierende Zentralzylinderzellen. Die von GFP-AtAnx4 markierten Strukturen lagen als lange Fäden, in unterschiedlicher Stärke, unverzweigt vor. In vielen Zellen waren auch kleine punktförmige Strukturen markiert. **b)** BFA-Kompartimente und die Zellwand wurden durch den Farbstoff FM4-64 angefärbt (siehe Kap. 2.1.5). **c)** Überlagerungsbild von a) und b). Es konnte keine direkte Überlagerung der Signale von GFP-AtAnx4 und FM4-64 beobachtet werden. Die angefärbten bzw. markierten Strukturen lagen jedoch oft in räumlicher Nähe (Pfeile). **a) bis c)** Einzelschnitte. Maßstab: 10 µm. GFP-Signal in grün, FM4-64-Signal in rot.

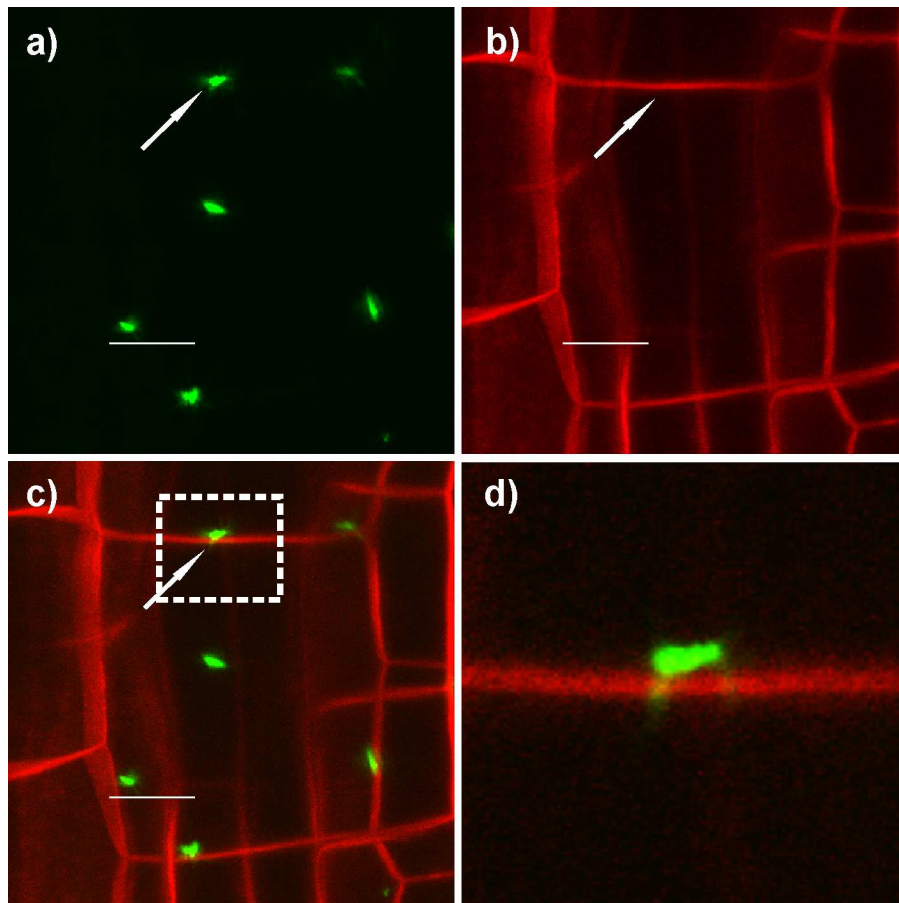
Für die Färbung von Aktinpolymerstrukturen wurde in der vorliegenden Arbeit Aktin-Puffer mit Phalloidin-TRITC verwendet (Abb. 28). In diesem Experiment zeigte sich, dass in einigen Zellen die Zugabe des Puffers Auswirkungen auf die Beschaffenheit von GFP-AtAnx4 markierten Strukturen hatte. Der beobachtete Effekt konnte dem im Puffer enthaltenen Glycerin zugeordnet werden. Während in unbehandelten Pflanzen GFP-AtAnx4 gefärbte Strukturen in der Wurzel in Größe, Struktur und Verteilung mit denen des Hypokotyls vergleichbar sind, bewirkte die Zugabe von 5 % Glycerin für 1 h in Lösung eine Veränderung in der Organisation der Strukturen im Hypokotyl. In der Wurzel wurde die Organisation der markierten Filamente nicht beeinträchtigt. GFP-AtAnx4 Filamente im Hypokotyl waren dahingehend verändert, dass sie in manchen Zellen in kleine punktuelle Strukturen (wenige µm) zerfielen, die meistens an bzw. zwischen den Chloroplasten lokalisiert waren (Abb. 25).



**Abbildung 25: Lokalisation von GFP-AtAnx4-Strukturen im Hypokotyl nach Behandlung für 1 h in 5 % Glycerin.**

Stabil transformierte, GFP-AtAnx4 konstitutiv exprimierende *A. thaliana*. **a)** GFP-AtAnx4-Signal. Manche Zellen zeigten statt langen, gestreckten Strukturen (rechts und unten im Bild) kleine punktförmige Strukturen **b)** Aufnahme der Chlorophyll-Autofluoreszenz. Sowohl links als auch rechts im Bild sind Cluster von Chloroplasten zu erkennen. Durch die Behandlung mit Glycerin sind die Chloroplasten in ihrer Struktur und in ihrem Zusammenhalt nicht beeinträchtigt. **c)** Überlagerungsbild von a) und b). Die von GFP-AtAnx4 markierten, punktförmigen Strukturen lokalisieren oft in der Nähe von Chloroplasten (Pfeile). Diese Strukturen sind aber nur an der Oberfläche der Chloroplasten angelagert. **a) bis c)** Einzelschnitte. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . GFP in grün, Chloroplastenautofluoreszenz in rot.

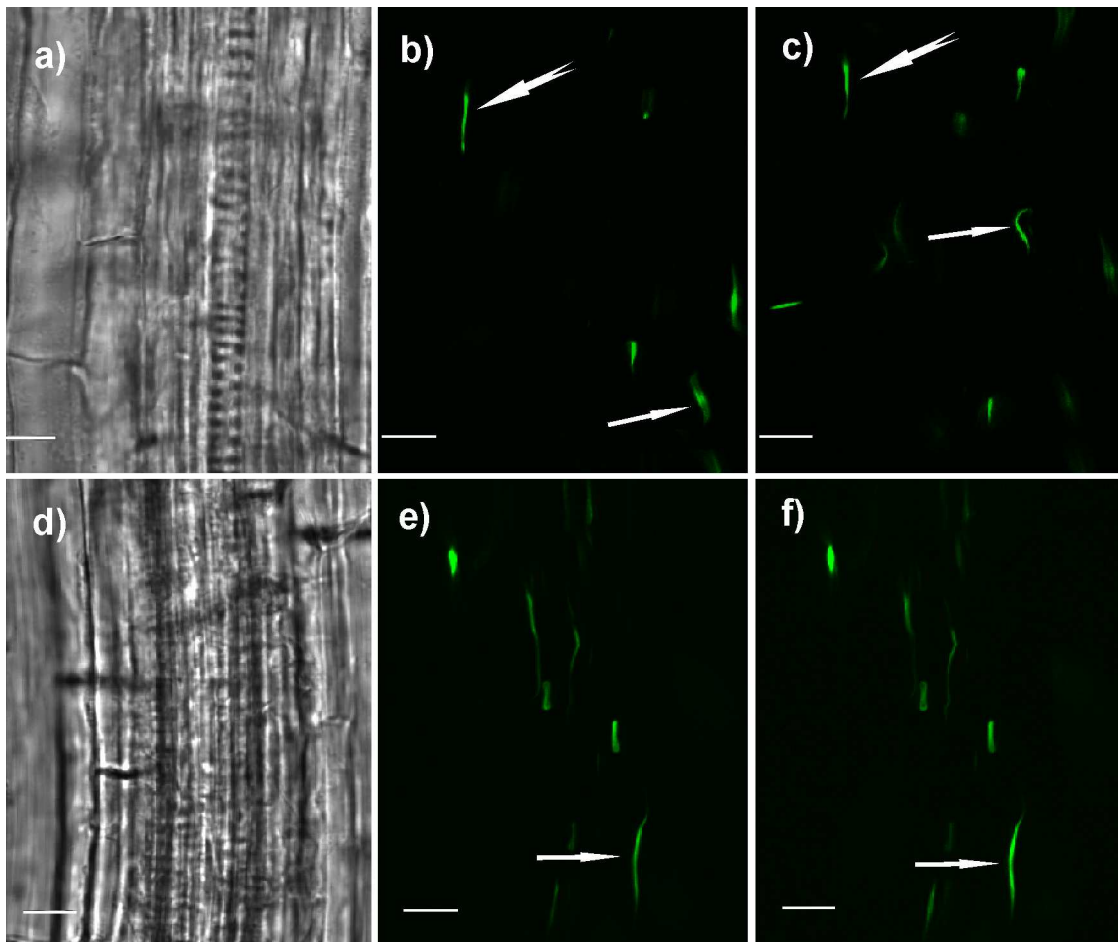
In jungen Zellen der Streckungszone der Wurzel waren manche der fädigen GFP-AtAnx4 markierten Strukturen komplett immotil. Diese stationären Strukturen kolokalisieren häufig mit der Plasmamembran (Abb. 26) und manche scheinen dort verankert zu sein (Abb. 26c, Pfeil) oder reichten sogar durch die Plasmamembran und die Zellwand in die nächste anliegende Zelle (Abb. 26d). Anders als in Zellen der Differenzierungszone oder in oberirdischen Geweben sind die durch GFP-AtAnx4 angefärbten Strukturen hier weder länglich noch als Ring organisiert, sondern als kleine ovale bis runde Strukturen.



**Abbildung 26: Lokalisation vom GFP-AtAnx4 im Zentralzylinder von stabil transformierten *Arabidopsis*-Wurzeln.**

**a)** GFP fusioniertes AtAnx4 in jungen Zellen des Zentralzylinders. Die durch GFP-AtAnx4 angefarbten Strukturen sind hier klein und oval bis rund. **b)** FM4-64 Signal: Hier wurde durch den Farbstoff die Plasmamembran angefarbt. **c)** Überlagerungsbild von a) und b). Die kurzen stationären Strukturen koloalisieren teilweise mit der Plasmamembran. Manche Strukturen reichen von einer Zelle in die Nächste (Pfeil). **d)** Einzelschnitt des in c) umrandeten Bereichs. **a) bis c)** Z-Projektion 17 Bilder, Fokus-Schrittlänge 1  $\mu\text{m}$ . Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . GFP in grün, FM4-64 in rot.





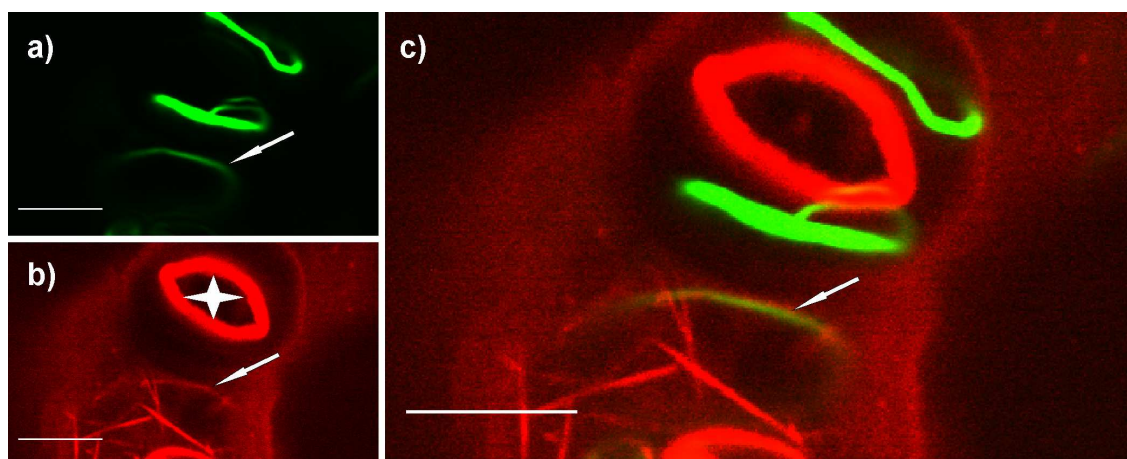
**Abbildung 27: In-vivo Lokalisation von GFP-AtAnx4 in Zellen des Zentralzylinders von stabil transformierten *Arabidopsis*-Wurzeln nach 1 h Latrunculin B-Behandlung.**

**a)** Durchlichtbild zu Bild **b)** und **c)**. **b) und c)** 240 s Zeitserie einer unbehandelten Kontrollwurzel. Die durch GFP-AtAnx4 markierten Strukturen bewegen sich entlang der Wurzel-Längsachse. Die visualisierten Strukturen können sich mit  $1,5 \mu\text{m}$  pro Minute (gespaltener Pfeil) bis zu  $10 \mu\text{m}$  pro Minute bewegen (Pfeil). Einige der Strukturen bewegten sich noch schneller mit einigen  $\mu\text{m}$  pro Sekunde. Manche der Strukturen sind auch in unbehandelten Pflanzen fest verankert und nicht beweglich. Besonders schnell waren angefärbten Strukturen im Zentralzylinder der Wurzel. **d)** Durchlichtbild zu Bild **e)** und **f)**. **e) und f)** 240 s Zeitserie. Nach Zugabe des Aktin-Inhibitors Latrunculin B (1 h;  $1,5 \mu\text{M}$ ) konnte keine Bewegung der angefärbten Strukturen mehr beobachtet werden (Pfeil). **a) bis f)** Einzelschnitte. Maßstab:  $10 \mu\text{m}$ . GFP-Signal in grün.

Während in Blattepidermiszellen auch ringförmig geschlossene Strukturen markiert waren (Abb. 28), waren es in der Wurzel eher längliche Strukturen, welche zum Teil eine starke Motilität zeigten (Abb. 23, 24 und 27). Um zu überprüfen ob die beobachtete Bewegung aktinabhängig ist, wurde der Inhibitor Latrunculin B zugegeben, der den Aufbau der Aktinfilamente hemmt (Kaufman 2008). Die Bewegung der Strukturen wurde durch die Zugabe von Latrunculin B gestoppt. Vor der Zugabe von Latrunculin B wurden partiell sehr schnelle Bewegungen beobachtet (einige  $\mu\text{m}$  pro Sekunde), nach der Zugabe waren nur

noch ungerichtete sehr langsame Bewegungen zu beobachten (Abb. 27d und e). Auch im Hypokotyl konnten im Leitbündel schnelle, gerichtete Bewegungen von AtAnx4-Filamenten beobachtet werden (Bewegung wie in Abb. 27b und c). In Zellen der Wurzelrinde und der Blattepidermis wurden langsamere oder eher ungerichtete Bewegungen beobachtet. Die Motilität der AtAnx4-positiv, filamentartigen Strukturen ist, wenn man alle Ergebnisse zusammenfasst, nur in den unter- und oberirdischen Leitgeweben stark und gerichtet, in allen anderen Geweben hingegen eher schwach und ungerichtet.

Da die zelluläre Bewegung von GFP-AtAnx4-Strukturen anscheinend durch Aktin beeinflusst werden kann, wurde überprüft, inwiefern eine Kolo-kalisation mit Aktin beobachtet werden kann. Unter anderem wurden stabil transformierte Pflanzen mit TRITC-konjugiertem Phalloidin inkubiert, um Aktinpolymerstrukturen anzufärben. Allerdings führte dieses Färbeverfahren nur bei oberirdischen Geweben der Pflanzen zum Erfolg, wohingegen das Aktinzytoskelett in Wurzelgewebe damit nicht nachgewiesen werden kann. Im Blattgewebe konnte gezeigt werden, dass angefärbte Aktinfilamentbündel und GFP-AtAnx4 markierte Filamentstrukturen parallel zu einander verlaufen. Allerdings trifft das nicht für alle AtAnx4-Filamente in einer Zelle zu.

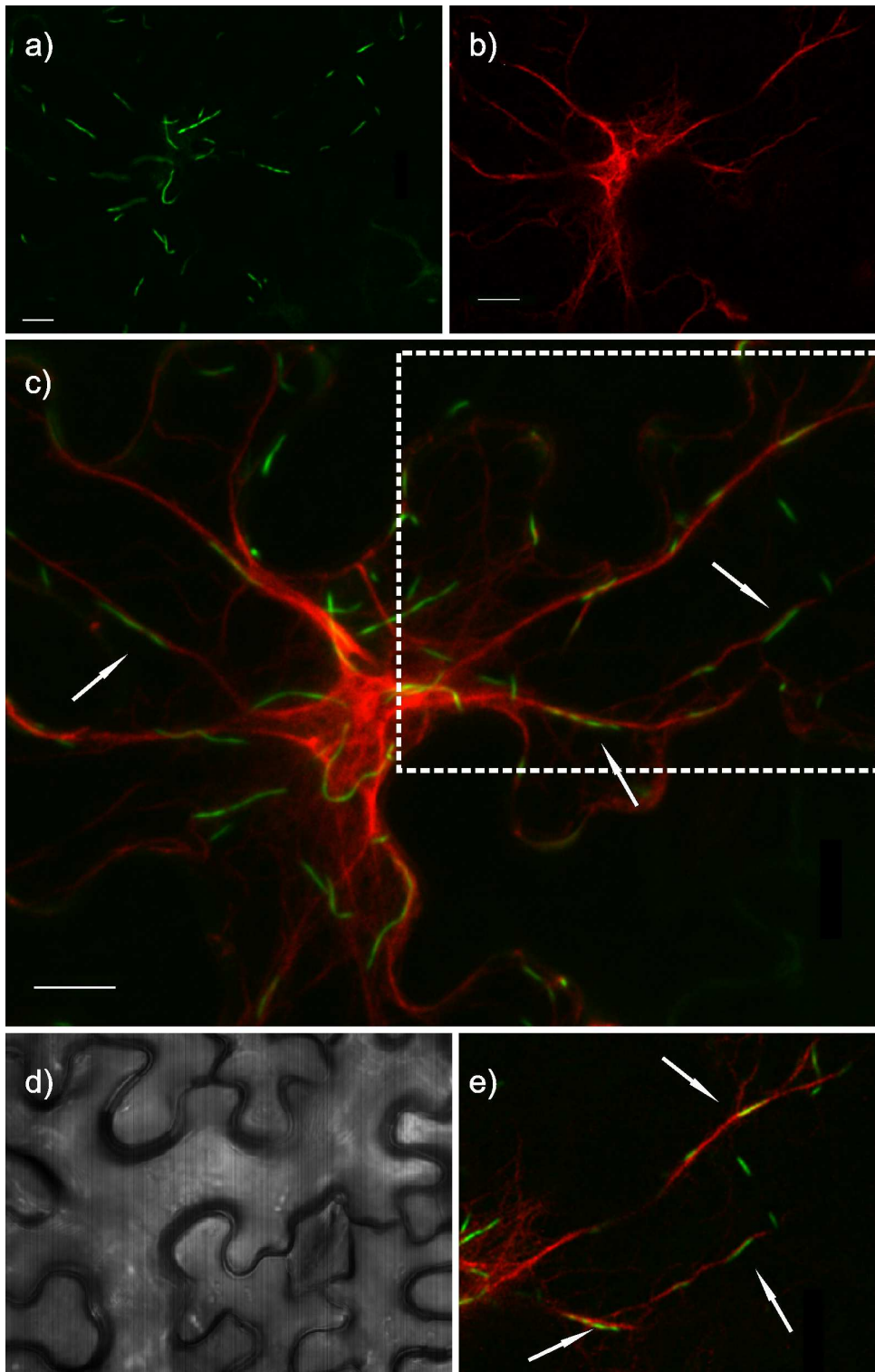


**Abbildung 28:** *In-vitro* Lokalisation von stabil transformiertem GFP-AtAnx4 in Blattepidermiszellen stabil transformierter *A.thaliana*-Pflanzen gefärbt mit Phalloidin-TRITC.

**a)** Lokalisation des GFP-AtAnx4 Fusionsproteins. Das Fusionsprotein markiert fädige Strukturen. Jede der beiden Schließzellen besitzt ein kräftiges AtAnx4-Filament, wobei das untere einen endständigen Loop aufweist **b)** Phalloidin-TRITC Färbung: Angefärbt sind vernetzte Aktinfilamente (Pfeil). Der Innenrand der Spaltöffnung (Stern) zeigt eine sehr starke Autofluoreszenz durch eingelagertes Kutin. **c)** Überlagerungsbild von a) und b). Das GFP-AtAnx4 Filament liegt exakt entlang des mit Phalloidin-TRITC angefärbten Aktinfilamentbündels (Pfeil). **a) bis c)** Einzelschnitte. Maßstab: 10  $\mu$ M. GFP ist in grün, TRITC in Rot.

### 3.4.3 Koexpression von Organellmarkern mit GFP-AtAnx4

Um bestimmen zu können, ob und welche Zellkompartimente GFP-AtAnx4 bindet oder markiert, wurden in dieser Arbeit verschiedene Farbstoffe verwendet (s. o.) oder Fusionsproteine aus Organellmarkern und rot fluoreszierenden Proteinen mit GFP-AtAnx4 koexprimiert. Als Organellmarker wurde einerseits der bereits beschriebene ER-Marker DsRed-HDEL exprimiert, andererseits das aktinbindende Fusionsprotein DsRed-ABD2, das die C-terminale Aktinbindedomäne von *Arabidopsis* Fimbrin1 enthält.



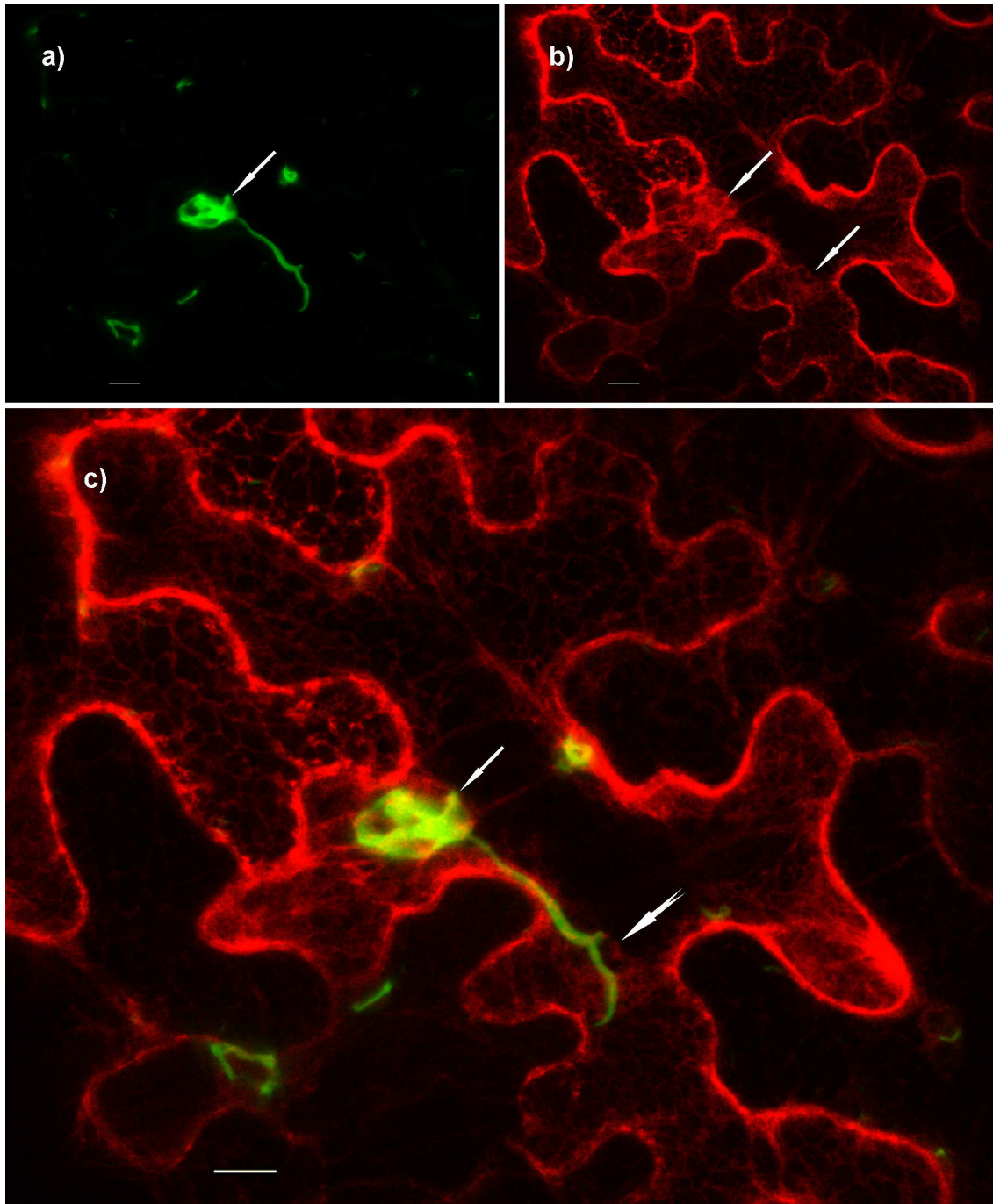
**Abbildung 29: *In-vivo* Kolokalisation von GFP-AtAnx4 und DsRed-ABD2.**

Transient transformierte Tabakblattepidermiszelle. **a)** GFP-AtAnx4 liegt nach der Koexpression mit DsRed-ABD2 als fadenförmige Strukturen aus gleichmäßig dicken Filamenten in der gesamten Zelle vor. **b)** DsRed-ABD2 Signal. Angefärbt sind Aktinstränge und Bündel in der Zellperipherie aber auch ein feines Netzwerk im Zellinneren. **c)** Überlagerung von a) und b). GFP-AtAnx4-Filamente kolokalisieren mit den Kortikalen Aktinbündeln (Pfeile). **d)** Zur besseren Identifizierung der Kolokalisation (Pfeile) wurde hier ein Einzelschnitt aus der Z-Projektion in c) gewählt (umrandeter Bereich). **a) bis c)** Z-Projektion: 10 Bilder, Fokus-Schrittlänge: 2  $\mu\text{m}$ . Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . GFP-Signal in grün, DsRed-Signal in rot.



Die zeitgleiche Expression von DsRed-ABD2 und GFP-AtAnx4 in Epidermiszellen führte zu einer partiellen Kolokalisation von GFP-AtAnx4-Filamenten und Aktinstrukturen (Abb. 29). Zusätzlich waren die AtAnx4-Filamente, nach Koexpression mit DsRed-ABD2, weiträumiger in der Zelle verteilt und feiner als in Blattgewebe, dass nur mit dem GFP-AtAnx4 Konstrukt alleine transformiert worden war (Abb. 21).

Die gleichzeitige Expression von DsRed-HDEL und GFP-AtAnx4 führte ebenfalls zu einer Veränderung der GFP-AtAnx4 markierten Strukturen. Die durch GFP-AtAnx4 markierten Strukturen waren viel kompakter als in unbehandelten Blättern (vergleiche Abb. 21 und Abb. 30). Partiiell konnte eine Kolokalisation des ER-Markers DsRed-HDEL mit AtAnx4 Strukturen gezeigt werden. Die beobachtete Kolokalisation beschränkte sich jedoch auf Bereiche in denen das ER stark gebündelt war (Abb. 30c, Pfeil).



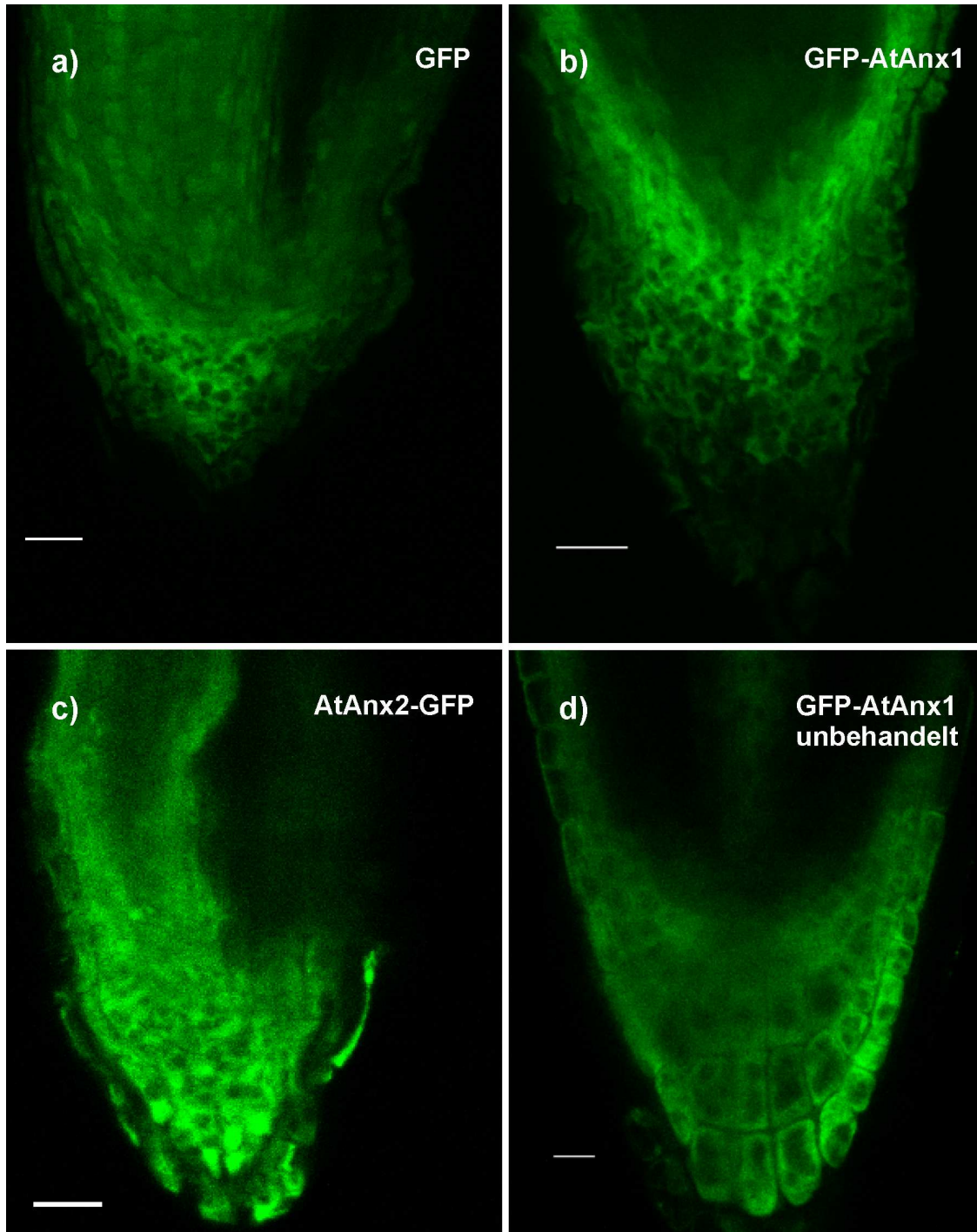
**Abbildung 30: *In-vivo* Kolokalisation von GFP-AtAnx4 und dem ER (35S:DsRed-HDEL) in Tabakblättern.**

**a)** GFP-AtAnx4-Signal zeigt stellenweise ein Ineinanderfließen von dicken Filamenten (Pfeil). **b)** ER-Elemente im gleichen Sektor dieser Epidermiszelle, DsRed-HDEL-Marker. Teilweise ist eine Ansammlung des ERs im Zytoplasma zu erkennen (Pfeile) **c)** Überlagerungsbild von a) und b). Der ER-Marker DsRed-HDEL und der GFP-AtAnx4-Reporter sind partiell miteinander kolokalisiert (Pfeil). Mitunter ist auch eine räumliche Nähe von GFP-AtAnx4 markierten Strukturen und dem markierten ER zu erkennen, ohne, dass die Signale Überlagern (gespaltener Pfeil) **a) bis c)** Z-Projektion. 20 Bilder. Fokus-Schrittlänge 2 µm. Maßstab: 10 µm. GFP-Signal in grün, DsRed-Signal in rot.

## **3.5 Trockenstressbehandlungen Annexin Überexpressionslinien**

### **3.5.1 Lufttrocknung von 35S:GFP-AtAnx1, 2 und 4-Pflanzen**

Nach zweistündiger Lufttrocknung in der Sterilbank wurde von Cantero und Mitarbeitern (2006) eine Veränderung in der mRNA-Menge der Annexine AtAnx1 bis 4 beobachtet. Daher wurde überprüft, ob die Lufttrocknung zusätzlich Auswirkungen auf die Lokalisation der Annexine 1, 2 oder 4 hat. In Blättern konnte jedoch keine Relokalisation nach Lufttrocknung beobachtet werden. Ebenso konnte in Wurzelspitzen, welche für kurze Zeit (30s) Luftgetrocknet wurden keine Relokalisation der GFP-fusionierten Annexine beobachtet werden, wenn diese anschließend in Öl mikroskopiert wurden (Abb. 31).



**Abbildung 31: GFP, GFP-AtAnx1 und AtAnx2-GFP Lokalisation nach 30 s Lufttrocknung in der Wurzelspitze.**

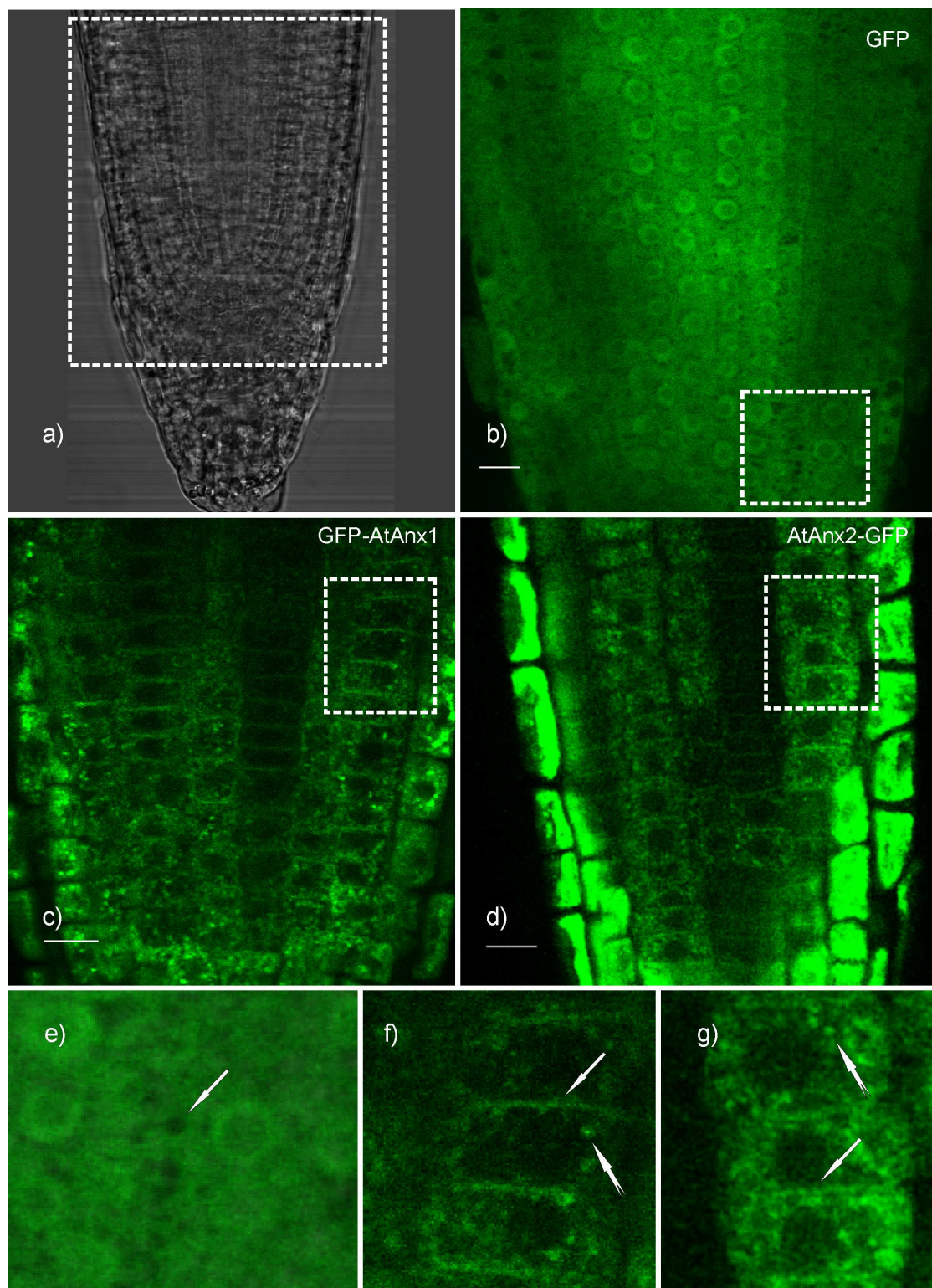
**a)** Wurzelspitze einer GFP exprimierenden Pflanze nach 30 s Lufttrocknung unter dem konstanten Luftfluss einer Sterilbank. Statt Nährlösung wurde Paraffinöl als Medium zur Einbettung verwendet, um eine Rehydrierung der Zellen zu verhindern (Kap. 2.2.4). Die Zellen waren aufgrund der Austrocknung stark verkleinert und deformiert. Die Wurzelspitze war stark eingefallen. **b)** Wurzelspitze einer GFP-AtAnx1 exprimierenden Pflanze in Paraffinöl nach 30 s Lufttrocknung. Die Zellform ist aufgrund der Austrocknung stark verändert. Im oberen mittleren Bereich ist keine Expression des Konstruktes zu beobachten, was auf natürliche Schwankungen der Expressionsstärke des 35S-Promotors zurückzuführen ist. **c)** Wurzelspitze von AtAnx1-GFP exprimierender Pflanze in Paraffinöl nach 30 s Lufttrocknung. Die Zellform ist aufgrund der Austrocknung stark verändert. **b)** Wurzelspitze von GFP-AtAnx1 →

exprimierender Pflanze in Paraffinöl ohne Lufttrocknung. Nach 3 h in Paraffinöl zeigte die Pflanze immer noch eine normale Zytoplasmaströmung und Lokalisation von GFP-AtAnx1. Maßstab: 10 µm. **a) bis d)** Einzelschnitte. Die verringerte Qualität der Aufnahmen ist durch die Austrocknung bzw. auch durch das verwendete Öl bedingt. GFP-Signal in grün.

Hier konnte kein auswertbares Ergebnis beobachtet werden, da die zelluläre Lokalisation der Proteine 35S:GFP-AtAnx1, AtAnx2-GFP und 35S:GFP, im Gegensatz zu denen in unbehandelten Pflanzen (Abb. 12 und 16), nicht detailliert zu differenzieren war (Abb. 31a bis c). Die Zellen waren aufgrund der Austrocknung stark verkleinert und die betroffenen Wurzelspitzen waren eingefallen. Die Zellen und Gewebe in den oberen Abschnitten der Wurzel zeigten nach Lufttrocknung keine Veränderungen (Beschaffenheit wie in Abb. 12a, b und 16c). Da die Wurzelpräparate nach der Trocknungsphase nicht in Wasser sondern in Paraffinöl mikroskopiert wurden, wurde überprüft, ob das verwendete Paraffinöl an sich einen nachteiligen Effekt auf das Wurzelgewebe haben könnte. Dabei zeigten die Kontrollpflanzen keine Beeinträchtigungen der Zytoplasmaströmung oder der Zellstruktur, wie hier beispielhaft anhand einer GFP-AtAnx1 exprimierenden Pflanze nach 3 stündiger Inkubation in Öl gezeigt (Abb. 31d).

Nach Lufttrocknung und anschließender Rehydrierung war die Lokalisation der Proteine GFP-AtAnx1 und AtAnx2-GFP jedoch verschieden von der in unbehandelten Kontrollpflanzen. In den so behandelten Pflanzen war in den Zellen der Wurzelspitze von GFP-AtAnx1 und AtAnx2-GFP-Pflanzen Vesikel und kortikale Strukturen markiert (Abb. 32c, d, f und g). Dieses Muster war deutlich anders als in Pflanzen die unfusioniertes GFP exprimierten (Abb. 32b und e). Nach der Lufttrocknung mit anschließender Rehydrierung konnte in mit 35S:GFP transformierten *Arabidopsis* keine Umlagerung von unfusioniertem GFP beobachtet werden (Zytoplasma und Zellkern), jedoch eine Verkleinerung der Vakuolen (Abb. 32b, und e, Pfeil).





**Abbildung 32: Lokalisation von GFP (unfusionsiert), GFP-AtAnx1 und AtAnx2-GFP nach Rehydrierung in der Wurzelspitze (siehe auch Kap. 2.2.4).**

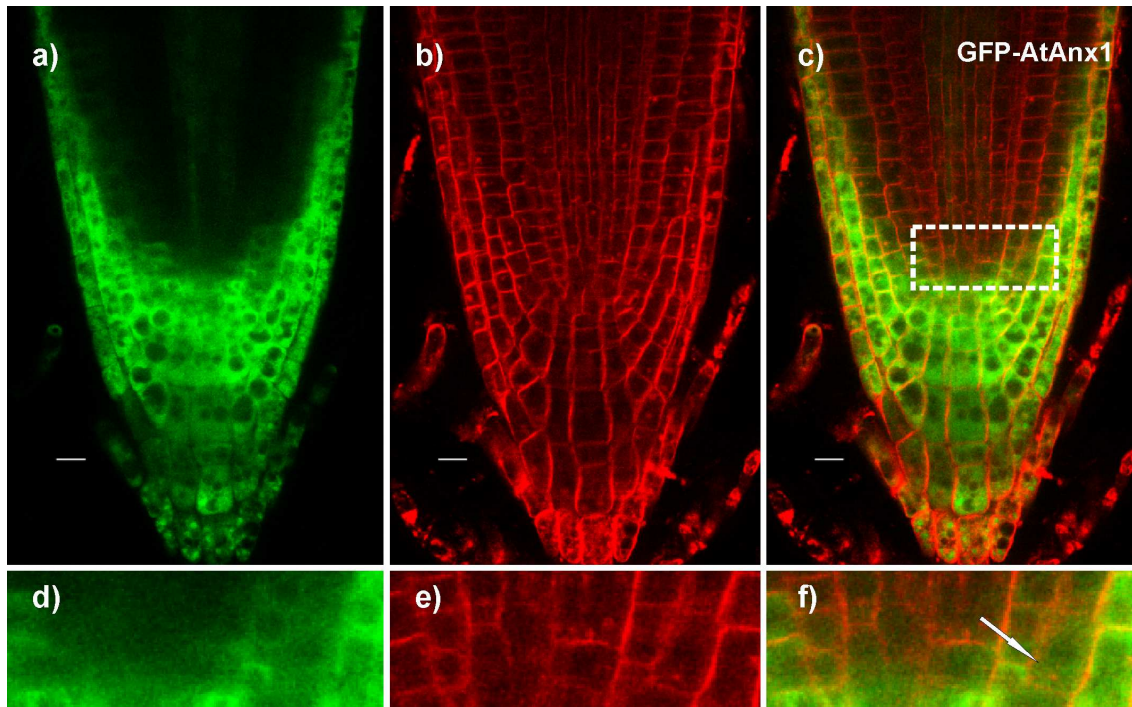
Stabil transformierte *A. thaliana* Überexpressionslinien (unfusionsiertes GFP, GFP-AtAnx1 und AtAnx2-GFP unter 35S-Promotor). **a)** Durchlichtübersicht einer Wurzelspitze. Für die Darstellung der Ergebnisse von a) bis g) wurde der umrandete Ausschnitt gewählt, da hier die Reaktion auf die Lufttrocknung mit anschließender Rehydrierung am deutlichsten zu erkennen war. **b)** Wurzelspitze einer GFP exprimierenden Pflanze nach 30 s Lufttrocknung und →

anschließender Rehydrierung. Das durch das unfusionierte GFP angefärbte Zytoplasma ist in den durch Rehydratation gestressten Zellen gleichmäßig im Zelllumen verteilt. **c)** Wurzelspitze einer GFP-AtAnx1-Überexpressionslinie nach 30 s Lufttrocknung und anschließender Rehydrierung. Eine stärkere Lokalisation an der Plasmamembran ist in den inneren Wurzelspitzenzellen zu erkennen. Wie in b) war die Zytoplasmaströmung stark verlangsamt. **d)** Wurzelspitze einer AtAnx2-GFP Überexpressionslinie nach 30 s Lufttrocknung und anschließender Rehydrierung. Aufgrund der starken Belichtung ist das Signal in den äußeren Zellen sehr stark. **e)** Detail des in b) umrandeten Ausschnitts. Anstelle einer großen Vakuole sind viele kleinere Vakuolen innerhalb der Zellen vorhanden (Pfeil). **f)** Detailansicht des in c) umrandeten Bereichs. Einzelne vesikuläre Strukturen innerhalb der Zelle (gespaltener Pfeil) und teilweise die Plasmamembran (Pfeil) sind durch das exprimierte GFP-AtAnx1 markiert. Anders als in c) ist das Signal im Zytoplasma nur noch schwach vorhanden. **g)** Einzelne vesikuläre Strukturen innerhalb der Zelle (gespaltener Pfeil) und teilweise die Plasmamembran (Pfeil) sind durch das exprimierte AtAnx2-GFP markiert. Anders als in b) ist das Signal im Zytoplasma nur noch schwach vorhanden. Eine stärkere Lokalisation an der Plasmamembran ist in den inneren Wurzelspitzenzellen zu erkennen. Wie in c) war die Zytoplasmaströmung stark verlangsamt. **a) bis g)** Einzelschnitte. Maßstab: 10µm. GFP-Signal in grün.

Um die Identität der vesikulären Strukturen detaillierter bestimmen zu können, wurden die Keimlinge 1 h in Brefeldin A (BFA) und FM-4-64 inkubiert (Abb. 33a bis f und 34a bis f). Eine Behandlung mit BFA und Färbung mit FM4-64 zeigte hier weder eine Veränderung der Lokalisation von GFP-AtAnx1, AtAnx2-GFP (Abb. 33a bis f und 34a bis f) noch eine Kolokalisation mit FM4-64 gefärbten BFA-Kompartimenten. BFA lässt retrograde Endozytosevesikel akkumulieren (Takac et al. 2012), während FM4-64 sich zunächst nur in die Plasmamembran integriert und dann im Zuge der Endozytose in die Zelle aufgenommen wird (Gaffield und Betz 2006). Nach BFA-Hemmung ist der Fluoreszenzfarbstoff deshalb zeitnah in den so genannten BFA-Kompartimenten nachweisbar.

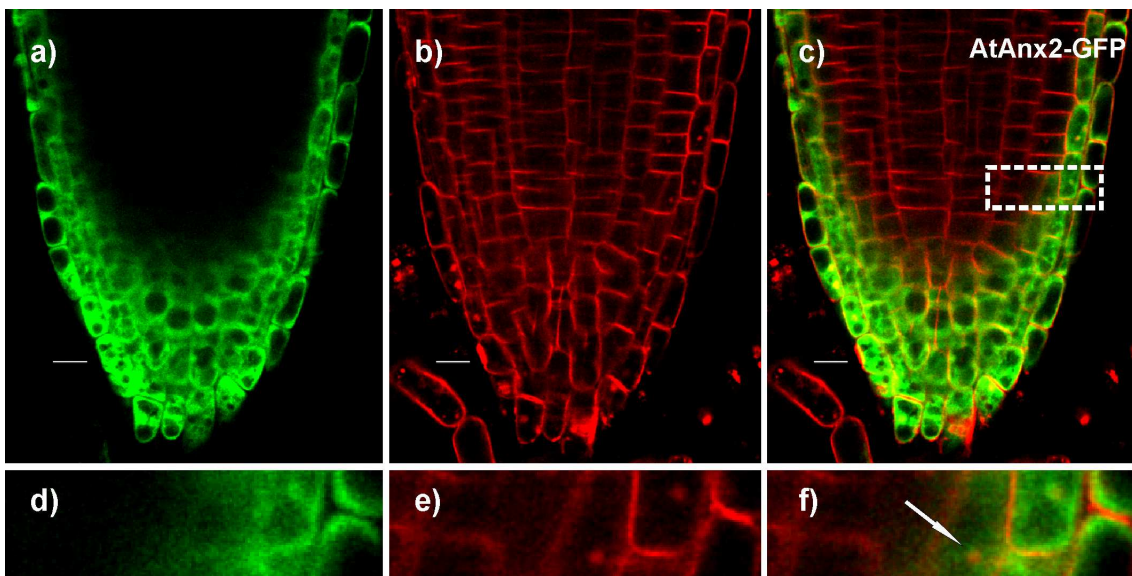
Nach der Inkubation mit FM4-64 und BFA und der anschließenden Lufttrocknung mit Rehydrierung zeigte sich für die Behandlung von GFP-AtAnx1 und AtAnx2-GFP-Pflanzen eine partielle Überlagerung der Signale (GFP und durch FM4-64 angefärbte BFA-Kompartimente; Abb. 35c, Pfeil; Abb. 36c, Pfeil). Es wurden jedoch nicht alle mit FM4-64 gefärbten BFA-Kompartimente auch von GFP-AtAnx1 bzw. AtAnx2-GFP markiert (Abb. 35c, gespaltener Pfeil; Abb. 27c, gespaltener Pfeil). Zusätzlich zu der Kolokalisation an vesikulären Strukturen konnte auch an der Plasmamembran partiell eine Kolokalisation beobachtet werden (Abb. 35c und 36c). Da GFP-AtAnx4 nach Lufttrocknung mit anschließender Rehydrierung keine Änderung der Lokalisation zeigte wurden GFP-AtAnx4 exprimierende Pflanzen hier nicht näher untersucht.





**Abbildung 33: Mit BFA behandelte und FM4-64 angefärbte Wurzelspitzen von stabil mit GFP-AtAnx1 transformierte *A.thaliana*-Pflanzen.**

**a)** GFP-AtAnx1 Signal nach 1 h BFA-Behandlung (1 h, 50  $\mu$ M). Das Zytoplasma ist gleichmäßig markiert. **b)** FM4-64 (3,3 mM) Signal nach BFA-Behandlung. Zu beobachten sind hier BFA-Kompartimente. **c)** Überlagerungsbild von a) und b). **d)** GFP-AtAnx1 -Signal des in c) umrandeten Bereichs. **e)** FM4-64 Signal des in c) umrandeten Bereichs. Zu beobachten sind hier BFA-Kompartimente. **f)** Überlagerungsbild von d) und e). Eine Kolokalisation von GFP-AtAnx1 und BFA-Kompartimenten ist nicht feststellbar (Pfeil). **a) bis f)** Einzelschnitte. Maßstab: 10  $\mu$ m. GFP-Signal in grün, FM4-64-Signal in rot.

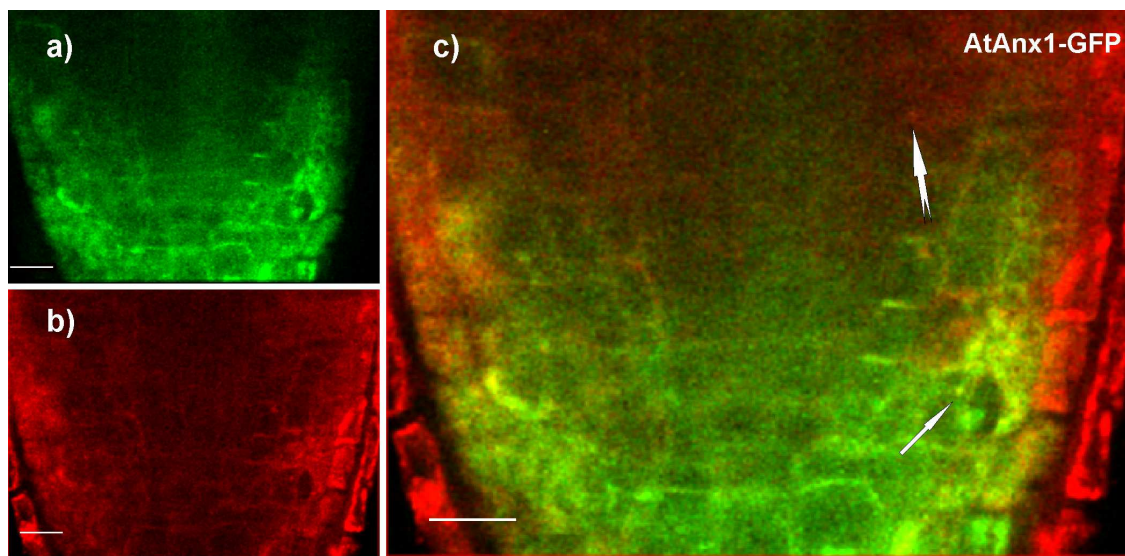


**Abbildung 34: Mit BFA behandelte und FM4-64 angefärbte Wurzelspitzen von stabil mit AtAnx2-GFP transformierten *A. thaliana*-Pflanzen.**

**a)** AtAnx2-GFP Signal nach 1 h BFA-Behandlung (1 h, 50  $\mu$ M). Das Zytoplasma ist gleichmäßig markiert. **b)** FM4-64 (3,3 mM) Signal nach BFA-Behandlung. Zu beobachten sind hier BFA-Kompartimente. **c)** Überlagerungsbild von a) und b). **d)** AtAnx1-GFP-Signal des in c)  $\rightarrow$

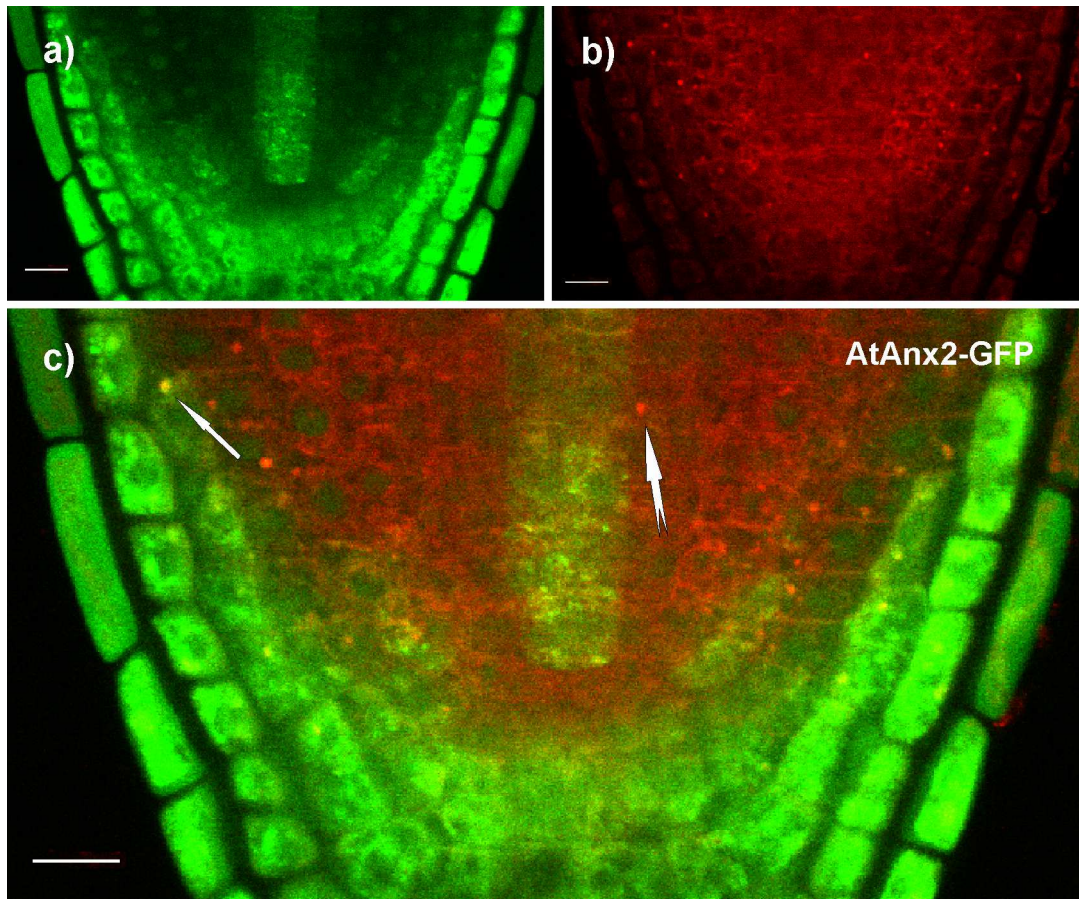


umrandeten Bereichs. **e)** FM4-64 Signal des in c) umrandeten Bereichs. Zu beobachten sind hier BFA-Kompartimente. **f)** Überlagerungsbild von d) und e). Eine Kolokalisation von GFP-AtAnx2 und BFA-Kompartimenten ist nicht feststellbar (Pfeil). **a) bis f)** Einzelschnitte. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . GFP-Signal in grün, FM4-64-Signal in rot.



**Abbildung 35: Mit BFA behandelte und mit FM4-64 gefärbte Wurzelspitzen von stabil transformierten GFP-AtAnx1 Keimlingen nach Lufttrocknung mit anschließender Rehydrierung.**

**a)** GFP-AtAnx1 -Signal nach 1 h BFA (50  $\mu\text{M}$ ) mit anschließender Lufttrocknung und Rehydrierung. Das Protein ist in BFA-Kompartimenten und an der Plasmamembran lokalisiert. **b)** FM4-64-Signal nach 1 h BFA (50  $\mu\text{M}$ ) Behandlung mit anschließender Lufttrocknung und Rehydrierung. Gefärbt sind BFA-Kompartimenten und die Plasmamembran. **c)** Überlagerungsbild von a) und b). Das GFP-AtAnx1 -Signal und die mit FM4-64 gefärbten BFA-Kompartimente kolokalisieren (Pfeil). Ebenfalls sind BFA-Kompartimente (Pfeil) angefärbt, welche nicht mit GFP-AtAnx1 kolokalisieren (gestrichelter Pfeil). **a) bis c)** Einzelschnitte. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . GFP-Signal in grün, FM4-64-Signal in rot. Ausschnitt ähnlich wie in Abbildung 33a.

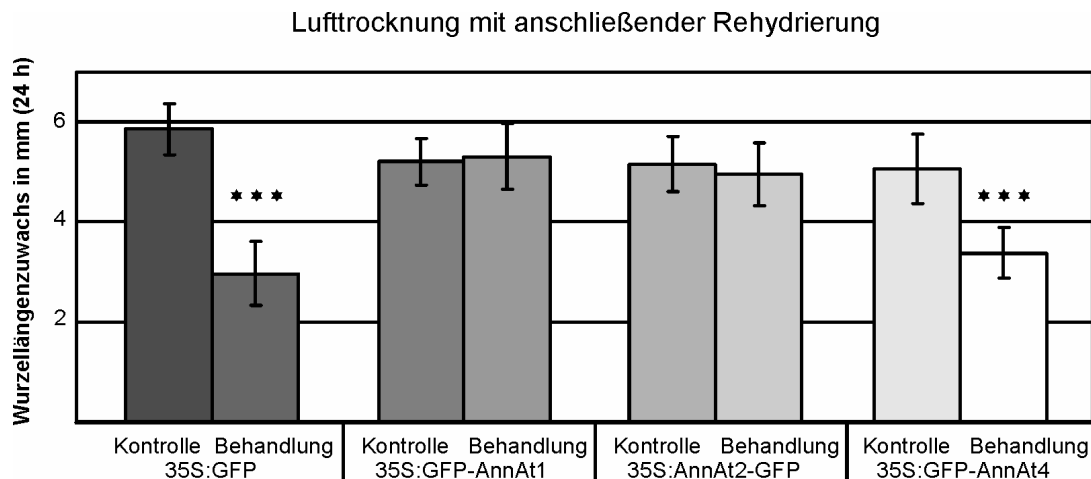


**Abbildung 36: Mit BFA behandelte und mit FM4-64 gefärbte Wurzelspitzen von stabil transformierten AtAnx2-GFP Keimlingen nach Lufttrocknung mit anschließender Rehydrierung.**

**a)** AtAnx2-GFP-Signal nach 1 h BFA (50  $\mu\text{M}$ ) mit anschließender Lufttrocknung und Rehydrierung. Das Protein ist in BFA-Kompartimenten und an der Plasmamembran lokalisiert. **b)** FM4-64-Signal nach 1 h BFA (50  $\mu\text{M}$ ) Behandlung mit anschließender Lufttrocknung und Rehydrierung. Gefärbt sind BFA-Kompartimente und die Plasmamembran. **c)** Überlagerungsbild von a) und b). Das AtAnx2-GFP-Signal und die mit FM4-64 gefärbten BFA-Kompartimente koloalisieren (Pfeil). Ebenfalls sind BFA-Kompartimente (Pfeil) angefärbt, welche nicht mit GFP-AtAnx1 koloalisieren (gestrichelter Pfeil). **a) bis c)** Einzelschnitte. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . GFP-Signal in grün, FM4-64-Signal in rot. Ausschnitt ähnlich wie in Abbildung 33a.

Um zusätzlich zu untersuchen in wie fern die Überexpression von GFP-AtAnx1, AtAnx2-GFP, AtAnx4-GFP oder GFP Auswirkungen auf die Toleranz gegen Lufttrocknung der transformierten Pflanzen hat, wurden sieben Tage alte Keimlinge für 30 s unter der Sterilbank luftgetrocknet, wieder rehydriert und der Längenzuwachs nach 24 h gemessen (Kap. 2.2.4). Nach einer Lufttrocknung mit anschließender Rehydrierung zeigten die Überexpressionslinien von GFP-AtAnx1 oder AtAnx2-GFP keinen Unterschied im Wachstum zu der unbehandelten Kontrolle (Abb. 37). Nach der Überexpression von GFP oder

GFP-AtAnx4 konnte hingegen ein hoch signifikant verlangsamtes Wachstum festgestellt werden (Irrtumswahrscheinlichkeit 0,1 %;  $\alpha = 0,001$ ). Somit ist eine erhöhte Toleranz von GFP-AtAnx1 oder AtAnx2-GFP überexprimierenden Keimlingen gegen Trockenstress sehr wahrscheinlich.

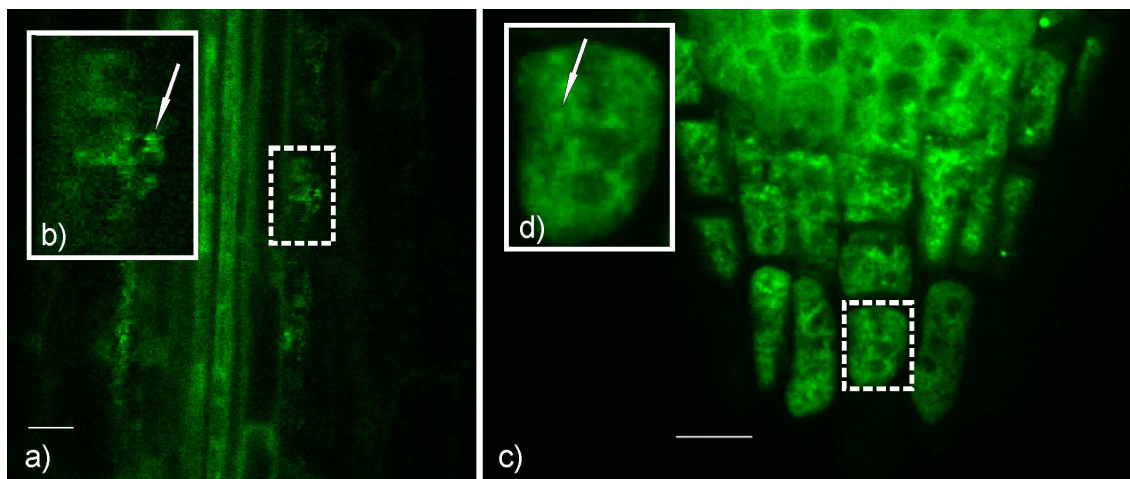


**Abbildung 37: Wurzellängenzuwachs von unbehandelten und behandelten Überexpressionslinien.**

Lufttrocknung mit anschließender Rehydrierung von 7 d alten Keimlingen. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der gemessenen Wurzelwachstumsgeschwindigkeiten (in mm pro 24 h). Als Fehlerbalken sind die Konfidenzintervalle angegeben ( $\alpha = 0,001$ ; GFP/AtAnx1/AtAnx2:  $n = 30$ ; GFP-AtAnx4 Kontrolle:  $n = 18$ ; GFP-AtAnx4 Behandlung:  $n = 26$ ). **Kontrolle:** Wurzellängenzuwachs von unbehandelten Keimlingen (siehe Kap. 2.2.4). Die Wurzellängen wurden bestimmt und nach 24 h (16 h Licht, 8 h dunkel und 24 °C) erneut gemessen um den Längenzuwachs zu dokumentieren. **Behandlung:** Die Keimlinge wurden für 30 s getrocknet (siehe Kap. 2.2.4), anschließend in Nährmedium rehydriert und danach die Wurzellängen gemessen. Diese wurden nach 24 h erneut ermittelt. **35S:GFP und 35S:GFP-AtAnx4:** Die Behandelten Keimlinge zeigten nach 24 h ein verlangsamtes Wurzelwachstum. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Behandlung keinen Effekt hat (= Nullhypothese) liegt bei unter 0,1 % ( $\alpha = 0,001$ ) und kann mit hoher Signifikanz falsifiziert werden (Kap. 2.2.4). **35S:GFP-AtAnx1 und 35S:AtAnx2-GFP:** Die Behandlung zeigte bei den GFP-AtAnx1 und AtAnx2-GFP überexprimierenden Pflanzen keinen signifikanten Effekt. Einzeldaten siehe Anhang (Kap. 7.5).

### 3.5.2 Behandlung von GFP-AtAnx1-Pflanzen mit Abscisinsäure

Da mit den hier durchgeführten Versuchen gezeigt werden konnte, dass GFP-AtAnx1 und 2 überexprimierende Pflanzen eine erhöhte Trockenresistenz gegenüber Lufttrocknung mit anschließender Rehydrierung aufweisen, wurde mit Abscisinsäure (ABA) eine Stressantwort induziert, um zu testen ob die beobachteten Relokalisierungen (Abb. 32) mit dem ABA-Signalweg in Verbindung stehen. Das Hormon wird bei Trockenstress verstärkt ausgeschüttet und bedingt eine Reihe von Veränderungen innerhalb der Pflanze, welche die Trockentoleranz erhöhen. Nach der Inkubation in ABA wurden in der Wurzel von stabil transformierten Keimlingen (35S:GFP-AtAnx1) punktartige Strukturen im Bereich des Zellkortex markiert. Dies konnte in den Zellen der Wurzelhaube und den äußeren Zellen des Zentralzylinders beobachtet werden.



**Abbildung 38: GFP-AtAnx1 Lokalisation in der Wurzelspitze und der Differenzierungszone in stabil transformierten Pflanzen nach 1 h ABA-Behandlung.**

**a)** Zentralzylinder in der Differenzierungszone einer GFP-AtAnx1 exprimierenden Pflanze nach 1 h ABA-Behandlung. Zytoplasmatische Lokalisation von GFP-AtAnx1. Zusätzlich sind partikelartige Strukturen im Randbereich des Zentralzylinders zu erkennen, siehe **b)**. **b)** Vergrößerung des in **a)** umrandeten Bereichs. In den Zellen des Perizykels sind immobile körnige Strukturen im Zellinneren markiert (Pfeil). **c)** Wurzelspitze einer GFP-AtAnx1 exprimierenden Pflanze nach 1 h ABA (1  $\mu$ M)-Behandlung. Schnittebene: 2 Zellschichten oberhalb der Mitte. Angefärbt ist das Zytoplasma und Strukturen im Zellkortex, siehe **d)**. **d)** Vergrößerung des in **c)** umrandeten Bereichs. Markiert sind, ähnlich wie in **b)** immobile körnige Strukturen im Zellinneren (Pfeil). Die Lokalisation im Zellkortex war hier aber nur auf wenige Zellschichten begrenzt. Weiter oberhalb konnte der Effekt nicht mehr beobachtet werden (oberer Rand). **a) bis d)** Einzelschnitte. Maßstab: 10  $\mu$ m. GFP-Signal in grün.

Die Lokalisation von unfusioniertem GFP änderte sich hingegen nach einer Behandlung nicht (Lokalisation wie in Abb. 13a und d). Die Inkubation in höher konzentrierter ABA-Lösung (5, 10 oder 15  $\mu\text{M}$ ) hatte keine Umlagerung des Proteins GFP-AtAnx1 zur Folge (Lokalisation wie in Abb. 12b und e).

### 3.5.3 Langzeittrockenexperiment mit GFP-AtAnx4-Pflanzen

Wie in den vorherigen Versuchen und durch Cantero und Mitarbeiter (2006) gezeigt wurde (Abb. 37), spielen Annexine mit hoher Wahrscheinlichkeit bei der Reaktion von *Arabidopsis* auf eine spezifische Form von Trockenstress (Lufttrocknung) eine wichtige Rolle. Für ATAnx4 Überexpressionspflanzen konnte eine verminderte Fähigkeit die Spaltöffnungen zu schließen und eine verminderte Toleranz gegenüber Wassermangel festgestellt werden (Huh et al. 2010). Daher wurde hier überprüft, ob die Überexpression eines Anx4-GFP Fusionsproteins vergleichbare Auswirkungen auf die Sensitivität der Pflanzen gegenüber länger andauerndem Wassermangel bewirkte.

Wie in Abbildung 39 zu sehen ist, sind sechs Wochen alte, kultivierte 35S:GFP Pflanzen, die für 10 Tage nicht gegossen wurden, noch erkennbar vital. Im Gegensatz dazu zeigte die Überexpressionslinie von GFP-AtAnx4 nach der gleichen Behandlung eindeutige Zeichen von Wassermangel. Dies war daran zu erkennen, dass die Blätter stark eingefallen waren und die Stängel ebenfalls an Stabilität verloren hatten.





**Abbildung 39: Trockenstressversuch mit 6 Wochen alten *A.thaliana*-Pflanzen.**

10-tägige Trockenperiode bei sechs Wochen alten Pflanzen. Vergleich einer 35S:GFP exprimierenden Pflanze mit einer 35S:GFP-AtAnx4 exprimierenden Pflanze. Während die 35S:GFP-Pflanzen kaum Trockenstresssymptome zeigen, sind die GFP-AtAnx4 exprimierenden Pflanzen stark gestresst. Die Stängel haben kaum Stabilität und die Blätter sind leicht verfärbt und welken.

## 4. Diskussion

### 4.1 Lokalisation der Annexine AtAnx1 bis 4 und ihre möglichen Funktionen

In den ersten Veröffentlichungen über tierische und pflanzliche Annexine wurden diese als membrangebundene Proteine beschrieben (Creutz et al. 1978; Boustead et al. 1989). Im Laufe der letzten 3 bis 4 Jahrzehnte stellte sich jedoch immer deutlicher heraus, dass es in den meisten Fällen eine zytosolische Annexinpopulation gibt, welche durch den Einfluss bestimmter Signale an Membranen binden kann (siehe Kap. 1.2.3) (Babiychuk und Draeger 2000; Draeger et al. 2005; Hegde et al. 2006; McNeil et al. 2006). Bisher gibt es jedoch nur wenige veröffentlichte Daten über mögliche Funktionen und die intrazellulären Lokalisationen von pflanzlichen Annexinen *in-vivo*. Daher wurden in der vorliegenden Dissertation durch Fusion der Annexine AtAnx1, 2, 3 oder 4 mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) Reporterproteine erstellt, um diese *in-vivo* näher zu charakterisieren. Insbesondere sollten Bedingungen ermittelt werden, welche eine Relokalisation der erstellten Fusionsproteine zur Folge hatten. Anhand der Art des applizierten Stresses und der anschließenden Reaktion der Fusionsproteine sollten mögliche Funktionen oder Aufgaben der verschiedenen Annexine abgeleitet werden (siehe auch Kap. 1.2).

#### 4.1.1 Lokalisation und Funktionen der GFP-AtAnx1 Fusionsproteine

##### 4.1.1.1 Lokalisation von AtAnx1 unter Kontrollbedingungen

Zu AtAnx1 gibt es bisher nur wenige veröffentlichte Arbeiten in denen eine Fusion an GFP beschrieben ist (Richter 2008; Huh et al. 2010). Von Richter (2008) wurde gezeigt, dass GFP-AtAnx1 in transient transformierten Pflanzenzellen (*Allium porrum*) eingeschlossene kleine Vesikel in größeren Organellen markiert. Ob diese Vesikel Mikrosomen darstellen, wie von Lee und Mitarbeiter (2004) beschrieben ist, wurde jedoch nicht näher bestimmt. Diese

Organellen mit vesikulären Einschlüssen waren in den für die vorliegende Arbeit stabil transformierten Pflanzen nicht zu beobachten (Abb. 11 und 12). AtAnx1 wurde durch Richter (2008) nach der Behandlung von Arabidopsiswurzeln mit dem Inhibitor Wortmannin im Wurzelproteom in erhöhter Menge vorgefunden. Da Wortmannin die Phosphatino­sit­ol-3-Kinase und Phosphatino­sit­ol-4-kinase hemmt und eine Vergrößerung von multivesikulären Körperchen (MVB) bedingt (Takac et al. 2012), wurde von Richter (2008) postuliert, dass es sich bei den beobachteten Strukturen um MVB's handeln könnte. In der vorliegenden Dissertation zeigte die Behandlung mit Wortmannin von Wurzelspitzen der mit 35S:GFP-AtAnx1 stabil transformierten Pflanzen jedoch keine Veränderung der ansonsten zytosolischen Lokalisation von GFP-AtAnx1. Da MVB's sich nach einer Behandlung mit Wortmannin vergrößern (Schwellen), hätte GFP-AtAnx1 bei einer Bindung an MVB's hiernach eine eindeutig vesikuläre Lokalisation zeigen müssen. Wahrscheinlich werden die beobachteten Organellen nur in Lauchepidermiszellen ausgebildet oder die Organellen sind in *Arabidopsis* kleiner oder anders strukturiert als in den transient transformierten Lauchzellen. Daher konnten die in *Allium porrum* beobachteten Strukturen nicht näher charakterisiert werden und es konnte nicht ermittelt werden, ob es sich bei den beobachteten Organellen in *Allium porrum* möglicherweise um MVB's handelt. Zur detaillierteren Identifikation der Vesikel könnten verschiedene Organellmarker über eine gleichzeitige Expression auf eine Kolo­ka­li­sa­tion mit GFP-AtAnx1 markierten Vesikeln in Lauchepidermiszellen hin überprüft werden. Zusätzlich zu dem schon vorhandenen Konstrukt GFP-AtAnx1 (Richter 2008), wurde GFP C-terminal an AtAnx1 fusioniert. Außerdem wurde die Fusion N- und C-terminal mit einem wenige AS kurzer Linker zwischen GFP und AtAnx1 wiederholt (Schema: Abb. 8; Linker: Kap. 7.3). Die erstellten Proteine zeigten nach stabiler Transformation *in-vivo* eine zytoplasmatische Lokalisation (Abb. 10 bis 12 und 14). Lediglich AtAnx1-GFP (genomische Sequenz mit Introns und Linker zwischen AtAnx1 und GFP) unter der Kontrolle des endogenen AtAnx1-Promotors (Abb. 13f) markiert in Wurzelhaaren ein scharf gezeichnetes Netzwerk, welches dem ER entsprechen könnte (s. u.; Kap. 4.1.1.2). Sonst waren keine erkennbaren Unterschiede zu einer zytosolischen Lokalisation zu beobachten. Dies zeigt, dass die Lokalisation von unfusioniertem GFP der Lokalisation der Fusionsproteine aus AtAnx1 und GFP



sehr ähnlich ist, mit dem Unterschied, dass der Zellkern durch die Fusionsproteine nicht markiert wird (Abb. 10; 11; 12e und 14d).

Bisher wurde eine Lokalisation von AtAnx1 an der Plasmamembran (Alexandersson et al. 2004), in Chloroplasten (Kleffmann et al. 2004), an Tonoplasten (Carter et al. 2004), in der Zellwand (Kwon et al. 2005) und an Mikrosomen (Lee et al. 2004) beschrieben. Eine eindeutige Lokalisation in der Zellwand, an Tonoplasten, in Chloroplasten oder an bzw. in Mikrosomen konnte in der vorliegenden Dissertation jedoch weder in stabil transformierten Pflanzen, noch in transient transformierten Zellen beobachtet werden (vergl. Abb 14). Es könnte sein, dass AtAnx1 nur zu einem sehr geringen Teil oder unter bestimmten Bedingungen wie beschriebenen lokalisiert. Weiterhin könnte GFP als Fusionsprotein eine Relokalisation von AtAnx1 verhindern. Jedoch wurden in der AS-Sequenz von AtAnx1 keine bekannten Lokalisierungssignale gefunden, weswegen ungeklärt ist, welche spezifischen Umstände zu den beschriebenen Lokalisierungen geführt haben könnten (Laohavisit und Davies 2011).

#### **4.1.1.2 Kolokalisation von AtAnx1 mit dem endoplasmatischen Retikulum**

Die Verwendung von GFP als Fusionspartner zur Untersuchung von AtAnx1 *in-vivo*, wurde bisher erst in einer Veröffentlichung beschrieben (Huh et al. 2010). In dieser Publikation berichten Huh und Mitarbeiter (2010), AtAnx1-GFP sei mit dem ER in *Arabidopsis*-Protoplasten kolokalisiert. Die Bilddaten sind jedoch keineswegs so eindeutig wie die Autoren behaupten, z. B. wenn man die Abb. 11c betrachtet, in welcher der AtAnx1-GFP Kanal alleine gezeigt wird. Deswegen wurde anhand des zytosolischen GFP's kontrolliert, ob markiertes ER (35S:DsRed-HDEL) eine Kolokalisation mit dem Zytosol zeigt. In dem Kontrollexperiment wurde eine partielle Kolokalisation von unfusioniertem, zytoplasmatischen GFP (Reichel et al. 1996) mit DsRed-HDEL beobachtet (Abb. 14). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Kolokalisation von AtAnx1-GFP mit dem ER-Marker 35S:DsRed-HDEL (Abb. 14) ist somit kein eindeutiger Nachweis für eine ER-Lokalisation von AtAnx1. Daher kann über eine mögliche Interaktion von AtAnx1 mit dem ER anhand der gewonnenen

Daten, anders als von Huh und Mitarbeiter (2006) suggeriert, keine eindeutige Aussage getroffen werden.

In der hier erstellten  $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$ -Linie konnte, im Gegensatz zur GFP-exprimierenden Pflanze, lediglich in Wurzelhaaren eine Lokalisation in einem scharf gezeichneten Netzwerk, ähnlich dem ER, gezeigt werden (vergl. Abb.13b bis d). Daher wäre es zwar möglich, dass AtAnx1 unter endogenen Bedingungen zumindest in speziellen Zelltypen im ER lokalisiert ist, jedoch bleibt offen, ob der von Huh und Mitarbeiter gezeigte Protoplast von einem Wurzelhaar stammt. Daher wurden weitere Experimente zur Bestimmung der Lokalisation von AtAnx1 durchgeführt.

#### 4.1.1.3 Expressionmuster des endogenen Promotors von AtAnx1

Um die endogene Verteilung von AtAnx1 in *Arabidopsis* zu untersuchen, wurde die genomische Sequenz von AtAnx1 unter der transkriptionellen Kontrolle des endogenen Promotors mit C-terminal fusioniertem GFP stabil in *Arabidopsis* transformiert (Klonierungsschema: Abb. 8). Im Zentralzylinder der Wurzel von Pflanzen, die das  $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$  Konstrukt tragen, ist ein schwaches GFP-Signal zu erkennen (Abb. 12). Auffällig ist außerdem, dass in der Wurzelspitze nur in den äußeren beiden Zellschichten eine Expression von AtAnx1-GFP zu beobachten ist (Abb. 12). In der äußeren Zellschicht ist das Protein stärker exprimiert, während in der darunterliegenden Zellschicht nur eine schwache Expression zu beobachten ist. In den noch weiter innen liegenden Zellschichten ist keine Expression zu erkennen. Das durch den in der vorliegenden Arbeit klonierten, endogenen Promotor erhaltene Expressionmuster wurde ebenfalls von Clark und Mitarbeiter anhand einer *in-situ*-Hybridisierung beobachtet (Clark et al. 2001). Dies zeigt, dass der gewählte Sequenzabschnitt (2518 bp vor dem Startcodon des AtAnx1 Gens) wahrscheinlich den funktionalen Promotor  $\text{AtAnx1}$  enthält.

#### 4.1.1.4 Physiologische Effekte der GFP-link-AtAnx1 Überexpression

Die Überexpression von endogenen Proteinen kann zu phänotypischen Ausprägungen führen. Hier wurde untersucht ob die Überexpression von AtAnx1 Auswirkung auf das Erscheinungsbild von *A. thaliana* haben kann. Dazu wurden neben dem schon vorhandenen Konstrukt 35S:GFP-AtAnx1 (Richter 2008) die Konstrukte 35S:GFP-link-AtAnx1 und  $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$  stabil in *Arabidopsis* transformiert. Dabei zeigten die mit AtAnx1 stabil transformierten Pflanzen 35S:GFP-AtAnx1 und  $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$ , genau wie die bereits im Labor vorhandene Knockoutmutante *Atanx1-1*, keine phänotypischen Ausprägungen unter Kontrollbedingungen.

Hingegen zeigte das mit einem Linker zwischen GFP und dem Annexin Leseraster versehene Konstrukt einen kleinwüchsigen Phänotyp (Abb. 15) und eine stärkere Grünfärbung der Blätter im Vergleich zum WT. Möglich wäre als Ursache eine Anhäufung von Chloroplasten oder Chlorophyll in den Blättern der transformierten Pflanzen oder eine verändertes Verhältnis von Chlorophyll zu Carotin (Lightbourn et al. 2008; Gomez-Garcia Mdel und Ochoa-Alejo 2013). Denkbar wäre ebenso, dass die Calciumregulation in diesen Pflanzen defekt ist, was eine gedrungene Wuchsform bedingen könnte (Tang et al. 2012).

Trotz einer vergleichbaren Lokalisation des GFP-link-AtAnx1 Proteins zu der des GFP-AtAnx1 (Abb. 11), könnte die Ursache zum einen in der leicht veränderten Größe des Proteins und der damit verbunden Beweglichkeit des GFP's liegen. Zum anderen könnte der verwendete Linker (GGATCCACTAAAAGTAGAAGAAAA) eine mögliche Ursache für den beobachteten Phänotyp darstellen, da dieser natürlicherweise nicht an das Protein gekoppelt ist. Die Sequenz des Linkers kodiert jedoch für keine bekannte Domäne, was eine unspezifische Interaktion sehr unwahrscheinlich macht.

Drittens wäre denkbar, dass bei der Transformation durch die zufällige Insertion des Fremdgens das Leseraster von einem für das Wachstum wichtigen Protein zerstört wurde, was allerdings aufgrund der unglaublich hohen Zahl von Möglichkeiten schwer nachzuweisen wäre.

Um mehr Informationen über die Ursache des Wachstumsdefekts zu erhalten, könnte z. B. überprüft werden an welcher Stelle im Genom die transformierte

artifizielle DNS genau inseriert wurde und ob an dieser Stelle ein wichtiges Wachstumsgen ausgeschaltet wurde. Weiterhin könnte die stabile Transformation wiederholt werden. Wenn die inserierte DNS zufälligerweise ein Wachstumsgen ausgeschaltet haben sollte, so dürfte der beobachtete Phänotyp dann mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nicht mehr auftreten.

## **4.1.2 Lokalisation und Funktion des AtAnx2-GFP Fusionsproteins**

### **4.1.2.1 Lokalisation von AtAnx2-GFP unter Kontrollbedingungen**

Die subzelluläre Lokalisation von AtAnx2 wurde bisher in drei verschiedenen Veröffentlichungen untersucht (Clark et al. 2005a; Clark et al. 2005b; Tan et al. 2011). Die Lokalisation des von Tan und Mitarbeitern (2011) erstellten Fusionsproteins unter Kontrolle des putativen Promotors<sub>AtAnx2</sub> ist zytoplasmatisch, ebenso wie die des hier erstellten AtAnx2-GFP unter Kontrolle des 35S-Promotors (Abb. 16). In der Arbeit von Clark und Mitarbeitern (2005a und b) an *Arabidopsis* wurde die Lokalisation von AtAnx2 mit Hilfe von Immunfluoreszenz gezeigt. Das Ergebnis war identisch, da auch hier diese Annexin Isoform hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert war. Das unterstützt die in der vorliegenden Arbeit gemachte Beobachtung, dass AtAnx2-GFP in der stabil transformierten Pflanze in allen Zellen im Zytoplasma lokalisiert ist (Abb. 16).

Zusätzlich soll AtAnx2 allerdings, genau wie AtAnx1, in der Zellwand lokalisiert sein (Kwon et al. 2005). Da für AtAnx2 wie für AtAnx1 (s. o.) kein Exportsignalpeptid bekannt ist (Laohavisit und Davies 2011) und eine extrazelluläre Lokalisation in der für diese Arbeit erstellten Überexpressionspflanze (35S:AtAnx2-GFP) nicht bestätigt werden konnte (Abb. 16 und 18), ist die Sekretion von AtAnx2 in den extrazellulären Raum in unbehandelten Pflanzen unwahrscheinlich.

Der bereits erwähnte endogene Promotor<sub>AtAnx2</sub> zeigte nach Stimulation durch Hypergravitation, im Vergleich zu unbehandelten Wurzelspitzen, eine erhöhte Aktivität in den mittleren Zellen der Wurzelhaube (Abb. 3) (Tan et al. 2011). Die in dem Versuch von Tan und Mitarbeiter (2011) beobachtete Anhäufung von

AtAnx2-GFP in den mittleren Zellen der 2. und 3. Wurzelhaubenschicht konnte in der vorliegenden Dissertation bei der erstellten Überexpressionslinie nicht beobachtet werden (Abb. 18). Da in der vorliegenden Arbeit lediglich ein anderer Promotor verwendet wurde, scheint der Einfluss des endogenen Promotors eine entscheidende Rolle bei der von Tan und Mitarbeiter beobachteten Reaktion nach Gravitationsstimulus zu spielen. Um dies detaillierter zu untersuchen, könnte versucht werden die Verteilung von AtAnx2 nach Gravitationsstimulus mit Hilfe von Immunozytochemischen Verfahren zu visualisieren.

#### **4.1.2.2 Relokalisation von AtAnx2 nach Lageveränderung**

Clark und Mitarbeiter (2005b) konnten zeigen, dass der Vektor der Gravitationseinwirkung einen Einfluss auf die Expression und intrazelluläre Lokalisation von AtAnx2 hat. Nach einer Lageveränderung um 90° ergab sich eine Umlagerung von AtAnx2 im Hypokotyl aus dem Zytoplasma an die dem Gravitationsvektor zugewandten Plasmamembranen der äußeren Zellen. In der Wurzelspitze wurde hingegen keine Umlagerung beschrieben.

Diese Beobachtung, die auf Immunfluoreszenz-Daten beruht, kann mit der GFP-Fusionstechnik nicht in dieser Weise bestätigt werden. Hier ist es vielmehr genau umgekehrt. Nach Lageveränderung von AtAnx2-GFP überexprimierenden Pflanzen wurde in Zellen der Wurzelhaube das fluoreszierende AtAnx2-GFP vom Zytoplasma in vesikuläre bzw. granuläre Strukturen umgelagert, während die Lokalisation im Hypokotyl zytoplasmatisch blieb. Dieser Unterschied könnte anhand von Modifikationen erklärt werden, wenn diese zwar an das endogene AtAnx2, jedoch nicht an das durch die CDS kodierte AtAnx2 angefügt werden können. Somit wäre die Umlagerung von AtAnx2 im Hypokotyl, welche für AtAnx2-GFP nicht beobachtet werden konnte, methodisch bedingt. Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte Markierung vesikulärer Strukturen in der Wurzelhaube (Abb. 17) könnte hingegen durch die induzierte Überexpression von AtAnx2-GFP bedingt sein. Das anhand der Immunfluoreszenz erhaltene Signal (Clark et al. 2005b) wäre in diesem Fall zu schwach, um die hier markierten Strukturen (Abb. 17) zu visualisieren. Denkbar wäre ebenso, dass anhand der von Clark und Mitarbeiter (2005b)

durchgeführten Fixierung der Wurzel (Formaldehyd; Phosphat-Puffer) AtAnx2 nach der Fixierung keine Markierung der in der vorliegenden Dissertation visualisierten Strukturen (Abb. 17) mehr zeigt.

Möglicherweise ist AtAnx2 also bei der Reaktion auf Gravitationsreize beteiligt. Im Detail könnte AtAnx2 an die markierten immobilen Strukturen binden und an der Oberfläche in der Signalkaskade beteiligt sein, die zur Krümmung der Wurzel führt. Eine Beteiligung von AtAnx2 bei der Antwort auf Gravitationsreize wurde auch von Clark und Mitarbeiter postuliert, da das endogene AtAnx2 besonders in Geweben exprimiert wird, die zu asymmetrischem Wachstum befähigt sind (2005b). Wie genau AtAnx2 hier wirkt konnte jedoch nicht geklärt werden, da weder der Vorgang der Wurzelkrümmung im Detail verstanden ist (Baldwin et al. 2005; Perrin et al. 2005) noch Bindungspartner von AtAnx2 bekannt sind. Möglich wäre allerdings auch, dass AtAnx2 an den gebundenen Strukturen Ionenkanäle öffnet oder, dass AtAnx2 hier mit Proteinen die bei der Krümmungsreaktion beteiligt sind interagiert.

#### **4.1.3 Lokalisation und Funktion des Fusionsproteins AtAnx3-GFP**

AtAnx3 ist von den ersten vier Annexinen in Arabidopsis bisher am wenigsten untersucht worden. So existieren für Annexin3 weder veröffentlichte GFP-Fusionskonstrukte noch Promoter-GUS-Linien. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit Annexin3 unter der Kontrolle des 35S-Promotor transient in Tabak und stabil in *Arabidopsis* transformiert. Während die transiente Expression von AtAnx3 in Tabakblattepidermiszellen zu einem starken GFP-Signal führte, wurde das Protein nach stabiler Transformation in *Arabidopsis* nur schwach exprimiert. Aufgrund der schwachen Expression in den erstellten stabil transformierten *Arabidopsis* Linien war eine Untersuchung der AtAnx3-GFP Lokalisation unter Stressbedingungen nicht möglich. Eine schwache Expression eines stabil transformierten Konstruktes ist trotz eines konstitutiven Promotors denkbar und ist wahrscheinlich auf die Integration des Konstruktes in eine inaktive Region der DNA zurückzuführen (Benoit et al. 2013).

Trotz der mitunter sehr schwachen Expression von Annexin3 konnte gezeigt

werden, dass die zelluläre Lokalisation von AtAnx3-GFP, fast genau der Lokalisation der ersten beiden Annexine (AtAnx1 und AtAnx2) entspricht (Abb. 19). AtAnx3 zeigte in Tabak und in *Arabidopsis* eine Markierung des Zytoplasmas mit dem Zusatz, dass der Zellkern durch AtAnx3-GFP markiert wird (Abb. 19). Da AtAnx3-GFP zu groß ist (63 kDa) um auf passivem Wege in den Kern zu gelangen (Goryaynov et al. 2012), muss hier ein aktiver Transport vorliegen. Ursächlich für die Kernlokalisation könnte eine von Clark und Mitarbeiter (2001) beschriebene Kernlokalisationssequenz in AtAnx3 sein. Die Kernlokalisationssequenz besteht aus 6 AS (KEKKKK) und reicht von AS 38 bis AS 41. AtAnx3 könnte im Nukleus an die DNS binden, was schon für tierisches Annexin beschrieben wurde (Boyko et al. 1994) oder andere DNS-bindende Proteine beeinflussen. Welche Funktionen pflanzliche Annexine im Zellkern genau ausüben ist allerdings noch nicht beschrieben und kann möglicherweise nur über die Identifikation von Bindungspartnern genauer beschrieben werden.

#### **4.1.4 Lokalisation und Funktion des Fusionsproteins GFP-AtAnx4**

AtAnx4 wurde in der Vergangenheit mit Hilfe unterschiedlicher Methoden untersucht (Lee et al. 2004; Kiba et al. 2005; Cantero et al. 2006; Huh et al. 2010), allerdings gibt es nur eine Untersuchung, die sich mit der in-vivo Lokalisation dieser Annexin-Isoform befasst (Huh et al. 2010). In dieser Arbeit wurde das Konstrukt 35S:AtAnx4-GFP in Wurzelprotoplasten transformiert und mit einem ER-Marker koexprimiert (s. u. Kap. 4.1.4.3).

Um die zelluläre Lokalisation von AtAnx4 zu untersuchen und mögliche Funktionen in stabil transformierten *Arabidopsis* abzuleiten, wurde auch AtAnx4 als Fusionskonstrukt mit GFP kloniert. In den meisten Zellen zeigte GFP-AtAnx4 in der vorliegenden Arbeit eine Lokalisation an fadenförmigen Strukturen, deren Zuordnung zu den bekannten Intrazellulären Strukturen nicht ohne weiteres möglich ist. Es handelt sich um eine bisher nicht beschriebene, intrazelluläre Struktur.

Grundsätzlich zeigten die von GFP-AtAnx4 markierten Strukturen abhängig vom beobachteten Gewebe unterschiedliche Erscheinungsformen. Die markierten



Filamente hatten eine Dicke zwischen 0,1 und 2  $\mu\text{m}$ , waren bis zu 50  $\mu\text{m}$  lang und leicht geschwungen, gelegentlich schlaufenförmig oder aber miteinander zu einem Netzwerk verbunden (Abb. 21). In manchen Geweben hatten sie die Form von kurzen Stäbchen oder Punkten, was auf eine hohe Flexibilität der beobachteten Strukturen hindeutet.

Sie bewegten sich teils frei im Zytoplasma, waren jedoch auch an Zellorganellen bzw. Zellkompartimente gebunden (Abb. 21, 26, 27). Die markierten Filamente waren an den Seiten und Enden teilweise in filigrane Substrukturen aufgespalten. Zusätzlich wurde beobachtet, dass einzelne Fäden an den Enden miteinander verschmelzen konnten und anschließend als verlängerter Strang in der Zelle vorlagen (Abb. 22). Es wäre möglich, dass die stärkeren Filamente aus vielen miteinander verbundenen filigraneren Fäden zusammengesetzt sind, welche verschmelzen oder sich zu Netzwerken zusammenlagern können.

Die durch GFP-AtAnx4 markierten Filamente könnten sowohl lineare Polymere als auch Aggregate sein, welche mit dem Endomembransystem interagieren. Es ist bekannt, dass AtAnx4 Dimerisieren kann (Huh et al. 2010). Ob es jedoch genau wie Annexin1 aus *Gossypium* (GhAnn1) polymerisieren kann, ist noch ungeklärt. Dieses Anextin zeigt *in-vitro* eine Kettenform, die an Membranen polymerisiert (Dabitz et al. 2005). Ob GhAnx1 zuerst polymerisiert ist oder zuerst an die Membranoberfläche gebunden hatte, konnte von Dabitz und Mitarbeiter (2005) anhand der erstellten Elektronenmikroskopbilder nicht geklärt werden. Zumindest ist anhand der erhobenen Daten wahrscheinlich, dass die Fähigkeit von His<sub>4</sub>-GhAnx1 in dem gezeigten Maße zu polymememrisieren (Abb. 2), dem endogenen Protein ebenfalls gegeben ist.

Möglicherweise ist also das exprimierte Fusionsprotein GFP-AtAnx4 in der vorliegenden Arbeit für die Bildung der neuartigen Strukturen verantwortlich. Entweder könnte dieses direkt oder indirekt involviert sein, in dem es z. B. andere Proteine zu der Bildung der beobachteten Strukturen befähigt oder die beobachteten Strukturen zeigen sich endogen nur bei starker Expression von AtAnx4 und sind deswegen bei normaler Expression nur selten zu beobachten. Um zu untersuchen, unter welchen Bedingungen sich endogen die beobachteten Strukturen zeigen, wäre es z. B. möglich AtAnx4 in Wildtyppflanzen mit Hilfe von Immunofluoreszenz zu visualisieren.

#### 4.1.4.1 N-Terminus AtAnx4

Die Fähigkeit von GFP-AtAnx4, filamentöse Strukturen aufzubauen, bzw. mit dem Endomembransystem so zu interagieren, dass Filamente und Netzwerke entstehen können, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht im N-Terminus von AtAnx4. Dieser wurde in der vorliegenden Arbeit an GFP fusioniert und liegt rein zytoplasmatisch vor (Abb. 20). Das Klonieren des Konstruktes 35S:GFP-AtAnx4<sub>CT</sub> (GFP an den C-Terminus von AtAnx4 kloniert), war im Gegensatz zu der Klonierung des Konstruktes 35S:GFP-AtAnx4<sub>NT</sub> nicht erfolgreich. Daher kann zu dem Einfluss des C-Terminus auf die Lokalisation von AtAnx4 keine Aussage getroffen werden.

#### 4.1.4.2 Kolokalisation von AtAnx4 mit Chloroplasten

Unter Kontrollbedingungen konnte in den Blätter der 35S:GFP-AtAnx4-Linie eine räumliche Nähe des Fusionsproteins zu Chloroplasten beobachtet werden. Die Chloroplasten waren dabei von den durch GFP-AtAnx4 markierten Strukturen umschlossen (Abb. 21) oder bewegten sich sogar an diesen entlang. Ein weiterer Hinweis, dass AtAnx4-Strukturen zumindest indirekt an Chloroplasten binden, konnte nach einer Behandlung mit Glycerin beobachtet werden. Glycerin ist zu 5 % in dem in der vorliegenden Arbeit (Abb. 25) verwendeten Aktin-Puffer für die Färbung mit TRITC-Phalloidin enthalten. Dieser wurde zur Permeabilisierung der Plasmamembran für TRITC-Phalloidin verwendet. Nach der Inkubation in Aktin-Puffer konnte eine Fragmentierung der langen Filamente in kurze, teilweise nur punktförmige Strukturen beobachtet werden (Abb. 25). Dieser Effekt konnte auf das enthaltene Glycerin zurückgeführt werden. Ob Glycerin direkt auf AtAnx4 wirkt oder nur indirekt, konnte hier nicht näher untersucht werden.

Bereits bekannt ist, dass in Rinderspermazellen zwei besonders wichtige Effekte identifiziert wurden: Erstens permeabilisiert Glycerin die Plasmamembran und induziert zweitens eine Veränderung des Aktinzytoskeletts (teilweise depolymerisierend) (Macias Garcia et al. 2012). Der zweite Effekt könnte jedoch auch eine Folge des ersten Effekts darstellen, denn sollten durch die permeabilisierte Membran unkontrolliert Calciumionen in die Zelle einströmen, könnte Gelsolin aktiviert werden, welches anschließend

Aktinfilamente in der Zelle abbaut. Da für GFP-AtAnx4 eine partielle Kolokalisation mit dem Aktinzytoskelett gezeigt werden konnte (Abb. 29), könnte sich Glycerin also entweder direkt oder indirekt durch einen der von Glycerin induzierten Effekte auf GFP-AtAnx4-Strukturen auswirken. So könnte sich die Depolymerisierung des Aktinzytoskeletts auf die Organisation auswirken. Möglich wäre aber ebenso, dass AtAnx4 über kleinere Membrankompartimente und das daran gebundene Myosin mit dem Aktinzytoskelett verknüpft ist und Glycerin das Membranpotential dieser Organellen so beeinflusst, dass die von AtAnx4 markierten Strukturen zerfallen. Bei der Kolokalisation von GFP-AtAnx4 mit Chloroplasten unter der Einwirkung von Glycerin konnte beobachtet werden, dass die Fragmente der Annexin4-Filamente oft zwischen Chloroplasten lokalisiert waren (Abb. 25). Dies spricht für eine hohe Affinität, selbst der kleinen Fragmente, zur Oberfläche der Plastiden. GFP-AtAnx4-Strukturen liegen in allen oberirdischen Geweben der transformierten Pflanze in räumlicher Nähe zu Chloroplasten. Wenn AtAnx4 direkt an die Chloroplastenmembran bindet, wie von Dabitz und Mitarbeiter (2005) im Fall von GhAnx1 für artifizielle Membranen gezeigt, könnte diese Bindung möglicherweise über bestimmte Membrandomänen vermittelt werden.

#### **4.1.4.3 Kolokalisation von AtAnx4 mit dem ER**

Das endoplasmatische Retikulum (ER) in Pflanzen ist normalerweise netzartig aufgebaut (Abb. 30b), kann aber auch kleinere stäbchenförmige Strukturen so genannte ER-bodies bilden (Yamada et al. 2009). Da GFP-AtAnx4 filamentartige Strukturen markiert, welche durchaus Ähnlichkeit zu der Morphologie der bekannten ER-Strukturen besitzen, wurde in der Vorliegenden Arbeit das ER und AtAnx4-Filamente auf eine Kolokalisation überprüft. Zudem wurde von Huh und Mitarbeiter (2010) anhand eines Versuchs in Wurzelprotoplasten eine Verbindung postuliert. Da das markierte ER jedoch keine netzartige Struktur zeigte, wie das ER von unbehandelten Wurzelzellen oder Blatterpidermiszellen in unbehandelten Pflanzenzellen, wurde dieser Versuch in der vorliegenden Arbeit ergänzt. Bei der transienten Koexpression von GFP-AtAnx4 mit dem ER-Marker DsRed-HDEL in Tabakblatterpidermiszellen wurde beobachtet, dass die sonst fadenförmigen (Abb. 21)

GFP-AtAnx4-Strukturen stark akkumulierten (Abb 30). Weshalb die fadenförmigen Strukturen sich nicht mehr wie in Abbildung 29 entfalten konnten, ist unklar. Würde durch die Überexpression von DsRed-HDEL jedoch eine „unfolded protein response“ (UPR) ausgelöst (Moreno und Orellana 2011), könnte die anschließende Stressreaktion eine Veränderung der GFP-AtAnx4 markierten Strukturen bedingen. Eine spezifische Bindung von GFP-AtAnx4 an das ER ist zumindest in transient transformierten Tabakepidermiszellen anhand der hier vorgestellten Abbildungen nicht offensichtlich.

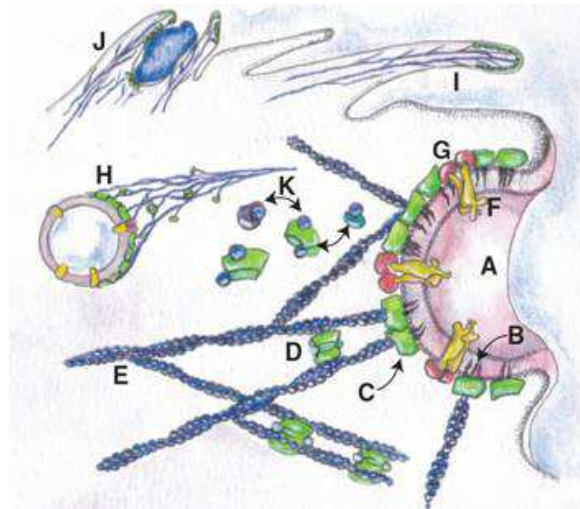
Diese Schlussfolgerung steht im Gegensatz zu den von Huh und Mitarbeiter (2010) in *Arabidopsis*-Protoplasten gemachten Beobachtungen, die eine komplette Überlagerung von AtAnx4-GFP mit dem markierten ER beschreiben. Huh und Mitarbeiter (2010) transformierten dafür Protoplasten mit AtAnx4-GFP und einem ER-Marker (Bip-RFP). Ursächlich für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass das von Huh und Mitarbeiter (2010) erstellte Protein AtAnx4-GFP in Protoplasten andere Strukturen markiert, als das für die vorliegende Arbeit erstellte GFP-AtAnx4 in transient transformierten Tabakblättern (Abb. 30). Die von Huh und Mitarbeiter (2010) verwendeten Protoplasten wären in diesem Fall nur eingeschränkt mit unbehandelten Zellen im Zellverbund zu vergleichen, da sich das Fehlen der Zellwand auf die Genexpression auswirken kann (Wojtaszek 2000). Eine weitere Möglichkeit für die Unterschiede zwischen den vorliegenden Ergebnissen und denen von Huh und Mitarbeiter (2010) könnte in der Art des verwendeten Fusionskonstrukts liegen. Von Huh und Mitarbeiter wurde GFP an den C-Terminus von AtAnx4 fusioniert, während in der vorliegenden Arbeit GFP an den N-Terminus von AtAnx4 fusioniert wurde (Abb. 8). Auch beim ER-Fusionsreporter gibt es Unterschiede. Während in der vorliegenden Arbeit DsRed-HDEL verwendet wurde, war es bei Huh und Mitarbeiter (2010) Bip-RFP. Obwohl die Wahl des Reporters Auswirkungen auf die Lokalisation von Annexin4 haben kann, scheint hier eher die Wahl des Untersuchungsobjektes ausschlaggebend. So zeigte weder AtAnx4-GFP noch Bip-RFP im Protoplasten klar abgegrenzte Strukturen. Im Gegensatz dazu konnten durch GFP-AtAnx4 und DsRed-HDEL in Tabakepidermiszellen klar definierte Strukturen visualisiert werden, was auf einen nicht unerheblichen Einfluss des verwendeten Konstruktes schließen lässt. Um diesen Sachverhalt weiter zu differenzieren, könnte untersucht

werden, ob AtAnx4-GFP zusammen mit ER anhand eines Dichtegradientens aufgereinigt werden kann.

#### **4.1.4.4 Kolokalisation von AtAnx4 mit Aktin und aktinabhängige Bewegung**

In Pflanzen ist das Aktinzytoskelett notwendig für die gerichtete Bewegung von Organellen. Diese wird durch Myosine vollzogen, welche entlang des Aktinzytoskeletts laufen. Um diese klar definierten Elemente des zellulären Transports der Pflanze herum gibt es eine Vielzahl an Komponenten, die sehr definiert interagieren und so eine große Palette an Reaktionsmöglichkeiten darstellen. Daher ist es von Bedeutung möglichst viele der Interaktionspartner und deren Funktion innerhalb des Netzwerks zu bestimmen. Da AtAnx4 im Zentralzylinder der Wurzel bewegliche, filamentöse Strukturen markiert, liegt die Vermutung nah, dass diese Strukturen mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind. Daher wurde GFP-AtAnx4 zusammen mit einem Aktinmarker exprimiert, bzw. zusammen mit TRITC-Phalloidin verwendet.

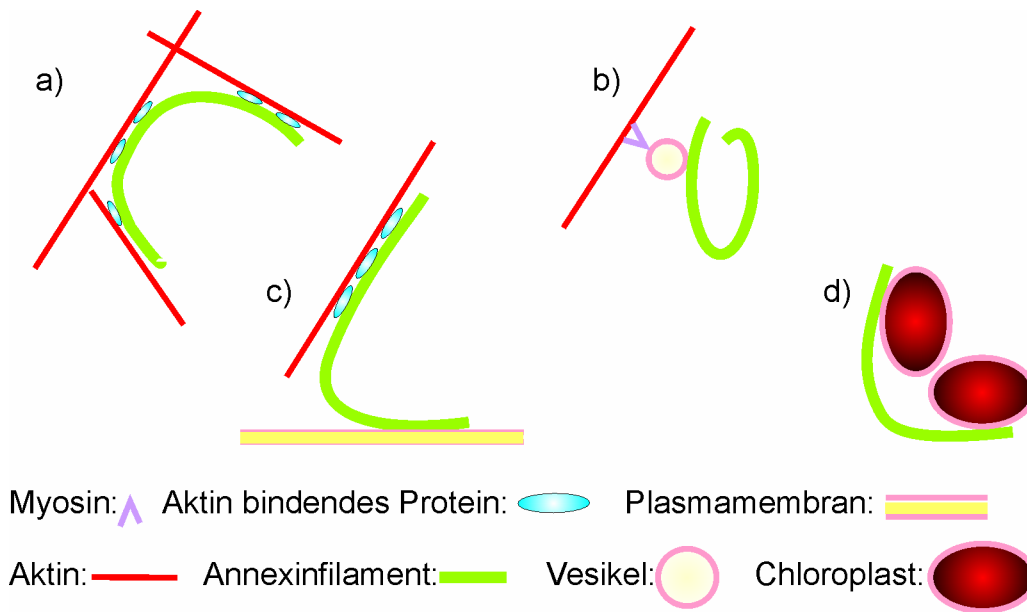
Nach gemeinsamer transients Expression von DsRed-ABD2 und dem GFP-fusionierten AtAnx4 in Tabak, konnte eine partielle Kolokalisation der Fusionsproteine beobachtet werden. Viele der von GFP-AtAnx4 markierten Fäden kolokalisierten aber nur zum Teil oder lagen lediglich in räumlicher Nähe zu markierten Aktinfilamenten (Abb. 29), während andere Teilstücke frei im Zytoplasma beweglich waren. Zusätzlich zu der Kolokalisation in transient transformierten Tabakblättern wurde eine partielle Kolokalisation in stabil transformierten, mit TRITC-Phalloidin gefärbten 35S:GFP-AtAnx4 Pflanzen deutlich (Abb. 28). Da angefärbte, beziehungsweise markierte Aktinfilamente und AtAnx4-Strukturen nur teilweise kolokolalisieren, wäre möglich, dass AtAnx4 anders als tierische Annexine (z. B. Annexin2; Abb. 40) nicht direkt an Aktin bindet, sondern lediglich mit speziellen Aktin bindenden Proteinen oder Strukturen interagiert (Schema: Abb 41).



**Abbildung 40: Mögliche Interaktionen von tierischen Annexinen mit Aktin.**

Modifikationen des Aktinzytoskeletts bezogen auf Endozytose, Vesikeltransport und Motilität. A: Entstehendes Endosom. B: Phosphatidylinositol 4,5 bisphosphat. C: Annexinmonomer an Aktin gebunden. D: Aktin organisierendes Annexindimer. E: Aktinfilament. F: Verknüpfung intrazellulärer mit extrazellulären Rezeptoren. G: G-Protein. H: Motiles Makropinosom. I: Mit dynamischen, aktinreichen Filopodien verknüpftes Annexin. J: Annexin an einer Membran und aktinreichen Phagosom. K: Annexin als Aktinmonomer-Bindeprotein. Hayes et al. 2004

Um die Verbindung mit dem Aktinzytoskelett präziser untersuchen zu können, wurden GFP-AtAnx4 exprimierende Pflanzen mit Latrunculin B behandelt. Aktin wird durch eine Latrunculin B-Behandlung depolymerisiert, was zu einer Hemmung des an Aktin entlang laufenden myosinabhängigen Transports führt (Kaufman 2008). In der GFP-AtAnx4 Überexpressionslinie wurde durch die Behandlung mit Latrunculin B eine Hemmung der gerichteten Bewegung der markierten Strukturen induziert. Dies deutet auf eine Interaktion mit dem Aktin-Myosinsystem hin (Abb. 27), da die beobachtete Motilität von GFP-AtAnx4-markierten Strukturen sonst nicht durch eine Latrunculin B-Behandlung gestoppt werden würde. Wie AtAnx4 allerdings auf molekularer Ebene mit dem Aktin-Myosinsystem interagiert, muss noch geklärt werden. Mögliche Funktionen der GFP-AtAnx4-Strukturen könnten nach den hier gemachten Beobachtungen die Verbindung von Aktinfilamenten zu diversen Organellen sein oder das Stabilisieren bzw. das Ermöglichen von Aktin-Membran oder Membran-Membran Interaktionen. So könnten AtAnx4-Strukturen auch das Clustern von Chloroplasten oder anderen Organellen begünstigen (siehe Kap. 4.1.4.2).



**Abbildung 41: Mögliche Funktionen von AtAnx4.**

AtAnx4-Filamente Verknüpfen Membranen und Aktin. **a)** AtAnx4-Filamente binden über Aktinbindende Proteine an Aktinfilamente und stabilisieren so das Aktinnetzwerk. **b)** AtAnx4 bindet an Vesikel, welche wiederum über Myosine an Aktin entlanglaufen. **c)** AtAnx4 bringt Aktinfilamente in die Nähe der Plasmamembran. **d)** Chloroplasten lagern sich mit Hilfe einer Annexin-Lipidbindung zusammen.

#### 4.1.4.5 Kolokalisation von AtAnx4 mit anderen Organellen und Mikrotubuli

Da GFP-AtAnx4-Strukturen im Hypokotyl in der Nähe von Chloroplasten lokalisiert waren, wurde überprüft, ob im Wurzelgewebe eventuell andere Organellen in räumlicher Nähe zu GFP-AtAnx4 markierten Strukturen zu beobachten waren. Zu diesem Zweck wurden, wie bereits für AtAnx1 beschrieben (Kap. 4.1.1.1), durch BFA Behandlung BFA-Kompartimente erzeugt und diese mit Hilfe von FM4-64 angefärbt. Zwischen den BFA-Kompartimenten und den Annexinsträngen war nach der Behandlung eine räumliche Nähe zu erkennen, aber keine Kolokalisation (Abb. 24). Etwas anders verhalten sich GFP-AtAnx4 gefärbte Strukturen zu Mitochondrien. Die angefärbten Mitochondrien kolokalisierten nur selten mit den AtAnx4 markierten Strukturen (Abb. 23). Wahrscheinlich sind die durch GFP-AtAnx4 markierten Strukturen höchstens teilweise oder nur unter speziellen Bedingungen in der Lage, an die Oberfläche von Mitochondrien oder BFA-sensitiven Vesikelpopulationen zu binden.



Da GFP-AtAnx4 sich in räumlicher Nähe zu BFA-Kompartimenten (Abb. 24) und der Plasmamembran befindet (Abb. 26) und mit Aktin kolokalisiert (Abb. 29), wäre es also denkbar, dass AtAnx4 an Vesikel oder Organellen bindet und diese entweder mit dem Aktinzytoskelett oder der Plasmamembran in räumliche Nähe bringt.

Um zu überprüfen, welche Art von Vesikeln an AtAnx4 binden, könnte man unter anderem GFP-AtAnx4-Strukturen zusammen mit spezifischen Vesikelreporterkonstrukten transient in Blattepidermiszellen transformieren.

## **4.1.5 Trockenstressbehandlungen Annexin Überexpressionslinien**

### **4.1.5.1 Relokalisation von AtAnx1 und AtAnx2 nach Trockenstress-Behandlung**

Sessile Landpflanzen haben in Stresssituationen ausschließlich die Möglichkeit sich über die Regulation von chemischen Prozessen an veränderte Umweltbedingungen anzupassen, daher haben sich in Pflanzen sehr effektive und differenzierte Möglichkeiten entwickelt, um auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren. So löst z. B. Trockenstress bei Wassermangel eine Vielzahl von Reaktionen innerhalb der Pflanze aus (Fujii und Zhu 2012; Budak et al. 2013). Da es Untersuchungen auf RNA-Ebene gibt, welche eine Beteiligung von Annexinen an dieser Reaktion nahelegen (Cantero et al. 2006), wurde versucht anhand von Relokalisationen der erstellten Reporterproteine nach appliziertem Stress, Aussagen über mögliche Funktionen der jeweiligen Annexine abzuleiten. Die Lufttrocknung wurde von Cantero und Mitarbeiter (2006) an 7 Tage alten Arabidopsiskeimlingen für 2 h unter der Sterilbank durchgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit erstellten und stabil transformierten Reporterproteine (GFP-AtAnx1; AtAnx2-GFP und GFP-AtAnx4) zeigten in Arabidopsisblättern nach Lufttrocknung über 2 h keine Umlagerung auf zellulärer Ebene. Wahrscheinlich wird bei der Lufttrocknung für 2 h lediglich die Expressionsstärke der einzelnen Annexine und nicht deren Lokalisation reguliert. Dabei scheinen die Zellen der Blattepidermis nach 2 h so beschädigt

zu sein, dass die untersuchten GFP-Annexinfusionsproteine zu keiner differenzierten Reaktion mehr in der Lage waren. Daher wurde untersucht, ob eine kürzere Behandlungszeit eine Umlagerung der Fusionsproteine bewirkt oder andere Gewebe auf Trockenstress reagieren. Bei der genaueren Betrachtung wurde beobachtet, dass Wurzelspitzen in der Sterilbank sich makroskopisch erkennbar schon nach wenigen Sekunden verformen. Deshalb wurden diese in weiteren Experimenten detaillierter untersucht. Die Lufttrocknung in der Sterilbank wurde hier gewählt, um möglichst kontrollierte Bedingungen herzustellen.

Bei längeren Trocknungszeiten mit anschließender Rehydrierung sind nur noch undefinierte Strukturen in der Wurzelspitze zu erkennen, was auf einen besonders starken Stress bei Trocknungszeiten über 30s hindeutet. Um zu untersuchen wie stark der Wasserentzug in den behandelten Wurzelspitzen ist, wurden diese zusätzlich in Parafinöl mikroskopiert. Hier wurde nach einer kurzen Lufttrocknungsphase (30s) eine starke Verformung der Zellen und makroskopisch sowie mikroskopisch der gesamten Wurzelspitze beobachtet (Abb. 31). Anhand der ausgeprägten Verformung nach Lufttrocknung kann man somit auf einen starken Wasserentzug schließen. Eine Umlagerung der Fusionskonstrukte konnte unter diesen Versuchsbedingungen nicht beobachtet werden. Entweder reagieren Annexine nicht auf den starken Wasserentzug oder sie sind aktiv, aber nicht membrangebunden. Wurzeln die für 2 h in Parafinöl lagerten, zeigten keine Veränderungen in ihrer Morphologie (Abb. 31). Daher ist der Effekt des verwendeten Parafinöl auf die beobachtete Verformung der Zellen und der Wurzelspitze, wenn überhaupt vorhanden, eher als gering einzuschätzen.

Die Lufttrocknung unter der Sterilbank (30 s) von GFP-AtAnx1 und von AtAnx2-GFP überexprimierenden *Arabidopsis*-Keimlingen mit anschließender Rehydrierung zeigte allerdings eine Relokalisation von GFP-AtAnx1 und AtAnx2-GFP (35S-Promotor; Abb. 32). Nach der anschließenden Rehydrierung mit  $\frac{1}{2}$  MS-Medium wurden in der Wurzelspitze vesikuläre Strukturen und punktuell die Plasmamembran von den Fusionsproteinen markiert (Abb 32). Wahrscheinlich werden unter diesen Bedingungen die Membranbindedomänen der beiden Annexine aktiv. Die Behandlung der GFP exprimierenden Kontrollpflanze zeigte, dass unfusioniertes GFP immer noch gelöst im

Zytoplasma vorlag und in den Zellen der Wurzelspitze die großen Vakuolen in kleinere zerfallen waren (vergl. Abb. 12 d mit Abb. 32 b). Dies konnte für Schließzellen auch schon beobachtet werden (Gao et al. 2009). Wahrscheinlich ist der plötzliche Wasserinflux hierbei für die Umlagerung der Fusionsproteine ursächlich.

Denkbar wäre eine generelle Beteiligung von Annexinen an der Membranreparatur, wie es Schapire und Mitarbeiter für pflanzliche Annexine postuliert haben, nachdem diese Rolle bereits spezifisch für Annexin 1 in tierischen Zellen nachgewiesen worden war (McNeil et al. 2006; Schapire et al. 2009). Das tierische Annexin1 zeigte bereits nach wenigen Sekunden eine Relokalisation an eine Plasmamembranstelle mit induzierter Verwundung. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstützen diese Membranreparatur-These, da eine erhöhte Membranbindung als Antwort auf einen putativen Membranstress (besonders schneller Influx von Wasser nach Lufttrocknung mit anschließender Rehydrierung) gezeigt werden konnte (Abb. 32). Ein weiterer Hinweis, dass durch den Stress die Integrität von Membranen gestört sein könnte, ist das stark veränderte Erscheinungsbild von FM4-64-gefärbten Membranen nach Applikation des Stresses (Abb. 35 und 34). Die Geschwindigkeit der Umlagerung von tierischem Annexin1 wird laut McNeil (2006) über die Calciumkonzentration gesteuert. So könnte der Calciumlevel sprunghaft ansteigen, sobald Risse in der Membran entstehen und so Annexin1 an die beschädigten Membranen binden lassen. Eine ähnliche Verhaltensweise wäre ebenso für AtAnx1 denkbar, da auch Pflanzen Konzentrationsgradienten über Membranen aufbauen (Baluska und Mancuso 2013).

Um die markierten Vesikelpopulationen genauer zu untersuchen und so das Wirkungsspektrum von Annexinen zu präzisieren, wurde versucht die markierten Vesikel zusätzlich anzufärben. So wurden Wurzelspitzen von GFP-AtAnx1-Pflanzen vor dem Trockenstress z. B. mit BFA behandelt und gleichzeitig der Endozytosemarker FM4-64 hinzu gegeben. BFA hemmt Guanosin-Austauschfaktoren (Arf-GEFs) an mindestens zwei Stellen im sekretorischen Pfad (Ritzenthaler et al. 2002; Geldner et al. 2003). Als Folge dieser Hemmung bilden sich so genannte BFA-Kompartimente, in denen sich Endomembranelemente ansammeln (Takac et al. 2012). Sollten die von GFP-AtAnx1 und AtAnx2-GFP markierten Vesikel zu der BFA sensitiven

Vesikelpopulation zählen, so wären diese auch in größeren BFA-Kompartimenten zusammengelagert.

Nach der Behandlung mit BFA und der anschließenden Lufttrocknung mit Rehydrierung waren unter anderem große Organellen durch GFP-AtAnx1 bzw. AtAnx2-GFP markiert. Die Markierung der Plasmamembran durch GFP-AtAnx1 bzw. AtAnx2-GFP war unverändert diskontinuierlich, wie nach Lufttrocknung mit Rehydrierung ohne Zugabe von BFA. Die partielle Kolo-kalisation der beiden Fusionsproteine mit FM4-64 gefärbten BFA-Kompartimenten lässt darauf schließen, dass in gestressten Zellen unter anderem Endozytosevesikel durch die beiden Fusionsproteine gebunden werden (Abb. 26 und 37). Zusätzlich wurden sowohl BFA-Kompartimente als auch GFP-AtAnx1 gefärbte Vesikel beobachtet, die keine Kolo-kalisation zeigten. Deshalb ist davon auszugehen, dass GFP-AtAnx1 bzw. AtAnx2-GFP nur zu einem Teil an Endozytosevesikel binden (Abb. 35 und 36). Die Frage, welche Lipide oder Proteine an der beobachteten Bindung beteiligt sind, kann hier also nicht näher präzisiert werden. Jedoch scheint das Rehydrieren sowohl die Plasmamembran als auch Endozytosevesikel stark zu beschädigen.

Zusätzlich zu der mikroskopischen Betrachtung gestresster Wurzelspitzen wurde untersucht, ob die Überexpression der beiden Fusionsproteine GFP-AtAnx1 bzw. AtAnx2-GFP von physiologischer Bedeutung ist. Es konnte beobachtet werden, dass die Überexpression der beiden Fusionsproteine in *Arabidopsis*-Keimlingen diesen zusätzlich eine erhöhte Toleranz dem applizierten Stress gegenüber verleiht (Abb. 37). Daher liegt hier die Vermutung nahe, dass die Umlagerung von GFP-AtAnx1 / AtAnx2-GFP in der Wurzelspitze von physiologischer Bedeutung ist. Es wäre möglich, dass die Bindung der Annexine an die Plasmamembran und an Vesikel, diese bis zu einem gewissen Grad vor der Auswirkung der plötzlichen Rehydrierung schützen. Dadurch wäre die Pflanze nach der Wiederherstellung von Kontrollbedingungen (Rehydrierung) schneller wieder in der Lage, ihr Wachstum in normalem Umfang aufzunehmen. Auffällig ist, dass das plötzliche Rehydrieren einen viel stärkeren Einfluss auf die Lokalisation der Annexine hat, als die Lufttrocknung der Pflanze ohne anschließende Rehydrierung (vergl. Abb. 31 und 33). Der eigentliche Stimulus wäre in diesem Fall die plötzliche Rehydrierung der dehydrierten Wurzelspitzen.

Die Ursache für die gesteigerte Toleranz gegen Austrocknung könnte die Überexpression der Annexin-Konstrukte unter der Kontrolle des 35S-Promotors sein. Während die endogenen Promotoren von AtAnx1 (Abb. 12) und AtAnx2 (Tan et al. 2011) in den inneren Zellen der Wurzelspitze nicht aktiv sind, könnten die überexprimierten Fusionsproteine (GFP-AtAnx1 und AtAnx2-GFP) aufgrund der ektopischen Expression die für das Wurzelwachstum wichtigen Stammzellen des Apikalmeristems schützen und so zu einer schnelleren Regeneration führen. Somit wären die Wurzeln, wie in Abbildung 32 zu sehen, nach einer Lufttrocknung schneller wieder zu einem normalen Wachstum fähig. Diese Theorie muss jedoch durch weitere Versuche noch genauer präzisiert werden. Dazu wäre es möglicherweise sinnvoll, bekannte Proteine des Membranreparaturmechanismus auf eine Interaktion mit AtAnx1 hin zu untersuchen oder durch die Verwundung mit Hilfe von konzentrierten Laserstrahlen einen Membranreparaturvorgang zu initiieren, wie bereits durch McNeil (2006) an tierischen Zellen durchgeführt.

#### **4.1.5.2 Abscisinsäurebehandlung von 35S:GFP-AtAnx1-Pflanzen**

Anhand von verschiedenen Untersuchungen wurde in der Vergangenheit eine Verbindung des Abscisinsäure (ABA)-Signalweges zu Annexin1 nachgewiesen (Kap. 1.2) (Gorecka et al. 2005; Gorecka et al. 2007; Huh et al. 2010). Wie genau diese Verbindung aussieht, ist in diesen Veröffentlichungen allerdings nicht untersucht. So induziert ABA verschiedene Antworten in der Pflanze (Schließen der Spaltöffnungen; verlängerte Keimruhe; beschleunigte Fruchtreifung und Stresstoleranz) (Ben-Ari 2012), wobei z. B. in der Wurzel nur die Induktion von Stresstoleranz von Bedeutung ist. Bei dieser Reaktion induziert ABA die Bindung des ABF (ABA-response-element-binding-factor) an das *ABRE* (ABA-response-element). Der Komplex bindet anschließend an die DNS und induziert seinerseits die Expression von Proteinen, welche die Stress-Toleranz erhöhen (Ben-Ari 2012).

Da ABA unter anderem durch membrangebundene Rezeptoren gebunden wird (Santiago et al. 2009), wurde die Lokalisation von GFP-AtAnx1 auf zellulärer Ebene nach Zugabe von ABA untersucht. Nach der Zugabe von 1  $\mu$ M ABA konnte eine Markierung von immobilisierten Strukturen durch GFP-AtAnx1

beobachtet werden. In den Zellen der Wurzelhaube waren diese als punktförmige Strukturen erkennbar. In den ausdifferenzierten äußeren Zellen des Zentralzylinders waren längliche und teilweise runde Strukturen markiert (Abb. 38).

Somit wäre eine Modifikation der subzellulären Lokalisation von AtAnx1 durch die induzierte Expression von Stresstoleranzproteinen möglich. Da eine Deaktivierung von AtAnx1 über eine Dephosphorylierung bereits postuliert wurde (Gorecka et al. 2005), wäre hier z. B. eine Aktivierung von AtAnx1 über Kinasen in Folge der ABA-Behandlung denkbar. Vielleicht ist AtAnx1 Teil des ABA-Signalweges und bindet daher die markierten Strukturen zum Zweck einer Signalweiterleitung. Möglich wäre ebenso, dass AtAnx1 am Ende der Signalkette steht, wichtig für die Toleranz gegen Trockenstress ist und durch die beobachtete Bindung einen Schutzmechanismus in Gang setzt. Um die beobachtete Reaktion von AtAnx1 präziser zu analysieren, wäre z. B. ein Vergleich der Knockoutmutante mit der Überexpressionsmutante in Bezug auf deren Toleranz gegenüber Trockenstress denkbar.

#### **4.1.5.3 Physiologische Auswirkungen der Überexpression von GFP-AtAnx4**

Die Überexpression von unfusioniertem AtAnx4 in Arabidopsispflanzen zeigt eine erhöhte Sensitivität gegenüber Trockenstress, was bereits durch Huh und Mitarbeiter (2010) nachgewiesen werden konnte. Daher wurde überprüft, ob die Überexpression von GFP-AtAnx4 einen ähnlichen Phänotyp bedingt, da durch die Überexpression von GFP-AtAnx4 bislang unbekannte Strukturen auf zellulärer Ebene visualisiert wurden und die Funktionalität von AtAnx4 durch die GFP-Fusion beeinträchtigt sein könnte (Abb. 21). Anhand von 6 Wochen alten GFP-AtAnx4-Überexpressionspflanzen konnten die Ergebnisse von Huh und Mitarbeiter (2010) auch für AtAnx4 mit anfusioniertem GFP reproduziert werden. Pflanzen die GFP-AtAnx4 unter der transkriptionellen Kontrolle des 35S Promoters exprimieren, zeigten nach einer 10-tägigen Trockenperiode einen schlechteren Allgemeinzustand als 6 Wochen alte 35S:GFP-Pflanzen (Abb. 39). Um genauer zu überprüfen, ob die Fusion mit GFP an AtAnx4 Veränderungen in der Aktivität oder Lokalisation von AtAnx4 bei Überexpression induziert,

müsste allerdings überexprimiertes AtAnx4 z. B. über Immunocytochemie in transformierten Pflanzen nachgewiesen werden.

Die nach Überexpression erhöhte Sensitivität gegenüber Trockenstress wurde von Huh und Mitarbeiter (2010) auf das unvollständige Schließen der Stomata in AtAnx4 Überexpressionspflanzen zurückgeführt. Zu dem Umstand, dass der Spaltöffnungsapparat nach AtAnx4 Überexpression nicht mehr richtig schließen kann, stellten Hu und Mitarbeiter (2010) folgende Überlegungen an: Annexine regulieren negativ die Expression von AtNCDE3. Dadurch wird die ABA-Konzentration erhöht. Eine erhöhte ABA-Konzentration führt zu einer erhöhten Konzentration an Calciumionen, was wiederum zu einer verminderten Schließfähigkeit führt.

Eine andere Möglichkeit wie die Aktivität von Schließzellen beeinflusst werden kann, wurde von Zhao und Mitarbeiter (2011) beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Schließzellen nach einer Modifikation (Bündelung) des Aktinzytoskeletts verändert war (Zhao et al. 2011). Nach den hier gewonnenen Ergebnissen (Abb. 29) wäre es also ebenso möglich, dass AtAnx4 das Aktinzytoskelett modifiziert und so den Spaltöffnungsapparat beeinflusst. Dies erfordert allerdings weitere Untersuchungen. So könnte z. B. die Expressionsstärke von AtNCDE3 in AtAnx4 Überexpressionspflanzen untersucht werden oder die Bündelung von Aktinfilamenten in Schließzellen von AtAnx4 Überexpressionslinien.

#### **4.1.6 Ausblick**

Obwohl in vielen Einzelfällen detaillierte Ergebnisse zu den einzelnen Annexinen existieren, so sind viele Funktionen auf molekularer Ebene noch nicht verstanden. Wie viele andere Proteine scheinen auch Annexine in einem weit verzweigten Netzwerk von Protein-Protein-Interaktionen mitzuwirken. Zusätzlich haben sie die Möglichkeit auf verschiedene Calcium-gesteuerte Signale zu reagieren und Lipide zu binden, was die Reaktionsmöglichkeiten nochmals erhöht. Ein wichtiger Aspekt wird in Zukunft also die Identifikation von Interaktionspartnern sein. Dies scheint sich aber für Annexine recht schwierig darzustellen, da diese, wie ebenfalls in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden



konnte, nur unter sehr spezifischen Bedingungen reagieren. Die Erforschung könnte sich weiterhin als schwierig gestalten, da Annexine sich teilweise in ihren Funktionen überschneiden (AtAnx1 und AtAnx2 nach Rehydrierung), teilweise aber auch sehr unterschiedliche Eigenschaften besitzen (vergleich Lokalisation AtAnx1, 3 und AtAnx4). Da bisher keine letalen Knockoutmutanten beschrieben sind, ist davon auszugehen, dass Annexine an der Feinregulation bestimmter Vorgänge beteiligt sind. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten geben erste Anhaltspunkte für einige dieser Vorgänge, wie zum Beispiel Trocknung mit anschließender Rehydrierung, Signaltransduktion nach Gravitationsperzeption, Veränderung des Phänotyps durch GFP-link-AtAnx1, mögliche Interaktionen im Zellkern oder Organisation von Aktinfilamenten und Zellkompartimenten. Die Untersuchung auf molekularer Ebene wird zeigen, ob die Regulation dieser Vorgänge auf generellen Eigenschaften von Annexinen beruht oder ob sich Annexine grundsätzlich in ihrer Wirkungsweise unterscheiden.

## 5. Zusammenfassung

In Pflanzen sind Antworten auf Stresssituationen sehr vielseitig und zum Teil artspezifisch. Um auf einen Reiz angemessen reagieren zu können, werden unter anderem Proteine benötigt, welche sich in unterschiedlichen Situationen spezifisch regulieren lassen. Dazu gehört die Annexin-Proteinfamilie, deren Mitglieder je nach Bedingung in unterschiedlicher Weise an Membranen binden können.

In dieser Arbeit konnten für die Annexine AtAnx1, 2, 3 und AtAnx4 GFP-Fusionskonstrukte erstellt werden, welche transient in Tabak und stabil in *A. thaliana* transformiert wurden. Dabei wurde für die Annexine AtAnx1, 2 und 3 eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation beobachtet, wobei AtAnx1 und 2 nach Lufttrocknung und anschließender Rehydrierung an kortikale und vesikuläre Strukturen relokalisieren. Eine ähnliche Relokalisation vergleichbarer Geschwindigkeit wie die der Annexine AtAnx1 und 2 konnte auch für das tierische Annexin A1 nach Verwundung der Plasmamembran beobachtet werden, was für eine Mitwirkung von pflanzlichen Annexinen bei der Reparatur von Membranen spricht. Für AtAnx2 konnte in der Wurzelspitze nach einem Gravitationsstimulus ebenfalls eine Umlagerung beobachtet werden. Möglicherweise ist AtAnx2 bei der Reaktion der Pflanze auf Gravitationsreize beteiligt und ist Teil der Signalkette der auf die Perzeption folgenden Krümmungsreaktion.

Das schwach exprimierte AtAnx3 war zusätzlich zur zytoplasmatischen Lokalisation im Nukleus lokalisiert, was die Frage aufwirft, welche Funktion AtAnx3 hier erfüllt. Da es keinerlei detaillierte Erkenntnisse zu der Wirkung von Annexinen im Nukleus gibt, könnte dieses Ergebnis einen interessanten Ansatz für weitere Versuche darstellen. Im Unterschied zu den anderen untersuchten Annexinen wurden durch AtAnx4 Filamente markiert, welche eine Kollokalisierung mit dem Aktin/Myosinsystem zeigten. Diese Strukturen könnten durchaus artifizieller Natur sein, da ähnliche Strukturen noch nicht beschrieben wurden. Sollte sich bei weiteren Studien zu AtAnx4 allerdings bestätigen, dass die beobachteten Filamente nicht artifizieller Natur sind und von AtAnx4 gebildet werden, könnte AtAnx4 eine Rolle als Aktin- und/oder Membranverbindungselement spielen.

Dies stellt einen interessanten Aspekt für die Funktion von AtAnx4 in Pflanzen dar.

Zusammengefasst sind die genaue Funktionsweise sowie die Bindungspartner der einzelnen Annexine noch unklar. Die in dieser Dissertation gewonnenen Daten können jedoch wichtige Hinweise auf mögliche Interaktionspartner und die involvierten Mechanismen geben.

## 6. Literaturverzeichnis

- Alexandersson, E., G. Saalbach, et al. (2004). "Arabidopsis plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking." Plant Cell Physiol **45**(11): 1543-56.
- Ando, Y., S. Imamura, et al. (1991). "Calcium-induced intracellular cross-linking of lipocortin I by tissue transglutaminase in A431 cells. Augmentation by membrane phospholipids." J Biol Chem **266**(2): 1101-8.
- Babiychuk, E. B. and A. Draeger (2000). "Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains." J Cell Biol **150**(5): 1113-24.
- Baldwin, K. L., A. K. Strohm, et al. (2005). "Gravity sensing and signal transduction in vascular plant primary roots." Am J Bot **100**(1): 126-42.
- Baluska, F. and S. Mancuso (2013). "Ion channels in plants: From bioelectricity, via signaling, to behavioral actions." Plant Signal Behav **8**(1).
- Bayer, E. M., A. R. Bottrill, et al. (2006). "Arabidopsis cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology." Proteomics **6**(1): 301-11.
- Ben-Ari, G. (2012). "The ABA signal transduction mechanism in commercial crops: learning from Arabidopsis." Plant Cell Rep **31**(8): 1357-69.
- Benoit, M., E. Layat, et al. (2013). "Heterochromatin dynamics during developmental transitions in Arabidopsis - a focus on ribosomal DNA loci." Gene **526**(1): 39-45.
- Blackbourn, H. D., P. J. Barker, et al. (1992). "Properties and partial protein sequence of plant annexins." Plant Physiol **99**(3): 864-71.
- Boustead, C. M., M. Smallwood, et al. (1989). "Identification of calcium-dependent phospholipid-binding proteins in higher plant cells." Febs Letters **2**: 456 - 460.
- Boyko, V., O. Mudrak, et al. (1994). "A major cellular substrate for protein kinases, annexin II, is a DNA-binding protein." FEBS Lett **345**(2-3): 139-42.
- Breton, G., A. Vazquez-Tello, et al. (2000). "Two novel intrinsic annexins accumulate in wheat membranes in response to low temperature." Plant Cell Physiol **41**(2): 177-84.
- Budak, H., M. Kantar, et al. (2013). "Drought tolerance in modern and wild wheat." ScientificWorldJournal **2013**: 548246.
- Burger, A., D. Voges, et al. (1994). "Structural and electrophysiological analysis of annexin V mutants. Mutagenesis of human annexin V, an in vitro voltage-gated calcium channel, provides information about the structural features of the ion pathway, the voltage sensor and the ion selectivity filter." J Mol Biol **237**(4): 479-99.
- Calvert, C. M., S. J. Gant, et al. (1996). "Tomato annexins p34 and p35 bind to F-actin and display nucleotide phosphodiesterase activity inhibited by phospholipid binding." Plant Cell **8**(2): 333-42.
- Cangelosi, G. A., E. A. Best, et al. (1991). "Genetic analysis of Agrobacterium." Methods Enzymol **204**: 384-97.
- Cantero, A., S. Barthakur, et al. (2006). "Expression profiling of the Arabidopsis annexin gene family during germination, de-etiolation and abiotic stress."

- Plant Physiol Biochem **44**(1): 13-24.
- Carter, C., S. Pan, et al. (2004). "The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins." Plant Cell **16**(12): 3285-303.
- Chandran, D., N. Inada, et al. (2010). "Laser microdissection of *Arabidopsis* cells at the powdery mildew infection site reveals site-specific processes and regulators." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(1): 460-5.
- Chou, M., K. H. Krause, et al. (1989). "Antibodies against the Calcium-Binding Protein: Calsequestrin from *Streptanthus tortuosus* (Brassicaceae)." Plant Physiol **91**(4): 1259-61.
- Clark, G., A. Cantero-Garcia, et al. (2005b). "Secretion as a key component of gravitropic growth: implications for annexin involvement in differential growth." Gravit Space Biol Bull **18**(2): 113-4.
- Clark, G. B., M. Dauwalder, et al. (1992). "Purification and immunolocalization of an annexin-like protein in pea seedlings." Planta **187**: 1-9.
- Clark, G. B., M. Dauwalder, et al. (1998). "Immunological and biochemical evidence for nuclear localization of annexin in peas." Plant Physiol Biochem **36**(9): 621-7.
- Clark, G. B., D. Lee, et al. (2005a). "Immunolocalization and histochemical evidence for the association of two different *Arabidopsis* annexins with secretion during early seedling growth and development." Planta **220**(4): 621-31.
- Clark, G. B., R. O. Morgan, et al. (2012). "Evolutionary adaptation of plant annexins has diversified their molecular structures, interactions and functional roles." New Phytol **196**(3): 695-712.
- Clark, G. B., A. Sessions, et al. (2001). "Differential expression of members of the annexin multigene family in *Arabidopsis*." Plant Physiol **126**(3): 1072-84.
- Clark, G. B., S. Turnwald, et al. (1995). "Polar distribution of annexin-like proteins during phytochrome-mediated initiation and growth of rhizoids in the ferns *Dryopteris* and *Anemia*." Planta **197**(2): 376-84.
- Cornely, R., C. Rentero, et al. (2011). "Annexin A6 is an organizer of membrane microdomains to regulate receptor localization and signalling." IUBMB Life **63**(11): 1009-17.
- Creutz, C. E., C. J. Pazoles, et al. (1978). "Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules." J Biol Chem **253**(8): 2858-66.
- Crumpton, M. J. and J. R. Dedman (1990). "Protein terminology tangle." Nature **345**(6272): 212.
- Dabitz, N., N. J. Hu, et al. (2005). "Structural determinants for plant annexin-membrane interactions." Biochemistry **44**(49): 16292-300.
- De Carvalho-Niebel, F., N. Lescure, et al. (1998). "The *Medicago truncatula* MtAnn1 gene encoding an annexin is induced by Nod factors and during the symbiotic interaction with *Rhizobium meliloti*." Mol Plant Microbe Interact **11**(6): 504-13.
- De Carvalho-Niebel, F., A. C. Timmers, et al. (2002). "The Nod factor-elicited annexin MtAnn1 is preferentially localised at the nuclear periphery in symbiotically activated root tissues of *Medicago truncatula*." Plant J **32**(3): 343-52.

- Delmer, D. P. and T. S. Potikha (1997). "Structures and functions of annexins in plants." Cell Mol Life Sci **53**(6): 546-53.
- Draeger, A., S. Wray, et al. (2005). "Domain architecture of the smooth-muscle plasma membrane: regulation by annexins." Biochem J **387**(Pt 2): 309-14.
- Ebrahimi, R. and S. C. Bhatla (2012). "Ion distribution measured by electron probe X-ray microanalysis in apoplastic and symplastic pathways in root cells in sunflower plants grown in saline medium." J Biosci **37**(4): 713-21.
- Friso, G., L. Giacomelli, et al. (2004). "In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database." Plant Cell **16**(2): 478-99.
- Fujii, H. and J. K. Zhu (2012). "Osmotic stress signaling via protein kinases." Cell Mol Life Sci **69**(19): 3165-73.
- Gaffield, M. A. and W. J. Betz (2006). "Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes." Nat Protoc **1**(6): 2916-21.
- Gao, X. Q., X. L. Wang, et al. (2009). "Dynamics of vacuoles and actin filaments in guard cells and their roles in stomatal movement." Plant Cell Environ **32**(8): 1108-16.
- Geldner, N., N. Anders, et al. (2003). "The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth." Cell **112**(2): 219-30.
- Gerke, V. and S. E. Moss (2002). "Annexins: from structure to function." Physiol Rev **82**(2): 331-71.
- Gidrol, X., P. A. Sabelli, et al. (1996). "Annexin-like protein from *Arabidopsis thaliana* rescues delta oxyR mutant of *Escherichia coli* from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 11268-73.
- Gifford, J. L., M. P. Walsh, et al. (2007). "Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix-loop-helix EF-hand motifs." Biochem J **405**(2): 199-221.
- Gomez-Garcia Mdel, R. and N. Ochoa-Alejo (2013). "Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum* spp.)." Int J Mol Sci **14**(9): 19025-53.
- Gorecka, K. M., D. Konopka-Postupolska, et al. (2005). "Peroxidase activity of annexin 1 from *Arabidopsis thaliana*." Biochem Biophys Res Commun **336**(3): 868-75.
- Gorecka, K. M., C. Thouverey, et al. (2007). "Potential role of annexin AnnAt1 from *Arabidopsis thaliana* in pH-mediated cellular response to environmental stimuli." Plant Cell Physiol **48**(6): 792-803.
- Goryaynov, A., J. Ma, et al. (2012). "Single-molecule studies of nucleocytoplasmic transport: from one dimension to three dimensions." Integr Biol (Camb) **4**(1): 10-21.
- Hashimoto, M., M. Toorchi, et al. (2009). "Proteome analysis of rice root plasma membrane and detection of cold stress responsive proteins." Protein and Peptide Letters **16**: 685-697.
- Hegde, B. G., J. M. Isas, et al. (2006). "A novel calcium-independent peripheral membrane-bound form of annexin B12." Biochemistry **45**(3): 934-42.
- Hepler, P. K. (2005). "Calcium: a central regulator of plant growth and development." Plant Cell **17**(8): 2142-55.
- Hofmann, A. and R. Huber (2003). "Liposomes in assessment of annexin-

- membrane interactions." Methods Enzymol **372**: 186-216.
- Hofmann, A., J. Proust, et al. (2000). "Annexin 24 from *Capsicum annuum*. X-ray structure and biochemical characterization." J Biol Chem **275**(11): 8072-82.
- Hofmann, A., S. Ruvinov, et al. (2002). "Plant annexins form calcium-independent oligomers in solution." Protein Sci **11**(8): 2033-40.
- Hoshino, D., A. Hayashi, et al. (2004). "Biochemical and immunohistochemical characterization of *Mimosa* annexin." Planta **219**(5): 867-75.
- Hoshino, T., A. Mizutani, et al. (1995). "Plant annexin form homodimer during Ca(2+)-dependent liposome aggregation." Biochem Mol Biol Int **35**(4): 749-55.
- Hu, N. J., A. M. Yusof, et al. (2008). "The crystal structure of calcium-bound annexin Gh1 from *Gossypium hirsutum* and its implications for membrane binding mechanisms of plant annexins." J Biol Chem **283**(26): 18314-22.
- Huh, S. M., E. K. Noh, et al. (2010). "Arabidopsis annexins AnnAt1 and AnnAt4 interact with each other and regulate drought and salt stress responses." Plant Cell Physiol **51**(9): 1499-514.
- Jami, S. K., A. Dalal, et al. (2009). "Molecular cloning and characterization of five annexin genes from Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern and Coss)." Plant Physiol Biochem **47**(11-12): 977-90.
- Kaufman, P. L. (2008). "Enhancing trabecular outflow by disrupting the actin cytoskeleton, increasing uveoscleral outflow with prostaglandins, and understanding the pathophysiology of presbyopia interrogating Mother Nature: asking why, asking how, recognizing the signs, following the trail." Exp Eye Res **86**(1): 3-17.
- Kiba, T., T. Naitou, et al. (2005). "Combinatorial microarray analysis revealing arabidopsis genes implicated in cytokinin responses through the His->Asp Phosphorelay circuitry." Plant Cell Physiol **46**(2): 339-55.
- Kleffmann, T., D. Russenberger, et al. (2004). "The Arabidopsis thaliana chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions." Curr Biol **14**(5): 354-62.
- Konopka-Postupolska, D., G. Clark, et al. (2009). "The role of annexin 1 in drought stress in Arabidopsis." Plant Physiol **150**(3): 1394-410.
- Konopka-Postupolska, D., G. Clark, et al. (2011). "Structure, function and membrane interactions of plant annexins: an update." Plant Sci **181**(3): 230-41.
- Kovacs, I., F. Ayaydin, et al. (1998). "Immunolocalization of a novel annexin-like protein encoded by a stress and abscisic acid responsive gene in alfalfa." Plant J **15**(2): 185-97.
- Kretsinger, R. H. and C. E. Nockolds (1973). "Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description." J Biol Chem **248**(9): 3313-26.
- Kudla, J., O. Batistic, et al. (2010). "Calcium signals: the lead currency of plant information processing." Plant Cell **22**(3): 541-63.
- Kung, C. C., W. N. Huang, et al. (2006). "Proteomic survey of copper-binding proteins in Arabidopsis roots by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry." Proteomics **6**(9): 2746-58.
- Kush, A. and K. Sabapathy (2001). "Oxy5, a novel protein from Arabidopsis thaliana, protects mammalian cells from oxidative stress." Int J Biochem



- Cell Biol **33**(6): 591-602.
- Kwon, H. K., R. Yokoyama, et al. (2005). "A proteomic approach to apoplastic proteins involved in cell wall regeneration in protoplasts of Arabidopsis suspension-cultured cells." Plant Cell Physiol **46**(6): 843-57.
- Laohavisit, A., R. Colaco, et al. (2012). "Cytosolic Ca(2+) determinations in studying plant responses to salinity and oxidative stress." Methods Mol Biol **913**: 163-71.
- Laohavisit, A. and J. M. Davies (2011). "Annexins." New Phytol **189**(1): 40-53.
- Laohavisit, A., J. C. Mortimer, et al. (2009). "Zea mays annexins modulate cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and generate a Ca<sup>2+</sup>-permeable conductance." Plant Cell **21**(2): 479-93.
- Lee, J., K. He, et al. (2007). "Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development." Plant Cell **19**(3): 731-49.
- Lee, S., E. J. Lee, et al. (2004). "Proteomic identification of annexins, calcium-dependent membrane binding proteins that mediate osmotic stress and abscisic acid signal transduction in Arabidopsis." Plant Cell **16**(6): 1378-91.
- Lefebvre, B., F. Furt, et al. (2007). "Characterization of lipid rafts from Medicago truncatula root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system." Plant Physiol **144**(1): 402-18.
- Lightbourn, G. J., R. J. Griesbach, et al. (2008). "Effects of anthocyanin and carotenoid combinations on foliage and immature fruit color of Capsicum annuum L." J Hered **99**(2): 105-11.
- Lim, E. K., M. R. Roberts, et al. (1998). "Biochemical characterization of tomato annexin p35. Independence of calcium binding and phosphatase activities." J Biol Chem **273**(52): 34920-5.
- Lindermayr, C., G. Saalbach, et al. (2005). "Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis." Plant Physiol **137**(3): 921-30.
- Macias Garcia, B., C. Ortega Ferrusola, et al. (2012). "Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential." Theriogenology **77**(7): 1280-9.
- Marathe, R., Z. Guan, et al. (2004). "Study of Arabidopsis thaliana resistome in response to cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray." Plant Mol Biol **55**(4): 501-20.
- McNeil, A. K., U. Rescher, et al. (2006). "Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair." J Biol Chem **281**(46): 35202-7.
- Moreno, A. A. and A. Orellana (2011). "The physiological role of the unfolded protein response in plants." Biol Res **44**(1): 75-80.
- Mortimer, J. C., A. Laohavisit, et al. (2008). "Annexins: multifunctional components of growth and adaptation." J Exp Bot **59**(3): 533-44.
- Odell, J. T., F. Nagy, et al. (1985). "Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter." Nature **313**(6005): 810-2.
- Patel, N., N. Hamamouch, et al. (2010). "A nematode effector protein similar to annexins in host plants." J Exp Bot **61**(1): 235-48.
- Peltier, J. B., Y. Cai, et al. (2006). "The oligomeric stromal proteome of Arabidopsis thaliana chloroplasts." Mol Cell Proteomics **5**(1): 114-33.

- Peltier, J. B., O. Emanuelsson, et al. (2002). "Central functions of the luminal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction." Plant Cell **14**(1): 211-36.
- Perrin, R. M., L. S. Young, et al. (2005). "Gravity signal transduction in primary roots." Ann Bot **96**(5): 737-43.
- Proust, J., G. Houlne, et al. (1999). "Regulation of biosynthesis and cellular localization of Sp32 annexins in tobacco BY2 cells." Plant Mol Biol **39**(2): 361-72.
- Reichel, C., J. Mathur, et al. (1996). "Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea victoria* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5888-93.
- Renault, J., J.-F. Hausman, et al. (2006). "Proteomics and lowtemperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism." Physiologia Plantarum **126**: 97-109.
- Repetto, O., G. Bestel-Corre, et al. (2003). "Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots." New Phytologist **157**: 555-56.
- Richter, H. (2008). "Proteomstudien an *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung vesikulärer Inhibitoren."
- Ritzenthaler, C., A. Nebenfuhr, et al. (2002). "Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera." Plant Cell **14**(1): 237-61.
- Rizo, J. and T. C. Sudhof (1998). "C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>-binding domain." J Biol Chem **273**(26): 15879-82.
- Rothhut, B. (1997). "Participation of annexins in protein phosphorylation." Cell Mol Life Sci **53**(6): 522-6.
- Samaj, J., F. Baluska, et al. (2004). "Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling." Plant Physiol **135**(3): 1150-61.
- Samaj, J., N. D. Read, et al. (2005). "The endocytic network in plants." Trends Cell Biol **15**(8): 425-33.
- Santiago, J., A. Rodrigues, et al. (2009). "Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor PYL5 through inhibition of clade A PP2Cs." Plant J **60**(4): 575-88.
- Santoni, V., D. Rouquie, et al. (1998). "Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane." Plant J **16**(5): 633-41.
- Schapiro, A. L., V. Valpuesta, et al. (2009). "Plasma membrane repair in plants." Trends Plant Sci **14**(12): 645-52.
- Schapiro, A. L., B. Voigt, et al. (2008). "Arabidopsis synaptotagmin 1 is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability." Plant Cell **20**(12): 3374-88.
- Schlaepfer, D. D. and H. T. Haigler (1987). "Characterization of Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid binding and phosphorylation of lipocortin I." J Biol Chem **262**(14): 6931-7.
- Seigneurin-Berny, D., N. Rolland, et al. (2000). "Sulfolipid is a potential candidate for annexin binding to the outer surface of chloroplast." Biochem Biophys Res Commun **272**(2): 519-24.
- Siegel, R. S., S. Xue, et al. (2009). "Calcium elevation-dependent and attenuated resting calcium-dependent abscisic acid induction of stomatal

- closure and abscisic acid-induced enhancement of calcium sensitivities of S-type anion and inward-rectifying K channels in Arabidopsis guard cells." Plant J **59**(2): 207-20.
- Smith, C., D. F. Gibson, et al. (2009). "Transmembrane voltage regulates binding of annexin V and lactadherin to cells with exposed phosphatidylserine." BMC Biochem **10**: 5.
- Sullivan, D. M., N. B. Wehr, et al. (2000). "Identification of oxidant-sensitive proteins: TNF-alpha induces protein glutathiolation." Biochemistry **39**(36): 11121-8.
- Takac, T., T. Pechan, et al. (2012). "Proteomics on brefeldin A-treated Arabidopsis roots reveals profilin 2 as a new protein involved in the cross-talk between vesicular trafficking and the actin cytoskeleton." J Proteome Res **10**(2): 488-501.
- Takac, T., T. Pechan, et al. (2012). "Wortmannin Treatment Induces Changes in Arabidopsis Root Proteome and Post-Golgi Compartments." J Proteome Res.
- Tan, C., H. Wang, et al. (2011). "A proteomic approach to analyzing responses of Arabidopsis thaliana root cells to different gravitational conditions using an agravitropic mutant, pin2 and its wild type." Proteome Sci **9**: 72.
- Tang, R. J., H. Liu, et al. (2012). "Tonoplast calcium sensors CBL2 and CBL3 control plant growth and ion homeostasis through regulating V-ATPase activity in Arabidopsis." Cell Res **22**(12): 1650-65.
- Truman, W., M. H. Bennett, et al. (2007). "Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 1075-80.
- Tuomainen, M., A. Tervahauta, et al. (2010). "Proteomics of *Thlaspi caerulescens* accessions and an inter-accession cross segregating for zinc accumulation." J Exp Bot **61**(4): 1075-87.
- Voigt, B., A. C. Timmers, et al. (2005). "Actin-based motility of endosomes is linked to the polar tip growth of root hairs." Eur J Cell Biol **84**(6): 609-21.
- Weber, M., A. Trampczynska, et al. (2006). "Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in Arabidopsis thaliana and the Cd(2+)-hypertolerant facultative metallophyte Arabidopsis halleri." Plant Cell Environ **29**(5): 950-63.
- Wice, B. M. and J. I. Gordon (1992). "A strategy for isolation of cDNAs encoding proteins affecting human intestinal epithelial cell growth and differentiation: characterization of a novel gut-specific N-myristoylated annexin." J Cell Biol **116**(2): 405-22.
- Wojtaszek, P. (2000). "Genes and plant cell walls: a difficult relationship." Biol Rev Camb Philos Soc **75**(3): 437-75.
- Xiang, C., P. Han, et al. (1999). "A mini binary vector series for plant transformation." Plant Mol Biol **40**(4): 711-7.
- Yamada, K., A. J. Nagano, et al. (2009). "The ER body, a new organelle in Arabidopsis thaliana, requires NAI2 for its formation and accumulates specific beta-glucosidases." Plant Signal Behav **4**(9): 849-52.
- Yan, Y., S. Stolz, et al. (2007). "A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway." Plant Cell **19**(8): 2470-83.
- Yano, K. and A. Zarain-Herzberg (1994). "Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties." Mol Cell Biochem **135**(1): 61-70.

Zhao, Y., S. Zhao, et al. (2011). "The plant-specific actin binding protein SCAB1 stabilizes actin filaments and regulates stomatal movement in Arabidopsis." Plant Cell **23**(6): 2314-30.

## 7. Anhang

### 7.1 Primer:

Da viele Restriktionsenzyme besser schneiden wenn es mindestens kurze flankierende Sequenzen gibt (2-3 bp), wurde den erstellten Primern ein GC vorangestellt. Die erstellten Primer für die verwendeten Konstrukte waren (Die Schneidestellen der Restriktionsenzyme sind fett gedruckt):

35S:GFP-AtAnx1 (FOR:BamHI; REV:SpeI),(CDS: 960 Bp):

FOR(forward): GC GGATCC ATGGCGACTCTTAAGGTT

REV(reverse): GC ACTAGT AGCATCATCTTCACCGAG

35S: AtAnx1-GFP (FOR:NcoI; REV:NcoI),(CDS: 960 Bp):

FOR: GC CCATGG ATGGCGACTCTTAAGG

REV: GC CCATGG C TTC AGCATCATCTTCACCG

35S:GFP-link-AtAnx1 (FOR:BamHI; REV:SpeI),(CDS: 960 Bp):

FOR: GC GGATCC ACTAAAAGTAGAAGAAAAATG

REV: GC ACTAGT TTAAGCATCATCTTCACCGAGAAG

Prom<sub>AtAnx1</sub>: AtAnx1-GFP (FOR:NotI; REV:NcoI),(Sequenz: 4196 Bp):

FOR: GC GCGGCCGC ATCAGTTATCTGGAAGAGTTCCTGC

REV: CG CCATGG T TATGTTTCTCTGTGGAGGATTGATTGAATAAGC

35S:AtAnx2-GFP (FOR:NcoI; REV:NcoI),(CDS: 960 Bp):

FOR: GC CCATGG ATGGCGTCTCTCAAAGTCCCAA

REV: GC CCATGG C GCAAGCATCGCCATGTCCG

35S: AtAnx3-GFP (FOR:NcoI; REV:NcoI),(CDS: 960 Bp):

FOR: CG CCATGG GGAAAACAAAAACAGTAATAA

REV: CG CCATGG C GATTTTAGATCCAAGTAAG

35S:GFP-AtAnx4 (FOR:BamHI; REV:SpeI),(CDS: 960 Bp):

FOR: GC GGATCC ATCAACTGCAAGAAA ATGGC

REV: GC ACTAGT ATCGGATTTGGAGAGAAGTGTGA

35S:GFP-AtAnx4NT (FOR:BamHI; REV:SpeI),(Bp: 1-90):

FOR: GC GGATCC ATCAACTGCAAGAAAATGGC

REV: GC ACTAGT TCA AGC TTC TTC TCC TTT

Zum erstellen des modifizierten Vektors: "pCatGFP without promoter" wurden folgende Primer verwendet:

FOR: GC GCGGCCGC CCATGG GTAAAGGAGAAGAAGTCTT

REV: GC GCGGCCGC GAATTC AGATCT CCACCATGTTGACCTGCAGG

## 7.2 PCR Programme

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

	<b>Denaturierung:</b>	<b>Bindung:</b>	<b>Verlängerung:</b>
<b>Dauer:</b>	15 Sekunden	30 Sekunden	1 Minute
<b>Temperatur:</b>	98 °C	56 °C	72 °C

Für die Amplifizierung von  $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$  wurde die Verlängerungszeit auf 3 Minuten erweitert, genau wie bei der Amplifizierung des pCatGFP Vector zur Erzeugung des pCatGFP Vektors ohne Promoter. Der Zyklus der DNS-Vervielfältigung wurde 32 mal wiederholt.

## 7.3 Linker

Es wurden für das erste Annexin (AtAnx1) 2 verschiedene Linker verwendet.

Das Konstrukt 35S:GFP-link-AtAnx1 wurde mit dem Linker:

GGATCCACTAAAAGTAGAAGAAAA (AS: GSTKSRRK)

fusioniert,  $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}:\text{AtAnx1-GFP}$  mit dem Linker:

CCATGGTTATGTTTCTCTGTGGAGGATTGATTGA (AS: SINPPQRNITM).

Der für beide Konstrukte mit Annexin 4 verwendete Primer war:

GGATCCATCAACTGCAAGAAA (AS: GSINCKK)

8.4 pGwp (Vektor: **pCatGFP without promoter**)

Die Sequenz des neu erstellten Vektors war:

AAGCTTGCATGCCTGCAGGAGATCTGAATTCGCGGCCGCCATGGGTAAA  
GGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTG  
ATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAA  
CATACGGAAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAAGCTACCTGTT  
CCTTGGCCAACACTTGTCACTACTTTCTGTTATGGTGTACAATGCTTTTCAA  
GATACCCAGATCATATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTG  
AGGGATACGTACAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGGAAGTAC  
AAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAGGGAGACACCCTCGTCAACAGGAT  
CGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCGGCCACA  
AGTTGGAATACAAGTACAAGTACAAGTACAAGTACAAGTACAAGTACAAGT  
AAAGAATGGAATCAAAGCTAAGTCAAAGTCAAAGTCAAAGTCAAAGTCAAAG  
AGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCC  
CTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAA  
AGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCCTTCTTGAGTTTGTAACAGC  
TGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAAGGATCCCTAGAG  
GTCCGCAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATTTTCTCCA  
GAATAATGTGTGAGTAGTTCCAGATAAGGGAATTAGGGTTCTTATAGGGTT  
TCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAAA  
ATACTTCTATCAATAAAAATTTCTAATTCTAAAACCAAATCCAGTGACCTGCA  
GGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAA  
AACCCTGGCGTTACCCAAGTAAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTTCGCC  
AGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTT  
GCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCA  
TCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCT  
GATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGC  
GCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGA  
CCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCCGTCATCACCGAAA  
CGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCA  
TGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCG  
CGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT  
GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGA  
GTATTCACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCTT  
CCTGTTTTTGTCAACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGAT  
CAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAA  
GATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTT  
AAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAG  
CAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCAC

CAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCA  
 GTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAA  
 CGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGAT  
 CATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA  
 AACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCG  
 CAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAG  
 ACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTT  
 CCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTC  
 TCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT  
 AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA  
 GATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCA  
 AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAGG  
 ATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGA  
 GTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTC  
 TTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCA  
 CCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTT  
 CCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTA  
 GTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACA  
 TACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAG  
 TCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAAGGCGCAG  
 CGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAA  
 CGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCA  
 CGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGT  
 CGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTAT  
 CTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGT  
 GATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGC  
 CTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTCTCT  
 GCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTG  
 ATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGA  
 GGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGG  
 CCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGG  
 CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCA  
 GGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGA  
 TAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCC

Mögliche Schneidepunkte für Restriktionsenzyme sind in Abbildung 7 dargestellt (Sequenz mit  $\text{prom}_{\text{AtAnx1}}$ :AtAnx1-linker) die neu eingefügte MCS ist wie folgt aufgebaut: in der Sequenz genau wie hier markiert (fett und unterstrichen: für Restriktionsschnittstellen; unterstrichen: Für die Sequenz von GFP (das ATG der NcoI-Schnittstelle ist das Startcodon von GFP); kursiv: für die UTR) (inklusive GFP und 3' UTR):

**Sdal(Sse83) / BgIII / EcoRI / NotI / NcoI / GFP / BamHI / 3'UTR / Sdal(Sse83)**



## 7.4 Lösungen und Puffer

### 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 <sub>2</sub> (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)	

**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

### Lösungen für Immunmarkierung

PBS

0,14 M NaCl 8,0 g

2,7 mM KCl 0,2 g

6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 1,15 g

1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g

Aqua dest. ad 1 l

pH 7,3

### 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 Lämmlli**

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

**SDS-Laufpuffer (10x)**

250 mM Tris	30 g
1,92 M Glycin	144 g
10 % SDS	10 g
Aqua dest.	ad 1 l

**Blotpuffer (1x)**

20 mM Tris	9,68 g
150 mM Glycin	45,05 g
10 % Methanol	400 ml
Aqua dest.	ad 4 l

**TBS-Puffer (10x)**

100 mM Tris/HCl (pH7,4)	12,1 g
1,5 mM NaCl	87,6 g
Aqua dest.	ad 1 l

**TBS-T Puffer**

Tween20 (0,1 %)	500 µl
TBS Puffer	500 ml

## 7.5 Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
ABD2	Aktinbindedomäne 2 (aus Fimbrin)
Abb.	Abbildung
Anx	Annexin
AS	Aminosäure
BFA	Brefeldin A
Bp	Basenpaare
cDNS	komplementäre DNS
CFMV	Cliflour-Mosaic-Virus
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia 0
C-Terminus	Carboxylterminus eines Proteins
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DsRed	Discosoma spec. rotes fluoreszierendes Protein
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FM4-64	N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
kDa	Kilo Dalton
Kap.	Kapitel
KLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MBD	Mikrotubuli bindende Domäne
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
MS-Medium	Murashige und Skoog-Medium
N-Terminus	Aminoterninus eines Proteins
OD	optische Dichte
p	Plasmid
p. A.	pro Analysis
PAGE	Polyacrylamide Gel Elektrophorese
PBS	phosphate buffered saline

---

PCR	Polymerase Kettenreaktion
pS	piko Siemens
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SA	Salicylsäure
SDS	Natrium Dodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris Acetat Elektrophorese-Puffer
TBS	Tris buffered saline
T-DNS	Transfer DNS
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{m}$	Mikrometer
vergl.	vergleiche
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
YEB	yeast extract beef medium

## **Lebenslauf**

## Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln – persönlich, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Weiterhin versichere ich, dass die vorgelegte Arbeit nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist.

Bonn, Januar 2014

Hendrik Richter



## Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Diedrik Menzel für die Möglichkeit der Promotion, sein Interesse an dieser Arbeit und die konstruktiven Ratschläge.

Herrn PD Dr. Frantisek Balluska danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Claudia Heym, Dr. Boris Voigt, Prof. Dr. Jozef Samaj, Christian Burbach, Ursula Mettbach, Matthias Weiland und Sandra Krüger danke ich für eine gute Zusammenarbeit, viele konstruktive Gespräche und das Interesse an meiner Arbeit.

Von ganzen Herzen danke ich auch meinen Freunden und besonders meiner Familie, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg immer unterstützt hat und der ich viele schöne Erinnerungen verdanke.