

BestMasters

Linda Brochhausen

Die Aufprägung und Vererbung der Zellpolarität

Analyse der Kernmigration anhand
der Aufdeckung eines Kernkorbs
aus Aktinfilamenten



Springer Spektrum

BestMasters

Mit „BestMasters“ zeichnet Springer die besten Masterarbeiten aus, die an renommierten Hochschulen in Deutschland, Österreich und der Schweiz entstanden sind. Die mit Höchstnote ausgezeichneten Arbeiten wurden durch Gutachter zur Veröffentlichung empfohlen und behandeln aktuelle Themen aus unterschiedlichen Fachgebieten der Naturwissenschaften, Psychologie, Technik und Wirtschaftswissenschaften.

Die Reihe wendet sich an Praktiker und Wissenschaftler gleichermaßen und soll insbesondere auch Nachwuchswissenschaftlern Orientierung geben.

Linda Brochhausen

Die Aufprägung und Vererbung der Zellpolarität

Analyse der Kernmigration anhand
der Aufdeckung eines Kernkorbs aus
Aktinfilamenten

Mit einem Geleitwort von Prof. Dr. Peter Nick

 Springer Spektrum

Linda Brochhausen
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Deutschland

BestMasters

ISBN 978-3-658-08179-9

ISBN 978-3-658-08180-5 (eBook)

DOI 10.1007/978-3-658-08180-5

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Springer Spektrum

© Springer Fachmedien Wiesbaden 2015

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen.

Gedruckt auf säurefreiem und chlorfrei gebleichtem Papier

Springer Fachmedien Wiesbaden ist Teil der Fachverlagsgruppe Springer Science+Business Media (www.springer.com)

Geleitwort

Jede einzelne Pflanzenzelle kann einen ganzen Organismus bilden. Unsere Zellen können das nicht – tierische übrigens auch nicht. Pflanzenzellen verhalten sich also wie Stammzellen, ohne dass es dazu nobelpreiswürdiger Technologien bedarf. Zentral für diese erstaunliche Bildekraft pflanzlicher Zellen (für die der Fachbegriff Totipotenz geprägt wurde) ist eine innere „Richtung“ der einzelnen Zellen. Diese wird über das Zellskelett forwährend immer wieder neu eingestellt. Bei der Bildung eines neuen Organismus wird die zelluläre „Richtung“ in Antwort auf chemische Schwingungen ausgerichtet. Wie entsteht aber diese „Richtung“? Warum wird sie ständig neu "hinterfragt"? Diese Fragen fordern neue Wege.

Eine entscheidende Rolle für die pflanzliche Zellpolarität spielt die Zellteilung, weil sie Symmetrie, Achse und Orientierung der neu zu bildenden Zellwand bestimmt und damit die räumlichen Bedingungen für das nachfolgende Zellwachstum festlegt. Die innere „Richtung“ der einzelnen Zellen hängt mit der Orientierung des Cytoskeletts zusammen. Gleichzeitig beginnt der Zellkern vor der Teilung mit einer intensiven Bewegung, die erst nach etwa einem Tag in der Zellmitte zur Ruhe kommt. Erst wenn die Zelle solcherart „ihre Mitte“ gefunden hat, kann die eigentliche Zellteilung beginnen. Wie findet nun der Zellkern die Mitte? Und wie wird die innere „Richtung“ der Mutterzelle bei der Teilung an die Tochterzellen weitergegeben? Diese Fragen sind ebenso spannend wie ungeklärt.

Mithilfe von fluoreszenten Proteinen können wir inzwischen das Verhalten des Zellskeletts in lebenden Zellen in Echtzeit verfolgen. Damit lassen sich erstmals die Geheimnisse der pflanzlichen „Richtungsvererbung“ lüften. In der Arbeit von Frau Brochhausen wird nun gezeigt, dass der Zellkern bei seiner intensiven Suchbewegung von einem besonderen Netzwerk aus Actinfilamenten gelenkt wird. Mithilfe einer Fusion aus einem actinbindenden Peptid (Lifeact) und dem schaltbaren fluoreszenten Protein psRFP kann dieser Actinkorb erstmals sichtbar gemacht werden. Dieser Actinkorb bleibt während der Kernteilung bestehen und wird anschließend symmetrisch auf die Tochterzellen verteilt – er scheint also das „räumliche Gedächtnis“ der Zelle zu übertragen. Durch Manipulation des gerichtet durch die Zelle hindurch transportierten Pflanzenhormons Auxin lässt sich die Bewegung des Actinkorbs abbremsen. Ebenso kann die Suchbewegung des Kerns dadurch beeinflusst werden, dass der dynamische Umbau von Actin über Wirkstoffe manipuliert wird.

Wie es sich für eine richtige wissenschaftliche Untersuchung geziemt, wird im Laufe dieser Arbeit eine Erklärung entwickelt. Die zelluläre „Richtung“, die in der Suchbewegung des Zellkerns sichtbar wird, hängt mit einem Gefälle der Actindynamik zusammen. Die „Muskeln der Zelle“ werden also nicht in der ganzen Zelle symmetrisch auf- und abgebaut, sondern es gibt „vorne“ und „hinten“ unterschiedliche Aktivitäten des Actinumbaus. „Richtung“ ist also keine Struktur, sondern eine Aktivität.

Diese Erklärung ist ebenso spannend wie anregend und zwingt uns dazu, unser Konzept von „Zelle“ (immerhin eines der zentralen Konzepte der Biologie), neu zu überdenken. Ich freue mich daher, dass diese Arbeit durch Aufnahme in das BestMasters Programm einer breiteren Öffentlichkeit zugänglich wird und so zu weiteren Diskussion anregen kann.

Karlsruhe, September 2014

Prof. Dr. Peter Nick

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Professor Dr. Peter Nick für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die vielen Anregungen und wertvollen Ratschläge während der Masterarbeit bedanken.

Herrn Professor Dr. Martin Bastmeyer danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Mein besonderer Dank gebührt Dr. Jan Maisch für die kompetente und engagierte Betreuung, die mich besonders motivierte. Er hat mich in allen Phasen meiner Arbeit umfassend unterstützt, sich stets Zeit genommen mir mit gutem Rat zur Seite zu stehen und zahlreiche Vorschläge eingebracht.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Botanischen Instituts I für die großzügige Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Vor allem danke ich Beatrix Zaban, Natalie Schneider und Sebastian Kühn für die Hilfe im Labor und die Durchsicht meines Manuskriptes während der Weihnachtszeit, sowie Qiong Liu und Ningning Gao für die große Hilfe bei der Transformation.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mir meinen Studienwunsch erfüllt und mich mit großem Interesse unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------|
| Geleitwort | V |
| Danksagung..... | VII |
| Inhaltsverzeichnis | IX |
| Zusammenfassung..... | XIII |
| Abstract | XV |
| Abkürzungsverzeichnis | XVII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Von Polarität in Pflanzengeweben bis zur Zellpolarität - der „Kompass“, den jede Zelle in sich trägt | 1 |
| 1.2 Die durch Aktinfilamente gesteuerte Kernwanderung ist entscheidend für die Zellpolarität..... | 3 |
| 1.3 Aktin - ein hochkonserviertes Protein mit vielen unterschiedlichen Aufgaben | 4 |
| 1.4 Auxingradienten bestimmen die Zellpolarität und Ausbildung spezifischer Muster | 7 |
| 1.5 Fragestellung der Masterarbeit..... | 9 |
| 1.6 Die transgene BY-2 Lifeact::psRFP Zelllinie zur Beobachtung des perinukleären Aktinnetzwerks während der Kernwanderung | 10 |
| 2 Material und Methoden..... | 15 |
| 2.1 Zellkultur..... | 15 |
| 2.2 Transformation | 15 |
| 2.2.1 Elektroporation..... | 16 |
| 2.2.2 Kultivierung..... | 16 |
| 2.2.2.1 Kultivierung der transformierten Agrobakterien | 16 |
| 2.2.2.2 Kultivierung der Tabakzellen..... | 17 |
| 2.2.3 Kokultivierung, Selektion und Etablierung der transgenen Suspensionskultur | 17 |
| 2.3 Manipulation des <i>nuclear baskets</i> anhand von Hemmstoffexperimenten...19 | |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.4 | Kategorisierung der Lokalisation des markierten perinukleären Aktinnetzwerks und Analyse der Kernposition | 20 |
| 2.4.1 | Ermittlung der Signalposition | 20 |
| 2.4.2 | Ermittlung der Kernposition..... | 22 |
| 2.5 | Mikroskopie und Bildanalyse..... | 23 |
| 2.5.1 | Mikroskope | 23 |
| 2.5.2 | Langzeitstudien | 24 |
| 3 | Ergebnisse..... | 26 |
| 3.1 | Beschreibung der transgenen Linie..... | 27 |
| 3.1.1 | Die Lage des perinukleären Aktinnetzwerks kann in vier Kategorien eingeordnet werden | 28 |
| 3.1.2 | In der exponentiellen Phase befindet sich das markierte perinukleäre Aktinnetzwerk rund um den Zellkern, danach wird es mit der Zellwand verankert..... | 30 |
| 3.1.3 | Nach der exponentiellen Phase befinden sich die Zellkerne vermehrt in lateraler Position | 32 |
| 3.1.4 | Langzeitaufnahmen decken die Reorientierung der perinukleären Aktinfilamente während der Zellteilung auf..... | 35 |
| 3.2 | Manipulation des <i>nuclear baskets</i> | 39 |
| 3.2.1 | Hemmstoffgruppe 1 Auxine und Phytotropine | 40 |
| 3.2.2 | Hemmstoffgruppe 2 Hemmstoffe der Aktindynamik..... | 47 |
| 3.2.3 | Hemmstoffgruppe 3 Die Myosininhibitoren | 53 |
| 3.2.4 | Die Zugabe von Zellteilungshemmstoffen, niedrig konzentrierten Mikrotubulihemmstoffen als auch weiteren Hemmstoffen der Aktindynamik erzeugen geringe Effekte auf die Kernbewegung. | 59 |
| 3.3 | Zusammenfassung | 60 |
| 4 | Diskussion | 63 |
| 4.1 | Beschreibung des <i>nuclear baskets</i> | 63 |
| 4.1.1 | Lifeact::psRFP markiert eine perinukleäre Aktinpopulation, die ein <i>nuclear basket</i> formt | 63 |
| 4.1.2 | Das <i>nuclear basket</i> ist als räumliches „Gedächtnis“ für die prä- und postmitotische Positionierung des Nukleus notwendig | 64 |
| 4.1.3 | Das <i>nuclear basket</i> als „Polaritätsspeicher“ der Zelle?..... | 65 |
| 4.1.4 | Das <i>nuclear basket</i> könnte in Pflanzenzellen die Funktion der tierischen Lamina als stabilisierende Stützstruktur des Zellkerns übernehmen | 67 |
| 4.2 | Manipulation des <i>nuclear baskets</i> | 68 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.2.1 | Eine verzögerte Kernmigration aus dem Zellzentrum könnte zu einer erhöhten Zellteilung führen..... | 69 |
| 4.2.2 | Ein Modell zum Effekt von Phalloidin und Myosininhibitoren auf die Kernmigration..... | 72 |
| 4.2.3 | BDM und Blebbistatin wirken bezüglich der Kernbewegung auf unterschiedliche Myosinklassen..... | 76 |
| 4.3 | Zusammenfassung..... | 78 |
| 4.4 | Ausblick..... | 80 |
| 4.4.1 | Biochemischer Ansatz..... | 80 |
| 4.4.2 | Zellbiologischer Ansatz..... | 80 |
| 5 | Literaturverzeichnis..... | 83 |
| 6 | Anhang..... | 89 |
| 6.1 | Sequenz und Vektor des Lifeact::psRFP Konstrukts..... | 89 |
| 6.2 | Weitere Hemmstoffe..... | 91 |
| 6.3 | Abbildungs- und Tabellenverzeichnis..... | 96 |