

# Funktionelle Analyse der Kinesin-5 und Kinesin-14 Familien in Pflanzen im Vergleich zu nichtpflanzlichen Organismen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg  
(Fachbereich Biologie)

Vorgelegt von  
Saskia Schattner

Hamburg, November 2022

1. Gutachter: Prof. Dr. Wim Walter
  2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Hoth
- Datum der Disputation: 24.02.2023



### **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.



# Inhalt

1	Einleitung.....	2
1.1	Kinesine.....	4
1.1.1	Kinesin-5.....	6
1.1.2	Kinesin-14.....	7
1.2	Mikrotubuli.....	8
1.3	Analyseverfahren Motorproteine.....	10
1.3.1	<i>Gliding Assay</i> .....	11
1.3.2	<i>Stepping Assay</i> .....	11
1.3.3	<i>Sliding Assay</i> .....	12
1.4	Ausprägung der mitotischen Spindel.....	13
1.5	Zusammenfassung Schattner et al. (2020).....	15
1.6	Zusammenfassung Strauß et al. (2021).....	15
2	Diskussion.....	17
2.1	KCH vermittelter Spermienzelltransport in Pflanzen.....	17
2.2	Die Rolle von Kinesin-5 in der pflanzlichen mitotischen Spindel.....	26
2.3	Funktionen von Kinesin-5 außerhalb der mitotischen Spindel.....	29
2.4	Fazit.....	32
3	Literaturverzeichnis.....	33

# 1 Einleitung

Kein Leben ohne Veränderung, keine Veränderung ohne Bewegung. In allen eukaryotischen Zellen wird ein Großteil der Bewegung durch Motorproteine vermittelt und reguliert. Myosine, Kinesine und Dyneine wandeln chemisch gebundene Energie in Form von ATP in Bewegungsenergie um. Die Hydrolyse von ATP führt zu einer Konformationsänderung, die eine Verschiebung des Moleküls entlang von Strukturproteinen, Aktinfilamenten oder Mikrotubuli, zur Folge hat. Auf diese Weise sind Motorproteine an zahlreichen intrazellulären Prozessen direkt oder indirekt beteiligt.

Die physiologische und biomechanische Funktionalität vieler tierischer Kinesine ist gut erforscht und neben vielfältigen Knockoutmutanten liegt ein breites Spektrum an Funktions- und Strukturanalysen vor. Die Datenlage für die entsprechenden pflanzlichen Homologe ist demgegenüber unterrepräsentiert, obwohl viele der sequenzierten Pflanzen deutlich mehr Kinesine aufweisen als tierische Organismen. So findet man in *Arabidopsis thaliana* als dikotyle Blütenpflanze 61 (Reddy und Day 2001) und in der monokotylen Blütenpflanze Reis (*Oryza sativa*) 41 verschiedene Kinesine (Richardson et al. 2006). In Moosen wie *Physcomitrella patens* wurden bisher 71 (Shen et al. 2012) und für die Alge *Chlamydomonas reinhardtii* 23 (Richardson et al. 2006) verschiedene Kinesine identifiziert. Für bestimmte tierische Kinesine ist kein pflanzliches Homolog zu finden und es wurden umgekehrt pflanzliche Kinesine identifiziert, zu denen es kein tierisches Homolog gibt. Ein Beispiel für pflanzenspezifische Kinesine stellt die Gruppe der Kinesine mit *calponin-homology* Domäne dar, welche der Kinesin-14 Familie zugeordnet werden und in tierischen Systemen nicht zu finden sind. Diese Tatsache ist nicht überraschend, da sich Pflanzen sowohl auf organischer als auch auf zellulärer Ebene deutlich von tierischen Organismen unterscheidet. So ist beispielsweise die Ausbildung eines Pollenschlauches zum Transport der auf die Eizelle zu übertragenden Spermienzellen nur in Pflanzen zu finden. Ebenso unterscheidet sich der Aufbau und die Mechanismen des pflanzlichen Zytoskeletts deutlich von dem in tierischen Zellen. Während in tierischen Zellen meist Aktinfilamente die Basis für Morphologie einer Zelle bilden, so sind in pflanzlichen Zellen meist Mikrotubuli stärker involviert. Außerdem gibt es in pflanzlichen Zellen keine Intermediärfilamente. Auch bei der pflanzlichen Zellteilung gibt es Unterschiede. So fehlen in pflanzlichen mitotischen Spindeln die Zentrosomen. Dafür bilden Pflanzen im Gegensatz zu tierischen Zellen kurz vor der Zellteilung ein sogenanntes Präprophaseband aus

Mikrotubuli aus, das den Entstehungsort der späteren Zellwand markiert. Eine einfache Übertragung der Ergebnisse des mit Hilfe von tierischen Organismen erlangten Wissens auf das pflanzliche Umfeld ist entsprechend nicht sinnvoll und meist auch nicht möglich. Es muss für pflanzliche Kinesine der gleiche Umfang an Forschungsarbeit geleistet werden, wie für tierische Organismen, damit der gleiche Wissensstand auch in diesem Bereich erreicht werden kann.

Besonders deutlich wird dieser Umstand am Beispiel der Minusende-gerichteten Kinesine. In tierischen Systemen sind die meisten Kinesine Plusende-gerichtete, das heißt sie bewegen sich entlang von Mikrotubuli immer in Richtung deren Plusende. Für viele Prozesse ist aber eine Bewegung von Motorproteinen in die entgegengesetzte Richtung notwendig, zum Beispiel bei der Geißelbewegung oder bei der Ausbildung und dem Erhalt der mitotischen Spindel. In tierischen Systemen kommen hier in vielen Fällen Dyneine zum Einsatz, die zwar wie Kinesine mit Mikrotubuli assoziiert sind, aber eine Minusende-gerichtete Bewegung zeigen. Die Vermutung liegt nahe, dass auch in Pflanzen für Minusende-gerichtete Bewegungen entlang von Mikrotubuli Dyneine beteiligt sind. Tatsächlich wurden diese aber zumindest in Blütenpflanzen bisher nicht nachgewiesen, sie können diese Rolle entsprechend nicht übernehmen. Zwar sind bestimmte Prozesse, wie die Geißelbewegung, in Pflanzen nicht oder nur in Ausnahmefällen vorhanden, aber auch in Pflanzen ist für eine funktionale mitotische Spindel eine Bewegung von Motorproteinen in Richtung des Minusendes essentiell und damit für eine korrekte Zellteilung und das Fortbestehen der Art notwendig. Eine Ausnahme von den Plusende-gerichteten Kinesinen bilden die Kinesine der Familie der Kinesin-14: Diese sind sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Organismen Minusende-gerichtet und erfüllen in tierischen Organismen hauptsächlich ihre Funktion beim Erhalt und der Regulierung der mitotischen Spindel (Matthies et al. 1996; Gicking et al. 2018). Es wird vermutet, dass viele Prozesse, bei denen in Pflanzen Minusende-gerichtete Bewegung entlang von Mikrotubuli benötigt werden, von Kinesin-14 Proteinen übernommen werden. Die Tatsache, dass diese Familie in Pflanzen deutlich überrepräsentiert ist, spricht für diese Hypothese.

Anders als die Kinesin-14 sind die Kinesine der Familie der Kinesin-5 strukturell stark über die Reiche konserviert (Richardson et al. 2006; Miki et al. 2005). Auch deren Funktion ist sowohl in Tieren als auch in Pflanzen die gleiche: Sie vernetzen die Spindelmikrotubuli miteinander und gewährleisten so die Stabilität dieser (Bannigan et al. 2007; Kashina et al. 1997). Es

scheint, dass in diesem Fall von der Funktion in tierischen Organismen auf die Funktion in pflanzlichen Organismen geschlossen werden kann (Bannigan et al. 2007; Strauß et al. 2021). Trotzdem spielen auch diese hochkonservierten Kinesine eine Rolle in tierischen Systemen, die sie so in Pflanzen nicht ausführen können, weil Pflanzen den entsprechenden Zelltyp nicht besitzen.

Wie variabel ist die Funktion von eigentlich hochkonservierten Kinesin-5? Gibt es auch hier pflanzenspezifische Funktionen? Sind die biomechanischen Eigenschaften von Kinesin-5 ebenfalls konserviert in Pflanzen? Übernehmen Kinesin-14 tatsächlich die Funktion von Dynein und wenn ja: Wie ist das ihnen möglich? Welche pflanzenspezifischen Funktionen haben Kinesin-14 darüber hinaus ausgebildet? Diese Fragen sollen in dieser Arbeit beantwortet werden. Dazu wurden experimentell erhobene Daten ausgewertet, in zwei Artikeln publiziert und in Zusammenhang mit bereits bestehenden Erkenntnissen gebracht.

## 1.1 Kinesine

Kinesine gehören neben Myosin und Dynein zur Gruppe der Motorproteine. Sie sind in der Lage, chemisch gebundene Energie in Bewegungsenergie umzusetzen und mit dieser Fähigkeit in allen Eukaryoten an Prozessen beteiligt, die Bewegung erfordern. Entdeckt wurden Kinesine in den Axonen tierischer Neuronen, wo sie für den Langstreckentransport von Vesikeln verantwortlich sind (Vale et al. 1985). Weitere Funktionen von Kinesinen sind der Transport von Organellen, die Zytokinese, Signaltransduktion und Morphogenese (Reddy und Day 2001; Verhey et al. 2001; Lee und Lee 2004; Hirokawa et al. 2009). Auffällig viele Publikationen gibt es über die Funktionen der Kinesine während der Mitose. Sie sind an der Trennung der Chromosomen beteiligt, der Bindung der Chromosomen an Mikrotubuli, der Aggregation der Chromosomen, der Ausbildung der mitotischen Spindel und der Spindelelongation (Sharp et al. 2000).

Während in tierischen Systemen alle drei Gruppen von Motorproteinen zu finden sind, gibt es bei Blütenpflanzen lediglich Myosine und Kinesine. Dyneine konnten in höheren Pflanzen noch nicht gefunden werden. Myosine sind mit Aktinfilamenten assoziiert und Kinesine mit Mikrotubuli. Durch phylogenetische Analyse wurden die Kinesine zunächst in 14 Familien eingeteilt (Miki et al. 2005), wobei sich später herausstellte, dass sich diese Klassifizierung auf insgesamt 17 Familien erweitern ließ (Wickstead und Gull 2006). Die Kinesin-Familien sind unterschiedlich stark repräsentiert, teilweise auch stark abhängig vom Organismus.



Kinesine liegen meist als Homodimere vor. Sie besitzen als Dimer zwei Motordomänen mit denen sie mit Mikrotubuli interagieren, zwei oder mehr *coiled-coil* Domänen für die Dimerisierung (Huang et al. 1994; Kozielski et al. 1997; Kozielski et al. 1999; Hizlan et al. 2006; Valentine et al. 2006) und hochvariable C- oder N-Termini, die für unterschiedlichste Funktionen zuständig sind (Abbildung 1).

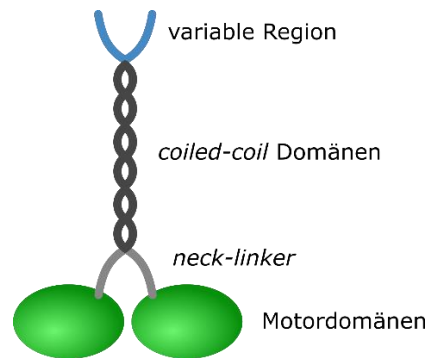


Abbildung 1: Domänen eines Kinesin-Dimers

Die meisten, aber nicht alle Kinesine, bewegen sich entlang von Mikrotubuli auf das Plusende zu und sind somit Plusende-gerichtete Kinesine. Die Direktionalität von Kinesinen wird von der Sequenz des *neck-linker* bestimmt, einer kurzen Region zwischen der Motordomäne und den dimerisierenden *coiled-coil* Domänen (Sablin et al. 1998). Um die endgültige Sicherheit über die Direktionalität eines Kinesins zu erlangen sind allerdings *in vitro* Assays mit rekombinantem Protein notwendig (siehe Analyseverfahren Motorproteine). Eine weitere Eigenschaft nach der sich Kinesine klassifizieren lassen, ist die Prozessivität, also die Art und Weise wie sie sich entlang von Mikrotubuli bewegen. Man unterscheidet grundsätzlich die Bewegungen prozessiv, nicht-prozessiv und diffusiv (Gilbert et al. 1995). Bei der prozessiven Bewegung binden die Kinesine mit der Motordomäne an den Mikrotubulus und legen eine längere Strecke am Mikrotubulus zurück ohne sich wieder von diesem zu lösen. Auch bei der diffusiven Bewegung sind die Kinesine über einen längeren Zeitraum an den Mikrotubulus gebunden. Sie vollführen dabei allerdings keine gerichtete Bewegung, sondern bewegen sich diffusiv auf dem Mikrotubulus hin und her. Bei der nicht-prozessiven Bewegung binden die Kinesine nur kurz an den Mikrotubulus, vollführen einen Kraftschlag und lösen sich anschließend wieder. Ein gerichteter Transport über einen längeren Zeitraum ist für solche Kinesine nur in Kooperation mit mehreren nicht-prozessiven Kinesinen möglich. Sind mehrere Kinesine über ihr *Cargo* miteinander verknüpft, sind ausreichend Kinesine mit dem Mikrotubulus assoziiert, sodass ein prozessiver Transport des *Cargos* möglich ist.

Kinesine durchlaufen wie alle Motorproteine einen mechanochemischen Zyklus, wenn die Motordomänen an den Mikrotubulus binden. Durch das Abspalten des terminalen Phosphates von ATP durchläuft das Protein in der Motordomäne eine Konformationsänderung, die für das Binden an und Lösen vom Mikrotubulus essentiell ist. Durch diese Konformationsänderung wird außerdem Kraft übertragen. Für ein detailliertes Review siehe Cross (2016).

#### 1.1.1 Kinesin-5

Die Familie der Kinesin-5 ist hochkonserviert und strukturell in fast allen Organismen sehr ähnlich. Das erste Kinesin-5, BimC, wurde in *Aspergillus nidulans* auf Grund seiner Ähnlichkeit zum Kinesin-1 gefunden (Enos 1990). Es scheint eine Rolle bei der Ausprägung von Zellteilungsspindeln zu spielen. Verschiedene Forschungsarbeiten im Bereich der Zellteilung zeigten eine Reihe von weiteren Kinesin-5 auf, die alle mit der Zellteilungsspindel assoziiert sind: Cut7 aus *Schizosaccharomyces pombe* (Hagan und Yanagida 1990), Eg5 (XIEg5) aus *Xenopus laevis* (Le Guellec et al. 1991), Cin8 und Kip1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hoyt et al. 1992), Klp61F aus *Drosophila melanogaster* (Heck et al. 1993) und humanes Eg5 (HsEg5) (Blangy et al. 1995).

Kinesin-5 besitzt eine N-terminale Motordomäne, während die Funktion des C-Terminus noch nicht vollständig geklärt ist (Düselder et al. 2015; Weinger et al. 2011). Bei der Dimerisierung weist Kinesin-5 eine Besonderheit auf (Gordon und Roof 1999; Kashina et al. 1997): Zunächst lagern sich zwei Monomere parallel zu einem Dimer zusammen, sodass beide Motordomänen beieinander liegen und sich entlang von Mikrotubuli bewegen können. Diese Dimere bilden mit je einem anderen Dimer einen bipolaren Homotetramer, indem sich diese antiparallel miteinander verbinden. Es entsteht ein Motorprotein welches sowohl auf der einen als auch auf der anderen Seite der *coiled-coil*-Domänen je zwei Motordomänen aufweist (Abbildung 2). Die zentral gelegene BASS Domäne scheint für diese Art der Tetramerisierung essentiell zu sein (Hildebrandt et al. 2006). In dieser Form ist Kinesin-5 in der Lage, Mikrotubuli gegeneinander zu verschieben, was experimentell bereits für mehrere Kinesin-5 untersucht wurde und eine Voraussetzung für dessen Funktionalität innerhalb der Spindel ist (Kapitein et al. 2005; van den Wildenberg et al. 2008).

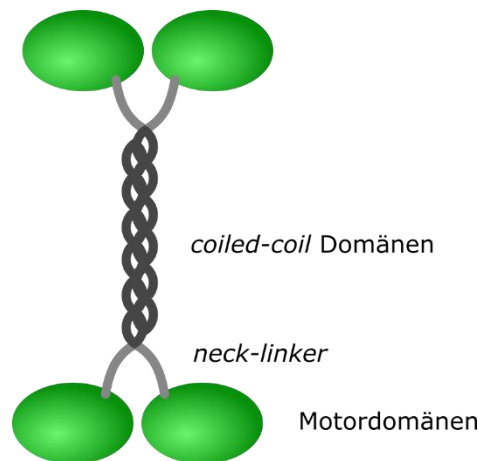


Abbildung 2: Domänen eines Kinesin-5 Dimers

### 1.1.2 Kinesin-14

Kinesin-14 ist im Vergleich zu Kinesinen aus anderen Kinesin-Familien ein Minusende-gerichtetes Kinesin und wurde wie Kinesin-5 als wichtiger Bestandteil bei der Ausprägung der Zellteilungsspindel entdeckt (Endow et al. 1990). In *Saccharomyces cerevisiae* wurde bald darauf ein weiteres Kinesin-14, Kar3, entdeckt, das eine Rolle bei der Fusion von Zellkernen und der Meiose spielt (Meluh 1990). Am besten untersucht sind bisher KIF1C aus dem Menschen (Dorner et al. 1998) und aus der Maus *Mus musculus* (Nakagawa et al. 1997), außerdem Ncd aus *Drosophila melanogaster* (Endow 1999). In Pflanzen ist ATK5 aus *Arabidopsis thaliana* (Ambrose et al. 2005) bereits gut untersucht und in *Schizosaccharomyces pombe* sind Pkl1 und Klp2 (Pidoux et al. 1996; Troxell et al. 2001) bekannte Kinesin-14. Außerdem gibt es eine große Gruppe von Kinesinen mit *calponin-homology* Domäne (KCHs), die vielfältige Rollen in Pflanzen übernehmen (Schneider und Persson 2015). In Hefen und Tieren sind meist ein bis drei Kinesin-14 Gene bekannt, die meist eine prominente Rolle bei der Ausprägung der mitotischen oder meiotischen Spindel spielen. In Pflanzen hingegen ist die Familie-14 durch Genduplikation stark angestiegen und auch ihre Funktionen sind äußerst divers.

Kinesin-14 besitzt in tierischen Zellen grundsätzlich drei funktionelle Domänen: Eine N-terminal gelegene Domäne, die vielfältige Funktionen erfüllt, eine zentrale *coiled-coil* Domäne und eine C-terminal liegende Motordomäne (Cross und McAinsh 2014; Vale und Fletterick 1997). In Pflanzen gestaltet sich die Struktur der Kinesin-14 sehr vielfältig. Oft besitzen sie eine zentral oder N-terminal gelegene Motordomäne und unterschiedliche zusätzliche Domänen

(Richardson et al. 2006). Für die meisten Kinesin-14 wurde festgestellt, dass diese sich nicht-prozessiv entlang von Mikrotubuli bewegen (Foster und Gilbert 2000; Zhang et al. 2015a).

## 1.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli bilden in der Pflanzenzelle ein dynamisches Netzwerk, entlang dessen sich Kinesine bewegen. Um zu verstehen, auf welche Weise Kinesine bestimmte Funktionen erfüllen, ist es nötig, eine Vorstellung davon zu haben, wie Mikrotubuli gebildet werden, wie sie sich verändern und welche Eigenschaften sie besitzen.

Die ersten Mikrotubuli wurden sichtbar durch die Erfindung der Elektronenmikroskopie (Ledbetter und Porter 1963). Sie wurden in Zilien und Flagellen, sowie in der Nähe von Zentriolen und Basalkörpern als röhrenförmige Strukturen beobachtet (Burnside 1975). Später wurde deutlich, dass Mikrotubuli in nahezu allen Zellen zu finden sind und dort mit den Membranen zahlreicher Organellen verbunden sind (Burnside 1975). Mikrotubuli sind gerade, oder leicht gebogene röhrenförmige Strukturen und weisen durch diese Struktur eine hohe Widerstandskraft gegenüber Verbiegung auf (Slautterback 1963; Burton 1966). In ihrer Länge sind Mikrotubuli extrem variabel und dynamisch. Innerhalb kürzester Zeit kann sich die Länge von mikroskopisch nicht erkennbar bis hin zu mehreren  $\mu\text{m}$  verändern (Behnke 1967; Desai und Mitchison 1997).

Ein Mikrotubulus setzt sich aus einzelnen, in den meisten Fällen *in vivo* 13 Protofilamenten zusammen (Evans et al. 1985), die jedes für sich relativ instabil sind. Erst die laterale Zusammenlagerung mehrerer dieser Protofilamente führt zur Stabilität dieser und es bildet sich eine, sich durch hohe Steifigkeit auszeichnende Röhre: der Mikrotubulus. Die Protofilamente und entsprechend auch der Mikrotubulus können durch nichtkovalente Anlagerung von Tubulindimeren verlängert werden. Die Dimere bestehen aus je einem globulärem  $\alpha$ -Tubulin und einem globulärem  $\beta$ -Tubulin. Die Anlagerung der Tubulindimere an den Mikrotubulus ist abhängig von der Konzentration der Untereinheiten in der Lösung. Bei hoher Konzentration findet die Anlagerung schneller statt als bei niedriger Konzentration.

Die Depolymerisation läuft im Vergleich zur Polymerisation mit höherer Geschwindigkeit ab. Folgender Mechanismus unterliegt der Polymerisation und der Depolymerisation von Mikrotubuli und wird als dynamische Instabilität bezeichnet (Mitchison und Kirschner 1984): Bei der Anlagerung der Tubulin-Dimere ist GTP an die  $\beta$ -Untereinheit gebunden. Dimere mit

gebundenem GTP lagern sich im 180° Winkel an dem Mikrotubulus an und bilden somit eine gerade Röhre. Nach einer gewissen Zeit wird das GTP in gebundenen Dimeren zu GDP hydrolysiert (Weisenberg et al. 1976; David-Pfeuty et al. 1977; MacNeal und Purich 1978), wodurch eine Konformationsänderung stattfindet. Die Protofilamente biegen sich leicht nach außen und werden am wachsenden Ende durch die GTP-Kappe (Mitchison und Kirschner 1984) zusammengehalten. Entsprechend baut sich eine Spannung im Mikrotubulus auf, die eine zusätzliche Steifigkeit hervorbringt. (Hyman et al. 1995; Alushin et al. 2014; Zhang et al. 2015b). Wächst das polymerisierende Ende langsamer als die Hydrolyse des GTP voranschreitet, so schrumpft die GTP-Kappe. Sobald die vordersten Dimere als Tubulin-GDP vorliegen, können die Protofilamente nicht mehr als Röhre zusammengehalten werden und biegen sich nach außen (Mandelkow und Mandelkow 1985; Mandelkow et al. 1991; Tran et al. 1997). Dieser instabile Zustand führt zu einer raschen Depolymerisierung der einzelnen Protofilamente und damit zur Verkürzung des Mikrotubulus, einer sogenannten „Katastrophe“.

*In vitro* wird zur Polymerisation teilweise das nicht-hydrolysierbare GTP Analogon GMPCPP verwendet. Dadurch kann die GTP-Kappe nicht schrumpfen und der Mikrotubulus bleibt stabil (Mickey und Howard 1995). Beobachtungen der Mikrotubulidynamik zeigen, dass an beiden Enden des Mikrotubulus Polymerisation und Depolymerisation stattfindet, aber mit unterschiedlicher Dynamik. Die Polymerisation des Plusendes verläuft schneller und Katastrophen sind seltener als beim Minusende des Mikrotubulus (Allen und Borisy 1974).

Die Dynamik der Mikrotubuli ist abhängig von Temperatur, Tubulin-Konzentration, Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) und Mikrotubuli-aktiven Substanzen. Höhere Temperaturen stabilisieren Mikrotubuli und beschleunigen die Polymerisation, während sie bei niedrigen Temperaturen depolymerisieren. Je höher die Tubulin-Konzentration in Lösung, desto länger werden Mikrotubuli. Bei einer zu geringen Konzentration an Tubulin in der Lösung findet keine Polymerisation statt. Bei einer bestimmten Konzentration kann der so genannte Tretmühlenmechanismus beobachtet werden (Margolis und Wilson 1978). Dabei wächst das Plusende und erfährt nur mit geringer Wahrscheinlichkeit eine Katastrophe, während das Wachstum am Minusende so gering ist, dass Katastrophen häufiger stattfinden und das Minusende insgesamt schrumpft. Auf diese Weise bewegt sich der Mikrotubulus insgesamt innerhalb der Zelle. Mikrotubuli-aktive Substanzen beeinflussen auf

unterschiedliche Art die Dynamik von Mikrotubuli. Oryzalin wird als Herbizid verwendet und wirkt nur auf pflanzliche Mikrotubuli. Es bindet an Tubulin-Dimere und verhindert die Polymerisation von Mikrotubuli (Morejohn et al. 1987). In der Folge ist die Dynamik der Mikrotubuli in Richtung der Depolymerisation verschoben. Colchicin hat einen ähnlichen Effekt, wirkt aber auch auf tierisches Tubulin (Wilson und Farrell 1986). Eine stabilisierende Wirkung auf Mikrotubuli hat die Substanz Peritaxel, die als das Krebsmedikament Taxol bekannt ist (Schiff et al. 1979). Ein stabilisierender Effekt durch MAPs entsteht meist durch Vernetzung mit anderen Mikrotubuli. Die so entstehenden Mikrotubuli-Bündel sind gegenüber Katastrophen weniger anfällig, da diese nur bis zu Vernetzungsstelle voranschreiten können.

Mikrotubuli spielen eine Rolle in einer Vielzahl von intrazellulären Prozessen. Besonders deutlich wird die Beteiligung von Mikrotubuli bei der Mitose und der Meiose. Mikrotubuli entstehen ausgehend von den Spindelpolen und überlappen sich in der Mitte der Spindel, beziehungsweise binden an die Kinetochore der Chromosomen. Sie sind somit maßgeblich sowohl bei dem Aufbau und der Wahrung der Spindelform als auch bei der Chromosomensegregation beteiligt. In der Interphase sind Mikrotubuli am intrazellulären Transport von Vesikeln und Proteinkomplexen beteiligt, indem sie Strukturen bilden, entlang derer sich Kinesine bewegen können. Nach einem ähnlichen Prinzip bilden Mikrotubuli die Basis für die Organisation des Cytoplasmas, so werden mit ihrer Hilfe Chloroplasten und der Zellkern positioniert. Darüber hinaus leisten sie ihren Beitrag zur korrekten Ausbildung von Zellpolaritäten, beeinflussen die Morphogenese einer Zelle und weisen in migrierenden Zellen die Richtung. Direkt an der Bewegung beteiligt sind Mikrotubuli in Zilien und an der Basis von Flagellen.

### 1.3 Analyseverfahren Motorproteine

Zur Charakterisierung von Motorproteinen wird oft die Geschwindigkeit, Direktionalität, Prozessivität und die Fähigkeit der Interaktion mit *Cargo* während der Bewegung bestimmt. Dazu wird die Bewegung von Motorproteinen, Mikrotubuli oder *Cargo* unter dem Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum beobachtet und anschließend computergestützt ausgewertet. Zur *in vitro* Charakterisierung von Motorproteinen werden üblicherweise drei verschiedene Assays durchgeführt, die bei Bedarf modifiziert werden können.

### 1.3.1 Gliding Assay

Beim *Gliding Assay* wird vorwiegend die Geschwindigkeit ermittelt, mit der sich Kinesine entlang von Mikrotubuli bewegen (Abbildung 3). Dazu werden die Kinesine mit Hilfe von Antikörpern fest an eine Glasoberfläche gebunden. Fluoreszenzmarkierte Mikrotubuli binden dann an die beweglichen Motordomänen der Kinesine. In einer ATP-haltigen Umgebung wird ATP durch die Motorköpfe der Kinesine gebunden, gespalten und löst so eine Bewegung der Motorköpfe aus. Entsprechend verschiebt sich der gebundene Mikrotubulus und diese Bewegung kann unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Die Verschiebung des Mikrotubulus pro Zeiteinheit erlaubt die Bestimmung der Geschwindigkeit, mit der sich die Kinesine entlang des Mikrotubulus bewegen.

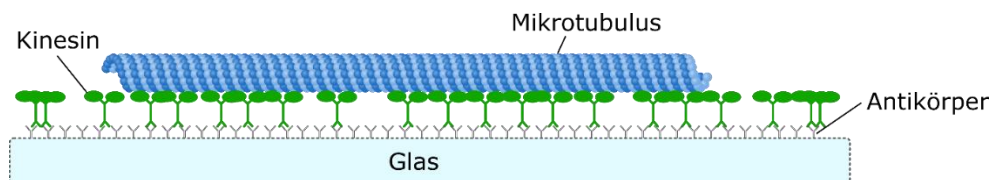


Abbildung 3: Schema eines Gliding-Assays

In einer modifizierten Form kommt dieser Versuchsaufbau für die Bestimmung der Direktionalität der Kinesine zur Anwendung. Statt gleichmäßig fluoreszenzmarkierter Mikrotubuli werden in dieser Variante polaritätsmarkierte Mikrotubuli verwendet, das heißt ein Ende ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert als der Rest des Mikrotubulus. Experimentell bedingt wird meist das Plusende markiert. Bewegen sich die Kinesine in Richtung des Plusendes (in Richtung des markierten Endes), so verschieben sie den Mikrotubulus mit dem unmarkierten Ende voran. Werden entsprechend Mikrotubuli beobachtet, die sich mit dem unmarkierten Ende voran bewegen, handelt es sich bei dem Kinesin um ein Plusende-gerichtetes Kinesin. Bei einem Minusende-gerichteten Kinesin würde man eine Verschiebung der Mikrotubuli mit dem markierten Ende (Plusende) voran beobachten.

### 1.3.2 Stepping Assay

Zur Analyse der Prozessivität eines Motorproteins wird meist der *Stepping Assay* herangezogen (Vale et al. 1996; Korten et al. 2011; Walter et al. 2012)(Abbildung 4). Anders als beim *Gliding Assay* werden in diesem Versuchsaufbau die Mikrotubuli über Antikörper fest an die Glasoberfläche gebunden. Fluoreszenzmarkierte Motorproteine binden an den immobilisierten Mikrotubulus und bewegen sich unter ATP-Verbrauch. Motorproteine, die

prozessiv laufen, sind unter dem Mikroskop als Punkte erkennbar, die sich über eine längere Strecke entlang des Mikrotubulus bewegen. Diffusive Bewegung erkennt man an Punkten, die sich ungerichtet und zufällig hin- und herbewegen. Nicht-prozessive Motorproteine landen nur kurz auf dem Mikrotubulus und sind entsprechend auch nur kurz sichtbar. Eine Bewegung ist nicht zu erkennen, da für die Schrittgröße die Auflösung eines Fluoreszenzmikroskops räumlich und zeitlich nicht ausreicht.

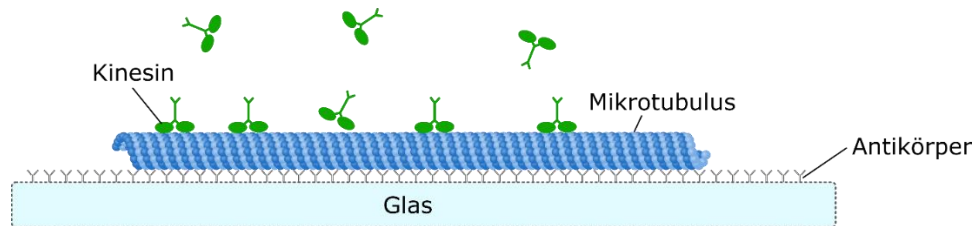


Abbildung 4: Schema eine Stepping-Assays

Da gebundene Motorproteine unter dem normalen Fluoreszenzmikroskop nicht von freien Motorproteinen in Lösung unterschieden werden können, wird dieser Assay mit Hilfe der *total internal reflexion* Fluoreszenzmikroskopie (TIRF-Mikroskopie) durchgeführt (Thompson et al. 1981). Dabei fällt der Laserstrahl, der der Anregung der Fluorophore dient, nicht im rechten Winkel auf die Glasoberfläche des Objektträgers, sondern in einem sehr flachen Einfallswinkel von wenigen Grad. Durch den unterschiedlichen Brechungsindex von Glas und Wasser wird der Laserstrahl an der Glasoberfläche reflektiert. Dabei entsteht oberhalb des Glases in der Versuchslösung eine evaneszente Welle, deren Intensität lediglich 100 bis 200 nm über der Glasoberfläche stark genug ist, um Fluorophore anzuregen. Alle Fluorophore, die weiter entfernt von der Glasoberfläche sich in der Lösung befinden, werden nicht angeregt und sind somit nicht sichtbar. Da Mikrotubuli einen entsprechend kleinen Durchmesser von nur 25  $\mu\text{m}$  aufweisen, werden nur solche Motorproteine länger angeregt und sichtbar gemacht, die direkt mit dem Mikrotubulus assoziiert sind.

### 1.3.3 Sliding Assay

Ein *Sliding Assay* wird verwendet, um die Fähigkeit der Kinesine zu untersuchen, Filamente gegeneinander zu verschieben (Abbildung 5). Dabei werden Mikrotubuli ähnlich wie beim *Stepping Assay* fest an die Unterlage gebunden. Kinesine, die eine entsprechende Eigenschaft besitzen, sind dann in der Lage, freie Mikrotubuli entlang des gebundenen Mikrotubulus zu verschieben. Um die Mikrotubuli voneinander unterscheiden zu können werden bei der Herstellung der gebundenen und der freien Mikrotubuli unterschiedliche



Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Außerdem müssen für diesen Assay spezielle Antikörper verwendet werden, die nicht an Tubulin generell, sondern an ein spezielles Antigen binden, mit dem nur die fest gebundenen Mikrotubuli markiert sind. Der Grund dafür ist, dass sonst auch die freien Mikrotubuli an die Unterlage binden würden und dann nicht mehr frei verschiebbar wären.

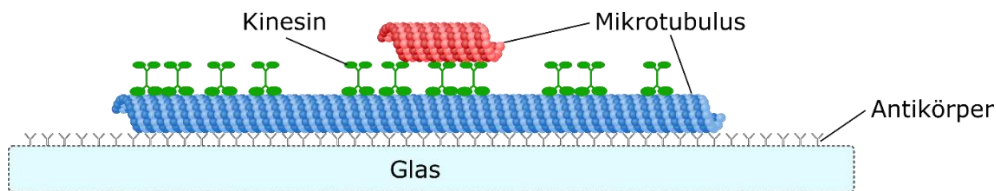


Abbildung 5: Schema eines Sliding-Assays

In einem alternativen Assay werden statt freier Mikrotubuli Aktinfilamente verwendet, die von den Kinesinen entlang von fest gebundenen Mikrotubuli transportiert werden. In den Publikationen wird dieser Assay als Aktin-Transport-Assay bezeichnet.

#### 1.4 Ausprägung der mitotischen Spindel

Sowohl Kinesin-5 als auch Kinesin-14 spielen eine bedeutende Rolle in der Ausprägung der mitotischen Spindel. Aus diesem Grund ist der Grundaufbau und Funktion dieser in diesem Abschnitt dargestellt. Außerdem wird auf den Unterschied zwischen der tierischen und der pflanzlichen Spindel eingegangen.

In allen eukaryotischen Zellen wird während der Zellteilung eine mitotische Spindel ausgebildet. Diese besteht aus Mikrotubuli, die von zwei Polen ausgehend sich in der Mitte überlappen, beziehungsweise an die Chromosomen binden. Mit Hilfe des Spindelapparates gelingt es der Zelle, die Chromosomen gleichmäßig und korrekt auf die beiden Zellen aufzuteilen. Die Ausprägung einer intakten Spindel ist also Voraussetzung für die erfolgreiche Chromosomensegregation und Zellteilung. Obwohl dieses Grundprinzip sowohl in tierischen als auch pflanzlichen Zellen Bestand hat, unterscheidet sich der exakte Mechanismus und die Morphologie des Spindelapparates in bestimmten Bereichen.

In tierischen Zellen befindet sich während der Interphase ein Organell in der Nähe des Zellkerns, von dem die Bildung der Spindelmikrotubuli ausgeht und organisiert wird. Innerhalb dieses als Zentrosom bezeichneten Organells befindet sich ein Zentriolenpaar, welches aus kurzen, eine zylindrische Form bildenden Mikrotubuli besteht. Zu Beginn der Prophase verdoppelt sich das Zentriolenpaar und wandert entlang der sich auflösenden Kernmembran

zu den gegenüberliegenden Seiten des Zellkerns. Während dieses Prozesses spannen sich zwischen den sich voneinander entfernenden Zentriolen Polmikrotubuli. Diese sind jeweils von einem der Zentriolenpaare ausgehend und so lang, dass sie sich in der Mitte überlappen. Dabei sind die Minusenden der Mikrotubuli an den Zentriolen verankert, während die Plusenden in Richtung des anderen Zentriolenpaares auswachsen. Die Zentrosomen mit den Zentriolen sind außerdem über Astralmikrotubuli mit der Zellmembran verbunden, die in die entgegengesetzte Richtung der Polmikrotubuli auswachsen. In der Metaphase ist der Spindelapparat voll ausgebildet und bietet ein stabiles Grundgerüst für die Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene. Dabei binden Kinetochormikrotubuli mit dem Plusende an die Zentromere der Chromosomen und richten sie auf die Weise korrekt aus. In der Anaphase verkürzen sich die Kinetochormikrotubuli und ziehen so die Chromosomen in Richtung der Zentrosomen zu den beiden Polen der Zellteilungsspindel. Die Spindelpole sind den gesamten Prozess über stark an den Zentrosomen fokussiert.

In pflanzlichen Zellen gibt es deutliche Unterschiede in der Morphologie der Zellteilungsspindel, die sich vor allem auf die Anordnung der Mikrotubuli beziehen und bei denen die Hauptursache im Fehlen von klassischen Zentrosomen liegt. Ob man in pflanzlichen Zellen von Zentrosomen sprechen kann, ist eine aktuelle Diskussion, denn in pflanzlichen Zellen wurden bisher keine Zentriolen nachgewiesen. Nichtsdestotrotz sind Pflanzen in der Lage eine bipolare Zellteilungsspindel auszubilden, die korrekt Chromosomen auf die Tochterzellen aufteilt. Der genaue Mechanismus, wie Pflanzen in Abwesenheit von Zentriolen eine bipolare Spindel ausprägen, ist noch nicht geklärt. In der Interphase liegen wie in tierischen Zellen kortikale Mikrotubuli in der Zelle vor, die jedoch nicht zentral vom Zentrosom ausgehen, sondern eher von der Zellkernhülle und von dort in die Peripherie ausstrahlen. Sobald die Zelle in die frühe Prophase eintritt, findet eine Reorientierung der kortikalen Mikrotubuli statt und sie lagern sich tangential zur Kernmembran an. Dabei geschieht dies nicht gleichmäßig verteilt, sondern es bilden sich gegenüberliegende, nahe an der Kernhülle liegende Pole aus, an denen die Mikrotubuli fokussiert vorliegen. Diese Struktur wird Prophasespindel genannt und ist spezifisch für pflanzliche Zellen. Während der Auflösung der Kernmembran bildet sich von der Prophasespindel ausgehend die mitotische Spindel aus. Diese besteht, vergleichbar mit tierischen Zellen, aus Polmikrotubuli, die sich in der mittleren Zone überlappen, und Kinetochormikrotubuli, die an die Zentromere der Chromosomen binden. Im Unterschied zu tierischen Zellen liegen die Pole der Metaphasespindel jedoch nicht

fokussiert vor, sondern die Pole sind erweitert und bilden eine Struktur, die nach mehreren kleinen Einzelspindeln aussieht. Man spricht hier zum Teil von diffusen Zentrosomen, falls man ein Zentrosom ohne Zentriolenpaar als solches bezeichnen kann. In der Anaphase werden in Pflanzenzellen ebenfalls die Kinetochormikrotubuli verkürzt, wodurch die Chromosomen sich zu den Polen bewegen. In dieser Phase können die Pole mal mehr mal weniger fokussiert vorliegen, abhängig von der Pflanzenart.

#### 1.5 Zusammenfassung Schattner et al. (2020)

Zur Befruchtung der pflanzlichen Eizelle wächst ein Pollenschlauch aus dem Pollenkorn in das Fruchtblattgewebe ein. Innerhalb des Pollenschlauches werden die Spermienzellen zur Eizelle transportiert. In *Arabidopsis thaliana* ist die Bewegung der Spermienzellen innerhalb des Pollenschlauches durch mehrere Vor- und Zurückbewegungen charakterisiert. Welcher Transportmechanismus dieser Bewegung zu Grunde liegt, ist bisher noch nicht endgültig aufgeklärt. Die zwei Spermienzellen sind miteinander und mit dem vegetativen Kern des Pollens verbunden und werden so gemeinsam als *male germ unit* transportiert. Bisher ging man davon aus, dass der vegetative Kern über das Aktin-Myosin-Netzwerk transportiert wird und die Spermienzellen sich passiv über die Verbindung zum vegetativen Kern mitbewegen. In der Publikation wird allerdings gezeigt, dass die Spermienzellen teilweise voneinander getrennt werden und trotzdem unabhängig davon die saltatorischen Bewegungen vollführen. Außerdem werden die Spermienzellen mit längeren und schnelleren Bewegungen in Richtung der Pollenschlauchspitze als in Richtung des Pollenkorns transportiert. Von Schattner et al. (2020) wurde daher ein Modell entwickelt, dass die saltatorischen Bewegungen über einen KCH-vermittelten Transport erklärt, dem ein *tug-of-war* Mechanismus zu Grunde liegt. Diese Untergruppe der Kinesin-14 bindet dabei an einen Mikrotubulikäfig, der sich um die Spermienzellen herum befindet. Das Modell basiert zum einen auf *in vitro* Experimenten mit KCH Motorproteinen und zum anderen auf der Validierung mit einem mathematischen Modell.

#### 1.6 Zusammenfassung Strauß et al. (2021)

Die meisten Kinesin-5 in tierischen Systemen haben ihr Hauptfunktion in der Ausprägung der mitotischen Spindel. In der Publikation (Strauß et al. 2021) wurde überprüft, ob die pflanzlichen Kinesin-5 wie ihre tierischen Homologe in der Lage sind, ihre vorausgesagte Rolle in der mitotischen Spindel zu übernehmen. In tierischen Zellen ist die Hauptaufgabe von

Kinesin-5, die sich in der mittleren Spindelzone überlappenden Mikrotubuli zu vernetzen und so gegeneinander zu verschieben, dass die Spindel auseinandergeschoben, also verlängert wird. Diese Funktion wird vor allem durch die besondere tetramere Struktur des Kinesin-5 ermöglicht, bei der an den gegenüberliegenden Enden der *coiled-coil* Struktur jeweils zwei Motordomänen verortet sind. Durch die Experimente, deren Ergebnisse in der Publikation dargestellt wurden, konnte bestätigt werden, dass das Kinesin-5 alle biophysikalischen Voraussetzungen erfüllt, um die Funktion innerhalb der pflanzlichen Spindel zu übernehmen, die auch für tierische Zellen gilt. Darüber hinaus wurde allerdings festgestellt, dass das Kinesin-5 in Pflanzen wohlmöglich weitere, pflanzenspezifische Funktionen übernimmt. Ein deutlicher Hinweis darauf ist die Tatsache, dass das untersuchte Kinesin-5 aus *Arabidopsis thaliana* eine ungewöhnlich hohe Prozessivität aufweist, die normalerweise mit Kinesinen assoziiert ist, die am Langstreckentransport von Proteinen beteiligt sind. Außerdem verschiebt Kinesin-5 mit einer unerwartet niedrigen Geschwindigkeit Mikrotubuli gegeneinander. Dies hängt entweder mit einem unterschiedlichen Aufbau der mitotischen Spindel in Pflanzenzellen zusammen oder ist ebenfalls ein Hinweis auf eine pflanzenspezifische Funktion. Der stärkste Hinweis auf pflanzenspezifische Funktionen von Kinesin-5 ist allerdings, dass vor allem eine Promotoraktivität im vaskulären Gewebe festgestellt wurde und nicht wie erwartet in meristematischem Gewebe.

## 2 Diskussion

Aus der Einleitung leiten sich folgende Hypothesen ab, die mit Hilfe der beiden eigenen Publikationen und weiteren Publikationen untersucht und in den folgenden Kapiteln diskutiert werden.

**Die Funktionsweise und auch der Funktionsort pflanzlicher Kinesine-14 unterscheidet sich stark von denen ihrer nichtpflanzlichen Homologe. Außerdem haben pflanzliche Kinesin-14 eine unvergleichlich hohe Diversität in ihrer Struktur. Es kann daher nicht vom tierischen auf das pflanzliche System geschlossen werden, sondern eine eigenständige Untersuchung der Funktion pflanzlicher Kinesin-14 ist notwendig.**

**Die Gruppe der Kinesin-5 ist strukturell hoch konserviert, daher unterscheiden sich die Funktionen im Tier- und Pflanzenreich nur geringfügig voneinander.**

### 2.1 KCH vermittelter Spermienzelltransport in Pflanzen

In der Publikation Schattner et al. (2020) habe ich mich mit einer pflanzenspezifischen Funktion eines Kinesin-14 beschäftigt. Einige KCHs aus *Arabidopsis thaliana* spielen vermutlich eine Rolle beim Transport von Spermienzellen innerhalb des Pollenschlauches. Die Spermienzellen von *Arabidopsis thaliana* zeigen eine saltatorische Bewegung auf ihrem Weg innerhalb des Pollenschlauches. Solche saltatorischen Bewegungen sind bereits von Organellen, Vesikeln und anderen Strukturen innerhalb der Zelle in vielen tierischen Systemen bekannt. Dabei wechseln sich Phasen der Bewegung in die eine Richtung mit Pausen und Phasen der Bewegung in die andere Richtung ab. Diese saltatorischen Bewegungen wurden zunächst in Axonen von Tintenfischneuronen für größere transportierte Organellen beobachtet (Vale 1985) und später auch in anderen Zellen und für andere zu transportierende Zellbestandteile wie zum Beispiel Chromosomen (Sutradhar und Paul 2014). Es ist allgemein akzeptiert, dass diese Bewegungen auf dem Zusammenspiel von Motorproteinen beruht, die am gleichen Cargo ansetzen, aber in unterschiedliche Richtungen wirken. Durch einen *tug-of-war* Mechanismus und kooperative Mechanismen entstehen dann wechselnde Bewegungen in die eine oder die andere Richtung (Müller et al. 2008). Bei den meisten beschriebenen Fällen von saltatorischen Bewegungen, die auf einen *tug-of-war* Mechanismus zurückzuführen sind, sind Kinesine als Plusende-gerichtete Motorproteine und Dyneine als Minusende-gerichtete Motorproteine beteiligt (Hendricks et al. 2010)(Abbildung 6). Für diese Kombination gibt es

darüber hinaus zahlreiche Simulationen und Ergebnisse aus *in vitro* Experimenten (Rezaul et al. 2016; Monzon et al. 2020).

Im Gegensatz zu tierischen Organismen wurden in höheren Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* bisher keine Dyneine nachgewiesen (Wickstead und Gull 2007; Lawrence et al. 2001). Ein *tug-of-war* Mechanismus zwischen Plusende-gerichtetem Kinesin und Minusende-gerichtetem Dynein kommt für den Fall der sich saltatorisch bewegenden Spermienzellen entsprechend nicht in Frage. Es wurde bereits mehrfach vermutet, dass in Pflanzen die Minusende-gerichteten Kinesine der Kinesin-14 Familie die Aufgaben der Dyneine übernehmen (Lee et al. 2015; Zhu und Dixit 2012; Gicking et al. 2018). Für diese Theorie spricht, dass die Familie der Kinesin-14 sich in Landpflanzen zeitgleich zu dem Verlust der Dyneingene stark vergrößerte, um so die vielfältigen Funktionen dieser übernehmen zu können (Reddy und Day 2001; Richardson et al. 2006). Die Vermutung liegt entsprechend nahe, dass auch bei den saltatorischen Bewegungen Dynein, als Antagonist zu einem Plusende-gerichteten Kinesin, durch Minusende-gerichtete Kinesin-14 ersetzt wurde.

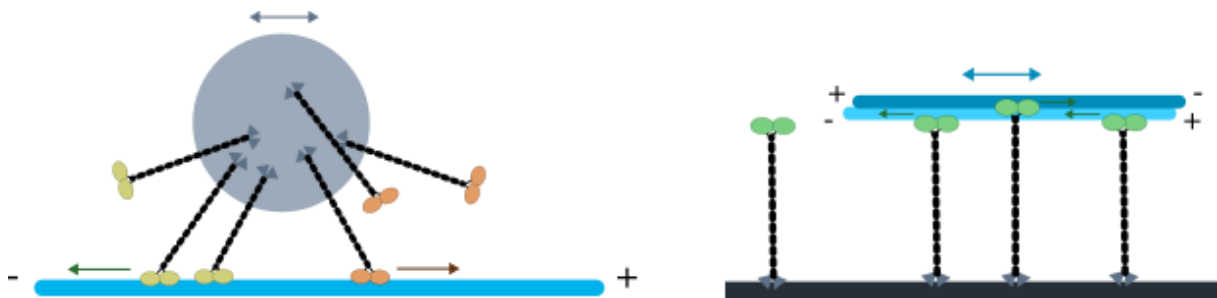


Abbildung 6: Links: Tug-of war durch Minusende-gerichtete Motorproteine (gelb) und Plusende-gerichtete Motorproteine (orange). Beide Motorproteine sind statisch mit dem Cargo (grau) verbunden und bewegen sich entlang eines Mikrotubulus (blau). Rechts: Minusende-gerichtetes Kinesin-14 bewegt sich entlang von antiparallel miteinander vernetzten Mikrotubulibündeln (blau) und verschieben diese auf diese Weise. Sie sind fest mit der Unterlage (schwarz) verbunden.

In dem in Schattner et al. (2020) von mir beschriebenen Modell wird nicht nur Dynein durch ein Minusende-gerichtetes Kinesin ersetzt, sondern sogar erklärt, wie entgegengesetzte Bewegungen durch dasselbe Motorprotein hervorgerufen werden können. Die Idee dahinter ist, dass es sich bei dem Cargo um antiparallel ausgerichtete Mikrotubulibündel handelt (Abbildung 6). Je nachdem, ob die Kinesine an die eine Population von Mikrotubuli bindet oder an die andere, werden die Mikrotubulibündel entweder nach rechts oder nach links verschoben. In diesem Falle bewegen sich die Motorproteine nicht mit dem Cargo mit, sondern verbleiben an Ort und Stelle. Lediglich die Mikrotubulibündel vollführen saltatorische Bewegungen.

Im Falle der *Arabidopsis thaliana* Spermienzellen sind die vorwärts gerichteten Bewegungen in Richtung der Pollenschlauchspitze normalerweise länger und schneller als die rückwärtsgerichtete Bewegung in Richtung des Pollenkorns. Daraus resultiert gezwungenermaßen eine Nettobewegung in Vorwärtsrichtung. Indem ich die experimentellen Daten mit Modelldaten verglichen habe, konnte ich zeigen, dass diese Bewegung mit einem *Tug-of-war* Mechanismus beschrieben werden kann. Dabei interagieren KCHs mit dem Mikrotubulikäfig, der die Spermienzellen umgibt.

Folgende Anordnung der Kinesine, Aktinfilamente und Mikrotubuli liegt dem Modell zu Grunde (Abbildung 7): Im Pollenschlauch befinden sich entlang der Pollenschlauchmembran Aktinfilamente, die fest an der Membran verankert sind. Die Ausrichtung der Aktinfilamente ist parallel, mit dem Plusende immer in der Richtung der Pollenschlauchspitze und dem Minusende immer in Richtung der Basis des Pollenschlauchs (Lenartowska und Michalska 2008). Über die *calponin-homology*-Domäne sind KCH-Motorproteine statisch mit den Aktinfilamenten an der Membran verknüpft. Über die Motordomäne sind die Kinesine in der Lage dynamisch an die Mikrotubuli zu binden, die sich um die Spermienzellen herum befinden (Schattner et al. 2020). Durch die Bewegung der Kinesine entlang der Mikrotubuli bewegen sie das gesamte Mikrotubuli-Spermienzell-Konstrukt innerhalb des Pollenschlauchs.

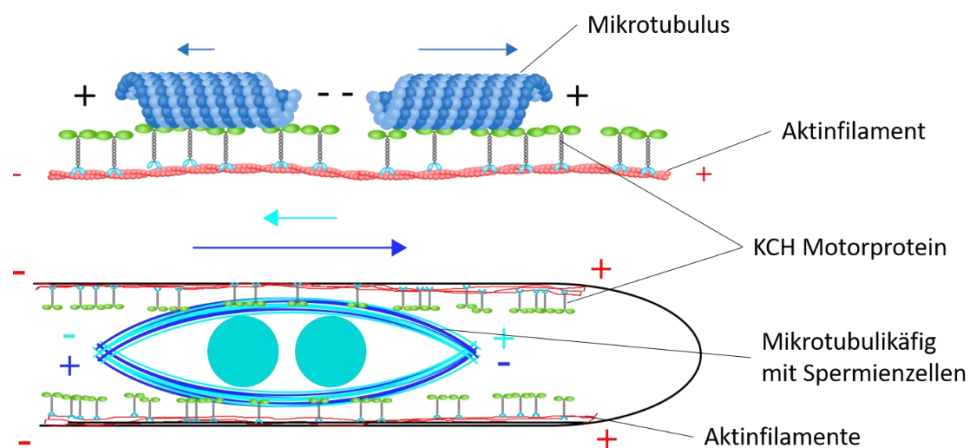


Abbildung 7: Schema des Modells für den Transport von Spermienzellen im Pollenschlauch von *Arabidopsis thaliana* durch KCHs vermittelt. Oben: Schema eines inversen Aktin-Transport-Assays bei dem das Aktinfilament (rot) fest gebunden ist und die Mikrotubuli (blau) entlang des Aktinfilaments durch KCHs (grün) transportiert werden. Je nach Ausrichtung der Mikrotubuli in Bezug auf das Aktinfilament ergibt sich eine Transportrichtung hin zum Plus- oder Minusende des Aktinfilaments. Unten: Die Spermienzellen (hellblaue Punkte) sind von antiparallel ausgerichteten Mikrotubuli (hellblau und dunkelblau) umgeben. Die KCHs (grün) sind fest mit den Aktinfilamenten (rot) und somit mit der Pollenschlauchwand (schwarz) verbunden. Je nach Anzahl der Motorproteine, die an die eine oder andere Population von Mikrotubuli binden, bewegt sich der gesamte Mikrotubulikäfig mit den Spermienzellen in Richtung der Pollenschlauchspitze oder in Richtung des Pollenkorns.

Ich gehe davon aus, dass die saltatorischen Bewegungen aus einem *tug-of-war* Szenario hervorgehen, das durch eine antiparallele Anordnung der Mikrotubuli um die Spermienzellen herum entsteht. Binden die Kinesine an Mikrotubuli, deren Plusende in Richtung der Pollenschlauchspitze zeigt, so bewegt sich, auf Grund der Minusende-gerichteten Bewegung der Kinesin-14, der Mikrotubuli-Käfig in Richtung der Pollenschlauchspitze. Binden hingegen die Kinesine an die Mikrotubuli deren Minusende in Richtung der Pollenschlauchspitze zeigt, so schieben diese den Mikrotubuli-Käfig und damit die Spermienzellen in die entgegengesetzte Richtung zum Pollenkorn (Abbildung 7). Es wirken entgegengesetzte Kräfte auf die Mikrotubuli ein, die sich zum Teil aufheben. Eine tatsächliche Bewegung in die ein oder andere Richtung entsteht, wenn die Anzahl der gebundenen Kinesine sich nicht im Gleichgewicht befindet. Da KCHs wahrscheinlich nicht-prozessive Motorproteine sind (Walter et al. 2015), das heißt sie lösen sich nach jedem Kraftschlag vom Mikrotubulus, entstehen zu jedem Zeitpunkt neue Kombinationen aus Kinesinen, die in die eine oder die andere Richtung wirken. Ist der Mikrotubuli-Käfig allerdings erst einmal in Bewegung gesetzt, fördert dies die Bindung der Kinesine an die entsprechende Richtung, sodass eine länger dauernde Bewegung in eine Richtung möglich wird (Müller et al. 2008). Erst sobald durch Zufall oder durch Regulationsmechanismen wieder genug Kinesine an die andersherum ausgerichteten Mikrotubuli binden, kehrt sich die Bewegungsrichtung um.

Eine Voraussetzung dafür, dass sich auf diese Weise der Spermienzellkäfig insgesamt gesehen in Richtung der Pollenschlauchspitze bewegt, ist, dass die Bewegungen in Vorwärtsrichtung schneller und/oder länger sind als die Bewegungen in die umgekehrte Richtung. Tatsächlich habe ich experimentell nachweisen können, dass eine Kombination aus sowohl schnelleren als auch länger andauernden Bewegungsphasen den Grund für die Nettobewegung in Richtung der Pollenschlauchspitze darstellt. Da aber sowohl für die Vorwärts- als auch für die Rückwärtsbewegung ein und dasselbe Motorprotein verantwortlich ist, müssen die unterschiedlichen Transportdynamiken durch die Ausrichtung von Aktinfilamenten im Bezug zum Mikrotubulus zustande kommen.

In Walter et al. (2015) wurde gezeigt, dass OsKCH1, ein KCH aus Reis *in vitro* Aktinfilamente entlang von Mikrotubuli transportiert. Auffällig war, dass für die Aktinfilamente nicht nur eine, sondern zwei unterschiedliche Transportgeschwindigkeiten ermittelt wurden, mit denen die Aktinfilamente im Aktin-Transport-Assay durch die Motorproteine bewegt werden. Ein



Filament bewegt sich entweder mit der langsameren oder mit der schnelleren Geschwindigkeit. Ein Wechsel der Geschwindigkeiten findet nur statt, wenn ein Aktinfilament das Ende eines Mikrotubulus erreicht und in entgegengesetzter Orientierung erneut bindet. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Orientierung von Aktinfilamenten im Bezug zum Mikrotubulus einen direkten Einfluss auf die Transportgeschwindigkeit der Aktinfilamente hat. Welche Ausrichtung zu welcher Geschwindigkeit führt, konnte im Rahmen der Veröffentlichung noch nicht ermittelt werden. Experimente, die ich mit polaritätsmarkierten Aktinfilamenten durchgeführt habe, deuten allerdings darauf hin, dass Aktinfilamente, die mit den Minusende voran transportiert werden, sich schneller bewegen, als Aktinfilamente, die mit dem Plusende voran transportiert werden.

Der Grund für die unterschiedlichen Geschwindigkeiten liegt vermutlich in einer erhöhten Steifigkeit des OsKCH1. Im Vergleich zu Kinesin-1 weist OsKCH1 im Rotationsassay eine wesentlich geringere Rotationsfreiheit auf (Walter et al. 2015). Geht man davon aus, dass sowohl die CH-Domäne als auch die Motordomäne eine inhärente Bindeorientierung an Aktinfilamente bzw. Mikrotubuli aufweist, so ergibt sich für die eine Orientierung von Aktinfilament zu Mikrotubulus eine für das Motorprotein günstige Konformation, wodurch eine schnelle Transportgeschwindigkeit erreicht wird. Für die ungünstigere Ausrichtung von Aktinfilament zu Mikrotubulus muss sich das Motorprotein intern verdrehen, um die korrekte Bindung sowohl an Aktinfilament und Mikrotubulus zu vollziehen (Abbildung 8). Durch die geringe Rotationsfähigkeit ist OsKCH1 vermutlich in diesem Fall weniger gut in der Lage, sich entlang des Mikrotubulus zu bewegen und die Transportgeschwindigkeit ist entsprechend langsam.

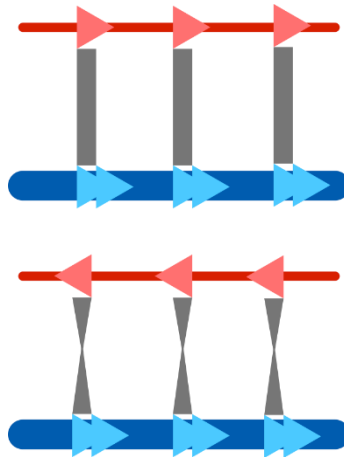


Abbildung 8: Schema eines Aktin-Transport-Assays mit zwei unterschiedlichen Ausrichtungen des transportierten Aktinfilaments: Oben: Das Aktinfilament (rot) befindet sich in der günstigen Ausrichtung, wodurch die coiled-coil Domäne (grau) nicht verdreht ist und sich somit die Motordomänen (hellblau) mit einer höheren Geschwindigkeit entlang des Mikrotubulus (dunkelblau) bewegen können. Unten: Das Aktinfilament befindet sich in der ungünstigeren Ausrichtung, wodurch die coiled-coil Domäne verdreht ist und sich somit die Motordomänen mit einer niedrigeren Geschwindigkeit entlang des Mikrotubulus bewegen können.

Auf das Modell bezogen können diese Ergebnisse erklären, warum wir unterschiedliche Bewegungscharakteristika in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung der Spermienzellen erkennen. Binden die KCHs an die parallel zu den Aktinfilamenten ausgerichteten Mikrotubuli, so sind die Motorproteine in einer günstigeren Konformation und können mit einer schnelleren Geschwindigkeit den Mikrotubulikäfig in Richtung der Pollenschlauchspitze transportieren. Binden sie jedoch an die antiparallel liegenden Mikrotubuli, so sind sie auf Grund ihrer Steifigkeit in ihrer Bewegung eingeschränkt und können die Spermienzellen nur langsam transportieren. Die biophysikalischen Charakteristika, die für OsKCH1 ermittelt wurden, passen zu denen, die das Modell voraussetzt (Schattner et al. 2020).

Neben OsKCH1 wurde auch OsKCH2 in *in vitro* Versuchen untersucht und ist ebenfalls wie OsKCH1 in der Lage, Aktinfilamente entlang von Mikrotubuli zu verschieben. Man kann daher vermuten, dass sich diese Eigenschaft auch auf andere KCHs und vor allem auf die KCHs in *Arabidopsis* Pollenschläuchen übertragen lässt. Im Gegensatz zu OsKCH1 ist OsKCH2 allerdings das erste sich als einzelner Homodimer prozessiv fortbewegendes pflanzliche Kinesin-14 (Tseng et al. 2018). Tierische Kinesin-14, wie zum Beispiel Ncd und HSET zeigen ebenfalls eine nicht-prozessive Bewegung (deCastro et al. 1999; Foster und Gilbert 2000), OsKCH2 bildet somit eine bemerkenswerte Ausnahme. Die KCH-Motorproteine weisen im Gegensatz zu anderen Kinesin-14 eine zweite *coiled-coil* Domäne auf, die zur Dimerisierung benötigt wird. Die zweite *coiled-coil* Domäne ist bei OsKCH2 für die Prozessivität notwendig, denn die zweite *coiled-coil* Domäne aus OsKCH2 in OsKCH1 kann OsKCH1 Prozessivität verleihen (Tseng et al.

2018). Es wird eine direkte Interaktion der zweiten *coiled-coil* Domäne mit dem Mikrotubulus vermutet, wodurch eine bessere Bindung an den Mikrotubulus gewährleistet wird und somit die Prozessivität gesteigert ist. Walter et al. (2015) hingegen vermuten, dass die zweite *coiled-coil* Domäne in KCHs mit der ersten *coiled-coil* Domäne interagiert und im Homodimer eine tetramere Struktur bildet (Abbildung 9), die für eine gewisse Steifigkeit sorgt und Voraussetzung für die Entstehung der zwei unterschiedlichen Geschwindigkeit im Transport von Aktinfilamenten darstellt.

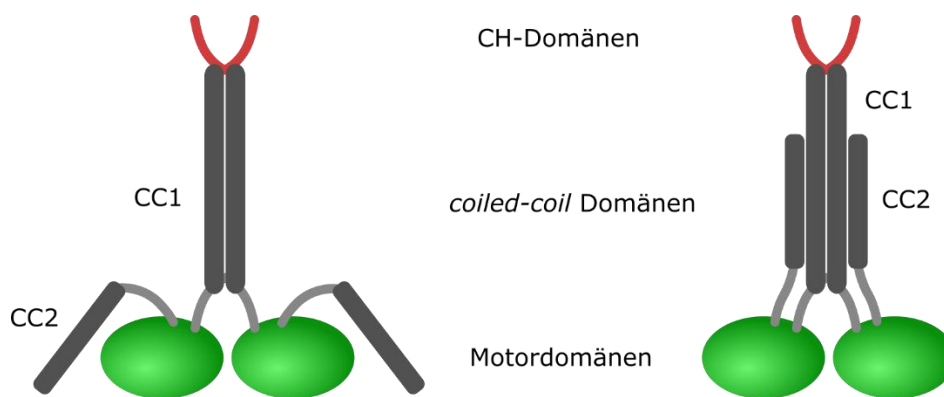


Abbildung 9: Unterschiedliche Hypothesen über die Konformation der zweiten *coiled-coil* Domäne (CC2) in KCHs. Links: CC2 interagiert mit dem Mikrotubulus. Rechts: CC2 interagiert mit der CC1 und bildet eine tetramere Struktur.

Die von Walter et al. (2015) vermutete Funktion der zweiten *coiled-coil* Domäne ist eine Voraussetzung für das in Schattner et al. (2020) publizierte Modell. Falls die zweite *coiled-coil* Domäne aber wie in Tseng et al. (2018) beschrieben mit dem Mikrotubuli interagiert, würde dies dem Modell widersprechen. Tseng et al. (2018) schließen aus der erhöhten Prozessivität von OsKCH2, die auf dem Vorhandensein der zweiten *coiled-coil* Domäne beruht, auf eine Interaktion dieser mit dem Mikrotubulus, wodurch durchaus eine Prozessivität erlangt werden kann. Darüber hinaus kämen aber zwei weitere Mechanismen in Frage, die erklären würden, wie die zweite *coiled-coil* Domäne zur Prozessivität beiträgt und die nicht auf einer Interaktion mit dem Mikrotubulus beruhen. Zum einen ruft eine Erhöhung der ATP-Hydrolysegeschwindigkeit und damit eine veränderte *duty ratio* eine höhere Prozessivität hervor (Hancock 2016). Zum anderen kann die Prozessivität durch verstärkten Zug auf den *neck-linker* erhöht werden. Dies wurde zum Beispiel an Kinesin-1 und Kinesin-2 gezeigt (Shastry und Hancock 2010). Schon kleine Änderungen im *neck-linker* durch Zugabe oder Wegnahme einzelner Aminosäuren führen zu einer Veränderung der Prozessivität (Miyazono et al. 2010). Um eine prozessive Bewegung auszuführen ist es notwendig, dass sich der hintere Motorkopf erst vom Mikrotubulus löst, sobald der vordere gebunden ist. Yildiz et al. (2008)

fanden heraus, dass sich der hintere Motorkopf erst löst, sobald eine gewisse Spannung auf diesem liegt, die durch den *neck-linker* hervorgerufen wird. Eine Verlängerung des *neck-linkers* führte zu einer verringerten Spannung auf dem hinteren Motorkopf und damit zu einer verzögerten Ablösung vom Mikrotubulus und einer geringeren Geschwindigkeit. Eine zusätzliche externe Erhöhung der Spannung mit Hilfe einer optischen Pinzette führte wiederum zu einer normalen Schrittgeschwindigkeit. Eine durch einen verlängerten *neck-linker* hervorgerufene geringere Geschwindigkeit würde mit einer erhöhten Prozessivität einhergehen, da die Zeit, die die Motorköpfe mit dem Mikrotubulus verbunden sind, sich insgesamt verlängert. Ein verringerter intermolekularer Zug würde also zu einer höheren Prozessivität führen können. Auf diese Weise wäre es möglich, dass die Konformation des *coiled-coil* Dimers bzw. Tetramers einen großen Einfluss auf die Prozessivität hat, ohne dass eine Interaktion der zweiten *coiled-coil* Domäne mit dem Mikrotubulus stattfindet.

Es bleibt die Frage zu klären, warum die saltatorische Bewegung der Spermienzellen der kontinuierlichen Bewegung vorzuziehen ist. Einer kontinuierlichen Bewegung würde ein viel simplerer Mechanismus zu Grunde liegen und es müsste deutlich weniger Wegstrecke zurückgelegt werden und entsprechend weniger Energie aufgewendet werden.

Die Bewegung der *male germ unit*, also der Spermienzellen und des vegetativen Kerns im Pollenschlauch scheint stark reguliert zu sein und ist offenbar abhängig von der Geschwindigkeit des Wachstums der Pollenschlauchspitze. Entsprechende Versuche wurden von Sanati Nezhad et al. (2013) mit *Camellia* Pollen durchgeführt. Dabei ließen sie die Pollenschläuche durch enge Kanäle wachsen, die verschiedenen starke Verengungen an den Seiten aufwiesen. Dies sollte den Weg des Pollenschlauches durch den Fruchtknoten simulieren. Sanati Nezhad et al. (2013) wollten herausfinden, wie Pollenschläuche auf Behinderungen mit ihrem Wachstum reagieren. Bei weniger starken Verengungen ist das Wachstum des Pollenschlauches insgesamt nicht gestört. Allerdings beobachteten sie bei ihren Experimenten, dass die Verengung nicht nur auf das Pollenschlauchwachstum einen Einfluss hat, sondern auch auf den Transport der *male germ unit*. Beim uneingeschränkten Wachstum des Pollenschlauches befindet sich die *male germ unit* meist in einem gewissen, etwa gleich bleibenden Abstand hinter der wachsenden Pollenschlauchspitze. Dies ist vermutlich notwendig, damit die Spermienzellen und der vegetative Kern in der hochaktiven Wachstumszone an der Pollenschlauchspitze keine Behinderung darstellen. Darüber hinaus

wären sie direkt an der Spitze weniger geschützt und könnten schneller Schaden nehmen. Daher ist es notwendig, dass die Pflanze einen Regulationsmechanismus aufweist, mit dem sie flexibel auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Pollenschlauchs reagieren und die Transportgeschwindigkeit der *male germ unit* entsprechend anpassen kann. Durch Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften der KCHs über zum Beispiel einen Ionengradienten im Pollenschlauch, wäre es innerhalb des Modells möglich, den Mikrotubulikäfig entweder in eine eher vorwärts gerichtete Bewegung, eine pausierende oder in eine rückwärtsgerichtete Bewegung zu zwingen und somit immer im richtigen Abstand zur ungleichmäßig schnell wachsenden Pollenschlauchspitze zu halten. Dabei befinden sich die Spermienzellen immer in einem dynamischen Gleichgewicht, das heißt auch wenn die aktuelle Position gehalten werden soll, würde sich der Spermienzellkäfig vor- und zurückbewegen, allerdings so, dass keine Nettobewegung in die eine oder die andere Richtung stattfindet.

In der Publikation wird von einem aktiven, über Kinesine vermittelten Transport der Spermienzellen ausgegangen. Dies steht im Gegensatz zu der bisher üblichen Annahme, dass der vegetative Zellkern aktiv über das Aktin-Myosin-Netzwerk transportiert wird und die Spermienzellen passiv über eine Verbindung mit dem vegetativen Zellkern bewegt werden (Lalanne und Twell 2002; Zhang et al. 2017). Ein genauer Mechanismus dieses Myosin-vermittelten Transportes wurde allerdings nie beschrieben. Außerdem habe ich zeigen können, dass die Spermienzellen, sobald sie durch zum Beispiel höhere Temperaturen voneinander getrennt werden, unabhängig voneinander und vom vegetativen Kern im Pollenschlauch bewegt werden (Schattner et al. 2020), was einen passiven Transport ausschließt.

Es ist durchaus wahrscheinlich, dass noch weitere Motorproteine, auch Myosine, am Prozess des Spermienzelltransportes aktiv und regulatorisch beteiligt sind. Ein Beispiel wären hier die KCBPs, Minusende-gerichtete Kinesine, die ebenfalls zur Familie der Kinesin-14 gehören und eine Calmodulinbindedomäne besitzen. Eine Inhibition von SpKinc, einem KCBP Homolog in *Picea abies*, führt zur Bündelung von Mikrotubuli im Pollenschlauch und dadurch zur Verlangsamung des Pollenschlauchwachstums, weil die Organisation von Mikrofilamenten und Mikrotubuli beeinträchtigt ist (Lazzaro et al. 2013). Inwiefern Myosine am Transport der Spermienzellen beteiligt sind und wie deren genauer Mechanismus aussieht, sodass der Weg

der Spermienzellen zur Eizelle in Pflanzen vollständig verstanden werden kann, muss in den nächsten Jahren intensiv erforscht werden.

## 2.2 Die Rolle von Kinesin-5 in der pflanzlichen mitotischen Spindel

AtKRP125b ist das erste pflanzliche Kinesin-5 für das *in vitro* die Direktionalität, Prozessivität und die Fähigkeit, Mikrotubuli gegeneinander zu verschieben, überprüft wurden (Strauß et al. 2021). Eine Plusende-gerichtete Bewegung sowie die Vernetzung und Verschiebung von Mikrotubuli sind eine Voraussetzung dafür, dass Kinesin-5 seine kanonische Funktion in der mitotischen Spindel erfüllen kann. Für viele tierische Kinesin-5 wurde die Funktion in der mitotischen Spindel bereits ausführlich untersucht. Ein Verlust der Funktion von HsEg5, dem humanen Kinesin-5 führt zu unorganisierten bzw. monopolen und kollabierten Spindeln, die anscheinend nicht in der Lage sind, über die Prometaphase hinausgehend funktionale Spindeln auszubilden (Blangy et al. 1995). Das gleiche gilt für das Homolog in *Xenopus laevis* XlEg5 (Sawin et al. 1992). Die Folge davon ist eine *nondisjunction* der Chromosomen und ein Arrest des Zellzyklus. Als Plusende-gerichtetes Motorprotein ist HsEg5 als bipolares Tetramer in der Lage, Mikrotubuli miteinander zu vernetzen und sich entlang beider Mikrotubuli zu bewegen (Kapitein et al. 2015). Als Folge daraus verschiebt Eg5 antiparallel angeordnete Mikrotubuli gegeneinander, während sich bei parallel angeordneten Mikrotubuli die Kräfte aufheben und keine Bewegung zu beobachten ist (Kapitein et al. 2005). Tierisches Kinesin-5 ist sowohl an den Spindelpolen als auch in der mittleren Zone der Spindel aktiv. An den Spindelpolen löst Kinesin-5 Zugkräfte aus, während es in der mittleren Zone die Spindel auseinander drückt indem es sich in Richtung der Plusenden bewegt.

Auch AtKRP125b als pflanzliches Kinesin-5 kann *in vitro* Mikrotubuli miteinander vernetzen und gegeneinander verschieben. Auch eine Plusende-gerichtete Bewegung wurde im *Gliding-Assay* für das pflanzliche Kinesin-5 nachgewiesen (Strauß et al. 2021). Damit ist es auf Grund seiner biophysikalischen Eigenschaften in der Lage, auch in Pflanzen die kanonische Rolle bei der Ausprägung der mitotischen Spindel zu erfüllen. Versuche im Zusammenhang mit den weiteren Kinesin-5 Genen in *Arabidopsis thaliana* bestätigen die Vermutung, dass Kinesin-5 ihre kanonische Rolle bei der Ausprägung der Spindel auch in Pflanzen erfüllen und diese somit über die Reiche konserviert ist. So führt eine Punktmutation im Gen für AtKRP125c wie in tierischen Zellen zu monopolen und kollabierten Spindeln (Bannigan et al. 2007). Außerdem lokalisiert TKRP125, ein Kinesin-5 aus Tabak ebenfalls ähnlich wie Eg5 hauptsächlich in der

mittleren Zone der Metaphasespindel in der Nähe der Chromosomen (Asada et al. 1997). Hier scheint es als bipolares Plusende-gerichtetes Motorprotein für das Auseinanderdriften der Spindelpole verantwortliche zu sein. Auch bezüglich des Domänenaufbaus sind sich tierisches und pflanzliches Kinesin-5 ähnlich. Ebenso wie ihre tierischen Homologe besitzen TKRP125, AtKRP125a, AtKRP125b, AtKRP125c und AtF16L2.60 eine Phosphorylierungsstelle innerhalb der BimC-Box und sind vermutlich, mit Ausnahme von AtF16L2.60, über diese während der Mitose hochreguliert (Vanstraelen et al. 2006).

Unterschiede zwischen der Funktion von tierischem und pflanzlichem Kinesin-5 zeigen sich bereits bei den biomechanischen Eigenschaften in Form einer auffällig geringen Geschwindigkeit im *Sliding-Assay*. Da bei der Verschiebung unabhängig voneinander Kraft auf die beiden antiparallelen Mikrotubuli ausgeübt wird, sollte die Geschwindigkeit doppelt so groß sein wie im *Gliding Assay*, bei dem nur eine Seite des bipolaren Motors Kraft ausüben kann. Diese Vermutung wurde von Kapitein et al. (2005) für Eg5 bestätigt. AtKRP125b zeigt aber sowohl im *Gliding-* als auch im *Slidingassay* eine vergleichbare Geschwindigkeit, ist also beim Verschieben der Mikrotubuli nur halb so schnell wie erwartet. Der genaue Mechanismus, aus dem bei pflanzlichen Kinesin-5 eine verringerte *Sliding*-Geschwindigkeit resultiert, ist bisher nicht untersucht. Es gibt allerdings die Vermutung, dass hier der C-Terminus dieses Proteins eine Rolle spielt (Bodrug et al. 2020): Die Funktion des C-Terminus ist vergleichsweise wenig erforscht. Seine Hauptfunktionalität erreicht Kinesin-5 durch seine Tetramerisierung zu einem bipolaren Kinesin, das mit den Motordomänen an jedem Ende an zwei unterschiedliche Mikrotubuli binden kann. Kryoelektronische Untersuchungen zeigen allerdings, dass anscheinend auch der C-Terminus in gewissem Maße an die Mikrotubuli bindet. Daraus resultiert eine verringerte ATP-Umsetzung und eine entsprechend geringere Schrittfrequenz (Bodrug et al. 2020). Es wäre daher möglich, dass eine noch stärkere Bindung von pflanzlichen Kinesin-5 an Mikrotubuli mit dem C-Terminus dazu führt, dass eine deutlich langsamere *Sliding*-Geschwindigkeit zu beobachten ist. Eine verstärkte Bindung an den Mikrotubulus müsste sich im *Stepping-Assay* auf die Prozessivität auswirken, denn eine längere Bindung an den Mikrotubulus verringert die Wahrscheinlichkeit des Lösens von diesem. Tatsächlich wurde eine ungewöhnlich hohe Prozessivität von AtKRP125b von Strauß et al. (2021) nachgewiesen, was diese Hypothese unterstützt.

Es ist gut möglich, dass die veränderten biophysikalischen Eigenschaften von AtKRP125b darauf zurückzuführen sind, dass in der pflanzlichen Spindel leicht veränderte Kräfte wirken durch die unfokussierten Spindeln und mit Kinesin-14 statt Dynein als Antagonisten. AtKRP125b als auch AtKRP125c sind nicht in der Lage, den Funktionsverlust von Eg5 in tierischen Zellen zu komplementieren (Bannigan et al. 2007). Darüber hinaus inhibiert Monastrol tierisches, aber kein pflanzliches Kinesin-5. Dies spricht dafür, dass der Funktionsmechanismus sich auf pflanzlicher Ebene stark von dem tierischen Funktionsmechanismus unterscheidet. Eine andere Möglichkeit ist, dass die pflanzlichen Kinesin-5 einen pflanzenspezifischen Partner benötigen, um überhaupt ihre Funktion zu erfüllen und sich zu bewegen. Die *in vitro* Assays mit AtKRP125b wurden allerdings mit gereinigtem Protein durchgeführt und es zeigte sich, dass AtKRP125b allein in der Lage ist, Mikrotubuli gegeneinander zu verschieben. Dies widerspricht der Annahme, dass pflanzenspezifische Partner für eine Funktionalität in der mitotischen Spindel benötigt werden. Nicht ausschließen lässt sich allerdings, dass pflanzliche Proteine die Funktion von Kinesin-5 durch posttranslationale Anpassungen regulieren.

Auch in der Lokalisation der Motorproteine in der Spindel gibt es Unterschiede zwischen pflanzlichem und dem tierischem System. AtKRP125c ist zum Beispiel nicht wie Eg5 nur an den Polen und in der mittleren Zone der Spindel zu finden, sondern lagert sich über die komplette Länge der Spindel an die Mikrotubuli an (Bannigan et al. 2007). TKRP125 kolokalisiert außerdem mit perinuklearen bipolaren Mikrotubuli, was bedeuten könnte, dass TKRP125 an der Ausprägung der bipolaren mitotischen Spindel unabhängig vom Vorhandensein von Zentrosomen in Pflanzen beteiligt ist (Asada et al. 1997).

Durch die leicht veränderten biomechanischen Eigenschaften ist es außerdem denkbar, dass AtKRP125b ähnlich wie Kip1 aus Hefe in die Lage versetzt wird, Funktionen außerhalb der mitotischen Spindel zu erfüllen. Kip1 weist eine bidirektionale Bewegung auf, trotzdem ist es an der Ausprägung der mitotischen Spindel beteiligt und für die Stabilität dieser mitverantwortlich (Fridman et al. 2013). Es wird vermutet, dass diese besondere Eigenschaft, Kip1 dazu befähigt, abhängig von der Ionenstärke auch Funktionen außerhalb der mitotischen Spindel zu erfüllen, für die eine Minusende-gerichtete Bewegung benötigt wird. Das dies für AtKRP125b der Fall sein könnte, zeigen Lokalisierungsexperimente von Strauß et al. (2021). Ein GFP-Fusionsprotein von AtKRP125b ist hauptsächlich im Nukleus lokalisiert. Darüber



hinaus ist es auch im Zytoplasma zu finden, was eventuell auf eine zusätzliche Funktion außerhalb der mitotischen Spindel hinweist. Die Promotoraktivität eines Kin5-Promotor-GUS Konstruktes ist hauptsächlich auf vaskuläres Gewebe in Blättern, Kotyledonen und Wurzeln beschränkt. Es wurde interessanterweise keine Promotoraktivität in meristematischen Geweben festgestellt, obwohl man diese dort vermuten würde, falls AtKRP125b eine Rolle in der mitotischen Spindel einnimmt. Auch die vergleichsweise hohe Prozessivität von AtKRP125b könnte ein Hinweis darauf sein, dass es in irgendeiner Form eine eher transportierende als vernetzende und stabilisierende Rolle übernimmt.

### 2.3 Funktionen von Kinesin-5 außerhalb der mitotischen Spindel

Es gibt eine Vielzahl an pflanzenspezifischen Prozessen, an denen Mikrotubuli und entsprechend auch Kinesine beteiligt sind, bei denen Kinesin-5 möglicherweise eine Rolle spielt und die nicht mit der Ausprägung der mitotischen Spindel zusammenhängen.

Eine Mikrotubuli-basierte Besonderheit während der pflanzlichen Zellteilung ist die Ausbildung eines Phragmoplasten, der für die Ausbildung der Zellwand zwischen den sich bei der Zellteilung bildenden Tochterzellen verantwortlich ist. Der Phragmoplast besteht aus zwei Sets aus kurzen Mikrotubuli, die sich in der Mitte überlappen (Hepler und Jackson 1968; Euteneuer und McIntosh 1980). Zur korrekten Funktion dieser Mikrotubuli driften diese auseinander, wobei dieser Prozess ATP-abhängig ist (Asada et al. 1997). Es wird daher vermutet, dass ein Kinesin an dieser Bewegung beteiligt ist. Da Kinesin-5 als bipolares Kinesin in der Lage ist, antiparallele Mikrotubuli gegeneinander zu verschieben (Kapitein et al. 2008) und dies auch für das pflanzliche Kinesin-5 AtKRP125b (Strauß et al. 2021) nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass Kinesin-5 in Pflanzen hier eine Rolle spielt. Dafür spricht, dass ein Verlust der Funktion von TKRP125 durch die Zugabe eines spezifischen Antigens, welches die Motorfunktion blockiert, zu einer reduzierten Translokation von Mikrotubuli im Phragmoplasten führt (Asada et al. 1997).

Eine weitere Mikrotubuli-basierte Besonderheit in Pflanzen ist die Ausbildung eines Präprophasebandes. Es handelt sich hierbei um ein gürtelförmiges Band aus Mikrotubuli, das vor der Prophase gebildet wird und die spätere Zellteilungsebene markiert. TKRP125 kolokalisiert mit kortikalen Mikrotubuli während der Interphase (Asada et al. 1997). Es wird daher vermutet, dass TKRP125 an der Umstrukturierung von kortikalen Mikrotubuli zum Präprophaseband beziehungsweise zu perinuklearen Mikrotubuli beteiligt ist und damit

vorbereitend für die M-Phase wirkt. TKRP125 scheint zusätzlich zu seiner vermuteten Rolle im Phragmoplasten, auch im Präprophaseband eine Rolle zu spielen. Der Wechsel zwischen den beiden Funktionen, Reorganisation des Präprophasebandes und des Phragmoplasten und der klassischen Rolle in der mitotischen Spindel, könnte durch eine Phosphorylierung durch eine cdc2 Kinase hervorgerufen werden (Asada et al. 1997).

AtKRP125c weist nicht nur gegenüber seinen tierischen homolog Eg5, sondern auch gegenüber anderen pflanzlichen Kinsin-5 eine Besonderheit auf: Es ist nicht primär in der mitotischen Spindel an den Polen und in der mittleren Zone zu finden, sondern bindet in allen Zyklusphasen an die komplette Länge der Mikrotubuli. Das gilt für Mikrotubuli der mitotischen Spindel aber auch für kortikale Mikrotubuli in der Interphase (Bannigan et al. 2007). Es wurde herausgefunden, dass in rsw7 Mutanten eine Punktmutation in dem Gen vorliegt, dass für AtKRP125c codiert. Außerdem finden sich in diesen temperatursensitiven Mutanten bei der restriktiven Temperatur von 30 °C unorganisierte kortikale Mikrotubuli in Wurzelzellen in der Interphase. Dieser Phänotyp fällt zusammen mit dem Phänotyp, der dieser Mutante ihren Namen verleiht: geschwollenen Wurzelspitzen. Es könnte sein, dass AtKRP125c eine Rolle bei der Organisation der kortikalen Mikrotubuli in der Interphase hat und ein Verlust dieser Funktion zu unorganisierten Mikrotubuli und dadurch zu morphologisch veränderten Wurzelzellen und Wurzelspitzen führt. Eine andere Möglichkeit ist, dass AtKRP125c wie Eg5 lediglich eine Rolle bei Ausprägung der mitotischen Spindel hat und ein Verlust dieser Funktion sekundär zu einem Verlust der Mikrotubuliorganisation in der Interphase führt. Da eine intakte mitotische Spindel aber nicht unbedingt mit der Morphologie von kortikalen Mikrotubuli korreliert ist, scheint die erste Erklärung wahrscheinlicher zu sein.

Auch in tierischen Zellen ist Kinesin-5 an Prozessen beteiligt, die nichts mit der Ausprägung der mitotischen Spindel zu tun haben. So scheint Eg5 am Transport von Proteinen vom Trans-Golgi-Netzwerk zur Zelloberfläche in Neuronen beteiligt zu sein indem es in den Zellen das Mikrotubulinetzwerk aufrecht erhält (Wakana et al. 2013; Ari et al. 2014). Auch bei der Migration von Neuronen und Krebszellen spielt Kinesin-5 eine Rolle. Über die Menge von exprimierten Kinesin-5 kann die Geschwindigkeit der Migration reguliert werden (Falnikar et al. 2011; Zalenski et al. 2020). Auf Pflanzen lassen sich diese Prozesse nicht übertragen, da es sich um spezifische Zelltypen von Tieren handelt. Darüber hinaus ist ein Kinesin-5 am TOR-Signalweg in *Drosophila melanogaster* beteiligt. mTORC1 ist der Masterregulator für

Wachstum und Zellteilung (Kim et al. 2013). Er wird einerseits durch Wachstumsfaktoren aktiviert, benötigt jedoch für eine vollständige Aktivierung darüber hinaus die Anwesenheit von Aminosäuren (Hara et al. 1998; Wang et al. 1998). Die Anwesenheit von Aminosäuren veranlasst mTORC1 dazu, sich aus dem Zytosol zu den Lysosomen zu bewegen um dort seine Funktion zu erfüllen (Nguyen et al. 2017; Sancak et al. 2010). Durch die Manipulation von Mikrotubulidynamiken oder durch die Suppression von Klp61F, einem Kinesin-5 aus *Drosophila melanogaster*, wird die TORC1 Aktivität gesteigert (Jang et al. 2020). In Zellkulturen zeigte sich, dass ein Knockout von KIF11 oder das Aufbrechen des Mikrotubulinetzwerkes dazu führte, dass mTORC1 auch bei der Abwesenheit von Aminosäuren an den Lysosomen lokalisiert war (Jang et al. 2020). Dies legt die Vermutung nahe, dass das Kinesin-5 in *Drosophila melanogaster* mTORC1 aktiv entlang von Mikrotubuli von den Lysosomen in das Zytosol transportiert und somit inaktiviert wird. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, dass mLST8 als strukturelle Domäne von mTORC1 direkt an die N-terminale Domäne von Kif11 bindet (Jang et al. 2020). Der TOR-Signalweg ist über alle Reiche konserviert, also auch in Pflanzen zu finden. LST8-like Proteins in *Arabidopsis* (Moreau et al. 2012) und *Chlamydomonas* (Díaz-Troya et al. 2008) zeigen die gleiche Domänenanordnung wie LST8 in Tieren und Hefen. Auch die Funktionalität ist ähnlich: LST8-like Proteins aus *Arabidopsis* und *Chlamydomonas* können die Funktion in Hefe komplementieren und binden an TOR (Díaz-Troya et al. 2008; Moreau et al. 2012). Eine Interaktion von LST8 mit einem Kinesin-5 in Pflanzen und eine Beteiligung von Kinesin-5 an diesem Signalweg wäre also theoretisch möglich. Allerdings unterscheidet sich die TOR-Regulation in Pflanzen von der in tierischen Systemen schon allein insofern voneinander, dass Pflanzen anders als Tiere normalerweise Stickstoff nicht in seiner organischen Form aufnehmen und der TOR-Signalweg wird entsprechend weniger stark über das Vorhandensein von Aminosäuren reguliert. Eine Beteiligung von Kinesin-5 an diesem Signalweg ist also durchaus denkbar, muss aber durch entsprechende Experimente untersucht werden.

## 2.4 Fazit

Wie in dieser Arbeit beispielhaft anhand von zwei Kinesinen aus zwei verschiedenen Kinesinfamilien dargestellt wurde, unterscheiden sich die Aufgaben der Kinesine im pflanzlichen Kontext deutlich von den Aufgaben im nichtpflanzlichen Kontext. Sowohl für Kinesin-5 als auch für Kinesin-14 gilt, dass in Pflanzen mehr Homologe, wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden, vorliegen, als im tierischen Genom.

Obwohl sowohl Kinesin-5 in tierischen als auch in pflanzlichen Zellen eine bedeutende Rolle innerhalb der mitotischen Spindel zeigt und diese Funktion reichübergreifend konserviert erscheint, unterscheidet sich das pflanzliche Kinesin-5 dennoch in seiner Prozessivität und seiner Bewegungsgeschwindigkeit von seinen nichtpflanzlichen Homologen. Auffällig ist allerdings, dass Kinesin-5 in Pflanzen meist an Prozessen beteiligt ist, die mit der Zellteilung zusammenhängen, zum Beispiel die Ausbildung eines Phragmoplasten oder des Präprophasebandes. Dies sind beides pflanzenspezifische Strukturen, die in tierischen Zellen nicht zu finden sind. Es scheint also auch bei konservierten Motorproteinen, wie Kinesin-5 notwendig zu sein, nach pflanzenspezifischen Funktionen Ausschau zu halten und diese genau zu untersuchen um ein genaues Bild über die Funktion des Proteins zu erhalten

Die großen funktionalen Unterschiede zwischen Tieren und Pflanzen bezogen auf die Kinesin-14 Familie sind zu einem großen Teil darauf zurück zu führen, dass viele Prozesse in pflanzlichen Zellen grundsätzlich anders ablaufen als in nichtpflanzlichen Zellen. In dieser Arbeit wurde der Prozess des Spermienzelltransportes genauer untersucht, der sich grundlegend von dem Mechanismus in tierischen Systemen unterscheidet. Ein Aufgabe für die Zukunft wird es sein, die weiteren pflanzenspezifischen Funktionen der Kinesin-14 zu untersuchen. Nur so ist es möglich, die ablaufenden Prozesse auch in Pflanzen vollumfänglich nachzuvollziehen und damit eine Grundlage für weitere Forschung und Innovation zu legen.

### 3 Literaturverzeichnis

- Allen, C.; Borisy, G. (1974): Structural polarity and directional growth of microtubules of *Chlamydomonas* flagella. In: *Journal of Molecular Biology* 90 (2), S. 381–402. DOI: 10.1016/0022-2836(74)90381-7.
- Alushin, G. M.; Lander, G. C.; Kellogg, E. H.; Zhang, R.; Baker, D.; Nogales, E. (2014): High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in  $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. In: *Cell* 157 (5), S. 1117–1129. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.053.
- Ambrose, J. C.; Li, W.; Marcus, A.; Ma, H.; Cyr, R. (2005): A minus-end-directed kinesin with plus-end tracking protein activity is involved in spindle morphogenesis. In: *Molecular biology of the cell* 16 (4), S. 1584–1592. DOI: 10.1091/mbc.e04-10-0935.
- Ari, C.; Borysov, S.; Wu, J.; Padmanabhan, J.; Potter, H. (2014): Alzheimer amyloid beta inhibition of Eg5/kinesin 5 reduces neurotrophin and/or transmitter receptor function. In: *Neurobiology of aging* 35 (8), S. 1839–1849. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.006.
- Asada, T.; Kuriyama, R.; Shibaoka, H. (1997): TKRP125, a kinesin-related protein involved in the centrosome-independent organization of the cytokinetic apparatus in tobacco BY-2 cells. In: *Journal of Cell Science* 110 (Pt 2), S. 179–189.
- Bannigan, A.; Scheible, W.; Lukowitz, W.; Fagerstrom, C.; Wadsworth, P.; Somerville, C.; Baskin, T. I. (2007): A conserved role for kinesin-5 in plant mitosis. In: *Journal of Cell Science* 120 (Pt 16), S. 2819–2827. DOI: 10.1242/jcs.009506.
- Behnke, O. (1967): Incomplete microtubules observed in mammalian blood platelets during microtubule polymerization. In: *Journal of Cell Biology* 34 (2), S. 697–701. DOI: 10.1083/jcb.34.2.697.
- Blangy, A.; Lane, H. A.; d'Hérin, P.; Harper, M.; Kress, M.; Nigg, E. A. (1995): Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. In: *Cell* 83 (7), S. 1159–1169. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90142-6.
- Bodrug, T.; Wilson-Kubalek, E.; Nithianantham, S.; Thompson, A.; Alfieri, A.; Gaska, I. et al. (2020): The kinesin-5 tail domain directly modulates the mechanochemical cycle of the motor domain for anti-parallel microtubule sliding. In: *eLife* 9. DOI: 10.7554/eLife.51131.

- Burnside, B. (1975): The form and arrangement of microtubules: an historical, primarily morphological, review. In: *Ann NY Acad Sci* 253 (1 The Biology o), S. 14–26. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1975.tb19189.x.
- Burton, Paul R. (1966): Substructure of Certain Cytoplasmic Microtubules: An Electron Microscopic Study. In: *Science* 154 (3751), S. 903–905. Online verfügbar unter <http://www.jstor.org/stable/1719460>.
- Cross, R. A. (2016): Review: Mechanochemistry of the kinesin-1 ATPase. In: *Biopolymers* 105 (8), S. 476–482. DOI: 10.1002/bip.22862.
- Cross, R. A.; McAinsh, A. (2014): Prime movers: the mechanochemistry of mitotic kinesins. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 15 (4), S. 257–271. DOI: 10.1038/nrm3768.
- David-Pfeuty, T.; Erickson, H. P.; Pantaloni, D. (1977): Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12), S. 5372–5376. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5372.
- deCastro, M. J.; Ho, C. H.; Stewart, R. J. (1999): Motility of dimeric ncd on a metal-chelating surfactant: evidence that ncd is not processive. In: *Biochemistry* 38 (16), S. 5076–5081. DOI: 10.1021/bi9829175.
- Desai, A.; Mitchison, T. J. (1997): Microtubule polymerization dynamics. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13 (1), S. 83–117. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.83.
- Díaz-Troya, S.; Florencio, F. J.; Crespo, J. L. (2008): Target of rapamycin and LST8 proteins associate with membranes from the endoplasmic reticulum in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. In: *Eukaryotic cell* 7 (2), S. 212–222. DOI: 10.1128/EC.00361-07.
- Dorner, C.; Ciossek, T.; Müller, S.; Møller, P. H.; Ullrich, A.; Lammers, R. (1998): Characterization of KIF1C, a new kinesin-like protein involved in vesicle transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (32), S. 20267–20275. DOI: 10.1074/jbc.273.32.20267.
- Düselder, A.; Fridman, V.; Thiede, C.; Wiesbaum, A.; Goldstein, A.; Klopfenstein, D. R. et al. (2015): Deletion of the Tail Domain of the Kinesin-5 Cin8 Affects Its Directionality. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (27), S. 16841–16850. DOI: 10.1074/jbc.M114.620799.

Endow, S. A. (1999): Determinants of molecular motor directionality. In: *Nat Cell Biol* 1 (6), E163-7. DOI: 10.1038/14113.

Endow, S. A.; Henikoff, S.; Soler-Niedziela, L. (1990): Mediation of meiotic and early mitotic chromosome segregation in *Drosophila* by a protein related to kinesin. In: *Nature* 345 (6270), S. 81–83. DOI: 10.1038/345081a0.

Enos, A. (1990): Mutation of a gene that encodes a kinesin-like protein blocks nuclear division in *A. nidulans*. In: *Cell* 60 (6), S. 1019–1027. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90350-N.

Euteneuer, U.; McIntosh, J. R. (1980): Polarity of midbody and phragmoplast microtubules. In: *Journal of Cell Biology* 87 (2 Pt 1), S. 509–515. DOI: 10.1083/jcb.87.2.509.

Evans, L.; Mitchison, T.; Kirschner, M. (1985): Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. In: *Journal of Cell Biology* 100 (4), S. 1185–1191. DOI: 10.1083/jcb.100.4.1185.

Falnikar, A.; Tole, S.; Baas, P. (2011): Kinesin-5, a mitotic microtubule-associated motor protein, modulates neuronal migration. In: *Molecular biology of the cell* 22 (9), S. 1561–1574. DOI: 10.1091/mbc.E10-11-0905.

Foster, K. A.; Gilbert, S. P. (2000): Kinetic studies of dimeric Ncd: evidence that Ncd is not processive. In: *Biochemistry* 39 (7), S. 1784–1791. DOI: 10.1021/bi991500b.

Fridman, V.; Gerson-Gurwitz, A.; Shapira, O.; Movshovich, N.; Lakämper, S.; Schmidt, C. F.; Gheber, L. (2013): Kinesin-5 Kip1 is a bi-directional motor that stabilizes microtubules and tracks their plus-ends in vivo. In: *Journal of Cell Science* 126 (Pt 18), S. 4147–4159. DOI: 10.1242/jcs.125153.

Gicking, A. M.; Swentowsky, K. W.; Dawe, R. K.; Qiu, W. (2018): Functional diversification of the kinesin-14 family in land plants. In: *FEBS Lett* 592 (12), S. 1918–1928. DOI: 10.1002/1873-3468.13094.

Gilbert, S. P.; Webb, M. R.; Brune, M.; Johnson, K. A. (1995): Pathway of processive ATP hydrolysis by kinesin. In: *Nature* 373 (6516), S. 671–676. DOI: 10.1038/373671a0.

Gordon, D. M.; Roof, D. M. (1999): The kinesin-related protein Kip1p of *Saccharomyces cerevisiae* is bipolar. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (40), S. 28779–28786. DOI: 10.1074/jbc.274.40.28779.

Hagan, I.; Yanagida, M. (1990): Novel potential mitotic motor protein encoded by the fission yeast *cut7+* gene. In: *Nature* 347 (6293), S. 563–566. DOI: 10.1038/347563a0.

Hancock, W. (2016): The Kinesin-1 Chemomechanical Cycle: Stepping Toward a Consensus. In: *Biophysical Journal* 110 (6), S. 1216–1225. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.02.025.

Hara, K.; Yonezawa, K.; Weng, Q. P.; Kozlowski, M. T.; Belham, C.; Avruch, J. (1998): Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (23), S. 14484–14494. DOI: 10.1074/jbc.273.23.14484.

Heck, M. M.; Pereira, A.; Pesavento, P.; Yannoni, Y.; Spradling, A. C.; Goldstein, L. S. (1993): The kinesin-like protein KLP61F is essential for mitosis in *Drosophila*. In: *Journal of Cell Biology* 123 (3), S. 665–679. DOI: 10.1083/jcb.123.3.665.

Hendricks, A.; Perlson, E.; Ross, J.; Schroeder, H.; Tokito, M.; Holzbaur, E. (2010): Motor coordination via a tug-of-war mechanism drives bidirectional vesicle transport. In: *Current biology : CB* 20 (8), S. 697–702. DOI: 10.1016/j.cub.2010.02.058.

Hepler, P. K.; Jackson, W. T. (1968): Microtubules and early stages of cell-plate formation in the endosperm of *Haemaphys katherinae* Baker. In: *Journal of Cell Biology* 38 (2), S. 437–446. DOI: 10.1083/jcb.38.2.437.

Hildebrandt, E. R.; Gheber, L.; Kingsbury, T.; Hoyt, M. A. (2006): Homotetrameric form of Cin8p, a *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-5 motor, is essential for its in vivo function. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (36), S. 26004–26013. DOI: 10.1074/jbc.M604817200.

Hirokawa, N.; Noda, Y.; Tanaka, Y.; Niwa, S. (2009): Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (10), S. 682–696. DOI: 10.1038/nrm2774.

Hizlan, D.; Mishima, M.; Tittmann, P.; Gross, H.; Glotzer, M.; Hoenger, A. (2006): Structural analysis of the ZEN-4/CeMKLP1 motor domain and its interaction with microtubules. In: *Journal of Structural Biology* 153 (1), S. 73–84. DOI: 10.1016/j.jsb.2005.10.007.

Hoyt, M. A.; He, L.; Loo, K. K.; Saunders, W. S. (1992): Two *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related gene products required for mitotic spindle assembly. In: *Journal of Cell Biology* 118 (1), S. 109–120. DOI: 10.1083/jcb.118.1.109.



Huang, T. G.; Suhan, J.; Hackney, D. D. (1994): Drosophila kinesin motor domain extending to amino acid position 392 is dimeric when expressed in Escherichia coli. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (23), S. 16502–16507.

Hyman, A. A.; Chrétien, D.; Arnal, I.; Wade, R. H. (1995): Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphonate. In: *Journal of Cell Biology* 128 (1-2), S. 117–125. DOI: 10.1083/jcb.128.1.117.

Jang, Y.; Choi, Y.; Jun, K.; Chung, J. (2020): Mislocalization of TORC1 to Lysosomes Caused by KIF11 Inhibition Leads to Aberrant TORC1 Activity. In: *Molecules and cells* 43 (8), S. 705–717. DOI: 10.14348/molcells.2020.0089.

Kapitein, L.; Kwok, B.; Weinger, J.; Schmidt, C.; Kapoor, T.; Peterman, E. (2008): Microtubule cross-linking triggers the directional motility of kinesin-5. In: *Journal of Cell Biology* 182 (3), S. 421–428. DOI: 10.1083/jcb.200801145.

Kapitein, L. C.; Peterman, E. J. G.; Kwok, B. H.; Kim, J. H.; Kapoor, T. M.; Schmidt, C. F. (2005): The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. In: *Nature* 435 (7038), S. 114–118. DOI: 10.1038/nature03503.

Kashina, A.S; Rogers, G.C; Scholey, J.M (1997): The bimC family of kinesins: essential bipolar mitotic motors driving centrosome separation. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1357 (3), S. 257–271. DOI: 10.1016/S0167-4889(97)00037-2.

Kim, S.; Buel, G. R.; Blenis, J. (2013): Nutrient regulation of the mTOR complex 1 signaling pathway. In: *Molecules and cells* 35 (6), S. 463–473. DOI: 10.1007/s10059-013-0138-2.

Korten, T.; Nitzsche, B.; Gell, C.; Ruhnnow, F.; Leduc, C.; Diez, S. (2011): Fluorescence imaging of single Kinesin motors on immobilized microtubules. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 783, S. 121–137. DOI: 10.1007/978-1-61779-282-3\_7.

Kozielski, F.; Bonis, S. de; Burmeister, W. P.; Cohen-Addad, C.; Wade, R. H. (1999): The crystal structure of the minus-end-directed microtubule motor protein ncd reveals variable dimer conformations. In: *Structure* 7 (11), S. 1407–1416. DOI: 10.1016/S0969-2126(00)80030-1.

Kozielski, F.; Sack, S.; Marx, A.; Thormählen, M.; Schönbrunn, E.; Biou, V. et al. (1997): The Crystal Structure of Dimeric Kinesin and Implications for Microtubule-Dependent Motility. In: *Cell* 91 (7), S. 985–994. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80489-4.

Lalanne, E.; Twell, D. (2002): Genetic Control of Male Germ Unit Organization in Arabidopsis. In: *Plant physiology* 129 (2), S. 865–875. DOI: 10.1104/pp.003301.

Lawrence, C. J.; Morris, N. R.; Meagher, R. B.; Dawe, R. K. (2001): Dyneins have run their course in plant lineage. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2 (5), S. 362–363. DOI: 10.1034/j.1600-0854.2001.25020508.x.

Lazzaro, M. D.; Marom, E. Y.; Reddy, A. S. N. (2013): Polarized cell growth, organelle motility, and cytoskeletal organization in conifer pollen tube tips are regulated by KCBP, the calmodulin-binding kinesin. In: *Planta* 238 (3), S. 587–597. DOI: 10.1007/s00425-013-1919-8.

Le Guellec, R.; Paris, J.; Couturier, A.; Roghi, C.; Philippe, M. (1991): Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA that encodes a kinesin-related protein. In: *Molecular and cellular biology* 11 (6), S. 3395–3398. DOI: 10.1128/mcb.11.6.3395-3398.1991.

Ledbetter, M. C.; Porter, K. R. (1963): A "Microtubule" In Plant Cell Fine Structure. In: *Journal of Cell Biology* 19 (1), S. 239–250. DOI: 10.1083/jcb.19.1.239.

Lee, Y. J.; Lee, B. (2004): Cytoskeletal motors in Arabidopsis. Sixty-one kinesins and seventeen myosins. In: *Plant physiology* 136 (4), S. 3877–3883. DOI: 10.1104/pp.104.052621.

Lee, Y. J.; Qiu, W.; Liu, B. (2015): Kinesin motors in plants: from subcellular dynamics to motility regulation. In: *Current Opinion in Plant Biology* 28, S. 120–126. DOI: 10.1016/j.pbi.2015.10.003.

Lenartowska, M.; Michalska, A. (2008): Actin filament organization and polarity in pollen tubes revealed by myosin II subfragment 1 decoration. In: *Planta* 228 (5), S. 891–896. DOI: 10.1007/s00425-008-0802-5.

MacNeal, R. K.; Purich, D. L. (1978): Stoichiometry and role of GTP hydrolysis in bovine neurotubule assembly. In: *Journal of Biological Chemistry* 253 (13), S. 4683–4687.

Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E. (1985): Unstained microtubules studied by cryo-electron microscopy. In: *Journal of Molecular Biology* 181 (1), S. 123–135. DOI: 10.1016/0022-2836(85)90330-4.

Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E.; Milligan, R. A. (1991): Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. In: *Journal of Cell Biology* 114 (5), S. 977–991. DOI: 10.1083/jcb.114.5.977.

Margolis, R. L.; Wilson, L. (1978): Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro. In: *Cell* 13 (1), S. 1–8. DOI: 10.1016/0092-8674(78)90132-0.

Matthies, H. J.; McDonald, H. B.; Goldstein, L. S.; Theurkauf, W. E. (1996): Anastral meiotic spindle morphogenesis: role of the non-claret disjunctional kinesin-like protein. In: *Journal of Cell Biology* 134 (2), S. 455–464. DOI: 10.1083/jcb.134.2.455.

Meluh, P. (1990): KAR3, a kinesin-related gene required for yeast nuclear fusion. In: *Cell* 60 (6), S. 1029–1041. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90351-E.

Mickey, B.; Howard, J. (1995): Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents. In: *Journal of Cell Biology* 130 (4), S. 909–917. DOI: 10.1083/jcb.130.4.909.

Miki, H.; Okada, Y.; Hirokawa, N. (2005): Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. In: *Trends in Cell Biology* 15 (9), S. 467–476. DOI: 10.1016/j.tcb.2005.07.006.

Mitchison, T.; Kirschner, M. (1984): Dynamic instability of microtubule growth. In: *Nature* 312 (5991), S. 237–242. DOI: 10.1038/312237a0.

Miyazono, Y.; Hayashi, M.; Karagiannis, P.; Harada, Y.; Tadakuma, H. (2010): Strain through the neck linker ensures processive runs: a DNA-kinesin hybrid nanomachine study. In: *The EMBO journal* 29 (1), S. 93–106. DOI: 10.1038/emboj.2009.319.

Monzon, G. A.; Scharrel, L.; DSouza, A.; Henrichs, V.; Santen, L.; Diez, S. (2020): Stable tug-of-war between kinesin-1 and cytoplasmic dynein upon different ATP and roadblock concentrations. In: *Journal of Cell Science* 133 (22). DOI: 10.1242/jcs.249938.

Moreau, M.; Azzopardi, M.; Clément, G.; Dobrenel, T.; Marchive, C.; Renne, C. et al. (2012): Mutations in the Arabidopsis homolog of LST8/GβL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. In: *Plant Cell* 24 (2), S. 463–481. DOI: 10.1105/tpc.111.091306.

Morejohn, L. C.; Bureau, T. E.; Molè-Bajer, J.; Bajer, A. S.; Fosket, D. E. (1987): Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. In: *Planta* 172 (2), S. 252–264. DOI: 10.1007/BF00394595.

Müller, M. J. I.; Klumpp, S.; Lipowsky, R. (2008): Tug-of-war as a cooperative mechanism for bidirectional cargo transport by molecular motors. In: *PNAS* 105 (12), S. 4609–4614. DOI: 10.1073/pnas.0706825105.

Nakagawa, T.; Tanaka, Y.; Matsuoka, E.; Kondo, S.; Okada, Y.; Noda, Y. et al. (1997): Identification and classification of 16 new kinesin superfamily (KIF) proteins in mouse genome. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (18), S. 9654–9659. DOI: 10.1073/pnas.94.18.9654.

Nguyen, T. P.; Frank, A. R.; Jewell, J. L. (2017): Amino acid and small GTPase regulation of mTORC1. In: *Cellular Logistics* 7 (4), e1378794. DOI: 10.1080/21592799.2017.1378794.

Pidoux, A. L.; LeDizet, M.; Cande, W. Z. (1996): Fission yeast pkl1 is a kinesin-related protein involved in mitotic spindle function. In: *Molecular biology of the cell* 7 (10), S. 1639–1655. DOI: 10.1091/mbc.7.10.1639.

Reddy, A. S.; Day, I. S. (2001): Kinesins in the Arabidopsis genome: a comparative analysis among eukaryotes. In: *BMC genomics* 2, S. 2. DOI: 10.1186/1471-2164-2-2.

Rezaul, K.; Gupta, D.; Semenova, I.; Ikeda, K.; Kraikivski, P.; Yu, J. et al. (2016): Engineered Tug-of-War Between Kinesin and Dynein Controls Direction of Microtubule Based Transport In Vivo. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 17 (5), S. 475–486. DOI: 10.1111/tra.12385.

Richardson, D. N.; Simmons, M. P.; Reddy, A. S. N. (2006): Comprehensive comparative analysis of kinesins in photosynthetic eukaryotes. In: *BMC genomics* 7, S. 18. DOI: 10.1186/1471-2164-7-18.

Sablin, E. P.; Case, R. B.; Dai, S. C.; Hart, C. L.; Ruby, A.; Vale, R. D.; Fletterick, R. J. (1998): Direction determination in the minus-end-directed kinesin motor ncd. In: *Nature* 395 (6704), S. 813–816. DOI: 10.1038/27463.

Sanati Nezhad, A.; Naghavi, M.; Packirisamy, M.; Bhat, R.; Geitmann, A. (2013): Quantification of cellular penetrative forces using lab-on-a-chip technology and finite element modeling. In: *PNAS* 110 (20), S. 8093–8098. DOI: 10.1073/pnas.1221677110.

Sancak, Y.; Bar-Peled, L.; Zoncu, R.; Markhard, A. L.; Nada, S.; Sabatini, D. M. (2010): Regulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. In: *Cell* 141 (2), S. 290–303. DOI: 10.1016/j.cell.2010.02.024.

- Sawin, K. E.; LeGuellec, K.; Philippe, M.; Mitchison, T. J. (1992): Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. In: *Nature* 359 (6395), S. 540–543. DOI: 10.1038/359540a0.
- Schattner, S.; Schattner, J.; Munder, F.; Höpfe, E.; Walter, W. J. (2020): A Tug-of-War Model Explains the Saltatory Sperm Cell Movement in *Arabidopsis thaliana* Pollen Tubes by Kinesins With Calponin Homology Domain. In: *Frontiers in plant science* 11, S. 601282. DOI: 10.3389/fpls.2020.601282.
- Schiff, P. B.; Fant, J.; Horwitz, S. B. (1979): Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. In: *Nature* 277 (5698), S. 665–667. DOI: 10.1038/277665a0.
- Schneider, R.; Persson, S. (2015): Connecting two arrays: the emerging role of actin-microtubule cross-linking motor proteins. In: *Frontiers in plant science* 6, S. 415. DOI: 10.3389/fpls.2015.00415.
- Sharp, D. J.; Rogers, G. C.; Scholey, J. M. (2000): Microtubule motors in mitosis. In: *Nature* 407 (6800), S. 41–47. DOI: 10.1038/35024000.
- Shastry, S.; Hancock, W. O. (2010): Neck linker length determines the degree of processivity in kinesin-1 and kinesin-2 motors. In: *Current biology : CB* 20 (10), S. 939–943. DOI: 10.1016/j.cub.2010.03.065.
- Shen, Z.; Collatos, A. R.; Bibeau, J. P.; Furt, F.; Vidali, L. (2012): Phylogenetic analysis of the Kinesin superfamily from *Physcomitrella*. In: *Frontiers in plant science* 3, S. 230. DOI: 10.3389/fpls.2012.00230.
- Slautterback, D. B. (1963): Cytoplasmic Microtubules. I. HYDRA. In: *J Cell Biol* 18 (2), S. 367–388. DOI: 10.1083/jcb.18.2.367.
- Strauß, T.; Schattner, S.; Hoth, S.; Walter, W. J. (2021): The *Arabidopsis thaliana* Kinesin-5 AtKRP125b Is a Processive, Microtubule-Sliding Motor Protein with Putative Plant-Specific Functions. In: *International journal of molecular sciences* 22 (21). DOI: 10.3390/ijms222111361.
- Sutradhar, S.; Paul, R. (2014): Tug-of-war between opposing molecular motors explains chromosomal oscillation during mitosis. In: *Journal of theoretical biology* 344, S. 56–69. DOI: 10.1016/j.jtbi.2013.11.023.

Thompson, N. L.; Burghardt, T. P.; Axelrod, D. (1981): Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy. In: *Biophysical Journal* 33 (3), S. 435–454. DOI: 10.1016/S0006-3495(81)84905-3.

Tran, P. T.; Joshi, P.; Salmon, E. D. (1997): How tubulin subunits are lost from the shortening ends of microtubules. In: *Journal of Structural Biology* 118 (2), S. 107–118. DOI: 10.1006/jsbi.1997.3844.

Troxell, C. L.; Sweezy, M. A.; West, R. R.; Reed, K. D.; Carson, B. D.; Pidoux, A. L. et al. (2001): pkl1(+) and klp2(+): Two kinesins of the Kar3 subfamily in fission yeast perform different functions in both mitosis and meiosis. In: *Molecular biology of the cell* 12 (11), S. 3476–3488. DOI: 10.1091/mbc.12.11.3476.

Tseng, K.; Wang, P.; Lee, Y. J.; Bowen, J.; Gicking, A. M.; Guo, L. et al. (2018): The preprophase band-associated kinesin-14 OsKCH2 is a processive minus-end-directed microtubule motor. In: *Nat Commun* 9 (1), S. 1067. DOI: 10.1038/s41467-018-03480-w.

Vale, R. (1985): Movement of organelles along filaments dissociated from the axoplasm of the squid giant axon. In: *Cell* 40 (2), S. 449–454. DOI: 10.1016/0092-8674(85)90159-X.

Vale, R. D.; Fletterick, R. J. (1997): The design plan of kinesin motors. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, S. 745–777. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.745.

Vale, R. D.; Funatsu, T.; Pierce, D. W.; Romberg, L.; Harada, Y.; Yanagida, T. (1996): Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. In: *Nature* 380 (6573), S. 451–453. DOI: 10.1038/380451a0.

Vale, R. D.; REESE, T.; SHEETZ, M. (1985): Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. In: *Cell* 42 (1), S. 39–50. DOI: 10.1016/S0092-8674(85)80099-4.

Valentine, M. T.; Fordyce, P. M.; Krzysiak, T. C.; Gilbert, S. P.; Block, S. M. (2006): Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5 step processively and support substantial loads in vitro. In: *Nat Cell Biol* 8 (5), S. 470–476. DOI: 10.1038/ncb1394.

van den Wildenberg, S. M. J. L.; Tao, L.; Kapitein, L. C.; Schmidt, C. F.; Scholey, J. M.; Peterman, E. J. G. (2008): The homotetrameric kinesin-5 KLP61F preferentially crosslinks

microtubules into antiparallel orientations. In: *Current biology : CB* 18 (23), S. 1860–1864. DOI: 10.1016/j.cub.2008.10.026.

Vanstraelen, M.; Inzé, D.; Geelen, D. (2006): Mitosis-specific kinesins in Arabidopsis. In: *Trends in Plant Science* 11 (4), S. 167–175. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.02.004.

Verhey, K. J.; Meyer, D.; Deehan, R.; Blenis, J.; Schnapp, B. J.; Rapoport, T. A.; Margolis, B. (2001): Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. In: *Journal of Cell Biology* 152 (5), S. 959–970. DOI: 10.1083/jcb.152.5.959.

Wakana, Y.; Villeneuve, J.; van Galen, J.; Cruz-Garcia, D.; Tagaya, M.; Malhotra, V. (2013): Kinesin-5/Eg5 is important for transport of CARTS from the trans-Golgi network to the cell surface. In: *The Journal of cell biology* 202 (2), S. 241–250. DOI: 10.1083/jcb.201303163.

Walter, W. J.; Beránek, V.; Fischermeier, E.; Diez, S. (2012): Tubulin acetylation alone does not affect kinesin-1 velocity and run length in vitro. In: *PLoS ONE* 7 (8), e42218. DOI: 10.1371/journal.pone.0042218.

Walter, W. J.; Machens, I.; Rafieian, F.; Diez, S. (2015): The non-processive rice kinesin-14 OsKCH1 transports actin filaments along microtubules with two distinct velocities. In: *Nature plants*.

Wang, X.; Campbell, L. E.; Miller, C. M.; Proud, C. G. (1998): Amino acid availability regulates p70 S6 kinase and multiple translation factors. In: *Biochemical Journal* 334 (Pt 1) (1), S. 261–267. DOI: 10.1042/bj3340261.

Weinger, J. S.; Qiu, M.; Yang, G.; Kapoor, T. M. (2011): A nonmotor microtubule binding site in kinesin-5 is required for filament crosslinking and sliding. In: *Current biology : CB* 21 (2), S. 154–160. DOI: 10.1016/j.cub.2010.12.038.

Weisenberg, R. C.; Deery, W. J.; Dickinson, P. J. (1976): Tubulin-nucleotide interactions during the polymerization and depolymerization of microtubules. In: *Biochemistry* 15 (19), S. 4248–4254. DOI: 10.1021/bi00664a018.

Wickstead, B.; Gull, K. (2006): A "holistic" kinesin phylogeny reveals new kinesin families and predicts protein functions. In: *Molecular biology of the cell* 17 (4), S. 1734–1743. DOI: 10.1091/mbc.e05-11-1090.

- Wickstead, B.; Gull, K. (2007): Dyneins across eukaryotes: a comparative genomic analysis. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8 (12), S. 1708–1721. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2007.00646.x.
- Wilson, L.; Farrell, K. W. (1986): Kinetics and steady state dynamics of tubulin addition and loss at opposite microtubule ends: the mechanism of action of colchicine. In: *Ann NY Acad Sci* 466, S. 690–708. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1986.tb38452.x.
- Yildiz, A.; Tomishige, M.; Gennerich, A.; Vale, R. D. (2008): Intramolecular strain coordinates kinesin stepping behavior along microtubules. In: *Cell* 134 (6), S. 1030–1041. DOI: 10.1016/j.cell.2008.07.018.
- Zalenski, A. A.; Majumder, S.; De, K.; Venere, M. (2020): An interphase pool of KIF11 localizes at the basal bodies of primary cilia and a reduction in KIF11 expression alters cilia dynamics. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 13946. DOI: 10.1038/s41598-020-70787-4.
- Zhang, J.; Huang, Q.; Zhong, S.; Bleckmann, A.; Huang, J.; Guo, X. et al. (2017): Sperm cells are passive cargo of the pollen tube in plant fertilization. In: *Nature plants* 3, S. 17079. DOI: 10.1038/nplants.2017.79.
- Zhang, P.; Dai, W.; Hahn, J.; Gilbert, S. P. (2015a): *Drosophila* Ncd reveals an evolutionarily conserved powerstroke mechanism for homodimeric and heterodimeric kinesin-14s. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (20), S. 6359–6364. DOI: 10.1073/pnas.1505531112.
- Zhang, R.; Alushin, G. M.; Brown, A.; Nogales, E. (2015b): Mechanistic Origin of Microtubule Dynamic Instability and Its Modulation by EB Proteins. In: *Cell* 162 (4), S. 849–859. DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.012.
- Zhu, C.; Dixit, R. (2012): Functions of the Arabidopsis kinesin superfamily of microtubule-based motor proteins. In: *Protoplasma* 249 (4), S. 887–899. DOI: 10.1007/s00709-011-0343-9.





# A Tug-of-War Model Explains the Saltatory Sperm Cell Movement in *Arabidopsis thaliana* Pollen Tubes by Kinesins With Calponin Homology Domain

Saskia Schattner<sup>1</sup>, Jan Schattner<sup>1</sup>, Fabian Munder<sup>1</sup>, Eva Höppe<sup>1</sup> and Wilhelm J. Walter<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Institute for Plant Science and Microbiology, University of Hamburg, Hamburg, Germany,

<sup>2</sup> Department Medicine, Health and Medical University Potsdam, Potsdam, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Peter Nick,

Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Germany

### Reviewed by:

Katerina Schwarzerova,

Charles University, Czechia

Stefan Diez,

Technische Universität

Dresden, Germany

### \*Correspondence:

Wilhelm J. Walter

wilhelm.walter@

health-and-medical-university.de

### Specialty section:

This article was submitted to

Plant Cell Biology,

a section of the journal

Frontiers in Plant Science

**Received:** 31 August 2020

**Accepted:** 28 December 2020

**Published:** 16 February 2021

### Citation:

Schattner S, Schattner J, Munder F, Höppe E and Walter WJ (2021) A Tug-of-War Model Explains the Saltatory Sperm Cell Movement in *Arabidopsis thaliana* Pollen Tubes by Kinesins With Calponin Homology Domain. *Front. Plant Sci.* 11:601282. doi: 10.3389/fpls.2020.601282

Upon pollination, two sperm cells are transported inside the growing pollen tube toward the apex. One sperm cell fertilizes the egg cell to form the zygote, while the other fuses with the two polar nuclei to form the triploid endosperm. In *Arabidopsis thaliana*, the transport of the two sperm cells is characterized by sequential forward and backward movements with intermediate pauses. Until now, it is under debate which components of the plant cytoskeleton govern this mechanism. The sperm cells are interconnected and linked to the vegetative nucleus via a cytoplasmic projection, thus forming the male germ unit. This led to the common hypothesis that the vegetative nucleus is actively transported via myosin motors along actin cables while pulling along the sperm cells as passive cargo. In this study, however, we show that upon occasional germ unit disassembly, the sperm cells are transported independently and still follow the same bidirectional movement pattern. Moreover, we found that the net movement of sperm cells results from a combination of both longer and faster runs toward the pollen tube apex. We propose that the observed saltatory movement can be explained by the function of kinesins with calponin homology domain (KCH). This subgroup of the kinesin-14 family actively links actin filaments and microtubules. Based on KCH's specific properties derived from *in vitro* experiments, we built a tug-of-war model that could reproduce the characteristic sperm cell movement in pollen tubes.

**Keywords:** intracellular transport, cytoskeleton, kinesin motors, pollen, sperm cells

## INTRODUCTION

A major step in the evolution of land plants was the shift from a gametophyte-dominant to a sporophyte-dominant life cycle in flowering plants which represent more than 90% of all land plants today. The male and female gametophytes of flowering plants are highly reduced and live and reproduce almost entirely within sporophytic tissues such as the anther, carpel, and ovule (Williams and Mazer, 2016). Consequently, the sperm cells have to be transported toward the ovary through the female tissue to finally fertilize the egg cell and the central cell of the megagametophyte. This challenge is met by the displacement of self-propelling sperm cells by pollen-mediated transport of the male gametes.

During maturation, the pollen undergoes two asymmetric cell divisions resulting in three cells: the vegetative cell, which encloses the two smaller generative cells—the sperm cells. As soon as the mature pollen encounters the stigma, it starts to grow a pollen tube. This tube grows through the style toward the ovary. During this process, the two sperm cells are transported inside the pollen tube toward the tube apex. As soon as the pollen tube reaches an unfertilized egg cell, it bursts open and releases the two sperm cells. Whereas, the processes of the growing pollen tube (Lord and Russell, 2002; Moscatelli and Idilli, 2009; Onelli and Moscatelli, 2013) and the fertilization process itself (Lord and Russell, 2002; Mori and Igawa, 2014; Takahashi and Igawa, 2019) are well-studied, surprisingly little is known about the transport process of the two sperm cells inside the pollen tube. In most flowering plants including the model plant *Arabidopsis thaliana*, the sperm cells travel together and are interconnected with each other as well as with the vegetative nucleus by a cytoplasmic projection (Lalanne and Twell, 2002). This complex which is composed of the two sperm cells and the vegetative nucleus is called the male germ unit (Jensen and Fisher, 1970; Russell and Cass, 1981). It appears to be quite unstable since a slight increase of temperature during *in vivo* pollen germination assays causes a disruption of the male germ unit and leads to individually transported sperm cells (Ge et al., 2011). During transport through the pollen tube, the sperm cells do not move continuously in the direction of the apex but perform saltatory back and forth movements (Hamamura et al., 2011).

Motility inside cells is most often achieved by the action of motor proteins of the myosin and kinesin superfamilies (Nebenführ and Dixit, 2018). Whilst myosins are binding to and moving along actin filaments, kinesins are associated to microtubules. Kinesins with calponin homology domain (KCHs), which are a subgroup of the microtubule minus end-directed Kinesin-14 family (Endow and Waligora, 1998), increasingly gained attention over the last years (Schneider and Persson, 2015). They are characterized by an internal kinesin-14 motor domain flanked by coiled-coil domains and an N-terminal calponin homology domain.

*In vitro* assays with the KCH1 (Walter et al., 2015) and KCH2 (Tseng et al., 2018) from *Oryza sativa* revealed that KCHs are microtubule minus end-directed motors that bind to actin filaments via their calponin homology domain and transport them along microtubules with two distinct velocities. Walter et al. (2015) proposed that the orientation-dependent transport velocities emerge from the KCHs' low torsional compliance combined with an inherently oriented binding to the actin filament.

Phylogenetic analysis of the *Arabidopsis* Kinesin-14 motor proteins revealed a subgroup of seven KCHs (Reddy and Day, 2001). Four of the seven KCHs (At1g63640, At5g41310, At1g09170, and At5g27000) are almost exclusively expressed in mature pollen (eFP browser, University of Toronto, Canada; Genevestigator, Nebion, Zurich, Switzerland). Combined with the observation that the sperm cells inside the pollen tube are engaged into a spindle-shaped microtubule structure (Laitinen et al., 2002; Poulter et al., 2008) this led us to the hypothesis that

KCH motors are the main actuator for the movement of sperm cells in the pollen tube.

In this study, we characterized the saltatory sperm movement in growing *Arabidopsis thaliana* pollen tubes, and propose a model to explain this motion by the function of KCH motors.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant Lines and Growth Conditions

For the pollen germination assays, pollen from plants of an histone 2B marker line (H2B-mTurquoise) kindly provided by Prof. Dr. Arp Schnittger (University Hamburg, Germany) and a tubulin A marker (TuA-mCherry) line kindly provided by Dr. Rene Schneider (MPIMP Golm, Germany) were used. All plants were sown on soil at 24°C. Illuminance was 100  $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$  for 18 h per day.

### Pollen Germination Assay

For the pollen germination assays, pollen from open but not yet withered *Arabidopsis thaliana* flowers were used. The anther was prepared and the pollen was placed on a gel cushion of pollen germination medium (0.01%  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 4 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 18% sucrose, 5 mM MOPS pH7.0 with Tris, 0.5% agarose), which was placed on a gas-permeable adhesive foil (13-40-0516-24, Biolabproducts, Bebensee, Germany). The pollen was then trapped between the gel cushion and the slide. After an incubation period of 2 h at room temperature in darkness, pollen germination and sperm movement were imaged.

### Actin Transport Assay

The His-tagged protein OsKCH1 was expressed in the *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) pRARE grown in LB medium and subsequently purified by affinity chromatography as previously described (Walter et al., 2015). Microtubules were polymerized as described before (Walter et al., 2012a,b). Actin filaments were polymerized from 3  $\mu\text{M}$  chicken breast muscle actin in 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid/NaOH pH 7.0, 100 mM KCl, 2 mM ATP, and 5  $\mu\text{M}$  rhodamine phalloidin (R415, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 60 min at 4°C. Actin-Transport-Assays were performed as described in Walter et al. (2015).

### Imaging

Images were acquired by the NIS software packages (Nikon, Tokyo, Japan) using an sCMOS camera (Andor Zyla 4.2, Oxford Instruments, Abingdon, UK) mounted on an inverted fluorescence microscope equipped with an autofocus system (Eclipse Ti, Nikon, Tokyo, Japan). Cells were visualized using bright field or fluorescence epi-illumination with the respective filter sets.

### Evaluation of Run Velocity and Run Length

Positions of sperm cells and actin filaments were obtained using FIESTA tracking software as described before (Ruhnnow et al., 2011). For each pollen, we calculated the displacement-weighted occurrence of sperm cells' velocities (Alper et al., 2013).

Afterwards, we fitted a Gaussian fit function over the velocity data. From this fit, mean and standard deviation were extracted.

For each pollen, we determined the position of a sperm cell at defined time points. From this data, we calculated the so-called point-to-point displacements, i.e., the distance of the sperm cell at each point in time compared to the previous point in time. All positive displacements are forward movements, whereas negative displacements are backward movements. More than one displacement in either direction above a velocity threshold of  $1 \text{ nm s}^{-1}$  is taken together into a run (positive or negative). Displacements with a velocity smaller than  $1 \text{ nm s}^{-1}$  are seen as pauses. From displacement and time data, we calculated the velocities for each datapoint.

## Modeling

The model described in this paper is mainly based on the model described in Müller et al. (2008). Specific portions are adapted to fit the nature of the KCH motor proteins. We implemented the model with the following parameters: Each motor binds to a microtubule of the cargo with the binding rate  $\pi_0$  and detaches with the detachment rate  $\epsilon_0$ . Binding rates are increasing exponentially with increasing external force given by the detachment force  $F_d$ . When bound to the microtubule, the motor moves toward the minus end of the respective microtubule with the forward velocity  $v_F$ . This velocity decreases with external force and reaches zero at the stall force  $F_s$ . Under superstall external forces, the motor moves toward the plus end of the respective microtubule with a slow velocity  $v_B$ .

The motors bind to and detach from the cargo in a stochastic fashion, so the number of bound motors to each population of microtubules fluctuate with time.

$$R_{tot} = n_+ \epsilon + (N_+ - n_+) \pi_0 + n_- \epsilon(F) + (N_- - n_-) \pi_0$$

For the modeling, we used the following parameters:

- Forward direction:
  - Stall force = 3 pN
  - Detachment force = 10 pN
  - Binding rate =  $0.7 \text{ s}^{-1}$
  - Unbinding rate =  $1.7 \text{ s}^{-1}$
  - Forward velocity =  $0.08 \mu\text{m s}^{-1}$
  - Backward velocity =  $0.008 \mu\text{m s}^{-1}$
- Backward direction:
  - Stall force = 3 pN
  - Detachment force = 10 pN
  - Binding rate =  $0.6 \text{ s}^{-1}$
  - Unbinding rate =  $1.6 \text{ s}^{-1}$
  - Forward velocity =  $0.01 \mu\text{m s}^{-1}$
  - Backward velocity =  $0.001 \mu\text{m s}^{-1}$
- Number of motors = 70

The Gillespie algorithm (Gillespie, 1976) is used to model the dynamic behavior of the motor protein. Therefore, the total rate is split into four parts: two for each motor direction as well as the cases binding and unbinding. Each of these events can happen

with a different possibility but for each time interval, one of these events must happen.

The rate for one of these four events is based on its individual rate multiplied by the number of motors in this state. The binding rate is independent of the force acting on the motor, for both directions, respectively:

$$\pi(F) = \pi_0$$

However, the unbinding rate depends on the force acting on the motor, for both directions, respectively:

$$\epsilon(F) = \epsilon_0 \exp(|F|/F_d)$$

In contrast to Müller et al. (2008), there is no independent total number of plus and minus end-directed motors but just one number of total motors that can perform forward and backward runs. Thus, it exists only one type of unbound motors. This makes it still possible to apply the basic principles of the model. The velocity depends, similar to the unbinding rate, on the force

$$v(F) = \begin{cases} v_F (1 - F/F_s) & \text{for } F \leq F_s \\ v_B (1 - F/F_s) & \text{for } F \geq F_s \end{cases}$$

From the relation of the cargo force:

$$F_c = n_+ F_+ = n_- F_-$$

and the cargo velocity:

$$v_c(n_+, n_-) = v_+(F_c/n_+) = v_-(-F_c/n_-)$$

It is possible to derive expressions for the cargo force and the cargo velocity with two cases. For a stronger plus direction with  $n_+ F_{s+} > n_- F_{s-}$

$$F_c(n_+, n_-) = \lambda n_+ F_{s+} + (1 - \lambda) n_- F_{s-}$$

$$v_c(n_+, n_-) = \frac{(n_+ F_{s+} - n_- F_{s-})}{\frac{n_+ F_s}{v_{F+}} + \frac{n_- F_s}{v_{B-}}}$$

$$\lambda = \frac{1}{1 + \frac{n_+ F_{s+} v_{B-}}{n_- F_{s-} v_{F+}}}$$

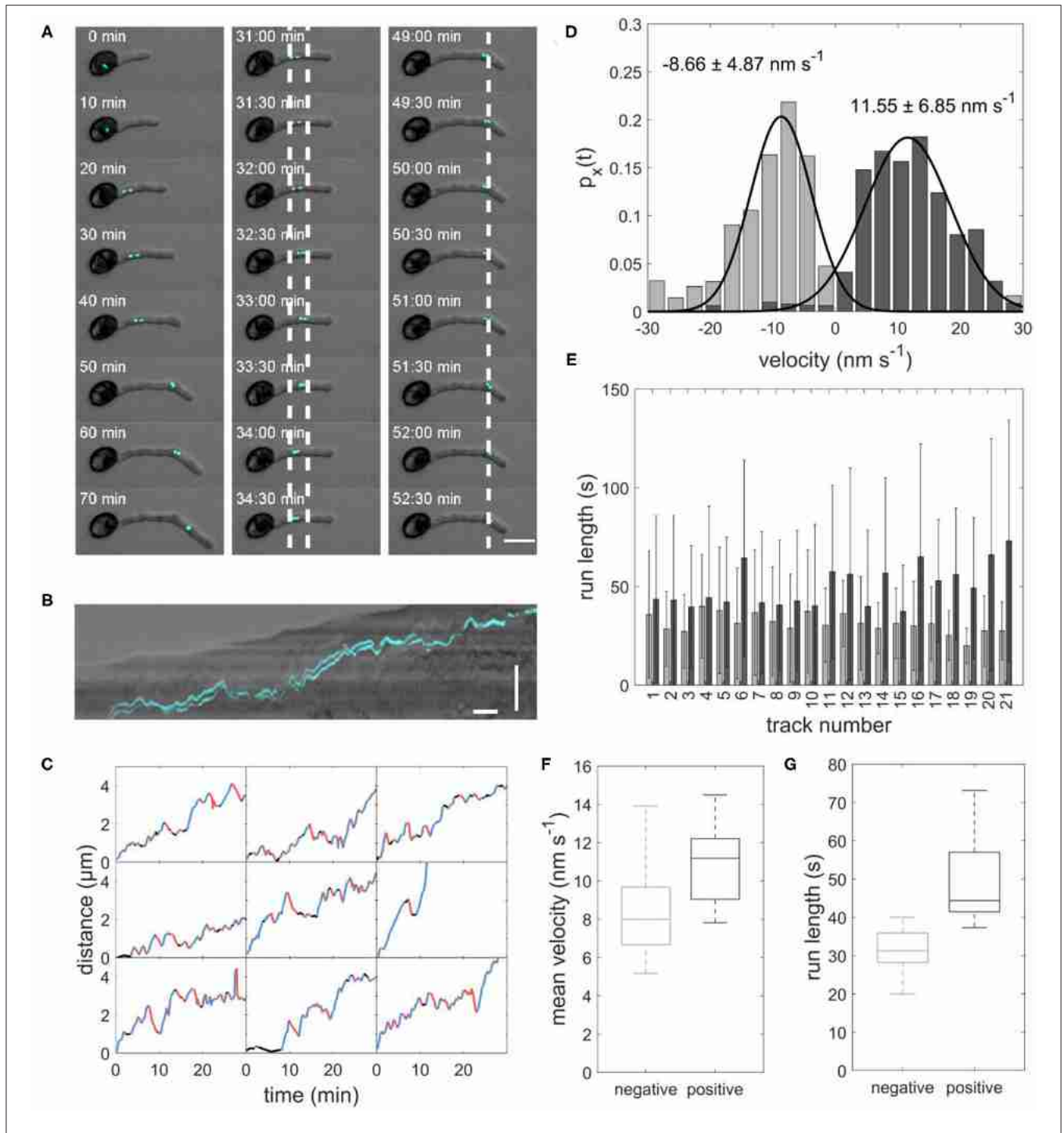
For a stronger minus direction with  $n_- F_{s-} > n_+ F_{s+}$

$$F_c(n_+, n_-) = \lambda n_+ F_{s+} + (1 - \lambda) n_- F_{s-}$$

$$v_c(n_+, n_-) = \frac{(n_+ F_{s+} - n_- F_{s-})}{\frac{n_+ F_s}{v_{B+}} + \frac{n_- F_s}{v_{F-}}}$$

$$\lambda = \frac{1}{1 + \frac{n_+ F_{s+} v_{F-}}{n_- F_{s-} v_{B+}}}$$

Note that in the formulas for the second case, the expression for the cargo force is identical as before. However, in the other



**FIGURE 1 | (A)** Image sequence of sperm cells (cyan) transported inside a growing pollen tube. Left panel: The sperm cells move from the pollen grain to the tip of the growing pollen tube. Central panel: Example of sperm cells moving forward and backward between the two dotted lines. Right panel: Example of sperm cells staying stationary for several minutes at the dotted line. Scale bar:  $25 \mu\text{m}$ . **(B)** Kymograph of sperm cells transported inside a pollen tube. Horizontal scale bar: 5 min, vertical scale bar:  $30 \mu\text{m}$ . **(C)** Distance-over-time plots for nine sperm cells. Blue: forward runs, red: backward runs, black: pauses. **(D)** Displacement-weighted velocity distributions for forward (dark gray) and backward (light gray) runs of one sperm cell. **(E)** Barplot of the run lengths for each sperm cell in forward (dark gray) and backward (light gray) directions. **(F)** Boxplot of mean forward (dark gray) and backward (light gray) velocities calculated from the gaussian fits over displacement-weighted velocity distributions ( $n = 21$ ,  $p < 0.05$ ). **(G)** Boxplot of the mean run lengths in forward (dark gray) and backward (light gray) directions ( $n = 21$ ,  $p < 0.05$ ).



equations the forward velocity  $v_{F+}$  has to be replaced by its backward velocity  $v_{B+}$  and  $v_{B-}$  by  $v_{F-}$ .

Due to the use of the Gillespie algorithm, the time interval of the simulation is not uniform. It is the key idea of the Gillespie algorithm that the time interval is based on an exponentially distributed random function. To obtain comparable datasets, the simulated datasets were downsampled to the frame-rate of the experimental data. When necessary, a linear interpolation was used to determine the position of the simulated sperm cells at a given time point, taking the neighboring simulation points into account.

## RESULTS

### Sperm Cells Are Transported With a Higher Velocity and With Longer Runs Toward the Tube Apex Than Toward the Pollen Grain

In flowering plants, sperm cells are transported inside the growing pollen tube from the pollen grain toward the tube apex. To investigate the exact path of the moving sperm cells, time-lapse microscopy of germination assays was performed with pollen from an mTurquoise-histone 2B *Arabidopsis thaliana* marker line. Since this histone is highly expressed in sperm cells, the generative cells could be visualized and tracked during the experiment (Figures 1A,B and Supplementary Movie 1).

As expected, we found a net movement of the sperm cells from the pollen grain toward the tube apex in all observed pollen. We determined an average sperm cell velocity of  $7.0 \pm 4.2 \mu\text{m h}^{-1}$  ( $n = 21$ ). Remarkably, the sperm cells in all observed pollen did not continuously move toward the tube apex but performed several forward movements toward the apex and backward movements toward the pollen grain with intermediate pauses (Figures 1A–C). Furthermore, the sperm cells are not permanently arranged one behind the other, but sometimes change their position (Supplementary Movie 2). This is of particular interest as this changes the orientation of the cage at the same time apparently without affecting the transport pattern.

Duration and velocity of each run and were highly variable. We evaluated the velocity of each forward and backward run. Figure 1D shows an example histogram with mean velocity and standard deviation for all forward runs ( $11.55 \pm 6.85 \text{ nm s}^{-1}$ ) and all backward runs ( $-8.66 \pm 4.87 \text{ nm s}^{-1}$ ) the sperm cells performed in one pollen tube. In all evaluated pollen, the mean velocity of the forward runs was higher than the mean velocity of the backward runs (Table 1). The mean velocity of sperm cells in 21 evaluated pollen was  $-9.06 \pm 4.45 \text{ nm s}^{-1}$  for backward runs and  $10.85 \pm 1.93 \text{ nm s}^{-1}$  for forward runs. The forward velocities were significantly higher than the backward velocities ( $p < 0.05$ ;  $n = 21$ ; Figure 1F). Moreover, we found that for each pollen, the runs in the forward direction ( $44.89 \pm 39.69 \text{ s}$ ,  $n = 21$ ) are longer than in the backward direction ( $32.03 \pm 25.15 \text{ s}$ ,  $n = 21$ ; Figures 1E,G).

We also occasionally observed the dissociation of the male germ unit. In this case, each sperm cell moved independently

**TABLE 1** | Mean velocity and standard deviation for all sperm cell tracks in forward and backward direction.

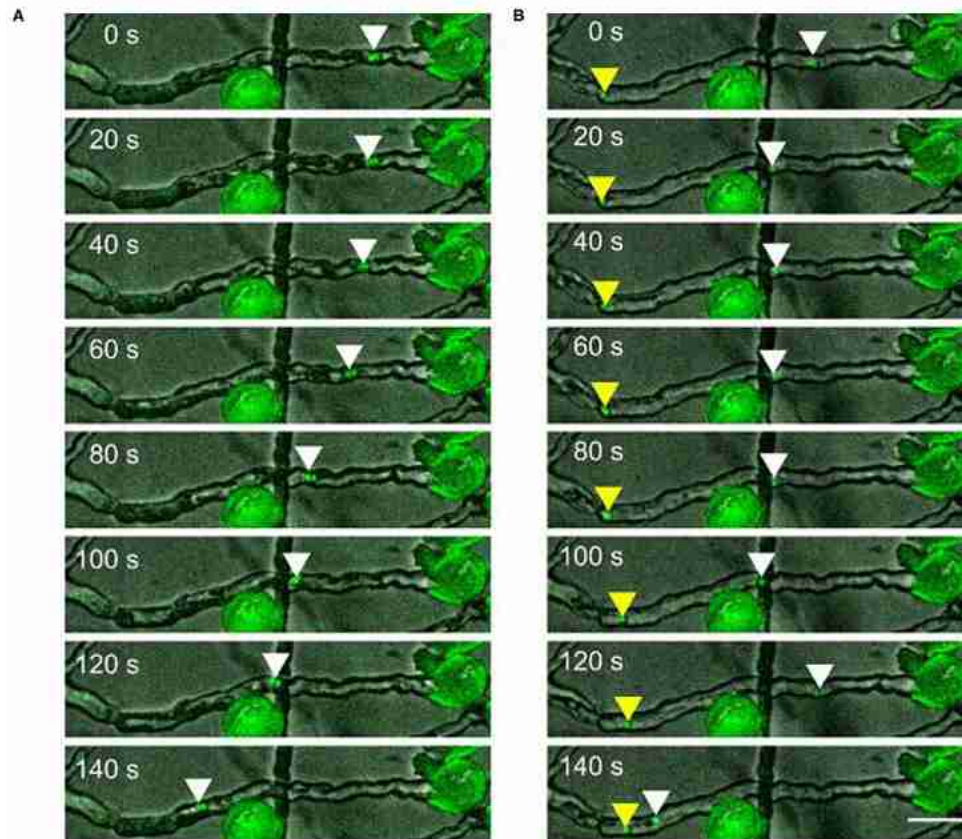
Track number	Mean forward velocity $\pm$ SD ( $\text{nm s}^{-1}$ )	mean backward velocity $\pm$ SD ( $\text{nm s}^{-1}$ )
1	$8.74 \pm 4.96$	$-6.69 \pm 3.66$
2	$7.81 \pm 4.25$	$-7.41 \pm 5.27$
3	$9.07 \pm 5.44$	$-6.60 \pm 2.56$
4	$9.31 \pm 4.91$	$-7.66 \pm 3.72$
5	$11.86 \pm 6.47$	$-11.78 \pm 7.17$
6	$14.49 \pm 9.02$	$-26.17 \pm 23.79$
7	$12.08 \pm 7.75$	$-9.90 \pm 5.70$
8	$13.82 \pm 8.70$	$-8.99 \pm 4.49$
9	$11.55 \pm 6.85$	$-8.66 \pm 4.87$
10	$8.53 \pm 4.88$	$-7.99 \pm 4.41$
11	$11.25 \pm 5.57$	$-13.90 \pm 11.82$
12	$12.57 \pm 6.01$	$-9.60 \pm 4.65$
13	$8.89 \pm 5.46$	$-6.35 \pm 3.31$
14	$10.86 \pm 6.76$	$-5.79 \pm 2.92$
15	$9.42 \pm 4.93$	$-8.17 \pm 4.58$
16	$11.18 \pm 6.06$	$-9.19 \pm 5.14$
17	$13.30 \pm 7.28$	$-5.46 \pm 2.31$
18	$8.93 \pm 4.79$	$-6.92 \pm 2.55$
19	$9.74 \pm 5.15$	$-5.17 \pm 1.63$
20	$12.84 \pm 7.10$	$-7.74 \pm 4.60$
21	$11.66 \pm 6.47$	$-10.16 \pm 6.42$

inside the pollen tube. The movement pattern of each sperm cell is comparable to the movement of the connected sperm cells. It shows forward and backwards runs with intermediate pauses (Figure 2 and Supplementary Movie 3).

### The Putative Function of KCH Motor Proteins in Sperm Cell Transport

We performed *in vitro* assays with OsKCH1 to characterize the movement parameters of OsKCH1 and compare them with those of sperm cell transport. The actin transport assays show that OsKCH1 transports actin filaments at two different velocities along microtubules as previously described (Walter et al., 2015). The slower population of actin filaments is transported with a velocity of  $24.2 \pm 13.42 \text{ nm s}^{-1}$  and the faster population is transported with a velocity of  $69.17 \pm 14.77 \text{ nm s}^{-1}$  (mean  $\pm$  s.d.,  $N = 58$  total transport events, Figures 3A–C).

Since we also observed two velocities for the forward and backward movement of sperm cells and four KCHs are expressed only in mature pollen, we hypothesized that KCHs play a role in the transport of sperm cells inside the pollen tube. KCH kinesins are interconnecting microtubules and actin filaments. Actin filaments are usually bundled in long cables at the cell cortex and oriented in a polar way in pollen tubes where they play a major role in vesicle transport (Cai and Cresti, 2009). In contrast, the role of microtubules and kinesin-mediated transport in pollen tubes is not yet fully understood. Performing pollen germination assays with pollen from a



**FIGURE 2** | Two sperm cells moving **(A)** together or **(B)** independently upon dissociation in a pollen tube. Scale bar: 30  $\mu\text{m}$ . Arrowheads mark the position of sperm cells.

Tubulin-mCherry *Arabidopsis thaliana* marker line showed a cage of microtubules around sperm cells (**Figure 3D**) which moves together with the sperm cells in a saltatory manner (**Figure 4** and **Supplementary Movie 4**).

### Movement of Sperm Cells Inside Pollen Tubes Can Be Described With a Tug-of-War Model

Based on our observations of the saltatory sperm movement, the microtubule cage, and the characteristic features of KCH motors, we adapted a model by Müller et al. (2008) to describe KCH-driven sperm cell transport. The original model simulated the movement of small cargoes transported by groups of motor proteins that exert force in opposing directions resulting in subsequent forward and backward runs that resemble the saltatory movements of sperm cells.

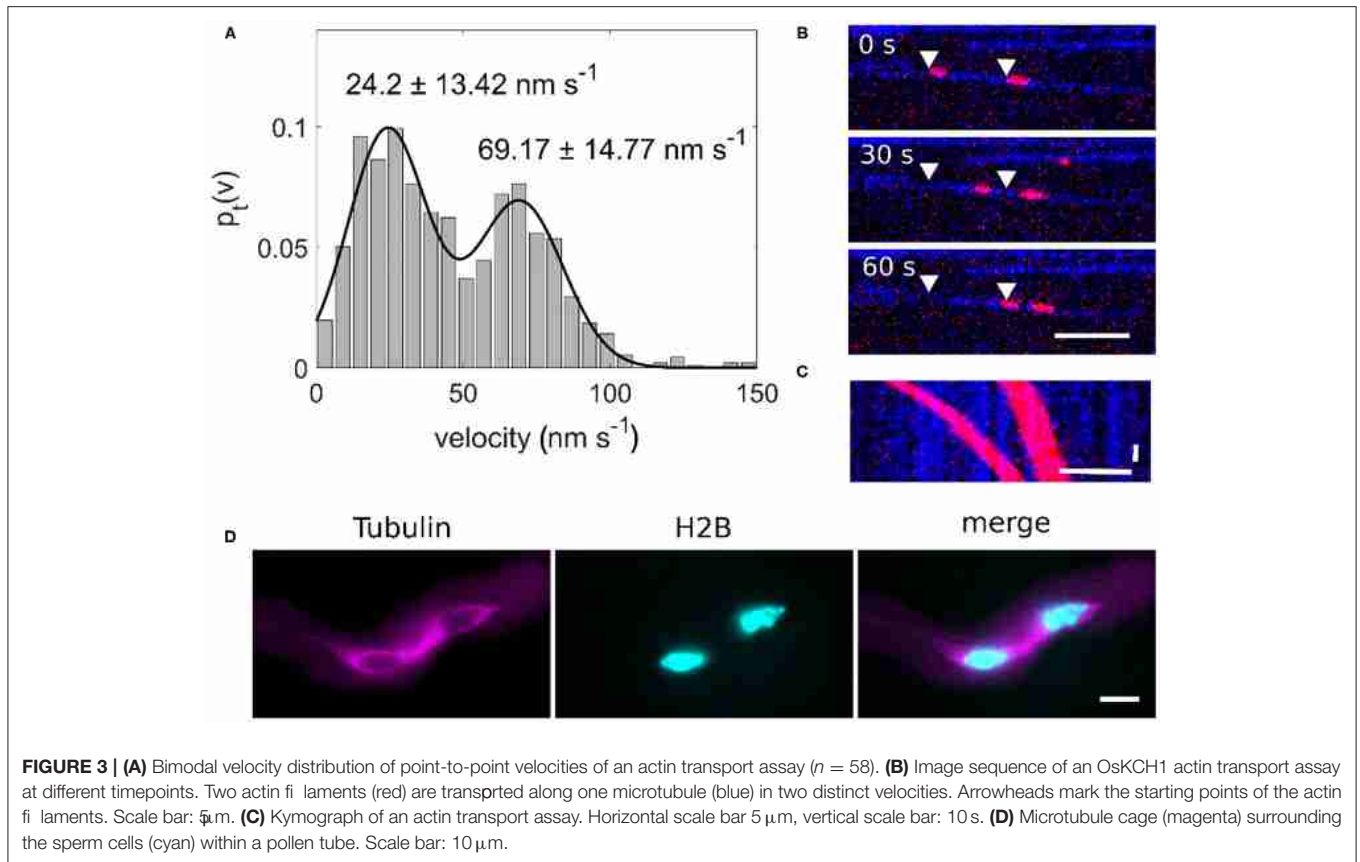
Using our model, we created 21 sample datasets, which were evaluated in the same way as the experimental data. The individual tracks of the model data are comparable to those of the experimental data (**Figure 5A**). As with the experimental

data, the runs varied in length and velocity. The mean velocity was  $10.83 \pm 0.76 \text{ nm s}^{-1}$  for forward runs and  $6.77 \pm 0.38 \text{ nm s}^{-1}$  for backward runs (**Figures 5B,C**). The mean run length was  $30.76 \pm 1.66 \text{ s}$  for forward runs and  $25.91 \pm 1.40 \text{ s}$  for backward runs (**Figures 5D,E**). Both run length and velocity in the forward direction was significantly higher than in the backward direction ( $p < 0.05$ ;  $N = 21$ ). The simulated values correspond to the observed *in vivo* data (**Figures 1D–G**). To rule out an effect of the unknown motor number on the transport patterns, we performed the modeling with different numbers of motor proteins, which had no influence on the transport pattern (**Figure 6**).

## DISCUSSION

### Proposed Model for Sperm Cell Transport in Pollen Tubes

We found that sperm cells are transported in *Arabidopsis thaliana* pollen tubes in a saltatory manner. Forward movements toward the pollen tube tip of the sperm cells are typically longer



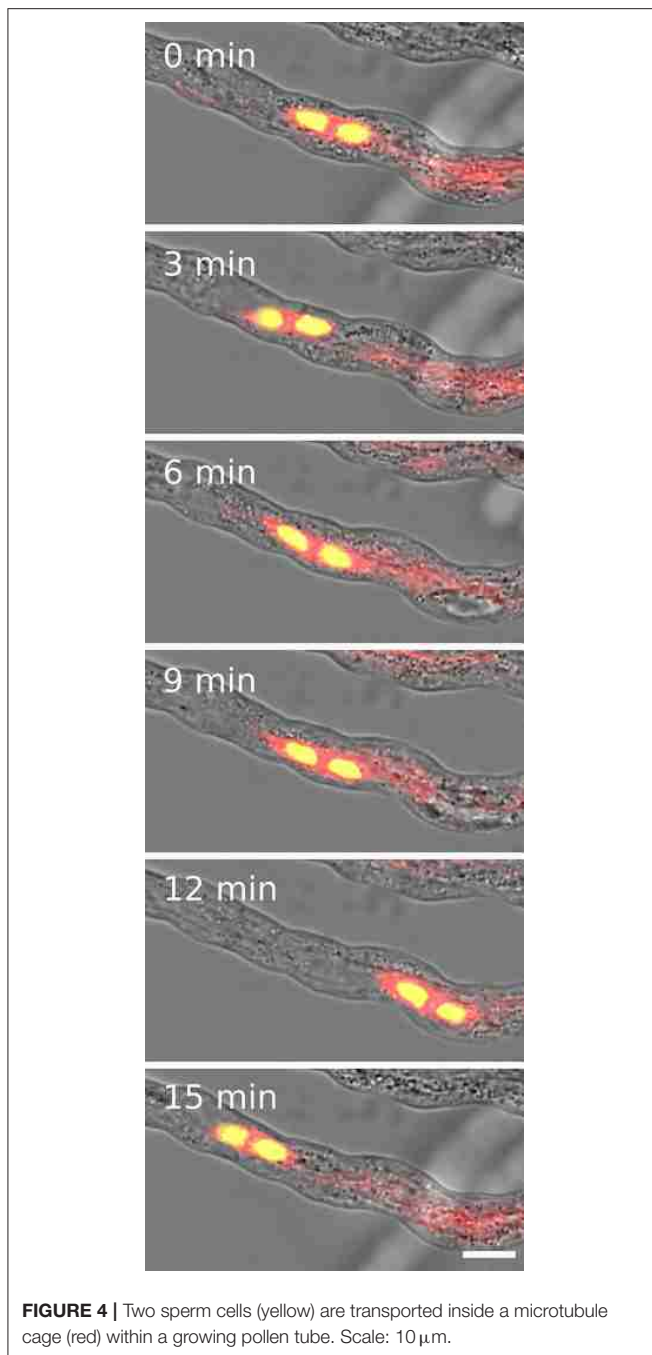
and faster than backward runs toward the pollen grain. This necessarily results in a net movement direction in the forward direction. By comparing experimental data with model data, we showed that this movement can be described by a tug-of-war mechanism of cortical KCHs acting on the microtubule cage surrounding the sperm cells.

We propose the following model for the sperm cell movement in pollen tubes: sperm cells are enclosed in a cage formed by microtubules with a random polar orientation so that there are plus and minus ends at each end of the cage. Parallel actin cables with the plus end pointing toward the tube apex are located at the cortex of the pollen tube (Lenartowska and Michalska, 2008). The microtubules forming the sperm cell cage and the cortical actin cables are interconnected by KCH kinesins. The KCHs are statically bound to the actin cables with their calponin homology domain as previously shown (Walter et al., 2015). The kinesins are moving along the microtubules of the sperm cell cage with their motor domain, resulting in a movement of the whole cage (Figure 7). The mechanism resembles an inverse actin transport (Figure 7): Actin filaments are firmly bound and microtubules are transported.

We assume that the microtubules are randomly arranged around the sperm cells, i.e., there are microtubules with their minus end pointing toward the pollen tube tip (in the forward direction) and microtubules with their minus end pointing

toward the pollen grain (in the backward direction). Since KCHs are minus-end directed kinesins, they shift the microtubules either in the forward direction or in the backward direction, depending on the respective orientation of the microtubule they bound to. Accordingly, the mobile cage would be move, because the kinesins are firmly anchored to the cortical actin filaments. If by chance all kinesins were to bind exclusively to the microtubules with their minus ends pointing toward the pollen grain, a situation would arise as shown on the right panel of Figure 7. The KCHs would all move toward the minus end, pushing the sperm cell cage and sperm cells in the forward direction. In *in vitro* experiments with OsKCH1, it was found that the transport velocity depends on the orientation of the microtubule in relation to the actin filament. Thus, for the case described above, we assume that this represents the “more favorable” orientation and that the sperm cell cage moves at a fast speed toward the pollen tube tip. For the opposite case, i.e., if by chance all kinesins bind to the microtubules whose minus end points toward the pollen tube tip, the sperm cell cage is pushed toward the pollen grain accordingly. For this case, the orientation of microtubules and actin filaments is as shown in Figure 7 for the left microtubule and the sperm cells move at slow speed in the backward direction. During the transport process, all combinations of bound kinesins to microtubules of one orientation as well as the other are possible and determines





the speed and direction with which the sperm cells move. The forward movement is always faster than the backward movement. This results in a net movement toward the pollen tube tip.

The model is in agreement with the results of several studies on microtubules and kinesins in the pollen tube. A spindle-shaped microtubule structure, similar to the one we found in *Arabidopsis*, has also been found in other plants like tobacco (Åström et al., 1995), papaver (Poulter et al., 2008), and *Tradescantia virginiana* (Palevitz and Cresti, 1988). A function

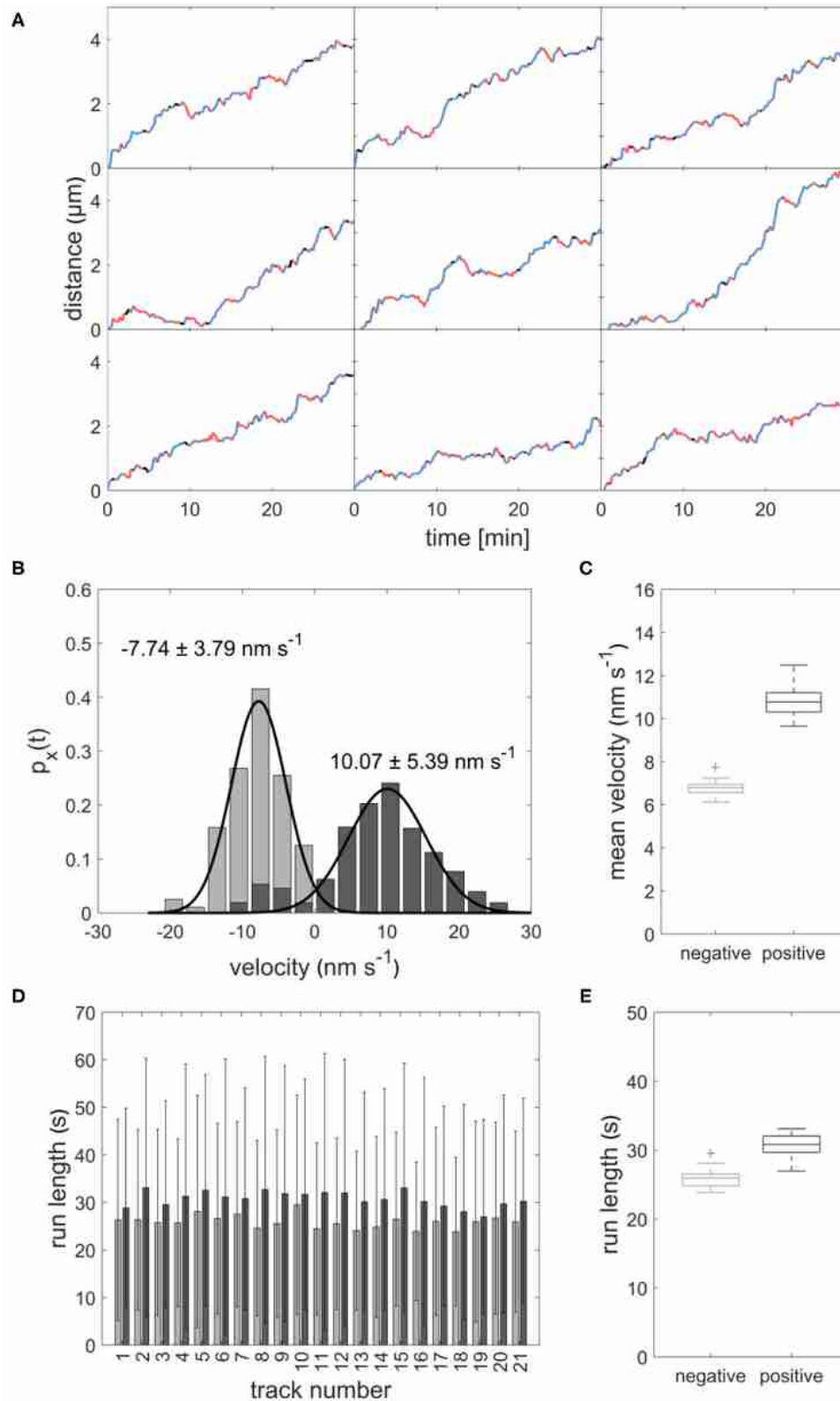
has not yet been assigned to these microtubules. However, it has been confirmed several times that a disruption of the microtubules in the pollen tube contributes to the retarding of sperm cell transport. This is true both for disruption with the help of substances such as oryzalin (Åström et al., 1995) or colchicine (Heslop-Harrison et al., 1988) as well as for cold treatment (Åström et al., 1991). Kinesins have already been detected in the pollen tube by immunostaining (Cai et al., 1993), although only in the tube apex. Nevertheless, Romagnoli et al. (2003) have shown in *in vitro* studies that organelles from the pollen tube are transported via kinesins and propose that kinesins play a role in organelle transport in addition to myosins. The overall sparse presence of microtubules in the pollen tube emphasizes the unique importance of the described microtubule cage. It is fair to speculate, that microtubule-associated processes have been gradually reduced in pollen tubes in order to avoid effects on the transport of the sperm cells as described in our model.

In *in vitro* studies with OsKCH1, a KCH from rice, it has been shown that OsKCH1 is a non-processive motor protein (Walter et al., 2015), i.e., it does not move along microtubules over a longer period of time, but detaches from the microtubule after each power stroke and has to bind again for another power stroke. For the model, we have assumed that the kinesins transporting the sperm cells are also non-processive. OsKCH2, however, is processive but also transports actin filaments at two different velocities comparable to OsKCH1 in an actin transport assay (Walter et al., 2015; Tseng et al., 2018). It can, therefore, be assumed that the movement of the sperm cells can also be reproduced under the assumption of a processive motor.

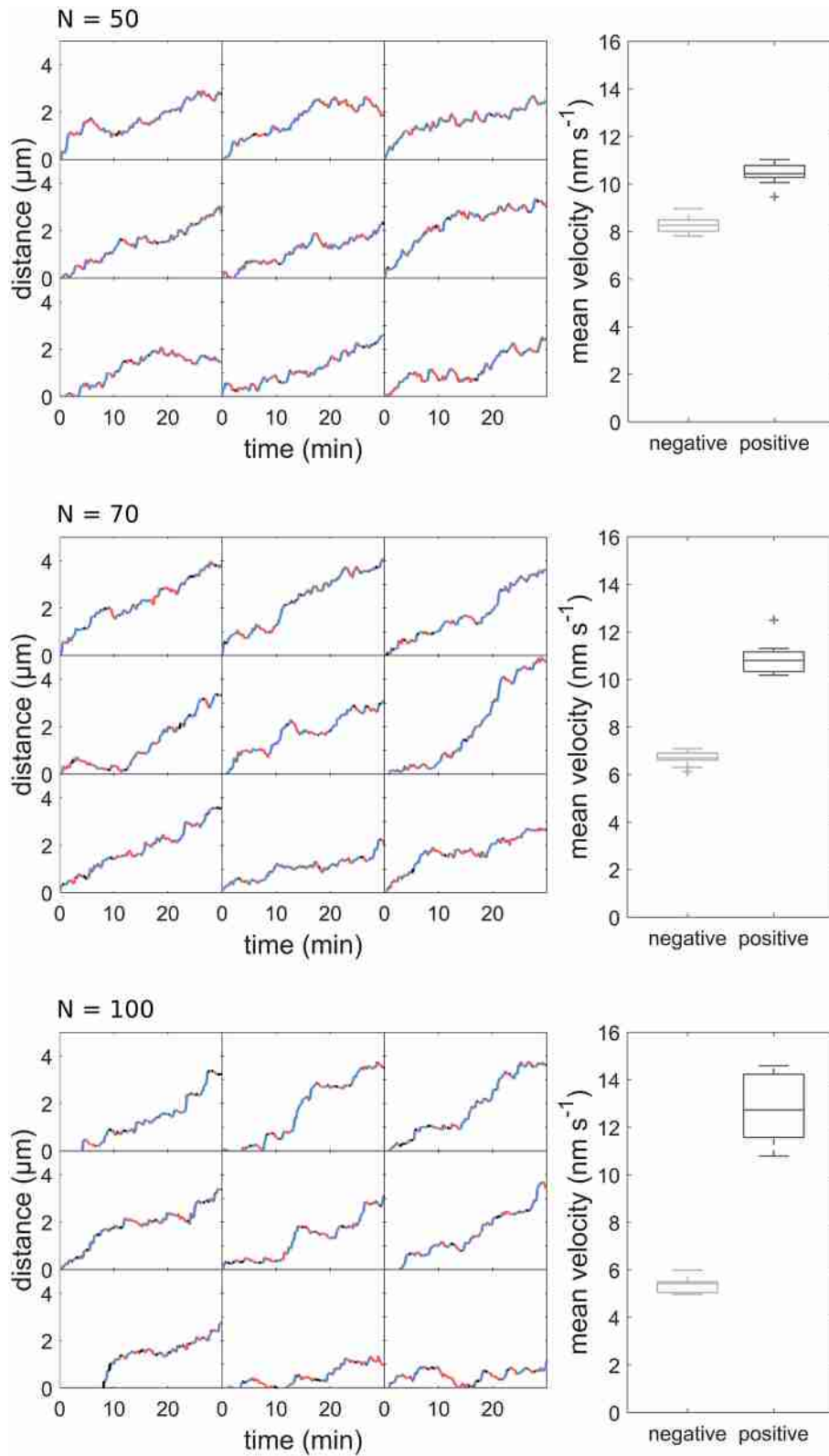
According to expression studies, KCH1, 2, 5, and 6 in *Arabidopsis* are almost exclusively expressed in the pollen tube. Therefore, we consider them as promising candidates for the transport of sperm cells in the pollen tube. Localization studies and pollen germination assays with corresponding KCH knockout mutant lines are important next steps toward revealing the exact transport mechanism of sperm cells in pollen tubes.

Our model is in contrast to the common hypothesis that sperm cells are transported as passive cargo attached to the actively transported vegetative nucleus. This hypothesis was mainly based on the identification of the cytoplasmic projection connecting the sperm cells with the vegetative nucleus. It was shown that this cytoplasmic projection plays some role in the sperm cell guidance and might also contribute to some other regulatory mechanisms inside the pollen (McCue et al., 2011). Nevertheless, we were able to show that upon dissociation of the male germ unit the sperm cells are still moving inside the pollen tube which would be impossible if the sperm cells were merely dragged along as a passive cargo. In addition, we have observed cases in which the sperm cells change their position and are still transported afterwards, which also speaks against the theory of sperm cells as passive cargo. Our model explains how the sperm cells can be actively transported by KCHs anchored on cortical actin cables acting on the spindle-shaped microtubule cage.

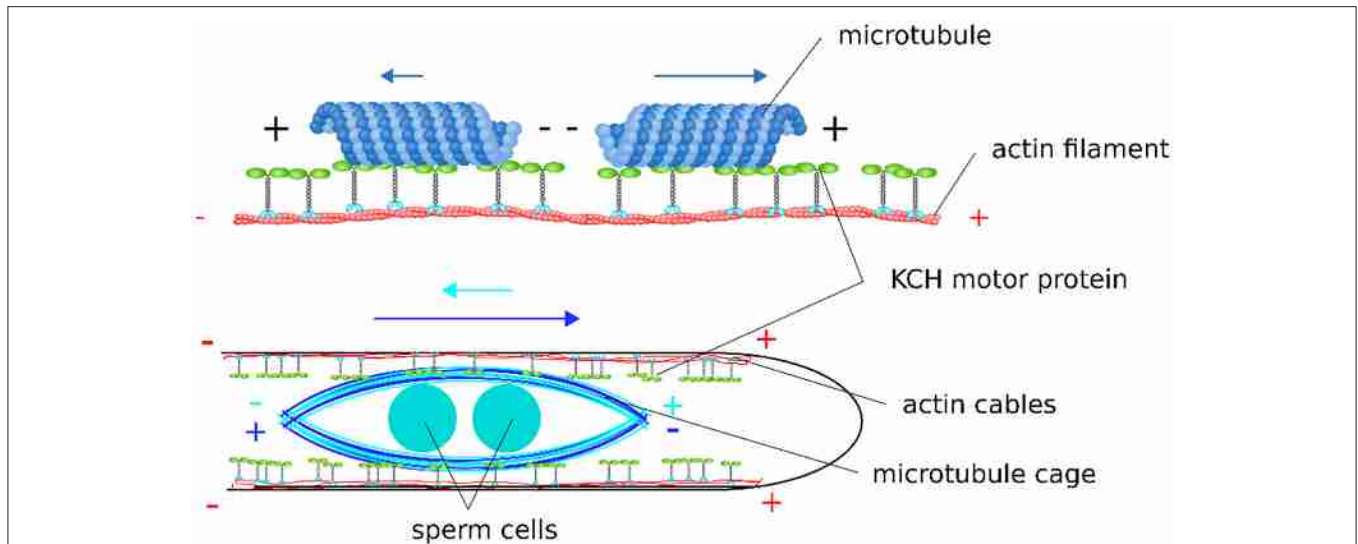




**FIGURE 5 | (A)** Distance-over-time plots for 9 modeled sperm cells. Blue: forward runs, red: backward runs, black: pauses. **(B)** Displacement-weighted velocity distributions for forward (dark gray) and backward (light gray) runs of one modeled sperm cell. **(C)** Boxplot of mean forward (dark gray) and backward (light gray) velocities calculated from the gaussian fits over displacement-weighted velocity distributions ( $n = 21$ ,  $p < 0.05$ ). **(D)** Barplot of the run lengths for each modeled sperm cell in forward (dark gray) and backward (light gray) directions. **(E)** Boxplot of the mean run lengths of the modeled sperms in forward (dark gray) and backward (light gray) directions ( $n = 21$ ,  $p < 0.05$ ).



**FIGURE 6** | Distance-over-time plots and mean velocity of sperm cell movement patterns modeled with different motor numbers.



**FIGURE 7** | Scheme of the proposed model for sperm cell transport mediated by KCHs statically bound to cortical actin cables. Depending on their polar orientation, microtubules are transported in opposite directions and at different velocities along actin filaments. As the sperm cells are encaged into a microtubule structure, this bidirectionality leads to a tug-of-war scenario when sperm cells are transported along the polar, cortical actin cables within the pollen tube.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

WW and SS designed the experiments and wrote the manuscript. SS, FM, and EH carried out the experiments. SS and JS generated our model and analyzed the data. All authors discussed the results. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## FUNDING

We acknowledge support from the Berthold Leibinger Foundation to WW.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Arp Schnittger (University Hamburg, Germany) for providing the H2B-mTurquoise marker

## REFERENCES

- Åström, H., Sorri, O., and Raudaskoski, M. (1995). Role of microtubules in the movement of the vegetative nucleus and generative cell in tobacco pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* 8, 61–69. doi: 10.1007/BF00230890
- Åström, H., Virtanen, I., and Raudaskoski, M. (1991). Cold-stability in the pollen tube cytoskeleton. *Protoplasma* 160, 99–107. doi: 10.1007/BF01539961
- Alper, J. D., Tovar, M., and Howard, J. (2013). Displacement-weighted velocity analysis of gliding assays reveals that chlamydomonas axonemal dynein preferentially moves conspecific microtubules. *Biophys. J.* 104, 1989–1998. doi: 10.1016/j.bpj.2013.03.041
- Cai, G., Bartalesi, A., Del Casino, C., Moscatelli, A., Tiezzi, A., and Cresti, M. (1993). The kinesin-immunoreactive homologue from *Nicotiana tabacum* pollen tubes: biochemical properties and subcellular localization. *Planta* 191, 496–506. doi: 10.1007/BF00195751
- Cai, G., and Cresti, M. (2009). Organelle motility in the pollen tube: a tale of 20 years. *J. Exp. Bot.* 60, 495–508. doi: 10.1093/jxb/ern321
- Endow, S. A., and Waligora, K. W. (1998). Determinants of kinesin motor polarity. *Science* 281, 1200–1202. doi: 10.1126/science.281.5380.1200

line, Dr. René Schneider (University Potsdam, Germany) for providing the TuA-mCherry marker line, as well as Wenke Bahnsen, Julia Sandberg, and Pierre Endries for technical assistance.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.601282/full#supplementary-material>

**Supplementary Movie 1** | Saltatory movement of sperm cells (cyan) transported inside a growing pollen tube.

**Supplementary Movie 2** | Two sperm cells change their position during transport inside a growing pollen tube.

**Supplementary Movie 3** | Two sperm cells move independently upon dissociation in a pollen tube.

**Supplementary Movie 4** | Two sperm cells (yellow) are transported inside a microtubule cage (red) within a growing pollen tube.

- Ge, L., Gou, X., Yuan, T., Strout, G. W., Nakashima, J., Blancaflor, E. B., et al. (2011). Migration of sperm cells during pollen tube elongation in *Arabidopsis thaliana*: behavior during transport, maturation and upon dissociation of male germ unit associations. *Planta* 233, 325–332. doi: 10.1007/s00425-010-1305-8
- Gillespie, D. T. (1976). A general method for numerically sumulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions. *J. Comput. Phys.* 1976, 403–434.
- Hamamura, Y., Saito, C., Awai, C., Kurihara, D., Miyawaki, A., Nakagawa, T., et al. (2011). Live-cell imaging reveals the dynamics of two sperm cells during double fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 21, 497–502. doi: 10.1016/j.cub.2011.02.013
- Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., Cresti, M., Tiezzi, A., and Moscatelli, A. (1988). Cytoskeletal elements, cell shaping and movement in the angiosperm pollen tube. *J. Cell Sci.* 91, 49–60.
- Jensen, W. A., and Fisher, D. B. (1970). Cotton embryogenesis: the pollen tube in the stigma and style. *Protoplasma* 69, 215–235. doi: 10.1007/BF01280723
- Laitinen, E., Nieminen, K., Vihinen, H., and Raudaskoski, M. (2002). Movement of generative cell and vegetative nucleus in tobacco pollen tubes is dependent on microtubule cytoskeleton but independent of the synthesis of callose plugs. *Sex. Plant Reprod.* 15, 195–204. doi: 10.1007/s00497-002-0155-3
- Lalanne, E., and Twell, D. (2002). Genetic control of male germ unit organization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 865–875. doi: 10.1104/pp.003301
- Lenartowska, M., and Michalska, A. (2008). Actin filament organization and polarity in pollen tubes revealed by myosin II subfragment 1 decoration. *Planta* 228, 891–896. doi: 10.1007/s00425-008-0802-5
- Lord, E. M., and Russell, S. D. (2002). The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 81–105. doi: 10.1146/annurev.cellbio.18.012502.083438
- McCue, A. D., Cresti, M., Feijó, J. A., and Slotkin, R. K. (2011). Cytoplasmic connection of sperm cells to the pollen vegetative cell nucleus: potential roles of the male germ unit revisited. *J. Exp. Bot.* 62, 1621–1631. doi: 10.1093/jxb/err032
- Mori, T., and Igawa, T. (2014). Gamete attachment process revealed in flowering plant fertilization. *Plant Signal. Behav.* 9:e977715. doi: 10.4161/15592324.2014.977715
- Moscatelli, A., and Idilli, A. I. (2009). Pollen tube growth: a delicate equilibrium between secretory and endocytic pathways. *J. Integr. Plant Biol.* 51, 727–739. doi: 10.1111/j.1744-7909.2009.00842.x
- Müller, M. J. I., Klumpp, S., and Lipowsky, R. (2008). Tug-of-war as a cooperative mechanism for bidirectional cargo transport by molecular motors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 4609–4614. doi: 10.1073/pnas.0706825105
- Nebenführ, A., and Dixit, R. (2018). Kinesins and myosins: molecular motors that coordinate cellular functions in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 69, 329–361. doi: 10.1146/annurev-arplant-042817-040024
- Onelli, E., and Moscatelli, A. (2013). Endocytic pathways and recycling in growing pollen tubes. *Plants* 2, 211–229. doi: 10.3390/plants2020211
- Palevitz, B. A., and Cresti, M. (1988). Microtubule organization in the sperm of *Tradescantia virginiana*. *Protoplasma* 146, 28–34. doi: 10.1007/BF01354292
- Poulter, N. S., Vatovec, S., and Franklin-Tong, V. E. (2008). Microtubules are a target for self-incompatibility signaling in Papaver pollen. *Plant Physiol.* 146, 1358–1367. doi: 10.1104/pp.107.107052
- Reddy, A. S. N., and Day, I. S. (2001). Analysis of the myosins encoded in the recently completed *Arabidopsis thaliana* genome sequence. *Genome Biol.* 2:research0024.1. doi: 10.1186/gb-2001-2-7-research0024
- Romagnoli, S., Cai, G., and Cresti, M. (2003). *In vitro* assays demonstrate that pollen tube organelles use kinesin-related motor proteins to move along microtubules. *Plant Cell* 15, 251–269. doi: 10.1105/tpc.005645
- Ruhnnow, F., Zwicker, D., and Diez, S. (2011). Tracking single particles and elongated filaments with nanometer precision. *Biophys. J.* 100, 2820–2828. doi: 10.1016/j.bpj.2011.04.023
- Russell, S. D., and Cass, D. D. (1981). Ultrastructure of the sperms of *Plumbago zeylanica*. *Protoplasma* 107, 85–107. doi: 10.1007/BF01275610
- Schneider, R., and Persson, S. (2015). Connecting two arrays: the emerging role of actin-microtubule cross-linking motor proteins. *Front. Plant Sci.* 6:415. doi: 10.3389/fpls.2015.00415
- Takahashi, T., and Igawa, T. (2019). Evaluation of fertilization state by tracing sperm nuclear morphology in *Arabidopsis* double fertilization. *J. Vis. Exp.* 150:e59916. doi: 10.3791/59916
- Tseng, K.-F., Wang, P., Lee, Y.-R. J., Bowen, J., Gicking, A. M., Guo, L., et al. (2018). The preprophase band-associated kinesin-14 OsKCH2 is a processive minus-end-directed microtubule motor. *Nat. Commun.* 9:1067. doi: 10.1038/s41467-018-03480-w
- Walter, W. J., Beránek, V., Fischermeier, E., and Diez, S. (2012a). Tubulin acetylation alone does not affect kinesin-1 velocity and run length *in vitro*. *PLoS ONE* 7:e42218. doi: 10.1371/journal.pone.0042218
- Walter, W. J., Koonce, M. P., Brenner, B., and Steffen, W. (2012b). Two independent switches regulate cytoplasmic dynein's processivity and directionality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 5289–5293. doi: 10.1073/pnas.1116315109
- Walter, W. J., Machens, I., Rafieian, F., and Diez, S. (2015). The non-processive rice kinesin-14 OsKCH1 transports actin filaments along microtubules with two distinct velocities. *Nat. Plants* 1:15111. doi: 10.1038/nplants.2015.111
- Williams, J. H., and Mazer, S. J. (2016). Pollen—tiny and ephemeral but not forgotten: new ideas on their ecology and evolution. *Am. J. Bot.* 103, 365–374. doi: 10.3732/ajb.1600074

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Schattner, Schattner, Munder, Höpffe and Walter. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Article

# The *Arabidopsis thaliana* Kinesin-5 AtKRP125b Is a Processive, Microtubule-Sliding Motor Protein with Putative Plant-Specific Functions

Tobias Strauß<sup>1</sup>, Saskia Schattner<sup>1</sup>, Stefan Hoth<sup>1,\*</sup> and Wilhelm J. Walter<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Plant Science and Microbiology, Universität Hamburg, 20146 Hamburg, Germany; strauss.1988@web.de (T.S.); saskia.schattner@uni-hamburg.de (S.S.)

<sup>2</sup> Medical Department, HMU Health and Medical University, 14471 Potsdam, Germany

\* Correspondence: stefan.hoth@uni-hamburg.de (S.H.); wim.walter@health-and-medical-university.de (W.J.W.)

**Abstract:** The formation and maintenance of the mitotic spindle during cell division requires several microtubule-interacting motor proteins. Members of the kinesin-5 family play an essential role in the bipolar organization of the spindle. These highly conserved, homotetrameric proteins cross-link anti-parallel microtubules and slide them apart to elongate the spindle during the equal separation of chromosomes. Whereas vertebrate kinesin-5 proteins are well studied, knowledge about the biochemical properties and the function of plant kinesin-5 proteins is still limited. Here, we characterized the properties of AtKRP125b, one of four kinesin-5 proteins in *Arabidopsis thaliana*. In in vitro motility assays, AtKRP125b displayed the archetypal characteristics of a kinesin-5 protein, a low velocity of about 20 nm·s<sup>-1</sup>, and a plus end-directed, processive movement. Moreover, AtKRP125b was able to cross-link microtubules and to slide them apart, as required for developing and maintaining the mitotic spindle. In line with such a function, GFP-AtKRP125b fusion proteins were predominantly detected in the nucleus when expressed in *Arabidopsis thaliana* leaf protoplasts or *Nicotiana benthamiana* epidermis cells and analyzed by confocal microscopy. However, we also detected GFP signals in the cytoplasm, suggesting additional functions. By generating and analyzing *AtKRP125b* promoter-reporter lines, we showed that the *AtKRP125b* promoter was active in the vascular tissue of roots, lateral roots, cotyledons, and true leaves. Remarkably, we could not detect promoter activity in meristematic tissues. Taken together, our biochemical data support a role of AtKRP125b in mitosis, but it may also have additional functions outside the nucleus and during interphase.



**Citation:** Strauß, T.; Schattner, S.; Hoth, S.; Walter, W.J. The *Arabidopsis thaliana* Kinesin-5 AtKRP125b Is a Processive, Microtubule-Sliding Motor Protein with Putative Plant-Specific Functions. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 11361. <https://doi.org/10.3390/ijms222111361>

Academic Editor: Mamoru Sugita

Received: 29 September 2021

Accepted: 18 October 2021

Published: 21 October 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** kinesin; *Arabidopsis thaliana*; motor protein; intracellular transport; single-molecule

## 1. Introduction

Transport processes and restructuring are an essential part of the cycle of a living cell and are largely mediated by motor proteins in almost all eukaryotic organisms. Kinesins move along microtubules and are, therefore, often involved in processes such as organelle transport, mitotic spindle assembly and maintenance, and chromosome movement. Microtubules serve as a transport structure for the navigation of kinesins. However, the dynamics of microtubules themselves can also be influenced by some kinesins by either stabilizing or depolymerizing them in a controlled manner [1,2]. The highly conserved motor domain forms the catalytic center of these proteins and is capable of hydrolyzing ATP. The ATP-turnover allows a precisely timed binding and unbinding of the motor heads to the microtubule resulting in force transmission [3,4].

All kinesins are classified into 14 families according to their structure. Classification is often, but not always, accompanied by functional clustering. The high variability in kinesin function is due to characteristics outside the motor domain of kinesins. Whereas the variability of structure and function within a kinesin family can be quite high, the kinesin-5 family is highly conserved. The classical role of kinesin-5 in animal systems is the



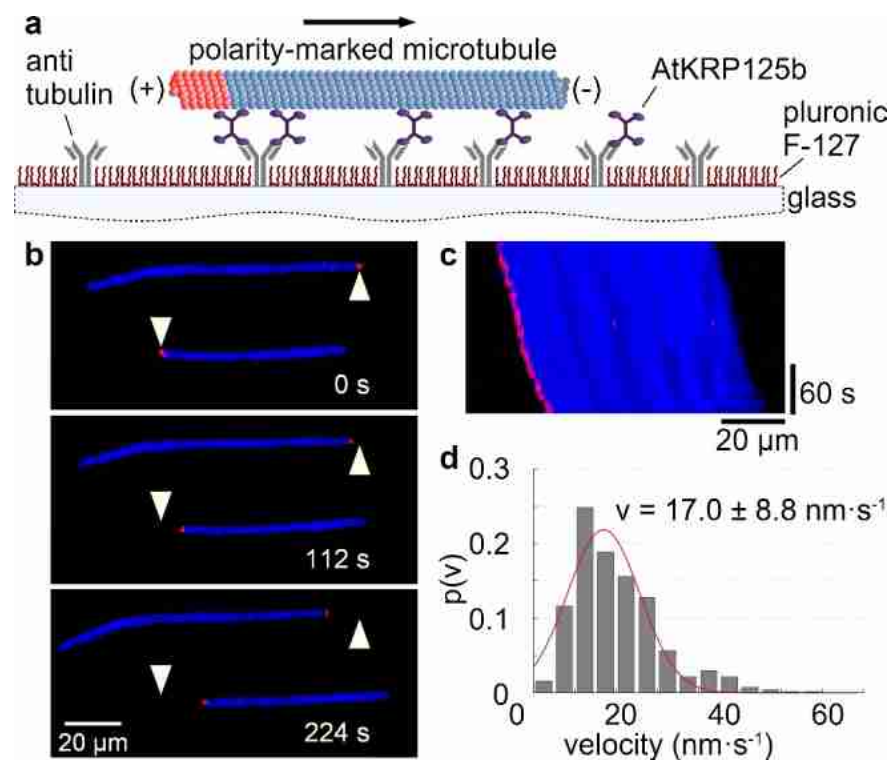
assembly and maintenance of the mitotic spindle during anaphase and metaphase [5–7]. Kinesin-5, unlike most kinesins, forms dumbbell-shaped bipolar homotetramers rather than homodimers [8]. It has been shown for Eg5, an animal kinesin-5, that both ends of these tetramers, occupied by motor domains, are able to bind to two microtubules simultaneously and thus cross-link them. Movement of Eg5 along the cross-linked microtubules causes anti-parallel microtubules to be displaced relative to each other. Within the spindle, Eg5 cross-links and displaces the spindle midzone microtubules, ensuring their stability and elongation [9]. Knockout of Eg5 leads to nonpolar spindles and thus problems with the correct division of chromosomes during cell division. This highlights the importance of kinesin-5 in cell division. In contrast to the spindle in animal cells, the plant spindle lacks the centrioles, so their structure differs significantly. Nevertheless, there is evidence that kinesin-5 proteins are also involved and play an important role in the plant spindle: the kinesin-5 AtKRP125c occupied plant spindle microtubules, and a lack of AtKRP125c led to compromised spindle structure and problems with cytokinesis [10,11]. Beyond this, the function of kinesin-5 in plants has been poorly understood, especially with regard to the biochemical and biophysical properties of plant kinesin-5 proteins. Here, we performed *in vitro* motility assays with a recombinant kinesin-5 from *Arabidopsis thaliana* (AtKRP125b). In the process, we found that AtKRP125b was capable of cross-linking and counter-shifting microtubules *in vitro* and thus indeed possessed all the properties to fulfill the canonical role in the spindle.

Interestingly, *Arabidopsis* has a high number of kinesin-5 genes compared to most eukaryotic organisms. Whereas most eukaryotes contain only one gene encoding a kinesin-5, *Arabidopsis* was found to have 4 kinesin-5 genes, namely *AtKRP125a*, *AtKRP125b*, *AtKRP125c*, and *AtF16L2.60* [12,13]. In general, the number of kinesin genes in plants is significantly higher than in other eukaryotes [12]. Most of these additional genes have arisen through gene duplications within specific kinesin families, such as kinesin-7, kinesin-12 or kinesin-14. Gene duplication is often accompanied by the acquisition of plant-specific functions. For example, a large proportion of kinesin-14 takes on a role as a minus-end directed kinesin, replacing dynein, which is absent in plants [14]. Kinesins of the kinesin-7 family are involved in plant-specific processes such as phragmoplast expansion [15]. A role in mitochondria is also speculated [16]. Kinesin-12 motor proteins are also involved in phragmoplast and preprophase band organization, both functions outside their classical role in animal cells [17–19]. Therefore, we wondered whether the high number of kinesin-5 genes in *Arabidopsis* may also indicate that kinesin-5 has evolved specific functions in plants and investigated putative cellular functions of AtKRP125b. For this purpose, we examined the *AtKRP125b* promoter activity in transgenic promoter-*GUS* *Arabidopsis* lines and the intracellular localization of GFP-AtKRP125b after expression in transformed *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* cells. The *AtKRP125b* promoter was active in vascular but not in meristematic tissue, whereas the AtKRP125b protein was localized in both the nucleus and the cytoplasm. Our results may indicate that AtKRP125b does not have an exclusive role in the mitotic spindle but may also perform additional functions in the cell during interphase.

## 2. Results

### 2.1. The Kinesin AtKRP125b Moves along Microtubules at a Slow Velocity

The velocity at which a kinesin moves along microtubules can be determined by using a gliding assay. For this purpose, the recombinant full-length AtKRP125b was bound to a glass surface with antibodies. In an ATP-rich environment, fluorescently labelled microtubules were able to bind to the motor domains of AtKRP125b and were transported by them along the glass surface (Figure 1a–c, Supplementary Movie S1). Analysis of the velocity of microtubule displacement revealed that AtKRP125b displaces microtubules at  $17 \pm 8.8$  nm/s (Figure 1c,d). This velocity is generally quite low compared to other kinesins. However, our observations were comparable to studies on Eg5, which showed that Eg5 moves at a velocity of  $\sim 20$  nm s<sup>-1</sup> towards the microtubules plus end [5].



**Figure 1.** AtKRP125b moves with a slow velocity in in vitro gliding assays. (a) Schematic representation of a gliding motility assay with His-tagged full-length AtKRP125b. (b) Fluorescent micrographs of polarity-marked microtubules gliding along a AtKRP125b coated surface at different timepoints. The plus end of the polarity-marked microtubule is labelled in red, the remainder of the microtubule is labelled in blue. The starting position of each microtubule is marked by a white arrowhead. (c) Kymograph of the lower microtubule shown in (b). This space–time plot displays intensity values along the microtubule’s path over time. The velocity can be deduced from the kymograph’s slope. (d) Histogram of the mean transport velocities for 504 gliding microtubule filaments. A Gaussian fit (red line) shows a velocity of  $17.0 \pm 8.8 \text{ nm s}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD).

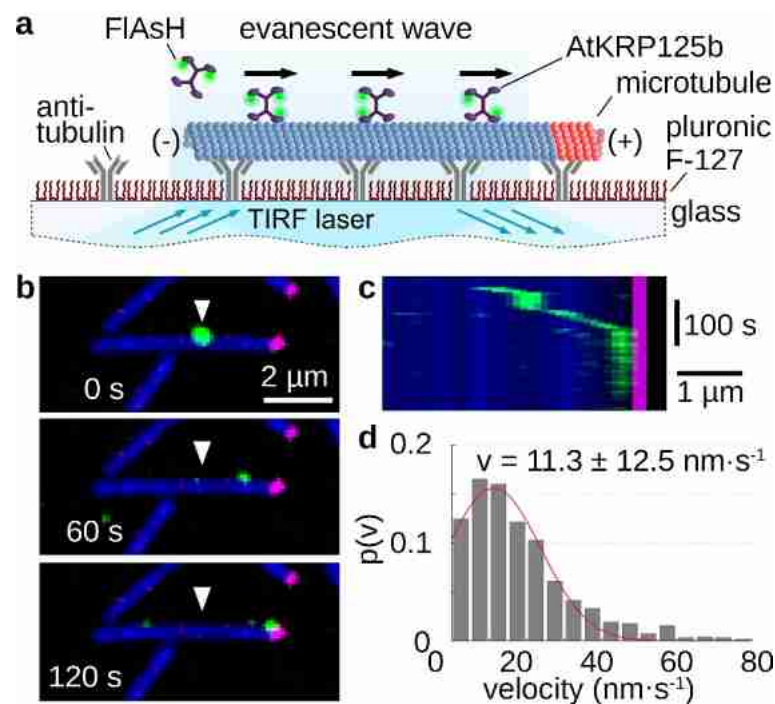
## 2.2. AtKRP125b Is a Processive Kinesin

The processivity of a kinesin describes its ability to move as a single molecule over longer distances along microtubules, always with at least one motor head bound to the microtubule. The longer the traveled distance of this motor protein, the more processive it is. For the role in the mitotic spindle, high processivity is not necessary, because in this case several molecules cooperate. Therefore, kinesin-5 motor proteins can distribute the resulting forces very well among several motor proteins in a cluster and prevent the detachment of individual molecules [20]. In the stepping assay, single FAsH-stained AtKRP125b molecules moved along microtubules, which were tightly bound to the glass surface via antibodies (Figure 2a). It is clearly evident that AtKRP125b moves processively in the  $\mu\text{m}$  range (Figure 2b,c, Supplementary Movie S2). An evaluation of the velocity of the single molecules revealed a mean velocity of  $11.3 \pm 12.5 \text{ nm/s}$  (mean  $\pm$  SD,  $n = 122$  total stepping events), which is comparable to the velocity from the gliding assay (Figures 2d and 1d).

## 2.3. AtKRP125b Moves along Microtubules toward Their plus End

The directionality of a kinesin is mainly determined by the location of the motor domain and a specific neck-linker sequence [21]. Since the plus ends of spindle microtubules point toward the midzone and kinesin-5 is involved in elongation, i.e., pushing apart the overlapping spindle molecules, AtKRP125b was hypothesized to be a plus end-directed motor protein to fulfill the classical role of a kinesin-5 in the mitotic spindle. In the applied stepping assay, it could be seen that AtKRP125b molecules always moved toward the labeled plus end (Figure 2b,c, Supplementary Movie S2). Accordingly, it could

be observed that the displacement of microtubules was unidirectional with a leading minus end and a trailing plus end (labelled end) in the gliding assay (Figure 1b,c and Supplementary Movie S1), indicating that AtKRP125b moved toward the plus end of the microtubule and thus it is a plus end-directed kinesin. This finding is consistent with the directionality determined for human Eg5, which also moves toward the plus end [5].



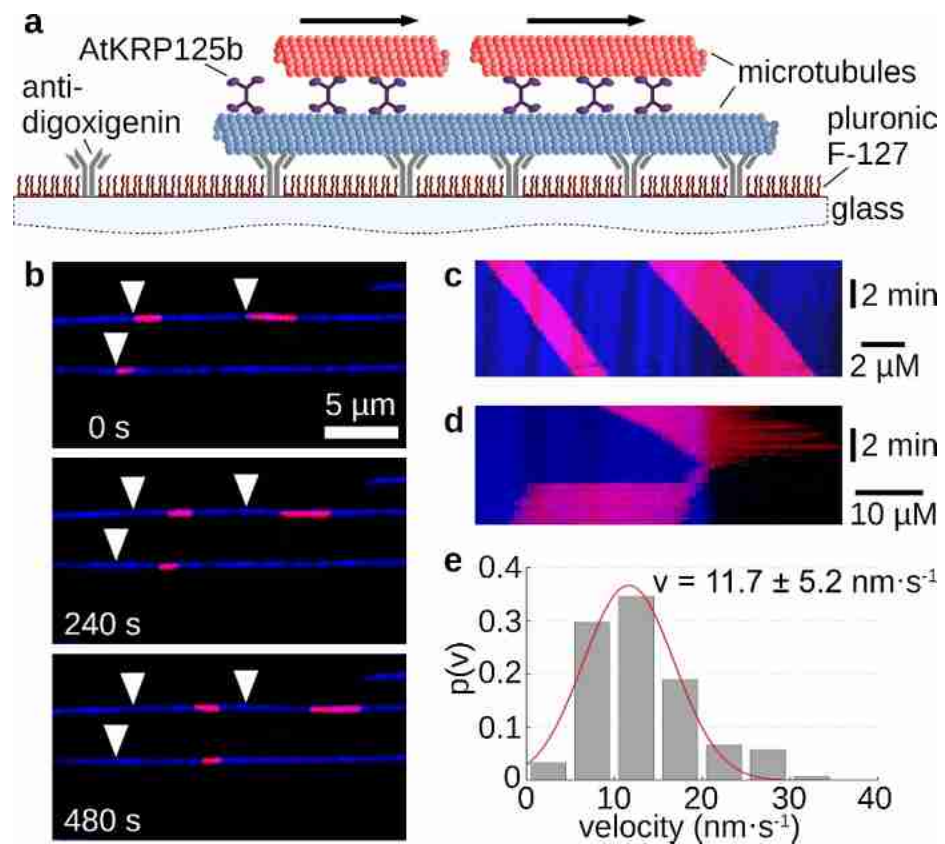
**Figure 2.** Single molecule stepping assays reveal, AtKRP125b is a processive motor protein. (a) Schematic representation of a single molecule stepping assay with fluorescently-labelled full length AtKRP125b. (b) Fluorescent micrographs of a single AtKRP125b molecule (green) stepping along an immobilized polarity marked microtubule at different timepoints. The plus end of the polarity-marked microtubule is labelled in magenta, while the remainder of the microtubule is labelled in blue. The starting position of the AtKRP125b-molecule is marked by a white arrowhead. (c) Kymograph of the stepping event shown in (b). (d) Histogram of the mean transport velocities for 121 single molecule stepping events. A Gaussian fit (red line) shows a velocity of  $11.3 \pm 12.5 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD).

#### 2.4. AtKRP125b Is Able to Cross-Link Microtubules and Slide Them Apart

The homotetrameric structure of kinesin-5 proteins generally enables two microtubules to be linked and slid apart simultaneously. In the sliding assay, fluorescently labelled long microtubules were tightly bound to the support via antibodies. Free short microtubules labeled with a fluorescent dye of a different wavelength were cross-linked to the immobilized microtubule by recombinant AtKRP125b (Figure 3a). Movement of the short microtubules along the long microtubules occurred only in some cases (Figure 3b,c, Supplementary Movie S3). Moreover, there were rare cases in which the short microtubule reached the end of the long microtubule and, instead of detaching, made a 180° turn and re-attached to the long microtubule. In these cases, the movement stopped (Figure 3d, Supplementary Movie S4). If the plus ends of the microtubules point in the same direction, force is exerted in the same direction by both pairs of motor domains and no net motion occurs. However, if the microtubules are in an anti-parallel relationship, force from the two pairs of motor domains will be exerted in opposite directions and there will be net motion. This motion should be twice as fast as the determined velocity from the gliding assay. Surprisingly, we determined a mean velocity of  $11.7 \pm 5.2 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD,



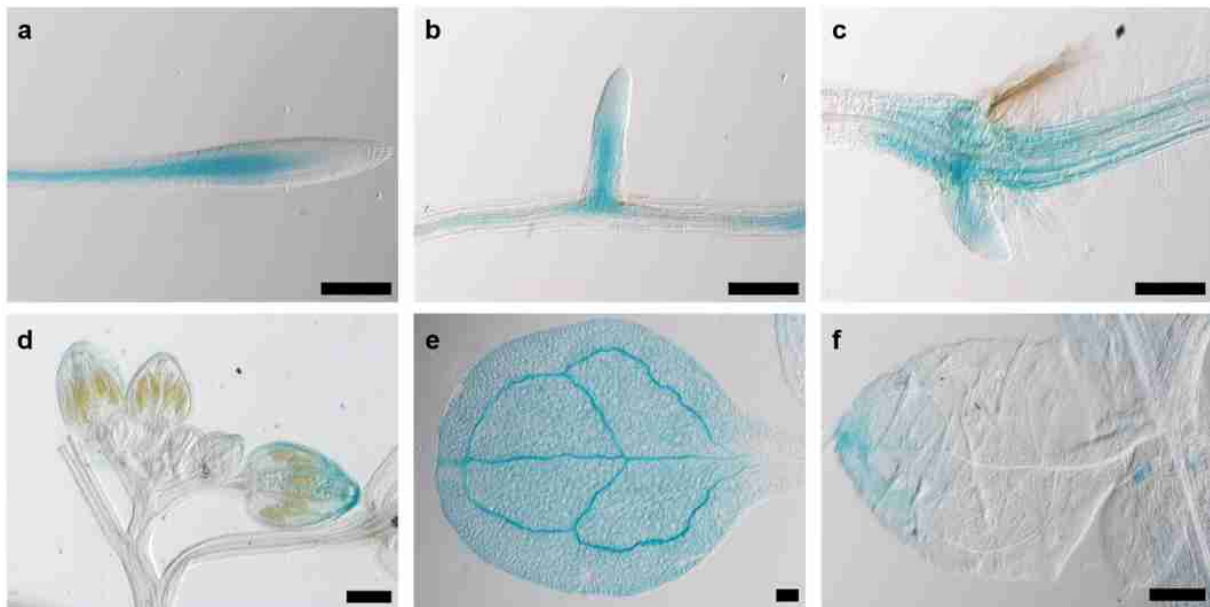
$N = 121$  total sliding events, Figure 3e) for the moving short microtubules, which was not a doubling but even a slight slowdown compared to the gliding velocity of  $17 \text{ nm s}^{-1}$ .



**Figure 3.** Sliding assays show AtKRP125b cross-links microtubules and slides them apart. (a) Schematic representation of a sliding motility assay with full-length AtKRP125b. (b) Fluorescent micrographs of short red microtubules sliding along long, immobilized microtubules (blue) at different timepoints. The starting position of each microtubule is marked by a white arrowhead. (c) Kymograph of the upper blue microtubule shown in (b). (d) Kymograph of a short, red microtubule being transported to the end of the lower, blue microtubule and immediately flipping back onto it. The red microtubule stops after flipping. (e) Histogram of the mean transport velocities for 122 sliding microtubule filaments. A gaussian fit (red line) shows a velocity of  $11.7 \pm 5.2 \text{ nm s}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD).

### 2.5. The *AtKRP125b* Promoter Is Not Active in Mitotically Active Tissues

Since cell division in plants occurs almost exclusively in meristematic tissue, we assumed that the promoter activity of *AtKRP125b* is most pronounced in or even restricted to meristems. GUS staining of eight-day-old *pAtKRP125b::GUS* seedlings revealed blue staining of leaves and roots. Promoter activity was observed in vascular tissue in the root (Figure 4a), in emerging lateral roots (Figure 4b), in the basal region of the hypocotyl (Figure 4c), in the petals of young flowers (Figure 4d), and the apex and vascular tissue of cotyledons and true leaves (Figure 4e,f). In 24-day-old *pAtKRP125b::GUS* plants, the promoter was also active in vascular tissue of petals, the stigma, and anthers of mature flowers and in the remnants of the stigma and in the internode of young siliques (data not shown). Remarkably, no GUS staining was detected in mitotically active tissue such as the root apical meristem or the flowering meristem, which contradicts our hypothesis that *AtKRP125b* shows a role in the mitotic spindle. However, we cannot exclude the possibility that not all regulatory elements were captured with the selected promoter sequence. A repeat of the experiment with a longer promoter sequence failed to transform with agrobacteria due to the length of the construct.



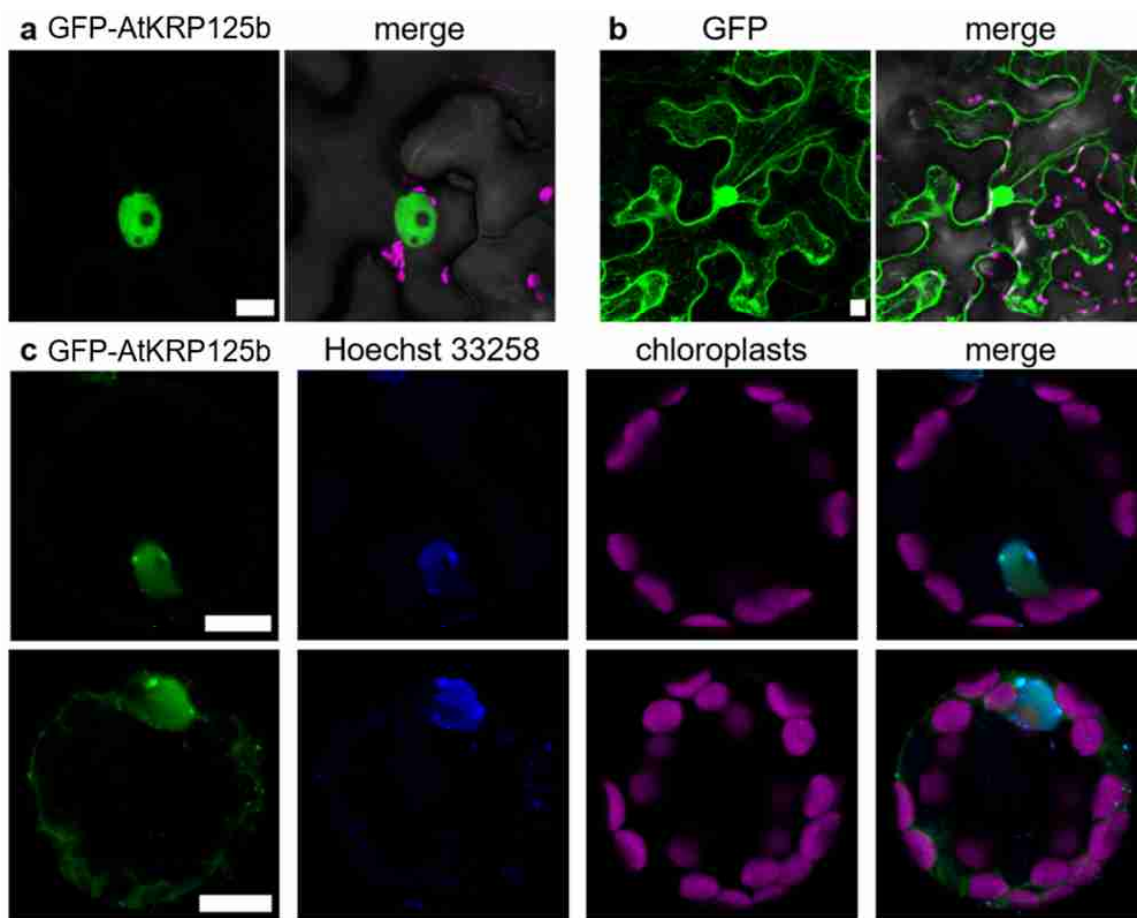
**Figure 4.** The *AtKRP125b* promoter is active in various organs. Images show GUS-staining in 8 day-old plants of *pAtKRP125b::GUS* lines after 90 min incubation with X-Gluc. (a,b), Intense GUS staining was observed in vascular tissue of the root (a) and emerging lateral root (b) above the meristem. (c) GUS staining was visible in the hypocotyl and in emerging adventitious roots. d,e,f, GUS-staining was observed in the apex and vascular tissue of flower buds (d), cotyledons (e), and true leaves (f). Scale bars: 200  $\mu$ m.

#### 2.6. *AtKRP125b* Knockout Mutants Show No Developmental Abnormalities

If *AtKRP125b* is indeed involved in mitotic spindle formation, knockout of the corresponding gene should result in changes of plant development, such as growth retardation. However, phenotyping of *krp125b* single mutants did not show any significant change in growth or development compared with wild-type plants (Figure S1). It may, however, well be that one of the other kinesin-5 family members substitutes for the missing *AtKRP125b* function. All our attempts to generate double or multiple kinesin-5 *Arabidopsis* mutants by CRISPR-Cas9 technology were not successful.

#### 2.7. *GFP-AtKRP125b* Is Localized in the Nucleus and in the Cytoplasm

The lack of *AtKRP125b* promoter activity in mitotically active cells prompted us to test for a putative subcellular localization of the *AtKRP125b* protein. For that purpose, we infected *Nicotiana benthamiana* leaf pavement cells with *Agrobacterium tumefaciens* carrying a *CaMV-35S::GFP-AtKRP125b* construct and detected the fluorescence by confocal laser scanning microscopy. In contrast to the GFP control, which was distributed between the nucleus and cytoplasm, the GFP-*AtKRP125b* fusion protein was exclusively found in the nucleus (Figure 5a,b). To quantify the overlap of the signals, we calculated the square of Pearson's correlation coefficient ( $R^2$ ), which was 0.77 and 0.62, respectively, indicating high signal agreement. In the next step, we were aiming to study the subcellular localization in the native environment and transformed isolated *Arabidopsis* leaf cell protoplasts. A strong GFP fluorescence was observed in a nuclear structure. The overlap with the applied Hoechst 33342 signal, which stained DNA, confirmed that the GFP-*AtKRP125b* protein was indeed localized to the nucleus (Figure 5c). In addition to this expected localization, a fluorescence signal was present in the cytosol in about 50% of all protoplasts (Figure 5c), thus indicating that *AtKRP125b* may also have a function outside the nucleus during interphase.



**Figure 5.** GFP-AtKRP125b is localized in the nucleus and cytoplasm. (a) Fluorescent image of transiently expressed GFP-AtKRP125b (green) in *Nicotiana benthamiana* leaf pavement cells. The second image shows a merge of three channels: GFP-AtKRP125b (green), bright field (grey) and chlorophyll autofluorescence (magenta). (b) Fluorescent image of transiently expressed free GFP as a comparison to (a). Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ . (c) Co-localization of GFP-AtKRP125b and nucleus in *Arabidopsis thaliana* mesophyll protoplasts. Images show transient expression of GFP-AtKRP125b (green), nuclei staining with Hoechst 33342 (blue) and chloroplast autofluorescence (magenta). The upper images show a protoplast without a signal in the cytoplasm. The lower images show a maximum intensity projection of a protoplast with an additional GFP-AtKRP125b signal in the cytosol.

### 3. Discussion

Members of the kinesin-5 motor protein subfamily have a major function in the spindle organization during mitosis in different organisms ranging from humans to plants [9]. Here, we demonstrated that the biochemical and biophysical properties of AtKRP125b, one of four kinesin-5 proteins in *Arabidopsis*, were in line with a putative function in spindle organization. Its intracellular localization in nucleus and cytoplasm may suggest an additional function during interphase.

The ability to cross-link the spindle microtubules and thus to maintain the stability of the mitotic spindle depends on the property of kinesin-5 proteins to bind to two different microtubules at the same time and to displace them against each other. The tetrameric nature of kinesin-5 allows the cross-linking of microtubules with its two pairs of motor domains at each end. Though this function has been widely observed in all eukaryotes and is well investigated in animals [5–7,11], it had not been demonstrated yet in vitro for a kinesin-5 motor protein from plants. In the first step, we were interested to find out whether AtKRP125b is a plus-end directed motor protein. Studies on the directionality showed that most kinesin-5 proteins, which were localized in the midzone of the mitotic spindle and were responsible for spindle elongation, were plus end-directed motor pro-

teins. An exception is the two yeast kinesins Kip1 and Cin8, which were described as bidirectional kinesins [22–24]. In the case of Cin8 bidirectionality is achieved by clustering of multiple molecules. This bidirectionality may indicate a function of Cin8 unrelated to the mitotic spindle [24]. In contrast, kinesin-5 from tobacco TKRP125 shows distinct plus end-directed movement [10,25]. We performed gliding assays and found that AtKRP125 was capable of binding to microtubules and to move towards the plus-end of polarity-marked microtubules (Figure 1a–c and Supplementary Movie S1). We determined the velocity of gliding microtubule filaments to  $17 \pm 8.8 \text{ nm s}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD,  $n = 504$  total transport events, Figure 1d). This relatively slow velocity was comparable to studies on Eg5, showing that Eg5 moves at a velocity of  $\sim 20 \text{ nm s}^{-1}$  [5]. Such slow velocities are common for kinesins that work collectively in a cluster. These motor proteins are usually non-processive kinesins, because they distribute the resulting forces among several motor proteins in the cluster and prevent the detachment of individual molecules [20]. Although it is not required to be processive to slide microtubules [26–29], we wanted to know whether AtKRP125b is a processive motor, because such processivity might allow more diverse functions, such as, for example, long range transport. Therefore, we examined the processivity of AtKRP125b in addition to its directionality and velocity. Stepping assays with FIAsh-labelled AtKRP125b revealed a surprisingly high processivity in the  $\mu\text{m}$  range (Figure 2b,c). In addition, we have shown in sliding assays that AtKRP125b was indeed able not only to cross-link microtubules but also to move anti-parallel aligned microtubules along each other. Since AtKRP125b exerts force in both directions on microtubules as a bipolar tetramer, one would expect the velocity of transported microtubules to be twice as high as in the gliding assay. In similar in vitro experiments with Eg5, Kapitein et al. [5] observed a doubling of the velocity in sliding assays ( $\sim 40 \text{ nm s}^{-1}$ ) compared to gliding assays ( $\sim 20 \text{ nm s}^{-1}$ ) which suits the velocity of microtubules sliding apart at the equator of the metaphase spindle in animals ( $\sim 30\text{--}50 \text{ nm s}^{-1}$ ) [30]. In contrast to that, the velocity in the sliding assay with AtKRP125b was even slightly lower than the velocity in the gliding assay. We cannot rule out the possibility that the low velocity is due to lack of posttranslational modifications in the recombinant molecule, but we rather suspect that the unusually high processivity is associated with the low velocity in the sliding assay. Cryo-EM structure analysis revealed that the tail domain of one kinesin-5 tetramer interacts with the opposing motor domain of a neighboring tetramer [31]. It has been shown that this interaction has a significant impact on the ATP-binding of the motor domain. Thereby, the tail slows down the ATP binding of the motor domain, resulting in a prolonged interaction between the motor domain and microtubule, a slower velocity, and a higher processivity. The reduction of velocity brings an increase of generated force in return (Shimamoto et al. 2015). Since the plant spindle differs in structure from the spindle in animal cells, it is quite possible that this additional force is a prerequisite for AtKRP125b to fulfill its canonical role in the plant cell. In agreement with our data, AtKRP125c was also found to be associated with microtubules and appears to play a central role in the mitotic spindle [11]. Barroso et al. [32] demonstrated binding to microtubules for DcKRP120 from carrot (*Daucus carota*), and Asada et al. [10] demonstrated for TKRP125 from tobacco that this protein moves along microtubules toward their plus end. Both proteins appear to be primarily active during mitosis [10,32]. Furthermore, it is also conceivable that AtKRP125b requires this additional force for other functions unrelated to the mitotic spindle, especially since AtKRP125c is also thought to have a role outside the mitotic spindle [11].

In order to support the notion of AtKRP125b functions in addition to the putative role in the mitotic spindle, we determined the *AtKRP125b* promoter activity and the intracellular localization of the gene product. Since the mitotic spindle is only formed in cells undergoing cell division and these cells are located in mitotic tissue, we assumed to find *AtKRP125b* promoter activity mainly in meristems. In fact, however, GUS staining of *AtKRP125b*-promoter: *GUS* plants showed that the promoter was primarily active in vascular tissue. We did not detect any activity in meristematic tissue (Figure 4). The absence of *AtKRP125b* promoter activity in these regions may contradict our hypothesis that



AtKRP125b has a role in the mitotic spindle. However, we cannot exclude the possibility that not all regulatory elements were captured with the selected promoter sequence or that mRNA produced in the vasculature may be transported into mitotically active tissues. Previously, expression analyses indeed showed that the *AtKRP125b* transcript was present in meristematic tissues and induced in mitosis [25]. The high basal level of *AtKRP125b* transcript before the induction of mitosis may suggest that *AtKRP125b* is expressed already in interphase and has a function that is beyond mitosis [25]. This was supported by the detection of GFP-AtKRP125b fusion proteins not only in the nucleus, but also in the cytoplasm (Figure 5). Future experiments will show whether this dual localization is due to shuttling of AtKRP125b between cytoplasm and nucleus or whether AtKRP125b has an additional function during interphase. Such functions outside the mitotic spindle have already been described for animal homologs of kinesin-5. Thus, human Eg5 plays a role in the transport of neurotrophins and neurotransmitter receptors in neurons [33]. Falnikar et al. [34] found that when Eg5 is inhibited in migrating neurons, their velocity is increased, but their movement is less directed. Eg5 transports short microtubules along the axons of migrating neurons. When Eg5 is inhibited, the frequency of transport is reduced [34]. In *Drosophila melanogaster*, kinesin-5 Klp61F transports proteins from the Golgi complex to the cell surface in non-mitotic cells [35]. A similar function for AtKRP125b in non-meristematic tissue would be possible. However, this needs to be investigated by further experiments. Not only in animal cells, but also in plant cells, the localization of kinesin-5 indicates a role outside the mitotic spindle. Inhibition of TKRP125 leads to inhibition of translocation of phragmoplast microtubules in tobacco BY-2 cells [10]. In addition, TKRP125 is present along cortical microtubules during S phase [10]. Based on the ability of AtKRP125b to cross-link and counter-shift microtubules, we hypothesize that AtKRP125b is involved in such processes. Kinesin-4 FRA1 is involved in cell wall assembly and appears to play a role in the organization of cortical microtubule networks [36]. Involvement of kinesin-5 in these processes has not yet been investigated but seems possible to us.

Taken together, our in vitro data showed that on the molecular level AtKRP125b displays the canonical properties of a kinesin-5 motor protein. The localization of AtKRP125b in the nucleus and cytoplasm, as well as the missing promoter activity in meristematic tissue, open the possibility for additional functions beyond the spindle elongation for kinesin-5 proteins in plants.

## 4. Material and Methods

### 4.1. Protein Expression, Purification, and Labelling

For the expression plasmid, *AtKRP125b* cDNA was cloned into the pFastBac1-vector (Invitrogen, Waltham, MA, USA) by using overlap extension PCR cloning [37]. In the cloning procedure, a His-tag and tetracycline-tag were added, respectively. After expression in High Five Cells (BTI-TN-5B1-4), recombinant His-tagged protein was purified via metal affinity chromatography (HisTrap by GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK), snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  or used immediately. Microtubules were purified and polymerized as described before [38,39]. Polarity-marked microtubules were polymerized as described previously [40]. Cy5-labelled tubulin was used to prepare the seeds and Dylight 594-labelled tubulin for the elongation, resulting in Dylight 594-labelled plus ends. Digoxigenin-labelled microtubules were prepared as described previously [39] using a mixture of digoxigenin-labelled tubulin and Cy5-labelled tubulin in a 1:5 ratio.

### 4.2. In Vitro Motility Assays

Microscope flow chambers were constructed as described previously [41]. Gliding and stepping assays were performed as described before [42,43]. AtKRP125b was stained with  $1\ \mu\text{M}$  FlAsH-EDT2 [44] for one hour on ice before imaging stepping assays. For the sliding assay, digoxigenin-labelled microtubules were immobilized on the glass surface with digoxigenin antibodies (Roche, Basel, Switzerland). Full-length AtKRP125b was injected into the flow chamber and attached to the digoxigenin-labelled microtubules.

Unbound motor protein was washed out after short incubation with BRB80 pH 6.9 containing 0.01 mM Taxol. Then, short Dylight 594-labelled microtubules were injected and washed out after short incubation. All motility assays were performed at 28 °C in BRB80 pH 6.9 supplemented with 1 mM ATP, 10 mM DTT, 10 µM Taxol and 1 mM n-propyl galate [45]. Fluorescently labelled microtubules were visualized with epi-illumination under a fluorescence microscope (TI-E, Nikon, Tokyo, Japan) at 564 nm or 640 nm, respectively. Single FLAsH-stained AtKRP125b molecules in stepping assays were excited with 488 nm TIRF illumination. Positions of microtubule filaments and single motor protein molecules were tracked with the FIESTA software [46], and velocities were analyzed using MatLab (Mathworks, Natick, MA, USA).

#### 4.3. Analysis of Promoter Activity

For cloning of the *AtKRP125b*-promoter GUS construct we amplified 847 bp in front of the start codon of *AtKRP125b* from genomic DNA by PCR with primers Kin5\_GUS-fw (CACCGIGTTTCCTAGCCTTCTTTT) and Kin5\_GUS-rev (GAACGGACGGCGAATCCAGTGAGA) and cloned the derived fragment into pMDC163 using TOPO PCR-Cloning (Invitrogen, Waltham, MA, USA). *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 cells were transformed with this plasmid and painted onto flowers and buds of *Arabidopsis thaliana* plants as previously described [47]. Transformed offspring was identified by hygromycin selection [48]. We identified five independent GUS-positive plant lines that showed a distinct signal after staining in X-Gluc solution for 90 min.

#### 4.4. Plant Material and Growth Conditions

If not stated otherwise, all plants were grown either on soil or Murashige and Skoog media (MS, Duchefa, Haarlem, The Netherlands) supplemented with 0.8% phyto agar (Duchefa) and 1% sucrose in growth chambers at 22 °C under long-day conditions (16 h light, 8 h dark). To examine *Arabidopsis thaliana* roots, seedlings were grown at 22 °C and 17 °C in a vertical position for seven days under long-day conditions (16 h light, 8 h dark) and afterwards shifted to new plates to ensure that the roots grew on top of MS media. The roots were exposed to light during growth on MS medium. 72 plants of each line were examined. The T-DNA alleles of *atkrp125b-1* (GK011.H10) and *atkrp125b-2* (SALK\_152139) were received from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre.

#### 4.5. Subcellular Localization

A GFP-fusion construct was generated by cloning *AtKRP125b* from cDNA into pMDC43 using TOPO-PCR cloning (Invitrogen). Protoplasts from *Arabidopsis thaliana* mesophyll cells were prepared as previously described [49] and transformed, using 20 ng of plasmid DNA. Additionally, the construct was inserted into *A. tumefaciens* C58C1 and then transformed into *N. benthamiana* leaves [50]. These procedures were repeated 3 times. All imaging of subcellular localization was captured with a confocal laser scanning microscope (TCS SP8, Leica, Wetzlar, Germany). GFP fluorescence was visualized using an argon laser at 488 nm for excitation and an emission window of 502–512 nm. Hoechst 33342 was visualized with an excitation of wavelength of 405 nm and an emission window of 445–465 nm, whereas chlorophyll autofluorescence was detected in an emission window of 660–675 nm.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms222111361/s1>.

**Author Contributions:** W.J.W. and S.H. designed the experiments, T.S. and S.S. carried out the experiments; all authors wrote the manuscript. All authors analyzed the data and discussed the results. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** We thank Julia Sandberg, Wenke Bahnsen, and Judith Mehrmann (Universität Hamburg) for technical assistance. We acknowledge support by Astrid Sydow and Gunnar Baermann (UKE Hamburg) with the protein expression in High Five cells.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Ogawa, T.; Nitta, R.; Okada, Y.; Hirokawa, N. A common mechanism for microtubule destabilizers-M type kinesins stabilize curling of the protofilament using the class-specific neck and loops. *Cell* **2004**, *116*, 591–602. [[CrossRef](#)]
2. Gigant, E.; Stefanutti, M.; Laband, K.; Gluszek-Kustusz, A.; Edwards, F.; Lacroix, B.; Maton, G.; Canman, J.C.; Welburn, J.P.I.; Dumont, J. Inhibition of ectopic microtubule assembly by the kinesin-13 KLP-7 prevents chromosome segregation and cytokinesis defects in oocytes. *Development* **2017**, *144*, 1674–1686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Brady, S.T. A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature* **1985**, *317*, 73–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Vale, R.D.; Reese, T.S.; Sheetz, M.P. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* **1985**, *42*, 39–50. [[CrossRef](#)]
5. Kapitein, L.C.; Peterman, E.J.G.; Kwok, B.H.; Kim, J.H.; Kapoor, T.M.; Schmidt, C.F. The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature* **2005**, *435*, 114–118. [[CrossRef](#)]
6. Miki, T.; Naito, H.; Nishina, M.; Goshima, G. Endogenous localizome identifies 43 mitotic kinesins in a plant cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E1053–E1061. [[CrossRef](#)]
7. Peters, N.T.; Miller, A.C.; Kropf, D.L. Localization and function of Kinesin-5-like proteins during assembly and maintenance of mitotic spindles in *Silvetia compressa*. *BMC Res. Notes* **2009**, *2*, 106. [[CrossRef](#)]
8. Kashina, A.S.; Baskin, R.J.; Cole, D.G.; Wedaman, K.P.; Saxton, W.M.; Scholey, J.M. A bipolar kinesin. *Nature* **1996**, *379*, 270–272. [[CrossRef](#)]
9. Mann, B.J.; Wadsworth, P. Kinesin-5 Regulation and Function in Mitosis. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 66–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Asada, T.; Kuriyama, R.; Shibaoka, H. TKRP125, a kinesin-related protein involved in the centrosome-independent organization of the cytokinetic apparatus in tobacco BY-2 cells. *J. Cell Sci.* **1997**, *110*, 179–189. [[CrossRef](#)]
11. Bannigan, A.; Scheible, W.-R.; Lukowitz, W.; Fagerstrom, C.; Wadsworth, P.; Somerville, C.; Baskin, T.I. A conserved role for kinesin-5 in plant mitosis. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 2819–2827. [[CrossRef](#)]
12. Richardson, D.N.; Simmons, M.P.; Reddy, A.S.N. Comprehensive comparative analysis of kinesins in photosynthetic eukaryotes. *BMC Genom.* **2006**, *7*, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Reddy, A.S.; Day, I.S. Kinesins in the Arabidopsis genome: A comparative analysis among eukaryotes. *BMC Genom.* **2001**, *2*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Zhu, C.; Dixit, R. Functions of the Arabidopsis kinesin superfamily of microtubule-based motor proteins. *Protoplasma* **2012**, *249*, 887–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Nishihama, R.; Soyano, T.; Ishikawa, M.; Araki, S.; Tanaka, H.; Asada, T.; Irie, K.; Ito, M.; Terada, M.; Banno, H.; et al. Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. *Cell* **2002**, *109*, 87–99. [[CrossRef](#)]
16. Itoh, R.; Fujiwara, M.; Yoshida, S. Kinesin-related proteins with a mitochondrial targeting signal. *Plant Physiol.* **2001**, *127*, 724–726. [[CrossRef](#)]
17. Hiwatashi, Y.; Obara, M.; Sato, Y.; Fujita, T.; Murata, T.; Hasebe, M. Kinesins are indispensable for interdigitation of phragmoplast microtubules in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **2008**, *20*, 3094–3106. [[CrossRef](#)]
18. Lee, Y.R.; Liu, B. Identification of a phragmoplast-associated kinesin-related protein in higher plants. *Curr. Biol.* **2000**, *10*, 797–800. [[CrossRef](#)]
19. Lipka, E.; Gadeyne, A.; Stöckle, D.; Zimmermann, S.; de Jaeger, G.; Ehrhardt, D.W.; Kirik, V.; van Damme, D.; Müller, S. The Phragmoplast-Orienting Kinesin-12 Class Proteins Translate the Positional Information of the Preprophase Band to Establish the Cortical Division Zone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **2014**, *26*, 2617–2632. [[CrossRef](#)]
20. Shimamoto, Y.; Forth, S.; Kapoor, T.M. Measuring Pushing and Braking Forces Generated by Ensembles of Kinesin-5 Crosslinking Two Microtubules. *Dev. Cell* **2015**, *34*, 669–681. [[CrossRef](#)]
21. Endow, S.A.; Waligora, K.W. Determinants of kinesin motor polarity. *Science* **1998**, *281*, 1200–1202. [[CrossRef](#)]
22. Fridman, V.; Gerson-Gurwitz, A.; Shapira, O.; Movshovich, N.; Lakämper, S.; Schmidt, C.F.; Gheber, L. Kinesin-5 Kip1 is a bi-directional motor that stabilizes microtubules and tracks their plus-ends in vivo. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 4147–4159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gerson-Gurwitz, A.; Thiede, C.; Movshovich, N.; Fridman, V.; Podolskaya, M.; Danieli, T.; Lakämper, S.; Klopfenstein, D.R.; Schmidt, C.F.; Gheber, L. Directionality of individual kinesin-5 Cin8 motors is modulated by loop 8, ionic strength and microtubule geometry. *EMBO J.* **2011**, *30*, 4942–4954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Roostalu, J.; Hentrich, C.; Bieling, P.; Telley, I.A.; Schiebel, E.; Surrey, T. Directional switching of the kinesin Cin8 through motor coupling. *Science* **2011**, *332*, 94–99. [[CrossRef](#)]
25. Vanstraelen, M.; Inzé, D.; Geelen, D. Mitosis-specific kinesins in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **2006**, *11*, 167–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Braun, M.; Lansky, Z.; Szuba, A.; Schwarz, F.W.; Mitra, A.; Gao, M.; Lüdecke, A.; ten Wolde, P.R.; Diez, S. Changes in microtubule overlap length regulate kinesin-14-driven microtubule sliding. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 1245–1252. [[CrossRef](#)]
27. Hentrich, C.; Surrey, T. Microtubule organization by the antagonistic mitotic motors kinesin-5 and kinesin-14. *J. Cell Biol.* **2010**, *189*, 465–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Hepperla, A.J.; Willey, P.T.; Coombes, C.E.; Schuster, B.M.; Gerami-Nejad, M.; McClellan, M.; Mukherjee, S.; Fox, J.; Winey, M.; Odde, D.J.; et al. Minus-end-directed Kinesin-14 motors align antiparallel microtubules to control metaphase spindle length. *Dev. Cell* **2014**, *31*, 61–72. [[CrossRef](#)]
29. Mitra, A.; Meißner, L.; Gandhimathi, R.; Renger, R.; Ruhnow, F.; Diez, S. Kinesin-14 motors drive a right-handed helical motion of antiparallel microtubules around each other. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2565. [[CrossRef](#)]
30. Sawin, K.E.; Mitchison, T.J. Poleward microtubule flux mitotic spindles assembled in vitro. *J. Cell Biol.* **1991**, *112*, 941–954. [[CrossRef](#)]
31. Bodrug, T.; Wilson-Kubalek, E.M.; Nithianantham, S.; Thompson, A.F.; Alfieri, A.; Gaska, I.; Major, J.; Debs, G.; Inagaki, S.; Gutierrez, P.; et al. The kinesin-5 tail domain directly modulates the mechanochemical cycle of the motor domain for anti-parallel microtubule sliding. *eLife* **2020**, *9*, e51131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Barroso, C.; Chan, J.; Allan, V.; Doonan, J.; Hussey, P.; Lloyd, C. Two kinesin-related proteins associated with the cold-stable cytoskeleton of carrot cells: Characterization of a novel kinesin, DcKRP120-2. *Plant J.* **2000**, *24*, 859–868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ari, C.; Borysov, S.I.; Wu, J.; Padmanabhan, J.; Potter, H. Alzheimer amyloid beta inhibition of Eg5/kinesin 5 reduces neurotrophin and/or transmitter receptor function. *Neurobiol. Aging* **2014**, *35*, 1839–1849. [[CrossRef](#)]
34. Fahnkar, A.; Tole, S.; Baas, P.W. Kinesin-5, a mitotic microtubule-associated motor protein, modulates neuronal migration. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 1561–1574. [[CrossRef](#)]
35. Wakana, Y.; Villeneuve, J.; van Galen, J.; Cruz-Garcia, D.; Tagaya, M.; Malhotra, V. Kinesin-5/Eg5 is important for transport of CARTS from the trans-Golgi network to the cell surface. *J. Cell Biol.* **2013**, *202*, 241–250. [[CrossRef](#)]
36. Ganguly, A.; Zhu, C.; Chen, W.; Dixit, R. FRA1 Kinesin Modulates the Lateral Stability of Cortical Microtubules through Cellulose Synthase-Microtubule Uncoupling Proteins. *Plant Cell* **2020**, *32*, 2508–2524. [[CrossRef](#)]
37. Bryksin, A.V.; Matsumura, I. Overlap extension PCR cloning: A simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques* **2010**, *48*, 463–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Castoldi, M.; Popov, A.V. Purification of brain tubulin through two cycles of polymerization-depolymerization in a high-molarity buffer. *Protein Expr. Purif.* **2003**, *32*, 83–88. [[CrossRef](#)]
39. Hyman, A.; Drechsel, D.; Kellogg, D.; Salser, S.; Sawin, K.; Steffen, P.; Wordeman, L.; Mitchison, T. Preparation of modified tubulins. *Methods Enzymol.* **1991**, *196*, 478–485. [[CrossRef](#)]
40. Howard, J.; Hyman, A.A. Preparation of marked microtubules for the assay of the polarity of microtubule-based motors by fluorescence microscopy. *Methods Cell Biol.* **1993**, *39*, 105–113. [[CrossRef](#)]
41. Fink, G.; Hajdo, L.; Skowronek, K.J.; Reuther, C.; Kasprzak, A.A.; Diez, S. The mitotic kinesin-14 Ncd drives directional microtubule-microtubule sliding. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 717–723. [[CrossRef](#)]
42. Walter, W.J.; Beránek, V.; Fischermeier, E.; Diez, S. Tubulin acetylation alone does not affect kinesin-1 velocity and run length in vitro. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e42218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Walter, W.J.; Koonce, M.P.; Brenner, B.; Steffen, W. Two independent switches regulate cytoplasmic dynein's processivity and directionality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 5289–5293. [[CrossRef](#)]
44. Griffin, B.A.; Adams, S.R.; Tsien, R.Y. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **1998**, *281*, 269–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Widengren, J.; Chmyrov, A.; Eggeling, C.; Löfdahl, P.-A.; Seidel, C.A.M. Strategies to improve photostabilities in ultrasensitive fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 429–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ruhnow, F.; Zwicker, D.; Diez, S. Tracking single particles and elongated filaments with nanometer precision. *Biophys. J.* **2011**, *100*, 2820–2828. [[CrossRef](#)]
47. Zhang, X.; Henriques, R.; Lin, S.-S.; Niu, Q.-W.; Chua, N.-H. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 641–646. [[CrossRef](#)]
48. Harrison, S.J.; Mott, E.K.; Parsley, K.; Aspinall, S.; Gray, J.C.; Cottage, A. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* **2006**, *2*, 19. [[CrossRef](#)]
49. Tong, M.; Kotur, T.; Liang, W.; Vogelmann, K.; Kleine, T.; Leister, D.; Brieske, C.; Yang, S.; Lüdke, D.; Wiermer, M.; et al. E3 ligase SAUL1 serves as a positive regulator of PAMP-triggered immunity and its homeostasis is monitored by immune receptor SOC3. *New Phytol.* **2017**, *215*, 1516–1532. [[CrossRef](#)]
50. Sparkes, I.A.; Runions, J.; Kearns, A.; Hawes, C. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2019–2025. [[CrossRef](#)]



## Anteil der Kandidatin an der Publikation Schattner et al. (2020)

Das Projekt wurde innerhalb der Arbeitsgruppe zusammen mit Prof. Wim Walter, PhD (Arbeitsgruppenleiter) und der Kandidatin geplant und in wöchentlichen Meetings besprochen. In den Meetings wurden Zwischenergebnisse diskutiert und neue Experimente geplant.

Die Kandidatin war bei der Durchführung aller in die Publikation eingeflossenen Experimente beteiligt. Die Pollenkeimungsassays, die die Grundlage für die Datenauswertung in der Publikation bilden, wurden teilweise von der Kandidatin selbst oder von einem Studenten unter der Anleitung der Kandidatin durchgeführt.

Die Auswertung der Bewegungen der Spermienzellen aus den Pollenkeimungsassays wurde ausschließlich von der Kandidatin durchgeführt. Die Erstellung des mathematischen Modells fand in Zusammenarbeit zwischen der Kandidatin und Jan Schattner statt. Zusammen mit Prof. Wim Walter, PhD entwickelte sie das Modell zum KCH-vermittelten Transport von Spermienzellen innerhalb des Pollenschlauches.

Die Kandidatin hat in Zusammenarbeit mit dem Erstautor und den weiteren Autoren der Publikation die erste Version des Manuskriptes erstellt. Sie war an der Verfassung der Einleitung, des Ergebnisteils, des Material- und Methodenteils und der Diskussion beteiligt.



---

Potsdam, 14.09.2022, Prof. Wim Walter, PhD

## Anteil der Kandidatin an der Publikation Strauß et al. (2021)

Das Projekt wurde innerhalb der Arbeitsgruppe zusammen mit Prof. Wim Walter, PhD (Arbeitsgruppenleiter), Prof. Dr. Stefan Hoth (Abteilungsleiter) und Tobias Strauß (Erstautor) und der Kandidatin geplant und in wöchentlichen Meetings besprochen. In den Meetings wurden Zwischenergebnisse diskutiert und neue Experimente geplant.

Die Kandidatin war bei der Durchführung der *in vitro* Experimente beteiligt. Auf diese Weise konnte die Geschwindigkeit und Direktionalität von AtKRP125b im Gliding-Assay, die Prozessivität im Stepping-Assay und die Fähigkeit, Mikrotubuli gegeneinander zu verschieben im Sliding-Assay bestimmt werden.

Die Kandidatin war an der Auswertung der Daten aus den *in vitro* Experimenten beteiligt. Der Fokus der Kandidatin lag dabei hauptsächlich auf der Entwicklung und Bereitstellung entsprechender Matlab-Skripte mit der die Geschwindigkeiten der Einzelmoleküle und der Filamente statistisch ausgewertet werden und mit den Daten von Kinesin-5 Motorproteinen aus anderen Organismen verglichen werden konnte.

Die Kandidatin hat in Zusammenarbeit mit dem Erstautor und den weiteren Autoren der Publikation die erste Version des Manuskriptes erstellt. Sie war an der Verfassung der Einleitung, des Ergebnisteils und der Diskussion beteiligt.



---

Potsdam, 14.09.2022, Prof. Wim Walter, PhD

## Gesamtzusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Kinesin-14 und Kinesin-5 in Pflanzen zu charakterisieren und ggf. funktionelle Unterschiede aufzudecken und zu beschreiben. Für KCHs, die zur Kinesin-14 Familie gehören, habe ich ein Modell entwickelt, welches die Funktion der KCHs beim Transport von Spermienzellen innerhalb des Pollenschlauches beschreibt. Grundlage für dieses Modell ist die Analyse der Spermienzellbewegung, die sich als saltatorische Vor- und Zurückbewegung beschreiben lässt. Es basiert auf einem *Tug-of-war* Mechanismus, bei dem Kinesine Kraft auf antiparallel ausgerichtete Mikrotubuli ausüben und damit in unterschiedliche Richtungen wirken. Bei der Dissoziation der zytoplasmatischen Verbindung zwischen dem vegetativen Kern und den beiden Spermienzellen, werden beide Spermienzellen unabhängig voneinander im Pollenschlauch bewegt. Das widerspricht der bisher üblichen Annahme, dass die Spermienzellen passiv über einen aktiven Transport des vegetativen Kerns über das Aktin-Myosin-Netzwerk transportiert werden. Das Modell stellt eine neue Funktion für pflanzliche Kinesin-14 dar, die bisher nicht beschrieben wurde.

Die biophysikalischen Eigenschaften von Kinesin-5 wurden bisher im pflanzlichen Kontext noch nicht untersucht. Man geht davon aus, dass auf Grund der geringen Sequenzunterschiede, die Funktion von pflanzlichen und tierischen Kinesin-5 die gleiche ist und Kinesin-5 auch in Pflanzen eine Rolle bei der Entstehung und dem Erhalt der mitotischen Spindel spielt. Das pflanzliche Kinesin-5 AtKRP125b zeigt bei *in vitro* Experimenten eine prozessive, Plusende-gerichtete Bewegung mit einer Geschwindigkeit von 20 nm/s. Damit erfüllt es die biophysikalischen Voraussetzungen um die kanonische Funktion in der mitotischen Spindel zu erfüllen. Allerdings zeigen Lokalisationsstudien, dass AtKRP125b auch im Zytoplasma und außerhalb von meristematischen Gewebe zu finden ist. Dies weist auf pflanzenspezifische Funktionen hin, die nicht mit der mitotischen Spindel assoziiert sind.

## Abstract

The goal of this work was to characterize kinesin-14 and kinesin-5 in plants and to uncover and describe functional differences. For KCHs, belonging to the kinesin-14 family, I developed a model describing the function of KCHs in transporting sperm cells within the pollen tube. The basis for this model is the analysis of sperm cell movement, which can be described as a saltatory back and forth motion. It is based on a tug-of-war mechanism in which kinesins exert force on antiparallel microtubules, thus acting in different directions. Upon dissociation of the cytoplasmic projection between the vegetative nucleus and the two sperm cells, both sperm cells are moved independently in the pollen tube. This contradicts the previously held assumption that sperm cells are passively transported via active transport of the vegetative nucleus across the actin-myosin network. The model represents a new function for plant kinesin-14 that has not been described previously.

The biophysical properties of kinesin-5 have not been previously studied in the plant context. It is believed that based on the minor sequence differences, the function of plant and animal kinesin-5 is the same, and kinesin-5 also plays a role in the development and maintenance of the mitotic spindle in plants. Plant kinesin-5 AtKRP125b exhibits a processive, plus-end directed movement with a speed of 20 nm/s in *in vitro* experiments. Thus, it fulfills the biophysical requirements to perform the canonical function in the mitotic spindle. However, localization studies show that AtKRP125b is also found in the cytoplasm and outside meristematic tissues. This indicates plant-specific functions not associated with the mitotic spindle.

# Danksagung

Eine Dissertation verfasst man nicht allein. Direkt oder indirekt sind viele Menschen an dieser Arbeit beteiligt gewesen und ich möchte ihnen hiermit danken.

An erster Stelle möchte ich hier meinen Doktorvater Wim Walter nennen, ohne den es dieses Forschungsthema nicht gegeben hätte. Seinem beruflichen „Ausflug“ in den Bereich der pflanzlichen Kinesine ist es zu verdanken, dass ich mich ebenfalls mit diesem Thema beschäftigen konnte und wollte. Seine Kreativität und seine Begeisterungsfähigkeit waren während der experimentellen Phase von großem Nutzen und sorgte dafür, dass der Laboralltag niemals langweilig wurde.

Für Spaß, gute Laune und wichtige wissenschaftliche Inputs sorgten alle Mitglieder der Arbeitsgruppen von Stefan Hoth und Wim Walter. Besonders hervorheben möchte ich Julia Sandberg, Pierre Endries und Wenke Bahnsen, die als technische Angestellte dafür gesorgt haben, dass dem produktiven Experimentieren im Labor nichts im Wege stand.

Ich möchte ebenfalls meinen Mitautor:innen der Publikationen danken. Allen voran Tobias Strauß, der eine großartige Arbeit rund um die Charakterisierung eines pflanzlichen Kinesin-5 geleistet hat. Ich bin froh, Teil dieses Projektes sein zu dürfen. Ebenso danke ich Stefan Hoth für den wissenschaftlichen Input zum Kinesin-5 Paper und für die Begutachtung dieser Arbeit. Fabian Munder und Eva Höppe waren als Studierende an der Publikation zum Spermienzelltransport beteiligt und haben einen großen Teil der mikroskopischen Daten erhoben. Ohne diese Daten wäre es nicht möglich gewesen eine so ausführliche Beschreibung der Bewegungsmuster anzufertigen.

Jan Schattner möchte ich gleich mehrfach danken. Er hat mich nicht nur bei der Erstellung des mathematischen Modells für den Spermienzelltransport unterstützt, sondern vor allem in den Endzügen der Schreibphase. Er verglich die Abgabe der Arbeit mit dem Besteigen des Mount Everest. In der Todeszone ist er mir nicht von der Seite gewichen und fand irgendwie immer die richtigen Worte um mich letztendlich zurück an den Schreibtisch zu bringen, sodass ich den Gipfel bezwingen konnte. Ebenfalls für die Unterstützung in der Schreibphase zu Dank verpflichtet bin ich Sonja Reißmann. In stundenlangen Zoomsitzungen war sie die soziale Kontrolle, die ich brauchte, um an den Texten zu arbeiten.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, dass sie an mich geglaubt haben und meinen Zielen nie im Wege standen.