

Identifizierung und Charakterisierung des  
Signalweges zur Aktivierung von Anionenkanälen  
während des Pollenschlauchwachstums



Dissertation zur Erlangung  
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Timo Gutermuth

aus Eichenzell

Würzburg, 2016



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich
2. Gutachter: Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Geschlechtliche Vermehrung bei Pflanzen	7
1.2	Entwicklung und Reifung des weiblichen Gametophyten	7
1.3	Entwicklung und Reifung des männlichen Gametophyten	8
1.4	Pollenkeimung und Befruchtung der Eizelle	11
1.5	Polares Zellwachstum von Pollenschläuchen	14
1.5.1	Vesikeltransport und Aktin-Zytoskelett	14
1.5.2	Zellwandaufbau und Modifikationen	15
1.5.3	Spitzenlokalisierter zytosolischer Calciumgradient	16
1.5.4	Protoneneinstrom in die Pollenschlauchspitze und pH-Gradient	19
1.5.5	Einfluss von Kalium	20
1.5.6	Einfluss von Anionen auf das Pollenschlauchwachstum	22
1.6	Anionentransport in Pflanzen	25
1.6.1	R-Typ-Anionenkanäle	26
1.6.2	ALMT12 (Quac1)	27
1.6.3	S-Typ-Anionenkanäle	29
1.6.4	SLAH3	30
1.7	Zielsetzung	32
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>34</b>
2.1	Anzucht <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Nicotiana tabacum</i>	34
2.2	Kreuzen von T-DNA-Verlustmutanten	34
2.3	Pollenernte	35
2.3.1	Pollenernte <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
2.3.2	Pollenernte <i>Nicotiana tabacum</i>	35
2.4	Pollenkeimung und Keimungsmedien	35
2.4.1	Pollenkeimung <i>Arabidopsis thaliana</i>	36

2.4.2	Pollenschlauch-Phänotyp-Analyse: Längenwachstum von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Wildtyp und Verlustmutanten.....	36
2.4.3	Pollenkeimung <i>Nicotiana tabacum</i> .....	36
2.5	<i>Arabidopsis thaliana</i> T-DNA-Insertionslinie .....	38
2.6	Elektrophysiologische Methoden.....	39
2.6.1	Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (TEVC two electrode voltage clamp).....	39
2.6.2	Konvention .....	40
2.6.3	Messplatz-Aufbau.....	40
2.6.4	Zweikanal-Elektroden für elektrophysiologische Charakterisierung von Pollenschläuchen.....	42
2.6.5	Software, Spannungspulsprotokolle und Datenauswertung .....	44
2.6.6	Elektrophysiologische Untersuchungen an <i>Arabidopsis thaliana</i> - und <i>Nicotiana tabacum</i> -Pollenschläuchen.....	46
2.7	Fluoreszenzmikroskopie.....	46
2.7.1	Aufbau der Messapparatur .....	47
2.7.2	Auswertung der Calcium-Fluoreszenzmessung mit Yellow Cameleon 3.6 (YC 3.6).....	47
2.7.3	Auswertung der Chlorid-Fluoreszenzmessung des Chloridsensors (Cl <sup>-</sup> -Sensor).....	49
2.8	Elektrophysiologische Charakterisierung an <i>Xenopus</i> -Oozyten.....	49
2.8.1	IVT-PCR und verwendete Vektoren.....	50
2.8.2	In vitro-Transkription (IVT).....	50
2.8.3	cRNA-Injektion in <i>Xenopus</i> -Oozyten .....	51
2.8.4	Messaufbau des TEVC-Arbeitsplatzes für Oozytenmessungen.....	52
2.8.5	Messlösungen für elektrophysiologische Charakterisierung .....	54
2.8.6	Elektrophysiologische Charakterisierung.....	54
2.8.7	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) .....	55
2.8.8	Auswertung .....	56
2.9	Genotypisierung und quantitative Real-time-PCR .....	57
2.9.1	DNA-Isolierung für Genotypisierung .....	57

2.9.2	RNA-Isolierung aus <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pollenschläuchen.....	58
2.9.3	cDNA-Synthese.....	59
2.9.4	Quantitative Real-time-PCR .....	59
2.10	GUS-Färbung.....	62
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
3.1	Transkriptionsanalyse und Screening nach Pollenschlauch-Anionenkanälen .....	64
3.2	Identifizierung von Anionenströmen mittels TEVC-Technik .....	66
3.2.1	Einfluss des Anionenkanal-Inhibitors NPPB und Niflumsäure auf <i>Arabidopsis thaliana</i> -Ganzzellströme .....	69
3.2.2	Optimierung des <i>in vitro</i> -Keimungsmediums zur selektiven Analyse von Anionenströmen mittels der TEVC-Technik .....	72
3.2.3	Analyse der Ganzzellströme bei unterschiedlichen Nitratkonzentrationen .....	74
3.3	Transkriptionsanalyse bei unterschiedlichen Anionen-konzentrationen im Wachstumsmedium.....	76
3.3.1	Inhibierung der S-Typ-Anionenströme auf 40 mM Nitratmedium .....	79
3.4	Elektrophysiologische Charakterisierung von Anionenströmen in Pollenschlauch-Verlustmutanten von <i>slah3-1</i> , <i>slah3-2</i> , <i>cpk6-1</i> , <i>cpk2-1 x cpk20-2</i> und <i>cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1</i> .....	81
3.5	Calcium-abhängiger S-Typ-vermittelter Anionenausstrom in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pollenschläuchen .....	84
3.6	Transkriptionsanalyse auf unterschiedlichen Anionen-konzentrationen im Anzuchtmedium von Col-0 und <i>almt12-2</i> -Pollenschläuchen.....	88
3.7	Elektrophysiologische Charakterisierung von R-Typ-Anionenströmen in Col-0-Pollenschläuchen in Abhängigkeit der Malat-Konzentration.....	91
3.8	Charakterisierung der Anionenpermeabilität von ALMT12 im Oozyten-Expressionssystem .....	96
3.8.1	Aktivierung von ALMT12 durch Calcium-abhängige Kinasen in <i>Xenopus</i> -Oozyten.....	100
3.9	Elektrophysiologische Charakterisierung von Pollenschlauch R-Typ-Anionenströmen in <i>Arabidopsis thaliana</i> - Anionenkanal-Verlustmutanten ...	103

3.10	Calcium-abhängiger R-Typ-vermittelter Anionenausstrom in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pollenschläuchen .....	108
3.11	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Pollenschlauch Wachstums-Phänotyp-Analyse mit R-Typ-Anionenkanal-Verlustmutanten.....	110
3.12	Charakterisierung von zytoplasmatischen Calcium- und Chlorid-Oszillationen in der Spitze von Tabak-Pollenschläuchen.....	112
3.13	Simultane Anwendung der TEVC-Technik und Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung der Calciumkanal vermittelten Anionenkanalaktivierung .....	115
3.14	Modulierung der Calciumkanal-Aktivität durch den Calciumkanal-Inhibitor Lanthan an der Pollenschlauchspitze .....	118
3.15	Einfluss des Anionenkanal-Inhibitors Niflumsäure auf den spitzenlokalisierten hyperpolarisations-aktivierten Calciumeinstrom.....	120
3.16	Charakterisierung des spitzenlokalisierten Anionenausstroms mittels simultaner Anwendung der TEVC und Fluoreszenzmikroskopie .....	121
3.17	Einfluss der zytoplasmatischen Chloridkonzentration auf die spitzenlokalisierten S-Typ-Anionenströme.....	124
3.18	Einfluss des Calciumkanal-Inhibitors Lanthan auf den spitzenlokalisierten Anionenausstrom .....	127
3.19	Membranpotenzial-Oszillationen in der apikalen Region des Pollenschlauchs .....	130
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>133</b>
4.1	Identifizierung der für den Anionenausstrom verantwortlichen Anionenkanäle in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pollenschläuchen .....	133
4.2	S-Typ-Anionenkanal SLAH3 in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pollenschläuchen .....	136
4.2.1	Transkriptionelle Regulation des Anionenkanals SLAH3 in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pollenschläuchen .....	136
4.2.2	S-Typ-vermittelte Stromantwort in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pollenschläuchen .....	137
4.2.3	Aktivierung von SLAH3 durch Calcium-abhängige Kinasen in der Pollenschlauchspitze .....	139
4.3	R-Typ-Anionenkanäle in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pollenschläuchen .....	142

4.4	Calcium-Influx und Chlorid-Efflux in <i>Nicotiana tabacum</i> -Pollenschläuchen .....	146
4.5	Regulationsmodell des Anionenausstroms aus der Pollenschlauchspitze ...	152
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>156</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>159</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>161</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis.....	161
7.2	Tabellenverzeichnis .....	164
7.3	Abkürzungsverzeichnis .....	165
7.4	Literaturverzeichnis .....	169
7.5	Lebenslauf Timo Gutermuth .....	193
7.6	Eidesstattliche Erklärung.....	196
7.7	Danksagung.....	197

# 1 Einleitung

Pflanzen sind in der Lage, sich geschlechtlich durch Bestäubung oder vegetativ durch Seitentriebe und Ableger zu vermehren. Während die vegetative Vermehrung nur eine lokale Ausbreitung um den Wachstumsort der Pflanze ermöglicht, können die durch die geschlechtliche Vermehrung gebildeten Samen weite Entfernungen zurücklegen und neue Standorte besiedeln.

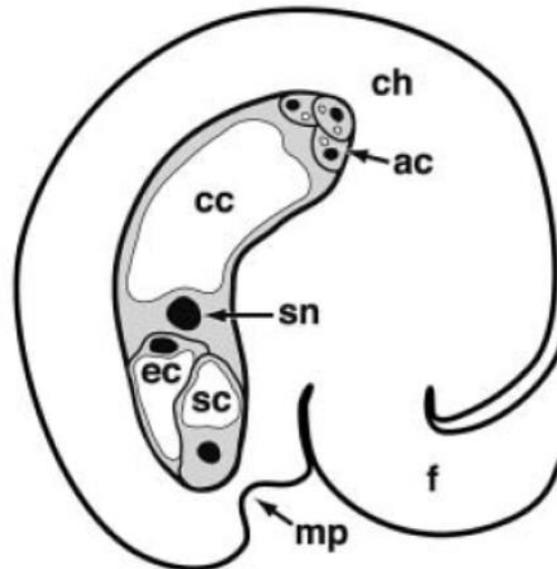
## 1.1 Geschlechtliche Vermehrung bei Pflanzen

Die geschlechtliche Vermehrung bei Blütenpflanzen unterteilt sich in Sporogenese und Gametogenese. Bei der Sporogenese bilden die Keimzellen die Sporophyten in den Samenanlagen (Antheren und Fruchtknoten) diploide Sporen. Diese bilden durch Meiose haploide Sporen (männlich = 4 Mikrosporen, weiblich = 1 Megaspore), welche sich durch Mitose zum Gametophyten (Gametogenese) weiter differenzieren. Der männliche Gametophyt, die Spore, beinhaltet die haploiden Spermienzellen und der weibliche Gametophyt, der Embryosack, beinhaltet die zu befruchtende haploide Eizelle (Russell *et al.*, 1993; Borg *et al.*, 2009).

## 1.2 Entwicklung und Reifung des weiblichen Gametophyten

Der weibliche Gametophyt besteht aus sieben Zellen, einer Eizelle, zwei Synergidzellen, der Zentralzelle und drei Antipodalzellen. Dieser Aufbau ist typisch für die Gruppe des sogenannten *Polygonum*-Typs, welcher in ca. 70 % aller Pflanzen, darunter auch *Arabidopsis thaliana* vorkommt und im Weiteren beschrieben wird (Strasburger *et al.*, 1879; Maheshwari *et al.*, 1950; Willemse und van Went *et al.*, 1984; Haig *et al.*, 1990; Huang und Russell *et al.*, 1992). Die Entwicklung der weiblichen Eizelle wird in Megasporogenese und Megagametogenese unterteilt. Zu Beginn der Megasporogenese teilt sich die diploide Megaspore im Inneren der Samenanlagen (Ovarien) durch Meiose in vier haploide Zellen, von denen drei degenerieren. Die restliche haploide Megaspore

teilt sich durch mehrere Zyklen Mitose, es entstehen acht Zellkerne, wobei je vier Zellkerne an einem Pol lokalisiert sind. Je ein Zellkern jedes Pols fusioniert mit dem anderen zur Zentralzelle, während die restlichen Zellkerne zu je drei Antipodalzellen, zwei Synergidzellen und einer Eizelle werden. Synergidzellen und Eizelle entwickeln sich an der mikropylaren Seite der weiblichen Samenanlage (siehe Abbildung 1).



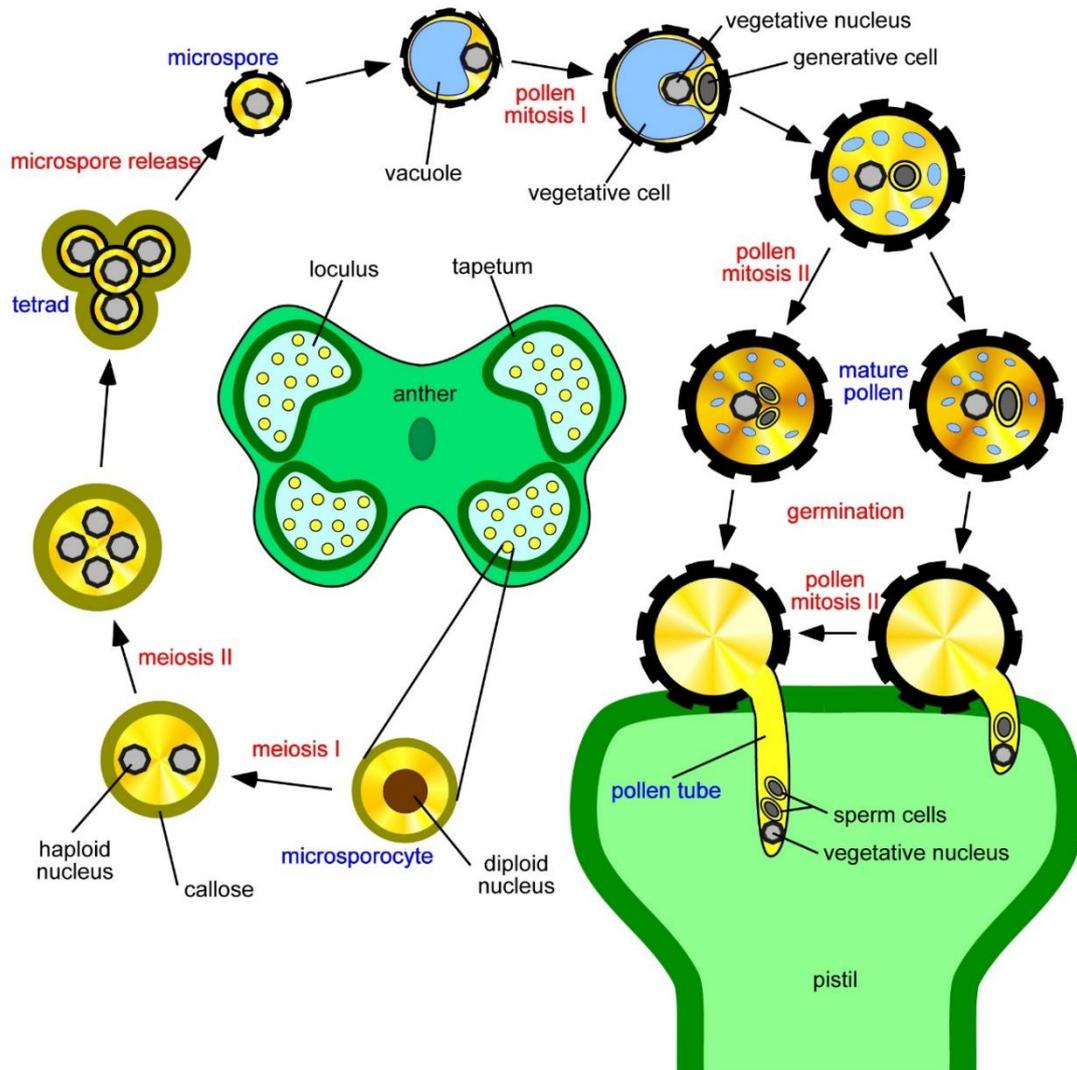
**Abbildung 1: Aufbau des weiblichen Gametophyten in *Arabidopsis thaliana***

Der weibliche Gametophyt setzt sich in der Ovarie (ch) aus drei Antipodalzellen (ac), der Zentralzelle (cc) mit sekundärem Nukleus (sn), Eizelle (ec) und zwei Synergidzellen (sc) zusammen, welche vor dem Mikropylar (mp) des Funikulus (f) sitzen (Yadegari R., G. N. Drews (2004). Female gametophyte development. *Plant Cell*, 16 (Suppl.) pp. S. 133 - S. 141 , Copyright American Society of Plant Biologists).

### 1.3 Entwicklung und Reifung des männlichen Gametophyten

Die Pollenentwicklung bzw. die Ausbildung des männlichen Gametophyten findet in den Mikrosporangien der Antheren statt. Die vom Tapetum umschlossenen diploiden Sporozysten bilden durch Meiose eine Tetrade aus vier haploiden Mikrosporen. Die von Kallose umschlossene Tetrade wird durch vom Tapetum abgesonderten Enzymen gelöst und dadurch vier individuelle Mikrosporen freigesetzt (Preuss *et al.*, 1994), welche durch das Tapetum mit Nährstoffen versorgt werden. Im Anschluss sondert das Tapetum

Sporopollenin ab, welches die widerstandsfähige Hülle der sich entwickelnden Mikrospore bildet. Durch Mitose entstehen in der Mikrospore ein vegetativer Nukleus und ein generativer Nukleus. Während der Reifung akkumuliert der Pollen Nährstoffe wie Zucker und Fettsäuren sowie Proteine und RNA. Am Ende der Pollenreifung wird die Dormanz des Pollenkorns durch Dehydrierung eingeleitet. Hierbei kommt es zu einer durch den Wasserverlust verursachten Reduktion der Pollenkorngröße. Durch Rehydrierung des Pollenkorns auf dem Stigma wird eine schnelle Keimung sowie das Pollenschlauchwachstum eingeleitet (Pacini *et al.*, 1994; Pacini *et al.*, 1996; Schwacke *et al.*, 1999; reviewed in Twell 2002). Die Pollenhülle, welche für die spätere Adhäsion an die Stigmaoberfläche in *Arabidopsis thaliana* (Zinkl *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 1998; Zinkl und Preus *et al.*, 2000; Paxson-Sowders *et al.*, 2001) eine wichtige Rolle zu spielen scheint, besteht aus zwei Schichten, einer inneren Hülle, der Intine, und einer äußeren Hülle, der Exine (Dobson *et al.*, 1989). Nach Abschluss der Pollenreife geben die Mikrosporangien die reifen Pollen frei (siehe Abbildung 2). Speziesabhängig teilt sich der generative Nukleus bereits vor dem endgültigen Ausreifen der Pollenkörner in zwei Spermienzellen auf (trizelluläre Pollen z. B. *Arabidopsis thaliana*) oder die Mitose erfolgt erst nach Ausbildung des Pollenschlauchs (bizelluläre Pollen z. B. *Nicotiana tabacum*) (Honys *et al.*, 2009).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entwicklung des männlichen Gametophyten**

Die Abbildung zeigt die Reifung der Mikrosporozyte in den Antheren zur reifen Mikrospore. Dargestellt ist die Ausbildung des generativen und vegetativen Nukleus des Pollenkorns sowie die Ausbildung des Pollenschlauches beim Einwachsen in das Stigma der Blüte. (Diese Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Dr. David Honys, Arbeitsgruppe: Laboratory of Pollen Biology, Institute of Experimental Botany AS CR, zur Verfügung gestellt).

## 1.4 Pollenkeimung und Befruchtung der Eizelle

Gelangt das reife Pollenkorn auf ein Stigma, interagiert dessen Oberfläche mit den Papillarzellen des Stigmas und es kommt zur speziesspezifischen Anhaftung des Pollenkorns (Elleman *et al.*, 1992). Diese speziesspezifische Adhäsion scheint durch Pollenlipide und Stigmawachse vermittelt zu werden (Zinkl und Preuss *et al.*, 2000). In *Arabidopsis thaliana* konnte der Einfluss der Exine-Hülle nachgewiesen werden, welche eine feste Anhaftung an die stigmatische Zelloberfläche erlaubt, während andere Pollenkörner nur schlecht haften (Taylor *et al.*, 1998; Zinkl *et al.*, 1999; Paxson-Sowers *et al.*, 2001). Pollen mit defekter Hülle, z. B. in Verlustmutanten der *CER*-Gene, welche an der Synthese langkettiger Fettsäuren beteiligt sind, sind nicht in der Lage, die weiblichen Eizellen zu erreichen, da die Hydrierung der Pollenkörner auf der Oberfläche des Stigmas negativ beeinflusst wird (Preuss *et al.*, 1993; Hulskamp *et al.*, 1995). An der Wasseraufnahme während der Hydrierung scheinen Aquaporine wie PIP2 beteiligt zu sein (Ikeda *et al.*, 1997).

Die während der Pollenreifung eingelagerte mRNA erlaubt eine schnelle Expression der für die Ausbildung des Pollenschlauches notwendigen Proteine, nachdem das Pollenkorn vollständig hydriert ist. Bei diesem Vorgang kommt es zu einer Polarisierung und Reorganisation des Zytoplasmas (Heslop-Harrison *et al.*, 1987; Tiwari und Polito *et al.*, 1990a; Mazina *et al.*, 2002). Die Calcium-ATPase *ACA13* scheint durch Bestandteile der Pollenkornhülle aktiviert zu werden und Calcium aus den Papillarzellen zum anhaftenden Pollenkorn zu transportieren. Die Verlustmutante von *ACA13* zeigt eine Reduktion der Calciumkonzentration der Papillarzellen im Vergleich zum Wildtyp. Hierdurch kommt es zu einer Erniedrigung der Keimungsrate und der Anzahl an befruchteten Eizellen (Iwano *et al.*, 2014). Weiterhin konnte eine zytoplasmatische Polarisierung durch einen lokalen Anstieg der Calciumkonzentration an der späteren Austrittsstelle des Pollenschlauchs *in vitro* und *in vivo* in *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden (Iwano *et al.*, 2004). Der sich ausbildende Pollenschlauch wächst mit Hilfe von sezernierten Esterasen, Pektinasen und Polygalacturonidasen in die Papillarzellen des Stigmas ein (Knox und Heslop-Harrison *et al.*, 1970a; Hiscock *et al.*, 1994; Mu *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1996; Edlund *et al.*, 2004). Auf dem Weg zu den Ovarien durchwächst der Pollenschlauch das Transmissionsgewebe, welches ihn mit seiner extrazellulären Matrix mit Polysacchariden, Proteinen und Lipiden versorgt (Lord und Sanders *et al.*, 1992). Durch Interaktion mit dem Transmissionsgewebe kommt es zu einem geleiteten Wachstum des Pollenschlauchs. Lind *et al.*, 1996 zeigte den Einfluss von Arabinogalactan-Proteinen (AGPs) auf das Wachstum der Pollenschläuche durch das

Transmissionsgewebe in Tabak. Die Reduktion der AGP-Transkripte durch ein Antisense-Konstrukt resultiert in einer Reduktion des Pollenschlauchwachstums (Wu *et al.*, 1995). Auch wurde der Einfluss eines Calcium- und  $\gamma$ -Aminobuttersäure-(GABA)-Gradienten entlang des Transmissionsgewebes untersucht. So konnte der Einfluss der Transaminase POP2 auf den GABA-Gradienten in *Arabidopsis thaliana* und dessen Einfluss auf das gerichtete Wachstum des Pollenschlauchs zu den Ovarien gezeigt werden. Es konnte ein Anstieg der GABA-Konzentration, ausgehend von 20  $\mu\text{M}$  im Stigma bis zu 110 bis 160  $\mu\text{M}$  in den Ovarien, nachgewiesen werden (Palanivelu *et al.*, 2003). Yu *et al.*, 2014, konnte ebenfalls einen vom Stigma zu den Ovarien ansteigenden GABA-Gradienten in *Nicotiana tabacum* nachweisen. Weiterhin konnte ein Anstieg des Calciumeinstroms in Pollenschlauchprotoplasten durch die Applikation von 1 mM GABA in die Badlösung beobachtet werden. Während Yu *et al.*, 2014, eine Aktivierung von Calciumkanälen durch GABA postuliert, zeigt Sunita *et al.*, 2015, eine durch GABA induzierte Deaktivierung des Anionenausstroms des Anionenkanals ALMT1. Auch wurde eine in der ganzen ALMT-Familie konservierte GABA-Bindungsdomäne gezeigt. Sowohl Yu *et al.*, 2014, als auch Sunita *et al.*, 2015, weisen beide ein reduziertes Pollenschlauchwachstum bei GABA bzw. dem GABA Analog Muscimol nach. Jedoch führten diese Experimente noch zu keinem eindeutigen Nachweis, der das gerichtete Wachstum im Transmissionsgewebe vollständig erklären könnte (Palanivelu *et al.*, 2003; Dumas *et al.*, 2006; Higashiyama *et al.*, 2006). Durch die Entnahme beider Synergidzellen in *Torenia fournieri* konnte eine starke Reduktion des Anlockens und Einwachsens des Pollenschlauchs durch die Mikropyle induziert werden (Higashiyama *et al.*, 2001). Tatsächlich konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass LURE-Proteine, aus den Synergiden sekretierte Proteine, für das Anlocken der Pollenschläuche zu den Synergiden eine große Rolle spielen (Okuda *et al.*, 2009).

Homologe dieser Lure-Peptide wurden auch in *Arabidopsis thaliana* identifiziert und heterolog in *Torenia fournieri*-Synergidzellen exprimiert. Die Expression von *AtLure1* hatte zur Folge, dass *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuche in den Embryosack von *Torenia fournieri* einwachsen konnten (Takeuchi und Higashiyama *et al.*, 2012).

Der Signalweg, welcher beim Eintritt des Pollenschlauchs in der Mikropyle zum Abstoppen des Schlauchs und zur Freigabe der Spermienzellen führt, scheint in *Feronia*-, *Sirene*- sowie *Lorelei*-Verlustmutanten gestört zu sein (Huck *et al.*, 2003; Rotmann *et al.*, 2003; Capron *et al.*, 2008). Diese Gene codieren Rezeptor-ähnliche Kinasen, die für eine erfolgreiche Befruchtung der Eizellen eine wichtige Rolle spielen. Anstatt die Spermien freizugeben, wächst der Pollenschlauch in diesen Verlustmutanten in den Embryosack ein. Weiterhin kommt es zur Anlockung zusätzlicher

Pollenschläuche, nachdem der erste bereits die Micropyle durchwachsen hat. Der Einfluss dieser drei Gene beruht auf einem noch nicht bekannten Signalweg, welcher die Befruchtung der Eizelle steuert und die Kommunikation zwischen Pollenschlauch und Synergidzellen kontrolliert (Huck *et al.*, 2003; Rotmann *et al.*, 2003; Capron *et al.*, 2008). Für *Feronia* konnte kürzlich eine Interaktion mit dem rapid alkalisation factor RALF gezeigt werden. Diese Bindung führt zu einer Hemmung der H<sup>+</sup>-ATPase in Wurzelhaaren und zu einem Anstieg der Calciumkonzentration (Pearce *et al.*, 2001; Haruta und Constabel *et al.*, 2003; Haruta *et al.*, 2008; Haruta *et al.*, 2014).

Zwei nahe Homologe von *Feronia* wurden in der Plasmamembran von *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen identifiziert. Die Rezeptor-ähnlichen Kinasen ANXUR1 und 2 spielen eine entscheidende Rolle bei der Zellwandstabilität durch die Regulation der ROS-Produktion (Boisson-Dernier *et al.*, 2009). Eine Überexpression dieser Kinasen resultiert in schlechterem Pollenschlauchwachstum und einer Verringerung der Keimungsrate. An der Pollenschlauchspitze kommt es zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen Endo- und Exozytose, was zu einer Plasmamembraneinstülpung und Akkumulation von Membranbausteinen an der Pollenschlauchspitze führt. Des Weiteren wurden ANXUR1 und 2 als Regulatoren der beiden NADPH-Oxidasen RBOH-H und RBOH-J identifiziert. Der Verlust beider Oxidasen führt zu einer starken Verringerung der ROS-Produktion, welche sich auf die Zellwandstabilität auswirkt und eine verringerte Transmissionsrate zur Folge hat (Boisson-Dernier *et al.*, 2013). ANXUR1 und 2 sowie RBOH-H und RBOH-J zeigen die gleiche Lokalisation in der subapikalen Zone der Pollenschlauchspitze. Durch die Reduktion der ROS-Konzentration kommt es zu einer Änderung der Calcium-Oszillationen an der Pollenschlauchspitze, was auf einen Regulationskreislauf zwischen ROS und Calcium schließen lässt. ROS scheint einen inhibitorischen Einfluss auf den Calciumeinstrom zu haben, während Calcium an der Aktivierung der RBOH's in der Pollenschlauchspitze beteiligt zu sein scheint (Lässig *et al.*, 2014). Die reduzierte ROS-Konzentration in der RBOH-H/J-Doppelverlustmutante führt zu einer Verringerung des inhibitorischen Einflusses von ROS auf den Calciumeinstrom, was zu einem verstärkt oszillierenden Wachstum des Pollenschlauchs führt (Boisson-Dernier *et al.*, 2013; Lässig *et al.*, 2014). Kaya *et al.*, 2014, hingegen beschrieben ebenfalls eine Aktivierung der NADPH-Oxidasen RBOH-H und J durch Calcium, postulierte aber eine positive Verstärkung des Calciumeinstroms durch ROS.

Durch Platzen des Pollenschlauchs erfolgt die Freisetzung der beiden Spermienzellen und es kommt zur Doppelbefruchtung. Hierbei fusioniert eine Spermienzelle mit der weiblichen Eizelle und bildet die Zygote, während die zweite Spermienzelle mit den

beiden Zellkernen der Zentralzelle verschmilzt und das triploide Endosperm bildet, das den heranreifenden Embryo ernährt (Russell *et al.*, 1993).

## 1.5 Polares Zellwachstum von Pollenschläuchen

Polares Zellwachstum von Pollenschläuchen zeichnet sich durch den gerichteten Transport von Membranbausteinen aus, welche in Form von Vesikeln an die apikale Plasmamembranseite transportiert werden und dort mit der Zellmembran fusionieren. Die Zelle wächst so nur in dieser Region und verlängert sich aufgrund der Fusion immer weiterer Membranbausteine mit der apikalen Plasmamembran. Die dabei entstehende Vergrößerung des Zellvolumens muss von der Zelle durch strukturelle, metabolische und transkriptionelle Adaption gesteuert werden.

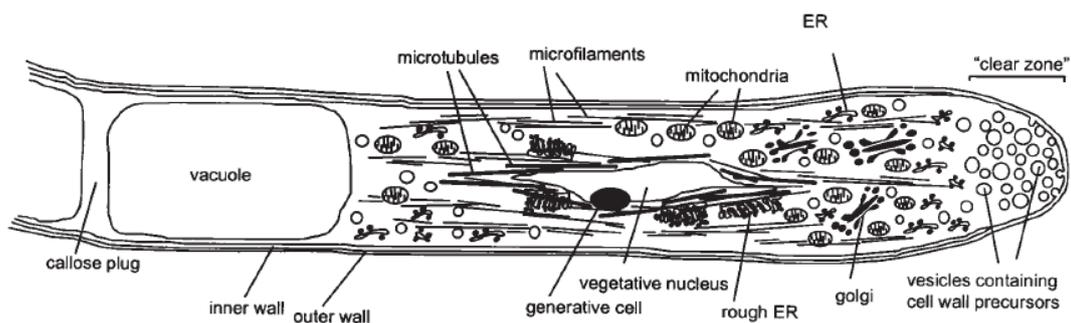
### 1.5.1 Vesikeltransport und Aktin-Zytoskelett

Während der hintere Teil des Pollenschlauchs mit Kallose-Plugs von dem vorderen Teil des Pollenschlauchs abgetrennt wird und von Vakuolen durchzogen ist, befinden sich im vorderen Teil des Pollenschlauchs der vegetative Nukleus sowie die beiden Spermienzellen. Dieser Bereich zeichnet sich durch eine schnelle Zytoplasmaströmung sowie besonders viele Organellen (Abbildung 3) aus.

Der für das polare Zellwachstum erforderliche Vesikeltransport erfolgt durch F-Aktin-Stränge, welche Vesikel aus dem Golgi-Netzwerk bis an die apikale Spitze transportieren. Dort werden sie in das Organell-freie Zytoplasma der apikalen Region abgegeben und bilden den Vesikelpool, welcher für die Exozytose benötigt wird (Bove *et al.*, 2008). In die Membran der Vesikel sind unter anderem regulatorische Proteine wie zum Beispiel Ionenkanäle und Transporter integriert und die Membran fungiert als Quelle für die Zunahme der Membranfläche. Die Vesikel werden in der subapikalen Region von den F-Aktin-Filamenten entlassen und über die Aktin-Grenze in die apikale Region (clear zone, frei von Organellen und Zytoskelettkomponenten) transportiert. Dort fusionieren sie durch Exozytose mit der Zellmembran der Pollenschlauchspitze und ermöglichen so ein gezieltes polares Spitzenwachstum (Abbildung 3) (Yang *et al.*, 1998; Gu *et al.*, 2005;

Chen *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2005; de Graaf *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Cheung *et al.*, 2010; Quin und Yang *et al.*, 2011).

Die im hinteren Bereich für den Vesikel-Transport zuständigen F-Aktin-Stränge spalten sich in der subapikalen Zone zu feineren Filamenten auf und bilden die Aktin-Grenze (actin fringe) (Kost *et al.*, 1999; Geitmann und Emons *et al.*, 2000). Diese Grenze scheint durch pH-abhängige Aktin Depolymerisierungsfaktoren (ADF) reguliert zu werden (Chen *et al.*, 2003). Das Aktin-Zytoskelett und der spitzenlokalisierte pH- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient scheinen sich gegenseitig zu beeinflussen. Die Aktin-Polymerisierung wird durch hohe  $\text{H}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen negativ beeinflusst (Wang *et al.*, 2008). Die Inhibierung der Aktin-Polymerisation mit Latrunculin B führt zu einem Wachstumsstopp und der Degradierung der Aktin-Grenze, ebenso verschwindet der für das Pollenschlauchwachstum notwendige  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient (Gibbon *et al.*, 1999; Cardenas *et al.*, 2008).



### Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Pollenschlauchs

Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau eines Pollenschlauchs in seinen unterschiedlichen Regionen. Der hintere Teil des Pollenschlauchs ist mit Kallose Plugs und Vakuolen durchzogen, während im vorderen Teil Aktin-Stränge für den Transport von Vesikeln und Organellen verantwortlich sind. An der Spitze des Pollenschlauchs befindet sich die sogenannte „clear zone“, welche frei von Aktin-Strängen und Organellen ist. Hier fusionieren die zur Spitze transportierten Vesikel mit der Zellmembran (Figure 1 aus Franklin-Tong. *et al.*, (1999). Signaling and modulation of pollen-tube growth. *Plant Cell* 11, 727–738. Copyright American Society of Plant Biologists).

### 1.5.2 Zellwandaufbau und Modifikationen

Die Zellwand des Pollenschlauchs besteht aus zwei miteinander verbundenen Schichten welche zum Großteil aus Pektin, Kallose und zu einem kleinen Teil aus Zellulose und Matrix-Komponenten aufgebaut sind. Hierbei bilden Kallose und Zellulose die innere und Pektin die äußere Hülle der Zellwand (Chebli *et al.*, 2012). Pektin wird in methoxylierter Form über exozytierende Vesikel an der Pollenschlauchspitze freigesetzt (O’Neil *et al.*,

1990). Dort wird es über das Enzym Pektin-Methylesterase (PME), welches möglicherweise über die gleichen Vesikel wie die Pektinester in den extrazellulären Raum freigegeben wird, von seinen Methylestern abgespalten (Li *et al.*, 2002). Nach der Abspaltung des Methylesters stehen freie Carboxylgruppen zur Verfügung, welche über Calcium-Ionen miteinander komplexiert werden. Dies führt zu einer stärkeren Verknüpfung der einzelnen Pektine (Willats *et al.*, 2001a; Willats *et al.*, 2001b; Bosch und Hepler *et al.*, 2005; Palin und Geitmann *et al.*, 2012; Wolf und Greiner *et al.*, 2012). Die an der Pollenschlauchspitze sezernierte PME wird zum einen durch den eigenen N-Terminus als auch durch einen ebenfalls freigesetzten PME-Inhibitor reguliert. Der PME-N-Terminus inhibiert den katalytischen C-Terminus des Enzyms, welches erst aktiv wird, nachdem der N-Terminus von Proteasen abgespalten wurde. Der PME-Inhibitor scheint durch Endozytose an der Pollenschlauchspitze in seiner Konzentration kontrolliert zu werden. Diese beiden Prozesse hemmen das Enzym in der apikalen Region, was eine verzögerte bzw. eingeschränkte Aktivität zu Folge hat. Es bildet sich ein „Pektin-Gradient“, bei dem es zur Abnahme des veresterten Pektins ab ca. 10 µm hinter der Spitze kommt, je weiter man sich von der apikalen Region entfernt (Wolf *et al.*, 2003; Bosch *et al.*, 2005; Röckel *et al.*, 2008). Dies führt zu einer Versteifung der Zellwand hinter der apikalen Zone (Zerzour *et al.*, 2009).

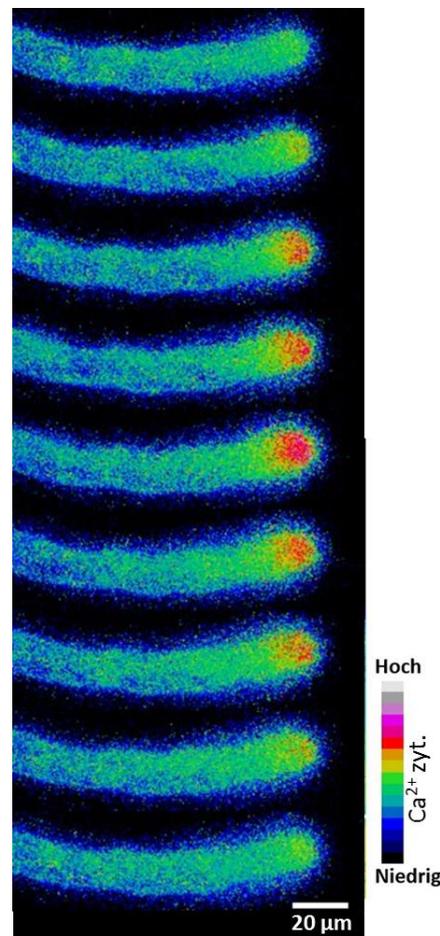
Während das Pektinnetz über Vesikel von der Pollenschlauchspitze aus aufgebaut wird, wird Kallose von in der Plasmamembran verankerten Kallose-Synthasen, hinter der apikalen Zone in die Zellwand eingebaut. Der Einbau erfolgt zwischen Plasmamembran und Pektinnetz und bildet die innere Schicht der Zellwand. Die Kallose-Synthese erfolgt in *Arabidopsis thaliana* ca. 10 µm, in Tabak erst 30 µm distal der apikalen Zone (Chebli *et al.*, 2012). Der geringe Anteil an Zellulose wird über ebenfalls in der Plasmamembran verankerte Zellulose-Synthasen in die Zellwand integriert. Sowohl Kallose als auch Zellulose tragen zur weiteren Versteifung und Stabilisierung der Zellwand bei (Heslop-Harrison *et al.*, 1987, Chebli *et al.*, 2012).

### 1.5.3 Spitzenlokalisierter zytosolischer Calciumgradient

Die zytoplasmatische Calciumkonzentration spielt eine wichtige Schlüsselrolle in der Regulation des polaren Zellwachstums in Pollenschläuchen. Durch den strikt regulierten Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen durch Calciumkanäle an der Pollenschlauchspitze formt sich im Pollenschlauch ein oszillierender, spitzenlokalisierter Gradient mit hohen apikalen

zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen. Die extrazelluläre Calciumkonzentration beeinflusst sowohl die Keimung als auch die Wachstumsgeschwindigkeit des Pollenschlauchs. So nimmt die Keimung und die Pollenschlauchlänge mit steigender extrazellulärer Calciumkonzentration bis 10 mM stetig zu (Fan *et al.*, 2001). Der oszillierende zytoplasmatische Calciumgradient (siehe Abbildung 4) in der Pollenschlauchspitze hat Einfluss auf die Zellelongation (Brewbaker und Kwack *et al.*, 1963; Holdaway-Clarke *et al.*, 1997, Messerli *et al.*, 2000) und auf die Wachstumsrichtung des Pollenschlauchs. So konnte in Malho *et al.*, 1996, durch Manipulation des Calciumgradienten in der Pollenschlauchspitze mit Hilfe des Calciumkanal-Inhibitors  $\text{Gd}^{3+}$  und des Calcium-Ionophores A23187 die Wuchsrichtung des Pollenschlauches beeinflusst werden.

Hierbei änderte sich die Wuchsrichtung des Pollenschlauchs immer in Richtung der höchsten Calciumkonzentration in der Spitze. Auch spielt der Calciumgradient bei Exo- und Endozytose (Camacho und Malho *et al.*, 2003; Coelho und Malho *et al.*, 2006) sowie bei der Fusion von Vesikeln eine entscheidende Rolle (Südhof *et al.*, 2004). Die Regulation des Calciumeinstroms an der Pollenschlauchspitze ist noch nicht vollständig verstanden, es konnte aber eine Interaktion mit der ROP1-Signalkaskade gezeigt werden. ROP1 (Rho-related GTPases from plants) zählt zu einer Unterfamilie der Rho-GTPasen in Pflanzen (Lih *et al.*, 1998). Hohe Calciumkonzentrationen hemmen die ROP1-Aktivität, ROP1 wiederum führt über RIC3 (Rop-interactive CRIB-containing protein 3) zum Calciumeinstrom, wodurch sich eine Feedback-Schleife bildet, welche sowohl das Aktin-Zytoskelett als auch die Exo- und Endozytose beeinflusst (Gu *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2009; Hwang



**Abbildung 4: Calcium-Gradient in *Nicotiana tabacum*-Pollenschlauch**

Zeitreihenaufnahme im Abstand von 30 s des oszillierenden Calciumeinstroms an der Pollenschlauchspitze von *Nicotiana tabacum*-Pollenschlauch (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Konrad, Lehrstuhl für Botanik I – Pflanzenphysiologie und Biophysik, Universität Würzburg).

*et al.*, 2010). Durch den Calciumgradienten, der auch in oszillierender Form auftreten kann, wird die Aktivität von Calciumsensorproteinen, welche mittels EF-Händen die zytoplasmatische Calciumkonzentration messen können, verändert. Effektoren für  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege können unter anderem Calmodulin (CAM), Calmodulin-like Proteine (CML), Calcium-abhängige Kinasen (CPK) und Calcineurin-B-like (CBL) Calciumsensoren sein. Diese übermitteln den Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration an nachfolgenden Proteinen in diversen Signalkaskaden (Cheng *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2009; Hashimoto und Kudla *et al.*, 2011; reviewed in Steinhorst und Kudla *et al.*, 2012). So konnte 2013 die Aktivierung von CPK11 durch zytosolisches Calcium und die dadurch induzierte Inhibierung des Kaliumkanals SPIK in Pollenschlauch-Protoplasten gezeigt werden. Die Inhibierung des Kaliumkanals erfolgte durch die Calcium-abhängige Phosphorylierung von CPK24 durch CPK11. Durch diese Calcium-abhängige Phosphorylierung von CPK24 kommt es zu einer Reduktion der SPIK-vermittelten Kaliumströme (Zhao *et al.*, 2013). Ein ähnlicher Mechanismus konnte für den Kaliumkanal AKT1 gezeigt werden, welcher durch die Calcineurin B-like Proteine (CBL) CBL1 und CBL9 in einem Komplex mit der CBL-interacting Protein-Kinase (CIPK) 23 phosphoryliert und damit aktiviert werden konnte (Hashimoto *et al.*, 2012). Die für den Calciumeinstrom an der Pollenschlauchspitze verantwortlichen Kanäle sind noch nicht eindeutig identifiziert, jedoch scheinen verschiedene cyclic nucleotide gated channels (CNGC) und Glutamat-Rezeptor-ähnliche Kanäle (GLR) beteiligt zu sein. Michard *et al.*, 2011 zeigte, dass GLR1.2 und -3.7 in der apikalen Zone des Pollenschlauchs durch extrazelluläres D-Serin aktiviert werden und einen Calciumeinstrom verursachen. Weiterhin sind GLRs an der Navigation durch das Transmissionsgewebe zu den Eizellen beteiligt. Dieser Vorgang scheint durch die D-Serin-Konzentration im Transmissionsgewebe reguliert zu werden.

Pflanzliche CNGCs werden ebenso wie ihre tierischen Homologe durch zyklisches Adenosin- oder Guaninmonophosphat (cAMP, cGMP) aktiviert (Balague *et al.*, 2003, Hua *et al.*, 2003) und durch hohe intrazelluläre Calciumkonzentrationen in Verbindung mit Calmodulin inhibiert (Arazi *et al.*, 2000). Der Einfluss von cAMP auf die Wuchsrichtung des Pollenschlauchs und auf die zytoplasmatische Calciumkonzentration wurde 2000/2001 nachgewiesen (Malho *et al.*, 2000; Moutinho *et al.*, 2001). CNGC18 ist in der Plasmamembran der Pollenschlauchspitze lokalisiert. Die Expression von CNGC18 in *Escherichia coli* resultierte in einer erhöhten Calciumakkumulation, und auch im Tiermodell konnte eine Calciumleitfähigkeit gezeigt werden. Zhou *et al.*, 2014, zeigte die Aktivierung des putativen Calciumkanals CNGC18 mit CPK32. Sowohl die Überexpression von CPK32, als auch von CNGC18 in Tabak-Pollen resultierte in einer Akkumulation der apikalen Calciumkonzentration sowie dem Anschwellen der

Pollenschlauchspitze. Ebenso zeigen die Verlustmutanten von CNGC7 und CNGC8 einen Anstieg an geplatzten Pollenschläuchen. Der Verlust der Genaktivität beider CNGCs verursacht eine erhöhte Ruptur der Zellmembran der Pollenkörner während der Keimung *in vitro* und eine 3000-fache Reduktion der Transmissionsrate bei der Befruchtung (Chang *et al.*, 2007; Frietsch *et al.*, 2007; Tunc-Özdemir *et al.*, 2013). Weiterhin konnte die Existenz von  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanälen in Lilienpollen- und Pollenschlauchprotoplasten mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik bewiesen werden. Die druckabhängige Aktivierung des Kanals erfolgte sowohl bei positiv als auch negativ appliziertem Druck. Die Applikation von Gadolinium oder dem Gift von *Grammostola spatulata* bewirkte eine Reduktion des Calciumeinstroms und die Inhibierung des Pollenschlauchwachstums (Dutta *et al.*, 2004). Ebenfalls konnten hyperpolarisationsabhängige Calciumkanäle in Pollenschlauchprotoplasten von *Pyrus pyrifolia* mittels der Patch-Clamp-Technik nachgewiesen werden. Die gemessenen Calciumströme zeigten eine starke pH-Abhängigkeit. So konnte bei pH 4,5 im Keimungsmedium ein ca. dreimal höherer Calciumeinstrom als bei pH 6,5 beobachtet werden. Der Calciumeinstrom konnte ebenfalls durch die dreiwertigen Kationen  $\text{La}^{3+}$  und  $\text{Gd}^{3+}$  inhibiert werden (Qu *et al.*, 2007).

Die strikte Begrenzung und Regulierung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration in den unterschiedlichen Regionen, vorrangig aber in der apikalen Zone des Pollenschlauchs erfordert die zuverlässige Regulation der zytoplasmatischen Calciumkonzentration, um das Pollenschlauchwachstum zu gewährleisten. Für die pollenspezifische autoinhibitorische Calcium-ATPase ACA9 konnte eine Lokalisation in der Plasmamembran gezeigt werden. Die Verlustmutante von ACA9 zeigt eine reduzierte Wachstums- und Transmissionsrate. Der autoinhibitorische N-Terminus von ACA9 bindet Calmodulin in Anwesenheit von Calcium und aktiviert die Calcium-ATPase (Schiott *et al.*, 2004).

#### 1.5.4 Protoneneinstrom in die Pollenschlauchspitze und pH-Gradient

Feijo *et al.*, 1999, konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie und Vibrating-Probe-Messungen den oszillierenden Protoneneinstrom an der Pollenschlauchspitze und den Efflux in der subapikalen Zone in Pollenschläuchen von Lilien nachweisen. Der Protoneneinstrom resultiert in einer Ansäuerung des Zytoplasmas der apikalen Zone (pH 6,8), während der Protonenausstrom eine alkalische

Bande (pH 7,8) ca. 50  $\mu\text{M}$  hinter der Spitze in Lilien-Pollenschläuchen erzeugt. Die für den  $\text{H}^+$ -Einstrom verantwortlichen Kanäle oder Transporter sind bisher noch nicht bekannt, aber eine für den Protonenausstrom vermutlich mitverantwortliche  $\text{H}^+$ -ATPase konnte in Tabak-Pollen identifiziert (*NtAHA*) werden. *NtAHA* ist in der Plasmamembran, mit Ausnahme der apikalen Zone, lokalisiert und ist ein Homolog der in *Arabidopsis*-Pollen exprimierten  $\text{H}^+$ -ATPasen AHA6, AHA8 und AHA9 (Ceral *et al.*, 2008, Pina *et al.*, 2005). Der zytosolische pH-Gradient beeinflusst maßgeblich die Organisation des Zytoskeletts. Der pH-abhängige Aktin-Depolymerisierungsfaktor ADF, welcher durch hohe pH-Werte stimuliert wird (Hawkins *et al.*, 1993; Maciver *et al.*, 1998), könnte durch die oszillierenden Schwankungen des apikalen zytoplasmatischen pH-Werts reguliert werden. Wachstumsgeschwindigkeit und apikaler pH-Wert stehen in einem antizyklischen Verhältnis. Die Wachstumsgeschwindigkeit nimmt mit steigendem apikalem pH-Wert ab (Feijo *et al.*, 1999). Lovy-Wheeler *et al.*, 2006, zeigte, dass die Stimulierung der  $\text{H}^+$ -ATPase durch Fusicoccin zur Alkalisierung des Zytoplasmas führt und dass Änderungen des pH-Wertes Einfluss auf die Regulation des Aktin-Zytoskeletts haben, welche scheinbar über ADF erfolgen. So führt die Ansäuerung des Zytoplasmas zum Verlust der Aktin-Grenze, welche die Organell- und Aktin-freie apikale Zone von der subapikalen Zone des Pollenschlauchs trennt. Ebenso kommt es zu einer Reduktion von Aktinsträngen. Eine Alkalisierung führte allerdings ebenfalls zum Abbau des F-Aktins in der Aktin-Grenze, wobei die im hinteren Bereich lokalisierten Aktinstränge im Gegensatz zur Ansäuerung erhalten blieben (Lovy-Wheeler *et al.*, 2006). Die genauen Auswirkungen, die die Protonenkonzentration auf die Aktin-Grenze in der apikalen und subapikalen Zone hat und welche Rolle der Depolymerisierungsfaktor ADF dabei spielt, bleibt noch ungewiss und bedarf genauerer Betrachtung. Ebenso wie der zytoplasmatische pH-Wert spielt der extrazelluläre pH-Wert bei der Pollenkeimung und dem Pollenschlauchwachstum eine Rolle. Die besten Keimungs- und Wachstumsraten erfolgten in Fan *et al.*, 2001, bei pH 6, während Boavida und McCormick *et al.*, 2007, ein Optimum von pH 7.5 beschrieben.

### 1.5.5 Einfluss von Kalium

Die bisherige Datenlage zeigt, dass die Kalium-Homöostase im polaren Zellwachstum sowohl Einfluss auf die Pollenschlauchlänge als auch auf die Keimungsrate hat. So kommt es bis zu einer Kaliumkonzentration von 1 mM im Keimungsmedium zu einem

Anstieg der Keimungsrate und der Pollenschlauchlänge (Fan *et al.*, 2001). Ebenso konnten die Auswirkungen von Kalium-Ionen auf die Fertilität der Pollenschläuche nachgewiesen werden (Lu *et al.*, 2011).

Durch Phänotyp-Analysen des Längenwachstums konnte die Rolle des „Shaker *Pollen* inward  $K^+$  Channels“ (SPIK) aus der Shaker-Familie auf das polare Zellwachstum nachgewiesen werden. Die Verlustmutante zeigte eine 40%ige Reduktion des Längenwachstums im Vergleich zur Wildtyplinie Col-0. Patch-Clamp-Messungen bestätigten die starke Reduktion der Kalium-Einwärtsströme in Pollenprotoplasten (Mouline *et al.*, 2002). Patch-Clamp-Messungen an SPIK-exprimierenden Cos-Zellen, welche tierische Zelllinien darstellen, deuteten weiterhin auf eine Regulation des Kanals durch extrazelluläre pH-Änderungen hin. Eine Ansäuerung von pH 7 auf pH 5 führte zu einer Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung um 47 mV zu positiveren Membranspannungen (Mouline *et al.*, 2002). Ein weiterer Vertreter der Shaker-Familie, der Auswärtsgleichrichter SKOR, wird ebenfalls in Pollenschläuchen exprimiert (Mouline *et al.*, 2002; Wang und Wu *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu SPIK wird SKOR durch extrazelluläre und zytoplasmatische Ansäuerung inhibiert (Lacombe *et al.*, 2000). Ebenso verfügt SKOR über einen ROS-sensitiven Spannungssensor, welcher über Cystein 168 reguliert wird (Garcia Mata *et al.*, 2010). Über den Einfluss des  $K^+$ -Kanals SKOR auf das polare Zellwachstum in Pollenschläuchen ist bisher noch nichts bekannt. Der Tandem-Pore-Kaliumkanal TPK4 wird fast ausschließlich in Pollenschläuchen exprimiert und zeichnet sich durch instantane spannungsunabhängige Ströme aus. TPK4 wird durch Calcium und Protonen reguliert. Eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration führt zur Reduktion des Kaliumstroms bei negativen Membranspannungen,  $> ca. -120$  mV, und eine intrazelluläre Ansäuerung führt zur Deaktivierung des Kanals. TPK4 vermittelt so einen Kaliumstrom in einem Spannungsbereich positiver von  $-100$  mV (Becker *et al.*, 2004).

Neben den bereits erwähnten Kaliumkanälen scheinen Kationen-Protonen-Austauscher der CHX-Familie, von der 14 von 18 Homologen in Pollenschläuchen exprimiert werden, eine wichtige Rolle bei der  $K^+$ -Aufnahme zu spielen. Zwei dieser Vertreter scheinen an der Fertilität der Pollenschläuche beteiligt zu sein. Die gleichzeitige Deletion von CHX21 und CHX23, nicht aber von CHX21 und CHX23 allein, führt zum Verlust eines gerichteten Wachstums der Pollenschläuche in die Samenanlagen, während das Wachstum im Transmissionsgewebe mit dem des Wildtyps vergleichbar war (Lu *et al.*, 2011). Die Komplementation mit CHX23-GFP konnte die Fertilität wieder vollständig herstellen. CHX23 ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und wird über pH-Änderungen (Ansäuerung) aktiviert. Die Expression in *Escherichia coli* zeigte einen

Anstieg der Kaliumaufnahme in die Bakterien. Der genaue Einfluss von CHX21 und CHX23 auf die Transmission des Pollenschlauchs ist noch unbekannt, könnte aber auf einer Störung der Kalium-Homöostase beruhen (Lu *et al.*, 2011).

### 1.5.6 Einfluss von Anionen auf das Pollenschlauchwachstum

Im Allgemeinen sind Anionen an der Turgor- und Membranpotenzial-Regulation in Pflanzen beteiligt. Die durchschnittlichen Anionenkonzentrationen in Pflanzenzellen betragen ungefähr 3-10 mM Chlorid, 2-10 mM Nitrat und 1-5 mM Malat im Zytoplasma. Die Vakuole enthält die vier- bis zehnfache Anionenkonzentration (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000). Der aktive Transport anorganischer Anionen in die Zelle verläuft gegen den Konzentrationsgradienten über Protonen-Anionen-Symporter. Organische Anionen wie Citrat und Malat werden hingegen im Krebszyklus von den Zellen selbst synthetisiert (Crawford *et al.*, 1998, Forde *et al.*, 2000, Pineros *et al.*, 2008). Die Aufnahme von Anionen gegen den Konzentrationsgradienten ermöglicht einen passiven Efflux von Anionen über Kanäle vom Zytoplasma in den extrazellulären Raum. In Schließzellen wird der Anionenausstrom durch Ionenkanäle der SLAC/SLAH-Familie sowie der ALMT-Familie vermittelt, und diese sind an der Regulation der Spaltöffnung beteiligt (Negi *et al.*, 2008; Vahisalu *et al.*, 2008; Ache *et al.*, 2010; Geiger *et al.*, 2011; Mumm *et al.*, 2013).

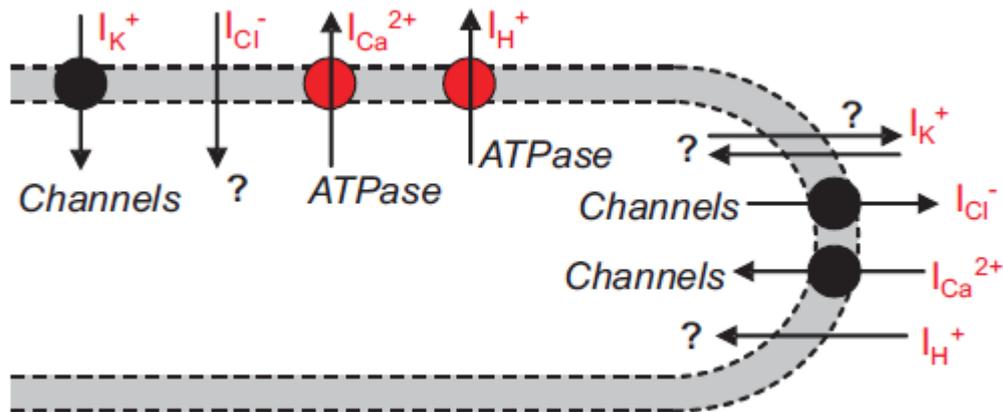
In Zonia *et al.*, 2001, wurde erstmals ein oszillierender Chlorid-Efflux aus der Spitze von Tabak- und Lilium-Pollenschläuchen mittels der „Vibrating-Probe“-Technik nachgewiesen. Die Aufnahme von Chlorid erfolgte entlang der Seiten des Pollenschlauches in nicht oszillierender Weise und betrug ca. 4000 pmol/cm\*s 26 µm hinter der Spitze. Der Efflux, welcher auch in oszillierender Form stattfinden kann, wurde nur an der Pollenschlauchspitze gemessen und betrug 50-8000 pmol/cm\*s bei Lilien, 400-1200 pmol/cm\*s bei Tabak-Pollenschläuchen.

Die Anionenkanal-Inhibitoren 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino) Benzoessäure (NPPB), 2-[[3-(Trifluoromethyl)phenyl]amino]nicotinsäure (Niflumsäure) und 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedisulfonsäure (DIDS) führten zum Wachstumsstopp und einem Anschwellen der Pollenschlauchspitze. Ebenso wie synthetische Anionenkanal-Inhibitoren konnte das endogene Inositol (3, 4, 5, 6) P4 einen Wachstumsstopp sowie das Anschwellen der Pollenschlauchspitze durch Inhibierung

des Anionenausstroms induzieren (Zonia *et al.*, 2002). Die Korrelation von Wachstumsrate und Anionenausstrom zeigt, dass beide Ereignisse nahezu zeitgleich stattfinden, während der Calcium- und Protonen-Influx zeitversetzt von den Wachstumsschüben stattfindet (Holdaway-Clarke *et al.*, 1997; Zonia *et al.*, 2001; Feijo *et al.*, 2003). Messerli *et al.*, 1999 zeigte, dass der Calciuminflux um ca. 13 s nach den Wachstumsschüben des Pollenschlauchs stattfindet. Auch der Protonen- und Kaliuminflux findet in diesem Zeitraum kurz vor dem Calciumeinstrom jedoch nach dem Wachstumsschub statt. Während Calcium-, Protonen- und Kaliumeinstrom zeitlich nach dem oszillierenden Wachstumsschub des Pollenschlauchs liegen, findet der Chloridausstrom nahezu zeitgleich mit den Wachstumsschüben und mit dem Vesikel-Transport in der apikalen Zone statt (Zonia *et al.*, 2001). Durch den Ausstrom von Chlorid aus der Pollenschlauchspitze und dem nachströmenden Chlorid aus dem subapikalen Zytoplasma könnte eine Triebkraft entstehen, welche die Vesikel an die Spitze des Pollenschlauchs bewegt. In Zonia *et al.*, 2001; Zonia *et al.*, 2002, wurde bereits über eine solche Triebkraft diskutiert (Holdaway-Clarke *et al.*, 1997; Zonia *et al.*, 2001; Zonia *et al.*, 2002; Lovy-Wheeler *et al.*, 2006). Matveyeva *et al.*, 2003, belegte eine deutliche Erniedrigung der Keimungsrate von Pollenkörnern durch die Unterdrückung der Anionenkanalaktivität mittels NPPB und Niflumsäure. Die Inhibierung des Anionenausstroms durch hohe extrazelluläre Chloridkonzentrationen führte zur Hyperpolarisierung des Membranpotenzials durch akkumulierende Chloridionen im Zytoplasma (Breygina *et al.*, 2009). Die Chlorid-Aufnahme könnte möglicherweise durch Chlorid-Kationen-Cotransporter AtCCC1 in Pollenschläuchen vermittelt werden, da GUS-Reporter-Studien dessen Expression in Pollen nachweisen konnten (Colmenero-Flores *et al.*, 2007). Es bleibt aber abzuwarten, ob sich eine Beteiligung von AtCCC1 an der Aufnahme von Anionen bestätigen lässt.

Die molekularen Grundlagen für den Anionenefflux an der Pollenschlauchspitze sind bis heute ebenfalls noch ungeklärt. Tavares *et al.*, 2011, bewies allerdings an Lilienpollen-Protoplasten drei voneinander unterscheidbare Anionen-Leitfähigkeiten, welche durch Calcium reguliert werden und eine Permeabilität für Chlorid und Nitrat besitzen. Die Patch-Clamp-Messungen zeigten zwar eine Inhibierung der Ströme durch NPPB, wiesen aber nur sehr geringe Einwärtsströme, gleichbedeutend mit einem Anionenefflux, aber starke Auswärtsströme, gleichbedeutend mit einem Anioneninflux auf. Diese drei Anionen-Leitfähigkeiten (L1-3) zeigten bereits eine Calcium-abhängige Regulierung und eine höhere Leitfähigkeit für Nitrat gegenüber Chlorid. Im negativen Spannungsbereich (-160 mV) variierte der gemessene Strom von 432 pA (L1), 451 pA (L2) und 77 pA (L3) im positiven Spannungsbereich (+160 mV) von 2086 pA (L1), 3314 pA (L2) und 688 pA (L3) bei nanomolaren intrazellulären Calciumkonzentrationen. Fasst

man die bereits bekannten Erkenntnisse von Kationen und Anionenfluxen in Pollenschläuchen zusammen, ergibt sich das in Abbildung 5 zu sehende Modell. Es zeigt den Ionenkanal-vermittelten passiven Ein- und Ausstrom von Ionen an der Pollenschlauchspitze sowie den großteils durch Carrier-vermittelten aktiven Transport von Ionen an den Seiten des Pollenschlauchs.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Ionenflüsse durch aktiven und passiven Transport über die Plasmamembran von *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen**

Die Darstellung zeigt den Ionen-In- und -Efflux entlang des Pollenschlauchs bis zur apikalen Region. Die Flüsse wurden mittels ionenselektiver Vibrating-Probe-Technik gemessen. Calcium und Protonen permeieren die Zellmembran an der Pollenschlauchspitze passiv und werden über Calcium- und Protonen-ATPasen an der Seite wieder in den extrazellulären Raum gepumpt. Chlorid wird über einen noch unbekanntem Mechanismus an der Seite aktiv durch Carrier aufgenommen und verlässt an der Spitze über Anionenkanäle den Pollenschlauch. Kalium wird über Ionenkanäle aufgenommen, wobei der In- bzw. Efflux von Kalium-Ionen an der Pollenschlauchspitze noch nicht vollständig geklärt ist (Michard *et al.*, 2009, Figure 1b aus "The role of ion fluxes in polarized cell growth and morphogenesis: the pollen tube as an experimental paradigm" by Erwan Michard, Filipa Alves and José A. Feijó, "Reproduziert mit Genehmigung durch The International Journal of Developmental Biology (Int. J. Dev. Biol.) (2009) Vol: 53 (1609/1622).

## 1.6 Anionentransport in Pflanzen

Sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Zellen spielen Anionen eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung des Membranpotenzials (Ullrich *et al.*, 1984; Hedrich, Busch und Raschke *et al.*, 1990; Fatima-Shad *et al.*, 1993; Levchenko *et al.*, 2005; Ratte *et al.*, 2011). Über die Regulation der zytoplasmatischen Anionenkonzentration in pflanzlichen Zellen durch Anionenkanäle ist wenig bekannt. Allerdings konnte man durch elektrophysiologische Messungen in zahlreichen Zelltypen und Pflanzenspezies Anionenströme elektrophysiologisch charakterisieren, jedoch sind die für die gemessenen Ströme verantwortlichen Gene meist noch nicht identifiziert. Die meisten Erkenntnisse über den Einfluss von Anionen in Pflanzen konnten im Schließzellmodell erbracht werden. In Schließzellen vermitteln die Anionenkanäle SLAC1, SLAH3 und ALMT12 einen Anionenausstrom, welcher zu einem Turgorverlust durch den Ausstrom von Wasser und Kalium und so zum Stomaschluss führt (Geiger *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2010; Geiger *et al.*, 2011). Die in *Arabidopsis thaliana* charakterisierten und identifizierten Anionenkanäle/Transporter umfassen unter anderem Gene der ALMT- (Kovermann *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2011; De Angeli *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014), SLAC/SLAH- (Geiger *et al.*, 2010; Meyer *et al.*, 2010; Geiger *et al.*, 2011), CLC- (Hechenberger *et al.*, 1996; De Angeli *et al.*, 2006; Marmagne *et al.*, 2007; von der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2007; Lv *et al.*, 2009; von der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2010), NRT-Familien (Guo *et al.*, 2003; Little DY *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010) sowie der Chlorid-Kationen-Cotransporter AtCCC1 (Colmenero-Flores *et al.*, 2007).

Zu den bis jetzt in *Arabidopsis thaliana* elektrophysiologisch charakterisierten ALMTs zählen ALMT1, ALMT6, ALMT9 und ALMT12. ALMT1 vermittelt einen Aluminium-induzierten Malat-Efflux in den Wurzeln, der die Pflanze durch die Bildung von Malat-Aluminiumkomplexen vor der toxischen Wirkung von freien Aluminiumionen im Boden schützt (Yamaguchi *et al.*, 2005; Hoekenga *et al.*, 2006). ALMT6 und 9 sind in der Vakuole lokalisiert und vermitteln eine Malat-aktivierte Aufnahme von Chlorid in den Tonoplasten (Kovermann *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2011; De Angeli *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014). ALMT12 spielt neben SLAC1 und SLAH3 eine Rolle bei dem für den Stomaschluss verantwortlichen Anionenefflux in Schließzellen (Meyer *et al.*, 2010; Geiger *et al.*, 2010; Geiger *et al.*, 2011). Schon länger identifiziert und besser charakterisiert sind die Vertreter der CLC-Familie, welche in Vertebraten als Chloridkanäle fungieren (Birkenhäger *et al.*, 2001, Estévez *et al.*, 2001). Der humane CLC1-Kanal ist beispielsweise maßgeblich an der Repolarisierung von Muskelzellen beteiligt (Koch *et al.*, 1992). Während die CLC-Familie in tierischen Zellen zu den

Anionenkanälen gezählt wird, fungieren die bereits charakterisierten pflanzlichen CLCs bekanntlich als Carrier. In *Arabidopsis thaliana* wurden sieben CLC-Homologe (CLC-a bis CLC-g) identifiziert (Hechenberger *et al.*, 1996; Lv *et al.*, 2009). CLC-a und CLC-b fungieren als  $H^+/NO_3^-$ -Austauscher in Tonoplasten von *Arabidopsis thaliana* (De Angeli *et al.*, 2006; von der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2010). CLC-c ist in der Vakuole lokalisiert (Jossier *et al.*, 2010), CLC-d und CLC-f konnten im trans-Golgi-Netzwerk nachgewiesen werden und scheinen dort an der Vakuolenbeladung beteiligt zu sein (von der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2007, Marmagne *et al.*, 2007).

### 1.6.1 R-Typ-Anionenkanäle

Anfang der 90er Jahre wurde die R-Typ-Stromantwort erstmals mittels Patch-Clamp-Technik elektrophysiologisch an Schließzellprotoplasten von *Vicia faba* entdeckt (Hedrich *et al.*, 1990). Der typisch schnellen Aktivierung von ca. 50 ms bei Membrandepolarisation und die schnelle Deaktivierung bei Membranhyperpolarisation verdankt der zu diesem Zeitpunkt nur elektrophysiologisch charakterisierte Kanal die Bezeichnung R-Typ (rapid type) Anionenkanal (Keller *et al.*, 1989). Die auffallend glockenförmig verlaufende Stromantwort leitet sich von der stark spannungsabhängigen Aktivität des Kanals ab, die zugleich über die apoplasmatische Malatkonzentration reguliert wird (Hedrich *et al.*, 1990). Malat, welches neben Nitrat und Chlorid als Substrat des Kanals dient, ist zugleich an der Regulation der Spannungsabhängigkeit beteiligt (Hedrich und Marten *et al.*, 1993). Je höher die extrazelluläre Malatkonzentration ist, desto mehr verschiebt sich die maximale Stromamplitude zu negativeren Spannungsbereichen. Die mit negativerer Spannung steigende elektrische Triebkraft sorgt für einen Anstieg des Anioneneffluxes (Hedrich und Marten *et al.*, 1993). Extrazelluläres Malat führt somit zu einem verstärkten Anionenausstrom. Da Malat selbst Substrat des Kanals ist, kommt es zu einer positiven Rückkopplung durch zytoplasmatisches Malat, welches durch den R-Typ-Kanal ALMT12 nach außen strömt um dessen Aktivität zu steigern. Diese feed-forward-Regulation konnte für den R-Typ-Anionenkanal ALMT12 aufgezeigt werden und ist möglicherweise für die Stomaphysiologie von Bedeutung (Meyer *et al.*, 2010).

Durch eine dauerhafte Membran-Depolarisierung kommt es zu einer R-Typ-spezifischen Kanal-Inaktivierung, die durch längere Hyperpolarisation rückgängig gemacht werden kann (Schröder und Keller *et al.*, 1992). Die physiologische Rolle dieser Inaktivierung des Kanals dient vermutlich zur Gegenregulation eines andauernden Anionenausstroms durch Depolarisierung. Wenn die R-Typ-Anionenkanäle aktiviert werden, kommt es durch den Anionenausstrom zu einer Depolarisierung und dem darauf durch den Ausstrom von Malat folgenden feed-forward-Regulationsmechanismus. Dieser Regulationsmechanismus wird durch die Inaktivierung des Kanals effektiv unterbrochen, um die Pflanzenzelle vor einem totalen Verlust von Anionen zu schützen. Durch Messungen an Outside-out-Patches konnte gezeigt werden, dass keine posttranskriptionelle Aktivierung notwendig ist, um eine Kanalaktivierung zu erhalten. Allerdings konnte in Patch-Clamp-Experimenten an *Vicia faba*-Schließzellprotoplasten eine Calcium-vermittelte Steigerung der Stromantwort demonstriert werden (Hedrich und Marten *et al.*, 1993), von der man heute weiß, dass sie durch mehrere Kinasen vermittelt werden kann. Ebenso hat der pH-Wert Einfluss auf die Kanalaktivität. Schulz-Lessdorf *et al.*, 1996 zeigte, dass durch Manipulation des Protonengradienten (pH 7,2<sub>extern</sub> und 5,6<sub>intern</sub>) die Inaktivierung der R-Typ-Stromantwort langsamer und eine erneute Aktivierung ohne Protonengradienten (pH 7,2<sub>extern</sub> und 7,2<sub>intern</sub>) schneller erfolgt. Colcombet *et al.*, 2005, demonstrierte in *Arabidopsis thaliana*-Hypocotylzellen, dass die extrazelluläre Alkalisierung zum Shift der Spannungsabhängigkeit zu positiveren Membranpotenzialen und zu einer Abnahme der Stromamplitude führt. Intrazelluläre pH-Änderungen zeigten keinen signifikanten Effekt. Der zu diesem Zeitpunkt belegten Regulation der R-Typ-Ströme in Pflanzenzellen durch Calcium und Protonen sowie durch Änderungen der Membranspannung konnten jedoch bis 2010 noch keine identifizierten Kanäle zugeordnet werden.

### 1.6.2 ALMT12 (Quac1)

2010 wurde von Meyer *et al.* der Anionenkanal ALMT12 als Teil der R-Typ-Stromantwort identifiziert. Die Expression von ALMT12 konnte durch GUS-Färbungen in *Arabidopsis thaliana*-Schließzellen, Pollenkörnern und der Stele der Wurzel nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde durch die Expression eines Fusionsproteins ALMT12-GFP die zelluläre Lokalisation von ALMT12 in der Plasmamembran belegt. Die Verlustmutante *almt12*

weist einen reduzierten Stomaschluss bei Dunkelheit und bei der Begasung mit CO<sub>2</sub> im Vergleich zum Wildtyp Col-0 auf.

Eine elektrophysiologische Charakterisierung in *Arabidopsis thaliana* erfolgte mittels Patch-Clamp-Messungen. Die Verlustmutante wies eine 40%ige Reduktion der Stromantwort bei Malat im Keimungsmedium auf. Die charakteristische R-Typ-Stromantwort blieb aber weiterhin erhalten, was auf die Beteiligung weiterer R-Typ-Kanäle hindeutet (Meyer *et al.*, 2010). Auf extrazellulärem Sulfat basierende Patch-Clamp-Messungen zeigten keinen Unterschied zwischen Wildtyp und *almt12-1* Pflanzen. Malat fungiert in *Vicia faba*-Schließzellen als Substrat und Regulator der Spannungsabhängigkeit (Keller *et al.* 1989; Hedrich und Marten *et al.*, 1993; Dietrich und Hedrich *et al.*, 1994). Auch in *Arabidopsis thaliana*-Schließzellen kam es bei Erhöhung der extrazellulären Malatkonzentration zu einer Verschiebung der Aktivierungsspannung in negativere Spannungsbereiche und zur Zunahme der Stromamplitude (Meyer *et al.*, 2010). Auf Chlorid basierende TEVC-Messungen an *Xenopus*-Oozyten ohne extrazelluläres Malat konnten keinen Anionenausstrom (Einwärtsströme), sondern nur den Einstrom von Chlorid bei depolarisierenden Spannungspulsen nachweisen (Sasaki *et al.*, 2010).

Messungen an ALMT12-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten im Labor von Prof. Rainer Hedrich zeigten, dass es durch die Injektion von Malat in die Oozyte zu einem Anstieg der Stromamplitude kommt. Malat fungiert auch hier als Substrat und als extrazellulärer Regulator (Mumm *et al.*, 2013). Weiterhin konnte eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit von ALMT12 im Oozyten-Expressionssystem bewiesen werden, wenn die Malatkonzentration in der Badlösung erhöht wurde (Meyer *et al.*, 2010). Dieser Effekt wurde bereits 1993 in Hedrich und Marten *et al.*, für R-Typ-Anionenströme gezeigt und deckt somit die Beteiligung von ALMT12 an den R-Typ-Anionenströmen. Weiterhin konnte die direkte Interaktion und Aktivierung von ALMT12 durch die SnRK-Kinase OST1 aufgezeigt werden und in den Calcium-unabhängigen Signalweg in *Arabidopsis thaliana*-Schließzellen integriert werden. Die Co-Expression von ALMT12, OST1 und der Phosphatase ABI1 führen zur Unterdrückung der ALMT12-vermittelten Stromantwort durch die Inhibierung von OST1 (Abbildung 6). ABI1 dient als negativ regulatorische Phosphatase, welche durch Dephosphorylierung von OST1 die Aktivierung von SLAC1 und ALMT12 unterdrückt. Die Inhibierung von ABI1 durch Abscisinsäure (ABA) führt zur Aktivierung der Anionenkanäle SLAC1 und ALMT12 durch die SnRK-Kinase OST1 (Imes *et al.*, 2013). Die Fusion von GFP an den C-Terminus von ALMT12 resultierte in einem Verlust der spannungsabhängigen Deaktivierung des Kanals im Hyperpolarisationsbereich. Der C-Terminus scheint somit an der

spannungsabhängigen Regulation von ALMT12 beteiligt zu sein (Mumm *et al.*, 2013), allerdings ist noch unklar, ob der C-Terminus des ALMT12-Proteins im Zytosol oder im Apoplasten lokalisiert ist. Ob die Spannungsabhängigkeit von ALMT12 durch die apoplastische Malat-Aktivierung, den Efflux von zytoplasmatischem Malat oder auch von der intrazellulären Malatkonzentration reguliert wird, ist noch nicht eindeutig geklärt.

### 1.6.3 S-Typ-Anionenkanäle

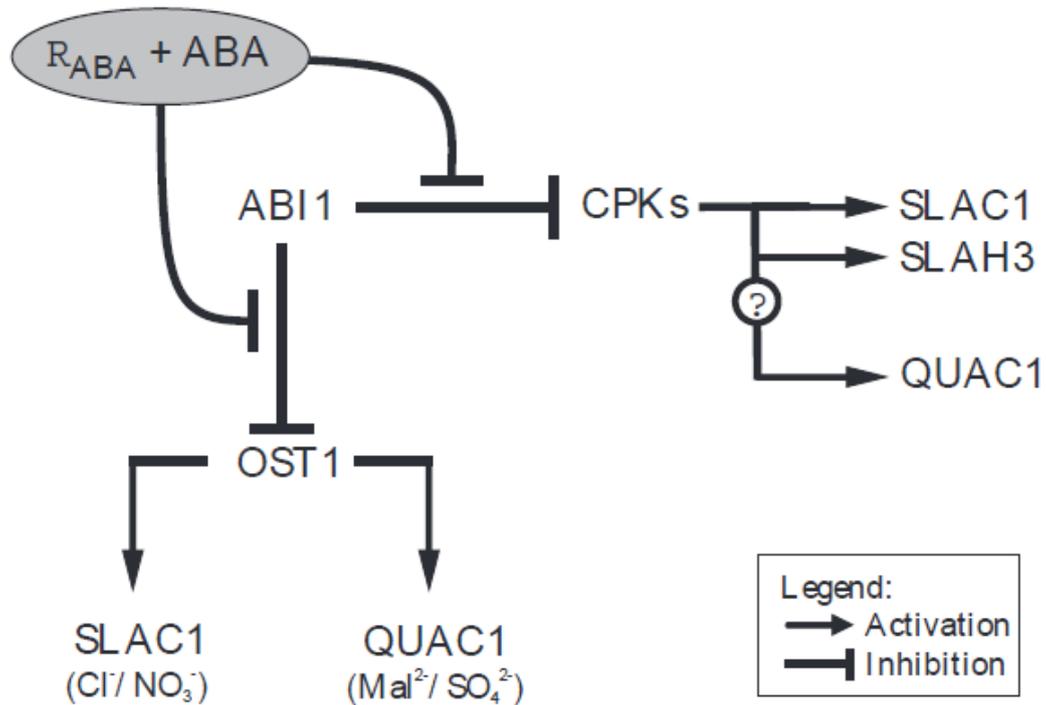
Die bereits in *Vicia faba*-Schließzellen 1990 elektrophysiologisch gut charakterisierten S-Typ-Anionenkanäle (S steht für slow) erhielten ihren Namen durch ihre langsame Aktivierung bei Depolarisation sowie einer langsamen Deaktivierung nach anschließender Hyperpolarisation (Hedrich, Busch und Raschke *et al.*, 1990; Schröder und Keller *et al.*, 1992). Die für diese Ströme verantwortlichen Kanäle wurden erst 2008 durch Untersuchungen der Ozon-sensitiven-*rcd*-Mutanten (*rcd*, radical induced cell death) entdeckt. Die heute als *slac1-1* bekannte Verlustmutante (slow anion channel 1) zeigte eine Mutation im At1g12480-Gen, welche zu einem reduzierten Stomaschluss bei Ozon-Applikation führte. Weiterhin wurde eine erhöhte Transpiration in *slac1-1*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp Col-0 festgestellt (Vahisalu *et al.*, 2008). Die Familie der SLAC/SLAH-Anionenkanäle umfasst in *Arabidopsis thaliana* noch vier Homologe, die SLAH1-4 genannt werden. Strukturell leitet sich SLAC1 vom bakteriellen HiTehA ab. Dieses SLAC1-Homolog aus *Haemophilus influenzae* wurde 2010 erstmals kristallisiert und zeigt eine Struktur bestehend aus einem Trimer. Jedes Monomer des Trimers formt eine eigenständige Pore, die durch ein in der gesamten SLAC/SLAH-Familie konserviertes Phenylalanin (F450 in SLAC1) blockiert wird und durch eine phosphorylierungsabhängige Konformationsänderung die Pore frei gibt. Die Mutation des Phenylalanins F450 in ein Alanin resultierte in einer Zunahme der SLAC1-Anionenströme, vergleichbar mit der Stromantwort von SLAC1 in phosphoryliertem Zustand, wie sie bei der Co-Expression von SLAC1 mit OST1 auftritt (Chen *et al.*, 2010). Eine solche Phosphorylierung wurde von Geiger *et al.*, 2009 und 2010, in *Xenopus*-Oozyten nachgewiesen. Es konnte sowohl eine Calcium-unabhängige Aktivierung durch OST1 (Abbildung 6), als auch eine Calcium-abhängige Aktivierung durch die beiden Calcium-abhängigen Kinasen CPK21 und 23 gezeigt werden (Geiger *et al.*, 2010). Als negativer Regulator der SLAC1-Aktivität wurde die Phosphatase ABI1 identifiziert. ABI1 wirkt als negativer Regulator sowohl für den Calcium-abhängigen als

auch für den unabhängigen Signalweg zur Aktivierung der Anionenkanäle (Geiger *et al.*, 2009). Neben der Phosphorylierung konnte Colcombet *et al.*, 2005, eine durch intrazelluläre Ansäuerung und extrazelluläre Alkalisierung induzierte Zunahme der charakteristischen S-Typ-Stromantwort in *Arabidopsis thaliana*-Hypocotylzellen nachweisen. Dies konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt aber im heterologen Expressionssystem der Oozyte noch nicht gezeigt werden.

#### 1.6.4 SLAH3

Neben SLAC1 (Negi *et al.*, 2008) konnte die Expression des SLAC1-Homologes SLAH3 in *Arabidopsis thaliana*-Schließzellen nachgewiesen werden (Geiger *et al.*, 2011). SLAH3 zeigt im Gegensatz zu SLAC1 bei Co-Expression mit CPK21 keine makroskopischen Ströme und benötigt extrazelluläres Nitrat zur Aktivierung. In Anwesenheit von 3 mM Nitrat in der Badlösung konnte die Aktivierung von SLAH3 durch die Calcium-abhängigen Kinasen 3, 6, 21 und 23 (Geiger *et al.*, 2011, Scherzer *et al.*, 2012) sowie durch CIPK23 + CBL1 gezeigt werden (Maierhofer *et al.*, 2014). SLAH3 interagiert ebenso wie SLAC1 mit den SnRK-Kinasen 2.1, 2.2, 2.6 und 2.8 (Geiger *et al.*, 2009), zeigt aber keine Aktivierung durch diese und wird so dem Calcium-abhängigen Signalweg in Schließzellen zugeordnet. Die Aktivierung des Kanals erfolgt durch Phosphorylierung am Threonin 187. Der Austausch dieses Threonins durch Asparaginsäure führt zu einer Stromantwort, die mit der Co-Expression von SLAH3 mit CPK21 vergleichbar ist. SLAH3 T187D simuliert somit einen dauerhaft phosphorylierten SLAH3-Kanal. SLAH3 wird wie SLAC1 durch die Phosphatase ABI1 deaktiviert. Die durch ABI1 vermittelte Deaktivierung erfolgt durch Dephosphorylierung der Calcium-abhängigen Kinasen sowie der SnRK Kinase OST1. Die Inaktivierung von ABI1 durch ABA/ABA-Rezeptor-Komplex ermöglicht erst die Phosphorylierung der Anionenkanäle durch SnRK und CPKs (siehe Abbildung 6), (Geiger *et al.*, 2009; Geiger *et al.*, 2010; Geiger *et al.*, 2011).

Die extrazelluläre Nitratkonzentration bestimmt sowohl die relative Offenwahrscheinlichkeit, als auch die Stromamplitude, die sich mit steigender extrazellulärer Nitratkonzentration in negativere Spannungsbereiche verschiebt. SLAH3 leitet sowohl Chlorid als auch Nitrat, wobei SLAH3 eine 20-fach höhere Leitfähigkeit für Nitrat gegenüber Chlorid besitzt. Nitrat dient somit sowohl als Substrat, als auch als Regulator von SLAH3 (Geiger *et al.*, 2011).



**Abbildung 6: Regulation von R- und S-Typ-Anionenkanälen im ABA-Signalweg in *Arabidopsis thaliana*-Schließzellen**

Die Bindung von Abscisinsäure (ABA) an den zytosolischen Rezeptor ( $R_{aba}$ ) inaktiviert die PP2C-Phosphatase ABI1. Die ausbleibende Inhibierung führt zur Calcium-unabhängigen Aktivierung durch die SnRK-Kinase OST1 bzw. Calcium-abhängigen Aktivierung durch Calcium-abhängige Kinasen (CPKs) der Anionenkanäle. Durch die Calcium-unabhängige Phosphorylierung der Anionenkanäle SLAC1 und ALMT12 (QUAC1) durch OST1 kommt es zu einem Anionenefflux. Eine Calcium-abhängige Aktivierung durch CPKs konnte für die Anionenkanäle SLAC1 und SLAH3 gezeigt werden (Imes *et al.*, 2013; Abbildung 7 aus Imes, D., Mumm, P., Böhm, J., Al-Rasheid, K. A., Marten, I., Geiger, D., Hedrich, R. (2013). Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J.* 1. Mai 2013; 74 (3): 372-82. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tpj.12133/pdf>).

## 1.7 Zielsetzung

Der spitzenlokalisierte Calciumeinstrom in der Pollenschlauchspitze und dessen Einfluss auf das Wachstum sind bereits gut dokumentiert. Dieser zum Teil oszillierende Calcium-Gradient scheint der zentrale Taktgeber des Pollenschlauchwachstums zu sein. Bekannt ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Regulation von Endo- und Exozytose sowie die Regulation des Aktin-Zytoskeletts durch ROP-GTPasen. Die Regulation des durch den Kaliumkanal SPIK-vermittelten Kaliumeinstroms wird ebenfalls durch Calcium-abhängige Kinasen und von Calciumsensorproteinen gesteuert (Camacho und Malho *et al.*, 2003; Coelho und Malho *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008; Cardenas *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2013).

Neben dem oszillierenden Calciumgradienten an der Pollenschlauchspitze spielt die Anionenhomöostase ebenfalls eine entscheidende Rolle im Wachstumsprozess. Zonia *et al.*, 2002, zeigte erstmals einen oszillierenden Ausstrom von Chlorid aus der Spitze von wachsenden Pollenschläuchen. Die Inhibierung des Chloridausstroms führte zu einem sofortigen Wachstumsstopp. Eine elektrophysiologische Charakterisierung der Anionenströme von Lilien-Pollen- und Pollenschlauchprotoplasten mittels Patch-Clamp-Technik ergab drei unterscheidbare Anionen-Leitfähigkeiten, welche durch die intrazelluläre Calciumkonzentration reguliert wurden (Tavares *et al.*, 2011). Diese Calcium-abhängigen Anionenströme deuten auf einen Zusammenhang zwischen Calcium und Anionen-Homöostase sowie eine Korrelation mit dem Pollenschlauchwachstum hin. So finden Anionenausstrom und Wachstumsschübe zeitgleich statt (Zonia *et al.*, 2001) was die essentielle Bedeutung des Anionenausstroms für das Pollenschlauchwachstum noch einmal verdeutlicht. Über die für den Anionenausstrom verantwortlichen Kanäle sowie über deren genaue Regulation ist noch nichts bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung der für den Anionenausstrom verantwortlichen Anionenkanäle sowie deren Regulation und physiologische Rolle im polaren Zellwachstum von Pollenschläuchen aufzuklären. Zu diesem Zweck wurden in dieser Doktorarbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Welche Anionenkanäle werden in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen exprimiert und wie werden sie durch die Anionenzusammensetzung des Keimungsmediums auf transkriptioneller Ebene reguliert? Hierzu sollten die quantitative Real-time-PCR und GUS-Promotor-Linien Verwendung finden.

- Unter welchen Ionenzusammensetzungen lassen sich Anionenströme in intakten Pollenschläuchen mittels TEVC-Technik am besten *in vivo* auflösen und quantifizieren? Unter Verwendung der TEVC-Technik sollte die Ionenzusammensetzung des Keimungsmediums herausgearbeitet werden, die eine selektive Auflösung von R- und S-Typ-Anionenkanälen ermöglichen.
- Aus welchen Komponenten setzen sich die Anionenströme zusammen und welche Gene sind hierfür verantwortlich? Der Einfluss auf die Anionenströme sollte durch vergleichende Messungen an Pollenschläuchen zwischen Wildtyp- und Anionenkanal-Verlustmutanten ermittelt werden. Anionenkanal-Verlustmutanten sollten herangezogen werden, um den Wachstumsphänotyp der Pollenschläuche zu analysieren. Ebenfalls sollten die Mechanismen zur Steuerung der Anionenkanäle untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte überprüft werden, ob eine Calcium-abhängige Signaltransduktionskette mittels Calcium-abhängiger Kinasen an der Anionenkanalregulation beteiligt ist. Hierzu sollte die TEVC-Technik an *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen angewendet und das heterologe *Xenopus*-Oozyten-Expressionssystem herangezogen werden.
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem oszillierenden apikalen Calcium-Gradienten und dem ebenfalls oszillierenden Anionenefflux an der Pollenschlauchspitze? Hierzu sollten unter Verwendung von genetisch codierten Sonden für zytoplasmatische Calcium- und Anionen-Konzentrationen die Fluoreszenzmikroskopie und TEVC-Technik miteinander kombiniert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Anzucht *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*

Der *Arabidopsis thaliana*-Ecotyp Col-0 sowie sämtliche T-DNA-Verlustmutanten wurden 4-6 Wochen in einer Klimakammer unter Kurztagbedingungen (8 h Licht/16 h Dunkelheit bei 22/16°C) auf Erde angezogen und anschließend unter Langtagbedingungen (12 h Licht/12 h Dunkelheit bei 22/16°C) im Gewächshaus bei einer Beleuchtungsstärke von  $100 \mu\text{m m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (25 W, 230 V, Osram TL70 F32T8/TL 741; Philips) bis zur Samenreife weiterkultiviert. *Nicotiana tabacum* (Petit Havana SR1) Pflanzen wurden auf Erde im Gewächshaus bei 10 h Licht/14 h Dunkelheit und 22-24°C/20°C bei einer Lichtstärke von 30 KLux (SON-T Agro 400 W; Philips) kultiviert.

### 2.2 Kreuzen von T-DNA-Verlustmutanten

Zum Kreuzen der T-DNA-Verlustmutanten wurden noch geschlossene Blüten unter einem Binokular (MZ-6, Leica) präpariert. Hierzu wurden alle Blütenbestandteile bis auf den Fruchtknoten entfernt. Es wurden je Kreuzungsversuch 10 Fruchtknoten präpariert, welche am nächsten Tag mit frisch geernteten Pollen der gewünschten Mutanten bestäubt wurden. Die bestäubten Fruchtknoten wurden mit farbigem Klebeband markiert und nach Samenreifung geerntet (F1). Die F1-Generation wurde erneut ausgesät und Samen geerntet. Die daraus resultierende F2-Generation konnte nun zum Screening auf eine homozygote Linie genotypisiert werden

## 2.3 Pollenernte

### 2.3.1 Pollenernte *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana*-Pollen wurden mittels einer Absaugvorrichtung (Johnson-Brousseau und McCormick *et al.*, 2004) auf einer 6 µm-Gaze gesammelt und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert oder es wurden frische Blüten gesammelt und die Pollen direkt auf die Oberfläche des Keimungsmediums aufgebracht.

### 2.3.2 Pollenernte *Nicotiana tabacum*

Die frisch geöffneten *Nicotiana tabacum*-Blüten wurden abgeerntet und die fünf Antheren mittels einer feinen Pinzette gesammelt. Anschließend wurden die Pollen mit Hilfe eines feinen Siebs von den Pollensäcken getrennt. Die frisch geernteten Pollen wurden bei -20°C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

## 2.4 Pollenkeimung und Keimungsmedien

Sämtliche durchgeführten Experimente erfolgten auf einem Basismedium mit 1,6 mM Borsäure, 1 mM MES, 1,5-2 % Low melt Agarose (LMA). Die Osmolarität wurde mit Saccharose auf 370 bzw. 400 mosmol/kg und der pH Wert mit Tris auf pH 6,5 (*Arabidopsis thaliana*) oder 5,8 (*Nicotiana tabacum*) eingestellt. Die Konzentration von Anionen und Kationen wurde je nach Experiment variiert (siehe Tabelle 1).

### 2.4.1 Pollenkeimung *Arabidopsis thaliana*

Um eine hohe Keimungsrate zu gewährleisten, wurden die gesammelten Pollen auf die Oberfläche des festen LMA-Keimungsmediums (1,5 % Low melt Agarose) aufgebracht und für 3-6 h bei Raumtemperatur und hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert. Im Anschluss wurden die gekeimten Pollenschläuche mit einer Lösung (gleiche Zusammensetzung wie das LMA-Medium) überschichtet und für elektrophysiologische Messungen bzw. Phänotyp-Analysen verwendet.

### 2.4.2 Pollenschlauch-Phänotyp-Analyse: Längenwachstum von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp und Verlustmutanten

Die mittels Absaugvorrichtung geernteten Pollen von Wildtyp und Verlustmutanten wurden zeitgleich auf ein LMA-Keimungsmedium (1,5 % LMA) aufgebracht und für 6 h bei Raumtemperatur inkubiert. Da die Pollendichte Einfluss auf die Keimungsrate hat (Boavida *et al.*, 2007), wurde beim Aufbringen der Pollen auf eine gleichmäßige Verteilung geachtet. Im Anschluss wurden die gekeimten Pollenschläuche nach 6 h fotografiert und mit der Software ImageJ ( $n \geq 250$ ) vermessen. Die Phänotyp-Analyse wurde dreimal an unterschiedlichen Tagen repliziert.

### 2.4.3 Pollenkeimung *Nicotiana tabacum*

*Nicotiana tabacum*-Pollen wurden mit dem 40°C-warmen LMA-Medium gemischt und auf einen zuvor mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckglas/Anzuchtschälchen (siehe Abbildung 7) gegeben. Auf einem Heizblock wurde den Pollenkörnern bei 40° Grad für 2-3 min Zeit gelassen, sich auf dem Boden des Objektträgers abzusetzen. Im Anschluss wurden die erkalteten Objektträger mit dem 400-µL-Medium überschichtet. Diese Methode gewährleistete einen geraden Wuchs der Pollenschläuche zwischen dem Objektträger und dem LMA-Medium. Nach 4-6 h bei hoher Luftfeuchtigkeit konnten die

gekeimten Pollenschläuche für die Fluoreszenzmikroskopie und elektrophysiologischen Experimente genutzt werden.



**Abbildung 7: Pollenschlauch-Anzuchtschälchen**  
Die Anzuchtschälchen wurden mit ca. 200  $\mu$ l LMA-Keimungsmedium befüllt und wie in Abschnitt 2.4.1 und 2.4.2 beschrieben, mit Pollen bestückt.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der in vitro-Keimungsmedien**

Keimungsmedium	Calcium (mM)	Kalium (mM)	Chlorid (mM)	Nitrat (mM)	Malat (mM)	pH	Osmolarität (mosmol/kg)
3/7	10	1	7	14	0	6.5	370
3/7 K <sup>+</sup> frei	10	0	6	14	0	6.5	370
Tabak 20 Cl <sup>-</sup>	10	0	20	0	0	5.8	400
0 K <sup>+</sup>	1	0	2	0	0	6.5	370
1 K <sup>+</sup>	1	1	2	0	0	6.5	370
10 K <sup>+</sup>	1	10	2	0	0	6.5	370
40 Cl <sup>-</sup>	20	0	40	0	0	6.5	370
40 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	20	0	40	0	0	6.5	370
20 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	20	0	20	0	0	6.5	370
10 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	20	0	10	0	0	6.5	370
5 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	20	0	5	0	0	6.5	370
20 Malat	20	0	40	0	20	6.5	370
10 Malat	20	0	40	0	10	6.5	370
5 Malat	20	0	40	0	5	6.5	370

## 2.5 *Arabidopsis thaliana* T-DNA-Insertionslinie

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung der Anionenströme wurden folgende T-DNA-Verlustmutanten verwendet (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: *Arabidopsis thaliana*-Verlustmutanten und Überexpressionslinien**

Name	Linie	Mutation
<i>slah3-1</i>	GK-371G03	T-DNA Insertion
<i>slah3-2</i>	SALK_085191	T-DNA Insertion
<i>almt12-1</i>	SM_3_38592	T-DNA Insertion
<i>almt12-2</i>	SM_3_1713	T-DNA Insertion
<i>slah3-1 x almt12-1</i>	GK-371G03 x SM_3_38592	T-DNA Insertion
<i>almt13-1</i>	SAIL_517_F03	T-DNA Insertion
<i>almt14</i>	SALK_046375C	T-DNA Insertion
<i>almt12-1 x almt13-1</i>	SM_3_38592 x SAIL_517_F03	T-DNA Insertion
<i>almt12-1 x almt14</i>	SM_3_38592 x SALK_046375C	T-DNA Insertion
<i>slac1-3 x slah3-1 x almt12-1 x almt13-1</i>	SALK_099139 x GK-371G03 x SM_3_38592 x SAIL_517_F03	T-DNA Insertion
<i>slac1-3 x slah3-1 x almt12-1 x almt14</i>	SALK_099139 x GK-371G03 x SM_3_38592 x SALK_046375C	T-DNA Insertion
<i>cpk6-1</i>	SALK_025460C	T-DNA Insertion
<i>cpk2-1 x cpk20-1</i>	SALK_059237 x SALK_073448	T-DNA Insertion
<i>cpk2-1 x cpk20-2</i>	SALK_059237 x SALK_044320	T-DNA Insertion
<i>cpk6-1 x cpk2-1 x cpk20-1</i>	SALK_025460C x SALK_059237 x SALK_073448	T-DNA Insertion

## 2.6 Elektrophysiologische Methoden

### 2.6.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (TEVC two electrode voltage clamp)

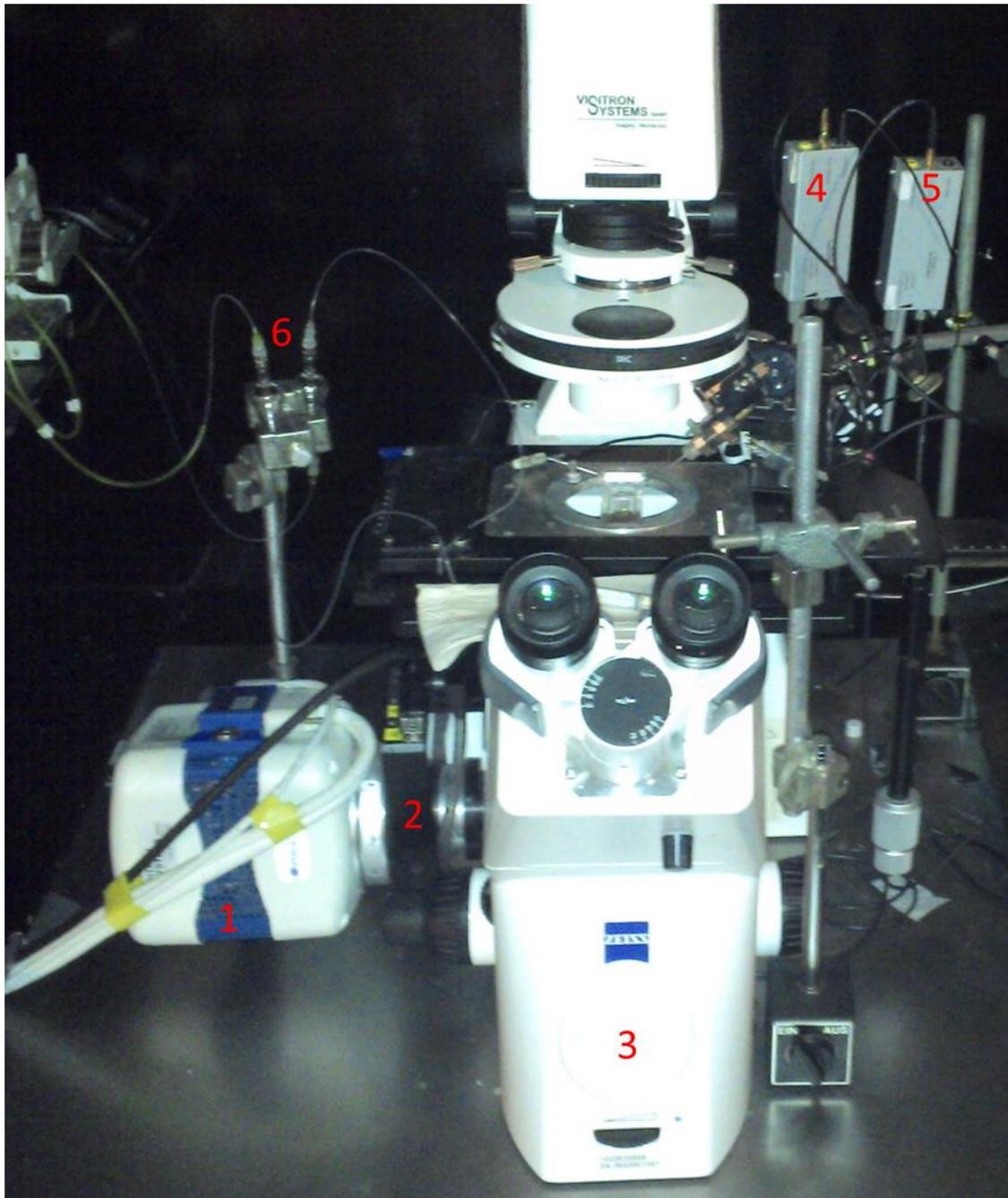
Die elektrophysiologischen Experimente wurden mit Hilfe der „Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik“ durchgeführt. Diese Methode wurde zum ersten Mal in den frühen 50er Jahren von Kenneth C. Cole, Alan Hodgkin und Andrew Huxley (Cole *et al.*, 1949; Hodgkin *et al.*, 1949; Hodgkin *et al.*, 1952) an einem Tintenfisch-Axon verwendet. Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme ermöglicht es, Ionenflüsse bei einem definierten Membranpotenzial (MP) zu messen, was eine elektrophysiologische Charakterisierung der vorhandenen Ionenkanäle der Zelle ermöglicht. Hierzu wird mit einer Zweikanal-Einstichelektrode (Potenzial- und Spannungselektrode) die Zellmembran durchstoßen. Anschließend kann über die Potenzialelektrode das freie Membranpotenzial gemessen und die Zelle durch eine entsprechende Strominjektion der Stromelektrode auf eine definierte Spannung geklemmt werden. Hierzu vergleicht der Differenzialverstärker die gewünschte Soll-Spannung mit der über die Potenzialelektrode gemessenen Ist-Spannung und gleicht die Differenzladungen über die Stromelektrode aus. Der Ein- oder Ausstrom von Ionen über Membranproteine, wie Ionenkanäle, führt nun zu einer Abweichung von der vorgegebenen Soll-Spannung und wird durch den Differenzialverstärker ausgeglichen. Somit entspricht die durch den Verstärker ausgeglichene Ladung der Ionenbewegung, die über die gesamte Zellmembran stattfindet. Im Gegensatz zu Patch-Clamp-Messungen bleibt die zytoplasmatische Ionenkonzentration weitestgehend unverändert und wird nicht durch die Elektrodenlösung ausgetauscht, kann aber durch die Ionenbedingungen im Keimungsmedium beeinflusst werden.

### 2.6.2 Konvention

Per Konvention nach Bertl *et al.*, 1992, definiert die Ladungstrennung zwischen extrazellulärer und zytosolischer Membranseite das Membranpotenzial, wobei das extrazelluläre Potenzial per Konvention auf null gesetzt wird. Somit erzeugt ein Kationeneinstrom bzw. ein Anionenausstrom einen negativen Strom, während ein Kationenausstrom aus der Zelle bzw. ein Anioneneinstrom in die Zelle einen positiven Strom verursacht.

### 2.6.3 Messplatz-Aufbau

Der gesamte Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Messplatz wurde mit einem faradayschen Käfig vor äußeren elektrischen Feldern abgeschirmt und durch einen schwingungsgedämpften Tisch ein möglichst erschütterungsfreier Messplatz hergestellt. Kernstück des Einstichmessplatzes war ein inverses Mikroskop (AxioObserver, Carl Zeiss AG) mit angeschlossenem Highspeed-Filterrad (Ludl Electronic Products Ltd.) und Kamera (EMCCD-Kamera Evolve, Photometrics). Dieses wurde durch einen Sensapex Mikromanipulator sowie ein Perfusionssystem ergänzt. Mit Hilfe des Sensapex Mikromanipulators konnte die Einstichelektrode präzise und stabil in die Zelle eingeführt werden und mit Hilfe des Perfusionssystems die Ionenbedingungen der Badlösung variiert bzw. Effektoren und Inhibitoren eingespült werden. Die für die TEVC-Technik verwendeten Vorverstärker des Differenzialverstärkers TEC05X (NPI Electronic) wurden ebenfalls im faradayschen Käfig (Abbildung 8 und Abbildung 9) vor elektrischen Feldern abgeschirmt.

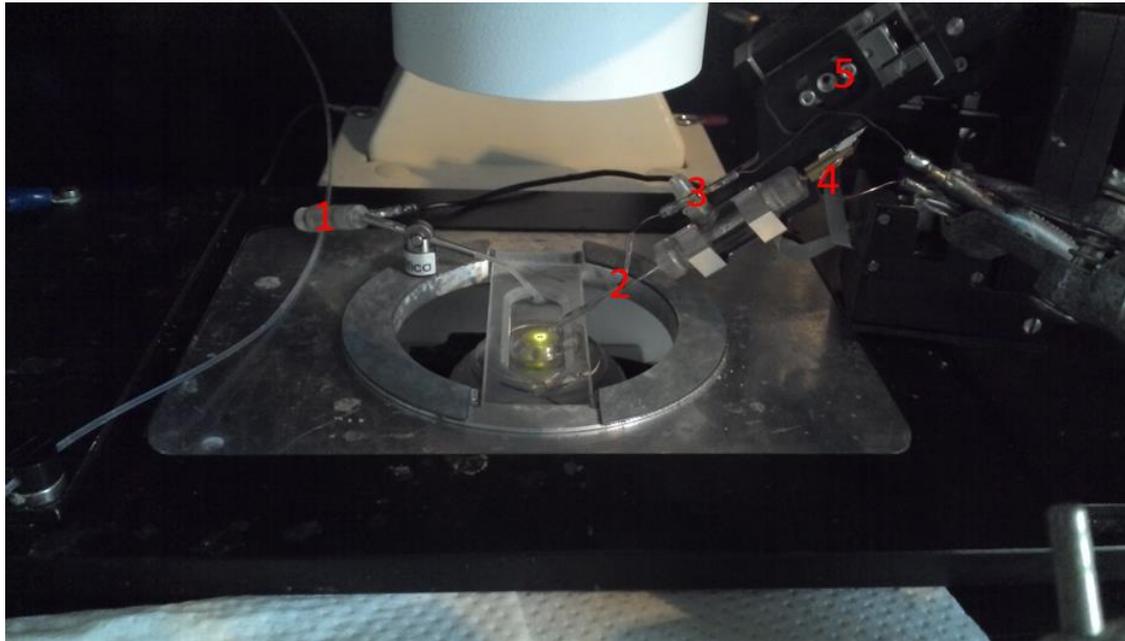


**Abbildung 8: Aufbau des TEVC-Einstich-Messplatzes**

Die EMCCD-Kamera Evolve (1) mit vorgeschaltetem Highspeed-Filterrad (Ludl) (2) an dem inversen Mikroskop AxioObserver (3) bilden das Kernstück des TEVC-Einstich-Messplatzes. Ebenfalls im faradayschen Käfig integriert sind die beiden Vorverstärker für Potenzial- (4) und Stromelektrode (5) sowie das Perfusionssystem (6) zum Einspülen diverser Lösungen in die Messkammer.

#### **2.6.4 Zweikanal-Elektroden für elektrophysiologische Charakterisierung von Pollenschläuchen**

Die in dieser Arbeit für den Einstich benötigten Zweikanal-Einstichelektroden wurden aus zwei Borosilikatglas-Kapillaren (1 mm Außendurchmesser, 0,58 mm Innendurchmesser, Hilgenberg) gefertigt. Hierzu wurden beide Kapillaren in einem Vertikalpuller (L/M-3P-A; Medical Electronics) erhitzt, um 360° miteinander verdreht und über eine Länge von 4,5 mm ausgezogen. Der so entstandene Rohling wurde nun mit Hilfe eines Laserpullers (P2000; Sutter Instruments) in zwei Zweikanal-Einstichelektroden ausgezogen (P2000 Operation Manual). Die Einstellungen wurden so gewählt, dass sich der Elektrodenwiderstand im verwendeten Keimungsmedium im Bereich  $< 100 \text{ M}\Omega$  befand. Die Elektroden wurden mit 300 mM KCl luftblasenfrei befüllt und über einen chlorierten Silberdraht ein elektrischer Kreislauf mit den Vorverstärkern des TEC-05X-Verstärkers hergestellt. Die Referenzelektrode wurde ebenfalls mit 300 mM KCl befüllt und mit einem 2%igen Agarosepfropfen (300 mM KCl) verschlossen. Der Einstich erfolgte mit Hilfe eines Sensapex Mikromanipulators (Abbildung 9). Die in Abbildung 7 gezeigten Anzuchtschälchen fungierten zugleich als Messkammer für die Einstich-Experimente und die Fluoreszenzmikroskopie.



**Abbildung 9: Anordnung von Bad- und Zweikanal-Einstichelektrode**

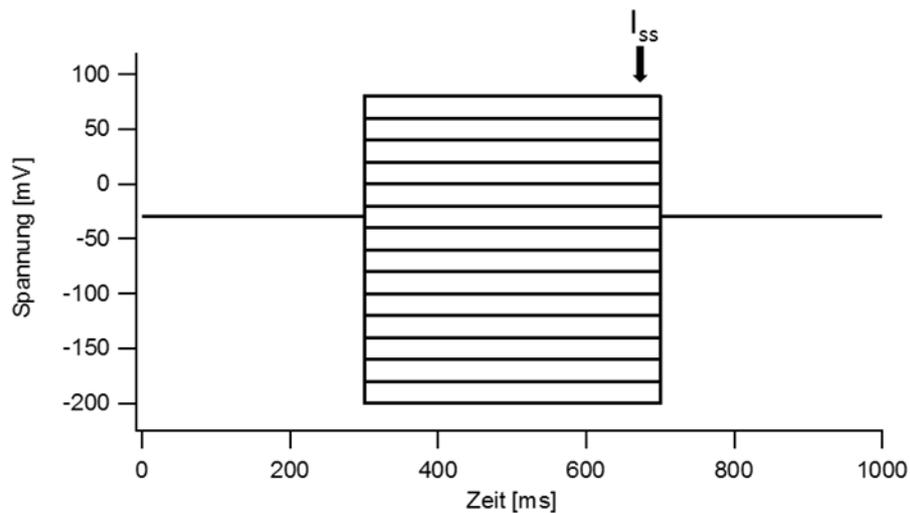
Die Badelektrode (1) befindet sich im hinteren Teil der Messkammer und ist in Kontakt mit der Badlösung, während Potenzial- (3) und Stromelektrode (4) über eine Zweikanal-Einstichelektrode (2) durch einen Sensapex Mikromanipulator (5) mit einem in der Messkammer wachsenden Pollenschlauch mittels Einstich verbunden werden.

### 2.6.5 Software, Spannungspulsprotokolle und Datenauswertung

Zur Applikation als auch zur Analyse von Spannungspulsprotokollen wurde die Software PULSE (Version 8.77, HEKA Electronics) benutzt. Die graphische Auswertung erfolgte mittels Igor (Igor Pro 6.35A5, Wave Metrics). Analysiert wurden die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  („steady state“-Ströme) der durch die Spannungspulse ausgelösten Stromantworten. Ausgehend von der Haltespannung, welche dem freien Membranpotenzial entsprechend gewählt wurde, wurden 14-16 Spannungspulse ( $\Delta 20$  mV) appliziert. Dabei wurde die Zelle nach jedem Spannungspuls wieder zurück auf die Haltespannung gesetzt (300 ms vor und 300 ms nach dem Spannungspuls), bevor ein neuer Spannungspuls (400 ms) appliziert wurde. Zur Differenzierung von R- und S-Typ-Anionenkanälen wurden zwei verschiedene Spannungspulsprotokolle verwendet (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11), welche sich nur durch einen 100 ms Vorpuls auf 60 mV im Spannungspulsprotokoll zur besseren Ableitung von R-Typ-Anionenströmen voneinander unterscheiden. Die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  wurden aus den letzten 20 ms des Spannungspulses exportiert.

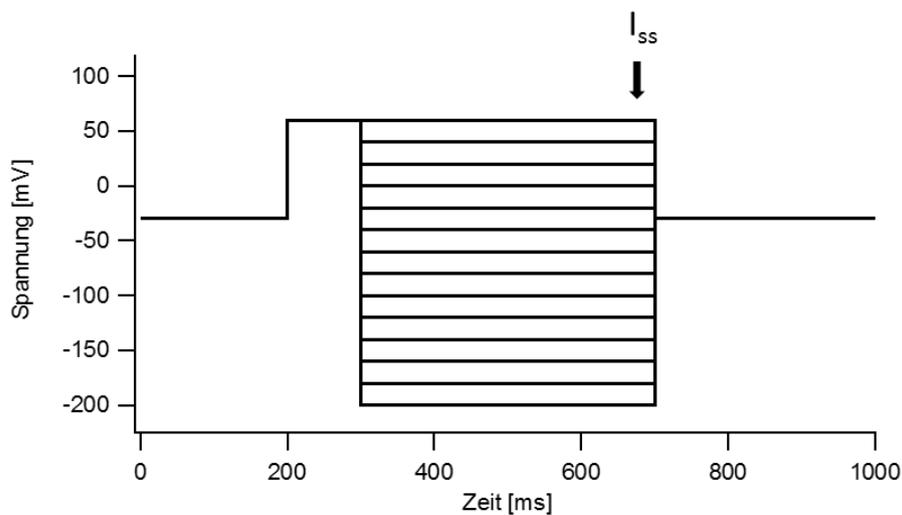
Um eine Verfälschung der zytoplasmatischen Anionenkonzentration durch einen Einstrom von Anionen bei positiven Spannungspulsen zu verhindern, begannen die Spannungspulsprotokolle immer im negativen Spannungsbereich und wurden mit jedem Durchlauf um +20 mV erhöht.

Folgende Spannungspulsprotokolle wurden zur Charakterisierung der Ganzzellströme verwendet:



**Abbildung 10: Spannungspulsprotokoll zur Ableitung von S-Typ-Anionenströmen**

In den ersten 300 ms wird die Haltespannung dem freien Membranpotenzial der Zelle angepasst. Im Anschluss erfolgt ein Spannungspuls mit einer Länge von 400 ms, worauf erneut für 300 ms zur Haltespannung zurückgekehrt wird bevor der nächste Spannungspulszyklus ( $\Delta 20$  mV) begonnen wird. Die Spannungspulse beginnen bei -200 mV und enden bei +80 mV



**Abbildung 11: Spannungspulsprotokoll zur Ableitung von R-Typ-Anionenströmen**

In den ersten 200 ms wird die Haltespannung dem freien Membranpotenzial der Zelle angepasst. Darauf erfolgt ein 100 ms andauernder Spannungssprung (Vorpuls) auf +60 mV, gefolgt von einem 400 ms langen Spannungspuls, beginnend bei -200 mV. Im Anschluss wird erneut für 300 ms auf die Haltespannung zurück gesprungen und ein neuer Spannungspuls ( $\Delta 20$  mV) begonnen. Die applizierten Spannungspulse beginnen bei -200 mV und enden bei +60 mV, wobei jedem Spannungspuls eine Vorpuls von 100 ms bei +60 mV vorangeht.

### 2.6.6 Elektrophysiologische Untersuchungen an *Arabidopsis thaliana*- und *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung der Ganzzellströme wurde mit Hilfe der Einstichelektrode die Zellmembran möglichst in der subapikalen Zone des Pollenschlauchs durchstoßen und das freie Membranpotenzial der Zelle aufgezeichnet. Nachdem sich ein stabiles Membranpotenzial eingestellt hatte (ca. 60 s), wurde die Zelle auf diese Spannung geklemmt. Ausgehend von dieser Haltespannung konnten nun Spannungspulse (siehe Spannungspulsprotokolle) appliziert und die korrespondierenden Ströme aufgezeichnet werden. Für alle Experimente wurden nur Zellen mit sichtbarer Zytoplasmaströmung verwendet. Mit Hilfe eines Perfusionssystems, bestehend aus zwei Peristaltikpumpen konnte die Ionenzusammensetzung des Mediums während der Messungen geändert bzw. Effektoren und Pharmaka ein- und ausgespült werden.

## 2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Durch den Einsatz von FRET-basierten genetisch codierten Reportern für zytoplasmatische Calcium- und Anionenkonzentrationen, Yellow-Cameleon 3.6 (YC3.6) (Nagai *et al.*, 2004) und Chloridsensors (Cl<sup>-</sup>-Sensor) (Markova *et al.*, 2008), konnte ein Calcium- und Chlorid-Ionengradient und deren Oszillationen in intakten *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen (SR1) untersucht werden. Alle Experimente wurden mit stabilen pLat52-YC3.6- oder pLat52-Cl<sup>-</sup>-Sensor-Linien durchgeführt, welche von Dr. Kai Konrad bereitgestellt wurden. Des Weiteren wurde Fluoreszenzmikroskopie mit der TEVC-Technik kombiniert, was durch die Applikation von Spannungspulsen die Aktivierung von Calcium- und Chloridkanälen bei gleichzeitiger Visualisierung der zytoplasmatischen Calcium- oder Chlorid-Ionen ermöglichte.

### 2.7.1 Aufbau der Messapparatur

Die Fluoreszenzexperimente wurden mit dem inversen AxioObserver-Mikroskop (Zeiss AG) und einer EMCCD-Kamera Evolve (512 x 512 pixel, Photometrics), wie oben beschrieben, bei 40- oder 60-facher Vergrößerung (C-Apochromat 40x/1.2W Korr, C-Apochromat 63x/1.2W Korr, Carl Zeiss) aufgenommen. Die Anregung der Fluorophore erfolgte durch ein Highspeed-Polychromator-System (Visitron Systems) bei Wellenlängen von 420 nm für CFP und 505 nm für YFP. Die Fluoreszenzemission wurde von einem dichroitischen Spiegel (440/520, Semrock Inc.) reflektiert und durch einen Dual-Band-Filter (464/547, Semrock Inc.) geleitet und anschließend im Highspeed-Filterrad (Ludl Electronic Products Ltd.) über zwei Bandpassfilter (ET 470/24 nm (CFP) und ET 535/30 nm (YFP), Chroma Technology Corporation) in CFP- und YFP-Emissionen aufgetrennt. Die Steuerung und Einstellungen der Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit Hilfe der zugehörigen VisiView Software (Visitron Systems).

### 2.7.2 Auswertung der Calcium-Fluoreszenzmessung mit Yellow Cameleon 3.6 (YC 3.6)

Für die Analyse der zytoplasmatischen Calciumkonzentration mittels YC3.6 wurde die Software ImageJ (ImageJ 1.48V; MacBiophotonics) benutzt. Hierzu wurde das Verhältnis der  $YFP_{\text{Emission}}$  bei  $CFP_{\text{Anregung}}$  ( $YFP@CFP$ ) geteilt durch  $CFP_{\text{Emission}}$  bei  $CFP_{\text{Anregung}}$  ( $CFP@CFP$ ) ermittelt. Zuvor wurde das  $YFP@CFP$ -Signal durch eine Background-Subtraction in ImageJ aufgearbeitet.

$$\text{Ratio} = \frac{YFP@CFP}{CFP@CFP}$$

Zur besseren Visualisierung wurde das Signal im Anschluss mit einem Pseudo-Farbcode überarbeitet (Ratio look up table), welcher die zytoplasmatische

Calciumkonzentration über die Farbskala von blau (niedrige Calciumkonzentration) bis rot/weiß (hohe Calciumkonzentration) darstellt.

### 2.7.3 Auswertung der Chlorid-Fluoreszenzmessung des Chloridsensors (Cl-Sensor)

Die Analyse des Cl-Sensors erfolgte aufgrund des starken Protonengradienten des Pollenschlauches über einen dritten Kanal YFP<sub>Emission</sub> bei YFP<sub>Anregung</sub> (YFP@YFP). Durch die H<sup>+</sup>-Abhängigkeit der YFP-Emission (McAnaney *et al.*, 2005) käme es durch den Protonengradienten entlang der Pollenschlauchspitze zu einer Signalverfälschung. Um dies zu umgehen, wurde die YFP-pH-Abhängigkeit über den dritten Fluoreszenzkanal herausgerechnet. Die hier gezeigte Formel ermöglicht eine pH-unabhängige Auswertung des Cl-Sensors.

$$\text{Ratio} = \left( \frac{\text{CFP@CFP}}{\text{YFP@CFP}} \right) \times \text{YFP@YFP}$$

Zur besseren Visualisierung wurde das Signal im Anschluss mit einem Pseudo-Farbcode (Ratio look up table) überarbeitet, welcher die zytoplasmatische Calciumkonzentration über die Farbskala von blau (niedrige Calciumkonzentration) bis rot/weiß (hohe Calciumkonzentration) darstellt.

## 2.8 Elektrophysiologische Charakterisierung an *Xenopus*-Oozyten

Zur Charakterisierung und Identifizierung möglicher Interaktionspartner des R-Typ-Anionenkanals ALMT12 wurde das heterologe Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyten gewählt. Dieses mittlerweile etablierte Expressionssystem zur Charakterisierung von Membranproteinen wurde erstmals von Gurden *et al.*, 1971, beschrieben. Durch das Einbringen von Fremd-cRNA kommt es zur Translation des entsprechenden Proteins und zum anschließenden Einbau in die Zellmembran.

### 2.8.1 IVT-PCR und verwendete Vektoren

Die für die *in vitro*-Transkription benötigten PCR-Fragmente wurden mit vektorspezifischen Primern aus den bereits vorhandenen pNB1u Vektoren (siehe Tabelle 3) gewonnen. Die jeweilige cDNA war bereits von Dennis Imes, Tobias Maierhofer und Dr. Kai Konrad in die benutzten Vektoren integriert worden. Die so gewonnenen Template-Fragmente enthielten die komplette cDNA-Sequenz des Zielgens sowie T7-Promotor und 3'- und 5'-UTRs. Zur Aufreinigung des IVT-PCR-Produktes wurde Qiagen PCR Purification-Kit verwendet.

**Tabelle 3: Verwendete Oozyten-Vektoren**

Vektor Nr.	Name	Beschreibung	cDNA-Insertion
#16	pNB1u	User-kompatibler Oozyten-Expressionsvektor	AtALMT12
#17	pNB1u N-term. YC	C-terminale Hälfte des YFP-User-Kassette	AtALMT12
#20	pNB1u C-term. YN	User-Kassette - N-terminale Hälfte des YFP	ATCPK2 ΔEF
			ATCPK6 ΔEF
			ATCPK17 ΔEF
			ATCPK20 ΔEF
			ATCPK34 ΔEF
			AtOST1

### 2.8.2 In vitro-Transkription (IVT)

Um die gewonnenen Template-Fragmente von cDNA in cRNA umzuschreiben, wurde das AmpliCap-Max™ T7 High Yield Message Maker-Kit (CellScript Inc.) verwendet (siehe Tabelle 4). Das Kit basiert auf der Verwendung der viralen T7-RNA-Polymerase, welche das unter der Kontrolle des T7-Promotors stehende Zielgen mit hoher Ausbeute transkribiert.

Tabelle 4: Reaktionsansatz in vitro-Transkription

cDNA-Template-Fragment	3 $\mu$ l
T7-Puffer	1 $\mu$ l
Dithiothreitol (DTT)	1 $\mu$ l
T7-Polymerase	1 $\mu$ l
Cap/NTP-Mix	4 $\mu$ l
RNAse-Inhibitor	0,25 $\mu$ l

Der Reaktionsansatz (10  $\mu$ l) wurde bei 37°C für 90 min inkubiert und die synthetisierte cRNA im Anschluss mit 20  $\mu$ l Ammoniumacetat für 30 min auf Eis gefällt. Das durch einen Zentrifugationsschritt (30 min, 4°C) gewonnene RNA-Pellet wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 4°C). Die gewaschene RNA wurde getrocknet und im Anschluss in 10  $\mu$ l RNAse freiem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration wurde mittels des Spektrophotometers Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) bestimmt.

### 2.8.3 cRNA-Injektion in *Xenopus*-Oozyten

Zur Injektion der cRNA wurden Glaskapillaren (Drummond #3-00-203-G/X, Drummond Scientific Company) durch einen Vertikalpuller (PC-10, Narashige) ausgezogen und die Spitze auf einen Durchmesser von 2  $\mu$ m abgebrochen. Die Injektion und die anschließende Inkubation erfolgte in ND96-Lösung (siehe Tabelle 5).

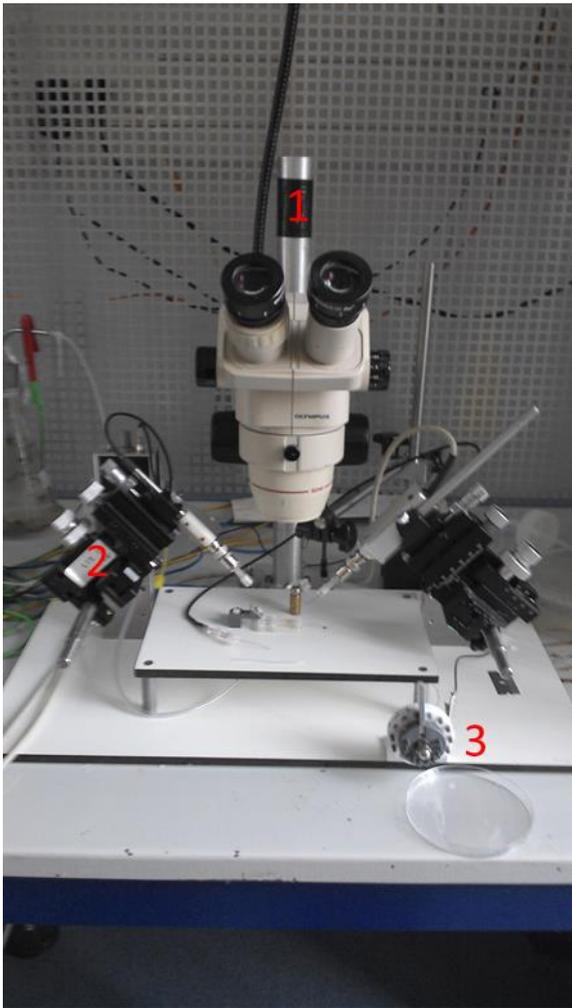
Mittels Nanoject II Auto Nanoliter Injector (Drummond) wurden in jede Oozyte 50,6 nl mit je 25 ng des R-Typ-Anionenkanals ALMT12 und 12,5 ng Kinase (CPK2, 6, 17, 20, 34 bzw. OST1) injiziert. Nach 2-3 Tagen bei 18°C war eine ausreichende Expression des Kanals erreicht und die Oozyten konnten elektrophysiologisch oder fluoreszenzmikroskopisch mittels BiFC-Analyse untersucht werden.

Tabelle 5: ND96-Lösung

NaCl	96 mM
KCl	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
Gentamycin	100 µg/ml
pH	7,4

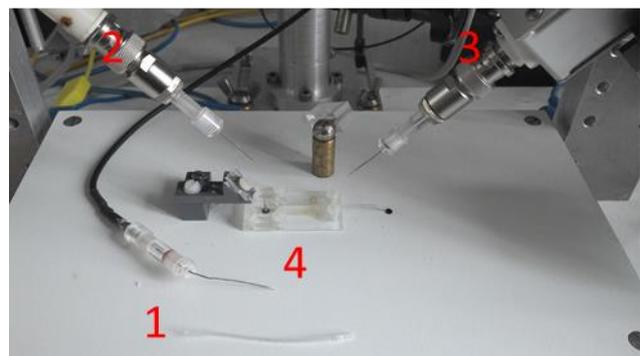
#### 2.8.4 Messaufbau des TEVC-Arbeitsplatzes für Oozytenmessungen

Das gesamte Oozyten-Einstichsetup befand sich, wie das TEVC-Setup auf einem schwingungsgedämpften Tisch, der mit einem faradayschen Käfig umgeben war. Der Messaufbau des Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Messplatzes für Oozyten unterschied sich prinzipiell nicht von dem bereits beschriebenen TEVC-Messplatz zum Einstich von Pollenschläuchen (siehe Abschnitt 2.6.1). Im Gegensatz zum Pollenschlauch-TEVC-Messplatz erfolgte der Einstich über zwei separate Elektroden mit Hilfe zweier Mikromanipulatoren (AIW WI213), die rechts und links neben der Messkammer angebracht waren. Bei dem verwendeten Differenzialverstärker handelte es sich um einen Turbo TEC 05X (NPI Electronics). Die Digitalisierung des Messsignals erfolgte über einen 16 Bit AD/DA-Wandler (RS-01R, NPI Electronics). Mit Hilfe eines an die Messkammer angeschlossenen Perfusionssystems konnten die Anionenkonzentrationen in der Badlösung variiert werden.



**Abbildung 12: Oozyten-Einstich-Messplatz**

Der Oozyten-Einstich-Messplatz setzt sich aus einem Binokular (1) mit zwei Mikromanipulatoren (AIW WI 213) (2), welche rechts und links von der durch ein Perfusionssystem (3) gespeisten Messkammer sitzen, zusammen.



**Abbildung 13: Oozyten-Messkammer und Elektroden**

Die Badelektrode (1) wird im linken äußeren Teil der Messkammer (4) angebracht, während Strom- (2) und Potzialektrode (3) über Mikromanipulatoren in die in der Messkammer liegende Oozyte eingeführt werden.

### 2.8.5 Messlösungen für elektrophysiologische Charakterisierung

Zur Charakterisierung des R-Typ-Anionenkanals ALMT12 wurden folgende Injektions- und Badlösungen (siehe Tabelle 6) verwendet. Die Osmolarität wurde mit D-Sorbitol auf 220 mosmol/kg eingestellt.

**Tabelle 6: Verwendete Injektions-/Messlösungen für die elektrophysiologische Charakterisierung von ALMT12**

Anionen Perfusionslösungen	25 mM Chlorid	25 mM Malat	25 mM Gluconat
MgGluc <sub>2</sub> (mM)	1	1	1
CaGluc <sub>2</sub> (mM)	1	1	1
LaCl <sub>3</sub> (mM)	1	1	1
Mes/Tris	10	10	10
pH	5,6	5,6	5,6
NaH Malat (mM)	0	25	0
NaCl (mM)	25	0	0
NaGluc (mM)	0	0	25
Osmolarität (mosmol/kg)	220	220	220

Anionen Injektionslösungen	Malat (mM)	NaCl (mM)	pH
200 mM Chlorid	0	200	7
200 mM Malat	200	0	

### 2.8.6 Elektrophysiologische Charakterisierung

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung der ALMT12-Ströme (aus #16 Vektor) wurde cRNA in Oozyten injiziert und die Stromantwort nach 2-3 Tagen durch Variation der Anionen im Keimungsmedium gemessen. Des Weiteren wurde wie in

Meyer *et al.*, 2010, beschrieben, die interne Anionenkonzentration durch Injektion von 50 nl der in Tabelle 6 aufgelisteten Injektionslösungen auf ca. 18 mM Cl<sup>-</sup> oder Malat angehoben um die Anionenselektivität des Kanals zu testen. Das verwendete Spannungspulsprotokoll entsprach dem in Abbildung 11 beschriebenen Spannungspulsprotokoll zur Ableitung von R-Typ-Anionenströmen mit folgenden Modifikationen. Der Vorpuls wurde auf 50 ms reduziert und der anschließende Spannungspuls von 400 ms auf 1000 ms verlängert.

Für die Aktivierung von ALMT12 durch Calcium-abhängige Kinasen (CPKs) wurde cRNA aus BiFC-Vektoren (ALMT12#17 + CPKΔEF#20 Vektor, siehe Tabelle 3) verwendet. Diese ermöglicht durch Komplementation der C-terminalen YFP-Hälfte und der N-terminalen YFP-Hälfte eine Interaktion von Kanal und Kinase mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation zu bestätigen und die Aktivierung des Kanals unter Variation der Anionenbedingungen im Keimungsmedium (25 mM Chlorid, 25 mM Malat und 25 mM Gluconat) zu charakterisieren.

### **2.8.7 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)**

Zur Bestätigung einer durch CPKs-vermittelten Kanalaktivierung wurden die mit ALMT12#17 + CPKΔEF#20 (siehe Tabelle 3) cRNA co-injizierten Oozyten von Dr. Kai Konrad mittels konfokalem Laser Scanning-Mikroskop auf ihre Fluoreszenzkomplementierung hin untersucht. Durch die verwendeten BiFC-Vektoren kommt es bei einer Interaktion zwischen Kanal und C-terminale Hälfte YFP (ALMT12#17) und Kinase und N-terminale Hälfte YFP (CPKΔEF#20) zur Komplementierung eines YFP-Proteins, dessen Fluoreszenz detektiert werden kann.

### **2.8.8 Auswertung**

Für die Auswertung der abgeleiteten Ströme wurden die Gleichgewichtsströme durch die Software Patch Master (HEKA Electronics) analysiert und mit Igor (Igor Pro 6.35A5, Wave Metrics) ausgewertet und grafisch dargestellt. Die Abweichungen der einzelnen Messungen wurden mittels Standard-Fehler angegeben.

## 2.9 Genotypisierung und quantitative Real-time-PCR

### 2.9.1 DNA-Isolierung für Genotypisierung

Die verwendeten Pflanzenlinien wurden regelmäßig auf genetische Kontaminationen getestet und gegebenenfalls neue saubere homozygote Pflanzen selektiert.

Zur DNA-Isolierung wurden ca. 5 x 5 mm Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gefroren und mit 5 Glaskugeln im Tissue Lyser II (Qiagen) zerkleinert. Im Anschluss wurde das Pflanzenmaterial mit 300 µl modifizierten Edwards Puffer (siehe Tabelle 7) gemischt. Die Proben wurden kurz anzentrifugiert und 2 µl des Überstandes als Template für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet.

**Tabelle 7: Zusammensetzung 50 ml modifizierter Edwards Puffer**

Tris HCl	20 mM
NaCl	25 mM
EDTA pH 8	2,5 mM
SDS	0.05 % v/v
TE Puffer	Auf 50 ml auffüllen
pH	7.5

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit dem Enzym Phusion cx (Bio Labs) durchgeführt (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9). Die Reaktion erfolgte in PCR-Cyclern (Mastercycler, Eppendorf) wobei die Elongationszeit der zu erwartenden Produktlänge angepasst wurde.

**Tabelle 8: Zusammensetzung PCR-Reaktionsmix**

H <sub>2</sub> O	12,5 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
dNTP's	0,4 µl
Phusion Enzym	0,2 µl
Phusion Puffer	4 µl

Das PCR-Produkt wurde je nach zu erwartender Größe auf einem 1-2%igen Agarosegel (Gel Green, Biotium) aufgetrennt und im Geldock (NTAS UV-System) fotografiert und ausgewertet.

**Tabelle 9: Genotypisierungsprimer**

Insertions- mutante	Forward Primer 5' → 3'	Reverse Primer 5' → 5'	T-DNA Primer
<i>SLAH3-1</i>	GGATAATGGTGG TCACGAGCAG	ACCCCATTTCCACC TTCGGTATG	CCCATTTGGACGTGA ATGTAGACAC
<i>SLAH3-2</i>	GTTGATCAACAA GAAGACGGC	AACCCTTTATTGCG ATGTTCC	ATTTTGCCGATTTCCG GAAC
ALMT12-1	GTTGTGCAAAGG GCTTAATAGAG	CTCCGGCTAATCTT ACACAAGG	TACGAATAAGAGCGT CCATTTTAGAGT
ALMT12-2	GTTGTGCAAAGG GCTTAATAGAG	CTCCGGCTAATCTT ACACAAGG	TACGAATAAGAGCGT CCATTTTAGAGT
ALMT13	TAATAAAGCGGA ATTGGAACG	GGCGGATTTAGAAT CCAAAAC	TTCATAACCAATCTCG ATACAC
ALMT14	TGAGGCCGAAA GTATAAAAAGC	TTGGAAACAGTGCT ATTTGGG	TGGTTCACGTAGTGG GCCATC
CPK2	TTGCGTTGGACC AAACATTTCTG	CTTTCTGCTTGGTT TCTTCTGCAAG	TGGTTCACGTAGTGG GCCATC
CPK20	GCTTGTGTCAGAGG AAGAAATAGCA	ACTCACCTTTAAAC CCATTTTG	TGGTTCACGTAGTGG GCCATC
CPK6	Genotypisiert von Roman Lassig (Arbeitsgruppe Tina Romeis, Institut für Biologie, Freie Universität Berlin)		

### 2.9.2 RNA-Isolierung aus *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen

*Arabidopsis thaliana*-Pollen wurden mittels Absaugvorrichtung (siehe Abschnitt 2.3.1) geerntet und mit der Gaze auf unterschiedlichen Keimungsmedien (1 % LMA) für 6 h inkubiert. Im Anschluss wurden die gekeimten Pollenschläuche durch Abziehen der Gaze vom Keimungsmedium isoliert und sofort in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser überführt und zerkleinert. Die zerkleinerten Pollenschläuche wurden mit 1 ml

TRIreagent (Sigma Aldrich) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch einen Zentrifugationsschritt (1 min bei 5000 g) wurden Zelltrümmer entfernt und der Überstand mit 200 µl Chloroform gemischt. Nach 3 min Inkubation wurde das Gemisch für 15 min bei 15000 g, bei 4°C zentrifugiert und der klare Überstand abgezogen. Die darin enthaltene RNA wurde mit 0,5 ml Isopropanol gefällt und erneut bei 12000 g, 4°C für 10 min zentrifugiert. Die gefällte RNA wurde mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 7500 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst.

### 2.9.3 cDNA-Synthese

Die gewonnene RNA wurde direkt für die cDNA-Synthese eingesetzt. Hierzu wurden ca. 1 µg RNA mit 0,4 µl Poly-T-Primern (100 µM), 0,5 µl dNTPs (10 mM), und 2,5 µl 5 x M\_MLV RT Puffer gemischt und für 2 min bei 72°C inkubiert und anschließend im Eisbad abgekühlt. Nun wurden 0,4 µl reverse Transkriptase zugegeben und für 90 min bei 42°C inkubiert. Die so gewonnene cDNA wurde für Transkriptionsanalysen mittels Real-time-PCR verwendet.

### 2.9.4 Quantitative Real-time-PCR

Die Quantifizierung der gewonnenen cDNA erfolgte mit SYBR Green (Abgene) mittels eines Realplex<sup>2</sup> (Eppendorf) Cyclers. Hierzu wurde die cDNA mit t-RNA-Wasser (1µg/µl) verdünnt (1:20) und 2 µl als Template eingesetzt (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10: Real-time-PCR Mastermix**

SYBR Green Enzym Mix	10 µl
Primer Mix	8 µl
Template	2 µl

Das Temperatur-Optimum (Schmelztemperatur  $T_m$ ) und die Selektivität der verwendeten Primer (siehe Tabelle 11) wurde durch den Temperaturgradienten PCR ermittelt und die

PCR-Produkte nach Auftrennung per Agarosegel auf mögliche Doppelbanden hin untersucht.

Zur Quantifizierung der getesteten Proben wurde für jedes Gen eine Standardreihe (10 fg -0,01 fg des PCR-Produkts) angelegt, welche zeitgleich mit der untersuchten Probe gemessen wurde. Als „housekeeping“-Gen wurde Aktin 2/8 verwendet und die gemessenen Transkripte auf 10000 Aktin-Moleküle normiert.

**Tabelle 11: Verwendete Real-time-Primer**

AGI-Code	Bezeichnung	Forward Primer 5'→3'	Reverse Primer 3'→5'	T <sub>m</sub> (°C)
<i>At1g12480</i>	SLAC1	CCGGGCTCTAGCACT CA	TCAGTGATGCGACTC TT	56
<i>At1g62280</i>	SLAH1	TGGCTTAATGCTTATC T	GGTATGGTTGACAAGTA	50
<i>At4g27970</i>	SLAH2	CCAGTGCGACGATCA AA	CCGTGGA ACTATCTACA	56
<i>At5g24030</i>	SLAH3	GGTCCTATGTGCCAT TG	ATCATTACTCTGACTGC	56
<i>At1g62262</i>	SLAH4	ATGTCGCTTCGGTCT TG	AGTAGTCTGTAGTTGGT	56
<i>At1g08430</i>	ALMT1	CTATACGAGAAGTCG GA	TGCCATTACTTAATGT	56
<i>At1g08440</i>	ALMT2	CCGTGGGTGCATTAC T	TTCGACTTAGACGGCT	56
<i>At1g18420</i>	ALMT3	CTAGGGTTAGGGATT TGAC	CTGTAACATACTTCCCG	56
<i>At1g25480</i>	ALMT4	AATGATTCTCAGCTAT GGA	GTGTCTCGCTAACTTGT	50
<i>At1g68600</i>	ALMT5	AAATGGGATCAGTAC CG	GTTTCAAATAACTAGCA CC	56
<i>At2g17470</i>	ALMT6	GATGAATCTCAGATAT GGG	TTGATCCACTACGTTAA G	56
<i>At2g27240</i>	ALMT7	CCTGTAAATCACTCA CC	CGTCTACATGCGTATCA	56

<i>At3g11680</i>	ALMT8	CACACATTGACA ACT CC	ACATGACATGAGCTATT	56
<i>At3g18440</i>	ALMT9	TCCAATCTACGCCTT CA	CCAAAACACCTACGAAT	50
<i>At4g00910</i>	ALMT10	GATTTCTGGTGTTT GA	GTTGTTTAGTGTTGTTG TC	50
<i>At4g17585</i>	ALMT11	GACGATAAGCGAGAA AGTAAT	AGTATGGCTGGTTAAGG AC	56
<i>At4g17970</i>	ALMT12	AGGAGGATGTTACGG C	GGTTTTCGCATCGGAC	50
<i>At5g46600</i>	ALMT13	GGCCACGTTTCATAT TAC	ACCTCCACAGTCTTATC	56
<i>At5g46610</i>	ALMT14	AGGAAATAGCGGTAG AC	CTCAGAATCTTTCTTTC GT	56
<i>At3g10660</i>	CPK2	GTACAGATTGACGGT G	GTCCGGGGTGATAAAG	56
<i>At2g17290</i>	CPK6	TGCTGGTGTAGGGAG AA	CCTCACAGCTACTGATG AA	56
<i>At5g12180</i>	CPK17	TTACATCGCACCTGA G	CCACTACTATCAGTATC C	56
<i>At2g38910</i>	CPK20	AGTCCTTATTATGTGG C	GTGATGTGTCCACTAT	56
<i>At5g19360</i>	CPK34	GCTAGGTCGTGGACA G	ATCGTCCGTAGTAACGA G	56
<i>At1g73020</i>	CaCl	CTTGTTAAACATCTG GC	CACAGCTACTATGCACA	56
<i>At5g49890</i>	CIC-c	AAGGTTGGGGTAATA TG	ACTTCTCAGAATTTGTG	50
<i>At5g26240</i>	CIC-d	TCAGGCACAGTTTTA GC	CCTATCACACGGGAAG	56
<i>At5g37500</i>	GORK	CCTCCTTTAATTTAGA AG	GCTCCATCCGATAG	56
<i>At2g25600</i>	SPIK (AKT6)	GCCAGTGCGGTTAC	GAICTCAATCGCTTGTA	52

<i>At3g02850</i>	SKOR	TGAAACGGCTTCTTA	GAGCCACTCGGAAAC	50
<i>At1g04710</i>	KAT1	ACTTCCGACACTGC	CCCAAATGACAATCTAA	52
<i>At2g33150</i>	KAT2	ATATTGATATGGGGT CA	ATCTATTTCTGCGTTTT	50
<i>At4g22200</i>	AKT3	AAAATGGCGAAAACA C	CGCTGCTTCACATAGAA	58
<i>At3g18780</i> <i>At1g49240</i>	Act2/8	GGTGATGGTGTGTCT	ACTGAGCACAATGTTAC	56

## 2.10 GUS-Färbung

Die GUS-Färbung wurde nach Jefferson *et al.*, 1987, mit prom SLAH3::GUS- (Negi *et al.*, 2008) und prom ALMT12::GUS-Linien (Meyer *et al.*, 2010) durchgeführt. Hierzu wurden Blüten über Nacht bei 37°C in GUS-Färbelösung (siehe Tabelle 12) eingelegt und am Folgetag mittels Aceton entfärbt.

**Tabelle 12: GUS-Färbelösung**

Natriumphosphatpuffer pH 7	100 mM
EDTA pH 8	0,1 mM
Kaliumferricyanid	5 mM
Kaliumferrocyanid	5 mM
Triton-X-100	1% v/v
X-Gluc	1 mg/ml

Zum Anfärben von Pollenschläuchen auf einem Keimungsmedium (1 % LMA) wurde der pH-Wert des Mediums auf pH 7 eingestellt, um eine hohe Enzymaktivität zu gewährleisten und 1 mg X-Gluc in das auf 40°C abgekühlte, noch flüssige LMA-Medium gegeben. Auf diesem Medium wurden die Pollen, wie in Abschnitt 2.3.1. beschrieben, für 5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die gekeimten Pollen wurden im Anschluss über

Nacht bei 37°C angefärbt. Die angefärbten Blüten und Pollenschläuche wurden mittels Binokular dokumentiert.

## 3 Ergebnisse

Da bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Anionenkanäle für den bereits erwähnten oszillierenden Chlorid-Efflux (Zonia *et al.*, 2001) identifiziert wurden, beschäftigt sich diese Arbeit mit der Identifizierung und Charakterisierung von Anionenkanälen in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen und deren Einfluss auf das polare Zellwachstum.

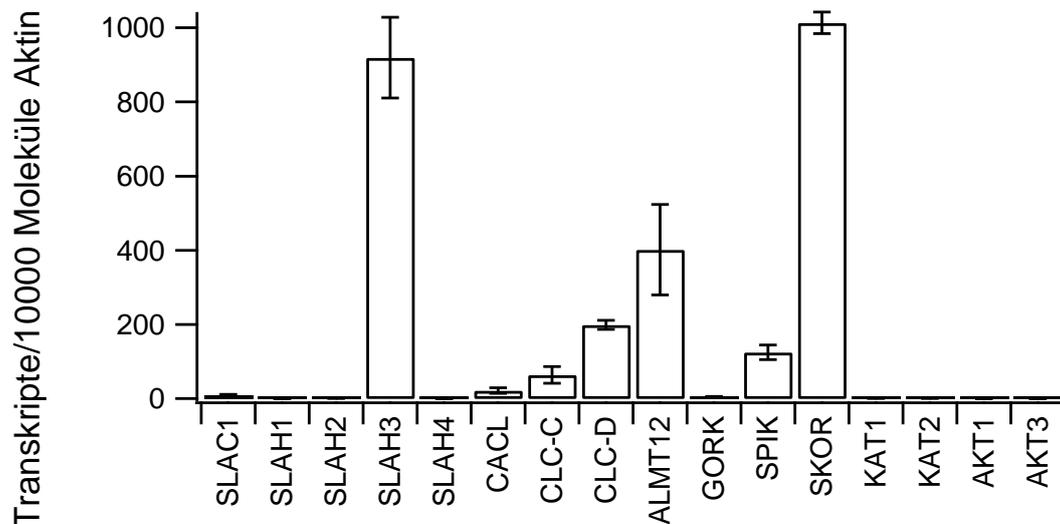
### 3.1 Transkriptionsanalyse und Screening nach Pollenschlauch-Anionenkanälen

Zur Identifizierung potenziell exprimierter Ionen-Kanäle in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen mittels quantitativer Real-time-PCR wurden die geernteten Pollen auf 3/7-Medium unter *in vitro*-Bedingungen ausgekeimt. Das Medium enthielt neben 7 mM Chlorid und 14 mM Nitrat, 1 mM Kalium und 10 mM Calcium. Nach 6 h Inkubationszeit wurde eine quantitative Analyse der relativen Transkripte der putativ exprimierten Anionen- und Kationenkanäle durchgeführt. Untersucht wurde die Expression von Vertretern der S-Typ-Anionenkanalfamilie (slow type), die erstmals in Patch-Clamp-Experimenten in *Vicia faba*-Schließzellprotoplasten elektrophysiologisch nachgewiesen wurden (Hedrich *et al.*, 1990; Schröder und Keller *et al.*, 1992). Die charakteristischen S-Typ-Ströme konnten erst im Jahre 2008 dem Anionenkanal SLAC1 zugeordnet werden (Negi *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurde die relative Transkription von SLAC1 und seiner vier Homologe (SLAH1-4) in Pollenschläuchen analysiert.

Als weiterer vielversprechender Kandidat für den Anionenefflux wurde der R-Typ (rapid type) Anionenkanal ALMT12 ausgewählt, da die Expression von ALMT12 bereits in Pollen mittels GUS-Färbung nachgewiesen worden war (Meyer *et al.*, 2010). Charakteristische R-Typ-Ströme sind seit Beginn der 90er Jahre elektrophysiologisch beschrieben worden und konnten ebenso wie S-Typ-Ströme in Schließzellprotoplasten von *Vicia faba* sowie in *Arabidopsis thaliana*-Schließzellen und Hypocotylzellen dokumentiert werden (Hedrich *et al.*, 1990; Schröder und Keller *et al.*, 1992; Hedrich und Marten *et al.*, 1993; Colcombet *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2010).

In der quantitativen Real-time-PCR-Analyse wurde ebenfalls die Expression des pflanzlichen Homologes von ANO1 (CaCl), einem Calcium-aktivierten Chloridkanal in Vertebraten untersucht, da in Tavares *et al.*, 2011, bereits Calcium-vermittelte Anionenströme in Lilienpollen-Protoplasten beschrieben wurden. Als Positivkontrolle dienten die ebenfalls in Pollen exprimierte Kaliumkanäle SPIK und SKOR (Mouline *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008) sowie die Anionentransporter CLC-c und CLC-d (Pina *et al.*, 2005). Die Kationenkanäle KAT1, KAT2 sowie AKT1 und AKT3 und GORK zeigten keine Expression in Pollenschläuchen (siehe Abbildung 14).

Von den untersuchten S-Typ-Anionenkanälen zeigt lediglich SLAH3 eine hohe Expressionsrate von 920/10000 Aktin-Transkripten (Abbildung 14). Auch die Expressionsrate des R-Typ-Anionenkanals ALMT12 bestätigt mit 402/10000 Aktin-Transkripten die in Meyers *et al.*, 2010, durchgeführte GUS-Färbung (Abbildung 14). Somit konnten der S-Typ-Anionenkanal SLAH3 und der R-Typ-Anionenkanal ALMT12 als potenzielle Kandidaten für den durch Zonia *et al.*, 2001, identifizierten Anionenefflux an der Pollenschlauchspitze identifiziert werden. Der putative Calcium-abhängige Chloridkanal CaCl zeigte mit 21,6 Transkripten/10000 Aktin nur eine geringe Transkription (Abbildung 14). Die als Positivkontrollen verwendeten, bereits publizierten Kaliumkanäle SPIK und SKOR (Mouline *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008) konnten mit 124,3 und 1013,4 Transkripten/10000 Aktin-Transkripten nachgewiesen werden. Da CLC-c in der Vakuole (Jossier *et al.*, 2010) und CLC-d im Trans-Golgi-Netzwerk (von der Fecht-Bartenbach *et al.*, 2007) lokalisiert sind, haben sie keinen direkten Einfluss auf den Anionenausstrom aus der Pollenschlauchspitze, sind aber mit 63,6 und 198,8 Transkripten/10000 Aktin Moleküle transkribiert.



**Abbildung 14: Transkriptionsanalyse von Anionen- und Kationenkanälen in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen nach 6 h Inkubation auf 3/7 Medium**

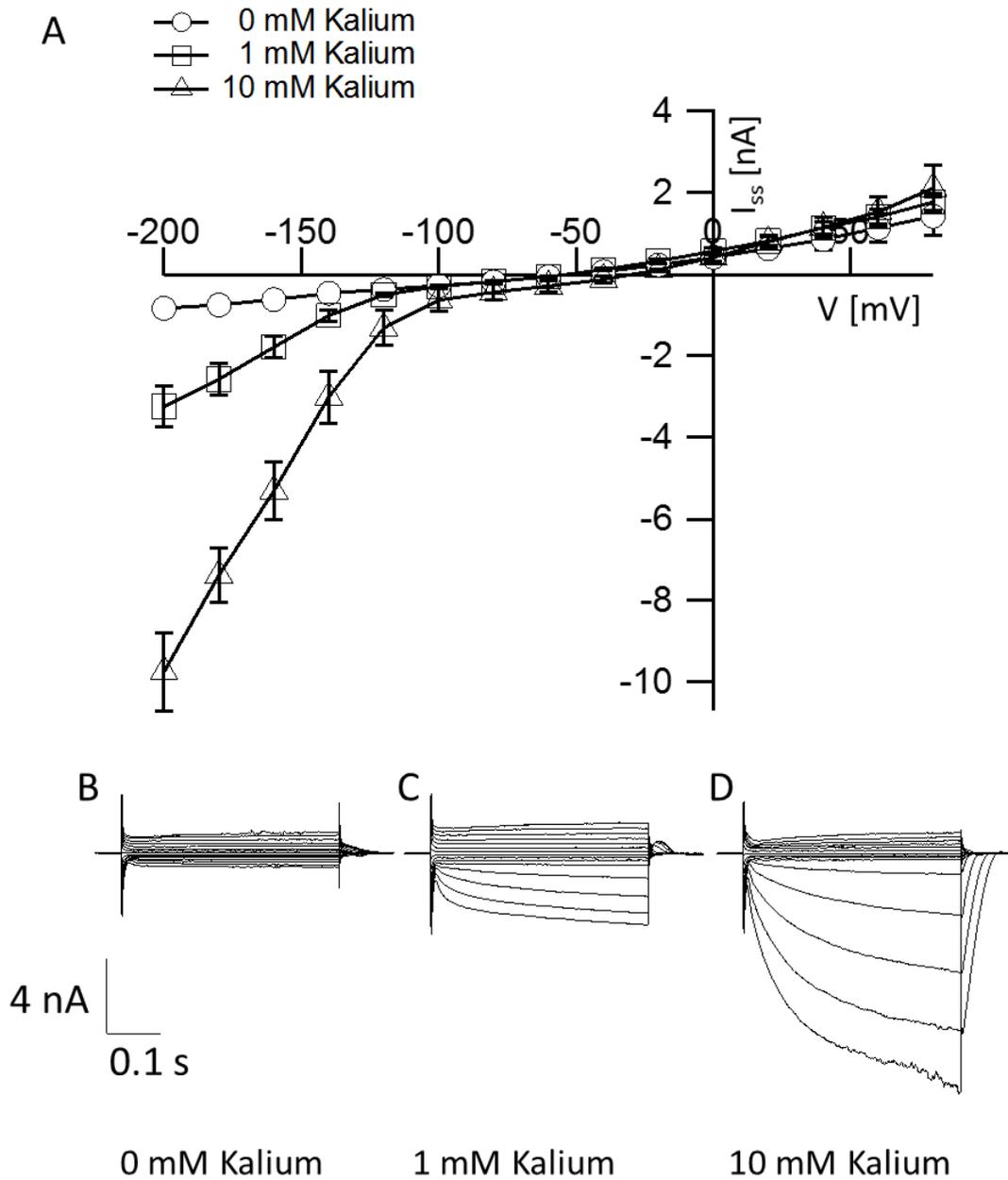
Die Transkriptionsanalyse erfolgte mittels quantitativer Real-time-PCR auf cDNA von 6 h inkubierten Col-0 Pollenschläuchen. Als Referenzen zu den getesteten Anionen- und Kationenkanälen-Expressionsraten wurde Aktin verwendet und die Transkripte auf 10000 Aktinmoleküle standardisiert (n = 5).

### 3.2 Identifizierung von Anionenströmen mittels TEVC-Technik

Während bei der Patch-Clamp-Technik eine Manipulation der Ionenkonzentrationen im Zytoplasma und im extrazellulären Medium möglich ist, bleibt die zytoplasmatische Ionenkonzentration bei Verwendung der TEVC-Technik weitestgehend unbeeinflusst. Aus diesem Grund mussten Medienkonditionen gefunden werden, die eine möglichst selektive Ableitung von Anionenströmen in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen gewährleisten und ein Pollenschlauchwachstum zulassen. Um die Abhängigkeit der Ganzzell-Ströme von der Kaliumkonzentration im Keimungsmedium zu ermitteln, wurden während der Ganzzell-Strommessungen steigende Kaliumkonzentrationen perfundiert und das in Abbildung 10 beschriebene Spannungspulsprotokoll für die Ableitung von S-Typ-Strömen verwendet.

Vergleicht man die resultierenden Ströme von Pollenschläuchen auf einem Kalium-freien Keimungsmedium (0 mM Kalium) mit den Strömen bei 1 mM und 10 mM Kalium im Medium, ist bei steigender Kaliumkonzentration eine Zunahme der Ströme ab ca. -120 mV im negativen Spannungsbereich zu erkennen (Abbildung 15). Diese

spannungs- und zeitabhängige Aktivierungskinetik der Einwärtsströme (Abbildung 15 C und D) wurde bereits im heterologen Expressionssystem der COS-Zellen (Mouline *et al.*, 2002), dem Kalium-Einwärtsgleichrichter SPIK zugeordnet. Dies deutet auf einen SPIK-vermittelten KaliumEinstrom in der Zelle hin. Die Einwärtsströme ohne Kalium im Keimungsmedium (Abbildung 15 B) betragen -0,83 nA bei -200 mV. Bei einer Konzentrationssteigerung von 1 mM Kalium (Abbildung 15 C) im Keimungsmedium kommt es zu einem Anstieg auf -3,24 nA und bei 10 mM Kalium (Abbildung 15 D) zu einem Anstieg von -9,75 nA bei -200 mV (n=3).

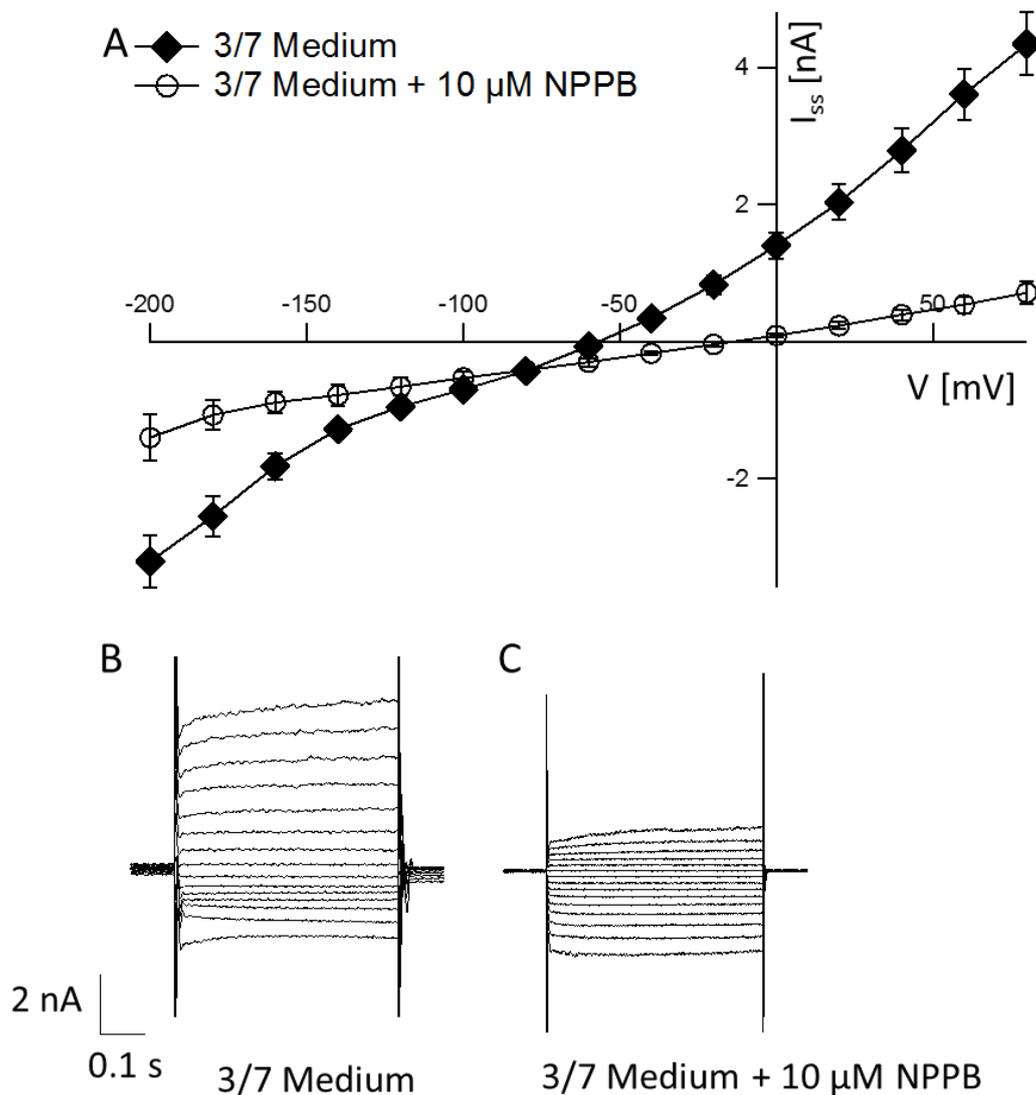


**Abbildung 15: Kaliumströme in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen**

Kaliumströme wurden mittels TEVC-Technik, unter variierenden Kaliumkonzentrationen im Keimungsmedium, von auf *in vitro* gekeimten Pollenschläuchen abgeleitet. Die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  wurden gegen die applizierte Membranspannung von -200 mV bis +80 mV ( $\Delta 20$  mV) aufgetragen, wobei die Haltespannung dem Membranpotenzial der Zelle angepasst wurde (A). Die Ionenzusammensetzung des Keimungsmediums betrug 1 mM Calcium und 2 mM Chlorid bei pH 6,5. Durch Variation der Kaliumkonzentration ausgehend von 0 mM Kalium im Keimungsmedium (B) wurden die Kaliumkonzentration auf 1 mM (C) und 10 mM (D) erhöht und die Ganzzellströme in Col-0 Pollenschläuchen ( $n = 3$ ) gemessen.

### 3.2.1 Einfluss des Anionenkanal-Inhibitors NPPB und Niflumsäure auf *Arabidopsis thaliana*-Ganzzellströme

Bereits in Zonia *et al.*, 2002, und Matveyeva *et al.*, 2003, konnte gezeigt werden, dass die Applikation von NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid) und Niflumsäure zu einer Inhibierung des polaren Zellwachstums und der Keimungsrate in *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen führt. Weiterhin konnte eine Reduktion von Anionenströmen durch NPPB in Patch-Clamp-Messungen an Lilium-Pollenprotoplasten aufgezeigt werden (Tavares *et al.*, 2011). Abbildung 16 zeigt den Einfluss von 10  $\mu$ M NPPB auf die Ganzzellströme von Col-0-Pollenschläuchen im 3/7-Medium. Durch die Perfusion mit 10  $\mu$ M NPPB kommt es im 3/7-Medium zu einem Rückgang der Stromamplitude von 55,25 % bei -200 mV und 83,65 % bei +80 mV (n=4).

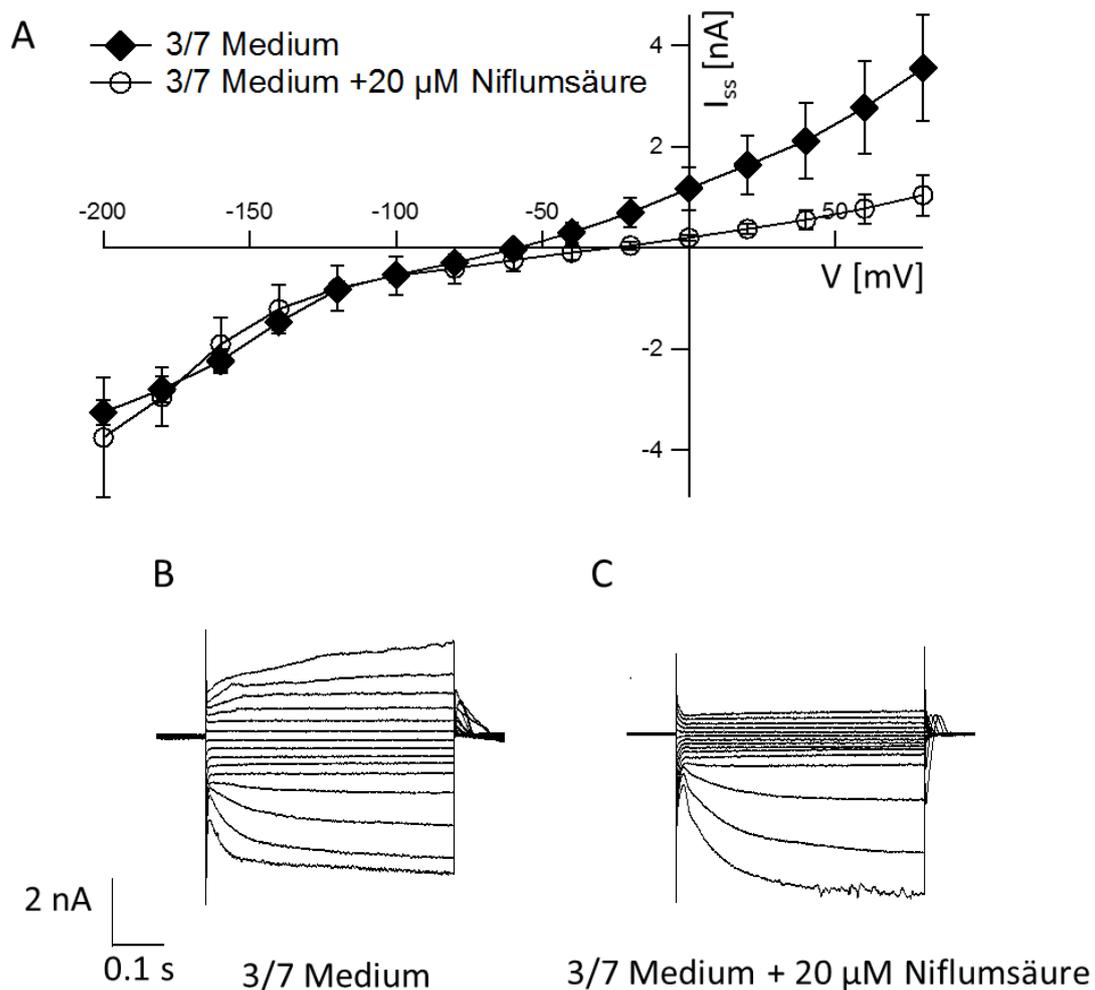


**Abbildung 16: Einfluss des Anionenkanal-Inhibitors NPPB auf die Ganzellströme von Col-0-Pollenschläuchen**

Dargestellt sind die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  von Pollenschläuchen im 3/7-Medium vor und nach der Applikation von 10  $\mu\text{M}$  NPPB ( $n=4$ ). Zur Ableitung der Ströme wurde die TEVC-Technik angewendet (A). Die Gleichgewichtsströme wurden gegen die applizierte Membranspannung von -200 mV bis +80 mV ( $\Delta 20$  mV) aufgetragen, wobei die Haltespannung dem Membranpotenzial der Zelle angepasst wurde (A). Gezeigt sind die makroskopischen Ganzellströme von Col-0-Pollenschläuchen vor (B) und nach der Perfusion mit 10  $\mu\text{M}$  NPPB (C).

Im Vergleich zu NPPB führt die Applikation von Niflumsäure (Abbildung 17) nur zu einer Reduktion der Auswärtsströme um 70,6 % bei +80 mV. Die charakteristischen Kaliumeinwärtsströme im Spannungsbereich von -200 mV bis -120 mV bleiben unverändert ( $n=4$ ) (Abbildung 17 B und C). Die nach der Inhibierung mit 20  $\mu\text{M}$  Niflumsäure gemessenen Gleichgewichtsströme entsprechen in etwa denen in Abbildung 15 A und C gezeigten Gleichgewichtsströmen im 1 mM Kalium-Medium.

Niflumsäure ist im Vergleich zu NPPB der selektivere Anionenkanal-Inhibitor in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen, da es keine Auswirkungen auf die langsam aktivierenden Kaliumströme im Spannungsbereich von -120 bis -200 mV (Abbildung 17 C) hat, während NPPB diese ebenfalls erniedrigt (Abbildung 16 C).



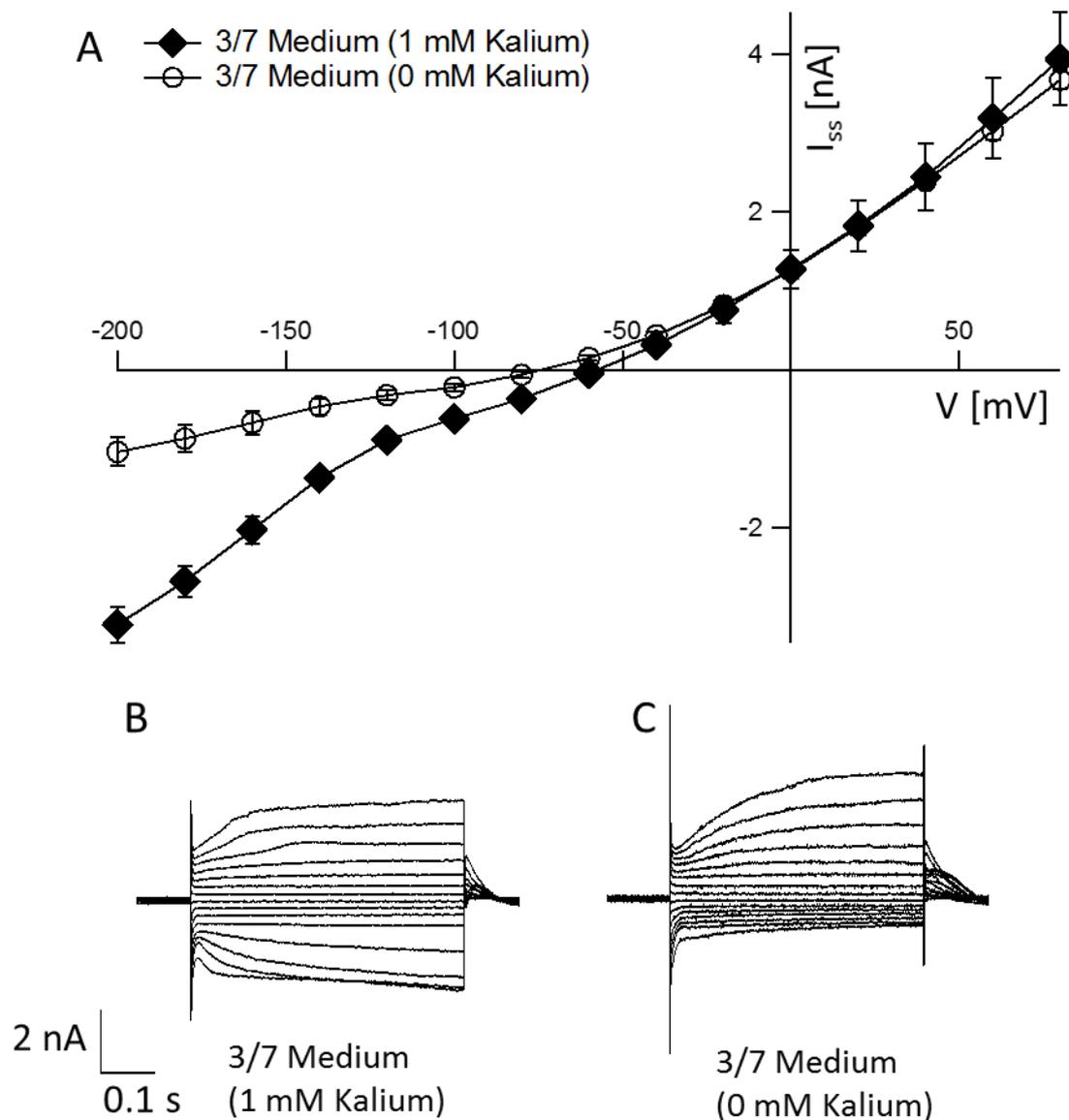
**Abbildung 17: Einfluss des Anionenkanal-Inhibitors Niflumsäure auf die Ganzzellströme von Col-0-Pollenschläuchen**

Dargestellt sind die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  im 3/7-Medium vor und nach der Applikation von 20 µM Niflumsäure ( $n=4$ ). Zur Ableitung der Ströme wurde die TEVC-Technik angewendet (A). Die Gleichgewichtsströme wurden gegen die applizierte Membranspannung von -200 mV bis +80 mV ( $\Delta 20$  mV) aufgetragen, wobei die Haltespannung dem Membranpotenzial der Zelle angepasst wurde. Gezeigt sind die makroskopischen Ganzzellströme von Col-0-Pollenschläuchen vor (B) und nach (C) der Perfusion mit Niflumsäure.

### 3.2.2 Optimierung des *in vitro*-Keimungsmediums zur selektiven Analyse von Anionenströmen mittels der TEVC-Technik

Die in Abschnitt 3.2, 3.2.1 und 3.2.2 durchgeführten Experimente zeigten, dass schon geringe Mengen von Kalium (1 mM) im Keimungsmedium zu Kaliumströmen führten (Abbildung 15), die den Efflux von Anionen aus dem Zytoplasma überlagern kann. Durch die Verwendung eines Kalium-freien 3/7-Mediums konnten nun selektiv die Ganzzell-Anionenströme ohne eine Überlagerung durch Kaliumströme abgeleitet werden (Abbildung 18 A). Durch die Abwesenheit der Kaliumströme wird nun die für S-Typ-Anionenkanäle charakteristische langsame Deaktivierung (Schröder und Keller *et al.*, 1992; Geiger *et al.*, 2009) bei hyperpolarisierenden Spannungspulsen sichtbar (Abbildung 18 C). Wie aus Abbildung 18 ersichtlich wird, bleiben die langsam aktivierenden Einwärtsströme, welche ab einer negativen Spannung von ca. -120 mV in Anwesenheit von Kalium aufgezeichnet werden konnten (Abbildung 18 B), im Kalium-freien Medium aus (Abbildung 18 C) und die vorher überlagerten Anionenströme werden sichtbar.

Durch das Kalium-freie 3/7-Medium kommt es zu einer 67,8%igen Reduzierung der Einwärtsströme (2,19 nA) (n=8) (Abbildung 18 A). Diese korreliert mit der in Abbildung 15 A (Kaliumreihe) gemessenen Zunahme der Einwärtsströme von 2,41 nA bei der Erhöhung der Kaliumkonzentration im Keimungsmedium von 0 mM auf 1 mM (Abbildung 15 A).



**Abbildung 18: Einfluss von Kalium auf die Ganzzellströme in Col-0-Pollenschläuchen**

Gemessen wurden Ganzzellströme (A) von Col-0-Pollenschläuchen mittels TEVC-Technik in 3/7-Medium in An- und Abwesenheit von 1 mM Kalium (n=8).

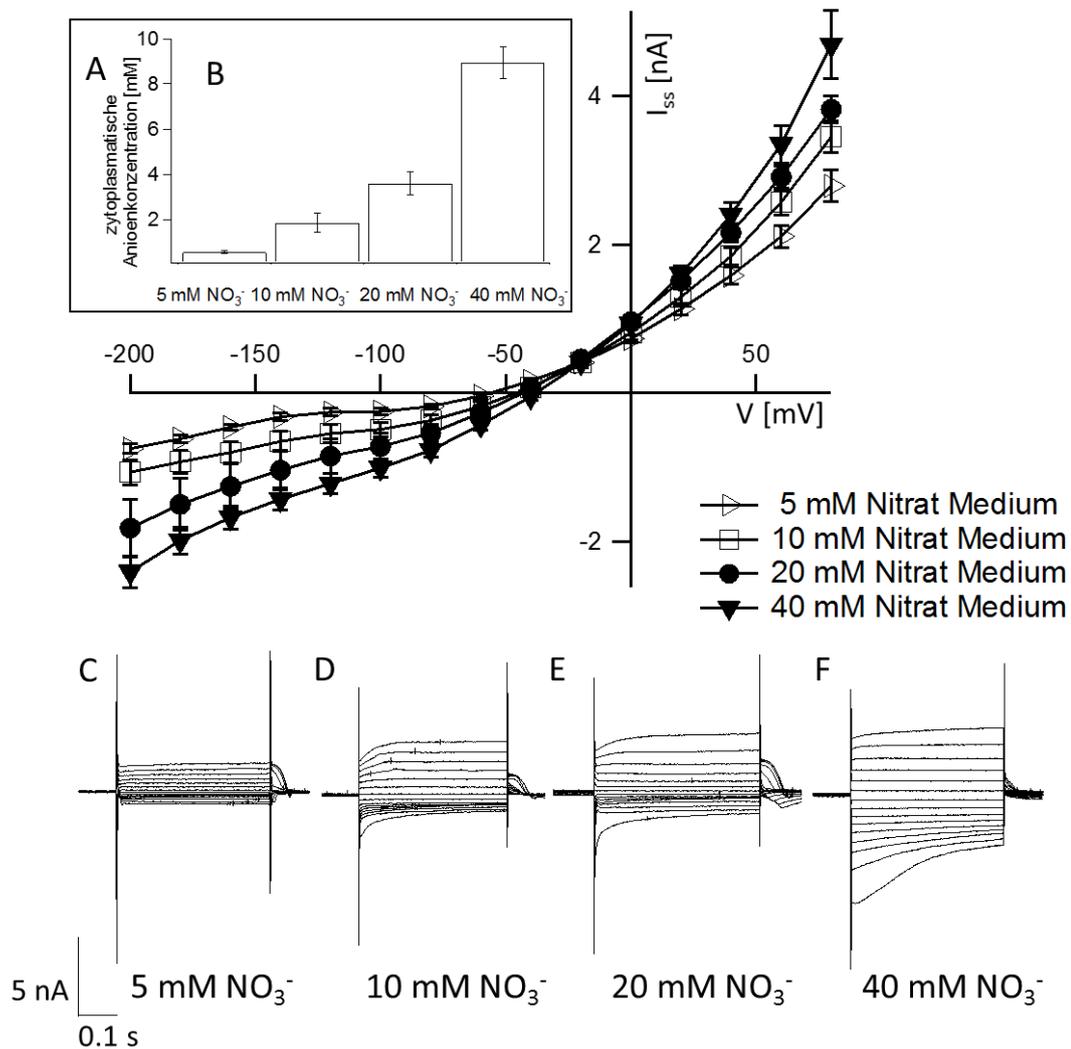
Dargestellt sind die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  gegen die angelegte Membranspannung von -200 mV bis +80 mV ( $\Delta 20$  mV). Die Haltespannung wurde dem Membranpotenzial der Zelle angepasst. Gezeigt sind die makroskopischen Ganzzellströme von Col-0-Pollenschläuchen in Anwesenheit 3/7 von 1 mM Kalium (B) und in Abwesenheit von Kalium (C).

Abbildung 18 C zeigt die charakteristischen S-Typ-Anionenkanalströme im negativen Spannungsbereich. Diese zeichnen sich durch eine langsame Deaktivierungskinetik und die spannungsabhängige Abnahme der Kanalaktivität aus. Die langsame Deaktivierungskinetik gleicht der in Geiger *et al.*, 2011, beschriebenen Deaktivierungskinetik in SLAH3-exprimierenden *Xenopus laevis* Oozyten. Aufgrund der hohen Transkription des S-Typ-Anionenkanals SLAH3 in

*Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen (Abbildung 14) schien eine Beteiligung von SLAH3 an den gemessenen Anionenströmen wahrscheinlich.

### 3.2.3 Analyse der Ganzzellströme bei unterschiedlichen Nitratkonzentrationen

Da SLAH3 eine ca. 20-mal höhere Permeabilität von Nitrat gegenüber Chlorid aufweist (Geiger *et al.*, 2011), wurde zur besseren Auflösung der SLAH3-vermittelten Anionenströme in Pollenschläuchen ein rein auf Nitrat basierendes Kalium-freies Medium gewählt. Unter Variation des Nitratgehaltes (5 mM, 10 mM, 20 mM und 40 mM  $\text{NO}_3^-$ ) des Keimungsmediums wurden erneut die Ganzzellströme nach dem in Abbildung 10 beschriebenen Spannungspulsprotokoll gemessen. Mit steigender Nitratkonzentration kommt es zur Zunahme der Ein- und Auswärtsströme. Die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  steigen bei -200 mV von -0,7 nA bei 5 mM  $\text{NO}_3^-$ , 1,07 nA bei 10 mM, 1,82 nA bei 20 mM und auf 2,41 nA bei 40 mM  $\text{NO}_3^-$  an ( $n = 10$  für 5 mM  $\text{NO}_3^-$ ,  $n = 10$  für 10 mM  $\text{NO}_3^-$ ,  $n = 8$  für 20 mM  $\text{NO}_3^-$ ,  $n = 10$  für 40 mM  $\text{NO}_3^-$ ) (Abbildung 19 A). Des Weiteren kommt es zu einer verstärkten Ausprägung der charakteristischen langsamen S-Typ-Deaktivierung bei Hyperpolarisationspulsen. Die S-Typ-Deaktivierungskinetik wird ab einer Nitratkonzentration von 10 mM (Abbildung 19 D) im Keimungsmedium sichtbar. Ein weiterer Anstieg der Nitratkonzentrationen von 20 mM und 40 mM im Medium führt zu einer weiteren Zunahme der charakteristischen S-Typ-Ströme, was in Abbildung 19 E und F deutlich wird. Durch Auftragen der Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  gegen die Spannung wurde das Umkehrpotenzial ermittelt und mit Hilfe der Nernst-Gleichung die intrazelluläre Anionenkonzentration berechnet. Mit steigender Medium-Nitratkonzentration kommt es zu einer Verschiebung des Umkehrpotenzials (Abbildung 19 A) und einer Steigerung der zytoplasmatischen Anionenkonzentration (Abbildung 19 B). So steigt die zytoplasmatische Anionenkonzentration von 0,58 mM bei 5 mM Nitrat im Keimungsmedium auf 1,87 mM bei 10 mM Nitrat, 3,61 mM bei 20 mM Nitrat und weiter auf 8,93 mM bei 40 mM Nitrat an.



**Abbildung 19: Ganzzellstromableitungen der Anionenströme in Col-0-Pollenschläuchen bei unterschiedlichen Nitratkonzentrationen im Keimungsmedium**

Gemessen wurden Ganzzellströme (A) von Col-0-Pollenschläuchen mittels TEVC-Technik unter Variation der Nitratkonzentration im Keimungsmedium ( $n = 10$  für 5 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>,  $n = 10$  für 10 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>,  $n = 8$  für 20 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>,  $n = 10$  für 40 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  wurden gegen die applizierte Membranspannung von -200 mV bis +80 mV ( $\Delta 20$  mV) aufgetragen, wobei die Haltespannung dem Membranpotenzial der Zelle angepasst wurde. Weiterhin wurden die intrazellulären Anionenkonzentrationen mittels Nernst-Gleichung und den gemessenen Umkehrpotenzialen berechnet und gegen die Anionenkonzentration im Keimungsmedium aufgetragen (B). Mit steigender Medium-Anionenkonzentration kam es zu einer Zunahme der makroskopischen Ganzzellströme. Während bei 5 mM Nitrat im Keimungsmedium noch keine charakteristischen S-Typ-Auswärtsströme vorhanden sind (C), werden diese ab 10 mM Nitrat im Keimungsmedium sichtbar (D) und nehmen konzentrationsabhängig mit zunehmender extrazellulärer Nitratkonzentration von 20 mM und 40 mM (E und F) zu.

Die in diesem Experiment gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass das Kalium-freie Medium mit 40 mM Nitrat zur elektrophysiologischen Charakterisierung der langsam deaktivierenden S-Typ-Kinetik des SLAH3 Anionenkanals geeignet und eine ausreichende Auflösung der Anionenströme gewährleistet ist.

### 3.3 Transkriptionsanalyse bei unterschiedlichen Anionenkonzentrationen im Wachstumsmedium

Aufgrund der Aktivierung von SLAH3 in Anwesenheit von extrazellulärem Nitrat und der 20-fach höheren Leitfähigkeit von Nitrat gegenüber Chlorid (Geiger *et al.*, 2011) sowie der gemessenen 35,2%igen Stromreduktion der Auswärtsströme (Abbildung 22 D) wurde eine Transkriptionsanalyse auf unterschiedlichen Anionenmedien mittels quantitativer Real-time-PCR (Abschnitt 2.9) durchgeführt. Da bereits die Aktivierung von SLAH3 durch Calcium-abhängige Kinasen in Geiger *et al.*, 2011, und Scherzer *et al.*, 2012, beschrieben worden war, wurden zusätzlich zu den SLAC1-Homologen mehrere in Pollenschläuchen exprimierte CPKs auf ihre relative Transkriptionsmenge mit 40 mM Nitrat-, 40 mM Chlorid- und einem Minimalmedium (1 mM Nitrat und 1 mM Chlorid) analysiert (Abbildung 20). Die Transkriptionsanalyse (Abbildung 20 A) zeigt, dass von allen Mitgliedern der S-Typ-Anionenkanalfamilie ausschließlich SLAH3 eine nennenswerte Transkription unter allen drei Keimungsmedien besitzt. Die Expression von SLAH3 wird abhängig von der Anionenkomposition des Keimungsmediums reguliert, wobei sowohl die Konzentration, als auch die Art der vorhandenen Anionen einen Einfluss zu haben scheint. Wie bereits oben erwähnt ist die Permeabilität von SLAH3 gegenüber Nitrat 20-fach höher gegenüber Chlorid. Im Nitratmedium (40 mM Nitrat) zeigt SLAH3 eine niedrigere Transkription von 2290 Transkripten, im Vergleich zu 4903 Transkripten in dem auf 40 mM Chlorid basierenden Mediums, obwohl die Konzentration der vorhandenen Anionen im Keimungsmedium gleich ist. Auch der Anstieg der Anionenkonzentration von 2 mM auf 40 mM im Keimungsmedium (Anionenkonzentration 2 mM Anionen Minimalmedium je 1mM Chlorid/Nitrat zu 40 mM Anionen Chlorid oder Nitrat) führt zu einer Steigerung der Transkription von SLAH3 von 1304 (Minimalmedium) auf 4903 (Chlorid) und 2290 (Nitrat).

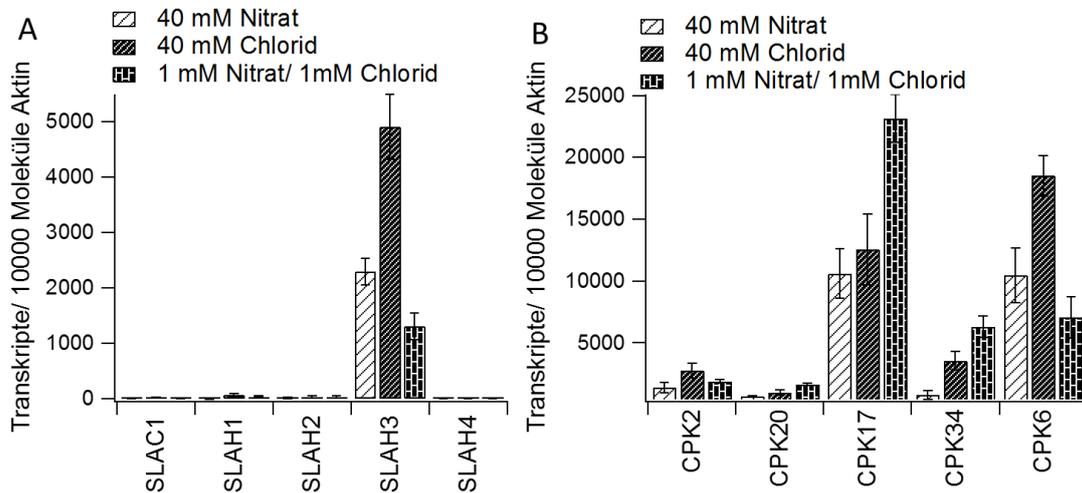
Der bereits erwähnte Calciumgradient (Holdaway-Clarke *et al.*, 1997) (Abschnitt 1.5.3) sowie der Anionenausstrom (Zonia *et al.*, 2002) in der Pollenschlauchspitze könnte eine Aktivierung des Anionenkanals SLAH3 durch Calcium-abhängige Kinase nahe legen. Eine Aktivierung von SLAH3 durch Calcium-abhängige Kinasen wie CPK3, CPK6, CPK21 und CPK23 wurde bereits im heterologen Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyten nachgewiesen (Geiger *et al.*, 2010, 2011; Scherzer *et al.*, 2012).

Um diejenigen CPKs einzugrenzen, die eine SLAH3-Aktivierung an der Pollenschlauchspitze vermitteln könnten, wurde durch die Analysen bioinformatischer

Datenbanken (Geninvestigator) die Expression von 12 der 34 in *Arabidopsis thaliana* exprimierten CPKs in Pollen belegt. Sämtliche Pollenschlauch-exprimierten CPKs sowie SLAH3 wurden transient als YFP-Fusionsproteine in Tabakpollen exprimiert und die subzelluläre Lokalisation im Pollenschlauch analysiert. Für CPK2 und CPK20 sowie CPK17 und CPK34 konnte eine subzelluläre Lokalisation ausschließlich an der Plasmamembran der apikalen Region sowie eine ubiquitäre Lokalisation in der Plasmamembran für CPK6 gezeigt werden (Gutermuth *et al.*, 2013; Durchführung und Ergebnisse von Dr. Kai Konrad). Die essentielle Bedeutung von CPK's an der Regulation des Pollenschlauchwachstums wurde von Myers *et al.*, 2009, durch die Deletion der spitzenlokalisierten Calcium-abhängigen Kinasen CPK17 und CPK34 verdeutlicht. Der Verlust von CPK17 und CPK34 führt zu einer 350-fachen Verringerung der Transmissionsrate in *Arabidopsis*-Pollenschläuchen, wobei der genaue Einfluss beider Kinasen auf die Ionenströme oder Zytoskelett-Organisation nicht bekannt ist (Myers *et al.*, 2009). Weiterhin konnte eine Proteininteraktion von CPK2 und CPK20 mit SLAH3, nicht aber mit CPK17 und CPK34, mittels FRET-FLIM (Durchführung und Ergebnisse von Dr. Kai Konrad) nachgewiesen werden. Mit Hilfe des heterologen Expressionssystems der *Xenopus*-Oozyten konnte die Aktivierung von SLAH3 mittels Phosphorylierung durch CPK2 und CPK20 und deren Interaktion mit SLAH3 durch bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) (Gutermuth *et al.*, 2013; Durchführung und Ergebnisse von Dr. Tobias Maierhofer) bestätigt werden.

Die quantitative Transkriptionsanalyse der im Pollenschlauch exprimierten CPKs (Abbildung 20 B) zeigt, dass CPK6 eine ähnliche anionenabhängige Regulation der Transkription besitzt wie SLAH3. Pollenschläuche die auf 40 mM Chlorid gewachsen waren, zeigten im Vergleich zum 40 mM Nitratmedium beinahe eine Verdopplung der CPK6-Transkription von 10.464 auf 18.507 Transkripten. Ebenso zeigt sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Transkription von 7079 auf Minimalmedium (1 mM Nitrat/1 mM Chlorid) auf 10.464 und 18.507 zu 40 mM Nitrat oder Chlorid. Die beiden spitzenlokalisierten CPKs, CPK2 und CPK20, zeigen insgesamt eine niedrigere Expression und kein anionenabhängiges Transkriptionsmuster im Vergleich zu CPK6. Die Transkription von CPK2 betrug 2778 Transkripte auf 40 mM Chlorid, 1403 Transkripte auf 40 mM Nitrat und 1895 Transkripte auf dem Minimalmedium mit je 1 mM Chlorid/Nitrat. Die Transkription von CPK20 betrug 1002 Transkripte auf 40 mM Chlorid, 646 Transkripte auf 40 mM Nitrat und 1645 Transkripte auf dem Minimalmedium mit je 1 mM Chlorid/Nitrat. CPK17 und 34 zeigen eine Steigerung der Transkription bei niedrigen Anionenkonzentrationen im Keimungsmedium von 23121 und

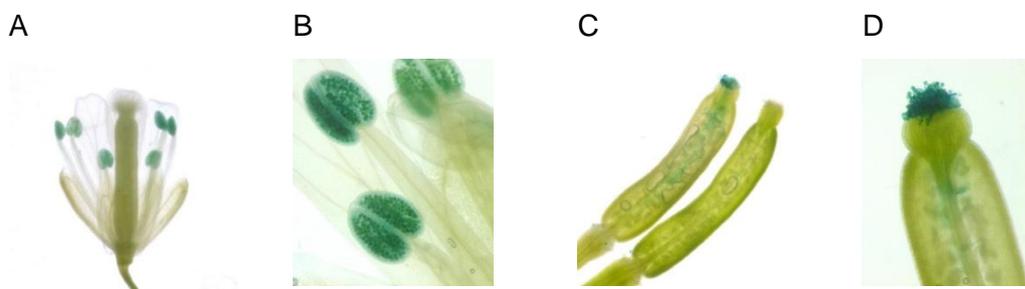
6316 Transkripten (Minimalmedium mit je 1 mM Chlorid/Nitrat) im Vergleich zu 12557 und 3561 Transkripten bei 40 mM Chlorid oder 10.586 und 786 bei 40 mM Nitrat.



**Abbildung 20: Transkriptionsanalyse auf unterschiedlichen Anionenmedien**

Gezeigt wird die Transkriptionsanalyse von Anionenkanälen der S-Typ-Anionenkanalfamilie und Calcium-abhängigen Kinasen in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen. Die Inkubation erfolgte auf 40 mM Nitrat, 40 mM Chlorid und je 1 mM Nitrat und 1 mM Chloridmedium. Die Transkriptionsanalyse wurde mittels quantitativer Real-time-PCR auf cDNA von 6 h inkubierten Col-0-Pollenschläuchen durchgeführt. Als Referenzen zu den getesteten Anionen- und Kationenkanal-Expressionsraten wurde Aktin verwendet und die Transkription auf 10000 Aktinmoleküle standardisiert. Abbildung 20 A stellt die transkriptionelle Regulation von SLAC1 und Homologen und Abbildung 20 B Calcium-abhängigen Kinasen in Col-0-Pollenschläuchen unter verschiedenen Anionenkonzentrationen im Keimungsmedium (n=5) dar.

Die Expression von SLAH3 in *Arabidopsis thaliana*-Pollenkörnern und -Pollenschläuchen konnte mittels einer prom SLAH3:GUS-Linie, *in vivo* im Transmissionsgewebe bestätigt werden.



**Abbildung 21: GUS-Färbung von prom SLAH3::GUS Reportergergen Linie**

Die GUS-Färbung zeigt, dass sich die Promotoraktivität von prom SLAH3 und die daraus resultierende Expression von  $\beta$ -Glucuronidase in der gesamten Blüte auf die Pollenkörner beschränkt (A und B). Weiterhin wird die Promotoraktivität in Pollenschläuchen beim Einwachsen in das Stigma und Durchwachsen des Transmissionsgewebes gezeigt (C und D).

Die GUS-Färbung (Abbildung 21) zeigt sowohl eine Expression von SLAH3 in den Pollenkörnern der Antheren als auch nach dem Auskeimen der Pollenschläuche auf dem Stigma und bei dem Durchwachsen des Transmissionsgewebes präparierter Col-0-Blüten.

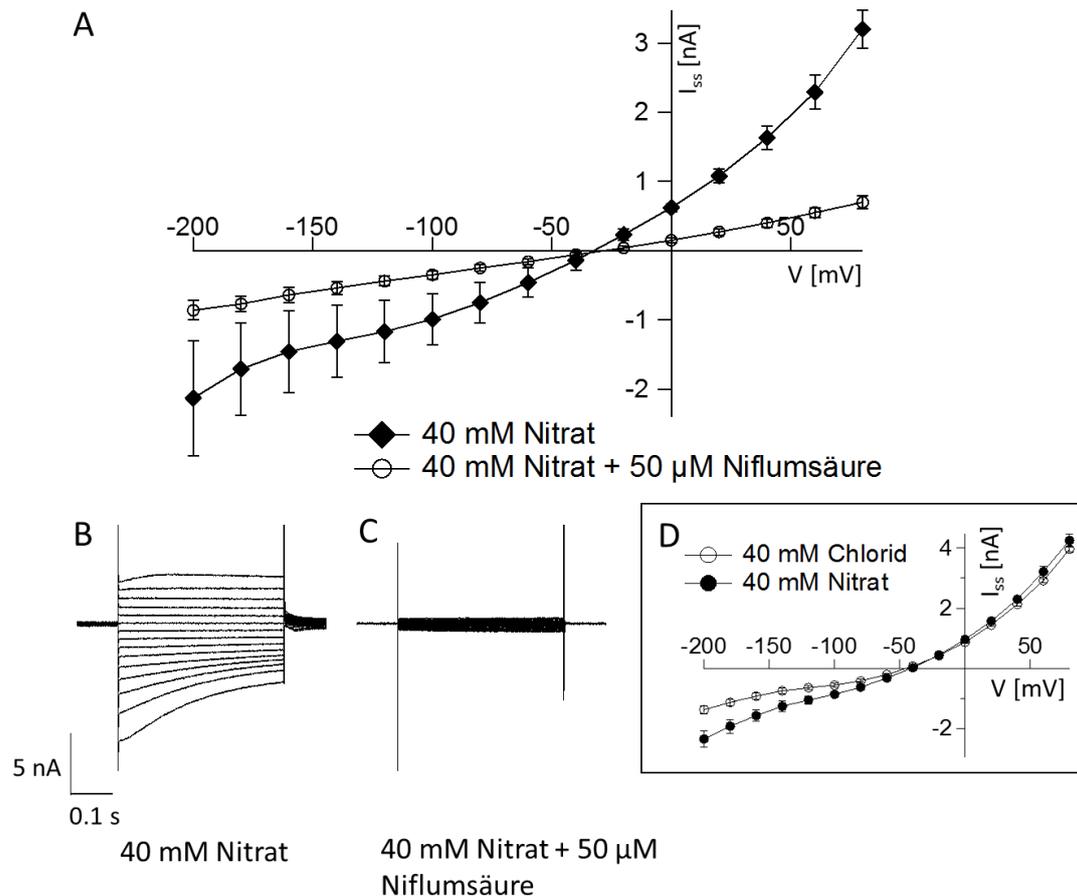
### 3.3.1 Inhibierung der S-Typ-Anionenströme auf 40 mM Nitratmedium

Zur Bestätigung der S-Typ-vermittelten Anionenströme wurde eine erneute Inhibierung der Ganzzellströme mit 50  $\mu\text{M}$  Niflumsäure auf 40 mM Nitrat-Medium (siehe Tabelle 1) durchgeführt und zusätzlich die Veränderungen der Ganzzellströme bei verschiedenen Anionen im Keimungsmedium (40 mM  $\text{NO}_3^-$  und 40 mM  $\text{Cl}^-$ ) betrachtet.

Durch die Perfusion mit 50  $\mu\text{M}$  Niflumsäure kommt es bei 40 mM Nitrat im Keimungsmedium zu einer Inhibierung der Ein- und Auswärtsströme. Die Gleichgewichtsströme (Abbildung 22 A) reduzieren sich in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Niflumsäure bei -200 mV um 59,6 % und bei +80 mV um 78,9 %. Während die makroskopischen Ganzzellströme in Abwesenheit des Anionenkanal-Inhibitors Niflumsäure die charakteristische S-Typ-Kinetik im negativen Spannungsbereich zeigen (n=4) (Abbildung 22 B), wird durch die Perfusion mit 50  $\mu\text{M}$  Niflumsäure die charakteristische S-Typ-Kinetik im negativen Spannungsbereich sowie die Auswärtsströme unterdrückt (Abbildung 22 C).

Um die in Geiger *et al.*, 2011, gezeigte 20-fach höhere Leitfähigkeit des Anionenkanals SLAH3 von Nitrat im Vergleich zu Chlorid zu überprüfen, wurden die Ströme bei einer Anionenkonzentration von 40 mM Nitrat und 40 mM Chlorid im Keimungsmedium miteinander verglichen.

Der Wechsel von einem reinen Nitrat auf ein reines Chloridmedium führt zu einer Reduktion der Einwärtsströme um 35,2 % bei -200 mV, die Auswärtsströme blieben unverändert (n = 12 für 40 mM Chlorid, n = 27 für 40 mM Nitrat) (Abbildung 22 D).



**Abbildung 22: Inhibierung der Nitrat-vermittelten Anionenströme durch den Anionenkanal-Inhibitor Niflumsäure**

Dargestellt sind die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  in 40 mM Nitrat-Medium vor und nach der Applikation von 50  $\mu$ M Niflumsäure ( $n = 4$ ). Zur Ableitung der Ströme wurde die TEVC-Technik angewendet (A). Die Gleichgewichtsströme wurden gegen die applizierte Membranspannung von -200 mV bis +80 mV ( $\Delta 20$  mV) aufgetragen, wobei die Haltespannung dem Membranpotenzial der Zelle angepasst wurde. Die makroskopischen Ganzzellströme zeigen in Abwesenheit von Niflumsäure die charakteristische S-Typ-Stromantwort (B). Die charakteristische langsame Deaktivierung im negativen Spannungsbereich verschwindet jedoch nach der Applikation von 50  $\mu$ M Niflumsäure (C). Der Vergleich der Anionenbedingungen im Keimungsmedium von 40 mM Nitrat mit 40 mM Chlorid zeigt eine Reduktion der Gleichgewichtsströme im negativen Spannungsbereich ( $n = 12$  für 40 mM Chlorid,  $n = 27$  für 40 mM Nitrat) (D).

### 3.4 Elektrophysiologische Charakterisierung von Anionenströmen in Pollenschlauch-Verlustmutanten von *slah3-1*, *slah3-2*, *cpk6-1*, *cpk2-1 x cpk20-2* und *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1*

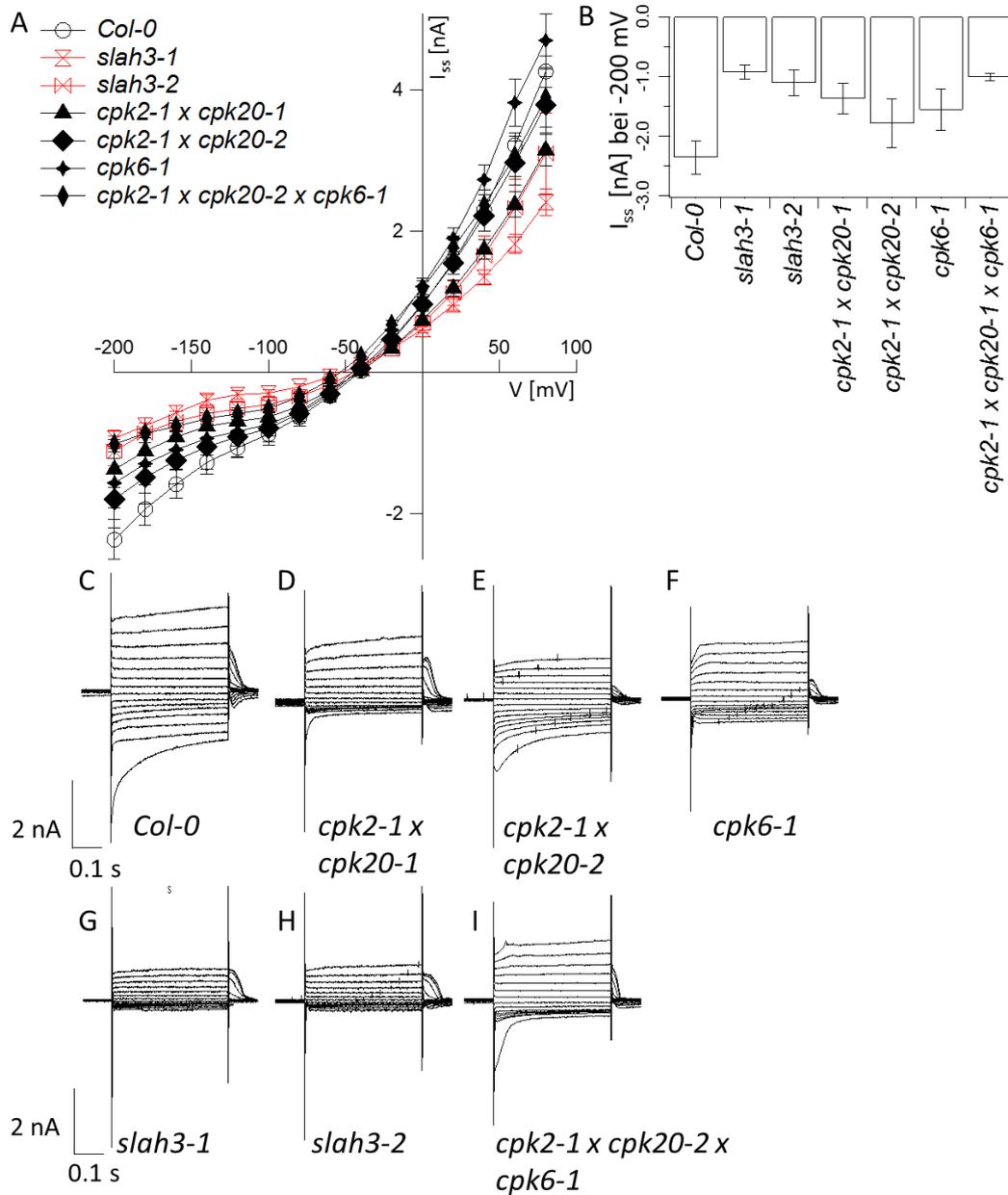
Die elektrophysiologische Charakterisierung der Pollenschläuche zur Untersuchung der Ganzzell-Anionenströme erfolgte im 40 mM  $\text{NO}_3^-$ -Keimungsmedium mittels S-Typ-Spannungspulsprotokoll (Abbildung 10). Anstatt die Insertionslinien der relativ niedrig exprimierten Kinasen CPK2- und CPK20- einzeln zu charakterisieren, wurden zwei von Roman Lassig (AG Tina Romeis, Dahlem Center of Plant Sciences) generierte *cpk2 x cpk20* Doppelverlustmutanten (*cpk2-1 x cpk20-1* und *cpk2-1 x cpk20-2*, siehe Abschnitt 2.5) sowie *cpk6-1* und eine Dreifachverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* (siehe Abschnitt 2.5) verwendet. Des Weiteren wurden zwei unabhängige SLAH3-Salk-Insertionslinien (*slah3-1* und *slah3-2*, siehe Abschnitt 2.5) elektrophysiologisch charakterisiert (n = 27 für Col-0, n = 13 für *slah3-1*, n = 11 für *slah3-2*, n = 13 für *cpk2-1 x cpk20-1*, n = 10 für *cpk2-1 x cpk20-2*, n = 11 für *cpk6-1*, n = 11 für *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1*).

Die abgeleiteten Ganzzellströme der Verlustmutanten zeigen im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (Abbildung 23 A) eine deutliche Reduzierung der Pollenschlauchein- und -auswärtsströme (ausgenommen die *cpk6-1* Auswärtsströme, diese sind leicht erhöht). Bei allen charakterisierten Mutanten zeigt sich eine Reduktion des Anionenausstroms im Vergleich zu Wildtyp-Pollenschläuchen. In Tabelle 13 sind die Anionenströme der gemessenen CPK- sowie der SLAH3-Verlustmutanten bei -200 mV und +80 mV aufgetragen. Diese Reduktion der Auswärtsströme bei -200 mV fällt in den Kinase-Verlustmutanten im Vergleich zu den Ionenkanal-Verlustmutanten geringer aus, wobei in *cpk6-1*-Pollenschläuchen eine Reduktion von -33,8 %, bei *cpk2-1 x cpk20-1* und *cpk2-1 x cpk20-2*-Pollenschläuchen eine Reduktion von -24,1 % und -41,9 % zu erkennen war. In den beiden SLAH3-Verlustmutanten zeigten die Anionenströme mit -60,5 % und -52,9 % eine vergleichsweise starke Reduzierung der Pollen-Anionenströme bei -200 mV (siehe Abbildung 23 A und B). Bemerkenswerterweise zeigt die Dreifachverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* eine vergleichbare Reduktion von -57,2 % des Anionenausstroms bei -200 mV, wie die beiden Anionenkanal-Verlustmutanten *slah3-1* und *slah3-2*. Die charakteristische S-Typ-Kinetik ist in den beiden Verlustmutanten *slah3-1* und *slah3-2* während der negativen Spannungspulse

nicht mehr zu erkennen (Abbildung 23 G und H) und bei den CPK-Verlustmutanten im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert (Abbildung 23 D, E, F und I).

**Tabelle 13: Reduktion der Ein- und Auswärtsströme in SLAH3- und CPK-Verlustmutanten bei 40 mM Nitrat im Keimungsmedium**

Linie	Stromreduktion $I_{ss}$ in % bei -200 mV	Stromreduktion $I_{ss}$ in % bei +80 mV
Col-0 Wildtyp	-	-
<i>cpk2-1 x cpk20-1</i>	-41,9	-26,1
<i>cpk2-1 x cpk20-2</i>	-24,1	-11,0
<i>cpk6-1</i>	-33,8	10,3
<i>cpk2-1 x cpk6-1 x cpk20-1</i>	-57,2	-8,5
<i>slah3-1</i>	-60,5	-27,2
<i>slah3-2</i>	-52,9	-43,4



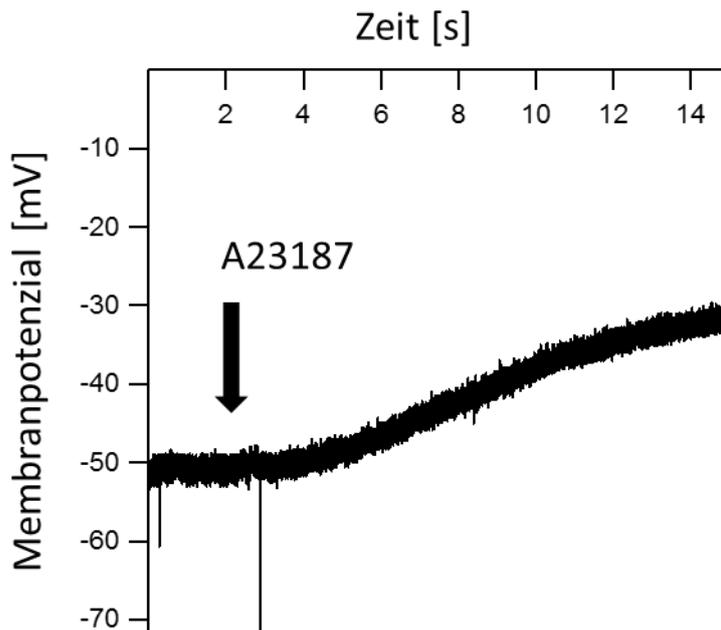
**Abbildung 23: Einfluss von SLAH3- und CPK-Verlustmutanten auf die Ganzzellströme bei 40 mM Nitrat im Keimungsmedium**

Dargestellt sind die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  von Anionenströmen aus Pollenschläuchen von Col-0, zweier *cpk2 x cpk20* Doppelverlustmutanten, *cpk6-1*, der Dreifachverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* und beiden *slah3*-Verlustmutanten in 40 mM Nitrat-Medium (A) ( $n = 27$  für Col-0,  $n = 13$  für *slah3-1*,  $n = 11$  für *slah3-2*,  $n = 13$  für *cpk2-1 x cpk20-1*,  $n = 10$  für *cpk2-1 x cpk20-2*,  $n = 11$  für *cpk6-1*,  $n = 11$  für *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1*). Zur Ableitung der Ströme wurde die TEVC-Technik angewendet. Die Gleichgewichtsströme wurden gegen die applizierte Membranspannung von -200 mV bis +80 mV ( $\Delta 20$  mV) aufgetragen, wobei die Haltespannung dem Membranpotenzial der Zelle angepasst wurde. Die Auswärtsströme des Wildtyps Col-0 und der Mutanten wurden bei -200 mV aufgetragen (B). Die makroskopischen Ganzzellströme des Wildtyps zeigen die charakteristische S-Typ-Kinetik im negativen Spannungsbereich (C). Diese Kinetik ist in den beiden *cpk2 x cpk20* Doppelverlustmutanten (D und E) sowie in *cpk6-1* (F) und der Dreifachverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* (I) reduziert. Die beiden SLAH3-Verlustmutanten zeigen keine charakteristische S-Typ-Kinetik mehr (G und H).

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass der S-Typ-Anionenkanal SLAH3 in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen exprimiert wird und dessen Transkription sowohl durch die Komposition der Anionen im Keimungsmedium, als auch durch deren Konzentration reguliert wird. Ebenfalls konnte die Beteiligung von SLAH3 an dem Anionenefflux an der Pollenschlauchspitze und die Aktivierung von SLAH3 durch die Calcium-abhängigen Kinasen CPK2, CPK20 und CPK6 in Pollenschläuchen gezeigt werden.

### **3.5 Calcium-abhängiger S-Typ-vermittelter Anionenausstrom in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen**

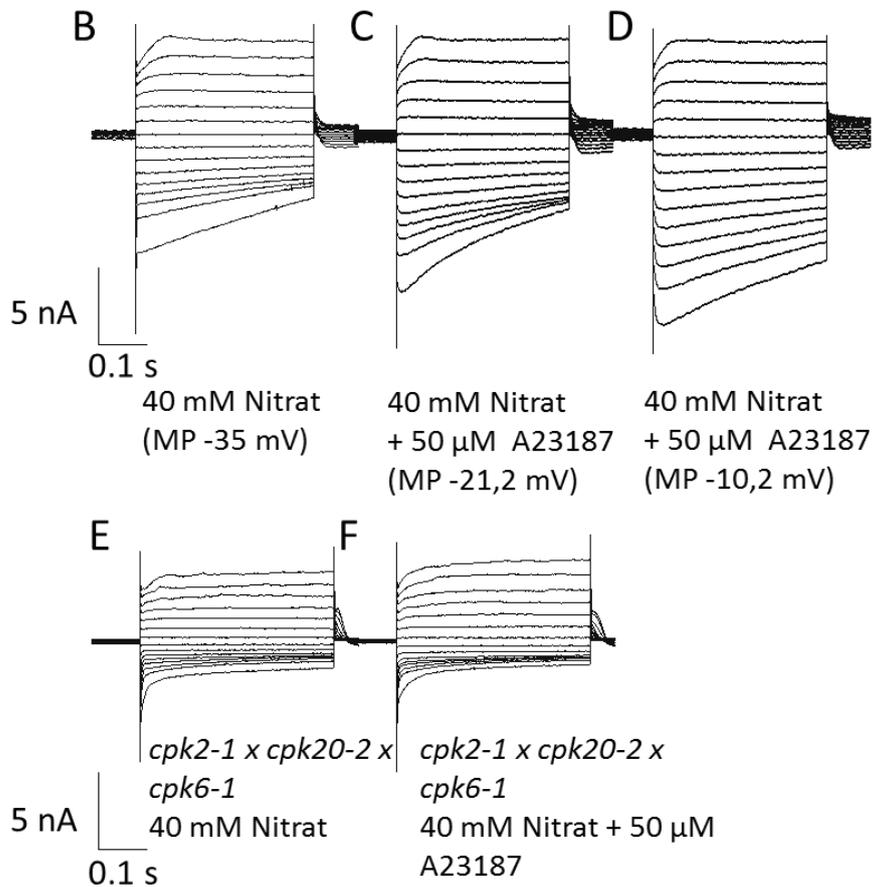
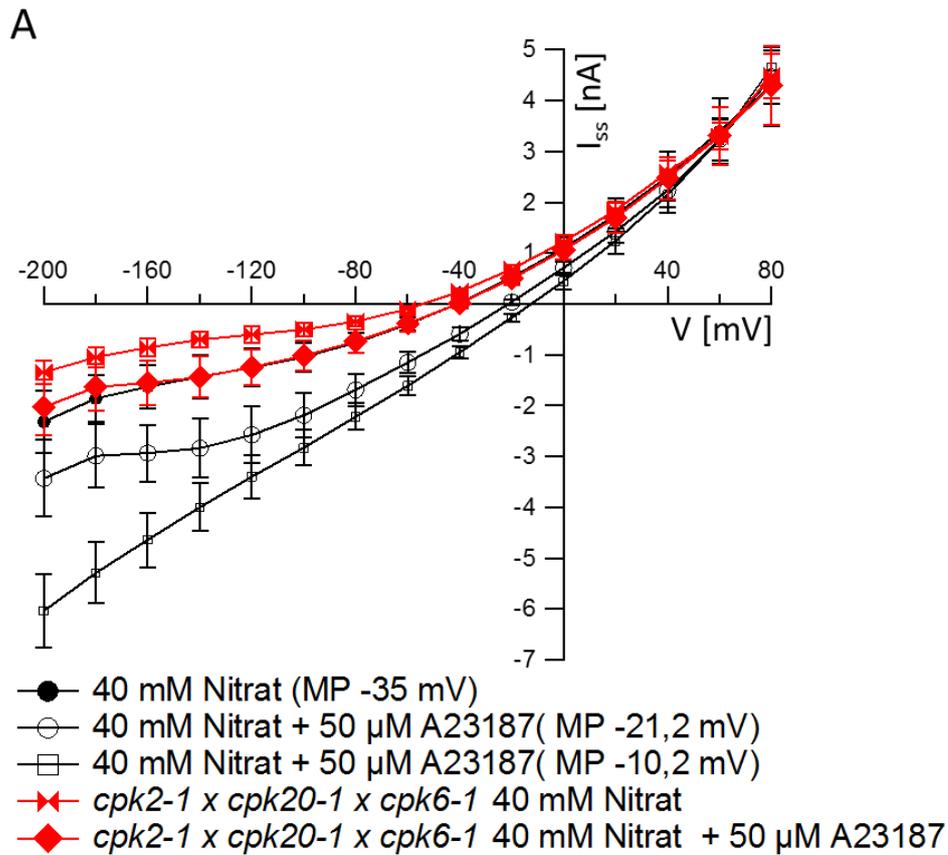
Wie in Abschnitt 3.4 gezeigt, haben Calcium-abhängige Kinasen einen deutlichen Einfluss auf die makroskopischen Anionenströme in Pollenschläuchen. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine von außen gesteuerte Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einer Aktivierung von Anionenströmen durch die CPKs führt. Durch die Applikation von 50  $\mu\text{M}$  des Calcium-Ionophores A23187 in das Keimungsmedium kommt es zu einer Depolarisierung des Membranpotenzials gegen 0 mV, welche durch den selektiven Einstrom von Calcium hervorgerufen wird (Abbildung 24). Während dieses Zeitraums wurden die Gleichgewichtsströme bei unterschiedlichen Membranspannungen (n=5) (freies MP bei ca. -20 mV und -10 mV) aufgezeichnet.



**Abbildung 24: Depolarisierung des Membranpotenzials durch den Calcium-Ionophor A23187**

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus einer Membranpotenzialmessung eines Col-0-Pollenschlauchs vor und nach der Perfusion mit 50  $\mu\text{M}$  A23187. Nach Applikation des Calcium-Ionophores kommt es zu einer Depolarisation des Membranpotenzials.

Mit fortschreitender Depolarisierung des Membranpotenzials, ausgelöst durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ionophor-abhängige Zunahme der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, kommt es zu einer Steigerung der charakteristischen S-Typ-Stromantwort (Abbildung 25 A). Die makroskopischen Ganzzellströme zeigen eine Zunahme der Ein- und Auswärtsströme nach Perfusion mit dem Calcium-Ionophor A23187 in Wildtyp-Pollenschläuchen (Abbildung 25 B, C und D). Die Depolarisierung des Membranpotenzials von ca. -35 mV auf -10 mV führt zu einer Zunahme der Auswärtsströme von 160 % bei einer Membranspannung von -200 mV. Die makroskopischen Ein- und Auswärtsströme der Dreifachverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* ( $n=7$ ) (Abbildung 25 E und F) zeigen nur eine geringfügige Steigerung der Auswärtsströme um +51 % im Vergleich zu Wildtyp-Col-0-Pollenschläuchen. Durch die Verwendung der TEVC-Technik kann innerhalb dieser Experimentreihe die Aktivierung anderer Anionenkanäle, wie der ebenfalls exprimierte R-Typ-Anionenkanal ALMT12 und dessen Beitrag zu den gemessenen Ganzzellströmen, nicht vollständig ausgeschlossen werden.



**Abbildung 25: Calcium-induzierte Aktivierung der S-Typ-Anionenkanal-Stromantwort in Col-0 und der Dreifachverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1***

Die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  im Spannungsbereich von -200 mV bis +80 mV ( $\Delta 20$  mV), ausgehend von der Haltespannung, welche dem Membranpotenzial der Zelle angepasst wurde, in 40 mM Nitrat-Medium von Col-0 ( $n=5$ ) und der Dreifachverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* ( $n=7$ ) in Ab- und Anwesenheit von 50  $\mu$ M Calcium-Ionophor A23187 (A). Zur Ableitung der Ströme wurde die TEVC-Technik angewendet. Die makroskopischen Ganzzellströme zeigen im Wildtyp und in der Dreifachverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* die jeweils charakteristische S-Typ-Kinetik, welche in der Mutante jedoch reduziert ist (A und E).

Die gemessene Dreifachverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* zeigt ein reduziertes Ansprechen auf den durch A23187 induzierten Calciumanstieg, ausgehend von den bereits in Abbildung 23 gezeigten reduzierten Ganzzellströmen der *cpk2-1 x cpk20-2 x cpk6-1* Pollenschläuche. Durch den Verlust von CPK2, CPK20 und CPK6 in der Dreifachverlustmutante ist die Calcium-vermittelte Aktivierung des Anionenkanals SLAH3 stark reduziert. Im Vergleich zeigen die Wildtyp-Col-0-Pollenschläuche eine 160%ige Zunahme des Anionenausstroms bei -200 mV, während die *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* Mutante lediglich eine 50%ige Zunahme bei -200 mV, ausgehend von den bereits reduzierten Ganzzellströmen der Mutante verzeichnet.

Durch die in diesem Experiment gewonnenen Erkenntnisse konnte die These der Calcium-vermittelten Aktivierung von SLAH3 durch Calcium-abhängige Kinasen in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen weiter bestätigt werden.

### 3.6 Transkriptionsanalyse auf unterschiedlichen Anionenkonzentrationen im Anzuchtmedium von Col-0 und *almt12-2*-Pollenschläuchen

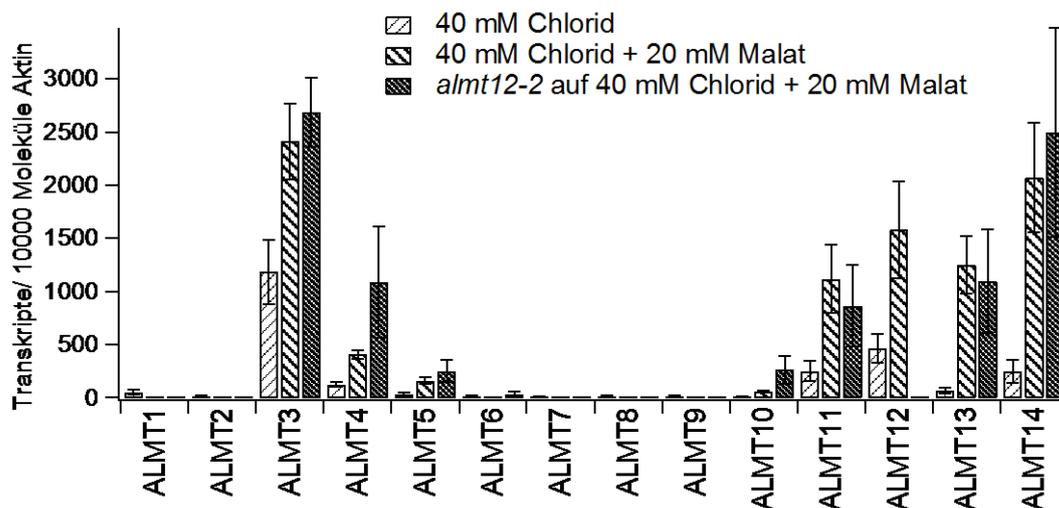
Der Einfluss des R-Typ-Anionenkanals ALMT12 auf die Anionenstromantwort in *Arabidopsis thaliana*-Schließzellen wurde 2010 in Meyer *et al.* nachgewiesen. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, wird neben SLAH3 auch ALMT12 in Pollenschläuchen exprimiert. Es stellte sich nun die Frage, ob noch andere Vertreter der ALMT-Familie in Pollenschläuchen exprimiert werden.

Um den Einfluss der in Meyer *et al.*, 2010, gezeigten Malat-induzierten R-Typ-Ströme auf transkriptioneller Ebene zu untersuchen, wurden die Pollen auf einem reinen Chloridmedium bzw. auf Chlorid-/Malat-Medium (siehe Tabelle 1) angezogen, was eine Aktivierung des S-Typ-Anionenkanals SLAH3 durch extrazelluläre Nitratkonzentrationen verhindern soll. In Meyer *et al.*, 2010, konnte in Patch-Clamp-Experimenten an Schließzell-Protoplasten gezeigt werden, dass die R-Typ-Stromantwort in der ALMT12-Verlustmutante bei 20 mM Malat in der Badlösung reduziert, aber noch R-Typ-Anionenströme sichtbar waren und somit noch andere R-Typ-Anionenkanäle neben ALMT12 an der Stromantwort beteiligt sein müssen. Aus diesem Grund wurden hier zusätzlich zu WT-Col-0-Pollenschläuchen ebenfalls Pollenschläuche der ALMT12 Verlustmutante (*almt12-2*) auf einem Chlorid-/Malat-Medium mittels quantitativer Real-time-PCR (qRT-PCR) analysiert, um eine mögliche transkriptionelle Regulation anderer ALMT-Kanäle in der Verlustmutante zu erkennen.

Um zu untersuchen, welche ALMT-Gene in Pollen exprimiert werden, wurde eine transkriptionelle Analyse mittels qRT-PCR (n = 8) mit der gesamten bekannten ALMT-Familie (ALMT1 - ALMT14) sowie mit den bereits in Absatz 3.3 beschriebenen Kinasen unter verschiedenen Anionenbedingungen im Keimungsmedium durchgeführt. Die Transkriptionsanalyse zeigt die Expression von ALMT3, ALMT4 sowie von ALMT11, ALMT12, ALMT13 und ALMT14 auf dem Medium mit 40 mM Chlorid (Abbildung 26). Bei den ALMT-Genen ALMT 3, 4, 5, 6 und 9 handelt es sich basierend auf ihrer phylogenetischen Ähnlichkeit (Dreyer *et al.*, 2012) zu ALMT6 vermutlich um Vertreter der vakuolären R-Typ-Anionenkanäle, ALMT6 (Meyer *et al.*, 2011) und ALMT9-YFP konnte bereits in *Arabidopsis*-Tonoplasten lokalisiert werden (Kovermann *et al.*, 2007). ALMT12 zeigt die höchste Transkription der ALMT-Gene auf 40 mM Chlorid.

Basierend auf den von Meyer *et al.*, 2010, durchgeführten Experimenten, in denen Malat als permeables Anion für ALMT12 nachgewiesen wurde, lag die Vermutung einer möglichen transkriptionellen Regulation von ALMT12 und seiner Homologe durch Malat nahe. Die Zugabe von 20 mM Malat ins Keimungsmedium führt zu einer erhöhten Transkription aller exprimierten ALMT-Gene. Die Transkription erhöht sich bei ALMT11 um 345 %, bei ALMT12 um 241 %, bei ALMT13 um 1714 % und bei ALMT14 um 744 %. Die Verlustmutante *alm12-2* zeigt wie erwartet keine Transkription des ALMT12-Gens, aber auch keine signifikanten Änderungen des Transkriptionsmusters anderer exprimierter ALMT-Gene.

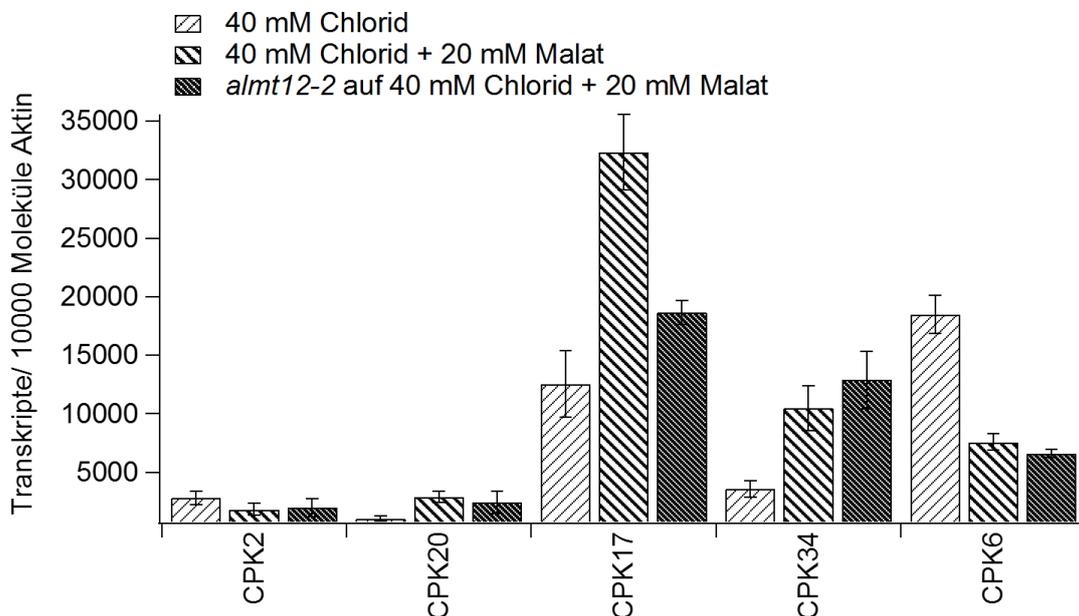
Es konnte somit gezeigt werden, dass ALMT3, ALMT4, ALMT5 sowie ALMT11, ALMT12, ALMT13 und ALMT14 in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen exprimiert werden und die Transkription durch Malat gesteigert wird. Durch die hohe Homologie 67 % und 63 % von ALMT13 und ALMT14 zu ALMT12 auf Proteinebene stellten diese beiden Gene die wahrscheinlichsten Kandidaten für die in Meyer *et al.*, 2010, beschriebenen ALMT12-unabhängigen R-Typ-Anionenströme dar.



**Abbildung 26: Transkriptionsanalyse für die Gene der ALMT-Familie in Col-0- und *alm12-2*-Pollenschläuchen**

Transkriptionsanalyse der ALMT-Familie (ALMT1-14) in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen bei unterschiedlicher Anionenzusammensetzung des Keimungsmediums. Die Inkubation erfolgte für Col-0 bei 40 mM Chlorid und 40 mM Chlorid + 20 mM Malat. Zusätzlich wurde die Transkription der ALMT-Gene für die Verlustmutante *alm12-2* unter 40 mM Chlorid + 20 mM Malat quantifiziert. Die Transkriptionsanalyse erfolgte mittels quantitativer Real-time-PCR auf cDNA von 6 h inkubierten Col-0- und *alm12-2*-Pollenschläuchen. Als Referenzgen zu den getesteten Anionenkanal-Expressionsraten wurde Aktin verwendet und die Transkripte auf 10000 Aktinmoleküle standardisiert (n = 8).

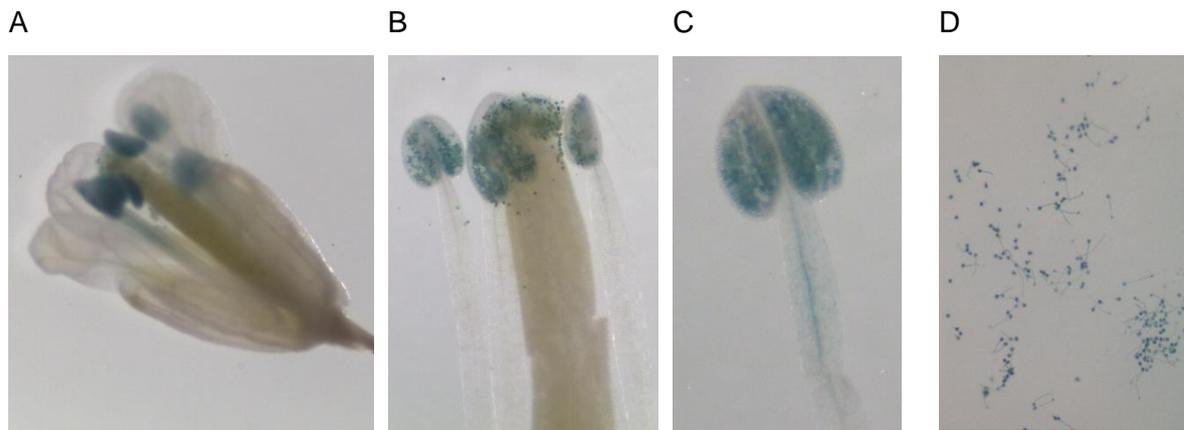
Die Transkriptionsanalyse der Calcium-abhängigen Kinasen 2, 20, 17, 34 und 6 (Abbildung 27) zeigt eine 188%ige Erhöhung der Transkription von CPK20 sowie eine Steigerung von 157 % für CPK17 und 193 % für CPK 34 durch die Zugabe von Malat ins Keimungsmedium. CPK17 zeigt weiterhin als einzige der getesteten Kinasen eine Reduktion der Transkription in der Verlustmutante *almt12-2* unter Malat. CPK6 hingegen unterliegt einer -59%igen Reduktion durch die Zugabe von 20 mM Malat ins Keimungsmedium. Die Transkription von CPK2 zeigt wiederum keine signifikanten Änderungen im Transkriptionsmuster durch Zugabe von 20 mM Malat.



**Abbildung 27: Transkriptionsanalyse von Pollen-exprimierten Genen der CPK-Familie**

Dargestellt wird die Transkriptionsanalyse der Calcium-abhängigen Kinasen in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen bei unterschiedlicher Anionenzusammensetzung des Keimungsmediums. Col-0-Pollenschläuche wurden auf einem Medium angezogen, welches 40 mM Chlorid sowie 40 mM Chlorid + 20 mM Malat enthielt. Zusätzlich wurde die Transkription der ALMT-Gene für die Verlustmutante *almt12-2* unter 40 mM Chlorid + 20 mM Malat quantifiziert. Die Transkriptionsanalyse erfolgte mittels quantitativer Real-time-PCR auf cDNA von 6 h inkubierten Col-0- und *almt12-2*-Pollenschläuchen. Als Referenzgen zu den getesteten CPK-Expressionsraten wurde Aktin verwendet und die Transkripte auf 10000 Aktinmoleküle standardisiert (n = 8).

Zusätzlich zur quantitativen Bestimmung der Transkription wurde die in Meyer *et al.*, 2010, gezeigte GUS-Färbung an prom ALMT12::GUS-Blüten und Antheren (Abbildung 28 A, B und C) zur Kontrolle noch einmal wiederholt und zusätzlich erstmals die Expression von ALMT12 in gekeimten Pollenschläuchen mittels GUS-Färbung nachgewiesen (Abbildung 28 D).



**Abbildung 28: GUS-Färbung von prom ALMT12::GUS-Blüten und Pollenschläuchen**

Die GUS-Färbung der Blüten zeigt, dass sich die Promotoraktivität von prom ALMT12 auf die Pollenkörner in den Antheren beschränkt (A, B und C). Die *in vitro*-Anfärbung auf X-Gluc-Keimungsmedium von ausgekeimten Pollenschläuchen zeigt auch hier eine intensive Blaufärbung und damit Promotoraktivität (D).

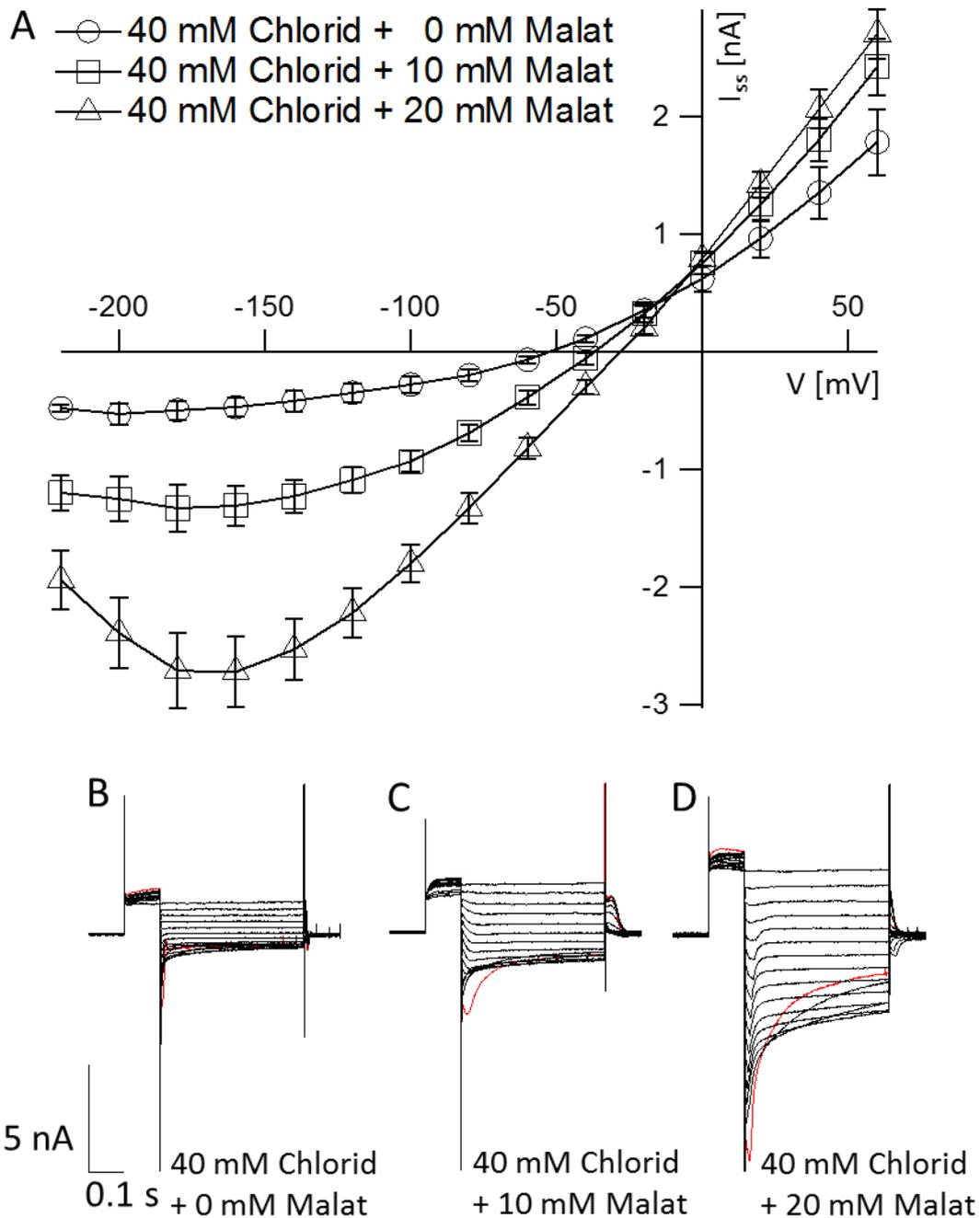
### 3.7 Elektrophysiologische Charakterisierung von R-Typ-Anionenströmen in Col-0-Pollenschläuchen in Abhängigkeit der Malat-Konzentration

Um neben dem in Abschnitt 3.60 gezeigten transkriptionellen Einfluss von Malat im Keimungsmedium auch den Einfluss der Malat-Konzentration auf die R-Typ-Anionenströme zu ermitteln, wurden Col-0-Pollen auf 40 mM Chloridmedium mit variierenden Malatkonzentrationen (0 mM, 10 mM und 20 mM) angezogen und mittels TEVC-Technik elektrophysiologisch charakterisiert (siehe Abbildung 11). In Abwesenheit von Malat im Keimungsmedium konnte keine charakteristische R-Typ-Anionenkanal-Glockenkurven-Kinetik, wie sie bereits in Hedrich *et al.*, 1990, Hedrich und Marten *et al.*, 1993, Meyer *et al.*, 2010, und Mumm *et al.*, 2013, beschrieben wurde, abgeleitet werden. Erst ab einer Konzentration von 10 mM Malat im Keimungsmedium wurde diese im negativen Spannungsbereich sichtbar und mit steigender Malatkonzentration von 20 mM deutlich erkennbar (Abbildung 29 A). Durch Steigerung der Malatkonzentration im Keimungsmedium kam es zu einer Zunahme des Anionenausstroms bei -160 mV um 178 % bei 10 mM und 478 % bei 20 mM Malat (n = 9 für 0 mM Malat, n = 9 für 10 mM Malat, n = 16 für 20 mM Malat).

Durch die Ableitung der Ganzzellströme unter diesen Bedingungen konnte eine Beteiligung des S-Typ-Anionenkanals SLAH3 zur Stromantwort im Wildtyp-Hintergrund Col-0 nicht vermieden werden. Dies wird besonders in den Gleichgewichtsströmen der negativen Spannungspulse in

Abbildung 29 A sichtbar, da es hier zu einer Überlagerung von S-Typ- und R-Typ-Anionenströmen kommt. Die charakteristische R-Typ-Glockenkurven-Kinetik zeigt bei sehr negativen Spannungen von -200 mV nur geringe Kanalaktivität und wird im Wildtyp durch SLAH3 vermittelte Anionenströme in diesem Spannungsbereich überlagert, was sich durch den negativen Strom von -1,94nA bei -200mV äußert.

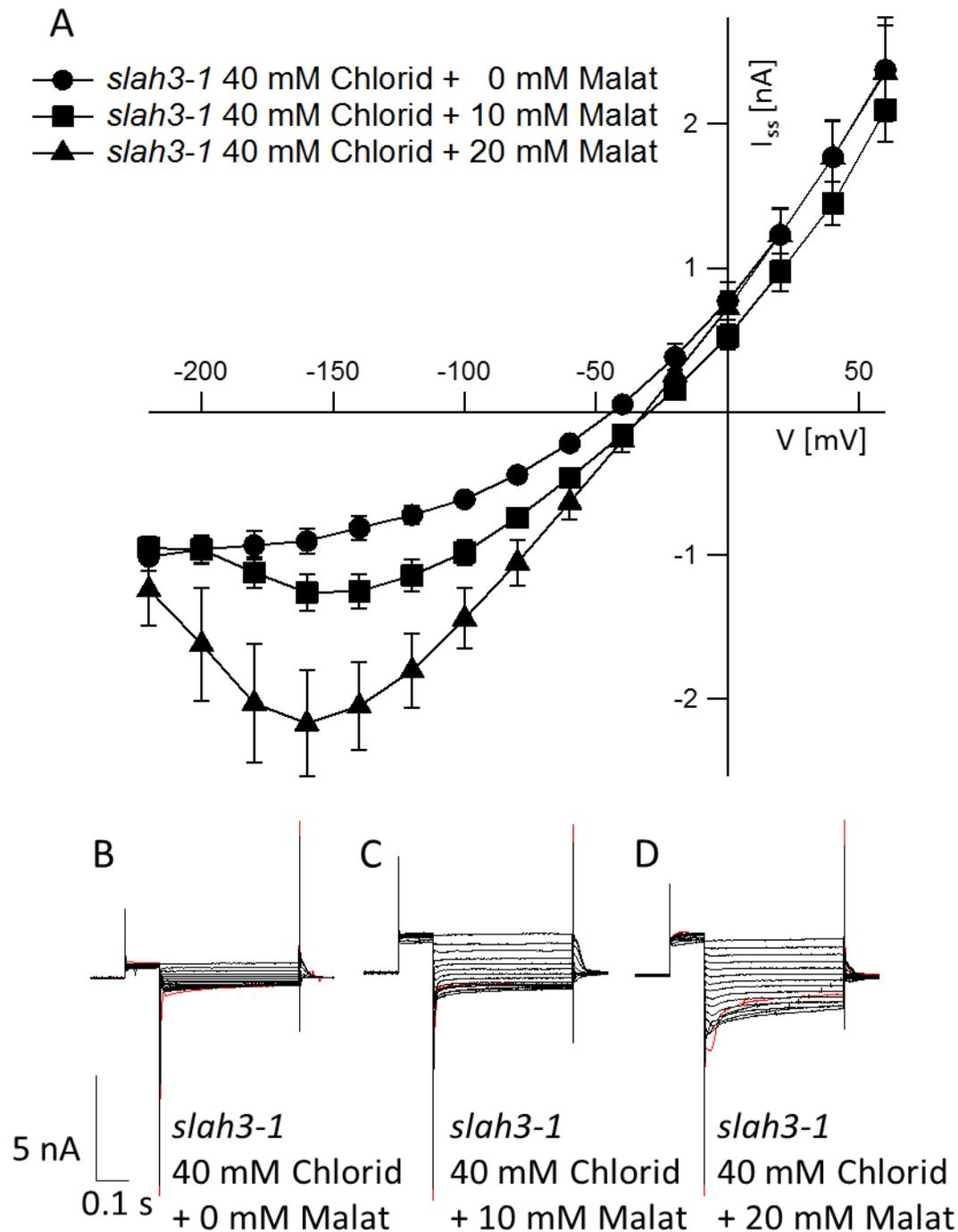
Des Weiteren ist im Col-0-Hintergrund die charakteristische R-Typ-Kinetik erst bei 20 mM Malat wirklich ausgeprägt. Die charakteristische schnelle R-Typ- Deaktivierung im negativen Spannungsbereich von -200 bis -160 mV ist im reinen Chloridmedium nicht zu erkennen (Abbildung 29 B) und wird erst mit steigender Malatkonzentration von 10 mM, besser noch 20 mM Malat, sichtbar (Abbildung 29 C und D).



**Abbildung 29: Einfluss der Medium-Malatkonzentration auf R-Typ-Anionenströme in Col-0-Pollenschläuchen**

Gemessen wurden Ganzzellströme  $I_{ss}$  von Col-0-Pollenschläuchen mittels TEVC-Technik unter Variation der Malatkonzentration im Keimungsmedium ( $n = 9$  für 0 mM Malat,  $n = 9$  für 10 mM Malat,  $n = 16$  für 20 mM Malat) (A). Die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  wurden gegen die applizierte Membranspannung von -220 mV (rote Stromspur) bis +60 mV ( $\Delta 20$  mV) aufgetragen, wobei die Haltespannung dem Membranpotenzial der Zelle angepasst wurde. Mit steigender Malatkonzentration im Keimungsmedium kam es zu einer Zunahme der makroskopischen Ganzzellströme. Während bei 0 mM Malat im Keimungsmedium noch keine charakteristischen R-Typ-Auswärtsströme sichtbar sind (B), zeigt sich ab 10 mM die charakteristische schnelle R-Typ-Deaktivierung im negativen Spannungsbereich (C), diese nimmt konzentrationsabhängig mit zunehmendem 20 mM Malat im Keimungsmedium (D) zu.

Um die Beteiligung von SLAH3 an der Stromantwort zu vermeiden, wurde das Experiment erneut mit der *slah3-1*-Verlustmutante durchgeführt. Die Ableitung der Ganzzellströme im *slah3-1*-Hintergrund resultierte in einer besseren Auflösung der charakteristischen R-Typ-Glockenkurven-Kinetik. Es erhöhten sich die Auswärtsströme bei -160 mV um 40 % und 141 % bei einer Steigerung der Malatkonzentration von 0 auf 10 mM bzw. 20 mM (n = 11 für 0 mM Malat, n = 15 für 10 mM Malat, n = 26 für 20 mM Malat). In Abwesenheit von Malat war keine spannungsabhängige Glockenkurven-Kinetik sichtbar (Abbildung 30 A). Die Zunahme der Malatkonzentration im Keimungsmedium führte zu einem Anstieg der makroskopischen Ein- und Auswärtsströme. Die charakteristische schnelle R-Typ-Deaktivierung im negativen Spannungsbereich wurde erst in Anwesenheit von Malat im Keimungsmedium sichtbar und prägte sich mit steigender Konzentration weiter aus (Abbildung 30 C und D). In reinem Chloridmedium (0 mM Malat) ist keine schnelle Deaktivierungskinetik messbar (Abbildung 30 B).



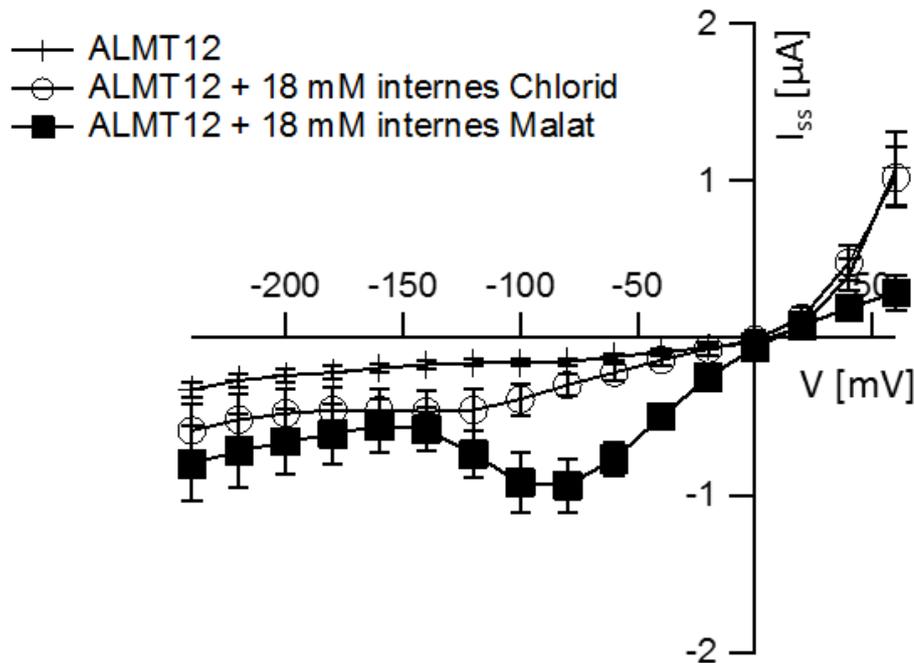
**Abbildung 30: Einfluss der Medium-Malatkonzentration auf R-Typ-Anionenströme in Pollenschläuchen der Verlustmutante *slah3-1***

Gemessen wurden Ganzzellströme (A) von *slah3-1*-Pollenschläuchen mittels TEVC-Technik unter Variation der Malatkonzentration im Keimungsmedium ( $n = 11$  für 0 mM Malat,  $n = 15$  für 10 mM Malat,  $n = 26$  für 20 mM Malat). Die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  wurden gegen die applizierte Membranspannung von  $-220$  mV (rote Stromspur) bis  $+60$  mV ( $\Delta 20$  mV) aufgetragen, wobei die Haltespannung dem Membranpotenzial der Zelle angepasst wurde. Mit steigender Medium-Malatkonzentration kam es zu einer Zunahme der makroskopischen Ganzzellströme. Während bei 0 mM Malat im Keimungsmedium noch keine charakteristischen R-Typ-Auswärtsströme sichtbar sind (B), zeigt sich ab 10 mM die charakteristische schnelle R-Typ-Deaktivierung im negativen Spannungsbereich (C), diese nimmt konzentrationsabhängig mit zunehmender Malat-Konzentration im Keimungsmedium (D) weiter zu.

### 3.8 Charakterisierung der Anionenpermeabilität von ALMT12 im Oozyten-Expressionssystem

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Leitfähigkeit der für die R-Typ-Anionenströme verantwortlichen Kanäle sowie die in Abbildung 29 und Abbildung 30 gemessenen Malat-abhängigen Ganzzellströme um einen rein Malat-basierten Anionenausstrom oder einen Malat-aktivierten Ausstrom von Chlorid handelt, wurde das heterologe Expressionssystem der *Xenopus* Oozyten genutzt.

Durch die Änderung der apoplastischen- und der zytoplasmatischen Anionenzusammensetzung in ALMT12 exprimierende Oozyten durch die Injektion bzw. der Perfusion von Chlorid, Malat oder Gluconat konnte die Leitfähigkeit der ALMT12 vermittelten R-Typ-Ströme ermittelt werden. Bei der Perfusion mit 25 mM Chlorid in der Badlösung kommt es lediglich bei den mit 18 mM Malat injizierten Oozyten zu charakteristischen R-Typ-Gleichgewichtsströmen und einem Anstieg der Stromamplitude von +526 % bei -80 mV im Vergleich zu den uninjizierten ALMT12-Oozyten. Sowohl die uninjizierten ALMT12-Oozyten als auch die mit 18 mM Chlorid beladenen ALMT12-Oozyten zeigen keine „Glockenkurven-Kinetik“ (Abbildung 31) in Abwesenheit von Malat in der Badlösung (n=4).



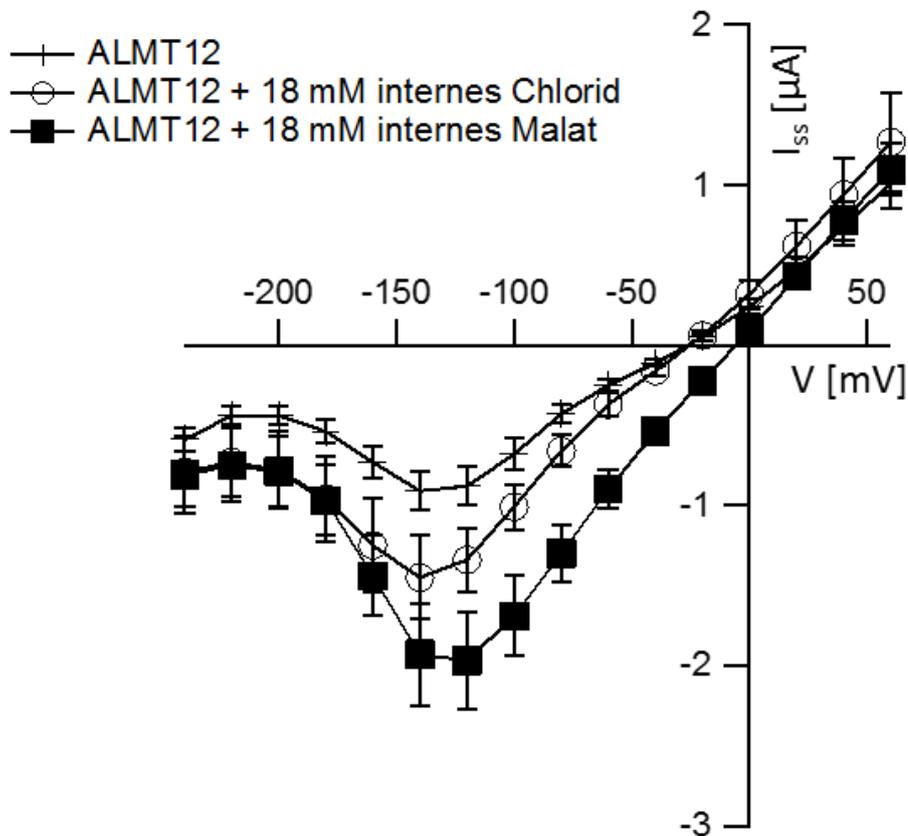
### 25 mM externes Chlorid

#### Abbildung 31: Anionen-Permeabilität von ALMT12 in *Xenopus*-Oozyten unter Chlorid in der Badlösung

Dargestellt sind die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  von ALMT12-exprimierenden Oozyten im Spannungsbereich von -240 mV - +60 mV ( $\Delta$  20 mV) bei einer Haltespannung von -20 mV. Die Oozyten wurden nach 2-3 Tagen nach Injektion der cRNA mittels TEVC-Technik gemessen und die Anionenströme mittels R-Typ-Spannungspulsprotokoll (Abbildung 11) abgeleitet. Vor der elektrophysiologischen Charakterisierung wurden die Oozyten mit je 18 mM Chlorid bzw. 18 mM Malat beladen und mit 25 mM Chlorid in der Badlösung perfundiert (n=4).

Der Wechsel von 25 mM Chlorid auf 25 mM Malat in der Badlösung führt zu einer Aktivierung des Kanals in allen Oozyten (Abbildung 32). Die maximale Stromamplitude verschiebt sich von -80 mV auf -140 mV und steigt bei den mit Chlorid beladenen ALMT12-Oozyten um 59,3 %, bei den mit Malat beladenen ALMT12-Oozyten um +112 % im Vergleich zu den unbeladenen ALMT12-Kontroll-Oozyten (n=4).

Dies zeigt, dass ALMT12 bei einer extrazellulären Aktivierung durch Malat sowohl leitfähig für Malat als auch für Chlorid ist.

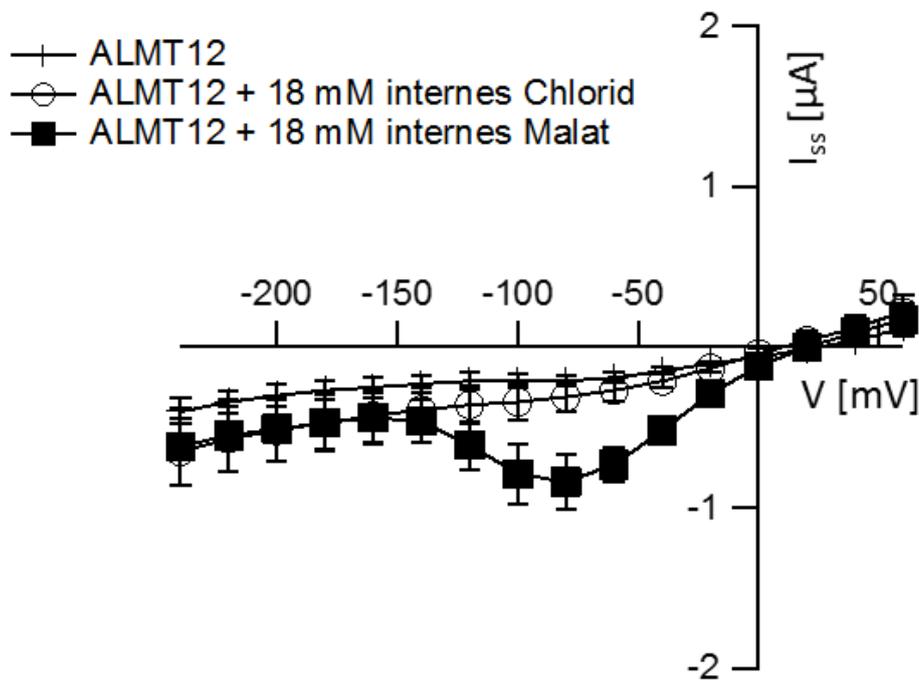


### 25 mM Malat in der Badlösung

#### Abbildung 32: Anionen-Permeabilität von ALMT12 in *Xenopus*-Oozyten unter Malat in der Badlösung

Dargestellt sind die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  von ALMT12-exprimierenden Oozyten im Spannungsbereich von  $-240$  mV -  $+60$  mV ( $\Delta$  20 mV) bei einer Haltespannung von  $-20$  mV. Die Oozyten wurden nach 2-3 Tagen nach Injektion der cRNA mittels TEVC-Technik gemessen und die Anionenströme mittels R-Typ-Spannungspulsprotokoll (Abbildung 11) abgeleitet. Vor der elektrophysiologischen Charakterisierung wurden die Oozyten mit je 18 mM Chlorid bzw. 18 mM Malat beladen und mit 25 mM Malat in der Badlösung perfundiert ( $n=4$ ).

Die Perfusion mit 25 mM Gluconat (Abbildung 33) führt zu einer Inhibierung der Auswärtsströme (Anioneneinstrom) in den ungeladenen ALMT12-Kontroll-Oozyten um  $-741$  % und  $-800$  % bei  $+60$  mV im Vergleich zur 25 mM Chlorid- und Malat-Badlösung. Des Weiteren ist die charakteristische R-Typ-Glockenkurven-Kinetik nur in den Malat-beladenen Oozyten messbar ( $n=4$ ). Hier zeigt die maximale Stromamplitude einen Anstieg von  $+300$  % bei  $-80$  mV.



### 25 mM Gluconat in der Badlösung

#### Abbildung 33: Anionen-Permeabilität von ALMT12 in *Xenopus*-Oozyten unter Gluconat in der Badlösung

Dargestellt sind die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  von ALMT12-exprimierenden Oozyten im Spannungsbereich von -240 mV - +60 mV ( $\Delta$  20 mV) bei einer Haltespannung von -20 mV. Die Oozyten wurden nach 2-3 Tagen nach Injektion der cRNA mittels TEVC-Technik gemessen und die Anionenströme mittels R-Typ-Spannungspulsprotokoll (Abbildung 11) abgeleitet. Vor der elektrophysiologischen Charakterisierung wurden die Oozyten mit je 18 mM Chlorid bzw. 18 mM Malat beladen und mit 25 mM Gluconat in der Badlösung perfundiert ( $n=4$ ).

Vergleicht man die mit Malat beladenen Oozyten unter den verschiedenen Anionenbedingungen in der Badlösung, zeigt sich, dass die maximale Leitfähigkeit bei 25 mM Malat in der Badlösung um +105 % bzw. +129,7 % im Vergleich zu 25 mM Chlorid und 25 mM Gluconat erhöht ist. Des Weiteren verschiebt sich die Spannungsabhängigkeit in Anwesenheit von 25 mM Malat in der Badlösung in den negativen Spannungsbereich. Die maximale Stromamplitude verschiebt sich von -80 mV bei 25 mM Chlorid und Gluconat auf -140 mV bei 25 mM Malat in der Badlösung. Die Spannungsabhängigkeit von ALMT12 wird durch extrazelluläres Malat reguliert, dies konnte bereits in Hedrich und Marten *et al.*, 1993 gezeigt werden.

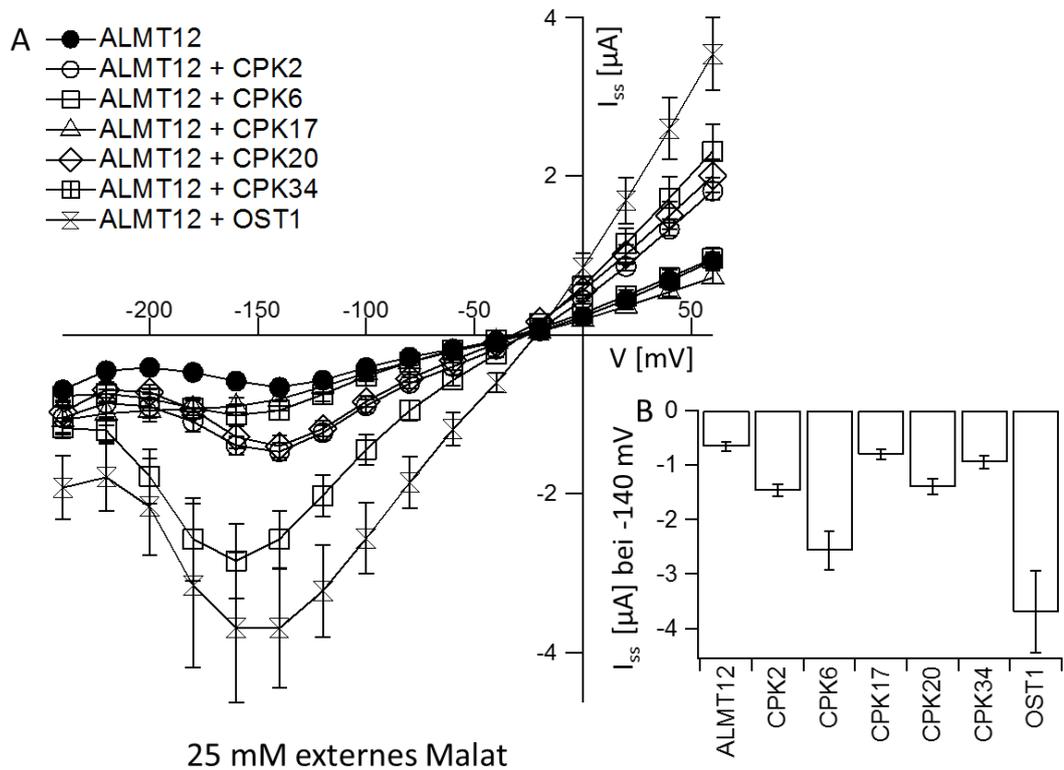
### 3.8.1 Aktivierung von ALMT12 durch Calcium-abhängige Kinasen in *Xenopus*-Oozyten

Da bereits die Aktivierung von SLAH3 durch in der Pollenschlauchspitze lokalisierten CPK2, CPK20 und CPK6 in dieser Arbeit nachgewiesen wurden, richtete sich der Fokus der weiteren Experimente auf die mögliche Interaktion von ALMT12 mit Calcium-abhängigen Kinasen. Im Jahre 2013 konnte erstmals die Interaktion von ALMT12 und der SnRK-Kinase OST1 mit Hilfe der BiFC-Komplementation in Oozyten gezeigt werden. Die Co-Expression von ALMT12 und OST1 resultiert in einer Zunahme der Stromamplitude wenn Malat im Badmedium vorhanden war (Imes *et al.*, 2013).

Um eine mögliche Aktivierung von ALMT12 mit Pollen-exprimierten CPKs zu überprüfen, wurde der Kanal zusammen mit ausgewählten Calcium-abhängigen Kinasen (CPK2, 6, 17, 20, 34) (siehe Abbildung 27) exprimiert und nach 2-3 Tagen durch Variation der extrazellulären Anionenbedingungen elektrophysiologisch charakterisiert (Abschnitt 2.8.6.). Die Co-Expression mit OST1 wurde als Positiv-Kontrolle verwendet, obwohl OST1 in Pollen nicht exprimiert wird aber eine Aktivierung durch Interaktion bereits bekannt war. In allen hier dargestellten Oozyten-Messungen wurden konstitutiv aktive CPKs verwendet, bei denen die EF-Hände entfernt wurden ( $\Delta$ EF). Durch die Abwesenheit der EF-Hände der CPKs, welche als Calciumbindungsstelle fungieren und durch Konformationsänderung die Kinase aktivieren, entfällt deren autoinhibitorische Funktion und resultiert in einer konstitutiv aktiven Kinase. Zusätzlich wurde mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation die Interaktion von ALMT12 und den getesteten Kinasen überprüft (Daten nicht gezeigt, Durchführung Dr. Kai Konrad).

Die Co-Expression von ALMT12 mit CPK17 und 34 (Abbildung 34 A und B) zeigt keine signifikante Steigerung der ALMT12-vermittelten R-Typ-Ströme unter 25 mM Malat in der Badlösung, während die Co-Expression von ALMT12 mit CPK2 und CPK20 hingegen zu einer gesteigerten Aktivierung des Kanals mit einer Zunahme des Anionenausstroms um +123 % mit CPK2 und +112 % mit CPK20 bei -140 mV führt. CPK6 und OST1 (Positivkontrolle) führen zu einer gesteigerten Aktivierung von +389,6 % für CPK6 und +457,6 % für OST1 bei -160 mV (Abbildung 34 A und B). Die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  der Co-Expression der getesteten Calcium-abhängigen Kinasen zeigten unter 25 mM Chlorid in der Badlösung keine charakteristische R-Typ-„Glockenkurve“ (Daten nicht gezeigt).

Somit konnte gezeigt werden, dass ALMT12 in Anwesenheit von extrazellulärem Malat durch die Calcium-abhängigen Kinasen 2, 20 und 6 aktiviert werden kann. Diese Aktivierung resultiert in einer Zunahme der maximalen Einwärtsströme um +123 % für CPK2, +112 % für CPK20 bei -140 mV und +389,6 % für CPK6 bei -160mV. Die Auswärtsströme änderten sich um +94,6 % bei CPK2, +150 % bei CPK20 und +148,4 % bei CPK6, bei +60 mV im Vergleich mit der Expression von ALMT12 ohne zusätzliche Kinase (n = 10 für ALMT12, n = 7 für CPK2, n = 7 für CPK6, n = 8 für CPK17, n = 8 für CPK20, n = 7 für CPK34, n = 4 für OST1). Die Co-Expression von ALMT12 mit den aktivierenden CPKs zeigt außerdem eine Verlagerung der „Glockenkurven“-Stromamplitude in negativere Spannungsbereiche bei gleicher Malatkonzentration in der Badlösung. Somit ist die maximale negative Stromamplitude bei Co-Expression mit CPK2 und CPK20 bei -140 mV, bei Co-Expression mit CPK6 bei -160 mV.



**Abbildung 34: Aktivierung von ALMT12 durch Calcium-abhängige Kinasen in *Xenopus*-Oozyten**

Die Abbildung zeigt die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  im Spannungsbereich von -240 mV bis +60 mV ( $\Delta$  20 mV), bei einer Haltespannung von -20 mV von ALMT12-exprimierende Oozyten sowie die Co-Expression von ALMT12 mit den Calcium-abhängigen Kinasen  $\Delta$ EF (CPK2, 6, 17, 20, 34) und OST1 (A). Die Oozyten wurden nach 2-3 Tagen nach Injektion der cRNA mittels TEVC-Technik unter 25 mM Malat in der Badlösung gemessen und die Anionenströme mittels R-Typ-Spannungspulsprotokoll (Abbildung 11) abgeleitet (n = 10 für ALMT12, n = 7 für CPK2, n = 7 für CPK6, n = 8 für CPK17, n = 8 für CPK20, n = 7 für CPK34, n = 4 für OST1).

Dargestellt sind die Auswärtsströme des Anionenkanals ALMT12 mit und ohne Co-Expression der getesteten Kinasen CPK2, CPK6, CPK17, CPK20; CPK34 und OST1 bei -140 mV (B).

### 3.9 Elektrophysiologische Charakterisierung von Pollenschlauch R-Typ-Anionenströmen in *Arabidopsis thaliana*- Anionenkanal-Verlustmutanten

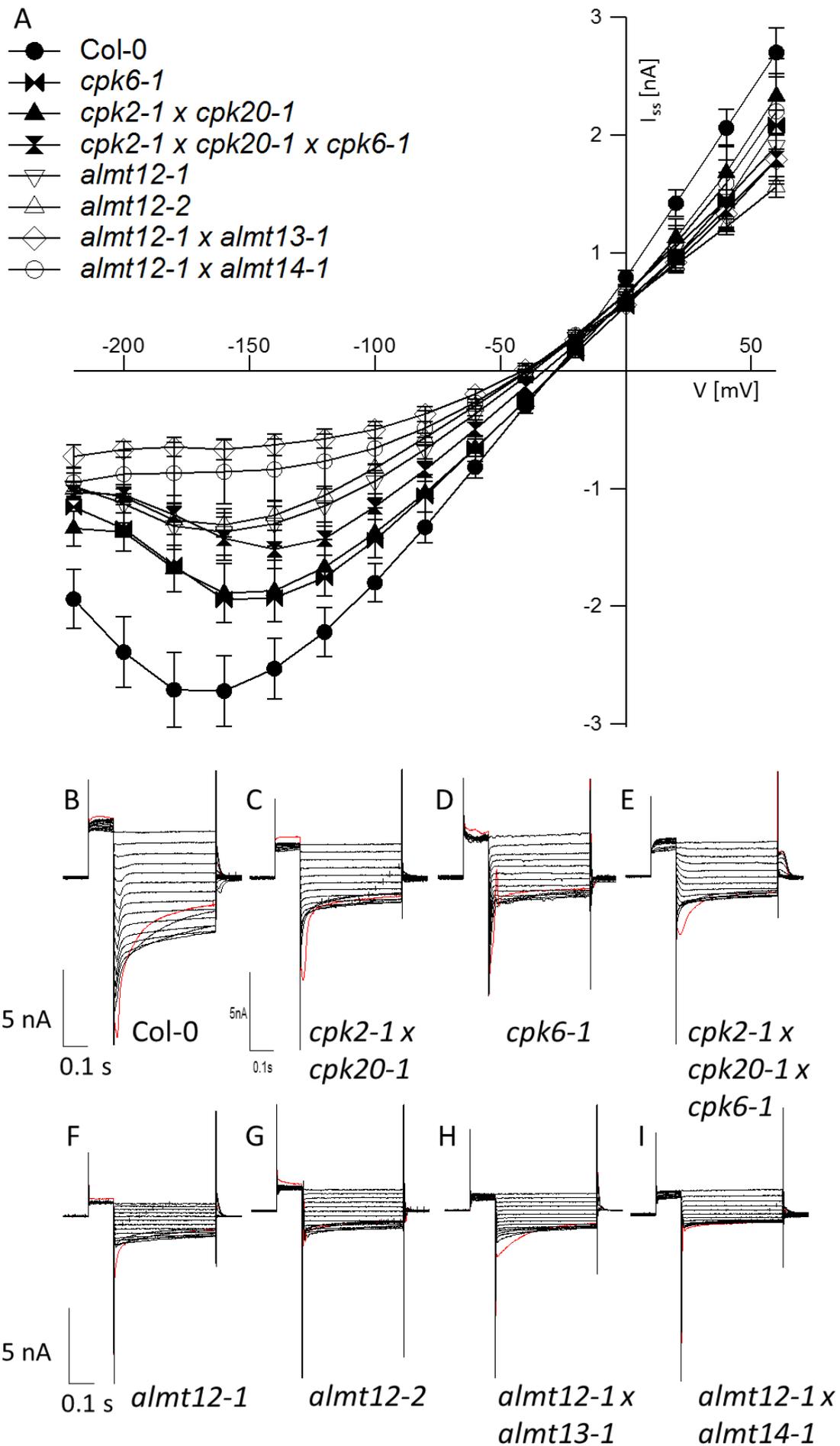
Durch die in den Abschnitten 3.6, 3.7 und 3.8 gewonnenen Erkenntnissen konnte eine optimale Zusammensetzung des Keimungsmediums eruiert werden um die zu charakterisierenden Verlustmutanten R-Typ-Anionenkanäle zu untersuchen. Die elektrophysiologische Charakterisierung der R-Typ-Anionenströme erfolgte auf einem Chlorid-basierten Medium (40 mM Chlorid) dem 20 mM Malat zugefügt wurde, um sowohl eine gesteigerte Transkription von ALMT13 und ALMT14 als auch eine ausreichende Aktivierung der R-Typ-Anionenkanäle durch Malat zu erhalten. Die elektrophysiologische Charakterisierung erfolgte sowohl im Wildtyp-Hintergrund Col-0 als auch zur besseren Auflösung der R-Typ-Kinetik im *slah3-1*-Hintergrund. Im Wildtyp-Hintergrund konnten zwei unabhängige *almt12*-Linien, *almt12-1 x almt13-1* und *almt12-1 x almt14-1* sowie die Doppelverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1*, *cpk6-1* und die Dreifachverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* charakterisiert werden.

Die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  zeigen sowohl im Wildtyp (Abbildung 35) als auch im *slah3-1*-Hintergrund (Abbildung 36), dass der Verlust von ALMT12 zu keinem vollständigen Verlust, sondern nur zu einer Reduzierung der charakteristischen R-Typ-Stromamplitude um 49,6 % in *almt12-1* und 51,8 % in *almt12-2* im Wildtyp-Hintergrund bei -160 mV führt. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Meyer *et al.*, 2010, in Schließzellprotoplasten, da neben ALMT12 noch weitere Vertreter der ALMT-Familie an der charakteristischen R-Typ-Stromantwort beteiligt sind.

Eine weitere Reduzierung der R-Typ-Stromamplitude bei -160 mV um 75,4 % und 68,4 % konnte in der Doppelverlustmutante *almt12-1 x almt13-1* und *almt12-1 x almt14-1* im Wildtyp-Hintergrund (Abbildung 35 A) gemessen werden.

Die Charakterisierung der *cpk2-1 x cpk20-2* Doppelverlustmutante (Abbildung 35 A und C), *cpk6-1*-Verlustmutante (Abbildung 35 A und D) und *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* (Abbildung 35 A und E) stützt die Ergebnisse der Oozyten-Experimente. Der Verlust von *AtCPK2* und *AtCPK20* führt zu einer Reduzierung des Anionenausstroms um 26 %, der Verlust von *AtCPK6* zu einer Reduktion von 25 % im Wildtyp-Hintergrund bei -140 mV. Der Verlust aller drei Gene (Dreifachverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1*) resultiert

in einer 41%igen Stromreduktion bei -140 mV im Vergleich zum Wildtyp Col-0 (n = 16 für Col-0, n = 12 für *almt12-1*, n = 10 für *almt12-2*, n = 11 für *cpk2-1 x cpk20-1*, n = 16 für *cpk6-1*, n = 8 für *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1*, n = 7 für *almt12-1 x almt13-1*, n = 11 für *almt12-1 x almt14-1*).



**Abbildung 35: Charakterisierung von R-Typ-Anionenströmen verschiedener Verlustmutanten im Vergleich zu Col-0-Pollenschläuchen**

Gemessen wurden die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  von Col-0-Pollenschläuchen, *almt12-1* und *almt12-2*-Verlustmutanten, der Verlustmutanten *cpk6-1* und *cpk2-1 x cpk20-1* und *almt12-1 x almt13-1* und *almt12-1 x almt14-1*. Col-0-Pollenschläuche und Verlustmutanten wurden mittels TEVC-Technik bei 20 mM Malat und 40 mM Chlorid im Keimungsmedium gemessen. Die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  wurden gegen die applizierte Membranspannung von -220 mV (rote Stromspur) bis +60 mV ( $\Delta 20$  mV) aufgetragen, wobei die Haltespannung dem Membranpotenzial der Zelle angepasst wurde (A). Die makroskopischen Ganzzellströme zeigen in Col-0 (B) eine schnelle Deaktivierung bei negativen Spannungspulsen, welche in den CPK-Verlustmutanten *cpk2-1 x cpk20-1* (C), *cpk6-1* (D) und *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* (E) reduziert ist. Die Verlustmutanten *almt12-1* (F) und *almt12-2* (G) und die beiden Doppelverlustmutanten *almt12-1 x almt13-1* (H) und *almt12-1 x almt14-1* (I) zeigen eine weitere Reduktion der charakteristischen R-Typ-Glockenkurven-Kinetik sowie der Stromamplitude bei -140 mV (n = 16 für Col-0, n = 12 für *almt12-1*, n = 10 für *almt12-2*, n = 11 für *cpk2-1 x cpk20-1*, n = 16 für *cpk6-1*, n = 8 für *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1*, n = 7 für *almt12-1 x almt13-1*, n = 11 für *almt12-1 x almt14-1*).

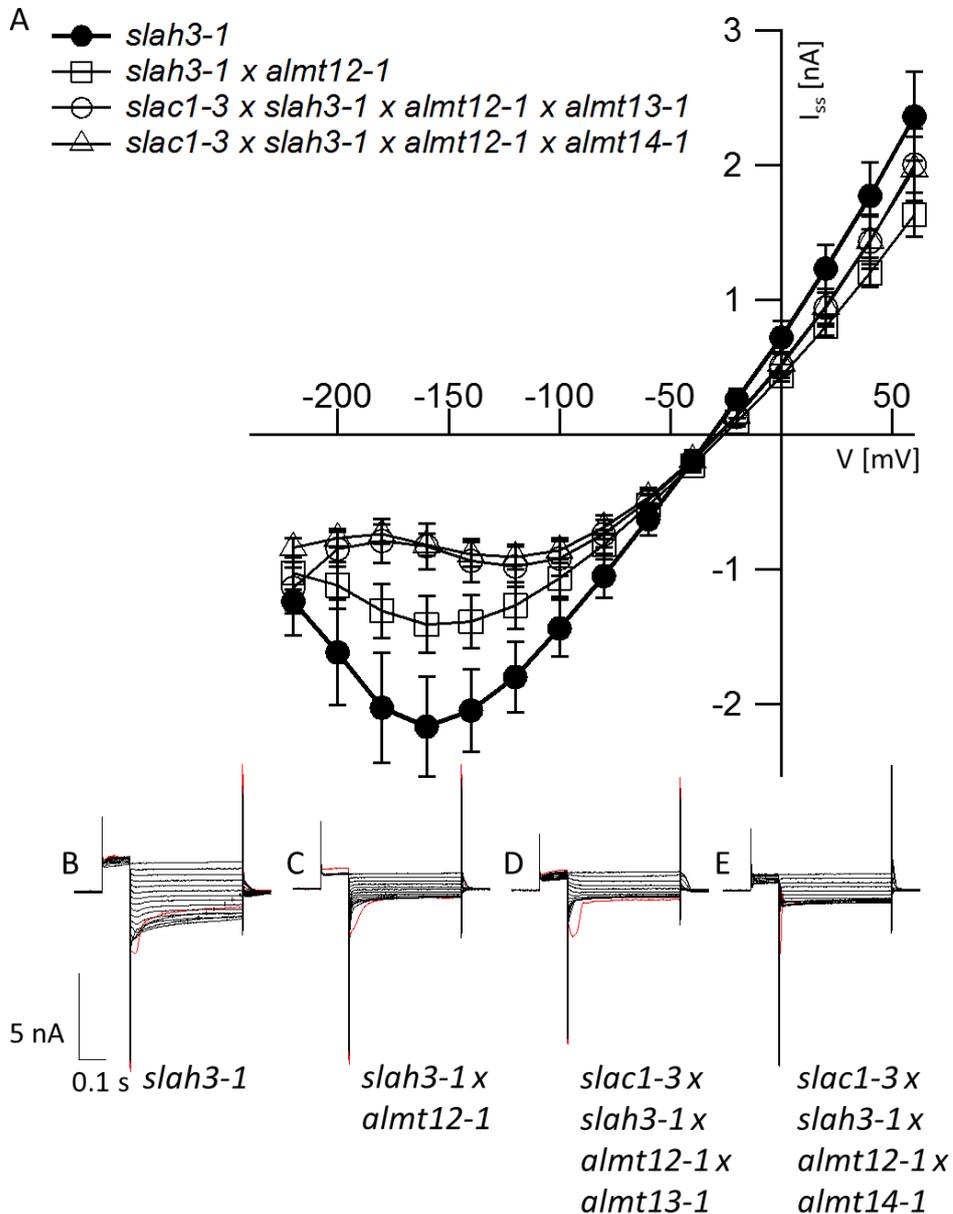
Für die bessere Auflösung der R-Typ-Anionenströme in der *slah3-1*-Verlustmutante wurden die Vierfachverlustmutanten (*slac1-3 x slah3-1 x almt12-1 x almt13-1* bzw. *slac1-3 x slah3-1 x almt12-1 x almt14-1*) verwendet. Diese Vierfachverlustmutanten sind in Pollenschläuchen als Dreifachverlustmutanten zu sehen, da die Transkriptionsanalyse (Abbildung 14) ergab, dass SLAC1 nicht in Pollenschläuchen exprimiert wird und somit keinen Einfluss auf die Ganzzellströme hat. Diese Anionenkanal-Verlustmutanten wurden freundlicherweise von Mikael Brosché und Hannes Kollist bereitgestellt.

Beide Vierfachverlustmutanten (*slac1-3 x slah3-1 x almt12-1 x almt13-1* und *slac1-3 x slah3-1 x almt12-1 x almt14-1*) führen zu einer weiteren Reduzierung der Glockenkurven-Kinetik, nie aber den vollständigen Verlust der R-Typ-Anionenströme. Da *AtALMT13* und *AtALMT14* auf einem Chromosom lokalisiert sind, konnte keine Dreifachverlustmutante generiert werden, bei der eine gleichzeitige Deletion von ALMT13 und ALMT14 zusammen mit ALMT12 vermutlich zu einer weiteren Reduktion, wenn nicht sogar vollständigem Verlust der R-Typ-charakteristischen Kinetik geführt hätte.

Der Verlust von *AtALMT12* allein führt zu einer 35%igen Reduktion des Anionenausstroms bei -160 mV im *slah3-1*-Hintergrund. Der zusätzliche Verlust von *AtALMT13* und *AtALMT14* führt zu einer weiteren Reduktion des Anionenausstroms von 61,75 % für *almt12-1 x almt13-1* und 62,2 % *almt12-1 x almt14-1* bei -160 mV im *slah3-1*-Hintergrund (Abbildung 36 A). Die verbleibenden R-Typ-Anionenströme könnten jeweils von dem noch aktiven R-Typ-Anionenkanal ALMT13 oder ALMT14 vermittelt werden (n = 26 für *slah3-1*, n = 23 für *slah3-1 x almt12-1*, n = 16 für *slac1-3 x slah3-1 x almt12-1 x almt13-1*, n = 10 für *slac1-3 x slah3-1 x almt12-1 x almt14-1*).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Anionenkanäle ALMT12, ALMT13 und ALMT14 (der Einfluss von ALMT11 muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden) zum Großteil

für die in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen gemessenen charakteristischen R-Typ-Anionenströme verantwortlich sind.



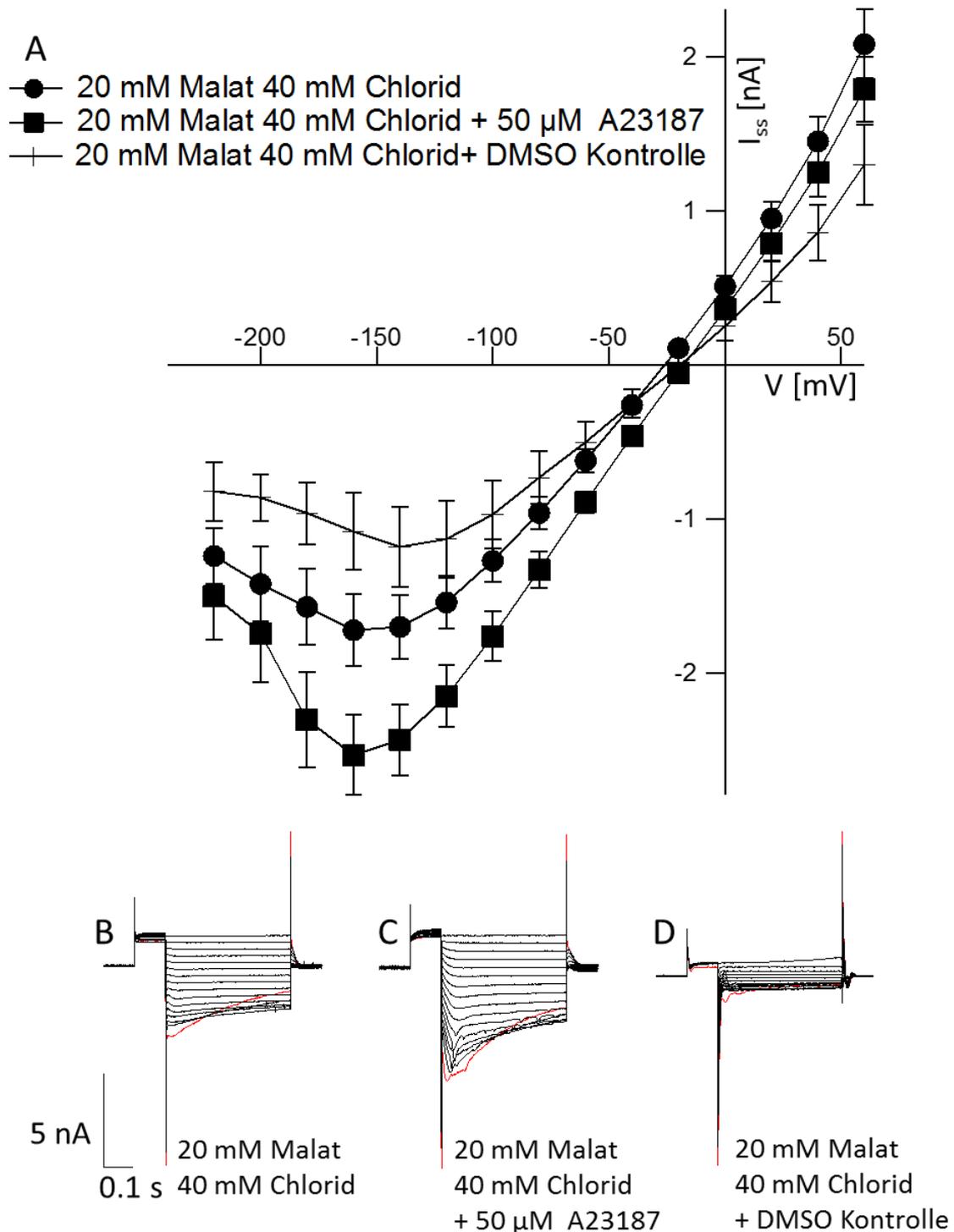
**Abbildung 36: Charakterisierung von R-Typ-Anionenströmen in verschiedenen *slah3-1*-Verlustmutanten**

Gemessen wurden die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  im *slah3-1*-Hintergrund von *slah3-1 x almt12-1*, *slac1-3 x slah3-1 x almt12-1 x almt13-1* und *slac1-3 x slah3-1 x almt12-1 x almt14-1*. Die *slah3-1*-Pollenschläuche und Verlustmutanten wurden mittels TEVC-Technik bei 20 mM Malat und 40 mM Chlorid im Keimungsmedium gemessen. Die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  wurden gegen die applizierte Membranspannung von -220 mV (rote Stromspur) bis +60 mV ( $\Delta 20$  mV) aufgetragen, wobei die Haltespannung dem Membranpotenzial der Zelle angepasst wurde ( $n = 26$  für *slah3-1*,  $n = 23$  für *slah3-1 x almt12-1*,  $n = 16$  für *slac1-3 x slah3-1 x almt12-1 x almt13-1*,  $n = 10$  für *slac1-3 x slah3-1 x almt12-1 x almt14-1*) (A). Die makroskopischen Ganzzellströme zeigen in *slah3-1*-Pollenschläuchen eine schnelle Deaktivierung bei negativen Spannungspulsen (B), welche in der Doppelverlustmutante *slah3-1 x almt12-1* (C) und beiden Quatruple-Verlustmutanten *slac1-3 x slah3-1 x almt12-1 x almt13-1* (D) und *slac1-3 x slah3-1 x almt12-1 x almt14-1* (E) weit weniger ausgeprägt ist.

### 3.10 Calcium-abhängiger R-Typ-vermittelter Anionenausstrom in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen

Die bereits für den S-Typ-Anionenkanal SLAH3 gezeigte Calcium-abhängige Aktivierung durch Calcium-abhängige Kinasen wurde, wie in Abbildung 25 ersichtlich, auch durch die Anwendung des Calcium-Ionophor A23187 mit der TEVC-Technik an Pollenschläuchen getestet. Um ausschließlich die Calcium-Abhängigkeit für die R-Typ-Stromantwort zu analysieren, wurden *slah3-1*-Pollenschläuche in 20 mM Malat und 40 mM Chlorid im Keimungsmedium herangezogen. Die Ableitungen der Ganzzellströme erfolgten vor und nach der Applikation des Calcium-Ionophors. Nach der Applikation von A23187 erfolgte, wie bereits in Abschnitt 3.5 beschrieben, eine Depolarisierung des freien Membranpotenzials. Während dieser Depolarisierung wurden die Ganzzellströme abgeleitet und mit den zuvor aufgezeichneten A23187-freien Ganzzellströmen verglichen

Die charakteristischen R-Typ-Anionenströme zeigen eine Calcium-abhängige Steigerung des Anionenausstroms nach Perfusion mit 50  $\mu$ M A23187 (gelöst in DMSO) bei -160 mV um +43,1 %, wohingegen sich der Anionenausstrom bei der Perfusion mit der DMSO-Kontrolle um 37,8 % verringert (Abbildung 37 A). Die makroskopischen Ganzzellströme vor Perfusion mit dem Calcium-Ionophor A23187 zeigen die typische schnelle Deaktivierung im negativen Spannungsbereich. Nach Perfusion mit A23187 kommt es zu einer Steigerung der Einwärtsströme und einer Zunahme der charakteristischen R-Typ-Kinetik (Abbildung 37 B auf C). Nach Perfusion mit der DMSO-Kontrolle kommt es zu einer Reduktion der makroskopischen Ganzzellströme sowie zu einer Abnahme der charakteristischen R-Typ-Glockenkurven-Kinetik (Abbildung 37 B auf D) (n = 16 für 20 mM Malat + 40 mM Chlorid, n = 10 für 20 mM Malat + 40 mM Chlorid + 50  $\mu$ M A23187, n = 6 für 20 mM Malat + 40 mM Chlorid + DMSO-Kontrolle).



**Abbildung 37: Calcium-induzierte Aktivierung der R-Typ-Anionenkanal-Stromantwort in Pollenschläuchen der *slah3-1*-Verlustmutante**

Dargestellt sind die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  im Spannungsbereich von -220 mV (rote Stromspur) bis +60 mV ( $\Delta 20$  mV), ausgehend von der Haltespannung, welche dem Membranpotenzial der Zelle angepasst wurde, in 20 mM Malat 40 mM Chlorid-Medium von *slah3-1* vor und nach der Perfusion mit dem Calcium-Ionophor A23187 (A) ( $n = 16$  für 20 mM Malat + 40 mM Chlorid,  $n = 10$  für 20 mM Malat + 40 mM Chlorid + 50  $\mu$ M A23187,  $n = 6$  für 20 mM Malat + 40 mM Chlorid + DMSO-Kontrolle). Die makroskopischen Ganzzellströme zeigen in der *slah3-1*-Verlustmutante die jeweils charakteristische R-Typ-Kinetik vor der Perfusion mit 50  $\mu$ M A23187 (gelöst in DMSO) kommt es in der *slah3-1*-Verlustmutante zu einer Zunahme der Einwärtsströme sowie zu einer weiteren Ausprägung

der charakteristischen schnellen R-Typ-Deaktivierungskinetik (C). Die Perfusion mit der verwendeten DMSO-Kontrolle resultiert im Gegensatz zur A23187-Perfusion in einer Abnahme der Ein- und Auswärtsströme und einer Reduktion der charakteristischen R-Typ-Glockenkurven-Kinetik (D).

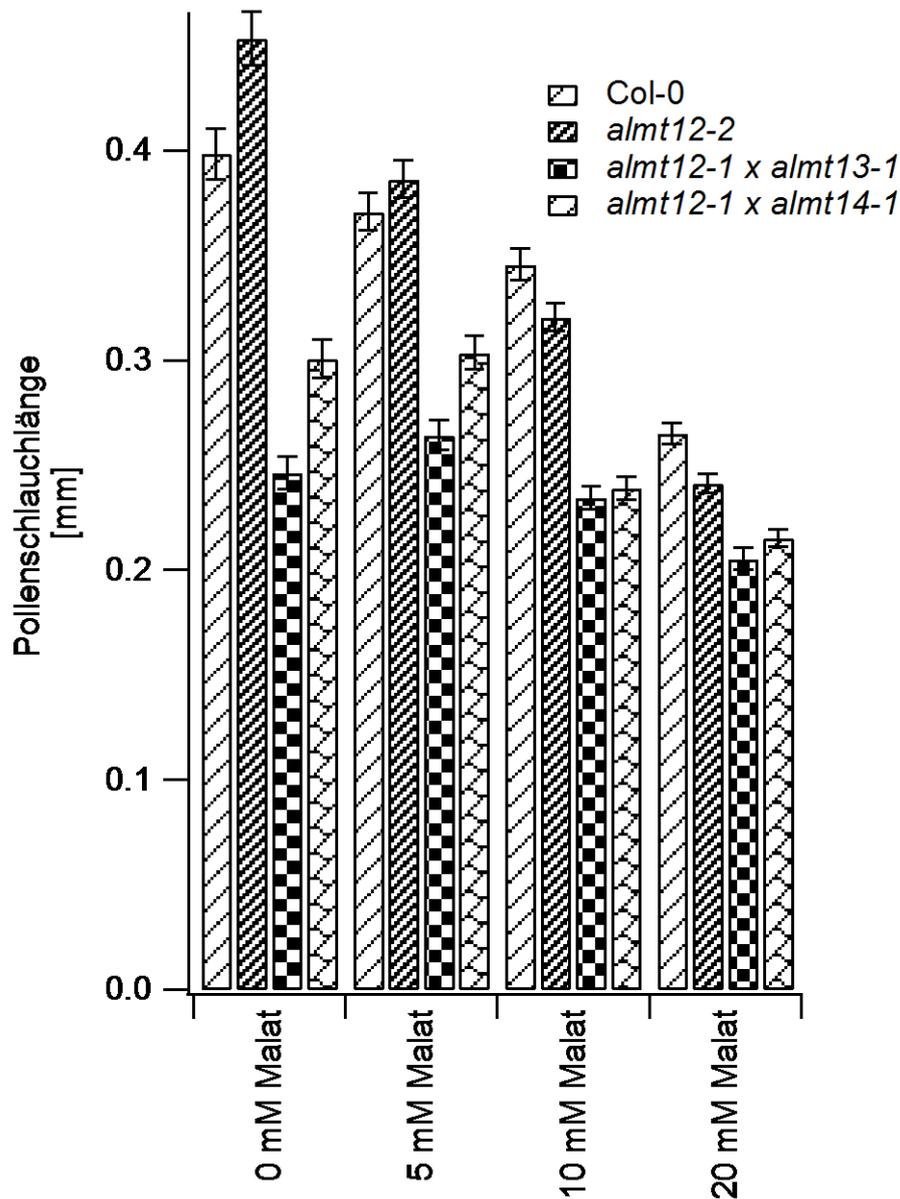
### **3.11 *Arabidopsis thaliana*-Pollenschlauch Wachstums- Phänotyp-Analyse mit R-Typ-Anionenkanal- Verlustmutanten**

Der in Abschnitt 3.9 gezeigte Malat-abhängige Einfluss der Anionenkanäle ALMT12, ALMT13 und ALMT14 auf die Ganzzellströme in 20 mM Malat und 40 mM Chlorid Keimungsmedium und der daraus resultierende Effekt auf die Anionen-Homöostase sollte nun durch die in Abschnitt 2.4.2 beschriebene Phänotyp-Analyse überprüft werden. Hierdurch sollte die Relevanz der Anionenkanalaktivität von ALMT12, ALMT13 und ALMT14 für das Pollenschlauchwachstum *in vitro* nachgewiesen werden. Die Malatkonzentration im 40 mM Chlorid-Keimungsmedium wurde von 0 mM Malat auf 5 mM, 10 mM und 20 mM Malat angehoben und der Einfluss auf das Längenwachstum beobachtet. Die Phänotyp-Analyse wurde dreimal repliziert und die Ergebnisse im Anschluss gemittelt.

Sowohl die Wildtyp-Linie Col-0 als auch die getesteten Verlustmutanten zeigen ein reduziertes Längenwachstum mit steigender Malatkonzentration (Abbildung 38). Hierbei wird ersichtlich, dass die getestete Verlustmutante *almt12-2* sensibler auf höhere extrazelluläre Malatkonzentration reagiert, was sich in einer stärkeren Reduktion des Längenwachstums bei einem Anstieg von 0 mM auf 20 mM Malat äußert. Der Wildtyp Col-0 zeigt bei einem Anstieg von 0 mM auf 20 mM Malat im Keimungsmedium eine 33,4%ige Reduktion des Längenwachstums, *almt12-2* eine Reduktion von 53,3 % und die beiden Doppelverlustmutanten *almt12-1 x almt13-1* und *almt12-1 x almt14-1* zeigen jeweils eine schwächere Reduktion des Längenwachstums von 10,3 % und 21,4 %.

Weiterhin zeigt die Verlustmutante *almt12-2* mit steigender Malatkonzentration ab 10 mM eine signifikante Reduktion des Längenwachstums im Vergleich zum Wildtyp von 7,3 % bei 10 mM und 9,0 % bei 20 mM Malat, während die beiden Doppelverlustmutanten *almt12-1 x almt13-1* und *almt12-1 x almt14-1* auf allen getesteten Medienkonditionen eine deutliche Reduktion des Längenwachstums im Vergleich zum Wildtyp Col-0 zeigen. Die Verlustmutante *almt12-1 x almt13-1* zeigt eine

32,1%ige und 22,6%ige Reduktion der Pollenschlauchlänge im Vergleich zu Col-0 auf 10 mM und 20 mM Malat. Die Verlustmutante *almt12-1 x almt14-1* zeigt ebenfalls eine Reduktion des Längenwachstums von 30,9 % und 18,8 % im Vergleich zu Col-0 auf 10 mM und 20 mM Malat im Keimungsmedium (Abbildung 38).



**Abbildung 38: Vermindertem Pollenschlauchwachstum in ALMT-Anionenkanal-Verlustmutanten *in vitro***

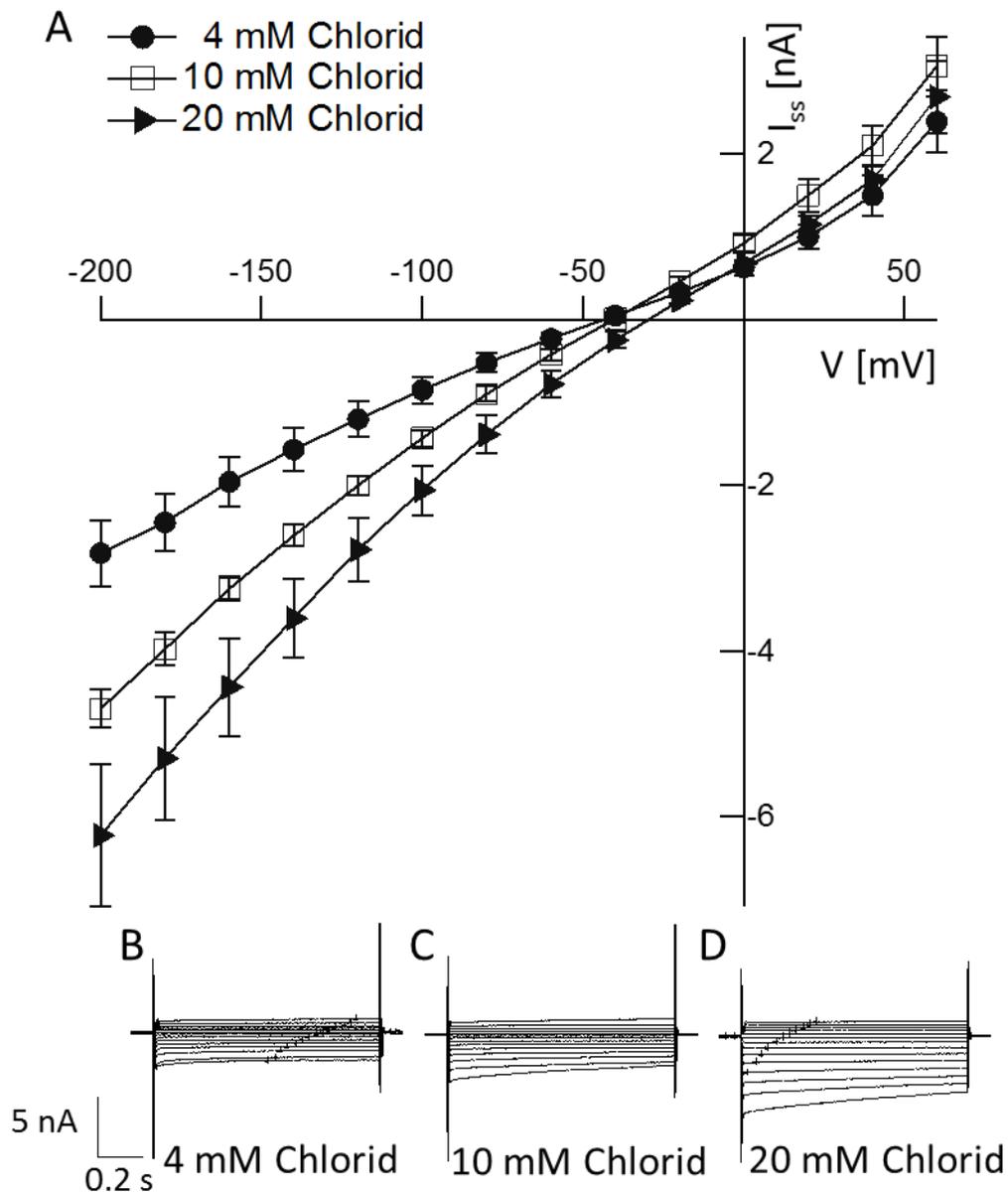
Die Pollen der Wildtyplinie Col-0 sowie der Verlustmutante *almt12-2* und der beiden Doppelverlustmutanten *almt12-1 x almt13-1* und *almt12-1 x almt14-1* wurden nach einer Wachstumszeit von 6 h auf variierenden Malatkonzentrationen 0 mM, 5 mM, 10 mM und 20 mM + 40 mM Chlorid im Keimungsmedium vermessen. Je Konzentration wurden mindestens 250 Pollenschläuche je Linie pro Phänotyp-Analyse gemessen. Die Phänotyp-Analyse wurde dreimal an unterschiedlichen Tagen repliziert und die Ergebnisse im Anschluss gemittelt ( $n = 3$ ).

### 3.12 Charakterisierung von zytoplasmatischen Calcium- und Chlorid-Oszillationen in der Spitze von Tabak-Pollenschläuchen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen einen Zusammenhang der zytoplasmatischen Calcium- und Anionenkonzentrationen durch Calcium-abhängige Kinasen in der Pollenschlauchspitze. Um ein besseres Verständnis für diese Verknüpfung in lebenden Pollen zu erhalten, wurden Fluoreszenzmikroskopie und TEVC-Technik miteinander kombiniert. Hierzu wurden stabile pLat52-YC3.6 oder pLat52-Cl<sup>-</sup>-Sensor-Linien (generiert von Dr. Kai Konrad) auf 20 mM Chlorid-Medium angezogen und mittels TEVC-Technik definierte Spannungspulse in intakte Pollenschläuche appliziert, um den in *Arabidopsis thaliana* postulierten Mechanismus des Calcium-vermittelten Anionenausstroms zu überprüfen. In Hamilton *et al.*, 2000, und Stange *et al.*, 2010, wird der Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration durch Hyperpolarisation des Membranpotenzials in *Nicotiana tabacum* und *Vicia faba*-Schließzellen beobachtet, welcher durch hyperpolarisationsaktivierte Calciumkanäle (HACCs) in der Plasmamembran verursacht wird. Während Hamilton *et al.*, 2000, die Existenz von HACCs in Schließzellprotoplasten mittels Patch-Clamp-Technik nachweisen konnte, verwendete Stange *et al.*, 2010, intakte Schließzellen, welche mit Hilfe der TEVC-Technik vermessen wurden. Der durch die HACCs verursachte Calciumanstieg führte zu einer Zunahme der S-Typ-vermittelten Anionenströme in Schließzellen. In Pollenschläuchen konnte die Existenz solcher hyperpolarisations-aktivierten Calciumkanäle bereits in *Lilium davidii* (Shang *et al.*, 2005), *Pyrus pyrifolia* (Qu *et al.*, 2007), *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2004) mittels Patch-Clamp-Messungen an Protoplasten, aber noch nie in intakten Pollenschläuchen nachgewiesen werden. Die Kombination von TEVC-Technik und Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht erstmals die gezielte Aktivierung von HACCs bei gleichzeitiger Visualisierung der zytoplasmatischen Calcium- oder Chloridkonzentration und Aufzeichnung der abgeleiteten Ganzzellströme in intakten Pollenschläuchen. Um sicherzustellen, dass es sich bei den abgeleiteten Ganzzellströmen um Anionenströme handelt, wurden diese analog zu den *Arabidopsis thaliana*-Messungen (Abbildung 19) durch steigende Chloridkonzentrationen im Badmedium in Tabak-Pollenschläuchen charakterisiert.

Die applizierten Spannungspulse basieren auf dem in Abschnitt 9 beschriebenen S-Typ-Spannungspuls-Protokoll. Abbildung 39 zeigt die abgeleiteten

S-Typ-Anionenströme in Tabak-Pollenschläuchen auf Chlorid-basierten Keimungsmedien mit unterschiedlichen Chloridkonzentrationen. Ähnlich wie in *Arabidopsis thaliana* können charakteristisch S-Typ-Anionenströme mit einer relativ langsamen Deaktivierungskinetik im Hyperpolarisationsbereich in *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen nachgewiesen werden (Abbildung 39 B, C und D). Durch die Erhöhung der extrazellulären Chloridkonzentration kommt es zu einem Anstieg der Gleichgewichtsströme im negativen Spannungsbereich, ausgehend von 4 mM Chlorid um 66,7 % bei 10 mM und 120 % bei 20 mM Chlorid bei -200 mV (n = 6 für 4 mM Chlorid, n = 6 für 10 mM Chlorid, n = 5 für 20 mM Chlorid). Somit konnte gezeigt werden, dass *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuche wie *Arabidopsis thaliana* S-Typ-Anionenkanäle exprimieren und diese eine Leitfähigkeit für Chlorid besitzen.



**Abbildung 39: Charakteristische S-Typ-Anionenströme in Tabak-Pollenschläuchen auf einem Wachstumsmedium mit unterschiedlichen Chloridkonzentrationen**

Dargestellt sind die abgeleiteten Ganzzellströme von Tabak-Pollenschläuchen mittels TEVC-Technik unter Variation der Chloridkonzentration (4 mM, 10 mM und 20 mM) im Keimungsmedium ( $n = 6$  für 4 mM Chlorid,  $n = 6$  für 10 mM Chlorid,  $n = 5$  für 20 mM Chlorid). Die Gleichgewichtsströme  $I_{ss}$  wurden im Spannungsbereich von -200 mV bis +60 mV ( $\Delta 20$  mV) aufgenommen. Die Haltespannung wurde dem Membranpotenzial der Zelle angepasst.

Die abgeleiteten Gleichgewichtsströme zeigen eine ansteigende Stromamplitude des Chloridausstroms bei ansteigenden Chloridkonzentrationen im Keimungsmedium. Abbildung B zeigt eine exemplarische Tabak-Pollenschlauch-Ganzzellstrom-Ableitung in 4 mM (C) und 20 mM (D) Chlorid Keimungsmedium mit langsamer S-Typ-Deaktivierungskinetik im negativen Spannungsbereich.

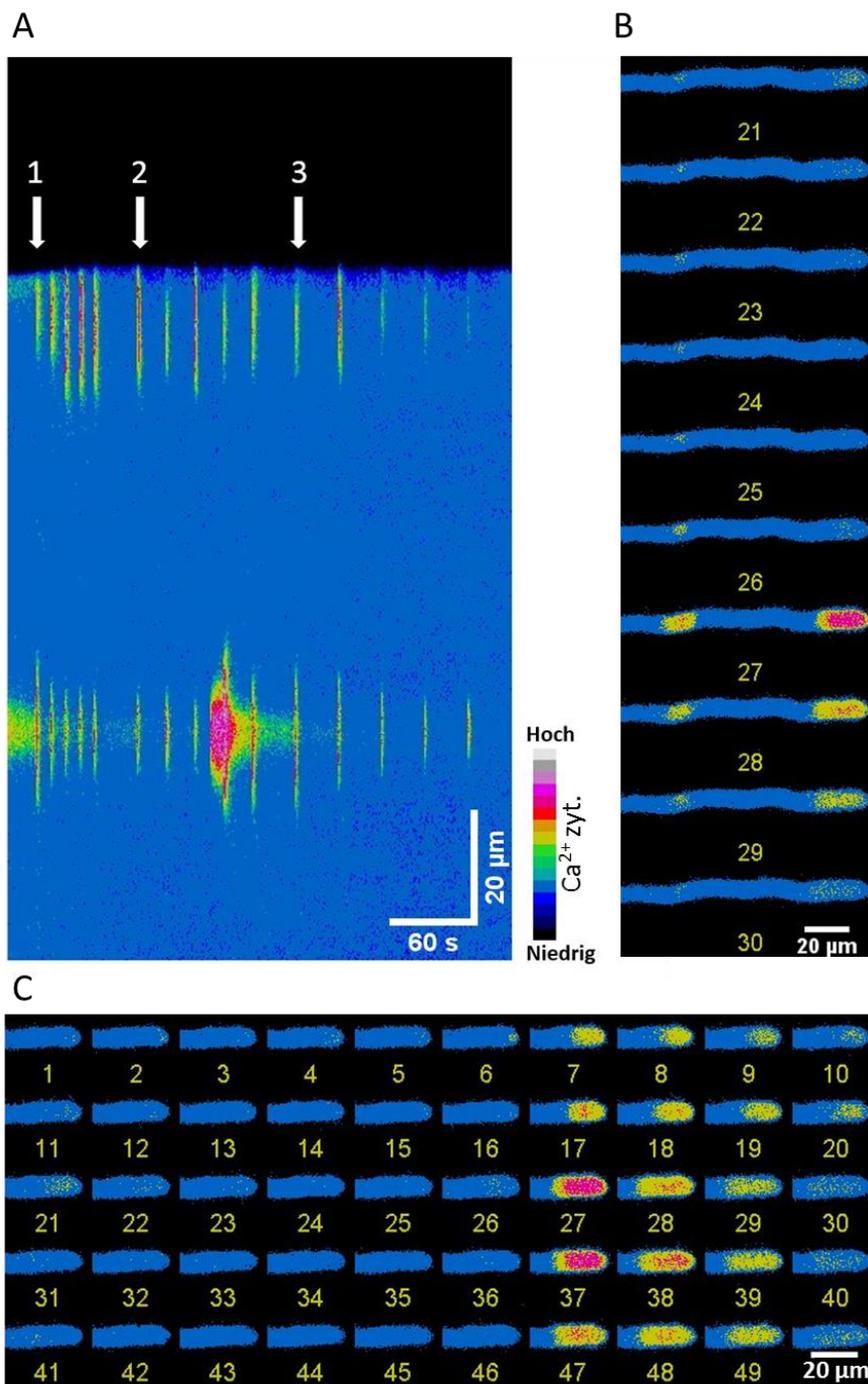
### 3.13 Simultane Anwendung der TEVC-Technik und Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung der Calciumkanal vermittelten Anionenkanalaktivierung

Durch die Kombination aus Fluoreszenzmikroskopie und TEVC-Technik ist es möglich, durch hyperpolarisierende Spannungspulse (-200 mV für 1 s) Calciumsignale, welche mit einem Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration gleichzusetzen sind, in der Pollenschlauchspitze von pLat52-YC3.6 auszulösen und die korrespondierenden Stromantworten aufzuzeichnen. Die Applikation der Spannungspulse erfolgt bei einem über die gesamte Messung geklemmten Membranpotenzial der Zelle (ca. -25 bis -40 mV), was zu einem Wachstumsstopp des Pollenschlauchs führt. Die induzierte Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration durch den Hyperpolarisations-Spannungspuls war in den meisten Messungen auch an der Einstichstelle der Elektrode zu sehen (Abbildung 40 A und C) und wird nicht durch einen Ionenkanal vermittelt.

Abbildung 40 zeigt, dass sich durch die Applikation von einer Sekunde andauernden Hyperpolarisationspulsen die Calciumkonzentration in der Pollenschlauchspitze in beliebiger Frequenz reproduzierbar erhöhen lässt. Exemplarisch wurden je fünf Hyperpolarisierungspulse im Abstand von 10 s, 20 s und 30 s (Abbildung 40 A 1, 2, 3) ( $n = 4$ ) appliziert. Die zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhungen begrenzen sich nur auf die Pollenschlauchspitze, es kommt zu keinem Calciumeinstrom in der subapikalen Zone. Die Lokalisation des Calciumeinstroms entspricht dem natürlichen in Pollenschläuchen existierenden Calciumgradienten. Hyperpolarisations-aktivierte Calciumkanäle in Pollen wurden schon in Qu *et al.*, 2007, in *Pyrus pyrifolia* und in Very *et al.*, 2000, in Wurzelhaaren beschrieben. Allerdings wurden hierzu Protoplasten, nicht aber intakte Zellen untersucht, die sich beim enzymatischen Verdau der Zellwand von der Spitze der tubulösen Zellen abschnüren. Durch diese Arbeit wird die Existenz eines spitzenlokalisierten hyperpolarisations-aktivierten Calciumkanals gestützt, der ausschließlich im apikalen Bereich dieser Zellen lokalisiert sein muss.

Die folgenden Ergebnisse wurden in 20 mM Chloridmedium (siehe Tabelle 1) durchgeführt und mittels kymographischer Auswertung dargestellt. Dies zeigt das Pollenschlauchwachstum bzw. die Änderung der Fluoreszenzratio entlang des Pollenschlauchs ( $y$ -Achse) über die Zeitdauer ( $x$ -Achse) des Experiments. Jede vertikale Pixelreihe stellt die Fluoreszenzratio entlang des Pollenschlauches eines Bildes der

Bilderserie dar, welche im Abstand von 1 s aufgenommen wurden. Die kymographische Darstellung zeigt den Pollenschlauch von der Einstichstelle (unten im Bild) bis zur Pollenschlauchspitze (oberer Teil des Bildes). Die kymographische Darstellungsweise in Abbildung 40 A des Experiments zeigt den Calciueinstrom aller drei Frequenzreihen mit je 5 durch Hyperpolarisation für 1 s bei -200 mV induzierten Calciumkanalaktivierungen im Abstand von 10 s, 20 s und 30 s an der Spitze (Abbildung 40 A 1, 2 und 3) und an der Einstichstelle des Pollenschlauchs. Abbildung 40 B visualisiert eine Zeitreihe der in Abbildung 40 A 1 dargestellten 10 s-Frequenzreihe. Hier wird die an der Pollenschlauchspitze beginnende und sich in den subapikalen Bereich fortsetzende Calciumkonzentrationserhöhung sichtbar. Es kommt zur zytosolischen Erhöhung der Calciumkonzentration, ausgehend von der Pollenschlauchspitze, welche sich in den subapikalen Bereich ausdehnt (Abbildung 40 C z. B. Bild 6-10). Abbildung 40 B dokumentiert den Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration während eines Hyperpolarisationspulses sowohl an der Pollenschlauchspitze als auch an der Einstichstelle im hinteren Bereich des Pollenschlauchs. Somit konnte die Existenz von hyperpolarisationsaktivierten Calciumkanälen in der Pollenschlauchspitze von *Nicotiana tabacum* aufgezeigt werden.



**Abbildung 40: Lokale Aktivierung von Hyperpolarisations-aktivierten Calcium-permeablen Kanälen in der Pollenschlauchspitze**

Eine Kombination von Fluoreszenzmikroskopie und TEVC wurde an stabil transformierten Tabak-Pollenschläuchen durchgeführt, die den zytosolischen Calcium-Sensor YC3.6 unter dem pollenspezifischen Promotor pLeLAT52 exprimierten. Gezeigt ist eine kymographische Darstellung (A) einer repräsentativen Zeitreihen-Messung in 20 mM Chlorid-Keimungsmedium bei der jeweils 5 Spannungspulse (-200 mV für 1 s) alle 10 s (1), 20 s (2) oder 30 s (3) appliziert wurden ( $n = 4$ ). Durch Applikation des -200 mV Spannungspulses kommt es zu einer Zunahme der Fluoreszenzratio CFP@YFP/CFP@CFP (Calciumstrom) an der Pollenschlauchspitze sowie der Elektroden-Einstichstelle. In Abbildung (B) wird die Zu- und Abnahme der Fluoreszenzratio an der Pollenschlauchspitze und der Einstichstelle als Zeitreihe (1 s/Bild) über einen -200 mV Spannungspuls dargestellt. Abbildung (C) zeigt eine Zeitreihe (1 s/Bild) der Pollenschlauchspitze über 5 Spannungspulse mit der Frequenz von 10 s (A.1).

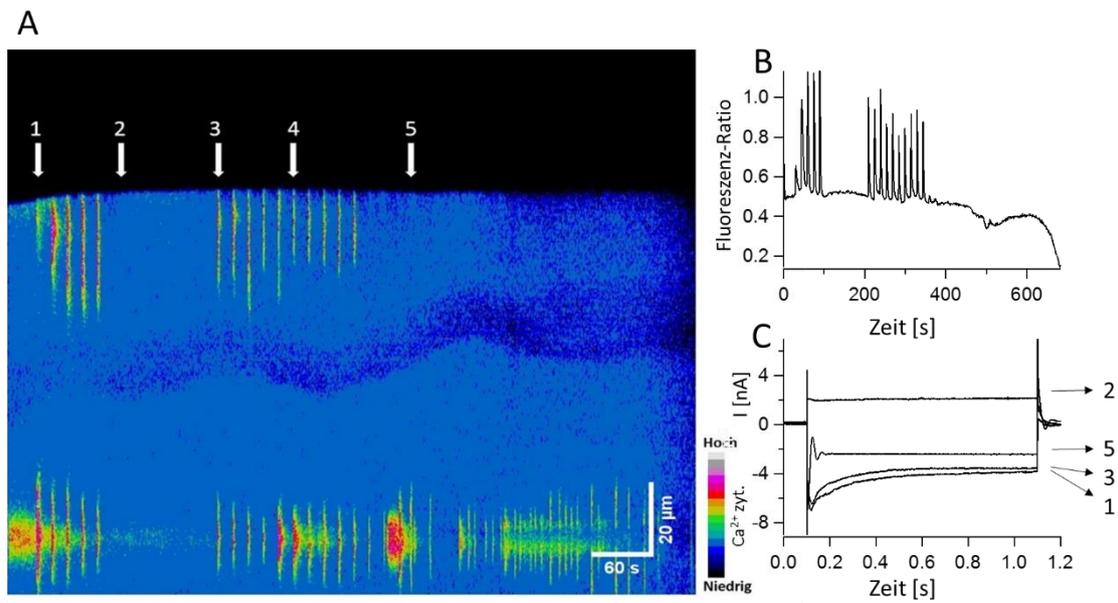
### 3.14 Modulierung der Calciumkanal-Aktivität durch den Calciumkanal-Inhibitor Lanthan an der Pollenschlauchspitze

Zur Charakterisierung des spitzenlokalisierten Calciumeinstroms wurde die Spannungsabhängigkeit der in der apikalen Zone lokalisierten Calciumkanäle getestet. Zuerst wurden 5 Hyperpolarisationspulse (-200 mV für 1 s im Abstand von 15 s), danach 5 Depolarisationspulse (+60 mV für 1 s im Abstand von 15 s) und im Anschluss dauerhaft Hyperpolarisationspulse im Abstand von 15 s appliziert, wobei nach den ersten 5 Hyperpolarisationspulsen 100  $\mu$ M Lanthanchlorid eingespült wurde ( $n = 3$ ). Lanthan fungiert als Calciumkanal-Inhibitor und wurde bereits von Qu *et al.*, 2007, zur Inhibierung des Calciumeinstroms in *Pyrus pyrifolia*-Pollenschlauchprotoplasten verwendet.

Abbildung 41 reflektiert die Zunahme der Fluoreszenzintensität während des oben beschriebenen Spannungspulsprotokolls an der Pollenschlauchspitze. Die Erhöhung der Fluoreszenzintensität ist gleichbedeutend mit einer spitzenlokalisierten Calciumkonzentrationserhöhung. Diese Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration wird durch die spitzenlokalisierten Calciumkanäle vermittelt. Diese Zunahme der Fluoreszenzintensität (Abbildung 41 B) wird ausschließlich durch die Hyperpolarisationspulse von -200 mV für 1 s (Abbildung 41 A: 1 und 3) nicht aber durch Depolarisationspulse von 60 mV für 1 s (Abbildung 41 A 2) ausgelöst.

Die Perfusion mit dem Calciumkanal-Inhibitor Lanthan führte zur kompletten Inhibierung der durch den Spannungspuls induzierten  $Ca^{2+}$ -Konzentrationserhöhung an der Spitze, nicht aber an der Einstichstelle, was für eine nicht kanalvermittelte artifizielle  $Ca^{2+}$ -Konzentrationserhöhung spricht, die durch die Einstichelektrode verursacht wird, da dort der Calciumeinstrom nicht durch den Calciumkanal-Inhibitor Lanthan inhibiert wird. Betrachtet man die bei den Hyperpolarisationspulsen gemessenen Ströme (Abbildung 41 C), erkennt man in den Hyperpolarisationspulsen 1 und 3 (Abbildung 45 C) die charakteristische S-Typ-Stromantwort. Die Hyperpolarisationspulse 1 und 3 zeigen keine signifikante Abweichung voneinander ( $I_{ss}$  reduziert sich lediglich um 7,5 %), erst nach der Inhibierung der Calciumkanäle durch 100  $\mu$ M Lanthan (Abbildung 45 C Hyperpolarisationspuls 5) ist die apikale Calciumkonzentrationserhöhung nicht mehr zu erkennen. Die gemessenen Anionenströme ( $I_{ss}$ ) reduzieren sich, ausgehend von Hyperpolarisationspuls 1 um 36 % nach der Applikation von Lanthan (Hyperpolarisationspuls 5).

Dieses Experiment konnte aufzeigen, dass die Hyperpolarisation zur Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -permeablen Kanälen in der Pollenschlauchspitze führt, und der daraus resultierende Calciumeinstrom beeinflusst wiederum die Aktivität der Anionenkanäle positiv.



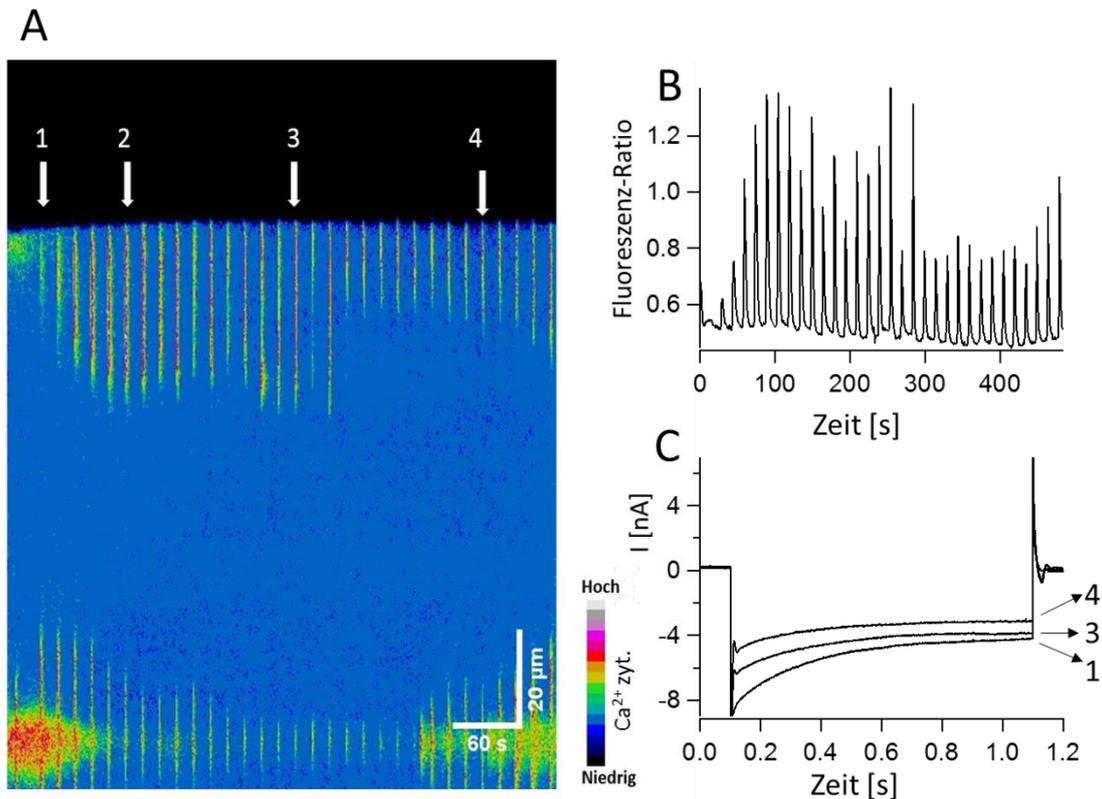
**Abbildung 41: Spannungsabhängige Aktivierung der spitzenlokalisierten Calciumkanäle durch die simultane Anwendung der TEVC-Technik und Fluoreszenzmikroskopie an stabil exprimierenden YC3.6 *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen**

Kymographische Darstellung (A) einer repräsentativen Zeitreihen-Messung in 20 mM Chlorid-Keimungsmedium mit der Applikation von je 5 Hyperpolarisationspulsen bei -200 mV für 1 s (1), gefolgt von 5 Depolarisationspulsen bei +60 mV für 1 s (2), wiederum gefolgt von 5 Hyperpolarisationspulsen (3). Alle Pulse wurden im Abstand von 15 s appliziert und anschließend der Calciumkanal-Inhibitor Lanthan eingespült (4). Die Hyperpolarisationspulse wurden im Abstand von 15 s weiter fortgeführt (n = 3). Abbildung (B) zeigt die Änderung der Fluoreszenzintensität an der Pollenschlauchspitze über das gesamte Zeitreihenexperiment. Abbildung C reflektiert exemplarische Stromspuren der abgeleiteten makroskopischen Ganzzellströme. C1 und 3 stellen die charakteristische langsame S-Typ-Deaktivierungskinetik bei der Applikation von Hyperpolarisationspulsen dar, welche durch das Einspülen des Calciumkanal-Inhibitors Lanthan stark erniedrigt wird (C5).

### **3.15 Einfluss des Anionenkanal-Inhibitors Niflumsäure auf den spitzenlokalisierten hyperpolarisations-aktivierten Calciumeinstrom**

Um den Einfluss des Anionenkanal-Inhibitors Niflumsäure auf den hyperpolarisations-aktivierten Calciumeinstrom und die gemessenen S-Typ-Anionenströme zu untersuchen, wurden Experimente durchgeführt, die ein sehr ähnliches Design hatten wie die in den Abschnitten 3.13 und 3.14. Über den gesamten Zeitraum des Experiments wurden 1 s dauernde Hyperpolarisationspulse bei -200 mV im Abstand von 15 s appliziert und gleichzeitig Fluoreszenzmessungen zur Analyse der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durchgeführt. Nach den ersten 5 Hyperpolarisationspulsen (Abbildung 42 A 2) wurden 50  $\mu\text{M}$  Niflumsäure eingespült ( $n = 4$ ).

Wie in Abbildung 42 zu sehen ist, hat der Anionenkanal-Inhibitor Niflumsäure keinen Einfluss auf den hyperpolarisations-aktivierten Calciumeinstrom. Trotz Perfusion mit Niflumsäure kommt es in Anwesenheit des Anionenkanal-Inhibitors bei Hyperpolarisationspulsen weiterhin zum Anstieg der Fluoreszenzratio, was gleichbedeutend ist mit einem Calciumeinstrom an der Pollenschlauchspitze (Abbildung 42 A und B). Betrachtet man die Stromantwort der induzierten Spannungspulse, sieht man allerdings eine Reduktion der charakteristischen S-Typ-Anionenströme über einen Zeitraum von über 400 s (Abbildung 42 C 3 und 4) in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Niflumsäure. Die gemessenen Anionenströme ( $I_{ss}$ ) reduzieren sich ausgehend von Hyperpolarisationspuls 1 um 26 % nach der Applikation von 50  $\mu\text{M}$  Niflumsäure (Hyperpolarisationspuls 4). Die Experimente in Abbildung 41 (Lanthan) und Abbildung 42 (Niflumsäure) zeigen die Auswirkungen von Calcium- und Anionenkanal-Inhibitoren auf den Calciumeinstrom an der Pollenschlauchspitze und die Auswirkungen auf die charakteristischen S-Typ-Anionenströme. Zusammenfassend kann man hier sagen, dass sowohl die Inhibierung der hyperpolarisations-aktivierten Calciumkanäle durch Lanthan, als auch der Anionenkanäle durch Niflumsäure zu einer Reduktion der S-Typ-Anionenströme (Abbildung 41 und Abbildung 42) führt, während die Inhibierung der Anionenkanäle keinen Einfluss auf den Calciumeinstrom hat (Abbildung 42). Dies stützt die vorausgegangenen Experimente und deutet auf den kausalen Zusammenhang zwischen dem nahezu zeitgleichen Einstrom von Calcium und dem Ausstrom von Anionen aus der Pollenschlauchspitze hin.



**Abbildung 42: Einfluss des Anionenkanal-Inhibitors Niflumsäure auf den spitzenlokalisierten Calciumeinstrom durch die simultane Anwendung der TEVC-Technik und Fluoreszenzmikroskopie an stabil exprimierenden YC3.6 *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen**

Kymographische Darstellung (A) einer repräsentativen Zeitreihen-Messung mit der Applikation von Hyperpolarisationspulsen mit  $-200$  mV für  $1$  s im Abstand von  $15$  s zueinander, in  $20$  mM Chlorid-Keimungsmedium (1). Ab dem sechsten Puls (2) wurde der Anionenkanal-Inhibitor Niflumsäure eingespült und die Hyperpolarisationspulse weiter im Abstand von  $15$  s fortgeführt ( $n = 4$ ). Durch Applikation der  $-200$  mV Spannungspulse kommt es zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität an der Pollenschlauchspitze und der Einstichstelle der Elektrode. Nach dem Einspülen von  $50$   $\mu$ M Niflumsäure (2) kommt es zu keinem Verlust der Fluoreszenzratio-Erhöhung an der Pollenschlauchspitze und der Einstichstelle. In (B) sind die Fluoreszenzratio-Änderungen an der Pollenschlauchspitze gezeigt, welche durch Applikation der Hyperpolarisationspulse ausgelöst werden. Die makroskopischen Ströme (C) bei den Hyperpolarisationspulsen aus (A) zeigen Ströme mit einer charakteristisch langsamen S-Typ-Deaktivierungskinetik (C1), welche durch das Einspülen von Niflumsäure zeitabhängig stark erniedrigt werden (C3 und 4).

### 3.16 Charakterisierung des spitzenlokalisierten Anionenausstroms mittels simultaner Anwendung der TEVC und Fluoreszenzmikroskopie

Um zu überprüfen, wie sich die induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhungen durch Hyperpolarisationspulse auf die Anionenhomöostase des Pollenschlauches auswirken, wurde analog zu dem in Abschnitt 3.13 durchgeführten Experiment, in dem

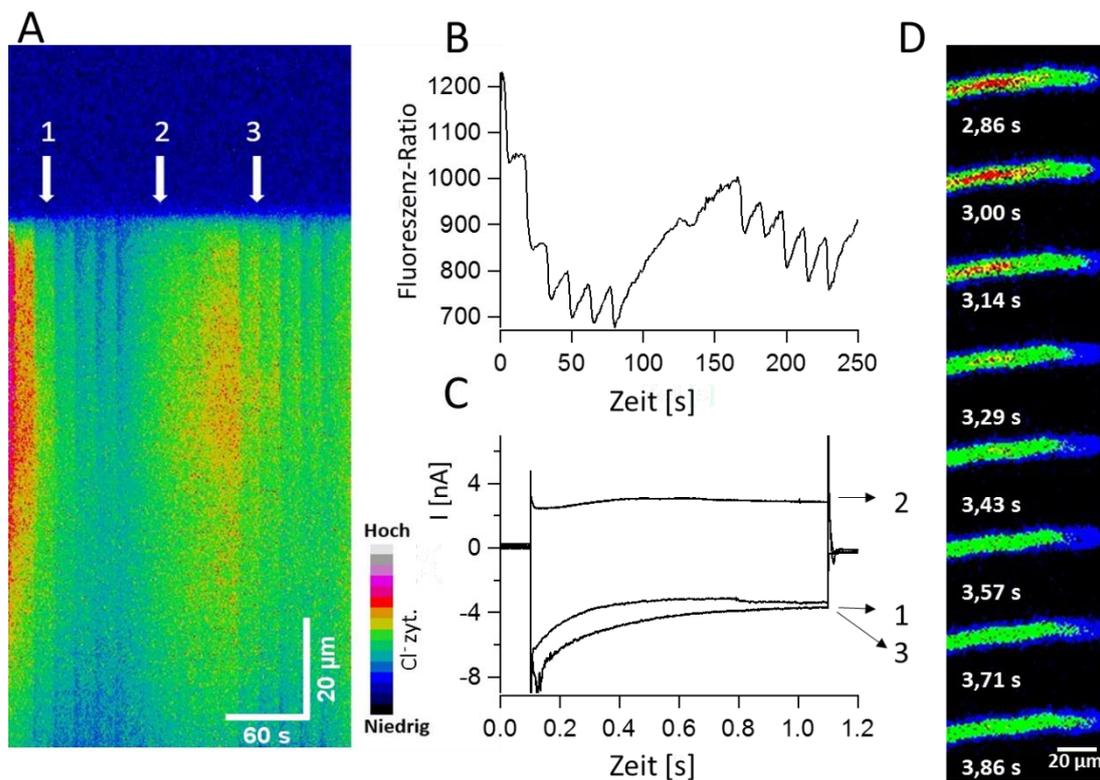
TEVC-Technik und Fluoreszenzmikroskopie simultan angewendet wurden, nun Tabak-Pollenschläuche vermessen, die den zytoplasmatischen Anionensensor Cl<sup>-</sup>-Sensor (Markova *et al.*, 2008) exprimierten, welcher uns freundlicherweise von Piotr Bregestowski zu Verfügung gestellt wurde.

Durch die wesentlich schwächere Expression des Chloridsensors im Vergleich zum YC3.6 konnte bei der Anwendung der Fluoreszenzzeitreihenexperimente mit der schnellen Bildaufnahme von 1 Bild/Sekunde ein Ausbleichen der Fluoreszenzintensität kaum vermieden werden. Zudem verursachte der Chloridausstrom zusätzlich eine Erniedrigung der zytoplasmatischen Chloridkonzentration, welche sich in einer stetigen Abnahme der Fluoreszenzratio äußerte.

Zur Bestätigung des Anionenausstroms an der Pollenschlauchspitze (Zonia *et al.*, 2001) und zum Überprüfen, ob eine Hyperpolarisationspuls-getriebene Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zu einer Änderung der zytoplasmatischen Anionenkonzentrationsänderung führt, wurde das gleiche Spannungspulsprotokoll wie aus Abbildung 41 beim Imaging verwendet. Das applizierte Spannungspulsprotokoll umfasste 5 Hyperpolarisationspulse bei -200 mV, gefolgt von 5 Depolarisationspulsen bei 60 mV und einer erneuten Abfolge von 5 Hyperpolarisationspulsen bei -200 mV. Alle Spannungspulse wurden für 1 s im Abstand von 15 s appliziert.

Bei beiden Hyperpolarisationspuls-Reihen (Abbildung 43 A 1 und 3) kommt es zu einer Abnahme der Fluoreszenzratio in der Pollenschlauchspitze (Abbildung 43 D), welche gleichbedeutend mit einem Chloridausstrom aus der apikalen Zone des Pollenschlauchs ist. Ebenso kommt es durch den Chloridausstrom mit jedem Hyperpolarisationspuls zu einer weiteren Erniedrigung der gesamten zytoplasmatischen Chloridkonzentration (Abbildung 43 B). Jeder Anionen-Ausstrom wird gefolgt von einer erneuten Akkumulation von Chlorid in der Pollenschlauchspitze (Anstieg der Fluoreszenzratio um ca. +70, Abbildung 43 B). Es könnten Anionen aus der subapikalen Zone des Pollenschlauchs in die apikale Zone nachströmen, denn der zeitabhängige Anstieg der Chloridkonzentration nach dem Anionenausstrom beginnt in der subapikalen Zone, in welcher die Aufnahme von Chlorid erfolgt (Abbildung 43 A und D). Durch die wiederholte schnelle Aktivierung der Anionenkanäle kommt es allerdings zu einer Reduktion des Cl<sup>-</sup>-Sensor-Ratios, was eine Reduktion der zytoplasmatischen Anionenkonzentration in der apikalen und subapikalen Zone bis ca. 80 µm hinter der Pollenschlauchspitze widerspiegelt (siehe Abbildung 43 A und B).

Die Applikation von Depolarisationspulsen führte in 2 der 3 gemessenen Pollenschläuche zu einer Erhöhung der zytoplasmatischen Chloridkonzentration und so zum Anstieg der Fluoreszenzintensität (Anstieg der Fluoreszenzratio um ca. +300, Abbildung 43 B) in der subapikalen Zone des Pollenschlauchs (Abbildung 43 A 2). Diese Zunahme der zytoplasmatischen Anionenkonzentration erfolgte ca. 10  $\mu\text{m}$  – 80  $\mu\text{m}$  hinter der Pollenschlauchspitze und scheint auf diese Region begrenzt zu sein. Der Chloridausstrom erfolgt nur an der Pollenschlauchspitze sowie an der Einstichstelle (artifizuell). Die Chloridaufnahme erfolgt hingegen nur im subapikalen Bereich (10  $\mu\text{m}$  – 80  $\mu\text{m}$ ) des Pollenschlauchs, nicht aber an der Pollenschlauchspitze ( $n = 4$ ). Betrachtet man die gemessene Stromantwort in Abbildung 43 C, wird die charakteristische S-Typ-Deaktivierung der makroskopischen Ströme in den Hyperpolarisationspulsen 1 und 3 sichtbar. Es kommt zu keiner signifikanten Stromreduktion über die Zeit. Die Gleichgewichtsströme erniedrigen sich zwischen Hyperpolarisationspulsen 1 und 3 nur um 8,5 %. Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem in Abbildung 43 B gezeigten Fluoreszenzsignal in der Pollenschlauchspitze wird ersichtlich, dass die zytoplasmatische Chloridkonzentration während der beiden Hyperpolarisationspulse 1 und 3 nahezu identisch war.



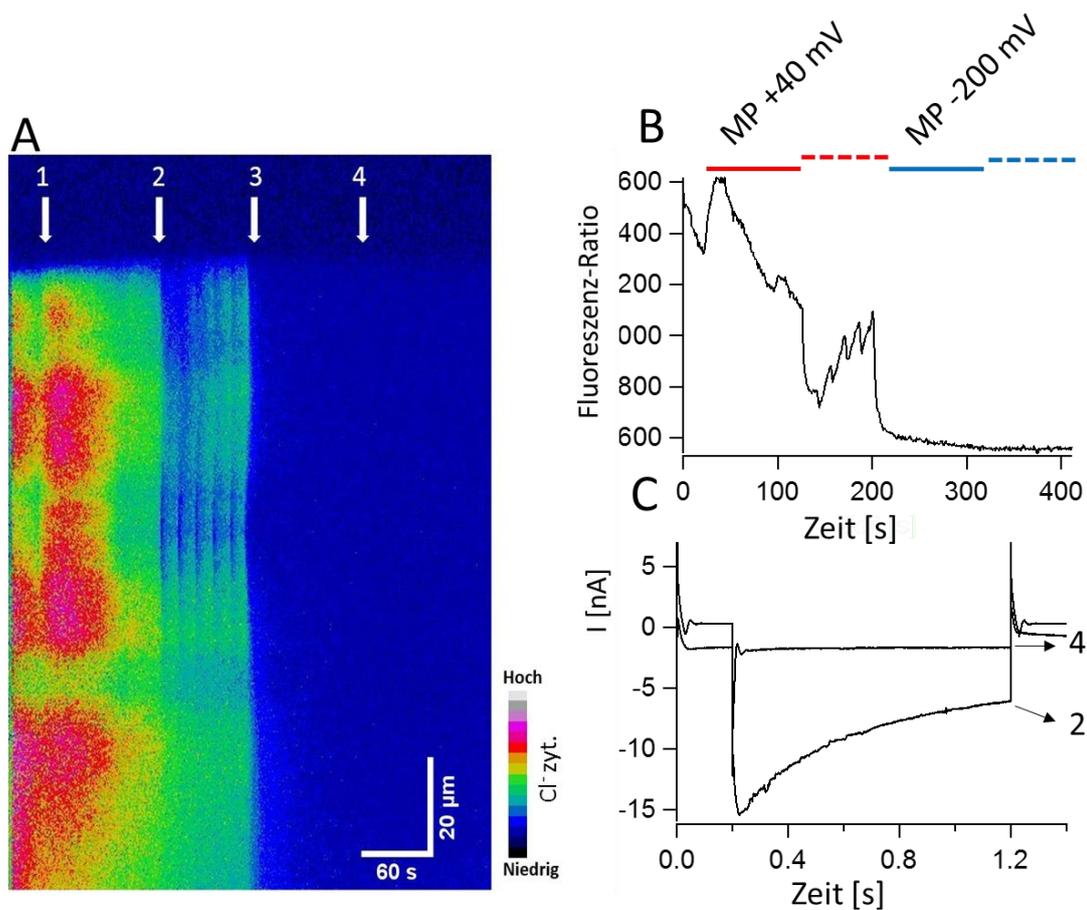
**Abbildung 43: Aktivierung der spitzenlokalisierten Anionenkanäle durch Hyperpolarisationspulse aktivierte apikale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhungen**

Zur Anwendung kam hier die simultane Anwendung der TEVC-Technik und Fluoreszenzmikroskopie an stabil exprimierenden  $\text{Cl}^-$ -Sensor *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen. Abbildung A zeigt die kymographische Darstellung einer repräsentativen Zeitreihen-Messung im 20 mM Chlorid-Keimungsmedium mit der Applikation von je 5 Hyperpolarisationspulsen bei -200 mV für 1 s (1), gefolgt von 5 Depolarisationspulsen bei +60 mV für 1 s (2), gefolgt von 5 weiteren Hyperpolarisationspulsen (3), alle Pulse wurden im Abstand von 15 s appliziert ( $n = 4$ ). Durch Applikation der -200 mV Spannungspulse kommt es zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität an der Pollenschlauchspitze und der Einstichstelle der Elektrode (1 und 3). Die applizierten Depolarisationspulse verursachen einen Anstieg der Fluoreszenzintensität in der subapikalen Zone des Pollenschlauchs (2). (B) zeigt die Änderung der Fluoreszenzintensität an der Pollenschlauchspitze bei Applikation der Hyper- und Depolarisationspulse. Die makroskopischen Ströme zeigen die charakteristisch langsame S-Typ-Deaktivierungskinetik bei Applikation von Hyperpolarisationspulsen (C1 und 3) sowie einen positiven Strom bei der Applikation von +60 mV (C2). (D) zeigt eine Zeitreihenaufnahme alle 15 s über einen Hyperpolarisationspuls mit -200 mV für 1 s und den damit verbundenen Anionenausstrom (Fluoreszenzabnahme) aus der Pollenschlauchspitze sowie die darauf folgende erneute Akkumulation (Fluoreszenzanstieg in der Spitze) von Chlorid.

### 3.17 Einfluss der zytoplasmatischen Chloridkonzentration auf die spitzenlokalisierten S-Typ-Anionenströme

Um den Einfluss der zytoplasmatischen Chloridkonzentration auf die gemessenen S-Typ-Anionenströme zu ermitteln, wurde die Zelle auf ein Membranpotenzial von +40 mV geklemmt, um die zytoplasmatische Chloridkonzentration zu erhöhen und somit

Rückschlüsse auf den Einfluss der zytoplasmatischen Chloridkonzentration auf die gemessenen Anionenströme ziehen zu können. Die Depolarisierung des Membranpotenzials resultierte in einem Anstieg der zytoplasmatischen Chloridkonzentration (Anstieg der Fluoreszenzratio um ca. +2500, Abbildung 44 B, rote Linie) in der subapikalen Zone. Dieser Anstieg reduzierte sich aber wieder auf das Ausgangsniveau, sobald die Zelle auf ihr freies Membranpotenzial von -30 mV geklemmt wurde (Abbildung 44 A 1). Die Applikation von 5 Hyperpolarisationspulsen (Abbildung 44 A 2 und Abbildung 44 B rote gestrichelte Linie) bei -200 mV für jeweils 1 s im Abstand von je 15 s resultierte in einer schrittweisen Fluoreszenzabnahme an der Pollenschlauchspitze (Anstieg der Fluoreszenzratio um ca. -120, Abbildung 43 B), was gleichbedeutend mit einem Anionenausstrom ist. Der exemplarisch gezeigte Ganzzellstrom (Abbildung 44 C 2) zeigt die charakteristische langsame S-Typ-Deaktivierungskinetik bei -200 mV (Pulslänge 1 s). In Anschluss wurde die Zelle auf -200 mV geklemmt (massiver Calciumeinstrom in stabilen pLat52-YC 3.6-Linien, Daten nicht gezeigt), was zu einer massiven Reduktion des Fluoreszenzratios um ca. -500 führte (Abbildung 44 B, blaue Linie) und die Zelle einem massiven Efflux von Anionen ausgesetzt wurde (3). Die Fluoreszenzintensität reduziert sich im gesamten Pollenschlauch durch den Ausstrom des zytoplasmatischen Chlorids. Wiederum wurden 5 Hyperpolarisationspulsen bei einer Haltespannung gleich dem freien Membranpotenzial appliziert (Abbildung 44 A 4 und Abbildung 44 B, blaue gestrichelte Linie). Der exemplarisch gezeigte makroskopische Ganzzellstrom zeigt, nachdem die intrazelluläre Chloridkonzentration erniedrigt wurde, eine Reduktion des Gleichgewichtsstroms  $I_{ss}$  und keine charakteristische S-Typ-Kinetik mehr (Abbildung 44 C 4), da die stark erniedrigte zytoplasmatische Chloridkonzentration keinen messbaren Chlorid-Efflux mehr zulässt (n=3). Die makroskopischen Ganzzellströme ( $I_{ss}$ ) zeigen eine Reduktion von 72,7 %, nachdem die zytoplasmatische Chloridkonzentration durch eine dauerhafte Hyperpolarisation verringert wurde.



**Abbildung 44: Einfluss der intrazellulären Chloridkonzentration auf den Anionenausstrom aus der Pollenschlauchspitze**

Zur Anwendung kam hier die simultane Anwendung der TEVC-Technik und Fluoreszenzmikroskopie an stabil exprimierenden Cl<sup>-</sup>-Sensor *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen. Abbildung A zeigt die kymographische Darstellung einer repräsentativen Zeitreihen-Messung im 20 mM Chlorid-Keimungsmedium (n=3). Der Pollenschlauch wurde durch das Klemmen des Membranpotenzials (MP) auf +40 mV mit Chlorid beladen A (1) und auf das freie Membranpotenzial geklemmt. Durch Applikation von je 5 Hyperpolarisationspulsen bei -200 mV für 1 s (2) kommt es zur Fluoreszenzintensitätsabnahme an der Pollenschlauchspitze. Im Anschluss wurde die Haltespannung auf -200 mV eingestellt, was zu einer Erniedrigung der intrazellulären Chloridkonzentration (Fluoreszenzabnahme) führte (3). Erneut wurden 5 Hyperpolarisationspulse bei -200 mV für 1 s appliziert und die makroskopischen Ganzzellströme aufgezeichnet (C). Diese zeigen bei gefüllten zytoplasmatischen "Chloridspeichern" (A2 und C2) die charakteristische S-Typ-Kinetik, während bei geleerten "Chloridspeichern" (A4 und C4) keine charakteristisch langsame S-Typ-Deaktivierung sichtbar ist. (B) zeigt die Änderung der Fluoreszenzratio in der Pollenschlauchspitze über den gesamten Zeitraum des Experiments.

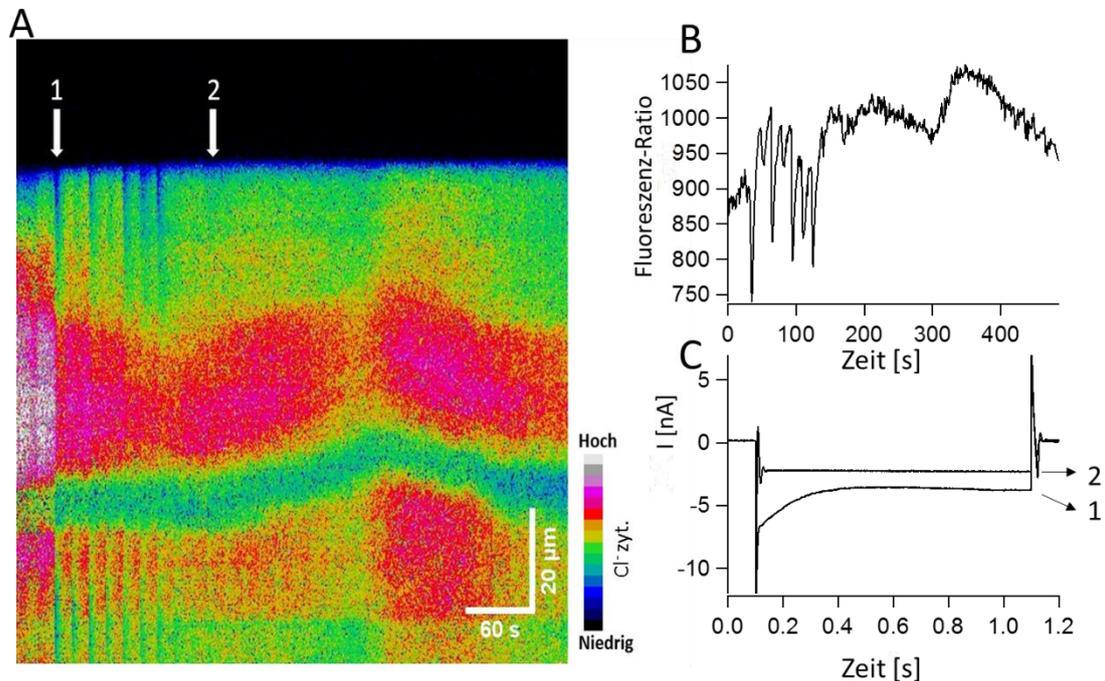
Dieses Experiment bestätigt noch einmal den Einfluss der intrazellulären Anionenkonzentration auf die gemessenen Ganzzellströme. Eine Abnahme des Fluoreszenzratios geht einher mit der Reduzierung der gemessenen Anionenströme. Ebenso wird bestätigt, dass der apikale Influx von Calcium (gezeigt in Abbildung 40) (verursacht durch eine Haltespannung -200 mV beim Entladen) den Ausstrom von Chlorid aus der apikalen Zone bedingt. Weiterhin machten die Messungen aus Abbildung 44 deutlich, dass die Anionenaufnahme des Pollenschlauches in der

subapikalen Zone 10  $\mu\text{m}$  – 80  $\mu\text{m}$  hinter der Pollenschlauchspitze lokalisiert ist, da es nur hier beim Klemmen auf positive Membranspannung zu einer schnellen Zunahme der Cl<sup>-</sup>-Sensor-Fluoreszenzratio in diesem Bereich kommt. Die in Abbildung 44 A gezeigte Zunahme der Chloridkonzentration ab ca. 100 $\mu\text{m}$  bzw. die Abnahme der Anionenkonzentration während Hyperpolarisationspulse wird durch die in diesem Bereich platzierte Einstichelektrode verursacht und ist, wie schon in Abschnitt 3.14 gezeigt, artifizieller Natur.

### **3.18 Einfluss des Calciumkanal-Inhibitors Lanthan auf den spitzenlokalisierten Anionenausstrom**

Wie in Abschnitt 3.14 beschrieben, korreliert die Inhibierung der Pollenschlauch-Calciumkanäle mit Lanthan in einer starken Reduktion der S-Typ-Anionenströme. Dieses Experiment wurde mit Pollenschläuchen wiederholt, die den Anionensensor „Cl<sup>-</sup>-Sensor“ stabil unter der Kontrolle des LeLAT52-Promotors exprimierten. Im gesamten Zeitreihenexperiment wurden im Abstand von 15 s Hyperpolarisationspulse (-200 mV für 1 s) appliziert und der Calcium-Inhibitor Lanthan nach den ersten 5 Pulsen eingespült.

Die Applikation der Hyperpolarisationspulse führte zu einem Chloridausstrom aus der Pollenschlauchspitze, wie es schon in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben wurde. Nach dem Einspülen des Calcium-Inhibitors kam es innerhalb von 10 Sekunden zu einer Verringerung des Chloridausstroms und schließlich zum vollständigen Verlust des Chlorid-Effluxes aus der Pollenschlauchspitze. Zeitgleich kommt es zu einer Fluoreszenzzunahme im subapikalen Bereich (Akkumulation von Chlorid) (Abbildung 45 A und B) (n = 5), was gleichbedeutend mit einer Anionenkonzentrationszunahme ist. Die exemplarisch dargestellten Stromspuren der Hyperpolarisations-Spannungspulse zeigen, ebenso wie Abbildung 41, dass vor der Inhibierung der Calciumkanäle durch Lanthan die charakteristische S-Typ-Deaktivierungskinetik sichtbar ist (Abbildung 41 C 1) und mit dem Chloridausstrom aus der Spitze korreliert. Nach der Inhibierung der Ca<sup>2+</sup>-permeablen Kanäle mit 100  $\mu\text{M}$  Lanthan kommt es zu keinem weiteren Chloridausstrom aus der Spitze (Abbildung 45 A 2) sowie zum Verlust der typischen S-Typ-Deaktivierungskinetik (Abbildung 45 C 2) und einer Reduktion der Ganzzellströme ( $I_{ss}$ ) um 39,2 % bei -200 mV.

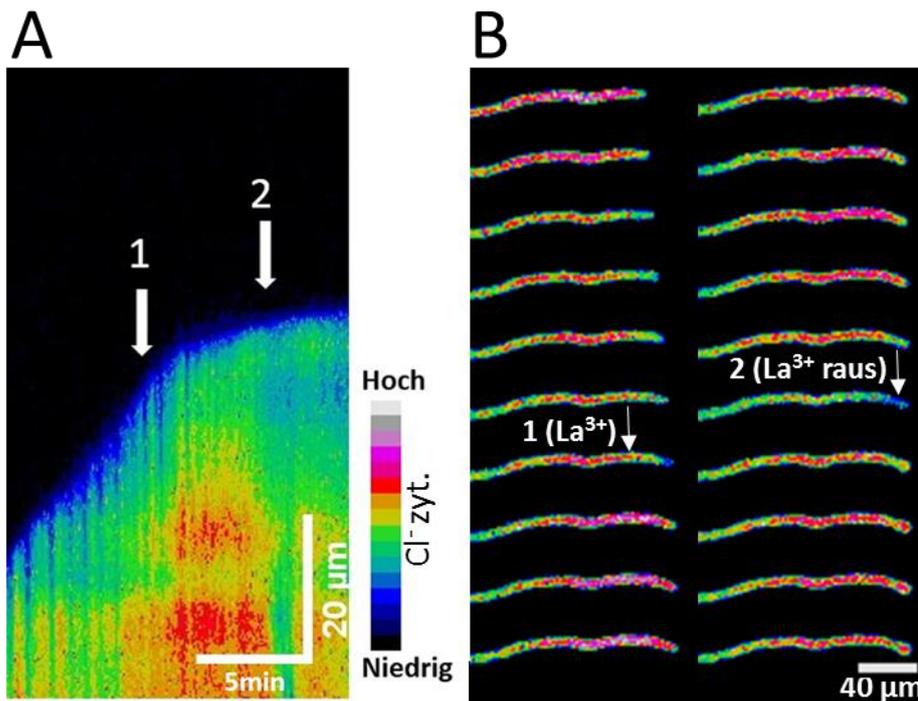


**Abbildung 45: Einfluss des Calciumkanal-Inhibitors Lanthanchlorid auf den spitzendlokalisierten Anionenausstrom**

Zur Anwendung kam hier die simultane Anwendung der TEVC-Technik und Fluoreszenzmikroskopie an stabil exprimierenden Cl-Sensor *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen. Abbildung A zeigt die kymographische Darstellung einer repräsentativen Zeitreihen-Messung mit einer dauerhaften Applikation von Hyperpolarisationspulsen mit  $-200$  mV für 1 s im Abstand von 15 s zueinander in 20 mM Chlorid-Keimungsmedium (1). Ab dem sechsten Puls wurde der Calciumkanal-Inhibitor Lanthan ( $100 \mu\text{M}$ ) eingespült und die Hyperpolarisationspulse im Abstand von 15 s weiter fortgeführt. Die Inhibierung des Calciumeinstroms (2) erfolgt 60 s später ( $n = 5$ ). Abbildung B zeigt die Änderung der Fluoreszenzintensität an der Pollenschlauchspitze bei Applikation der Hyperpolarisationspulse während des gesamten Experiments. Die aufgezeichneten exemplarischen, makroskopischen Ganzzellströme (C) der Hyperpolarisationspulse aus (A) zeigen die charakteristische langsame S-Typ-Deaktivierungskinetik bei Applikation von Hyperpolarisationspulsen (C1), welche durch das Einspülen von Lanthan komplett erniedrigt wird (C2).

Da es aufgrund des Einstichs durch die Mikroelektrode und dem geklemmten Membranpotenzial (ca.  $-30$  mV) meist zum Wachstumsstopp des Pollenschlauchs kommt, wurde zusätzlich zu den gezeigten Experimenten (Abbildung 45) ebenfalls ein Experiment ohne Einstich an wachsenden Pollenschläuchen wiederholt, um die Auswirkung von Lanthan auf die zytoplasmatische Anionenhomöostase ohne Manipulation des Membranpotenzials durch die TEVC-Technik beobachten zu können. Abbildung 46 A zeigt die natürlichen Chlorid-Oszillationen im wachsenden Pollenschlauch, wie sie schon in Gutermuth *et al.*, 2013, beschrieben wurden. Das Einspülen von  $100 \mu\text{M}$  Lanthanchlorid (1) verursacht einen Wachstumsstopp und eine Akkumulation von Chlorid in der Pollenschlauchspitze. Diese Akkumulation reduziert sich durch das Auswaschen des Calciumkanal-Inhibitors (2) leicht. Vereinzelt kommt es

nach dem Auswaschen des Calciumkanal-Inhibitors wieder zu einzelnen Anionenausströmen aus der Pollenschlauchspitze. Die Akkumulation von Chlorid im subapikalen Bereich, ca. 10  $\mu\text{m}$  hinter der Pollenschlauchspitze, wird von einem Anschwellen der apikalen Zone begleitet (Abbildung 46 B). Dies konnte nur bei wachsenden Pollenschläuchen ( $n = 3$ ) beobachtet werden, deren Membranpotenzial nicht geklemmt wurde.



**Abbildung 46: Einfluss des Calciumkanal-Inhibitors Lanthanchlorid auf den spitzenlokalisierten Anionenausstrom in wachsenden Pollenschläuchen**

Kymographische Darstellung einer repräsentativen Zeitreihen-Messung in stabilen pLat52-Cl<sup>-</sup>-Sensor-Pollenschläuchen vor und nach dem Einspülen von 100  $\mu\text{M}$  Lanthanchlorid (1) sowie nach dem Ausspülen des Inhibitors (2) ( $n = 3$ ) im 20 mM Chlorid-Keimungsmedium. Vor dem Einspülen des Calciumkanal-Inhibitors sind regelmäßige oszillierende Chlorid-Effluxe aus der Pollenschlauchspitze (Fluoreszenzabnahme) sichtbar, weiterhin wächst der Pollenschlauch bis zum Einspülen des Inhibitors (1). Danach kommt es zu einem schnellen Wachstumsstopp und einem Verlust der oszillierenden Chlorid-Effluxe. Im subapikalen Bereich steigt die Fluoreszenzintensität an (Chloridakkumulation). (B) zeigt eine Zeitreihe über die Dauer des gesamten Experiments. Nach dem Einspülen von Lanthan (B1) beginnt die subapikale Chloridakkumulation und der beschriebene Wachstumsstopp, ab (B2) wird das Anschwellen der Pollenschlauchspitze erkennbar.

Die in Abschnitt 3.12 bis 3.18 gezeigten Ergebnisse korrelieren mit den in *Arabidopsis thaliana* gezeigten TEVC-Experimenten und stützen die These einer durch Calciumeinstrom vermittelten Aktivierung der Anionenkanäle durch Calcium-abhängige Kinasen in der Pollenschlauchspitze sowie den Einfluss der Calcium-/Anionenhomeostase auf das Pollenschlauchwachstum. So konnte erstmals die Existenz von exklusiv in der Pollenschlauchspitze lokalisierten hyperpolarisationsaktivierten Calciumkanälen (HACCs) sowie deren notwendige Aktivierung durch Hyperpolarisation für den Anionenausstrom aus der Pollenschlauchspitze gezeigt werden. Diese Ergebnisse ergänzen den in *Arabidopsis thaliana* gezeigten Verlust des charakteristischen S-Typ-Anionenausstroms durch die Unterbrechung der Calciumsignalkaskade in der Pollenschlauchspitze durch Calcium-abhängige Kinasen in der Dreifachverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* (Abbildung 25). Weiterhin konnte der Einfluss der zytoplasmatischen Anionenkonzentration auf den Anionenausstrom und der Einfluss der Anionenhomöostase auf das Zellwachstum weiter aufgeklärt werden. Wie schon in *Arabidopsis thaliana* gezeigt, führt die Reduktion des Anionenausstroms zu einer Störung des Längenwachstums (Abbildung 36 und Abbildung 38). Durch die Kombination der TEVC-Technik mit der Fluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 3.14 und 3.18) konnte die HACC-vermittelte Calciumkonzentrationserhöhung bei Hyperpolarisation des Membranpotenzials in Tabak mit der Anionenkanalaktivität und zytoplasmatische Anionenhomöostase verknüpft werden.

### **3.19 Membranpotenzial-Oszillationen in der apikalen Region des Pollenschlauchs**

Der Einfluss des Calcium-vermittelten Anionenausstroms auf die Zellelongation konnte in dieser Arbeit bereits nachgewiesen werden (Abbildung 34, Abbildung 35 und Abbildung 38), der genaue Mechanismus, welchen Einfluss der Anionenausstrom auf die Vesikelbewegung in der apikalen Zone hat, bleibt weiterhin ungewiss. Bereits Zonia *et al.*, 2001; Zonia *et al.*, 2002, zeigte die Korrelation zwischen Anionenausstrom, Vesikelakkumulation in der apikalen Zone, die für eine erfolgreiche Exozytose-getriebene Zellelongation wichtig sind. Breygina *et al.*, 2009, berichtet über einen

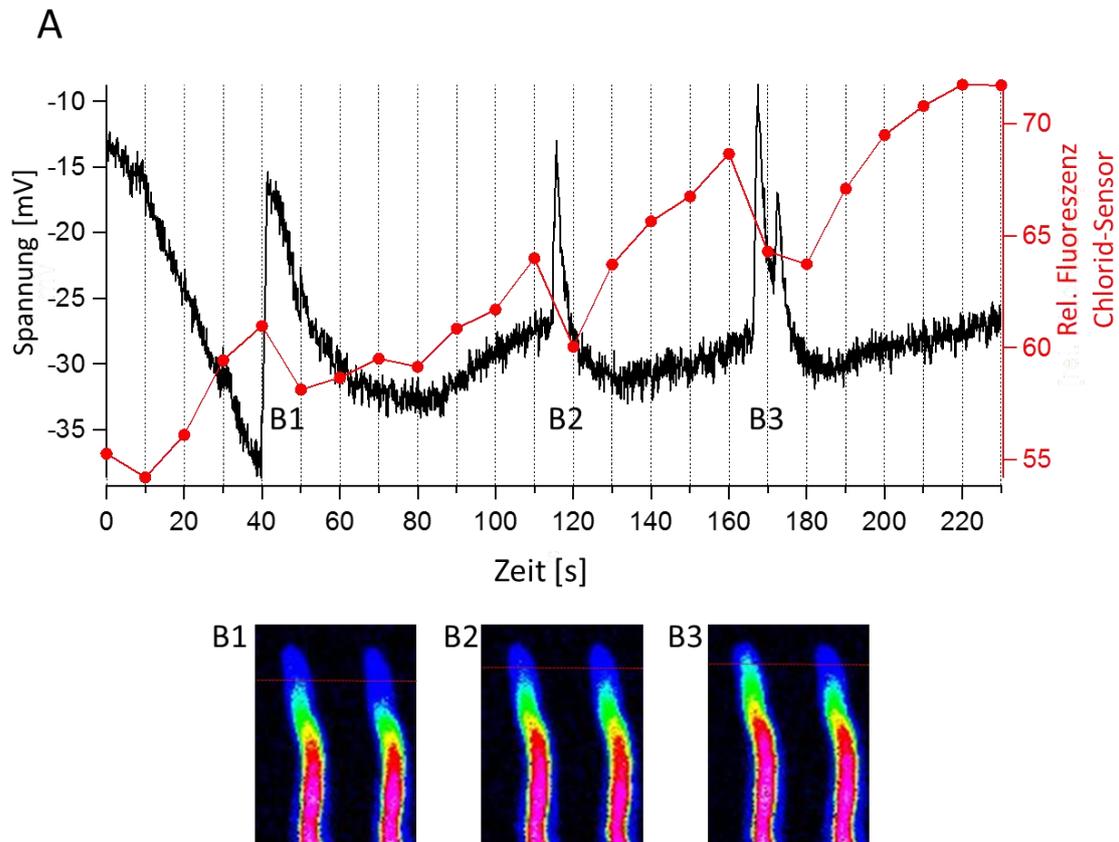
Membranpotenzial-Gradienten in Lilien-Pollenschläuchen, welcher nach der Applikation des Anionenkanal-Inhibitors NPPB verschwindet. Ebenso kommt es zum Wachstumsstopp des Pollenschlauchs. Über eine lokale Depolarisierung in der Pollenschlauchspitze und die daraus resultierende elektromagnetische Triebkraft zwischen den bei physiologischem pH-Wert negativ geladenen Vesikeln und der depolarisierten Pollenschlauchspitze wurde in Lipchinsky *et al.*, 2015, spekuliert. Um die vermuteten Membranpotenzial-Oszillationen in der Pollenschlauchspitze zu untersuchen, wurde folgender experimenteller Aufbau angewandt.

Wie in den vorangegangenen Experimenten wurde die Kombination aus TEVC-Technik und Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Durch Einstich in die apikale Spitzenregion stabil exprimierender pLat52-Chlorid-Sensor-Pollenschläuche konnte das freie Membranpotenzial in der Pollenschlauchspitze aufgezeichnet und der Einfluss des natürlichen Calcium-induzierten Chloridausstroms, wie er schon in Abbildung 46 gezeigt wurde, auf das Membranpotenzial beobachtet werden, während die Chloridkonzentration zeitgleich aufgezeichnet werden konnte.

Während der Messung des freien Membranpotenzials sind schnelle Depolarisationstransienten zu sehen, welche mit dem Chlorid-Efflux (Fluoreszenzabnahme) in der Pollenschlauchspitze korrelieren (Abbildung 47 A und B). Die der Depolarisierung folgende Repolarisierung erfolgt durch den Anstieg des sich erneut aufbauenden Chloridgradienten (Fluoreszenzzunahme), der von der subapikalen Region auszugehen scheint (Abbildung 47 B 1 - 3). Die Form dieser Membranpotenzial-Transienten erinnern an Aktionspotenziale in tierischen Zellsystemen (Hodgkin *et al.*, 1952). Die Depolarisation erfolgt im Vergleich zur Repolarisation sehr schnell, während die Repolarisation in ihrem zeitlichen Verlauf (Vergleich Peak B1 und B3) variiert und von der intrazellulären Chloridkonzentration abzuhängen scheint. So kommt es bei Peak B1 zu einer langsamen Repolarisierung (langsame Fluoreszenzzunahme), während die Repolarisierung von Peak B2 und B3 schneller den Ausgangswert erreicht und eine schnelle Fluoreszenzzunahme zu beobachten war (Abbildung 47 A).

Die Peak Amplitude der Depolarisationstransienten variiert und beträgt im Schnitt zwischen 10-15 mV. Die nach dem Einstich gemessenen Chlorid-Oszillationen waren im Vergleich zu natürlichen, nicht durch die Messelektrode beeinflussten Oszillationen schwächer und die Zelle stellte das Wachstum ein ( $n = 3$ ). Hier bedarf es einer Optimierung der experimentellen Methodik, um das Experiment an wachsenden Pollenschläuchen durchführen zu können.

Dennoch konnte in diesem Experiment erstmals eine lokale Depolarisation in der apikalen Region des Pollenschlauchs nachgewiesen werden, an der der Ausstrom von Chlorid beteiligt ist. Diese gemessenen transienten Membran-Depolarisationen konnten nur bei Einstich nahe der apikalen Region ( $< \text{ca. } 80 \mu\text{m}$ ) gemessen werden, Membranpotenzialmessungen im hinteren Bereich ( $> \text{ca. } 140 \mu\text{m}$ ) zeigten keine transienten Membranpotenzialdepolarisationen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 47: Chlorid-abhängige Membranpotenzial-Oszillationen in der Pollenschlauchspitze**  
 Membranpotenzial und relative Fluoreszenz (Chlorid-Sensor, 1 Bild/10 s) in der Tabak-Pollenschlauchspitze (stabile pLat52-Chlorid-Sensor-Linie) einer repräsentativen Messung ( $n = 3$ ).  
 Abbildung A zeigt die Fluoreszenzabnahme (rote Spur) bzw. den Chloridausstrom aus der Pollenschlauchspitze und die dadurch verursachten Membranpotenzial-Oszillationen (schwarze Spur) sowie die zu den Depolarisierungspeaks A 1-3 korrespondierenden Fluoreszenzbilder vor und nach der lokalen Depolarisation durch den Ausstrom von Chlorid (Abbildung B 1-3).

## 4 Diskussion

### 4.1 Identifizierung der für den Anionenausstrom verantwortlichen Anionenkanäle in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen

Polares Zellwachstum in Pollenschläuchen unterliegt einer Vielzahl von ineinander greifenden strikt regulierten Prozessen, wie z. B. die Synthese von Zellwandbestandteilen, Transport und Fusion neuer Plasmamembranbestandteile, Vesikeltransport und vielen weiteren Abläufen. Die Koordination und Regulation erfolgt unter anderem durch einen Regelkreislauf von Ionenflüssen in der Pollenschlauchspitze. So wird der oszillierende Einstrom von Calcium in die Pollenschlauchspitze bis jetzt als zentraler Taktgeber dieses Regelkreislaufs angesehen, da die Inhibierung des Calciumeinstroms zu einem sofortigen Wachstumsstopp (Dutta *et al.*, 2004) führt. Der oszillierende Anstieg der Calciumkonzentration in der apikalen Zone ist unter anderem entscheidend für die Wachstumsrichtung des Pollenschlauchs (Malho *et al.*, 1996) durch seinen Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett sowie auf Endo- und Exozytose in der Pollenschlauchspitze (Gu *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2010). Wie der gerichtete Transport der für die Elongation der Zelle verantwortlichen Membranbausteine in der Zellorganell-freien apikalen Zone erfolgt, ist bisher jedoch wenig verstanden. Neben dem oszillierenden Einstrom von Calcium in die Pollenschlauchspitze konnten mittels Patch-Clamp-Technik und Vibrating-Probemessungen weitere Ionenströme über die Plasmamembran von Pollenschläuchen nachgewiesen werden. Der In- und Efflux von Kalium konnte bisher noch nicht vollständig mittels Vibrating-Probe geklärt werden, jedoch zeigte Becker *et al.*, 2004, erstmals die Ableitung von Kalium-vermittelten Ganzzellströmen mittels TEVC--Technik an *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen. Ebenfalls konnte die Regulation des in Pollenschläuchen exprimierten einwärts gleichrichtenden Kaliumkanals SPIK (Mouline *et al.*, 2002) der Shaker-Familie durch die Calcium-abhängigen Kinasen CPK24 und CPK11 nachgewiesen werden (Zhao *et al.*, 2013). Der durch Calcium regulierte Kaliumeinstrom beeinflusst das Längenwachstum der Pollenschläuche. So kommt es zu einer 40%igen Reduktion der Pollenschlauchlänge in der SPIK-Verlustmutante im Vergleich zum Wildtyp (Mouline *et al.*, 2002). Neben dem oszillierenden Einstrom von Calcium bildet sich auch ein apikaler

Protonengradient in der Pollenschlauchspitze aus, der, ähnlich wie der Calcium-Gradient, oszilliert und zu einer Ansäuerung der apikalen Zone führt (Feijo *et al.*, 1999). Der sich bildende pH-Gradient hat ebenfalls einen regulatorischen Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett (Hawkins *et al.*, 1993; Maciver *et al.*, 1998), jedoch steht der oszillierende Protoneneinstrom zeitversetzt zu den Wachstumsschüben des Pollenschlauchs (Holdaway-Clarke *et al.*, 1997; Feijo *et al.*, 1999). Während der Einstrom von Calcium und Protonen zeitversetzt zu den Wachstumsschüben stattfindet, konnte Zonia *et al.*, 2001 erstmals mittels Vibrating-Probemessungen einen massiven Chloridausstrom aus der Pollenschlauchspitze nachweisen, welcher zeitgleich mit den Wachstumsschüben des Pollenschlauchs auftritt. Über den Einfluss von Anionenkanälen auf die Pollenkeimung wurde bereits in Matveyeva *et al.*, 2003, berichtet. Durch die Zugabe der Anionenkanal-Inhibitoren NPPB und Niflumsäure in das Pollenkeimungsmedium konnte die Pollenkeimung vollständig unterdrückt werden, und es kam zur Reduktion des Anionenausstroms aus dem Pollenkorn, welcher für die Keimung und für das Wachstum des Pollenschlauchs essentiell zu sein scheint. Während bereits Anionenströme in Pollenprotoplasten (Tavares *et al.*, 2011) sowie der oszillierende Ausstrom von Chlorid aus der Pollenschlauchspitze (Zonia *et al.*, 2001) mittels Patch-Clamp- und Vibrating-Probemessungen belegt sind, konnten bisher noch keine Anionenströme per TEVC-Technik an intakten Pollenschläuchen gemessen werden. Welche Gene für die Anionenströme verantwortlich sind, war bis zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch gänzlich ungeklärt. Der in Zonia *et al.*, 2002, beschriebene oszillierende Anionenefflux aus der Pollenschlauchspitze beträgt zwischen 50 und 8000 pmol/cm\*s<sup>-1</sup> und übersteigt den ebenfalls mittels Vibrating-Probe-Messungen quantifizierten Calciumeinstrom mit 1-20 pmol/cm\*s<sup>-1</sup> (Kühtreiber und Jaffe *et al.*, 1990; Holdaway-Clarke *et al.*, 1997; Messerli *et al.*, 1999) und Protoneninflux mit 0-0,4 pmol/cm\*s<sup>-1</sup> (Feijo *et al.*, 1999) um ein Vielfaches. Jedoch konnten die beteiligten Anionenkanäle erst durch die in dieser Arbeit durchgeführte Transkriptionsanalyse und die elektrophysiologische Charakterisierung des S-Typ-Anionenkanals SLAH3 und die R-Typ-Anionenkanäle ALMT12, ALMT13 und ALMT14 in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen nachgewiesen und ihr Einfluss auf die Ganzzellströme und das polare Zellwachstum größtenteils aufgeklärt werden. Zudem konnte eine Regulation der Anionenkanäle auf transkriptioneller Ebene durch die Anionenkomposition des Keimungsmediums demonstriert werden. So zeigte der Anionenkanal SLAH3 eine Reduktion der Transkription auf 40 mM Nitrat-Keimungsmedium im Vergleich zum 40 mM Chlorid-Keimungsmedium. Durch Zugabe von Malat in das Chlorid-basierte Keimungsmedium kommt es zu einer

Zunahme der R-Typ-Anionenkanäle ALMT12-, ALMT13- und ALMT14-Transkripte. Dies deutet auf die transkriptionelle Adaption der Anionenkanäle auf die apoplastische Anionenzusammensetzung hin und ermöglicht es dem Pollenschlauch, den Anionenausstrom durch die Regulation der Expression an die sich ändernden Ionenkonzentrationen und Zusammensetzung anzupassen und die Anionenhomöostase aufrecht zu halten. In zukünftigen Transkriptionsanalysen wäre es demnach interessant, den Einfluss der apoplastischen Calciumkonzentration auf die Expression der Anionenkanäle zu untersuchen. Ge *et al.*, 2009, konnte die Existenz eines zu den Ovarien ansteigenden Calciumgradienten im Transmissionsgewebe von *Nicotiana tabacum* nachweisen. Der Anstieg der apoplastischen Calciumkonzentration legt eine Regulation des Anionenausstroms nahe, ob diese allerdings auch auf transkriptioneller Ebene stattfindet, bleibt abzuwarten. Malho *et al.*, 1992, wies die Existenz eines ansteigenden Chlorid-Gradienten im Transmissionsgewebe nach, welcher von ca. 40 mM im Stigma auf ca. 60 mM Chlorid im Bereich der Ovarien anstieg. Dieser Anionenkonzentrationsbereich deckt sich mit den in dieser Arbeit verwendeten Anionenkonzentrationen der Keimungsmedien.

Die in Abschnitt 3.2.2 durchgeführten Experimente zur besseren Isolierung der Anionenströme durch die Ionenzusammensetzung des Keimungsmediums (Abbildung 18 (3/7 +/-Kalium)) zeigen, dass bereits 1 mM Kalium im Medium zu einer Maskierung des Anionenausstroms im Spannungsbereich von -40 bis -200 mV führt, der durch die Aktivität von einwärts gerichteten Kaliumkanälen herrührt. Die Aktivierungskinetik dieser Kalium-vermittelten Einwärtsströme konnte bereits in TEVC-Messungen in Pollenschläuchen von Becker *et al.*, 2004, gezeigt werden. Der in dieser Arbeit gemessene Kaliumeinstrom von bis zu 2.19 nA führt zu einer Überlagerung des deutlich kleineren Anionenausstroms von 1,04 nA bei -200 mV (Abbildung 18). In Abwesenheit von zugesetztem Kalium im Keimungsmedium konnten Ströme mit einer charakteristischen S-Typ-Anionenkanal-Kinetik gemessen werden, wie sie schon in Schließzellen (Hedrich *et al.*, 1990; Schröder und Keller *et al.*, 1992) und *Xenopus* Oozyten (Geiger *et al.*, 2010; Geiger *et al.*, 2011) beschrieben wurde. Die weitere Charakterisierung der gemessenen S-Typ-Ströme durch die Anionen-Inhibitoren NPPB und Niflumsäure zeigt zum einen eine höhere Spezifität von Niflumsäure im Vergleich zu NPPB (Kaliumeinstrom wurde ebenfalls durch NPPB reduziert, Abbildung 16 und Abbildung 17), als auch die Anionen-vermittelte Natur der gemessenen S-Typ-Ströme (Abbildung 19). Des Weiteren zeigt die Anwendung der Anionenkanalinhibitoren, dass die Aktivität der Anionenkanäle für das polare Zellwachstum von großer Bedeutung ist (Breygina *et al.*, 2009, Gutermuth *et al.*, 2013).

## 4.2 S-Typ-Anionenkanal SLAH3 in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen

### 4.2.1 Transkriptionelle Regulation des Anionenkanals SLAH3 in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen

In Abschnitt 3.3 konnte belegt werden, dass die Transkription des Anionenkanals SLAH3 durch die Anionenkonzentration im Keimungsmedium reguliert wird. Diese Regulation wird durch zwei Faktoren beeinflusst. Zum einen wird die Transkription von SLAH3 durch die Konzentration der Anionen im Keimungsmedium und zum anderen scheint die Präferenz von SLAH3 für die vorhandenen Anionen (Nitrat oder Chlorid) Einfluss auf dessen transkriptionelle Regulation zu haben. Die Zunahme der Anionenkonzentrationen im Keimungsmedium von 2 mM auf 40 mM Anionen führt zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der SLAH3-Transkription (Abbildung 20). Dies deutet auf eine Anpassung an die, den Pollenschlauch umgebende Anionenkonzentration hin, da mit steigender Anionenkonzentration im Medium auch eine steigende zytoplasmatische Anionenkonzentration quantifiziert werden konnte (Abbildung 19 B). Ein ähnlicher Mechanismus konnte von Su *et al.*, 2002, in *Mesembryanthemum crystallinum* für die Kaliumtransporter HAK1 und HAK4 gezeigt werden, welche einen Anstieg der Transkription bei Kaliummangel zeigten. Die gesteigerte Expression der beiden Kaliumtransporter soll eine zusätzliche Aufnahme von Kalium bei einer Unterversorgung gewährleisten. Ein ähnlicher Mechanismus könnte für den Anionenkanal SLAH3 vorliegen, welcher bei steigenden zytoplasmatischen Anionenkonzentrationen stärker exprimiert wird, um einen für das Pollenschlauchwachstum notwendigen Anionenausstrom (Abbildung 46) zu gewährleisten (Gutermuth *et al.*, 2013).

SLAH3 besitzt eine 21-fach höhere Permeabilität für Nitrat gegenüber Chlorid (Geiger *et al.*, 2011). Ein Anstieg der Transkription von SLAH3 im Chlorid-Keimungsmedium könnte durch die schlechtere Permeabilität von Chlorid gegenüber Nitrat hervorgerufen worden sein (Abbildung 22 D), um möglicherweise die schlechtere Permeabilität auszugleichen und den für das Wachstum notwendigen Anionenausstrom anzupassen. Vergleicht man den Anionenausstrom in Abbildung 22 D bei -200 mV erkennt man trotz transkriptioneller Regulation, dass keine vollständige Kompensation des Anionenausstroms im 40 mM Chlorid im Vergleich zu 40 mM Nitrat stattfindet. Ein Vergleich der

Wachstumsgeschwindigkeit auf beiden Keimungsmedien könnte weitere Einblicke auf den Einfluss des Anionenausstroms und dessen transkriptionelle Kompensation geben. Eine mögliche Erklärung für die transkriptionelle Regulation des Anionenkanals SLAH3 durch die Anionenkonzentration im Keimungsmedium könnte der in Gutermuth *et al.*, 2013, gezeigte Einfluss der Anionenkonzentration auf den apikalen Calciumeinstrom sein. Mit steigender Chloridkonzentration im Keimungsmedium kommt es bei oszillierendem Pollenschlauchwachstum zu einer Verringerung der Oszillationsfrequenz und einer Zunahme der Amplitude des Calciumeinstroms. Diese Änderungen der Calciumsignatur könnten von Calciumsensoren registriert und an Transkriptionsfaktoren weitergeleitet werden. Ein solcher Mechanismus konnte beispielsweise für den Calciumsensor CBL1 nachgewiesen werden. CBL1 vermittelt eine durch Trocken- und Kältestress verursachte Calciumsignatur, welche zur Expression von Stress-Markergenen wie *RD29A/B* und *KIN1/2* führt (Cheong *et al.*, 2003). Dies könnte möglicherweise durch die im vegetativen Kern lokalisierte CPK24 (Gutermuth *et al.*, 2013) vermittelt werden und durch die Kombination der bereits vorgeschlagenen Transkriptionsanalyse mit variierenden Calciumkonzentrationen überprüft werden. Hierbei könnte die Transkription der Anionenkanäle SLAH3 und ALMT12 in 40 mM Chloridmedium bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen im Wildtyp Col-0 und in der Verlustmutante *cpk24* miteinander verglichen werden, um den regulatorischen Einfluss von CPK24 auf die Transkription der Anionenkanäle zu bestimmen.

#### **4.2.2 S-Typ-vermittelte Stromantwort in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen**

Bekannt ist, dass der Anionenausstrom in Schließzellen durch R-Typ- und S-Typ-Anionenkanäle vermittelt wird und die Anionenströme zusammen mit den Kaliumströmen zu Turgoränderungen und dadurch der Stomaschluss ausgelöst wird (Keller *et al.*, 1989, Hedrich *et al.*, 1990; Schröder und Keller *et al.*, 1992). Der S-Typ-Anionenausstrom wird in *Arabidopsis thaliana*-Schließzellen durch die Anionenkanäle SLAC1 und SLAH3 vermittelt (Geiger *et al.*, 2010, Geiger *et al.*, 2011), während er in Pollenschläuchen nur durch den Anionenkanal SLAH3 vermittelt wird (Abbildung 14). Der Einfluss von SLAH3 auf den oszillierenden Anionenausstrom und das Wachstum in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen wurde bereits in Gutermuth *et al.*, 2013, bestätigt. Allerdings schien die Beteiligung weiterer Anionenkanäle in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen wahrscheinlich, da der Efflux von Anionen an der

Pollenschlauchspitze in *slah3-1*-Pollenschläuchen nur um etwa 20 % verringert war (Gutermuth *et al.*, 2013). Die Inhibierung des Anionenausstroms durch 50  $\mu$ M Niflumsäure in Wildtyp-Pollenschläuchen (Abbildung 22) zeigt eine Stromreduktion im negativen Spannungsbereich, die mit der Stromreduktion der beiden gemessenen Verlustmutanten *slah3-1* und *slah3-2* auf 40 mM Nitratmedium korreliert (Abbildung 23). Die Einwärtsströme der beiden Verlustmutanten *slah3-1* und *slah3-2* bei -200 mV zeigen eine Stromreduktion von 52,9 % und 60,5 % (Abbildung 23), im Vergleich dazu kommt es bei der Inhibierung der Anionenströme durch Niflumsäure im Wildtyp Col-0 zu einer Stromreduktion von 59,6 % (Abbildung 22). Der auf Nitrat-Keimungsmedium gemessene Anionenausstrom scheint vollständig SLAH3-vermittelt zu sein, während der Anioneneinstrom (im positiven Spannungsbereich) im Nitrat-Keimungsmedium durch einen weiteren Anionenkanal beeinflusst zu werden scheint. Vergleicht man die Stromreduktion der Niflumsäure-Inhibierung bei +80 mV (Abbildung 22) und der *slah3-1* oder *slah3-2*-Verlustmutanten bei +80 mV (Abbildung 23), zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Reduktion der Anionenströme von ca. 80 % bei 50  $\mu$ M Niflumsäure (Abbildung 22) zu ca. 27 % in der *slah3-2*-Verlustmutante und 43 % in der *slah3-1*-Verlustmutante (Abbildung 23). Dies deutet auf die Expression eines weiteren Niflumsäure-sensitiven Anionenkanals hin, der unter den verwendeten Anionenbedingungen von 40 mM Nitrat an dem Einstrom von Anionen beteiligt ist.

Aus Meyers *et al.*, 2011, war bekannt, dass der R-Typ-Anionenkanal ALMT12 in Pollen exprimiert wird und stellte somit einen potenziellen Kandidaten für diesen Reststrom dar. ALMT12 wird unter den untersuchten Medienbedingungen exprimiert (Abbildung 14 und Abbildung 26) und ist laut Colcombet *et al.*, 2005, sensitiv für den Anionenkanal-Inhibitor Niflumsäure. Weiterhin besitzt der R-Typ-vermittelte Anionenstrom in Hypocotylzellen eine Permeabilität für Nitrat und Chlorid (Colcombet *et al.*, 2005). Die in dieser Arbeit gemessenen Ganzzellströme in *Xenopus*-Oozyten und in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen zeigen, dass ALMT12 ohne die Aktivierung durch Malat keine Einwärtsströme (Anionenausstrom), wohl aber Auswärtsströme (Anioneneinstrom) im positiven Spannungsbereich zulässt (siehe Abbildung 29, Abbildung 30 und Abbildung 31). Diese Messungen basieren allerdings auf einem Chlorid-basierten Medium und wurden bereits in Sasaki *et al.*, 2010, beobachtet. Sasaki *et al.*, 2010, beschrieb ebenfalls den Einstrom von Chlorid bei positiven Membranspannungen, konnte allerdings ohne Malat im Keimungsmedium keinen Anionenausstrom im negativen Spannungsbereich nachweisen. Eine schnelle Überprüfung der These, dass ALMT12 an den Auswärtsströmen in Nitrat basierendem Keimungsmedium beteiligt ist, bestünde in der Wiederholung der TEVC-Pollenschlauchmessungen mit Niflumsäure im

*almt12-1*-Verlustmutanten-Hintergrund, um eine Angleichung der Reduktion der Auswärtsströme auf 40 mM Nitrat-Keimungsmedium mit der *slah3-1*-Verlustmutante zu überprüfen. Auf Grundlage dieser These scheinen die gemessenen Auswärtsströme (Anioneneinstrom) nicht allein durch den Anionenkanal SLAH3 vermittelt zu werden, während die biologisch relevanteren Einwärtsströme auf reinem Nitratmedium größtenteils auf dem Anionenkanal SLAH3 beruhen.

#### **4.2.3 Aktivierung von SLAH3 durch Calcium-abhängige Kinasen in der Pollenschlauchspitze**

Die Calcium-vermittelte Regulation von Anionenkanälen durch Calcium-abhängige Kinasen wurde in Schließzellen bereits weitestgehend aufgeklärt. So konnte der für den Stomaschluss verantwortliche Anionenausstrom aus der Zelle durch S-Typ-Anionenkanäle belegt werden, die durch Calcium-abhängige Kinasen gesteuert werden (Keller *et al.*, 1989, Hedrich *et al.*, 1990; Schröder und Keller *et al.*, 1992; Mori *et al.*, 2006; Geiger *et al.*, 2010; Geiger *et al.*, 2011; Scherzer *et al.*, 2012). Diese Calcium-vermittelte Aktivierung von S-Typ-Anionenkanälen durch CPK21, CPK23, CPK3 und CPK6 (Mori *et al.*, 2006; Geiger *et al.*, 2010; Geiger *et al.*, 2011; Scherzer *et al.*, 2012) konnte bereits in Schließzellen durch eine Kombination von Proteinbiochemie, Elektrophysiologie sowie Phänotypanalysen beim Stomaschluss nachgewiesen werden. In Pollenschläuchen beschränkt sich die Regulation von Calciumsensorproteinen durch wechselnde Calciumkonzentrationen wahrscheinlich auf die Pollenschlauchspitze, da sich hier, bedingt durch den oszillierenden Calciumeinstrom, eine lokal hohe zytoplasmatische Calciumkonzentration einstellt. Bisher konnte der vollständige Signalweg vom Calciumeinstrom bis zur Ionenkanalaktivierung in Pollenschläuchen erst 2013 in Zhao *et al.* und Gutermuth *et al.*, 2013, aufgezeigt werden. Zhao *et al.*, 2013, konnte die Regulation des pollenspezifischen Kaliumkanals SPIK durch die beiden Calcium-abhängigen Kinasen CPK11 und CPK24 in Pollenprotoplasten aufklären. Hierbei kommt es zu einer Calcium-abhängigen Aktivierung von CPK11, die daraufhin den CPK24-N-Terminus phosphoryliert, was dann zu einer negativen Regulation des SPIK-vermittelten Kaliumeinstroms führt. Ein ähnlicher Mechanismus könnte für die spitzenlokalisierten Calcium-abhängigen Kinasen CPK2 und CPK20 in intakten *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen durch die hier vorliegende Arbeit aufgezeigt werden. Durch den oszillierenden Calciumeinstrom kommt es zur Aktivierung der beiden

Calcium-abhängigen Kinasen in der Pollenschlauchspitze, wo diese durch Phosphorylierung des Anionenkanals SLAH3 zu einem lokalen Ausstrom von Anionen aus der Pollenschlauchspitze führen. Die Interaktion von CPK2 und CPK20 mit dem Anionenkanal SLAH3 wurde sowohl in FRET-FLIM und BiFC-Experimenten, als auch im Oozyten-Expressionssystem (Gutermuth *et al.*, 2013) und *in vivo* in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen (Abschnitt 3.4) bestätigt.

Die in dieser Arbeit gezeigte Reduktion der Einwärtsströme der Dreifachverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* entspricht in etwa der Reduktion der beiden Verlustmutanten *slah3-1* und *slah3-2* von 52,9 % und 60,5 % bei -200 mV (Abbildung 23). Somit scheinen diese drei Kinasen größtenteils für die Aktivierung von SLAH3 verantwortlich zu sein. Eine weitere mögliche Aktivierung der SLAH3-vermittelten Einwärtsströme könnte die in Colcombet *et al.*, 2005, erwähnte pH-Abhängigkeit von S-Typ-Kanälen sein. Colcombet zeigt einen Anstieg der S-Typ-Anionenkanalaktivität bei zytosolischer Ansäuerung, welche im Pollenschlauch durch einen ebenfalls oszillierenden Protonengradienten an der Pollenschlauchspitze (Feijo *et al.*, 1999; Michard *et al.*, 2008) gegeben wäre. Des Weiteren würde die H<sup>+</sup>-vermittelte Aktivierung die charakteristischen S-Typ-Ströme auf reinem Chloridmedium ohne die extrazelluläre Aktivierung durch Nitrat erklären, die in Abbildung 22 D zu sehen ist. In Gutermuth *et al.*, 2013, konnten wir zeigen, dass der Einfluss der Anionenkonzentration im Keimungsmedium auf den apikalen pH-Wert regulatorisch wirkt. Mit steigenden Anionenkonzentrationen kommt es zu einer stärkeren apikalen Ansäuerung sowie zu einer stärkeren Ausprägung des Calciumgradienten. Gleichzeitig kommt es zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Anionenkonzentration (Abbildung 19). Die Aktivierung von SLAH3 durch die apikale Ansäuerung könnte ein weiterer physiologischer Regelkreis bei der Steuerung des Anionenausstroms in der Pollenschlauchspitze sein.

Weitere TEVC-Experimente mit unterschiedlichen pH-Werten des Keimungsmediums könnten den Einfluss des pH-Gradienten auf die Aktivierung von SLAH3 in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen weiter aufklären.

Eine artifizielle Erhöhung der zytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch das Calcium-Ionophor A23187 zeigt deutlich die Abhängigkeit der S-Typ-Anionenströme von der intrazellulären Calciumkonzentration (Abbildung 25). Eine solche Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit konnte ebenfalls für die Anionenströme in *Tabak*-Schließzellen belegt werden (Marten *et al.*, 2008). In Pollenschläuchen spielen CPK2 und CPK20 aufgrund ihrer Spitzenlokalisation eine wichtige Rolle, da der oszillierende Calciumeinstrom sich auf die Spitzenregion beschränkt (Holdaway-Clark *et al.*, 1997). Die subzelluläre Lokalisation

von CPK6 ergab in Pollen ebenfalls eine Plasmamembran-Lokalisation, wenngleich sie nicht so polar wie die CPK2 und CPK20 an der Spitze vorkam und eher ubiquitär nachgewiesen werden konnte. Allerdings zeigt die Dreifachverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* eine deutliche Reduktion der durch das Calcium-Ionophor vermittelten Aktivierung der S-Typ-Anionenströme, mit einer lediglich 50%igen Zunahme im Vergleich zum Wildtyp Col-0 mit einer 160%igen Steigerung der Stromamplitude bei -200 mV (Abbildung 25). In Gutermuth *et al.*, 2013, wurde mittels Vibrating-Probenmessungen eine Reduktion des Anionenausstroms aus der Pollenschlauchspitze von *slah3-1* und *cpk2-1 x cpk20-2*-Verlustmutanten im Vergleich zum Wildtyp Col-0 sowie eine signifikante Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit in der *cpk2-1 x cpk20-2* Verlustmutante nachgewiesen (Gutermuth *et al.*, 2013). Der Einfluss weiterer Calcium-abhängiger Aktivatoren sollte nicht ausgeschlossen werden. So konnte Zhou *et al.*, 2015, eine durch Überexpression von CIPK19 vermittelte Änderung des Calciumeinstroms in die Pollenschlauchspitze zeigen, während die Verlustmutante einen starken Transmissionsdefekt aufwies. Die in Abschnitt 3.2.3, 3.4 und 3.5 beschriebene Regulation der zytoplasmatischen Anionenkonzentration durch die apoplastische Anionenkonzentration und die Calcium-abhängige Aktivierung des Anionenausstroms durch die Calcium-abhängigen Kinasen CPK2, CPK6 und CPK20 deuten auf einen Regelkreislauf zwischen Anionenausstrom und Calciumeinstrom hin. Dieser wird durch die in Gutermuth *et al.*, 2013, gezeigten Änderungen des oszillierenden Calciumeinstroms und der Wachstumsoszillationen durch die apoplastische Anionenkonzentration noch ergänzt. So verringern sich der Calciumeinstrom bei niedrigen Anionenkonzentrationen im Keimungsmedium (Gutermuth *et al.*, 2013), was gleichbedeutend mit einer geringeren zytoplasmatischen Anionenkonzentration (Abbildung 19) ist und zu einem geringeren Anionenausstrom führt. Durch die Steigerung der Anionenkonzentration im Keimungsmedium kommt es zu einem Anstieg des Calciumeinstroms und zu einem stärkeren Anionenausstrom, was einhergeht mit stärkeren Wachstumsoszillationen (Gutermuth *et al.*, 2013). Um den kausalen Zusammenhang zwischen der hohen apikalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und dem Anionenefflux direkt aufzeigen zu können, sollte der durch das Ionophor vermittelte Calciumeinstrom und dessen Einfluss auf die Ganzzellströme betrachtet werden. So könnte mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie der Einfluss des Anionenausstroms auf die Wachstumsrichtung des Pollenschlauchs durch die Wiederholung der in Malho *et al.*, 1996 gezeigten Experimente in Tabak-Pollenschläuchen mittels Chlorid-Sensor nachgewiesen werden. Malho applizierte geringe Mengen Calcium-Ionophor an einer Seite der apikalen Zone und änderte dadurch die Wachstumsrichtung des

Pollenschlauchs. Dies lässt vermuten, dass eine seitenspezifische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung sich auch auf die Orientierung des Anionenausstroms auswirken könnte. Dies würde die Korrelation zwischen zytoplasmatischer Calciumkonzentration, Anionenefflux und einem gerichteten Wachstum entlang eines Calciumgradienten im Transmissionsgewebe (Ge *et al.*, 2009) festigen.

### 4.3 R-Typ-Anionenkanäle in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen

Durch die durchgeführte qRT-PCR Expressionsanalyse der ALMT-Gen-Familie konnte erstmals die Expression von ALMT3, 4 und 5 sowie ALMT11, 12, 13 und 14 (Abbildung 26) in Pollenschläuchen aufgezeigt werden. Weiterhin konnte die transkriptionelle Steuerung durch extrazelluläre Malatkonzentrationen aller in Pollenschläuchen exprimierten ALMT-Gene nachgewiesen werden. Aufgrund phylogenetischer Homologien (Dreyer *et al.*, 2012) von ALMT12, dem bereits gut charakterisierten Plasmamembran-ständigen R-Typ-Anionenkanal, zu ALMT11, ALMT13 und ALMT14 wurde der Fokus unserer Anionenkanal-Analysen auf diese Vertreter gelegt. Die Klasse der Plasmamembran-lokalisierten ALMTs zeigten ebenfalls einen Malat-induzierten Anstieg der ALMT11, 12, 13 und 14-Transkripten, allerdings weist ALMT12 auch ohne Malat im Keimungsmedium eine vergleichbar hohe Transkription in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen auf. Um zu überprüfen, ob der Verlust von ALMT12 Auswirkungen auf die Transkription der anderen ALMT-Gene hat, wurden die ALMT-Transkripte in der ALMT12-Verlustmutante untersucht. Die Abwesenheit von ALMT12 führte überraschenderweise zu keiner signifikanten Änderung der Transkription der ebenfalls in der Plasmamembran lokalisierten Anionenkanäle ALMT13 und ALMT14 sowie der anderen exprimierten ALMTs in der *almt12-2*-Verlustmutante. Die Malat-induzierte Steigerung der Transkription könnte auf einen ähnlichen Mechanismus zurückgehen, wie der bereits für den S-Typ-Anionenkanal SLAH3 im Chlorid-Medium in Abschnitt 4.2.1 beschriebene. Durch eine hohe Malat-Konzentration im Medium könnte es zu einer gesteigerten Aufnahme von Malat ins Zytoplasma des Pollenschlauchs kommen, was wiederum zu einem gesteigerten Anionenausstrom führt (Abbildung 29 und Abbildung 30), welcher durch die gesteigerte Expression von ALMT12, ALMT13 und ALMT14 gewährleistet wird, um eine Störung der

Anionenhomöostase entgegenzuwirken. Eine gezielte Aufnahme von Malat aus den Apoplasten wurde bereits im Schließzellmodellssystem nachgewiesen und wird durch den ABC-Transporter ABCB14 vermittelt. Die heterologe Expression von ABCB14 in *Escherichia coli* führte zu einem gesteigerten Malat-Transport (Lee *et al.*, 2008).

Die eigens durchgeführte elektrophysiologische Charakterisierung von ALMT12 im *Xenopus*-Oozyten-System deckt sich mit den Daten, welche durch Meyer *et al.*, 2010, publiziert wurden. In den Messungen zeigt sich ein Anstieg der Einwärtsströme (Anionenausstrom aus dem Zytoplasma) durch die extrazelluläre Aktivierung von Malat in der Badlösung als auch bei Messungen, bei denen eine zytosolische Beladung von Malat in ALMT12-exprimierenden Oozyten stattgefunden hatte (Abbildung 31, Abbildung 32 und Abbildung 33). Eine zytosolische Konzentrationserhöhung könnte durch die Permeabilität von ALMT12 für Malat zu einer extrazellulären Aktivierung durch ausströmendes Malat führen. Die Messungen zeigen ebenfalls erstmals, dass die ALMT12-vermittelten Einwärtsströme sowohl durch die Erhöhung der intrazellulären Cl<sup>-</sup> als auch Malat-Konzentrationen verursacht werden, wobei die Anwesenheit von extrazellulärem Malat für eine generelle Aktivierung des Kanals notwendig ist (Abbildung 32). Auch die im *Xenopus*-Oozyten-System gezeigten Ergebnisse sind konform mit der Transkriptionsanalyse (Abbildung 26) und der R-Typ-Anionenstrom-Charakterisierung (Abbildung 29 und Abbildung 30) in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen. Elektrophysiologische Untersuchungen der R-Typ-Anionenströme in Pollenschläuchen zeigte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Steigerung der R-Typ-Anionenströme durch extrazelluläre Malatkonzentration. Durch die elektrophysiologische Charakterisierung von *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen konnte gezeigt werden, dass alle drei R-Typ-Anionenkanäle ALMT12, ALMT13 und ALMT14 einen Teil der charakteristischen R-Typ-Stromantwort (Abbildung 35 und Abbildung 36) darstellen. Obwohl die Expression von ALMT12 im Vergleich zu ALMT13 und ALMT14 in Pollenschläuchen auch ohne Malat im Keimungsmedium mit 461 Transkripten schon relativ hoch exprimiert vorliegt, führt der Verlust von ALMT12 zu keiner transkriptionellen Änderung der ALMT13- und ALMT14-Transkription (Abbildung 26). Allerdings weisen *almt12-1*- und *almt12-2*-Pollenschläuche eine deutliche Reduzierung der R-Typ-Stromantwort (Abbildung 35 und Abbildung 36) sowie ein verringertes Längenwachstum (Abbildung 38) unter erhöhten Malatkonzentrationen (0 mM auf 20 mM Malat) im Keimungsmedium auf.

Die Aktivierung von ALMT12 durch die SnrK-Kinase OST1, welche in Schließzellen für die Calcium-unabhängige Aktivierung von R- und S-Typ-Anionenkanälen verantwortlich ist, wurde bereits von Imes *et al.*, 2013, nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte auch zum ersten Mal die Aktivierung von ALMT12 durch CPK2 und 20 sowie CPK6 in *Xenopus*-Oozyten aufgezeigt werden, was aus Abschnitt 3.8.1 ersichtlich wird. Dieser Aktivierungsmechanismus ähnelt sehr der Calcium-abhängigen Regulation des S-Typ-Anionenkanals SLAH3 und deutet ebenfalls auch auf einen zweiten OST1-unabhängigen, Calcium-abhängigen Aktivierungsweg von ALMT12 in Schließzellen hin, für die bis zu diesem Zeitpunkt nur eine Calcium-unabhängige Aktivierung des R-Typ-Anionenkanals ALMT12 durch OST1 (Imes *et al.*, 2013) bekannt war. Ob die Calcium-vermittelte Aktivierung auch auf ALMT13 und ALMT14 zutrifft, muss in zukünftigen Versuchsreihen geklärt werden, jedoch deuten die Messungen auf eine Malat-abhängige Aktivierung von ALMT13 und ALMT14 in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen (Abbildung 35 und Abbildung 36) hin.

Aufschlussreich wäre ebenfalls die Charakterisierung von ALMT11, für den ebenfalls eine Malat-induzierte Steigerung der Transkription gezeigt werden konnte (Abbildung 26), im *Xenopus*-Expressionssystem und ob ALMT11 einen Einfluss auf die R-Typ-Anionenströme von ALMT12, ALMT13 oder ALMT14 hat. ALMT11 könnte wegen seiner geringen Größe (17,1 KDa) und seiner starken Homologie zum N-Terminus von ALMT12 eventuell eine regulatorische Funktion übernehmen. Ebenfalls sollte der Einfluss von ALMT12-, ALMT13- und ALMT14-Heteromeren auf die R-Typ-Stromantwort untersucht werden, um Rückschlüsse auf Leitfähigkeit und Selektivität dieser Heteromere ziehen zu können.

Die Regulation von ALMT13 und ALMT14 durch Calcium-abhängige Kinasen sowie deren relative Permeabilität konnte in dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht geklärt werden. Die Messungen aus Abschnitt 3.9 legen aber eine Aktivierung von ALMT13 und ALMT14 durch Malat in der gleichen Weise wie bei ALMT12 nahe, da die durch ALMT13 und ALMT14 verursachten R-Typ-Ströme in *almt12-1*- und *almt12-2*-Pollenschläuchen nur in Anwesenheit von Malat im Keimungsmedium messbar waren. Es konnte auch in Wildtyp-Pollenschläuchen keine charakteristische R-Typ-Glockenkurven-Kinetik in Abwesenheit von Malat beobachtet werden.

Die Deletion des ALMT12-Gens in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen verursacht eine Reduktion des Längenwachstums mit steigender Malatkonzentration im Keimungsmedium. Die in dieser Arbeit erbrachten Daten zeigen, dass es durch den Verlust von CPK2 und CPK20 sowohl zu einer Reduktion des S-Typ- als auch des

R-Typ-Anionenausstroms aus der Pollenschlauchspitze kommt. Dies könnte die in Gutermuth *et al.*, 2013, beschriebene stärkere Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit der *cpk2-1 x cpk20-2-* im Vergleich zur *slah3-1*-Verlustmutante erklären. Die Doppel-Deletion von entweder ALMT12 und ALMT13 oder ALMT12 und ALMT14 führt zu noch kürzeren Pollenschläuchen im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 38), was auf eine Beteiligung von ALMT13 und ALMT14 am Pollenschlauchwachstum unter *in vitro*-Bedingungen schließen lässt. Die Malat-unabhängige Reduktion des Längenwachstums der *almt12-1 x almt13-1-* und *almt12-1 x almt14-1*-Pollenschläuchen unter Malat-freien Medienbedingungen lässt sich im Vergleich mit der Verlustmutante *almt12-2* auf die Deletion von ALMT13 und ALMT14 zurückführen, da der Verlust von ALMT12 unter Malat-freien Bedingungen unter den gewählten Medienkonditionen zu keiner Beeinträchtigung des Längenwachstums führt.

Der gezeigte Wachstums-Phänotyp in Malat-freiem Keimungsmedium (Abbildung 38) der beiden Doppelverlustmutanten *almt12-1 x almt13-1* und *almt12-1 x almt14-1* könnte durch die Messung der Ganzzellströme im *slah3-1*-Hintergrund in Malat-freiem Keimungsmedium aufgeklärt werden, hierbei sollten die Ganzzellströme von *almt12-1 x almt13-1* und *almt12-1 x almt14-1* gegen *almt12-1 x slah3-1* in Malat-freiem Chloridmedium verglichen werden. Weiterhin sollte die Aktivierung von ALMT13 und ALMT14 durch Calcium-abhängige Kinasen im Oozyten-Expressionssystem mit in die elektrophysiologische Charakterisierung einbezogen werden und eine Pollenschlauch-Längenwachstums-Phänotyp-Analyse der Dreifachverlustmutante *cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1* durchgeführt werden. Ebenfalls sollte der in Sunita *et al.*, 2015, beschriebene Einfluss von GABA im Keimungsmedium auf die gemessenen R-Typ-Anionenströme untersucht werden. Sunita beschreibt eine in der gesamten ALMT-Familie konservierte GABA-Bindungsdomäne, welche ebenfalls im humanen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor zu finden ist. Die Bindung von GABA führt zu einer Reduktion des ALMT-vermittelten Anionenausstroms. Dieser Effekt wurde aber erst für den in Wurzeln exprimierten Anionenkanal ALMT1 durch elektrophysiologische Ableitungen bestätigt. Weiterhin zeigte Sunita *et al.*, 2015, eine Reduktion der Pollenschlauchlänge durch das GABA Analog Muscinol. Dieses Ergebnis stützt den in dieser Arbeit gezeigten Wachstumsphänotyp der ALMT-Verlustmutanten (Abbildung 38) und bestätigt den für das Pollenschlauchwachstum notwendigen R-Typ-Anionenausstrom. Die GABA-induzierte Inhibierung der R-Typ-Anionenströme könnte den in Palanivelu *et al.*, 2003, beschriebenen Wachstumsarrest der Pollenschläuche in der Transaminase Verlustmutante *pop2*, bei der es zum Verlust des natürlichen, vom Stigma zu den Ovarien hin ansteigenden GABA-Gradienten kommt, erklären. Der Verlust von *pop2*

führt zur Akkumulation von GABA im Transmissionsgewebe und würde somit zu einer frühzeitigen Inhibierung des R-Typ-Anionenausstroms und zum Wachstumsstopp führen. Eine zukünftige Phänotyp-Analyse mit ansteigenden GABA-Konzentrationen im Keimungsmedium könnte diese These bestätigen. Zusätzlich sollten Pollenschläuche der Verlustmutanten *almt12-1* und *almt12-2* sowie die Doppelverlustmutanten *almt12-1 x almt13-1* und *almt12-1 x almt14-1* auf eine mögliche höhere Sensitivität gegenüber GABA mit dem Wildtyp Col-0 verglichen werden, um den Einfluss von GABA auf ALMT12, ALMT13 und ALMT14 zu untersuchen.

#### **4.4 Calcium-Influx und Chlorid-Efflux in *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen**

Der oszillierende Calciumgradient in der Pollenschlauchspitze wurde erstmals 1975 in Jaffe *et al.* beschrieben und zeigte eine 100-fach höhere Calciumakkumulation in der Spitze im Vergleich zum hinteren Bereich des Pollenschlauchs. In den darauf folgenden Jahren etablierte sich der Calciumgradient als ein essentieller Bestandteil des polaren Pollenschlauchwachstums (Brewbaker und Kwack *et al.*, 1963; Holdaway-Clarke *et al.*, 1997, Messerli *et al.*, 2000). Die für den apikalen Calciumeinstrom verantwortlichen  $Ca^{2+}$ -permeablen Kanäle sind bis heute noch nicht vollständig bekannt. In Pollenschläuchen wurden Calciumkanäle aus der CNGC- und GLR-Familie in Frietsch *et al.*, 2007, und Michard *et al.*, 2011, beschrieben. Frietsch *et al.* zeigt, dass CNGC18 eher an dem eigentlichen Wachstumsprozess durch das stigmatoide Gewebe verantwortlich zu sein scheint. Pollenschläuche der GNGC18-Verlustmutante waren nicht in der Lage, in das Transmissionsgewebe einzuwachsen. GLR1.2 und GLR3.7 hingegen haben starken Einfluss auf den eigentlichen Prozess des polaren Zellwachstums und werden durch externes D-Serin reguliert. Die Existenz mehrerer Calciumkanalfamilien in der Pollenschlauchspitze mit unterschiedlichen regulatorischen Eigenschaften ist durchaus denkbar. Durch die Zugabe von D-Serin zum Keimungsmedium könnte man die Abhängigkeit der Anionenkanäle von Calciumkanälen aus der GLR-Familie in Pollenschläuchen untersuchen. Generell könnte die elektrophysiologische Charakterisierung der Anionenströme von GNGC18-, GLR1.2- und GLR3.7-Verlustmutanten Aufschluss über die für den Calcium-vermittelten Anionenausstrom verantwortlichen Kanäle erbringen. Sind die verantwortlichen

Calciumkanäle identifiziert, könnten diese im heterologen Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyten weiter charakterisiert werden, um den für den Calciumeinstrom in die Pollenschlauchspitze verantwortlichen Aktivierungsmechanismus aufzudecken.

Die Existenz hyperpolarisations-aktivierter Calciumkanäle in Pollen wurde bereits für *Lilium davidii* (Shang *et al.*, 2005), *Pyrus pyrifolia* (Qu *et al.*, 2007), *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2004) mittels Patch-Clamp-Messungen nachgewiesen. Dutta *et al.*, 2004, beschreibt ebenfalls mechanosensitive Calciumkanäle in der Pollenschlauchspitze von *Lilium longiflorum*. Die Beteiligung von Hyperpolarisations-aktivierten Calciumkanälen ist ebenfalls bei der Regulation des Stomaschlusses in Schließzellen bekannt (Grabov *et al.*, 1998; Hamilton *et al.*, 2000; Levchenko *et al.*, 2005; Marten *et al.*, 2008; Stange *et al.*, 2010). In *Nicotiana tabacum*-Schließzellen konnte eine durch Hyperpolarisation induzierte Erhöhung der Calciumkonzentration ausgelöst werden, welches zur Aktivierung der S-Typ-Anionenkanäle und damit zum Stomaschluss führte (Stange *et al.*, 2010).

Durch die Kombination aus TEVC und Fluoreszenzmikroskopie konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals die Aktivierung von hyperpolarisations-aktivierten, plasmamembranständigen Calciumkanälen (HACCs) an der Pollenschlauchspitze gezeigt werden. Hierzu wurden hyperpolarisierende Spannungspulse appliziert und gleichzeitig mit Hilfe von YC3.6-exprimierenden Tabak-Pollenschläuchen eine zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationserhöhung visualisiert (Abbildung 40). Der apikale Calciumeinstrom lässt sich nur durch Hyperpolarisation, nicht durch Depolarisation des Membranpotenzials induzieren (Abbildung 41). Die Länge und Stärke des Hyperpolarisationspulses wurde hierbei so gewählt, dass eine reproduzierbare Induktion des Calciumeinstroms gewährleistet war. Positivere und kürzere Hyperpolarisationspulse führten ebenfalls zu einem Calciumeinstrom (Daten nicht gezeigt), waren aber stark vom Abstand der Elektrode zur Pollenschlauchspitze abhängig und mussten für jede gemessene Zelle erst neu bestimmt werden. Das gewählte Spannungspulsprotokoll von -200 mV für 1 s ermöglichte ein über den gesamten Zeitraum der Experimente reproduzierbaren Calciumeinstrom. Da der künstlich durch Hyperpolarisation ausgelöste Calciumeinstrom nur an der Pollenschlauchspitze auftritt (Abbildung 40), obwohl die gesamte Zellmembran des Pollenschlauchs während des Spannungspulses auf -200 mV hyperpolarisiert wird, deutet dies auf eine exklusive Lokalisation der HACCs in der Pollenschlauchspitze oder aber auf eine für die Aktivierung der HACCs verantwortliche Komponente in der apikalen

Region des Pollenschlauches hin. Der apikal oszillierende Protonengradient (Feijo *et al.*, 1999) könnte eine auf die apikale Region beschränkte regulatorische Funktion für die HACCs darstellen. Qu *et al.*, 2007, zeigte einen Anstieg des Calciumeinstroms in Pollenprotoplasten durch Ansäuerung. Die Ansäuerung findet durch den oszillierenden Einstrom von Protonen in die Pollenschlauchspitze statt und erfolgt kurz vor dem Einstrom von Calcium (Messerli *et al.*, 1999). Der Protoneneinstrom wiederum wird durch die zytoplasmatische Chloridkonzentration beeinflusst. Mit steigender apoplastischer Chloridkonzentration kommt es zu einem Anstieg des oszillierenden Protoneneinstroms an der Pollenschlauchspitze (Gutermuth *et al.*, 2013). Eine intensive Betrachtung des oszillierenden Protonengradienten und dessen Einfluss auf die Calcium-Anionenhomöostase sollte in zukünftigen Experimenten mit variierenden pH-Werten in Kombination mit TEVC-Technik und Fluoreszenzmikroskopie mit einbezogen werden.

Durch die Anwendung der oben beschriebenen Hyperpolarisationspulse konnte in Cl-Sensor-exprimierenden Tabak-Pollenschläuchen ein Chloridausstrom aus der Pollenschlauchspitze durch die simultane Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie und TEVC-Technik detektiert werden (Abbildung 43). Dies ist konform mit Messungen aus den Abschnitten 3.4, 3.5, 3.9 und 3.10 in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen, bei denen eine Aktivierung der Anionenkanäle durch Calcium-abhängige Kinasen nachgewiesen wurde. Interessanterweise führte die Applikation von Depolarisationspulsen mit +60 mV für 1 s bei 2 der 3 Experimente zu einer Zunahme der zytoplasmatischen Chloridkonzentration (Abbildung 43). Diese Zunahme erfolgte in der subapikalen Zone des Pollenschlauchs, wie es schon in Zonia *et al.*, 2002, durch Vibrating-Probemessungen an Tabak-Pollen gezeigt werden konnte. Der Chlorideinstrom erfolgt unabhängig von der apikalen Zone und wird über andere Transportproteine als der Chloridausstrom vermittelt, da es in der Pollenschlauchspitze zu keiner Zunahme der Chloridkonzentration während der Depolarisation kommt (Abbildung 43). Die gemessenen Ganzzellströme zeigen eine klare Korrelation zur zytoplasmatischen Chloridkonzentration und der charakteristischen S-Typ-Kinetik. Je höher die zytoplasmatische relative Chloridkonzentration ist, die hier optisch mittels des Anionen-sensitiven Cl-Sensors aufgezeichnet wurde, desto größer fallen auch die charakteristischen S-Typ-Stromantworten aus (Abbildung 44). Sowohl Calciumeinstrom als auch ein Chloridausstrom konnte durch Hyperpolarisation der Plasmamembran in der Pollenschlauchspitze ausgelöst werden. Calciumeinstrom und Chloridausstrom erfolgten (Abbildung 41 und Abbildung 43) bei der verwendeten zeitlichen Auflösung von einem 1 Hz fast zeitgleich. Durch eine höhere Bildaufnahmefrequenz könnte die zeitliche

Abfolge des Calciumein- und Chloridausstroms noch genauer betrachtet werden. Der kausale Zusammenhang zwischen der apikalen Calciumkonzentration und dem Chlorid-Efflux konnte durch einen pharmakologischen experimentellen Ansatz mittels Inhibitoren aufgeklärt werden. Durch die Applikation des Calciumkanal-Inhibitors Lanthan wurde gezeigt, dass sowohl der Calciumeinstrom (Abbildung 41) als auch der Chloridausstrom inhibiert wurde (Abbildung 45), während die Applikation des Anionenkanal-Inhibitors Niflumsäure (Abbildung 42) keinen Einfluss auf den Calciumeinstrom hat. Die gemessenen Anionenströme konnten durch Niflumsäure allerdings stark reduziert werden. Wir können demnach davon ausgehen, dass eine Abhängigkeit des Chloridausstroms von dem hyperpolarisations-aktivierten Calciumeinstrom vorliegt. Dies ist auch in Übereinstimmung mit den in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen durchgeführten elektrophysiologischen Messreihen der CPK-Verlustmutanten (Abbildung 23 und Abbildung 35), bei denen es zu einer Reduktion der R-Typ- und S-Typ-Anionenströme kam. Durch die Applikation des Calcium-Ionophores A23187 in das Keimungsmedium (Abbildung 25 und Abbildung 37) konnte ebenfalls ein Anstieg des R-Typ- als auch des S-Typ-vermittelten Anionenausstroms induziert werden.

Der Einsatz von Lanthan verursacht in wachsenden Pollenschläuchen eine apikale Erhöhung der zytoplasmatischen Chloridkonzentration (Abbildung 46). Möglicherweise führt dies zu einer Turgorerhöhung aufgrund des fehlenden Chloridausstroms und könnte somit zum beobachteten Anschwellen der Pollenschlauchspitze beigetragen haben. Diese Beobachtung korreliert mit dem in Messerli *et al.*, 2000, beschriebenen osmotisch induzierten Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration. Über eine Turgorerhöhung durch die Inhibierung von Anionenkanälen wurde bereits in Zonia *et al.*, 2001, spekuliert, konnte aber bis heute noch nicht nachgewiesen werden. In Benkert *et al.*, 1997, konnte keine Korrelation zwischen Turgordruck und der Wachstumsgeschwindigkeit festgestellt werden. Die in dieser Arbeit gezeigte Interaktion von Calciumeinstrom und Chloridausstrom stützt die These, dass Anionen an der Turgorregulation beteiligt sind (Abbildung 46). Die mögliche osmotisch bedingte Turgorzunahme, welche durch die Akkumulation von Anionen in der Zelle verursacht wird, könnte einen Calciumeinstrom auslösen, welcher zur Anionenkanalaktivierung führt und somit wieder zu einer Abnahme des Turgors. In Stomata kommt es durch die Akkumulation von Kalium, Chlorid und Malat (Roelfsema & Hedrich 2005; Van Kirk & Raschke 1978) zu einer Zunahme des Turgors und somit zur Stomaöffnung. Hierbei kommt es zu Vergrößerung der Plasmamembranoberfläche (Franks *et al.*, 2001), welche zu Aktivierung von mechanosensitiven Calciumkanälen der MSL-Familie führen könnte.

Mechanosensitive Calciumkanäle wurden sowohl in Schließzellen (Cosgrove & Hedrich 1991; Haswell et al. 2008), als auch in Pollenschläuchen (Dutta *et al.*, 2004) beschrieben. Ebenso konnte die Existenz von hyperpolarisationsaktivierten Calciumkanälen in Schließzellen (Stange et al. 2010) und erstmals in dieser Arbeit in *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen nachgewiesen werden. Der hier postulierte Anionen-/Calcium-Regelkreis könnte maßgeblich an der Regulation des polaren Zellwachstums beteiligt sein. Die durch den Calciumeinstrom und Anionenausstrom verursachte Depolarisation (Abbildung 47) könnte, wie in Schließzellen, zur Aktivierung von auswärtsgerichtenden Kaliumkanälen (Hosy *et al.*, 2003) kommen. In Schließzellen wird diese Depolarisierung durch R- und S-Typ-Anionenkanäle vermittelt (Roelfsema *et al.*, 2004), die Depolarisierung führt zur Aktivierung des auswärtsgerichtenden Kaliumkanals GORK (Guard cell outward rectifying K<sup>+</sup> channel) (Ache *et al.*, 2000). Ein ähnlicher Mechanismus könnte in Pollenschläuchen mit dem sich zur Pollenschlauchspitze aufbauenden Chloridgradienten und dem durch die Depolarisation vermittelten Kaliumausstrom für eine Repolarisation des Membranpotenzials nach dem Anionenausstrom sorgen. Da die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente in Kalium-freien Medien durchgeführt wurden, kann die gezeigte Repolarisation (Abbildung 47) nicht Kalium-abhängig sein und könnte durch die Beteiligung von Calcium- und Protonen-ATPasen oder nur durch Auffüllen der subapikalen "Chloridspeicher" stattfinden. Andernfalls wäre eine Turgor-unabhängige Regulation des Calciumeinstroms und Anionenausstroms über die in Tabak nachgewiesenen hyperpolarisations-aktivierten Calciumkanäle möglich. Eine durch den Anstieg der Anionenkonzentration in der Pollenschlauchspitze hervorgerufene Hyperpolarisation (Breygina *et al.*, 2009) könnte die Calciumkanäle aktivieren und so durch den Ausstrom von Anionen für eine erneute Depolarisierung des Membranpotenzials sorgen, welches durch nachströmende Chlorid-Ionen aus dem subapikalen Zytoplasma wieder repolarisiert werden würde.

Diese Regulation könnte die widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich des GABA Gradient in Yu Gh *et al.*, 2014, und Sunita *et al.*, 2015, erklären und die beobachtete Erhöhung des Calciumeinstroms als auch die Deaktivierung des Anionenausstroms der ALMT-Anionenkanalfamilie miteinander verknüpfen. Während Sunita eine Inhibierung von Anionenkanälen der ALMT-Familie durch GABA postuliert, weisen die Ergebnisse von Yu auf eine Aktivierung von Calciumkanälen durch GABA hin. Eine Inhibierung des ALMT-vermittelten Anionenausstroms durch GABA könnte durch die Akkumulation von Anionen zu einer Hyperpolarisation führen, was wiederum zu einer verstärkten Aktivierung der hyperpolarisations-aktivierten Calciumkanäle führen würde. Ein Anstieg

des oszillierenden Calciumeinstroms durch den Anstieg der apoplastischen und der damit einhergehende Anstieg der zytoplasmatischen Chloridkonzentration (Abbildung 19) wurde bereits in Tabak-Pollenschläuchen nachgewiesen (Gutermuth *et al.*, 2013). Weiterhin müssten aber vorab die in Tabak exprimierten ALMT-Anionenkanäle identifiziert und elektrophysiologisch charakterisiert werden. Im Anschluss ließe sich durch die in dieser Arbeit verwendete Kombination aus Fluoreszenzmikroskopie und TEVC-Technik der Einfluss von GABA auf die Anionen- und Calcium-Homöostase weiter entschlüsseln.

Die durch den in dieser Arbeit erstmals dargelegten Calcium-/Anionen-Regelkreislauf resultierenden Membranpotenzialschwankungen in der Pollenschlauchspitze wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits beobachtet. Die in Abbildung 47 gezeigten Depolarisationstransienten konnten erstmals in Pollenschläuchen nachgewiesen werden und verdeutlichen, welche komplexen Abläufe in der Organell-freien apikalen Zone des Pollenschlauchs ablaufen und eine gerichtete Vesikelbewegung erst ermöglichen. Jedoch konnte die artifizielle Induktion des Calciumeinstroms durch den Einstich der Messelektrode noch nicht ausgeschlossen werden. Um die Membranpotenzial-Aktionspotenziale (Abbildung 47) in der Pollenschlauchspitze besser beobachten zu können, könnten die Einstichelektroden noch weiter optimiert werden, um eine durch den Einstich verursachte Störung der Anionenhomöostase, welche vermutlich durch einen Calciumeinstrom induziert wird, zu verringern. Man könnte in diesem Zusammenhang auch testen, ob die beobachteten „Aktionspotenziale“ durch Lanthan inhibiert werden können. Sollten weitere „Aktionspotenziale“ nach der Inhibierung der Calciumkanäle durch Lanthan sichtbar sein, kommt es zum Calciumeinstrom an der Elektrodeneinstichstelle und damit zu einer künstlich induzierten Depolarisation durch den artifiziellen Calciumeinstrom und den daraus resultierenden Chloridausstrom. Das natürliche Vorkommen der gezeigten „Aktionspotenziale“ konnte in dieser Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden, allerdings deuten die durchgeführten Experimente auf die Existenz solcher Membranpotenzial-Transienten hin, welche durch die Verwendung von Spannungssensoren in einer nicht invasiven Weise beobachtet werden könnten. Betrachtet man die in Abbildung 47 gemessene Membranpotenzialspur erkennt man nur bei der ersten der drei aufgezeichneten Membranpotenzial-Transienten eine Hyperpolarisierung des Membranpotenzials, während es bei den zwei nachfolgenden Membranpotenzial-Transienten kurz vorher zu einer langsam ansteigenden Depolarisierung kommt, welche gegen eine hyperpolarisations-induzierte Aktivierung und für eine mechanosensitive Aktivierung der Calciumkanäle sprechen würde. Die Differenz des natürlichen Calciumeinstroms mit  $1\text{-}20\text{ pmol/cm}^2\text{s}^{-1}$  und des

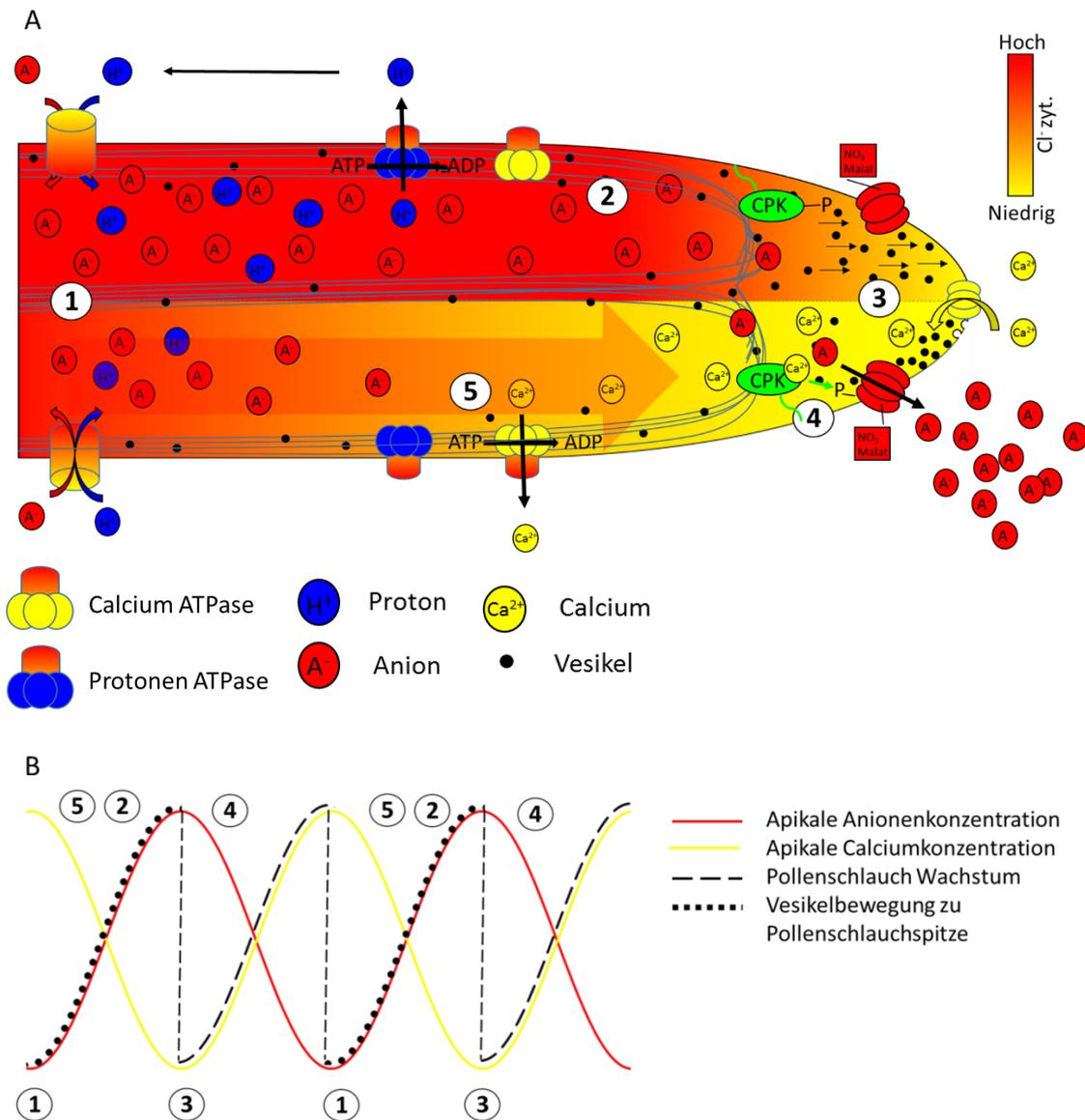
Chloridausstroms mit  $50\text{-}8000\text{ pmol/cm}^2\text{s}^{-1}$  (Kühtreiber und Jaffe *et al.*, 1990; Holdaway-Clarke *et al.*, 1997; Messerli *et al.*, 1999, Zonia *et al.*, 2002) deuten darauf hin, dass die gezeigten Depolarisationstransienten großteils durch den Ausstrom von Anionen als durch den geringeren Einstrom von Calcium verursacht werden. Die weitere Optimierung der in Abschnitt 3.19 beschriebenen Technik wird in Zukunft sicher zu einem besseren Verständnis für die Membranpotenzial-Oszillationen und des postulierten Regelkreises zwischen Calcium und Anionen in der Pollenschlauchspitze führen.

#### 4.5 Regulationsmodell des Anionenausstroms aus der Pollenschlauchspitze

Bereits in Zonia *et al.*, 2001 konnte nachgewiesen werden, dass Pollenschlauchwachstum und der oszillierende Anionenausstrom aus der Pollenschlauchspitze zeitgleich stattfinden. Ebenso kommt es während des Chloridausstroms zu einer Vesikelbewegung in der apikalen Zone zur Plasmamembran der Pollenschlauchspitze (Zonia *et al.*, 2002). Weiterhin wurde in Gutermuth *et al.*, 2013 der Zusammenhang zwischen der Anionenkonzentration im Keimungsmedium und der Frequenz des oszillierenden Calciumein- und Anionenausstroms sowie der Wachstumsoszillationen festgestellt. Je höher die Anionenkonzentration des Keimungsmediums war, desto niedriger wurden die Frequenz des Calciumein- und des Anionenausstroms, wobei die Stärke der jeweiligen relativen Konzentrationsänderungen zunahm. Dieser Effekt korrelierte mit dem Pollenschlauchwachstum, welches sich an die Frequenz des Anionenausstroms und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen anpasste (Abbildung 48 B). Niedrige Anionenkonzentrationen führten zu einer gesteigerten Frequenz und geringeren Variationen der apikalen relativen Calcium- und Chloridkonzentrationen, was zu einem annähernd gleichmäßigen nicht oszillierenden Wachstum führt. Die für das Wachstum benötigten Membranbausteine (exozytierende Vesikel) werden über Aktinstränge zur Pollenschlauchspitze transportiert und sammeln sich in der Organell- und Zytoskelett-freien apikalen Zone. Von dort aus bewegen sie sich mit dem Chloridausstrom an die Plasmamembran (Zonia *et al.*, 2002). Zonia *et al.*, 2001, vermutete einen durch den gerichteten Ausstrom von Chlorid-Ionen aus der Spitze entstehenden Wasserausstrom, der die Vesikel an die Plasmamembran treibt. Zu diesem Zeitpunkt ist die zytoplasmatische Calciumkonzentration in der apikalen Region

durch den, dem Anionenausstrom vorangegangenen Calciumeinstrom erhöht, was die Vesikelfusion mit der Plasmamembran begünstigt (Endozytose) (Camacho und Malho *et al.*, 2003; Coelho und Malho *et al.*, 2006; Südhof *et al.*, 2004) (Abbildung 48 B). Parton *et al.*, 2001, wies durch Anfärben der Vesikel mit dem Membranfarbstoff FM4-64 Oszillationen der Vesikelkonzentration in der apikalen Zone 5-10  $\mu\text{m}$  hinter der Spitze nach. Die Vesikelkonzentration war kurz vor der eigentlichen Wachstumsphase am höchsten. Da Wachstumsschub und Anionenausstrom zeitgleich erfolgen (Zonia *et al.*, 2001), deutet dies auf einen parallelen Anstieg von Vesikel- und zytosolischer Anionenkonzentration in der Pollenschlauchspitze hin. Diese Vermutung deckt sich mit den in Lipchinsky *et al.*, 2015, gemachten Berechnungen, welche die Vesikelbewegung zur Pollenschlauchspitze entgegen des Cl<sup>-</sup>-Konzentrationsgradienten mathematisch belegen. Hierbei kommt es zu einem osmotisch bedingten Ausstrom von Wasser in der hinteren Vesikelhälfte, die einer höheren Chloridkonzentration ausgesetzt ist als der vordere Teil des Vesikels, welcher der Pollenschlauchspitze zugewandt ist und durch die niedrigere Chloridkonzentration Wasser aufnimmt. Dieser theoretisch berechnete Wassereinstrom in der vorderen Vesikelhälfte und der Ausstrom an der hinteren Hälfte erzeugt eine physikalische Triebkraft welche die Vesikel entlang des Chloridgradienten nach vorne an die Plasmamembran bewegt (Lipchinsky *et al.*, 2015) (Abbildung 48 B). Weiterhin führt der zur Pollenschlauchspitze abfallende Chloridgradient zu einer theoretischen Druckdifferenz von 2,5 bis 100 kPa. Dies führt zu einem Wassereinstrom entlang der subapikalen Zone und zum Ausstrom von Wasser an der apikalen Zone. Dieser transzelluläre Fluss könnte ebenfalls am Vesikeltransport beteiligt sein (Lipchinsky *et al.*, 2015). Ebenso könnte die während des Chloridausstroms entstehende Depolarisation der apikalen Zone zu einer Bewegung von G-Aktin entlang der sich bildenden elektromagnetischen Triebkraft zwischen positiv geladener Pollenschlauchspitze und der negativ geladenen subapikalen Zone führen. G-Aktin ist unter physiologischem pH negativ geladen und würde sich zur positiv geladenen Pollenschlauchspitze bewegen (Lipchinsky *et al.*, 2015). Alle diese theoretischen Vorhersagen stützen das in dieser Arbeit gezeigte Modell, müssen aber in Zukunft erst noch durch praktische Experimente belegt werden. Hierfür würden sich die simultane Betrachtung der zytoplasmatischen Vesikelbewegung und des oszillierenden Anionenausstroms mit Hilfe der bereits in dieser Arbeit verwendeten stabilen pLat52-Chlorid-Sensor-Pollenschläuche und dem Membranfarbstoff FM4-64, welcher bereits in Parton *et al.*, 2001, zum Anfärben der Membranvesikel in Pollenschläuchen verwendet wurde, anbieten.

Das in Abbildung 48 A dargestellte Modell zeigt die Regulation des oszillierenden Anionenefflux in wachsenden Pollenschläuchen, welches auf den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten und den bereits bekannten Erkenntnissen beruht. Die Aufnahme der extrazellulären Anionen (Abbildung 48 A1) erfolgt vermutlich durch aktiven Transport entlang des durch die Protonen-ATPase aufgebauten elektrochemischen Gradienten über Protonen-Anionen-Symporter, welche bereits in Gerste (Glass *et al.*, 1992) und *Arabidopsis thaliana*-Wurzeln (Tsay *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996) beschrieben wurden. Ein weiteres Indiz für die Beteiligung von Chlorid-Kationen-Co-Transportern bei der Aufnahme von Chlorid ist die Inhibierung der Pollen-Keimungsrate durch die Chlorid-Kationen-Co-Transporter-Inhibitoren: Furosemid, Bumetanid und DIBAC<sub>3</sub>(5), welche die Pollen-Keimungsrate um etwa 50 % reduzierten (Matveyeva *et al.*, 2003). Die Perfusion wachsender pLat52-Chlorid-Sensor-Pollenschläuche mit diesen Inhibitoren könnte Aufschluss über das Vorhandensein von Chlorid-Kationen-Co-Transportern geben. Die Anionen-Aufnahme erfolgt im Pollenschlauch ab etwa 15 µm hinter der Pollenschlauchspitze (*Nicotiana tabacum*), nimmt dann bis zum Bereich von 20-60 µm hinter der Spitze zu und nimmt dann zum hinteren Teil des Pollenschlauches wieder ab. Die Aufnahme von Chlorid führt zu einer Akkumulation von Chlorid in der apikale Zone (Abbildung 48 A2) (Zonia *et al.*, 2002). Durch ein bis jetzt noch nicht verstandenes Signal kommt es zur Aktivierung mechanosensitiver- bzw. hyperpolarisierungsaktivierter Calcium-Kanäle und somit zum Calciumeinstrom (Abbildung 48 A3) welcher zur Aktivierung Calcium-abhängiger Kinasen in der Pollenschlauchspitze führt. Diese phosphorylieren die vorhandenen Anionenkanäle SLAH3 und ALMT12 (CPK-Aktivierung von ALMT13 und ALMT14 noch nicht nachgewiesen), welche den Anionenausstrom (Abbildung 48 A4) aus der Pollenschlauchspitze vermitteln. Die Aktivierung und Spannungsabhängigkeit des Anionenausstroms wird zusätzlich über die extrazelluläre Nitrat- und Malatkonzentration gesteuert (Meyer *et al.*, 2010, Geiger *et al.*, 2011). Durch die ausströmenden Anionen kommt es zu einer Depolarisierung bzw. zum Abfall des Turgordrucks und zum Schließen der Calciumkanäle in die Pollenschlauchspitze. Calcium-ATPasen (Schiott *et al.*, 2004) transportieren zytosolisches Ca<sup>2+</sup> wieder über die Plasmamembran aus dem Zytosol der Pollenschlauchspitze (Abbildung 48 A5), was zur Inaktivierung der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Signalkette zur CPK-abhängigen Anionenkanalaktivierung und zum Schließen der Anionenkanäle sowie zur erneuten Akkumulation von Anionen in der apikalen Region führt.



**Abbildung 48: Modell des spitzenlokalisierten Calcium-vermittelten Anionenausstroms und des apikalen Calcium-Anionen-Regelkreislaufs**

Das Modell zeigt die Regulation des oszillierenden Calcium-vermittelten Anionenausstroms aus der Pollenschlauchspitze (A) sowie die Calcium- und Anionenkonzentration in der apikalen Region des Pollenschlauchs und deren Einfluss auf die Vesikelbewegung und das Pollenschlauchwachstum (B).

1. Anionenaufnahme mittels Protonen-Anionensymporter in der subapikalen Region des Pollenschlauchs führt zum Anstieg der zytosomatischen Anionenkonzentration hinter der subapikalen Zone.
2. Akkumulation von Anionen in der apikalen Region, Protonen werden durch ATPasen energiegetrieben nach außen gepumpt. Die Vesikel bewegen sich mit dem sich aufbauenden Anionengradienten in Richtung Pollenschlauchspitze.
3. Hyperpolarisationsinduzierte bzw. mechanosensitive Aktivierung der Calciumkanäle in der Pollenschlauchspitze durch Anstieg der apikalen Anionenkonzentration.
4. Calcium bindet und aktiviert spitzenlokalisierte CPK2, CPK20 sowie CPK6. CPKs phosphorylieren Anionenkanal (ALMT12 bzw. SLAH3), es erfolgt ein Anionenausstrom aus der Pollenschlauchspitze, welcher die Vesikel zur Apex bewegen, wo sie aufgrund der erhöhten Calciumkonzentration mit der Zellmembran fusionieren und zur Zunahme des Zellvolumens an der Pollenschlauchspitze beitragen.
5. Die sinkende Anionenkonzentration führt zur Deaktivierung der Calciumkanäle und zur Abnahme der zytosomatischen Calciumkonzentration in der Pollenschlauchspitze wodurch es zur Deaktivierung der Anionenkanäle kommt.

## 5 Zusammenfassung

Pollenschläuche sind ein Modellsystem zur Untersuchung pflanzlicher Wachstumsprozesse. Zellwachstum in Pollenschläuchen zeichnet sich durch den gerichteten Transport und Fusion von Vesikeln mit der apikalen Zellmembran des Pollenschlauchs aus. Der Vesikeltransport erfolgt entlang des Pollenschlauchs durch Aktin-Filamente bis an die Organell- und Zytoskelett-freie apikale Zone, wo sich die Vesikel sammeln und in oszillierenden Wachstumsschüben mit der apikalen Zellmembran fusionieren (Yang *et al.*, 1998; Zonia *et al.*, 2001, Gu *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2005; de Graaf *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Cheung *et al.*, 2010; Quin und Yang *et al.*, 2011). Die polaren Wachstumsprozesse des Pollenschlauches sind an ein Ionenflussmuster gekoppelt, welches durch den Einsatz der Vibrating Probe-Technik zeitlich aufgelöst werden konnten. Es konnte ein zeitversetzter oszillierender Einstrom von Calcium, Kalium und Protonen sowie der zeitgleich mit den Wachstumsschüben auftretende oszillierende Ausstrom von Chlorid aus der Pollenschlauchspitze nachgewiesen werden (Kühtreiber und Jaffe *et al.*, 1990; Holdaway-Clarke *et al.*, 1997; Feijo *et al.*, 1999, Messerli *et al.*, 1999, Zonia *et al.*, 2001). Die Inhibierung des Chloridausstroms resultiert in einem sofortigen Wachstumsstopp und verdeutlicht die Notwendigkeit des Anionenausstroms für das polare Zellwachstum in Pollenschläuchen (Breygina *et al.*, 2009).

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten die an dem Anionenausstrom beteiligten Anionenkanäle, sowie deren  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen regulatorischen Komponenten identifiziert und mit Hilfe der TEVC-Technik elektrophysiologisch an intakten *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen charakterisiert werden. Weiterhin konnte die physiologische Rolle der für den Anionenausstrom verantwortlichen Kanäle auf das polare Zellwachstum in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen nachgewiesen werden.

Durch Transkriptionsanalysen wurde die Expression des S-Typ-Anionenkanals SLAH3 sowie der R-Typ-Anionenkanäle ALMT12, ALMT13 und ALMT14 in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen belegt und deren transkriptionelle Regulation durch die Anionenkonzentration und Komposition des Keimungsmediums nachgewiesen werden. Eine elektrophysiologische Charakterisierung an intakten *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen konnte sowohl einen Anstieg der SLAH3-vermittelten S-Typ-Ströme, als auch ALMT12-, ALMT13- und ALMT14-vermittelte R-Typ-Anionenströme bei steigenden Anionenkonzentrationen im Keimungsmedium nachweisen. Die Charakterisierung der Verlustmutanten von SLAH3,

ALMT12, ALMT13 und ALMT14 resultierte in einer Abnahme des Anionenausstroms und einer Reduktion des Längenwachstums der getesteten Mutanten. Es konnten ebenfalls die regulatorischen Komponenten der Signalkette zur Anionenkanalaktivierung identifiziert werden. Die Aktivierung von SLAH3 und ALMT12 durch die Calcium-abhängigen Kinasen CPK2, CPK20 und CPK6 aus *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen konnte mittels einer Kombination von elektrophysiologischen- und molekularbiologischen Techniken nachgewiesen werden. Somit wurden nicht nur die für den Anionenausstrom verantwortlichen Anionenkanäle identifiziert, sondern auch die Signalkette zu deren Aktivierung durch spitzenlokalisierte Calcium-abhängige Kinasen aufgeklärt werden. Diese Signalkaskade führt ebenfalls durch die artifizielle Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration durch das Calcium-Ionophor A23187 zu einem Anstieg des S-Typ- und R-Typ-Anionenkanalaktivität in *Arabidopsis thaliana*-Pollenschläuchen.

Eine intensivere Charakterisierung des entdeckten Calcium-vermittelten Anionenausstroms erfolgte am transgenen pLat52-Chlorid-Sensor bzw. an YC3.6 Tabak-Pollenschläuchen durch die Kombination von TEVC-Technik und Fluoreszenzmikroskopie. Dies ermöglichte die simultane Messung der zytoplasmatischen Calcium- bzw. Chloridkonzentration in *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen bei gleichzeitiger Ableitung der Ganzzellströme. Die elektrophysiologische und fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung erbrachte erstmals den Nachweis für eine exklusive Lokalisation von hyperpolarisations-aktivierten Calciumkanälen in der Pollenschlauchspitze, welche sich durch die Verwendung der TEVC-Technik gezielt aktivieren ließen. Diese Aktivierung der spitzenlokalisierten Calciumkanäle induziert den Anionenausstrom durch den Anstieg der apikalen Calciumkonzentration. Die Inhibierung der Calciumkanäle durch den Calciumkanalblocker Lanthan führt zu einem vollständigen Verlust des Calciumeinstroms und des daraus resultierenden Anioneneinstroms. Durch die Inhibierung der Calciumkanäle kommt es gleichzeitig zu einer Akkumulation von Chlorid in der apikalen Zone, die zum Anschwellen der Pollenschlauchspitze führt. Die Inhibierung der Anionenkanäle durch Niflumsäure hat hingegen keinen Einfluss auf den spitzenlokalisierten Calciumeinstrom, sondern reduziert nur den gemessenen Anionenausstrom. Somit wird ein kausaler Zusammenhang zwischen der Erhöhung der apikalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und einer Anionenkanalaktivierung weiter verdeutlicht. Durch die Anwendung der TEVC-Technik an intakten Pollenschläuchen konnten erstmals Aktionspotenzial-ähnliche Depolarisierungstransienten, welche sich auf die

apikale Zone des Pollenschlauchs beschränken und zeitgleich mit dem Anionenausstrom stattfinden, nachgewiesen werden.

Durch diese Arbeit kann erstmals ein Modell des Calcium-vermittelten oszillierenden Anionenausstroms aus der Pollenschlauchspitze aufgestellt werden. Dieses verknüpft die Regulation der beteiligten R-Typ-Anionenkanäle ALMT12, ALMT13 und ALMT14 und des S-Typ-Anionenkanals SLAH3 durch die Calcium-abhängigen Kinasen CPK2, CPK20 und CPK6 mit dem spitzenlokalisierten oszillierenden Calciumeinstrom. Das Modell verdeutlicht die physiologische Bedeutung des simultanen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ein- und Anionenausstroms für das polare Zellwachstum von Pollenschläuchen.

## 6 Summary

In this study pollen tubes were used as a model cell system to study plant polar growth. Polar cell growth is characterized by a vectorial transport of vesicles to the apical dome of pollen tubes. Vesicles fuse with the apical plasma membrane leading to a polar elongation of the tube tip. Vesicle transport to the clear zone is mediated by F-actin bundles and these vesicles serve as a pool of membranes for the surface increase. In an oscillatory growth pulse the vesicles move from the clear zone to the apical plasma membrane in order to fuse with the plasma membrane (Yang *et al.*, 1998; Zonia *et al.*, 2001, Gu *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2005; de Graaf *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008; Cheung *et al.*, 2010; Quin and Yang *et al.*, 2011). Pollen tube elongation is associated with a distinct pattern of ion fluxes that cannot be uncoupled from the growth process. A tip localized influx of calcium, potassium and protons, as well as the simultaneous oscillatory apical efflux of chloride are features of growing pollen tubes (Kühnreiter and Jaffe *et al.*, 1990; Holdaway-Clarke *et al.*, 1997; Feijo *et al.*, 1999, Messerli *et al.*, 1999, Zonia *et al.*, 2001). Inhibition of apical chloride efflux leads to an instantaneous pollen tube growth arrest (Breygina *et al.*, 2009) demonstrating the importance of the oscillatory apical chloride efflux for cell elongation.

Within the framework of this dissertation, I was able to identify the anion channels responsible for anion fluxes and to characterize the regulatory components for channel activation by using the TEVC technique in intact pollen tubes.

A quantitative analysis of ion channel transcripts in *Arabidopsis thaliana* pollen tubes via qRT-PCR demonstrated the expression of the S-type anion channel SLAH3, the R-type anion channels ALMT12, ALMT13 and ALMT14 as well as their transcriptional regulation by different anion concentrations. The electrophysiological characterization of the anion currents in intact pollen tubes revealed an anion concentration that depends on an increase in SLAH3 mediated S-type currents and ALMT12, ALMT13 and ALMT14 mediated R-type currents with rising anion concentrations in the germination medium. The electrophysiological characterization of *slah3*, *almt12*, *almt12 x almt13* and *almt12 x almt14* knock-out mutant pollen tubes resulted in decreased anion currents and a reduction in pollen tube length compared to the wild-type. An activation of SLAH3 and ALMT12 by the calcium dependent kinases CPK2, CPK20 and CPK6 in *Arabidopsis thaliana* pollen tubes was proven with a combination of electrophysiological and molecular biology techniques. Strong evidence is presented here for the regulation of oscillatory anion efflux by simultaneous calcium influx at the pollen tube tip via calcium

dependent kinases. An increase of the cytoplasmic calcium concentration by the calcium ionophore A23187 leads to an increase of S-type and R-Type anion channel current in *Arabidopsis thaliana* pollen tubes.

In order to substantiate the hypothesis of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent anion channel activation mechanism in pollen tubes a combination of TEVC technique and fluorescence microscopy was applied with transgenic tobacco pollen tubes expressing the genetically encoded anion- and  $\text{Ca}^{2+}$ -reporters Cl-Sensor and YC3.6, respectively. This technique enabled the simultaneous measurement of the cytoplasmic calcium- or chloride concentration along with voltage-clamp experiments. The application of 1 sec lasting hyperpolarization pulses with the TEVC technique and simultaneous live-cell  $\text{Ca}^{2+}$ - and anion imaging demonstrated the existence of hyperpolarization activated calcium channels in the pollen tube tip. The activation of the tip localized calcium channels by -200 mV pulses evoked a decrease in apical anion concentration depending on an elevation of the calcium concentration at the pollen tube tip. Inhibition of the calcium channels by lanthan abolished the calcium influx and subsequently the anion efflux. Inhibiting the  $\text{Ca}^{2+}$ - channels resulted in an apical accumulation of the cytoplasmic anion concentration and led to pollen tube tip swelling. Anion channel inhibition by niflumic acid did not alter tip localized calcium influx providing sufficient evidence for a causal relationship between  $\text{Ca}^{2+}$ - and anion channel activity. Furthermore, evidence is presented for the existence of membrane potential spikes in the pollen tube tip caused by the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent anion channel activation that look very similar to action potentials and were located in the pollen tube tip. This local restriction of the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent anion channel activation to the region of growth shows the necessity of the anion efflux for the pollen tube elongation.

On the basis of this dissertation I was able to propose a model of a calcium-dependent anion channel activation mechanism in the pollen tube tip, which involves the R-type anion channels ALMT12, ALMT13 and ALMT14 and the S-type anion channel SLAH3 being regulated by the calcium dependent kinases CPK2, CPK20 and CPK6. The model highlights the physiological relevancy of the interplay between the tip focused anion efflux and  $\text{Ca}^{2+}$  influx for the pollen tube growth process.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des weiblichen Gametophyten in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entwicklung des männlichen Gametophyten .....	10
Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Pollenschlauchs .....	15
Abbildung 4: Calcium-Gradient in <i>Nicotiana tabacum</i> -Pollenschlauch .....	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Ionenflüsse durch aktiven und passiven Transport über die Plasmamembran von <i>Nicotiana tabacum</i> -Pollenschläuchen .....	24
Abbildung 6: Regulation von R- und S-Typ-Anionenkanälen im ABA-Signalweg in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Schließzellen .....	31
Abbildung 7: Pollenschlauch-Anzuchtschälchen .....	37
Abbildung 8: Aufbau des TEVC-Einstich-Messplatzes .....	41
Abbildung 9: Anordnung von Bad- und Zweikanal-Einstichelektrode.....	43
Abbildung 10: Spannungspulsprotokoll zur Ableitung von S-Typ-Anionenströmen.....	45
Abbildung 11: Spannungspulsprotokoll zur Ableitung von R-Typ-Anionenströmen ....	45
Abbildung 12: Oozyten-Einstich-Messplatz .....	53
Abbildung 13: Oozyten-Messkammer und Elektroden.....	53
Abbildung 14: Transkriptionsanalyse von Anionen- und Kationenkanälen in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pollenschläuchen nach 6 h Inkubation auf 3/7 Medium.....	66
Abbildung 15: Kaliumströme in <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pollenschläuchen .....	68
Abbildung 16: Einfluss des Anionenkanal-Inhibitors NPPB auf die Ganzzellströme von Col-0-Pollenschläuchen .....	70
Abbildung 17: Einfluss des Anionenkanal-Inhibitors Niflumsäure auf die Ganzzellströme von Col-0-Pollenschläuchen .....	71
Abbildung 18: Einfluss von Kalium auf die Ganzzellströme in Col-0-Pollenschläuchen	73
Abbildung 19: Ganzzellstromableitungen der Anionenströme in Col-0-Pollenschläuchen bei unterschiedlichen Nitratkonzentrationen im Keimungsmedium.....	75
Abbildung 20: Transkriptionsanalyse auf unterschiedlichen Anionenmedien.....	78
Abbildung 21: GUS-Färbung von prom SLAH3::GUS Reportergeren Linie .....	78

Abbildung 22: Inhibierung der Nitrat-vermittelten Anionenströme durch den Anionenkanal-Inhibitor Niflumsäure .....	80
Abbildung 23: Einfluss von SLAH3- und CPK-Verlustmutanten auf die Ganzzellströme bei 40 mM Nitrat im Keimungsmedium .....	83
Abbildung 24: Depolarisierung des Membranpotenzials durch den Calcium-Ionophor A23187 .....	85
Abbildung 25: Calcium-induzierte Aktivierung der S-Typ-Anionenkanal-Stromantwort in Col-0 und der Dreifachverlustmutante <i>cpk2-1 x cpk20-1 x cpk6-1</i> .....	87
Abbildung 26: Transkriptionsanalyse für die Gene der ALMT-Familie in Col-0- und <i>almt12-2</i> -Pollenschläuchen.....	89
Abbildung 27: Transkriptionsanalyse von Pollen-exprimierten Genen der CPK-Familie .....	90
Abbildung 28: GUS-Färbung von prom ALMT12::GUS-Blüten und Pollenschläuchen.	91
Abbildung 29: Einfluss der Medium-Malatkonzentration auf R-Typ-Anionenströme in Col-0-Pollenschläuchen.....	93
Abbildung 30: Einfluss der Medium-Malatkonzentration auf R-Typ-Anionenströme in Pollenschläuchen der Verlustmutante <i>slah3-1</i> .....	95
Abbildung 31: Anionen-Permeabilität von ALMT12 in <i>Xenopus</i> -Oozyten unter Chlorid in der Badlösung.....	97
Abbildung 32: Anionen-Permeabilität von ALMT12 in <i>Xenopus</i> -Oozyten unter Malat in der Badlösung.....	98
Abbildung 33: Anionen-Permeabilität von ALMT12 in <i>Xenopus</i> -Oozyten unter Gluconat in der Badlösung.....	99
Abbildung 34: Aktivierung von ALMT12 durch Calcium-abhängige Kinasen in <i>Xenopus</i> -Oozyten .....	102
Abbildung 35: Charakterisierung von R-Typ-Anionenströmen verschiedener Verlustmutanten im Vergleich zu Col-0-Pollenschläuchen .....	106
Abbildung 36: Charakterisierung von R-Typ-Anionenströmen in verschiedenen <i>slah3-1</i> -Verlustmutanten.....	107
Abbildung 37: Calcium-induzierte Aktivierung der R-Typ-Anionenkanal-Stromantwort in Pollenschläuchen der <i>slah3-1</i> -Verlustmutante .....	109
Abbildung 38: Vermindertes Pollenschlauchwachstum in ALMT-Anionenkanal-Verlustmutanten <i>in vitro</i> .....	111
Abbildung 39: Charakteristische S-Typ-Anionenströme in Tabak-Pollenschläuchen auf einem Wachstumsmedium mit unterschiedlichen Chloridkonzentrationen .....	114

Abbildung 40: Lokale Aktivierung von Hyperpolarisations-aktivierten Calcium-permeablen Kanälen in der Pollenschlauchspitze .....	117
Abbildung 41: Spannungsabhängige Aktivierung der spitzenlokalisierten Calciumkanäle durch die simultane Anwedung der TEVC-Technik und Fluoreszenzmikroskopie an stabil exprimierenden YC3.6 <i>Nicotiana tabacum</i> -Pollenschläuchen .....	119
Abbildung 42: Einfluss des Anionenkanal-Inhibitors Niflumsäure auf den spitzenlokalisierten Calciumeinstrom durch die simultane Anwendung der TEVC-Technik und Fluoreszenzmikroskopie an stabil exprimierenden YC3.6 <i>Nicotiana tabacum</i> -Pollenschläuchen .....	121
Abbildung 43: Aktivierung der spitzenlokalisierten Anionenkanäle durch Hyperpolarisationspulse aktivierte apikale Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationserhöhungen .....	124
Abbildung 44: Einfluss der intrazellulären Chloridkonzentration auf den Anionenausstrom aus der Pollenschlauchspitze .....	126
Abbildung 45: Einfluss des Calciumkanal-Inhibitors Lanthanchlorid auf den spitzenlokalisierten Anionenausstrom .....	128
Abbildung 46: Einfluss des Calciumkanal-Inhibitors Lanthanchlorid auf den spitzenlokalisierten Anionenausstrom in wachsenden Pollenschläuchen .....	129
Abbildung 47: Chlorid-abhängige Membranpotenzial-Oszillationen in der Pollenschlauchspitze .....	132
Abbildung 48: Modell des spitzenlokalisierten Calcium-vermittelten Anionenausstroms und des apikalen Calcium-Anionen-Regelkreislaufs .....	155

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der in vitro-Keimungsmedien .....	37
Tabelle 2: <i>Arabidopsis thaliana</i> -Verlustmutanten und Überexpressionslinien.....	38
Tabelle 3: Verwendete Oozyten-Vektoren.....	50
Tabelle 4: Reaktionsansatz in vitro-Transkription.....	51
Tabelle 5: ND96-Lösung .....	52
Tabelle 6: Verwendete Injektions-/Messlösungen für die elektrophysiologische Charakterisierung von ALMT12 .....	54
Tabelle 7: Zusammensetzung 50 ml modifizierter Edwards Puffer .....	57
Tabelle 8: Zusammensetzung PCR-Reaktionsmix .....	57
Tabelle 9: Genotypisierungsprimer .....	58
Tabelle 10: Real-time-PCR Mastermix.....	59
Tabelle 11: Verwendete Real-time-Primer .....	60
Tabelle 12: GUS-Färbelösung .....	62
Tabelle 13: Reduktion der Ein- und Auswärtsströme in SLAH3- und CPK- Verlustmutanten bei 40 mM Nitrat im Keimungsmedium.....	82

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{A}$	Mikroampere
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
A	Ampere
A23187	Calcium Ionophore
ABA	Abscisinsäure
ABI1	ABA-insensitive
ACA9	putative Calcium Kation transportierende P2B-Typ ATPase
ADF	Aktin Depolymerisationsfaktor
AHA	putative Tonoplasten Protonen transportierende P3A-type ATPase
AKT1	Einwärts gleichrichtender Kalium Kationen Kanal1
ALMT	Aluminum-aktivierter Malat Transporter
AtCCC1	Cation-Chloride-Cotransporter
BIFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
$\text{Ca}^{2+}$	Calcium Ion
CaCl	Calciumchlorid
CAM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBL	Calcineurin B-like
cDNA	copy DANN
CER-Gene	Eceriferum Gene
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CHX C	ation/ $\text{H}^+$ exchanger
CIPK	CBL-interacting protein kinases

---

CL <sup>-</sup>	Chlorid Ion
CLC	Chloride channel
CML	CAM-like
CNGC	cyclic nucleotide-gated channel
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Col-0	Columbia 0
CPK	Calcium-abhängige Proteinkinase
cRNA	copy RNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIDS	Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
et. al.	et alii
F1	Erste filiale Generation
F2	Zweite filiale Generation
FRET-FLIM	Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie
GABA	γ-Aminobuttersäure
GD <sup>3+</sup>	Gadolinium Ion
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLR	Glutamate receptor-like channel
GTP	Guanosintriphosphat
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O	Wasser
HiTEH	Tellurit-Resistenz Protein aus Haemophilus influenzae
I <sub>ss</sub>	steady state Strom
IVT-PCR	in vitro Polymerase-Kettenreaktion
K <sup>+</sup>	Kalium Ion
KCl	Kaliumchlorid
KZM1	Inwardly rectifying potassium channel
La <sup>3+</sup>	Lanthan Ion

---

LMA	Low melt Agarose
MAP	mitogen-activated protein-Kinase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mosmol	milliosmole
mV	Millivolt
MPK3	mitogen-activated protein kinase 3
mRNA	messenger RNA
mS	Millisiemens
mV	Millivolt
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nM	Nanomolar
nA	Nanoampere
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat Ion
NPPB	5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoesäure
NRT	Nitrat transporter
OST1	Open stomata 1
pA	Pikoampere
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von Protonen
PIP2	phosphatidylinositol Bisphosphat
pLAT	Promotor LAT-Gen (late anther tomato)
PME	Pektin Methylesterase
pmol	pikomolar
POP2	GABA Transaminase POP2
PP2C	Protein Phosphatase 2C
QUAC1	Quick anion channel 1

---

RALF	Rapid Alkalinization Factor
rcd	Radical-induced cell death
rel.	relativ
RIC3	CRIB domain-containing protein 3
ROP1	RHO-related protein from plants 1
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunde
SKOR	Stelar K <sup>+</sup> outward rectifying channel
SLAC	Slow anion channel
SLAH	SLAC1-Homolog
SnRK	Snf-1 related kinase
SPIK	Shaker pollen inward K <sup>+</sup> channel
SR1	Petit Havana SR1
TEVC	Two electrode voltage clamp
TPC	tandem-pore K <sup>+</sup> channel
V	Volt
X-Gluc	S-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronid
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein
z. B.	zum Beispiel

## 7.4 Literaturverzeichnis

**Ache, P., Bauer, H., Kollist, H., Al-Rasheid, K.A., Lautner, S., Hartung, W. and Hedrich, R. (2010).**

Stomatal action directly feeds back on leaf turgor: new insights into the regulation of the plant water status from non-invasive pressure probe measurements. *Plant J.* 62: 1072–1082.

**Ache, P., Becker, D., Ivashikina, N., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. and Hedrich, R. (2000).**

GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of *Arabidopsis thaliana*, is a K<sup>+</sup>-selective, K<sup>+</sup>-sensing ion channel. *FEBS Lett* 486(2): 93-98.

**Arazi, T., Kaplan, B., Fromm, H. (2000).**

A high-affinity calmodulin-binding site in a tobacco plasma-membrane channel protein coincides with a characteristic element of cyclic nucleotide-binding domains. *Plant Mol. Biol.*, 42: 591–601

**Balague, C., Lin, B., Alcon, C., Flottes, G., Malmstrom, S., Kohler, C., Neuhaus, G., Pelletier, G., Gaymard, F., Roby, D. (2003).**

HLM1, an essential signaling component in the hypersensitive response, is a member of the cyclic channel ion channel family. *Plant Cell*, 15: 365–379

**Barbier-Brygoo, H., Vinauger, M., Colcombet, J., Ephritikhine, G., Frachisse, J.-M. and Maurel, C. (2000).**

Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochim. Biophys. Acta*, 1465: 199–218.

**Becker, D., Geiger, D., Dunkel, M., Roller, A., Bertl, A., Latz, A., Carpaneto, A., Dietrich, P., Roelfsema MRG, Völker, C., Schmidt, D., Müller-Röber, B., Czempinski, K., Hedrich, R. (2004).**

AtTPK4, an *Arabidopsis* tandem-pore K<sup>+</sup> channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 101: 15621–15626.

**Benkert, R., Obermeyer, G., Bentrup, F-W. (1997).**

The turgor pressure of growing lily pollen tubes. *Protoplasma* 198:1–8

**Bertl, A., Blumwald, E., Coronado, R., Eisenberg, R., Findlay, G., Gradmann, D., Hille, B., Kohler, K., Kolb, H. A., MacRobbie, E. (1992).**

Electrical measurements on endomembranes. *Science* 258: 873 - 874

**Birkenhäger, R., Otto, E., Schürmann, M.J., Vollmer, M., Ruf, E.M., Maier-Lutz, I., Beekmann, F., Fekete, A., Omran, H., Feldmann, D., Milford, D.V., Jeck, N., Konrad, M., Landau, D., Knoers NVAM, Antignac, C., Sudbrack, R., Kispert, A., Hildebrandt, F. (2001).**

Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure.

Nat Genet 29: 310–314.

**Boavida, L.C., McCormick, S. (2007).**

Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*.

Plant J 52: 570–582

**Boisson-Dernier, A., Roy, S., Kritsas, K., Grobei, MA, Jaciubek, M., Schroeder J.I., Grossniklaus, U. (2009).**

Disruption of the pollen-expressed FERONIA homologs ANXUR1 and ANXUR2 triggers pollen tube discharge.

Development 136: 3279–3288

**Boisson-Dernier, A., Lituiev, D.S., Nestorova, A., Franck, C.M., Thirugnanarajah, S., Grossniklaus, U. (2013).**

ANXUR receptor-like kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases.

PLoS Biol. 11: e1001719.

**Borg, Michael, Brownfield, Lynette and Twell, David (2009).**

Male gametophyte development: a molecular perspective.

Journal of Experimental Botany, Vol. 60, No. 5: 1465–1478.

**Bosch, M. and Hepler, P.K. (2005).**

Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes.

Plant Cell 17: 3219-3226.

**Bosch, M., Cheung, A.Y. and Hepler, P.K. (2005).**

Pectin methylesterase, a regulator of pollen tube growth.

Plant Physiol 138: 1334-1346.

**Bove, J., Vaillancourt, B., Kroeger, J., Hepler, P.K., Wiseman, P.W., et al. (2008).**

Magnitude and direction of vesicle dynamics in growing pollen tubes using spatiotemporal image correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching.

Plant Physiol 147: 1646–1658.

**Brewbaker, J.L. and Kwack, B.H. (1963).**

Essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth.

American J. Bot. 50: 859

**Breygina, M.A., Smirnova, A.V., Matveeva, N.P. and Ermakov, I.P. (2009).**

Membrane Potential Changes During Pollen Germination and Tube Growth.

Tsitologija, vol. 51, no. 10, pp. 815–823.

**Camacho, L. and Malho, R. (2003).**

Endo/exocytosis in the pollen tube apex is differentially regulated by Ca<sup>2+</sup> and GTPases.

J. Exp. Bot. 54: 83–92.

**Capron, A., Gourgues, M., Neiva, L. S., Faure, J. E., Berger, F., Pagnussat, G., Krishnan, A., Alvarez-Mejia, C., Vielle-Calzada, J. P., Lee, Y. R. et al. (2008).**

Maternal control of male-gamete delivery in *Arabidopsis* involves a putative GPI-anchored protein encoded by the LORELEI gene.

Plant Cell 20: 3038–3049.

**Cárdenas, L., Lovy-Wheeler, A., Kunkel, J.G., Hepler, P.K. (2008).**

Pollen tube growth oscillations and intracellular calcium levels are reversibly modulated by actin polymerization.

Plant Physiol. 146: 1611–1621.

**Certal, A.C., Almeida, R.B., Carvalho, L.M., Wong, E., Moreno, N., Michard, E., Carneiro, J., Rodriguez-Leon, J., Wu, H.-M., Cheung, A.Y. and Feijó, J.A. (2008).**

Exclusion of a proton ATPase from the apical membrane is associated with cell polarity and tip growth in *Nicotiana tabacum* pollen tubes.

Plant Cell 20: 614–634.

**Chang, F., Yan, A., Zhao, L.-N., Wu, W.-H. and Yang, Z. (2007).**

A putative calcium-permeable cyclic nucleotide-gated channel, CNGC18, regulates polarized pollen tube growth. J. Integr.

Plant Biol. 49: 1261–1270.

**Chebli, Y., Kaneda, M., Zerzour, R., Geitmann, A. (2012).**

The cell wall of the *Arabidopsis* pollen tube: spatial distribution, recycling, and network formation of polysaccharides.

Plant Physiol 160: 1940–1955

**Chen, C.Y.H., Cheung, A.Y., Wu, H.-M. (2003).**

Actin-depolymerizing factor mediates Rac/Rop GTPase-regulated pollen tube growth.

Plant Cell 15: 237–249

**Chen, Y. H., Hu, L., Punta, M., Bruni, R., Hillerich, B., Kloss, B., et al. (2010).**

Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves. Nature 467: 1074–1080.

**Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C. and Sheen, J. (2002).**

Calcium signaling through protein kinases: the *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family.

Plant Physiol. 129: 469–485.

**Cheong, Y.H., Kim, K.N., Pandey, G.K., Gupta, R., Grant, J.J., Luan, S. (2003).**

CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*.  
Plant Cell 15: 1833–1845

**Cheung, A.Y., Niroomand, S., Zou, Y. and Wu, H.M. (2010).**

A transmembrane formin nucleates subapical actin assembly and controls tip-focused growth in pollen tubes.  
Proc. Natl Acad. Sci. U S A. 107: 16390–16395.

**Coelho, P., Malhó, R. (2006).**

Correlative analysis of  $[Ca^{2+}]_c$  and apical secretion during pollen tube growth and reorientation.  
Plant Sig Behav 1: 152–157

**Colcombet, J., Lelievre, F., Thomine, S., Barbier-Brygoo, H., Frachisse, J.M. (2005).**

Distinct pH regulation of slow and rapid anion channels at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* hypocotyl cells.  
J Exp Bot 56: 1897–1903

**Cole, K. S. (1949).**

Dynamic Electrical Characteristics of the Squid Axon Membrane.  
Archives Des Sciences Physiologiques 3(2): 253-258.

**Colmenero-Flores, J.M., Martinez, G., Gamba, G., Vazquez, N., Iglesias, D.J., Brumos, J., Talon, M. (2007).**

Identification and functional characterization of cation-chloride cotransporters in plants.  
The Plant Journal 50: 278–292.

**Cosgrove, D. J. and Hedrich, R. (1991).**

Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba*.  
Planta 186(1): 143-153.

**Crawford, N. M. and Glass, A. D. M. (1998).**

Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants.  
*Trends Plant Sci.* 10: 389–395.

**De Angeli, A., Zhang, J., Meyer, S., Martinoia, E. (2013).**

AtALMT9 is a malate-activated vacuolar chloride channel required for stomatal opening in *Arabidopsis*.  
Nat Commun 4:1804

**De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J. M., Thomine, S., Gambale, F. and Barbier-Brygoo, H. (2006).**

The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles.  
Nature 442: 939-942

**de Graaf, B.H., Cheung, A.Y., Andreyeva, T., Levasseur, K., Kieliszewski, M. and Wu, H.M. (2005).**

Rab11 GTPase-regulated membrane trafficking is crucial for tip-focused pollen tube growth in tobacco.  
Plant Cell. 17: 2564–2579.

**Dietrich, P. and Hedrich, R. (1994).**

Interconversion of fast and slow gating modes of GCAC1, a guard cell anion channel.  
Planta, 195: 301–304.

**Dobson, H. E. M. (1989).**

Pollenkitt in plant reproduction.  
In The Evolutionary Ecology of Plants (ed. J. H. Bock and Y. B. Linhart) Boulder.  
Westview Press: 227-246

**Dreyer, Ingo, Gomez-Porras, Judith Lucia, Riaño-Pachón, Diego Mauricio, Hedrich, Rainer and Geiger, Dietmar (2012).**

Molecular evolution of slow and quick anion channels (SLACs and QUACs/ALMTs).  
Front Plant Sci. 2012 Nov 29:3:263.

**Dumas, C., Gaude, T. (2006).**

Fertilization in plants: is calcium a key player?  
Seminars in Cell and Developmental Biology 17:244-253.

**Dutta, Rajiv and Kenneth, R. Robinson (2004).**

Identification and Characterization of Stretch-Activated Ion Channels in Pollen Protoplasts.  
Plant Physiol. 135(3): 1398–1406.

**Edlund, A.F., Swanson, R. and Preuss, D. (2004).**

Pollen and stigma structure and function: The role of diversity in pollination.  
Plant Cell 16 (suppl.): S84–S97.

**Elleman, C. J., Franklin Tong, V. and Dickinson, H. G. (1992).**

Pollination in species with dry stigmas the nature of the early stigmatic response and the pathway taken by pollen tubes.  
New Phytol. 121: 413-424.

**Estévez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhäger, R., Otto, M., Hildebrandt, F. and Jentsch, T. (2001).**

J. Barttin is a Cl<sup>-</sup>-channel  $\beta$ -subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup>-reabsorption and inner ear K<sup>+</sup>-secretion.  
Nature. 414(6863):558-61

**Fan, L. M., Wang, Y.F., Wang, H. and Wu, W.H. (2001).**

In vitro *Arabidopsis* pollen germination and characterization of the inward potassium currents in *Arabidopsis* pollen grain protoplasts.  
J. Exp. Bot. 52: 1603–1614.

**Fatima-Shad, K., Barry P.H. (1993).**

Anion permeation in GABA- and glycine-gated channels of mammalian hippocampal neurons.  
Proc R Soc Lond Ser B.; 253:69–75.

**Feijó, J.A., Sainhas, J., Hackett, G., Kukel, J.G. and Hepler, P.K. (1999).**

Growing pollen tubes have a constitutive alkaline band on the clear cap and a growth-dependent acidic tip.  
J. Cell Biol. 144: 483–496

**Feijo, J.A., Sainhas, J., Holdaway-Clarke, T., Cordeiro, M.S., Kunkel, J.G. and Hepler, P.K. (2001).**

Cellular oscillations and the regulation of growth: The pollen tube paradigm.  
Bioessays 23: 86–94.

**Forde, B. (2000).**

Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation.  
Biochimica et Biophysica Acta 1465: 219–235.

**Franklin-Tong, V.E. (1999).**

Signaling and modulation of pollen-tube growth.  
Plant Cell 11: 727–738.

**Franks, P. J., Buckley, T. N., Shope, J. C. and Mott, K. A. (2001).**

Guard cell volume and pressure measured concurrently by confocal microscopy and the cell pressure probe.  
Plant Physiology 125(4): 1577-1584.

**Frietsch, S., Wang, Y.F., Sladek, C., Poulsen, L.R., Romanowsky, S.M., Schroeder, J.I. and Harper, J.F. (2007).**

A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen.  
Proc. Natl Acad. Sci. U S A. 104: 14531–14536.

**Garcia-Mata, C., Wang, J., Gajdanowicz, P., Gonzalez, W., Hills, A., Donald, N., Riedelsberger, J., Amtmann, A., Dreyer, I & Blatt MR (2010).**

A minimal cysteine motif required to activate the SKOR K<sup>+</sup> channel of *Arabidopsis* by the reactive oxygen species H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.  
J Biol Chem 285: 29286–29294.

**Ge, L., Xie, C., Tian, H., Russell, S. (2009).**

Distribution of calcium in the stigma and style of tobacco during pollen germination and tube elongation.  
Sex Plant Reprod 22:87–96.

**Geiger, D., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K.A., Scherzer, S., Mumm, P., Liese, A., Ache, P., Wellmann, C., Marten, I., Grill, E., Romeis, T. and Hedrich, R. (2011).**

Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1.  
Sci Signal.;4(173):ra32

**Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Marten, I., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Wellmann, C., Al-Rasheid, K.A., Grill, E., Romeis, T. and Hedrich, R. (2010).**

Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct  $\text{Ca}^{2+}$  affinities.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 8023–8028.

**Geiger, D., Scherzer, S., Mumm, P., Stange, A., Marten, I., Bauer, H., Ache, P., Matschi, S., Liese, A., Al-Rasheid, K.A.S., Romeis, T. and Hedrich, R. (2009b).**

Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 21425–21430.

**Geitmann, A., Emons AMC. (2000).**

The cytoskeleton in plant and fungal cell tip growth.  
Journal of Microscopy 198: 218-245.

**Gibbon BC, Kovar DR, Staiger CJ (1999).**

Latrunculin B has different effects on pollen germination and tube growth.  
Plant Cell 11: 2349–2363

**Glass, A.D.M., Shaff, J.E. and Kochian, L.V. (1992).**

Studies of the uptake of nitrate in barley.  
Plant Physiol. 99: 456–463.

**Grabov, A. and Blatt, M.R. (1998).**

Membrane voltage initiates  $\text{Ca}^{2+}$  waves and potentiates  $\text{Ca}^{2+}$  increases with abscisic acid in stomatal guard cells.  
Proc. Natl Acad. Sci. USA, 95: 4778–4783

**Gu, Y., Fu, Y., Dowd, P., Li, S., Vernoud, V., Gilroy, S. and Yang, Z. (2005).**

A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes.  
J. Cell Biol. 169: 127–138.

**Guo FQ, Young J, Crawford NM. (2003).**

The nitrate transporter AtNRT1.1 (CHL1) functions in stomatal opening and contributes to drought susceptibility in *Arabidopsis*.  
The Plant Cell 15:107-117.

**Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R. and Marbaix, G. (1971).**

Use of Frog Eggs and Oocytes for the Study of Messenger RNA and its Translation in Living Cells.  
Nature 233: 177-182

**Gutermuth, T., Lassig, R., Portes, M.T., Maierhofer, T., Romeis, T., Borst, J.W., Hedrich, R., Feijo, J.A. and Konrad, K.R. (2013).**

Pollen tube growth regulation by free anions depends on the interaction between the anion channel SLAH3 and calcium-dependent protein kinases CPK2 and CPK20.  
Plant Cell, 25: 4525–4543.

**Haig, D. (1990).**

New perspectives on the angiosperm female gametophyte.  
Bot. Rev. 56: 236–274.

**Hamilton, D.W., Hills, A., Kohler, B. and Blatt, M.R. (2000).**

Ca<sup>2+</sup> channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid.  
Proc. Natl Acad. Sci. USA, 97: 4967–4972.

**Haruta, M., Constabel, C.P. (2003).**

Rapid alkalization factors in poplar cell cultures. Peptide isolation, cDNA cloning, and differential expression in leaves and methyl jasmonate-treated cells.  
Plant Physiology 131: 814–823.

**Haruta, M., Monshausen, G., Gilroy, S., Sussman, M.R. (2008).**

A cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> functional assay for identifying and purifying endogenous cell signaling peptides in *Arabidopsis* seedlings: identification of AtRALF1 peptide.  
Biochemistry 47: 6311–6321.

**Haruta, M., Sabat, G., Stecker, K., Minkoff, B.B., Sussman, M.R. (2014).**

A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion.  
Science 343: 408–411.

**Hashimoto, K., et al. (2012).**

Phosphorylation of calcineurin B-like (CBL) calcium sensor proteins by their CBL-interacting protein kinases (CIPKs) is required for full activity of CBL-CIPK complexes toward their target proteins.  
J Biol Chem 287:7956–7968

**Hashimoto, K. and Kudla, J. (2011).**

Calcium decoding mechanisms in plants.  
Biochemie. 93: 2054–2059.

**Haswell, E. S., Peyronnet, R., Barbier-Brygoo, H., Meyerowitz, E. M. and Frachisse, J. M. (2008).**

Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the *Arabidopsis* root.  
Current Biology 18(10): 730-734.

**Hawkins, M., Pope, B., et al. (1993).**

Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments.

Biochemistry 32: 9985-9993.

**Hechenberger, M., Schwappach, B., Fischer, W.N., Frommer, W.B., Jentsch, T.J., Steinmeyer, K. (1996).**

A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption.

Journal of Biological Chemistry 271: 33632–33638.

**Hedrich, R., Marten, I. (1993).**

Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO<sub>2</sub> sensor to guard cells.

EMBO J 12: 897-901

**Hedrich, R., Busch, H. and Raschke, K. (1990).**

Ca<sup>2+</sup> and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells.

EMBO J 9(12): 3889-3892.

**Hepler, P.K., Vidali, L. and Cheung, A.Y. (2001).**

Polarized cell growth in higher plants.

Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17: 159–187.

**Heslop-Harrison, J. (1987).**

Pollen germination and pollen-tube growth.

Int Rev Cytol 107: 1–78

**Higashiyama, T., Inatsugi, R., Sakamoto, S., Sasaki, N., Mori, T., Kuroiwa, H., Nakada, T., Nozaki, H., Kuroiwa, T., Nakano, A. (2006).**

Species preferentiality of the pollen tube attractant derived from the synergid cell of *Torenia fournieri*.

Plant Physiol. 142, 481-491.

**Higashiyama, T., Yabe, S., Sasaki, N., Nishimura, Y., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T. (2001).**

Pollen tube attraction by the synergid cell.

Science 293: 1480-1483.

**Hiscock, S.J., Dewey, F.M., Coleman, J.O.D., Dickinson, H.G. (1994).**

Identification and localisation of an active cutinase in the pollen of *Brassica napus*.

Planta 193: 377-384.

**Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. and Katz, B. (1949).**

Ionic Currents Underlying Activity in the Giant Axon of the Squid.

Archives Des Sciences Physiologiques 3(2): 129-150.

- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. and Katz, B. (1952).**  
Measurement of Current-Voltage Relations in the Membrane of the Giant Axon of Loligo.  
Journal of Physiology-London 116(4): 424-448.
- Hoekenga, O.A., Maron, L.G., Piñeros, M.A., Cançado, G.M.A., Shaff, J., Kobayashi, Y., Ryan, P.R., Dong, B., Delhaize, E., Sasaki, T., et al. (2006).**  
AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*.  
Proc Natl Acad Sci USA 103: 9738–9743
- Holdaway-Clarke, T. L. and Hepler, P. K. (2003).**  
Control of pollen tube growth: Role of ion gradients and fluxes.  
New Phytol. 159: 539–563.
- Holdaway-Clarke, T.L., Feijo, J.A., Hackett, G.R., Kunkel, J.G. and Hepler, P.K. (1997).**  
Pollen tube growth and the intracellular cytosolic calcium gradient oscillate in phase while extracellular calcium influx is delayed.  
Plant Cell. 9: 1999–2010.
- Honys, D., Renak, D., Fecikova, J., Jedelsky, P.L., Nebesarova, J., et al. (2009).**  
Cytoskeleton-associated large RNP complexes in tobacco male gametophyte (EPPs) are associated with ribosomes and are involved in protein synthesis, processing, and localization.  
J Proteome Res 8: 2015–2031
- Hosy, E., Vavasseur, A., Mouline, K., Dreyer, I., Gaymard, F., Poree, F., Boucherez, J., Lebaudy, A., Bouchez, D., Very, A.A., et al. (2003).**  
The *Arabidopsis* outward K<sup>+</sup> channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration.  
Proc Natl Acad Sci U S A 100: 5549-5554.
- Hua, B.G., Mercier, R.W., Leng, Q., Berkowitz, G.A. (2003).**  
Plants do it differently. A new basis for potassium/sodium selectivity in the pore of an ion channel.  
Plant Physiol., 132: 1353–1361
- Huang, Nien-Chen, Chien-Sung Chiang, Nigel, M. , Crawford, B. and Yi-Fang Tsaya (1996).**  
CHLI Encodes a Component of the Low-Affinity Nitrate Uptake System in *Arabidopsis* and Shows Cell Type-Specific Expression in Roots.  
The Plant Cell, Vol. 8: 2183-2191.
- Huang, B.-Q. and Russell, S.D. (1992).**  
Female germ unit: Organization, isolation, and function.  
Int. Rev. Cytol. 140: 233–292.

- Huck, N., Moore, J.M., Federer, M., Grossniklaus, U. (2003).**  
The *Arabidopsis* mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception.  
Development 130: 2149–2159
- Hulskamp, M., Kopczak, S.D., Horejsi, T.F., Kihl, B.K. and Pruitt, R.E. (1995).**  
Identification of genes required for pollen–stigma recognition in *Arabidopsis thaliana*.  
Plant J. 8: 703–714.
- Hwang, J.U., Gu, Y., Lee, Y.J. and Yang, Z. (2005).**  
Oscillatory ROP GTPase activation leads the oscillatory polarized growth of pollen tubes.  
Mol. Biol. Cell. 16: 5385–5399.
- Hwang, J.U., Wu, G., Yan, A., Lee, Y.J., Grierson, C.S. and Yang, Z. (2010).**  
Pollen-tube tip growth requires a balance of lateral propagation and global inhibition of Rho-family GTPase activity.  
J. Cell Sci. 123: 340–350.
- Ikeda, S., Nasrallah, J.B., Dixit, R., Preiss, S. and Nasrallah, M.E. (1997).**  
An aquaporin-like gene required for the Brassica self-incompatibility response.  
Science 276: 1564–1566.
- Imes, D., Mumm, P., Böhm, J., Al-Rasheid KA, Marten, I., Geiger, D., Hedrich, R. (2013).**  
Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in *Arabidopsis* guard cells.  
Plant J. 1. Mai 2013; 74 (3): 372-82.
- Iwano, M., Igarashi, M., Tarutani, Y., Kaothien-Nakayama, P., Nakayama, H., Moriyama, H., Yakabe, R., Entani, T., Shimosato-Asano, H., Ueki, M., Tamiya, G. and Takayama, S. (2014).**  
A pollen coat-inducible autoinhibited  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase expressed in stigmatic papilla cells is required for compatible pollination in the Brassicaceae.  
Plant Cell 26: 636–649.
- Iwano, M., Shiba, H., Miwa, T., Che, F.S., Takayama, S., Nagai, T., Miyawaki, A. and Isogai, A. (2004).**  
 $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in a pollen grain and papilla cell during pollination of *Arabidopsis*.  
Plant Physiol. 136: 3562–3571
- Jaffe, L.A., Weisenseel, M.H. and Jaffe, L.F. (1975).**  
Calcium accumulations within the growing tips of pollen tubes.  
J. Cell Biol. 67: 488–492.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987).**  
GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.  
EMBO J. 6: 3901–3907.

**Johnson-Brousseau, Sheila A. and McCormick, Sheila (2004).**

A compendium of methods useful for characterizing *Arabidopsis* pollen mutants and gametophytically- expressed genes.  
Plant J. 39(5):761-75.

**Jossier, M., Kroniewicz, L., Dalmas, F., Le Thiec D., Ephritikhine, G., Thomine, S., Barbier-Brygoo, H., Vavasseur, A., Filleur, S., Leonhardt, N. (2010).**

The *Arabidopsis* vacuolar anion transporter, AtCLC<sub>c</sub>, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance.  
Plant J. 64: 563–576.

**Kaya, H., Nakajima, R., Iwano, M., Kanaoka, M.M., Kimura, S., Takeda, S., Kawarazaki, T., Senzaki, E., Hamamura, Y., Higashiyama, T., Takayama, S., Abe, M., Kuchitsu, K. (2014).**

Ca<sup>2+</sup>-activated reactive oxygen species production by *Arabidopsis* RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth.  
Plant Cell, 26: 1069–1080

**Keller, B.U., Hedrich, R., Raschke, K. (1989).**

Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells.  
Nature 341: 450-453

**Knox, R. B. and Heslop-Harrison, J. (1970a).**

Pollen wall proteins: localization and enzymic activity.  
J. Cell Sci. 6 1-27.

**Koch, M.C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K.H., Jentsch T.J. (1992).**

The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia.  
Science. 257:797–800.

**Kost, B., Lemichez, E., Spielhofer, P., Hong, Y., Tolia, K., Carpenter, C. and Chua, N.H. (1999).**

Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth.  
J. Cell Biol. 145: 317–330.

**Kovermann, P., Meyer, S., Hortensteiner, S., Picco, C., Scholz-Starke, J., Ravera, S., Lee, Y. and Martinoia, E. (2007).**

The *Arabidopsis* vacuolar malate channel is a member of the ALMT family.  
Plant J. 52: 1169–1180.

**Kühtreiber, W.M. and Jaffe, L.F. (1990).**

Detection of extracellular calcium gradients with a calcium-specific vibrating electrode.  
J. Cell Biol. 110: 1565–1573.

**Lacombe, B., Pilot, G., Gaymard, F., Sentenac, H., Thibaud, J.B. (2000).**  
pH control of the plant outwardly-rectifying potassium channel SKOR.  
FEBS Lett 466: 351–354

**Lassig, Roman, Gutermuth, Timo, Bey, Till D., Konrad, Kai R. and Romeis, Tina (2014).**  
Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth.  
The Plant Journal Volume 78: 94–106.

**Lee, M., Choi, Y., Burla, B., Kim, Y.Y., Jeon, B., et al. (2008).**  
The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO<sub>2</sub>.  
Nat Cell Biol. 10:1217–23.

**Lee, Y.J. and Yang, Z. (2008).**  
Tip growth: signaling in the apical dome.  
Curr. Opin. Plant Biol. 11: 662–671.

**Levchenko, V., Konrad, KR, Dietrich, P., Roelfsema, MR, Hedrich, R. (2005).**  
Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca<sup>2+</sup> signals.  
Proc Natl Acad Sci USA. 102:4203–8

**Li, Y.Q., Mareck, A., Faleri, C., Moscatelli, A., Liu, Q. and Cresti, M. (2002).**  
Detection and localization of pectin methylesterase isoforms in pollen tubes of *Nicotiana tabacum*  
L. Planta 214: 734-740.

**Li, J.Y., Fu, Y.L., Pike, S.M., et al. (2010).**  
The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance.  
The Plant Cell;22:1633-1646.

**LiH, Wu G., Ware, D., Davis, K.R., Yang, Z. (1998).**  
*Arabidopsis* Rho-related GTPases: differential gene expression in pollen and polar localization in fission yeast.  
Plant Physiology 118: 407–417.

**Lind, J.L., Bacic, A., Clarke, A., Anderson, M.A. (1996).**  
A style specific hydroxyproline-rich glycoprotein with properties of both extensins and arabinogalactan proteins.  
The Plant Journal 6:491-502.

**Lipchinsky, Andrei (2015).**  
Osmophoresis - a possible mechanism for vesicle trafficking in tip-growing cells.  
Phys Biol. 24: 12(6):066012

**Little, D.Y., Rao, H., Oliva, S., Daniel-Vedele, F., Krapp, A., Malmay, J.E. (2005).**

The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues.  
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA;102:13693-13698.

**Lord, E. M. and Sanders, L. C. (1992).**

Roles for the extracellular matrix in plant development and pollination: A special case of cell movement in plants.  
Dev. Biol. 153: 16-28.

**Lovy-Wheeler, A., Kunkel, J.G., Allwood, E.G., Hussey, P.J., Hepler, P.K. (2006).**

Oscillatory increases in alkalinity anticipate growth and may regulate actin dynamics in pollen tubes of lily.  
Plant Cell 18: 2182–2193

**Lu, Y., Chanroj, S., Zulkifli, L., Johnson, M.A., Uozumi, N., Cheung, A., Sze, H. (2011).**

Pollen tubes lacking a pair of K<sup>+</sup> transporters fail to target ovules in *Arabidopsis*.  
Plant Cell 23: 81–93

**Lv, Q.D., Tang, R.J., Liu, H., Gao, X.S., Li, Y.Z., Zheng, H.Q., Zhang, H.X. (2009).**

Cloning and molecular analyses of the *Arabidopsis thaliana* chloride channel gene family.  
Plant Science 176: 650–661

**Maciver, S. K., Pope, B. J., et al. (1998).**

The effect of two ADF/cofilins on actin filament turnover: pH sensitivity of F-actin by human ADF, but not of *Acanthamoeba* actophorin.  
Biochemistry 256: 388-397.

**Maheshwari, P. (1950).**

An Introduction to the Embryology of Angiosperms.  
New York: McGraw-Hill.

**Maierhofer, T., Diekmann, M., Offenborn, J.N., Lind, C., Bauer, H., Hashimoto, K., Al-Rasheid, K.A.S., Luan, S., Kudla, J., Geiger, D. et al. (2014).**

Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid.  
Science Signaling 7: ra86.

**Malhó, R., Feijo, J.A., Pais, M.S.S. (1992).**

Effect of electrical fields and external ionic currents on pollen-tube orientation.  
Sexual Plant Reproduction 5: 57–63.

**Malhó, R. and Trewavas, A.J. (1996).**

Localized apical increases of cytosolic free calcium control pollen tube orientation.  
Plant Cell 8: 1935–1949.

- Malho, R., Camacho, L. and Moutinho, A. (2000).**  
Signalling pathways in pollen tube growth and reorientation.  
Ann. Bot., 85: 59-68.
- Markova, O., Mukhtarov, M., Real, E., Jacob, Y. and Bregestovski, P. (2008).**  
Genetically encoded chloride indicator with improved sensitivity.  
J. Neurosci. Methods 170: 67–76.
- Marmagne, A., Vinauger-Douard, M., Monachello, D., de Longevialle, AF, Charon, C., Allot, M., Rappaport, F., Wollma, FA, Barbier-Brygoo, H., Ephritikhine, G. (2007).**  
Two members of the *Arabidopsis* CLC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and Golgi membranes, respectively.  
Journal of Experimental Botany 58: 3385–3393
- Marten, H., Hyun, T., Gomi, K., Seo, S., Hedrich, R., Roelfsema, MRG. (2008).**  
Silencing of NtMPK4 impairs CO<sub>2</sub>-induced stomatal closure, activation of anion channels and cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals in *Nicotianatabacum* guard cells.  
The Plant Journal 55: 698–708.
- Matveyeva, NP., Andreyuk, DS., Yermakov, IP. (2003).**  
Transport of Cl<sup>-</sup> across the plasma membrane during pollen grain germination in tobacco.  
Biochemistry-Moscow 68: 1247–1251.
- Mazina, S., Matveeva, N. and Ermakov, I. (2002).**  
Determination of a position of a functional pore.  
Tsitologiya 44: 33–39.
- McAnaney, T.B., Zeng, W., Doe, C.F.E., Bhanji, N., Wakelin, S., Pearson, D.S., Abbyad, P., Shi, X., Boxer, S.G. and Bagshaw, C.R. (2005).**  
Protonation, photobleaching, and photoactivation of yellow fluorescent protein (YFP 10C): A unifying mechanism.  
Biochemistry 44: 5510–5524.
- Messerli, M.A., Creton, R., Jaffe, L.F. and Robinson, K.R. (2000).**  
Periodic increases in elongation rate precede increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> during pollen tube growth.  
Dev. Biol. 222: 84–98.
- Messerli, M.A., Danuser, G. and Robinson, K.R. (1999).**  
Pulsatile influxes of H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> lag growth pulses of *Lilium longiflorum* pollen tubes.  
J. Cell Sci. 112: 1497–1509.
- Meyer, S., Mumm, P., Imes, D., Endler, A., Weder, B., Al-Rasheid KA, Geiger, D., Marten, I., Martionia, E., Hedrich, R. (2010).**  
AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells.  
The Plant Journal 63:1054-1062.

**Meyer, S., Scholz-Starke, J., De, A. A., Kovermann, P., Burla, B., Gambale, F., et al. (2011).**

Malate transport by the vacuolar AtALMT6 channel in guard cells is subject to multiple regulation.

Plant J. 67: 247–257.

**Michard, E., Alves, F., Feijó J.A. (2009).**

The role of ion fluxes in polarized cell growth and morphogenesis: the pollen tube as an experimental paradigm.

Int J Dev Biol 53: 1609–1622.

**Michard, E., Dias, P. and Feijó, J.A. (2008).**

Tobacco pollen tubes as cellular models for ion dynamics: Improved spatial and temporal resolution of extracellular flux and free cytosolic concentration of calcium and protons using pHluorin and YC3.1 CaMeleon.

Sex. Plant Reprod. 21: 169–181.

**Michard, E., Lima, P.T., Borges, F., Silva, A.C., Portes, M.T., Carvalho, J.E., Gilliam, M., Liu, L.H., Obermeyer, G. and Feijó, J.A. (2011).**

Glutamate receptor-like genes form Ca<sup>2+</sup> channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine.

Science. 332: 434–437.

**Mori, Izumi C., Murata, Yoshiyuki, Yang, Yingzhen, Munemasa, Shintaro, Wang, Yong-Fei, Andreoli, Shannon, Tiriac, Hervé, Alonso, Jose M., Harper, Jeffery F., Ecker, Joseph R., Kwak, June M., Schroeder, Julian I (2006).**

CDPKs CPK6 and CPK3 Function in ABA Regulation of Guard Cell S-Type Anion- and Ca<sup>2+</sup>- Permeable Channels and Stomatal Closure.

PLoS Biol.:e327

**Mouline, K., Véry, A.A., Gaymard, F., Boucherez, J., Pilot, G., Devic, M., Bouchez, D., Thibaud, JB., Sentenac, H. (2002).**

Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K<sup>+</sup> channel in *Arabidopsis*.

Genes Dev. 1;16(3):339-50.

**Moutinho, A., Hussey, P.J., Trewavas, AJ., Malho, R. (2001).**

cAMP acts as a second messenger in pollen tube growth and reorientation.

Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 98: 10481–10486.

**Mu, J-H., Stains, J.P., Kao, T-H. (1994).**

Characterization of a pollen-expressed gene encoding a putative pectin esterase of *Petunia inflata*.

Plant Mol Biol 25: 539-544

**Mumm, P., Imes, D., Martinoia, E., Al-Rasheid, K.A.S., Geiger, G., Marten, I. and Hedrich, R. (2013).**

C-terminus mediated voltage gating of *Arabidopsis* guard cell anion channel QUAC1.

Mol Plant. 6(5):1550-63

**Myers, C., Romanowsky, SM., Barron, YD., Garg, S., Azuse, CL., Curran, A., et al. (2009).**

Calcium-dependent protein kinases regulate polarized tip growth in pollen tubes.  
Plant J.59:528-539

**Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M. and Miyawaki, A. (2004).**

Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> by circularly permuted yellow fluorescent proteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 10554–10559.

**Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M. and Iba, K. (2008).**

CO<sub>2</sub> regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells.

Nature 452(7186): 483- 486.

**Okuda, S., Tsutsui, H., Shiina, K., Sprunck, S., Takeuchi, H., et al. (2009).**

Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells.

Nature 458: 357–361.

**O'Neill, M.A., Albersheim, P. and Darvill, A. (1990).**

The pectic polysaccharides of primary cell walls.

In: Methods in Plant Biochemistry, Carbohydrates, P.M. Dey and J.B. Harborne, eds (London: Academic Press): 415-441.

**Pacini, E. (1994).**

Cell biology of anther and pollen development. In: Williams EG, Clarke AE, Knox RB., editors.

Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants.

Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants :289-308

**Pacini, E. (1996).**

Tapetum types in the Compositae: form and function. In: Hind DJH, Beentje H, Pope GV, editors. Proceedings of the International Compositae Conference.

Royal Botanic Gardens Kew: 21-28.

**Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, AF., Preuss, D. (2003).**

Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels.

Cell.: 114:47–59.

**Palin, R. and Geitmann, A. (2012).**

The role of pectin in plant morphogenesis.

Biosystems 109: 397-402.

**Parton, RM., Fischer-Parton, S., Watahiki, MK., Trewavas, AJ. (2001).**

Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes.

J Cell Sci 114: 2685–2695

**Paxson-Sowers, D.M., Dodrill, C.H., Owen, H.A. and Makaroff, C.A. (2001).**  
DEX1, a novel plant protein is required for exine pattern formation during development in *Arabidopsis*.  
Plant Physiol. 127: 1739–1749.

**Pearce, G., Moura, DS., Stratmann, J., Ryan, CA. (2001).**  
RALF, a 5-kDa ubiquitous polypeptide in plants, arrests root growth and development.  
Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 98: 12843–12847.

**Pina, C., Pinto, F., Feijo, J.A., Becker, JD. (2005).**  
Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation.  
Plant Physiol 138 744–756

**Piñeros, MA, .Cançado, GMA., Maron, LG., Lyi, SM., Menossi, M., Kochian, LV. (2008).**  
Not all ALMT1- type transporters mediate aluminum-activated organic acid responses: The case of ZmALMT1 – an anion selective transporter.  
The Plant Journal 53: 352–367.

**Preuss, D., Rhee, SY., Davis, RW. (1994).**  
Tetrad analysis possible in *Arabidopsis* with mutation of the QUARTET (QRT) genes.  
Science 264: 1458–1460

**Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G. and Davis, R.W. (1993).**  
A conditional sterile mutation eliminates surface components from *Arabidopsis* pollen and disrupts cell signaling during fertilization.  
Genes Dev. 7: 974–985.

**Qin, Y., Yang, Z. (2011).**  
Rapid tip growth: insights from pollen tubes.  
Semin. Cell Dev. Biol. 22: 816–824

**Qu, HY., Shang, ZL., Zhang, SL., Liu, LM., Wu, JY. (2007).**  
Identification of hyperpolarization-activated calcium channels in apical pollen tubes of *Pyrus pyrifolia*.  
New Phytol. 2007;174(3):524-36.

**Ratté, S., Prescott, SA. (2011).**  
CIC-2 channels regulate neuronal excitability, not intracellular chloride levels.  
J Neurosci.; 31:15838–15843

**Röckel, N., Wolf, S., Kost, B., Rausch, T. and Greiner, S. (2008).**  
Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PME1 at the pollen tube tip involves PME1 endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins.  
Plant J. 53: 133-143.

**Roelfsema, M. R. and Hedrich, R. (2005).**

In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'.  
New Phytol 167(3): 665-691.

**Roelfsema, M. R., Levchenko, V. and Hedrich, R. (2004).**

ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels.  
Plant J 37(4): 578-588.

**Rotman, N., Rozier, F., Boavida, L., Dumas, C., Berger, F. and Faure, J.E. (2003).**

Female control of male gamete delivery during fertilization in *Arabidopsis thaliana*.  
Curr. Biol. 13: 432–436.

**Russell, S.D. (1993).**

The egg cell: Development and role in fertilization and early embryogenesis.  
Plant Cell 5: 1349-1359.

**Sasaki, T., Mori, I. C., Furuichi, T., Munemasa, S., Toyooka, K., Matsuoka, K., et al. (2010).**

Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter.  
Plant Cell Physiol. 51: 354–36510.

**Scherzer, S., Maierhofer, T., Al-Rasheid, K.A., Geiger, D. and Hedrich, R. (2012).**

Multiple calcium-dependent kinases modulate ABA-activated guard cell anion channels.  
Mol. Plant 5: 1409–1412.

**Schiott, M., Romanowsky, S.M., Baekgaard, L., Jakobsen, M.K., Palmgren, M.G. and Harper, J.F. (2004).**

A plant plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump is required for normal pollen tube growth and fertilization.  
Proc. Natl Acad. Sci. U S A. 101: 9502–9507.

**Schroeder, J. I. and Keller, B. U. (1992).**

Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation.  
Proc Natl Acad Sci U S A 89(11): 5025-5029.

**Schulz-Lessdorf, B., Lohse, G. and Hedrich, R. (1996).**

GCAC1 recognizes the pH gradient across the plasma membrane: A pH-sensitive and ATP-dependent anion channel links guard cell membrane potential to acid and energy metabolism.  
Plant J. 10: 993-1004.

**Schwacke, R., Grallath, S., Breitzkreuz, KE. et al. (1999).**

LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and  $\gamma$ -amino butyric acid in tomato pollen.

The Plant Cell;11:377-392.

**Shang, Z., Ma, L., Zhang, H., He, R., Wang, X., Cui, S. and Sun, D. (2005).**

$\text{Ca}^{2+}$  influx into lily pollen grains through a hyperpolarization-activated  $\text{Ca}^{2+}$  permeable channel which can be regulated by extracellular CaM.

Plant Cell Physiol. 46: 598–608.

**Stange, A., Hedrich, R. and Roelfsema, M.R.G. (2010).**

$\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation of guard cell anion channels, triggered by hyperpolarization, is promoted by prolonged depolarization.

Plant J. 62: 265–276.

**Steinhorst, L. and Kudla, J. (2012).**

Calcium: a central regulator of pollen germination and tube growth.

Biochim Biophys Acta. 1833(7):1573-81.

**Strasburger, E. (1879).**

Die Angiospermen und die Gymnospermen.

Verlag Von Gustav Fischer, 1879 - 173

**Su, H., Gollmack, D., Zhao, C. and Bohnert, H. J. (2002).**

The expression of HAK-Type  $\text{K}^+$  transporters is regulated in response to salinity stress in common ice plant.

Plant Physiology, vol. 129: 1482–1493).

**Südhof, T. C. (2004).**

The Synaptic Vesicle Cycle.

Annual Review of Neuroscience 27: 509–547.

**Sunita, A. Ramesh, Tyerman, Stephen D., Xu, Bo, Bose, Jayakumar, Kaur, Satwinder, Conn, Vanessa, Domingos, Patricia, Ullah, Sana, Wege, Stefanie, Shabala, Sergey, Feijó, José A., Ryan, Peter R. and Gillham, Matthew (2015).**

GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters.

Nat Commun 29: 6-7879.

**Takeuchi, H., Higashiyama, T. (2012).**

A species-specific Cluster of Defensin-like genes encodes Diffusible pollen tube attractants in *Arabidopsis*.

PLOS Biology 10:e1001449.

**Tavares, B., Dias, P.N., Domingos, P., Moura, T.F., Feijó, J.A. and Bicho, A. (2011a).**

Calcium-regulated anion channels in the plasma membrane of *Lilium longiflorum* pollen protoplasts.

New Phytol. 192: 45–60.

**Taylor, P.E., Glover, J.A., Lavithis, M., Craig, S., Singh, M.B., Knox, R.B., Dennis, E.S. and Chaudhury, A.M. (1998).**

Genetic control of male fertility in *Arabidopsis thaliana*: structural analyses of postmeiotic developmental mutants.  
Planta, 205: 492-505.

**Tiwari, S.C. and Polito, V.S. (1990a).**

An analysis of the role of actin during pollen activation leading to germination in pear (*Pyrus communis* L.): Treatment with cytochalasin D.  
Sex. Plant Reprod. 3: 121-129.

**Tsay, Y., Schroeder, J.I., Feldmann, K.A. and Clawtord, N.M. (1993).**

The herbicide sensitivity gene CHL7 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter.  
Cell 72: 705-713.

**Tunc-Ozdemir, M., Rato, C., Brown, E., Rogers, S., Mooneyham, A., Frietsch, S., Myers, C.T., Poulsen, L.R., Malhó, R., Harper, JF. (2013a).**

Cyclic nucleotide gated channels 7 and 8 are essential for male reproductive fertility.  
PLoS ONE 8: e55277

**Twell, D. (2002).**

Pollen developmental biology.  
pp. 86–153 in Plant Reproduction (Annual Plant Reviews, Vol. 6)

**Ullrich, W.R., Larsson, M., Larsson, C-M, Lesch, S., Novacky, A. (1984).**

Ammonium uptake in *Lemna gibba* G1, related membrane potential changes, and inhibition of anion uptake.  
Physiol Plant 61: 369-376

**Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y.-F., Nishimura, N., Chan, W.-Y., Valerio, G., et al. (2008).**

SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signaling.  
Nature 452 : 483 – 486

**Van Kirk, C. A. and Raschke, K. (1978).**

Presence of Chloride Reduces Malate Production in Epidermis during Stomatal Opening. Plant.  
Physiol 61(3): 361-364.

**Véry, A.A., Davies, J.M. (2000).**

Hyperpolarization-activated calcium channels at the tip of *Arabidopsis* root hairs.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 97(17):9801-6.

**von der Fecht-Bartenbach, J., Bogner, M., Dynowski, M., Ludewig, U. (2010).**

CLC-b-mediated  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  exchange across the tonoplast of *Arabidopsis* vacuoles.  
Plant and Cell Physiology 51: 960–968

**von der Fecht-Bartenbach, J., Bogner, M., Krebs, M., Stierhof, Y.D., Schumacher, K., Ludewig, U. (2007).**

Function of the anion transporter AtCLC-d in the trans-Golgi network.  
The Plant Journal 50: 466–474

**Wang, Y., Zhang, W.Z., Song, L.F., Zou, J.J., Su, Z., Wu, W.H. (2008).**

Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*.  
Plant Physiology 148: 1201–1211.

**Wang, H. J., Wan, A. R. and Jauh, G. Y. (2008).**

An actin binding protein, LILIM1, mediates Ca and H regulation of actin dynamics in pollen tubes.  
*Plant Physiol.* 47: 1619–1636.

**Wang, Y.F., Fan, L.M., Zhang, W.Z., Zhang, W. and Wu, W.H. (2004).**

Ca<sup>2+</sup>- permeable channels in the plasma membrane of *Arabidopsis* pollen are regulated by actin microfilaments.  
Plant Physiol. 136: 3892–3904.

**Willats, W.G., McCartney, L., Mackie, W. and Knox, J.P. (2001a).**

Pectin: cell biology and prospects for functional analysis.  
Plant Mol. Biol. 47: 9-27.

**Willats, W.G., Orfila, C., Limberg, G., Buchholt, H.C., van Alebeek, G.J., Voragen, A.G., Marcus, S.E., Christensen, T.M., Mikkelsen, J.D., Murray, B.S. and Knox, J.P. (2001b).**

Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. Implications for pectin methyl esterase action, matrix properties, and cell adhesion.  
J. Biol. Chem. 276: 19404-19413.

**Willemse, M.T.M. and van Went, J.L. (1984).**

The female gametophyte.  
In Embryology of Angiosperms, B.M. Johri, ed (Berlin: Springer-Verlag): pp. 159–196.

**Wolf, S. and Greiner, S. (2012).**

Growth control by cell wall pectins.  
Protoplasma 249 Suppl 2: S169-175.

**Wolf, S., Grsic-Rausch, S., Rausch, T. and Greiner, S. (2003).**

Identification of pollen-expressed pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis*.  
Febs Letters 555: 551-555.

**Wu, H.M., Wang, H., Cheung, A.Y. (1995).**

A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower.  
Cell 82:395-403.

**WuY, Qiu, X., Du, S., Erickson, L. (1996).**

PO149, a new member of pollen pectate lyase-like gene family from alfalfa.  
Plant Molecular Biology 32:1037–1042.

**Yadegari, R. , Drews, G.N. (2004).**

Female gametophyte development.  
Plant Cell, 16 (Suppl.):S133–S141

**Yamaguchi, M., Sasaki, T., Sivaguru, M., Yamamoto, Y., Osawa, H., Ahn, S.J., Matsumoto, H. (2005).**

Evidence for the plasma membrane localization of Al-activated malate transporter (ALMT1).  
Plant Cell Physiol 46: 812–816

**Yan, A., Xu, G. and Yang, Z.B. (2009).**

Calcium participates in feedback regulation of the oscillating ROP1 Rho GTPase in pollen tubes.  
Proc. Natl Acad. Sci. U S A. 106: 22002–22007.

**Yang, Z. (1998).**

Signaling tip growth in plants.  
Curr. Opin. PlantBiol. 1: 525–530.

**Yu, G.H., Zou, J., Feng, J., Peng, X.B., Wu, J.Y., Wu, Y.L. et al. (2014).**

Exogenous gamma-aminobutyric acid (GABA) affects pollen tube growth via modulating putative Ca<sup>2+</sup>-permeable membrane channels and is coupled to negative regulation on glutamate decarboxylase.  
J Exp Bot. 65(12):3235-48.

**Zerzour, R., Kroeger, J. and Geitmann, A. (2009).**

Polar growth in pollen tubes is associated with spatially confined dynamic changes in cell mechanical properties.  
Dev. Biol. 334: 437-446.

**Zhang, J., Martinoia, E., De Angeli, A. (2014).**

Cytosolic nucleotides block and regulate the *Arabidopsis* vacuolar anion channel AtALMT9.  
J Biol Chem. 2014 Sep 12;289(37):25581-9.

**Zhao, L.N., Shen, L.K., Zhang, W.Z., Zhang, W., Wang, Y., Wu, W.H. (2013).**

Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase11 and 24 modulate the activity of the inward rectifying K<sup>+</sup> channels in *Arabidopsis* pollen tubes.  
Plant Cell 25: 649–661

**Zhao, Y., et al. (2010).**

Phosphoinositides regulate clathrin-dependent endocytosis at the tip of pollen tubes in *Arabidopsis* and tobacco.  
Plant Cell. 22: 4031–4044.

**Zhou, L., Lan, W., Chen, B., Fang, W., Luan, S. (2015).**

A Calcium Sensor-Regulated Protein Kinase, CALCINEURIN B-LIKE PROTEIN-INTERACTING PROTEIN KINASE19, Is Required for Pollen Tube Growth and Polarity.

Plant Physiol. 167(4):1351-60.

**Zhou, L., Fu, Y. and Yang, Z. (2009).**

A genome-wide functional characterization of *Arabidopsis* regulatory calcium sensors in pollen tubes.

J. Integr. Plant Biol. 51: 751–761.

**Zhou, L., Lan, W., Jiang, Y., Fang, W. and Luan, S. (2014).**

A calcium-dependent protein kinase interacts with and activates a calcium channel to regulate pollen tube growth.

Mol. Plant. 2014; 7: 369–376

**Zinkl, G.M. & Preuss, D. (2000).**

Dissecting *Arabidopsis* pollen–stigma interactions reveals novel mechanisms that confer mating specificity.

Annals of Botany 85 (Suppl.): 15–21.

**Zinkl, G.M., Zwiebel, Bl., Grier, D.G., Preuss D. (1999).**

Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine.

Development. 126:5431–5440.

**Zonia, L., Cordeiro, S., Tupy, J., Feijo, J.A. (2002).**

Oscillatory chloride efflux at the pollen tube apex has a role in growth and cell volume regulation and is targeted by inositol 3,4,5,6-tetra kisposphate.

The Plant Cell 14:2233-2249.

**Zonia, L., Cordeiro, S. and Feijó, J.A. (2001).**

Ion dynamics and the control of hydrodynamics in the regulation of pollen tube growth.

Sex. Plant Reprod. 14: 111–116.

## 7.5 Lebenslauf Timo Gutermuth

### PERSÖNLICHE ANGABEN:

---

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Alter: 31 Jahre (geb. 02.07.1984 in Fulda)

### SCHULISCHER WERDEGANG

---

#### 1990 - 1994

- Grundschule Eichenzell

#### 1994 - 2000

- Winfriedschule Fulda, Gymnasium

#### 2000 – 2001

- Realschule: Von-Galen, Eichenzell, Realschulabschluss

#### Fremdsprachen:

- 6 Jahre Englisch
- 4 Jahre Latein

### AUSBILDUNG

---

#### 2001 - 2003

- Chemisch-Technischer-Assistent (CTA)  
Schwerpunkt: Umwelt, Max-Eyth-Schule, Alsfeld

#### 2003 – 2004

- Fachoberschule, Schwerpunkt: Gesundheit, (Fachhochschulreife)  
Max-Eyth-Schule, Alsfeld

**2004 – 2005**

- Zivildienst (Malteser Hilfsdienst, Fulda)

**2005 – 2009**

- Studium Biotechnologie, Hochschule Darmstadt (8. Semester)
- März bis August 2007  
Studienarbeit Klinikum Fulda,  
Institut für Laboratoriumsmedizin

**2009 – 2010**

- Diplomarbeit (September 2009 – Juli 2010) Universität Regensburg, Plant Chromatin Group, Prof. Dr. Grasser

**2011 – 2015**

- Promotion / wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Würzburg, Lehrstuhl für Botanik I, Pflanzenphysiologie und Biophysik, Arbeitsgruppe von Dr. Kai Konrad, Polares Zellwachstum.

**Thema der Promotion:**

Identifizierung und Charakterisierung des Signalweges zur Aktivierung von Anionenkanälen während des Pollenschlauchwachstums

**2015 – 2016**

- Service-Ingenieur, Firma Onken, Bereich: Aminosäure-Analytik

---

**PUBLIKATIONEN**

---

**2013**

Timo Gutermuth, Roman Lassig, Maria-Teresa Portes, Tobias Maierhofer, Tina Romeis, Jan-Willem Borst, Rainer Hedrich, José A. Feijó and Kai R. Konrad.

Pollen Tube Growth Regulation by Free Anions Depends on the Interaction between the Anion Channel SLAH3 and Calcium-Dependent Protein Kinases CPK2 and CPK20.

The Plant Cell, Vol. 25: 4525–4543.

**2014**

Roman Lassig, Timo Gutermuth, Till D. Bey, Kai R. Konrad and Tina Romeis.

Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth.

Plant J. 2014 Apr; 78(1):94-106

---

**EICHENZELL, DEN 17.05.2016**

---

Timo Gutermuth

## 7.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbstständig und ausschließlich mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die gemäß Wortlaut oder Inhalt aus anderen Arbeiten entnommen sind, wurden durch Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Außerdem habe ich bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, .....

.....

Timo Gutermuth

## 7.7 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Möglichkeit unter seiner stets konstruktiven Anleitung am Institut für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg meine Dissertation anzufertigen, bedanken.

Die Ausstattung des mir zur Verfügung gestellten Labors entsprach dem neuesten Stand der Technik und ließ keine Wünsche offen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Kai Konrad für die ausgezeichnete Begleitung über den gesamten Zeitraum meiner Promotion. Ohne seine Unterstützung und Geduld, seine konstruktive Kritik und Ideen bei der Entwicklung neuer experimenteller Ansätze sowie seine stets motivierende Art wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke auch für die vielen netten Gespräche, aufmunternden Worte und die gute Stimmung im Labor.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Erhard Wischmeyer für das Interesse und die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch Melanie Papenfuss, die das zweifelhafte Vergnügen hatte, mir die quantitative Real-time-PCR näher bringen zu dürfen. Lena, Florian, Julian und Kai, welche den Laboralltag mit mir ertragen durften und Eva, Brigitte, Christine und Katha, die mich nach missglückten Experimenten im Büro wieder aufheiterten. Ich möchte mich wirklich herzlich für eure Unterstützung und die schöne Zeit mit euch und allen Kollegen und Mitarbeitern im Institut bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an Joachim, für die Unmengen an Pflanzen, die für meine Experimente angezogen werden mussten und oft einen Großteil des Gewächshauses einnahmen.

Zu guter Letzt ganz herzlichen Dank

- meiner Familie und insbesondere meinem Vater und meiner Mutter für ihre Hilfe und Beistand während des Studiums und der Promotion
- meiner Oma, die immer ein offenes Ohr für mich hat

- meiner Schwester Nadine und ihrem Mann Randy für die lustige Zeit in der WG in Würzburg
- meiner Freundin Kathrin, die immer zu mir steht und während des Verfassens der Dissertation meine Launen ertragen hat.

Opa, danke, dass du immer mein Interesse an der Natur gefördert und unterstützt hast.

**Danke!!!!!!!**

