

**Funktionelle Charakterisierung der  
pollenspezifischen NAD(P)H-Oxidasen  
RBOHH und RBOHJ**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktor  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Roman Van Lassig

aus Berlin

2014

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von März 2011 bis März 2014 an der Freien Universität Berlin, Abteilung Biochemie der Pflanzen unter Anleitung von Prof. Dr. Tina Romeis durchgeführt.

1. Gutachterin: Prof. Dr. Tina Romeis
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling

Tag der Disputation: 6.10.2014

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben. Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet. Ein Promotionsverfahren zu einem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderem Fachbereich wurde nicht beantragt.

Berlin, den 4. Juli 2014

Roman Van Lassig

Teile dieser Arbeit wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Lassig R, Gutermuth T, Bey TD, Konrad KR, Romeis T. Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. *Plant J.* 78 (1): 94-106. doi:10.1111/tpj.12452

## Zusammenfassung

Sexuelle Reproduktion in Blütenpflanzen erfordert die Ausbildung eines Pollenschlauchs, der die immotilen Spermien zu dem weiblichen Gametophyten transportiert. Pollenschläuche sind extrem polarisierte Zellen und aufgrund dieser Eigenschaft und ihrer fundamentalen Bedeutung für die Reproduktion gelten sie als wichtiges Modellsystem für die Untersuchung von polarem Zellwachstum und Signaltransduktion. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), synthetisiert von NAD(P)H-Oxidase, sind bekannt als Regulatoren des Pollenschlauchwachstums, jedoch ist deren genaue Funktion während dieses Prozesses noch unklar. In dieser Arbeit wurde die Funktion der pollenspezifischen NAD(P)H-Oxidase näher untersucht. Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* verfügt über zwei spezifisch in Pollen exprimierte NAD(P)H-Oxidase, RBOHH und RBOHJ. Durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass Fluoreszenzmarkierte RBOHH und RBOHJ in distinkten und überlappenden Plasmamembranregionen lokalisiert sind. Die Plasmamembranlokalisierung von RBOHH und RBOHJ war sensitiv gegenüber dem Exozytose-Inhibitor BFA, was daraufhin deutet, dass beide Enzyme während des Pollenschlauchwachstums kontinuierlich rezykliert werden.

Funktioneller Verlust von *RBOHH* und *RBOHJ* in homozygoten Doppelmutanten führt zu einer erheblichen Verringerung der Fertilität, was durch einen Defekt im männlichen Gametophyten verursacht wird. Pollen von *rbohH rbohJ*-Doppelmutanten kann zwar *in vitro* und *in vivo* keimen, jedoch kollabiert ein Großteil der Pollenschläuche während der Elongation. Eine Analyse der Pollenschlauchwachstumsgeschwindigkeit offenbarte signifikante Unterschiede zwischen WT- und *rbohH rbohJ*-Pollenschläuchen: Während WT-Pollenschläuche mit gleichmäßiger Geschwindigkeit wachsen, oszilliert die Wachstumsgeschwindigkeit bei *rbohH rbohJ*-Mutanten. Durch Lebendzellanalyse der Exozytosedynamik konnte gezeigt werden, dass diese Oszillationen durch ein Ungleichgewicht zwischen Zellexpansionsrate und Exozytoserate verursacht sind. Die Wachstumsoszillationen in *rbohH rbohJ* gingen einher mit einer verstärkten Oszillation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, d. h. es besteht mit hoher Wahrscheinlichkeit ein kausaler Zusammenhang zwischen Wachstum und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Anhand dieser Ergebnisse wird ein Modell vorgeschlagen, in dem ROS und  $\text{Ca}^{2+}$  eine einfache Rückkopplungsschleife konstituieren. Es wird postuliert, dass Wachstum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom induziert und damit ROS-Produktion aktiviert, wodurch wiederum das Wachstum gebremst wird. Die Amplitude der intrinsischen Wachstumsoszillation wird dadurch verkleinert und das Wachstum stabilisiert. Die hier vorgestellten Daten repräsentieren einen wichtigen Beitrag für das Verständnis des polaren Zellwachstums.

## Abstract

Sexual reproduction in flowering plants involves the formation of a pollen tube, an extremely polarized cell, which delivers the immotile male germ unit to the female gametophyte. Pollen tubes have proven to be an excellent model system for studying various aspects of polarized cell growth such as  $\text{Ca}^{2+}$ - or small GTPase-signaling. Reactive oxygen species (ROS) produced by NAD(P)H oxidases have long been recognized as important factors during pollen tube growth, however, their precise function during this process has remained largely unknown.

In this work, the biological function of pollen-expressed NAD(P)H oxidases was further explored. The model plant *Arabidopsis thaliana* has two pollen-specific NAD(P)H oxidase isoforms, RBOHH and RBOHJ, which have overlapping functions during pollen tube growth. Confocal laser scanning microscopy of pollen tubes expressing fluorescently labelled NAD(P)H oxidases showed that RBOHH and RBOHJ are located at overlapping and distinct plasma membrane regions. Both enzymes were internalized after application of the exocytosis inhibitor Brefeldin A, albeit with different kinetics, indicating that RBOHH and RBOHJ are continuously recycled during pollen tube elongation.

Genetic loss of *RBOHH* and *RBOHJ* in homozygous double mutants severely compromises plant fertility, which is caused by a male gametophytic defect. Although *rboh h rboh j* double mutant pollen was able to germinate, the resulting pollen tubes prematurely collapsed, significantly affecting fertilization. Using kinematic analysis of growing pollen tubes, it is further shown that *rboh h rboh j* pollen tubes have altered growth dynamics. Life cell imaging of exocytic dynamics in growing pollen tubes revealed that these alterations are most likely caused by an imbalance between the rate of cell expansion and the rate of exocytosis. The enhanced growth oscillations of *rboh h rboh j* pollen tubes are accompanied by growth dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -oscillations which do not occur in WT. Based on these findings a model is proposed in which NAD(P)H oxidase produced ROS and  $\text{Ca}^{2+}$  comprise a simple feedback loop that dampens the amplitude of intrinsic growth rate oscillations thus stabilizing growth. These findings not only elucidate the function of ROS during pollen tube growth, but have also profound implications for other processes involving NAD(P)H oxidases.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb. ....	Abbildung
AGP ....	Arabinogalactan-Protein
AS ....	Aminosäuren
<i>At</i> .....	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AU ....	<i>arbitrary units</i>
BFA ....	Brefeldin A
BIK1 .....	BOTRYTIS INDUCED KINASE1
bp .....	Basen Paare
BSA .....	<i>bovine serum albumin</i>
CaMV .....	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
Carb .....	Carbenicillin
CDPK .....	<i>calcium-dependent protein kinase</i>
CDS .....	Kodierende Sequenz
CLSM .....	<i>confocal laser-scanning-microscopy</i>
CNGC .....	<i>cyclic nucleotide-gated channel</i>
Col-0 .....	Columbia-0
cpVenus .....	<i>circularly permuted Venus</i>
CrRLK1L ....	<i>Cantharus roseus</i> Receptor-like kinase1-like
DCF .....	2', 7'-Dichlorofluorescein
DMF .....	Dimethylformamid
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
DNA .....	<i>desoxyribose ribonucleic acid</i>
DPI .....	Diphenyleiodonium
ECFP .....	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
Em. ....	Emissionswellenlänge
EtOH .....	Ethanol
Ex. ....	Exzitationswellenlänge
FAD .....	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FRAP .....	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
FRET .....	Förster Resonanzenergietransfer
Gent .....	Gentamycin
GLR .....	<i>glutamate-like receptors</i>
GUS .....	$\beta$ -Glucuronidase

H <sub>2</sub> DCFDA ...	2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetat
HEK .....	<i>human embryonic kidney</i>
HRGP .....	Hydroxyprolin-reiche Glykoprotein
HRP .....	<i>horseradish peroxidase</i>
Kan .....	Kanamycin
mAb .....	<i>monoclonal antibody</i>
MS-Medium ..	Murashige und Skoog Medium
NA .....	Numerische Apertur
NAD(P)H ....	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NBT .....	Nitroblau-Tetrazolium
<i>Os</i> .....	<i>Oryza sativa</i>
P-site .....	Phosphorylierungsstelle
PBL1 .....	PBS1-LIKE
PBS .....	<i>phosphate-buffered Saline</i>
PCR .....	<i>polymerase chain reaction</i>
PHOX .....	<i>phagocyte oxidase</i>
PI .....	Propidiumiodid
PM .....	Plasmamembran
PME .....	Pektin-Methylesterasen
PSI .....	Photosystem I
<i>rhd2</i> .....	<i>root hair defective2</i>
RALF .....	RAPID ALKANIZATION FACTOR
RBOH .....	<i>resperatory burst oxidase homologue</i>
Rif .....	Rifampicin
RLCK .....	<i>receptor-like cytoplasmic kinase</i>
ROI .....	<i>region of interest</i>
ROP .....	<i>rho of plants</i>
ROS .....	<i>reactive oxygen species</i>
RT .....	Raumtemperatur
SDS .....	Natriumdodecylsulfat
Ser .....	Serin
SKOR .....	STELAR K <sup>+</sup> OUTWARD RECTIFYER
T-DNA .....	Transfer-DNA
Tab. ....	Tabelle
TEVC .....	<i>two-electrode voltageclamp</i>



Thr	.....	Threonin
WT	.....	Wildtyp
X-Gluc	.....	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronsäure
YC3.6	.....	Yellow Cameleon 3.6
YFP	.....	Yellow Fluorescent Protein
Zyt	.....	Zytosol

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Eine kurze Einführung in die pflanzliche Reproduktion . . . . .	2
1.2	Die Zellbiologie des männlichen Gametophyten . . . . .	2
1.3	Molekulare und biophysikalische Aspekte des Pollenschlauchwachstums	4
1.4	Biologie der reaktiven Sauerstoffspezies . . . . .	5
1.5	Die Funktion der NAD(P)H-Oxidasen . . . . .	7
1.6	Zielsetzung . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	Material . . . . .	13
2.1.1	Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen . . . . .	13
2.1.2	Bakterienanzucht und Bakterienstämme . . . . .	14
2.1.3	Materialien für Molekularbiologie . . . . .	15
2.1.4	Verwendete Antikörper . . . . .	15
2.2	Methoden . . . . .	17
2.2.1	Molekularbiologische Standardmethoden . . . . .	17
2.2.2	Klonierungen . . . . .	17
2.2.3	Pflanzentransformation . . . . .	18
2.2.4	RNA-Isolierung und RT-PCR . . . . .	19
2.2.5	DNA-Isolierung für die Genotypisierung von Pflanzen . . . . .	19
2.2.6	Histochemische Analyse der Genexpression . . . . .	19
2.2.7	Pollenkeimung . . . . .	20
2.2.8	Analyse der Pollenschlauchphänotypen . . . . .	21
2.2.9	DPI-Behandlung . . . . .	21
2.2.10	NBT-Färbung . . . . .	22
2.2.11	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie . . . . .	22
2.2.12	Ca <sup>2+</sup> -Imaging mit Yellow Cameleon 3.6 und R-GECO . . . . .	23
2.2.13	Anilinblau-Färbung . . . . .	24
2.2.14	Propidiumiodid-Färbung . . . . .	24
2.2.15	<i>In situ</i> Detektion von Zellwandkomponenten . . . . .	24
2.2.16	Elektrophysiologie . . . . .	25

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
3.1	Identifikation pollenspezifischer NAD(P)H-Oxidasen . . . . .	27
3.2	Zellbiologische Charakterisierung von RBOHH und RBOHJ . . . . .	29
3.3	Genetische Charakterisierung von <i>rboh</i> Einzel- und Doppelmutanten	34
3.4	Charakterisierung des <i>in vivo</i> Pollenschlauchwachstums von <i>rbohh-1</i> <i>rbohj-2</i> . . . . .	40
3.5	Bestimmung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies . . . . .	42
3.6	Phänotypische Charakterisierung der <i>rbohh-1 rbohj-2</i> -Pollenschläuche	45
3.7	Pharmakologische Inhibition pollenspezifischer NAD(P)H-Oxidasen .	49
3.8	Analyse der Exozytoserate von Zellwandkomponenten in wachsenden Pollenschläuchen . . . . .	52
3.9	Untersuchung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Dynamik in Pollenschläuchen	55
3.10	Histochemische Analyse von Pollenschlauch-Zellwandbestandteilen .	62
3.11	Elektrophysiologische Charakterisierung . . . . .	66
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
4.1	RBOHH und RBOHJ regulieren die Wachstumsdynamik von Pollen- schläuchen . . . . .	72
4.2	Regulation der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität . . . . .	76
4.2.1	Aktivierung von RBOHH/J durch Rezeptor-ähnliche Kinasen	76
4.2.2	Regulation der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität durch Ca <sup>2+</sup> -und Phosphorylierung . . . . .	78
4.2.3	Subzelluläre Lokalisation von RBOHH und RBOHJ . . . . .	81
4.3	Ca <sup>2+</sup> -abhängige ROS-Produktion – ROS-abhängiger Ca <sup>2+</sup> -Influx? . .	84
4.4	Die Molekulare Funktion von ROS während des Pollenschlauchwach- stums . . . . .	86
4.5	<i>In vivo</i> Detektion von ROS . . . . .	88
4.6	Ausblick . . . . .	90
<b>5</b>	<b>Literatur</b>	<b>93</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>108</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>114</b>

# 1 Einleitung

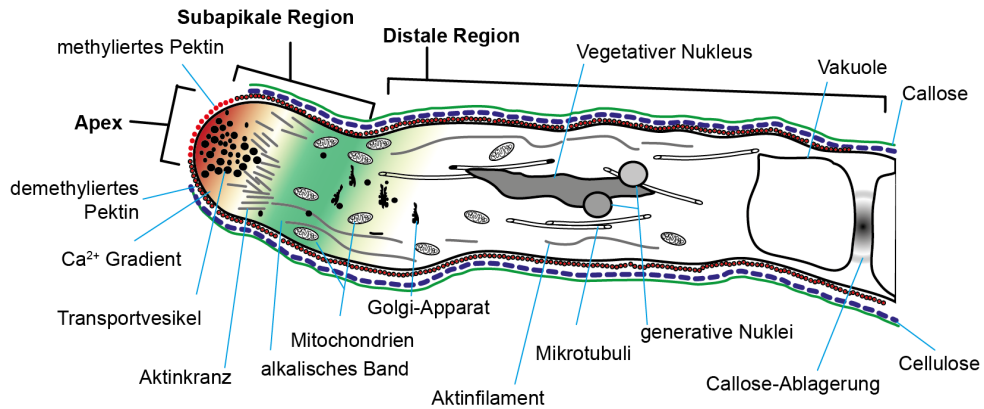
### 1.1 Eine kurze Einführung in die pflanzliche Reproduktion

Die sexuelle Reproduktion in Pflanzen ist gekennzeichnet durch den Wechsel zwischen diploider vegetativer Generation (Sporophyt) und der haploiden reproduktiven Generation (Gametophyt). In Blütenpflanzen ist die gametophytische Generation stark reduziert, d. h. nach der Meiose durchläuft der Gametophyt nur wenige Mitosen. Der weibliche Gametophyt (Embryosack) der Angiospermen entwickelt sich innerhalb des sporophytischen Gewebes (entspricht der Blüte) und besteht in der Regel aus sieben Zellen: Drei Antipoden, zwei Synergidzellen, eine Eizelle und die Zentralzelle. Der männliche Gametophyt (das Pollenkorn) ist meist dreizellig, wobei die eine vegetative Zelle (die Pollenzelle) zwei generative Zellen (Spermien) enthält. Die beiden generativen Zellen befruchten die Ei- und Zentralzelle des weiblichen Gametophyten, woraus sich anschließend Zygote bzw. Endosperm entwickeln.

### 1.2 Die Zellbiologie des männlichen Gametophyten

Pflanzliche Spermien besitzen keine Flagellen und sind nicht selbständig motil. Um zur weiblichen Eizelle zu gelangen bildet sich aus dem dreizelligen Pollenkorn ein Pollenschlauch, eine extrem polarisierte Zelle, die über das Tausendfache des ursprünglichen Pollenkorndurchmessers elongieren kann. Der Pollen keimt auf der Narbe des Fruchtblattes und der gebildete Pollenschlauch durchwächst den Stylus und das Ovarium um zu den dortigen weiblichen Gametophyten zu gelangen. Nach erfolgtem Kontakt mit den Synergidzellen des weiblichen Gametophyten werden die beiden sich in dem Pollenschlauch befindlichen Spermien freigegeben und es kommt zur doppelten Befruchtung. Aufgrund seiner fundamentalen Bedeutung für die pflanzliche Reproduktion und seiner bemerkenswerten zellulären Eigenschaften ist der Pollenschlauch mittlerweile ein wichtiges Modellsystem zur Untersuchung von Zell-Zell-Kommunikation und polarem Zellwachstum in Pflanzen.

Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung eines Pollenschlauchs, in der die polare Unterteilung der Zelle in Apex, subapikale und distale Region gezeigt wird. Die Elongation von Pollenschläuchen erfolgt durch Spitzenwachstum, weshalb es in der apikalen und subapikalen Region zu einer Akkumulation von Transportvesikeln kommt, die neues Zellwand- und Zellmembranmaterial durch Exozytose an der Spitze deponieren oder durch Endozytose überschüssiges Zellmembranmaterial internalisieren (Chebli et al., 2013). Diese invers kegelförmige Vesikelakkumulation ist umgeben von einem Aktinkranz, einem Ring von kortikalen Mikrofilamenten, der



**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung eines Pollenschlauchs. Gezeigt sind die Unterteilung des Pollenschlauchs in Apex, subapikale- und distale Region, sowie wichtige zelluläre Komponenten. Die rote Schraffierung an der Pollenschlauchspitze korrespondiert mit dem Ca<sup>2+</sup>-Gradienten während die grün schraffierte Region dem alkalischen Band entspricht.

unter anderem verhindert, dass größere Organellen (z.B. Vakuole, Mitochondrien) in die apikale Zone eindringen (Hepler et al., 2013). Die Pollenschlauchspitze ist außerdem gekennzeichnet durch den Calcium (Ca<sup>2+</sup>)-Gradienten, der durch apikalen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem Apoplast gebildet wird. An der Basis der subapikalen Region befinden sich zahlreiche Mitochondrien sowie die alkalische Bande, eine Region mit hoher H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität und dementsprechend relativ basischem pH (Feijó et al., 1999; Cárdenas et al., 2006). Entlang der distalen Region befinden sich lange Aktinkabel, Mikrotubuli sowie die Vakuole und der vegetative Nucleus (Abb. 1.1). Letzterer ist assoziiert mit den beiden Spermien (generative Nuclei). Während des polaren Wachstums verlängert sich der Pollenschlauch um ein vielfaches des ursprünglichen Pollenkorndurchmessers. Periodische Callose-Depositionen trennen alte Teile des Pollenschlauchs von der wachsenden Spitze ab, so dass sich das Zytoplasma nicht über die gesamte Pollenschlauchlänge erstreckt, sondern auf den vorderen Bereich des Pollenschlauchs beschränkt ist (Franklin-Tong, 1999).

Die Zellpolarität des Pollenschlauchs wird auch durch dessen Zellwandzusammensetzung reflektiert. Die Pollenschlauchspitze ist angereichert mit hochverestertem (bzw. methyliertem) Pektin (Chebli et al., 2012). Pektin-Methylesterasen (PMEs) demethylieren das apikale Pektin, dabei werden negativ-geladene Carboxygruppen frei, welche die Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Quervernetzung der Pektinketten ermöglichen (Jiang et al., 2005). Das demethylierte, quervernetzte Pektin befindet sich ebenso wie Callose und

Cellulose im subapikalen Bereich und erstreckt sich über die distale Region (Chebli et al., 2012)(Abb. 1.1). Durch diese Verteilung entsteht ein Festigkeitsgradient mit weichem, nachgebendem Zellwandmaterial (methyliertes Pektin) an der Spitze und festem Material (demethyliertes Pektin, Callose und Cellulose) in der subapikalen und distalen Region (Zerzour et al., 2009).

### 1.3 Molekulare und biophysikalische Aspekte des Pollenschlauchwachstums

Polares Zellwachstum erfordert ein hochpräzises Zusammenspiel zahlreicher molekularer und biophysikalischer Faktoren, dazu zählen  $\text{Ca}^{2+}$ - und, Zytoskelettdynamik, Zellwandeigenschaften und Vesikeltransport (Cheung und Wu, 2008). Die meisten während des Pollenschlauchwachstums messbaren Parameter, z. B. Wachstumsgeschwindigkeit, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient, die subapikale NAD(P)H-Konzentration oder Exozytoserate oszillieren oft mit gemeinsamer Periode aber phasenverschoben (Messerli et al., 2000; Cárdenas et al., 2006, 2008; McKenna et al., 2009). Beispielsweise ist die apikale  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation im Verhältnis zur Oszillation der Wachstumsgeschwindigkeit leicht verzögert (Messerli et al., 2000).

Der eigentliche Ursprung der Wachstumsoszillation wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Das hydrodynamische Modell besagt, dass in wachsenden Pollenschläuchen der Turgor nicht konstant ist, sondern oszilliert und damit die Wachstumsoszillation verursacht (Zonia und Munnik, 2011). Hingegen wird im Zellwandmodell postuliert, dass Veränderungen der mechanischen Eigenschaften der Zellwand für die Oszillation der Wachstumsrate verantwortlich sind (Winship et al., 2010). Ein möglicher Mechanismus dafür ist die periodische Exozytose von neuem Zellwandmaterial am Pollenschlauchapex. Dabei wird methyliertes Homogalakturonan (die Hauptkomponente von Pektin) in den extrazellulären Raum gegeben, welches von PMEs demethyliert wird. Die Demethylierung des Homogalakturonans exponiert  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen, die mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen von lasttragendem,  $\text{Ca}^{2+}$ -quervernetztem Pektin konkurrieren. Dadurch lösen sich zunächst  $\text{Ca}^{2+}$ -Quervernetzungen, wobei die apikale Zellwand aufgeweicht wird und diese dem konstanten Turgor nachgibt. Mit dem nun einsetzenden Wachstum werden auch die restlichen Homogalakturonan-Moleküle durch  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Quervernetzung in die Zellwand inkorporiert. Die Ausbildung des Pektinnetzwerks versteift die Zellwand und das Pollenschlauchwachstum wird verlangsamt (Hepler et al., 2013).

Polar wachsenden Zellen wie Wurzelhaaren, Pollenschläuchen, Pilzhypen oder Neu-

ronen ist die Ausbildung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten gemeinsam (Kater et al., 1988; Rathore et al., 1991; Schiefelbein et al., 1992; Kim et al., 2012). In Pollenschläuchen kann dieser apikale  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx u.a. die Aktivität von Zytoskelett-modifizierenden Enzymen oder Signaltransduktionskomponenten wie  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Proteinkinasen zeitlich und räumlich beeinflussen (Zhang et al., 2010; Gutermuth et al., 2013; Zhao et al., 2013). Wie  $\text{Ca}^{2+}$  dabei in die Zelle eindringt ist noch weitgehend ungeklärt. Zwar wurde gezeigt, dass Glutamat-ähnliche Rezeptoren (*glutamate-like receptors*, GLRs) als  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in Pollen funktionieren können, deren Verlust hat jedoch nur Auswirkung auf die zeitliche Komponente der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signatur und nicht auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten selbst (Michard et al., 2011). Neben GLRs werden auch zyklische Nukleotid-gesteuerte Kanäle (*cyclic nucleotide-gated channels*; CNGCs) als mögliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle für die Erzeugung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten gehandelt (Frietsch et al., 2007).

Aufgrund der Phasenverschiebung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation in Relation zur Wachstumsoszillation postulieren zudem einige Autoren die Existenz von Streckungs-aktivierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen (Dutta und Robinson, 2004; Hepler et al., 2012). Hierbei wäre der zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom während der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation eine Konsequenz von Wachstums-induzierter Deformierung der Plasmamembran. Dieses Szenario impliziert, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient selbst nicht essenziell für das polare Zellwachstum ist. In Wurzelhaaren konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass Behandlung mit  $\text{LaCl}_3$  (einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Antagonisten) zwar die Ausbildung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten verhindert, Wurzelhaarwachstum jedoch weiterhin stattfinden kann (Monshausen et al., 2008). Die Autoren jener Studie schlussfolgern daher, dass die übergeordnete Funktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation nicht die Initiation des Wachstums, sondern dessen Stabilisation ist (Monshausen et al., 2008).

#### 1.4 Biologie der reaktiven Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) wie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Hydroxyl-Radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) oder Superoxid-Anion-Radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) werden als toxische Nebenprodukte in aeroben Organismen durch Reduktion von molekularem Sauerstoff produziert. In Mitochondrien werden beispielsweise Superoxid-Anion-Radikale an Komplex I und Komplex III der Elektronentransportkette gebildet (Raha und Robinson, 2000). Unter physiologischen Bedingungen wird dieses  $\text{O}_2^{\cdot-}$  durch zytosolische oder mitochondriale Superoxid-Dismutasen (SODs) in  $\text{H}_2\text{O}_2$  überführt, da  $\text{O}_2^{\cdot-}$  Enzyme mit Eisen-Schwefel-Clustern (z. B. die Succinat-Dehydrogenase



und NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) inaktiviert und damit u. a. die Atmungskette stört (Raha und Robinson, 2000). Das membrangängige Wasserstoffperoxid kann in Anwesenheit von  $\text{Fe}^{2+}$  zum hochtoxischen Hydroxyl-Radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) reagieren (Fenton-Reaktion) (Raha und Robinson, 2000). Deshalb wird das durch Superoxid-Dismutation gebildete  $\text{H}_2\text{O}_2$  über den Glutathion-Ascorbat-Zyklus zu  $\text{H}_2\text{O}$  reduziert (Jimenez et al., 1997).

In Chloroplasten werden unter Lichtstressbedingungen ROS in Form von Superoxid-Anion-Radikalen am Photosystem I (PSI) bzw. in Form von Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) am Photosystem II (PSII) generiert (Asada, 1999; Triantaphylidès und Havaux, 2009). Wie in Mitochondrien müssen auch diese ROS detoxifiziert werden, was im Falle des  $\text{O}_2^{\cdot-}$  durch die anschließenden Reaktionen des Wasser-Wasser-Zyklus vermittelt wird (Asada, 1999).

Ein weiteres, eng mit der Produktion von ROS verknüpftes Zellorganell ist das Peroxisom. Mehrere metabolische Funktionen, die in Peroxisomen präsent sind, führen zur Produktion von ROS, so z. B. die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, der Abbau von Xanthin zu Harnsäure und die Glykolat-Oxidase-Reaktionen der Photorespiration (del Río et al., 2003). Zur Entgiftung der produzierten ROS verfügen Peroxisomen neben dem Glutathion-Ascorbat-Zyklus zusätzlich über Katalasen, welche die Umwandlung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  katalysieren (Nyathi und Baker, 2006).

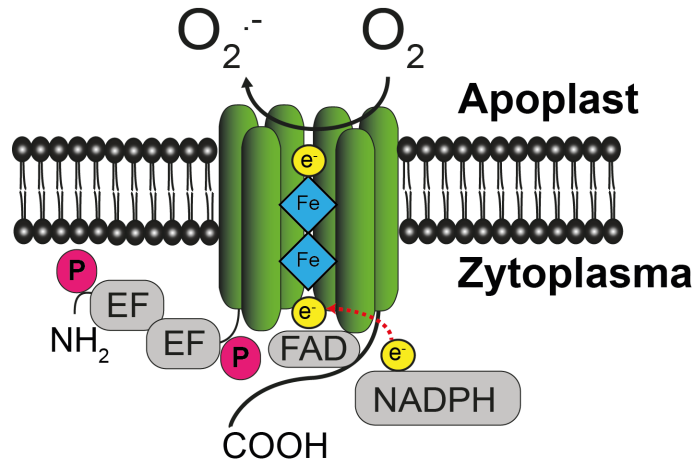
Die unkontrollierte ROS-Produktion kann fatale Folgen für Biomoleküle haben, u.a. durch Lipidperoxidation und Oxidation von Aminosäureresten in Proteinen (Rhoads et al., 2006). Inaktivierung von Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen Enzymen durch Superoxid-Anion-Radikal setzt reduziertes Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) frei, welches in Fenton-Reaktionen Hydroxyl-Radikale erzeugt (Benov, 2001). Hydroxyl-Radikale sind hochreaktiv und können unter Generierung weiterer Radikale mit Proteinen, DNA und Lipiden reagieren. Bei der Lipidperoxidation entstehen z. B. Lipid-Radikale (Farmer und Mueller, 2013). Dies ist der Ausgangspunkt eines katalytischen Zyklus, wobei Lipid-Radikale unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff Lipid-Peroxide erzeugen, die wiederum über einen Fenton-Mechanismus weitere Fettsäurereste oxidieren und erneut Lipid-Radikale erzeugen (Mano, 2012). Durch spontanen Abbau dieser Lipidoxidationsprodukte entstehen reaktive Carbonylspezies, die Proteine und DNA modifizieren können (Esterbauer et al., 1991).

## 1.5 Die Funktion der NAD(P)H-Oxidasen

Trotz deren potenzieller Schädlichkeit für gibt es zelluläre Mechanismen, die ROS gezielt erzeugen. Diese können als sekundäre Botenstoffe in der Signalweiterleitung fungieren, Zellwandeigenschaften als Antwort auf Pathogenangriff modifizieren oder direkt gegen angreifende Mikroorganismen eingesetzt werden (Lamb und Dixon, 1997; Babior, 1999; Miller et al., 2009). NAD(P)H-Oxidasen, deren primäres Produkt Superoxid-Anion-Radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) ist, gehören zu den wichtigsten Produzenten von ROS während physiologischer Prozesse.

Die prototypische Säugetier-NAD(P)H-Oxidase ist ein Multienzym-Komplex, zuerst identifiziert in Phagozyten, bestehend aus drei zytosolischen ( $p40^{PHOX}$ ,  $p47^{PHOX}$  und  $p67^{PHOX}$ ) und zwei membrangebundenen Untereinheiten ( $p22^{PHOX}$  und  $gp91^{PHOX}$ ). Die im Ruhezustand getrennten Enzymkomponenten werden nach einem entsprechenden Stimulus mit Hilfe des phosphorylierten  $p47^{PHOX}$  zu einem membranassoziierten Komplex zusammengefügt (El-Benna et al., 2009). Die integralen Membranproteine  $gp91^{PHOX}$  (auch als NOX2 bezeichnet) und  $p22^{PHOX}$  formen das Heterodimer Flavocytochrom b558 (cyt b558), wobei  $gp91^{PHOX}$  die für die enzymatische Aktivität wichtigen Co-Faktoren enthält während  $p22^{PHOX}$  mit den übrigen regulatorischen Untereinheiten ( $p40^{PHOX}$ ,  $p47^{PHOX}$  und  $p67^{PHOX}$ ) direkt oder indirekt interagiert (Leto et al., 1994; Sumimoto et al., 1994, 1996; Groemping und Rittinger, 2005). Die  $gp91^{PHOX}$  Untereinheit enthält sechs membranspannende alpha-Helices und eine C-terminale zytosolische Domäne mit FAD- und NAD(P)H-Bindestelle (Rotrosen et al., 1992). Über zwei Histidinpaare sind außerdem zwei Hämgruppen in  $gp91^{PHOX}$  koordiniert, wodurch der Elektronentransport vom NAD(P)H zum molekularen Sauerstoff über die Membran gewährleistet ist (Yu et al., 1998).

Die ersten genetisch identifizierten NAD(P)H-Oxidasen in Pflanzen wurde 1996 in *Oryza sativa* (Groom et al., 1996) und 1998 in *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Keller et al., 1998; Torres et al., 1998). Die gefundenen Enzyme, genannt RBOHs für *resperatory burst oxidase homologue*, wurden anhand ihrer Sequenzhomologie mit  $gp91^{PHOX}$  identifiziert und sind in *Arabidopsis* durch eine Genfamilie mit zehn Mitgliedern repräsentiert (Sagi und Fluhr, 2006). Anders als in Säugerzellen fehlen in Pflanzen die übrigen regulatorischen Untereinheiten ( $p22^{PHOX}$ ,  $p40^{PHOX}$ ,  $p47^{PHOX}$  und  $p67^{PHOX}$ ), jedoch verfügen pflanzliche NAD(P)H-Oxidasen über eine hydrophile N-terminale Region mit  $Ca^{2+}$ -bindenen EF-Händen (Keller et al., 1998) (Abb. 1.2). Auf diese N-terminale zytoplasmatische Domäne wirken mehrere posttranslationale



**Abb. 1.2:** Schematische Darstellung einer pflanzlichen NAD(P)H-Oxidase. Gezeigt sind die sechs membranspannenden Regionen (grün), die zwei komplexierten  $\text{Fe}^{2+}$  (blau) sowie die N-terminale regulatorische Domäne mit zwei EF-Händen (grau) und potenziellen Phosphorylierungsstellen (rot). Die C-terminale katalytische Domäne enthält den FAD-Cofaktor (grau) für die Übertragung der Elektronen (gelb) von NAD(P)H auf molekularen Sauerstoff.

Modifikationen, wodurch eine gezielte Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase ermöglicht, bzw. unkontrollierte ROS-Produktion verhindert wird. In HEK293 (*human embryonic kidney*)-Zellen konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase RBOHC durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an die EF-Hände stimuliert wird (Takeda et al., 2008). Weiterhin befinden sich am N-Terminus konservierte Serin (Ser)- und Threonin (Thr)-Reste, die z. B. nach Pathogenangriff  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig phosphoryliert werden können (Nühse et al., 2007; Dubiella et al., 2013; Kadota et al., 2014; Li et al., 2014). Für das Reisenzym *OsRBOHB* konnte außerdem gezeigt werden, dass dessen N-terminale regulatorische Domäne mit der kleinen GTPase *OsRAC1* interagiert und das Enzym dadurch aktiviert wird (Wong et al., 2007; Oda et al., 2010). Strukturdaten und FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)-Experimente deuten außerdem daraufhin, dass NAD(P)H-Oxidasen in ihrem aktiven Zustand als Dimer vorliegen (Oda et al., 2010; Hao et al., 2014). Neben Protein-Protein-Interaktionen spielen auch die subzelluläre Lokalisation und Endozytose eine wichtige Rolle in der Regulation der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität (Takeda et al., 2008; Hao et al., 2014). Die *Arabidopsis* NAD(P)H-Oxidase-Isoform RBOHD ist beispielsweise mit Lipidmikrodomänen (auch bekannt als *Membrane rafts*) assoziiert. Diese Lipidmikrodomänen sind Sterol-reiche Membranregionen, die

durch Assoziation mit unterschiedlichen Proteinen funktionelle Kompartimente innerhalb der Plasmamembran definieren (Zappel und Panstruga, 2008). Die Lokalisation von RBOHD innerhalb von Lipidmikrodomänen könnte die Bildung RBOHD-Dimeren erleichtern und damit indirekt deren Aktivität beeinflussen (Hao et al., 2014).

Die meisten pflanzlichen NAD(P)H-Oxidasen wurden im Kontext der biotischen und abiotischen Stressantwort charakterisiert. In *Arabidopsis* nehmen dabei die beiden Isoformen RBOHD und RBOHF eine Schlüsselstellung ein, da beide Enzyme sowohl an der Pathogenantwort als auch an der Schließung der Spaltöffnungen nach Zugabe von Abscisinsäure beteiligt sind (Torres et al., 2002; Kwak et al., 2003). Die eigentliche Funktion des Superoxid-Anion-Radikals bzw. des Wasserstoffperoxids, was in beiden Fällen produziert wird, ist dabei nicht immer eindeutig (Torres et al., 2005; Siddique et al., 2014). Wasserstoffperoxid wird jedoch als mögliches systemisches Signal sowohl in der biotischen als auch abiotischen Stressantwort gehandelt (Miller et al., 2009; Dubiella et al., 2013; Suzuki et al., 2013). Es wird postuliert, dass in der ROS-vermittelten systemischen Signalweiterleitung apoplastisches  $H_2O_2$  lokal am Ort der Stressperzeption (z.B. Verwundung oder Pathogenangriff) produziert wird und anschließend zu benachbarten Zellen diffundiert. Hier wird das  $H_2O_2$  über einen noch unbekanntem Mechanismus wahrgenommen, wodurch wiederum RBOH-vermittelte ROS-Produktion induziert wird. Das ROS-Signal kann sich durch diesen Mechanismus über die gesamte Pflanze ausbreiten (Dubiella et al., 2013; Suzuki et al., 2011).

Neben ihrer Funktion während verschiedener Stressantworten beteiligen sich einige NAD(P)H-Oxidase Isoformen auch an pflanzlichen Entwicklungsprozessen. Die erste identifizierte entwicklungspezifische RBOH-Isoform ist die in Wurzeln exprimierte RBOHC (Foreman et al., 2003). Die initiale phänotypische Charakterisierung zeigte, dass der funktionelle Verlust von RBOHC in der *root hair defective2 (rhd2)*-Mutante die Elongation von Wurzelhaaren verhindert (Foreman et al., 2003). Dies wurde primär auf den Verlust des  $Ca^{2+}$ -Gradienten in den Wurzelhaarspitzen zurückgeführt, wobei postuliert wurde, dass RBOHC-abhängige ROS-Produktion die Öffnung von Hyperpolarisations-abhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen stimuliert. Bemerkenswerterweise konnte das in dieser Studie nur für das Hydroxyl-Radikal gezeigt werden, während Applikation von  $H_2O_2$  alleine keine Auswirkung auf den  $Ca^{2+}$ -Einstrom hatte (Foreman et al., 2003). Unklar ist außerdem der kausale Zusammenhang zwischen dem Verlust des  $Ca^{2+}$ -Gradienten und des Wurzelhaarelongationsdefekts. Eine detaillier-

tere Charakterisierung des *rhd2*-Phänotyps zeigte, dass durch leichte Alkalisierung des umgebenen Mediums (von pH 5 nach pH 6) das Wurzelhaarwachstum in *rhd2* wiederhergestellt werden kann (Monshausen et al., 2007). Gleichzeitig bilden diese pH-,komplementierten“ *rhd2*-Mutanten einen Wildtyp-ähnlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten aus.

Einen ersten Hinweis auf die molekulare Funktion von ROS während der Wurzelhaarentwicklung lieferte die Beobachtung, dass ein Großteil der *rhd2* Wurzelhaare bei pH 5 platzten (Monshausen et al., 2007; Macpherson et al., 2008). Die Bedeutung von RHD2 (RBOHC) für die zelluläre Integrität von Wurzelhaaren impliziert eine mögliche Funktion von ROS in der chemischen Modifikation von Zellwänden. Dass diese Funktion nicht nur auf Wurzelhaare beschränkt ist, macht die NAD(P)H-Oxidase-Isoform RBOHF deutlich, die neben ihrer Rolle in der abiotischen und biotischen Stressantwort für die Ausbildung des Casparischen Streifens in Wurzeln benötigt wird (Lee et al., 2013). Der Casparische Streifen ist eine lignifizierte Zellschicht in der Wurzelendodermis, der als Diffusionsbarriere dient. Das von RBOHF synthetisierte Wasserstoffperoxid oxidiert in einer Peroxidase-katalysierten Reaktion Monolignol, was Ligninpolymerisation und die Ausbildung des Casparischen Streifens zur Folge hat (Lee et al., 2013).

Die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung der Wurzelhaar exprimierten NAD(P)H-Oxidase RBOHC deutete gleichzeitig auf eine ähnliche Funktion von ROS während der Pollenschlauchelongation hin, da beide Zellsysteme ähnliche Eigenschaften besitzen (Foreman et al., 2003; Cole und Fowler, 2006). In der Tat wurde gezeigt, dass pharmakologische Inhibition sowie RNAi-vermittelter Gen-Deaktivierung von Pollenschlauch-NAD(P)H-Oxidasen die Pollenschlauchelongation in Tabak (*Nicotiana tabacum*) hemmt (Potocký et al., 2007). Dieser Effekt scheint zunächst im Einklang mit dem von Foreman et al. (2003) publizierten *rhd2* (*rboh*c)-Phänotyp zu sein. Aufgrund fehlender genetischer Daten ist die eigentliche Funktion der NAD(P)-H-Oxidasen während des Pollenschlauchwachstums noch völlig unklar.

## 1.6 Zielsetzung

Reaktive Sauerstoffspezies produziert von NAD(P)H-Oxidasen sind essentielle Faktoren in diversen biologischen Prozessen, z. B. während der biotischen und abiotischen Stressantwort sowie zahlreichen Entwicklungsprozessen. Dabei ist der Mechanismus, durch den ROS diese Prozesse beeinflussen können, in den meisten Fällen unbekannt. Ziel dieser Arbeit war, anhand der funktionellen Charakterisierung der pollenspezifischen NAD(P)H-Oxidasen RBOHH und RBOHJ Erkenntnisse über die mögliche Funktion von ROS während des Pollenschlauchwachstums in *Arabidopsis thaliana* zu erlangen. Durch Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten der entsprechenden Gene sollte einerseits der Einfluss der pollenspezifischen NAD(P)H-Oxidasen auf die Fertilität untersucht und andererseits die Rolle von ROS während des Pollenschlauchwachstums näher beschrieben werden.

## 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

Der *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia-0 (Col-0) wurde in allen Experimenten als Wildtyp (WT)-Kontrolle verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Transfer-DNA (T-DNA)-Insertionsmutanten wurden vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) bezogen (Tab. 1). Die *rbohj-2* (SAIL\_31\_D07)-Linie war im *quartet* (*qrt*)-Hintergrund (Preuss et al., 1994; Sessions et al., 2002) und musste daher mit Col-0 rückgekreuzt werden um potenzielle Auswirkungen auf die Pollenkeimungsrate auszuschließen (Boavida und McCormick, 2007). Die Identität der jeweiligen Mutanten wurde über Genotypisierungs-PCRs (Polymerase Kettenreaktion) bestätigt. Die verwendeten Oligonukleotide für die T-DNA- und WT-Reaktionen sind in Tabelle 7 aufgelistet. Für die Bestimmung der exakten Position des linken Endes der T-DNA (*left border*) wurden PCR-Fragmente der T-DNA-Reaktionen aufgereinigt und sequenziert. Die Pflanzen wurden auf Erde oder 1/2 Murashige und Skoog (MS)-Medium (Tab. 3) unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht und 8 h Dunkelheit) bei 22 °C angezogen.

**Tabelle 1:** Verwendete *Arabidopsis thaliana*-Linien

Linie	Betroffenes Gen/Verwendung	Referenz
SALK_058170 ( <i>rboh-1</i> )	At5g60100	Alonso et al. (2003)
SALK_136917 ( <i>rboh-2</i> )	At5g60100	Alonso et al. (2003)
GK_787_E04 ( <i>rbohj-1</i> )	At3g45810	Rosso et al. (2003)
SAIL_31_D07 ( <i>rbohj-2</i> )	At3g45810	Sessions et al. (2002)
ProUBQ10::YC3.6	Expression des Ca <sup>2+</sup> -Sensors YC3.6	Krebs et al. (2012)
ProRBOHH675bp::GUS	Analyse der gewebespezifischen Expression von <i>RBOHH</i>	Diese Arbeit
ProRBOHH2kb::GUS	Analyse der gewebespezifischen Expression von <i>RBOHH</i>	Diese Arbeit
ProLat52::mCherry	Expression von mCherry in Pollen	Diese Arbeit
ProLat52::mCherry-RBOHH	Expression von mCherry-RBOHH in Pollen	Diese Arbeit
ProLat52::mCherry-RBOHJ	Expression von mCherry-RBOHJ in Pollen	Diese Arbeit
ProRBOHH675::YFP-RBOHH (CL)	Komplementation der <i>rboh-1 rbohj-2</i> -Mutante	Diese Arbeit



### 2.1.2 Bakterienanzucht und Bakterienstämme

*Escherichia coli* (Tab. 2) wurde bei 37 °C in LB-Medium (Tab. 3) angezogen. *Agrobacterium tumefaciens* (Tab. 2) wurde bei 28 °C in YEB-Medium (Tab. 3) kultiviert. Die verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 2:** Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Verwendung
<i>Escherichia coli</i> DH10b	F <sup>-</sup> , endA1, recA1, galE15, galK16, nupG, rpsL, ΔlacX74, ϕ80lacZΔM15, araD139, Δ(ara,leu)7697, mcrA, Δ(mrr-hsdRMSmcrBC)λ <sup>-</sup>	Klonierung
<i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> GV3101	pMP90RK, Rif <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Transformation von <i>Arabidopsis</i>

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der Medien

Medium	Zusammensetzung	Verwendung
LB-Medium	1,0 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt; 1,0 % (w/v) NaCl; pH 7	Anzucht von <i>E. coli</i>
YEB-Medium	0,5 % (w/v) Fleisch-Extrakt; 0,5 % (w/v) Pepton; 0,5 % (w/v) Saccharose; 0,1%(w/v) Hefe Extrakt; 2 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7,2	Anzucht von <i>A. tumefaciens</i>
1/2 MS-Medium	2,2 g/l MS-Salz (Duchefa); pH 5,7 mit KOH einstellen	Selektion von BASTA-resistenten <i>A.</i> <i>thaliana</i>

**Tabelle 4:** Verwendete Antibiotika

Name	Konzentration	Verwendung
Ampicilin	50 mg/ml	Selektion von <i>E. coli</i>
Carbenicilin	100 mg/ml	Selektion von <i>A. tumefaciens</i>
Gentamycin	15 mg/ml	Selektion von <i>A. tumefaciens</i>
Kanamycin	50mg/ml	Selektion von <i>A. tumefaciens</i>
Rifampicin	100 mg/ml	Selektion von <i>A. tumefaciens</i>

### 2.1.3 Materialien für Molekularbiologie

**Tabelle 5:** Verwendete Kit-Systeme

Name	Hersteller	Verwendung
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific	Plasmidaufreinigung
peqGOLD Gel Extraction Kit	PeqLab	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen
FastRNA PRO <sup>TM</sup> BLUE KIT	MP Biomedicals	RNA-Isolation aus Pollen
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Scientific	Klonierung von PCR-Fragmenten

**Tabelle 6:** Verwendete Enzyme

Name	Hersteller	Verwendung
Fast Digest <sup>®</sup> Restriktions Endonukleasen	Thermo Scientific	Klonierung
T4 Ligase	Thermo Scientific	Klonierung
GoTaq <sup>®</sup>	Promega	Standard-PCRs
Phusion <sup>®</sup> HF DNA Polymerase	Thermo Scientific	Klonierungs-PCR
MMLV-Reverse Transkriptase	Promega	cDNA-Synthese
DNase I	Thermo Scientific	DNA-Degradation für cDNA-Synthese
Cellulase R10	Onozuka	Zellwandverdau
Pektinase	Sigma-Aldrich	Zellwandverdau

### 2.1.4 Verwendete Antikörper

Der MAC207-Antikörper (Carbosource Services, Complex Carbohydrate Research Center, Athens, Georgia, USA) erkennt ein saures Trisaccharid (GlcA $\beta$  [1->3] GalA $\alpha$  [1->2] Rha), welches in Arabinogalaktan-Proteinen vorkommt (Yates et al., 1996). Die chemische Struktur des JIM11 (PlantProbes, Paul Knox Lab, University of Leeds, UK)-reaktiven Antigens ist unbekannt, jedoch bindet JIM11 an glykosyliertes Extensin (Ribeiro et al., 2006). Für die fluoreszenzmikroskopische Detektion der Antikörperbindung wurde ein Alexa 488-konjugierter sekundärer anti-Ratte IgG Antikörper (Life Technologies<sup>®</sup>) verwendet.

**Tabelle 7:** Verwendete Oligonukleotidprimer für Klonierung und Genotypisierung

Oligonukleotide	Sequenz (5' -> 3')	Verwendung
rbohH SALK_058170 For	GAGCCTACTCAAGCAGCCG	Genotypisierung von SALK_058170 und SALK_136917 und RT-PCR
rbohH SALK_058170 Rev	CTTCGTACATGCTTGTTAAGTAG TTATGC	Genotypisierung von SALK_058170 und SALK_136917 und RT-PCR
rbohJ SAIL31D07 For	GAATCTCTTGGGAGCCAAGC	Genotypisierung von SAIL_31_D07 und RT-PCR
rbohJ SAIL31D07 Rev	CTCCTAATGCTCTTATGTGAACGC	Genotypisierung von SAIL_31_D07 und RT-PCR
rbohJ GK787E04 For	AAGGCGATAGTTCTGTGAAACAACC	Genotypisierung von GK_787_E04
rbohJ GK787E04 Rev	TACCCAATGCTTCGTATACTTTTGC	Genotypisierung von GK_787_E04
GABI LB primer	ATATTGACCATCATACTCATTGC	<i>Left border</i> Primer GK-Linien
SalkLba1	TGGTTCACGTTAGTGGGCCATC	<i>Left border</i> Primer SALK-Linien
LB1 for Sail lines	TTTTTCAGAAATGGATAAAATAGCCT TGCTTC	<i>Left border</i> Primer SAIL-Linien
RBOHH EcoRI For	CCGAATTCATGAAAAGTAACACTC CTACGG	Klonierung der RBOHH-CDS
RBOHH FL SmaI Rev	AACCCGGGTAAAAATTTTCCTTG TGG	Klonierung der RBOHH-CDS
RBOHJ EcoRI For	CCGAATTCATGAAAAACAACAAA AGGTTGG	Klonierung der RBOHJ-CDS
RBOHJ SmaI Rev	ATCCCGGGTCAGAAATTTCTCTTTG TGAAAAG	Klonierung der RBOHJ-CDS
ProRBOHH675bp AscI for	TTGGCGCGCCGATTTTGATTTTTG	Klonierung der stromaufwärts intergenischen Region von RBOHH
ProRBOHH SacI rev	AAGAGCTCAGTATTATTATTATTC TTTCTCCGCC	Klonierung von <i>ProRBOHH</i> in pXNS2 YFP-RBOHH
Ubiquitin assoc. For	AAGATGAAATCGAGAGACAAGAAG GTC	RT-PCR-Primer für Ladekontrolle
Ubiquitin assoc. Rev	GCTACTTTTGCCCCACCATCATC	RT-PCR-Primer für Ladekontrolle

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Polymerase Kettenreaktion (PCR), Agarose-Gelelektrophorese, Restriktionsverdauung, DNA-Aufreinigung und Plasmid-Ligation wurden nach den Protokollen beschrieben in *Molecular Cloning: A laboratory manual* (Sambrook et al., 2001) und/oder mit Hilfe von entsprechenden Kits durchgeführt (Tab. 5 und Tab. 6).

### 2.2.2 Klonierungen

Promotor und Gensequenzen wurden über Phusion-PCR (Tab. 6) von genomischer DNA bzw. cDNA-Template amplifiziert, wobei an den 5'-und 3'-Termini Restriktionsschnittstellen eingeführt wurden (Tab. 7). Die PCR-Produkte wurden zunächst in pJet1.2/blunt (Thermo Scientific; Tab. 5) subkloniert und anschließend komplett sequenziert. Das Reporter-GUS-Konstrukt basiert auf einem pI-ProCPK28::GUS Vektor (Matschi et al., 2013), in welchem das *ProCPK28*-Fragment mit *ProRBOHH675* oder *ProRBOHH2kb* ausgetauscht wurde. Für die Expression in Pollenschläuchen wurden die *RBOHH* und *RBOHJ*-Sequenzen über die neuen, durch PCR eingeführten Restriktionsschnittstellen aus pJet1.2 ausgeschnitten und in den pXNS-Vektor gebracht (Cao et al., 2010). Der pXNS-Vektor wurde dafür wie folgt modifiziert: Die N-terminale Strep-Markierung wurde gegen eine mCherry-kodierende Sequenz ausgetauscht und der *Pro35S*-Promotor mit *ProLAT52* ersetzt (Twell et al., 1991). Für das Komplementationskonstrukt wurde statt des mCherry ein YFP und statt des *ProLat52*- ein *ProRBOHH675*-Fragment, jedoch das gleiche pXNS-Rückgrat verwendet. Die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Plasmide sind in Tabelle 8 aufgelistet.

**Tabelle 8:** In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Name	Verwendung
pJet1.2 RBOHH CDS	Klonierungsvektor; enthält komplette kodierende Sequenz (CDS) von RBOHH
pJet1.2 RBOHJ CDS	Klonierungsvektor; enthält komplette kodierende Sequenz (CDS) von RBOHJ
pJet1.2 ProRBOHH675	Klonierungsvektor; enthält ein 675 bp umfassendes RBOHH-Promotorfragment
pJet1.2 ProRBOHH2kb	Klonierungsvektor; enthält ein 2000 bp umfassendes RBOHH-Promotorfragment
pI ProRBOHH675::GUS	Vektor für Pflanzentransformation; enthält Promotor-Reportergen Fusion
pI ProRBOHH2kb::GUS	Vektor für Pflanzentransformation; enthält Promotor-Reportergen Fusion
pXNS ProLAT52::mCherry-RBOHH	Vektor für Pflanzentransformation; Expression von mCherry-RBOHH in Pollen
pXNS ProLAT52::mCherry-RBOHJ	Vektor für Pflanzentransformation; Expression von mCherry-RBOHJ in Pollen
pXNS ProLAT52::mCherry	Vektor für Pflanzentransformation; Expression von mCherry in Pollen
pXNS ProRBOHH675::YFP-RBOHH	Vektor für Pflanzentransformation; Komplementation von <i>rboh-1 rboh-2</i>

### 2.2.3 Pflanzentransformation

Die binären pXNS- und pI-Konstrukte wurden über *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation in *Arabidopsis* (Col-0) eingebracht. *A. tumefaciens* Übernachtskulturen (in 200 ml YEB-Medium mit Rifampicin, Kanamycin, Gentamycin und Carbenicillin bei 28 °C angezogen) wurden abzentrifugiert und in 200 ml 10 % (w/v) Saccharoselösung mit 0,01 % (v/v) Silwet L-077 resuspendiert. Blühende *Arabidopsis*-Pflanzen wurden anschließend 2 – 3 Mal für 30 s in die Bakteriensuspension gehalten und über Nacht in Plastikfolie eingepackt. Die resultierenden Samen wurden als T1-Generation designiert und auf Erde ausgesät. Keimlinge im 2-Blatt-Stadium wurden mit BASTA<sup>®</sup> (1:1000 Verdünnt in H<sub>2</sub>O) besprüht um Primärtransformanten zu selektieren. Die Anzahl der inserierten T-DNAs pro unabhängiger Linie wurde über Segregationsanalyse der BASTA<sup>®</sup> Resistenz bestimmt. Dafür wurden sterilisierte T2-Samen auf 1/2 MS-Festmedium (mit 1:1000 BASTA<sup>®</sup>) ausgelegt und das Verhältnis der überlebenden zu sterbenden Keimlingen bestimmt.

#### 2.2.4 RNA-Isolierung und RT-PCR

RNA wurde aus 4 – 6 Wochen-altem Pflanzenmaterial (Wurzel, Blätter, Blüten) mittels TRIsure-Reagenz (Bioline) und dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll isoliert. Für die Aufreinigung von RNA aus Pollen wurden zunächst ca. 100 Blüten in 2 ml Eppendorffgefäßen gesammelt und in 1 ml bidestillierten Wasser (ddH<sub>2</sub>O) für 1 min bei maximaler Intensität gevortext. Die Pollen konnten anschließend durch kurze Zentrifugation (10 s bei 5000\*g) am Gefäßboden gesammelt werden. Nach Entfernung der Blüten wurde das Pollenpellet in 1 ml FastRNA<sup>®</sup> Pro Blue-Lösung (MP Biomedicals) resuspendiert und in ein 2 ml-Schraubdeckelgefäß mit Lysis Matrix B (MP Biomedicals) überführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Homogenisierung in einer RETSCH<sup>®</sup>-Schwingmühle für 10 min bei 30 Hz. Die weitere RNA-Aufreinigung wurde nach dem FastRNA<sup>®</sup> Pro Blue-Protokoll durchgeführt. cDNA-Synthese wurde mit MMLV-reverser Transkriptase (Promega) und oligo-dT-Nukleotiden nach Herstellerangaben durchgeführt. Oligonukleotid Primer für die RT-PCR sind in Tabelle 7 aufgelistet.

#### 2.2.5 DNA-Isolierung für die Genotypisierung von Pflanzen

Blattmaterial (0,5 mm Ø) von *Arabidopsis*-Pflanzen wurde für die Genotypisierung in 1,5 ml-Eppendorffgefäßen gesammelt und in 200 µl Edwards-Puffer (Edwards et al., 1991) homogenisiert. Der Extrakt wurde anschließend zur Zelllyse mit 10 µl 10 % [w/v] SDS behandelt und für 5 min bei 10000\*g abzentrifugiert. Bei Genotypisierungen von mehr als 50 Pflanzen wurden alle folgenden Aufreinigungsschritte in einer 96-Well-PCR-Platte durchgeführt. Dabei wurden 75 µl des resultierenden Überstands in ein einzelnes Well überführt und nach Zugabe von 75 µl 2-Propanol für 5 min bei 3000\*g abzentrifugiert. Das DNA Pellet wurde in der 96-Well-PCR-Platte mit 150 µl 70 % [v/v] Ethanol gewaschen und anschließend vollständig getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris, pH 8; 1 mM EDTA) resuspendiert und für 10 min bei 65 °C in einem Thermocycler erhitzt. Für die anschließende Genotypisierungs-PCR wurden 2 µl DNA als Template eingesetzt.

#### 2.2.6 Histochemische Analyse der Genexpression

Die gewebespezifische Genexpression von *RBOHH* wurde durch eine Promotor-GUS-Fusion analysiert. Pflanzengewebe (Blüten, Blätter, Stengel) von transgenen *Arabidopsis*-Linien mit ProRBOHH675::GUS- oder ProRBOHH2kb::GUS-T-DNA-Inser-

tionen wurden in GUS-Färbelösung (50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2; 0,2 % [v/v] Triton X-100; 10 mM Kaliumferrocyanid; 10 mM Kaliumferricyanid; 1 mg/ml X-Gluc [5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronsäure]) getaucht, kurz vakuumfiltriert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Färbelösung wurde anschließend entfernt und mit 70 % (v/v) EtOH ersetzt. Das vollständig entfärbte Pflanzengewebe wurde mit einem Nikon SMZ Stereomikroskop untersucht.

### 2.2.7 Pollenkeimung

Das in dieser Arbeit verwendete Pollenkeimungsprotokoll basiert mit wenigen Veränderungen auf der Prozedur beschrieben von Boavida und McCormick (2007). Frisch geöffnete Blüten wurden gesammelt und für 30 min in einer mit einem feuchten Tuch abgedeckten 24er-Mikrotiter Platte inkubiert. Während der Inkubation wurde das *in vitro*-Pollenkeimungsmedium frisch präpariert. Das Medium bestand aus 0,01 % (w/v)  $H_3BO_3$ , 5 mM  $CaCl_2$ , 5 mM KCl, 1 mM  $MgSO_4$ , 10 % (w/v) Saccharose 1 % (w/v) Biozym<sup>®</sup> LE-Agarose, auf pH 7,5 eingestellt mit 1 M NaOH und wurde unter ständigem Rühren auf einem Heizrührer erhitzt bis die Agarose vollständig aufgelöst war. Flüssiges Medium wurde als dünne Schicht auf Mikroskop-Objektträger pipettiert (0,5 ml – 1 ml). Fertige Objektträger mit abgekühltem Medium wurden in quadratischen Petrischalen aufbewahrt. Um Austrocknung des Mediums zu verhindern wurden die Petrischalen mit feuchten Labortüchern ausgelegt. Die Blüten wurden nun vorsichtig über das Medium gestrichen, wodurch die Pollen an der Oberfläche haften blieben. Mittels eines Stereomikroskops wurde dabei sichergestellt, dass die Pollen auf der Oberfläche gleichmäßig verteilt waren. Für Lebendzellaufnahmen wurden die Petrischalen bei konstanten 22 °C für 3 h inkubiert. Um die Keimungsrate und Keimungsgeschwindigkeit zu erhöhen wurden in einigen Fällen die Petrischalen bei konstanten 28 °C inkubiert (Boavida und McCormick, 2007). Die Beschleunigung der Pollenkeimung war bei der NBT-Färbung und Quantifizierung der platzenden Pollenschläuche kritisch, da für diese Experimente eine maximale Anzahl an gekeimten Pollenschläuchen nach minimaler Inkubationszeit benötigt wurde. Damit wurde sichergestellt, dass ausreichend lebensfähige Pollenschläuche analysiert werden konnten. Die höhere Inkubationstemperatur hatte nur Auswirkungen auf die Keimungsgeschwindigkeit und nicht auf die auftretenden Pollenschlauchphänotypen.

### 2.2.8 Analyse der Pollenschlauchphänotypen

Der prozentuale Anteil an platzenden Pollenschläuchen wurde nach 4 h Pollenschlauchwachstum bei 28 °C mittels eines Nikon SMZ Stereomikroskops ermittelt. Dafür wurden über ImageJ (Schneider et al., 2012) die Anzahl der geplatzten Pollenschläuche (Zytoplasma kreisförmig um die Pollenschlauchspitze verteilt) und die Gesamtzahl der Pollenschläuche bestimmt. Die Pollenschlauchwachstumsdynamik wurde nach dreistündiger Keimungsphase bei 22 °C untersucht. Dafür wurden die gekeimten Pollen auf dem festen Keimungsmedium mit 50  $\mu$ l flüssigem Medium der gleichen Zusammensetzung überzogen und mit einem Deckglas bedeckt. Für die mikroskopische Analyse des Wachstums wurde ein Nikon Eclipse 90i Mikroskop und ein 100x/1,3 NA Plan Fluor Ölimmersionsobjektiv verwendet. Für die Analyse wurden Pollenschläuche von ungefähr 100 – 150  $\mu$ m Länge ausgewählt. Die Bewegungsdaten wurden über eine Hamamatsu Digitalkamera (C4742-95) gesteuert über Volocity<sup>®</sup> (PerkinElmer) aufgenommen. Die Bildrate betrug dabei zwischen 30 und 600 Bildern pro Minute. Die resultierenden Bildserien der wachsenden Pollenschläuche wurden in ImageJ in Kymographen umgewandelt oder über das *Manual Tracking Plugin* analysiert. Für das *Manual Tracking* mussten wegen der geringen Bildauflösung (384 x 256 Pixel) die Bildserien reduziert werden (aus 30 Bildern/min wurden 15 Bilder/min), da ansonsten keine adäquaten mittleren Wachstumsgeschwindigkeiten zwischen zwei Zeitpunkten bestimmt werden konnten. Die resultierenden Wachstumskurven wurden nochmals geglättet durch die Bildung eines gleitenden Mittelwertes von 5.

### 2.2.9 DPI-Behandlung

Für die Untersuchung der Wachstumsdynamik nach Diphenyleneiodonium (DPI)-Behandlung wurden Pollenschläuche nach dreistündiger Keimungsphase bei 22 °C mit einer 100  $\mu$ M DPI-Lösung, präpariert in Pollenkeimungsmedium, überdeckt. Als Kontrolle wurde statt DPI die entsprechende Menge Lösungsmittel (6 mM DPI-Stammlösung in DMSO) verwendet. Um die Langzeitwirkung der DPI-Behandlung zu untersuchen, wurden nach dreistündiger Keimungsphase die mit Pollenschläuchen bedeckten Agaroseblöcke mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und vorsichtig in eine 24-Well Platte transferiert. Dadurch konnten die auf Festmedium wachsenden Pollenschläuche mit 1 ml DPI-haltigen Medium (bzw. der DMSO-Kontrolle) vollständig bedeckt und für weitere 4 h inkubiert werden. Danach wurde die Flüssigkeit entfernt und die Agaroseblöcke konnten mit einem Stereomikroskop untersucht werden.



### 2.2.10 NBT-Färbung

Das in Pollen und Pollenschläuchen produzierte Superoxid-Anion-Radikal wurde mittels NBT (Nitroblau-Tetrazolium)-Färbung sichtbar gemacht. Pollen wurden für 4 h bei 28 °C auf Festmedium gekeimt und wie oben beschrieben in 24-Well-Platten transferiert. Die Agaroseblöcke mit den Pollenschläuchen wurden mit NBT-Färbelösung (5 mg/ml NBT, 7 % [v/v] DMF in flüssigem Keimungsmedium) überdeckt und 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die NBT-Färbelösung wurde anschließend entfernt und die Präparate wurden mit 70 % Methanol gewaschen. Bilder der NBT-gefärbten Pollenschläuche wurden für die Quantifizierung der NBT-Färbeintensität mit einem Nikon Eclipse 90i Mikroskop unter Verwendung eines 100x/1,3 NA Plan Fluor Ölimmersionsobjektivs und einer Hamamatsu Digitalkamera (C4742-95) gemacht. Die Schwarz-Weiß-Bilder wurden in ImageJ invertiert und nach Hintergrundsubtraktion wurde die Pixelintensität innerhalb der Pollenschlauchspitze gemessen. Farbaufnahmen von NBT-gefärbten Pollen und Pollenschläuchen wurden mit einem Zeiss Axioplan Mikroskop, gekoppelt an eine Canon EOS Digitalkamera, gemacht.

### 2.2.11 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Fluoreszenzbilder wurden mit einem Leica TCS SP5 konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) aufgenommen. Die benutzten Anregungslichtquellen waren eine 405 nm Diode, ein Argon-Laser (458 nm, 488 nm und 514 nm; Laserstärke bei 20 %) und ein Dioden-gepumpter Festkörperlaser (Ex. 568 nm). Die Exzitations/Emissionsparameter waren dabei wie folgt: ECFP (Ex. 458 nm/Em. 475 – 500 nm), EYFP und cpVenus (Ex. 514 nm/Em. 525 – 550 nm), mCherry (Ex. 561 nm/Em. 580 – 630 nm), FM4-64 (Ex. 514 nm/Em. 580 – 630 nm), Propidiumiodid (Ex. 561 nm/Em. 600 – 680 nm), Alexa 488 (Ex. 488 nm/520-550 nm) und Anilin Blau (Ex. 405 nm/Em. 500-530 nm). Die gleichzeitige Aufnahme von mCherry- und YFP-Fusionsproteinen wurde im sequenziellen Scanmodus durchgeführt. mCherry und YFP wurden dabei hintereinander mit den entsprechenden Wellenlängen angeregt, was die Trennung der beiden Emissionen erheblich verbesserte. Für die Beobachtung von Pollenschläuchen wurde ein HCX PL APO 63.0x/NA1.20 WATER UV Wasserimmersionsobjektiv verwendet. Bei größeren Präparaten (z. B. bei der Anilinblaufärbung) wurde ein HC Plan FLUOTAR 10x/NA 0,3 Luftimmersionsobjektiv benutzt.

---

---

Für die Brefeldin A (BFA)-Behandlung wurden auf Festmedium wachsende Pollenschläuche mit 30  $\mu\text{M}$  BFA (gelöst Flüssigmedium der gleichen Zusammensetzung) bedeckt (BFA-Stammlösung 5 mg/ml in EtOH). Bei Kontrollexperimenten wurde eine äquivalente Menge Lösungsmittel verwendet. Der Farbstoff FM4-64 (Synapto-Red; Sigma-Aldrich) wurde ebenfalls in Flüssigmedium gelöst (die FM4-64 Endkonzentration entsprach 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Nach Zugabe des Deckgläschens wurden die BFA-behandelten, FM4-64-gefärbten Pollenschläuche mittels CLSM mikroskopiert.

### 2.2.12 $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging mit Yellow Cameleon 3.6 und R-GECO

Yellow Cameleon 3.6 (YC3.6)-exprimierende WT- oder *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche wurden nach einer Keimungsphase von 3 h mit einem Leica TCS SP5 Mikroskop analysiert. Für maximale Signalausbeute wurde das *Pinhole* auf 600  $\mu\text{m}$  (maximale Größe) gestellt. Dadurch ist keine Konfokalität mehr gegeben, was jedoch bei der Bestimmung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik nicht erforderlich ist. Die Abtastrate (Scangeschwindigkeit) lag bei 700 Hz mit einem Line-Average (Mittelwert aus konsekutiv aufgenommenen Line-Scans) von zwei. Die Bildgröße betrug 256 x 256 Pixel bei einem 4x digitalen Zoom. Die Pollenschläuche wurden wie oben beschrieben (Abschnitt 2.2.8) mit 50  $\mu\text{l}$  Keimungsmedium und einem Deckglas bedeckt. YC3.6 wurde mit der 405 nm (bei 10 % bzw. 5 % Intensität) Diode angeregt bei gleichzeitiger Aufnahme der ECFP und cpVenus-Emissionswellenlängen. Die Aufnahmezeit betrug dabei entweder 30 Bilder- oder 300 Bilder pro Minute. Bildsequenzen der ECFP, cpVenus und Hellfeld-Kanäle wurden von der Leica Software als avi.-Format exportiert und über ImageJ analysiert. Zunächst wurden die Bildsequenzen gefiltert (Gaussfilter Größe 3) um das Bildrauschen zu reduzieren. Für Generierung der cpVenus/ECFP Ratiobilder wurde das RatioPlus Plugin verwendet (Palmer und Tsien, 2006). Für den Vergleich zwischen intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und Wachstumsgeschwindigkeit wurde zunächst die Veränderung der Wachstumsrate mittels *Motion Tracking* bestimmt. Danach wurde die jeweilige cpVenus/ECFP Ratio innerhalb einer definierten ROI (*Region of interest*) in der Pollenschlauchspitze gemessen. Die Messung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Dynamik mittels R-GECO wurde mit einem Nikon Eclipse 90i Mikroskop und einem 20x/ 0,5NA Plan Fluor Objektiv durchgeführt. Eine Kurzbogen-Quecksilberdampfampe diente dabei als Lichtquelle. Für die Aufnahme von R-GECO-Fluoreszenz wurde ein CY3.5 Filterset (Chroma<sup>®</sup>) mit einem 565/30 nm Exzitations- und 620/60 nm Emissionsfilter verwendet. Die Aufnahmezeit betrug 600 Bilder pro Minute.

### 2.2.13 Anilinblau-Färbung

Entfärbtes Anilinblau wurde in 108 mM  $K_3PO_4$  (pH 11) gelöst (Anilinblau-Konzentration 0,1 % [w/v]) und über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Danach wurde die Lösung durch Aktivkohle gefiltert und mit Glycerin versetzt (Endkonz. 2 % [v/v]). Emaskulierte Col-0-Blüten wurden mit Col-0 oder *rboh-1 rboh-2*-Pollen bestäubt und nach 16 h mit Eisessig/EtOH (im Verhältnis 1:3) für 2 h fixiert. Über eine EtOH-Serie (10 %, 50 %, 30 %, ddH<sub>2</sub>O) wurden die Blüten rehydriert und anschließend zum Aufweichen über Nacht in 8 M NaOH inkubiert. Die Blüten wurden danach zweifach mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mit entfärbtem Anilinblau gefärbt. Die Pollenschläuche innerhalb des Fruchtblatts konnten nun durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie sichtbar gemacht werden (siehe oben für verwendete Aufnahmeparameter).

### 2.2.14 Propidiumiodid-Färbung

Dynamische Zellwandexozytose wurde durch Propidiumiodid-Färbung und CLSM visualisiert. Nach dreistündiger Keimungsphase auf Festmedium wurden die Pollenschläuche mit 30  $\mu$ M Propidiumiodid (PI) (gelöst in flüssigem Keimungsmedium) bedeckt (50  $\mu$ l). Bei der Analyse der PI-gefärbten Pollenschläuche fiel auf, dass sich ab einer bestimmten Länge (ca. 150  $\mu$ m) PI innerhalb der Zellen anreicherte. Daher wurden nur Pollenschläuche mit einer Länge von bis ca. 100  $\mu$ m analysiert, wobei hier das PI-Signal fast ausschließlich extrazellulär (bzw. assoziiert mit der Zellwand) war. Die Scangeschwindigkeit betrug 700 Hz bei einem 8-fachen digitalen Zoom und einer Bildgröße von 256 x 256 Pixeln. Bilder wurden in 2 s- oder 5 s-Inkrementen aufgenommen. Die Auswertung der PI-Signalintensität in Relation zur Wachstumsgeschwindigkeit wurde wie oben beschrieben (Ca<sup>2+</sup>-Imaging, Abschnitt 2.2.12) durchgeführt.

### 2.2.15 *In situ* Detektion von Zellwandkomponenten

WT- oder *rboh-1 rboh-2*-Pollen wurden 4 h auf festem Keimungsmedium inkubiert. Anschließend wurde der mit Pollenschläuchen bedeckte Block Festmedium (1 cm x 1 cm) ausgeschnitten und in eine 24-Well Platte gelegt. Die Pollenschläuche wurden mit Formaldehyd für 1 h fixiert (4 % [v/v] Formaldehyd; 50 mM Pipes-Puffer, pH 6,9; 2 mM MgSO<sub>4</sub>) und anschließend dreimal mit PBS-Puffer (135 mM NaCl; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3) gewaschen. Für den Zellwandverdau wurden Pollenschläuche für 5 min mit Cellulase/Pektinase-Lösung behandelt

(2 % [w/v] Cellulase R-10 [Tab. 6]; 1 % [w/v]; 2 % [w/v] Pektinase [Tab. 6] in 15 mM MES, pH 5,5; 400 mM Mannitol; 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) und danach zweimal mit PBS-Puffer und einmal mit 0,05 % (v/v) Triton X-100 in PBS-Puffer gewaschen. Unspezifische Antikörperbindestellen wurden mit 3 % (w/v) Milchpulver in PBS-Puffer geblockt. Die Pollenschläuche wurden danach über Nacht mit den primären Antikörpern (1:10 verdünnt in PBS-Puffer mit 1 % [w/v] Milchpulver) bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Puffer und 0,05 % (v/v) Triton X-100 wurde der sekundäre Antikörper (1:60 in PBS-Puffer) hinzugegeben. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurden die Proben nochmals dreimal mit PBS-Puffer und 0,05 % (v/v) Triton X-100 gewaschen und anschließend mittels CLSM analysiert.

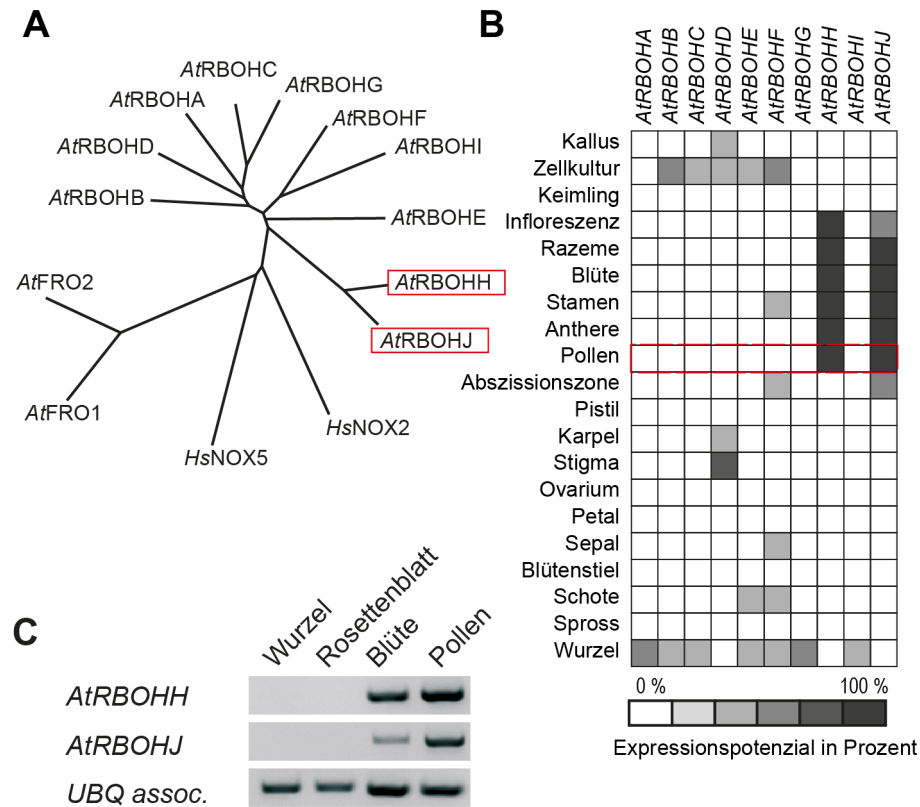
### 2.2.16 Elektrophysiologie

Kationen- und Anionenströme wurden mittels Zwei-Elektroden Spannungsklemme (*two-electrode voltageclamp*; TEVC) analysiert. Dafür wurden Mikropipetten aus zwei Borosilikat-Glaskapillaren hergestellt, wie in Becker et al. (2004) beschrieben. Die beiden Mikropipetten wurden mit einer 3 M KCl-Lösung befüllt und über Ag/AgCl-Drähte mit einem Mikroelektroden-Verstärker (TEC-05X, NPI Electronic GmbH) verbunden. Spannungsklemmen-Protokolle wurden mittels PULSE-Software (HEKA-Electronics) appliziert. Pollenschläuche wurden auf festem Keimungsmedium für 2 – 3 h inkubiert und anschließend mit Flüssigmedium derselben Zusammensetzung überdeckt. Für elektrophysiologische Experimente wurde ein modifiziertes Medium folgender Zusammensetzung verwendet: 1 mM MES, 1,6 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1 mM, 5, 10 oder 20 mM K-Gluconat, pH 6,5 mit Tris HCl. Für die Messung der Anionenströme wurde das K-Gluconat mit  $\text{CaNO}_3$  ersetzt. Osmolarität wurde auf 370 mosmol\*  $\text{kg}^{-1}$  (Vapor Pressure Osmometer 5520, Wescor, Vapro) with D(+)-Saccharose eingestellt. Nach dem Einstich der Mikropipetten in die Pollenschläuche wurde zunächst das Membranpotenzial bestimmt um anschließend die Membranspannung auf Werte zwischen -200mV bis +80 mV (in 20 mV-Inkrementen) zu klemmen und dabei die resultierenden Ströme zu messen. Für die iontophoretische Injektion von  $\text{Cs}^+$  wurde die Mikropipette mit 300 mM CsCl gefüllt und ein positiver Strom von 0,01 nA bis 0,05 nA appliziert. Für die pharmakologische Inhibition der NAD(P)H-Oxidasen mittels DPI und die für Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde ein Perfusionssystem verwendet.

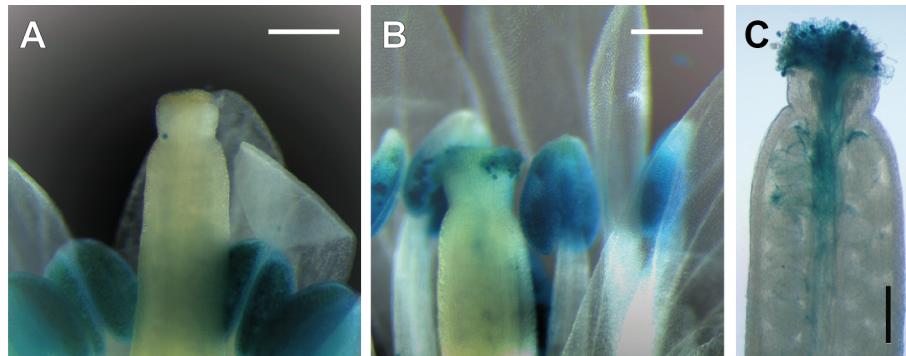
# 3 Ergebnisse

### 3.1 Identifikation pollenspezifischer NAD(P)H-Oxidasen

Das Genom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* enthält zehn für NAD(P)H-Oxidasen-kodierende Gene (*RBOHA-RBOHJ*) (Abb. 3.1A) (Sagi und Fluhr, 2006). Genexpressionsdaten basierend auf organspezifischen Microarrayanalysen zeigen, dass zwei RBOH-Isoformen, *RBOHH* und *RBOHJ*, spezifisch in Pollen exprimiert sind (Abb. 3.1B) (Potocký et al., 2007). Mittels reverser-Transkriptions-PCR (RT-PCR) wurde dieses Expressionsmuster bestätigt (Abb. 3.1C). Weiterhin wurden stromaufwärts liegende DNA-Sequenzen von *RBOHH* (675 bp bzw. 2000 bp umfassend, stromaufwärts vom Start-Codon) mit dem *GUS*-Reportergen (kodiert für die  $\beta$ -Glucuronidase aus *Escherichia coli*) fusioniert um die gewebespezifische Expression von *RBOHH* zu überprüfen. Diese Promotor-Reportergenfusionen wurden durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation stabil in *Arabidopsis*-Pflanzen (Col-0) integriert. Unterschiedliche Gewebe der resultierenden transgenen Linien wurden mit dem chromogenen Substrat X-Gluc behandelt, wodurch die pollenspezifische Aktivität des *RBOHH*-Promotors bestätigt wurde (Abb. 3.2). Die Promotorregion von *RBOHJ* ließ sich zwar nicht klonieren, dennoch ist aufgrund der RT-PCR Daten davon auszugehen, dass auch *RBOHJ* spezifisch in Pollen exprimiert wird (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1:** Phylogenie und gewebespezifische Expression der NAD(P)H-Oxidase-kodierenden Gene in *Arabidopsis thaliana*. A) Das *Arabidopsis*-Genom enthält zehn für NAD(P)H-Oxidase-kodierende Gene. Gezeigt sind die phylogenetischen Verhältnisse zwischen den *Arabidopsis* Enzymen (*AtRBOHA* – *AtRBOHJ*) und den Säugetier-NAD(P)H-Oxidase (*HsNOX2* und *HsNOX5*) sowie den verwandten Eisenchelate-Reduktasen (*AtFRO1* und *AtFRO2*). Die pollenspezifischen Enzyme *RBOHH* und *RBOHJ* sind in rot markiert. Der gezeigte Stammbaum basiert mit wenigen Veränderungen auf dem publizierten Stammbaum von Sagi und Fluhr (2006). B) *In silico*-Analyse der gewebespezifischen Expression der *RBOH*-Genfamilie mittels Genevestigator. Die Heatmap zeigt das Expressionspotenzial der einzelnen *RBOH*-Gene in verschiedenen Geweben. Das Expressionspotenzial ist ein Maß für die maximale Expression eines Genes und ist definiert als das Mittel der obersten 1 % Signalwerte eines Microarray-*Probesets* über alle in der Analyse verwendeten Experimente. Von mehr als 10000 hier ausgewerteten Microarray Datensätzen war demnach die höchste Expression von *RBOHH* und *RBOHJ* in Pollenexperimenten detektiert worden. C) Reverse Transkriptions-PCR-Analyse der Genexpression von *RBOHH* und *RBOHJ* in Wurzeln, Rosettenblättern, Blüten und Pollen. Das *UBQ associated*-Gen wurde als Ladekontrolle verwendet.

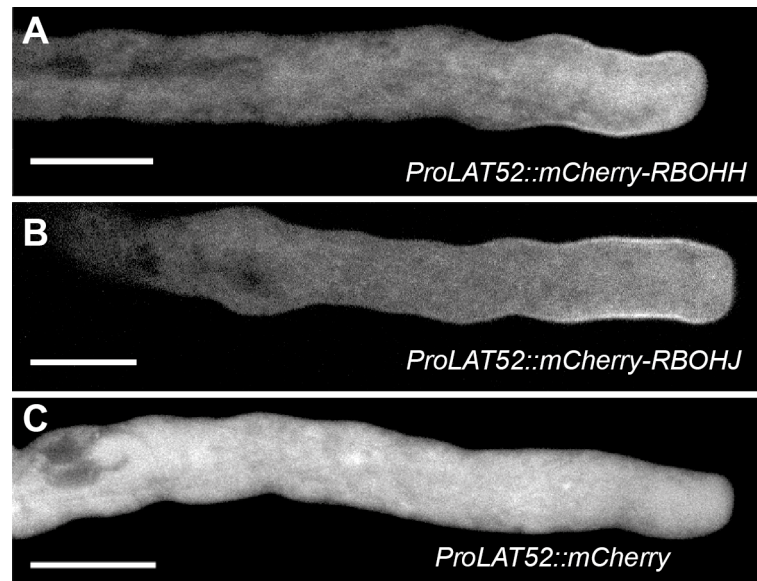


**Abb. 3.2:** Promotor-GUS-Analyse der *RBOHH*-Expression. GUS-Färbung transgener Linien mit *ProRBOHH2kb* (A und B) oder *ProRBOHH675bp* (C). Bei einer Stufe 10 – 11 Blüte (A) beschränkt sich die GUS-Färbung auf die Antheren, während bei Stufe 12 Blüten auch GUS-Färbung auf der Narbe sichtbar ist (B). Die GUS-Färbung auf der Narbe kommt von den adhärierenden Pollen bei der Selbstbestäubung. Größenbalken, 0,3 mm (A, B) und 0,1 mm (C).

### 3.2 Zellbiologische Charakterisierung von RBOHH und RBOHJ

Kritisch für die Funktion von NAD(P)H-Oxidasen ist deren subzelluläre Lokalisation (Hao et al., 2014), insbesondere im Hinblick auf die für Pollenschläuche typische Zellpolarität. Die subzelluläre Lokalisation von RBOHH und RBOHJ wurde anhand transgener *Arabidopsis*-Linien untersucht. Diese exprimierten RBOHH oder RBOHJ, die beide jeweils N-terminal mit dem Fluoreszenzproteinen mCherry (*monomeric Cherry*, ein *DsRed*-Derivat) oder YFP (*yellow fluorescent protein*) fusioniert waren. Mit Hilfe des pollenspezifischen *ProLAT52*-Promotors (Twell et al., 1991) oder eines Fragmentes des *RBOHH*-Promotors wurden die rekombinanten Proteine in Pollen und Pollenschläuchen exprimiert. Für die Lokalisationsexperimente wurde transgener Pollen auf Keimungsmedium aufgetragen und nach 3 h Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Das stärkste Fluoreszenzsignal in mCherry-RBOHH und mCherry-RBOHJ exprimierenden Pollenschläuchen konnte jeweils an der Zellperipherie innerhalb der subapikalen Region beobachtet werden (Abb. 3.3A, B). Dieses Signal korrespondiert mit hoher Wahrscheinlichkeit mit der Plasmamembran. Bei mCherry-RBOHH erstreckte sich diese Region über 10-15  $\mu\text{m}$  relativ zum Apex, während das mutmaßliche Plasmamembransignal von mCherry-RBOHJ auch weiter distal vom Apex detektiert wurde (bis zu 40  $\mu\text{m}$ ) (Abb. 3.3A, B). Das intrazelluläre mCherry-Signal, das in beiden Fällen (mCherry-RBOHH und mCherry-RBOHJ) beobachtet werden konnte, setzt

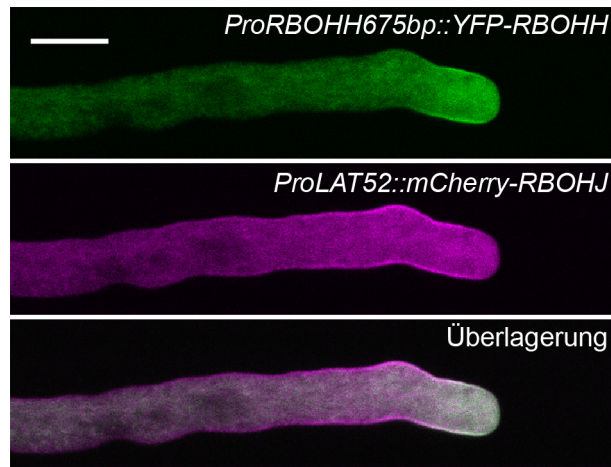




**Abb. 3.3:** Subzelluläre Lokalisation der NAD(P)H-Oxidase RBOHH und RBOHJ. A) Lokalisation von mCherry-RBOHH in wachsenden Pollenschläuchen. Pollen von *ProLAT52::mCherry-RBOHH*-Linien wurde 4 h auf *in vitro*-Keimungsmedium inkubiert und mittels CLSM analysiert. Die translationale Fusion von mCherry und RBOHH ist nicht nur im Zytoplasma sondern auch an der subapikalen Plasmamembran lokalisiert. B) Neben dem dominanten Plasmamembransignal in der subapikalen Region zeigt mCherry-RBOHJ ein schwaches Signal in distalen (relativ zur Pollenschlauchspitze) Plasmamembranregionen. C) Das Fluoreszenzprotein mCherry ist nur im Zytoplasma detektierbar. Größenbalken, 10  $\mu\text{m}$ .

sich vermutlich sowohl aus freiem mCherry als auch aus intrazellulär transportiertem mCherry-RBOHH bzw. mCherry-RBOHJ zusammen (Abb. 3.3A, B). Pollenschläuche, die als Kontrolle nur mCherry exprimierten, zeigten ausschließlich ein gleichmäßiges Fluoreszenzsignal innerhalb Zelle (Abb. 3.3C).

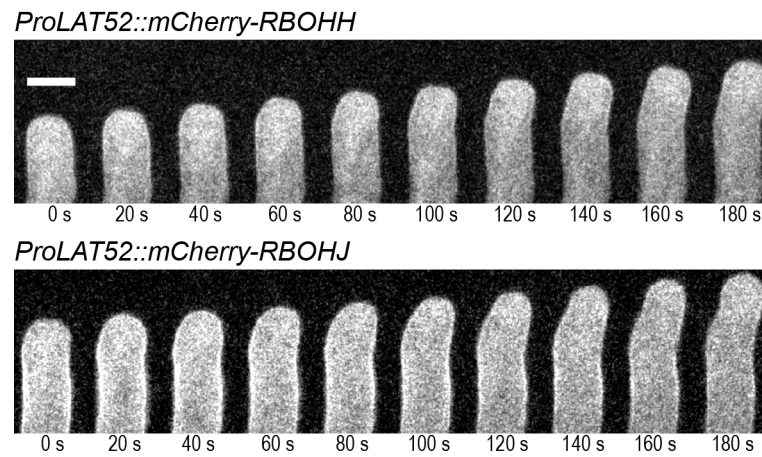
Um zu überprüfen, ob RBOHH und RBOHJ tatsächlich in distinkten Plasmamembranregionen vorkommen, wurden YFP-RBOHH und mCherry-RBOHJ gleichzeitig in einer Pflanze exprimiert. Die Co-Expression von YFP-RBOHH und mCherry-RBOHJ bestätigte die distinkten und überlappenden subzellulären Lokalisationen beider Proteine (Abb. 3.4). Zeitrafferaufnahmen von wachsenden Pollenschläuchen zeigen außerdem, dass die jeweiligen Plasmamembransignale von mCherry-RBOHH und mCherry-RBOHJ der sich bewegenden Pollenschlauchspitze dynamisch folgen (Abb. 3.5). Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass beide Enzyme während des



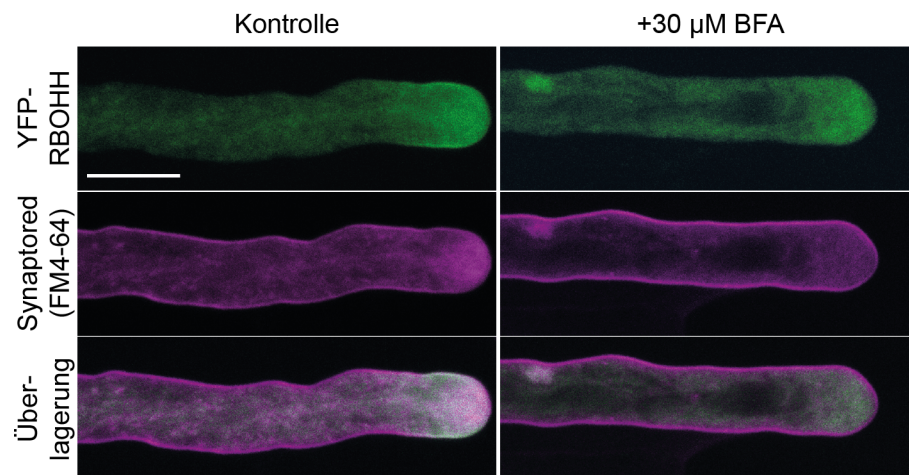
**Abb. 3.4:** Co-expression von RBOHH und RBOHJ in wachsenden Pollenschläuchen. CLSM-Aufnahme eines *in vitro* wachsenden Pollenschlauchs. Die Expression von YFP-RBOHH und mCherry-RBOHJ wurde durch ein RBOHH-Promotorfragment (*ProRBOHH675*) bzw. durch den pollenspezifischen *ProLAT52*-Promotor gesteuert. Die Überlagerung der YFP- und mCherry-Signale macht die RBOHH- und RBOHJ-spezifischen Plasmamembrandomänen sichtbar. Größenbalken, 10  $\mu\text{m}$ .

Wachstums kontinuierlich in die Plasmamembran integriert und über Endozytose rezykliert werden. Zudem haben vorangegangene Studien gezeigt, dass Exo- und Endozytose einen fundamentalen Einfluss auf die Lokalisation von NAD(P)H-Oxidasen in Wurzelhaaren haben (Takeda et al., 2008).

Mit dem Exozytose-Inhibitor Brefeldin A (BFA) wurde nun überprüft, ob die pollenspezifischen NAD(P)H-Oxidasen einer ständigen Rezyklierung unterliegen. BFA hemmt die Exozytose jedoch nicht die Endozytose, wodurch man testen kann, ob und in welchem zeitlichen Maße bestimmte Proteine von der Plasmamembran endozytiert und wieder rezykliert werden (Parton et al., 2001; Wang et al., 2005). Zunächst wurden YFP-RBOHH exprimierende Pollenschläuche mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64 angefärbt, wodurch die Plasmamembran selbst, sowie die Plasmamembran-spezifische Lokalisation von YFP-RBOHH gezeigt werden konnte (Abb. 3.6). Nach 20-minütiger Behandlung mit 30  $\mu\text{M}$  BFA wurde das Plasmamembran-assoziierte YFP-RBOHH Fluoreszenzsignal nicht mehr detektiert (Abb. 3.6). Das Plasmamembran-lokalisierte mCherry-RBOHJ war zu einem geringeren Maße BFA-sensitiv (Abb. 3.7A, B). Der Zeitraffer verdeutlicht, dass nach BFA-Zugabe, das Plasmamembransignal von YFP-RBOHH und mCherry-RBOHJ vom subapikalen Bereich zum Apex wandert, wobei sich letzteres langsamer bewegt und nach 20 min

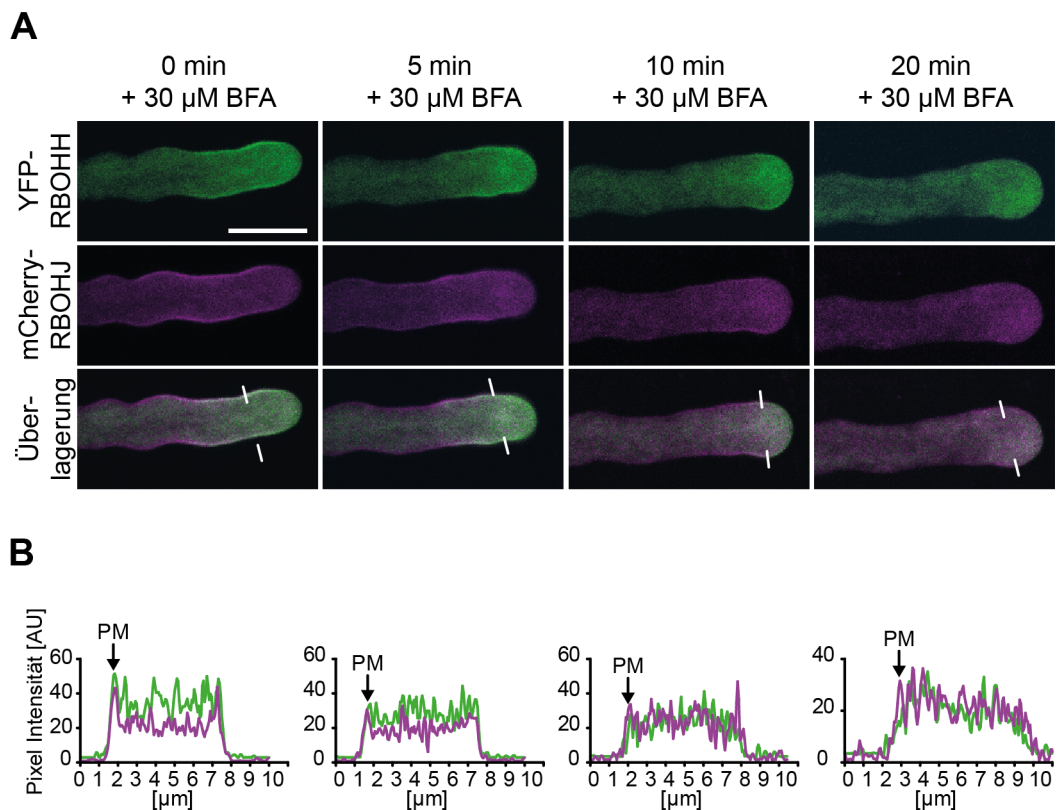


**Abb. 3.5:** Dynamische Lokalisation von mCherry-RBOHH und mCherry-RBOHJ während des Pollenschlauchwachstums. Montagen von Zeitrafferaufnahmen zeigen die Lokalisation von mCherry-RBOHH und mCherry-RBOHJ in 20 s-Inkrementen. Beide Proteine folgen der Pollenschlauchspitze während des Wachstums. Größenbalken, 5  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 3.6:** BFA-abhängige Internalisierung von RBOHH. Ein YFP-RBOHH exprimierender Pollenschlauch wurde mit dem lipophilen Membranfarbstoff Synaptored (FM4-64) gefärbt und mit dem Exozytose-Inhibitor BFA behandelt. Nach 20 min ist mit 30  $\mu\text{M}$  BFA das Plasmamembran-lokalisierte YFP-RBOHH-Signal vollständig internalisiert. Größenbalken, 20  $\mu\text{m}$

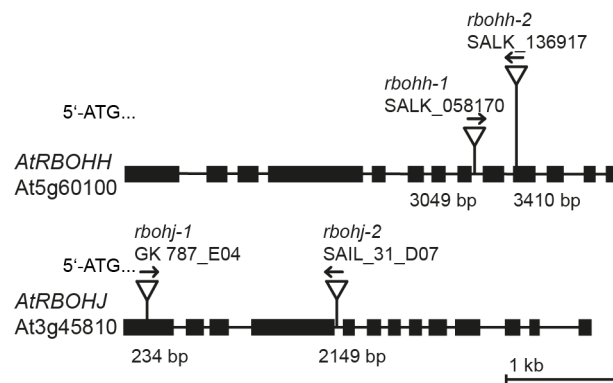
noch nicht vollständig internalisiert ist (Abb. 3.7A, B). Die rasche Internalisierung der RBOHs nach BFA-Zugabe macht deutlich, dass auch pollenspezifische NAD-(P)H-Oxidase einer ständigen Relokalisation unterworfen sind. Die BFA-abhängige Verschiebung des sonst subapikalen Fluoreszenzsignals in Richtung Apex zeigt, dass die RBOHs in die subapikale Plasmamembran exozytiert und am Apex endozytiert werden. Die unterschiedliche Lokalisation RBOHH und RBOHJ geht daher vermutlich auf Unterschiede in der Endozytose zurück.



**Abb. 3.7:** Veränderung der RBOHH- und RBOHJ-Lokalisation nach BFA-Behandlung. A) Ein YFP-RBOHH und mCherry-RBOHJ co-exprimierender Pollenschlauch wurde mit 30  $\mu$ M BFA behandelt. Gezeigt ist die subzelluläre Lokalisation von YFP-RBOHH und mCherry-RBOHJ in einem Pollenschlauch zum Zeitpunkt der Behandlung (0 min) sowie 5 min, 10 min und 20 min nach Zugabe von BFA. Beide Fluoreszenzsignale bewegen sich nach BFA-Zugabe in Richtung Pollenschlauchspitze. B) Fluoreszenzprofile verdeutlichen die Plasmamembranlokalisierung von YFP-RBOHH (grün) und mCherry-RBOHJ (magenta) in der durch die weiße Linie markierten Region (A). PM, Plasmamembran. Größenbalken, 10  $\mu$ m.

### 3.3 Genetische Charakterisierung von *rboh* Einzel- und Doppelmutanten

Um die Funktion der pollenspezifischen NAD(P)H-Oxidasen RBOHH und RBOHJ in *Arabidopsis* zu untersuchen, wurden T-DNA-Insertionslinien charakterisiert. Diese transgenen *Arabidopsis*-Linien enthielten T-DNA-Insertionen in den RBOHH- oder RBOHJ-kodierenden Sequenzen (Abb. 3.8). Die entsprechenden Mutanten wurden wie folgt bezeichnet: *rboh-1* (SALK\_058170; enthält eine Insertion in Intron 8), *rboh-2* (SALK\_136917; enthält eine Insertion in Exon 10), *rbohj-1* (GK787\_E04; enthält eine Insertion in Exon 1) und *rbohj-2* (SAIL\_31\_D07; enthält eine Insertion in Intron 4). Bis auf *rbohj-1* konnten für alle Mutanten homozygote Linien mittels Genotypisierungs-PCR identifiziert werden. Die Nachkommen von selbstbefruchteten, heterozygoten (-/+) *rbohj-1* hatten entweder ausschließlich Wildtyp-Allele (+/+) oder waren heterozygot (-/+) für die Insertion. Homozygote (-/-) Individuen konnten nicht gefunden werden. Demnach lag ein signifikanter Segregationsdefekt vor ( $n = 137$ ,  $p < 0,001$  in  $\chi^2$ -Test) (Tab. 9). In *rboh-2* (-/-) *rbohj-1* (-/+)-Doppelmutanten wurde zudem ein makroskopischer Phänotyp beobachtet (kleinere Pflanzen, leicht gerollte Blätter), der mit der *rbohj-1*-Insertion co-segregierte (Daten nicht gezeigt). Ob dieser dominante Effekt auf einer Fehlexpression einer funktionalen RBOHJ basiert oder durch Fehlexpression eines angrenzenden Genes verursacht wird, ist noch unklar. Unmittelbar stromauf- bzw. stromabwärts von *RBOHJ* (At3g45810)



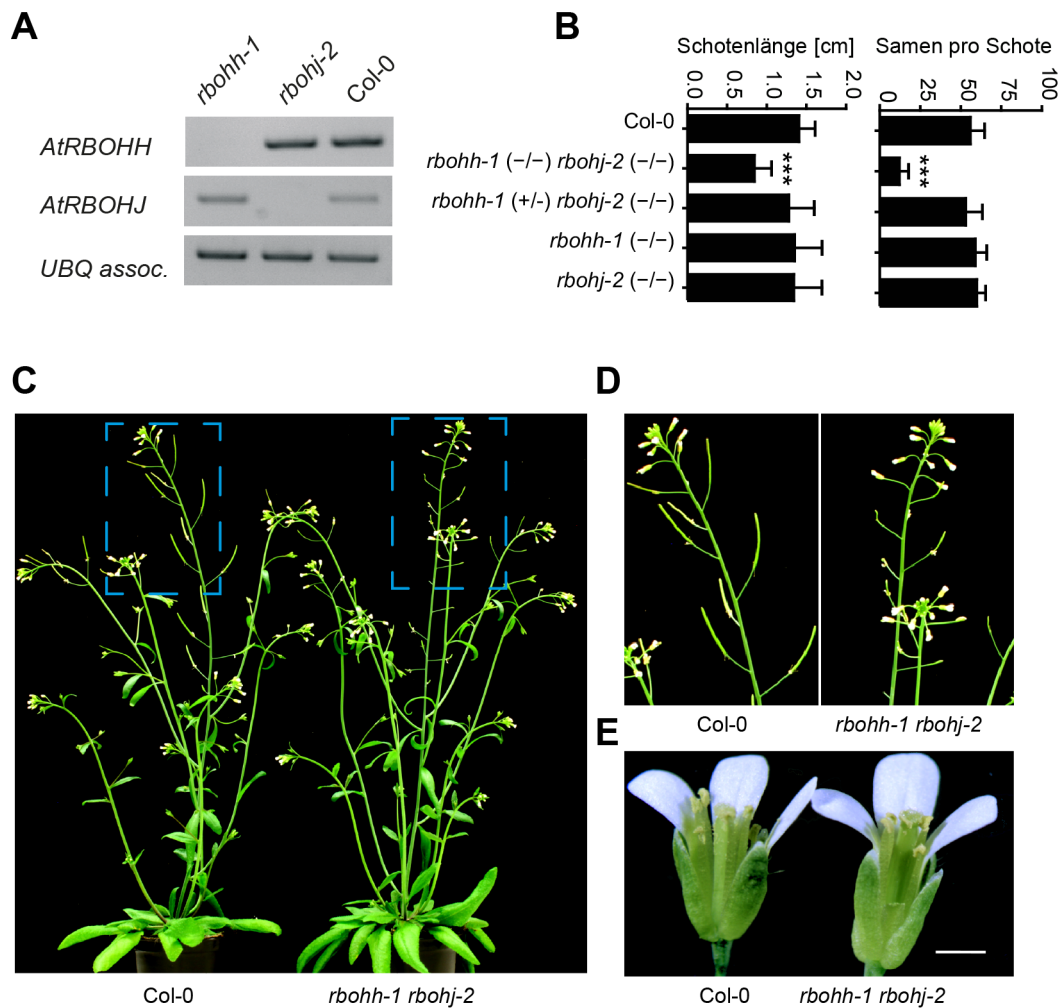
**Abb. 3.8:** Genstruktur von *AtRBOHH* und *AtRBOHJ*. Gezeigt ist die Intron/Exon zusammensetzung mit der Lokalisation der T-DNA-Insertionen relativ zum Translationsstart. Exons und T-DNA-Insertionen sind dargestellt als schwarze Kästen bzw. werden durch Dreiecke angezeigt. Die Pfeilrichtung über dem Dreieck verdeutlicht die durch DNA-Sequenzierung bestimmte Orientierung und Position der T-DNA-left border.

**Tabelle 9:** Aufspaltung der *rboh*h- und *rboh*j-Allele in selbstbefruchteten Einzel- und Doppelmutanten

Parentale Linie	Homozygot	Heterozygot	Wildtyp	Erwartete Aufspaltung	$\chi^2$ -Test
<i>rbohj-1(-/+)</i>	0	87	52	34: 68: 34	p < 0,001
<i>rboh</i> h-1(-/+) <i>rboh</i> j-2(-/-)	0	57	48	26: 53: 26	p < 0,001
<i>rboh</i> h-1(-/-) <i>rboh</i> j-2(-/+)	4	44	53	25: 51: 25	p < 0,001

befinden sich hauptsächlich Gene unbekannter Funktion, jedoch auch *PHOTOTROPIN1* (*PHOT1*; At3g45780), das für einen Blaulicht-Rezeptor kodiert, der u.a. in der Wachstumsregulation eine Rolle spielt (Takemiya et al., 2005). Weiterhin ist zu klären, ob das Fehlen einer homozygoten *rbohj-1* auf einem gametophytischen Defekt basiert.

Da für *rbohj-1* keine homozygoten Individuen isoliert werden konnten, wurde in dieser Arbeit hauptsächlich mit *rboh*h-1 und *rboh*j-2 gearbeitet. Weil es sich bei beiden Allelen um Insertionen in Intronregionen handelt, wurde mittels RT-PCR überprüft, ob die jeweiligen T-DNAs durch Spleißen entfernt werden. RT-PCR mit T-DNA-flankierenden Oligonukleotid-Primerpaaren ergaben kein entsprechendes Produkt (Abb. 3.9A). Das bedeutet, dass die T-DNA bei der Transkription erhalten bleibt. Damit wird mit hoher Wahrscheinlichkeit die Translation der für die Aktivität essentiellen C-terminalen katalytischen Domäne gestört. Es ist also anzunehmen, dass es sich bei *rboh*h-1 und *rboh*j-2 um *loss-of-function*-Allele handelt. Beide Einzelmutanten zeigten jedoch in Bezug auf Fertilisation und Produktivität (z. B. die Anzahl der Samen) keine auffälligen Defekte (Abb. 3.9B). Es wurden Doppelmutanten generiert, um zu überprüfen ob RBOHH und RBOHJ teilweise überlappende Funktionen während der Pollenentwicklung ausüben. Dadurch könnten auftretende Defekte in den Einzelmutanten von der jeweiligen intakten Isoform kompensiert werden. Die Nachkommen der selbstbefruchteten F2-Generation, *rboh*h-1(-/+) *rboh*j-2(-/-) bzw. *rboh*h-1(-/-) *rboh*j-2(-/+), zeigten einen signifikanten Segregationsdefekt, was einen ersten Hinweis auf einen möglichen gametophytischen Defekt darstellte (Tab. 9). Trotz des Segregationsdefektes konnten homozygote Doppelmutanten, *rboh*h-1(-/-) *rboh*j-2(-/-), isoliert werden. Diese Pflanzen zeigten im Vergleich zum WT signifikant verkürzte Schoten und enthielten weniger Samen pro Schote (Abb. 3.9B). Im Einklang mit der pollenspezifischen Expression beider Gene waren, mit Ausnahme der Schoten, sporophytische Gewebe nicht betroffen (Abb. 3.9C, D, E).

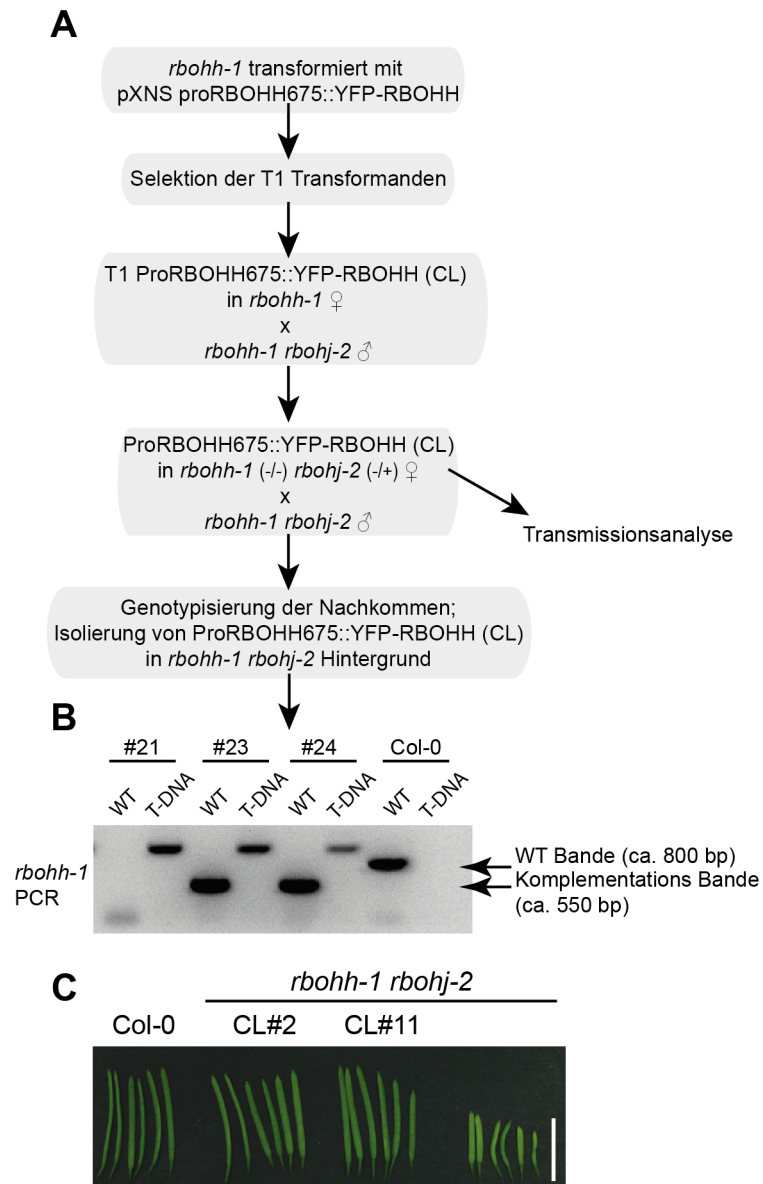


**Abb. 3.9:** Phänotypische Charakterisierung von *rboh-1 rboh-2*-Doppelmutanten. A) RT-PCR-Analyse mit cDNA aus Col-0, *rboh-1*- und *rboh-2*-Pollen. Eine PCR mit T-DNA-flankierenden Primern ergab kein Produkt in den jeweiligen Einzelmutanten. Das *UBQ*-Gen wurde als Ladekontrolle verwendet. B) Fertilitätsparameter in Col-0- und *rboh*-Einzel- und Doppelmutanten. Schotenlänge und Anzahl der Samen pro Schote sind signifikant reduziert in doppelt-homozygoten *rboh-1 rboh-2*-Mutanten. \*\*\* entspricht  $p < 0,001$  in t-Test. C) Gesamthabitus von *rboh-1 rboh-2*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. D) Vergrößerung der Bildausschnitte in (C). E) Blütenhabitus ist nicht verändert in *rboh-1 rboh-2*-Mutanten. Größenbalken, 1 mm.

Um zu bestätigen, dass das Fehlen der pollenspezifischen NAD(P)H-Oxidase diesen Phänotyp verursacht, wurde ein Komplementationsexperiment durchgeführt. Dafür wurde ein rekombinantes DNA-Konstrukt generiert, welches für ein N-terminal YFP-markiertes RBOHH codiert, dessen Expression durch ein *RBOHH*-Promotorfragment (*ProRBOHH675bp*) kontrolliert wird. Über *A. tumefaciens* vermittelte Transformation wurde dieses Konstrukt stabil in das *Arabidopsis*-Genom integriert, wobei zwei unabhängige transgene Linien mit Einzelinsertionen isoliert werden konnten (CL#2 und CL#11). Es war notwendig das Komplementationskonstrukt zunächst in den *rboh-1(-/-)*-Hintergrund zu bringen, da die homozygote Doppelmutante zu wenig Samen produziert und die Transformationseffizienz durch *A. tumefaciens* gering ist. Nach mehrmaligem Kreuzen der *rboh-1(-/-)* CL-Linien mit der *rboh-1(-/-) rboh-2(-/-)*-Linie konnten durch Genotypisierung *rboh-1(-/-) rboh-2(-/-)* CL(-/+)-Individuen isoliert werden (Abb. 3.10A, B). Diese Pflanzen hatten WT-ähnliche Schoten, demnach konnte der Schotenphänotyp durch die Expression von YFP-RBOHH im *rboh-1(-/-) rboh-2(-/-)*-Hintergrund komplementiert werden (Abb. 3.10C).

Es wurden zudem Transmissionsanalysen durchgeführt, um zu überprüfen, ob der Phänotyp der homozygoten Doppelmutante sowie der beobachtete Segregationsdefekt der *rboh-1(-/+) rboh-2(-/-)*- bzw. *rboh-1(-/-) rboh-2(-/+)*-Nachkommen durch eine Fehlfunktion des männlichen Gametophyten verursacht wurde. Dafür wurden *rboh-1(-/+) rboh-2(-/-)*- oder *rboh-1(-/-) rboh-2(-/+)*-Individuen mit WT-Individuen reziprok gekreuzt und die Verteilung der jeweiligen T-DNA-Insertionen in der resultierenden F1-Population analysiert. Im Falle der männlichen Transmission war die gleichzeitige Weitergabe der *rboh-1*- und *rboh-2*-Allele signifikant reduziert (Tab. 10). Die weibliche Transmission der *rboh-1*- und *rboh-2*-Allele war nicht beeinträchtigt (Tab. 10). Jedoch zeigten *rboh-1(-/-) rboh-2(-/+)* CL(-/+)-Individuen, d.h. Doppelmutanten mit dem Komplementationskonstrukt, eine erhöhte männliche Transmissionseffizienz (Tab. 10). Außerdem entwickelten sich aus *rboh-1 rboh-2* Blüten, die mit WT-Pollen bestäubt wurden, WT-artige Schoten (Abb. 3.11). Diese Daten bestätigen, dass der *rboh-1 rboh-2*-Phänotyp durch einen Defekt im männlichen Gametophyten verursacht wird. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der pollenspezifischen Expression von *RBOHH* und *RBOHJ*. Zudem zeigt die erfolgreiche Komplementation des *rboh-1 rboh-2*-Phänotyps durch YFP-RBOHH, dass die zuvor beobachtete subzelluläre Lokalisation der NAD(P)H-Oxidase (Abb. 3.4 oben) den *in vivo*-Zustand darstellt und nicht durch die N-terminale Markierung beeinträchtigt wird.





**Abb. 3.10:** Komplementation des *rboh-1 rboh-2*-Phänotyps. A) Schematische Darstellung des Komplementationsexperiments. B) Typisches Genotypisierungsexperiment mit WT- und T-DNA-PCR Reaktion nebeneinander aufgetragen. Gezeigt sind Genotypisierungsergebnisse von 3 Kreuzungsnachkommen (#21-#23) und Col-0 als Kontrolle. Die WT-Reaktion wurde mit T-DNA-flankierenden Primern durchgeführt dadurch ergab sich im WT eine Bande nicht jedoch in Individuum #21, welches homozygot für *rboh-1* ist, das Komplementationskonstrukt aber nicht trägt. Individuen #22 und #23 zeigen in der WT-Reaktion eine Bande, die jedoch kleiner als beim WT ist. Da für die Klonierung von YFP-RBOHH Pollen cDNA verwendet wurde, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass #22 und #23 das Komplementationskonstrukt tragen. C) Zwei unabhängige Komplementationslinien zeigen WT-artige Schotenlängen. Größenbalken, 1 cm.

**Tabelle 10:** Transmissionseffizienz der kombinierten *rboh*h- und *rboh*j-Allele

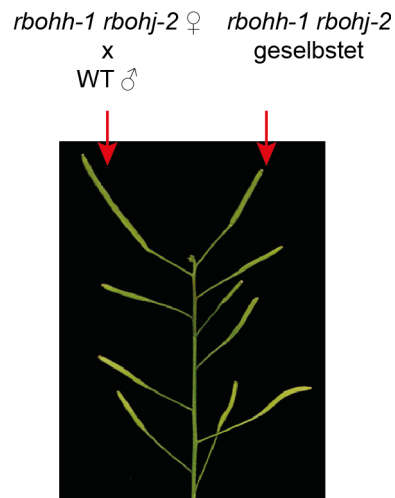
Männlich	x Weiblich	<i>rboh</i> h-1(-/+) <i>rboh</i> j-2(-/+)	<i>rboh</i> h-1(+/+) <i>rboh</i> j-2(-/+)	<i>rboh</i> h-1(-/+) <i>rboh</i> j-2(+/+)	Transmissions- Effizienz ( % ) <sup>a</sup>
<i>rboh</i> h-1(-/+) <i>rboh</i> j-2(-/-)	Col-0	47	41	-	114,6 <sup>b</sup>
<i>rboh</i> h-1(-/-) <i>rboh</i> j-2(-/+)	Col-0	46	-	39	117,9 <sup>b</sup>
Col-0	<i>rboh</i> h-1(-/+) <i>rboh</i> j-2(-/-)	16	78	-	22,2 <sup>c</sup>
Col-0	<i>rboh</i> h-1(-/-) <i>rboh</i> j-2(-/+)	16	-	72	20,5 <sup>c</sup>
Col-0	<i>rboh</i> h-1(-/-) <i>rboh</i> j-2(-/+) CL#2	35	-	51	68,6 <sup>d</sup>
Col-0	<i>rboh</i> h-1(-/-) <i>rboh</i> j-2(-/+) CL#21	40	-	19	50,6 <sup>d</sup>

a, Transmissionseffizienz entspricht der Anzahl der (+/-)(+/-) Individuen /Anzahl der (+/-)(+/+) Individuen \*100 = TE

b, Abweichung von der erwarteten 1:1 Aufspaltung ist nicht signifikant ( $\chi^2$ -Test)

c, hochsignifikante Abweichung von der erwarteten 1:1 Aufspaltung ( $\chi^2$ -Test)

d, signifikanter Unterschied zur nicht-komplementierten Linie (Fischer's Exact-Test)

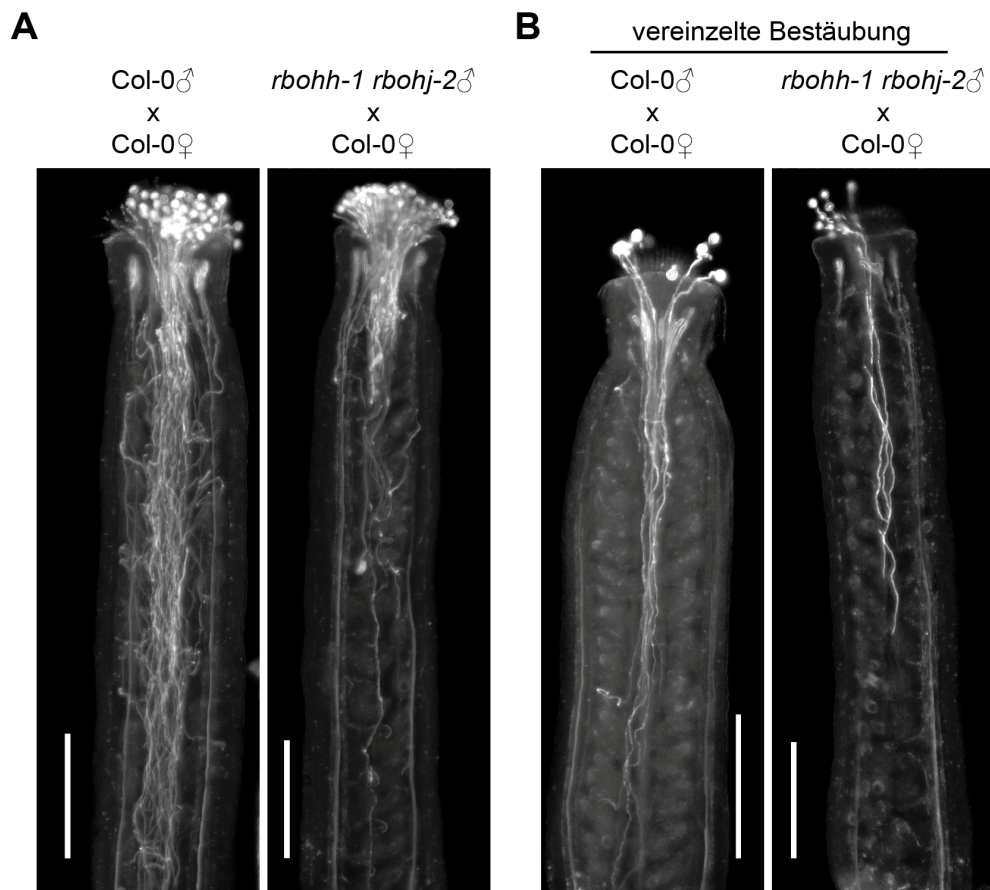


**Abb. 3.11:** Der Schotenphänotyp von *rboh-1 rboh-2* wird durch den Pollen übertragen. Gezeigt ist eine *rboh-1 rboh-2* Infloreszenz mit den typischen kurzen Schoten. Bestäubung mit Wildtyp-Pollen (linker Pfeil) resultiert in Wildtyp-artiger Schotenlänge.

### 3.4 Charakterisierung des *in vivo* Pollenschlauchwachstums von *rboh-1 rboh-2*

Die genetischen Untersuchungen an der *rboh-1 rboh-2*-Doppelmutante deuteten auf einen Defekt im männlichen Gametophyten hin, jedoch blieb unklar, ob es sich dabei um z. B. verringerte Pollenkeimung oder defektes Pollenschlauchwachstum handelte. Direkte Lebendzellaufnahmen von Pollenschläuchen während der Befruchtung sind zwar prinzipiell möglich, erfordern jedoch einen beträchtlichen technischen Aufwand (Cheung et al., 2010). Um Pollenschlauchwachstum innerhalb der Blüte zu visualisieren wurde daher Anilinblau verwendet. Anilinblau bindet spezifisch an Callose, ein Polysaccharid aus  $\beta$ -1  $\rightarrow$  3-verknüpften Glucose-Monomeren, welches in Pollenschlauchzellwänden angereichert ist. Wildtyp-Blüten wurden mit WT- oder *rboh-1 rboh-2*-Pollen handbestäubt und nach 16 h Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum der Anilinblau-Färbung unterzogen. Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurden die Pollenschläuche innerhalb des Ovariums sichtbar gemacht (Abb. 3.12A). Im Vergleich zum Wildtyp wurden bedeutend weniger *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche innerhalb des Ovariums beobachtet, obwohl eine große Anzahl die Narbe und den Griffel penetrieren konnten. Demnach scheint die Pollenkeimung in *rboh-1 rboh-2*-Mutanten nicht fundamental betroffen zu sein. Für eine genauere Aufklärung des *in vivo* Verhaltens von WT- und *rboh-1 rboh-2*-Pollens-

schläuchen wurde eine begrenzte Handbestäubung durchgeführt. Hierbei wurden nur vereinzelte Pollenkörner auf die Narbe aufgetragen, wodurch einzelne Pollenschläuche in der Anilinblaufärbung besser sichtbar wurden. Anders als WT-Pollenschläuche erreichten *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche nicht den unteren Bereich des Ovariums (Abb. 3.12B), was auch durch die Verteilung der sich entwickelnden Samenanlagen in selbstbefruchteten *rboh-1 rboh-2*-Blüten reflektiert wird (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.12:** *In vivo* Pollenschlauchwachstum. Emaskulierte WT-Blüten wurden mit WT- oder *rboh-1 rboh-2*-Pollen bestäubt. Nach 16 h wurden die bestäubten Blüten fixiert und mit Anilinblau gefärbt. Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurden die Pollenschläuche innerhalb des Fruchtblattes sichtbar gemacht. A) Gezeigt sind Z-Projektionen von 4 optischen Schnitten von Anilinblau-gefärbten Fruchtblättern. B) Vereinzelte Bestäubung zeigt, dass weniger *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche die unteren Regionen des Ovariums erreichen. Größenbalken, 250  $\mu\text{m}$ .

---

---

### 3.5 Bestimmung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies

Die Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies in lebenden Zellen ist technisch anspruchsvoll und jede der zu diesem Zeitpunkt bekannten Methoden hat Vor- und Nachteile. Das primäre Produkt der NAD(P)H-Oxidase ist das extrazelluläre Superoxid-Anion-Radikal, welches enzymatisch oder nicht-enzymatisch in Wasserstoffperoxid überführt werden kann. Anders als Wasserstoffperoxid ist Superoxid nicht membranpermeabel, deshalb erfordert eine direkte Messung der *in vivo*-NAD(P)-H-Oxidase-Aktivität, die Detektion von extrazellulärem ROS. Gelöst wurde dieses Problem von Monshausen et al. (2007), die mit Hilfe eines BSA-konjugierten Fluoreszeinderivates (OxyBurst Green<sup>®</sup>) oszillatorische ROS-Produktion in wachsenden Wurzelhaaren messen konnten. Durch die Kopplung an BSA ist OxyBurst Green<sup>®</sup> nicht membranpermeabel und laut vorangegangener Studien und Herstellerangaben, detektiert es spezifisch Superoxid-Anion-Radikale (Monshausen et al., 2007). Um extrazelluläre ROS-Produktion in lebenden Pollenschläuchen zu visualisieren wurde daher zunächst OxyBurst Green<sup>®</sup> verwendet. Wachsende WT-Pollenschläuche wurden mit OxyBurst Green<sup>®</sup> (gelöst in Pollenkeimungsmedium) behandelt und anschließend mittels CLSM untersucht. Im Gegensatz zu den bereits publizierten Studien in Wurzelhaaren wurde hier jedoch kein Fluoreszenzsignal (weder extra- noch intrazellulär) detektiert (Daten nicht gezeigt).

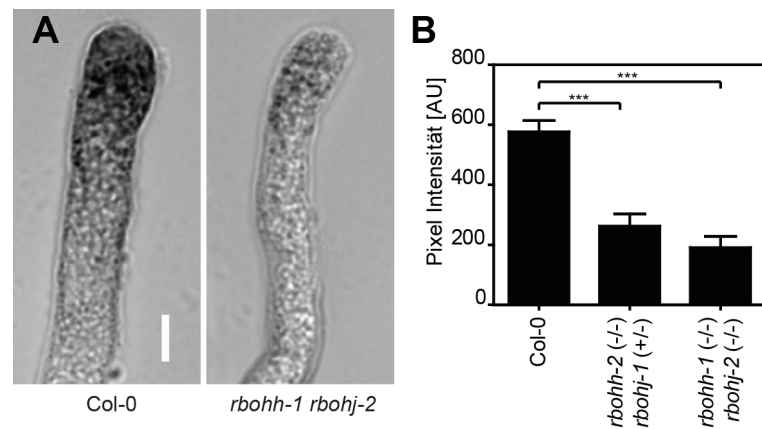
Als Alternativmethode zur Detektion von Superoxid-Anion-Radikal wurde der Farbstoff Nitroblau-Tetrazolium (NBT) gewählt. Die *in situ*-Superoxid-Detektion mittels NBT wurde bereits 1983 von Doke beschrieben und hat sich seit dem als zwar krude aber dennoch verlässliche Methode insbesondere in der Phytopathologie durchgesetzt (Doke, 1983; Torres et al., 2005). NBT ist ein wasserlösliches Ditetrazoliumsalz, das nach Superoxid-vermittelter Reduktion in das unlösliche, bläuliche Formazan überführt wird (Berridge et al., 2005). Durch die Präzipitation des Formazan-Farbstoffs kann Superoxidproduktion gewebespezifisch, oder im Fall von Pollenschläuchen und Wurzelhaaren, subzellulär lokalisiert werden (Torres et al., 2005; Jones et al., 2007). Die NBT-Färbung ist keine Lebendzellsfärbung und erlaubt daher keine Rückschlüsse auf die Dynamik der ROS-Produktion, sondern gibt nur die Stärke der ROS-Produktion zum Zeitpunkt der Behandlung wieder.

Für die *in situ* Detektion von Superoxid in Pollenschläuchen wurden zunächst WT-, *rboh-1 rboh-2*- und *rboh-2 (-/-) rboh-1 (-/+)*-Pollen auf *in vitro*-Pollenkeimungsmedium inkubiert. Nach 4 h Inkubation wurden WT- und *rboh-1 rboh-2*-Pollen-

schläuche für 30 min mit NBT behandelt. Durch die Zytotoxizität der Färbelösung verlieren nach der NBT-Behandlung alle Zellen ihre Lebensfähigkeit, was sich deutlich durch die Kondensation des Zytoplasmas zeigt (Abb. 3.13A, B). Bei ungekeimten Pollenkörnern war die NBT-Färbung auf kleinere Regionen konzentriert, was möglicherweise auf die Initiationsstelle des sich bildenden Pollenschlauchs hindeutet (Abb. 3.13C) (Speranza et al., 2012). Bemerkenswerterweise zeigten auch *rboh-1 rboh-2*-Pollenkörner dieses lokalisierte NBT-Signal (Abb. 3.13D). WT-Pollenschläuche akkumulierten nach NBT-Behandlung das bläuliche Formazanpräzipitat an der Pollenschlauchspitze und im subapikalen Bereich. Intakte *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche zeigten nur eine geringe oder gar keine Färbung (Abb. 3.13E, F; Abb. 3.14A, B). Die geringe Färbung in der Pollenschlauchspitze und subapikalen Region zeigte, dass Superoxidproduktion in *rboh-1 rboh-2* zwar signifikant reduziert ist, jedoch stellt sich die Frage der Herkunft des verbleibenden Superoxids, da weder RBOH1 noch RBOH2 präsent sind. Die positive Nettoladung des NBT lässt den Farbstoff in die Zelle diffundieren (Berridge et al., 2005), weshalb auch intrazellulär gebildetes Superoxid detektiert werden kann. Dieses kann beispielsweise als Nebenprodukt der aeroben Respiration in den Mitochondrien gebildet werden (Turrens, 2003), welche sich in Pollenschläuchen innerhalb der subapikalen Region befinden (Cárdenas et al., 2006). Es ist daher möglich, dass das detektierte Superoxid in *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen intrazellulären Ursprungs ist. Pollenschläuche von *rboh-2 (-/-) rboh-1 (-/+)*-Pflanzen zeigten ebenso eine signifikante Reduktion der Superoxidproduktion (Abb. 3.14B). Die NAD(P)H-Oxidasen RBOH1 und RBOH2 sind demnach die wichtigsten Superoxid-produzierenden Enzyme in Pollenschläuchen.



**Abb. 3.13:** Die Detektion von Superoxid-Anion-Radikal mittels Nitroblau-Tetrazolium. Pollen wurden zur Keimung auf *in vitro*-Pollenkeimungsmedium inkubiert und nach 4 h mit NBT gefärbt. A) Ein unbehandelter, wachsender WT-Pollenschlauch. B) Kondensation des Zytosols nach NBT-Färbung. C) Lokalisierte NBT-Färbung bei einem ungekeimten Pollenkorn. D) NBT-Färbung eines *rboh-1 rboh-2*-Pollenkorns. E) Ein elongierter WT-Pollenschlauch mit dem typischen Formazan-Gradienten nach der NBT-Färbung. F) Ein NBT-gefärbter *rboh-1 rboh-2*-Pollenschlauch. Größenbalken, 5  $\mu\text{m}$  (A, B) und 10  $\mu\text{m}$  (C – F).

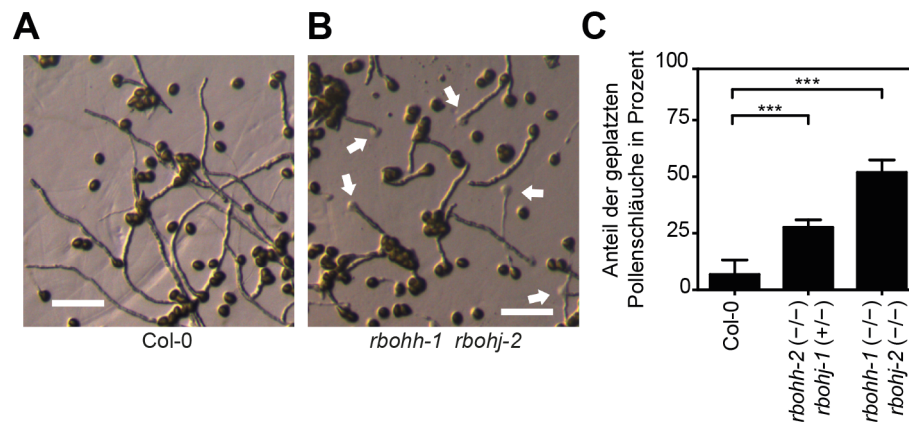


**Abb. 3.14:** Superoxidproduktion in *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen ist signifikant reduziert. A) WT- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche gefärbt mit NBT. Größenbalken, 5  $\mu\text{m}$ . B) Quantifizierung der NBT-Färbung in WT und *rboh rboh-2*-Pollenschläuchen. Die NBT-Färbintensität ist signifikant reduziert in *rboh rboh-2*-Doppelmutanten. Das Balkendiagramm gibt die Pixelintensität innerhalb der Pollenschlauchspitze in willkürlichen Einheiten wieder (*arbitrary units* [AU]). \*\*\*,  $p < 0,001$  in Dunn's post hoc-Test nach Kruskal Wallis-Test ( $n > 120$ ).

### 3.6 Phänotypische Charakterisierung der *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche

Die mikroskopische Auswertung der NBT-Färbung zeigte, dass ein Großteil der *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche an der Spitze geplatzt waren, wodurch sich das Zytoplasma ringförmig um die Pollenschlauchspitze verteilte (Abb. 3.15A, B). Das Pollenschlauchplatzen wurde nach 4 h Inkubationszeit auf Pollenkeimungsmedium bei 50 % der gekeimten *rboh-1(-/-) rboh-2(-/-)* und bei 25 % der gekeimten *rboh-2(-/-) rboh-1(-/+)*-Pollenschläuche beobachtet (Abb. 3.15C). Ähnliche Phänotypen wurden bereits in früheren Studien beschrieben. Der Verlust der Pollen exprimierten Pektin-Methylesterase VANGUARD1 führt beispielsweise zu verfrühtem Pollenschlauchplatzen, was auf eine Verringerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Quervernetzung und Verfestigung von Pektin zurückzuführen ist (Jiang et al., 2005). Die chemischen Eigenschaften von Zellwandkomponenten sind demnach kritisch für die Erhaltung der zellulären Integrität, daher könnte der *rboh-1 rboh-2*-Phänotyp auf einen möglichen Defekt in der Zellwandverfestigung hindeuten. Die Zellwandelastizität bzw. Viskosität hat wiederum Einfluss auf die Dynamik des polaren Zellwachstums. Zum Beispiel werden die für Pollenschläuche typischen Oszillationen in der Wachstums-

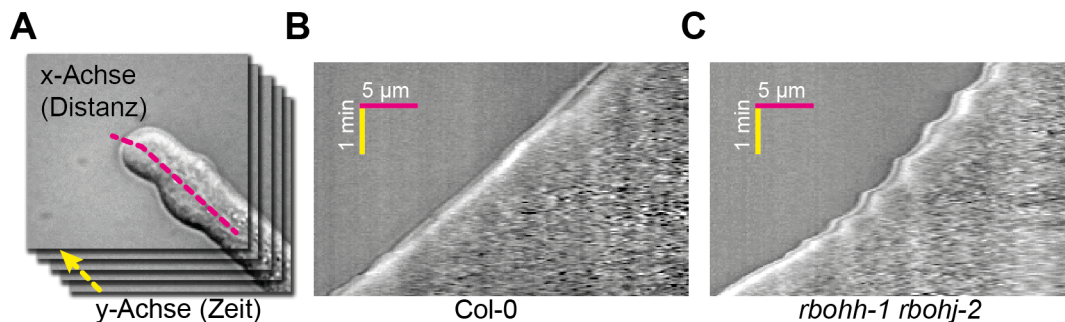




**Abb. 3.15:** Mikroskopische Charakterisierung des *rboh-1 rboh-2*-Phänotyps. A) Auf *in vitro*-Keimungsmedium wachsende Col-0-Pollenschläuche. B) *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche platzen während der Elongation. Weiße Pfeilspitzen deuten auf geplatze Pollenschläuche. Größenbalken, 0,1 mm. C) Anteil der geplatzen Pollenschläuche nach 4 h Inkubation auf *in vitro*-Pollenkeimungsmedium. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus drei Experimenten mit jeweils mindestens 300 Pollenschläuchen. \*\*\*,  $p < 0,0001$  in Fisher's exact-Test.

geschwindigkeit durch periodische Veränderungen der Zellwandelastizität verursacht (Winship et al., 2010).

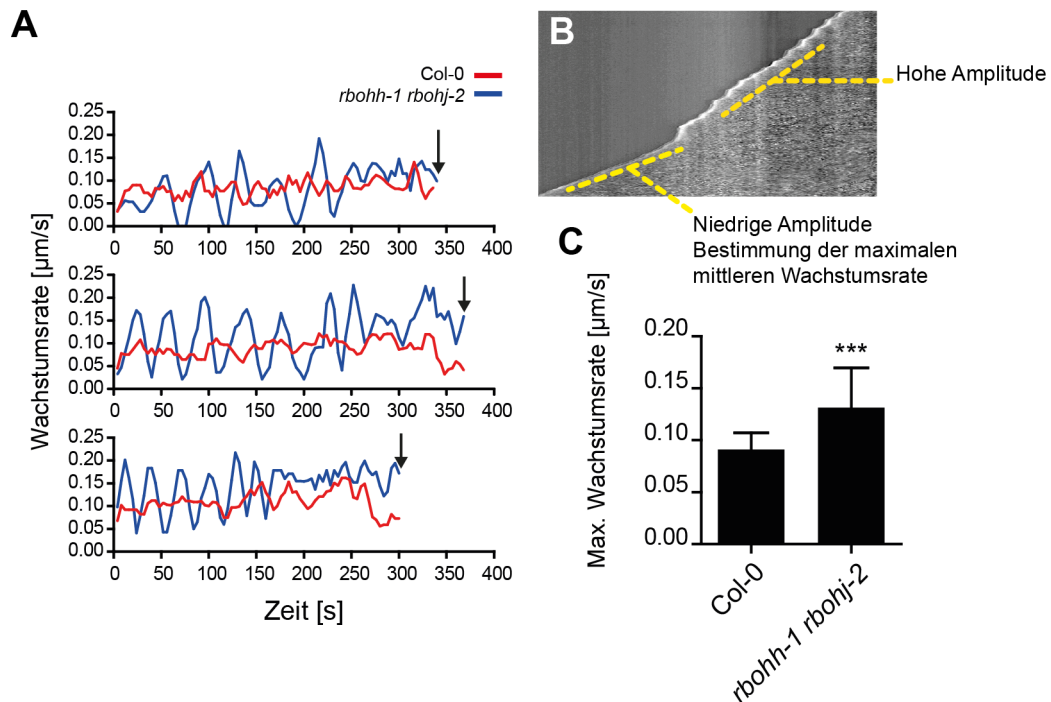
Um die Wachstumsdynamik von *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen zu untersuchen, wurden Zeitrafferaufnahmen gemacht, wobei das Pollenschlauchwachstum bei einer Aufnahmezeit von 30 Bildern pro Minute festgehalten wurde. Die resultierenden Bildserien wurden mit dem Programm ImageJ (Schneider et al., 2012) in Kymogramme umgewandelt. In den generierten Bewegungskymogrammen repräsentiert jeder Pixel in der x- bzw. y-Dimension Distanz und Zeit, dabei wird die Veränderung der Position der Pollenschlauchspitze über die Zeit als diagonale Kante sichtbar (Abb. 3.16A). Die glatte Kante im WT-Kymogramm zeigt, dass die Wachstumsgeschwindigkeit des WT-Pollenschlauchs kaum fluktuiert (Abb. 3.16B). In dem *rboh-1 rboh-2* Wachstumskymogramm deutet die gezackte Kante jedoch auf regelmäßige und starke Fluktuation in der Wachstumsrate hin (Abb. 3.16C). Mittels *Manual Tracking* wurde als nächstes die Veränderung der Wachstumsrate über die Zeit quantifiziert. Die Wachstumsrate von WT-Pollenschläuchen war typischerweise zwischen  $0,05 \mu\text{m/s}$  und  $0,1 \mu\text{m/s}$ , während *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche auf weit höhere Wachstumsraten beschleunigten (bis über  $0,2 \mu\text{m/s}$ ) um anschließend abrupt stehen zu bleiben, gefolgt von erneuter Beschleunigung (Abb. 3.17A). Aller-



**Abb. 3.16:** Analyse der Wachstumsdynamik von WT- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen. A) Generierung eines Kymographs mit Hilfe von ImageJ. Die Bewegungsdaten werden als Bilderstapel (*Image stack* bzw. Film) in ImageJ geladen. Danach wird die Bewegungsachse des Pollenschlauchs mit einer segmentierten Linie nachgezeichnet (magenta). ImageJ legt die segmentierten Linien aus jedem einzelnen Bild des Bilderstapels übereinander (gelber Pfeil entspricht der Zeit). Im Kymograph (B und C) entspricht damit jedes Pixel in der y-Dimension 2 s, da die Zeitserien mit einer Bildrate von 30 Bildern pro Minute aufgenommen wurden. B) Typischer Kymograph eines wachsenden WT-Pollenschlauchs. Die Abbildung entspricht 5 min kontinuierlichem Wachstum. Die diagonale Kante ist die sich stetig fortbewegende Pollenschlauchspitze. C) *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche zeigen eine veränderte Wachstumsdynamik. Die gezackte Linie verdeutlicht, dass der Pollenschlauch nicht stetig wächst sondern kurze Phasen der Beschleunigung und des plötzlichen Anhaltens aufeinander folgen.

dings war die Frequenz dieser Oszillation nicht stabil, sondern erhöhte sich mit der Zeit, wobei die Amplitude gleichzeitig sank (Abb. 3.17A). Bei *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen konnten daher zwei distinkte Wachstumsphasen unterschieden werden: Wachstumsoszillationen mit niedriger Frequenz und hoher Amplitude sowie Wachstumsoszillationen mit hoher Frequenz und niedriger Amplitude (Abb. 3.17B). Die mittlere Wachstumsgeschwindigkeit war bei Hochfrequenz-Wachstumsoszillationen von *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen im Vergleich zum WT signifikant erhöht (Abb. 3.17B, C). Die detaillierte Analyse der Wachstumsdynamik ermöglichte es *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche (15 von insgesamt 45 Aufnahmen) kurz vor bzw. während des Platzens zu beobachten. Diese zeigten vor dem Kollaps fast ausschließlich Hochfrequenz-Wachstumsoszillationen, weshalb hier die mittlere Wachstumsrate signifikant erhöht war. Die mittlere Wachstumsgeschwindigkeit von WT-Pollenschläuchen betrug  $0,091 \mu\text{m/s}$  (Stabw.: 0,016;  $n = 16$ ) während die Wachstumsgeschwindigkeit vor dem Kollaps bei *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen  $0,153 \mu\text{m/s}$  (Stabw.: 0,038;  $n = 15$ ) betrug. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der

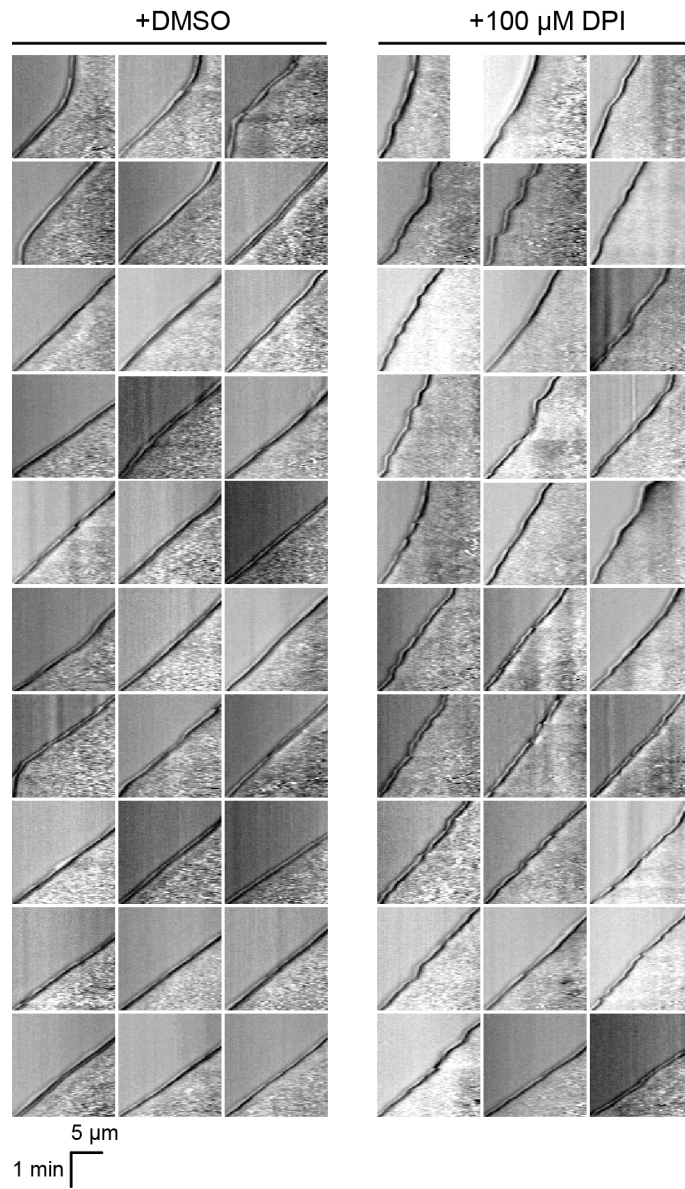
Verlust der zellulären Integrität nicht unmittelbar mit geringerer Zellwandfestigkeit zusammenhängt. Vielmehr impliziert die Korrelation von Pollenschlauchkollaps und Hochfrequenz-Wachstumsoszillationen, dass hier die veränderte Wachstumsdynamik von *rboh-1 rboh-2* die entscheidende Rolle spielt.



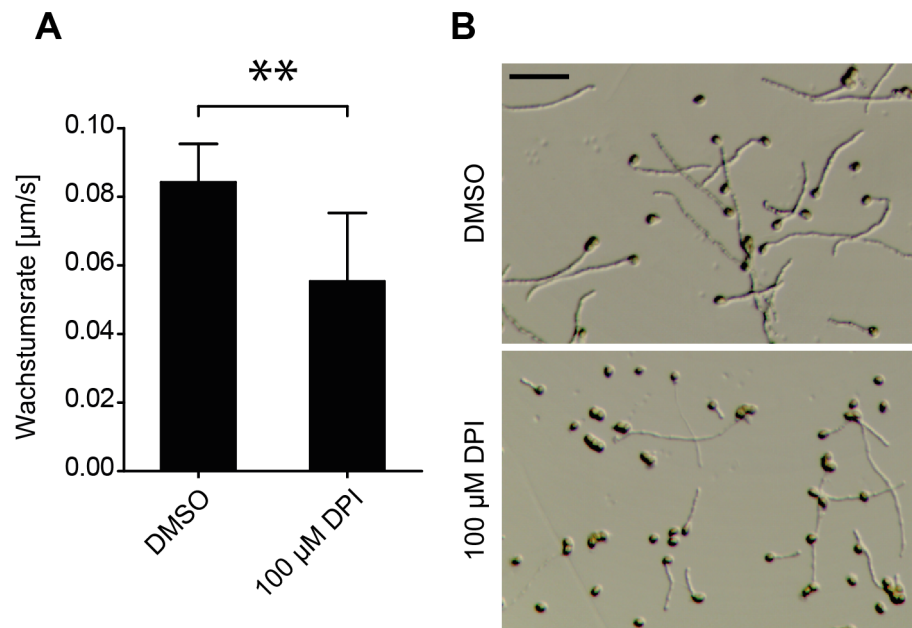
**Abb. 3.17:** Quantitative Auswertung der Pollenschlauchwachstumsdynamik. A) Veränderung der Wachstumsrate über die Zeit. Gezeigt sind Bewegungsdaten von jeweils drei WT- und drei *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen, aufgenommen über einen Zeitraum von mindestens fünf Minuten. Die mittlere Pollenschlauchwachstumsrate zwischen 4 s-Inkrementen wurde mittels des ImageJ *Manual Tracking Plugins* bestimmt. Die geringe Auflösung der original Bildsequenzen verursachte erhebliches Rauschen in den resultierenden Wachstumskurven, weshalb diese mittels eines gleitenden Mittelwertes von 5 Datenpunkten geglättet wurden. Insbesondere bei den *rboh-1 rboh-2* Wachstumskurven wird dadurch die Amplitude der Oszillationen verringert. Der schwarze Pfeil deutet jeweils auf den Zeitpunkt bei dem die *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche platzen. B) Kymograph eines *rboh-1 rboh-2*-Pollenschlauchs mit den zwei Wachstumsphasen. C) Die maximale mittlere Wachstumsrate von WT- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen. Um die maximale mittlere Wachstumsrate zu bestimmen wurden Kymographdaten ausgewertet wobei der Abschnitt mit der flachsten Steigung (entspricht der höchsten Wachstumsgeschwindigkeit) zur Bestimmung der Wachstumsrate verwendet wurde (siehe B). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. \*\*\*,  $p < 0,001$  in t-Test ( $n = 16-22$ ).

### 3.7 Pharmakologische Inhibition pollenspezifischer NAD(P)H-Oxidasen

Die erste Studie über die mögliche Funktion von pollenspezifischen NAD(P)H-Oxidasen zeigte, dass eine pharmakologische Inhibition der ROS-Produktion das Pollenschlauchwachstum hemmt (Potocký et al., 2007). Im Gegensatz dazu wurde oben gezeigt, dass der genetische Verlust der ROS-Produktion verstärkte Wachstumsoszillationen sowie eine Erhöhung der Pollenschlauchwachstumsrate verursacht (Abb. 3.17). Daher wurde getestet, ob die pharmakologische Inhibition der NAD(P)H-Oxidase vermittelten ROS-Produktion einen Einfluss auf die Pollenschlauchwachstumsdynamik hat. Der Flavoenzym-Inhibitor Diphenyliodonium (DPI) hat sich seit vielen Jahren als NAD(P)H-Oxidase Inhibitor etabliert (Cross und Jones, 1986; Foreman et al., 2003; Potocký et al., 2007; Müller et al., 2009). WT-Pollenschläuche, die mit 100  $\mu$ M DPI behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen vermehrt Fluktuationen in der Wachstumsgeschwindigkeit, ähnlich wie bei *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen (Abb. 3.18). DPI verursachte jedoch gleichzeitig eine signifikante Verminderung der mittleren Wachstumsgeschwindigkeit (Abb. 3.19A). Eine verlängerte Behandlung mit DPI (4 h) führte nicht zu Pollenschlauchplatzen sondern inhibierte lediglich die Pollenschlauchelongation (Abb. 3.19B). Die DPI-abhängige Verminderung der Wachstumsgeschwindigkeit wird daher womöglich nicht durch Inhibition der NAD(P)H-Oxidasen verursacht, sondern durch Interferenz mit anderen, durch Flavoenzyme gesteuerten, enzymatischen Reaktionen (Wind et al., 2010). Die partielle Rekapitulation des *rboh-1 rboh-2*-Wachstumsphänotyps durch DPI könnte außerdem darauf hindeuten, dass das Dämpfen der Wachstumsoszillation in Pollenschläuchen die primäre Funktion von RBOHH und RBOHJ ist.



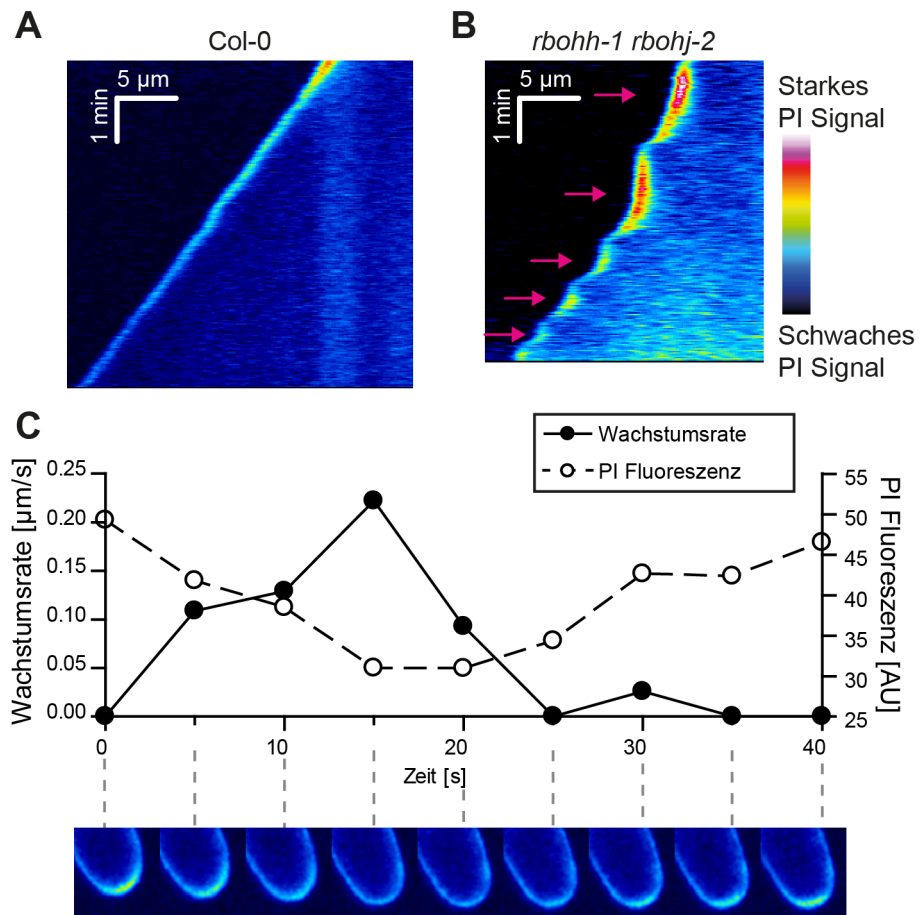
**Abb. 3.18:** Qualitative Analyse der Pollenschlauchwachstumsdynamik nach pharmakologischer Inhibition der NAD(P)H-Oxidase. *In vitro*-wachsende Pollenschläuche wurden mit 100 μM DPI oder DMSO (Kontrolle) behandelt. Die Kymographen zeigen jeweils 3 min Wachstum von 30 einzelnen Pollenschläuchen.



**Abb. 3.19:** Pharmakologische Inhibition von Pollenschlauch NAD(P)H-Oxidase verlangsamt das Wachstum. A) Bestimmung der mittleren Wachstumsrate von DMSO und DPI-behandelten Pollenschläuchen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. \*\*,  $p < 0,01$  in t-Test ( $n = 30$ ). B) Langzeit-Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  DPI führt nicht zu vermehrtem Pollenschlauchkollaps. WT-Pollen wurden für 3 h zur Keimung auf *in vitro*-Keimungsmedium inkubiert und anschließend mit DMSO oder 100  $\mu\text{M}$  DPI (beides gelöst in Keimungsmedium) beschichtet und weitere 4 h inkubiert. Größenbalken, 100  $\mu\text{m}$ .

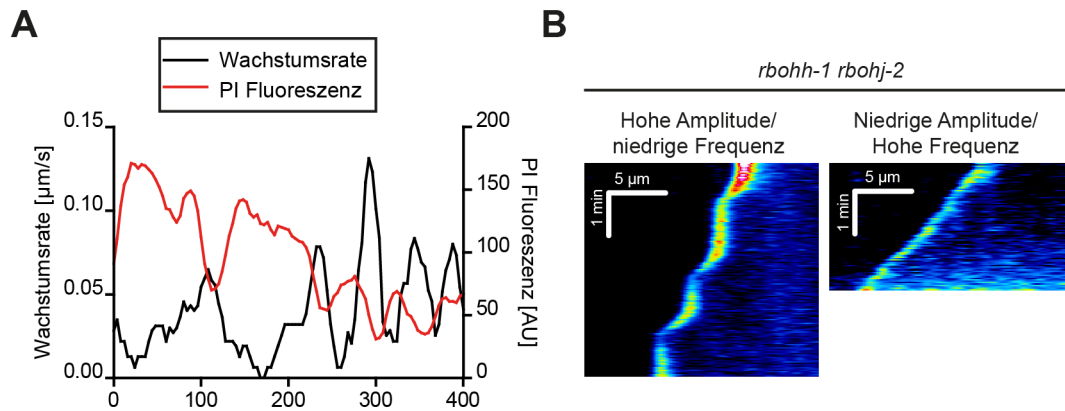
### 3.8 Analyse der Exozytoserate von Zellwandkomponenten in wachsenden Pollenschläuchen

Wachstumsoszillationen von *Lilium longiflorum*-Pollenschläuchen sind mit periodischen Veränderungen in der Festigkeit der apikalen Zellwand assoziiert (Zerzour et al., 2009). McKenna et al. (2009) postulieren, dass diese Variation in der Zellwandfestigkeit durch periodische Deposition von neuem Zellwandmaterial verursacht wird. Dabei wird durch Exozytose neues Zellwandmaterial, z. B. Homogalakturonan (Hauptbestandteil von Pektin), an der Pollenschlauchspitze deponiert, was die existierende Zellwand aufweicht, wodurch Wachstum induziert wird (Proseus und Boyer, 2006; Rojas et al., 2011; Proseus und Boyer, 2012). Die Frequenz der Zellwandexozytose ist damit entscheidend für die Wachstumsdynamik und fungiert als Schrittmacher für die Wachstumsgeschwindigkeit. Wie oben gezeigt (Abb. 3.17), hat der Verlust der NAD(P)H-Oxidase-vermittelten ROS-Produktion in Pollenschläuchen dramatische Auswirkungen auf die Wachstumsgeschwindigkeit- und -dynamik. Eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp ist, dass die Zellexpansionsrate (die Wachstumsgeschwindigkeit während einer Wachstumsperiode) und die Exozytoserate in diesen Mutanten voneinander entkoppelt sind. Die Zellexpansionsrate ist dabei zu schnell für den internen Oszillator, der periodisch neues Zellwandmaterial am Apex deponiert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Wachstumsdynamik zusammen mit der Exozytosedynamik in WT- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen untersucht. Für die Lebendzellanalyse der Zellwandexozytosedynamik in wachsenden Pollenschläuchen wurde der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) verwendet (McKenna et al., 2009; Rounds et al., 2011). Propidiumiodid bindet kompetitiv an die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen von demethoxyliertem Homogalakturonan und ermöglicht bei geringer Arbeitskonzentration die *in vivo*-Visualisierung von Zellwandexozytose (McKenna et al., 2009; Rounds et al., 2011). Anders als bei *L. longiflorum*-Pollenschläuchen sind Wachstumsoszillationen und damit auch Oszillationen in der Zellwandexozytose in *Arabidopsis* schwierig zu visualisieren, womöglich aufgrund der normalerweise niedrigen Amplitude. Daher zeigten PI-gefärbte WT-Pollenschläuche während des kontinuierlichen Wachstums keine Fluktuationen des apikalen PI-Signals (Abb. 3.20A). Während Niedrigfrequenz-Wachstumsoszillationen zeigten *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche hingegen ein starkes PI-Signal am Pollenschlauchapex (Abb. 3.20B, C). Dieses fluktuierte antiproportional zur Wachstumsoszillation, d.h. die PI-Signalarstärke verringerte sich mit zunehmender Wachstumsgeschwindigkeit und erhöhte sich wieder



**Abb. 3.20:** Analyse der apikalen Exozytose mittels Propidiumiodid-Färbung. A) Kymograph eines wachsenden WT-Pollenschlauchs gefärbt mit  $30 \mu\text{M}$  Propidiumiodid (PI). Bei stetigem Wachstum zeigen WT-Pollenschläuche keine Fluktuationen in der apikalen PI-Fluoreszenz. B) Kymograph eines wachsenden *rboh-1 rboh-2*-Pollenschlauchs gefärbt mit  $30 \mu\text{M}$  PI. Während des oszillatorischen Wachstums zeigt der Pollenschlauch periodisch auftretende Verdickungen der apikalen Zellwand (magenta Pfeile). Die Bildserien zur Erstellung der Kymographen wurden mit einer Aufnahmezeit von 30 Bildern pro Minute aufgenommen. C) Phasenverhältnis der Wachstumsoszillation und der Oszillation der apikalen PI-Fluoreszenzintensität. Aufgetragen sind die Wachstumsrate (schwarze Kreise) und die PI-Fluoreszenzintensität über die Zeit (weiße Kreise). Die Abbildung darunter ist eine Fotomontage des korrespondierenden mit PI gefärbten *rboh-1 rboh-2*-Pollenschlauchs. Jeder Datenpunkt des Graphen entspricht der darunterliegenden Abbildung.





**Abb. 3.21:** Korrelation von Wachstumsrate und Exozytoseereignissen. A) Veränderung der Wachstumsrate (schwarze Linie) und apikalen PI-Fluoreszenz (rote Linie) über die Zeit. Mit zunehmender Frequenz der Wachstumsoszillation erhöht sich die Frequenz der Exozytoseereignisse. Zur Glättung der Kurven wurde ein gleitender Mittelwert von 5 gebildet. B) Kymographen von wachsenden *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen. Bei Wachstumsoszillationen mit niedriger Amplitude (Kymograph rechts) gibt es keine Fluktuation in der apikalen PI-Fluoreszenz. Aufnahmeparameter sind wie in Abb. 3.20A und B

nachdem der Pollenschlauch abrupt stehen blieb (Abb. 3.20B, C). Das beobachtete apikale PI-Signal ist daher mit hoher Wahrscheinlichkeit identisch mit Zellwandexozytoseereignissen. Mit der Verringerung der Periode zwischen den einzelnen Exozytoseereignissen erhöhte sich gleichzeitig die Frequenz der Wachstumsoszillation (Abb. 3.21A), das heißt beide Parameter scheinen korreliert zu sein. Bei Hochfrequenz-Wachstumsoszillationen in *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen war die Fluktuation des apikalen PI-Signals ähnlich wie beim WT maskiert (Abb. 3.21B). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der oben vorgeschlagenen Hypothese, wobei ROS-vermittelte Verlangsamung der Zellexpansion die Koordination von Zellexpansion und Exozytoseereignissen ermöglicht.

---

---

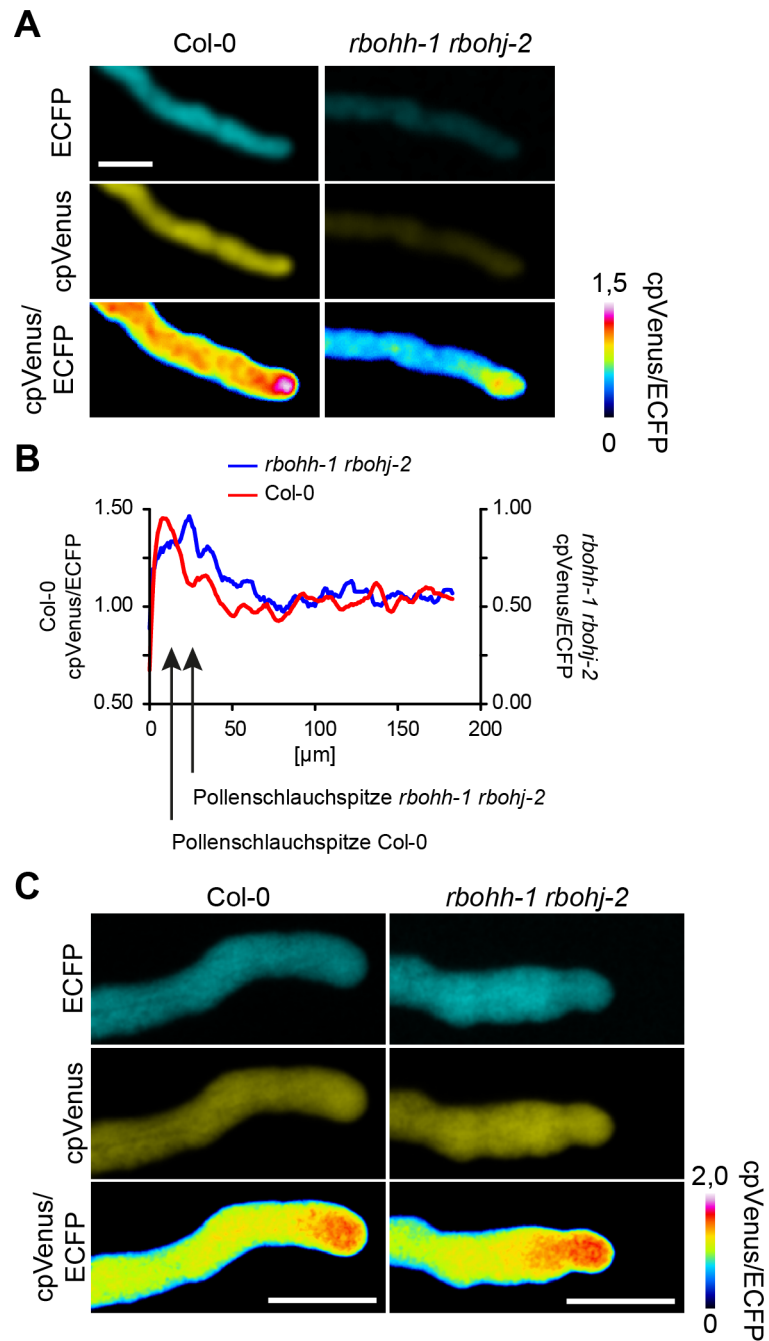
### 3.9 Untersuchung der intrazellulären $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik in Pollenschläuchen

Der apikale  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ist essentiell für das Pollenschlauchwachstum, jedoch ist dessen Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine mögliche Aufgabe des apikalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten besteht in der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidasen, da diese über  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende EF-Hände verfügen und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig ROS produzieren (Takeda et al., 2008). In wachsenden Wurzelhaaren wurde die Existenz einer Vorwärtskopplung postuliert, bei der  $\text{Ca}^{2+}$  die RBOHC-abhängige ROS-Produktion stimuliert. Diese aktiviert wiederum ROS-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Takeda et al., 2008). Die Existenz eines ähnlichen Mechanismus wurde für Pollenschläuche vorgeschlagen (Boisson-Dernier et al., 2013).

Für die Analyse möglicher Veränderungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten in *rboh-1 rboh-2* Pollenschläuchen, wurde der genetisch-kodierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor Yellow Cameleon 3.6 (YC3.6) verwendet (Miyawaki et al., 1999; Krebs et al., 2012). YC3.6 ist ein auf Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) basierender  $\text{Ca}^{2+}$ -Reporter, bestehend aus einem ECFP und einem cpVenus (*circularly permuted Venus*, ein YFP-Derivat), die durch einen M13-Linker und einem Calmodulin miteinander verbunden sind (Miyawaki et al., 1999). Die Detektion des YC3.6 wurde mittels CLSM durchgeführt, wobei das ECFP durch eine 405 nm-Diode angeregt wurde unter gleichzeitiger Aufnahme der ECFP- und cpVenus-Emissionswellenlängen. Bindet  $\text{Ca}^{2+}$  an das Calmodulin des YC3.6, kommt es zu einer Konformationsänderung innerhalb des Proteins, wodurch die FRET-Effizienz zwischen dem angeregten ECFP und dem cpVenus erhöht wird. Dabei verringert sich das emittierte ECFP-Signal unter gleichzeitiger Erhöhung des emittierten cpVenus Signals. Die einfachste Methode die resultierenden FRET-Daten auszuwerten, ist die Generierung von ratiometrischen Bildern, wobei die cpVenus-Signale durch die ECFP-Signale dividiert werden. Dieses Verfahren ist möglich, da beide Fluoreszenzproteine innerhalb eines Moleküls vereint sind und demnach in einem identischen molaren Verhältnis vorliegen.

Für die Untersuchung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik in Pollen wurde eine transgene *Arabidopsis*-Linie mit einer ProUBQ10::YC3.6-Insertion mit der doppelt-homozygoten *rboh-1 rboh-2* gekreuzt. Nach wiederholter Kreuzung mit *rboh-1 rboh-2* als Pollendonator, wurde in der F2-Generation eine doppelt-homozygote *rboh-1 rboh-2* mit der ProUBQ10::YC3.6 Insertion isoliert.

Diese zeigte im Vergleich zu der parallel angezogenen parentalen ProUBQ10::YC3.6-



**Abb. 3.22:** Expression des  $\text{Ca}^{2+}$ -reporters Yellow Cameleon 3.6 in *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen. (Fortsetzung auf der nächsten Seite)

**Abb. 3.22:** (Fortsetzung von vorheriger Seite) Expression des  $\text{Ca}^{2+}$ -Reporters Yellow Cameleon 3.6 in *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen. A) Ratiometrische Analyse des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten in YC3.6-exprimierenden WT- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen. Die Aufnahmeparameter waren für beide Genotypen identisch. Größenbalken, 15  $\mu\text{m}$ . B) Fluoreszenzprofil der in A) gezeigten Pollenschläuche. Die Pfeile deuten auf die Position der jeweiligen Pollenschlauchspitze. C) Analyse des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten mit unterschiedlichen Anregungsintensitäten. WT- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche wurden mit Ausnahme der Anregungsintensität mit identischen Parametern aufgenommen. Die relative Laserintensität ist 20 % (WT) bzw. 100 % (*rboh-1 rboh-2*). Größenbalken, 10  $\mu\text{m}$ .

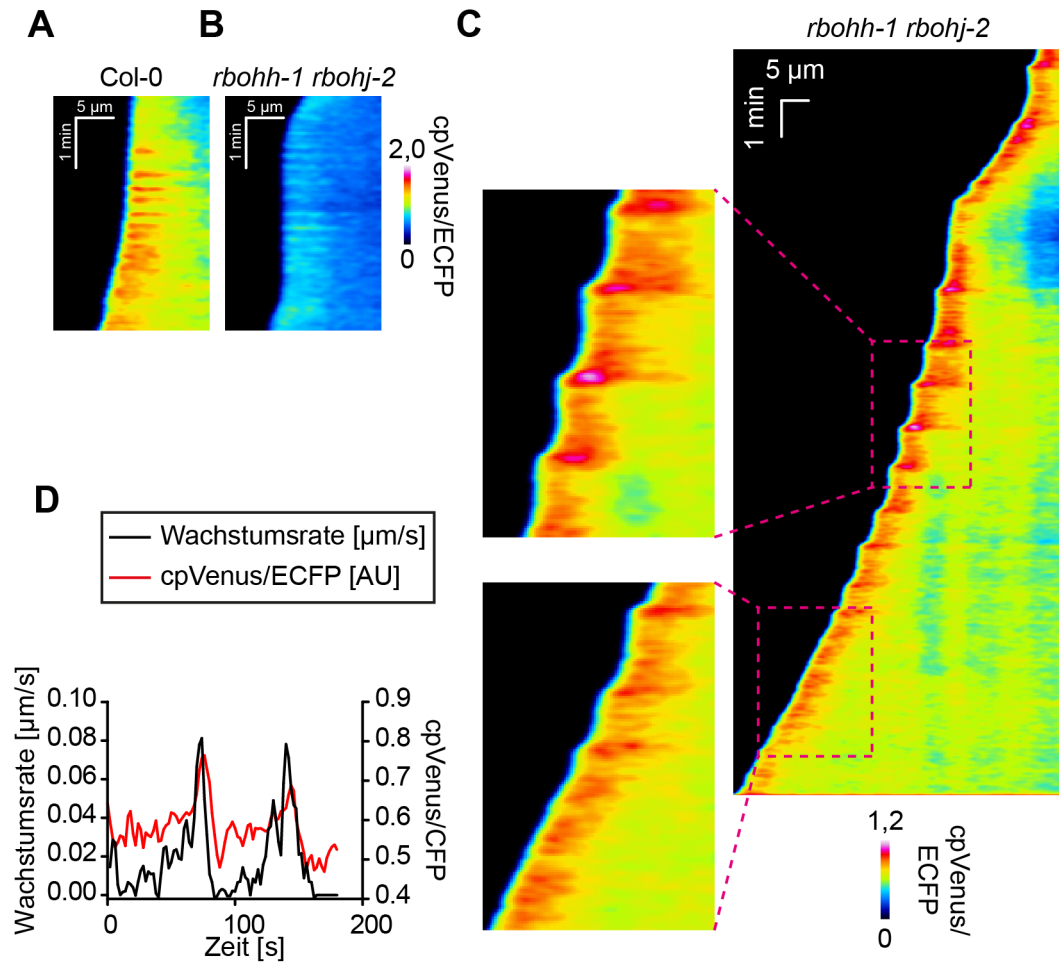
Linie im WT-Hintergrund ein um das Dreifache reduziertes Signal (Abb. 3.22A). Dadurch waren die absoluten ECFP/cpVenus-Ratiowerte in *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen niedriger als im WT (Abb. 3.22A). In beiden Genotypen wurde jedoch der charakteristische  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient an der Pollenschlauchspitze beobachtet, d.h. beide haben vergleichbare relative Ratiowerte (Abb. 3.22A, B). Durch Erhöhung der Laserintensität konnte die YC3.6-Signalintensität im *rboh-1 rboh-2*-Hintergrund jedoch derart verstärkt werden, dass die resultierenden cpVenus/ECFP-Ratiowerte identisch mit dem WT wurden (Abb. 3.22C). Die Diskrepanz in den absoluten Ratiowerten resultiert daher aus den unterschiedlichen Expressionsstärken und der Nicht-Linearität des Mikroskopdetektors und reflektiert keinen biologischen Unterschied in der Menge an intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ . Die verringerte YC3.6-Expression im *rboh-1 rboh-2*-Hintergrund wird vermutlich durch eine partielle Gen-Stillegung hervorgerufen verursacht durch die hohe Anzahl T-DNA-Insertionen und CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*) 35S-Promotoren in diesen Pflanzen (Tang et al., 2007; Daxinger et al., 2008). Zwar erlaubt der Unterschied in der YC3.6-Signalstärke keinen Vergleich der absoluten cpVenus/ECFP-Werte, jedoch ist er vernachlässigbar bei der Analyse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik. Aufgrund des schwachen YC3.6-Signals im *rboh-1 rboh-2*-Hintergrund mussten die Aufnahmeparameter für die Langzeitaufnahmen für maximale Signalausbeute bei minimaler Laseranregung angepasst werden. Gleichzeitig musste die Aufnahmegeschwindigkeit erhöht werden, um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik während des Pollenschlauchwachstums zu detektieren. Bei einer Laseranregung von 10 % und einer Aufnahmezeit von 30 Bildern pro Minute, konnten wachsende Pollenschläuche für einen Zeitraum von über 20 min beobachtet werden.

WT-Pollenschläuche zeigten während Wachstumsphasen keine regelmäßigen Veränderungen in der apikalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Wie in vorangegangenen Studi-

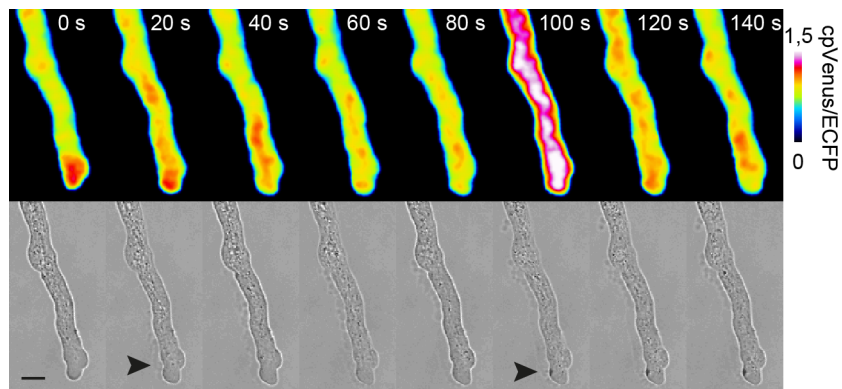
en bereits gezeigt wurde, traten diese nur während Wachstumspausen auf (Abb. 3.23A) (Iwano et al., 2009). Diese wachstumsunabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen wurden ebenso bei *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen beobachtet, d.h. die periodischen Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sind unabhängig vom hypothetischem ROS-sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal (Abb. 3.23B). Bei Niedrigfrequenz-Wachstumsoszillationen zeigten *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche wachstumsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen (Abb. 3.23C, D). Dabei erhöhte sich die apikale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration während der kurzen Wachstumsphasen und verringerte sich wieder bei Wachstumspausen. Der Übergang von Niedrigfrequenz- zu Hochfrequenz-Wachstumsoszillationen verdeutlicht die Korrelation zwischen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik und der Wachstumsdynamik, da sich die Frequenz der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation ebenfalls erhöht (Abb. 3.23C). In einigen Fällen konnte der Verlust der Zellintegrität während der Hochfrequenz-Wachstumsoszillation beobachtet werden. In dem gezeigten Beispiel entstand eine kleine Läsion im apikalen Bereich, wodurch sich die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration massiv erhöhte und kurz danach wieder auf das basal Niveau sank (Abb. 3.24).

Zusammengefasst deuten diese Daten daraufhin, dass Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Pollenschläuchen mit Veränderungen der Wachstumsgeschwindigkeit korreliert sind. Es ist demnach vorstellbar, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom wachstumsabhängig ist und durch Streckungs-aktivierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vermittelt wird. Direkte Hinweise auf die Existenz eines ROS-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals konnten nicht beobachtet werden. Da ROS jedoch, wie oben gezeigt, potenziell negative Regulatoren des polaren Wachstums sind, könnten diese, anders als postuliert, indirekt auch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom negativ beeinflussen. In diesem Szenario würden ROS und  $\text{Ca}^{2+}$  eine negative Rückkopplungsschleife konstituieren, was wiederum eine Oszillation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur Folge hätte. Jedoch konnten mit den bisher verwendeten Aufnahmeparametern keine wachstumsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation in WT-Pollenschläuchen beobachtet werden.

Es wurde daher überprüft, ob die potenziell auftretenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen durch die zu niedrige Aufnahme rate maskiert wurden. Durch Reduzierung der Laserintensität und Erhöhung der Abtastrate konnten wachsende YC3.6-Pollenschläuche (im WT-Hintergrund) bei einer Bildrate von 300 Bildern pro Minute beobachtet werden. Diese zeigten eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation mit einer Periode von 10 s (Abb. 3.25A). Mit der standardmäßigen Aufnahme rate von 30 Bildern pro Minute konnte diese Oszillation nicht detektiert werden (Abb. 3.25B). Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Oszillationen um ein technisches Artefakt handelt wurde ein

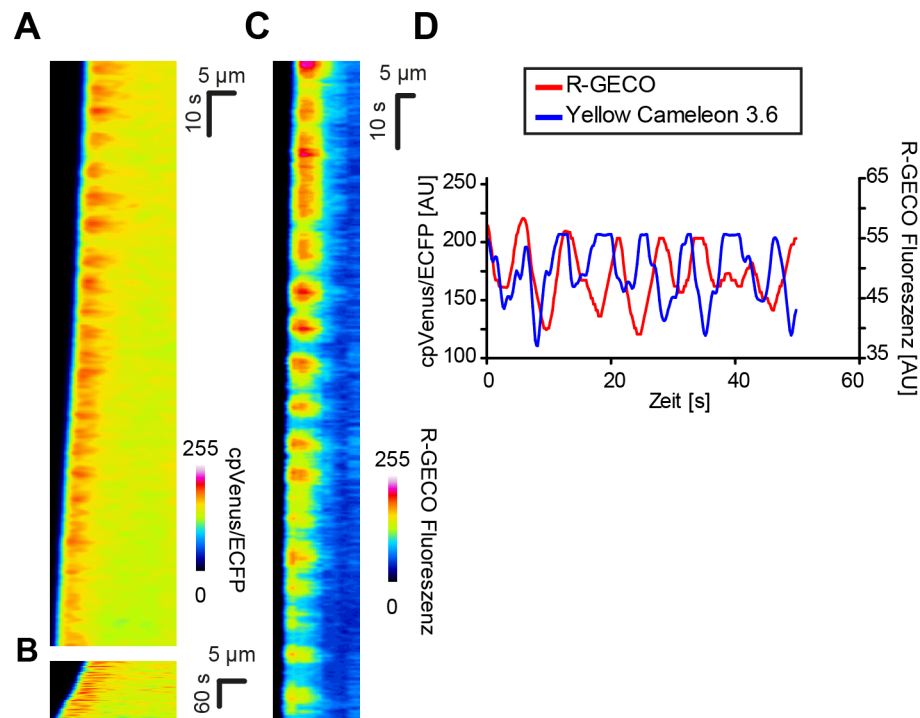


**Abb. 3.23:** Analyse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik in Col-0- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen. A, B) Kymographen von YC3.6-exprimierenden Col-0- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen.  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen in langsam wachsenden Col-0- (A) und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen (B). C) Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik während der Wachstumsoszillation und stetigem Wachstum in einem *rboh-1 rboh-2*-Pollenschlauch. Die Regionen in den magenta Boxen sind jeweils vergrößert angezeigt. D) Zeitliches Verhältnis von Wachstums- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Dynamik. Die Veränderung der Wachstumsrate (schwarze Linie) und cpVenus/ECFP-Werte (rote Linie) über die Zeit während des oszillatorischen Wachstums eines *rboh-1 rboh-2*-Pollenschlauchs.



**Abb. 3.24:** Verlust der Zellintegrität führt zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Gezeigt ist eine Bildserie eines *rboh-1 rboh-2*-Pollenschlauchs mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Reporter YC3.6. Der Pfeil in der Durchlichtaufnahme deutet auf eine spontan entstehende Läsionen, sichtbar durch den Ausfluss des Zellinhalts. Nach 20 s ist die Läsion noch vergleichsweise klein, daher entsteht nur eine geringfügige Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Nach 100 s hat sich die Läsion vergrößert, so dass sie als schwarzer Fleck im Durchlicht erscheint. Gleichzeitig kommt es zu einer starken, jedoch reversiblen Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Größenbalken, 5  $\mu\text{m}$ .

anderer  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor (R-GECO) verwendet. R-GECO ist eine Weiterentwicklung des nicht-ratiometrischen GCaMP2  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensors (Zhao et al., 2011). Letzterer setzt sich zusammen aus einem N-terminalen Calmodulin-bindenden M13-Peptid, einem zirkulär permutiertem EGFP (cpEGFP) und einem C-terminalen Calmodulin (CaM). Bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an die CaM-Domäne des ursprünglichen GCaMP2 kommt es zu einer Änderung in der Interaktion zwischen dem M13-Peptid und CaM, wobei sich die chemische Umgebung der EGFP-chromophoren Gruppe ändert und somit dessen Fluoreszenzintensität (Akerboom et al., 2009). R-GECO-exprimierende Pollenschläuche wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie bei einer Bildrate von 600 Bildern pro Minute analysiert. Auch hier wurde eine periodische Fluktuation der R-GECO-Signalintensität in der Pollenschlauchspitze beobachtet (Abb. 3.25C). Die YC3.6- und R-GECO-Daten zeigen, dass die intrazelluläre, apikale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in wachsenden *Arabidopsis*-Pollenschläuchen mit einer Periode von 10 s oszilliert (Abb. 3.25).



**Abb. 3.25:** Hochfrequenz- $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen in wachsenden WT-Pollenschläuchen. A) Kymograph eines wachsenden YC3.6-Pollenschlauchs (im WT-Hintergrund) bei einer Bildrate von 300 Bildern pro Minute. B) Dieselbe Aufnahme wie in A) bei einer Bildrate von 30 Bildern pro Minute. C) Kymograph eines R-GECO-exprimierenden WT-Pollenschlauchs bei einer Bildrate von 600 Bildern pro Minute. Die Daten in (A) und (B) wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop erfasst, während R-GECO mit einem Epifluoreszenzmikroskop ausgelesen wurde. D) Die graphische Auswertung der Kymographdaten zeigt, dass beide  $\text{Ca}^{2+}$ -Reporter  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen mit einer Periode von ca. 10 s wiedergeben.



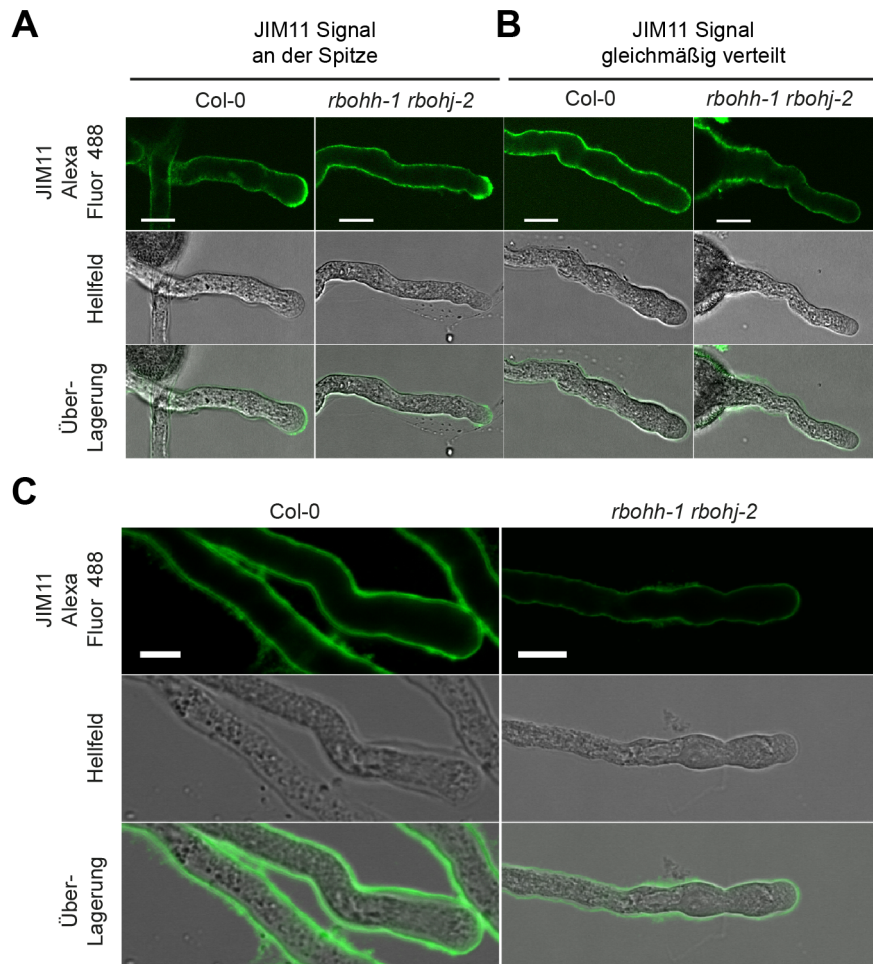
---

---

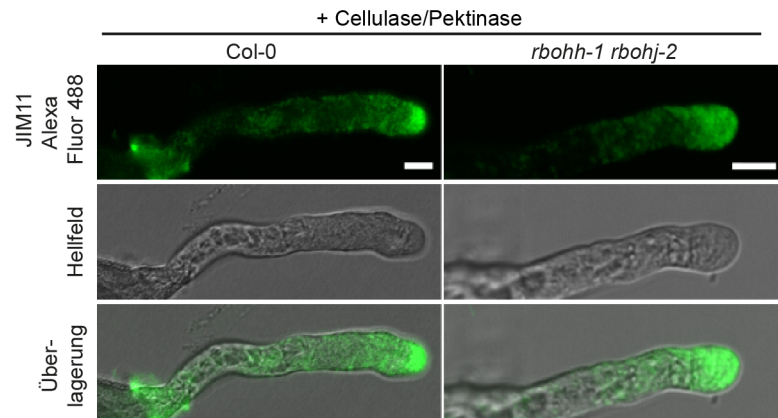
### 3.10 Histochemische Analyse von Pollenschlauch-Zellwandbestandteilen

Laut dem Zellwandmodell des Pollenschlauchwachstums werden Oszillationen der Wachstumsrate durch periodische Veränderungen der mechanischen Eigenschaften der Zellwand verursacht. Das abwechselnde Aufweichen und Erhärten der Zellwand führt dabei, unter konstantem Turgor, zur Beschleunigung bzw. Verlangsamung des Pollenschlauchs. Die erhöhten Wachstumsraten, die bei *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen beobachtet wurden, insbesondere während Wachstumsoszillationen mit hoher Amplitude, deuten auf eine mögliche Veränderung der Zellwandfestigkeit in diesen Mutanten. Eine direkte chemische Analyse von Pollenschlauchzellwänden ist zwar prinzipiell möglich (Dardelle et al., 2010), jedoch in dem hier vorliegenden Fall aufgrund der geringen Verfügbarkeit von adäquatem biologischen Material nicht praktikabel. Als Alternative wurde eine indirekte, qualitative Analyse der Zellwandkomposition mittels zellwandspezifischer Antikörper und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. ROS in Form von  $H_2O_2$  können, wenn extern appliziert, Zellwandkomponenten quervernetzen und somit die Zellwandrigidität erhöhen (Smirnova et al., 2013). Zu den möglichen Kandidaten für ROS-vermittelte Quervernetzung gehören Zellwandassoziierte Hydroxyprolin-reiche Glykoproteine (HRGPs) wie Arabinogalactan-Proteine (AGP) oder Extensine (Kjellbom et al., 1997; Ribeiro et al., 2006; Pereira et al., 2011). Unter Verwendung von spezifischen Antikörpern konnten AGPs (*monoclonal antibody*, mAb MAC207) (Pennell et al., 1989; Yates et al., 1996) und Extensine (mAb JIM11) (Smallwood et al., 1994) in Pollenschlauchzellwänden detektiert werden. JIM11-reaktive Zellwandepitope waren in Col-0- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen gleichmäßig über die Zellwand verteilt, jedoch gab es jeweils eine Subpopulation von Pollenschläuchen, in denen ein starkes Fluoreszenzsignal am Pollenschlauchapex detektiert wurde (Abb. 3.26A, B). Das Vorhandensein von zwei distinkten Färbungsmustern in beiden Genotypen reflektiert möglicherweise die periodische Exozytose der JIM11-reaktiven Zellwandkomponenten. Die Markierung mit MAC207 zeigte ebenfalls eine einheitliche Färbung der Pollenschlauch-Zellwand, dabei waren auch hier keine Unterschiede zwischen Col-0 und *rboh-1 rboh-2* zu erkennen (Abb. 3.26C).

Pflanzliche Zellwände sind komplexe Strukturen bestehend u.a. aus Pektin, Hemicellulose, Cellulose und Proteoglykanen. Die einzelnen Komponenten sind jedoch nicht isoliert voneinander, sondern interagieren über kovalente und nicht-kovalente

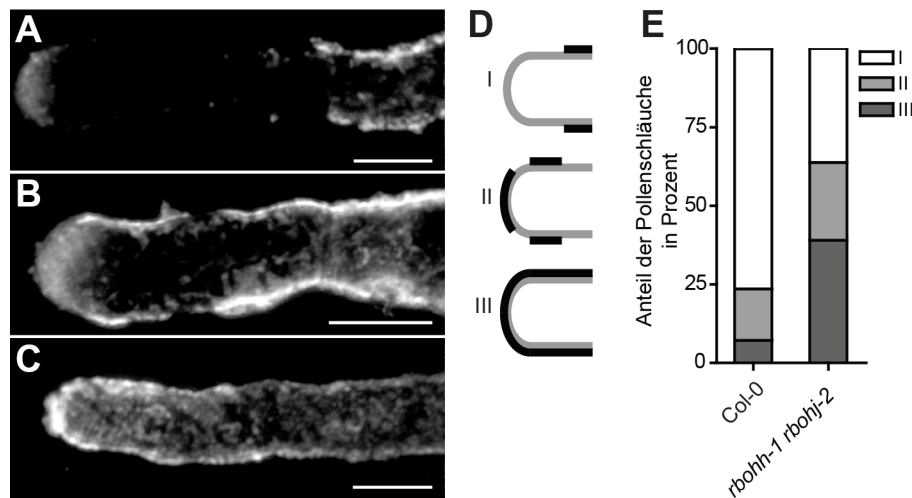


**Abb. 3.26:** Detektion von AGPs und Extensinen. Pollenschläuche wurden für 4 h auf *in vitro*-Keimungsmedium inkubiert und anschließend mit Formaldehyd fixiert. Die fixierten Pollenschläuche wurden mit monoklonalen Primärantikörpern gegen Extensin (JIM11) oder AGPs (MAC207) behandelt. Zur Detektion der Antikörperbindung *in situ* wurde ein Alexa Fluor 488-konjugierter sekundärer Antikörper verwendet. A) Konfokale Bilder von JIM11-markierten WT- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen. Bei einer Subpopulation der Pollenschläuche sind JIM11-reaktive Epitope an der gesamten Zellwand des Pollenschlauchs und an der Pollenschlauchspitze detekierbar. B) Bei der anderen Subpopulation sind die JIM11-reaktiven Epitope homogen über die gesamte Zellwand verteilt. C) MAC207-Markierung von Col-0- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen. Größenbalken, 10  $\mu\text{m}$  (A, B) und 5  $\mu\text{m}$  (C)



**Abb. 3.27:** Extensin-Detektion nach enzymatischem Abbau von Zellwandpolysacchariden. Col-0- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche wurden mit Formaldehyd fixiert und anschließend mit Cellulase und Pektinase behandelt. JIM11-reaktive Epitope sind nur noch intrazellulär detektierbar. Größenbalken, 5  $\mu\text{m}$ .

Bindungen. Extensine und AGPs sind beispielsweise mit Pektinen assoziiert (Nuñez et al., 2009; Tan et al., 2013). Um zu testen, ob NAD(P)H-Oxidase vermittelte ROS-Produktion einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Assoziation von Proteoglykanen und Polysacchariden hat, wurden Formaldehyd-fixierte Pollenschläuche mit Cellulase und Pektinase behandelt. Der enzymatische Abbau der Zellwandpolysaccharide entfernte gleichzeitig die JIM11-reaktiven Zellwandepitope (Abb. 3.27). Daher wurde in Col-0- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen nur noch intrazelluläres JIM11-Signal beobachtet (Abb. 3.27). Die Cellulase/Pektinase-Behandlung entfernte ebenso MAC207-reaktive Zellwandepitope, jedoch nur in der apikalen und subapikalen Region von Col-0-Pollenschläuchen (Abb. 3.28A). Zellwandregionen distal vom Apex waren weiterhin MAC207-reaktiv (Abb. 3.28A). Im Unterschied zu Col-0 waren die apikalen, MAC207-reaktiven Zellwandepitope von *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen teilweise unempfindlich gegenüber der Cellulase/Pektinase-Behandlung. Bei mehr als 50 % der beobachteten *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche wurde MAC207-reaktive Zellwand in der apikalen und subapikalen Region detektiert (Abb. 3.28B-F). Kontrollexperimente zur Pektin und Cellulose-Detektion (mit JIM5 und CBM3a) zeigten, dass die Cellulase/Pektinase-Behandlung in beiden Genotypen die entsprechenden Polysaccharide vollständig abgebaut hatte (Daten nicht gezeigt). Die partielle Unempfindlichkeit der MAC207-reaktiven Zellwandepitope gegenüber der Cellulase/Pektinase-Behandlung in *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen wurde demnach nicht durch eine verminderte Effizienz des Zellwandverdaus verursacht.



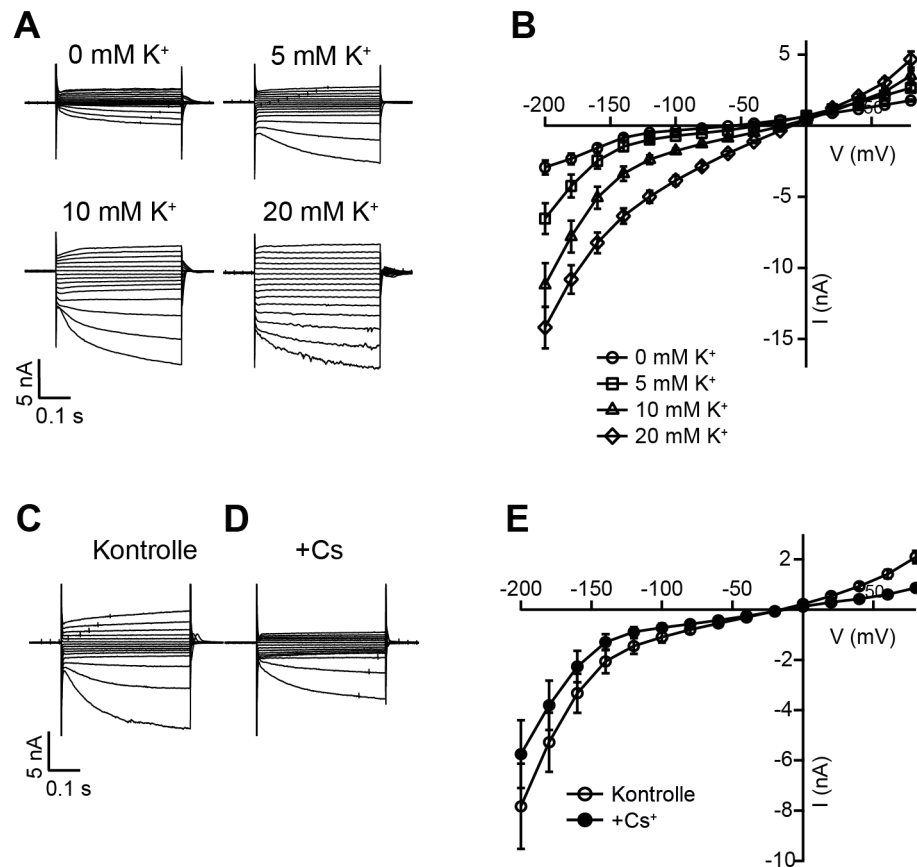
**Abb. 3.28:** Detektion von Zellwand-AGPs nach Cellulase/Pektinase-Behandlung. A) Eine Z-Projektion optischer Schnitte eines Cellulase/Pektinase-behandelten Col-0-Pollenschlauchs. MAC207-reaktive Epitope sind nur noch intrazellulär oder in distalen Zellwand-Regionen detektierbar. B) und C) Apikale MAC207-reaktive Zellwandepitope sind teilweise (B) oder vollständig (C) resistent gegenüber Cellulase/Pektinase-Behandlung in *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen. Größenbalken, 5  $\mu\text{m}$ . D) Schematische Darstellung der beobachteten MAC207-Markierungsmuster. Vollständiger (I), partieller (II) oder kein (III) Verdau der apikalen Zellwand. Die schematischen Markierungsmuster entsprechen den gezeigten Pollenschläuchen in (A) – (C). E) Häufigkeit der beobachteten Markierungsmuster in Col-0- (n = 151) und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen (n = 141).

### 3.11 Elektrophysiologische Charakterisierung

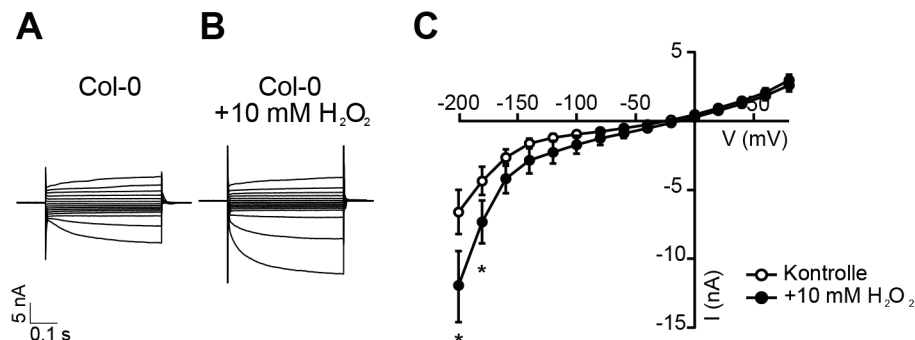
Der Zellturgor ist die treibende Kraft des Zellwachstums in pflanzlichen Zellen. Kalium ist dabei das wichtigste anorganische Osmolyt und spielt somit auch beim Pollenschlauchwachstum eine wichtige Rolle. Eine Erhöhung des Zellturgors, vermittelt durch Kaliumeinstrom, wurde zudem als ein möglicher Mechanismus zur Freigabe der Spermien postuliert. Dabei wurde in *Zea mays* eine Klasse Defensin-ähnlicher Cystein-reicher Proteine entdeckt (*ZmES1-4*), die bei externer Applikation Wachstumsarrest, Pollenschlauchplatzen und Spermienfreigabe verursachen (Amien et al., 2010). Kurz vor dem *ZmES*-induzierten Pollenschlauchkollaps kommt es zu einer Membrandepolarisation durch Erhöhung des Kaliumeinstroms. Die Autoren jener Studie spekulieren, dass dieser Kaliumeinstrom verantwortlich für den Pollenschlauchkollaps ist. Die Ähnlichkeit des *rboh1-1 rboh2-2*-Phänotyps mit dem *ZmES*-induzierten Pollenschlauchplatzen deutet auf eine mögliche Verbindung zwischen ROS-Produktion und Kaliumströmen. Unter den bekannten Kaliumkanälen wurde zudem der STELAR K<sup>+</sup> OUTWARD RECTIFIER (SKOR) als ROS-sensitiver, auswärtsgerichteter Kaliumkanal identifiziert (Garcia-Mata et al., 2010). Da SKOR auch in Pollen exprimiert wird (Loraine et al., 2013), wurde überprüft, ob der Verlust der pollenspezifischen NAD(P)H-Oxidasen Veränderungen der Ionenströme, insbesondere der Kaliumströme, verursacht.

Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden in Kollaboration mit Dr. Kai Konrad und Dipl. Biol. Timo Gutermuth an der Universität Würzburg durchgeführt. Die Ionenströme in intakten Pollenschläuchen wurden mittels Zweielektroden Spannungsklemme (*Two-electrode voltageclamp*, TEVC) analysiert. Bei einem TEVC-Experiment werden Pollenschläuche mit einer Doppelelektrode angestochen, wobei mit der einen Elektrode die Spannung gemessen und mit der anderen Elektrode Strom appliziert wird. Das Membranpotenzial wird mit Hilfe der intrazellulären Spannungselektrode bestimmt und mit einer vorgegebenen Sollspannung verglichen. Durch einen Rückkopplungsverstärker ist die Spannungselektrode mit der Stromgebenden Elektrode verbunden, so dass bei einer Differenz zwischen Sollspannung und gemessener Spannung zum Ausgleich ein in Vorzeichen und Amplitude entsprechender Strom appliziert wird. Der applizierte Strom ist proportional zu den Ionenströmen, die bei Änderung des Membranpotenzials durch die Membrankanäle fließen.

In dem verwendeten Standardprotokoll wurden verschiedene Membranspannungen



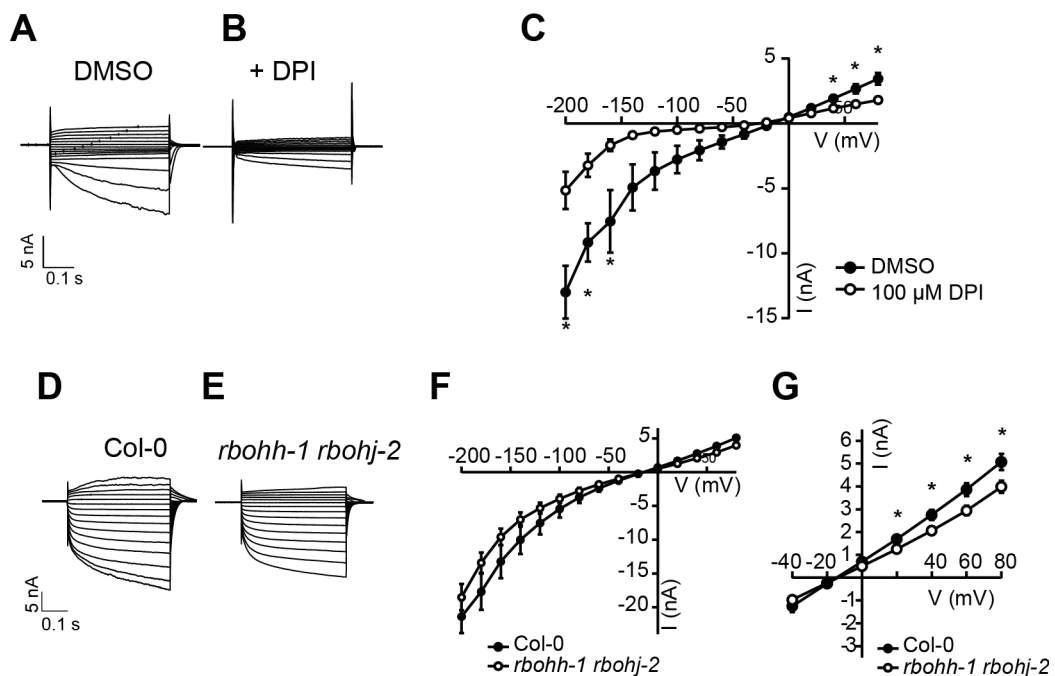
**Abb. 3.29:** Messung von K<sup>+</sup>-Strömen in lebenden WT-Pollenschläuchen mittels TEVC. A) Typische Stromspuren von Col-0-Pollenschläuchen auf Medium mit 0 mM K<sup>+</sup>, 5 mM K<sup>+</sup>, 10 mM K<sup>+</sup> oder 20 mM K<sup>+</sup>. Per Konvention sind die bei unterschiedlichen Membranspannungen gemessenen Ströme übereinander gelegt. B) Vergleich der in Pollenschläuchen gemessenen Gleichgewichtsströme bei verschiedenen K<sup>+</sup>-Konzentrationen und Membranspannungen. Beim Standardprotokoll wurden die Gleichgewichtsströme nach Applikation von 400 ms dauernden Spannungssprüngen von -200 mV bis +80 mV in jeweils 20 mV-Inkrementen gemessen. C) und D) Repräsentative Stromspuren von Col-0-Pollenschläuchen bei intrazellulärer Zugabe des K<sup>+</sup>-Kanal-Blockers Caesium (Cs<sup>+</sup>). E) Gleichgewichtsströme bei Cs<sup>+</sup>-Behandlung oder unter Kontrollbedingungen.



**Abb. 3.30:** Externe Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erhöht K<sup>+</sup>-Einwärtsströme. A) und B) Typische Stromspuren von Col-0-Pollenschläuchen unter Kontrollbedingungen (A) oder nach Zugabe von 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B). C) Gleichgewichtsströme bei unterschiedlichen Membranspannungen. Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt bei hyperpolarisierter Membran zu erhöhten K<sup>+</sup>-Einwärtsströmen. \*, p < 0,05 in t-Test, n = 6.

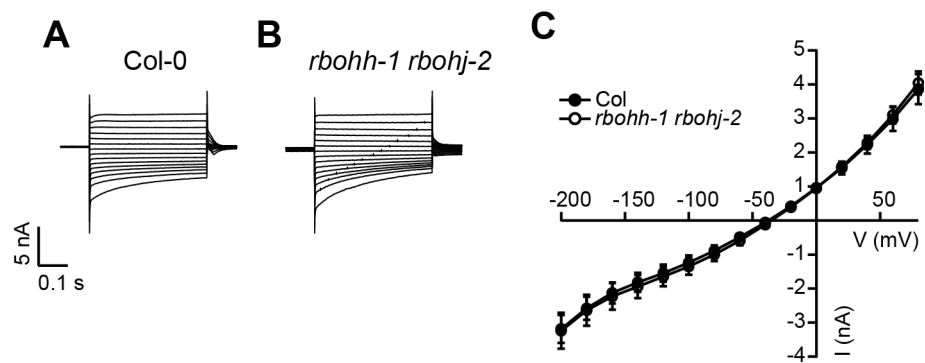
angelegt (von -200 bis +80 mV in 20 mV Inkrementen) und die daraus resultierenden Ströme gemessen. Um die Ladungsträger dieser Ströme zu identifizieren, wurden die Pollenschläuche in Medien mit unterschiedlicher Zusammensetzung inkubiert oder mit spezifischen Inhibitoren (z. B. K<sup>+</sup>-Kanal-Inhibitoren) behandelt. Bei Erhöhung der K<sup>+</sup>-Konzentration des Mediums unter Konstanthaltung der übrigen Ionen (Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>), verstärkten sich die gemessenen Einwärts- und Auswärtsströme (Abb. 3.29A, B). Im Gegensatz dazu verringerten sich die gemessenen Ströme nach Zugabe des K<sup>+</sup>-Kanal-Blockers Caesiumchlorid, womit bestätigt wurde, dass es sich bei den gemessenen Strömen um K<sup>+</sup>-Ströme handelt (Abb. 3.29C, D, E). Die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte bei einer Konzentration von 10 mM zu einer Erhöhung der Einwärts- nicht jedoch der Auswärtsströme (Abb. 3.30A, B, C). Pharmakologische Inhibition der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität mittels 100 μM DPI führte hingegen zu einer signifikanten Reduktion der K<sup>+</sup>-Ein- und Auswärtsströme im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle (Abb. 3.31A, B, C). Außerdem wurden in *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen im Vergleich zum WT ebenfalls verringerte Einwärts- und Auswärtsströme gemessen, wobei die Unterschiede nur im letzteren Fall aufgrund der starken Variabilität der Messdaten signifikant waren (Abb. 3.31D, E, F, G). Bei einem Membranpotential von +20 und +80 mV zeigen *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche eine Reduktion der K<sup>+</sup>-Auswärtsströme um 25 % bzw. 30 % (Abb. 3.31G). Zur Analyse der Anionenströme wurden Col-0- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche auf K<sup>+</sup>-freiem, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-basierendem Medium angezogen. Bei 40 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> konnten

bei stark negativem Membranpotential ( $> -120$  mV) langsam deaktivierende Ströme typisch für S-Typ-Anionenkanäle gemessen werden. Diese waren in *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen im Vergleich zum WT nicht verändert (Abb. 3.32A, B, C).



**Abb. 3.31:** NAD(P)H-Oxidase vermittelte ROS-Produktion beeinflusst K<sup>+</sup>-Ströme. A) – C) Pharmakologische Inhibition der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität verringert K<sup>+</sup>-Ein- und Auswärtsströme. Typische Col-0-Pollenschlauchstromspuren unter Kontrollbedingungen mit DMSO (A) oder nach Behandlung mit 100 μM DPI (B). C) Vergleich der Gleichgewichtsströme bei verschiedenen Membranspannungen unter Kontrollbedingungen oder DPI Behandlung (n = 5). D) und E) Repräsentative Stromspuren von Col-0- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen. F) und G) Vergleich der Gleichgewichtsströme von Col-0- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen bei verschiedenen Membranspannungen. G) Vergrößerung der Gleichgewichtsströme bei positivem Membranpotential verdeutlicht die signifikante Reduktion der K<sup>+</sup>-Auswärtsströme in *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen. \*, p < 0,05 in t-Test (n = 9).





**Abb. 3.32:** Anionenströme in Col-0- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen. Zur Analyse der Anionenströme wurden Pollenschläuche auf Medium mit 40 mM  $\text{NO}_3^-$  angezogen. A) und B) Repräsentative Stromspuren von Col-0- und *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen auf 40 mM  $\text{NO}_3^-$ -Medium zeigen bei stark negativem Membranpotential die langsame Deaktivierungskinetik typisch für S-Typ-Anionenkanäle. C) Gleichgewichtsströme auf  $\text{NO}_3^-$ -basierendem Medium zeigen keine Unterschiede zwischen Col-0 und *rboh-1 rboh-2* ( $n = 9$ ).

## 4 Diskussion

---



---

#### 4.1 RBOHH und RBOHJ regulieren die Wachstumsdynamik von Pollenschläuchen

Die Allgegenwärtigkeit der NAD(P)H-Oxidasen unter den Eukaryoten verdeutlicht, dass die gezielte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies ein essenzieller Bestandteil zahlreicher biologischer Prozesse ist (Kawahara et al., 2007). Dabei sind neben den mikrobiziden Eigenschaften von ROS vor allem deren Funktion in Signaltransduktion und Entwicklung von immer größerem Interesse. In dieser Arbeit konnte durch eine detaillierte phänotypische Charakterisierung die Funktion der NAD(P)H-Oxidase-vermittelten ROS-Produktion während des Pollenschlauchwachstums aufgeklärt werden. Im Gegensatz zu früheren Studien wurde gezeigt, dass ROS nicht für die Pollenschlauchelongation essenziell sind, sondern im Gegenteil als negative Regulatoren des Wachstums fungieren (Potocký et al., 2007; Lassig et al., 2014). Diese Eigenschaft von ROS bietet auch eine mögliche Erklärung für die Tatsache, dass die *rboh-1 rboh-2*-Doppelmutante nicht vollständig steril ist. Zwar platzt ein Großteil der *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche, jedoch erreichen einige dennoch den weiblichen Gametophyten und wachsen dabei sogar schneller als der Wildtyp. Evolutionär gesehen balancieren ROS zwei gegensätzliche Selektionsdrücke aus: Da jeder weibliche Gametophyt nur von einem Pollenschlauch befruchtet wird, wirkt sich Selektion positiv auf die Pollenschlauchwachstumsgeschwindigkeit aus. Andererseits unterliegt das polare Zellwachstum physikalischen Grenzen, d.h. die Integrität der wachsenden Zelle ist ab einer bestimmten Wachstumsrate nicht mehr gegeben. Es ist daher anzunehmen, dass die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit (artspezifisch) einem Wert entspricht, der beiden Kriterien gerecht wird, wobei NAD(P)H-Oxidasen hier eine kritische Rolle spielen.

Die NAD(P)H-Oxidasen RBOHH und RBOHJ verlangsamen die Wachstumsschübe während der Wachstumsoszillation, damit die Exozytose und Zellexpansionsrate miteinander koordiniert sind. Dieses Szenario wird durch folgende Beobachtungen gestützt: i) Während der Niedrigfrequenz-Wachstumsoszillation ist die Wachstumsgeschwindigkeit von *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen signifikant erhöht (0,2  $\mu\text{m/s}$  im Vergleich zu 0,1  $\mu\text{m/s}$  im WT), ii) nach diesem Wachstumsschub kommt der *rboh-1 rboh-2*-Pollenschlauch abrupt zum Stillstand, als begegnete er einer physikalischen Barriere, iii) neues Zellwandmaterial wird sekretiert nachdem der Pollenschlauch anhält und iv) die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation ist korreliert mit der Wachstumsoszillation, was einen möglichen Rückkopplungsmechanismus darstellen könnte. Dabei stimuliert ein

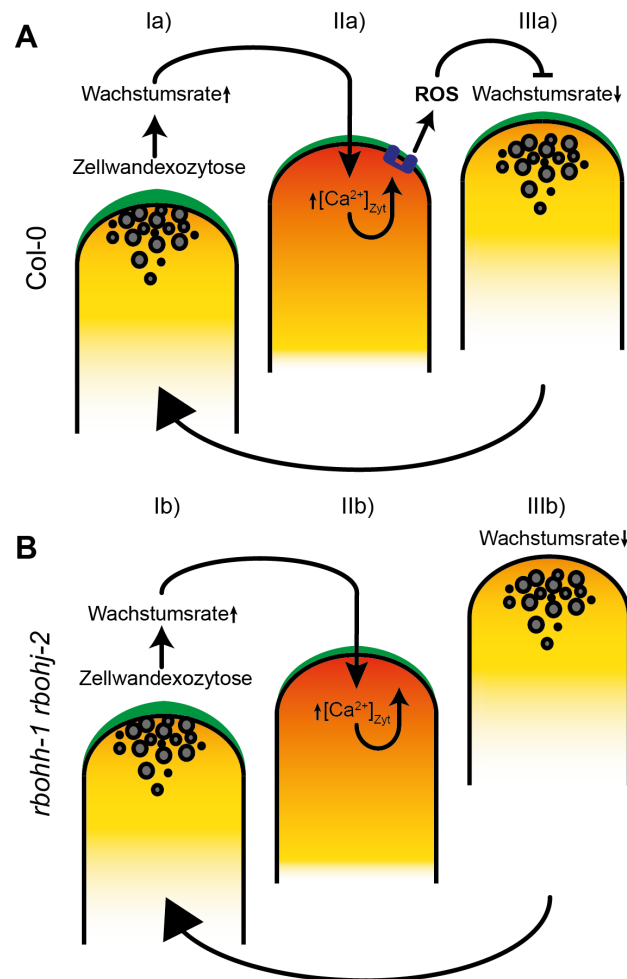
Wachstumspuls den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, was gleichzeitig die ROS-Produktion erhöht, wodurch die Amplitude der Wachstumsoszillation gedämpft werden würde. Durch diesen Mechanismus ermöglichen RBOHH und RBOHJ ein stabiles Pollenschlauchwachstum mit einer gleichmäßigen Wachstumsgeschwindigkeit (Abb. 4.1).

Die primäre Funktion von RBOHH und RBOHJ scheint demnach die Inhibition der Zellelongation zu sein. Dies scheint plausibel besonders im Hinblick auf die partielle Rekapitulation des *rboh-1 rboh-2*-Wachstumsphänotyps bei pharmakologischer Inhibition der ROS-Produktion mittels DPI. Obwohl DPI-behandelte Pollenschläuche verstärkt oszillieren, bleiben sie dennoch intakt. Dies ist wahrscheinlich bedingt durch die gleichzeitige Verlangsamung des Wachstums verursacht durch unspezifische Nebenwirkungen des FAD-Enzyminhibitors (Wind et al., 2010). Das Platzen der *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche könnte demnach ein sekundärer Effekt sein, der nur mittelbar mit der reduzierten ROS-Produktion verbunden ist. Die detaillierte Analyse der Wachstumsdynamik zeigte, dass der Pollenschlauchkollaps fast ausschließlich während Hochfrequenz-Wachstumsoszillationen mit signifikant erhöhten Wachstumsraten stattfindet. Die Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit scheint jedoch nicht der Auslöser für das Platzen zu sein, da Pollenschläuche auch während Niedrigfrequenz-Wachstumsoszillationen kurze Schübe mit extrem erhöhten Zellexpansionsraten durchlaufen. Dies deutet daraufhin, dass die Dynamik der Wachstumsoszillation und nicht die Wachstumsgeschwindigkeit entscheidend für die zelluläre Integrität in *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen ist.

Wie die Propidiumiodid-Färbung zeigte, ist die Frequenz der Wachstumsoszillation gekoppelt mit der Frequenz der Exozytose. Daraus folgt, dass vor dem Pollenschlauchkollaps die Exozytoserate erhöht sein müsste. Dies scheint zunächst der Erwartung zu widersprechen, da mit erhöhter Exozytoserate auch vermehrt Zellwandmaterial sekretiert wird. Von einigen Autoren wird daher postuliert, dass der *rboh-1 rboh-2*-Phänotyp durch eine verminderte Exozytoserate und der damit einhergehenden Schwächung der Zellwand hervorgerufen wird (Boisson-Dernier et al., 2013). Allerdings können *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche vor dem Kollaps über mehrere Minuten mit im Vergleich zum WT signifikant erhöhter Geschwindigkeit wachsen, was nur durch eine verstärkte Deposition von Zellwandmaterial möglich ist (Chebli et al., 2013). Eine Erklärung, wie es trotz erhöhter Exozytoserate zum Pollenschlauchkollaps kommen, kann bietet das Zellwandmodell des Pollenschlauchwachstums. In diesem Szenario verursacht die apikale Sekretion von Zellwandmaterial (hier Pektin) das Aufweichen der apikalen Zellwand durch die Verfügbarkeit von neuen

Ca<sup>2+</sup>-Bindestellen und der damit einhergehenden Auflösung von Ca<sup>2+</sup>-vermittelten Quervernetzungen (Hepler et al., 2013). Es ist demnach vorstellbar, dass bei einer drastisch erhöhten Exozytoserate die apikale Zellwand mit Baumaterial überladen wird und die periodische, Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Quervernetzung gestört ist. Eine Erhöhung der extrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration müsste daher theoretisch der exzessiven Sekretionsrate und dem damit verbundenen Pollenschlauchkollaps entgegenwirken. Dieses Experiment wurde von Boisson-Dernier et al. (2013) durchgeführt und das Ergebnis entspricht in der Tat der Erwartung, d.h. bei höherer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kollabieren weniger *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche.

Nichtsdestotrotz ist eigentliche der Auslöser für die Erhöhung der Exozytoserate unbekannt. Experimentelle Daten und Computer-Simulationen deuten auf einen möglichen Zusammenhang von Turgor und der Frequenz der Wachstumsoszillation in Pollenschläuchen (Messerli und Robinson, 2003; Kroeger et al., 2011). Kalium ist dabei das wichtigste anorganische Osmolyt und ist maßgeblich an der Ausbildung des Turgors beteiligt (Fan et al., 2001). Verlust der ROS-Produktion in *rboh-1 rboh-2*-Mutanten oder durch pharmakologische Inhibition hat eine Verringerung der K<sup>+</sup>-Einwärts- und Auswärtsströme zur Folge. Die Regulation des Turgors durch ROS ist daher prinzipiell vorstellbar. Alternativ könnte das Auftreten von Niedrigfrequenz-Oszillationen die Erhöhung der Exozytoserate verursachen. Dafür müsste ein Mechanismus existieren, der das Ungleichgewicht zwischen Exozytoserate und Zellexpansionsrate perzipiert und daraufhin die Exozytoserate erhöht. Der bei Niedrigfrequenz-Wachstumsoszillationen auftretende mechanische Stress könnte zum Beispiel auf das Zytoskelett wirken und dadurch auch den Vesikeltransport und die Exozytoserate beeinflussen.



**Abb. 4.1:** Vereinfachtes Modell der negativen Wachstumsrückkopplung durch ROS. A) In WT-Pollenschläuchen induziert Zellwandexozytose (in grün) einen Wachstumsschub (Ia), wodurch Ca<sup>2+</sup> in die Zelle eindringt (IIa) und NAD(P)H-Oxidase (in blau) aktiviert werden. ROS-Produktion verlangsamt das Wachstum (IIIa). Neues Zellwandmaterial wird exozytiert bevor das alte vollständig aufgebraucht ist. Durch welchen Kanal Ca<sup>2+</sup> in die Zelle eintritt ist hierbei unklar. Aufgrund der Korrelation von Wachstum und Ca<sup>2+</sup>-Influx wird an dieser Stelle die Existenz eines mechanosensitiven Ca<sup>2+</sup>-Kanals postuliert, der sich durch Wachstums-induzierte Streckung der Plasmamembran öffnet. B) In *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen wird Wachstum ebenfalls durch Exozytose induziert (Ib), jedoch folgt dem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom keine Verlangsamung des Wachstums (IIb). Der Pollenschlauch kommt erst zum Stehen, wenn sämtliches Zellwandmaterial inkorporiert ist (IIIb).

## 4.2 Regulation der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität

Die gezielte Produktion von ROS in biologischen Systemen unterliegt einer strikten Regulation, da unkontrollierte ROS-Produktion fatale Konsequenzen für den Organismus haben kann. Zu den bekannten regulatorischen Mechanismen zur Kontrolle der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität gehören u.a.  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung an die N-terminalen EF-Hände, Phosphorylierung konservierter Ser- und Thr-Reste und Bindung von Rho-GTPasen an den N-Terminus (Nühse et al., 2007; Wong et al., 2007; Take-da et al., 2008). Die meisten regulatorischen Faktoren der pflanzlichen NAD(P)H-Oxidasen wurden im Kontext des Wurzelhaarwachstums und der Pathogenabwehr entdeckt, jedoch existieren wahrscheinlich ähnliche Mechanismen auch für die Pollenspezifischen RBOHH und RBOHJ (Potocký et al., 2012; Boisson-Dernier et al., 2013; Kaya et al., 2014).

### 4.2.1 Aktivierung von RBOHH/J durch Rezeptor-ähnliche Kinasen

Boisson-Dernier et al. (2013) postulieren, dass RBOHH und RBOHJ durch die pollenspezifischen Rezeptor-ähnlichen Kinasen (*Receptor-like kinase*; RLK) ANXUR1 und ANXUR2 (ANX1/2) reguliert werden. ANX1 und 2 gehören zu der Unterfamilie der *Cantharus roseus* RLK1-like (CrRLK1L)-Rezeptorkinasen, die in *Arabidopsis* mit 17 Isoformen vertreten ist (Lindner et al., 2012). Die extrazelluläre, Ligandenbindende Domäne der CrRLK1Ls hat Ähnlichkeiten mit der Zucker-bindenden Domäne des *Xenopus laevis*-Proteins Malectin, weshalb CrRLK1L-Rezeptorkinasen als mögliche Sensoren des Zellwandstatus' gehandelt wurden (Turner, 2007; Boisson-Dernier et al., 2011; Cheung und Wu, 2011). Der einzig identifizierte Ligand für eine CrRLK1L Rezeptorkinase ist jedoch ein von Pflanzen sekretiertes Peptid, bekannt als RAPID ALKANIZATION FACTOR (RALF) (Haruta et al., 2014). Funktioneller Verlust der pollenspezifischen CrRLK1Ls-Rezeptorkinasen ANX1/2 in homozygoten *anx1 anx2*-Mutanten führt ähnlich wie bei den *rboh* *rbohj*-Mutanten zu verfrühtem Pollenschlauchkollaps (Boisson-Dernier et al., 2009; Miyazaki et al., 2009). Allerdings ist über die eigentliche Funktion und über stromabwärts-liegende Signalkomponenten von ANX1/2 bisher wenig bekannt.

Das ANXUR-Homolog FERONIA (FER) spielt im Wurzelhaarwachstum und während der Zell-Zell-Kommunikation zwischen Pollenschlauch und weiblichem Gametophyten eine wichtige Rolle (Escobar-Restrepo et al., 2007; Duan et al., 2010). Die FERONIA-abhängige Regulation der Zellelongation in Wurzelhaaren wird durch Ak-

tivierung von ROP-GTPasen (*rho of plants*) vermittelt, die wiederum, wahrscheinlich über RBOHC, ROS-Produktion und Wurzelhaarwachstum stimulieren (Duan et al. 2010). Diese Daten deuteten daraufhin, dass auch RBOHH/J über einen ähnlichen Signaltransduktionsweg aktiviert werden könnten (Potocky et al. 2012). Passend dazu ist die Beobachtung, dass *anx1 anx2*- und *rboh1 rboh2*-Mutanten einen scheinbar ähnlichen Phänotyp zeigen. Weiterhin wurde eine mögliche genetische Interaktion von *ANX1/2* und *RBOHH/J* beobachtet: Überexpression von ANX1-YFP führt zur partiellen Inhibition der Pollenkeimung, jedoch nur im WT- und nicht im *rboh1 rboh2*-Hintergrund (Boisson-Dernier et al. 2013).

Eine direkte Interaktion zwischen den pollenspezifischen NAD(P)H-Oxidasen und den CrRLK1L-Rezeptorkinasen, bzw. den ROP-GTPasen, die benötigt würden um RBOHH/J zu aktivieren, wurde nicht gezeigt. Ebenso ist unklar, ob in *rboh1 rboh2*- und *anx1 anx2*-Mutanten tatsächlich das gleiche Phänomen zu sehen ist. Wie in der vorliegenden Arbeit sowie in einer anderen Studie gezeigt wurde, kollabiert unter *in vitro*-Bedingungen ein Großteil der *rboh1 rboh2*-Pollenschläuche nach der Elongation, d. h. bei einer Länge von weit mehr als 10  $\mu\text{m}$  (Boisson-Dernier et al. 2013). Unter denselben Bedingungen initiieren *anx1 anx2*-Pollen zwar einen Pollenschlauch, dieser platzt jedoch noch vor der Elongation (nur 3,4 % werden dabei länger als 10  $\mu\text{m}$ ) (Boisson-Dernier et al., 2009). Außerdem wurde weiter oben gezeigt, dass der primäre Phänotyp von *rboh1 rboh2* die veränderte Wachstumsdynamik ist und nicht der Pollenschlauchkollaps (Abschnitt 3.6 und 3.7). Ob die Pollenschlauchwachstumsdynamik in *anx1 anx2*-Mutanten betroffen ist, bleibt unbekannt.

Auch die genetische Interaktion zwischen *ANX1/2* und *RBOHH/J* ist nicht eindeutig belegt. Die Überexpression von ANX1-YFP führt zur partiellen Inhibition des Pollenschlauchwachstums und der Pollenkeimung, wobei diese Effekte proportional zu der Expressionsstärke von ANX1-YFP sind (Boisson-Dernier et al., 2013). Damit wäre *ANX1-YFP* nur dann epistatisch zu *RBOHH/J*, wenn das Expressionsniveau von ANX1-YFP in WT- und *rboh1 rboh2*-Linien gleich ist. Im Hinblick auf die verringerte YC3.6-Expression in *rboh1-1 rboh2-2*-Pflanzen ist es denkbar, dass die beobachtete Aufhebung des ANX1-YFP-Effektes im *rboh1 rboh2*-Hintergrund eben nicht auf Epistase beruht, sondern auf eine geringere ANX1-YFP-Expression im Vergleich zum WT-Hintergrund. Dieser kritische Punkt wird von Boisson-Dernier et al. (2013) allerdings nicht berücksichtigt, weshalb unklar bleibt, ob hier tatsächlich eine genetische Interaktion vorliegt.



---

---

#### 4.2.2 Regulation der NAD(P)H-Oxidase-Aktivität durch Ca<sup>2+</sup>-und Phosphorylierung

Bereits mit der genetischen Identifizierung der NAD(P)H-Oxidasen in *Arabidopsis thaliana* wurde die Rolle von Ca<sup>2+</sup> als potenziellem regulatorischen Faktor deutlich, da innerhalb der N-terminalen Domäne zwei Ca<sup>2+</sup>-bindende EF-Hand-Motive detektiert wurden (Keller et al., 1998). Die N-terminalen EF-Hand-Motive sind zwar charakteristisch für pflanzliche NAD(P)H-Oxidasen, allerdings kommen sie auch in NAD(P)H-Oxidasen anderer Organismen vor (z. B. NOX5 in *H. Sapiens*) (Kawahara et al. 2007). Sämtliche *Arabidopsis* RBOH-Enzyme verfügen über zwei EF-Hand-Motive, wovon das zweite jedoch nicht der EF-Hand-Konsensussequenz entspricht (Abb. 4.2) (Keller et al., 1998; Gifford et al., 2007; Kawahara et al., 2007). Aktivitätstests in HEK293-Zellen zeigten überraschenderweise, dass die Abweichung von der kanonischen EF-Hand-Sequenz in EF-Hand II, die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Aktivität der RBOH-Enzyme nicht beeinträchtigt. Im Gegenteil, die Wiederherstellung der Konsensussequenz in EF-Hand II verringerte die Ca<sup>2+</sup>-abhängige ROS-Produktion (Ogasawara et al. 2008, Kimura et al. 2012). Mittels des HEK293-Testsystems konnte außerdem die Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit der pollenspezifischen NAD(P)H-Oxidasen RBOHH und RBOHJ demonstriert werden (Kaya et al., 2014).

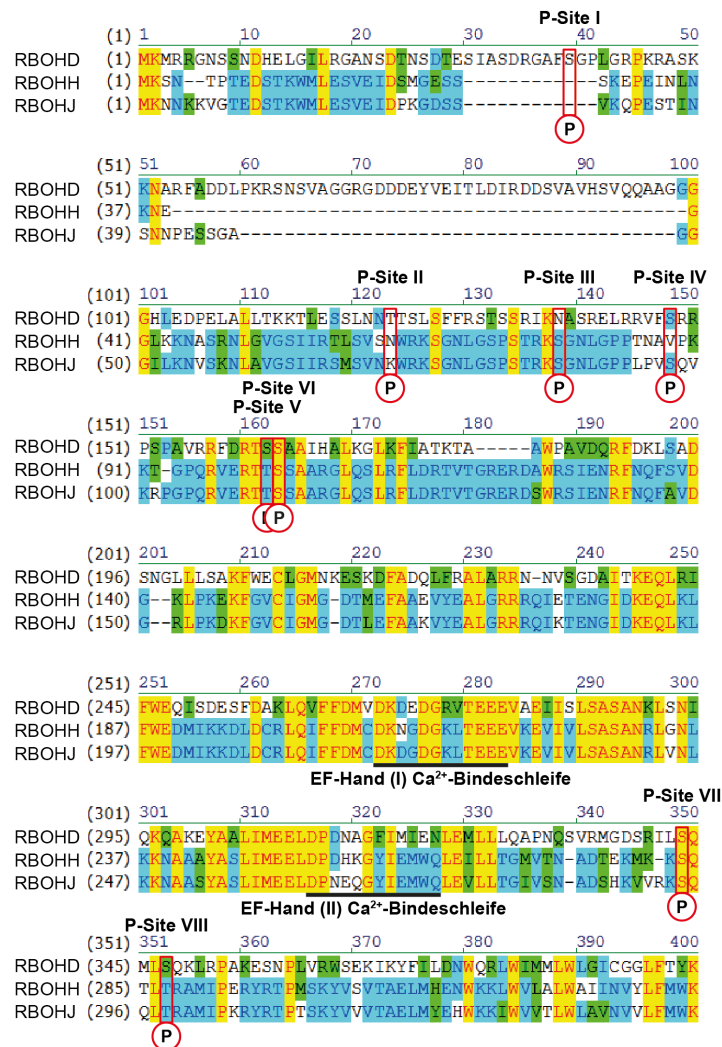
Wie in mehreren Phosphoproteom-Studien gezeigt wurde, spielt für die RBOH-Aktivierung neben der Ca<sup>2+</sup>-Bindung auch Phosphorylierung des N-Terminus' eine bedeutende Rolle (Nühse et al., 2007; Mayank et al., 2012; Dubiella et al., 2013; Kadota et al., 2014). Experimente in HEK293-Zellen zeigen, dass die Phosphorylierung des N-Terminus' und Ca<sup>2+</sup>-Bindung eine synergistische Wirkung auf NAD(P)H-Oxidase-abhängige ROS-Produktion haben (Ogasawara et al., 2008; Drerup et al., 2013; Kaya et al., 2014). Ein Sequenzvergleich zwischen der gut-charakterisierten Isoform RBOHD und den pollenspezifischen Isoformen RBOHH/J zeigt sowohl RBOHD- und RBOHH/J-spezifische als auch in allen drei Proteinen konservierte Phosphorylierungsstellen (Mayank et al., 2012; Dubiella et al., 2013; Kadota et al., 2014; Li et al., 2014) (Abb. 4.2).

Die in der Pathogenabwehr involvierte RBOHD wird von mindestens drei Kinasen, CPK5, BIK1 (BOTRYTIS INDUCED KINASE1) und PBL1 (PBS1-LIKE), phosphoryliert (Dubiella et al., 2013; Kadota et al., 2014; Li et al., 2014). BIK1 und PBL1 gehören zu der Familie VIIa der zytoplasmatischen Rezeptor-ähnlichen Kinasen (*receptor-like cytoplasmic kinase*; RLCK) und phosphorylieren bzw. akti-

vieren RBOHD nach FLS2 (FLAGELLIN INSENSITIVE2)-vermittelter Perzeption des bakteriellen Elizitors flg22 (Kadota et al., 2014; Li et al., 2014). Die RLCK VIIa-Proteinfamilie besteht in *Arabidopsis* aus 25 Isoformen (Anhang Abb. 6.1A), wovon mindestens zwei spezifisch in Pollen exprimiert sind (Anhang Abb. 6.1B) (Zimmermann et al., 2004). Das von BIK1/PBL1 phosphorylierte Ser343 (P-Site VII) der RBOHD ist in RBOHH und RBOHJ konserviert (Abb. 4.2), was auf eine mögliche Funktion von RLCK VIIa-Proteinen in der Steuerung der NAD(P)H-Oxidase-abhängigen ROS-Produktion während des Pollenschlauchwachstums hindeuten könnte.

CPK5 gehört zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Proteinkinasen (*calcium-dependent protein kinase*; CDPK), welche eine Kinase-Effektordomäne und eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensordomäne in einem Molekül enthalten (Cheng et al., 2002). Durch eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration können CDPKs aktiviert werden und ihre Zielproteine, wie z. B. RBOHD, phosphorylieren (Harper und Harmon, 2005). Die CDPK-Genfamilie besteht in *Arabidopsis* aus 34 Mitgliedern mit 12 in Pollen exprimierten Isoformen (Cheng et al., 2002; Myers et al., 2009). Von den pollenspezifischen CDPKs wurden die Isoformen CPK2, 20, 11, 24, 17 und 34 auf genetischer Ebene charakterisiert (Myers et al., 2009; Gutermuth et al., 2013; Zhao et al., 2013). Allerdings wurde bisher noch keine Einzel- oder Mehrfachmutante mit *rboh* *rbohj*-ähnlichem Phänotyp identifiziert. Dennoch ist die Regulation der Pollen-RBOHs durch CDPKs ein plausibles Szenario, da die CPK5-abhängigen Phosphorylierungsstellen Ser148 (P-Site IV), Ser163 (P-Site VI) und Ser347 (P-Site VIII) ebenso in RBOHH und RBOHJ zu finden sind (in RBOHH/J ist eine S163T Substitution) (Abb. 4.2).

$\text{Ca}^{2+}$  hätte damit eine Doppelfunktion bei der Aktivierung von NAD(P)H-Oxidasen, einerseits durch direkte Bindung an die N-terminalen EF-Hände und andererseits durch Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Proteinkinasen, die den N-Terminus phosphorylieren und damit die Enzymaktivität regulieren können. Eine Bedeutung dieses mehrschichtigen Regulationsmechanismus' liegt mit Sicherheit in der Prävention einer unkontrollierten Aktivierung der ROS-Produktion. Im Kontext des Pollenschlauchwachstums impliziert diese doppelte Regulation durch  $\text{Ca}^{2+}$  zudem die Möglichkeit einer weitaus plastischeren und weniger ortsgebundenen Aktivierung der NAD(P)H-Oxidasen. Wäre allein die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an die EF-Hände für die Aktivierung von RBOHH und RBOHJ verantwortlich, würde als Konsequenz des apikalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten ein ROS-Gradient entstehen, der in seiner zeitlichen und räumlichen Dynamik eng an den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten gebunden wäre. Die zusätzliche



**Abb. 4.2:** *Multiple Sequence-Alignment* der RBOHD, RBOHH und RBOHJ N-Termini. Die kompletten Aminosäuresequenzen wurden über ClustalW verglichen (Larkin et al., 2007). Identische Aminosäuren (AS) sind in rot mit gelber Schattierung, zwischen zwei Sequenzen konservierte AS sind in dunkelblau mit hellblauer Schattierung und AS mit ähnlichen chemischen Eigenschaften sind mit grüner Schattierung angezeigt. Das Ausmaß der jeweiligen N-terminalen regulatorischen Domäne wurde über die Vorhersage der Transmembrantopologie mittels TMHMM bestimmt (Krogh et al., 2001). Die Ca<sup>2+</sup>-Bindeschleifen wurden mit Prosite Scan identifiziert (de Castro et al., 2006). *In vivo*-Phosphorylierungsstellen (P-sites) wurden aus Mayank et al., (2012), (P-site III) Dubiella et al. (2013) (P-Site I, IV-VIII) und Kadota et al., (2014) (P-Site I, II, IV-VII) übernommen.

Phosphorylierung und synergistische Aktivierung durch CDPKs oder RLCKs ermöglicht, in Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation der jeweiligen Kinase, eine noch präzisere räumliche Steuerung der ROS-Produktion.

Interessanterweise findet man die CPK5-abhängige Phosphorylierungsstelle an Ser148 (P-Site IV) nur in RBOHJ und nicht in RBOHH (Abb. 4.2), was möglicherweise daraufhin deutet, dass RBOHH und RBOHJ differenziell durch CDPKs aktiviert werden könnten. Die Phosphorylierungsstelle an Ser77 (in RBOHH) bzw. Ser86 (in RBOHJ) (P-Site III) ist abwesend in RBOHD (Abb. 4.2), weshalb man hier von einem pollenspezifischen Regulationsmechanismus ausgehen kann. Dabei ist prinzipiell sowohl eine negative als auch eine positive Regulation der Enzymaktivität durch Phosphorylierung vorstellbar.

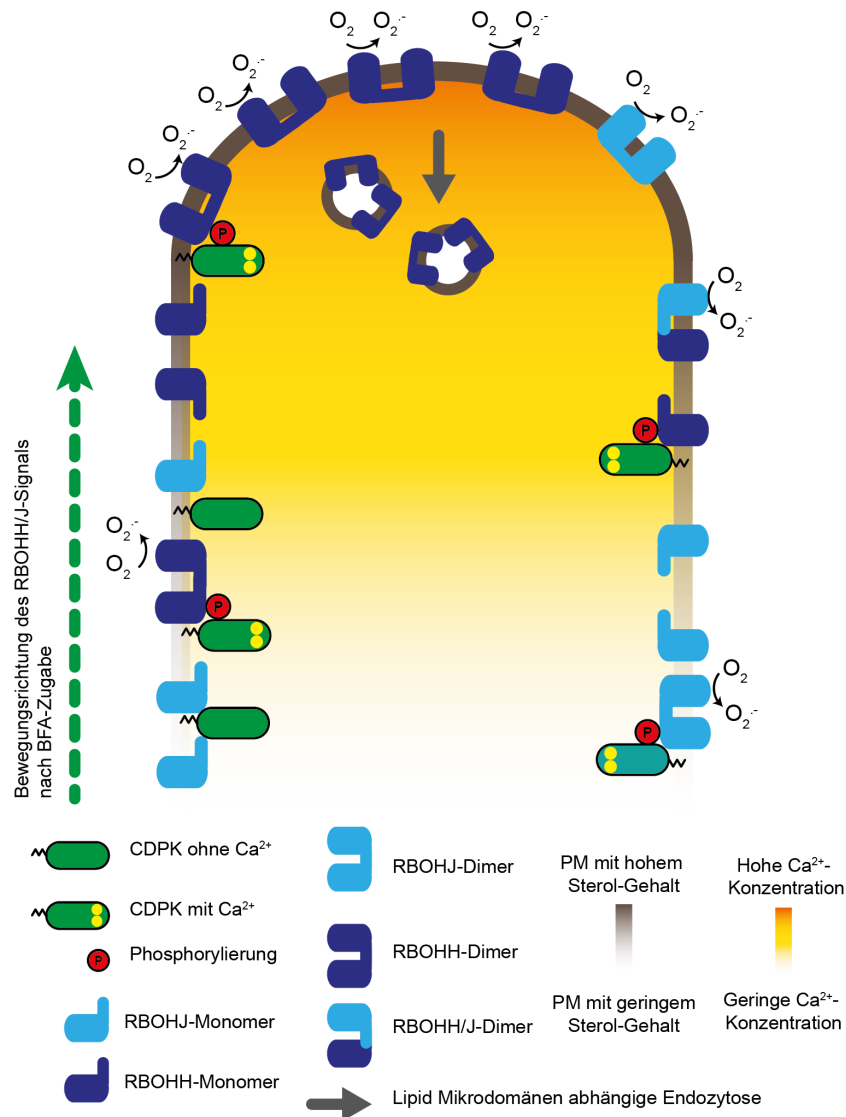
#### 4.2.3 Subzelluläre Lokalisation von RBOHH und RBOHJ

Neben postrationalen Modifikationen hat auch die Lokalisation der NAD(P)H-Oxidasen innerhalb von diskreten Membrankompartimenten einen Einfluss auf deren Aktivität (Hao et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass RBOHH und RBOHJ in distinkten und überlappenden subapikalen Plasmamembran (PM)-Regionen lokalisiert sind. Dabei werden beide Proteine kontinuierlich in der subapikalen Region in die Plasmamembran integriert und wahrscheinlich am Apex über Endozytose internalisiert. Das RBOHH-Signal war auf eine PM-Region von ca. 15  $\mu\text{m}$  relativ zum Apex entlang der Pollenschlauchachse beschränkt, während die RBOHJ-Domäne sich weiter distal erstreckte. Eine mögliche Erklärung für dieses distinkte Lokalisationsmuster ist die unterschiedliche Sensitivität gegenüber der Rekrutierung zur endosomalen Rezyklierung, denn anders als RBOHJ war das RBOHH-Plasmamembransignal nach 20-minütiger BFA-Behandlung vollständig internalisiert.

Die dynamische Lokalisation der NAD(P)H-Oxidase Isoform RBOHD wird sowohl über Clathrin-abhängige als auch Clathrin-unabhängige Endozytose durch Assoziation mit Sterol-reichen Plasmamembranregionen (Lipidmikrodomänen) reguliert (Hao et al., 2014). In *Picea meyeri*-Pollenschläuchen und *Arabidopsis*-Keimlingen wurde gezeigt, dass NAD(P)H-Oxidasen mit Lipidmikrodomänen assoziieren (Liu et al., 2009; Hao et al., 2014). Die Lokalisation innerhalb dieser Lipidmikrodomänen hat auch funktionelle Relevanz, da genetische oder pharmakologische Störung der chemischen Zusammensetzung von Sterol-reichen Plasmamembranregionen die ROS-Produktion beeinträchtigt (Liu et al., 2009; Posé et al., 2009). Lipidmikrodomänen

sind in *P. meyeri*-Pollenschläuchen polar ausgerichtet mit der höchsten Dichte von Sterol-reichen PM-Regionen am Pollenschlauchapex (Liu et al., 2009). Während des Pollenschlauchwachstums bewegen sich RBOHH und RBOHJ in Richtung Apex und damit in die Sterol-reiche Region der Pollenschlauch-Plasmamembran. Dies könnte möglicherweise die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität durch verstärkte Dimerisierung weiter stimulieren (Oda et al., 2010; Hao et al., 2014) (Abb. 4.3). Bei einer Sequestrierung der apikalen Sterole wird dagegen die ROS-Produktion am extremen Apex reduziert (Liu et al., 2009). Die Unterschiede in der subzellulären Verteilung von RBOHH und RBOHJ könnten durch differenzielle Assoziation mit Lipidmikrodomänen verursacht werden. Ein möglicher Mechanismus dafür wäre die differenzielle Phosphorylierung des N-Terminus' (z. B. an P-Site IV; Abb. 4.2), da bekannt ist, dass der Phosphorylierungszustand von RBOHD einen Einfluss auf deren Assoziation mit Sterol-reichen PM-Regionen hat (Hao et al. 2014).

Unklar bleibt jedoch die biologische Implikation der distinkten Lokalisation von RBOHH und RBOHJ, da beide genetisch redundant zu sein scheinen. Letzteres wird unterstützt durch das Fehlen eines Phänotyps in *rboh-1*- und *rboh-2*-Einzelmutanten, sowie durch die Komplementation des *rboh-1 rboh-2*-Phänotyps durch Expression von YFP-RBOHH. Da jedoch keine homozygote *rboh-1*-Linie isoliert werden konnte, ist es dennoch denkbar, dass RBOHJ zusätzliche Funktionen während der Pollenentwicklung ausübt.



**Abb. 4.3:** Schematische Darstellung der RBOHH/J-Lokalisation und der polaren Organisation der Pollenschlauchplasmamembran. NAD(P)H-Oxidasen liegen als Monomere vor, dimerisieren jedoch in Abhängigkeit zur Membranzusammensetzung. Bei höherem Sterolgehalt kommt es zur Dimerisierung (ggf. auch Heterodimerisierung zwischen RBOHH und RBOHJ) und Aktivierung. Die NAD(P)H-Oxidasen werden am Apex endozytiert und in der subapikalen Region in die PM integriert. Zur Vereinfachung sind als stromaufwärts-agierende Kinasen nur CDPKs dargestellt jedoch könnten hier auch RLCKs eine Rolle spielen. Die CDPKs sind mittels eines Myristoyl/Palmitoylankers mit der PM assoziiert.

### 4.3 $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige ROS-Produktion – ROS-abhängiger $\text{Ca}^{2+}$ -Influx?

Pflanzliche Zellen reagieren auf diverse externe und interne Stimuli (z. B. Kälte, Pathogene, Pflanzenhormone) mit einer raschen Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Zhu et al., 2013). Während des polaren Zellwachstums in Pollenschläuchen und Wurzelhaaren kommt es, anders als bei der Stimulus-abhängigen Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, zu einem scheinbar kontinuierlichem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom an der jeweiligen Zellspitze. Jedoch ist in beiden Fällen die molekulare Identität der für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx hauptverantwortlichen Ionenkanäle nicht bekannt. Einige Autoren postulieren die Existenz eines ROS-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals, der eine zentrale Funktion sowohl in der Stimulus-abhängigen als auch Stimulus-unabhängigen  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zyt}}$ -Erhöhung erfüllt (Pei et al., 2000; Foreman et al., 2003; Demidchik et al., 2007). In zwei unabhängigen Studien aus dem Jahr 2013 und 2014 wurde gezeigt, dass die zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in *rboh* *rbohj*-Pollenschläuchen signifikant reduziert ist (Boisson-Dernier et al., 2013) und, dass durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Hydroxyl-Radikalen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Pollenschläuchen erhöht wird (Duan et al., 2014). Diese experimentellen Daten belegen jedoch nicht zwingend die Existenz eines ROS-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals in Pollenschläuchen.

In der Studie von Boisson-Dernier et al. (2013) wurde der ratiometrische  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor YC3.6 verwendet und wie in der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Reduktion der cpVenus/ECFP-Ratiowerte in *rboh* *rbohj*-Pollenschläuchen beobachtet. In beiden Fällen hatte diese Reduktion keine Auswirkungen auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten, d.h. die relativen Ratiowerte waren in beiden Genotypen vergleichbar. Im Falle der vorliegenden Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass das Expressionslevel des  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensors in der *rboh* *rbohj*-Mutante um das Dreifache reduziert ist. Problematisch wird dies, wenn der Zusammenhang zwischen dem emittierten Signal der Probe und dem vom Mikroskopdetektor wahrgenommenen Signal nicht linear ist. In der Tat ist das ein bekanntes Problem des Leica TCS SP5-Detektors, welcher in dieser Arbeit, aber auch in der Studie von Boisson-Dernier et al. (2013) verwendet wurde. Die Nichtlinearität des Detektors führt dazu, dass FRET- aber auch FRAP-Werte von Proben mit geringem Fluoreszenzsignal im Vergleich zur Kontrolle niedriger sind. Es ist also möglich, dass die Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in *rboh* *rbohj*-Pollenschläuchen, wie sie Boisson-Dernier et al. (2013) beobachten, tatsächlich auf einem technischen Artefakt beruht und nicht durch einen biologischen Effekt verursacht wird.

In der Studie von Duan et al. (2014) wurde ebenfalls YC3.6 verwendet um Ver-

änderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Hydroxyl-Radikal zu messen. Kurz nach der Zugabe von ROS wurde in beiden Fällen ein massiver Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zyt}}$  beobachtet, unmittelbar gefolgt von Pollenschlauchplatzen. Die Autoren der Studie postulieren daher, dass i) ROS einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal aktiviert und ii) der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom den Pollenschlauchkollaps verursacht. Jedoch zeigen die Autoren keine den Fluoreszenzdaten korrespondierenden Durchlichtbilder, wodurch Aussagen über die Herkunft des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms nicht möglich sind. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde kommt es bei kleinen Beschädigungen an der Pollenschlauch-Zellwand und -Zellmembran zu einer massiven Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, oft gefolgt von Pollenschlauchplatzen. Es ist demnach denkbar, dass der von Duan et al. (2014) beobachtete  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch eine Beschädigung der Zellintegrität hervorgerufen wird, verursacht durch die Zugabe von hohen Mengen  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Hydroxyl-Radikal (Fry, 1998; Miller und Fry, 2001; Schopfer, 2001).

Die Existenz eines ROS-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals in Pollenschläuchen ist aufgrund der vorangegangenen Argumente noch nicht belegt. Die Annahme, dass dieser existiere stützt sich daher hauptsächlich auf Daten anderer Zellsysteme. In einer einflussreichen Studie von 2003 wurde beispielsweise gezeigt, dass Wurzelhaare der *rbohC*-Mutante keinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten vorweisen (Foreman et al., 2003). Wie sich jedoch herausstellte, sind der Verlust des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten und die fehlende ROS-Produktion in *rbohC*-Mutanten nicht unbedingt kausal miteinander verbunden (Monshausen et al., 2007).

Elektrophysiologische Experimente in Schließzellen zeigten, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  Zugabe bestimmte Einwärtsströme verstärkt, die als  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme identifiziert wurden (Pei et al., 2000; Kwak et al., 2003). Diese Studien belegen, dass sich die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als Antwort auf ROS-Zugabe erhöht. Es bleibt jedoch offen, in wie weit die exogene ROS-Zugabe der endogenen NAD(P)H-Oxidase vermittelten ROS-Produktion, die als primäres Produkt Superoxid-Anion-Radikal hervorbringt, entspricht. In diesem Zusammenhang besonders bemerkenswert ist die Studie von Ranf et al. (2011), in der die frühe zelluläre Antwort auf den bakteriellen Elizitor *flg22* analysiert wurde. Nach *flg22*-Behandlung reagieren Pflanzen mit einer raschen, NAD(P)H-Oxidase-abhängigen Produktion von ROS (*oxidative Burst*) und einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Die *flg22*-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Antwort entspricht einer Kurve mit zwei aufeinander folgenden  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zyt}}$ -Maxima gefolgt von einem raschen Abfall der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. In *rbohD*-Mutanten fehlt



der *flg22*-abhängige *oxidative Burst* vollständig, doch ist im Fall der *flg22*-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung nur das zweite  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Zyt}}$ -Maximum betroffen. NAD(P)H-Oxidasen werden demnach nicht grundsätzlich für die Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen benötigt, sondern modulieren scheinbar deren Aktivität.

Bisher konnte in keiner Studie gezeigt werden, dass der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom während des polaren Zellwachstums von Wurzelhaaren oder Pollenschläuchen die Aktivität von NAD(P)H-Oxidasen benötigt, da der charakteristische  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient in allen relevanten *rboh*-Mutanten vorhanden war. Trotzdem wurde die Existenz einer Vorwärtskopplung postuliert, bei der  $\text{Ca}^{2+}$  die ROS-Produktion stimuliert, wodurch wiederum ROS-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle aktiviert werden. Dieser Mechanismus würde den kontinuierlichen apikalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom verursachen. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass i) bei Verlust der NAD(P)H-Oxidasen  $\text{Ca}^{2+}$  nach wie vor einströmt, ii) dieser Einstrom mit der Wachstumsdynamik korreliert, also  $\text{Ca}^{2+}$  wachstumsabhängig einströmt, iii) ROS ein negativer Regulator des polaren Zellwachstums ist und iv) wachsende WT-Pollenschläuche eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation mit einer Periode von 10 s zeigen. Zusammengefasst deuten diese Beobachtungen vielmehr auf die Existenz einer negativen Rückkopplung. Dabei dringt  $\text{Ca}^{2+}$  durch Zellexpansion und der damit verbundenen Öffnung mechanosensitiver  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in die Zelle ein und aktiviert anschließend die apikalen NAD(P)H-Oxidasen, wodurch der Pollenschlauch verlangsamt wird. Das verringert den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  und resultiert in der Deaktivierung der NAD(P)H-Oxidasen. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus verbindet die Zellexpansion mit der ROS vermittelten Verlangsamung des Wachstums und stellt demnach eine Art zellulären Tempomat dar. Allerdings bleibt es offen, ob die bei *Col-0*-Pollenschläuchen beobachtete Hochfrequenz- $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation in *rboh-1 rboh-2*-Mutanten noch vorhanden ist.

#### 4.4 Die Molekulare Funktion von ROS während des Pollenschlauchwachstums

Die übergeordnete Funktion der NAD(P)H-Oxidasen RBOHH und RBOHJ ist die Regulation der Wachstumsgeschwindigkeit während der Pollenschlauchelongation, jedoch ist unklar welche chemischen Komponenten dabei von Superoxid-Anion-Radikalen bzw. Wasserstoffperoxid modifiziert werden. Die Erhöhung der Zellelongationsrate in *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen deutet auf eine mögliche Funktion von ROS in der Verfestigung der Zellwand hin. Die oxidative Modifikation von Zellwandkomponenten kann prinzipiell sowohl erhärtend als auch aufweichend wirken

(Passardi et al., 2004). Zellwandpolymere können z. B. durch Hydroxyl-Radikale gespalten werden, die über eine Fenton-Reaktion aus  $H_2O_2$  generiert werden können (Schopfer, 2001). Dagegen kann durch oxidative Quervernetzung von Extensinen oder Arabinogalactan-Proteinen (AGPs) die Zellwand erhärten (Brownleader et al., 1995; Kjellbom et al., 1997; Ribeiro et al., 2006; Pereira et al., 2011).

Extensine und AGPs gehören zu den Hydroxyprolin-reichen Glykoproteinen (HRGP), einer diversen Klasse von hochgradig (AGPs) und moderat glykolysierten (Extensine) Proteinen, die bis zu 20 % des Zellwandtrockengewichts ausmachen können (Kieliszewski und Shpak, 2001). HRGPs bestehen aus einem Proteinrückgrat mit für die jeweilige Klasse charakteristischen repetitiven Aminosäuremotiven, die reich an O-glykosyliertem Hydroxyprolin sind. Die Polysaccharid-Seitenketten der AGPs bestehen aus bis zu 150 Zuckermolekülen, darunter hauptsächlich Arabinose und Galactose aber auch anderen Zuckerresten wie Fucose (Seifert und Roberts, 2007). Zusätzlich zu ihrer möglichen Funktion während der Pathogenabwehr (Brisson et al., 1994; Wei und Shirsat, 2006; Deepak et al., 2007) sind Extensine und AGPs auch in Entwicklungsprozesse wie z. B. Zellelongation involviert (Yang et al., 2007; Velasquez et al., 2011).

Mittels AGP- und Extensin-spezifischer Antikörper wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob der Verlust der NAD(P)H-Oxidase vermittelten ROS-Produktion einen Einfluss auf Zellwandglykoproteine hat. Die Verteilung von AGPs und Extensinen in *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuchen war unverändert im Vergleich zum WT. Nach enzymatischem Abbau von Pektin und Cellulose wurden sowohl anti-Extensin (mAb JIM11) als auch anti-AGP (mAb MAC207) reaktive Epitope von der Zellwand entfernt. Auffallend war, dass in einem Großteil der *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche die MAC207-reaktiven Epitope resistent gegenüber dem Zellwandabbau waren. AGPs sind sowohl über einen GPI-Anker mit der Plasmamembran assoziiert als auch kovalent mit anderen Zellwandpolysacchariden wie Pektin verbunden (Showalter et al., 2010; Tan et al., 2013). Zudem konnte gezeigt werden das AGPs nach Verwundungsstimulus und in Abhängigkeit von  $H_2O_2$  zu größeren Komplexen aggregieren (Kjellbom et al., 1997). Es wurde spekuliert, dass die ROS-abhängige Komplexbildung der AGPs in Analogie zu der Extensin-Quervernetzung durch di-Tyrosin Brücken vermittelt wird (Kjellbom et al., 1997; Held et al., 2004).

NAD(P)H-Oxidasen könnten zusammen mit Zellwand-Peroxidasen an der Formation dieser quervernetzten AGP-Komplexe beteiligt sein. Ein Abbau der Zellwand mittels Pektinasen und Cellulasen würde so nicht nur individuelle, mit Pektinen kovalent

---

---

verbundene AGPs entfernen, sondern gleichzeitig die untereinander quervernetzten AGPs ablösen. Letztere wären bei Verlust der ROS-Produktion weniger anfällig gegenüber Zellwandabbau und würden ggf. weiter mit der äußeren Plasmamembran assoziiert bleiben. Um dieses Szenario zu überprüfen bedarf es allerdings noch zusätzlicher und unabhängiger Experimente.

#### 4.5 *In vivo* Detektion von ROS

Ein zentrales Hindernis für die funktionelle Charakterisierung von pflanzlichen NAD(P)H-Oxidasen ist das Fehlen von adäquaten ROS-Sensoren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete NBT-Färbung hat sich zwar über die Jahre als verlässliche Methode zur Bestimmung der Superoxidproduktion in pflanzlichen Geweben erwiesen, jedoch ermöglicht NBT keine Aussagen über deren Dynamik und genaue subzelluläre Lokalisation, da es keine Lebendzellfärbung ist. Für die Messung von ROS in lebenden Zellen werden Chemilumineszenz- oder Fluoreszenz-Methoden verwendet. Die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase RBOHD kann z. B. nach flg22-Stimulus in Blattscheiben oder Keimlingen über eine Luminol-Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*; HRP)-Reaktion detektiert werden (Keppler et al., 1989; Gómez-Gómez et al., 1999). Dabei wird durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermittelte Oxidation des Luminols, katalysiert durch die HRP, Licht emittiert, was über ein Luminometer gemessen werden kann. Für eine subzelluläre und dynamische Detektion von ROS ist diese Methode jedoch ungeeignet, da die Intensität des emittierten Lichts für die meisten Mikroskopdetektoren zu gering ist. In Pollenschläuchen, Wurzelhaaren aber auch Schließzellen, wurde stattdessen H<sub>2</sub>DCFDA (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetat) benutzt, welches nach Oxidation irreversibel in das stark fluoreszierende DCF (2', 7'-Dichlorofluorescein) überführt wird (Kim et al., 2006; Potocký et al., 2007; Desclos-Theveniau et al., 2012). Aufgrund der Irreversibilität der Reaktion ist die Messung dynamischer ROS-Produktion mit H<sub>2</sub>DCFDA nicht möglich.

Belousov et al. (2006) generierten daher einen genetisch-kodierten, fluoreszierenden ROS-Sensor, genannt HyPer, der die ROS-Produktion in lebenden Zellen dynamisch messen kann. HyPer basiert auf einem zirkulär permutierten YFP (cpYFP) fusioniert mit einer ROS sensitiven OxyR-Domäne aus *Escherichia coli* (Belousov et al., 2006). Wie YC3.6 kann HyPer als ratiometrischer Sensor verwendet werden, da es zwei Anregungsmaxima besitzt, die sich durch Oxidation von zwei Thiolresten innerhalb der OxyR-Domäne verschieben. Unter sequentieller Anregung mit den Wellenlängen dieser beiden Maxima, bei gleichzeitiger Detektion einer Emissionswellenlänge können

so Ratiobilder generiert werden. In Pflanzen wurde HyPer verwendet um Änderungen der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration in Peroxisomen und Zytoplasma zu messen (Costa et al., 2010). Boisson-Dernier et al. (2013) exprimierten HyPer in Col-0-Pollenschläuchen und konnten dadurch die Dynamik der ROS-Produktion während des Pollenschlauchwachstums beschreiben.

Ein kritischer Faktor bei der Interpretation von HyPer-Signalen ist dessen pH-Sensitivität (Belousov et al., 2006; Roma et al., 2012). Im Falle der HyPer-Expression in Pollenschläuchen fällt dabei die polare Verteilung des HyPer-Signals auf (Boisson-Dernier et al. 2013): Minimale HyPer-Ratio (ROS-Konzentration) an der Pollenschlauchspitze und maximale HyPer-Ratio in der distalen Region. NBT- und  $\text{H}_2\text{-DCFDA}$ -Färbungen zeigen jedoch eine entgegengesetzte Verteilung von intra- und extrazellulärem ROS (Potocký et al., 2007, 2012). Daher ist anzunehmen, dass HyPer in diesem Fall nicht die Verteilung von ROS anzeigt, sondern Regionen mit unterschiedlichem pH (Feijó et al., 1999). Die pH-Sensitivität von HyPer schränkt dessen Verwendbarkeit als ROS-Sensor fundamental ein, weshalb einige Autoren vorschlagen HyPer nur unter gleichzeitiger Messung des intrazellulären pH zu benutzen (Meyer and Dick 2010).

Die chemischen Eigenschaften von ROS erschweren das Design eines effektiven Sensors. Bei den verfügbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren (z. B. YC3.6 oder R-GECO) bindet  $\text{Ca}^{2+}$  reversibel an Calmodulin-Domänen, wodurch intramolekularer FRET (YC3.6) oder eine Veränderung der Signalintensität (R-GECO) verursacht wird. Das jeweilige Signal des Reporters verändert sich damit dynamisch in Abhängigkeit der umgebenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Anders als bei den  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren ist bei einem ROS-Sensor die Perzeption mit einer chemischen Veränderung Sensors selbst verbunden. Damit HyPer als reversibler ROS-Sensor fungieren kann, muss die durch Oxidation entstandene Disulfid-Brücke in der OxyR-Domäne reduziert werden. In *E. coli* wird die Reduktion des OxyR-Transkriptionsfaktors durch das Glutathion-System vermittelt, weshalb man davon ausgeht, dass auch HyPer durch Glutaredoxin reduziert wird (Zheng et al., 1998; Meyer und Dick, 2010). Die Reversibilität von HyPer und damit dessen Signalintensität ist daher abhängig von der Verfügbarkeit von NAD(P)H und reduziertem Glutathion. Eine Störung des Glutathion-Systems würde bei gleichbleibender  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration zu einer Erhöhung des HyPer-Signals führen (Meyer und Dick, 2010). Damit ist HyPer ein Sensor des generellen Redox-Status der Zelle und nicht spezifisch für NAD(P)H-Oxidase vermittelte ROS-Produktion.

Für die Untersuchung von extrazellulärer ROS-Produktion insbesondere von Super-

---

---

oxid-Anion-Radikal -Synthese gibt es, bis auf das weiter oben diskutierte OxyBurst<sup>®</sup>-Green (siehe Abschnitt 3.5), wenig experimentelle Alternativen. Die Sensitivität von Eisen-Schwefel-Clustern gegenüber  $O_2^{\cdot-}$  ist ein möglicher Ansatzpunkt für die Entwicklung von Superoxid-spezifischen, genetisch-kodierten Sensoren (Lukyanov und Belousov, 2014). Um ein Fluoreszenzprotein auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran zu verankern, kann man eine Transmembrandomäne (TM23) des *Homo sapiens* lysosomalen Proteins LAMP1 verwenden (Martinière et al., 2012). Eine Fusion von TM23 mit einem ROS-Sensor könnte die extrazelluläre Detektion von ROS auf subzellulärer Ebene ermöglichen. Allerdings bleiben auch hier die diskutierten Probleme in Bezug auf pH und Reversibilität bestehen.

Eine mögliche Alternative für die Messung der RBOH-Aktivität könnte die Bestimmung der NAD(P)H-Oxidationsrate sein. Cardenas et al. (2006) machten sich die Autofluoreszenz von NAD(P)H zu nutze um NAD(P)H-Oszillationen in *L. longiflorum*-Pollenschläuchen zu visualisieren. Das stärkste NAD(P)H-Signal war, ähnlich wie die NAD(P)H-Oxidasen in *Arabidopsis*, innerhalb der subapikalen Region lokalisiert und intensiviert sich nach DPI-Zugabe. Da NAD(P)H autofluoresziert, nicht aber die oxidierte Form  $NAD(P)^+$ , ist diese Methode minimal invasiv und würde eine dynamische Messung ermöglichen. Allerdings ist zu beachten, dass NAD(P)H an einer Vielzahl von metabolischen Prozessen beteiligt ist und wahrscheinlich fungiert nur ein kleiner Bruchteil der zellulären Gesamtmenge als Elektronendonator für RBOH-Proteine. Mit der in dieser Arbeit charakterisierten *rboh-1 rboh-2* Doppelmutante ließe sich jedoch leicht überprüfen, ob die von Cardenas et al. (2006) beobachtete NAD(P)H-Fluktuation eine oszillatorische Aktivierung von NAD(P)H-Oxidasen reflektiert. Nichtsdestotrotz bleibt die Entwicklung von spezifischen ROS-Sensoren eine Herausforderung für die Zukunft.

#### 4.6 Ausblick

Anhand der in dieser Arbeit generierten experimentellen Daten wird postuliert, dass die pollenspezifischen NAD(P)H-Oxidasen RBOHH und RBOHJ als negative Regulatoren des Pollenschlauchwachstums fungieren, vermutlich durch oxidative Modifikation von Zellwandkomponenten. Die detaillierte phänotypische Charakterisierung der *rboh-1 rboh-2*-Pollenschläuche erlaubt generelle Aussagen über die Funktion von RBOHH und RBOHJ zu treffen, allerdings ist der molekulare Mechanismus durch den  $O_2^{\cdot-}$  das Pollenschlauchwachstum verlangsamt noch unbekannt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Zellwandmarkierungen bieten einen ersten möglichen Hinweis

---

---

auf eine oxidative Modifikation von spezifischen Zellwandkomponenten. Nichtsdestotrotz ist eine unabhängige Bestätigung dieser Ergebnisse durch chemische Analyse der entsprechenden Zellwandkomponenten aufgrund der schlechten Zugänglichkeit des biologischen Materials vorerst nicht absehbar.

Um dennoch Einblicke in die molekulare Funktion des NAD(P)H-Oxidase produzierten  $O_2^{\cdot -}$  zu erlangen, bedarf es daher genetischer Ansätze. Lee et al. (2013) identifizierten eine Klasse-III-Peroxidase (PER64), die zusammen mit RBOHF für die oxidative Polymerisierung von Lignin verantwortlich ist. Eine durch Klasse-III-Peroxidasen-vermittelte Quervernetzung von anderen Zellwandkomponenten (z. B. HRGPs) stellt damit einen möglichen Mechanismus zur Zellwandeinhärtung dar (Brown et al., 1998; Daudi et al., 2012). RBOHH und RBOHJ könnten dabei im Pollenschlauchpoplast, ähnlich wie RBOHF in der Wurzelendodermis, das  $H_2O_2$  für die Peroxidase-Reaktion liefern (Lee et al., 2013). Der distinkte Wachstumsphänotyp von *rboh1 rboh2*-Mutanten und DPI-behandelten Col-0-Pollenschläuchen sollte dabei die Identifikation von NAD(P)H-Oxidase-abhängigen Reaktionskomponenten erleichtern. Falls Pollenschlauch-exprimierte Klasse-III-Peroxidasen für die ROS-vermittelte Zellwandeinhärtung benötigt werden, müsste pharmakologische Inhibition der Peroxidaseaktivität mittels Salicylhydroxamsäure den *rboh1 rboh2*-Wachstumsphänotyp rekapitulieren. Ähnliches gilt für die entsprechenden Einzel- oder Mehrfachmutanten der pollenspezifischen Klasse-III-Peroxidasen.

Die in dieser Arbeit hergestellten Mutanten-Linien bieten den Idealen Ausgangspunkt um nähere Erkenntnisse über die Regulation von RBOHH/J zu gewinnen. Der bereits makroskopisch sichtbare *rboh1-1 rboh2-2*-Phänotyp erlaubt z. B. die Identifikation von funktional relevanten Phosphorylierungsstellen innerhalb von RBOHH und RBOHJ durch Komplementationsexperimente mit entsprechenden Enzymvarianten. Im Gegensatz dazu wird sich die genetische Identifikation von stromaufwärts liegenden Kinasen bedeutend schwieriger gestalten. Im Idealfall würden Mutanten von RBOHH/J-spezifischen Kinasen (z. B. CDPKs oder RLCKs) einen *rboh1 rboh2*-ähnlichen Pollenphänotyp zeigen, jedoch ist dies, insbesondere bei Kinasen mit mehreren Zielproteinen, eher unwahrscheinlich. Alternativ könnten NAD(P)H-Oxidase-Aktivitätstest in heterologen Expressionssystemen wie HEK293-Zellen oder *Nicotiana benthamiana*-Blättern die Identifikation möglicher stromaufwärts-Kinasen erleichtern. Aufgrund derartiger funktioneller Daten und den bereits bekannten Phosphorylierungsstellen könnte man gezielte massenspektrometrische Analysen (z. B. mittels *selected reaction monitoring*; SRM) mit den entsprechenden Mutanten durchfüh-

ren, um differenziell phosphorylierte Aminosäurereste zu finden. Die YFP-RBOHH und mCherry-RBOHJ co-exprimierende *Arabidopsis*-Linie eignet sich zudem für eine Untersuchung der potenziellen Assoziation von NAD(P)H-Oxidasen mit Lipidmikrodomänen. Nach pharmakologischer Sequestrierung von Membran-Sterolen (z.B mit Fillipin) könnte man die Lokalisation beider NAD(P)H-Oxidase Isoformen analysieren und ggf. Rückschlüsse auf deren differenzielle Lokalisation in Abhängigkeit zur Membranzusammensetzung ziehen.

Der Fokus dieser Arbeit lag hauptsächlich auf der Funktion von ROS während des Pollenschlauchwachstums. Dass ROS vermutlich auch während der Pollenkeimung wichtig sind, illustriert die NBT-Färbung, die lokalisierte Superoxid-Anion-Radikal-Produktion in ungekeimten Pollenkörnern sowohl von Col-0 als auch *rboh-1 rboh-2* zeigte. Bestätigt wurde dies durch pharmakologische Experimente mit Kiwipollen (Speranza et al., 2012). Ob die hier charakterisierten NAD(P)H-Oxidasen ebenfalls an der Pollenkeimung beteiligt sind, bleibt noch offen, da sich die Bestimmung der Pollenkeimungsrate in der Doppelmutante als besonders problematisch erwies. Bezeichnend ist jedoch, dass Pollenkeimung in *rboh-1 rboh-2* noch stattfinden konnte, was auf eine zusätzliche RBOH-Isoform hindeuten könnte, die an der Pollenschlauchinitiation beteiligt ist. Microarray- und RNA-seq-Expressionsdaten haben bisher nur RBOHH und RBOHJ als pollenspezifische NAD(P)H-Oxidasen identifizieren können. Allerdings fand eine massenspektrometrische Analyse des *Arabidopsis* Pollen-Proteoms zusätzlich ein RBOHA-Peptid (Grobei et al., 2009). Die Funktion von RBOHA wurde bisher nicht näher untersucht. Microarray Transkriptomdaten deuten auf eine Expression in Wurzeln hin (Zimmermann et al. 2004), was eine mögliche Rolle in der Pollenkeimung jedoch nicht prinzipiell ausschließt.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit ein kritischer Grundstein für die weitere funktionelle Analyse der pollenspezifischen NAD(P)H-Oxidasen gelegt. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sind nicht begrenzt auf Pollenbiologie, sondern haben auch wichtige Implikationen für andere biologische Prozesse in denen ROS eine zentrale Rolle spielen.

---



---

## 5 Literatur

- Akerboom, J., Rivera, J. D. V., Guilbe, M. M. R., Malavé, E. C. A., Hernandez, H. H., Tian, L., Hires, S. A., Marvin, J. S., Looger, L. L. und Schreiter, E. R. (2009), ‘Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design’, *J Biol Chem* **284**(10), 6455–64.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C. und Ecker, J. R. (2003), ‘Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*’, *Science* **301**(5633), 653–7.
- Amien, S., Kliwer, I., Marton, M. L., Debener, T., Geiger, D., Becker, D. und Dresselhaus, T. (2010), ‘Defensin-like ZmES4 mediates pollen tube burst in maize via opening of the potassium channel KZM1.’, *PLoS Biol* **8**(6), e1000388.
- Asada, K. (1999), ‘The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons’, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**, 601–639.
- Babior, B. M. (1999), ‘NADPH oxidase: an update’, *Blood* **93**(5), 1464–76.
- Becker, D., Geiger, D., Dunkel, M., Roller, A., Bertl, A., Latz, A., Carpaneto, A., Dietrich, P., Rolfsema, M. R. G., Voelker, C., Schmidt, D., Mueller-Roeber, B., Czempinski, K. und 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’, *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(44), 15621–6.
- Belousov, V. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Staroverov, D. B., Shakhbazov, K. S., Terskikh, A. V. und Lukyanov, S. (2006), ‘Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide’, *Nat Methods* **3**(4), 281–6.
- Benov, L. (2001), ‘How superoxide radical damages the cell’, *Protoplasma* **217**(1-3), 33–6.
- Berridge, M. V., Herst, P. M. und Tan, A. S. (2005), ‘Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction’, *Biotechnol Annu Rev* **11**, 127–52.
- Boavida, L. C. und McCormick, S. (2007), ‘Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*’, *Plant J* **52**(3), 570–82.
- Boisson-Dernier, A., Kessler, S. A. und Grossniklaus, U. (2011), ‘The walls have ears: the role of plant CrRLK1Ls in sensing and transducing extracellular signals’, *J Exp Bot* **62**(5), 1581–91.
- Boisson-Dernier, A., Lituiev, D. S., Nestorova, A., Franck, C. M., Thirugnanarajah, S. und Grossniklaus, U. (2013), ‘ANXUR receptor-like kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases’, *PLoS Biol* **11**(11), e1001719.



- 
- 
- Boisson-Dernier, A., Roy, S., Kritsas, K., Grobei, M. A., Jaciubek, M., Schroeder, J. I. und Grossniklaus, U. (2009), ‘Disruption of the pollen-expressed FERONIA homologs ANXUR1 and ANXUR2 triggers pollen tube discharge’, *Development* **136**(19), 3279–88.
- Brisson, L. F., Tenhaken, R. und Lamb, C. (1994), ‘Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance’, *Plant Cell* **6**(12), 1703–1712.
- Brown, I., Trethowan, J., Kerry, M., Mansfield, J. und Bolwell, G. P. (1998), ‘Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and french bean mesophyll cells’, *The Plant Journal* **15**(3), 333–343.
- Brownleader, M. D., Ahmed, N., Trevan, M., Chaplin, M. F. und Dey, P. M. (1995), ‘Purification and partial characterization of tomato extensin peroxidase’, *Plant Physiol* **109**(3), 1115–1123.
- Cao, F.-Q., Werner, A. K., Dahncke, K., Romeis, T., Liu, L.-H. und Witte, C.-P. (2010), ‘Identification and characterization of proteins involved in rice urea and arginine catabolism’, *Plant Physiol* **154**(1), 98–108.
- Cárdenas, L., Lovy-Wheeler, A., Kunkel, J. G. und Hepler, P. K. (2008), ‘Pollen tube growth oscillations and intracellular calcium levels are reversibly modulated by actin polymerization’, *Plant Physiol* **146**(4), 1611–21.
- Cárdenas, L., McKenna, S. T., Kunkel, J. G. und Hepler, P. K. (2006), ‘NAD(P)H oscillates in pollen tubes and is correlated with tip growth’, *Plant Physiol* **142**(4), 1460–8.
- Chebli, Y., Kaneda, M., Zerzour, R. und Geitmann, A. (2012), ‘The cell wall of the *Arabidopsis* pollen tube—spatial distribution, recycling, and network formation of polysaccharides’, *Plant Physiol* **160**(4), 1940–55.
- Chebli, Y., Kroeger, J. und Geitmann, A. (2013), ‘Transport logistics in pollen tubes’, *Mol Plant* **6**(4), 1037–52.
- Cheng, S.-H., Willmann, M. R., Chen, H.-C. und Sheen, J. (2002), ‘Calcium signaling through protein kinases. the *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family’, *Plant Physiol* **129**(2), 469–85.
- Cheung, A. Y., Boavida, L. C., Aggarwal, M., Wu, H.-M. und Feijó, J. A. (2010), ‘The pollen tube journey in the pistil and imaging the in vivo process by two-photon microscopy’, *J Exp Bot* **61**(7), 1907–15.
- Cheung, A. Y. und Wu, H.-M. (2008), ‘Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes’, *Annu Rev Plant Biol* **59**, 547–72.
- Cheung, A. Y. und Wu, H.-M. (2011), ‘THESEUS 1, FERONIA and relatives: a family of cell wall-sensing receptor kinases?’, *Curr Opin Plant Biol* **14**(6), 632–41.

- 
- 
- Cole, R. A. und Fowler, J. E. (2006), 'Polarized growth: maintaining focus on the tip', *Curr Opin Plant Biol* **9**(6), 579–88.
- Costa, A., Drago, I., Behera, S., Zottini, M., Pizzo, P., Schroeder, J. I., Pozzan, T. und Lo Schiavo, F. (2010), 'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plant peroxisomes: an *in vivo* analysis uncovers a Ca<sup>2+</sup>-dependent scavenging system', *Plant J* **62**(5), 760–72.
- Cross, A. R. und Jones, O. T. (1986), 'The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. specific labelling of a component polypeptide of the oxidase', *Biochem J* **237**(1), 111–6.
- Dardelle, F., Lehner, A., Ramdani, Y., Bardor, M., Lerouge, P., Driouich, A. und Mollet, J.-C. (2010), 'Biochemical and immunocytological characterizations of *Arabidopsis* pollen tube cell wall', *Plant Physiol* **153**(4), 1563–76.
- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J. A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F. M. und Bolwell, G. P. (2012), 'The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern-triggered immunity', *Plant Cell* **24**(1), 275–87.
- Daxinger, L., Hunter, B., Sheikh, M., Jauvion, V., Gascioli, V., Vaucheret, H., Matzke, M. und Furner, I. (2008), 'Unexpected silencing effects from T-DNA tags in *Arabidopsis*', *Trends Plant Sci* **13**(1), 4–6.
- de Castro, E., Sigrist, C. J. A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Bairoch, A. und Hulo, N. (2006), 'ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins', *Nucleic Acids Res* **34**(Web Server issue), W362–5.
- Deepak, S., Shailasree, S., Kini, R. K., Hause, B., Shetty, S. H. und Mithöfer, A. (2007), 'Role of hydroxyproline-rich glycoproteins in resistance of pearl millet against downy mildew pathogen *Sclerospora graminicola*', *Planta* **226**(2), 323–33.
- del Río, L. A., Sandalio, L. M., Altomare, D. A. und Zilinskas, B. A. (2003), 'Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence', *J Exp Bot* **54**(384), 923–33.
- Demidchik, V., Shabala, S. N. und Davies, J. M. (2007), 'Spatial variation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal Ca<sup>2+</sup> flux and plasma membrane Ca<sup>2+</sup> channels', *Plant J* **49**(3), 377–86.
- Desclos-Theveniau, M., Arnaud, D., Huang, T.-Y., Lin, G. J.-C., Chen, W.-Y., Lin, Y.-C. und Zimmerli, L. (2012), 'The *Arabidopsis* lectin receptor kinase LecRK-V.5 represses stomatal immunity induced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000', *PLoS Pathog* **8**(2), e1002513.
- Doke, N. (1983), 'Involvement of superoxide-anion generation in the hypersensitive response of potato-tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components', *Physiological Plant Pathology* **23**(3), 345–357.

- 
- 
- Drerup, M. M., Schlücking, K., Hashimoto, K., Manishankar, P., Steinhorst, L., Kuchitsu, K. und Kudla, J. (2013), ‘The Calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the *Arabidopsis* NADPH oxidase RBOHF’, *Mol Plant* **6**(2), 559–69.
- Duan, Q., Kita, D., Johnson, E. A., Aggarwal, M., Gates, L., Wu, H.-M. und Cheung, A. Y. (2014), ‘Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in *Arabidopsis*’, *Nat Commun* **5**, 3129.
- Duan, Q., Kita, D., Li, C., Cheung, A. Y. und Wu, H.-M. (2010), ‘FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development’, *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(41), 17821–6.
- Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komander, E., Lassig, R., Witte, C.-P., Schulze, W. X. und Romeis, T. (2013), ‘Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation’, *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(21), 8744–9.
- Dutta, R. und Robinson, K. R. (2004), ‘Identification and characterization of stretch-activated ion channels in pollen protoplasts’, *Plant Physiol* **135**(3), 1398–406.
- Edwards, K., Johnstone, C. und Thompson, C. (1991), ‘A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis’, *Nucleic Acids Res* **19**(6), 1349.
- El-Benna, J., Dang, P. M.-C., Gougerot-Pocidallo, M. A., Marie, J. C. und Braut-Boucher, F. (2009), ‘p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases’, *Exp Mol Med* **41**(4), 217–25.
- Escobar-Restrepo, J.-M., Huck, N., Kessler, S., Gagliardini, V., Gheyselinck, J., Yang, W.-C. und Grossniklaus, U. (2007), ‘The FERONIA receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception’, *Science* **317**(5838), 656–60.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J. und Zollner, H. (1991), ‘Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes’, *Free Radic Biol Med* **11**(1), 81–128.
- Fan, L. M., Wang, Y. F., Wang, H. und 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**(361), 1603–14.
- Farmer, E. E. und Mueller, M. J. (2013), ‘ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling’, *Annu Rev Plant Biol* **64**, 429–50.
- Feijó, J. A., Sainhas, J., Hackett, G. R., Kunkel, J. G. und Hepler, P. K. (1999), ‘Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip’, *J Cell Biol* **144**(3), 483–96.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H. F., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M. A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J. D. G., Davies, J. M. und Dolan, L. (2003), ‘Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth’, *Nature* **422**(6930), 442–6.

- 
- 
- Franklin-Tong (1999), ‘Signaling and the modulation of pollen tube growth’, *Plant Cell* **11**(4), 727–38.
- Frietsch, S., Wang, Y.-F., Sladek, C., Poulsen, L. R., Romanowsky, S. M., Schroeder, J. I. und 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**(36), 14531–6.
- Fry, S. C. (1998), ‘Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals’, *Biochem J* **332** ( Pt 2), 507–15.
- Garcia-Mata, C., Wang, J., Gajdanowicz, P., Gonzalez, W., Hills, A., Donald, N., Riedelsberger, J., Amtmann, A., Dreyer, I. und Blatt, M. R. (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**(38), 29286–94.
- Gifford, J. L., Walsh, M. P. und Vogel, H. J. (2007), ‘Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix-loop-helix EF-hand motifs’, *Biochem J* **405**(2), 199–221.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G. und Boller, T. (1999), ‘A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*’, *Plant J* **18**(3), 277–84.
- Grobei, M. A., Qeli, E., Brunner, E., Rehrauer, H., Zhang, R., Roschitzki, B., Basler, K., Ahrens, C. H. und Grossniklaus, U. (2009), ‘Deterministic protein inference for shotgun proteomics data provides new insights into *Arabidopsis* pollen development and function’, *Genome Res* **19**(10), 1786–800.
- Groemping, Y. und Rittinger, K. (2005), ‘Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective’, *Biochem J* **386**(Pt 3), 401–16.
- Groom, Q. J., Torres, M. A., Fordham-Skelton, A. P., Hammond-Kosack, K. E., Robinson, N. J. und Jones, J. D. (1996), ‘*rbohA*, a rice homologue of the mammalian gp91phox respiratory burst oxidase gene’, *Plant J* **10**(3), 515–22.
- Gutermuth, T., Lassig, R., Portes, M.-T., Maierhofer, T., Romeis, T., Borst, J.-W., Hedrich, R., Feijo, J. A. und 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**(11), 4525–4543.
- Guy, E., Lautier, M., Chabannes, M., Roux, B., Lauber, E., Arlat, M. und Noël, L. D. (2013), ‘xopAC-triggered immunity against *Xanthomonas* depends on *Arabidopsis* receptor-like cytoplasmic kinase genes PBL2 and RIPK’, *PLoS One* **8**(8), e73469.
- Hao, H., Fan, L., Chen, T., Li, R., Li, X., He, Q., Botella, M. A. und Lin, J. (2014), ‘Clathrin and membrane microdomains cooperatively regulate RbohD dynamics and activity in *Arabidopsis*’, *Plant Cell*.
- Harper, J. F. und Harmon, A. (2005), ‘Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection’, *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(7), 555–66.

- 
- 
- Haruta, M., Sabat, G., Stecker, K., Minkoff, B. B. und Sussman, M. R. (2014), 'A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion', *Science* **343**(6169), 408–11.
- Held, M. A., Tan, L., Kamyab, A., Hare, M., Shpak, E. und Kieliszewski, M. J. (2004), 'Di-isodityrosine is the intermolecular cross-link of isodityrosine-rich extensin analogs cross-linked in vitro', *J Biol Chem* **279**(53), 55474–82.
- Hepler, P. K., Kunkel, J. G., Rounds, C. M. und Winship, L. J. (2012), 'Calcium entry into pollen tubes', *Trends Plant Sci* **17**(1), 32–8.
- Hepler, P. K., Rounds, C. M. und Winship, L. J. (2013), 'Control of cell wall extensibility during pollen tube growth', *Mol Plant* **6**(4), 998–1017.
- Iwano, M., Entani, T., Shiba, H., Kakita, M., Nagai, T., Mizuno, H., Miyawaki, A., Shoji, T., Kubo, K., Isogai, A. und Takayama, S. (2009), 'Fine-tuning of the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is essential for pollen tube growth', *Plant Physiol* **150**(3), 1322–34.
- Jiang, L., Yang, S.-L., Xie, L.-F., Pua, C. S., Zhang, X.-Q., Yang, W.-C., Sundaresan, V. und Ye, D. (2005), 'VANGUARD1 encodes a pectin methylesterase that enhances pollen tube growth in the *Arabidopsis* style and transmitting tract', *Plant Cell* **17**(2), 584–96.
- Jimenez, A., Hernandez, J. A., Del Rio, L. A. und Sevilla, F. (1997), 'Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves', *Plant Physiol* **114**(1), 275–284.
- Jones, M. A., Raymond, M. J., Yang, Z. und Smirnov, N. (2007), 'NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase', *J Exp Bot* **58**(6), 1261–70.
- Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Strassfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., Jones, J. D., Shirasu, K., Menke, F., Jones, A. und Zipfel, C. (2014), 'Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity', *Mol Cell* **54**(1), 43–55.
- Kater, S. B., Mattson, M. P., Cohan, C. und Connor, J. (1988), 'Calcium regulation of the neuronal growth cone', *Trends Neurosci* **11**(7), 315–21.
- Kawahara, T., Quinn, M. T. und Lambeth, J. D. (2007), 'Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes', *BMC Evol Biol* **7**, 109.
- 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. und Kuchitsu, K. (2014), ' $\text{Ca}^{2+}$ -activated reactive oxygen species production by *Arabidopsis* RbohH and RbohJ is essential for proper pollen tube tip growth', *Plant Cell* **26**(3), 1069–80.
- Keller, T., Damude, H. G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R. A. und Lamb, C. (1998), 'A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with  $\text{Ca}^{2+}$  binding motifs', *Plant Cell* **10**(2), 255–66.

- 
- 
- Keppler, L. D., Baker, C. J. und M, A. M. (1989), 'Active oxygen production during a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco suspension cells.', *Phytopathology* **79**, 974–978.
- Kieliszewski, M. J. und Shpak, E. (2001), 'Synthetic genes for the elucidation of glycosylation codes for arabinogalactan-proteins and other hydroxyproline-rich glycoproteins', *Cell Mol Life Sci* **58**(10), 1386–98.
- Kim, H.-S., Czymmek, K. J., Patel, A., Modla, S., Nohe, A., Duncan, R., Gilroy, S. und Kang, S. (2012), 'Expression of the Cameleon calcium biosensor in fungi reveals distinct  $\text{Ca}^{2+}$  signatures associated with polarized growth, development, and pathogenesis', *Fungal Genet Biol* **49**(8), 589–601.
- Kim, S.-Y., Sivaguru, M. und Stacey, G. (2006), 'Extracellular ATP in plants. visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling', *Plant Physiol* **142**(3), 984–92.
- Kjellbom, P., Snogerup, L., Stöhr, C., Reuzeau, C., McCabe, P. F. und Pennell, R. I. (1997), 'Oxidative cross-linking of plasma membrane arabinogalactan proteins', *Plant J* **12**(5), 1189–96.
- Krebs, M., Held, K., Binder, A., Hashimoto, K., Den Herder, G., Parniske, M., Kudla, J. und Schumacher, K. (2012), 'FRET-based genetically encoded sensors allow high-resolution live cell imaging of  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics', *Plant J* **69**(1), 181–92.
- Kroeger, J. H., Zerzour, R. und Geitmann, A. (2011), 'Regulator or driving force? The role of turgor pressure in oscillatory plant cell growth', *PLoS One* **6**(4), e18549.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. und Sonnhammer, E. L. (2001), 'Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes', *J Mol Biol* **305**(3), 567–80.
- Kwak, J. M., Mori, I. C., Pei, Z.-M., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangl, J. L., Bloom, R. E., Bodde, S., Jones, J. D. G. und Schroeder, J. I. (2003), 'NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*', *EMBO J* **22**(11), 2623–33.
- Lamb, C. und Dixon, R. A. (1997), 'The oxidative burst in plant disease resistance', *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 251–275.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. und Higgins, D. G. (2007), 'Clustal W and clustal X version 2.0', *Bioinformatics* **23**(21), 2947–8.
- Lässig, R., Gutermuth, T., Bey, T. D., Konrad, K. R. und Romeis, T. (2014), 'Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth', *Plant J* **78**(1), 94–106.
- Lee, Y., Rubio, M. C., Alassimone, J. und Geldner, N. (2013), 'A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis', *Cell* **153**(2), 402–12.

- 
- 
- Leto, T. L., Adams, A. G. und de Mendez, I. (1994), ‘Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: binding of Src homology 3 domains to proline-rich targets’, *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22), 10650–4.
- Li, L., Li, M., Yu, L., Zhou, Z., Liang, X., Liu, Z., Cai, G., Gao, L., Zhang, X., Wang, Y., Chen, S. und Zhou, J.-M. (2014), ‘The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity’, *Cell Host Microbe* **15**(3), 329–38.
- Lindner, H., Müller, L. M., Boisson-Dernier, A. und Grossniklaus, U. (2012), ‘CrRLK1L receptor-like kinases: not just another brick in the wall’, *Curr Opin Plant Biol* **15**(6), 659–69.
- Liu, P., Li, R.-L., Zhang, L., Wang, Q.-L., Niehaus, K., Baluska, F., Samaj, J. und Lin, J.-X. (2009), ‘Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth’, *Plant J* **60**(2), 303–13.
- Lorraine, A. E., McCormick, S., Estrada, A., Patel, K. und Qin, P. (2013), ‘RNA-seq of *Arabidopsis* pollen uncovers novel transcription and alternative splicing’, *Plant Physiol* **162**(2), 1092–109.
- Lukyanov, K. A. und Belousov, V. V. (2014), ‘Genetically encoded fluorescent redox sensors’, *Biochim Biophys Acta* **1840**(2), 745–56.
- Macpherson, N., Takeda, S., Shang, Z., Dark, A., Mortimer, J. C., Brownlee, C., Dolan, L. und Davies, J. M. (2008), ‘NADPH oxidase involvement in cellular integrity’, *Planta* **227**(6), 1415–8.
- Mano, J. (2012), ‘Reactive carbonyl species: their production from lipid peroxides, action in environmental stress, and the detoxification mechanism’, *Plant Physiol Biochem* **59**, 90–7.
- Martinière, A., Lavagi, I., Nageswaran, G., Rolfe, D. J., Maneta-Peyret, L., Luu, D.-T., Botchway, S. W., Webb, S. E. D., Mongrand, S., Maurel, C., Martin-Fernandez, M. L., Kleine-Vehn, J., Friml, J., Moreau, P. und Runions, J. (2012), ‘Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins’, *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(31), 12805–10.
- Matschi, S., Werner, S., Schulze, W. X., Legen, J., Hilger, H. H. und Romeis, T. (2013), ‘Function of calcium-dependent protein kinase CPK28 of *Arabidopsis thaliana* in plant stem elongation and vascular development’, *Plant J* **73**(6), 883–96.
- Mayank, P., Grossman, J., Wuest, S., Boisson-Dernier, A., Roschitzki, B., Nanni, P., Nühse, T. und Grossniklaus, U. (2012), ‘Characterization of the phosphoproteome of mature *Arabidopsis* pollen’, *Plant J* **72**(1), 89–101.
- McKenna, S. T., Kunkel, J. G., Bosch, M., Rounds, C. M., Vidali, L., Winship, L. J. und Hepler, P. K. (2009), ‘Exocytosis precedes and predicts the increase in growth in oscillating pollen tubes’, *Plant Cell* **21**(10), 3026–40.
- Messerli, M. A., Créton, R., Jaffe, L. F. und Robinson, K. R. (2000), ‘Periodic increases in elongation rate precede increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> during pollen tube growth’, *Dev Biol* **222**(1), 84–98.

- 
- 
- Messerli, M. A. und Robinson, K. R. (2003), 'Ionic and osmotic disruptions of the lily pollen tube oscillator: testing proposed models', *Planta* **217**(1), 147–57.
- Meyer, A. J. und Dick, T. P. (2010), 'Fluorescent protein-based redox probes', *Antioxid Redox Signal* **13**(5), 621–50.
- Michard, E., Lima, P. T., Borges, F., Silva, A. C., Portes, M. T., Carvalho, J. E., Gilliam, M., Liu, L.-H., Obermeyer, G. und Feijó, J. A. (2011), 'Glutamate receptor-like genes form  $\text{Ca}^{2+}$  channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine', *Science* **332**(6028), 434–7.
- Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M. A., Shulaev, V., Dangl, J. L. und Mittler, R. (2009), 'The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli', *Sci Signal* **2**(84), ra45.
- Miller, J. G. und Fry, S. C. (2001), 'Characteristics of xyloglucan after attack by hydroxyl radicals', *Carbohydr Res* **332**(4), 389–403.
- Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R. und Tsien, R. Y. (1999), 'Dynamic and quantitative  $\text{Ca}^{2+}$  measurements using improved cameleons', *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5), 2135–40.
- Miyazaki, S., Murata, T., Sakurai-Ozato, N., Kubo, M., Demura, T., Fukuda, H. und Hasebe, M. (2009), 'ANXUR1 and 2, sister genes to FERONIA/SIRENE, are male factors for coordinated fertilization', *Curr Biol* **19**(15), 1327–31.
- Monshausen, G. B., Bibikova, T. N., Messerli, M. A., Shi, C. und Gilroy, S. (2007), 'Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs', *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(52), 20996–1001.
- Monshausen, G. B., Messerli, M. A. und Gilroy, S. (2008), 'Imaging of the Yellow Cameleon 3.6 indicator reveals that elevations in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  follow oscillating increases in growth in root hairs of *Arabidopsis*', *Plant Physiol* **147**(4), 1690–8.
- Müller, K., Carstens, A. C., Linkies, A., Torres, M. A. und Leubner-Metzger, G. (2009), 'The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in *Arabidopsis* seed after-ripening', *New Phytol* **184**(4), 885–97.
- Myers, C., Romanowsky, S. M., Barron, Y. D., Garg, S., Azuse, C. L., Curran, A., Davis, R. M., Hatton, J., Harmon, A. C. und Harper, J. F. (2009), 'Calcium-dependent protein kinases regulate polarized tip growth in pollen tubes', *Plant J* **59**(4), 528–39.
- Nühse, T. S., Bottrill, A. R., Jones, A. M. E. und Peck, S. C. (2007), 'Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses', *Plant J* **51**(5), 931–40.
- Nuñez, A., Fishman, M. L., Fortis, L. L., Cooke, P. H. und Hotchkiss, Jr, A. T. (2009), 'Identification of extensin protein associated with sugar beet pectin', *J Agric Food Chem* **57**(22), 10951–8.



- 
- 
- Nyathi, Y. und Baker, A. (2006), 'Plant peroxisomes as a source of signalling molecules', *Biochim Biophys Acta* **1763**(12), 1478–95.
- Oda, T., Hashimoto, H., Kuwabara, N., Akashi, S., Hayashi, K., Kojima, C., Wong, H. L., Kawasaki, T., Shimamoto, K., Sato, M. und Shimizu, T. (2010), 'Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications', *J Biol Chem* **285**(2), 1435–45.
- Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., Yumoto, F., Kimura, S., Kadota, Y., Hishinuma, H., Senzaki, E., Yamagoe, S., Nagata, K., Nara, M., Suzuki, K., Tanokura, M. und Kuchitsu, K. (2008), 'Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by  $\text{Ca}^{2+}$  and phosphorylation', *J Biol Chem* **283**(14), 8885–92.
- Palmer, A. E. und Tsien, R. Y. (2006), 'Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators', *Nat Protoc* **1**(3), 1057–65.
- Parton, R. M., Fischer-Parton, S., Watahiki, M. K. und Trewavas, A. J. (2001), 'Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes', *J Cell Sci* **114**(Pt 14), 2685–95.
- Passardi, F., Penel, C. und Dunand, C. (2004), 'Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall', *Trends Plant Sci* **9**(11), 534–40.
- Pei, Z. M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G. J., Grill, E. und Schroeder, J. I. (2000), 'Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells', *Nature* **406**(6797), 731–4.
- Pennell, R. I., Knox, J. P., Scofield, G. N., Selvendran, R. R. und Roberts, K. (1989), 'A family of abundant plasma membrane-associated glycoproteins related to the arabinogalactan proteins is unique to flowering plants', *J Cell Biol* **108**(5), 1967–77.
- Pereira, C. S., Ribeiro, J. M. L., Vatulescu, A. D., Findlay, K., MacDougall, A. J. und Jackson, P. A. P. (2011), 'Extensin network formation in *Vitis vinifera* callus cells is an essential and causal event in rapid and  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced reduction in primary cell wall hydration', *BMC Plant Biol* **11**, 106.
- Posé, D., Castanedo, I., Borsani, O., Nieto, B., Rosado, A., Tacconnat, L., Ferrer, A., Dolan, L., Valpuesta, V. und Botella, M. A. (2009), 'Identification of the *Arabidopsis* dry2/sqe1-5 mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species', *Plant J* **59**(1), 63–76.
- Potocký, M., Jones, M. A., Bezvoda, R., Smirnov, N. und Žárský, V. (2007), 'Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth', *New Phytol* **174**(4), 742–51.
- Potocký, M., Pejchar, P., Gutkowska, M., Jiménez-Quesada, M. J., Potocká, A., Alché, J. d. D., Kost, B. und Žárský, V. (2012), 'NADPH oxidase activity in pollen tubes is affected by calcium ions, signaling phospholipids and Rac/Rop GTPases', *J Plant Physiol* **169**(16), 1654–63.

- 
- 
- Preuss, D., Rhee, S. Y. und Davis, R. W. (1994), ‘Tetrad analysis possible in *Arabidopsis* with mutation of the *QUARTET* (*QRT*) genes’, *Science* **264**(5164), 1458–60.
- Proseus, T. E. und Boyer, J. S. (2006), ‘Calcium pectate chemistry controls growth rate of *Chara corallina*’, *J Exp Bot* **57**(15), 3989–4002.
- Proseus, T. E. und Boyer, J. S. (2012), ‘Calcium deprivation disrupts enlargement of *Chara corallina* cells: further evidence for the calcium pectate cycle’, *J Exp Bot* **63**(10), 3953–8.
- Raha, S. und Robinson, B. H. (2000), ‘Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing’, *Trends Biochem Sci* **25**(10), 502–8.
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J. und Scheel, D. (2011), ‘Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns’, *Plant J* **68**(1), 100–13.
- Rathore, K. S., Cork, R. J. und Robinson, K. R. (1991), ‘A cytoplasmic gradient of  $\text{Ca}^{2+}$  is correlated with the growth of lily pollen tubes’, *Dev Biol* **148**(2), 612–9.
- Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Subbaiah, C. C. und Siedow, J. N. (2006), ‘Mitochondrial reactive oxygen species. contribution to oxidative stress and interorganellar signaling’, *Plant Physiol* **141**(2), 357–66.
- Ribeiro, J. M., Pereira, C. S., Soares, N. C., Vieira, A. M., Feijó, J. A. und Jackson, P. A. (2006), ‘The contribution of extensin network formation to rapid, hydrogen peroxide-mediated increases in grapevine callus wall resistance to fungal lytic enzymes’, *J Exp Bot* **57**(9), 2025–35.
- Rojas, E. R., Hotton, S. und Dumais, J. (2011), ‘Chemically mediated mechanical expansion of the pollen tube cell wall’, *Biophys J* **101**(8), 1844–53.
- Roma, L. P., Duprez, J., Takahashi, H. K., Gilon, P., Wiederkehr, A. und Jonas, J.-C. (2012), ‘Dynamic measurements of mitochondrial hydrogen peroxide concentration and glutathione redox state in rat pancreatic  $\beta$ -cells using ratiometric fluorescent proteins: confounding effects of pH with HyPer but not roGFP1’, *Biochem J* **441**(3), 971–8.
- Rosso, M. G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. und Weisshaar, B. (2003), ‘An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics’, *Plant Mol Biol* **53**(1-2), 247–59.
- Rotrosen, D., Yeung, C. L., Leto, T. L., Malech, H. L. und Kwong, C. H. (1992), ‘Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase’, *Science* **256**(5062), 1459–62.
- Rounds, C. M., Lubeck, E., Hepler, P. K. und Winship, L. J. (2011), ‘Propidium iodide competes with  $\text{Ca}^{2+}$  to label pectin in pollen tubes and *Arabidopsis* root hairs’, *Plant Physiol* **157**(1), 175–87.
- Sagi, M. und Fluhr, R. (2006), ‘Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases’, *Plant Physiol* **141**(2), 336–40.

- 
- 
- Sambrook, J., Russell, D. W. und Laboratory., C. S. H. (2001), *Molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell*, 3rd. ed. edn, Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schiefelbein, J. W., Shipley, A. und Rowse, P. (1992), 'Calcium influx at the tip of growing root-hair cells of *Arabidopsis thaliana*', *Planta* **187**(4), 455–9.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. und Eliceiri, K. W. (2012), 'NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis', *Nat Methods* **9**(7), 671–5.
- Schopfer, P. (2001), 'Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth', *Plant J* **28**(6), 679–88.
- Seifert, G. J. und Roberts, K. (2007), 'The biology of arabinogalactan proteins', *Annu Rev Plant Biol* **58**, 137–61.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J. D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M. und Goff, S. A. (2002), 'A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system', *Plant Cell* **14**(12), 2985–94.
- Showalter, A. M., Keppler, B., Lichtenberg, J., Gu, D. und Welch, L. R. (2010), 'A bioinformatics approach to the identification, classification, and analysis of hydroxyproline-rich glycoproteins', *Plant Physiol* **153**(2), 485–513.
- Siddique, S., Matera, C., Radakovic, Z. S., Hasan, M. S., Gutbrod, P., Rozanska, E., Sobczak, M., Torres, M. A. und Grundler, F. M. W. (2014), 'Parasitic worms stimulate host NADPH oxidases to produce reactive oxygen species that limit plant cell death and promote infection', *Sci Signal* **7**(320), ra33.
- Smallwood, M., Beven, A., Donovan, N., Neill, S., Peart, J., Roberts, K. und Knox, J. (1994), 'Localization of cell wall proteins in relation to the developmental anatomy of the carrot root apex', *The Plant Journal* **5**(2), 237–246.
- Smirnova, A. V., Matveyeva, N. P. und Yermakov, I. P. (2013), 'Reactive oxygen species are involved in regulation of pollen wall cytomechanics', *Plant Biol (Stuttg)* .
- Speranza, A., Crinelli, R., Scoccianti, V. und Geitmann, A. (2012), 'Reactive oxygen species are involved in pollen tube initiation in kiwifruit', *Plant Biol (Stuttg)* **14**(1), 64–76.
- Sumimoto, H., Hata, K., Mizuki, K., Ito, T., Kage, Y., Sakaki, Y., Fukumaki, Y., Nakamura, M. und Takeshige, K. (1996), 'Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase', *J Biol Chem* **271**(36), 22152–8.
- Sumimoto, H., Kage, Y., Nunoi, H., Sasaki, H., Nose, T., Fukumaki, Y., Ohno, M., Minakami, S. und Takeshige, K. (1994), 'Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase', *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(12), 5345–9.

- 
- 
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M. A. und Mittler, R. (2011), ‘Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling’, *Curr Opin Plant Biol* **14**(6), 691–9.
- Suzuki, N., Miller, G., Salazar, C., Mondal, H. A., Shulaev, E., Cortes, D. F., Shuman, J. L., Luo, X., Shah, J., Schlauch, K., Shulaev, V. und Mittler, R. (2013), ‘Temporal-spatial interaction between reactive oxygen species and abscisic acid regulates rapid systemic acclimation in plants’, *Plant Cell* **25**(9), 3553–69.
- Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K. und Dolan, L. (2008), ‘Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells’, *Science* **319**(5867), 1241–4.
- Takemiya, A., Inoue, S.-I., Doi, M., Kinoshita, T. und Shimazaki, K.-I. (2005), ‘Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments’, *Plant Cell* **17**(4), 1120–7.
- Tan, L., Eberhard, S., Pattathil, S., Warder, C., Glushka, J., Yuan, C., Hao, Z., Zhu, X., Avci, U., Miller, J. S., Baldwin, D., Pham, C., Orlando, R., Darvill, A., Hahn, M. G., Kieliszewski, M. J. und Mohnen, D. (2013), ‘An *Arabidopsis* cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein’, *Plant Cell* **25**(1), 270–87.
- Tang, W., Newton, R. J. und Weidner, D. A. (2007), ‘Genetic transformation and gene silencing mediated by multiple copies of a transgene in eastern white pine’, *J Exp Bot* **58**(3), 545–54.
- Torres, M. A., Dangl, J. L. und Jones, J. D. G. (2002), ‘*Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response’, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1), 517–22.
- Torres, M. A., Jones, J. D. G. und Dangl, J. L. (2005), ‘Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*’, *Nat Genet* **37**(10), 1130–4.
- Torres, M. A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K. E. und Jones, J. D. (1998), ‘Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox)’, *Plant J* **14**(3), 365–70.
- Triantaphylidès, C. und Havaux, M. (2009), ‘Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling’, *Trends Plant Sci* **14**(4), 219–28.
- Turner, S. R. (2007), ‘Cell walls: monitoring integrity with the kinase’, *Curr Biol* **17**(14), R541–2.
- Turrens, J. F. (2003), ‘Mitochondrial formation of reactive oxygen species’, *J Physiol* **552**(Pt 2), 335–44.
- Twell, D., Yamaguchi, J., Wing, R. A., Ushiba, J. und McCormick, S. (1991), ‘Promoter analysis of genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen-specific enhancer sequences and shared regulatory elements.’, *Genes Dev* **5**(3), 496–507.

- 
- 
- Velasquez, S. M., Ricardi, M. M., Dorosz, J. G., Fernandez, P. V., Nadra, A. D., Pol-Fachin, L., Egelund, J., Gille, S., Harholt, J., Ciancia, M., Verli, H., Pauly, M., Bacic, A., Olsen, C. E., Ulvskov, P., Petersen, B. L., Somerville, C., Iusem, N. D. und Estevez, J. M. (2011), ‘O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth’, *Science* **332**(6036), 1401–3.
- Wang, Q., Kong, L., Hao, H., Wang, X., Lin, J., Samaj, J. und Baluska, F. (2005), ‘Effects of brefeldin A on pollen germination and tube growth. Antagonistic effects on endocytosis and secretion’, *Plant Physiol* **139**(4), 1692–703.
- Wei, G. und Shirsat, A. H. (2006), ‘Extensin over-expression in *Arabidopsis* limits pathogen invasiveness’, *Mol Plant Pathol* **7**(6), 579–92.
- Wind, S., Beuerlein, K., Eucker, T., Müller, H., Scheurer, P., Armitage, M. E., Ho, H., Schmidt, H. H. W. und Winkler, K. (2010), ‘Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors’, *Br J Pharmacol* **161**(4), 885–98.
- Winship, L. J., Obermeyer, G., Geitmann, A. und Hepler, P. K. (2010), ‘Under pressure, cell walls set the pace’, *Trends Plant Sci* **15**(7), 363–9.
- Wong, H. L., Pinontoan, R., Hayashi, K., Tabata, R., Yaeno, T., Hasegawa, K., Kojima, C., Yoshioka, H., Iba, K., Kawasaki, T. und Shimamoto, K. (2007), ‘Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension’, *Plant Cell* **19**(12), 4022–34.
- Yang, J., Sardar, H. S., McGovern, K. R., Zhang, Y. und Showalter, A. M. (2007), ‘A lysine-rich arabinogalactan protein in *Arabidopsis* is essential for plant growth and development, including cell division and expansion’, *Plant J* **49**(4), 629–40.
- Yates, E. A., Valdor, J. F., Haslam, S. M., Morris, H. R., Dell, A., Mackie, W. und Knox, J. P. (1996), ‘Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies’, *Glycobiology* **6**(2), 131–9.
- Yu, L., Quinn, M. T., Cross, A. R. und Dinauer, M. C. (1998), ‘Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase’, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14), 7993–8.
- Zappel, N. F. und Panstruga, R. (2008), ‘Heterogeneity and lateral compartmentalization of plant plasma membranes’, *Curr Opin Plant Biol* **11**(6), 632–40.
- Zerzour, R., Kroeger, J. und Geitmann, A. (2009), ‘Polar growth in pollen tubes is associated with spatially confined dynamic changes in cell mechanical properties’, *Dev Biol* **334**(2), 437–46.
- Zhang, H., Qu, X., Bao, C., Khurana, P., Wang, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Chen, N., Blanchoin, L., Staiger, C. J. und Huang, S. (2010), ‘*Arabidopsis* VILLIN5, an actin filament bundling and severing protein, is necessary for normal pollen tube growth’, *Plant Cell* **22**(8), 2749–67.
- Zhao, L.-N., Shen, L.-K., Zhang, W.-Z., Zhang, W., Wang, Y. und 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**(2), 649–61.

- Zhao, Y., Araki, S., Wu, J., Teramoto, T., Chang, Y.-F., Nakano, M., Abdelfattah, A. S., Fujiwara, M., Ishihara, T., Nagai, T. und Campbell, R. E. (2011), ‘An expanded palette of genetically encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicators’, *Science* **333**(6051), 1888–91.
- Zheng, M., Aslund, F. und Storz, G. (1998), ‘Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation’, *Science* **279**(5357), 1718–21.
- Zhu, X., Feng, Y., Liang, G., Liu, N. und Zhu, J.-K. (2013), ‘Aequorin-based luminescence imaging reveals stimulus- and tissue-specific  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in *Arabidopsis* plants’, *Mol Plant* **6**(2), 444–55.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. und Gruissem, W. (2004), ‘GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox’, *Plant Physiol* **136**(1), 2621–32.
- Zonia, L. und Munnik, T. (2011), ‘Understanding pollen tube growth: the hydrodynamic model versus the cell wall model’, *Trends Plant Sci* **16**(7), 347–52.

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung eines Pollenschlauchs. . . . .	3
1.2	Schematische Darstellung einer pflanzlichen NAD(P)H-Oxidase. . . . .	8
3.1	Phylogenie und gewebespezifische Expression der NAD(P)H-Oxidasekodierenden Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	28
3.2	Promotor-GUS Analyse der <i>RBOHH</i> -Expression. . . . .	29
3.3	Subzelluläre Lokalisation der NAD(P)H-Oxidasen <i>RBOHH</i> und <i>RBOHJ</i> . . . . .	30
3.4	Co-Expression von <i>RBOHH</i> und <i>RBOHJ</i> in wachsenden Pollenschläuchen. . . . .	31
3.5	Dynamische Lokalisation von mCherry- <i>RBOHH</i> und mCherry- <i>RBOHJ</i> während des Pollenschlauchwachstums. . . . .	32
3.6	BFA-abhängige Internalisierung von <i>RBOHH</i> . . . . .	32
3.7	Veränderung der <i>RBOHH</i> - und <i>RBOHJ</i> -Lokalisation nach BFA-Behandlung. . . . .	33
3.8	Genstruktur von <i>AtRBOHH</i> und <i>AtRBOHJ</i> . . . . .	34
3.9	Phänotypische Charakterisierung von <i>rboh-1 rboh-2</i> -Doppelmutanten. . . . .	36
3.10	Komplementation des <i>rboh-1 rboh-2</i> -Phänotyps. . . . .	38
3.11	Der Schotenphänotyp von <i>rboh-1 rboh-2</i> wird durch den Pollen übertragen. . . . .	40
3.12	<i>In vivo</i> Pollenschlauchwachstum. . . . .	41
3.13	Die Detektion von Superoxid-Anion-Radikal-Produktion mittels Nitroblau-Tetrazolium. . . . .	44
3.14	Superoxidproduktion in <i>rboh-1 rboh-2</i> -Pollenschläuchen ist signifikant reduziert. . . . .	45
3.15	Mikroskopische Charakterisierung des <i>rboh-1 rboh-2</i> -Phänotyps. . . . .	46
3.16	Analyse der Wachstumsdynamik von Col-0- und <i>rboh-1 rboh-2</i> -Pollenschläuchen. . . . .	47
3.17	Quantitative Auswertung der Pollenschlauchwachstumsdynamik. . . . .	48
3.18	Qualitative Analyse der Pollenschlauchwachstumsdynamik nach pharmakologischer Inhibition der NAD(P)H-Oxidasen. . . . .	50
3.19	Pharmakologische Inhibition von Pollenschlauch NAD(P)H-Oxidasen verlangsamt das Wachstum. . . . .	51
3.20	Analyse der apikalen Exozytose mittels Propidiumiodid-Färbung. . . . .	53
3.21	Korrelation von Wachstumsrate und Exozytoseereignissen. . . . .	54

---



---

3.22	Expression des Ca <sup>2+</sup> -Reporters Yellow Cameleon 3.6 in <i>rboh-1 rboh-2</i> -Pollenschläuchen. . . . .	56
3.23	Analyse der Ca <sup>2+</sup> -Dynamik in Col-0- und <i>rboh-1 rboh-2</i> -Pollenschläuchen. . . . .	59
3.24	Verlust der Zellintegrität führt zu Ca <sup>2+</sup> -Einstrom. . . . .	60
3.25	Hochfrequenz-Ca <sup>2+</sup> -Oszillationen in wachsenden WT-Pollenschläuchen. . . . .	61
3.26	Detektion von AGPs und Extensinen . . . . .	63
3.27	Extensin-Detektion nach enzymatischem Abbau von Zellwandpolysacchariden. . . . .	64
3.28	Detektion von Zellwand-AGPs nach Cellulase/Pektinase-Behandlung. . . . .	65
3.29	Messung von K <sup>+</sup> -Strömen in lebenden WT-Pollenschläuchen mittels TEVC. . . . .	67
3.30	Externe Zugabe von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> erhöht K <sup>+</sup> -Einwärtsströme. . . . .	68
3.31	NAD(P)H-Oxidase vermittelte ROS-Produktion beeinflusst K <sup>+</sup> -Ströme . . . . .	69
3.32	Anionenströme in Col-0 und <i>rboh-1 rboh-2</i> . . . . .	70
4.1	Vereinfachtes Modell der negativen Wachstumsrückkopplung durch ROS . . . . .	75
4.2	<i>Multiple Sequence-Alignment</i> der RBOHD, RBOHH und RBOHJ N-Termini. . . . .	80
4.3	Schematische Darstellung der RBOHH/J-Lokalisation und der polaren Organisation der PollenschlauchPlasmamembran. . . . .	83
6.1	Stammbaum der RLCK VIIa Proteinfamilie in <i>Arabidopsis</i> . . . . .	115



---

---

## Tabellenverzeichnis

1	Verwendete <i>Arabidopsis thaliana</i> -Linien . . . . .	13
2	Verwendete Bakterienstämme . . . . .	14
3	Zusammensetzung der Medien . . . . .	14
4	Verwendete Antibiotika . . . . .	14
5	Verwendete Kit-Systeme . . . . .	15
6	Verwendete Enzyme . . . . .	15
7	Verwendete Oligonukleotidprimer für Klonierung und Genotypisierung	16
8	In dieser Arbeit hergestellte Plasmide . . . . .	18
9	Aufspaltung der <i>rboh</i> <i>h</i> - und <i>rboh</i> <i>j</i> -Allele in selbstbefruchteten Einzel- und Doppelmutanten . . . . .	35
10	Transmissionseffizienz der kombinierten <i>rboh</i> <i>h</i> - und <i>rboh</i> <i>j</i> -Allele . . .	39

## Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Frau Prof. Dr. Tina Romeis für die langjährige Unterstützung, die vielen Möglichkeiten und Freiheiten, die mir gegeben wurden und die schöne Zeit, die ich in der Arbeitsgruppe "Biochemie der Pflanzen" hatte.

Herrn Prof. Dr. Thomas Schmülling danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Bereitstellung des konfokalen Mikroskops, ohne welches vieles nicht möglich gewesen wäre.

Bei meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. Tomáš Werner bedanke ich mich für die Unterstützung und die vielen interessanten Gespräche.

Dr. Kai Konrad und Dipl. Biol. Timo Gutermuth von der Universität Würzburg danke ich für die sehr fruchtbare Kollaboration und die tolle Gastfreundschaft.

Dr. Diana Mutz danke ich für das Engagement und die Öffentlichkeitsarbeit, die meine Publikation einem breiteren Publikum zugänglich gemacht hat.

Ohne die Kollegen der AG Romeis und AG Witte wäre die Zeit der Doktorarbeit sicher nicht halb so schön gewesen, deshalb auch hier ein großes Dankeschön an alle derzeitigen und ehemaligen Mitglieder.

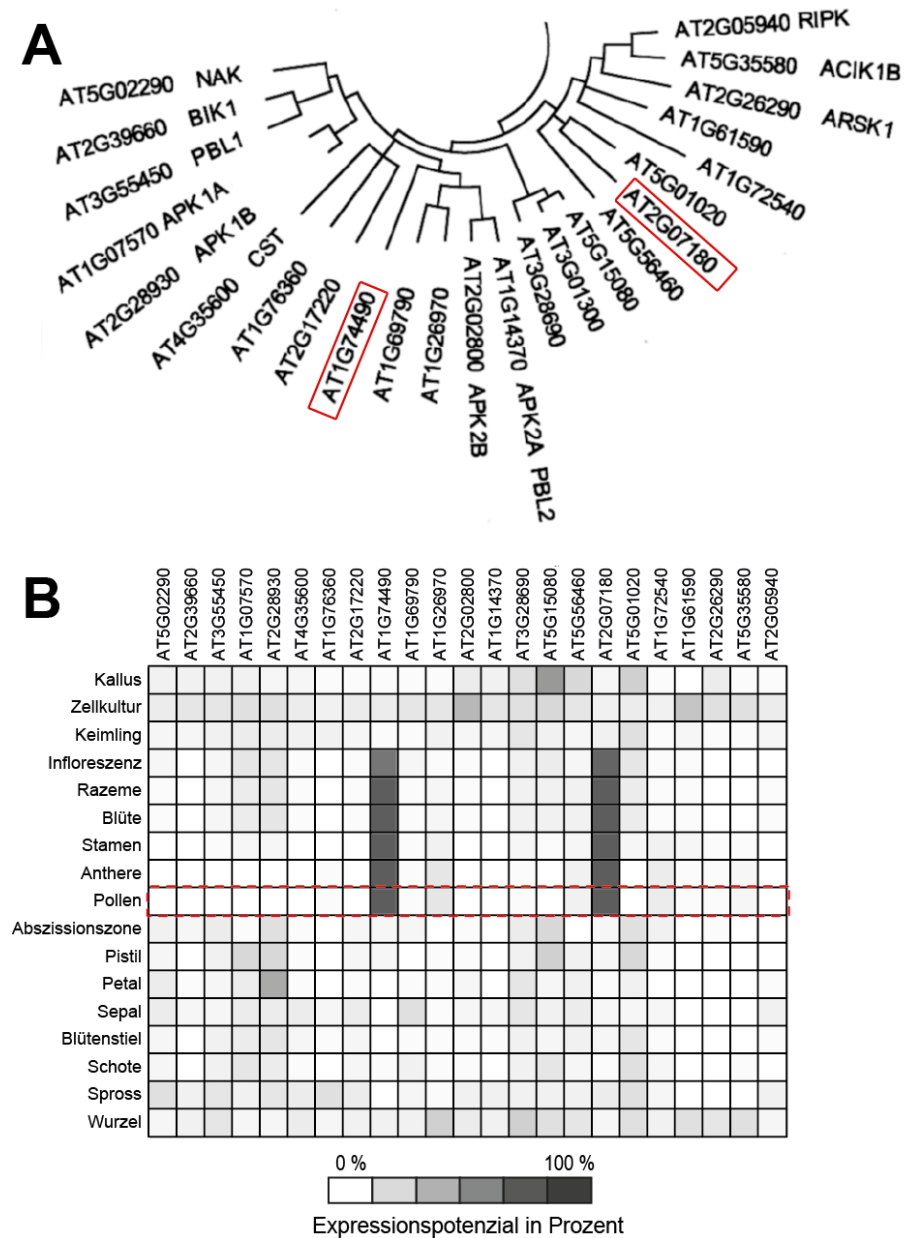
Ich danke meiner Familie für die Unterstützung außerhalb der Arbeit, insbesondere meinem Onkel Peter für die abenteuerliche Fahrt nach Würzburg.

Katharina, Dir danke ich für Deine unendliche Geduld und die seelische Unterstützung, die Du mir in allen Lebensphasen gegeben hast.

Der Lebenslauf ist in der Online-version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

# 6 Anhang



**Abb. 6.1:** Stammbaum der RLCK VIIa Proteinfamilie in *Arabidopsis*. A) Der Stammbaum wurde von Guy et al. (2013) übernommen und modifiziert. In rot umrandet sind die pollenspezifischen RLCK VIIa Proteine. B) *In silico* Expressionsanalyse der RLCK VIIa Genfamilie. Die öffentlich zugänglichen Microarraydaten wurden wie in Abb3.1 beschrieben analysiert (Zimmermann et al., 2004).