

**Funktion von Anionenkanälen bei der Entwicklung der Wurzelknöllchen-  
und Arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose in *Medicago truncatula***



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

vorgelegt von  
**Anna-Lena Hürter**  
aus Hannover

Würzburg 2017



Eingereicht am:

**Mitglieder der Promotionskommission:**

Vorsitzender:

1. Gutachter: PD Dr. M. Rob G. Roelfsema
2. Gutachter: PD Dr. Frank Waller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:



**Funktion von Anionenkanälen bei der Entwicklung der Wurzelknöllchen-  
und Arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose in *Medicago truncatula***



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

vorgelegt von  
**Anna-Lena Hürter**  
aus Hannover

Würzburg 2017



## Zusammenfassung

Bei der arbuskulären Myorrhiza-Symbiose (AM) und der Wurzelknöllchen-Symbiose (RNS) handelt es sich um symbiotische Interaktionen, die einen großen Vorteil für Pflanzenwachstum und -kultivierung mit sich bringen. Während bei der AM Pilze die Pflanze mit verschiedenen Nährstoffen aus dem Boden versorgen, stellen die in den Wurzelknöllchen lokalisierten Rhizobien der Pflanze fixierte Stickstoffverbindungen zur Verfügung. Folglich ist es von großem Interesse, die Entwicklung dieser Symbiosen im Detail zu verstehen.

Für die Erkennung der arbuskulären Mykorrhiza-Pilze und der Stickstoff-fixierenden Rhizobien durch die Pflanze sind lösliche symbiotische Signalmoleküle essentiell, die zu der Gruppe der Lipochitinoligosaccharide (LCOs) gehören. Während der Entwicklung der AM und der RNS erkennen die Pflanzenwurzeln diese LCOs über Lysin-Motiv-Rezeptor-ähnliche Kinasen der Plasmamembran. Eine der ersten Antworten der Wurzelzellen auf Nod-LCOs ist eine Depolarisierung des Membranpotentials. An dieser Antwort sind mit großer Wahrscheinlichkeit Anionenkanäle der Plasmamembran beteiligt, da sie auch bei Depolarisierungen als Antwort auf andere Stimuli bzw. Stressantworten involviert sind.

In *Arabidopsis* stellt die S-Typ-Familie eine bedeutende Gruppe von Anionenkanälen dar, die von Calcium-abhängigen Kinasen (CPKs) aktiviert werden. Da Nod-LCOs repetitive Veränderungen des zytosolischen Calcium-Levels induzieren, wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass Calcium-Signale CPKs aktivieren. CPKs sorgen im Gegenzug für die Stimulation von S-Typ-Anionenkanälen in Wurzelzellen.

Die Änderungen des Membranpotentials in *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen als Antwort auf Nod- und Myc-LCOs wurden mittels intrazellulärer Mikroelektroden analysiert. Es wurde gezeigt, dass Nod-LCOs in *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen eine Depolarisierung des Membranpotentials induzieren. Doch Wurzelhaarzellen reagieren nicht nur auf Nod-LCOs. So konnte in dieser Studie zum ersten Mal eine Depolarisierung als Antwort auf sulfatisierte Myc-LCOs nachgewiesen werden. Eine zweite Gruppe von Myc-LCOs, denen die Sulfatgruppe fehlt, löste keine Reaktion des Membranpotentials aus. Diese Daten deuten darauf hin, dass Wurzelhaarzellen für die Erkennung von sulfatisierten LCOs von symbiotischen Pilzen und Bakterien dasselbe Perzeptionssystem nutzen. Diese Schlussfolgerung wird von Experimenten unterstützt, in denen vor der Stimulation durch Nod-LCOs ein sulfatisierter Myc-LCO hinzugegeben wurde. Diese sukzessive Zugabe von zwei Stimuli führte zu einer einzigen

Depolarisierung. Die sulfatisierten Myc-LCOs unterdrückten die Antwort des Membranpotentials auf Nod-LCOs.

Die Beziehung zwischen Nod-LCO-induzierten zytosolischen Calcium-Signalen und Änderungen des Membranpotentials wurde mit einer Kombination aus intrazellulären Mikroelektroden und *Imaging* eines Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs analysiert. In Messungen der zytosolischen Calcium-Konzentration wurde keine transiente Zunahme innerhalb der ersten vier Minuten nach der Applikation der Nod-LCOs beobachtet. Die durch Nod-LCOs induzierten Depolarisierungen traten früher auf und erreichten ihr Maximum normalerweise nach drei Minuten. Demnach geht die Depolarisierung des Membranpotentials den zytosolischen Calcium-Signalen voraus. Diese Beobachtung wurde von simultanen Messungen beider Antworten bestätigt.

Um der Möglichkeit einer Beteiligung von S-Typ-Anionenkanälen an der LCO-abhängigen Depolarisierung nachzugehen, wurden zwei in den Wurzeln exprimierte *M. truncatula*-Orthologe der *AtSLAC1*-Anionenkanal-Familie identifiziert. Die klonierten Anionenkanäle, *MtSLAC1*, *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* zeigten bei der Untersuchung in *Xenopus*-Oozyten die typischen Charakteristika von S-Typ-Anionenkanälen. So konnte gezeigt werden, dass *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* eine Proteinkinase sowie externes Nitrat zur Aktivierung benötigen. Außerdem zeichnen sie sich durch eine sehr viel höhere Permeabilität für Nitrat im Vergleich zu Chlorid aus. Ähnlich wie bei *AtSLAH3* macht eine Koexpression mit *AtSLAH1* genau wie eine intrazelluläre Azidifikation *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* zu Anionenkanälen, die unabhängig von externem Nitrat und einer Phosphorylierung durch eine Proteinkinase aktiv sind.

Weil S-Typ-Anionenkanäle eine hohe Permeabilität für Nitrat aufweisen, wurde der Einfluss von Änderungen der extrazellulären Anionenkonzentration auf die Nod-LCO-induzierte Depolarisierung analysiert. Es stellte sich heraus, dass eine Verringerung der extrazellulären Nitratkonzentration die Antwort beschleunigt. Eine Erhöhung der extrazellulären Chlorid- und Sulfatkonzentration hingegen führte zu einer Verstärkung der Depolarisierung. Diese Beobachtung spricht dafür, dass andere Anionenkanal-Typen wie ALMT-Kanäle an der Depolarisierung des Membranpotentials durch LCOs beteiligt sind.

Die Daten dieser Arbeit zeigen eine Abhängigkeit der Nod-LCO-induzierten Änderungen des Membranpotentials vom *M. truncatula*-Genotyp. Neben Nod-LCOs lösen auch sulfatisierte

Myc-LCOs eine Depolarisierung des Membranpotentials aus. Vermutlich werden sulfatisierte Nod- und Myc-LCOs von demselben Rezeptorsystem erkannt. Die Nod-LCO-induzierte Depolarisierung ist unabhängig von Änderungen des zytosolischen Calcium-Levels. Folglich sind in die Depolarisierung keine S-Typ-Anionenkanäle involviert, die ausschließlich durch Calcium-abhängige Protein-Kinasen aktiviert werden. Interessanterweise lassen sich die *MtSLAH2-3*-Anionenkanäle aus *M. truncatula* im Gegensatz zu *AtSLAH3* von Calcium-unabhängigen SnRK2/OST1-Proteinkinasen aktivieren. Dies ermöglicht die Aktivierung der *MtSLAH2-3*-Anionenkanäle in Abwesenheit eines Calcium-Signals.

In weiterführenden Studien sollten die Genexpressionsprofile von Calcium-unabhängigen Proteinkinasen wie SnRK2 und S-Typ-Anionenkanälen aus *M. truncatula* sowie deren Interaktionen untersucht werden. So könnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Proteinkinasen die Anionenkanäle *MtSLAH2-3* Nod-LCO-spezifisch aktivieren. Außerdem wäre es von großem Interesse, verschiedene *M. truncatula*-Mutanten zu untersuchen, denen Gene für *MtSLAH2-3A*, *MtSLAH2-3B* und R-Typ-Anionenkanäle fehlen. Diese Experimente könnten zur Identifizierung von Genen führen, die an der frühen Entwicklung der Symbiose beteiligt sind und erklären, warum nur eine kleine Gruppe von Pflanzen dazu in der Lage ist, eine RNS einzugehen, während die AM im Pflanzenreich weit verbreitet ist.



## Summary

Arbuscular Mycorrhiza (AM) and Root Nodule Symbiosis (RNS) are symbiotic interactions with a high benefit for plant growth and crop production. In the soil, AM fungi supply the plant with a broad range of nutrients, whereas the rhizobium bacteria in the root nodules provide fixed nitrogen sources. Thus, it is of great interest to understand the developmental process of these symbiotic interactions.

For recognition of AM fungi and nitrogen-fixing bacteria by plants, diffusible symbiotic signals are essential, which belong to the group of lipochitinoligosaccharides (LCOs). During the development of AM and RNS, plant roots sense these LCOs with pairs of lysin motif domain receptor-like kinases that are located in the plasma membrane. One of the earliest Nod-LCO-triggered responses of root cells represents the depolarization of the plasma membrane. It is likely that plasma membrane anion channels are essential for this reaction, as these channels are required for depolarization in response to a number of other stimuli/stress responses.

In *Arabidopsis*, the S-type family is a prominent group of anion channels that are activated by calcium-dependent Protein Kinases (CPKs). As Nod-LCOs can trigger repetitive elevations of the cytosolic calcium level, we hypothesized that calcium signals activate CPKs, which in turn stimulate S-type anion channels in root cells.

The membrane potential changes of *M. truncatula* root hair cells in response to Nod- and Myc-LCOs were analyzed by using intracellular micro electrodes. In accordance with previous studies in *M. sativa*, Nod-LCOs evoked a membrane depolarization in root hairs cells of *M. truncatula*. Root hair cells not only were sensitive to Nod-LCOs, but for the first time a depolarization response was also shown in response to sulphated Myc-LCOs. However, a second group of Myc-LCO-signals, which lack the sulfate group, did not initiate any reaction of the membrane potential. These data thus suggest that root hair cells use the same perception system to sense sulfated LCOs of symbiotic fungi and bacteria. This conclusion was supported by experiments in which a sulfated Myc-LCO was applied, prior to stimulation with Nod LCOs. This successive application of two stimuli resulted only in a single transient depolarization, as sulfated Myc-LCOs repressed plasma membrane responses to Nod-LCOs.

The relations between Nod-LCO-induced cytosolic calcium signals and membrane potential changes were studied with a combination of intracellular micro electrodes and calcium sensitive reporter dye imaging. In measurements of the cytosolic calcium concentration the

first transient increase was not observed within four minutes after application of Nod-LCOs. Nod-LCO-induced depolarizations occurred earlier and normally peaked after three minutes. In contrast to current models as well as the initial hypothesis of this project, the membrane depolarization thus precedes the cytosolic calcium signals, which was confirmed by simultaneous measurement of both responses.

As S-type anion channels are good candidates for the induction of the LCO-dependent depolarization, we indentified two root-expressed *M. truncatula* orthologues of *AtSLAC1*-family. The cloned S-type anion channels, *MtSLAC1*, *MtSLAH2-3A* and *MtSLAH2-3B* showed typical characteristics of S-type anion channels, when studied in *Xenopus* oocytes. Thereby we could show that both *M. truncatula* anion channels, *MtSLAH2-3A* and *MtSLAH2-3B*, need a protein kinase and external nitrate for activation. They are characterized by a much higher permeability for nitrate compared to chloride. Similarly, to *AtSLAH3* coexpression with *AtSLAH1* or intracellular acidification rendered *MtSLAH2-3A/B* independent from phosphorylation via protein kinases and external nitrate.

Because S-type anion channels show a high permeability for nitrate, we tested the influence of changes in the extracellular anion concentration on the Nod-LCO induced depolarization. It turned out that the response was accelerated when the concentration gradient for nitrate was decreased. However, increasing the extracellular chloride and sulfate concentrations also enhanced the magnitude of the depolarization, which indicates that other types of anion channels, such as ALMT channels may contribute to the LCO-triggered depolarization of root hairs.

The data generated in this project show that the Nod-LCO induced membrane potential change is strongly dependent on the genotype of *M. truncatula*. This early response in the recognition of symbiotic microorganisms is also induced by sulfated Myc-LCOs, which seem to be perceived via the same receptor system as Nod-LCOs. In contrast to our expectations, the depolarization response to Nod-LCOs is independent of changes in the cytosolic calcium level. Consequently, S-type anion channels, activated solely by calcium-dependent protein kinases are not involved in this response. Interestingly, in contrast to the *Arabidopsis* SLAH3, the SLAH2-3s from *M. truncatula* are activated via calcium-independent SnRK2/OST1-like kinases which would allow the activation of the channels even in the absence of calcium transients. Thus, in future studies the expression profile and interaction of calcium-independent protein

kinases like SnRK2s and S-type anion channels in *M. truncatula* should be determined to investigate whether these proteins are capable of activating *MtSLAH2-3A/B* in a Nod-LCO-specific manner. Moreover, the further analysis of *M. truncatula* mutants that lack *MtSLAH2-3A/B* as well as *M. truncatula* R-type anion channels will be of great interest. These experiments can thus lead to the identification of genes that are involved in early symbiosis-related events, which may explain why only a small group of plants is able to develop root nodules, whereas the interaction with mycorrhiza is found for a large variety of plant species.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Symbiose.....	1
1.1.1 Die Mykorrhiza.....	1
1.1.2 Die Wurzelknöllchen-Symbiose.....	2
1.2 Entwicklung der AM und der RNS.....	3
1.2.1 Lebenszyklus der AM.....	3
1.2.2 Lebenszyklus der RNS.....	4
1.3 Struktur der Nod- und Myc-LCOs.....	4
1.4 Signaltransduktion in AM und RNS.....	7
1.5 Reaktionen auf symbiotische Nod-LCOs.....	11
1.5.1 Depolarisierung des Membranpotentials als Reaktion auf Nod-LCOs.....	11
1.5.2 pH-Änderungen als Reaktion auf Nod-LCOs.....	13
1.5.3 Änderungen der zytosolischen Calcium-Konzentration als Reaktion auf Nod-LCOs .....	14
1.6 Reaktionen der Pflanze auf Nod-LCOs vs. MAMPs.....	17
1.7 Modell zur Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials.....	18
1.8 Anionenkanäle in Pflanzen.....	19
1.8.1 S-Typ-Anionenkanäle.....	20
1.8.2 R-Typ-Anionenkanäle.....	22
1.9 Calcium-abhängige und Calcium-unabhängige Proteinkinasen.....	23
1.9.1 Calcium-unabhängige Proteinkinasen.....	23
1.9.2 Calcium-abhängige Proteinkinasen.....	24
1.10 Zielsetzung.....	25
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>28</b>
2.1 Pflanzenarbeiten.....	28
2.1.1 Pflanzenmaterial.....	28
2.1.2 Oberflächensterilisation und Vernalisation.....	28
2.1.3 Pflanzenanzucht zur Vermehrung von Wildtyp- und Mutantenlinien.....	29
2.1.4 Pflanzenanzucht und Messlösungen für Einstich- und FURA-2-Dextran-Messungen .....	29
2.2 Symbiotische Signalmoleküle: Nod-LCOs und Myc-LCOs.....	30
2.3 Einstich von intrazellulären Mikroelektroden.....	30
2.3.1 Herstellung von Referenz- und intrazellulären Elektroden.....	31
2.3.2 Aufbau des Einstich-Messplatzes.....	31
2.4 Calcium-Bildgebungsverfahren unter Verwendung des Calcium-sensitiven Farbstoffes FURA-2-Dextran.....	32
2.5 <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten als heterologes Expressionssystem.....	34
2.5.1 Gewinnung der Oozyten aus <i>Xenopus laevis</i> .....	35
2.5.2 Injektion von cRNA in die Oozyten von <i>Xenopus laevis</i> .....	35
2.6 Fluoreszenz-Mikroskopie.....	36
2.6.1 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC).....	36
2.6.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM).....	37
2.7 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik.....	37
2.7.1 Das Messprinzip.....	37
2.7.2 Der Messaufbau.....	38

2.7.3 Die Elektroden .....	39
2.7.4 Konventionen .....	39
2.7.5 Datenerfassung und Spannungsprotokolle.....	39
2.7.6 Messreihen und Messlösungen.....	41
2.7.7 Biophysikalische Grundlagen und Datenanalyse.....	42
2.7.7.1 Bestimmung von Umkehrpotentialen und relativen Permeabilitäten .....	43
2.8 Molekularbiologische Arbeiten .....	44
2.8.1 Isolierung von Nukleinsäuren und cDNA-Synthese .....	44
2.8.1.1 DNA-Isolierung nach der Köln-Methode aus <i>M. truncatula</i> -Blattgewebe.....	44
2.8.1.2 RNA-Isolierung aus <i>M. truncatula</i> -Wurzel- und -Blattgewebe (Kit).....	45
2.8.1.3 cDNA-Synthese.....	45
2.8.2 DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung.....	47
2.8.3 Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	47
2.8.3.1 PCR zur Amplifikation der kodierenden Sequenzen putativer Ionenkanäle ...	47
2.8.3.2 PCR-Mutanten-Genotypisierung.....	48
2.8.3.3 Quantitative PCR (qPCR).....	49
2.8.4 DNA-Agarosegelelektrophorese.....	50
2.8.5 USER-Klonierung.....	51
2.8.6 Molekularbiologische Methoden mit <i>Escherichia coli</i> .....	53
2.8.6.1 Bakterien-Transformation durch Hitzeschock .....	53
2.8.6.2 Herstellung von Übernachtskulturen .....	53
2.8.6.3 Isolierung der Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Bakterien.....	53
2.8.7 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse .....	54
2.8.8 Herstellung von cRNA zur Injektion in <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten .....	54
2.8.8.1 IVT-PCR.....	54
2.8.8.2 In vitro-Transkription.....	55
2.8.9 RNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	56
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>57</b>
3.1 Membranpotentialmessungen an Wurzelhaarzellen von <i>Medicago truncatula</i> .....	57
3.1.1 Nod-LCO-induzierte Membranpotentialsänderungen .....	57
3.1.2 Myc-LCO-induzierte Membranpotentialsänderungen .....	59
3.1.3 Antwort des Membranpotentials auf Nod-LCOs nach vorheriger Stimulation durch Myc-LCOs.....	61
3.1.4 Einfluss der Anionen Chlorid, Nitrat und Sulfat auf die Nod-LCO-induzierte Depolarisierung des Membranpotentials.....	63
3.2 Calcium-Messungen an Wurzelhaarzellen von <i>Medicago truncatula</i> .....	65
3.2.1 Messung der NOD-LCO-induzierten Änderungen der zytosolischen Calcium-Konzentration mittels FURA2-Dextran .....	66
3.2.2 Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Nod-LCO-induzierten Calcium-Signalen und der Depolarisierung des Membranpotentials .....	67
3.3 Funktionelle Charakterisierung AtSLAC/SLAH-orthologer Anionenkanäle aus <i>M. truncatula</i> .....	69
3.3.1 Identifikation und Klonierung AtSLAC/SLAH-orthologer Anionenkanäle aus <i>M. truncatula</i> .....	70
3.3.2 Expression von MtSLAH2-3A und MtSLAH2-3B in <i>Xenopus</i> -Oozyten.....	74
3.3.2.1 Aktivierung des Anionenkanals MtSLAH2-3B .....	74
3.3.2.2 Kinase-abhängige Aktivierung der Anionenkanäle MtSLAH2-3A und MtSLAH2-3B.....	76

3.3.2.3	Selektivität der Anionenkanäle MtSLAH2-3A und MtSLAH2-3B .....	77
3.3.3	Expression von MtSLAC1 in Xenopus-Oozyten .....	81
3.3.3.1	Kinase-abhängige Aktivierung von MtSLAC1 .....	81
3.3.3.2	Anionen-Selektivität von MtSLAC1 .....	83
3.3.4	Zytosolische Azidifikation .....	84
3.3.5	Aktivierung durch AtSLAH1 .....	86
3.4	Analyse von Tnt1-Transposoninsertionsmutanten für die Gene MtSLAH2-3A und MtSLAH2-3B.....	88
3.4.1	Anzucht, Selektion und Genotypisierung von Tnt1-Transposoninsertionsmutanten	88
3.4.2	Analyse der MtSLAH2-B-Genexpression in den Tnt1-Transposoninsertionslinien NF10039 und NF11647 .....	94
3.4.3	Analyse der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials in Wurzelhaarzellen von NF11647 und NF10039.....	95
3.4.4	Überblick über Tnt1-Transposoninsertionen der Linie NF10039.....	97
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>99</b>
4.1	Reaktion von <i>M. truncatula</i> -Wurzelhaarzellen auf Signalmoleküle der RNS (Nod-LCOs) und AM (Myc-LCOs) .....	99
4.1.1	Einfluss von Nod-LCOs auf das Membranpotential in <i>M. truncatula</i> -Wurzelhaarzellen .....	100
4.1.2	Einfluss von Myc-LCOs auf das Membranpotential in <i>M. truncatula</i> -Wurzelhaarzellen .....	100
4.1.3	LCOs: Chemische Struktur und Perzeption.....	101
4.1.4	Einfluss externer Anionen auf die durch Nod-LCOs induzierte Depolarisierung des Membranpotentials .....	102
4.2	Zytosolische Calcium-Änderungen als Antwort auf Nod-LCOs.....	104
4.3	Charakterisierung von <i>M. truncatula</i> -Anionenkanälen .....	106
4.3.1	MtSLAH2-3A und MtSLAH2-3B: Homologien zu AtSLAH2/SLAH3 und Kinase-abhängige Aktivierung .....	107
4.3.2	MtSLAC1: Homologien zu AtSLAC1 und Kinase-abhängige Aktivierung.....	108
4.3.3	Konservierung von SLAC1 und SnRK2-Kinasen .....	109
4.3.3.1	Aktivierung von MtSLAH2-3A und MtSLAH2-3B durch AtOST1 .....	111
4.3.4	Relative Anionenpermeabilität und SLAH1-Aktivierung von MtSLAH2-3A und MtSLAH2-3B.....	115
4.4	Analyse der MtSLAH2-3B-Transposonmutanten.....	116
4.4.1	Einfluss von MtSLAH2-3B auf die Nod-LCO-induzierte Depolarisierung .....	117
4.5	Zusammenfassung und Ausblick .....	120
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>123</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>140</b>
6.1	Aminosäuresequenzvergleiche der Gene MtSLAH2-3A und MtSLAH2-3B aus den Genotypen A17 und R108.....	140
6.2	Vektorkarten .....	142
6.3	Abbildungsverzeichnis .....	145
6.5	Tabellenverzeichnis .....	147
6.6	Abkürzungsverzeichnis .....	148
<b>7.</b>	<b>LEBENS LAUF UND PUBLIKATIONS LISTE .....</b>	<b>153</b>

---

7.1 Curriculum Vitae .....	153
7.2 Publikationsliste .....	155
<b>8. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG UND DANKSAGUNG.....</b>	<b>156</b>
8.1 Eidesstattliche Erklärung.....	156
8.2 Danksagung.....	157

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Symbiose

Die griechischen Wörter sym und bios bilden den Begriff Symbiose, der übersetzt „Zusammenleben“ bedeutet. Die Definition des Begriffs Symbiose ist umstritten. Einige Wissenschaftler meinen, der Begriff beschreibt die dauerhafte und enge ökologische Beziehung zwischen zwei oder mehr Arten zum gegenseitigen Nutzen (Mutualismus). Andere sind der Meinung, der Begriff umfasst jede persistente biologische Interaktion, ob sie nun mutualistisch, kommensalistisch oder parasitisch ist (Douglas 1994, Douglas 2010). Der deutsche Forscher Heinrich Anton de Bary definierte 1879 die Symbiose als das „Zusammenleben ungleicher Lebewesen“ (De Bary 1879). Nach jahrzehntelanger Debatte gilt aktuell die „de Bary“-Definition als anerkannte Beschreibung einer Symbiose (Martin and Schwab 2013).

Die am besten untersuchten mutualistischen Symbiosen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen sind die Arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose (AM) und die Wurzelknöllchen-Symbiose (engl. Root Nodule Symbiosis (RNS)), die in den Kapiteln 1.1.1 und 1.1.2 beschrieben werden. Die Entwicklung beider Symbiosen beginnt mit einem Austausch von Signalmolekülen zwischen den Symbionten. Durch die Signalmoleküle wird ein Signaltransduktionsweg eingeschaltet, ohne den eine vollständige Etablierung der AM und RNS nicht möglich wäre (Kapitel 1.4).

#### 1.1.1 Die Mykorrhiza

Im Jahr 1885 prägte Albert Bernhard Frank den Begriff der Mykorrhiza (Frank 1885), der die verbreitetste und wichtigste Symbiose im Pflanzenreich beschreibt. Der Begriff Mykorrhiza setzt sich zusammen aus den griechischen Wörtern mykes (Pilz) und rhiza (Wurzel) (Strack et al. 2001) und gibt somit gut die symbiontische Lebensgemeinschaft zwischen Pilz und Pflanze wieder, in der das gesamte Wurzelsystem der Wirtspflanze mit dem Pilzmycel in engem morphologischen und physiologischen Kontakt steht.

Es wird zwischen zwei verschiedenen Formen der Mykorrhiza unterschieden. Bei der Ektomykorrhiza, die meist bei Waldbäumen auftritt, sind die äußeren Rindenschichten der Baumwurzeln besiedelt. Die Pilzhypen dringen interzellulär in die äußeren Wurzelschichten ein. Im Gegensatz zur Ektomykorrhiza steht die Endomykorrhiza, bei der die Pilzhypen

intrazellulär in die Zellen der inneren Rindenschichten eindringen (Strack et al. 2001). Eine besondere Form der Endomykorrhiza ist die vor rund 450 Millionen Jahren entstandene Arbuskuläre Mykorrhiza (AM), die zwischen mindestens 80 % der Angiospermen und Pilzen der Abteilung Glomeromycota gebildet wird (Remy et al. 1994, Smith and Read 2008).

Warum entwickelte sich im Laufe der Evolution dieses symbiontische Wurzel-Pilz-System, das die Entwicklung der Landpflanzen vereinfachte (Simon et al. 1993)? Die Erklärung liegt im mutualistischen Charakter dieser Symbiose. Dies bedeutet, dass beide Partner, der Pilz und die Pflanze, einen großen Nutzen aus ihrer Verknüpfung ziehen. Der Pilz unterstützt die Pflanze bei der Aufnahme von Wasser sowie von Makro- und Mikronährstoffen aus dem Boden und erhält im Gegenzug bis zu 20 % der von der Pflanze in der Photosynthese fixierten Kohlenhydrate (Harrison 2005). Außerdem besitzt die Pflanze durch die Symbiose mit dem Pilz eine erhöhte Resistenz gegenüber Umweltstress und Befall durch Pflanzenpathogene (Cordier et al. 1998, Cameron et al. 2013, Pozo and Azcon-Aguilar 2007).

Typisch für die AM sind die Arbuskeln (lat. Arbusculum: Busch, kleiner Baum), die sich vorwiegend in den inneren kortikalen Zellen der Pflanzenwurzeln intrazellulär ausbilden. Diese Arbuskeln, die von einem interzellulären Hyphennetz im gesamten Rindenbereich ausgehen, sind hauptverantwortlich für den Nährstoffaustausch zwischen Pilz und Pflanze (Parniske 2008, Seddas et al. 2009).

### **1.1.2 Die Wurzelknöllchen-Symbiose**

Die Wurzelknöllchen-Symbiose (engl.: Root Nodule Symbiosis (RNS)), die sich vor rund 60 Millionen Jahren entwickelte, ist weniger verbreitet als die AM und beschränkt sich auf wenige Pflanzenfamilien und nur zwei Gruppen von Bakterien (Soltis et al. 1995). Die eine Gruppe von Bakterien umfasst die Rhizobien, die eine Symbiose mit Leguminosen (Fabaceae) und *Parasponia* (Cannabaceae) bilden (Trinick 1979, Op den Camp et al. 2011). Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um *Frankia*-Bakterien, die Aktinorhiza-Symbiosen mit bestimmten Angiospermen eingehen (Pawlowski and Bisseling 1996, Stacey et al. 1992, Li et al. 2015). Eine Gemeinsamkeit dieser Bakterien ist ihre Fähigkeit, Stickstoff aus der Atmosphäre zu fixieren und die Pflanze damit zu versorgen.

Stickstoff ist ein essentieller Nährstoff für die Pflanze, da er für den Aufbau von Proteinen und Nukleinsäuren benötigt wird. Pflanzen sind nicht dazu in der Lage, molekularen Stickstoff zu

fixieren. Deshalb sind sie auf Bakterien angewiesen, die Nitrogenasen besitzen, welche die Reaktion von elementarem molekularem Stickstoff ( $N_2$ ) in eine biologisch verfügbare Form (Ammonium) katalysieren. Nitrogenasen sind sehr sauerstoffempfindlich. Deswegen haben Bakterien Anpassungen entwickelt, um unter sauerstoffarmen Bedingungen Stickstoff zu fixieren. Die Wurzelknöllchen, die sich aus Zellen des Wurzelkortexes und Perizykel-Zellen der Wurzelstele der Wirtspflanze entwickeln, liefern optimale Bedingungen für die Stickstofffixierung und sind die essentiellen Organe der RNS. Wie bei der AM die Pilze erhalten bei der RNS die Bakterien von der Pflanze Kohlenhydrate aus der Photosynthese (Oldroyd and Downie 2008, Mus et al. 2016).

Trotz der großen Vorteile der RNS sind nur 2,5 % der Angiospermen in der Lage, solch eine Symbiose auszubilden (Soltis et al. 1995). Wären mehr Pflanzen dazu fähig, eine RNS einzugehen, könnte das Aufbringen von chemikalischen Düngemitteln beim Anbau von Nutzpflanzen stark reduziert werden.

## 1.2 Entwicklung der AM und der RNS

Die Ausbildung der AM und der RNS erfordert einen komplexen Signaltransduktionsweg zwischen Pilz und Pflanze bzw. Bakterium und Pflanze sowie die Umorganisation des genetischen und morphologischen Programmes der Wurzelzellen. Der Untersuchung der zellulären und molekularen Grundlagen dieser nicht nur aus landwirtschaftlicher, sondern auch aus ökologischer Sicht sehr wichtigen Symbiosen widmen sich daher zahlreiche Forschungsprojekte (Strack et al. 2001, Kosuta et al. 2003).

### 1.2.1 Lebenszyklus der AM

Die Entwicklung der AM beginnt mit der Keimung der Pilzsporen und der Ausbildung eines Hyphennetzes. Dies wird durch ein von der Wirtspflanze entsendetes Signalmolekül induziert, das auch als *branching factor* bezeichnet wird. Dabei handelt es sich um das Pflanzenhormon Strigolacton (Akiyama et al. 2005, Parniske 2008). Doch nicht nur die Pflanze, sondern auch der Pilz sendet Signalmoleküle aus. Diese sogenannten Myc-LCOs (LCO: Lipochitinoligosaccharid) aktivieren nach ihrer Erkennung durch die Pflanze einen Signaltransduktionsweg. Außerdem führen sie in den Epidermiszellen der Pflanzenwurzeln noch vor einem morphologischen Kontakt der zwei Symbiosepartner zu starken

Schwankungen des zytoplasmatischen und nukleären Calcium-Spiegels (Kosuta et al. 2008, Sun et al. 2015), die auch als Calcium-Oszillationen bezeichnet werden, sowie zu einer erhöhten Expression symbiosespezifischer Gene wie beispielsweise *MtENOD11* (Kosuta et al. 2003). Nach der Sekretion pilzlicher Myc-LCOs kommt es zur Ausbildung eines Hyphopodiums auf den Epidermiszellen der Pflanzenwurzeln. Ausgehend davon entsteht der *prepenetration apparatus* (PPA), eine von der Pflanze gebildete subzelluläre Struktur, die das Eindringen der Pilzhyphen in die Pflanzenzellen erleichtert (Parniske 2008). Letztendlich werden die typischen Arbuskeln im inneren Wurzelkortex gebildet, die für den Nährstoffaustausch essentiell sind.

### 1.2.2 Lebenszyklus der RNS

Auch die RNS beginnt mit der Aussendung von Signalmolekülen. Die Pflanzenwurzeln geben Flavonoide in die Rhizosphere ab, während die Rhizobien Nod-LCOs aussenden, die über Rezeptoren in den Epidermiszellen der Wurzeln erkannt werden. Die Erkennung der Nod-LCOs führt zur Aktivierung des Signaltransduktionsweges, der wie bei der AM Calcium-Oszillationen und die Aktivierung der Genexpression symbiosespezifischer Gene beinhaltet. Es folgen morphologische Veränderungen wie die Krümmung der Wurzelhaare, das sogenannte *root hair curling* (Callaham and Torrey 1981, Wood and Newcomb 1989). Durch diese Krümmung werden die Rhizobien vom Wurzelhaar umschlossen und können über einen Infektionsschlauch in das Wurzelgewebe eindringen. Infektionsschläuche sind invasive Invaginationen der Pflanzenzelle, die die Invasion der Rhizobien ins Wurzelgewebe ermöglichen (Callaham and Torrey 1981, Ridge and Rolfe 1985).

Die zur Stickstofffixierung essentiellen Wurzelknöllchen entstehen unterhalb der Stelle der bakteriellen Infektion durch die *de novo* Ausbildung eines Wurzelknöllchenmeristems im Wurzelkortex. Der Infektionsschlauch wächst in Richtung des entstehenden Wurzelknöllchens und verzweigt sich mit dessen Gewebe. Die Bakterien werden aus dem Infektionsschlauch in membrangebundene Kompartimente der Wurzelknöllchenzellen entlassen und differenzieren zu stickstofffixierenden Rhizobien (Oldroyd 2013).

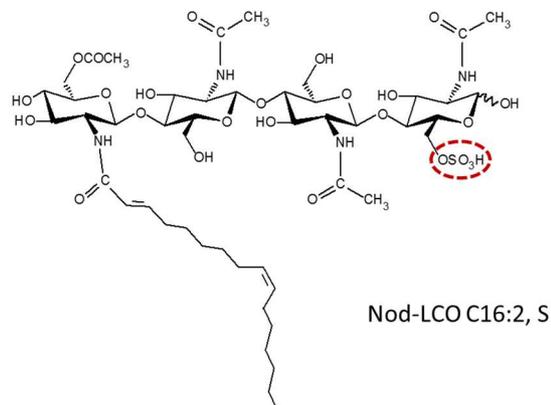
### 1.3 Struktur der Nod- und Myc-LCOs

Die Struktur der Nod-LCOs der RNS wurde von Lerouge et al. 1990 aufgeklärt. In verschiedenen Rhizobien-Spezies konnten allgemeine (nodABC) (Van Brussel et al. 1986, Zaat et al. 1987,

Faucher et al. 1988, Schmidt et al. 1988) und wirtsspezifische Nodulierungsgene (*nodH*, *nodQ*) (Faucher et al. 1988, Banfalvi and Kondorosi 1989) identifiziert werden, die an der Produktion extrazellulärer Nod-Signalmoleküle beteiligt sind.

Unter Verwendung von Rhizobienstämmen, die die symbiotischen Signalmoleküle überproduzieren, wurden die Nod-LCOs mittels Chromatographie-Verfahren aufgereinigt. Die Entschlüsselung der chemischen Struktur der Nod-LCOs erfolgte anhand einer Kombination von chemischen Analysen, Kernspinresonanz- (engl.: Nuclear Magnetic Resonance (NMR)) und Massenspektrometrie sowie <sup>35</sup>S-Markierungs-Verfahren (Lerouge et al. 1990).

Die Grundstruktur der Nod-LCOs bildet ein Chitin-Oligosaccharid-Rückgrat (Chitinoligosaccharid (CO)), das aus vier oder fünf N-Acetylglucosamin-Einheiten besteht und am reduzierenden, terminalen Zucker eine N-Acyl-Gruppe trägt. Die Nod-LCOs werden als Lipochitinoligosaccharide definiert und können unterschiedliche Substitutionen am terminalen Glucosamin tragen, wie beispielsweise eine Methylierung, Acetylierung, Glykosylierung oder Sulfatierung. Das macht neben der Länge und der Sättigung der N-Acyl-Gruppe die hohe Spezifität der Nod-LCOs für eine Wirtspflanze aus (Abbildung 1) (Denarie et al. 1996, Lerouge et al. 1990, Miller and Oldroyd 2012, Roche et al. 1991).



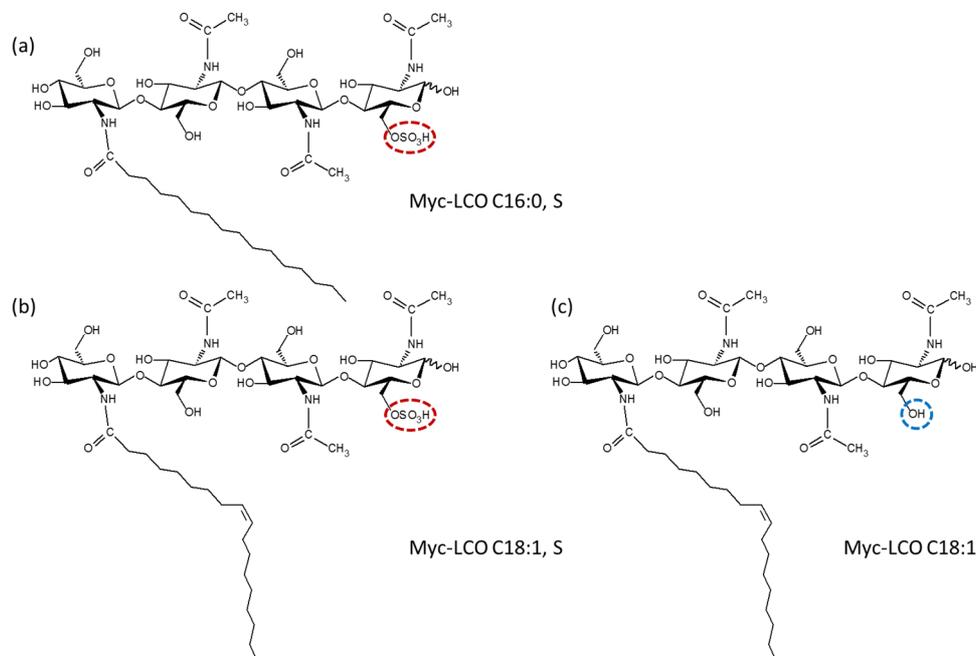
**Abbildung 1: Chemische Struktur eines Nod-LCOs**

Die abgebildete chemische Struktur beschreibt den am häufigsten vorkommenden Nod-LCO aus dem Bakterium *Sinorhizobium meliloti* (NodSM-IV, C16:2, S). Es handelt sich um ein Lipochitinoligosaccharid, das sich durch eine ungesättigte N-Acyl Gruppe und eine Sulfatgruppe am terminalen Glucosamin (rot markiert) auszeichnet.

Ein wichtiger Meilenstein für das Verständnis der AM war die Aufklärung der Struktur der Myc-LCOs, die Maillet et al. im Jahr 2011 gelang. Die Entschlüsselung der chemischen Struktur

wurde aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Menge an Myc-LCOs erschwert. Massenspektrometrische Verfahren, die sich stark weiterentwickelt hatten und auch bei geringer Menge des zu untersuchenden Moleküls zu sicheren Ergebnissen führten, dienten zur Aufklärung des Aufbaus der Myc-LCOs. Außerdem machte ein Vergleich der Ergebnisse mit den bereits bekannten Strukturen der Nod-LCOs oder synthetischen LCOs eine präzise Bestimmung der Myc-LCO-Struktur möglich.

Um eine größere Menge an Myc-LCOs zu erhalten, wurden *Rhizobien*-Stämme benutzt, bei denen für die Nod-LCO-Biosynthese wichtige nod-Gene mittels Gentechnik mutiert vorlagen. Dadurch produzierten sie sehr viel einfacher aufgebaute LCOs. Massenspektrometrische Strukturanalysen dieser aufgereinigten LCOs ergaben, dass es sich um Analoge der *G. intraradices* Myc-LCOs handelt. In einem weiterführenden Ansatz wurden rekombinante *Escherichia coli*-Stämme benutzt, die die entsprechenden nod-Gene aus *S. meliloti* trugen. So wurden Myc-LCOs in Milligramm-Mengen synthetisiert, die in biologischen Assays hinsichtlich Stimulation von Mykorrhizierung und Wurzelverzweigung (engl.: root branching) überprüft wurden (Ohsten Rasmussen et al. 2004, Maillet et al. 2011).



**Abbildung 2: Chemische Strukturen von Myc-LCOs**

Die chemischen Strukturen drei verschiedener Myc-LCOs des Pilzes *Glomus intraradices* sind dargestellt. Strukturunterschiede bestehen in der Länge und Sättigung der N-Acylgruppe und dem Vorhandensein (a, b) oder Fehlen (c) einer Sulfatgruppe am terminalen Glucosamin.

Bei den Myc-LCOs handelt es sich wie bei den Nod-LCOs um tetramere oder pentamere Lipochitinoligosaccharide. Myc-LCOs sind einfacher aufgebaut als Nod-LCOs. Dies könnte ein Grund für die geringe Wirtsspezifität bei der AM sein. Als N-Acyl-Substitutionen treten Palmitinsäure (C16:0) oder eine C18:1-Fettsäure auf. Die Anzahl der Substitutionen am terminalen Glucosamin ist bei Myc-LCOs limitiert und lediglich das Vorhandensein oder Fehlen einer Schwefelgruppe am reduzierenden Ende des Lipochitinoligosaccharides könnte für die Spezifität von Bedeutung sein.

Strukturelle Unterschiede zwischen Nod- und Myc-LCOs sind begrenzt. Nod-LCOs haben eine O-Acetyl-Gruppe an Position sechs des nicht reduzierenden Endes, die bei Myc-LCOs fehlt. Außerdem tragen Myc-LCOs eine einfach ungesättigte Ölsäure (C18:1) im Gegensatz zu der mehrfach ungesättigten Acyl-Kette (C16:2) der Nod-LCOs (Maillet et al. 2011). Aufgrund der Einfachheit ihrer Struktur wird vermutet, dass es sich bei den Myc-LCOs um evolutionäre Vorläufer der Nod-LCOs handelt. Folglich müssen beide Moleküle sehr eng verwandt sein. Neben dem *Myc-Signaling* besteht die Wirkung der Myc-LCOs auf die Pflanzenwurzel unter anderem in einer Stimulierung der Wurzelverzweigung über den DMI-Signaltransduktionsweg (engl.: Does not Make Infection (DMI)) (Maillet et al. 2011).

Bei den vom Pilz *G. intraradices* sekretierten Myc-LCOs handelt es sich immer um eine Mischung aus sulfatisierten und nicht sulfatisierten Lipochitinoligosacchariden. In dieser Arbeit wird zwischen sulfatisierten Myc-LCOs (sMyc) und nicht sulfatisierten Myc-LCOs (nsMyc) unterschieden.

#### 1.4 Signaltransduktion in AM und RNS

Die Signaltransduktion der RNS beginnt mit der Perzeption der Signalmoleküle durch Lysin-Motiv (LysM)-Rezeptor-ähnliche Kinasen (engl.: receptor like kinase (RLK)). Für die Erkennung der Nod-LCOs wurden in *Lotus japonicus* und *M. truncatula* jeweils zwei LysM-RLKs identifiziert: Nod factor receptor 1 (*LjNFR1*) und Nod factor receptor 5 (*LjNFR5*) in *L. japonicus* (Madsen et al. 2003, Radutoiu et al. 2003) sowie LysM receptor kinase 3 (*MtLYK3*) und Nod factor perception (*MtNFP*) in *M. truncatula* (Limpens et al. 2003, Arrighi et al. 2006). Die Leucin-rich-repeat (LRR)-Kinase *MtDMI2* (*LjSYMRK*) bildet einen Rezeptor-Komplex mit *MtLYK3* und steht als Rezeptor-ähnliche Kinase ebenfalls am Beginn der Signaltransduktion (Stracke et al. 2002, Endre et al. 2002).

Die erste messbare Reaktion der Wurzelhaarzellen auf Nod-LCOs ist eine Depolarisierung des Membranpotentials (Ehrhardt et al. 1992, Felle et al. 1995, Kurkdjian 1995). Darauf folgt eine Änderung der Calcium-Konzentration im Nukleus, die sogenannten Calcium-Oszillationen (Ehrhardt et al. 1996, Shaw and Long 2003, Miwa et al. 2006, Oldroyd and Downie 2006). Für die Calcium-Oszillationen sind neben Nukleoporinen (NUP85, NUP133, NENA) (Kanamori et al. 2006, Saito et al. 2007, Groth et al. 2010), auch Ionenkanäle wichtig, die in der Kernmembran lokalisiert sind (*MtDMI1/LjPOLLUX*, *CASTOR*, *CNGC15*) (Ane et al. 2004, Charpentier et al. 2008, Charpentier et al. 2016, Barker et al. 2017). Außerdem scheint Mevalonat als sekundärer Botenstoff die Calcium-Oszillationen zu aktivieren (Oldroyd 2013, Barker et al. 2017). Neueste Erkenntnisse zeigen, dass *MtDMI2* mit der 3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMGR1) assoziiert, ein Enzym, das an der Produktion des sekundären Botenstoffes Mevalonat beteiligt ist (Kevei et al. 2007, Venkateshwaran et al. 2015). Mevalonat ist ein kleines Molekül und kann ohne die Beteiligung von Nukleoporinen durch den Kernporenkomplex diffundieren (Genre and Russo 2016).

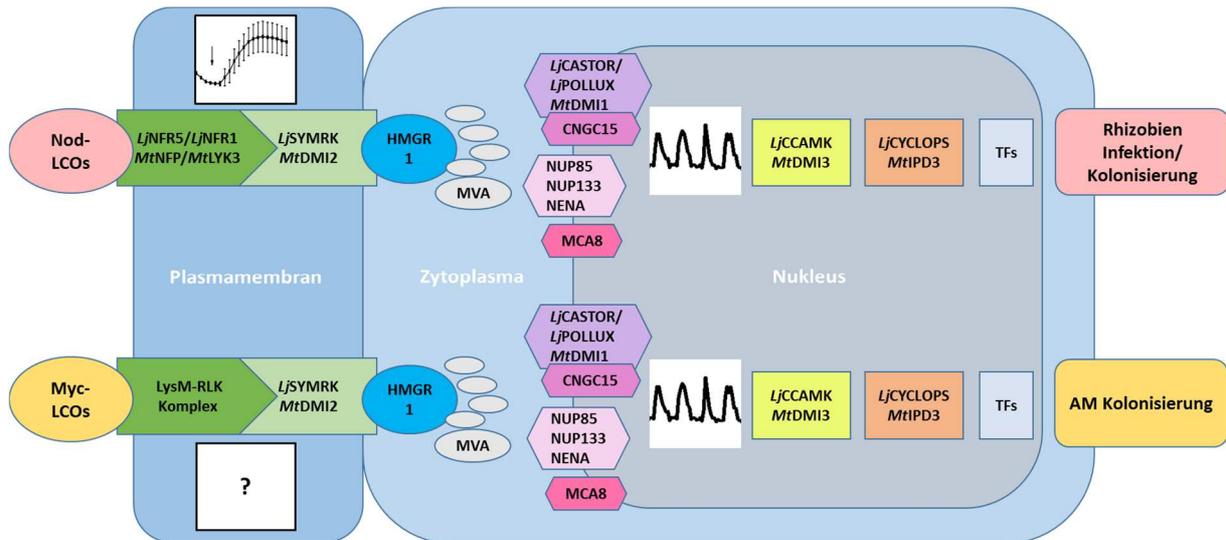
Für die Entstehung der plötzlichen Änderung der Calcium-Konzentration wird generell angenommen, dass Calcium über einen unbekanntem spannungsabhängigen Calcium-Kanal aus dem Lumen der Kernhülle ins Nukleoplasma strömt. Kürzlich wurden von zyklischen Nukleotiden gesteuerte Calcium-Kanäle identifiziert (engl.: cyclic nucleotide gated channel (CNGC)), die einen Komplex mit den Kalium-Kanälen *MtDMI1/LjPOLLUX* und *CASTOR* bilden und vermutlich für einen schnellen Calcium-Ausstrom aus dem Nukleus verantwortlich sind (Charpentier et al. 2016). Es wird vermutet, dass ein Kalium-Einstrom über die Kalium-Kanäle (*MtDMI1/LjPOLLUX*, *CASTOR*) den Calcium-Efflux aus der Kernmembran kompensiert (Ane et al. 2004, Oldroyd 2013). Außerdem wurde die Calcium-Pumpe MCA8 identifiziert, bei der es sich um eine Calcium-ATPase der SERCA-Familie (engl.: sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA)) handelt, die Calcium zurück in das Lumen der Kernhülle pumpt (Capoen et al. 2011).

Die intranuklearen Calcium-Oszillationen werden schließlich von einer Calcium-Calmodulin-abhängigen Kinase (CCaMK, *MtDMI3*) dekodiert (Levy et al. 2004, Mitra et al. 2004). Hierfür ist die Assoziation der CCaMK mit ihrem Substrat CYCLOPs (*MtIPD3*) und dessen Phosphorylierung essentiell (Messinese et al. 2007, Yano et al. 2008). Die Dekodierung führt zur Initiation der Genexpression essentieller Symbiose-Gene.

An der Aktivierung der symbiosespezifischen Genexpression sind verschiedene symbiosespezifische Transkriptionsfaktoren beteiligt. Transkriptionsfaktoren, die bei der RNS eine Rolle spielen, sind unter anderem NSP1, NSP2 und ERN1 (Kalo et al. 2005, Smit et al. 2005, Middleton et al. 2007). Einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren bei der Entwicklung der RNS ist *Nodule Inception* (NIN), der essentiell und ausreichend für die Bildung von Wurzelknöllchen ist (Soyano et al. 2013, Vernie et al. 2015).

Die Signaltransduktion der AM läuft sehr ähnlich ab wie die der RNS. Spezifische Myc-LCO-Rezeptoren konnten noch nicht identifiziert werden, allerdings spielt die Leucin-rich-repeat (LRR)-Rezeptor-Kinase *MtDMI2* auch eine Rolle bei der AM-Signaltransduktion. Es wird vermutet, dass *MtDMI2* mit einem bislang unbekanntem Myc-LCO-Rezeptor assoziiert (Stracke et al. 2002). In Reis konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor *OsCERK1* nicht nur bei der Immunantwort auf Chitin, sondern auch bei der Entwicklung der AM eine Rolle spielt (Miyata et al. 2014).

Die bereits beschriebenen Calcium-Oszillationen treten auch als Reaktion auf Myc-LCOs auf (Kosuta et al. 2008, Sieberer et al. 2012, Sun et al. 2015). Die Dekodierung der Calcium-Signale läuft bei der AM ebenfalls über die Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase (CCaMK, *MtDMI3*) und ihr Substrat CYCLOPS (*MtIPD3*) und führt zur Aktivierung der Expression symbiosespezifischer Gene. Daran sind wie bei der RNS symbiosespezifische Transkriptionsfaktoren beteiligt (NSP2, RAM1) (Maillet et al. 2011, Devers et al. 2011, Laouressergues et al. 2012, Gobbato et al. 2012).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges der RNS und AM**

Nod- und Myc-LCOs werden von einem Rezeptorkomplex erkannt, der aus Lysin-Motiv (LysM) und Leucin reach repeat (LRR) Rezeptor-ähnlichen Kinasen (RLKs) besteht. Für die Erkennung der Nod-LCOs wurden in *M. truncatula* *MtNFP*, *MtLYK3* (LysM-RLK) und *MtDMI2* (LRR-RLK) identifiziert. Als erste Reaktion der Pflanzenzelle auf Nod-LCOs kommt es zu einer Depolarisierung des Potentials der Plasmamembran. Außerdem werden sekundäre Botenstoffe ausgeschüttet. Ein sekundärer Botenstoff ist Mevalonat (MVA), an dessen Produktion das Enzym 3-hydroxy-3methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMGR1) beteiligt ist, das mit *MtDMI2* interagiert. An den Calcium-Oszillationen im Nucleus sind Kaliumkanäle wie *MtDMI1*, die Calcium-ATPase der SERCA-Familie *MCA8*, von zyklischen Nucleotiden gesteuerte Calcium-Kanäle (z.B.: *CNGC15*) und vermutlich die Nucleoporine *NUP85*, *NUP133* und *NENA* beteiligt. Die Dekodierung der intranuklearen Calcium-Signale erfolgt über die Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase *MtDMI3* und deren Substrat *MtIPD3*. An der Aktivierung der symbiosespezifischen Genexpression sind verschiedene symbiosespezifische Transkriptionsfaktoren (TFs) beteiligt.

Neben Nod-LCOs produzieren einige Rhizobien Effektorproteine, die vom Bakterium z.B. über das *type III secretion system* (T3ESS) direkt in das Zytoplasma der Pflanzenwurzelzelle injiziert werden. Sie spielen eine Rolle bei der Unterdrückung von Immunabwehrreaktionen der Wirtspflanze sowie der Regulation der Nodulierung und beeinflussen zudem die Wirtsspezifität (Jimenez-Guerrero et al. 2017). Die Funktion des Effektors hängt von dem Genotyp der Wirtspflanze ab. So kann ein Effektor die Nodulierung in einigen Wirtspflanzen fördern, während er sie in anderen inhibiert (Miwa and Okazaki 2017).

## 1.5 Reaktionen auf symbiotische Nod-LCOs

Die Antwort der Pflanzenwurzeln der Wirtspflanze auf Nod-LCOs wurde in zahlreichen Studien untersucht. Da die Myc-LCOs erst 2011 charakterisiert und synthetisiert wurden, gibt es nur wenige Studien über die Reaktion der Wurzelzellen auf die Signalmoleküle der AM. Aus diesem Grund werden im folgenden Kapitel ausschließlich die Reaktionen auf Nod-LCOs zusammengefasst.

Bei der Entwicklung der RNS ist eine erste morphologische Veränderung die Deformation der Wurzelhaare, die zum Einschluss der symbiotischen Bakterien, der Entwicklung des Infektionsschlauches und dem Eindringen der Bakterien in die Wurzelzellen führt. Isolierte Nod-LCOs können im Experiment genutzt werden, um diese ersten Reaktionen der Wirtspflanze auf die bakteriellen Signalmoleküle zu untersuchen. In zahlreichen *Bioassays* konnte gezeigt werden, dass auch isolierte Nod-LCOs eine Deformation der Wurzelhaare, die Entwicklung eines Vorstadiums des Infektionsschlauches, kortikale Zellteilungen und die Bildung von Wurzelknöllchenmeristemen initiieren (Lerouge et al. 1990, Price et al. 1992, Roche et al. 1991, Schultze et al. 1992, Spaink et al. 1991, van Brussel et al. 1992).

Unter Verwendung der isolierten Nod-LCOs können nicht nur die frühen morphologischen, sondern auch die zellulären und physiologischen Veränderungen der Wurzelzellen wie beispielsweise die Signaltransduktion und die symbiosespezifische Genexpression experimentell analysiert werden.

### 1.5.1 Depolarisierung des Membranpotentials als Reaktion auf Nod-LCOs

Eine der ersten Reaktionen der Wirtspflanze auf Nod-LCOs konnte 1992 von Ehrhardt et al. gemessen werden. Durch den Einstich von Mikroelektroden in Wurzelzellen von *Medicago sativa* konnte nach der Zugabe von zellfreien Filtraten des symbiotischen Bakteriums *Rhizobium meliloti* eine Depolarisierung des Membranpotentials gemessen werden (Ehrhardt et al. 1992). Die Depolarisierung startete 30 bis 60 s nach der Applikation der Filtrate (Nod-LCOs) und erreichte ihr Maximum von im Mittel 20 mV nach durchschnittlich 540 s. Die Antwort war konzentrationsabhängig mit einem maximalen Effekt bei einer Konzentration von  $10^{-8}$  bis  $10^{-7}$  M. 25 bis 30 min nach der Zugabe der Nod-LCOs repolarisierte das Membranpotential langsam (Ehrhardt et al. 1992). Ähnliche Beobachtungen wurden von Kurkdjian (1995) und Felle et al. (1995) gemacht, die ebenfalls an *M. sativa* Nod-LCO-

induzierte Depolarisierungen von 20 bis 40 mV messen konnten (Felle et al. 1995, Kurkdjian 1995).

Außerdem konnte der Einfluss der chemischen Struktur der Nod-LCOs auf die Depolarisierung des Membranpotentials gezeigt werden. Eine Entfernung der Sulfatgruppe am reduzierenden Ende des NodRM-IV (C16:2) führte beispielsweise zu einer Inaktivierung des Nod-LCOs, was sowohl im *Bioassay* als auch bei den Membranpotentialsmessungen beobachtet werden konnte (Felle et al. 1995, Roche et al. 1991). Auch andere Parameter wie die Länge der Oligosaccharidkette, die Sättigung der Acyl-Kette oder eine O-Acetylierung am nicht reduzierenden Ende des Nod-LCOs beeinflussen seine biologische Aktivität (Felle et al. 1995, Roche et al. 1991). Felle et al. (1995) beobachteten bei Zugabe von O-acetylierten Nod-LCOs (NodRM-IV (Ac, C16:2, S) im Vergleich zu nicht acetylierten Nod-LCOs (NodRM-IV (C16:2, S) eine beschleunigte Änderung des Membranpotentials der *M. sativa*-Wurzelhaarzellen, während die Amplitude der Depolarisierung identisch war. Phänotypische Reaktionen wie beispielsweise die Wurzelhaardeformation werden durch O-acetylierte Nod-LCOs verstärkt (Roche et al. 1991, Truchet et al. 1991). Auch Kurkdjian (1995) stellten fest, dass sowohl Wurzelhaardeformation als auch Membranpotentialdepolarisierung als Reaktion auf O-acetylierte Nod-LCOs ausgelöst werden. Generell korreliert meist die Stärke der von unterschiedlichen Nod-LCOs ausgelösten Membranpotentialdepolarisierungen mit deren Fähigkeit, auch phänotypische Antworten hervorzurufen. Bei O-acetylierten Nod-LCOs ist dies, wie bereits beschrieben, nicht der Fall (Felle et al. 1995).

Sowohl Felle et al. (1995) als auch Kurkdjian (1995) konnten außerdem eine Desensibilisierung der Wurzelhaarzellen bei wiederholter Zugabe von Nod-LCOs (NodRM-IV (C16:2, S) nachweisen. Das heißt, dass die Reaktion des Membranpotentials bei einer zweiten Zugabe von Nod-LCOs stark abgeschwächt ist.

Ein großer Unterschied zwischen Felle et al. (1995) und Kurkdjian (1995) liegt in der Beobachtung, welche Zelltypen auf Nod-LCOs mit einer Depolarisierung des Membranpotentials reagieren. Kurkdjian (1995) wies nach, dass das Alter des Keimlings und der Entwicklungsstatus des Wurzelhaars entscheidend dafür sind, ob das Membranpotential auf Nod-LCOs reagiert. Epidermiszellen, die sich bereits zu einem Wurzelhaar differenziert haben, d.h. bei denen sich das Wurzelhaar gerade vorwölbt, werden in dieser Studie als sehr sensitiv beschrieben. Im Gegensatz dazu sind Epidermiszellen insensitiv, die sich noch nicht zu

einem Wurzelhaar differenziert haben, d.h. bei denen keine Wurzelhaarwölbung vorliegt. Hinsichtlich einer Depolarisierung des Membranpotentials reagieren demnach 29 Stunden alte Wurzelhaare von intakten Keimlingen am sensitivsten auf Nod-LCOs. Journet et al. (1994) hingegen konnten eine verstärkte Genexpression des frühen Nodulierungs-Gens *Enod12* sowohl in Wurzelhaarzellen als auch in Epidermiszellen nachweisen (Journet et al. 1994). D.h. Nod-LCO-Rezeptoren müssen auch in den undifferenzierten Epidermiszellen bereits vorliegen. Kurkdjian (1995) erklärt diese Beobachtung mit zwei unterschiedlichen Signalkaskaden, die den zwei Reaktionen (Membranpotentialsdepolarisierung, Erhöhung der *Enod12*-Genexpression) zu Grunde liegen. Bei Felle et al. (1995) hingegen ist die Membranpotentialsdepolarisierung als Antwort auf Nod-LCOs bei Wurzelhaarzellen und Epidermiszellen der Wurzelhaarzone identisch. Das beweist das Vorhandensein von Nod-LCO-Rezeptoren in den Epidermiszellen der Wurzelhaarzone und erklärt somit die Beobachtung der erhöhten Genexpression von *Enod12* in Epidermiszellen von *M. sativa* nach Nod-LCO-Zugabe (Felle et al. 1995).

Es wird deutlich, dass die Antwort des Membranpotentials auf Nod-LCOs von verschiedenen Faktoren wie beispielsweise der chemischen Struktur der Nod-LCOs und dem Differenzierungsstatus der Wurzelzellen abhängt. Deshalb galt es in dieser Arbeit zunächst, ein Protokoll zu etablieren, um Membranpotentialsänderungen als Reaktion auf Nod-LCOs in Wurzelhaaren von *M. truncatula* messen zu können.

Ob die symbiotischen Signalmoleküle der AM (Myc-LCOs) ebenfalls eine Depolarisierung des Membranpotentials induzieren, konnte bislang nicht gezeigt werden.

### 1.5.2 pH-Änderungen als Reaktion auf Nod-LCOs

Neben der Depolarisierung des Membranpotentials ist eine weitere frühe Reaktion von *M. sativa* auf Nod-LCOs eine Änderung des intrazellulären und des extrazellulären pH-Wertes (Felle et al. 1996, Felle et al. 1998). Innerhalb von 15 s nach der Zugabe von  $10^{-8}$  M Nod-LCOs (NodRM-IV C16:2,S) reagieren *M. sativa*-Wurzelhaarzellen mit einer zytoplasmatischen Alkalisierung von 0,2 bis 0,3 pH-Einheiten (Felle et al. 1996). Interessanterweise findet diese Alkalisierung auch bei Zugabe einer nicht sulfatisierten Variante des Nod-LCOs (NodRM-IV C16:2) statt, obwohl dieser Stimulus keine Membranpotentialsdepolarisierung und auch keine Deformation der Wurzelhaare induziert (Felle et al. 1996, Schultze et al. 1992). Anhand dieser

Daten wurde von Felle et al. (1996) die Hypothese aufgestellt, dass sich im Laufe der Evolution zwei unabhängige Systeme für die Erkennung von sulfatisierten und nicht sulfatisierten Nod-LCOs entwickelt haben. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es sich bei dem Erkennungssystem für die nicht sulfatisierten Nod-LCOs um ein evolutionäres Relikt handelt, das noch funktionell und dazu in der Lage ist, primitive Nod-LCO-Strukturen ohne Substitutionen zu erkennen (Felle et al. 1996). Außerdem denkbar wäre, dass Rezeptoren pathogener Signalmoleküle (MAMP-Wahrnehmung, engl.: Microbe Associated Molecular Patterns (MAMPs)) die Erkennung der nicht sulfatisierten Nod-LCOs ermöglichen.

Nicht nur intrazellulär, sondern auch extrazellulär findet nach Nod-LCO-Zugabe eine transiente Alkalisierung statt. Mit pH-selektiven Mikroelektroden wurde gezeigt, dass sich der pH-Wert 4 bis 5 mm von der Wurzelspitze entfernt nach Zugabe von Nod-LCOs um 0,1 bis 0,4 pH-Einheiten erhöht (Felle et al. 1998). Diese Änderung des externen pH-Wertes könnte aus transienten Änderungen der Ionenkonzentrationen resultieren, die in den Raum um das Wurzelhaar eintreten und ihn wieder verlassen. Ob die intrazelluläre und extrazelluläre Alkalisierung mit der Depolarisierung des Membranpotentials verknüpft ist, ist noch unklar (Felle et al. 1998).

### **1.5.3 Änderungen der zytosolischen Calcium-Konzentration als Reaktion auf Nod-LCOs**

Calcium ist als sekundärer Botenstoff aus verschiedenen Signalwegen bekannt. In Pflanzen wurden Calcium-Oszillationen beispielsweise mit dem Schließen der Stomata als Antwort auf das Stresshormon Abscisinsäure (ABA) assoziiert (Allen et al. 2001). Jedoch sind diese Calcium-Signale nicht essentiell für die Schließzellantwort auf dieses Stresshormon (Levchenko et al. 2005).

Auch in der Entwicklung der RNS und AM wird für die Calcium-Signale eine wichtige Rolle postuliert. Ehrhardt et al. (1996) konnten unter Verwendung des Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2-Dextran Nod-LCO-induzierte Calcium-Oszillationen in Wurzelhaarzellen von *M. sativa* beobachten. Die gemessene Antwort startete 9 min nach der Zugabe der Nod-LCOs und dauerte 20 bis 60 min. Die Oszillationen traten in einminütigen Abständen auf und waren im perinukleären Bereich lokalisiert (Ehrhardt et al. 1996). Diese Nod-LCO-induzierten repetitiven Änderungen der zytosolischen Calcium-Konzentration

wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen unter Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe und Methoden gemessen. Einige Arbeitsgruppen nutzten ausschließlich einen Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff wie FURA2-Dextran (ratiometrisch) oder Oregon-Green-Dextran (nicht ratiometrisch) (Ehrhardt et al. 1996, Wais et al. 2000, Wais et al. 2002, Amor et al. 2003, Capoen et al. 2009). Andere Arbeitsgruppen führten ihre Experimente unter Verwendung von zwei Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen wie Calcium-Green- oder Oregon-Green-Dextran kombiniert mit Texas-Red-Dextran durch (Shaw and Long 2003, Amor et al. 2003, Capoen et al. 2009, Morieri et al. 2013, Granqvist et al. 2015). Wieder andere Arbeitsgruppen verwendeten transgene Pflanzen, die einen Calcium-Sensor (Yellow Cameleon) exprimieren, zur Untersuchung der zytosolischen Calcium-Änderungen nach Nod-LCO-Zugabe (Miwa et al. 2006, Morieri et al. 2013, Granqvist et al. 2015, Sun et al. 2015).

Neben den Calcium-Oszillationen, die ungefähr 10 min nach Nod-LCO-Zugabe starten, konnten Felle et al. (1999b) mittels intrazellulärer Ionen-selektiver Mikroelektroden eine frühere Änderung der zytosolischen Calcium-Konzentration messen, die zeitlich parallel zur Depolarisierung des Membranpotentials auftritt. Abhängig von der Stelle des Einstichs detektierten die Mikroelektroden in dieser Studie eine Zu- oder Abnahme des zytosolischen Calcium-Levels in wachsenden Wurzelhaarzellen von *M. sativa* ungefähr 1 bis 2 min nach Applikation der Nod-LCOs (Felle et al. 1999b). Diese von Felle et al. (1999b) gezeigten frühen Calcium-Signale wurden von anderen Arbeitsgruppen unter Verwendung von FURA2-Dextran bei *M. truncatula* nicht gemessen (Wais et al. 2000, Wais et al. 2002, Capoen et al. 2009). Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen eignet sich FURA2-Dextran möglicherweise nicht für Messungen dieser Art, da es in relativ hoher Konzentration in der Zelle vorliegen muss, um die minimalen Änderungen der Calcium-Konzentration zu detektieren. Da es sich bei FURA2-Dextran um ein sehr großes Molekül handelt, ist die Injektion in die Zelle nicht einfach, und hohe Konzentrationen werden nur schwer oder gar nicht erreicht. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass diese frühe Änderung der Calcium-Konzentration auf die Plasmamembran beschränkt und somit mit dem im Zytosol lokalisierten FURA2-Dextran nicht messbar ist. Interessanterweise unterstützen andere Experimente die Beobachtung der frühen Änderung der Calcium-Konzentration von Felle et al. (1999b). So wurde in Versuchen verschiedener Arbeitsgruppen, die genetisch kodierte Calcium-Sensoren nutzten oder zwei

Calcium-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe kombinierten, nach Nod-LCO-Zugabe ein früher Einstrom von Calcium unabhängig von den späteren Calcium-Oszillationen gemessen (Miwa et al. 2006, Morieri et al. 2013, Amor et al. 2003, Shaw and Long 2003).

Bis heute konnte nicht sicher aufgeklärt werden, woher das Calcium kommt, das die Nod-LCO-induzierten Oszillationen verursacht. Detailliertes Calcium-*Imaging* hat gezeigt, dass die repetitiven Calcium-Änderungen auslösende Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) kommt und seine Abgabe in den Nukleus von Kanälen in der Kernhülle gesteuert wird (Sieberer et al. 2009, Capoen et al. 2011). Da Kernhülle und ER-Membran ein morphologisches Kontinuum darstellen, ist ein Austausch von Calcium-Ionen leicht möglich. Für die repetitiven Calcium-Signale sind neben Calcium-Kanälen, Calcium-Pumpen oder Calcium-Symporter nötig, die das Calcium zurück in die Kernhülle pumpen. Außerdem sind weitere Ionenkanäle wie beispielsweise der *M. truncatula*-Kationenkanal DMI1 (engl.: Does not Make Infection 1 (DMI1)) wichtig, um das durch die Calcium-Bewegungen entstandene Ladungsungleichgewicht auszugleichen. MCA8, eine Calcium-ATPase der SERCA-Familie, wurde als mit der Symbiose assoziierte Calcium-Pumpe identifiziert (Capoen et al. 2011). Kürzlich wurden außerdem von zyklischen Nukleotiden gesteuerte Calcium-Kanäle identifiziert (engl.: cyclic nucleotide-gated channel (CNGC)), die einen Komplex mit den Kalium-Kanälen *MtDMI1/LjPOLLUX* und *CASTOR* bilden und vermutlich für einen schnellen Calcium-Ausstrom aus dem Nukleus verantwortlich sind (Charpentier et al. 2016).

Die zytosolischen Calcium-Signale sind nicht nur ein wichtiger Bestandteil der Signaltransduktion der RNS, sondern auch der AM. Calcium-Oszillationen als Antwort sowohl auf den symbiotischen Pilz *G. intraradices* als auch auf isolierte Myc-LCOs konnten bereits gezeigt werden (Kosuta et al. 2008, Chabaud et al. 2011, Sun et al. 2015). Interessanterweise induzieren nicht nur LCOs, sondern auch kurzkettige Chitinoligosaccharide (COs) Calcium-Oszillationen im Zytosol der Wurzelhaarzellen. Kurzkettige COs wie beispielsweise Tetra-Acetyl Chitotetraose (CO4) werden sowohl von pathogenen als auch von symbiotischen Pilzen abgegeben (Genre et al. 2013). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen fanden Sun et al. (2015) heraus, dass die Sulfatgruppe der Myc-LCOs bei der Initiation der Calcium-Oszillationen nicht essentiell ist. Es bleibt also unklar, wie die Pflanze zwischen COs von pathogenen und symbiotischen Pilzen unterscheidet.

## 1.6 Reaktionen der Pflanze auf Nod-LCOs vs. MAMPs

Änderungen der zytosolischen Calcium-Konzentration und Depolarisierungen des Membranpotentials sind in Pflanzen bei der Reaktion auf Signalmoleküle allgemein bekannte Mechanismen (Felle et al. 2000, Jeworutzki et al. 2010, Koers et al. 2011, Roelfsema et al. 2012, Wendehenne et al. 2002, Ye et al. 2013). Nod-LCO-Rezeptoren (LysM-RLKs) sind homolog zu den Rezeptoren für die Erkennung von Chitin-Fragmenten (Miya et al. 2007, Boller and Felix 2009). Chitin-Fragmente gehören wie auch flg22 (Felix et al. 1999), eine Komponente des bakteriellen Flagellums, und elf18 (Felix et al. 1993), ein bakterieller Elongationsfaktor, zu den sogenannten MAMPs (engl.: Microbe Associated Molecular Patterns (MAMPs)), die in der Pflanze verschiedene Antworten der Pathogen-Abwehr hervorrufen. Die Peptid-basierten MAMPs flg22 und elf18 werden nicht von LysM-RLKs, sondern von LRR-Rezeptoren erkannt (Boller and Felix 2009).

All diese symbiotischen und pathogenen Signalmoleküle verbindet, unabhängig von ihrer chemischen Natur oder dem Rezeptor, der sie erkennt, die erste Reaktion, die sie in der Pflanze induzieren: eine transiente Depolarisierung des Membranpotentials (Ehrhardt et al. (1992), (Felle et al. 1995, Kurkdjian 1995, Kuchitsu et al. 1997, Felle et al. 2000, Jeworutzki et al. 2010, Koers et al. 2011).

Als Reaktion auf MAMPs wurde, ähnlich wie bei der Reaktion auf Nod-LCOs, ein Anstieg des extrazellulären pH-Wertes (Felix et al. 1993, Felix et al. 1999, Felle et al. 2004) und eine Zunahme der zytosolischen Calcium-Konzentration (Blume et al. 2000, Lecourieux et al. 2005, Ranf et al. 2008, Jeworutzki et al. 2010) nachgewiesen.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass Anionenkanäle der Plasmamembran an der durch MAMPs induzierten Depolarisierung des Membranpotentials in Pflanzenzellen beteiligt sind (Roelfsema et al. 2012). In *Arabidopsis* Schließzellen beispielsweise stimuliert flg22 die S-Typ-Anionenkanäle SLAC1 und SLAH3 (Guzel Deger et al. 2015), die durch Calcium-abhängige Kinasen (CPKs) aktiviert werden (Geiger et al. 2010, Brandt et al. 2012, Scherzer et al. 2012, Demir et al. 2013). Diese CPKs spielen nicht nur bei der MAMP-induzierten Aktivierung der Plasmamembran-Anionenkanäle eine wichtige Rolle, sondern sind auch essentiell für die MAMP-abhängige Aktivierung der NADPH-Oxydase und der damit verbundenen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Boudsocq et al. 2010, Dubiella et al. 2013, Torres et al. 2002). Die bereits erwähnte Zunahme der zytosolischen Calcium-Konzentration der

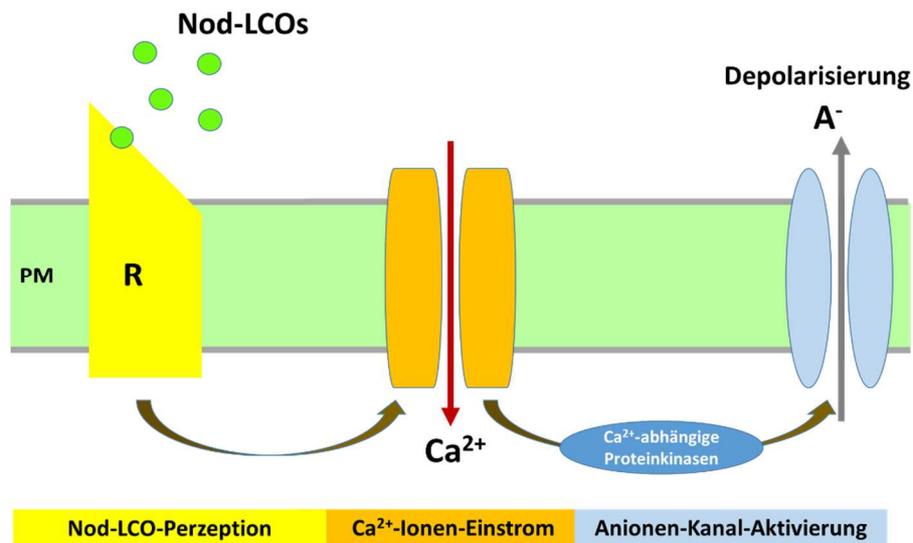
Pflanzenzelle als Reaktion auf MAMPs ist vermutlich für die Aktivierung der Calcium-abhängigen Kinasen (CPKs) wichtig und führt über die CPKs zur Aktivierung von Anionenkanälen der Plasmamembran (Blume et al. 2000, Jeworutzki et al. 2010, Lecourieux et al. 2005, Ranf et al. 2008, Thor and Peiter 2014). Daraus resultiert die Depolarisierung des Membranpotentials.

Nicht nur für das bakterielle flg22, sondern auch für den pilzlichen MAMP Chitosan wurde an Schließzellen von Gerste eine Chitosan-induzierte Aktivierung von S-Typ-Anionenkanälen beobachtet (Koers et al. 2011). Basierend auf simultanen Messungen des Membranpotentials und der zytosolischen Calcium-Konzentration mit Calcium-selektiven Mikroelektroden wurde von Felle et al (1998) ein ähnliches Modell für die Erklärung der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials aufgestellt.

### **1.7 Modell zur Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials**

Nach der Entdeckung der Depolarisierung des Membranpotentials in *M. sativa* Wurzelzellen als Antwort auf die symbiotischen Signalmoleküle der RNS (Nod-LCOs) sollte der Signalweg aufgeklärt werden, der diese Antwort auslöst.

Unter Verwendung von stationären, Ionen-selektiven, extrazellulären Mikroelektroden konnte gezeigt werden, dass nach der Erkennung der Nod-LCOs zunächst die zytosolische Calcium-Konzentration zunimmt. Es wird vermutet, dass es in Folge dessen zu einem Chlorid-Ausstrom aus der Wurzelzelle kommt. Dieser Efflux von Chlorid aus der Wurzelzelle soll zu der gemessenen Depolarisierung des Membranpotentials führen. Weiter wird angenommen, dass ein Kalium-Ausstrom für einen Ausgleich des Ladungsungleichgewichts sorgt und die Zelle schließlich aufgrund des Ausstroms von Protonen ( $H^+$ ) durch die Aktivität der Protonenpumpe repolarisiert (Felle et al. 1998). Der Anstieg der zytosolischen Calcium-Konzentration wird von Felle et al. (1999a) als essentiell für den Chlorid-Efflux und die daraus resultierende Depolarisierung des Membranpotentials angesehen (Felle et al. 1999a).



**Abbildung 4: Vereinfachtes Modell zur Depolarisierung des Membranpotentials von *M. truncatula* Wurzelhaarzellen**

LysM-Rezeptoren (R) der Plasmamembran (PM) der Wurzelzellen erkennen die vom symbiotischen Bakterium ausgesandten Nod-LCOs. Es kommt zum Einstrom von Calcium ins Zytosol über bislang unbekannte Calcium-Kanäle. Die Zunahme der zytosolischen Calcium-Konzentration führt vermutlich über Calcium-abhängige Proteinkinasen zur Aktivierung von Anionenkanälen. Durch den Ausstrom von Anionen (A<sup>-</sup>) wie beispielsweise Chlorid kommt es zur Depolarisierung des Membranpotentials.

Basierend auf den Daten von Felle et al. (1998, 1999) ist in Abbildung 4 das hypothetische Modell zur Depolarisierung des Membranpotentials als Antwort auf Nod-LCOs grafisch dargestellt. Es wird angenommen, dass es nach der Erkennung der Nod-LCOs über LysM-Rezeptoren in der Plasmamembran der Wurzelzellen zu einem Calcium-Einstrom ins Zytosol kommt. Diese erhöhte Calcium-Konzentration führt vermutlich über Calcium-abhängige Proteinkinasen zur Aktivierung von Anionenkanälen. Der folgende Ausstrom von Anionen aus dem Zytosol könnte die Depolarisierung des Membranpotentials auslösen.

### 1.8 Anionenkanäle in Pflanzen

1976 erfanden Erwin Neher und Bernd Sakmann die Patch-Clamp-Technik (Hamill et al. 1981, Neher and Sakmann 1976). Diese Technik ermöglicht die hochauflösende Messung von Ionenströmen durch einzelne Ionenkanäle einer Zelle.

Die ersten Patch-Clamp-Messungen an Pflanzenzellen wurden 1984 an Bohnen-Schließzellen und Zellen aus photosynthetisch aktiven Weizenblättern durchgeführt (Moran et al. 1984,

Schroeder et al. 1984). Patch-Clamp-Studien an *Vicia faba*-Protoplasten führten in den 1990er Jahren zur Identifizierung von zwei unterschiedlichen Anionenkanalklassen, die aufgrund ihrer Kinetiken als *Slow-Type* (S-Typ) und *Rapid-Type* (R-Typ) bezeichnet wurden.

Die Aktivierung von R-Typ-Anionenkanälen ist ungefähr 1000-fach schneller als die von S-Typ-Anionenkanälen. R-Typ-Anionenkanäle aktivieren bzw. deaktivieren innerhalb von Millisekunden, während S-Typ-Anionenkanäle zur Aktivierung bzw. Deaktivierung einige Sekunden benötigen. Außerdem sind R-Typ-Anionenkanäle spannungsabhängig, während S-Typ-Anionenkanäle nur eine geringe Spannungsabhängigkeit besitzen (Hedrich et al. 1990, Linder and Raschke 1992, Schroeder and Keller 1992, Kolb et al. 1995).

### 1.8.1 S-Typ-Anionenkanäle

Das erste Gen (SLAC1), das für einen Plasmamembran-Anionenkanal der S-Typ-Familie kodiert, wurde anhand von *Arabidopsis*-Verlustmutanten identifiziert, deren CO<sub>2</sub>- und Ozon-abhängiger Stomaschluss stark gestört war (Negi et al. 2008, Vahisalu et al. 2008). Da die SLAC1-Kanäle eine ähnlich langsame Aktivierung zeigten wie die von Linder und Raschke (1992) identifizierten Kanäle, wurden sie *slow anion channel-associated 1* genannt. Elektrophysiologische Studien in *Xenopus*-Oozyten haben gezeigt, dass der Anionenkanal AtSLAC1 nur bei Koexpression mit einer Proteinkinase aktiv ist. Das heißt, dass er eine Phosphorylierung zur Aktivierung benötigt (Geiger et al. 2009, Lee et al. 2009). Die größte Permeabilität weist AtSLAC1 für Nitrat auf, wobei AtSLAC1 auch für Chlorid durchlässig ist. Das Permeabilitätsverhältnis des AtSLAC1 von NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> liegt bei 10 (Geiger et al. 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass das Trockenstresshormon ABA die Phosphorylierung von AtSLAC1 über Calcium-unabhängige Proteinkinasen der SnRK-Familie (AtOST1) und Calcium-abhängige Proteinkinasen (AtCPK-Familie) stimuliert (Geiger et al. 2009, Lee et al. 2009, Chen et al. 2010, Geiger et al. 2010). Daraufhin kommt es zu einem AtSLAC1-vermittelten Anionenefflux (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>) aus der Schließzelle, was zu einer Depolarisierung des Membranpotentials führt. Als Ladungsausgleich fließen Kalium-Ionen über Kalium-Kanäle aus der Schließzelle. Durch den Ausstrom von Anionen und Kalium kommt es zu einer Abnahme des Turgors und des Volumens der Schließzelle. Als Folge schließen die Stomata, um das Blatt vor Wasserverlust durch Transpiration zu schützen (Geiger et al. 2011).

Der *AtSLAC1* besitzt in *Arabidopsis* vier Homologe (*SLAC1 HOMOLOGOUS1-4*, *SLAH1-4*), die in unterschiedlichen Pflanzengeweben lokalisiert sind (Negi et al. 2008, Vahisalu et al. 2008) und von denen *AtSLAH1*, *AtSLAH2* und *AtSLAH3* elektrophysiologisch untersucht wurden (Geiger et al. 2011, Demir et al. 2013, Maierhofer et al. 2014b, Cubero-Font et al. 2016).

Als erstes gelang die Identifizierung von *AtSLAH3*, einem Nitrat-selektiven Plasmamembran-Anionenkanal, der im Gegensatz zum *AtSLAC1* nicht nur in Schließzellen, sondern in vielen Zelltypen exprimiert wird. *AtSLAH3* weist eine Nitrat-Selektivität (Permeabilitätsverhältnis  $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^- = 20$ ) auf und benötigt zudem extrazelluläres Nitrat zur Aktivierung (Geiger et al. 2011). Wie der *AtSLAC1* muss der *AtSLAH3* über eine Phosphorylierung aktiviert werden, wobei der *AtSLAH3* ausschließlich von Calcium-abhängigen Kinasen aus den Familien der CPKs und CIPKs aktiviert wird. Die stärkste Aktivierung erfolgt durch die Kinase *AtCPK21*. *AtSLAH3* übernimmt wie der *AtSLAC1* eine wichtige physiologische Funktion beim Stomaschluss von *Arabidopsis*-Schließzellen (Geiger et al. 2010, Geiger et al. 2011, Guzel Deger et al. 2015).

*AtSLAH2*, der engste Homologe von *AtSLAH3* (Dreyer et al. 2012), weist eine spezifische Expression in der Stele der Wurzel und im Hypokotyl auf (Negi et al. 2008, Maierhofer et al. 2014b, Zheng et al. 2015a). Elektrophysiologische Analysen in *Xenopus*-Oozyten definierten den *AtSLAH2* als ausschließlich Nitrat-permeablen Anionenkanal (Permeabilitätsverhältnis  $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^- = 82,4$ ). Es konnte gezeigt werden, dass die hohe Nitrat-Selektivität durch die Polarität einer einzigen Aminosäure in der Pore des *AtSLAH2* bestimmt wird und somit allein die unterschiedliche Hydrophobizität von Chlorid und Nitrat die Selektivität ausmacht (Maierhofer et al. 2014b). Wie *AtSLAH3* benötigt auch *AtSLAH2* zur Aktivierung eine Phosphorylierung durch Calcium-abhängige Proteinkinasen (CPKs, CIPKs/CBLs). Bei hohem Natriumchloridgehalt im Boden ist die Pflanze Salzstress ausgesetzt. Hier ist vermutlich die Rolle des *AtSLAH2* einzuordnen, der aufgrund seiner starken Nitrat-Selektivität die Nitrat-Beladung der Xylemgefäße ermöglicht, ohne Chlorid aufzunehmen (Maierhofer et al. 2014b). Nitrat stellt die Hauptstickstoffquelle in Pflanzen dar und wird beispielsweise für den Aufbau von Aminosäuren benötigt.

Bei *AtSLAH1* handelt es sich um eine S-Typ-Anionenkanal-Untereinheit, die elektrisch inaktiv ist und in ans Xylem grenzenden Perizykel-Zellen exprimiert wird (Cubero-Font et al. 2016). Koexpressionsversuche in Oozyten zeigten, dass *AtSLAH1* mit *AtSLAH3* heteromerisiert. Im Zuge dieser Heteromerisierung verändert die elektrisch inaktive Untereinheit *AtSLAH1* die

elektrischen Eigenschaften des Anionenkanals *AtSLAH3* deutlich. So ist der *AtSLAH3* bei Koexpression mit *AtSLAH1* in Abwesenheit von externem Nitrat und Calcium-abhängigen Kinasen aktiv und weist eine stark erhöhte Chlorid-Permeabilität auf. Die Heteromerisierung von *AtSLAH1* und *AtSLAH3* erleichtert den *SLAH3*-vermittelten Chlorid-Efflux aus den Perizykelzellen in die Xylemgefäße der Wurzel. Über spezifisch regulierte Genexpression und Bildung des *SLAH3/SLAH1*-Komplexes kann somit die Verteilung von Nitrat und Chlorid zwischen Spross und Wurzel reguliert werden (Cubero-Font et al. 2016). Neuste Erkenntnisse zeigen, dass unter Salzstress und/oder ABA-Behandlung *AtSLAH3* und *AtSLAH1* stark reduziert exprimiert werden. Unter diesen Bedingungen übernimmt der *AtSLAH2* die Beladung der Xylemgefäße mit Nitrat (Cubero-Font et al. 2016, Hedrich and Geiger 2017, Li et al. 2017). Dies ist ein Schutzmechanismus der Pflanze, um unter Salzstress eine Chlorid-Aufnahme über *AtSLAH3/AtSLAH1* zu verhindern, die Nitratbeladung der Xylemgefäße über den *AtSLAH2* aber weiterhin zu gewährleisten.

### 1.8.2 R-Typ-Anionenkanäle

Das erste identifizierte Gen in Pflanzen, das für einen R-Typ-Anionen-Transporter kodiert, war *ALMT1* (engl.: aluminum activated malate transporter 1). Es wurde in Weizen (*Triticum aestivum*; *TaALMT1*) (Sasaki et al. 2004) und *A. thaliana* (*AtALMT1*) (Hoekenga et al. 2006) beschrieben. Diese in der Plasmamembran der Wurzel lokalisierten *ALMTs* helfen durch den Ausstrom von Malat aus der Wurzelspitze bei der Detoxifizierung von Aluminium in der Rhizosphäre, weil Malat das toxische Aluminium chelatiert (Sasaki et al. 2004, Hoekenga et al. 2006). Diese Aluminium-sensitive Aktivierung von Anionenströmen wurde auch bei der Expression von *TaALMT1* in *Xenopus*-Oozyten beobachtet (Sasaki et al. 2010). In späteren Studien wurde gezeigt, dass manche Vertreter der *AtALMT*-Familie im Tonoplasten lokalisiert sind, wo sie als vakuoläre Malatkanäle agieren (Kovermann et al. 2007).

2010 wurde ein weiterer *ALMT* in *Arabidopsis* entdeckt (Sasaki et al. 2010, Meyer et al. 2010). Bei *AtALMT12* handelt es sich um einen in der Plasmamembran der Schließzellen lokalisierten R-Typ-Anionenkanal, der eine hohe Malat- und Sulfat-Permeabilität besitzt. Außerdem zeigen Schließzellen von *AtALMT12*-Verlustmutanten eine beeinträchtigte Malat-abhängige R-Typ-Anionenkanalaktivität (Meyer et al. (2010)) und weisen ein verlangsamtes Stimulus-induziertes Schließen der Stomata auf (Meyer et al. 2010, Sasaki et al. 2010). Demnach sind

nicht nur S-Typ-Anionenkanäle, sondern auch Anionenkanäle des R-Typs in *Arabidopsis* am Schließen der Stomata beteiligt. Da der *AtALMT12* nicht sensitiv auf extrazelluläres Aluminium reagiert, erfolgte eine Umbenennung des *AtALMT12* zu *AtQUAC1* (engl.: quick anion channel 1) (Meyer et al. 2010).

Insgesamt gibt es in *Arabidopsis* 14 ALMTs, wobei nur *AtQUAC1* spezifisch in Schließzellen und Pollen exprimiert wird. Die Aktivität der R-Typ-Anionenkanäle ist spannungsabhängig (Meyer et al. 2010, Sasaki et al. 2010). Eine Koexpression mit der SnRK-Kinase *AtOST1* verstärkt die Aktivität des *AtQUAC1* in *Xenopus*-Oozyten (Imes et al. 2013). Prozesse, die eine Depolarisierung der Plasmamembran hervorrufen, wie beispielsweise die Aktivierung von S-Typ-Anionenkanälen (Linder and Raschke 1992), die Inhibierung der H<sup>+</sup>-ATPase (Goh et al. 1996) oder auch die Aktivierung von Calcium-Kanälen (Hamilton et al. 2000), reichen zur Aktivierung des *AtQUAC1* aus. In intakten Schließzellen ist die Aktivität von *AtQUAC1* schwer nachweisbar. Roelfsema et al. (2001, 2004) gelang es, in extrem depolarisierten Zellen und während starker ABA-Antworten eine *AtQUAC1*-Aktivität zu messen.

## 1.9 Calcium-abhängige und Calcium-unabhängige Proteinkinasen

Wie bereits beschrieben, werden S-Typ-Anionenkanäle von Kinasen reguliert, die somit in der Physiologie der Pflanze bei Prozessen wie beispielsweise dem Stimulus-induzierten Schließen der Stomata, der Elicitor-induzierten Pflanzenabwehr oder dem Nährstofftransport in der Wurzel über Anionenkanäle eine entscheidende Rolle spielen.

Bei der Aktivierung der S-Typ-Anionenkanäle wurden Calcium-abhängige und Calcium-unabhängige Kinasen der CDPK-SnRK-Kinasen-Superfamilie als wichtige Regulatoren identifiziert.

### 1.9.1 Calcium-unabhängige Proteinkinasen

Eine Calcium-unabhängige Proteinkinase wurde von Li und Assmann (1996) in *Vicia faba*-Schließzellen entdeckt. Die AAPK (engl.: ABA-activated protein kinase) ist ABA-abhängig und vermittelt die ABA-induzierte Aktivierung von Anionenkanälen und somit das Schließen der Stomata (Li and Assmann 1996, Li et al. 2000). Eine orthologe Kinase in *Arabidopsis* wurde 2002 beschrieben und OST1 (engl.: Open stomata 1) genannt, weil Pflanzen, denen OST1 fehlt,

nicht mehr dazu in der Lage sind, ihre Stomata zu schließen (Mustilli et al. 2002), da ABA-gesteuerte Anionenkanäle nicht aktiviert werden.

OST1 gehört zur Familie der SnRKs (engl.: sucrose non-fermenting-1 related kinases), wird auch als *AtSnRK2.6* bezeichnet und wird in Schließzellen und dem vaskulären System exprimiert. OST1 (*AtSnRK2.6*) wird der SnRK2-Gruppe zugeteilt, die einer von drei Untergruppen der SnRK-Kinasen-Familie angehört, und deren Proteine etwa 40 kD groß sind. In *Arabidopsis* wurden insgesamt 38 SnRKs identifiziert, die wie die CDPKs zu der Serin-Threonin-Kinasen-Familie gehören (Hrabak et al. 2003). SnRK-Kinasen (OST1, CIPKs) unterscheiden sich von CDPKs dadurch, dass sie ein Threonin im aktiven Zentrum (engl. activation loop) besitzen. An dieser Stelle weisen die CDPKs die Aminosäure Asparagin oder Glutaminsäure auf. Außerdem sind SnRK-Kinasen im Gegensatz zu CDPKs am N-Terminus nicht myrestiliert (Hrabak et al. 2003).

### 1.9.2 Calcium-abhängige Proteinkinasen

Calcium ist in Signalkaskaden eukaryotischer Zellen ein wichtiger sekundärer Botenstoff. In Pflanzen spielt die Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration eine wichtige Rolle in der Antwort auf verschiedene Signale wie beispielsweise Hormone, Licht, mechanische Störungen, abiotischen Stress und pathogene Signalmoleküle (Evans et al. 2001, Rudd and Franklin-Tong 2001, Sanders et al. 1999).

Sensorische Calcium-bindende Proteine setzen die Calcium-Signale um und leiten sie weiter. Hierzu gehören Calmoduline, *Calcineurin B-like Proteins* (CBLs) und *Calcium-dependent protein kinases* (CDPKs). Zu den am besten charakterisierten Calcium-Sensoren gehören die CDPKs, die neben einer Protein-Kinase auch eine Calmodulin-ähnliche Bindestelle besitzen. Da die Calmodulin-Domäne im Protein verankert ist, wird für die Stimulation der Kinase-Aktivität nur Calcium benötigt (Cheng et al. 2002). In *Arabidopsis* umfasst die Gruppe dieser Serin/Threonin-Kinasen 34 Mitglieder, die nach der Nomenklatur von Hrabak et al. (1996) mit CPK abgekürzt werden, und deren molekulare Masse zwischen 54,3 und 72,2 kD liegt (Hrabak et al. 1996, Hrabak et al. 2003). Die Perzeption des Calciums erfolgt über vier EF-Hände (Schultz et al. 2000) in der Calmodulin-ähnlichen Bindedomäne, die von der Kinasedomäne durch eine autoinhibitorische Domäne getrennt ist. Die autoinhibitorische Domäne kann als Pseudosubstrat an die Kinasedomäne binden und die Kinase somit inhibieren. Dies dient zur

Regulation der Kinase abhängig von der zytosolischen Calcium-Konzentration (Harper et al. 2004). Bei erhöhter zytosolischer Calcium-Konzentration löst sich die Autoinhibition und eine intramolekulare Autophosphorylierung der CDPK führt zur Aktivierung der Kinase (Chandran et al. 2006, Ludwig et al. 2004). Eine Deletion der autoinhibitorischen sowie der Calcium-Bindedomäne führt zu einer Kinase, die kein Calcium zur Aktivierung benötigt (Harmon et al. 1994, Harper et al. 1994, Vitart et al. 2000). Diese konstitutiv aktiven CDPKs werden als CPK $\Delta$ EF bezeichnet. Da in *Xenopus*-Oozyten die Calcium-Konzentration konstant ist und sich diese im Experiment nur schwer manipulieren lässt, werden oft Calcium-unabhängige CPK $\Delta$ EFs bei elektrophysiologischen Untersuchungen genutzt. Die Mehrheit der CDPKs ist an ihrem N-Terminus myrestiliert, was zu einer Membranassoziation der Kinasen führt (Martin and Busconi 2000, Hrabak et al. 2003).

Eine zweite wichtige Familie der Calcium-Sensoren in Pflanzen ist die der CBLs (engl.: Calcineurin-B like proteins). CBLs binden Calcium und interagieren mit CIPKs (engl.: CBL-interacting protein kinases), deren Aktivität sie beeinflussen. CIPKs gehören zur dritten von drei Untergruppen (SnRK3) der SnRK-Kinasen. In *Arabidopsis* wurden zehn CBLs und 26 CIPKs identifiziert, die unterschiedlich miteinander interagieren und somit bei Calcium-abhängigen Signalwegen eine wichtige Rolle spielen (D'Angelo et al. 2006). CBL-Proteine besitzen vier EF-Hände, die abhängig von ihrer Struktur unterschiedliche Calcium-Affinitäten aufweisen (Kolukisaoglu et al. 2004). Kommt es zu einer Erhöhung der zytosolischen Calcium-Konzentration, werden Calcium-Ionen durch die EF-Hände der CBLs gebunden. Eine daraus resultierende Konformationsänderung des CBL-Proteins ermöglicht die Bindung an die NAF-Domäne (Asparagin(N)-Alanin(A)-Phenylalanin(F)) der CIPK-Kinase (Hrabak et al. 2003). Diese Komplexbildung führt zu einer Konformationsänderung der CIPK, die eine Auflösung der Autoinhibition der Kinase zur Folge hat (Qiu et al. 2002, Quintero et al. 2002, Batistic and Kudla 2004, Sanchez-Barrena et al. 2007).

### 1.10 Zielsetzung

Wie in der Einleitung beschrieben, sind die Arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose (AM) und die Wurzelknöllchen-Symbiose (RNS) für die Wirtspflanzen von großem Vorteil. Die Wirtspflanzen werden über die Symbionten mit Nährstoffen aus dem Boden (AM) bzw. reduziertem Stickstoff aus der Atmosphäre (RNS) versorgt. Bis heute ist unklar, warum nicht alle Pflanzen

eine AM oder RNS eingehen können. Auch wie die Pflanze zwischen pathogenen und symbiotischen Pilzen bzw. Bakterien unterscheidet, ist noch nicht geklärt. Eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der AM und der RNS spielt die initiale Kommunikation zwischen Symbiont und Pflanze. Die Pflanze erkennt die symbiotischen Signalmoleküle (Nod-/Myc-LCOs) über Rezeptoren in der Plasmamembran der Wurzelzellen. Nach der Perzeption wird ein komplexer Signaltransduktionsweg initiiert. Als eine erste Reaktion der Pflanze auf Nod-LCOs findet eine Depolarisierung des Membranpotentials der Wurzelzellen statt (Ehrhardt et al. 1992, Felle et al. 1995, Kurkdjian 1995). Im weiteren Verlauf kommt es bei AM und RNS zu Calcium-Oszillationen im Zellkern der Pflanzenwurzeln (Ehrhardt et al. 1996, Shaw and Long 2003, Kosuta et al. 2008, Genre et al. 2013, Sun et al. 2015).

Auch auf pathogene Signalmoleküle, die sogenannten MAMPs (engl.: Microbe Associated Molecular Patterns), reagieren Pflanzen mit einer Depolarisierung des Membranpotentials (Guzel Deger et al. 2015, Jeworutzki et al. 2010, Koers et al. 2011, Roelfsema et al. 2012). Eine Beteiligung von S-Typ-Anionenkanälen bei der Depolarisierung des Membranpotentials von *Arabidopsis*-Schließzellen als Antwort auf das bakterielle flg22 wurde bereits bewiesen (Guzel Deger et al. 2015). Doch nicht nur für das bakterielle flg22, sondern auch für den pilzlichen MAMP Chitosan wurde an Schließzellen von Gerste eine Chitosan-induzierte Aktivierung von S-Typ-Anionenkanälen beobachtet (Koers et al. 2011).

Ablauf und Ursprung der physiologischen Reaktionen von *M. truncatula*-Wurzelzellen auf Nod- und Myc-LCOs während der prä-symbiotischen Phase der AM und RNS sollten in dieser Arbeit untersucht werden. Das Ziel dieser Arbeit war es, aufzuklären, welche Anionenkanäle an der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials beteiligt sind. Ausgangspunkt waren die Experimente von Ehrhardt et al., Felle et al. und Kurkdjian, die eine Nod-LCO-induzierte Depolarisierung des Membranpotentials in *M. sativa*-Wurzelhaarzellen nachweisen konnten (Ehrhardt et al. 1992, Felle et al. 1995, Kurkdjian 1995).

Die Hypothese dieser Arbeit basiert auf zwei verschiedenen Modellen. Zum einen postulierten Felle et al. (1998) einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Wurzelzelle und einen Ausstrom von Anionen aus der Wurzelzelle als Gründe für die Nod-LCO-stimulierte Depolarisierung des Membranpotentials. Zum anderen konnte, wie bereits erwähnt, für pathogene Signalmoleküle (MAMPs) wie flg22, die in *Arabidopsis*-Schließzellen ebenfalls eine Depolarisierung des Membranpotentials induzieren, eine Beteiligung der S-Typ-

Anionenkanäle *AtSLAC1* und *AtSLAH3* nachgewiesen werden (Guzel Deger et al. 2015). Dieses Wissen ließ vermuten, dass ein Anionenausstrom durch S-Typ-Anionenkanäle (SLAHs) eine Erklärung für die Reaktion der Pflanze auf Nod-LCOs ist, was in dieser Arbeit untersucht werden sollte.

Hierfür sollte in einem ersten Teil dieser Arbeit eine Methode etabliert werden, um elektrophysiologische Messungen des Membranpotentials von *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen mit Mikroelektroden durchführen zu können. In einem zweiten Teil sollte der Einfluss von Calcium-Ionen auf die Nod-LCO-induzierte Depolarisierung des Membranpotentials analysiert werden. Mittels eines Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs sollte die zytosolische Calcium-Änderung nach Nod-LCO-Zugabe parallel zur Depolarisierung des Membranpotentials gemessen werden. Ein dritter Teil dieser Arbeit hatte zum Ziel, orthologe S-Typ-Anionenkanäle der SLAC-Familie aus *Arabidopsis* in *M. truncatula* zu identifizieren und im heterologen Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyten elektrophysiologisch zu charakterisieren. Abschließend sollte in Transposon-Mutanten der identifizierten S-Typ-Anionenkanäle aus *M. truncatula* untersucht werden, ob sie eine veränderte Antwort auf Nod-LCOs zeigen oder ob die Depolarisierung des Membranpotentials unverändert abläuft.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenarbeiten

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial

Als Pflanzenmaterial wurde Saatgut der Modellleguminosen Jemalong A17 (T. Huguet, INRA Toulouse, Frankreich) und *Medicago truncatula* Gaertn cv. R108-1 (Hoffmann et al. 1997) verwendet. Die Klonierung der Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* erfolgte aus *M. truncatula*-Pflanzen des Genotyps R108-1. Der *MtSLAC1* wurde aus *M. truncatula*-Pflanzen des Genotyps A17 kloniert. Wie sich die Gene aus den zwei Genotypen unterscheiden, ist in Alignments im Anhang zu sehen (Abbildung 35, Abbildung 36). Bei den *MtSLAH2-3*-Mutanten handelt es sich um die Tnt1-Insertionslinien NF14366 für *MtSLAH2-3A* sowie NF10039 und NF11647 für *MtSLAH2-3B* (J. Wen, Samuel Robert Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma, USA). Die Tnt1-Transposonlinien entstammen dem genetischen Hintergrund von *M. truncatula* Gaertn cv. R108-1 (Tadege et al. 2008).

#### 2.1.2 Oberflächensterilisation und Vernalisation

Für die Pflanzenexperimente dieser Arbeit musste zuerst eine Skarifizierung der *M. truncatula*-Samen durchgeführt werden. Die Skarifizierung dient der Oberflächensterilisation sowie der künstlichen Beschleunigung der Samenruhe, um ein sofortiges und gleichmäßiges Keimen der Samen zu ermöglichen. Hierfür mussten zunächst die *M. truncatula*-Samen aus ihren Hülsen geholt werden, bevor sie unter sterilen Bedingungen mit dem doppelten Volumen der Samenmenge an 95 bis 98%iger Schwefelsäure versetzt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 5 bis 10 min und mehrfachem Invertieren wurde die Schwefelsäure vollständig abpipettiert und die Samen wurden mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub>® das Volumen der Samen füllend 6- bis 8-mal gespült. Danach wurde zur Sterilisation für 2 bis 4 Minuten eine Samen-bedeckende Menge an 2%igem (v/v) Natrium-Hypochlorid zugegeben, das nach der Inkubationszeit abgekippt wurde. Anschließend wurden die Samen unter ständigem Invertieren 6- bis 8-mal mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub>® gespült. Abschließend wurden die Samen mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub>® bedeckt, für mindestens 2 h im Licht quellen gelassen und danach auf 1%igem (w/v) Agar Agar Kobe I (Roth, Karlsruhe, Deutschland) ausgelegt. Um einen Feuchtigkeitsverlust zu verhindern, wurden die Petrischalen mit Parafilm

(Pechiney Plastic Packaging, Asheville, USA) verschlossen. Nach der Skarifizierung erfolgten die Vernalisation im Dunkeln für 4 Tage bei 4°C und die anschließende Keimung über Nacht bei Raumtemperatur.

### 2.1.3 Pflanzenanzucht zur Vermehrung von Wildtyp- und Mutantenlinien

Für die Anzucht und Vermehrung der *M. truncatula*-Wildtyp- und -Mutantenlinien wurde zunächst unter minimaler Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub>® die Samenhülle der *M. truncatula*-Keimlinge entfernt, bevor sie in Erde pikiert und im Gewächshaus bei 16-h-Licht (20°C)/8-h-Dunkel (16°C) herangezogen wurden. In den ersten Tagen nach dem Pikieren wurden die Keimlinge mit einer Haube abgedeckt, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu erzeugen. Gegossen wurde mit Leitungswasser. Nach ungefähr zwei Monaten konnten an den *M. truncatula*-Pflanzen die ersten Blütenstände beobachtet werden, aus denen sich langsam die Samenkapseln entwickelten. Diese wurden nach ihrer Reifung gesammelt. Eine Samenkapsel enthält 8 bis 10 Samen, die unter Benutzung eines Hammers sowie eines Brettes und einer Reibe aus ihrer Samenhülle entfernt wurden und danach zur weiteren Anzucht zur Verfügung standen.

### 2.1.4 Pflanzenanzucht und Messlösungen für Einstich- und FURA-2-Dextran-Messungen

Für die elektrophysiologischen Experimente an *M. truncatula*-Pflanzen wurden die Keimlinge nach der Entfernung ihrer Samenhülle auf 1,5 % Pflanzenagar (Duchefa Biochemie B.V, Haarlem, Niederlande) überführt, der in mit 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mM NaCl, 0,1 mM KCl und 5 mM MES/Tris, pH 7 versetztem H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub>® angesetzt wurde. Pro Messtag wurden 10 bis 15 Keimlinge auf eine Agarplatte (60x15 mm) (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) ausgelegt und für 2 h in vertikaler Ausrichtung in einer Klimakammer bei einer Lichtintensität von 84 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> kultiviert. In dieser Zeit bildeten sich erste Wurzelhaare, die für die Einstichexperimente verwendet wurden. Doch zunächst wurden die Pflanzen mit der Badlösung versetzt, die auch für die Messungen verwendet wurde, und für 2 h damit inkubiert. Die Standardbadlösung bestand aus 5 mM MES/Tris pH 7, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mM NaCl und 0,1 mM CsCl. Außerdem wurden Badlösungen mit verschiedenen Ionenkonzentrationen verwendet. Hierfür wurde das 0,1 mM CsCl der Standardbadlösung durch 1 mM bzw. 10 mM CsCl, 1 mM bzw. 10 mM CsNO<sub>3</sub> und 1 mM Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ersetzt. Für die Messung wurde ein Keimling

mit doppelseitigem Klebeband und Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) an einer Messkammer fixiert.

## 2.2 Symbiotische Signalmoleküle: Nod-LCOs und Myc-LCOs

Das Bakterium *Sinorhizobium meliloti* (SM) ist spezifisch für die Bildung der Wurzelknöllchen-Symbiose mit *Medicago truncatula*. Die aus diesem Bakterium synthetisierten Signalmoleküle (Nod-LCOs) wurden uns von F. Mailliet (Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, Castanet-Tolosan, Frankreich) zur Verfügung gestellt (NodSM-IV, C16:2, S).

Die in dieser Arbeit verwendeten Signalmoleküle der Arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose (Myc-LCOs) wurden mit Hilfe von *Escherichia coli*-Zellen synthetisiert (Maillet et al. 2011) und von S. Fort (French National Centre for Scientific Research, Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Zwei der drei verwendeten Myc-LCOs unterscheiden sich nur durch eine Schwefelgruppe an einer Glucosamin-Untereinheit bei Myc-LCO-IV-C18:1-S, die bei Myc-LCO-IV-C18:1 fehlt. Sowohl bei Myc-LCO-IV-C18:1 als auch bei Myc-LCO-IV-C18:1-S liegt eine N-Acylierung mit Ölsäure (C18:1) vor. Der dritte verwendete Myc-LCO (Myc-LCO-IV-C16:0-S) ist sulfatisiert und mit Palmitinsäure (C16:0) N-acyliert.

Die Nod-LCOs (NodSM-IV-C16:2-S) sowie alle drei Myc-LCOs wurden in 50%igem (v/v) Ethanol/Wasser gelöst, um eine 1 mM Stocklösung zu erhalten. Bei allen Messungen, in denen Nod- und Myc-LCOs Verwendung fanden, wurden sie mit der Badlösung des Experiments auf eine Konzentration von 100 nM verdünnt.

## 2.3 Einstich von intrazellulären Mikroelektroden

Der Einstich intrazellulärer Mikroelektroden dient der elektrophysiologischen Untersuchung einzelner Zellen. Es kann an isoliertem Pflanzengewebe oder auch an intakten Pflanzen gearbeitet werden. In dieser Arbeit wurde mittels Einstich einer Mikroelektrode in Wurzelhaare intakter *M. truncatula*-Keimlinge das Membranpotential dieser Wurzelhaarzellen unter verschiedenen Bedingungen beobachtet. Außerdem wurde der Calcium-sensitive Fluoreszenzfarbstoff FURA-2-Dextran über den Einstich einer Mikroelektrode in ein Wurzelhaar injiziert, um Änderungen des zytosolischen Calcium-Levels intakter *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen nach der Zugabe von Nod-LCOs zu untersuchen.

### 2.3.1 Herstellung von Referenz- und intrazellulären Elektroden

Die verwendeten Mikroelektroden wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren mit einem Außendurchmesser von 1 mm und einer Wandstärke von 0,21 mm (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland) angefertigt. In den Glaskapillaren war zusätzlich ein durchgehendes 0,1 mm dickes Glasfilament angebracht. Die Herstellung der Mikroelektroden erfolgte in einem horizontalen Pipettenziehgerät (P-2000, Sutter Instrument, Novato, USA). Dazu wurde eine einzelne Glaskapillare in der entsprechenden Halterung des Ziehgeräts eingespannt. Während der Erhitzung der Kapillare durch einen Laserstrahl wurde diese dann durch eine Zugvorrichtung auseinanderggezogen, so dass zwei separate, zugespitzte Einstich-Glasmikroelektroden mit einem Widerstand von 60 bis 100 M $\Omega$  entstanden. Vor der Messung wurde die Messelektrode mit 300 mM KCl befüllt. Als Referenzelektrode wurde eine Borosilikat-Glaskapillare ebenfalls mit 300 mM KCl befüllt, am unteren Ende durch eine Agarosebrücke (2 % Agarose und 300 mM KCl) verschlossen und in der Badlösung positioniert. Für die Injektion des Fluoreszenzfarbstoffs FURA-2-Dextran wurde die Messelektrode zuerst mit ca. 0,5  $\mu$ l 20  $\mu$ M FURA-2-Dextran (Thermo Fisher, Waltham, USA) befüllt und anschließend mit 300 mM KCl aufgefüllt.

Die Verbindungen der Mess- und der Referenzelektrode zum Vorverstärker bzw. zur Erdung erfolgten über eine Silber-/Silberchlorid-Halbzelle. Die Silber-/Silberchlorid-Halbzellen bestanden aus einem ca. 2 cm langen Polyvinylschlauch, in dem ein ca. 3 cm langer Silberdraht mit Zweikomponentenkleber fixiert wurde. Die beiden überstehenden Enden des Silberdrahtes wurden auf der einen Seite mit einem Kupferdraht und einem Stecker verbunden und auf der anderen Seite mit 0,5 M KCl chloriert. Durch Anlegen einer Gleichspannung wurde der Silberdraht mit einer Silberchloridschicht (AgCl) überzogen. Der chlorierte Silberdraht wurde über das offene Ende in die Elektrolytlösung der Messpipetten und der Referenzelektrode gesteckt. Anschließend wurden die Elektroden mit den Vorverstärkern bzw. der Erdung verbunden.

### 2.3.2 Aufbau des Einstich-Messplatzes

Für die Messungen des Membranpotentials wurde der *M. truncatula*-Keimling auf einer Messkammer fixiert, in die fokale Ebene eines Mikroskops (Axioskop 2FS, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) gelegt und mit einem Tropfen Badlösung versetzt, in den ein Emulsionsobjektiv

(W Plan-Achroplan, 40x/0,8 W, Carl Zeiss AG) vorsichtig eingetaucht wurde. Das Mikroskop war auf einem schwingungsgedämpften Tisch befestigt, der zur Abschirmung von äußeren, systemunabhängigen elektromagnetischen Induktionen von einem Faradaykäfig umgeben war. Der Einstich der Mikroelektrode in das Wurzelhaar erfolgte mit Hilfe eines piezoelektrischen Mikromanipulators (MM3A, Kleindiek Nanotechnik GmbH, Reutlingen, Deutschland), der magnetisch auf dem Mikroskop-Kreuztisch fixiert war. Die an dem Mikromanipulator befestigte Messelektrode wurde mit einem Vorverstärker verbunden, der an einen Hauptverstärker (IPA-2, Applicable Electronics, Sandwich, USA) gekoppelt war. Zur Schließung des Stromkreises wurde eine geerdete Silber-/Silberchlorid-Referenzelektrode mit Kontakt zur Badlösung angebracht. Die Aufzeichnung des Membranpotentials erfolgte unter Benutzung der WinEDR-Software (University of Strathclyde, Glasgow, Schottland) mit einem NI USB 6259-Interface (National Instruments, Austin, USA) bei einer Frequenz von 50 Hz. Ein Gravitations-getriebenes Perfusionssystem, bestehend aus einem Zulauf und einer Absaugpumpe, diente während der Messungen zum Durchlauf der externen Badlösung und zur Zugabe der Nod- und Myc-LCOs.

## **2.4 Calcium-Bildgebungsverfahren unter Verwendung des Calcium-sensitiven**

### **Farbstoffes FURA-2-Dextran**

In dieser Arbeit wurden Änderungen des zytosolischen Calcium-Levels in intakten *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen unter Verwendung des Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs FURA-2-Dextran untersucht. Der von Grynkiewicz et al. (1985) entwickelte Farbstoff FURA-2 besitzt im Vergleich zu anderen Fluoreszenzfarbstoffen eine sehr viel höhere Fluoreszenz und Calcium-Selektivität bei einer niedrigeren Calcium-Affinität (Grynkiewicz et al. 1985). Das an das FURA-2 gebundene Dextran-Salz ermöglicht eine gleichmäßige Beladung des Zytosols und verhindert durch seine molekulare Masse von 10.000 ein Ausströmen des Farbstoffes in andere Zellkompartimente wie beispielsweise die Vakuole. Ein Nachteil des FURA-2-Dextrans ist, dass die Größe des Dextran-Moleküls das Beladen der Zellen erschwert. Das Messprinzip des Fluoreszenzfarbstoffes FURA-2 basiert auf der Bildung eines Chelatkomplexes durch die Bindung von Calcium an das FURA-2-Molekül. Dieser Chelatkomplex bewirkt eine Verschiebung der Wellenlänge des Anregungsmaximums von 362 nm zu 335 nm, während die Emissionswellenlänge bei 510 nm nahezu unverändert bleibt.

Durch eine abwechselnde Anregung bei 345 nm und 390 nm kann anhand der Emissionskoeffizienten die Calcium-Konzentration bestimmt werden. FURA-2-basierte Messungen sind unabhängig von Zellwanddicke und Farbstoffkonzentration und wenig anfällig für z.B. Ausbleichen oder Streulicht (Grynkiewicz et al. 1985, Tsien 1989).

Die FURA-2-Dextran-Messungen zur Analyse der Änderung der zytosolischen Calcium-Konzentration in Wurzelhaarzellen nach Zugabe von Nod-LCOs wurde an einem Messplatz durchgeführt, der vom Aufbau dem in Kapitel 2.3.2 beschriebenen entsprach. Änderungen sind im Folgenden aufgeführt. Die Injektion von FURA-2-Dextran erfolgte mit einer Mikroelektrode, die mit Hilfe eines piezoelektrischen Mikromanipulators in ein Wurzelhaar eingestochen wurde. Die Mikroelektrode war über eine Silber/Silberchlorid-Halbzelle mit einem Vorverstärker (HS180, Bio-Logic Science Instruments, Seyssinet-Pariset, Frankreich, ca.  $10^{11} \Omega$ ) verbunden, der an einen Hauptverstärker (Ulliclamp, Würzburg, Deutschland) gekoppelt war. Nach dem Einstich in die Wurzelhaarzelle und der Stabilisierung des Membranpotentials wurde der Fluoreszenzfarbstoff FURA-2-Dextran durch das Anlegen eines negativen Beladungsstroms im Bereich von -4 bis -10 nA injiziert, bis die Intensität des Fluoreszenzsignals im Wurzelhaar stark genug für eine Messung war. Die Anregung des Farbstoffes wurde mit Belichtungszeiten von 200 ms mit einem Visichrom-Polychromator (High Speed Polychromatic Illumination System, Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland) bei Wellenlängen von 345 nm und 390 nm und einem Zeitintervall von 5 s vorgenommen. Das FURA-2-Dextran-Emissionssignal wurde vor der Aufzeichnung durch einen dichromatischen Spiegel (FT 395; Carl Zeiss AG) und einen 510 nm Bandpass-Filter (D510/40M; Chroma Technology Corp, Vermont, USA) gefiltert. Die Aufzeichnung der FURA-2-Dextran-Fluoreszenz wurde mit einer QuantEM 512SC Kamera (Photometrics, Tucson, USA) durchgeführt. Mit der Software VisiView Version 2.0.4 (Visitron Systems GmbH) wurden die Fluoreszenzdaten aufgenommen und während der Messung beobachtet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Image-J ([imagej.nih.gov/ij/](http://imagej.nih.gov/ij/)). Ein durch die Gravitation getriebenes Perfusionssystem, bestehend aus einem Zulauf und einer Absaugpumpe, diente während der Messungen zum Durchlauf der externen Badlösung und zur Zugabe der Nod-LCOs. Da die Charakterisierung der zytosolischen Calcium-Änderungen in Wurzelhaarzellen ohne eine Kalibrierung der minimalen und maximalen Calcium-Konzentration vorgenommen wurde,

konnten keine absoluten, sondern nur relative zytosolische Calcium-Änderungen erfasst werden.

Für Experimente, bei denen parallel zu den FURA2-Dextran-Messungen das Membranpotential aufgezeichnet wurde, erfolgte dies über den Einstich einer zweiten Mikroelektrode in das zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladene Wurzelhaar. Für die Steuerung der Mikroelektrode wurde ein zweiter piezoelektrischer Mikromanipulator verwendet. Diese Messelektrode wurde mit einer Silber/Silberchlorid-Halbzelle mit einem zweiten Vorverstärker (HS180, Bio-Logic Science Instruments) verbunden und an denselben Hauptverstärker (Ulliclamp) gekoppelt. Die elektrischen Eingangssignale wurden bei 50 Hz mit einem 4-Pol Tiefpass-Bessel-Filter (LPF 202A, Warner Instruments Corp., Hamden, USA) bei 200 Hz gefiltert und über einen Analog-/Digital-Wandler (DA/AD-Wandler LIH-1600, HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, Deutschland) an einen separaten Microsoft-Windows-Computer übertragen. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte mit der Software HEKA Pulse Version 8.74 (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH).

## **2.5 *Xenopus laevis*-Oozyten als heterologes Expressionssystem**

Die erste Injektion von Fremd-RNA in Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* erfolgte durch Gurdon et al. Sie stellten fest, dass das entsprechende Protein translatiert und in die Plasmamembran der Oozyten eingebaut wurde. Mit dieser Beobachtung wurde 1971 die Grundlage für die Nutzung von *Xenopus*-Oozyten als heterologes Expressionssystem gelegt (Gurdon et al. 1971). *Xenopus*-Oozyten zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Speicherstoffen, alle wichtigen Bestandteile der Translation und die hohe Anzahl an maternalen Ribosomen als optimales heterologes Expressionssystem aus. Auch die Größe der *Xenopus*-Oozyten mit einem Durchmesser von 1 mm ist von Vorteil, da sie das Anstechen bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (engl.: Double-Electrode-Voltage-Clamp (DEVCC)) erleichtert. Aufgrund der großen Oozyten-Oberfläche können auch Ströme im  $\mu\text{A}$ -Bereich problemlos aufgezeichnet werden. Mit den Versuchen von Gundersen et al. (1983), denen die funktionelle Expression von Rezeptoren und Ionenkanälen in Oozyten gelang, etablierte sich das heterologe Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyten als Standardmethode für die elektrophysiologische Charakterisierung von Membranproteinen (Gundersen et al. 1983).

### 2.5.1 Gewinnung der Oozyten aus *Xenopus laevis*

Die Gewinnung der Oozyten aus *Xenopus laevis*-Fröschen, die in kleinen Gruppen im Aquarium bei 20 bis 22 °C Wassertemperatur gehalten wurden, erfolgte über eine Operation, für die der Frosch mit 3-Aminobenzoessäure-ethylester (0,75 g/l) narkotisiert und auf Eis gebettet wurde. Ein Aufschneiden der Bauchhaut und des Muskelgewebes ermöglichte eine Entnahme der Ovarlappen mit einer Pinzette. Der Frosch wurde mit einigen Stichen genäht und konnte nach der Regeneration des Ovars erneut operiert werden. Die Oozyten des entnommenen Ovargewebes wurden mit Uhrmacherpinzetten unter einem Binokular vereinzelt und mit Ca<sup>2+</sup>-freier ND96-Lösung gewaschen, bevor sie zur Entfernung von Blutgefäßen und Follikelzellen einem Collagenase-Verdau (0,25-0,27 PZU/mg, Raumtemperatur, 1,5 h) unterzogen wurden. Nach einem weiteren Waschschrift mit Calcium-freier ND96-Lösung wurden die nun vereinzelt Oozyten in Calcium-haltiger ND96-Lösung bei + 18 °C gelagert. Als Antibiotikum wurde Gentamycin (100 mg/µl) hinzugegeben, um bakterielle Kontaminationen zu verhindern.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der ND96-Lösung**

Reagenz	Konzentration
NaCl	96 mM
KCl	2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Hepes	10 mM; pH 7,4 mit NaOH
Gentamycin	100 µg/ml
Osmolarität: 220 mOsmol/kg (mit D-Sorbitol)	
Ca <sup>2+</sup> -freie ND96: ohne CaCl <sub>2</sub> und Gentamycin	

### 2.5.2 Injektion von cRNA in die Oozyten von *Xenopus laevis*

Für die Expression eines bestimmten Proteins musste die entsprechende cRNA in die Oozyten injiziert werden. Hierfür wurden Glaskapillaren (31/2“ Drummond #3-00-203-G/X, Drummond Scientific Co, Broomall, USA) verwendet, die mit einem Kappilarziehgerät

(Narishige International Inc, East Meadow, USA) gezogen wurden. Ihre Spitze wurde unter einem Mikroskop (Mikroschmiede, Ernst Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) auf einen Durchmesser von 2  $\mu\text{m}$  abgebrochen. Die Injektionspipette wurde mit einem inerten, inkompressiblen Öl gefüllt. Anschließend konnte die in der *in vitro*-Transkription hergestellte cRNA mit Hilfe des Nanoject II Auto Nanoliter Injectors (Drummond Scientific Co) aufgezogen und in die Oozyten injiziert werden. Für elektrophysiologische Charakterisierungen wurden 50 nl cRNA (500 ng/ $\mu\text{l}$ ) der Anionenkanäle *MtSLAH2-3A*, *MtSLAH2-3B* und *MtSLAC1* mit einem Druckstoß in eine Oozyte injiziert. In einer Oozyte lagen dementsprechend 10 ng cRNA des zu untersuchenden Kanals vor. Bei der Koexpression von einem Anionenkanal mit einer Kinase wie beispielsweise CIPK23, CPK21 oder OST1 wurden auch von der Kinase 50 nl (500 ng/ $\mu\text{l}$ ) injiziert. Die injizierten Oozyten wurden in ca. 4 bis 5 ml ND96-Lösung mit Gentamycin (50mg/l) und 1 mM Calcium bei 16 °C gelagert. Die Expressionszeit ist abhängig von dem jeweiligen Konstrukt und betrug für *MtSLAH2-3A*, *MtSLAH2-3B* und *MtSLAC1* zwei Tage. Nach der Expressionszeit standen die Oozyten für elektrophysiologische Untersuchungen mit der DEVC-Technik zur Verfügung.

## 2.6 Fluoreszenz-Mikroskopie

### 2.6.1 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation dient dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen und wurde in dieser Arbeit verwendet, um potentielle Interaktionspartner (Kinasen) der zu charakterisierenden Anionenkanäle *in vivo* zu identifizieren. Hierfür wurden die zwei nicht fluoreszierenden Peptidhälften des gespaltenen Fluorophors YFP (engl.: Yellow Fluorescent Protein) jeweils an Anionenkanal und Kinase fusioniert. Bei einer Interaktion von Anionenkanal und Kinase und der damit verbundenen räumlichen Annäherung der YFP-Hälften kommt es zu einer Komplementation des Fluorophors und zu einer Rekonstitution der YFP-Fluoreszenz, die mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) detektiert werden kann. Diese einfache Nachweismethode von Proteininteraktionen hat allerdings auch einige Nachteile. Die BiFC-Methode kann nicht zur Echtzeit-Analyse von Interaktionen verwendet werden (Kerppola 2008), die Fluorophorkomplementation ist irreversibel und die Detektion von falsch-positiven Interaktionen ist möglich, da die getrennten Fragmente eine hohe Tendenz zur Selbstkomplementation aufweisen (Walter et al. 2004). In dieser Arbeit

wurde die cDNA der zu untersuchenden Anionenkanäle und Kinasen in USER-Vektoren kloniert, die bereits über die N-terminale oder die C-terminale YFP-Hälfte verfügten. Die Anionenkanäle *MtSLAH2-3A*, *MtSLAH2-3B* und *MtSLAC1* wurden in den Vektor pNB1u18 (Abbildung 38) und die Kinasen CIPK23, CPK21 $\Delta$ EF und OST1 in den Vektor pNB1u20 (Abbildung 39) kloniert.

## 2.6.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die Analyse der BIFC-Konstrukte in Oozyten wurde an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica DM6000 CS, Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Die Anregung des YFPs erfolgte mit Licht einer Wellenlänge von 514 nm durch einen Argon-Laser. Die Emission des YFPs wurde in Wellenlängen zwischen 528 und 580 nm detektiert. Die Fluoreszenz wurde als gelber Kanal dargestellt. Es wurde ein Leica Objektiv (HCX IRAPO L25x/0.95W) benutzt, und die Aufnahmen wurden unter Verwendung der Software LAS AF (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) erstellt (Maierhofer et al. 2014a).

## 2.7 Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik

Für die elektrophysiologische Charakterisierung von Anionenkanälen aus *M. truncatula* wurde die Zwei-Elektroden-Spannungsklemmenteknik (engl.: double-electrode-voltage clamp, DEVC) benutzt. Diese Technik wurde erstmalig Ende der 1940er und Anfang der 1950er Jahre an Tintenfischaxonen angewendet (Hodgkin and Katz 1949b, Hodgkin and Katz 1949a, Marmont 1949, Hodgkin et al. 1952, Cole and Moore 1960), bevor sie Anfang der 1970er auf das heterologe Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyten übertragen wurde. Seitdem wird sie bevorzugt zur funktionellen und strukturellen Untersuchung von Ionenkanälen, Transportern und Rezeptoren angewendet (Gurdon et al. 1971, Finkel and Gage 1985, Finkel and Redman 1985, Hille 1992).

### 2.7.1 Das Messprinzip

Bei der DEVC-Technik werden zwei Elektroden in eine *Xenopus*-Oozyte eingestochen. Die eine Elektrode wird als Potentialelektrode (PE) bezeichnet und misst das aktuelle Membranpotential ( $U_m$ ) der Oozyte (also die Potentialdifferenz zwischen der eingestochenen

Potentialelektrode in der Oozyte und der Referenzelektrode (RE) in der Messlösung nahe der Oozyte). Die Membranspannung der Oozyte wird über einen Differentialverstärker ( $D_V$ ) mit einer vorgegebenen Sollspannung ( $U_{com}$ ) verglichen. Entspricht das Membranpotential der Oozyte nicht der vorgegebenen Sollspannung, beispielsweise aufgrund von Ionenflüssen über die Membran, wird über die zweite in die Oozyte eingestochene Elektrode Strom appliziert und durch die so injizierte Ladung die Potentialdifferenz ausgeglichen. Die zweite Elektrode wird entsprechend ihrer Funktion als Stromelektrode (CE) bezeichnet. Der Transport von Ladungen über die Oozytenmembran verändert das Membranpotential der Oozyte. Der Ein- bzw. Ausstrom von Anionen und Kationen führt entweder zu einer Depolarisierung oder zu einer Hyperpolarisierung der Membran, wodurch sich das Membranpotential ändert. Der applizierte Strom, der nötig ist, um diese Änderung auszugleichen, ist proportional zu dem Ionenstrom, der durch alle Kanäle und Transporter der gesamten Oozytenmembran fließt.

### 2.7.2 Der Messaufbau

Die DEVC-Messungen erfolgten an einem Messplatz, der durch einen schwingungsgedämpften Tisch vor mechanischen Störungen und durch einen farradayschen Käfig vor elektrischen Störungen geschützt wurde. Alle leitenden Bestandteile des Messaufbaus waren außerdem geerdet.

Der Einstich der Oozyten erfolgte unter einer Stereolupe (SZ40, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) mit Lichtquelle (KL 1500 electronic, Schott AG, Mainz, Deutschland). Die Oozyte lag in einer Messkammer, die gleichmäßig mit wechselnden Messlösungen umspült werden konnte. Ein Gravitations-getriebenes Perfusionssystem, bestehend aus einem Zulauf und einer Absaugpumpe, diente während der Messungen zum Durchlauf der externen Badlösungen. Strom- und Spannungselektrode waren mit Mikromanipulatoren verbunden (Mikromanipulator Märzhäuser MM33, Drummond Scientific Co), über die sich der Einstich in die Oozyte präzise steuern ließ. Die Referenzelektrode war an die Erde des Vorverstärkers der Spannungselektrode angeschlossen und wurde in die Messkammer nahe der Oozyte positioniert. Während der Messungen wurde die von der Oozytenmembran abgeleitete Stromantwort über den Vorverstärker in den Messverstärker (Turbo TEC 01C, NPI electronics, Tamm, Deutschland) geleitet. Die analogen Signale wurden im Messverstärker tiefpassgefiltert, der über einen 16 Bit AD/DA-Wandler (ITC16 ST, HEKA-Elektronik) mit einem

Messrechner (IBM PC, Maxdata) verbunden war. Die Aufzeichnung der Messdaten erfolgte mit der Software „PatchMaster“ (HEKA-Elektronik). Mit dem Pulsgenerator der Software wurden auch die Spannungspuls-Protokolle erstellt und an der Oozyte appliziert. Für die Auswertung der Daten wurden die Softwares Excel (Microsoft) und IGOR (WaveMetrics) verwendet.

### **2.7.3 Die Elektroden**

Als Strom- und Potentialelektrode für die DEVC-Messungen wurden Borosilikatglaskapillaren (KWIK-FIL™, World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA) benutzt, die mit Hilfe eines Kapillarieziehgerätes (Narishige) gezogen wurden. Der Spitzendurchmesser der Kapillaren wurde so gewählt, dass ihr Widerstand in der Messlösung zwischen 0,5 und 1,5 MΩ lag. Für die Messung wurden die Kapillaren mit 3 M KCl befüllt und über chlorierten Silberdraht mit dem Vorverstärker verbunden. Die elektrolytische Chlorierung des Silberdrahtes erfolgte in 2 M KCl-Lösung und einem Chloriergerät (ALC-01, NPI electronics). Die Referenzelektrode bestand aus einem Polyvenylschlauch, der mit 3 M KCl befüllt und auf einer Seite mit Agarose (2% in 3 M KCl) verschlossen wurde, um ein Austreten von Salzlösung in die Messlösung zu verhindern.

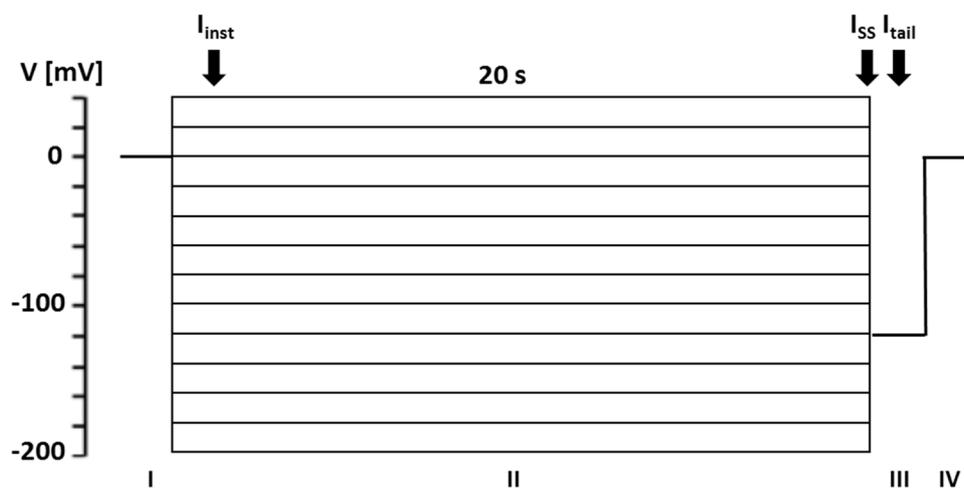
### **2.7.4 Konventionen**

Die Membranspannung wird als Potentialdifferenz zwischen zwei Kompartimenten definiert, die durch eine Membran voneinander getrennt sind, dem Zytosol und der umgebenden Flüssigkeit. Das extrazelluläre Potential, bestimmt durch die Referenzelektrode in der Messlösung, wird konventionsgemäß auf null gesetzt (geerdet). Der Einstrom von Kationen in die Zelle und der Ausstrom von Anionen aus der Zelle werden als negativer elektrischer Strom definiert. Dementsprechend handelt es sich sowohl bei einem Kationen-Ausstrom als auch bei einem Anionen-Einstrom um einen positiven elektrischen Strom.

### **2.7.5 Datenerfassung und Spannungsprotokolle**

Nachdem die Referenzelektrode angebracht und die Oozyte in der Messkammer positioniert wurde, wurden die Strom- und die Spannungselektrode über die Mikromanipulatoren in die Messlösung eingetaucht. Vor dem Einstich musste der Potentialgradient, der durch die

unterschiedlichen Cl<sup>-</sup>-Konzentrationen in Elektroden- und Messlösung entsteht, auf null abgeglichen werden. Außerdem wurden die Pipetten-Widerstände, die in einem Bereich von 0,5 und 1,5 MΩ liegen sollten, überprüft. Anschließend wurden mit Hilfe des Mikroskops und eines akustischen Signals beide Elektroden nacheinander in die Oozyte eingestochen. Nach dem Einstich, der im Stromklemmen-Modus erfolgte, wurde in den Spannungsklemmen-Modus gewechselt. Bei einer Haltespannung von -20 mV, was dem natürlichen Membranpotential der Oozyte entspricht, wurde ein Testpuls mit Spannungssprüngen von +20 und -20 mV für je 10 ms durchgeführt. Zur Charakterisierung der Anionenkanäle aus *M. truncatula* wurde ihr Verhalten in Abhängigkeit von der Membranspannung in verschiedenen Badlösungen untersucht. Hierfür wurde ein Pulsprotokoll angewendet, das von T. Maierhofer (Julius-von-Sachs-Institut, Universität Würzburg, Deutschland) für die Untersuchung der Anionenkanäle der SLAC-Familie aus *Arabidopsis* etabliert wurde. Die Oozyte wurde zunächst auf eine Haltespannung von 0 mV geklemmt, bevor verschiedene Spannungen für eine definierte Dauer appliziert wurden. Das Standardpulsprotokoll, bestehend aus vier Abschnitten, die 13-mal wiederholt werden, ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: Spannungspulsprotokoll, das in den Experimenten dieser Arbeit genutzt wurde**

Ausgehend von einer Haltespannung von 0 mV wurde die angelegte Spannung in 13 Durchläufen von 40 mV in 20 mV Schritten auf -200 mV erniedrigt. Zwischen den Durchläufen wurde die Oozyte 35 s auf 0 mV geklemmt. Instantane Ströme ( $I_{inst}$ ) und Gleichgewichtsströme ( $I_{ss}$ ) wurden in Abschnitt II 50 ms und 19 s nach Anlegen der jeweiligen Spannung abgelesen. Das Abgreifen der Folgepulströme ( $I_{tail}$ ) erfolgte während des 3 Sekunden dauernden Spannungssprungs auf -120 mV.

In den Abschnitten I und IV wurde die Haltespannung von 0 mV angelegt. Im Abschnitt II wurde die Spannung ausgehend von +40 mV bei jeder Wiederholung um 20 mV erniedrigt bis schließlich beim 13ten Durchlauf eine Spannung von -200 mV appliziert wurde. In Abschnitt III wurde immer eine Spannung von -120 mV angelegt. Zwischen den einzelnen Wiederholungen wurde die Oozyte für 35 s auf die Haltespannung von 0 mV geklemmt. Bei jedem Durchlauf wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten Ströme abgegriffen ( $I_{inst}$ ,  $I_{ss}$ ,  $I_{tail}$ ), die zur Auswertung zur Verfügung standen. Der instantane Strom ( $I_{inst}$ ) wurde 50 ms nach dem Anlegen der unterschiedlichen Spannungen in Abschnitt II abgegriffen und ermöglicht eine Aussage über die Anionenkanalströme unabhängig von ihrer zeitlichen, spannungsabhängigen Relaxation in den Gleichgewichtszustand. Um die zeitliche Spannungsabhängigkeit der Anionenkanäle zu berücksichtigen, wurden die Gleichgewichtsströme ( $I_{ss}$ , *steady-state*-Strom), die sich erst einige Sekunden (19 s) nach dem Anlegen der neuen Spannung einstellen, genutzt. Folgepulsströme ( $I_{tail}$ ), die kurz nach dem Spannungssprung auf -120 mV für 3 s in Abschnitt III abgelesen wurden, dienen der Berechnung der relativen Offenwahrscheinlichkeit der Anionenkanäle.

### 2.7.6 Messreihen und Messlösungen

Die Standardmesslösung für die Charakterisierung der Anionenkanäle aus *M. truncatula* mittels DEVC-Technik ist in Tabelle 2 dargestellt. Für einige Messungen wurde die Standardmesslösung mit 1 mM  $LaCl_3$  versetzt, das Calcium-Kanäle blockt. Somit wird die Aktivierung endogener Calcium-aktivierter Anionenkanäle verhindert.

Tabelle 2: Standardmesslösungen für die Charakterisierung der *M. truncatula*-Anionenkanäle

Reagenz	Konzentration
Natriumsalz des verwendeten Anions (NaCl, $NaNO_3$ , NaGluconat, NaAcetat)	100 mM
$Ca^{2+}$ -Gluconat	1 mM
Mg-Gluconat	1 mM
MES	10 mM
pH 5,6 mit Tris Osmolarität: 220-240 mOsmol/kg mit D-Sorbitol	

Für die Bestimmung der Selektivität der Anionenkanäle wurden verschiedene Lösungen mit variierenden Anionen verwendet, die in Tabelle 3 dargestellt sind.

**Tabelle 3: Messlösungen zur Bestimmung der Selektivität der Anionenkanäle**

Reagenz	Konzentration
Natriumsalz des verwendeten Anions (NaCl, NaNO <sub>3</sub> , NaGluconat, NaSO <sub>4</sub> , NaMalat, NaAcetat)	50 mM
Ca-Gluconat	1 mM
Mg-Gluconat	1 mM
Tris	10 mM
pH 7,5 mit MES Osmolarität: 220-240 mOsmol/kg mit D-Sorbitol	

### 2.7.7 Biophysikalische Grundlagen und Datenanalyse

In dieser Arbeit wurden die Anionenkanäle *MtSLAH2-3A*, *MtSLAH2-3B* und *MtSLAC1* hinsichtlich ihrer Aktivierung und Anionen-Selektivität untersucht. Hierfür wurden instantane Ströme und Umkehrspannungen in verschiedenen Badlösungen ermittelt.

Der zeit- und spannungsabhängige ( $U$ ,  $t$ ) Ganzzellstrom ( $I$ ) über die Oozytenmembran durch die untersuchten Anionenkanäle ist abhängig von drei Variablen: der Anzahl ( $N$ ) der aktivierbaren Kanäle in der Membran, dem Einzelkanalstrom ( $i$ ) bei einer bestimmten Spannung und einem bestimmten Anionengradienten ( $\Delta\text{Anion}$ ) und der Offenwahrscheinlichkeit ( $P_0$ ). Die Offenwahrscheinlichkeit ist von  $U$ ,  $t$  und der externen Anionenkonzentration (ext. Anion) abhängig. Eine Voraussetzung für die Gleichung, die den Ganzzellstrom beschreibt, ist, dass das Transportprotein nur in zwei verschiedenen Zuständen vorliegen kann. Da diese Voraussetzung gegeben ist, gilt:

$$I(U, t) = N * i(U, \Delta A_{\text{Anion}}) * p_0(U, t, \text{ext. Anion})$$

I = Ganzzellstrom, abhängig von der Spannung und der Zeit

N = Anzahl der Kanäle

i = spannungsabhängiger Einzelkanalstrom, abhängig vom Membranpotential und dem Anionengradienten

p<sub>0</sub> = Offenwahrscheinlichkeit, abhängig vom Membranpotential, der Zeit und der externen Anionenkonzentration

### 2.7.7.1 Bestimmung von Umkehrpotentialen und relativen Permeabilitäten

Der elektrochemische Gradient aller beteiligten Ionen bestimmt den Ionenfluss über die Oozytenmembran. Das Umkehrpotential (U<sub>rev</sub>) ist definiert als die Membranspannung, bei welcher der Gesamtionenfluss über die Membran null ist. Es kann über die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung berechnet werden (Goldman, 1943; Hodgkin and Katz, 1949):

$$U_{\text{rev}} = \frac{R * T}{F} * \ln \frac{P_X [X^+]_{\text{außen}} + P_Y [Y^-]_{\text{innen}} + P_Z [Z^-]_{\text{innen}}}{P_X [X^+]_{\text{innen}} + P_Y [Y^-]_{\text{außen}} + P_Z [Z^-]_{\text{außen}}}$$

R = Gaskonstante (8.3144598 J/mol\*K)

T = absolute Temperatur in °Kelvin

F = Faradaykonstante (96485.33289 C/mol)

P = Permeabilitätskoeffizient der einzelnen Ionen

[X+, Y-, Z-] = Konzentration der einzelnen Ionen X, Y, Z außen und innen

Diese Gleichung kann zur Nernst-Gleichung vereinfacht werden, da die in dieser Arbeit charakterisierten Anionenkanäle in der Anwesenheit nur eines externen, permeierenden Anions (X<sup>-</sup>) untersucht wurden.

$$U_{\text{rev}} = \frac{R * T}{Z_X F} * \ln \frac{P_X [X^-]_{\text{innen}}}{P_X [X^-]_{\text{außen}}}$$

Eine Vereinfachung der Nernst-Gleichung ist möglich. Ist das permeierende Anion einfach geladen (Z<sub>X</sub>=1) und herrscht eine absolute Temperatur von 298,15 K, dann gilt:

$$U_{\text{rev}} = 59,1 \text{ mV} * \lg \frac{P_X [X^-]_{\text{innen}}}{P_X [X^-]_{\text{außen}}}$$

Daraus folgt, dass beim Membranfluss eines monovalenten Anions eine zehnfache Veränderung der extrazellulären Anionenkonzentration eine Verschiebung des Umkehrpotentials um 59,1 mV ergibt.

Beim heterologen Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyten ist die Ionenkonzentration im Zytosol der Oozyte nicht bekannt. Deshalb wurden die Permeabilitäten verschiedener Anionen relativ zu einer definierten Messlösung mit 50 mM NaNO<sub>3</sub> bestimmt.

$$\frac{P_X}{P_{\text{NO}_3^-}} = 10^{\frac{\Delta U_{\text{rev}}}{59,1 \text{ mV}}} * \frac{[\text{NO}_3^-]_{\text{innen}}}{[X^-]_{\text{außen}}}$$

$\Delta U_{\text{rev}}$  ergibt sich aus der Differenz der in NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und X<sup>-</sup> gemessenen Umkehrpotentiale.

## 2.8 Molekularbiologische Arbeiten

Die Beschreibung der folgenden (Standard-) Methoden und Techniken wurde zum Teil aus Arbeiten von Tobias Maierhofer und Jennifer Böhm übernommen und an die experimentellen Gegebenheiten dieser Arbeit angepasst.

### 2.8.1 Isolierung von Nukleinsäuren und cDNA-Synthese

#### 2.8.1.1 DNA-Isolierung nach der Köln-Methode aus *M. truncatula*-Blattgewebe

Um bei den Transposon-Linien NF11647, NF10039 und NF14366 Pflanzen zu identifizieren, die homozygot für die Transposon-Insertion im Kandidatengen sind, wurde eine Genotypisierung durchgeführt. Hierfür wurde DNA aus *M. truncatula*-Blattgewebe nach der „Köln“- Methode isoliert. Ein junges Blatt wurde geerntet, mit einer Kugel in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und unter Stickstoff 1 min in einer Kugelmühle (Tissue Lyser II, Qiagen, Hilden, Deutschland) gemörsert. Unter Zugabe von 400 µl Lysis-Puffer wurde das gemörserte Blattgewebe langsam aufgetaut und für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in 300 µl Isopropanol aufgenommen, gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl Wasser aufgenommen und durch Vortexen komplett gelöst.

In Tabelle 4 ist die Zusammensetzung des Lysis-Puffers aufgeführt.

**Tabelle 4: Zusammensetzung des Lysis-Puffers (DNA Iso nach Köln Methode)**

Reagenz	Volumen pro 10 ml Ansatz [ml]	Endkonzentration
1M Tris-HCl, pH 7,5-8	2	200 mM
5 M NaCl	0,5	250 mM
0,5 M EDTA, pH 8	0,5	25 mM
20 % SDS	0,25	0,5 %
H <sub>2</sub> O	6,75	

### 2.8.1.2 RNA-Isolierung aus *M. truncatula*-Wurzel- und -Blattgewebe (Kit)

Bei der Amplifikation der zu klonierenden Anionenkanäle wurde cDNA als Template benutzt, die vorher aus isolierter RNA synthetisiert wurde. Außerdem wurde RNA aus Wurzelgewebe von *M. truncatula*-Mutanten isoliert, um deren Genexpression in der quantitativen PCR (qPCR) zu überprüfen. Für beide Experimente erfolgte die RNA-Isolation aus Wurzel- oder Blattmaterial von *M. truncatula* unter Verwendung des Plant RNA Mini Kits (Omega Biotek, Norcross, USA) nach Angaben des Herstellers. Der Aufschluss des Pflanzengewebes wurde mit dem Tissue Lyser II (Qiagen) für 5 x 30 s bei 6,5 m/s durchgeführt. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

### 2.8.1.3 cDNA-Synthese

Für die Klonierung der Anionenkanäle aus *M. truncatula* und die Analyse der *MtSLAH2-3*-Transposon-Mutanten mittels qPCR wurde zunächst RNA isoliert, die anschließend in cDNA umgeschrieben wurde. Um eine Kontamination mit DNA zu verhindern, wurde in einem ersten Schritt eine DNase-Behandlung der isolierten RNA durchgeführt. Der in Tabelle 5 aufgeführte Ansatz wurde in ein Reaktionsgefäß pipettiert und für 45 min bei 37 °C inkubiert.

**Tabelle 5: Reaktionsansatz der DNase-Behandlung**

Reagenz	Volumen pro Ansatz [ $\mu\text{l}$ ]
10 x DNase Puffer	2
RNase freie DNase I (10 U/ $\mu\text{l}$ )	1
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ Fermentas)	0,5
RNA 2,5 $\mu\text{g}$	
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	auf 20 $\mu\text{l}$ auffüllen

Nach der DNase-Behandlung der isolierten RNA folgte die RNA-Fällung. Hierfür wurde das Volumen von 20  $\mu\text{l}$  auf 100  $\mu\text{l}$  mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> aufgefüllt. Anschließend wurden 10  $\mu\text{l}$  5 M NH<sub>4</sub>Ac in 100 mM EDTA (pH 8), 1  $\mu\text{l}$  Glycogen (20 mg/ml) und 75  $\mu\text{l}$  Isopropanol hinzugegeben und der Reaktionsansatz wurde für 45 min bei 4°C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden 500  $\mu\text{l}$  Ethanol (70 %) hinzugegeben und der Reaktionsansatz wurde erneut für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Ethanol verworfen und die Proben wurden bei 37 °C im Heizblock (Thermo Shaker 100, Biosan, Riga, Lettland) getrocknet. Für die anschließende reverse Transkription (RT) der mRNA in cDNA wurde das Pellet aus der RNA-Fällung in 7  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> aufgenommen.

**Tabelle 6: Reaktionsansatz für die reverse Transkription von mRNA in cDNA**

Reagenz	Volumen pro Ansatz [ $\mu\text{l}$ ]
mRNA	7
RT-Primer (100 $\mu\text{M}$ )	0,4
dNTPs (10 $\mu\text{M}$ )	0,5
5 x RT-Puffer (Promega)	2

Der in Tabelle 6 aufgeführte Reaktionsansatz wurde in ein Reaktionsgefäß pipettiert, für 2 min bei 70 °C inkubiert (Primus 96, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) und anschließend 30 s auf Eis gekühlt. Danach wurden 0,4  $\mu\text{l}$  MMLV Reverse Transkriptase (200 u/ $\mu\text{l}$ , Promega, Madison, USA) hinzugegeben und es folgte eine Inkubation des Reaktionsansatzes für 1 h bei 42 °C (Primus 96, MWG Biotech).

## 2.8.2 DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung

Die NanoDrop-Konzentrationsbestimmung basiert auf einer photometrischen Messung der Nucleinsäuren (DNA, RNA) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Messung mit einem Volumen von nur 0,5 µl der Nucleinsäure-Probe genügt, um die Konzentration exakt zu bestimmen. Neben der Nucleinsäure-Konzentration wird automatisch auch der Quotient aus OD260/OD280 und OD260/OD230 gemessen. Somit kann eine Aussage über die Verunreinigung der Probe mit Proteinen und phenolischen Substanzen gemacht werden. Das NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) wurde in dieser Arbeit zur Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA benutzt.

## 2.8.3 Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient zur Amplifikation eines gewünschten DNA-Abschnitts aus dem Genom und wurde von Mullis et al. (1986) etabliert.

### 2.8.3.1 PCR zur Amplifikation der kodierenden Sequenzen putativer Ionenkanäle

Für die Klonierung der kodierenden Sequenzen der zu untersuchenden Anionenkanäle wurde eine Standard-PCR mit dem unten aufgeführten Reaktionsansatz (Tabelle 8) und PCR-Programm (Tabelle 9) durchgeführt. Die verwendeten USER-Primer sind in Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 7: Auflistung der zur Amplifikation kodierender Sequenzen putativer Ionenkanäle verwendeten USER-Primer**

Primer	Sequenz
MtSLAH2-3A fwd	5`-ggcttaauatggaaaatcacataaacacttgaa-3`
MtSLAH2-3A rev	5`-ggcttaauttaatttgagaattctgatcg-3`
MtSLAH2-3B fwd	5`-ggcttaauatggaaaatcacataactcttgaa-3`
MtSLAH2-3B rev	5`-ggcttauttattttggcaaattatgatcagt-3`
MtSLAC1 fwd	5`-ggcttaauatggacaagaacactgtgaatt-3`
MtSLAC1 rev	5`-ggcttauctaggccacaacactgttattatc-3`

**Tabelle 8: Ansatz der Standard-PCR, der sowohl zur Amplifikation kodierender Sequenzen putativer Ionenkanäle als auch zur Genotypisierung der Transposon-Mutanten genutzt wurde**

Reagenz	Volumen pro Ansatz [ $\mu$ l]
Phusion HF Puffer (5 x)	10
cDNA Template	1
dNTP Mix (je 10 mM)	1
Primer <sub>for</sub> (10 $\mu$ M)	1
Primer <sub>rev.</sub> (10 $\mu$ M)	1
Phusion Cx DNA-Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	1
Nuklease-freies Wasser	35 $\mu$ l

Die PCR-Reaktionen wurden in *Thermocyclern* der Firmen Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und MWG Biotech durchgeführt. Dabei wurden folgende Standardbedingungen gewählt:

**Tabelle 9: PCR-Programm, das sowohl zur Amplifikation kodierender Sequenzen putativer Ionenkanäle als auch zur Genotypisierung der Transposon-Mutanten genutzt wurde**

PCR-Schritt	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	2-4 min	98 °C
<u>30 Zyklen:</u>		
Denaturierung	30 s	98 °C
Primer-Annealing	30 s	60 °C
Elongation	40 s	72 °C
Finale Elongation	2 min	72 °C
Ende	$\infty$	4 °C

Das PCR-Produkt wurde in einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft und anschließend bei -20 °C gelagert.

### 2.8.3.2 PCR-Mutanten-Genotypisierung

Für die Genotypisierung der Mutantenlinien NF10039 und NF11647 für *MtSLAH2-3B* und NF14366 für *MtSLAH2-3A* auf Homozygotie der gewünschten Transposon-Insertion wurden PCRs auf aus Blattgewebe isolierter DNA durchgeführt. Das PCR-Programm und der

Reaktionsansatz entsprachen den in Tabelle 8 und Tabelle 9 aufgeführten Bedingungen bzw. Reagenzien. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10: Übersicht über die für die Genotypisierung der Transposon-Mutanten verwendeten PCR-Primer**

Primer	Sequenz
MtSLAH2-3A LB fwd	5`-atttcaagggccaaattatctgac-3`
MtSLAH2-3A RB rev	5`-actacacatggtcattggaacaatc-3`
MtSLAH2-3B LB fwd	5`-tccaaaaccttaacagttttcat-3`
MtSLAH2-3B RB rev	5`-aaattgcgtcaaacagtctcaca-3`
Tnt1-F	5`-tccttgttggattgtagccaacttcgtg-3`
Tnt1-R	5`-tgtagcaccgagacacggcaattaacaaga -3`

### 2.8.3.3 Quantitative PCR (qPCR)

Zur Analyse der Genexpression in den Mutantenlinien NF10039 und NF11647, die homozygot für die Transposon-Mutation im *MtSLAH2-3B*-Gen waren, wurde eine quantitative PCR (qPCR) unter Verwendung des Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mixes (ABgene, Thermo Fisher Scientific) in einem Light Cycler (Roche Holding AG, Basel, Schweiz) durchgeführt. Die verwendeten Primer, der Reaktionsansatz und die PCR-Programme sind den unten aufgeführten Tabellen zu entnehmen. Die Auswertung erfolgte mit der  $2^{-\Delta Ct}$ -Methode mit  $\Delta Ct = Ct_{MtSLAH2-3B} - Ct_{MtTEF1\alpha}$  (Livak and Schmittgen 2001). Zur Normalisierung wurde der Elongationsfaktor *MtTEF1 $\alpha$*  verwendet.

**Tabelle 11: Auflistung der in der qPCR verwendeten Primer**

Primer	Sequenz
MtSLAH2-3B fwd	5`-ttgaaatcatagaacaagc-3`
MtSLAH2-3B rev	5`-ttatgattacgattagcct-3`
MtTEF1 $\alpha$ fwd	5`-agctaggaggtattgacaag-3`
MtTEF1 $\alpha$ rev	5`-ctgtgcagtagtacttggtg-3`

Tabelle 12: Reaktionsansatz der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qPCRs

Reagenz	Volumen pro Ansatz [ $\mu$ l]
Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix (ABgene)	10
Primermix 6 (Primer fwd 50 $\mu$ M, Primer rev 50 $\mu$ M)	8
Template cDNA (1:20 verdünnt)	2

Tabelle 13: Light Cycler-Standard-Programm der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qPCRs

PCR-Schritt	Zeit	Temperatur
Denaturierung	15 min	95 °C
Amplifikation 40 Zyklen	15 s	95 °C
	20 s	59 °C
	20 s	72 °C
	5 s	79 °C
Schmelzkurve	5 s	95 °C
	30 s	75 °C
	0 s	95 °C
Kühlung	30 s	40 °C

### 2.8.4 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine essentielle Methode der Molekularbiologie und wurde in dieser Arbeit zur Analyse der PCR-Ergebnisse durchgeführt. Die Agarosekonzentration kann zwischen 0,8 und 2 % variiert und somit dem gewünschten Auftrennungseffekt angepasst werden. In dieser Arbeit erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte mit einem 1 %igem (w/v) Agarosegel. Hierfür wurden 5 g Agarose in 500 ml 1 x TAE-Puffer durch mechanisches Rühren und Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen auf 60 °C wurden 25  $\mu$ l des Fluoreszenzfarbstoffes GelGreen (GelGreen Nucleic Acid Stain, Biotium, Fremont, USA) hinzugegeben, der mit DNA interkaliert und bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 254-366 nm Licht emittiert. Ein Gel wurde in einer Gelkammer unter Verwendung eines zwölfzahnigen Kammes gegossen.

Nach der Auspolymerisierung des Gels wurde es mit einem Gelschlitten in eine mit 1x TAE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer überführt. Die Proben wurden mit 5x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde auf jedes Gel ein  $\lambda$  PstI-Marker aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 80 V. Nach 30 bis 40 min wurde das Gel an einem Intas UV Imager (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) in einem Wellenlängenbereich von 254 bis 366 nm photographisch ausgewertet.

### 2.8.5 USER-Klonierung

In dieser Arbeit wurden Anionenkanäle aus *M. truncatula* elektrophysiologisch charakterisiert. Für die heterologe Expression der Anionenkanäle in *Xenopus*-Oozyten musste die kodierende Sequenz des entsprechenden Gens zunächst in einen passenden Vektor kloniert werden. Dies erfolgte mittels USER<sup>TM</sup>-Klonierung (engl. uracil-specific excision reagent). Diese von Nour-Eldin et al. (2006) veröffentlichte Methode basiert darauf, dass Vektor und PCR-Produkt (Insert) mit Überhängen aus acht Nukleotiden versehen werden, die miteinander stabil hybridisieren können. Dadurch ist eine Transformation in Bakterien ohne Ligationsschritt möglich. Die Überhänge aus acht Nukleotiden am Vektor entstehen durch das Klonieren einer PacI-USER-Kassette in den Vektor. Eine Behandlung mit dem Restriktionsenzym PacI (New England Biolabs, Ipswich, USA) führt zur Linearisierung des Vektors. Durch eine weitere Behandlung mit dem Restriktionsenzym Nt.BbvCI (New England Biolabs), das nur einen Strang der doppelsträngigen DNA schneidet, entstehen 3'-Überhänge von 8 bp, die nicht komplementär zueinander sind. Somit wird eine Rehybridisierung des Vektors verhindert und eine gerichtete Insertion ermöglicht (Nour-Eldin et al. 2006). In Tabelle 14 sind die zur heterologen Expression in *Xenopus laevis*-Oozyten verwendeten USER-Vektoren aufgeführt, die bereits USER-kompatibel von Prof. Dr. Dietmar Geiger (Julius-von-Sachs-Institut, Universität Würzburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden (Vektorkarten s. Anhang). Als Ausgangsvektor diente der pGEMHE, der wie oben beschrieben nach Nour-Eldin et al. (2006) modifiziert wurde.

Tabelle 14: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten USER-Vektoren

Vektor-Bezeichnung	Beschreibung
pNB1u16	USER-kompatibler Oozyten-Expressionsvektor, Ampicillin-Resistenz (Abbildung 37)
pNB1u18	C-terminale Hälfte eines YFP downstream der USER-Kassette, Ampicillin-Resistenz (Abbildung 38)
pNB1u20	N-terminale Hälfte eines YFP downstream der USER-Kassette, Ampicillin-Resistenz (Abbildung 39)

Die Überhänge aus 8 Nukleotiden am 5'-Ende des zu klonierenden PCR-Produkts wurden über speziell designte Primer während der Amplifikation der genspezifischen Sequenz in der PCR angehängt. Hierfür wurde dem genspezifischen *forward*-Primer die Basenabfolge 5'-GGCTTAAU - 3' und dem genspezifischen *reverse*-Primer die Basenabfolge 5'-GGTTTAAU - 3' hinzugefügt. Nach der PCR-Amplifikation des gewünschten Inserts wird durch einen enzymatischen Verdau das Uracil der im PCR-Produkt integrierten USER-Sequenz entfernt, wodurch sich die acht Nukleotide einzelsträngig abspalten und der Überhang zur komplementären Hybridisierung mit dem USER-Vektor zur Verfügung steht. In Tabelle 15 ist der Reaktionsansatz der USER-Reaktion so aufgeführt, wie er in dieser Arbeit verwendet wurde.

Tabelle 15: Reaktionsansatz der USER-Reaktion

Reagenz	Volumen pro Ansatz [ $\mu$ l]
aufgeschnittener Vektor	1,5
USER <sup>TM</sup> -Enzym-Mix (1000 U/ml) (New England Biolabs Inc.)	1
TE-Puffer	3,5
PCR-Produkt/Insert (aufgereinigt)	4

Der Reaktionsansatz wurde in einem 1,5 ml fassenden Reaktionsgefäß zusammenpipettiert und in einem Thermocycler (Eppendorf) 30 min bei 37 °C und weitere 30 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeschock-Transformation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen.

## **2.8.6 Molekularbiologische Methoden mit *Escherichia coli***

### **2.8.6.1 Bakterien-Transformation durch Hitzeschock**

Bei der Hitzeschock-Transformation sind die *E. coli*-Bakterien aufgrund eines Temperaturschocks von 42 °C, der die Struktur der Bakterienmembran verändert, kurzzeitig für DNA-Moleküle durchlässig. Hierfür wurde ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit dem USER-Reaktionsansatz versetzt. Die Hitzetransformation erfolgte in einem Wasserbad bei 42 °C für 40 s. Anschließend wurden die transformierten Zellen direkt auf Eis gekühlt und auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **2.8.6.2 Herstellung von Übernachtskulturen**

Einige der nach der Bakterien-Transformation über Nacht auf den LB-Agarplatten gewachsenen Kolonien wurden einzeln in 15 ml Falcons mit 5 ml LB-Medium überführt, das mit entsprechendem Antibiotikum versetzt war. Die Kulturen wurden bei 37 °C über Nacht unter Schütteln (Inkubator Shaker Model G25, New Brunswick Scientific, Edison, USA) angezogen.

### **2.8.6.3 Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli*-Bakterien**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen der transformierten *E. coli*-Bakterien erfolgte unter Verwendung des QIAPrep Spin Mini Kits nach Angaben des Herstellers Qiagen. Hierbei wird die Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA und den bakteriellen Proteinen getrennt. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA wurde mit dem Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) photometrisch durchgeführt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

## 2.8.7 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Zur Überprüfung der Gensequenz der klonierten cDNA putativer Ionenkanäle wurden Sequenzierungen in Auftrag gegeben. Hierfür wurden isolierte Plasmid-DNA (Minipräparation) aus den transformierten *E. coli*-Bakterien sowie Vektor- bzw. CDS-spezifische Primer zu LGC Genomics gesandt, die die Sequenzierung extern durchführten. Die Sequenzanalyse erfolgte mit der Software Vector NTI (Invitrogen, Carlsbad, USA).

## 2.8.8 Herstellung von cRNA zur Injektion in *Xenopus laevis*-Oozyten

### 2.8.8.1 IVT-PCR

Die *in vitro*-PCR (IVT-PCR) wurde benutzt, um ein cDNA-Template zu synthetisieren, das anschließend in einer *in vitro*-Transkription in cRNA umgeschrieben werden konnte. Die cRNA wurde dann zur heterologen Expression in Oozyten verwendet. In der IVT-PCR wurde mit vektorspezifischen Primern die cDNA im gewünschten Oozyten-Expressionsvektor zusammen mit den angrenzenden Bereichen des Vektors amplifiziert, einschließlich der 5'-UTR (untranslatierte Region) und der 3'-UTR. Als Template für die IVT-PCR diente isolierte Plasmid-DNA. Die PCR-Reagenzien und PCR-Bedingungen sind in den folgenden Tabellen aufgeführt. Nach der PCR wurde das PCR-Produkt mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und diente als Template für die anschließende *in vitro*-Transkription der cDNA in cRNA.

Tabelle 16: Reaktionsansatz der IVT-PCR

Reagenz	Volumen pro Ansatz [ $\mu$ l]
Phusion HF Puffer (5 x)	10
Plasmid DNA Template	1
dNTP Mix (je 10 mM)	1
IVT-Primer <sub>for</sub> (10 $\mu$ M)	1
IVT-Primer <sub>rev.</sub> (10 $\mu$ M)	1
Phusion Cx DNA-Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	1
Nuklease-freies Wasser	35 $\mu$ l

**Tabelle 17: Programm der IVT-PCR**

PCR-Schritt	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	2-5 min	98 °C
<u>30 Zyklen:</u>		
Denaturierung	30 s	98 °C
Primer-Annealing	30 s	60 °C
Elongation	60 s	72 °C
Finale Elongation	3 min	72 °C
Ende	∞	4 °C

### 2.8.8.2 *In vitro*-Transkription

Für die *in vitro*-Transkription wurde das AmpliCap-Max™ T7 High Yield Message Maker Kit (Cell Script, Madison, USA) mit dem in Tabelle 18 dargestellten Standardansatz verwendet.

**Tabelle 18: Standardansatz der *in vitro*-Transkription**

Reagenz	Volumen pro Ansatz [µl]
cDNA-Template	2,75
Puffer	1
DTT	1
T7-Polymerase	1
Cap/NTP-Mix	4
RNase-Inhibitor	0,25

Dieser Ansatz wurde in ein 1,5 ml fassendes Reaktionsgefäß pipettiert und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl NH<sub>4</sub>Ac hinzugegeben und die RNA wurde bei -20 °C für mindestens 30 min gefällt. Daraufhin wurde die RNA bei 4 °C und 20.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 70 % Ethanol bei erneuter Zentrifugation gewaschen. Nach Abnahme des Ethanols wurde das Pellet bei 37 °C getrocknet, bevor es in 10 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert wurde. Die Überprüfung von Qualität und Quantität der cRNA erfolgte durch photometrische Konzentrationsbestimmung an einem Nano Drop (Kapitel 2.8.2) sowie durch RNA-Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.8.9).

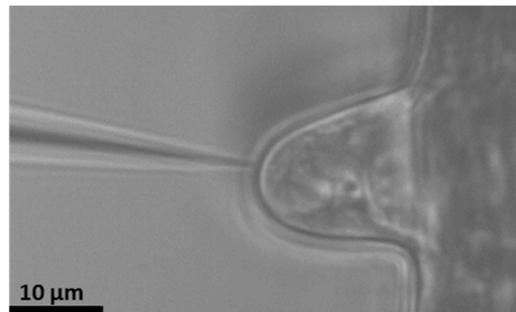
### **2.8.9 RNA-Agarose-Gelelektrophorese**

Die RNA-Agarose-Gelelektrophorese diente der Überprüfung der Qualität der synthetisierten cRNA. Für das 1 %ige Agarose-Gel wurden 0,5 g Agarose-Gel in 41 ml MEN-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen wurden 9 ml 37%iges Formaldehyd und 2,5  $\mu$ l des Fluoreszenzfarbstoffes GelGreen (Biotium, 5  $\mu$ l/100 ml) hinzugefügt. Das Gel wurde unter einem Abzug in einen Glasschlitten mit entsprechendem Kamm gegossen. Die cRNA-Proben wurden mit 3  $\mu$ l 4xRNA-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 60 bis 70 V für ca. 1 h. Das Gel wurde am UV-Imaging System (Intas Science Imaging Instruments GmbH) photographisch ausgewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Membranpotentialmessungen an Wurzelhaarzellen von *Medicago truncatula*

In dieser Arbeit wurde mittels Einstich von Mikroelektroden in Wurzelhaare intakter *M. truncatula*-Keimlinge das Membranpotential dieser Wurzelhaarzellen unter verschiedenen Bedingungen beobachtet (Abbildung 6). Ziel war es, die frühe Reaktion der Wurzelhaarzellen auf die Signalmoleküle der RNS (Nod-LCOs) und der AM (Myc-LCOs) elektrophysiologisch zu untersuchen.



**Abbildung 6: *M. truncatula*-Wurzelhaareinstich**

Durchlichtbild eines Wurzelhaars von *M. truncatula*, in das eine Mikroelektrode zur kontinuierlichen Messung des Membranpotentials eingestochen wurde.

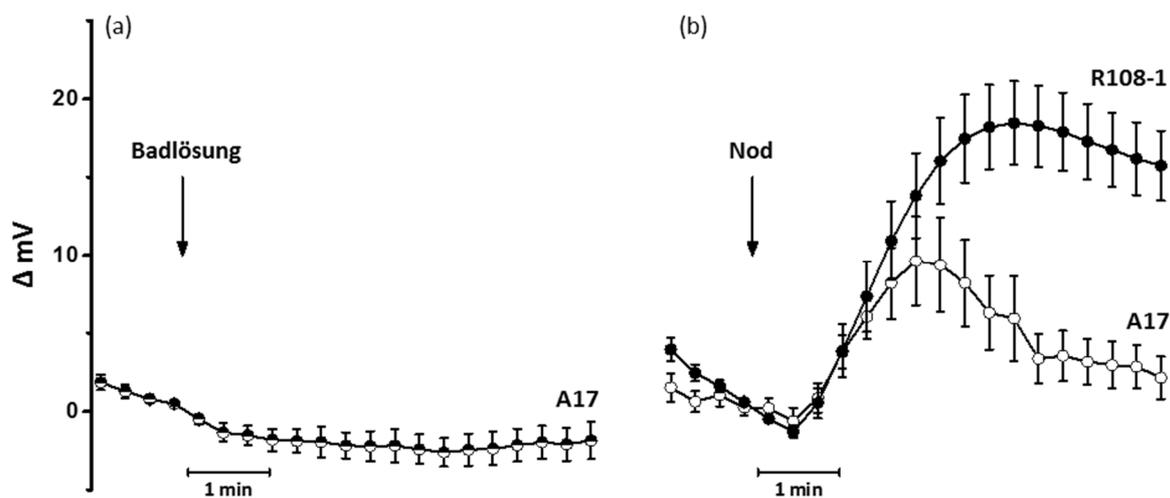
##### 3.1.1 Nod-LCO-induzierte Membranpotentialänderungen

Die von den symbiotischen Bakterien ausgeschütteten Nod-LCOs sind tetramere oder pentamere Lipochitinoligosaccharide, deren verschiedene Substitutionen ihre Wirtsspezifität bestimmen (Denarie et al. 1996, Lerouge et al. 1990). Ehrhardt et al. konnten 1992 als erste zeigen, dass die Wurzelhaarzellen von *Medicago sativa* auf die Zugabe von *Sinorhizobium meliloti*-Nod-LCOs mit einer Depolarisierung des Membranpotentials reagieren. In den darauffolgenden Jahren gelang es sowohl Felle et al. (1995), als auch Kurkdjian (1995) dieses Experiment für *M. sativa* zu wiederholen und weiterzuführen.

In dieser Arbeit galt es zunächst, ein Versuchsprotokoll zu etablieren, das die stabile Messung des Membranpotentials unter Perfusion einer Badlösung ermöglicht.

Die Messreihe „Badlösung A17“ in Abbildung 7a diente als Kontrolle und zeigt, dass die Membranpotentialmessungen ohne Störung durchführbar waren. Die Keimlinge wurden vor

und während der Messungen in einer mit Cäsium versetzten Badlösung gehalten, um Ionenkanäle zur Kaliumaufnahme zu blocken. Unter diesen Bedingungen lagen die nach dem Einstich der Mikroelektrode aufgezeichneten Membranpotentiale bei dem *M. truncatula*-Genotyp R108-1 im Durchschnitt bei  $-160,15 \text{ mV}$  ( $SE=2,15$ ,  $n=37$ ), während der *M. truncatula*-Genotyp A17 etwas stärker hyperpolarisierte Membranpotentiale von im Durchschnitt  $-185,1 \text{ mV}$  ( $SE=6,68$ ,  $n=11$ ) aufwies. Die Antworten auf Zugabe der *S. meliloti*-Nod-LCOs (NodSM-IV, C16:2, S) sind in Abbildung 7b für die *M. truncatula*-Genotypen R108-1 und A17 dargestellt.



**Abbildung 7: Einfluss von Nod-LCOs auf das Membranpotential von *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen**

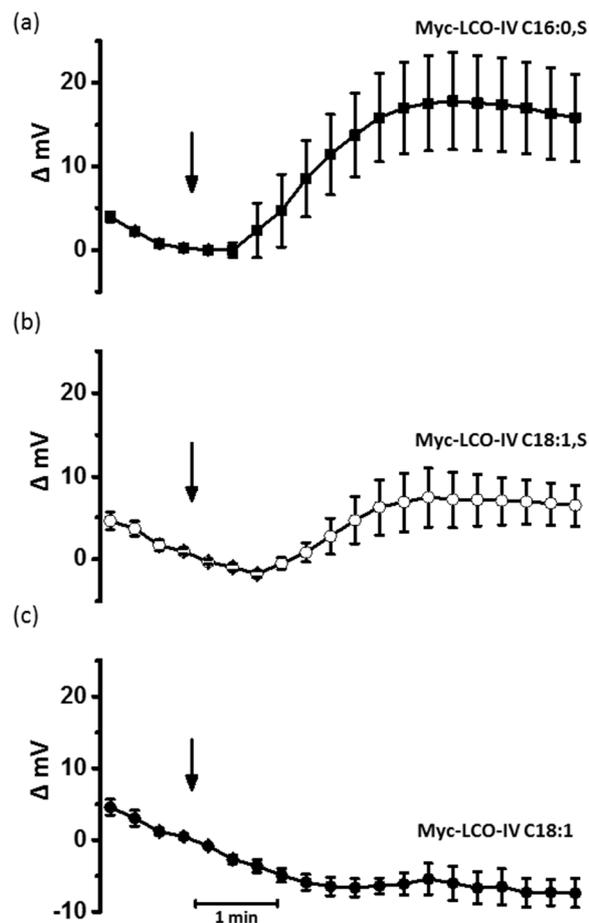
Durchschnittliche Änderungen des Membranpotentials nach Zugabe der Badlösung als Kontrollmessung ( $n=8$ ) (a) oder  $100 \text{ nM}$  des Nod-LCOs NodSM-IV, C16:2, S (b) (Mittelwert  $\pm$  SE). Die Reaktion von *M. truncatula*-Wurzelhaaren auf Nod-LCOs wurde an den Genotypen A17 ( $n=11$ ) und R108-1 ( $n=37$ ) untersucht.

Eine Zugabe von  $100 \text{ nM}$  Nod-LCOs führte bei beiden Genotypen (R108-1, A17) zu einer transienten Depolarisierung des Membranpotentials der Wurzelhaarzellen. Die Depolarisierung des Membranpotentials startete beim Genotyp R108-1  $44,53 \text{ s}$  ( $SE=3,74$ ,  $n=32$ ) und beim Genotyp A17  $33,9 \text{ s}$  ( $SE=2,65$ ,  $n=9$ ) nach der Zugabe der Nod-LCOs. Interessanterweise triggern Nod-LCOs beim Genotyp R108-1 trotz des weniger hyperpolarisierten Membranpotentials eine sehr viel stärkere Depolarisierung als beim Genotyp A17 (Abbildung 7b). Im Mittel lag die maximale Depolarisierung des Genotyps R108-1 bei  $21,03 \text{ mV}$  ( $SE=2,78$ ,  $n=37$ ), die des Genotyps A17 nur bei  $10,38 \text{ mV}$  ( $SE=2,7$ ,  $n=11$ ).

Ein weiterer Unterschied zwischen den Genotypen R108-1 und A17 lag in der Zeit, die bis zum Erreichen des Maximalwertes der Depolarisierung nach der Zugabe der Nod-LCOs vergangen war. Diese betrug beim Genotyp R108-1 210,46 s (SE=10,74, n=32), beim Genotyp A17 hingegen nur 108,9 s (SE=7,91, n=9).

### 3.1.2 Myc-LCO-induzierte Membranpotentialsänderungen

Bei den in der AM vom symbiotischen Pilz *Glomus intraradices* ausgesandten Myc-LCOs handelt es sich um sulfatisierte und nicht sulfatisierte Lipochitinoligosaccharide. Myc-LCOs sind einfacher aufgebaut als Nod-LCOs und die einzige mögliche Substitution an der Glucosamin-Untereinheit ist eine Sulfatisierung. Folglich ist die Wirtsspezifität bei der AM sehr viel geringer als bei der RNS (Maillet et al. 2011). Es wurde bislang nicht gezeigt, ob Myc-LCOs eine Änderung des Membranpotentials induzieren. Zwei sulfatisierte Myc-LCOs (LCO-IV C16:0, S, LCO-IV C18:1, S) und ein nicht sulfatisierter Myc-LCO (Myc-LCO-IV C18:1) wurden an Wurzelhaarzellen von *M. truncatula* (R108-1) getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: Myc-LCO-induzierte Depolarisierung des Membranpotentials von *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen**

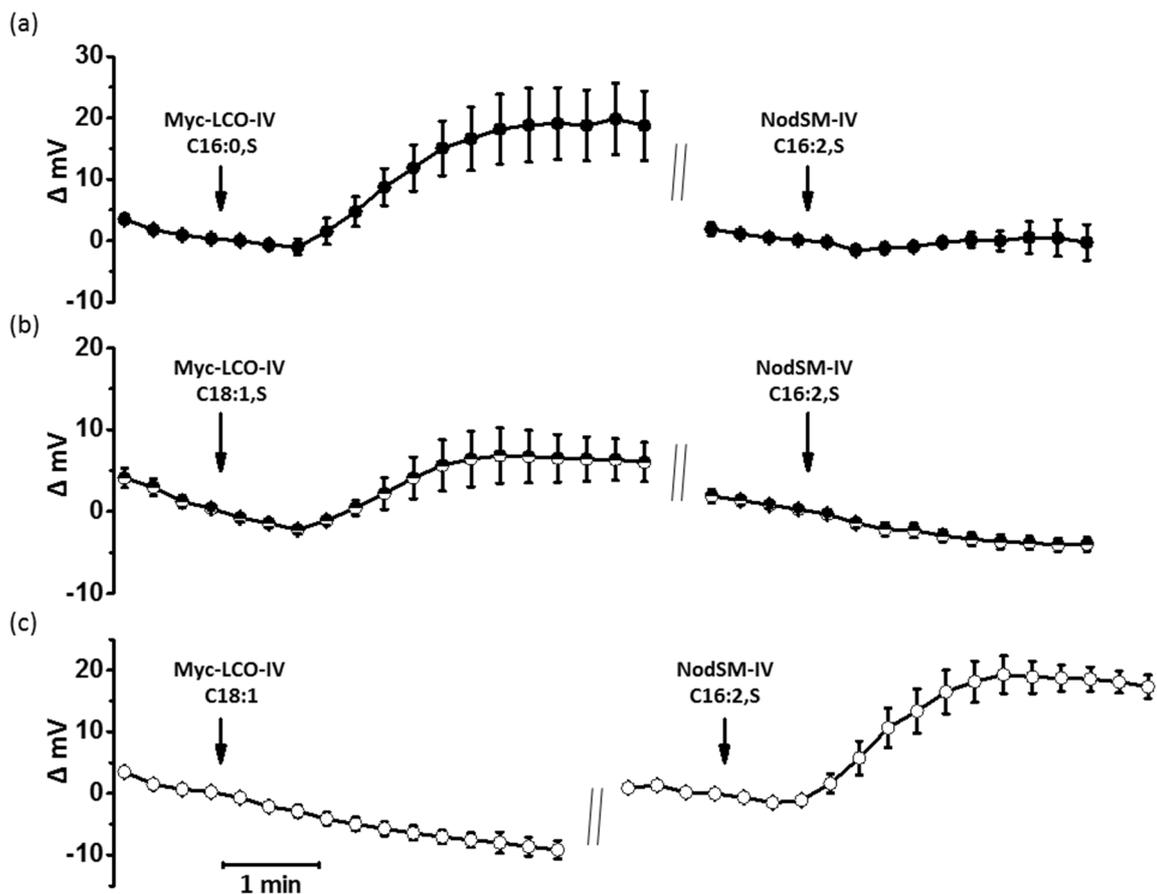
Durchschnittliche Änderungen des Membranpotentials der Wurzelhaarzellen des *M. truncatula*-Genotyps R108-1 nach Applikation von 100 nM des sulfatisierten Myc-LCOs-IV C16:0, S (a), des sulfatisierten Myc-LCOs-IV C18:1, S (b) und des nicht sulfatisierten Myc-LCOs-IV C18:1 (c) ( $n \geq 6$ , Mittelwert  $\pm$  SE).

Wurzelhaarzellen von *M. truncatula* reagieren auf die Zugabe von sulfatisierten Myc-LCOs mit einer Depolarisierung des Membranpotentials (Abbildung 8a, b). Die Stärke der Depolarisierung ist bei Zugabe des Myc-LCOs-IV C16:0, S mit einem Mittelwert von 19,22 mV ( $SE=6,24$ ,  $n=9$ ) ähnlich wie bei der durch Nod-LCOs (NodSM-IV, C16:2, S) induzierten Reaktion (R108-1) (vergleiche Abbildung 8a und 7b). Der Myc-LCO-IV C18:1, S hingegen löst eine schwächere Depolarisierung von im Mittel 8,99 mV ( $SE=3,61$ ,  $n=8$ ) aus (Abbildung 8b).

Im Gegensatz zu beiden sulfatisierten Myc-LCOs wirkt sich eine Zugabe des nicht sulfatisierten Myc-LCOs-IV C18:1 nicht auf das Membranpotential der *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen aus (Abbildung 8c).

### 3.1.3 Antwort des Membranpotentials auf Nod-LCOs nach vorheriger Stimulation durch Myc-LCOs

Die Perzeption von LCOs erfolgt über Lysin-Motiv-Rezeptor-ähnliche Kinasen (engl.: lysin motif domain receptor like kinases (LysM-RLKs)), die in der Plasmamembran der Pflanzenwurzelzellen lokalisiert sind. Für die Perzeption von Nod-LCOs in *M. truncatula* wurden zwei LysM-RLKs als essentiell identifiziert: LysM receptor kinase 3 (*MtLYK3*) und Nod factor perception (*MtNFP*) (Limpens et al. 2003, Arrighi et al. 2006). Auch die Erkennung der Myc-LCOs scheint in *M. truncatula* von der LysM-RLK *MtNFP* abhängig zu sein (Maillet et al. 2011), auch wenn *MtNFP* für die spätere AM-Kolonisierung der Pflanzenwurzeln nicht essentiell ist (Oldroyd 2013). Wie bereits gezeigt, ist nicht nur die chemische Natur, sondern auch die Reaktion der Plasmamembran auf Nod-LCOs und sulfatisierte Myc-LCOs sehr ähnlich (Kapitel 3.1.1 und 3.1.2). In den folgenden Experimenten sollte deshalb getestet werden, ob Nod- und Myc-LCOs um dasselbe Perzeptionssystem konkurrieren. Hierfür wurde nach der Stimulierung mit einem Myc-LCO der Nod-LCO appliziert. Die Aufzeichnung des Membranpotentials erfolgte, wie bereits beschrieben, durch den Einstich einer Mikroelektrode in eine Wurzelhaarzelle von *M. truncatula* (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Beeinflussung der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials durch die verschiedenen Myc-LCOs**

Durchschnittliche Änderungen des Membranpotentials nach Stimulation der Wurzelhaarzellen von *M. truncatula* zuerst mit 100 nM eines Myc-LCOs und anschließend mit 100 nM Nod-LCO. Nach der Zugabe der sulfatisierten Myc-LCOs-IV C16:0, S (a) und C18:1, S (b) und des nicht sulfatisierten Myc-LCOs IV C18:1 (c) wurde jeweils der Nod-LCO NodSM-IV, C16:2, S hinzugegeben (a-c) ( $n \geq 7$ , Mittelwert  $\pm$  SE).

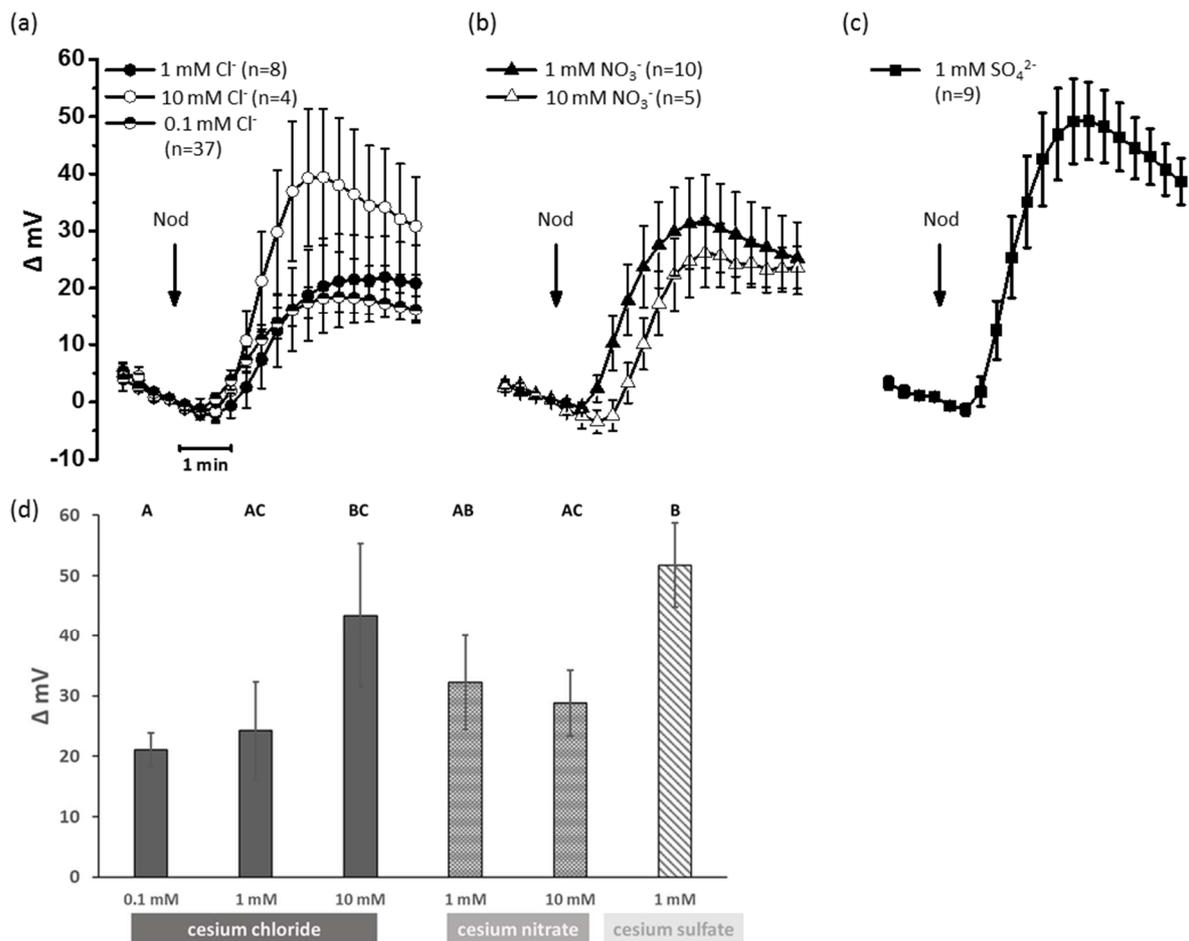
Die Zugabe der sulfatisierten Myc-LCOs (Myc-LCO-IV C16:0, S, Myc-LCO-IV C18:1, S) führte, wie bereits gezeigt, zu einer Depolarisierung des Membranpotentials der Wurzelhaarzellen. Die anschließende Zugabe des Nod-LCOs (NodSM-IV, C16:2, S) löste keine Änderung des Membranpotentials aus (Abbildung 9a, b). Die Nod-LCO-aktivierte Depolarisierung des Membranpotentials wurde also durch die vorher induzierte Reaktion auf den jeweiligen sulfatisierten Myc-LCO unterdrückt.

Diese Beobachtung konnte bei Zugabe des Nod-LCOs nach Applikation des nicht sulfatisierten Myc-LCOs nicht gemacht werden (Abbildung 9c). Da der nicht sulfatisierte Myc-LCO (Myc-LCO-IV C18:1) keine Reaktion der Wurzelhaarzellen auslöst (Abbildung 8c, Abbildung 9c), kann eine

anschließende Zugabe des Nod-LCOs eine transiente Depolarisierung des Membranpotentials induzieren (Abbildung 9c).

### **3.1.4 Einfluss der Anionen Chlorid, Nitrat und Sulfat auf die Nod-LCO-induzierte Depolarisierung des Membranpotentials**

Nod-LCOs aktivieren eine Depolarisierung des Membranpotentials in Wurzelhaarzellen von *M. truncatula* möglicherweise, wie in der Einleitung beschrieben, über die Aktivierung von S-Typ-Anionenkanälen, die in der Plasmamembran lokalisiert sind. Da Anionenkanäle unterschiedliche Permeabilitäten für verschiedene Anionen aufweisen und einige Anionenkanäle bestimmte Anionen zur Aktivierung benötigen, wurde in einem Experiment getestet, ob der zeitliche Ablauf und die Amplitude der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung von der Zusammensetzung der Anionen in der Badlösung abhängen. Zunächst wurde der Einfluss von Chlorid untersucht. Da für den S-Typ-Anionenkanal aus *Arabidopsis AtSLAH3* neben einer Chlorid-Permeabilität eine hohe Nitrat-Permeabilität gezeigt werden konnte (Geiger et al. 2011, Negi et al. 2008, Zheng et al. 2015b), wurden ebenfalls unterschiedliche Nitrat-Konzentrationen getestet. Neben der Familie der S-Typ-Anionenkanäle gibt es R-Typ-Anionenkanäle, die Sulfat-permeabel sind und durch Sulfat stimuliert werden (Frachisse et al. 1999). Aus diesem Grund wurde auch der Einfluss von Sulfat auf die Depolarisierung analysiert. Die Aufzeichnung des Membranpotentials erfolgte, wie bereits beschrieben, mittels eines Mikroelektroden-Einstichs in *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Einfluss der extrazellulären Anionenkonzentrationen auf die Nod-LCO-induzierte Depolarisierung des Membranpotentials in Wurzelhaarzellen von *M. truncatula***

(a-c) Durchschnittliche Änderungen des Membranpotentials nach Stimulation der Wurzelhaare mit 100 nM Nod-LCO. Die Badlösung bestand aus 0,1 mM  $CaCl_2$ , 0,1 mM  $NaCl$ , 0,1 mM  $CsCl$  und 5 mM MES/Tris, pH 7. Wo angegeben, wurde 0,1 mM  $CsCl$  (halb offener Kreis, n=37) durch 1 mM (geschlossener Kreis, n=8) oder 10 mM  $CsCl$  (offener Kreis, n=4) (a), 1 mM (geschlossenes Dreieck, n=10) oder 10 mM  $CsNO_3$  (offenes Dreieck, n=5) (b) oder 1 mM  $Cs_2SO_4$  (geschlossenes Quadrat, n=9) (c) ersetzt.

(d) Nod-LCO-induzierte maximale Depolarisierungen in Abhängigkeit von der extrazellulären Badlösung ( $CsCl$ ,  $CsNO_3$  oder  $Cs_2SO_4$ ). Der Nod-LCO wurde in einer Konzentration von 100 nM zugegeben. Die Konzentration von  $CsCl$ ,  $CsNO_3$  bzw.  $Cs_2SO_4$  in der Badlösung ist unter der X-Achse angegeben. Die Buchstaben über dem Diagramm kennzeichnen, welche Daten sich signifikant unterscheiden ( $p < 0,05$ , ungepaarter t-Test).

Eine Erhöhung der Chlorid-Konzentration in der Badlösung von 0,1 mM auf 10 mM führte zu einer stärkeren Depolarisierung des Membranpotentials (Abbildung 10a, d).

Aufgrund der hohen Permeabilität von *AtSLAH3* für Nitrat wurde in Anwesenheit von 10 mM im Vergleich zu 1 mM Cäsiumnitrat eine Zunahme der durchschnittlichen maximalen

Depolarisierung erwartet. Eine Erhöhung der Nitrat-Konzentration beeinflusste die Amplitude der Depolarisierung jedoch nicht (Abbildung 10b, d). Dafür erreichte die Depolarisierung in 10 mM Nitrat mit im Mittel 110,98 s (SE=9,86, n=5) später die halbmaximale Depolarisierung als in 1 mM Nitrat mit im Mittel 83,98 s (SE=6,71, n=9) (Abbildung 10b, d). Ein Vergleich mit den Zeitpunkten der halbmaximalen Depolarisierung in 1 mM Chlorid (118,84 s, SE=9,72, n=7) und 10 mM Chlorid (111,98 s, SE=15,43, n=4) zeigt, dass die Reaktion in 1 mM Nitrat verfrüht stattfindet.

Außerdem wurde der Einfluss von Sulfat in der Badlösung getestet, das nicht von S-Typ-Anionenkanälen transportiert wird, aber R-Typ-Anionenkanäle permeieren und stimulieren kann (Frachisse et al. 1999). Ein Austausch von 1 mM Chlorid durch 1 mM Sulfat verstärkte die Nod-LCO-induzierte Depolarisierung des Membranpotentials von *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen (Abbildung 10c, d).

Zusammenfassend kann also eine Verstärkung der Depolarisierung bei zunehmender Chlorid-Konzentration (0,1 zu 10 mM) und in Anwesenheit von Sulfat (1 mM) beobachtet werden. Eine erhöhte Nitrat-Konzentration (10 mM) führt im Vergleich zu 1 mM Nitrat zu einer zeitlichen Verzögerung der Depolarisierung.

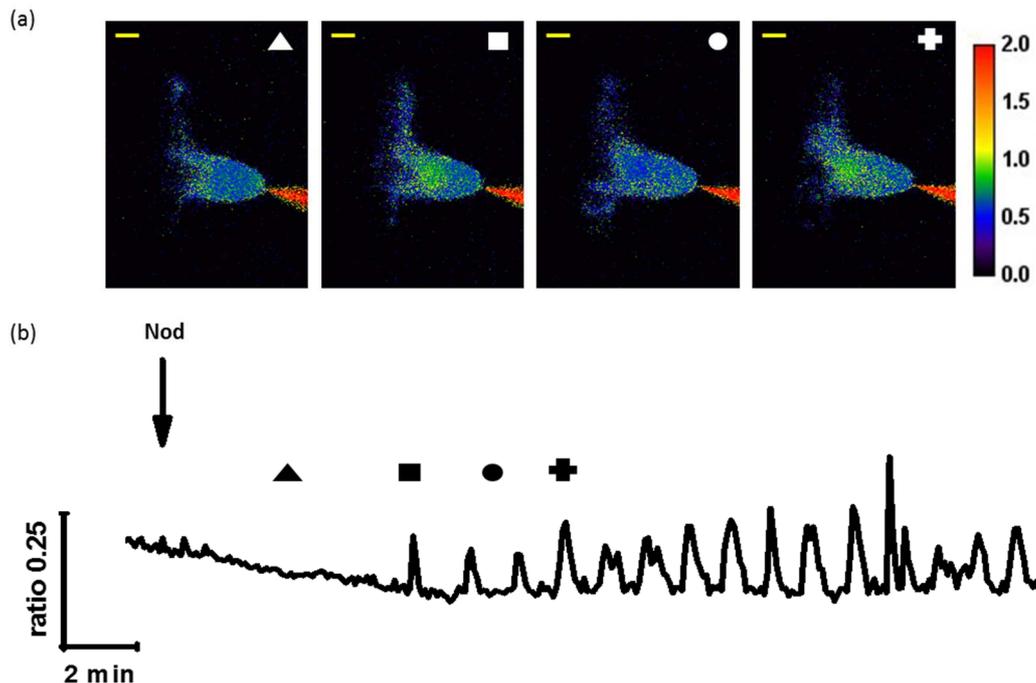
### 3.2 Calcium-Messungen an Wurzelhaarzellen von *Medicago truncatula*

Neben der Depolarisierung der Plasmamembran ist eine weitere frühe Reaktion der Pflanzenwurzeln auf Nod- und Myc-LCOs eine Änderung der zytosolischen Calcium-Konzentration (Ehrhardt et al. 1996, Wais et al. 2000, Wais et al. 2002, Capoen et al. 2009, Kosuta et al. 2008, Sun et al. 2015). Die Änderungen der Calcium-Konzentration werden auch als Calcium-*Signaling* bezeichnet und verknüpfen die Perzeption von LCOs mit der Induktion der Genexpression symbiosespezifischer Gene, die für die Entwicklung der Symbiosen wichtig sind (Ehrhardt et al. 1996, Kosuta et al. 2008).

Um die Frage zu klären, ob eine durch Nod-LCOs induzierte Änderung der zytosolischen Calcium-Konzentration schon während der Depolarisierung stattfindet, und wie diese zwei Prozesse miteinander verbunden sind, wurde in dieser Arbeit während der Messung der Calcium-Konzentration mittels FURA2-Dextran das Membranpotential parallel mit aufgezeichnet.

### 3.2.1 Messung der NOD-LCO-induzierten Änderungen der zytosolischen Calcium-Konzentration mittels FURA2-Dextran

Zur Bestimmung der zytosolischen Calcium-Konzentrationen wurde in dieser Arbeit das FURA2-Dextran mittels Strominjektion über eine Mikroelektrode in die *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen injiziert. Der Nod-LCO wurde über ein Perfusionsssystem hinzugegeben.



**Abbildung 11:** Änderungen der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen nach der Zugabe von Nod-LCOs

(a) Falschfarbenbilder eines *M. truncatula*-Wurzelhaars nach der Injektion von FURA2-Dextran und der Applikation von 100 nM Nod-LCOs. Dargestellt ist das FURA2 345/390-Anregungswellenlängen-Verhältnis einige Minuten nach der Zugabe der Nod-LCOs. Die Symbole entsprechen dem identisch gekennzeichneten Zeitpunkt in (b). Der Maßstab entspricht 10 µm.

(b) Nod-LCO-induzierte Änderungen des FURA2 F345/390-Fluoreszenz-Verhältnisses in Abhängigkeit von der Zeit für die selbe Wurzelhaarzelle, die auch in (a) dargestellt ist. Die Zugabe des Nod-LCOs ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

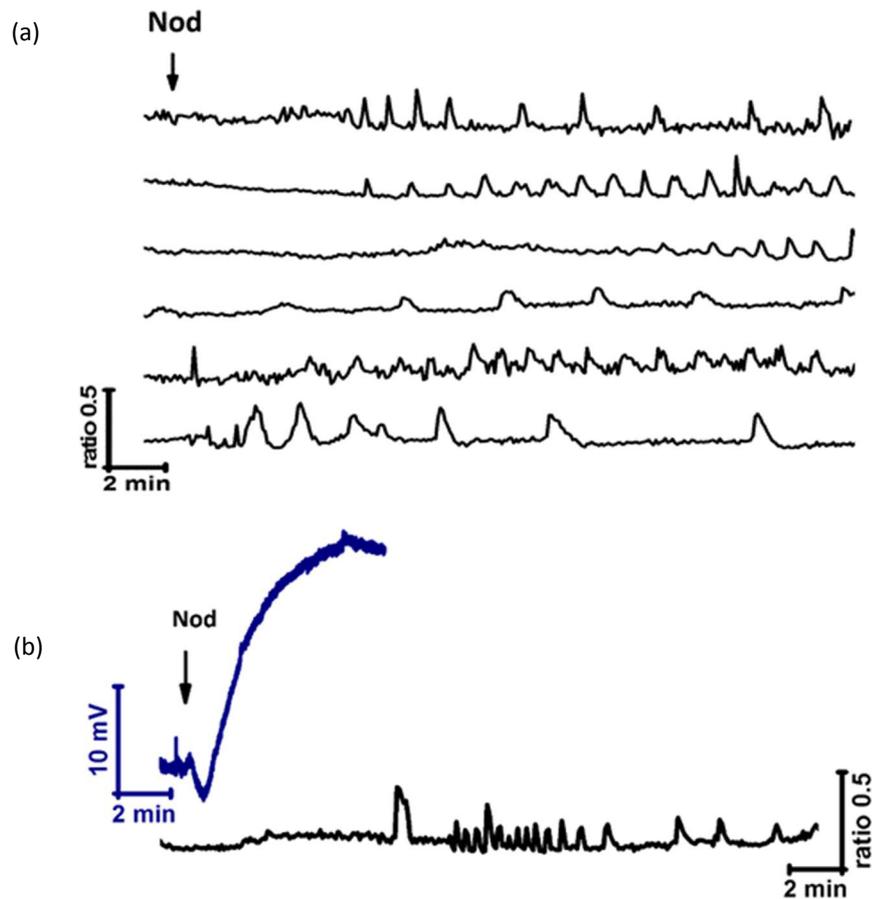
Falschfarbenbilder, die das FURA2 345/390-Anregungswellenlängen-Verhältnis darstellen, zeigen eine sich periodisch wiederholende Zunahme der zytosolischen Calcium-Konzentration nach Zugabe von Nod-LCOs. Diese Beobachtung wurde bei 16 von 23 gemessenen Zellen

bestätigt und war in einem subzellulären Kompartiment, das den Zellkern beinhaltet, am besten zu beobachten (Abbildung 11a).

Das erste der vier Bilder wurde einige Minuten nach der Nod-LCO-Zugabe aufgenommen. Nod-LCO-Zugabe und induzierte Calcium-Oszillationen sind in Abbildung 11b zu sehen, in der die Änderungen des FURA2 F345/390-Verhältnisses dargestellt sind. Die mit einem Symbol gekennzeichneten Zeitpunkte entsprechen den identisch gekennzeichneten Bildern in Abbildung 11a.

### **3.2.2 Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Nod-LCO-induzierten Calcium-Signalen und der Depolarisierung des Membranpotentials**

Wie in der Einleitung beschrieben, konnte gezeigt werden, dass verschiedene MAMPs eine Erhöhung der zytosolischen Calcium-Konzentration induzieren. Dadurch werden im Gegenzug Calcium-abhängige Kinasen (CPKs) aktiviert, die wiederum zur Aktivierung von Plasmamembran-Anionenkanälen führen. Das hat eine Depolarisierung des Membranpotentials zur Folge (Blume et al. 2000, Lecourieux et al. 2005, Ranf et al. 2008, Jeworutzki et al. 2010, Thor and Peiter 2014). Eine solche Reaktionskette könnte auch bei der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung eine Rolle spielen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit simultane Messungen des Membranpotentials und der Änderung des zytosolischen Calcium-Gehalts durchgeführt.



**Abbildung 12: Zusammenhang zwischen Änderungen der zytosolischen Calcium-Konzentration und des Membranpotentials in *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen nach der Zugabe von Nod-LCOs**

(a) Nod-LCO-induzierte Änderungen des FURA2 F345/390-Fluoreszenz-Verhältnisses in Abhängigkeit von der Zeit für sechs unabhängige Wurzelhaarzellen. (b) Simultane Aufzeichnungen des Membranpotentials (obere Spur) und des FURA2 F345/390-Verhältnisses (untere Spur) einer *M.truncatula*-Wurzelhaarzelle nach Zugabe von 100 nM Nod-LCO.

In Abbildung 12a, in der sechs unabhängige FURA2-Calcium-Messungen dargestellt sind, wird deutlich, dass die sich periodisch wiederholenden Änderungen des zytosolischen Calcium-Gehalts (*Spiking*) die erste messbare Calcium-Antwort sind. Im Mittel startet diese Reaktion der Wurzelhaarzelle mehr als 4 min nach der Zugabe der Nod-LCOs. Die Nod-LCO-induzierte maximale Depolarisierung ist im Mittel bereits nach ca. 3 min erreicht. Ein Zusammenhang zwischen der Membranpotentialsdepolarisierung und den Calcium-Oszillationen scheint demnach nicht zu bestehen.

Auch die simultanen Messungen des Membranpotentials und der Änderungen der zytosolischen Calcium-Konzentration zeigen keinen Zusammenhang zwischen Depolarisierung und Calcium-Antwort der Wurzelhaarzelle auf Nod-LCOs (Abbildung 12b). Die sich periodisch

wiederholenden Änderungen der Calcium-Konzentration beginnen erst zu einem Zeitpunkt, an dem das Membranpotential der Zelle bereits repolarisiert. Ein Calcium-Influx als Verstärkung der Depolarisierung war ebenfalls in keiner der Messungen zu beobachten. Eine Calcium-abhängige Aktivierung von Anionenkanälen als Auslöser der Depolarisierung des Membranpotentials ist somit eher unwahrscheinlich.

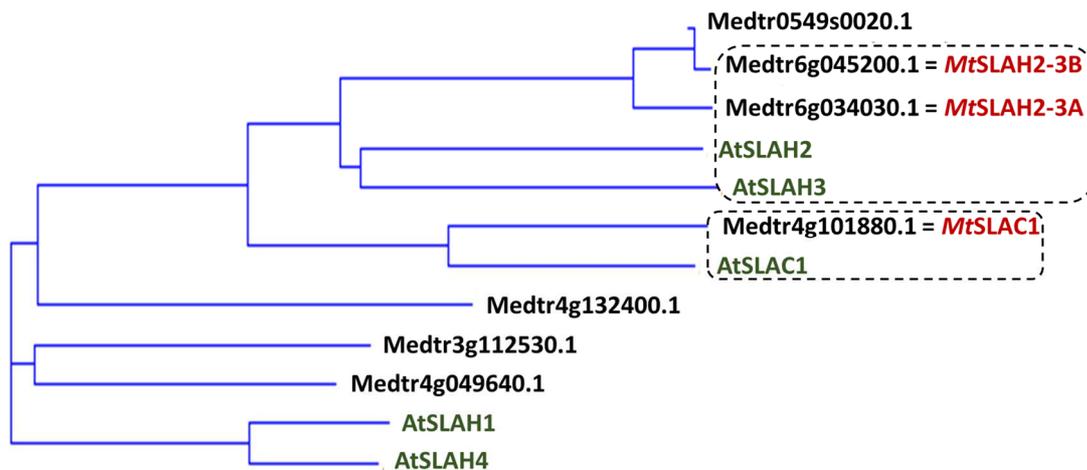
### **3.3 Funktionelle Charakterisierung *AtSLAC/SLAH*-orthologer Anionenkanäle aus *M. truncatula***

Anhand von Patch-Clamp-Studien an Pflanzenzellen wurden Anionenströme aufgrund ihrer Eigenschaften in drei Klassen eingeteilt: die S-Typ- und R-Typ- sowie die Al-sensitiven Kanäle (Schroeder and Keller 1992, Ryan et al. 1997, Kollmeier et al. 2001, Raman et al. 2005). Das erste Gen (*SLAC1*), das für einen Anionenkanal der S-Typ-Familie kodiert, wurde anhand von *Arabidopsis*-Verlustmutanten identifiziert, deren CO<sub>2</sub>- und ABA-abhängiger Stomaschluss stark beeinträchtigt ist (Negi et al. 2008, Vahisalu et al. 2008). *SLAC1* steht für *slow anion channel 1*, wird ausschließlich in Schließzellen exprimiert und besitzt in *Arabidopsis* vier Homologe (*SLAC1 HOMOLOGOUS1-4*, *SLAH1-4*), die in unterschiedlichen Pflanzengeweben lokalisiert sind (Negi et al. 2008).

In der Plasmamembran lokalisierte Anionenkanäle spielen auch bei der *Elicitor*-induzierten Depolarisierung von Pflanzenzellen eine große Rolle (Felle et al. 2000, Wendehenne et al. 2002, Jeworutzki et al. 2010, Koers et al. 2011, Roelfsema et al. 2012, Ye et al. 2013). Beispielsweise bei der *flg22*-stimulierten Depolarisierung des Membranpotentials in *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass die S-Typ-Anionenkanäle *AtSLAC1* und *AtSLAH3* essentiell sind (Guzel Deger et al. 2015). Aufgrund dieser Kenntnisse wird vermutet, dass S-Typ-Anionenkanäle auch an der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials beteiligt sind. Deshalb wurde sich in dieser Arbeit auf die Klonierung und elektrophysiologische Charakterisierung von *AtSLAC1*-Orthologen aus *M. truncatula* konzentriert.

### 3.3.1 Identifikation und Klonierung *AtSLAC/SLAH*-orthologer Anionenkanäle aus *M. truncatula*

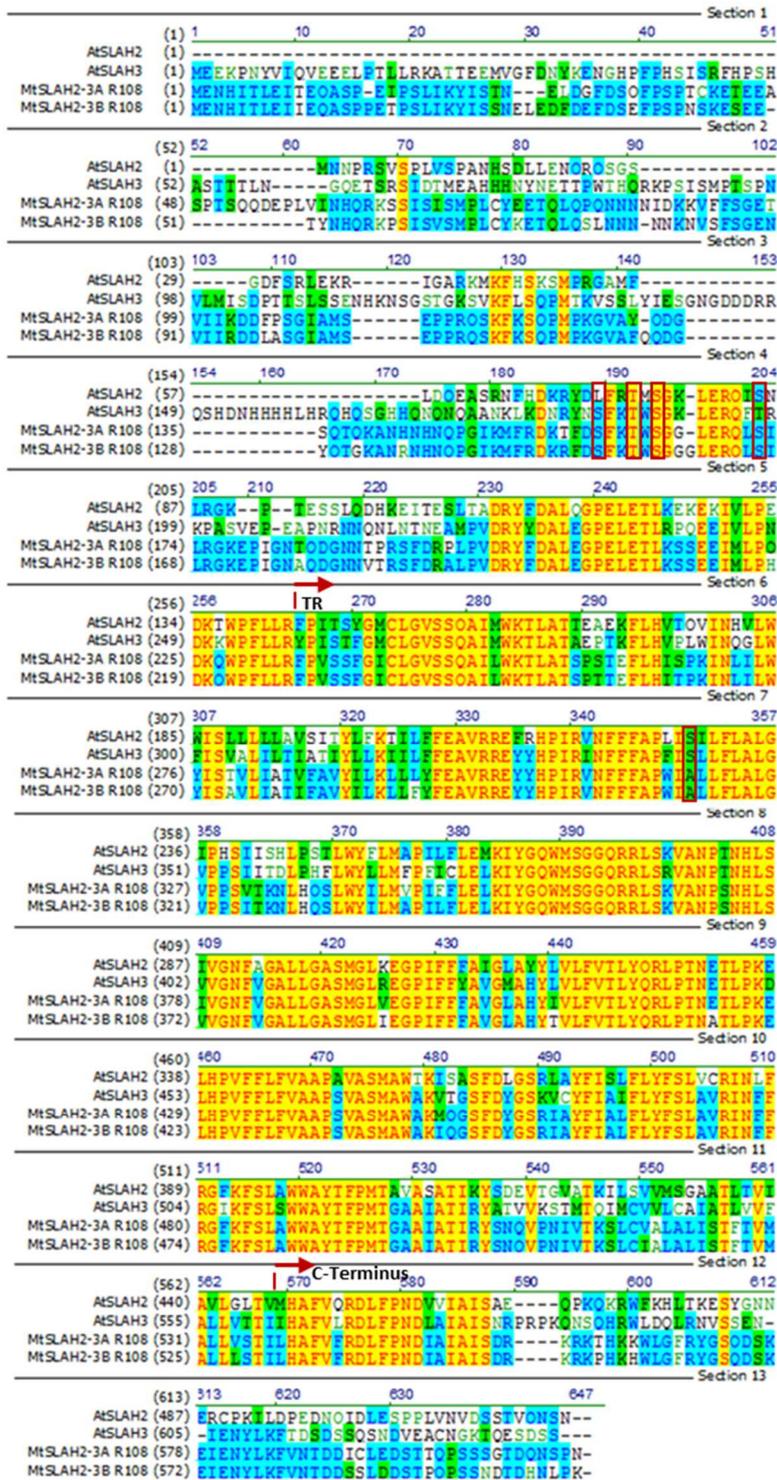
Anhand einer Analyse des *M. truncatula*-Genoms mit Hilfe der Datenbanken Phytozome, NCBI und JCVI (J. Craig Venter Institute), basierend auf dem *Medicago truncatula Genome Project v4.0*, konnten sieben Sequenzen identifiziert werden, die Homologien zu *AtSLAC1* und seinen vier Homologen *AtSLAH1-4* aufweisen. Wie im Dendrogramm in Abbildung 13 zu sehen, wurden drei dem *AtSLAH2* und dem *AtSLAH3* homologe Aminosäuresequenzen gefunden, wobei es sich bei Medtr0549s0020.1 um eine Teilsequenz von Medtr6g045200.1 handelt. Die Aminosäuresequenzen Medtr6g045200.1 und Medtr6g034030.1 wurden genutzt, um die orthologen Kanäle von *AtSLAH2* und *AtSLAH3* zu klonieren, die als *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* bezeichnet wurden. Da es bis heute nicht möglich ist, *SLAH2*- und *SLAH3*-Kanäle anhand ihrer Sequenzinformationen auseinanderzuhalten, wurde die Bezeichnung *SLAH2-3* gewählt. Bei *Arabidopsis* ist eine Unterscheidung von *AtSLAH2* und *AtSLAH3* ausschließlich auf funktioneller Ebene möglich, da *AtSLAH2* im Vergleich zu *AtSLAH3* eine hohe Nitratselektivität aufweist (Maierhofer et al. 2014b). Die Aminosäuresequenz (Medtr4g101880.1) wurde zur Klonierung des orthologen Kanals von *AtSLAC1* verwendet. Dieser Anionenkanal wurde als *MtSLAC1* bezeichnet. Drei Aminosäuresequenzen (Medtr4g132400.1, Medtr3g112530.1, Medtr4g049640.1) wiesen keine eindeutigen Homologien zu Mitgliedern der *AtSLAC1*-Genfamilie auf und wurden in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt.



**Abbildung 13: Dendrogramm von *AtSLAC1* und seinen vier Homologen aus *A. thaliana* sowie den dazu orthologen Anionenkanälen aus *M. truncatula***

Dargestellt sind die Verwandtschaftsverhältnisse von *AtSLAC1*, seinen vier Homologen *AtSLAH1-4* und den identifizierten Orthologen aus *M. truncatula* (Vector NTI, AlignX, multiples Alignment basierend auf ClustalW, Score-Matrix: blosum62mt2). Drei Aminosäuresequenzen mit hoher Homologie zu *AtSLAH2*, *AtSLAH3* bzw. *AtSLAC1* wurden kloniert und als *MtSLAH2-3A*, *MtSLAH2-3B* bzw. *MtSLAC1* bezeichnet.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von *MtSLAH2-3A*, *MtSLAH2-3B*, *AtSLAH2* und *AtSLAH3* weist hohe Homologien in der transmembranen Region der Proteine auf, während die N- und C-Termini sich stärker unterscheiden (Abbildung 14). In *Arabidopsis* wurden vier potentielle Phosphorylierungsstellen zur Aktivierung des *AtSLAH3* identifiziert (Geiger et al. 2011). Drei dieser vier potentiellen Phosphorylierungsstellen konnten auch bei *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* gefunden werden. Interessanterweise ist in der Aminosäuresequenz des *AtSLAH2* an Position 228 bei *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* anstatt des Serins ein Alanin zu finden. Ein Austausch des polaren Ser<sup>228</sup> durch die unpolare Aminosäure Valin macht den *AtSLAH2* zu einem *AtSLAC1*-ähnlichen Anionenkanal mit hoher Chlorid-Permeabilität und Nitrat-unabhängiger Aktivierung (Maierhofer et al. 2014b).



Phosphorylierungsstellen  
AtSLAH3

Ser<sup>228</sup> AtSLAH2

Abbildung 14: Vergleich der Anionenkanäle SLAH2 und SLAH3 aus *A. thaliana* und *M. truncatula*

Das Alignment der Aminosäuresequenzen von AtSLAH2, AtSLAH3, MtSLAH2-3A und MtSLAH2-3B wurde mit VectorNTI bei Standardeinstellungen (AlignX, multiples Alignment basierend auf ClustalW, Score-Matrix: blosum62mt2) erstellt. Hohe Homologien der Anionenkanäle sind im Transmembranbereich (TR) zu finden (gelb). Drei der vier bei AtSLAH3 identifizierten potentiellen Phosphorylierungsstellen im N-Terminus (rote Rechtecke) (Geiger et al. 2011) sind konserviert und treten auch bei MtSLAH2-3A und MtSLAH2-3B auf.

Neben *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* wurde der Anionenkanal *MtSLAC1* identifiziert. Ein Alignment der Aminosäuresequenzen von *MtSLAC1* und *AtSLAC1* ist in Abbildung 15 dargestellt. Drei aus *AtSLAC1* bekannte Phosphorylierungsstellen, die im N- bzw. C-Terminus lokalisiert sind, wurden in der Aminosäuresequenz von *MtSLAC1* wiedergefunden (Maierhofer et al. 2014a).

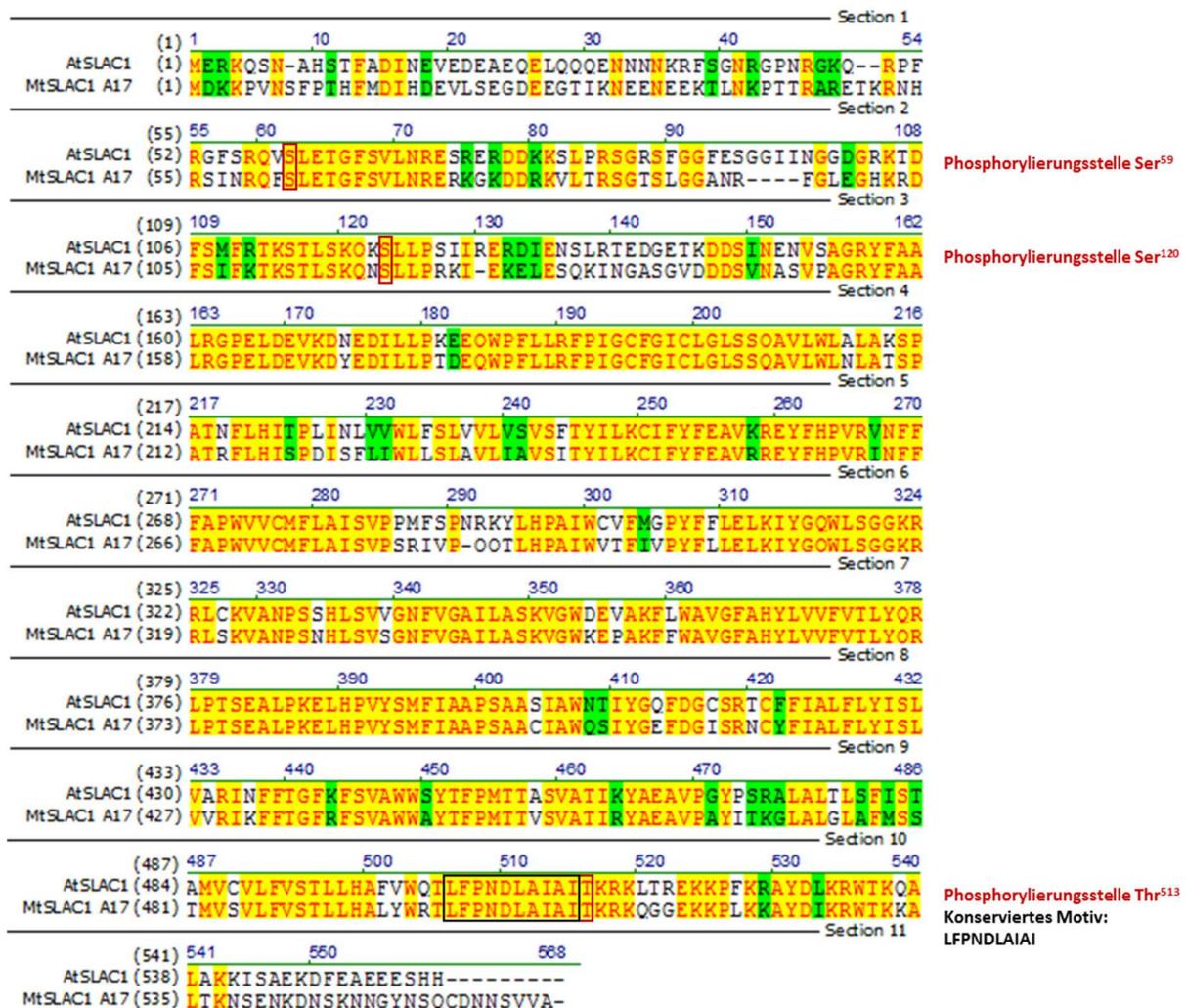


Abbildung 15: Vergleich der Anionenkanäle SLAC1 aus *A. thaliana* und *M. truncatula*.

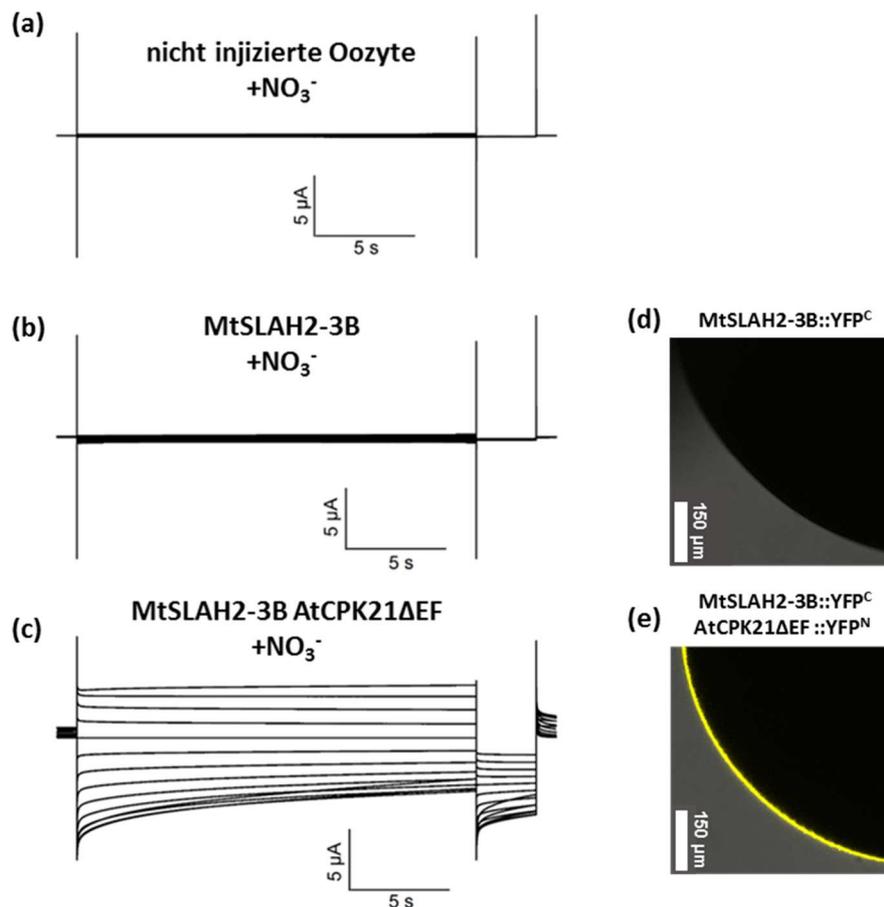
Das Alignment der Aminosäuresequenzen von *AtSLAC1* und *MtSLAC1* wurde mit VectorNTI bei Standardeinstellungen (AlignX, multiples Alignment basierend auf ClustalW, Score-Matrix: blosum62mt2) erstellt. Drei der bei *AtSLAC1* identifizierten potentiellen Phosphorylierungsstellen im N-Terminus bzw. C-Terminus (rote Rechtecke) (Maierhofer et al. 2014a) sind konserviert und treten auch bei *MtSLAC1* auf. Außerdem ist das bei höheren Pflanzen konservierte Motiv LFPNDLAIAl, das für die OST1-Sensitivität des Anionenkanals wichtig ist, im Alignment markiert (schwarzes Rechteck) (Chater and Gray 2015, Lind et al. 2015).

### 3.3.2 Expression von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* in *Xenopus*-Oozyten

Die Amplifikation der Anionenkanäle mittels PCR auf isolierter cDNA des *M. truncatula*-Genotyps R108 ergab eine Expression von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* im Blatt- und Wurzelgewebe. Für die funktionelle Charakterisierung von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* wurde das heterologe Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyten benutzt. Die cRNA der beiden *MtSLAH2-3*-Anionenkanäle wurde in Oozyten injiziert, für zwei Tage exprimiert und unter Verwendung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (DEVIC) gemessen.

#### 3.3.2.1 Aktivierung des Anionenkanals *MtSLAH2-3B*

Die alleinige Expression von *MtSLAH2-3B* in Oozyten führte zu keinen makroskopischen Strömen in Anwesenheit von Nitrat in der Messlösung (Abbildung 16b). Dies entspricht den Beobachtungen, die für die Anionenkanäle *AtSLAC1*, *AtSLAH3* und *AtSLAH2* gemacht wurden. Alle drei Anionenkanäle weisen wie *MtSLAH2-3B* bei alleiniger Expression in Oozyten keine makroskopischen Ströme auf, sondern müssen zur Aktivierung durch eine Kinase phosphoryliert werden (Geiger et al. 2009, Geiger et al. 2010, Geiger et al. 2011, Maierhofer et al. 2014b). Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass eine Koexpression der Anionenkanäle mit unterschiedlichen Kinasen, wie beispielsweise den Calcium-abhängigen Kinasen der CDPK-Familie, den CIPKs oder den Calcium-unabhängigen Kinasen der SnRK2-Familie, zu einer Aktivierung führt (Geiger et al. 2009, Geiger et al. 2010, Geiger et al. 2011, Brandt et al. 2012, Scherzer et al. 2012, Maierhofer et al. 2014b). Durch die Koexpression von *MtSLAH2-3B* und der *Arabidopsis*-Kinase *AtCPK21ΔEF*, einer konstitutiv aktiven Mutante der Calcium-abhängigen Kinase *AtCPK21*, konnte in dieser Arbeit eine Aktivierung des *M. truncatula*-Anionenkanals gezeigt werden. Sie ist anhand der makroskopischen Anionenströme deutlich zu sehen (Abbildung 16c). Die typischen, langsamen Deaktivierungskinetiken bei sehr negativen Membranpotentialen sprechen für einen S-Typ-Anionenkanal (Marten et al. 2007, Geiger et al. 2009). Als Kontrolle diente eine nicht injizierte Oozyte (Abbildung 16a). Das verwendete Standardpulsprotokoll ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 16: *MtSLAH2-3B*-vermittelte Anionenströme und BIFC-Interaktionsstudien**

(a-c) Ganzellströme einer nicht injizierten Oozyte in 30 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Messlösung (a) sowie einer den Anionenkanal *MtSLAH2-3B*-exprimierenden Oozyte (b) und einer Oozyte, die neben *MtSLAH2-3B* die Kinase *AtCPK21ΔEF* koexprimiert (c).

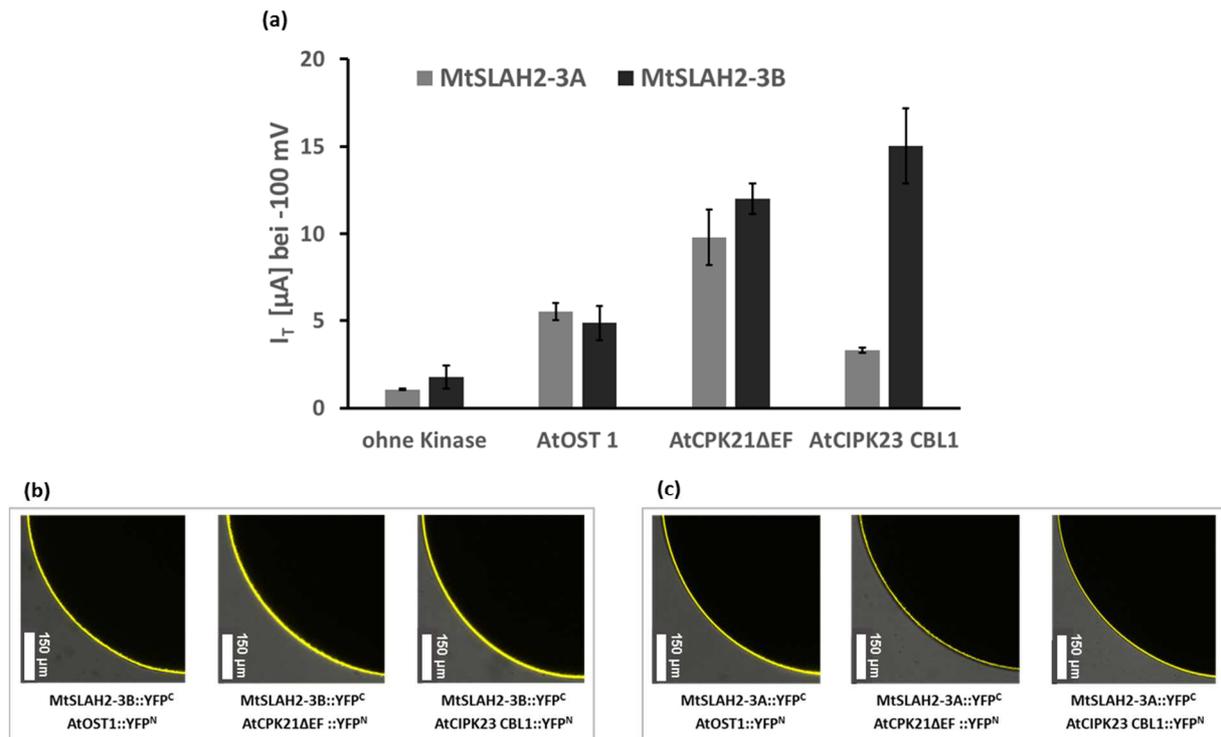
(d, e) Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BIFC) in *Xenopus*-Oozyten mit *MtSLAH2-3B*::YFP<sup>C</sup> (d) und *MtSLAH2-3B*::YFP<sup>C</sup> und *AtCPK21ΔEF*::YFP<sup>N</sup> (e) bei einem Maßstab von 150 μm. Die detektierte BiFC-Fluoreszenz in der Oozytenmembran deutet auf eine Interaktion zwischen dem *MtSLAH2-3B*-Anionenkanal und der *AtCPK21ΔEF*-Kinase hin.

Mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) gelang es, die Interaktion zwischen *MtSLAH2-3B* und *AtCPK21ΔEF* zu bestätigen (Abbildung 16e). Hierfür wurden die zwei Peptidhälften (YFP<sup>C</sup>=C-terminale Hälfte, YFP<sup>N</sup>=N-terminale Hälfte) des gespaltenen Fluorophors YFP (engl. Yellow Fluorescent Protein (YFP)) jeweils C-terminal an Anionenkanal oder Kinase fusioniert. Bei einer Interaktion von Anionenkanal und Kinase und der damit verbundenen räumlichen Annäherung der YFP-Hälften kommt es zu einer Komplementation

des Fluorophors und zu einer Rekonstitution der YFP-Fluoreszenz, die mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie (cLSM) detektiert werden kann (Abbildung 16e).

### **3.3.2.2 Kinase-abhängige Aktivierung der Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B***

Neben der konstitutiv aktiven Kinase *AtCPK21ΔEF* wurden der CBL1-CIPK23-Komplex (engl. CBL-interacting protein kinase) aus *Arabidopsis* und die SnRK-Kinase *AtOST1* hinsichtlich ihrer Aktivierung der Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* untersucht. Die im Spannungsprotokoll bei -100 mV in 100 mM Nitrat abgegriffenen instantanen Ströme ( $I_T$ ) zeigen deutlich, dass die Koexpression der Anionenkanäle mit einer Kinase zu makroskopischen Anionenströmen führt (Abbildung 17a). Ohne Kinase konnten nur geringe Ströme aufgezeichnet werden. Die größten Ströme wurden für *MtSLAH2-3A* bei Koexpression mit der Kinase *AtCPK21ΔEF* und für *MtSLAH2-3B* bei Koexpression mit der Kinase *AtCIPK23+CBL1* gemessen. Beide *M. truncatula*-Anionenkanäle wurden durch die Kinase *AtOST1* aktiviert, wenn auch nur eine geringe Stromantwort messbar war (Abbildung 17a). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zum *SLAH3* aus *Arabidopsis*, der sich durch *AtOST1* nicht aktivieren lässt (Geiger et al. 2011).



**Abbildung 17: Aktivierung von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* durch die Kinasen *AtOST1*, *AtCPK21 $\Delta$ EF* und *AtCIPK23+CBL1***

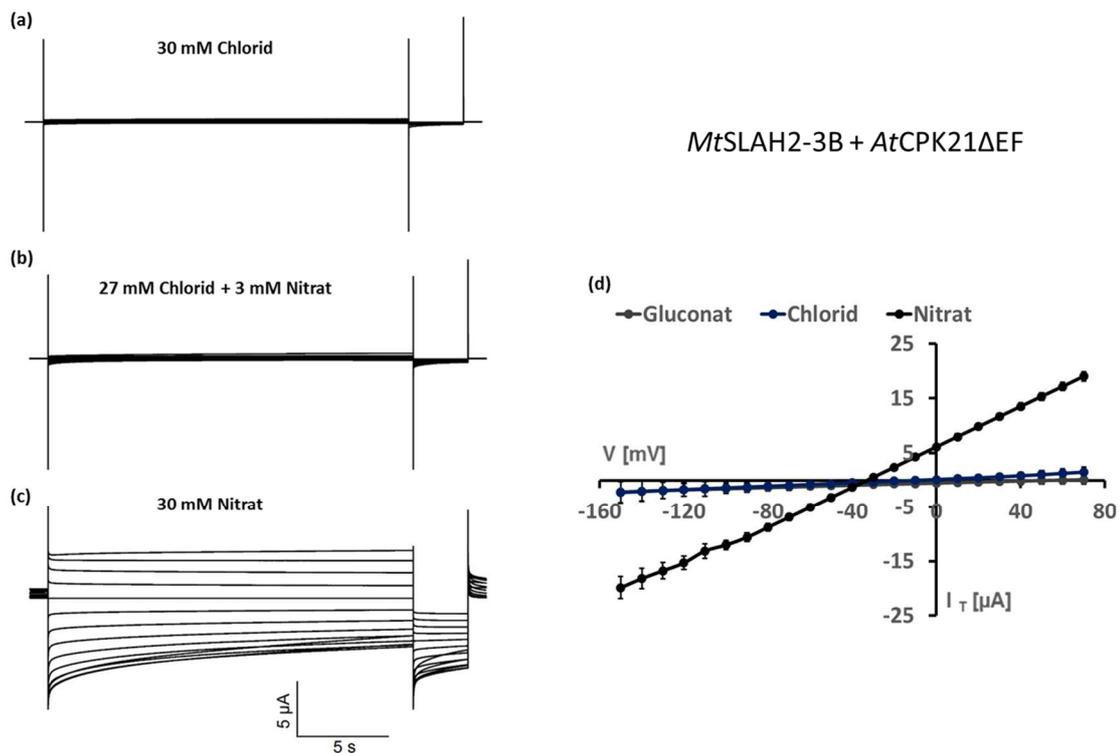
(a) Instantane Ströme der Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* in einer Nitrat-Messlösung (100 mM, pH 5,6) ohne Kinase oder koexprimiert mit *AtOST1*, *AtCPK21 $\Delta$ EF* und *AtCIPK23+CBL1* bei einer angelegten Spannung von -100 mV ( $n \geq 5$ , Mittelwert  $\pm$  SE). (b, c) BiFC-Interaktionsstudien in Oozyten. Dargestellt ist ein Viertel eines optischen Schnitts durch eine Oozyte bei einem Maßstab von 150  $\mu$ m. Die detektierte Fluoreszenz in der Oozytenmembran deutet auf eine Interaktion von *MtSLAH2-3B* (b) und *MtSLAH2-3A* (c) mit *AtOST1*, *AtCPK21 $\Delta$ EF* und *AtCIPK23* hin.

Die Interaktionen der Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* (Abbildung 17c) bzw. *MtSLAH2-3B* (Abbildung 17b) mit den aktivierenden Kinasen *AtOST1*, *AtCPK21 $\Delta$ EF* und *AtCIPK23+CBL1* wurden anhand von BiFC überprüft. Bei allen gemessenen Konstrukten kommt es zu einer Komplementation der zwei Hälften des Fluorophors YFP. Das deutet auf ein Zusammenwirken von Anionenkanal und Kinase hin.

### 3.3.2.3 Selektivität der Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B*

Eine fundamentale, elektrische Eigenschaft eines Kanals repräsentiert die Art des transportierenden Ions. Dabei kann das permeierte Ion auch gleichzeitig als Ligand zur Öffnung des Kanals dienen. Für die Anionenkanäle SLAH2 und SLAH3 aus *Arabidopsis* konnte

zum Beispiel eine starke Nitratabhängigkeit gezeigt werden. So konnten makroskopische Anionenströme nur aufgezeichnet werden, wenn Nitrat auf der extrazellulären Seite der Anionenkanäle vorhanden war. Wurde SLAH3 durch eine Kinase und extrazelluläres Nitrat aktiviert, war der Kanal leitfähig für Nitrat und Chlorid (Geiger et al. 2011). Bei SLAH2 war unter diesen Bedingungen ausschließlich eine Nitratleitfähigkeit zu erkennen (Maierhofer et al. 2014b). Im Gegensatz zu *AtSLAH2* und *AtSLAH3* öffnet *AtSLAC1* völlig unbeeinflusst von der Anwesenheit von physiologisch relevanten Anionen auf der extrazellulären Seite der Membran (Geiger et al. 2010, Geiger et al. 2009). Aufgrund der Vorarbeiten an der Modellpflanze *Arabidopsis* wurde auch für die Anionenkanäle *MtSLAH2-3* Nitrat als transportiertes Hauptanion und eine Nitrataktivierbarkeit vermutet. In Anwesenheit von 30 mM Chlorid in der Messlösung wurden bei *MtSLAH2-3B*, koexprimiert mit der aktivierenden Kinase *AtCPK21ΔEF*, keine Anionenströme gemessen (Abbildung 18a). Bei einer Zugabe von 3 mM Nitrat konnten nur sehr kleine Anionenströme aufgezeichnet werden, während bei 30 mM Nitrat makroskopische Anionenströme gemessen wurden (Abbildung 18b, c).



**Abbildung 18: Nitratabhängige Aktivierung von *MtSLAH2-3B + AtCPK21ΔEF* in *Xenopus*-Oozyten**

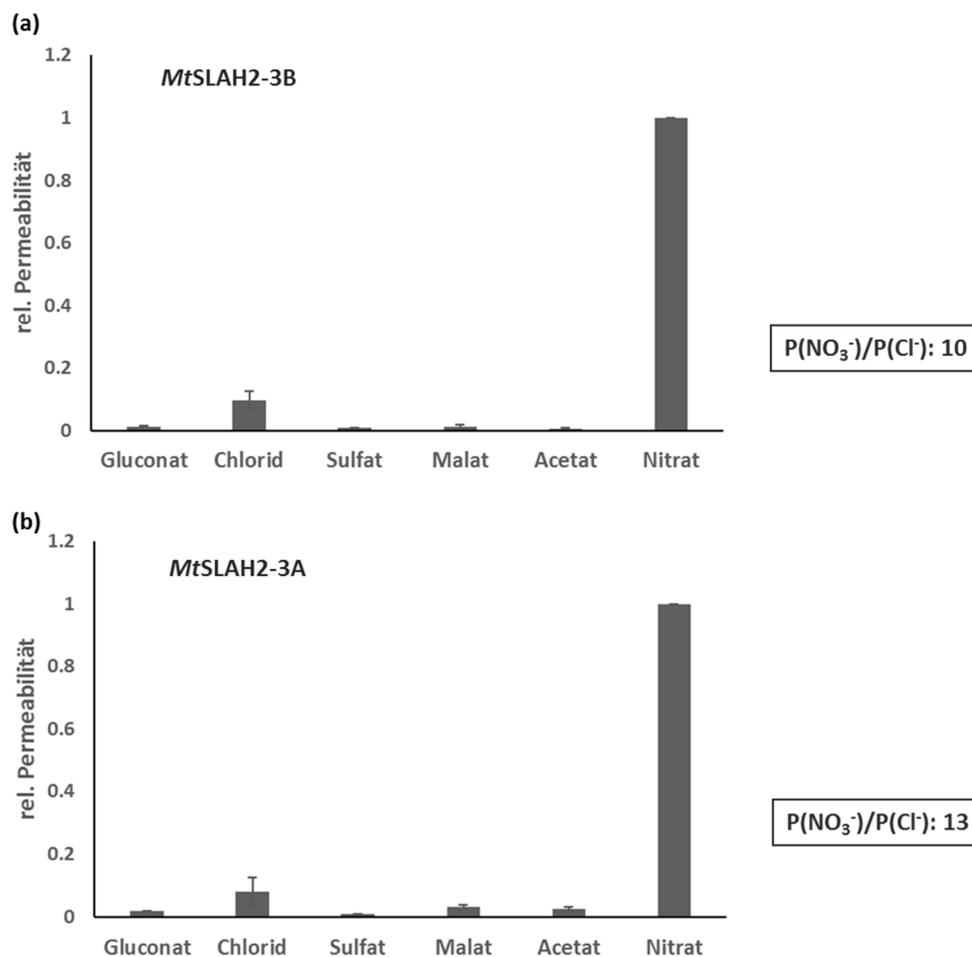
(a-c) Ganzzellströme von *MtSLAH2-3B + AtCPK21ΔEF* in 30 mM Cl<sup>-</sup> (a), 27 mM Cl<sup>-</sup>-Lösung versetzt mit 3 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (b) und 30 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (c).

(d) Strom-Spannungsdiagramm von *MtSLAH2-3B + AtCPK21ΔEF* in Gluconat, Cl<sup>-</sup>- und NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Messlösung (je 100 mM, pH 5,6) (n=7, Mittelwert ± SE).

Die Abhängigkeit des *MtSLAH2-3B* von externem Nitrat wird auch im Strom-Spannungs-Diagramm deutlich, in dem die gemessenen instantanen Ströme durch den Anionenkanal *MtSLAH2B (+AtCPK21ΔEF)* bei den unterschiedlichen vorgegebenen Spannungen in Gluconat, Chlorid und Nitrat (je 100 mM) dargestellt sind (Abbildung 18d). Das Anion, das die größte Stromantwort des *MtSLAH2-3B* erzeugt, ist Nitrat.

Die relative Permeabilität (Permeabilität von Nitrat = 1) verschiedener Anionen von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* wurde in einem weiteren Experiment bestimmt. Hierfür wurden die Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* jeweils mit *AtCPK21ΔEF* in Oozyten koexprimiert und ihr Membranpotential wurde in der Anwesenheit unterschiedlicher Anionen bestimmt. Da bereits ein starker Einfluss von Nitrat auf die Kanalaktivität gezeigt werden konnte, wurde eine 50 mM Nitratlösung zur Voraktivierung der Anionenkanäle benutzt. Anschließend wurde auf die jeweilige Anionenlösung gewechselt. Es wurden die

Umkehrspannungen für die Anionen Gluconat, Chlorid, Sulfat, Malat, Acetat und Nitrat aufgenommen. Aus den Werten der Umkehrspannungen wurden die relativen Permeabilitäten der beiden Kanäle für die jeweiligen Anionen errechnet, die relativ zu Nitrat in Abbildung 19 dargestellt sind.



**Abbildung 19: Bestimmung der Anionenselektivität von *MtSLAH2-3B* und *MtSLAH2-3A* in *Xenopus*-Oozyten**

Dargestellt ist die relative Permeabilität der Anionenkanäle *MtSLAH2-B* (a) und *MtSLAH2-A* (b). Die Kinase *AtCPK21ΔEF* wurde zur Aktivierung beider Anionenkanäle koexprimiert. Die Messungen wurden in Lösungen, die mit 50 mM des jeweiligen Anions versetzt waren, bei pH 7,5 durchgeführt. Es erfolgte eine Voraktivierung mit  $\text{NO}_3^-$ . In jeder Messlösung wurde das Umkehrpotential bestimmt, aus dem die Permeabilität des jeweiligen Anions relativ zu  $\text{NO}_3^-$  errechnet wurde. Die Permeabilität für  $\text{NO}_3^-$  wurde auf 1 gesetzt ( $n=5$ , Mittelwert  $\pm$  SD).

Für *MtSLAH2-3B* ergab sich folgende Reihenfolge an relativen Permeabilitäten:

Nitrat<sup>-</sup> 1 >> Chlorid<sup>-</sup> 0,1 ± 0,03 >> Gluconat<sup>-</sup> 0,01 ± 0,00, Malat<sup>-</sup> 0,01 ± 0,01, Sulfat<sup>-</sup> 0,01 ± 0,00, Acetat<sup>-</sup> 0,01 ± 0,00. Somit erweist sich *MtSLAH2-3B* als ein vorzugsweise Nitrat-permeabler Kanal mit einer 10-fach höheren Permeabilität für Nitrat im Vergleich zu Chlorid.

*MtSLAH2-3A* zeigt eine 13-fach höhere Permeabilität für Nitrat als Chlorid und auch die Reihenfolge der relativen Permeabilitäten ähnelt der für *MtSLAH2-3B* errechneten:

Nitrat<sup>-</sup> 1 >> Chlorid<sup>-</sup> 0,08 ± 0,05 > Malat<sup>-</sup> 0,03 ± 0,01, Acetat<sup>-</sup> 0,03 ± 0,00 > Gluconat<sup>-</sup> 0,02 ± 0,00 > Sulfat<sup>-</sup> 0,01 ± 0,00.

Diese Werte lassen sich vergleichen mit Angaben zur relativen Permeabilität von *AtSLAC1* mit einem Verhältnis  $P(\text{NO}_3^-)/P(\text{Cl}^-)$  von 10 (Geiger et al. 2009), von *AtSLAH3* mit einem Verhältnis  $P(\text{NO}_3^-)/P(\text{Cl}^-)$  von 20 (Geiger et al. 2011) und von dem Nitrat-selektiven Anionenkanal *AtSLAH2* mit einem Verhältnis  $P(\text{NO}_3^-)/P(\text{Cl}^-)$  von 82 (Maierhofer et al. 2014b). Dieser Vergleich zeigt, dass *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* hinsichtlich ihrer relativen Permeabilität eher *AtSLAC1* ähneln als *AtSLAH2* und *AtSLAH3*. Die Reihung der Permeabilitäten ist typisch für SLAC/SLAH-Anionenkanäle.

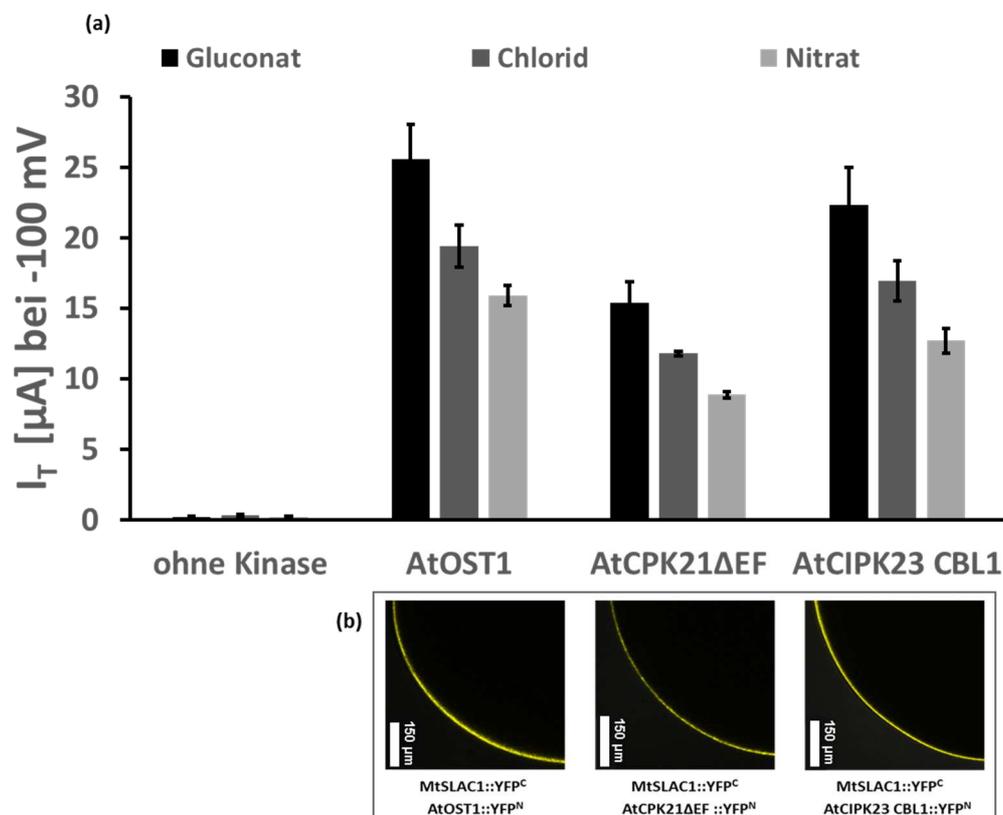
### 3.3.3 Expression von *MtSLAC1* in *Xenopus*-Oozyten

Der Anionenkanal *MtSLAC1* konnte mittels PCR auf isolierter cDNA des *M. truncatula*-Genotyps A17 ausschließlich im Blattgewebe detektiert werden. Dies entspricht den Ergebnissen von SLAC1-Expressionsstudien in *Arabidopsis*, die eine spezifische Expression von *AtSLAC1* in Schließzellen darlegen (Negi et al. 2008, Vahisalu et al. 2008). Die funktionelle Charakterisierung von *MtSLAC1* erfolgte im heterologen Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyten. Die cRNA des *MtSLAC1*-Anionenkanals wurde in Oozyten injiziert, für zwei Tage exprimiert und unter Verwendung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmen-Technik (DEVC) gemessen.

#### 3.3.3.1 Kinase-abhängige Aktivierung von *MtSLAC1*

Für *AtSLAC1* konnten bei alleiniger Expression in Oozyten über das gesamte Spannungsprotokoll der DEVC-Messungen keine makroskopischen Anionenströme aufgezeichnet werden (Negi et al. 2008, Vahisalu et al. 2008, Geiger et al. 2010). Auch für *MtSLAC1*-injizierte Oozyten ergab die alleinige Expression keine Aktivierung des

Anionenkanals und somit keine messbaren Anionenströme in Gluconat-, Chlorid- oder Nitrat-basierten Medien (Abbildung 20a). Da aus *Arabidopsis* bekannt ist, dass der Kanal *AtSLAC1* eine phosphorylierungsabhängige Aktivierung aufweist, wurden für den *MtSLAC1* die drei bekannten Kinasen *AtOST1*, *AtCPK21ΔEF* und *AtCIPK23+CBL1* getestet. Eine Koexpression des Anionenkanals *MtSLAC1* mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängigen Kinase *AtOST1* oder den Calcium-abhängigen Kinasen *AtCPK21ΔEF* und *AtCIPK23+CBL1* führte zu makroskopischen, instantanen Anionenströmen in allen drei Messlösungen (Abbildung 20a).



**Abbildung 20: Aktivierung von *MtSLAC1* durch die Kinasen *AtOST1*, *AtCPK21ΔEF* und *AtCIPK23 CBL1***

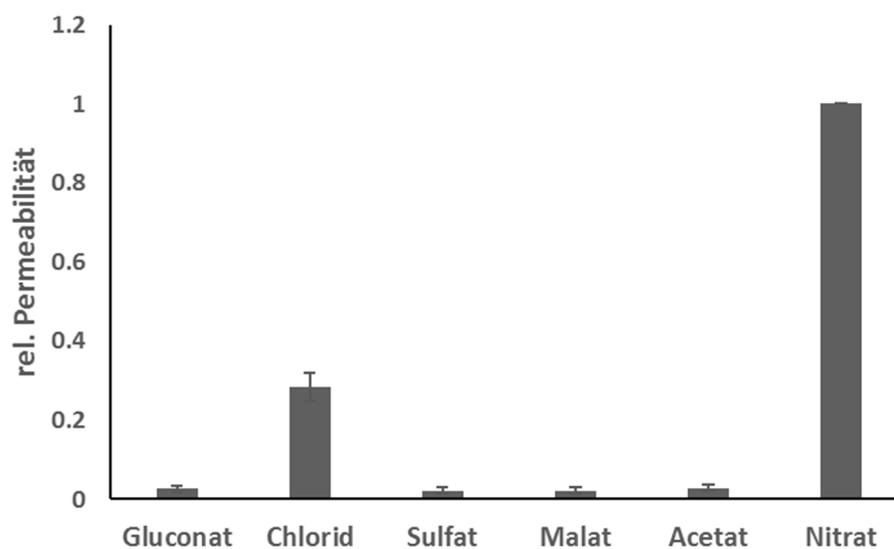
(a) Instantane Ströme des Anionenkanals *MtSLAC1* ohne Kinase oder koexprimiert mit *AtOST1*, *AtCPK21ΔEF* und *AtCIPK23* bei einer angelegten Spannung von  $-100 \text{ mV}$  in Gluconat-,  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{NO}_3^-$ -Messlösung in der Reihenfolge, in der gemessen wurde ( $n=5$ , Mittelwert  $\pm$  SE). (b) BiFC-Interaktionsstudien in Oozyten. Dargestellt ist ein Viertel eines optischen Schnittes durch eine Oozyte bei einem Maßstab von  $150 \mu\text{m}$ . Die detektierte Fluoreszenz in der Oozytenmembran deutet auf eine Interaktion von *MtSLAC1* mit *AtOST1*, *AtCPK21ΔEF* und *AtCIPK23* hin.

In BiFC-Studien wurde die Interaktion zwischen *MtSLAC1* und den aktivierenden Kinasen untersucht. Diese Analyse ergab ein YFP-Fluoreszenzsignal in der Oozyten-Plasmamembran

durch die Interaktion von *MtSLAC1* mit den Kinasen *AtOST1*, *AtCPK21ΔEF* und *AtCIPK23* CBL1 (Abbildung 20b).

### 3.3.3.2 Anionen-Selektivität von *MtSLAC1*

Für die Untersuchung der relativen Anionenpermeabilität wurde wie schon bei *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* in verschiedenen externen Anionenlösungen das Umkehrpotential ( $U_{rev}$ ) im Stromklemmenmodus des Messverstärkers aufgezeichnet. Das Umkehrpotential gibt die Spannung wieder, bei der kein Netto-Strom über die Oozytenmembran fließt. Durch die geschickte Wahl der Lösungsbedingungen kann die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung soweit vereinfacht werden, dass aus den Umkehrpotentialen die relative Permeabilität von *MtSLAC1* für unterschiedliche Anionen relativ zu Nitrat bestimmt werden konnte (Abbildung 21). Zur Aktivierung wurde *MtSLAC1* mit der Kinase *AtOST1* koexprimiert.



**Abbildung 21: Relative Permeabilität von *MtSLAC1***

Bestimmung der Anionenselektivität von *MtSLAC1* nach Aktivierung mit *AtOST1* in *Xenopus*-Oozyten. Die Messungen wurden in Lösungen, die mit 50 mM des jeweiligen Anions versetzt waren, bei pH 7,5 durchgeführt. Es erfolgte eine Voraktivierung mit  $\text{NO}_3^-$ . In jeder Messlösung wurde das Umkehrpotential bestimmt, aus dem die Permeabilität des jeweiligen Anions relativ zu  $\text{NO}_3^-$  errechnet wurde. Die Permeabilität für  $\text{NO}_3^-$  wurde auf 1 gesetzt ( $n=5$ , Mittelwert  $\pm$  SD).

Für *MtSLAC1* ergab sich folgende Reihenfolge an relativen Permeabilitäten:

Nitrat<sup>-</sup> 1 >> Chlorid<sup>-</sup>  $0,3 \pm 0,04$  >> Gluconat<sup>-</sup>  $0,03 \pm 0,01$ , Acetat<sup>-</sup>  $0,03 \pm 0,01$  > Sulfat<sup>-</sup>  $0,02 \pm 0,01$ , Malat<sup>-</sup>  $0,02 \pm 0,01$ . Das relative Permeabilitäts-Verhältnis  $P(\text{NO}_3^-)/P(\text{Cl}^-)$  des *MtSLAC1* beträgt 4 und ist damit deutlich niedriger als bei *MtSLAH2-3A* ( $P(\text{NO}_3^-)/P(\text{Cl}^-)=13$ ) und *MtSLAH2-3B* ( $P(\text{NO}_3^-)/P(\text{Cl}^-)=10$ ).

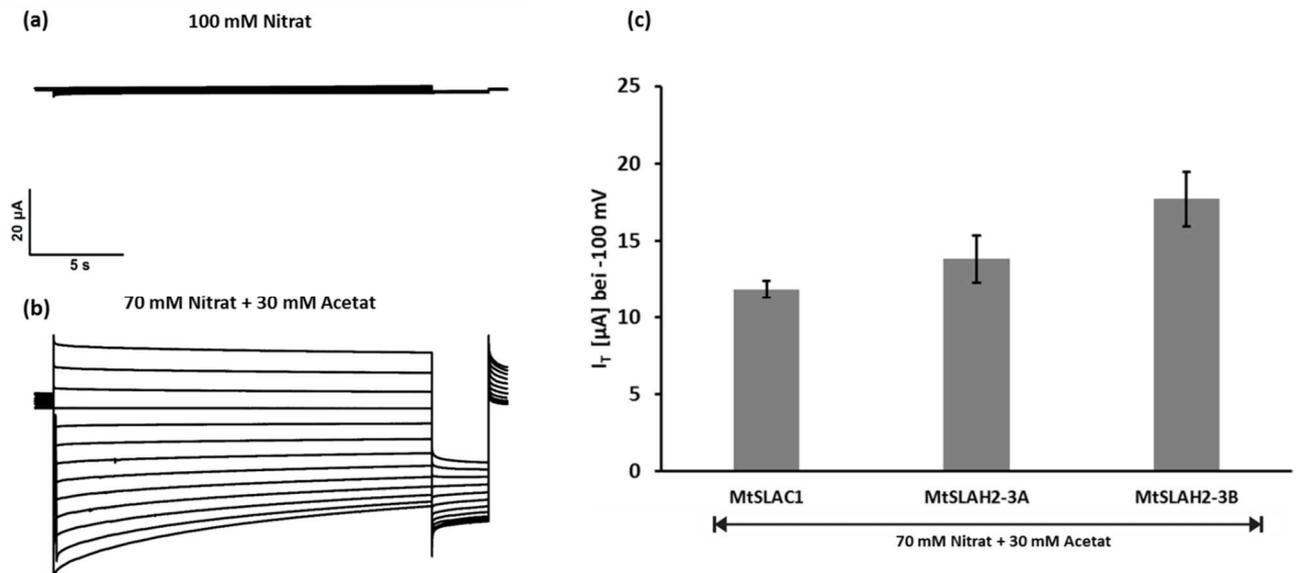
Verglichen mit dem *SLAC1* aus *Arabidopsis* ( $P(\text{NO}_3^-)/P(\text{Cl}^-)=10$ ) (Geiger et al. 2009) weist der *MtSLAC1* eine höhere relative Chlorid-Permeabilität auf.

### 3.3.4 Zytoplasmatische Azidifikation

Bei der zytoplasmatischen Azidifikation durchfließt protoniertes Acetat aus der externen Messlösung die Plasmamembran, dissoziiert in der Zelle und säuert somit das Zytosol der Oozyte an (Roos and Boron 1981, Tsai et al. 1995). Durch die Dissoziation des Protons kann das Acetat die Plasmamembran der Oozyte nicht mehr durchdringen.

Für *AtSLAH3* konnte bei Zugabe von Acetat in die externe Messlösung eine Aktivierung des Kanals ohne aktivierende Kinase beobachtet werden, während die zytoplasmatische Azidifikation bei *AtSLAH2* keinen und bei *AtSLAC1* nur einen geringen Einfluss auf die Aktivierung hatte (unveröffentlichte Daten, persönliche Kommunikation, Tobias Maierhofer).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss interner Änderungen des pH-Wertes für die Anionenkanäle *MtSLAC1*, *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* aus *M. truncatula* untersucht (Abbildung 22, Abbildung 23).



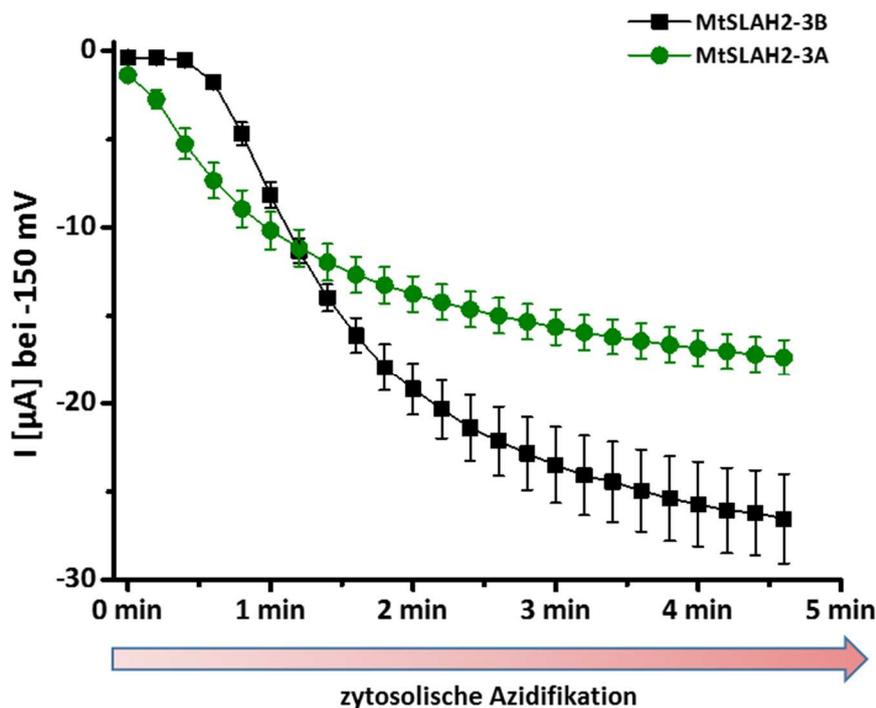
**Abbildung 22: Kanalaktivierung nach zytosolischer Azidifikation**

(a-b) Ganzzellströme von *MtSLAH2-3B* wurden in Nitrat-Messlösung (100 mM  $NO_3^-$ ) ohne Acetat (a) und mit Acetat (70 mM  $NO_3^-$  + 30 mM Acetat) (b) unter Verwendung des Standardpulsprotokolls aufgezeichnet. Für die Abbildungen wurde eine repräsentative Oozyte ausgewählt.

(c) Instantane Ströme der Anionenkanäle *MtSLAC1*, *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* (ohne Kinasen) bei einer angelegten Spannung von -100 mV in einer mit Acetat versetzten Messlösung (70 mM  $NO_3^-$  + 30 mM Acetat) ( $n=5$ , Mittelwert  $\pm$  SE).

Anhand der Ganzzellströme des Anionenkanals *MtSLAH2-3B* ist die durch eine zytosolische Ansäuerung bedingte Aktivierung des Anionenkanals ohne Koexpression einer aktivierenden Kinase deutlich zu sehen (Abbildung 22b). Makroskopische Anionenströme, die in 100 mM Nitrat nicht messbar sind (Abbildung 22a), treten bei Zugabe von 30 mM Acetat in die externe Messlösung auf (Abbildung 22b). Auch die instantanen, bei -100 mV aufgezeichneten Ströme zeigen sowohl für *MtSLAH2-3B* als auch für *MtSLAH2-3A* und *MtSLAC1* in Anwesenheit von Acetat eine Kinase-unabhängige Aktivierung (Abbildung 22c).

Der zeitliche Verlauf der Aktivierung der Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B*, ausgelöst durch die zytosolische Azidifikation, ist in Abbildung 23 dargestellt.



**Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der pH-induzierten Kanalaktivierung**

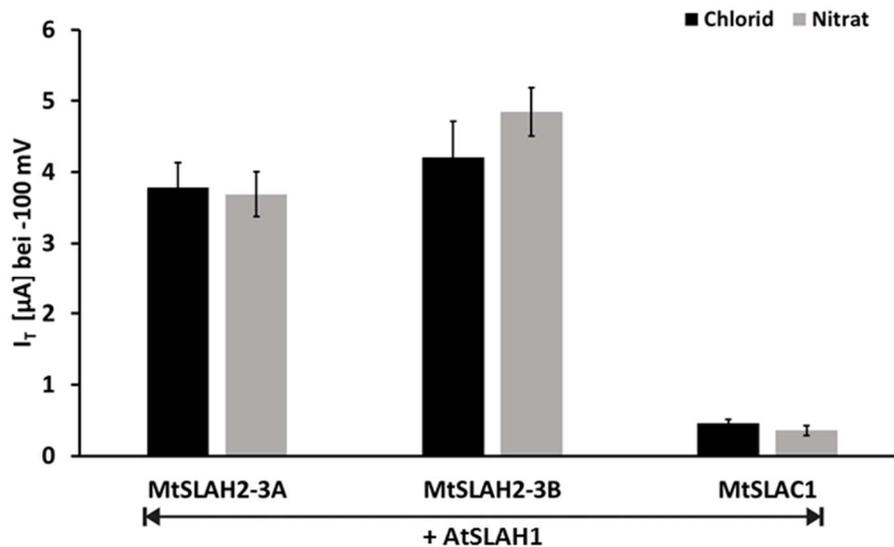
Dargestellt sind die instantanen Ströme der Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* bei einer angelegten Spannung von -150 mV in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf der Messung. Der zeitliche Verlauf steht für die zunehmende Ansäuerung des Zytosols der Oozyte aufgrund der Dissoziation des protonierten Acetats. Die Messlösung bestand aus 70 mM  $\text{NO}_3^-$  und 30 mM Acetat ( $n=5$ , Mittelwert  $\pm$  SE).

*MtSLAH2-3A* reagiert schneller auf die interne pH-Änderung als *MtSLAH2-3B*. Der Ausstrom von Nitrat ist allerdings bei *MtSLAH2-3B* im Vergleich zu *MtSLAH2-3A* sehr viel stärker ausgeprägt (Abbildung 23).

### 3.3.5 Aktivierung durch *AtSLAH1*

Cubero-Font et al. konnten 2016 eine Anionenkanal-Untereinheit der SLAC1-Familie aus *Arabidopsis* elektrophysiologisch charakterisieren und funktionell in die Physiologie der Pflanze einordnen. Wie in der Einleitung beschrieben, zeigten Koexpressionsversuche in Oozyten, dass die elektrisch inaktive Untereinheit *AtSLAH1* mit dem Anionenkanal *AtSLAH3* heteromerisiert. Im Zuge dieser Heteromerisierung verändert *AtSLAH1* die elektrischen Eigenschaften von *AtSLAH3* deutlich. So ist der *AtSLAH3* bei Koexpression mit *AtSLAH1* in Abwesenheit von Nitrat und Calcium-abhängigen Kinasen aktiv und weist eine stark erhöhte Chlorid-Permeabilität auf (Cubero-Font et al. 2016).

In dieser Arbeit wurde die Koexpression von *AtSLAH1* mit den Anionenkanälen *MtSLAH2-3A*, *MtSLAH2-3B* und *MtSLAC1* untersucht (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Kanalaktivierung durch Koexpression mit *AtSLAH1***

Instantane Ströme der Anionenkanäle *MtSLAH2-3A*, *MtSLAH2-3B* und *MtSLAC1* bei einer angelegten Spannung von -100 mV in  $\text{Cl}^-$ - oder  $\text{NO}_3^-$ -Messlösung (100 mM  $\text{Cl}^-$ , 100 mM  $\text{NO}_3^-$ ) ( $n \geq 4$ , Mittelwert  $\pm$  SE).

Die instantanen Ströme bei -100 mV zeigen eine Aktivierung von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* bei Koexpression mit *AtSLAH1* (Abbildung 24). Es werden wie bei *AtSLAH3* keine Kinase und auch kein Nitrat benötigt, um die zwei *Medicago*-Anionenkanäle zu aktivieren. Die Untersuchung der Anionen-Selektivität ergab für *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* bei Koexpression mit *AtCPK21ΔEF* eine nur geringe Permeabilität für Chlorid (Abbildung 19). Diese Eigenschaft ändert sich bei Koexpression der Anionenkanäle mit *AtSLAH1*, da dann der Chlorid- und Nitrat- Ausstrom von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* keinen Unterschied aufweist (Abbildung 24). *AtSLAH1* hat hingegen keinen Einfluss auf die Aktivität von *MtSLAC1*. Dies verdeutlicht die Spezifität der SLAH1/SLAH3-Interaktion. Da der SLAH1 aus *Arabidopsis* mit dem SLAH3 aus *Medicago* heteromerisiert, scheint diese spezifische Interaktion über Artgrenzen hinaus konserviert zu sein.

### 3.4 Analyse von Tnt1-Transposoninsertionsmutanten für die Gene *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B*

#### 3.4.1 Anzucht, Selektion und Genotypisierung von Tnt1-Transposoninsertionsmutanten

Um zu untersuchen, ob die elektrophysiologisch charakterisierten Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* an der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials beteiligt sind, wurden für die zwei Kandidatengene *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* Tnt1-Transposoninsertionslinien des *M. truncatula*-Genotyps R108 bei der *Noble Foundation* (Samuel Robert Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma, USA) identifiziert (Tadege et al. 2008). *MtSLAC1* wurde nicht als Kandidatengen betrachtet, da es mittels PCR nicht in *M. truncatula*-Wurzelgewebe amplifiziert werden konnte und somit sehr wahrscheinlich keine essentielle Rolle bei der Antwort der Wurzelhaarzellen auf Nod-LCOs spielt.

R1-Samen von drei Tnt1-Transposoninsertionslinien NF14366 für das Kandidatengen *MtSLAH2-3A* sowie NF10039 und NF11647 für *MtSLAH2-3B* wurden bestellt, wobei der *M. truncatula*-Genotyp R108 den genetischen Hintergrund bildete.

R0-Saatgut bezeichnet die Samen, die aus einer mittels Gewebekultur regenerierten Pflanze (R0-Pflanze) nach Selbstbestäubung hervorgehen. In R0-Pflanzen liegt die Transposoninsertion im Kandidatengen heterozygot vor. Aus dem R0-Saatgut entwickeln sich R1-Pflanzen, in denen die Transposoninsertion im Kandidatengen heterozygot, homozygot oder gar nicht vorliegt. Aus den R1-Pflanzen ergibt sich das R1-Saatgut, das von der Noble Foundation zur Verfügung gestellt wurde.

Aus dem R1-Saatgut wurden in dieser Arbeit R2-Pflanzen angezogen, die mittels PCR genotypisiert wurden. Um einen vollständigen *Knockout* des Kandidatengens zu erzielen, muss die Transposoninsertion homozygot und außerdem idealerweise in einem Exon vorliegen.

Bei den Linien NF10039 und NF11647 ist die Tnt1-Transposoninsertion in den Promotorbereich des Gens *MtSLAH2-B* gesprungen. Bei diesen Linien kann nicht zwangsläufig von einem vollständigen *Knockout* ausgegangen werden. Auch eine erhöhte oder erniedrigte *MtSLAH2-3B*-Genexpression ist möglich (Tabelle 19). Für das Gen *MtSLAH2-3A* wurden zwei Tnt1-Transposoninsertionslinien identifiziert, wobei nur von der Linie NF14366 Saatgut

vorhanden war. Bei dieser Linie war laut Datenbank die Tnt1-Transposoninsertion in einem Exon des Kandidatengens lokalisiert (Tabelle 19).

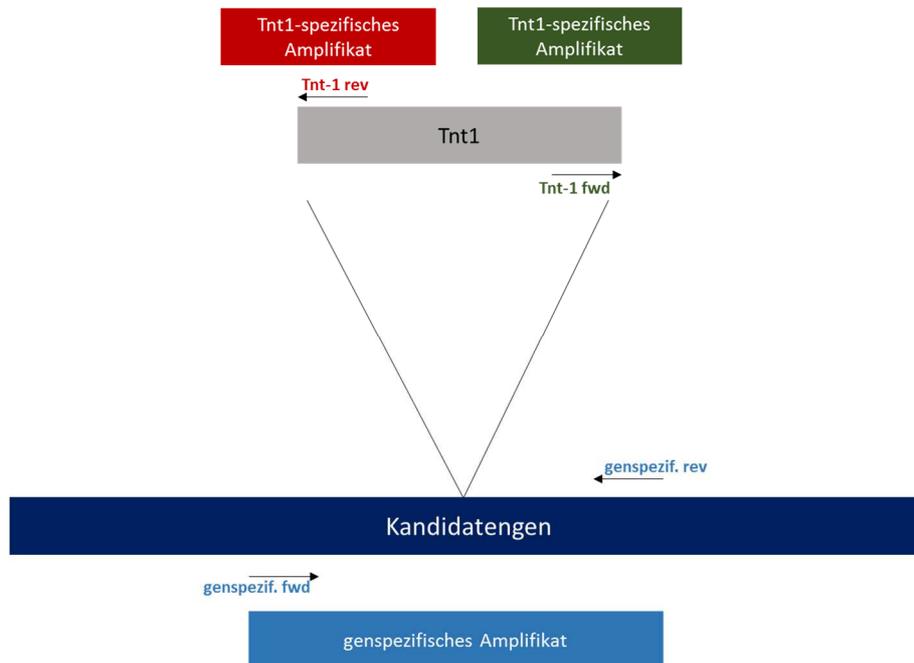
**Tabelle 19: Auflistung der von der *Noble Foundation* für die Gene *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* identifizierten Tnt1-Transposoninsertionslinien**

Dargestellt sind die Gennummern, die Namen der Tnt1-Transposoninsertionslinien und die Lokalisation der Tnt1-Transposoninsertionen im Gen *upstream* vom ATG-Startcodon.

Gen	Tnt1-Linie	Tnt1-Insertionsstelle
MTR6g045200	NF10039	385 bp Promotor
<b><i>MtSLAH2-3B</i></b>	NF11647	887 bp Promotor
MTR6g034030	NF14366	4865 bp Exon
<b><i>MtSLAH2-3A</i></b>	NF11930 kein Saatgut	3187 bp

Abbildung 25 zeigt das Prinzip der Genotypisierung der Tnt1-Transposoninsertionslinien. Für die Gene *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* wurden *upstream* und *downstream* der Tnt1-Transposoninsertionsstelle genspezifische Primer (genspezif. fwd, genspezif. rev) designt, die gemeinsam mit den von der *Noble Foundation* vorgegebenen Tnt1-spezifischen Primern verwendet wurden.

Die Primer wurden in den folgenden Kombinationen eingesetzt: Tnt-1 rev :: genspezif. fwd, Tnt1 fwd :: genspezif. rev zur Amplifikation der Tnt1-spezifischen Amplifikate und genspezif. fwd :: genspezif. rev zum Nachweis des genspezifischen Amplifikats. Anhand der unterschiedlichen Größe der jeweiligen Amplifikate kann nachgewiesen werden, ob die Tnt1-Insertion homozygot (nur Tnt1-spezifisches Amplifikat), heterozygot (Tnt1-spezifisches und genspezifisches Amplifikat) oder gar nicht (nur genspezifisches Amplifikat) vorliegt.



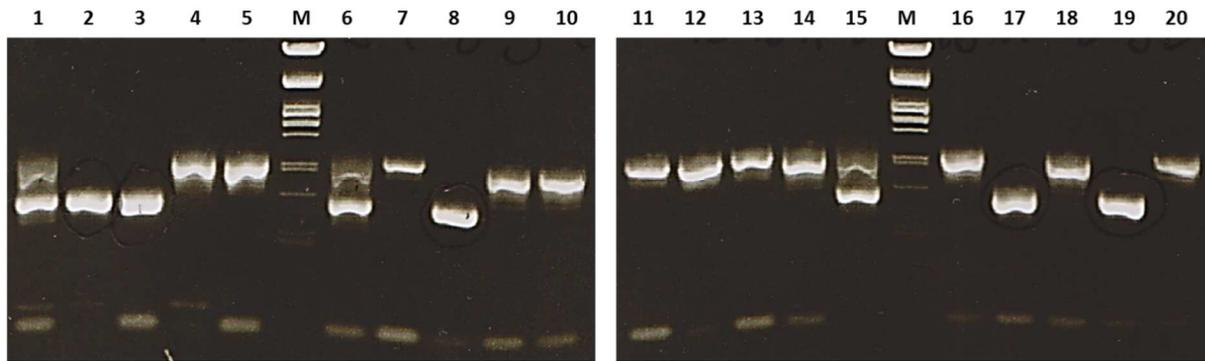
**Abbildung 25: Schematische Darstellung des Prinzips der Genotypisierung der Tnt1-Transposoninsertionslinien mittels PCR**

In PCRs werden das genspezifische Primerpaar und ein genspezifischer mit einem amplifikatsspezifischen Primer eingesetzt. Anhand der unterschiedlichen Größe der Amplifikate kann bestimmt werden, ob die Tnt1-Transposoninsertion in der Pflanze homozygot, heterozygot oder gar nicht vorliegt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Genotypisierung für die Tnt1-Transposoninsertionslinien NF10039, NF11647 und NF14366 erläutert.

### NF10039

In Abbildung 26 sind die PCR-Ergebnisse der Genotypisierung von 20 R2-Pflanzen der Tnt1-Transposoninsertionslinie NF10039 dargestellt. Es wurden drei Primer in einem PCR-Ansatz eingesetzt. Neben den genspezifischen Primern 3B LB fwd und 3B RB rev wurde der Tnt1-spezifische Primer Tnt-1 fwd verwendet.



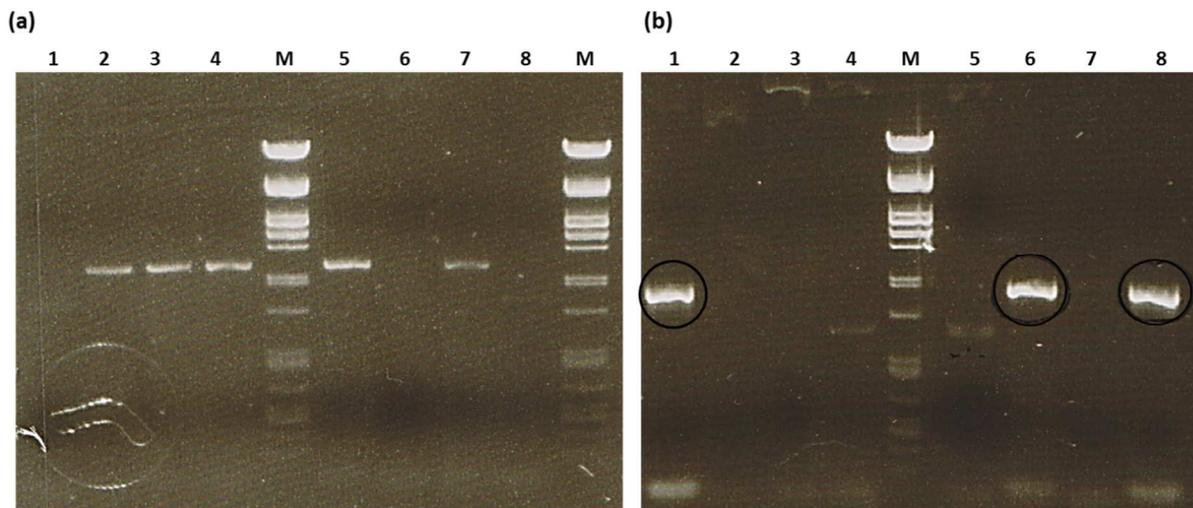
**Abbildung 26: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCRs zur Genotypisierung der Tnt1-Transposoninsertionslinie NF10039**

Zur Genotypisierung der Linie NF10039 wurden drei Primer in einem PCR-Ansatz verwendet. Es wurden die genspezifischen Primer 3B LB fwd und 3B RB rev sowie der Tnt1-spezifische Primer Tnt-1 fwd verwendet. Das genspezifische Amplifikat wurde bei 15 Pflanzen amplifiziert (4, 5, 7, 9-14, 16, 18, 20). Von diesen 15 Pflanzen waren drei heterozygot (1,6,15), da auch das Tnt1-spezifische Amplifikat detektiert wurde. Ausschließlich das Tnt1-spezifische Amplifikat wurde bei fünf Pflanzen (2, 3, 8, 17, 19) nachgewiesen, die demnach homozygot für die Tnt1-Transposoninsertion im Gen *MtSLAH2-3B* sind. M:  $\lambda$  PstI-Marker.

Die Auftrennung der PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese zeigt entweder eine größere Bande (Nr. 4, 5, 7, 9-14, 16, 18, 20), eine kleinere Bande (Nr. 2, 3, 8, 17, 19) oder zwei Banden (Nr. 1, 6, 15). Die größere Bande entspricht der Größe des genspezifischen Amplifikats und die kleinere Bande der des Tnt1-spezifischen Amplifikats. Dementsprechend sind die R2-Pflanzen 2, 3, 8, 17 und 19 homozygot für die Tnt1-Transposoninsertion im Promotor des Gens *MtSLAH2-3B*. Bei den Pflanzen mit den Nummern 1, 6 und 15 hingegen liegt die Tnt1-Transposoninsertion heterozygot vor. Zwölf Pflanzen der Linie NF10039 weisen keine Tnt1-Transposoninsertion im Kandidatengen auf (Nr. 4, 5, 7, 9-14, 16, 18, 20).

#### NF11647:

Die Genotypisierung der Tnt1-Transposoninsertionslinie NF11647 wurde bei acht R2-Pflanzen durchgeführt. Es wurde jeweils ein Primerpaar in einem PCR-Ansatz benutzt. Im ersten Ansatz wurde das Primerpaar 3B LB fwd :: 3B RB rev angewendet, das bei Heterozygoten und Pflanzen ohne Tnt1-Transposoninsertion zu einer Amplifikation führt. In einem zweiten Ansatz wurden die Primer Tnt1 fwd und 3B RB rev verwendet, die bei Homozygoten und Heterozygoten ein Fragment amplifizieren. Das genspezifische Amplifikat ist das größere, das Tnt1-spezifische das kleinere Amplifikat.



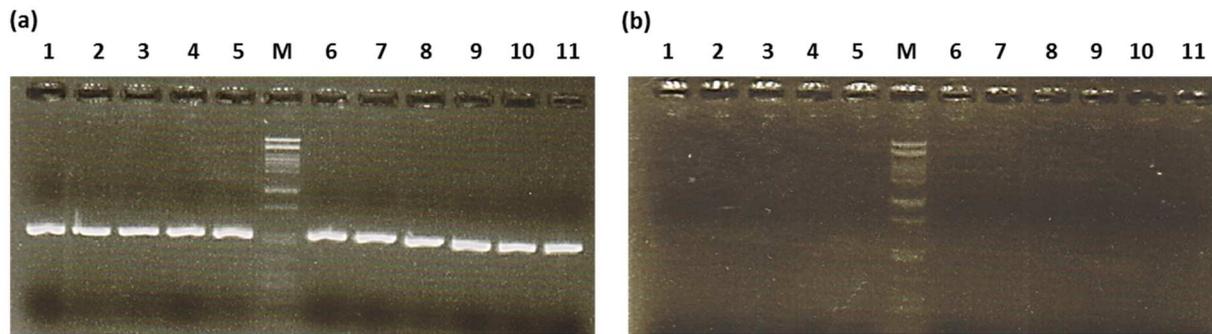
**Abbildung 27: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCRs zur Genotypisierung der Tnt1-Insertionslinie NF11647**

Zwei unabhängige PCR-Ansätze mit den genspezifischen Primern 3B LB fwd2 :: 3B RB rev2 im ersten Ansatz (a) und den Tnt1-spezifischen Primern Tnt1 fwd :: 3B RB rev2 im zweiten Ansatz (b). Das genspezifische Amplifikat wurde bei fünf Pflanzen (2, 3, 4, 5, 7) amplifiziert. Das ausschließlich Tnt1-spezifische Amplifikat wurde bei drei Pflanzen (1, 6, 8) nachgewiesen, die demnach homozygot für die Tnt1-Transposoninsertion im Gen *MtSLAH2-3B* sind. M:  $\lambda$  PstI-Marker.

Aus der in Abbildung 27 dargestellten gelelektrophoretischen Auftrennung der PCRs zur Genotypisierung von NF11647 geht hervor, dass die Pflanzen 1, 6 und 8 die Tnt1-Transposoninsertion im Promotor des Gens *MtSLAH2-3B* homozygot tragen. Die Pflanzen 2, 3, 4, 5 und 7 weisen keine Tnt1-Transposoninsertion im Kandidatengen auf. Heterozygote Pflanzen wurden nicht identifiziert.

### NF14366

Für die Tnt1-Transposoninsertionslinie NF14366 des Gens *MtSLAH2-3A* konnten elf R2-Pflanzen genotypisiert werden. Hierfür wurden in zwei getrennten PCR-Ansätzen die Primerpaare 3A RB rev :: Tnt1 fwd (Tnt1-spezifisches Amplifikat) und 3A RB rev :: 3A LB fwd (genspezifisches Amplifikat) eingesetzt. Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, ergab sich für NF14366 für alle elf Pflanzen ausschließlich eine genspezifische Amplifikation (Abbildung 28a). Dementsprechend stand für das Gen *MtSLAH2-3A* keine homozygote Tnt1-Transposoninsertionslinie zur Verfügung.



**Abbildung 28: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCRs zur Genotypisierung der Tnt1-Transposoninsertionslinie NF14366**

Zwei unabhängige PCR-Ansätze mit den genspezifischen Primern 3A RB rev :: 3A LB fwd im ersten Ansatz (a) und den Tnt1-spezifischen Primern 3A RB rev :: Tnt1 fwd im zweiten Ansatz (b). Das genspezifische Amplifikat wurde bei allen getesteten Pflanzen amplifiziert. Keine Pflanze wies das Tnt1-spezifische Amplifikat auf. M:  $\lambda$  PstI-Marker.

Tabelle 20 zeigt abschließend eine Übersicht über die Ergebnisse der Genotypisierung der Tnt1-Transposoninsertionslinien NF10039, NF11647 und NF14366. Da für die Tnt1-Transposoninsertionslinie 14366 keine Pflanzen mit homozygoter Tnt1-Transposoninsertion identifiziert wurden, konnte diese Linie nicht weiter analysiert werden.

**Tabelle 20: Übersicht der Ergebnisse der Genotypisierung der Tnt1-Transposoninsertionslinien NF10039, NF11647 und NF14366**

Dargestellt sind die Gennummern, die Namen der Tnt1-Transposoninsertionslinien, die Lokalisation der Transposoninsertionen im Gen und die Anzahl der Pflanzen, in denen die Transposoninsertion im jeweiligen Gen homozygot, heterozygot oder gar nicht vorliegt.

Gen	Tnt1-Linie	Tnt1-Insertionsstelle	Pflanzen mit homozygoter Tnt1-Insertion	Pflanzen mit heterozygoter Tnt1-Insertion	Pflanzen ohne Tnt1-Insertion
MTR6g045200 <i>MtSLAH2-3B</i>	NF10039	385 bp Promotor	5	3	12
	NF11647	887 bp Promotor	3	0	5
MTR6g034030 <i>MtSLAH2-3A</i>	NF14366	4865 bp Exon	0	0	11

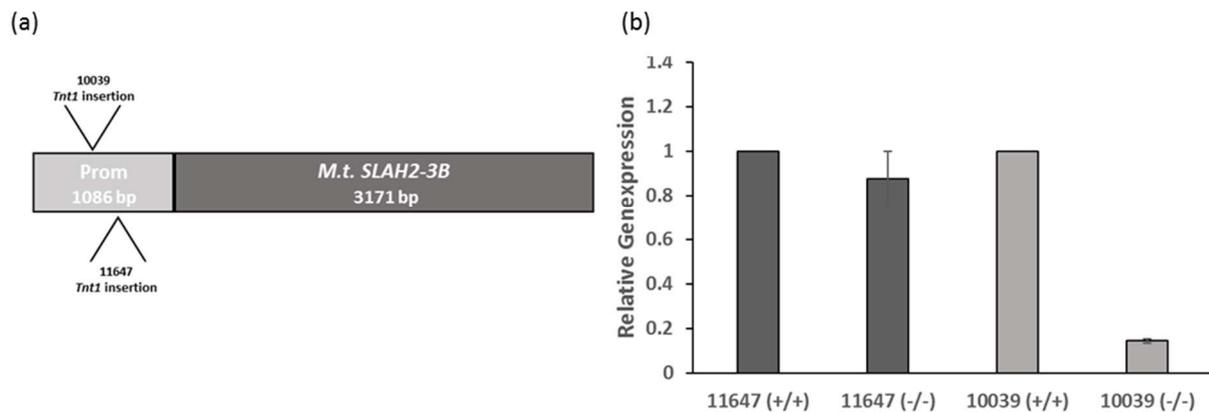
Die PCR-Amplifikate der als homozygot für die Tnt1-Transposoninsertion identifizierten Pflanzen der Linien NF11647 und NF10039 wurden zur Kontrolle der Genotypisierung mit dem Ergebnis sequenziert, dass eine Tnt1-Transposoninsertion im Promotorbereich des Kandidatengens vorliegt. Aus dem durch Selbstbestäubung erhaltenen R2-Saatgut dieser Pflanzen wurden neue Pflanzen angezogen, die noch einmal mittels PCR hinsichtlich ihres Genotyps überprüft wurden. Für die Membranpotentialmessungen an den Tnt1-Transposoninsertionslinien NF10039 und NF11647 des Gens *MtSLAH2-3B* wurden aus dem R2-Saatgut angezogene Keimlinge verwendet. Neben der für die Tnt1-Transposoninsertion homozygoten Pflanzen wurden zur Kontrolle außerdem Genotypen ausgewählt, die die Tnt1-Transposoninsertion nicht aufwiesen.

### **3.4.2 Analyse der *MtSLAH2-B*-Genexpression in den Tnt1-Transposoninsertionslinien NF10039 und NF11647**

In der Genotypisierung der Tnt1-Transposoninsertionslinien NF11647 und NF10039 wurden für die Tnt1-Transposoninsertion im Promotor des Gens *MtSLAH2-3B* homozygote Pflanzen selektiert. Pflanzen mit diesem Genotyp wurden als 11647 (-/-) bzw. 10039 (-/-) bezeichnet. Als Kontrolle wurden Pflanzen verwendet, welche die Tnt1-Transposoninsertion im Kandidatengen nicht tragen. Diese Kontrollpflanzen wurden mit 11647 (+/+) bzw. 10039 (+/+) benannt.

Die Kontrollpflanzen enthielten wahrscheinlich noch mehrere Mutationen gegenüber der Ausgangslinie R108. Da bei der Tnt1-Retrotransposon-Insertionstechnik die Tnt1-Transposoninsertionen über das gesamte Pflanzengenom zufällig verteilt stattfinden, enthalten die Pflanzen immer auch unbekannte Tnt1-Transposoninsertionen, die ebenfalls homozygot oder heterozygot vorliegen können.

Um zu untersuchen, ob die Genexpression des Gens *MtSLAH2-3B* durch die Tnt1-Transposoninsertion im Promotor ausgeschaltet oder erniedrigt ist, wurde die *MtSLAH2-3B*-Genexpression der Linie 11647 (-/-) relativ zu 11647 (+/+) und der Linie 10039 (-/-) relativ zu 10039 (+/+) mittels qPCR bestimmt.



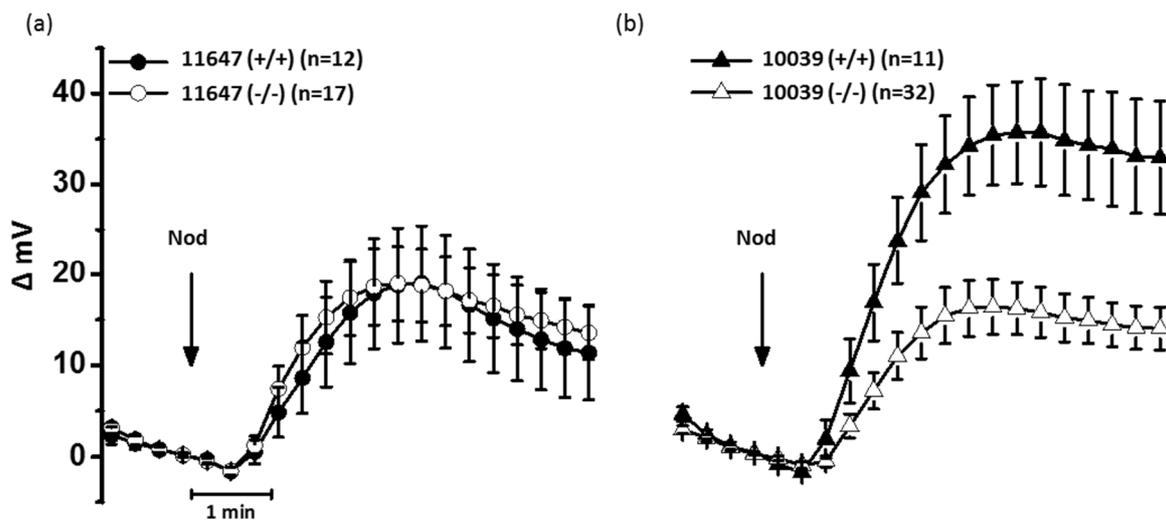
**Abbildung 29: Lokalisation der Tnt1-Transposoninsertionen und deren Einfluss auf die Genexpression von *MtSLAH2-3B***

(a) Schematische Darstellung der Tnt1-Transposoninsertionen der Linien NF10039 und NF11647 im Promotor des Gens *MtSLAH2-3B*. (b) Mittels qPCR bestimmte relative Genexpression der Tnt1-Transposoninsertionslinien NF10039 und NF11647. Die *MtSLAH2-3B*-Genexpression der Pflanzen, welche die Tnt1-Transposoninsertion im Promotor homozygot tragen (-/-) ist relativ zur Genexpression der Inzuchtlinie (+/+) dargestellt, welche die Tnt1-Transposoninsertion verloren hat. Die Auswertung der qPCR-Ergebnisse erfolgte mit der  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ -Methode mit  $\Delta\text{Ct} = \text{CT}_{\text{MtSLAH2-3B}} - \text{CT}_{\text{MtTEF1}\alpha}$  (Livak and Schmittgen 2001). Zur Normalisierung wurde der Elongationsfaktor *MtTEF1 $\alpha$*  verwendet. (Mittelwert  $\pm$  SE).

In Abbildung 29a sind die Lokalisationen der Tnt1-Transposoninsertionen im Promotor des Gens *MtSLAH2-3B* dargestellt. Die untersuchte Tnt1-Transposoninsertion der Linie NF11647 hat keinen Einfluss auf die Genexpression von *MtSLAH2-3B*, da das Gen in 11647 (+/+) und 11647 (-/-) gleich stark exprimiert wird (Abbildung 29b). Bei der Linie NF10039 konnte eine siebenfach reduzierte *MtSLAH2-3B*-Genexpression in 10039 (-/-) im Vergleich zu 10039 (+/+) gemessen werden. Dies zeigt, dass die 10039 Tnt1-Transposoninsertion im Promotor von *MtSLAH2-3B* einen Einfluss auf die Genexpression hat (Abbildung 29b).

### 3.4.3 Analyse der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials in Wurzelhaarzellen von NF11647 und NF10039

Zur Analyse der Beteiligung des Anionenkanals *MtSLAH2-3B* an der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials in *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen wurden die Tnt1-Transposoninsertionslinien NF11647 und NF10039 hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Reaktion auf Nod-LCOs untersucht.



**Abbildung 30: Membranpotentialsmessungen an Wurzelhaarzellen der Tnt1-Transposoninsertionslinien NF11647 und NF10039**

Durchschnittliche Änderungen des Membranpotentials nach Zugabe von 100 nM Nod-LCOs in Wurzelhaarzellen der Genotypen (a) 11647 (-/-) und 11647 (+/+) und (b) 10039 (-/-) und 10039 (+/+). Wobei (-/-) Pflanzen kennzeichnet, welche die Tnt1-Transposoninsertion im Promotor des Gens *MtSLAH2-3B* homozygot tragen, während (+/+) für die Inzuchtlinien steht, die diese Transposoninsertion verloren haben. (Mittelwert  $\pm$  SE).

Bei der Tnt1-Transposoninsertionslinie NF11647 war die Reaktion des Membranpotentials auf Nod-LCOs in den Genotypen 11647 (+/+) und 11647 (-/-) identisch (Abbildung 30a). Beide Genotypen reagierten mit einer Depolarisierung des Membranpotentials auf die Zugabe von Nod-LCOs. Die Stärke der Depolarisierung war mit der im *M. truncatula*-Wildtyp R108-1 gemessenen Reaktion identisch (vergleiche Abbildung 30a mit Abbildung 7b). Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da die Tnt1-Transposoninsertionslinie keine Veränderung in der Transkriptmenge von *MtSLAH2-3B* zeigte.

Auch für die Tnt1-Transposoninsertionslinie NF10039 konnte in dem für die Transposoninsertion im Promotor des Gens *MtSLAH2-3B* homozygoten Genotyp (-/-) keine Veränderung der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials beobachtet werden (Abbildung 30b). Die siebenfach reduzierte Genexpression des Anionenkanals *MtSLAH2-3B* scheint folglich keinen Einfluss auf die Reaktion der Wurzelhaarzellen auf Nod-LCOs zu haben.

Im Gegensatz dazu konnte im Genotyp 10039 (+/+), der Inzuchtlinie, die ihre Tnt1-Transposoninsertion im Promotor des Gens *MtSLAH2-3B* verloren hat, eine signifikant erhöhte

Nod-LCO-induzierte Depolarisierung des Membranpotentials gemessen werden (Abbildung 30b). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der Genotyp NF10039 (+/+) eine unbekannte Tnt1-Transposoninsertion an einer Stelle im Genom trägt, welche die Antwort des Membranpotentials auf Nod-LCOs verstärkt.

### 3.4.4 Überblick über Tnt1-Transposoninsertionen der Linie NF10039

Da die Inzuchtlinie NF10039 (+/+), die ihre Tnt1-Transposoninsertion im Promotor des Gens *MtSLAH2-3B* verloren hat, eine signifikant erhöhte Nod-LCO-induzierte Depolarisierung des Membranpotentials aufwies, wurde von der Mutantendatenbank *Noble Foundation* eine Liste aller Tnt1-Transposoninsertionen dieser Linie angefordert. In der Linie NF10039 liegen 40 Tnt1-Transposoninsertionen vor, deren Sequenzen mit der NCBI-Datenbank abgeglichen wurden. Diese BLAST-Suche ergab für 28 der 40 Ausgangssequenzen Treffer d.h. eine Liste von 28 Genen, die in der Linie NF10039 durch eine Tnt1-Transposoninsertion in ihrer Genexpression beeinflusst sein könnten. Die Liste ist in Abbildung 31 dargestellt.

Medicago truncatula soluble inorganic pyrophosphatase mRNA  
 Medicago truncatula amino-terminal domain cyclin mRNA  
 Medicago truncatula pyridoxal biosynthesis protein PDX1, putative mRNA  
 Medicago truncatula clone mth2-18a1, complete sequence  
 PREDICTED: Cicer arietinum calcium-transporting ATPase 2  
 Medicago truncatula clone mth2-88i1, complete sequence  
 Beta-galactosidase like protein  
 LRR and NB-ARC domain disease resistance protein  
 Abscisic acid-responsive HVA22 family protein-like, ABA-inducible bHLH-type transcription factor  
 Medicago truncatula clone mth2-31b9, complete sequence  
 Medicago truncatula clone mth2-4f13, complete sequence  
 Medicago truncatula clone mth2-116m7, complete sequence  
 Probable WRKY transcription factor 65  
 Medicago truncatula clone mth2-16n19, complete sequence  
 transmembrane protein, putative,  
 Medicago truncatula WRKY family transcription factor mRNA  
 Medicago truncatula homeobox leucine zipper protein mRNA  
 Medicago truncatula clone mth2-13k6, complete sequence  
 MYB domain protein  
 EF hand calcium-binding family protein  
 Membrane-associated salt-inducible protein isolog, PPR containing plant-like protein  
 Medicago truncatula EF hand calcium-binding family protein mRNA  
 M. truncatula DNA sequence from clone MTH2-2A23 on chromosome 3, complete sequence  
 Medicago truncatula calmodulin-interacting-like protein mRNA  
 Medicago truncatula chromosome 7 clone mth2-64h15, complete sequence  
 GNS1/SUR4 membrane family protein, Elongation of fatty acids protein 3  
 Pentatricopeptide repeat-containing protein  
 Medicago truncatula folate transporter/carrier-like protein partial mRNA

#### Abbildung 31: Gene mit Tnt1-Transposoninsertionen in der Linie NF10039

Liste der in der Datenbank NCBI gefundenen Gene, die eine Tnt1-Transposoninsertion in der Linie NF10039 tragen. Ob die Tnt1-Transposoninsertion im jeweiligen Gen homozygot, heterozygot oder gar nicht vorliegt, bleibt noch zu klären. Gene, die möglicherweise bei der Erkennung der Nod-LCOs oder an den frühen Reaktionen der Pflanze auf Nod-LCOs beteiligt sein könnten, sind gelb hervorgehoben.

In Abbildung 31 gelb hinterlegt sind Gene, die hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Nod-LCO-induzierten Membrandepolarisierung von besonderem Interesse sein könnten. Hierzu gehören Gene, die:

1. für Proteine codieren, die den Calciumgehalt in der Zelle regulieren: *Calcium transporting ATPase 2*,
2. für Proteine der Pathogenabwehr codieren: *LRR and NB-ARC domain disease resistance protein*,
3. für Proteine mit Calcium-Bindedomänen codieren: *EF hand calcium-binding family proteins*,
4. für Proteine codieren, die mit Calmodulin interagieren: *Calmodulin-interacting like protein*.

Diese Gene könnten bei einer Calcium-abhängigen Depolarisierung des Membranpotentials oder der Immun-Antwort der Pflanze auf symbiotische Signalmoleküle eine Rolle spielen.

Der zeitliche Rahmen dieser Arbeit ließ eine detaillierte Genotypisierung der Tnt1-Transposonlinie NF10039 (+/+) sowie eine Analyse der Genexpression der gefundenen fünf Kandidatengene in NF10039 (+/+) nicht zu. Für weiterführende Studien liefern diese Ergebnisse einen interessanten Ansatz.

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, aufzuklären, welche Anionenkanäle an der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials beteiligt sind. Hierfür wurde zunächst die Messung des Membranpotentials mittels Einstich von Mikroelektroden in *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen etabliert. Die Reaktion der Wurzelhaarzellen auf Nod-LCOs, sulfatisierte und nicht sulfatisierte Myc-LCOs war von Interesse.

Da Felle et al. (1998) neben einem Ausstrom von Anionen aus der Wurzelzelle auch einen Calcium-Einstrom in die Wurzelzelle als Grund für die Nod-LCO-stimulierte Depolarisierung des Membranpotentials postulierten, wurden in dieser Arbeit Änderungen des zytosolischen Calcium-Gehalts parallel zur Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials aufgezeichnet.

Für pathogene Signalmoleküle (MAMPs) wie flg22, die in *Arabidopsis*-Schließzellen ebenfalls eine Depolarisierung des Membranpotentials induzieren, konnte eine Beteiligung der S-Typ-Anionenkanäle *AtSLAC1* und *AtSLAH3* nachgewiesen werden (Guzel Deger et al. 2015). Dieses Wissen ließ vermuten, dass ein Anionenausstrom durch S-Typ-Anionenkanäle (SLAHs) eine mögliche Erklärung für die Reaktion des Membranpotentials der Wurzelzellen auf Nod-LCOs ist. Aus diesem Grund wurde nach *AtSLAC1/SLAH3*-homologen Anionenkanälen aus *M. truncatula* gesucht. Diese wurden mittels elektrophysiologischer Charakterisierung und Transposon-Mutanten hinsichtlich einer Beteiligung an der Antwort des Membranpotentials auf Nod-LCOs untersucht.

### 4.1 Reaktion von *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen auf Signalmoleküle der RNS (Nod-LCOs) und AM (Myc-LCOs)

Depolarisierungen des Membranpotentials und Änderungen der zytosolischen Calcium-Konzentration sind in Pflanzen bei der Reaktion auf Signalmoleküle allgemein bekannte Mechanismen. In verschiedenen Zelltypen wurde eine Depolarisierung bereits als Antwort auf symbiotische Nod-LCOs, Chitin-Fragmente und andere MAMPs nachgewiesen (Felle et al. 2000, Jeworutzki et al. 2010, Koers et al. 2011, Roelfsema et al. 2012, Wendehenne et al. 2002, Ye et al. 2013).

#### 4.1.1 Einfluss von Nod-LCOs auf das Membranpotential in *M. truncatula*

##### Wurzelhaarzellen

Die Nod-LCO-induzierte Depolarisierung des Membranpotentials wurde bislang ausschließlich für Wurzelzellen der Modellleguminose *M. sativa* gezeigt (Ehrhardt et al. 1992, Felle et al. 1995, Kurkdjian 1995). In dieser Arbeit gelang die Messung einer transienten Depolarisierung des Membranpotentials nach der Zugabe von Nod-LCOs (NodSm-IV C16:2, S) an *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen (Abbildung 7). Auffällig hierbei sind die Unterschiede in der Stärke der Depolarisierung bei den zwei verschiedenen Genotypen A17 und R108-1: Der Genotyp R108-1 reagierte sehr viel stärker und dafür aber langsamer auf Nod-LCOs. Die durchschnittliche Depolarisierung war beim Genotyp R108-1 mit 25 mV vergleichbar mit den von Felle et al. (1995) in *M. sativa* gemessenen Werten, jeweils nach Zugabe von 100 nM Nod-LCOs. Die stark reduzierte Antwort im Genotyp A17 kann auf metabolische Differenzen, Modifikationen der Membranpermeabilität oder Unterschiede in der Genexpression der Rezeptoren und deren Verteilung in der Plasmamembran zurückzuführen sein. Zudem könnte es sein, dass der Prozess, der zu einer Repolarisierung der Plasmamembran führt, im Genotyp A17 früher einsetzt als im Genotyp R108-1.

#### 4.1.2 Einfluss von Myc-LCOs auf das Membranpotential in *M. truncatula*-

##### Wurzelhaarzellen

In dieser Arbeit wurde neben der Reaktion von *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen auf Nod-LCOs auch die Antwort auf die Signalmoleküle der AM untersucht (Myc-LCOs). Es konnte gezeigt werden, dass 100 nM sulfatisierte Myc-LCOs (Myc-LCO IV C16:0, S und Myc-LCO IV C18:1, S) ebenfalls eine transiente Depolarisierung des Membranpotentials auslösen (Abbildung 8a, b). Die Antwort auf den sulfatisierten Myc-LCO IV C16:0, S ist der durch den Nod-LCO ausgelösten Reaktion sehr ähnlich. Da sich die zwei Signalmoleküle auch strukturell ähneln, kann eine Aktivierung des sogenannten Nod-Signalweges durch den sulfatisierten Myc-LCO IV C16:0, S vermutet werden. Diese Erklärung wird unterstützt von der Beobachtung von Maillet et al. (2011), dass die Stimulation der Verzweigung der Wurzelhaare (engl.: root branching stimulation, (RBS)) als Antwort auf sulfatisierte Myc-LCOs abhängig von dem Transkriptionsfaktor NSP1 ist. NSP1 galt bislang als spezifischer Transkriptionsfaktor des

Signalweges der RNS (Nod-Signalweg) (Maillet et al. 2011). Eine Neu-Definition des Begriffes „Nod-Signalweg“ wäre demnach sinnvoll.

#### 4.1.3 LCOs: Chemische Struktur und Perzeption

In weiterführenden Experimenten wurde gezeigt, dass in Wurzelhaarzellen von *M. truncatula* nach der Depolarisierung des Membranpotentials durch sulfatisierte Myc-LCOs (IV C16:0, S und IV C18:1, S) die Reaktion auf Nod-LCOs (NodSm-IV C16:2, S) inhibiert ist (Abbildung 9a, b). Dies ist ein guter Hinweis darauf, dass sulfatisierte Myc- und Nod-LCOs über denselben Signaltransduktionsweg die Änderung des Membranpotentials induzieren und vermutlich von denselben LysM-RLKs erkannt werden. Für den Nod-LCO-Rezeptor *MtLyk3* (Limpens et al. 2003) wird eine Beteiligung am *Myc-Signaling* ausgeschlossen, während der Rezeptor *MtNFP* (Arrighi et al. 2006) an der Erkennung von Nod- und Myc-LCOs beteiligt sein soll (Maillet et al. 2011).

Die chemische Struktur ist bei der Perzeption der Signalmoleküle in RNS und AM essentiell. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass 100 nM nicht sulfatisierte Myc-LCOs (Myc-LCO IV C18:1) keine Änderung des Potentials der Plasmamembran induzieren (Abbildung 8c), obwohl sie RBS auslösen (Maillet et al. 2011) und die Expression symbiosespezifischer Gene erhöhen (Czaja et al. 2012). Dies deutet darauf hin, dass verschiedene Signalwege an der RBS, der Aktivierung der symbiosespezifischen Genexpression und der Depolarisierung des Membranpotentials beteiligt sind und die Prozesse unabhängig voneinander ablaufen.

Die Zugabe von Nod-LCOs nach der Applikation des nicht sulfatisierten Myc-LCOs führt zu der bekannten transienten Depolarisierung des Membranpotentials (Abbildung 9). Der nicht sulfatisierte Myc-LCO scheint somit weder mit dem Nod-LCO um einen Rezeptor zu konkurrieren, noch in den durch Nod-LCOs induzierten-Signaltransduktionsweg involviert zu sein. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fähigkeit der Myc-LCOs, eine Änderung des Membranpotentials hervorzurufen, von der chemischen Struktur und insbesondere dem Vorhandensein einer Sulfat-Gruppe am reduzierenden Zucker abhängig ist.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Antwort von *M. sativa* auf Nod-LCOs gemacht. Die Zugabe nicht sulfatisierter Nod-LCOs (Nod RM IV C16:2) induziert in *M. sativa* weder die typische Deformation der Wurzelhaare (Roche et al. 1991) noch die Depolarisierung des Membranpotentials (Felle et al. 1995, Kurkdjian 1995). Für die Nod-LCOs vermuten Felle et al.

(1996), dass es zwei Perzeptionssysteme gibt. Das Perzeptionssystem für den nicht sulfatisierten Nod-LCO stellt dabei ein evolutionäres Relikt dar, das Nod-LCOs mit einfachen Strukturen ohne Dekorationen erkennt. Da die Sulfatisierung am Ende der Nod-LCO-Biosynthese steht (Schultze et al. 1995), ist eine Koevolution dieser Modifikation und des spezifischen Perzeptionssystems der Wirtspflanze vorstellbar (Felle et al. 1996).

Neben der chemischen Struktur spielt die eingesetzte Konzentration der Signalmoleküle eine Rolle. Demnach sind sulfatisierte Myc-LCOs 100-mal aktiver als nicht sulfatisierte. Während sulfatisierte Myc-LCOs die RBS bereits bei Konzentrationen von 0,01 bis 0,1 nM induzieren, müssen nicht sulfatisierte Myc-LCOs für eine ähnliche Antwort in einer Konzentration von 1 bis 10 nM vorliegen (Maillet et al. 2011). Mit 100 nM wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente eine hohe Konzentration an Myc-LCOs verwendet. Ein Konzentrationseffekt als Grund dafür, dass nicht sulfatisierte Myc-LCOs keine Depolarisierung des Membranpotentials induzieren, ist demnach auszuschließen. Bei all diesen Überlegungen ist zu berücksichtigen, dass in der Natur natürlich immer eine Mischung aus nicht sulfatisierten und sulfatisierten Myc-LCOs vom symbiotischen Pilz ausgesandt wird.

Sehr wahrscheinlich differenzieren die Rezeptoren zwischen Nod- und Myc-LCOs anhand von qualitativen (strukturellen) und quantitativen (Konzentration) Unterschieden (Maillet et al. 2011).

#### **4.1.4 Einfluss externer Anionen auf die durch Nod-LCOs induzierte Depolarisierung des Membranpotentials**

In der Hypothese dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, dass Nod-LCO-stimulierte Anionenkanäle die Änderung des Membranpotentials verursachen. Um weitere Beweise für diese Vermutung zu finden, wurde die Antwort der Wurzelhaarzellen von *M. truncatula* auf Nod-LCOs bei unterschiedlichen externen Anionenkonzentrationen untersucht.

Eine Erhöhung der extrazellulären Chlorid-Konzentration führte zu einer Verstärkung der Depolarisierung des Membranpotentials (Abbildung 10a, d). Bei *AtSLAH3* verschiebt sich die Offenwahrscheinlichkeit des Anionenkanals nur unter nicht physiologischen, sehr hohen Chlorid-Konzentrationen (100 mM). Somit ist die verstärkte Depolarisierung in Anwesenheit von 10 mM Chlorid kein Beweis für eine Beteiligung von *SLAH2-3*-Anionenkanälen an der Nod-LCO-induzierten Antwort des Membranpotentials. Allerdings wäre es möglich, dass die

Sensitivität der SLAH2-3-Anionenkanäle *in planta* erhöht ist, sodass eine Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit schon bei geringen Chlorid-Konzentrationen erfolgt. Eine Heteromerisierung mit SLAH1 beispielsweise könnte zu einer Nitrat- und Kinase-unabhängigen Aktivierung der MtSLAH2-3-Anionenkanäle und zu einer erhöhten Chlorid-Permeabilität führen (s. Kapitel 4.3.4) (Cubero-Font et al. 2016).

Für *Arabidopsis* wurde außerdem gezeigt, dass extrazelluläres Nitrat die Offenwahrscheinlichkeit des S-Typ-Anionenkanals AtSLAH3 verschiebt (Geiger et al. 2011). Jedoch führte in dieser Arbeit ein Austausch von Chlorid durch Nitrat in der Badlösung zu keiner Veränderung der Stärke der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials. Allerdings führte eine niedrigere extrazelluläre Nitrat-Konzentration (1 mM) im Vergleich zu 10 mM Nitrat zu einer beschleunigten Antwort der Wurzelhaarzellen (Abbildung 10b, d).

Demnach haben sowohl extrazelluläres Chlorid als auch Nitrat einen Einfluss auf die Antwort des Membranpotentials auf Nod-LCOs, bei der SLAH3-Typ-Anionenkanäle eine Rolle spielen könnten.

Neben den S-Typ-Anionenkanälen könnten auch R-Typ-Anionenkanäle an der Reaktion auf Nod-LCOs beteiligt sein, die von Malat und Sulfat aktiviert und permeiert werden (Frachisse et al. 1999). Interessanterweise verstärkt extrazelluläres Sulfat die Depolarisierung durch Nod-LCOs, was auf eine Mitwirkung von R-Typ-Anionenkanälen wie beispielsweise QUAC1 an der Nod-LCO-induzierten Antwort der Plasmamembran hindeutet (Abbildung 10c, d).

Erst kürzlich konnten Takanashi et al. (2016) eine Beteiligung des R-Typ-Anionenkanals ALMT4 bei der RNS in *Lotus japonicus* zeigen. Insgesamt wurden sieben ALMT-Gene identifiziert, von denen drei in Wurzelknöllchen detektiert wurden (*LjALMT3*, *LjALMT4*, *LjALMT5*). Eine Analyse der relativen Genexpression von *LjALMT3*, *LjALMT4* und *LjALMT5* mittels quantitativer RT-PCR ergab eine erhöhte Expression von *LjALMT4* in Wurzelknöllchen und Samen, wobei *LjALMT3* und *LjALMT5* verstärkt in Blattgewebe exprimiert wurden. Mittels heterologer Expression in *Xenopus*-Oozyten wurde der spezifisch in Leitbündeln der Wurzelknöllchen exprimierte *LjALMT4* als Dicarboxylat-Transporter identifiziert, der sowohl den Efflux von Malat, Fumarat und Succinat als auch den Influx anorganischer Anionen wie Chlorid und Nitrat vermittelt. Demnach hat *LjALMT4* vermutlich eine unterstützende Funktion bei der Versorgung der Pflanze mit Dicarboxylaten, die in den Parenchymzellen der Wurzelknöllchenleitbündel

produziert wurden. Zudem spielt *LjALMT4* bei der Erhaltung der Anionen-Homeostase im Wurzelknöllchengewebe eine Rolle (Takanashi et al. 2016). In den Genomen der Modellleguminosen *Glycine max* und *M. truncatula* wurden mit 31 und 18 Vollängen-Sequenzen im Vergleich zu *L. japonicus* sehr viel mehr ALMT-Gene gefunden (Schmutz et al. 2010, Young et al. 2011). Eine Charakterisierung dieser ALMTs könnte Aufschluss über ihre mögliche Funktion in RNS und AM geben. Die Untersuchung einer Beteiligung an der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung wäre dabei von großem Interesse.

#### **4.2 Zytosolische Calcium-Änderungen als Antwort auf Nod-LCOs**

Die Perzeption von Nod-LCOs erfolgt über Rezeptoren, die in den Epidermiszellen der Pflanzenwurzeln lokalisiert sind. Noch vor dem morphologischen Kontakt der zwei Symbionten kommt es zur Aktivierung eines Signaltransduktionswegs. In dieser Signaltransduktion spielen Calcium-Oszillationen eine wichtige Rolle, die von einer im Nukleus lokalisierten Calcium- und Calmodulin-abhängigen Kinase (CCaMK) dekodiert werden. Es folgt die Aktivierung der Expression symbiosespezifischer Gene und die Kolonisierung der Wurzel (Oldroyd 2013).

Die beschriebenen repetitiven Änderungen der zytosolischen Calcium-Konzentration einige Zeit nach Nod-LCO-Zugabe wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen gemessen (Ehrhardt et al. 1996, Felle et al. 1999b, Wais et al. 2000, Wais et al. 2002, Shaw and Long 2003, Miwa et al. 2006, Morieri et al. 2013, Granqvist et al. 2015). Neben den Calcium-Oszillationen konnte unter Verwendung intrazellulärer Ionen-selektiver Mikroelektroden (Felle et al. 1998, Felle et al. 1999b, Felle et al. 1999a) und genetisch veränderter Pflanzen, die einen Calcium-Sensor exprimieren (Miwa et al. 2006, Morieri et al. 2013), auch ein Anstieg der zytosolischen Calcium-Konzentration in den ersten zwei Minuten nach der Zugabe der Nod-LCOs gemessen werden.

Der Zusammenhang zwischen Membranpotentialsdepolarisierung, frühem Calcium-Einstrom und späten Calcium-Oszillationen sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Mittels Mikroinjektion des Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs FURA2-Dextran in *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen wurden Calcium-Oszillationen im Zytosol detektiert, die im Durchschnitt sieben Minuten nach der Zugabe der Nod-LCOs auftraten. Eine Änderung der zytosolischen Calcium-Konzentration in den ersten Minuten nach der Applikation des Nod-LCOs wurde nicht

festgestellt (Abbildung 11b, Abbildung 12a). Auch die parallelen Messungen des Membranpotentials und der zytosolischen Calcium-Konzentration an einer Wurzelhaarzelle zeigten keinen Calcium-Flux während der Depolarisierung des Membranpotentials (Abbildung 12b). Basierend auf diesen Ergebnissen ist ein Einstrom von Calcium-Ionen als Auslöser der Depolarisierung des Membranpotentials auszuschließen. Die Calcium-Oszillationen treten erst während der Repolarisation des Membranpotentials der Wurzelhaarzelle auf. Folglich sind die Membranpotentialsdepolarisierung und die repetitiven Calcium-Änderungen zwei zeitlich voneinander getrennte Prozesse. Inwieweit die Depolarisierung und das Calcium-Signaling sich beeinflussen, bleibt zu klären.

Auf die Hypothese dieser Arbeit bezogen, widerspricht das Fehlen eines Calcium-Einstroms einer Calcium-abhängigen Aktivierung von Anionenkanälen. In der Charakterisierung der Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* wurde gezeigt, dass beide Anionenkanäle durch die Calcium-unabhängige Kinase *AtOST1* aktiviert werden und eine Interaktion mit *AtSLAH1* ebenfalls zur Aktivierung führt (Abbildung 17a, Abbildung 24). Somit spricht ein fehlender Calcium-Einstrom nicht automatisch gegen eine Beteiligung von S-Typ-Anionenkanälen an der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials. Sowohl eine Nod-LCO-induzierte Interaktion mit *SLAH1* als auch eine Nod-LCO-induzierte Aktivierung von *MtSLAH3*-Kanälen durch SnRK2-Kinasen könnte zur Depolarisierung des Membranpotentials führen.

Die Resultate der Calcium-Messungen dieser Arbeit widersprechen den Ergebnissen, die mit *M. truncatula*-Pflanzen gemacht wurden, die einen Cameleon-Calcium-Sensor exprimieren (Miwa et al. 2006, Morieri et al. 2013) und eine Änderung der zytosolischen Calcium-Konzentration in den ersten Minuten nach Nod-LCO-Zugabe zeigen. Auch Experimente, in denen zwei Calcium-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe verwendet wurden, deuten auf einen Influx von Calcium-Ionen nach der Perzeption der Nod-LCOs hin, der unabhängig von den später auftretenden Calcium-Oszillationen ist (Amor et al. 2003, Shaw and Long 2003). Im Gegensatz dazu steht die Studie von Granqvist et al. (2015), in der verschiedene Leguminosen hinsichtlich ihrer Nod-LCO-induzierten Änderung der zytosolischen Calcium-Konzentration untersucht wurden. Das Resultat dieser Studie war, dass keine Calcium-Flüsse in der frühen Phase der Signaltransduktion stattfinden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Untersuchungen dieser Arbeit. Die Calcium-Konzentration ändert sich in den ersten Minuten nach der Nod-LCO-Zugabe nicht und somit hat Calcium keinen Einfluss auf die Depolarisierung

des Membranpotentials. Da Granqvist et al. (2015) wie auch Amor et al. (2003) und Shaw und Long (2003) zwei Calcium-sensitive Fluoreszenzfarbstoffe nutzten, kann das Ergebnis nicht auf die Messtechnik zurückzuführen sein.

Calcium-Oszillationen werden über den in der Einleitung beschriebenen allgemeinen Signaltransduktionsweg nicht nur von den Signalmolekülen der RNS, sondern auch von Myc-LCOs und kurzkettigen Chitin-Oligomeren (COs) stimuliert (Kosuta et al. 2008, Genre et al. 2013, Sun et al. 2015). Interessanterweise induzieren nicht sulfatisierte Myc-LCOs sowie auch nicht sulfatisierte Nod-LCOs Calcium-Oszillationen (Shaw and Long 2003, Sun et al. 2015), obwohl beide Signalmoleküle keine Depolarisierung des Membranpotentials induzieren (Felle et al. 1995, Kurkdjian 1995) (für nsMyc: Abbildung 8c). Als Erklärung für diese Unterschiede bei der Reaktion auf nicht sulfatisierte und sulfatisierte Signalmoleküle gibt es verschiedene Ansätze. Eine Möglichkeit ist, dass zwei verschiedene Rezeptoren für sulfatisierte und nicht sulfatisierte LCOs zwei unabhängige Signaltransduktionswege aktivieren, die zu Membrandepolarisierung und Calcium-Oszillationen führen. Eine andere Möglichkeit ist, dass ein einziger Rezeptor über Korezeptoren oder die Bindung von Liganden verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert. Beispielsweise wird der Rezeptor *MtDMI1* (*LjSYMRK*) von verschiedenen Interaktionspartnern reguliert. Es wird vermutet, dass die Interaktionspartner den Output des Rezeptors beeinflussen und somit ein Rezeptor unterschiedliche Signalwege beispielsweise für RNS und AM initiieren kann (Kelly et al. 2017).

Die Induktion von Calcium-Oszillationen durch nicht sulfatisierte LCOs bei fehlender Depolarisierung des Membranpotentials spricht auf jeden Fall dafür, dass beide Reaktionen unabhängig voneinander stattfinden. Das bestätigt die zuvor beschriebenen Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten parallelen Messungen von Membranpotential und zytosolischer Calcium-Konzentration.

### **4.3 Charakterisierung von *M. truncatula*-Anionenkanälen**

Durch eine Analyse des *M. truncatula*-Genoms wurden sieben Sequenzen identifiziert, die Homologien zu *AtSLAC1* aufweisen (Abbildung 13). Die Anionenkanäle *MtSLAH2-3A*, *MtSLAH2-3B* und *MtSLAC1* wurden als nächste Homologe von *AtSLAC1*, *AtSLAH2* und *AtSLAH3* ausgewählt und in dieser Arbeit im heterologen Expressionssystem der *Xenopus*-Oozyten elektrophysiologisch charakterisiert.

### 4.3.1 *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B*: Homologien zu *AtSLAH2/SLAH3* und Kinase-abhängige Aktivierung

In den vergangenen Jahren hat sich die Forschung mit der strukturellen Evolution der SLAC1-Anionenkanal-Familie beschäftigt. Dabei waren zentrale evolutionäre Schritte der Übergang an Land, die Anpassung an Dehydration, die Entwicklung von Stomata und die Fortpflanzung über Samen (Hedrich and Geiger 2017). Die ersten SLAC1-Anionenkanäle traten bereits bei Carophyten wie der Grünalge (*Klebsormidium nitens*), die als die erste Landpflanze gilt, bei Bryophyten wie Lebermoosen (*Marchantia polymorpha*) und Moosen (*Physcomitrella patens*), bei Lycophyten (*Selaginella moellendorffii*) sowie Farnen (*Ceratopteris richardii*) auf (Lind et al. 2015, McAdam et al. 2016). Bis heute ist es noch nicht gelungen, einen nahen Verwandten der SLAC1-Anionenkanäle in Chlorophyten zu identifizieren. In aquatischen Algen wurden Transporter gefunden, die Malat-Transportern (engl.: malic acid transport proteins (MAEs)) ähneln, aber keine Orthologen der SLAC1-Familie sind (Hedrich and Geiger 2017). In Angiospermen werden drei Klassen von SLAC1-Typ-Anionenkanälen unterschieden: die SLAH1/SLAH4-Gruppe mit SLAH1 und SLAH4, die SLAH2/SLAH3-Gruppe mit SLAH2 und SLAH3 und die SLAC1-Gruppe mit SLAC1 (Dreyer et al. 2012). Die SLAH1/SLAH4-Gruppe hat sich in der Evolution vor dem Auftreten der Bryophyten von den zwei anderen Gruppen der SLAC1-Familie abgespalten. Die Abspaltung der SLAH2/SLAH3-Gruppe von SLAC1 erfolgte evolutionär nach dem Auftreten der Bryophyten, aber vor dem Erscheinen der Lycophyten (Dreyer et al. 2012).

Die Aminosäuresequenzen von SLAH2-3A und SLAH2-3B der Leguminose *M. truncatula* weisen im transmembranen Bereich starke Homologien zu *AtSLAH2* und *AtSLAH3* auf, wobei sich die N- und C-Termini durch starke Sequenzunterschiede auszeichnen (Abbildung 14). Eine ähnliche Beobachtung wurde für den SLAH3 aus Pappel (*PttSLAH3*) gemacht (Jaborsky et al. 2016). Auch Sequenzvergleiche SLAC-ähnlicher Kanäle aus 32 Pflanzenfamilien führten zu dem Ergebnis, dass die Transmembranregion im Gegensatz zu den C- und N-terminalen Bereichen stark konserviert ist (Dreyer et al. 2012). Interessanterweise wurden für die Aktivierung von *AtSLAH3* vier wichtige Phosphorylierungsstellen identifiziert, die sich alle im N-terminalen Bereich des Proteins befinden (Geiger et al. 2011). Trotz des stark divergenten N-terminalen Bereichs scheinen die Phosphorylierungsstellen hoch konserviert zu sein. So finden sich drei der vier Phosphorylierungsstellen des *AtSLAH3* an homologen Positionen in den

Aminosäuresequenzen von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* wieder (Abbildung 14). Auch beim *PttSLAH3* sind diese Phosphorylierungsstellen konserviert, obwohl dieser Pappel-Anionenkanal in Oozyten bereits ohne Proteinkinase konstitutiv aktiv ist (Jaborsky et al. 2016). Dennoch deuten die Phosphorylierungsstellen darauf hin, dass wie bei *AtSLAH3* eine Phosphorylierung durch eine Kinase zur Aktivierung der Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* notwendig ist. Diese Vermutung wurde in der elektrophysiologischen Charakterisierung der Anionenkanäle in *Xenopus*-Oozyten bestätigt. Bei *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* handelt es sich um S-Typ-Anionenkanäle, die zur Aktivierung eine Proteinkinase benötigen. Eine Koexpression von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B*, sowohl mit der Calcium-unabhängigen Kinase *AtOST1* als auch mit den Calcium-abhängigen Kinasen *AtCPK21ΔEF* und *AtCIPK23+CBL1*, führt zur Aktivierung der Anionenkanäle (Abbildung 16a-c, Abbildung 17a). BIFC-Studien bestätigen eine physikalische Interaktion der Kinasen mit *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* (Abbildung 16e, Abbildung 17b-c). Die Aktivierung der *MtSLAH2/3*-Anionenkanäle durch *AtOST1* ist sehr interessant, da der *AtSLAH3* durch SnRK2-Kinasen nicht aktiviert werden kann (s. Kapitel 4.3.3.1).

#### 4.3.2 *MtSLAC1*: Homologien zu *AtSLAC1* und Kinase-abhängige Aktivierung

Ein Sequenzvergleich des Anionenkanals *MtSLAC1* mit dem *Arabidopsis*-homologen *AtSLAC1* weist starke Homologien auf (Abbildung 15). Für *AtSLAC1* wurden drei wichtige Phosphorylierungsstellen identifiziert. Eine N-terminale Phosphorylierungsstelle an Position 120 (Ser<sup>120</sup>) wird von *AtOST1* phosphoryliert, nicht aber von Calcium-abhängigen Kinasen. Die Phosphorylierungsstellen an den Positionen 59 im N-terminalen Bereich (Ser<sup>59</sup>) und 513 im C-Terminus des Proteins (Thr<sup>513</sup>) werden von allen drei den *AtSLAC1* aktivierenden Kinase-Familien (CIPK/CBL, CPK, OST1) zur Phosphorylierung genutzt (Maierhofer et al. 2014a). Alle drei Phosphorylierungsstellen finden sich in der Aminosäuresequenz des *MtSLAC1* wieder (Abbildung 15). Der Anionenkanal *MtSLAC1* konnte in dieser Arbeit ausschließlich in Blattgewebe amplifiziert werden. Folglich liegt eine schließzellspezifische Expression wie beim *AtSLAC1* nahe. Das muss aber noch bewiesen werden.

Eine Aktivierung des *MtSLAC1* erfolgt durch die Kinasen *AtOST1*, *AtCPK21ΔEF* und *AtCIPK23+CBL1*. Dabei findet die stärkste Aktivierung bei Koexpression von *MtSLAC1* mit *AtOST1* statt (Abbildung 20a).

Mit einem relativen Permeabilitätsverhältnis  $P(\text{NO}_3^-)/P(\text{Cl}^-)$  von 4 weist der Anionenkanal *MtSLAC1* im Vergleich zum *AtSLAC1* ( $P(\text{NO}_3^-)/P(\text{Cl}^-)=10$ ) (Geiger et al. 2009) eine höhere Chlorid-Permeabilität auf (Abbildung 21). Der *MtSLAC1* braucht im Gegensatz zu den *MtSLAH2-3*-Anionenkanälen kein extrazelluläres Nitrat zur Aktivierung und entspricht somit hinsichtlich Aktivierbarkeit und Selektivität einem typischen SLAC1-Anionenkanal (Geiger et al. 2009, Geiger et al. 2010, Maierhofer et al. 2014a). Dabei wäre zu diskutieren, was ein „typischer“ SLAC1-Anionenkanal ist. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine SLAC1-Isoform aus der Dattel *Phoenix dactylifera* (*PdSLAC1*) neben OST1 extrazelluläres Nitrat zur Aktivierung benötigt. Folglich verhält sich *PdSLAC1* wie eine Chimäre von *AtSLAC1* und *AtSLAH3* (Muller et al. 2017). Es liegen somit durchaus Unterschiede beim Aktivierungsverhalten von SLAC1-Anionenkanälen verschiedener Arten vor. Allerdings scheinen sich diese Unterschiede in der Nitrataktivierbarkeit hauptsächlich zwischen SLAC1-Anionenkanälen aus Monokotyledonen (nitrataktivierbar) und Dikotyledonen (nitratunabhängig) ausgebildet zu haben. Da *M. truncatula* genauso wie *Arabidopsis* zu den Dikotyledonen zählt, bestätigt die nitratunabhängige Aktivierung von *MtSLAC1* dieses Konzept.

Aufgrund der beschriebenen Ähnlichkeiten zwischen *MtSLAC1* und *AtSLAC1* ist es sehr wahrscheinlich, dass *Arabidopsis* und Leguminosen wie *M. truncatula* bei Trockenheit eine ähnliche ABA-abhängige Aktivierung von SLAC1 in Schließzellen aufweisen. Die Lokalisation des *MtSLAC1* wäre genau wie die elektrophysiologische Charakterisierung bei Koexpression mit den homologen *Arabidopsis*-Kinasen aus *Medicago* von großem Interesse.

Für die Fragestellung dieser Arbeit ist der *MtSLAC1* nicht von Bedeutung, da er in Wurzelgewebe von *M. truncatula* nicht amplifiziert werden konnte. Eine wichtige Rolle bei der RNS und bei der AM ist somit auszuschließen, da beide Symbiosen auf den Wurzelbereich beschränkt sind.

#### 4.3.3 Konservierung von SLAC1 und SnRK2-Kinasen

Die evolutionäre Entwicklung der aktivierenden Kinasen ist ebenso interessant wie die Evolution der Anionenkanäle. Das Moos *Physcometrella* besitzt bereits Stomata und sein Genom codiert für zwei SLAC1-Anionenkanäle (*PpSLAC1* und 2) (Lind et al. 2015) und vier OST1-ähnliche SnRK2-Kinasen (Chater et al. 2011). Lind et al. (2015) untersuchten, wie stark sich die SnRK2-Kinasen im Laufe der Evolution verändert haben und fanden heraus, dass eine

starke Konservierung vorliegt. So kann der SLAC1-Anionenkanal aus *Arabidopsis*-Schließzellen von den OST1-Kinasen aus *Physcometrella* aktiviert werden. Die *Physcometrella*-Anionenkanäle *PpSLAC1* und *PpSLAC2* weisen hingegen bei Koexpression mit OST1-Kinasen aus *Arabidopsis* und *Physcometrella* nur eine geringe bzw. gar keine Aktivierung auf.

Bei weiteren Analysen mit Chimären wurde der N-Terminus sowie ein Abschnitt des C-Terminus vom *AtSLAC1* als essentiell für die Aktivierung durch OST1 nachgewiesen. Der Abschnitt im C-Terminus ist bei *PpSLAC1* vorhanden. So reichte ein Austausch des N-Terminus von *PpSLAC1* gegen den von *AtSLAC1* aus, um eine Aktivierung des *PpSLAC1* durch *AtOST1* zu bewirken. Beim *PpSLAC2* musste sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus gegen die entsprechenden Abschnitte aus *AtSLAC1* ausgetauscht werden, damit der Anionenkanal durch *AtOST1* aktiviert werden konnte (Chater and Gray 2015, Lind et al. 2015).

Ähnliche Experimente mit SLAC1-OST1-Paaren aus dem Lebermoos *M. Polymorpha* und der Grünalge *K. nitens*, die keine Stomata besitzen, zeigten keinerlei Sensitivität der SLAC1-Anionenkanäle für OST1. Die OST1-Isoformen aus *M. polymorpha* und *K. nitens* hingegen führten bei Koexpression in *Xenopus*-Oozyten zur Aktivierung des Schließzell-spezifischen *AtSLAC1*-Anionenkanals. Neben Moosen besitzen auch Lycophyten und Farne Stomata. Die OSTs aus dem Lycophyten *S. moellendorffii* konnten ihre artgleichen SLAC1-Anionenkanäle nicht aktivieren, eine Aktivierung von *AtSLAC1* durch *SmOSTs* war jedoch möglich (McAdam et al. 2016). Die OST1s des Farns *C. richardii* aktivieren sowohl *AtSLAC1* als auch einen ihrer artgleichen SLAC1-Anionenkanäle (*CrSLAC*) (McAdam et al. 2016). Einige SLAC1-Anionenkanäle aus Moosen und Farnen besitzen demnach rudimentäre OST1-Bindedomänen (Hedrich and Geiger 2017). Mc Adam et al. (2016) zeigten außerdem, dass SnRK2-Kinasen in *C. richardii* hauptverantwortlich für die ABA-abhängige Geschlechtsdifferenzierung sind. Somit hat sich das SnRK2/ABA-Signaling in der Evolution schon weit vor seiner essentiellen Rolle in höheren Pflanzen bei Transpiration und CO<sub>2</sub>-Austausch etabliert.

Zusammenfassend konnten folglich alle evolutionären Vorgänger des OST1s aus *Arabidopsis* den *AtSLAC1* aktivieren und es scheint demnach eine hohe Konservierung der SnRK2-Kinase vorzuliegen, die weit über Artgrenzen hinausgeht. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen diese Beobachtung. Sowohl der *MtSLAC1* als auch die SLAH2-3-Anionenkanäle aus *M. truncatula* sind durch die OST1-Kinase aus *Arabidopsis* aktivierbar. Der hohe

Konservierungsgrad der SnRK2-Kinase OST1 lässt eine Phosphorylierung von Anionenkanälen der SLAC1-Familie weit über Artgrenzen hinaus zu.

In weiteren Experimenten wäre es interessant, die Aktivierung der Anionenkanäle *MtSLAC1*, *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* mit den *Arabidopsis*-orthologen Kinasen aus *Medicago* zu untersuchen und mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu vergleichen. Dabei sind für eine Beteiligung an der AM und der RNS insbesondere in Wurzeln exprimierte Proteinkinasen von Interesse.

#### 4.3.3.1 Aktivierung von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* durch *AtOST1*

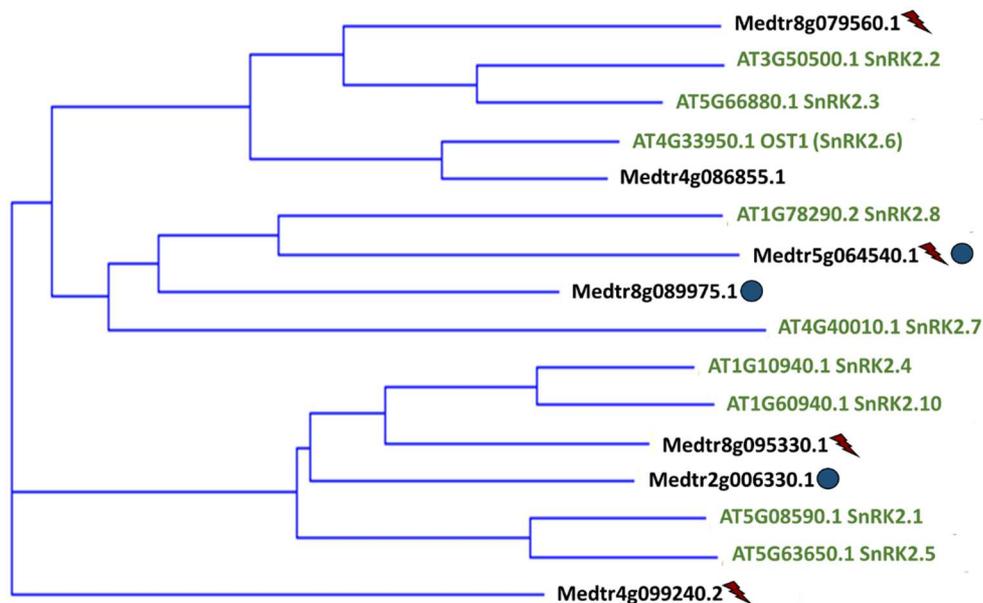
Die Aktivierung der *Medicago*-Anionenkanäle *MtSLAH2-3* durch *AtOST1* (*AtSnRK2.6*) ist interessant, da bisher für diese SnRK2-Kinase in *Arabidopsis* nur eine Aktivierung des ABA-regulierten Anionenkanals *AtSLAC1* in Schließzellen veröffentlicht wurde (Geiger et al. 2009, Lee et al. 2009, Geiger et al. 2010). Der in Schließzellen exprimierte *AtSLAH3* wird nicht über *AtOST1* oder eine andere SnRK2-Kinase aktiviert, sondern nur über Calcium-abhängige Kinasen der CPK- und CIPK-CBL-Familien (Geiger et al. 2011, Maierhofer et al. 2014a). Möglicherweise übt der *MtSLAH2-3* im Gegensatz zum *AtSLAH3* über eine Interaktion mit OST1 eine Funktion in *M. truncatula*-Schließzellen aus. Dafür sollte in zukünftigen Experimenten die Lokalisation von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* in Schließzellen nachgewiesen werden.

Eine andere Möglichkeit wäre die Expression von OST1 oder OST1-ähnlichen ABA-abhängigen Kinasen der SnRK2-Familie in der Wurzel, d.h. eine Wurzel-spezifische Interaktion von *MtSLAH2-3* und OST1/SnRK2s in *M. truncatula*. Während der Calcium-Oszillationen in der frühen Phase der AM und der RNS könnte eine Calcium-unabhängige Kinase von großem Vorteil sein, um unbeeinflusst von den Nod- und Myc-LCO-induzierten Calcium-Fluxen die *MtSLAH2-3*-Aktivität zu regulieren. Neueste elektrophysiologische Untersuchungen zeigen, dass *AtSLAH2* im Gegensatz zu *AtSLAH3* sowohl durch OST1 als auch durch die ebenfalls ABA-abhängigen, aber in der *Arabidopsis*-Wurzel exprimierten Kinasen *AtSnRK2.2* und *AtSnRK2.3* aktiviert werden kann (persönliche Kommunikation T. Maierhofer).

Kürzlich wurde die Funktion des Nitrat-selektiven *AtSLAH2s* beschrieben. Unter Salzstress und/oder ABA-Behandlung übernimmt der *AtSLAH2* die Beladung des Xylems mit Nitrat, da *AtSLAH3* und *AtSLAH1* unter salinen Bedingungen stark reduziert exprimiert werden (Cubero-

Font et al. 2016, Hedrich and Geiger 2017, Li et al. 2017). Dies ist ein Schutzmechanismus der Pflanze, um unter Salzstress eine übermäßige Chloridaufnahme über *AtSLAH3/AtSLAH1* zu verhindern, die Nitratversorgung über den *AtSLAH2* aber weiterhin zu gewährleisten. Eine Aktivierung durch OST1/SnRK2s könnte demnach darauf hindeuten, dass es sich bei *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* um SLAH2-Anionenkanäle handelt. Dieser Vermutung widersprechen jedoch die relative Permeabilität, die Aktivierung durch zytosolische Ansäuerung und die SLAH1-Aktivierung der *MtSLAH2-3*-Anionenkanäle, die bei *AtSLAH2* nicht zu beobachten sind. Neuerdings gibt es Hinweise, dass SLAH2-Anionenkanäle nur in Brassicaceae zu finden sind (persönliche Kommunikation M. Joergensen). Somit könnte es sich bei *MtSLAH2-3* der Fabaceae *M. truncatula* um eine Chimäre aus SLAH2 und SLAH3 handeln, die Funktionen beider Anionenkanäle übernimmt. Diese These unterstützen die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen von *MtSLAH2-3* in dieser Arbeit, die teilweise den bekannten Eigenschaften eines SLAH3- und teilweise denen eines SLAH2-Anionenkanals entsprechen.

Bei der Suche nach *AtOST1*-Homologen in *M. truncatula* konnten sieben SnRK2-Kinasen gefunden werden, von denen laut der Datenbank Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) vier eine Expression in der Wurzel von *M. truncatula* aufweisen (Abbildung 32).



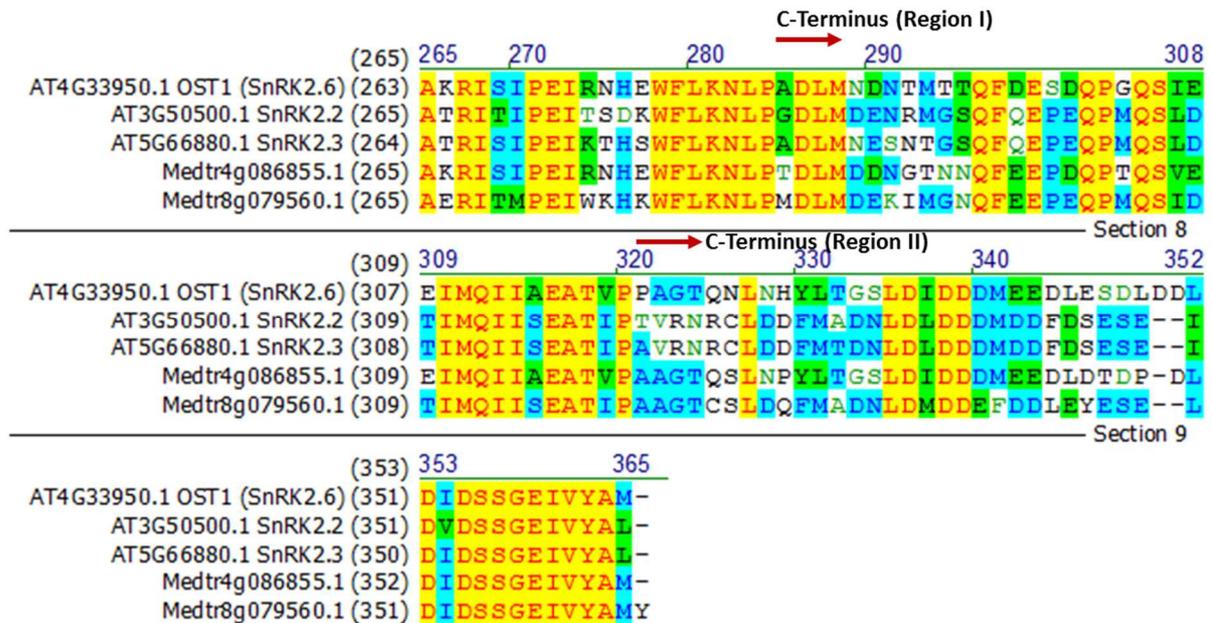
**Abbildung 32: Dendrogramm von AtSnRK2-Kinasen und deren Homologen aus *M. truncatula***

Sieben *Arabidopsis*-homologe SnRK2-Kinasen aus *M. truncatula* wurden unter Verwendung der Datenbank Phytozome identifiziert (Vector NTI, AlignX, multiples Alignment basierend auf ClustalW, Score-Matrix: blosum62mt2). Davon weisen vier eine Expression in *M. truncatula*-Wurzeln (Blitz) auf und drei der *M. truncatula*-SnRK2-Kinasen werden nach Angaben der Datenbank Phytozome in Wurzelknöllchen (Kreis) exprimiert.

Von den vier in Wurzeln exprimierten *Mt*SnRK2-Kinasen weist der Medtr8g079560.1 die größte Homologie zu *At*OST1 und den ABA-abhängigen SnRK2.2- und 2.3- Kinasen aus *Arabidopsis* auf. Drei der *M. truncatula*-SnRK2-Kinasen werden laut Datenbank Phytozome in Wurzelknöllchen exprimiert. Demnach spielen SnRK2-Kinasen auch während der AM und der RNS eine Rolle.

*At*OST1, *At*SnRK2.2 und *At*SnRK2.3 sind die drei hauptbeteiligten SnRK2s beim ABA-Signaling und gehören unter den zehn SnRK2-Kinasen in *Arabidopsis* einer separaten Klade an (Fujii and Zhu 2009, Nakashima et al. 2009, Fujita et al. 2009, Lind et al. 2015). Ein Vergleich von *At*OST1, *At*SnRK2.2 und *At*SnRK2.3 und ihren Homologen aus *M. truncatula* (Medtr4g086855.1, Medtr8g079560.1) zeigt stark konservierte Bereiche im C-Terminus der Kinasen (Abbildung 33). Nach Yoshida et al. (2006) wird der C-Terminus der SnRK2-Kinasen in zwei verschiedene Regionen eingeteilt, wobei die Region I für die ABA-unabhängige und die Region II für die ABA-abhängige Aktivierung verantwortlich ist (Yoshida et al. 2006). Da sich die Region II der C-

Termini von Medtr4g086855.1, Medtr8g079560.1, AtOST1, AtSnRK2.2 und AtSnRK2.3 sehr ähnlich, scheint es sich um ABA-abhängige SnRK2-Kinasen zu handeln.



**Abbildung 33: Ausschnitt eines Alignments von AtSnRK2.2, 2.3 und 2.6 (OST1) und der zwei nächsten Homologen aus *M. truncatula* (Medtr4g086855.1, Medtr8g079560.1)**

Das Alignment wurde mit Vector NTI erstellt (AlignX, multiples Alignment basierend auf ClustalW, Score-Matrix: blosum62mt2). Dargestellt ist der C-Terminus der SnRK2-Kinasen, der in zwei Regionen unterschieden wird. Region I ist für die ABA-unabhängige Aktivierung und Region II für die ABA-abhängige Aktivierung verantwortlich (Yoshida et al. 2006).

Eine starke Konservierung der Kinasen über Artgrenzen hinaus und ihre Ähnlichkeit untereinander könnten zu einer Aktivierung der *Medicago*-Anionenkanäle durch *Arabidopsis*-SnRK2-Kinasen führen. So reichen eventuell konservierte Bereiche des AtOST1s aus, um *Medicago*-Anionenkanäle zu aktivieren.

In weiterführenden Experimenten sollte die Lokalisation der *MtSLAH2-3*-Anionenkanäle bestimmt werden. Zudem sollten die SnRK2-Kinasen aus *M. truncatula* kloniert, in Oozyten mit *MtSLAH2-3A* bzw. *MtSLAH2-3B* koexprimiert und ihr Einfluss auf die Anionenkanalaktivität elektrophysiologisch untersucht werden. In Genexpressionsanalysen könnte der Einfluss von Nod- und Myc-LCOs auf die Expression der in *M. truncatula*-Wurzeln exprimierten SnRK2-

Kinasen überprüft werden. Außerdem sollte der Einfluss von ABA auf die Entwicklung der AM und der RNS näher betrachtet werden.

#### 4.3.4 Relative Anionenpermeabilität und SLAH1-Aktivierung von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B*

In Messungen der Anionenpermeabilität erwies sich *MtSLAH2-3B* als ein vorzugsweise Nitrat-permeabler Kanal mit einer zehnfach höheren Permeabilität für Nitrat als für Chlorid. *MtSLAH2-3A* zeigt eine 13-fach höhere Permeabilität für Nitrat als für Chlorid (Abbildung 19). Diese Werte ähneln der Anionenpermeabilität des *AtSLAC1* mit einem Verhältnis  $P(\text{NO}_3^-)/P(\text{Cl}^-)$  von 10 (Geiger et al. 2009), unterscheiden sich jedoch von den stärker Nitrat-selektiven Anionenkanälen *AtSLAH3* ( $P(\text{NO}_3^-)/P(\text{Cl}^-) = 20$ ) und *AtSLAH2* ( $P(\text{NO}_3^-)/P(\text{Cl}^-) = 82$ ) (Geiger et al. 2011, Maierhofer et al. 2014b).

Basierend auf der Kristallstruktur des bakteriellen Tellurit-Resistenz-Proteins (HiTehA) aus *Haemophilus influenzae* wurden Struktur-Funktions-Analysen mit *AtSLAC1* und *AtSLAH2* durchgeführt, um den Selektivitätsfilter der SLAC/SLAH-Anionenkanäle zu identifizieren. Es wurde festgestellt, dass vorwiegend der Transmembran-Bereich 3 die Selektivität der S-Typ-Anionenkanäle bestimmt (Maierhofer et al. 2014b). Für *AtSLAH2* wurden zwei Phenylalanine (Phe<sup>402</sup>, Phe<sup>231</sup>) im Porenbereich des Proteins gefunden, die die Kinaseabhängigkeit und Nitrat-Selektivität des Kanals bestimmen. Außerdem wurde ein Serin (Ser<sup>228</sup>) im Transmembran-Bereich 3, nahe der Phenylalanine in der Kanalpore, gefunden. Ein Austausch des Serins mit einem Valin macht den *AtSLAH2* zu einem *AtSLAC1*-ähnlichen Kanal. Der nitratspezifische *AtSLAH2* wird durch den Aminosäureaustausch zu einem neben Nitrat- auch Chlorid-permeablen und von extrazellulärem Nitrat unabhängigen Anionenkanal (Maierhofer et al. 2014b). Interessanterweise befindet sich in der Aminosäuresequenz von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* ein Alanin an der Position des polaren Serins (Ser<sup>228</sup>) von *AtSLAH2*. Alanin ist wie auch Valin eine unpolare Aminosäure. Deshalb könnte die im Vergleich zu *AtSLAH2* sehr viel höhere Chlorid-Permeabilität der Anionenkanäle *MtSLAH2-3* möglicherweise auf diesen Unterschied der Aminosäuresequenz zurückzuführen sein.

Sowohl die Aminosäuresequenzanalyse als auch die Kinase-abhängige Aktivierung der Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* deuten darauf hin, dass es sich bei den beiden Anionenkanälen um Homologe von *AtSLAH2* und *AtSLAH3* handelt. Die weniger ausgeprägte

Nitrat-Selektivität und auch die Kinase-unabhängige Aktivierung durch zytosolische Ansäuerung (Abbildung 22, Abbildung 23) spricht für eine nähere Verwandtschaft zum *AtSLAH3*. Ein weiteres Indiz dafür, dass es sich um SLAH3-Anionenkanäle handelt, ist die Aktivierung von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* durch *AtSLAH1*. Diese Interaktion ist in *Arabidopsis AtSLAH3*-spezifisch, d.h. *AtSLAH1* und *AtSLAH2* interagieren nicht (Cubero-Font et al. 2016).

Eine Koexpression von *MtSLAH2-3A* bzw. *MtSLAH2-3B* und *AtSLAH1* in Oozyten führt zu einer Aktivierung der *MtSLAH2-3*-Anionenkanäle in Abwesenheit von externem Nitrat und Proteinkinase (Abbildung 24). Das heißt, bei Koexpression mit *AtSLAH1* sind weder eine Phosphorylierung noch Nitrat nötig, um die *MtSLAH2-3*-Anionenkanäle zu aktivieren. Cubero-Font et al. (2016) zeigten die Aktivierung von SLAH3 durch eine Interaktion mit *AtSLAH1* neben *Arabidopsis* auch für die SLAH3s aus *Dionaea muscipula* (*DmSLAH3*) und *Populus tremula x P. tremuloides* (*PttSLAH3*). Wie in dieser Arbeit herausgefunden ist sie auch für die SLAH2-3-Anionenkanäle aus *M. truncatula* gültig. Dies unterstützt die These der Spezies-übergreifenden Konservierung der Anionenkanäle der SLAC1-Familie. Die Klonierung von SLAH1 aus *M. truncatula* wäre interessant, um die Aktivierung der *MtSLAH2-3*-Anionenkanäle durch *AtSLAH1* mit der Aktivierung durch *MtSLAH1* zu vergleichen. Um zu untersuchen, ob die Funktion der SLAH3/SLAH1-Interaktion mit der in *Arabidopsis* identisch ist, sollte unter Salzstress und ABA-Bedingungen die Genexpression von *MtSLAH2-3* und *MtSLAH1* analysiert werden.

In Abschnitt 4.3.3.1 wurde die Möglichkeit diskutiert, dass es in der Fabaceae *M. truncatula* keinen SLAH2-Anionenkanal gibt und es sich bei *MtSLAH2-3* um eine Chimäre von *AtSLAH2* und *AtSLAH3* handeln könnte. Basierend auf dieser Vermutung stellt sich die Frage, welcher Anionenkanal in *M. truncatula* unter den genannten Stress-Bedingungen die Funktion des *AtSLAH2* übernimmt und für eine Nitrat-selektive Beladung der Xylemgefäße sorgt.

#### 4.4 Analyse der *MtSLAH2-3B*-Transposonmutanten

Die Analyse von Transposonmutanten sollte in dieser Arbeit Aufschluss über die Beteiligung der S-Typ-Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* an der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials geben. Drei *M. truncatula*-Mutantenlinien, die laut Datenbank *Noble Foundation* eine Transposoninsertion im Gen bzw. im Promotor von

*MtSLAH2-3A* (NF14366) oder *MtSLAH2-3B* (NF10039, NF11647) aufweisen, wurden genotypisiert. Nach Mendels Vererbungslehre war eine Segregation der R1-Generation in Homozygote, Heterozygote und Pflanzen ohne die gewünschte Insertion zu erwarten.

Mittels Genotypisierung konnten für die Transposoninsertion im Promotor von *MtSLAH2-3B* in den Linien NF10039 und NF11647 homozygote Pflanzen selektiert werden (Abbildung 26, Abbildung 27). Dass für die Linie NF11647 keine heterozygoten Pflanzen identifiziert wurden, könnte auf die geringe Anzahl an getesteten Pflanzen zurückzuführen sein. Für die Linie NF14366, die eine Transposoninsertion im Exon von *MtSLAH2-3A* tragen soll, konnten in den getesteten Pflanzen weder hetero- noch homozygote Pflanzen gefunden werden (Abbildung 28). Sequenzierungen der genomischen DNA von *MtSLAH2-3A* aus einzelnen Pflanzen der Linie NF14366 konnten jedoch zeigen, dass auch an anderen Positionen des Gens keine Transposoninsertionen vorliegen.

Eine intensivere Suche durch das Screenen einer höheren Anzahl von putativen transgenen Samen oder Pflanzen könnte in Zukunft zur Identifikation einer Knock-out-Linie für das Gen *MtSLAH2-3A* führen. Nur mit der Möglichkeit, eine Knock-out-Pflanze dem Wildtyp gegenüberzustellen, lässt sich abschließend klären, ob diese Anionenkanalisoform für die Nod-LCO-induzierte Depolarisierung des Membranpotentials verantwortlich ist.

#### **4.4.1 Einfluss von *MtSLAH2-3B* auf die Nod-LCO-induzierte Depolarisierung**

Die Veränderung des Membranpotentials nach Zugabe von Nod-LCOs konnte in dieser Arbeit nur in den Transposoninsertionslinien NF10039 und NF11647 des Gens *MtSLAH2-3B* untersucht werden. Da beide Transposoninsertionen im Promotorbereich des Gens *MtSLAH2-3B* lokalisiert sind, musste mittels qPCR getestet werden, welchen Einfluss die Insertion auf die Genexpression von *MtSLAH2-3B* hat. Im für die Transposoninsertion homozygoten Genotyp der Linie NF11647 war die *MtSLAH2-3B*-Genexpression unverändert (Abbildung 29b). Folglich wurde auch bei der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung kein Unterschied zur Kontrolle (Abbildung 30a) und zum Wildtyp R108-1 (Abbildung 7b) festgestellt. Da Transposonmutanten zahlreiche Insertionen tragen, diente der Genotyp, der die Transposoninsertion im Gen *MtSLAH2-3B* nicht trägt, als Kontrolle.

Im für die Transposoninsertion homozygoten Genotyp der Linie NF10039 hingegen war die Expression von *MtSLAH2-3B* im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt (Abbildung 29b). Die

reduzierte Genexpression von *MtSLAH2-3B* hatte allerdings keinen Einfluss auf die Depolarisierung des Membranpotentials nach Nod-LCO Zugabe (Abbildung 30b).

Trotzdem scheint der Genotyp bei der Reaktion der Pflanzenwurzelzellen auf Nod-LCOs eine wichtige Rolle zu spielen, da die Depolarisierung im Kontrollgenotyp, der die Transposoninsertion im Gen *MtSLAH2-3B* nicht trägt, stark erhöht war (Abbildung 30b). Vermutlich trägt dieser Genotyp eine Transposoninsertion in einem Gen, das die Reaktion auf Nod-LCOs verstärkt. Ein Blick auf alle Transposoninsertionen der Linie NF10039 und die Annotationen der mutierten Gene liefert interessante Kandidaten, die bei der Depolarisierung des Membranpotentials als Antwort auf Nod-LCOs beteiligt sein könnten (Abbildung 31). Eine putative Beteiligung der in Abbildung 31 gelb hinterlegten Gene an der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials wird im Folgenden diskutiert.

1. *EF hand calcium-binding family proteins, Calmodulin-interacting like protein, Calcium transporting ATPase 2*

Calcium spielt während der initialen Phase der Entwicklung der AM und der RNS eine essentielle Rolle. Auf der einen Seite kommt es durch Calcium-Oszillationen und deren Dekodierung durch die CCaMK (engl.: calcium- and calmodulin-dependent protein kinase) zur Aktivierung der Genexpression symbiosespezifischer Gene. Zum anderen werden Anionenkanäle, deren Beteiligung an der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials in dieser Arbeit untersucht wurde, von Calcium-abhängigen Kinasen aktiviert. Somit könnten Proteine, die mit Calmodulin interagieren (*Calmodulin-interacting like proteins*), also über Calmodulin Calcium-gesteuert sind, die Reaktion des Membranpotentials auf Nod-LCOs beeinflussen. Auch Proteine, die durch EF-Hand-Motive Calcium binden (*EF hand calcium-binding family proteins*), könnten an der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung beteiligt sein. Die CPKs beispielsweise besitzen vier EF-Hand-Motive (Schultz et al. 2000), an die Calcium bindet und so für die Aktivierung der Kinase sorgt. Die Kinase wiederum aktiviert Anionenkanäle wie die der SLAC1-Familie (Geiger et al. 2011, Geiger et al. 2010).

Auch Proteine, die den Calcium-Gehalt der Zelle regulieren (*Calcium transporting ATPase 2*), wie Plasmamembran-Calcium-ATPasen (PMCA) oder *sarco/endoplasmic reticulum* Calcium-ATPasen (SERCA), sind interessante Kandidaten für eine weitere Untersuchung der

Transposoninsertionslinie NF10039 hinsichtlich einer möglichen Beteiligung an der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials. MCA8, eine Calcium-ATPase der SERCA-Familie, wurde als mit der Symbiose assoziierte Calcium-Pumpe identifiziert, die Calcium während der Oszillationen zurück in das Lumen der Kernhülle pumpt (Capoen et al. 2011).

## 2. LRR and NB-ARC domain disease resistance protein

NB-LRR-Proteine sind Proteine der pflanzlichen Pathogenresistenz, die von sogenannten R-Genen (engl.: resistance gene) kodiert werden. Sie bestehen aus einer Nukleotid-bindenden (engl.: nucleotide-binding (NB)) und einer Leucin-reichen (engl.: leucin-rich repeat (LRR)) Domäne und vermitteln die Immunität von Pflanzen gegen Pathogene (Sacco et al. 2007). Die NB-Domäne bindet und hydrolysiert ATP und reguliert die Aktivität des NB-LRR-Proteins (Tameling et al. 2002, Tameling et al. 2006), während die LRR-Domäne die spezifische Erkennung der pathogenen Effektoren bestimmt (Meyers et al. 1998, Noel et al. 1999, Mondragon-Palomino et al. 2002). Zwischen der NB- und der LRR-Domäne liegt die konservierte ARC-Domäne (Apaf-1) (Van der Biezen and Jones 1998b, van der Biezen and Jones 1998a, Albrecht and Takken 2006), die ebenfalls die Aktivität der NB-LRR-Proteine reguliert (Rairdan and Moffett 2006). NB-LRR-Proteine sind an der Pathogen-Abwehr entweder über bereits vorhandene, entwicklungs-regulierte Barrieren wie Thionine und Defensine beteiligt, oder aber sie sind in Immunantworten nach der Infektion involviert. Hierzu gehören Prozesse wie der hypersensitive Zelltod (engl. hypersensitive cell death (HR)), die lokal erlangte Resistenz (engl. local acquired resistance (LAR)) oder die systemisch erlangte Resistenz (engl. systemic acquired resistance (SAR)) (Uniprot: <http://www.uniprot.org/keywords/KW-0611>).

Über bestimmte microRNAs (miRNAs) können die NB-LRR-Proteine negativ reguliert werden. In *Medicago* wurden zahlreiche miRNAs gefunden, deren Sequenzen mit denen der NB-LRR-Proteine übereinstimmen. D.h. ein gezieltes Zerschneiden der NB-LRR-Proteintranskripte durch miRNAs und somit eine Unterdrückung der Immunantwort findet statt (Zhai et al. 2011, Fei et al. 2015). Dies könnte eine wichtige Rolle bei AM und RNS spielen, um eine Kolonisierung durch den symbiotischen Pilz bzw. das symbiotische Bakterium zu ermöglichen.

NB-LRR-Proteine sind folglich in der frühen Phase der Entwicklung beider Symbiosen von Bedeutung und können eventuell auch indirekt auf die initiale Depolarisierung des

Membranpotentials durch Nod- bzw. Myc-LCOs einwirken. Eine weitere Untersuchung des NB-LRR-Gens in der Transposoninsertionslinie NF10039 wäre deshalb zukünftig von großem Interesse.

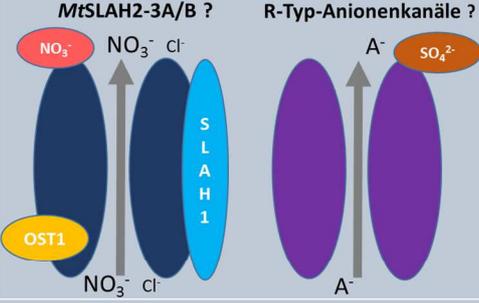
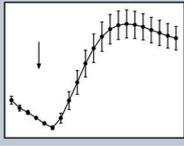
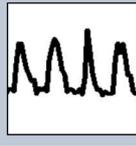
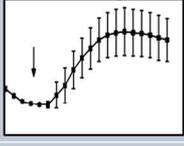
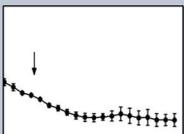
Der zeitliche Rahmen dieser Arbeit ließ eine detaillierte Genotypisierung der Transposonlinie NF10039 sowie eine Analyse der Genexpression der gefundenen Kandidatengene in NF10039 nicht zu. Für weiterführende Studien liefern diese Ergebnisse einen interessanten Ansatz.

Generell spielt der genetische Hintergrund der Pflanze bei der Reaktion auf Nod-LCOs eine wichtige Rolle. Dies zeigen auch die deutlichen Unterschiede in der Stärke der Depolarisierung der *M. truncatula*-Genotypen A17 und R108-1 (Abbildung 7).

#### **4.5 Zusammenfassung und Ausblick**

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine Depolarisierung des Membranpotentials durch Nod-LCOs und sulfatisierte Myc-LCOs in *M. truncatula*-Wurzelhaarzellen nachgewiesen werden. Die Depolarisierung ist stark abhängig vom untersuchten *M. truncatula*-Genotyp. Außerdem scheinen sulfatisierte Myc-LCOs und Nod-LCOs vom selben Perzeptionssystem erkannt zu werden.

Abbildung 34 fasst die Ergebnisse dieser Arbeit zur Nod- und sMyc-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials zusammen und beschreibt die putative Beteiligung von Anionenkanälen der S-Typ- und R-Typ-Familie.

LCOs	Perzeption	Calcium-unabhängige Aktivierung von Anionenkanälen	Änderung des Membranpotentials	Calcium-Oszillationen
sNod				
sMyc				
nsMyc		-		Calcium Oszillationen (Sun et al. 2015)
nsNod		-	keine Depolarisierung (Felle et al. 1995, Kurkdjian 1995)	Calcium Oszillationen (Shaw and Long 2003)

**Abbildung 34: Membranpotentialsdepolarisierung und Calcium-Oszillationen: Ergebnisse dieser Arbeit im Modell**

Wie in dieser Arbeit gezeigt, werden sulfatisierte Nod-LCOs (sNod) und sulfatisierte Myc-LCOs (sMyc) vermutlich über denselben Rezeptor erkannt. Es kommt über eine Aktivierung von Anionenkanälen zu einer Depolarisierung des Membranpotentials und unabhängig davon zu Calcium-Oszillationen. Die Aktivierung der Anionenkanäle ist Calcium-unabhängig. Putative Anionenkanäle sind *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* oder aber Anionenkanäle der R-Typ-Familie. In dieser Arbeit identifizierte elektrophysiologische Charakteristika von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* wie die Abhängigkeit von extrazellulärem Nitrat, die hohe Nitrat-Permeabilität sowie die Aktivierung durch eine Interaktion mit *AtSLAH1* und durch die Calcium-unabhängige SnRK2-Kinase *AtOst1* sind ebenfalls dargestellt. Für eine mögliche Beteiligung von Anionenkanälen der R-Typ-Familie spricht die verstärkte Nod-LCO-induzierte Depolarisierung bei Anwesenheit von extrazellulärem Sulfat. Auch vorstellbar wäre eine Beteiligung von Anionenkanälen sowohl der S-Typ- als auch der R-Typ-Familie. So könnte die Depolarisierung zunächst mit einem Nitrat-Efflux durch *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* beginnen und dann durch die spannungsabhängige Aktivierung von R-Typ-Kanälen verstärkt werden. Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass nicht sulfatisierte Myc-LCOs (nsMyc), genau wie nicht sulfatisierte Nod-LCOs (nsNod) (Felle et al. 1995, Kurkdjian 1995), keine Depolarisierung des Membranpotentials induzieren, obwohl sie Calcium-Oszillationen auslösen (Shaw and Long 2003, Sun et al. 2015).

Desweiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Depolarisierung des Membranpotentials unabhängig von Calcium-Änderungen ist. Folglich ist eine Aktivierung von S-Typ-Anionenkanälen durch Calcium-abhängige Kinasen eher unwahrscheinlich.

In weitestgehenden Experimenten sollte die Aktivierung von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* durch Calcium-unabhängige Kinasen aus *M. truncatula* wie die der SnRK2-Familie untersucht werden. Eine Lokalisationsstudie der Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* wäre außerdem von großem Interesse.

Eine Beteiligung der S-Typ-Anionenkanäle *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* an der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung konnte nicht gezeigt werden. Da die Genexpression der Kandidatengene in den Transposonmutanten gar nicht (NF11647) oder aber nur sehr schwach (NF10039) reduziert war bzw. keine Homozygoten vorlagen (NF14366), kann ein Mitwirken der S-Typ-Anionenkanäle leider nach diesen Studien auch nicht völlig ausgeschlossen werden. Grundsätzlich stellt sich die Frage, ob das Ausschalten eines einzelnen S-Typ-Anionenkanals die Depolarisierung überhaupt signifikant beeinflussen würde, da vermutlich mehrere S-Typ- und vielleicht auch R-Typ-Anionenkanäle die Reaktion verursachen und das Fehlen eines einzelnen Kanals dann nur schwer detektiert werden könnte. *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* beispielsweise sind sich in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnlich und können sich in ihrer Funktion möglicherweise gegenseitig ersetzen. Somit könnte *MtSLAH2-3A* bei einem *Knockout* von *MtSLAH2-3B* einfach seine Funktion übernehmen. Die Depolarisierung des Membranpotentials als Antwort auf Nod-LCOs würde dann unverändert ablaufen.

In Zukunft sollten Anionenkanäle der R-Typ-Familie aus *M. truncatula* elektrophysiologisch charakterisiert werden. Hierfür liefern die in Kapitel 4.1.4 genannten Arbeiten über ALMTs in *L. japonicus* und *M. truncatula* interessante Kandidaten (Takanashi et al. 2016, Young et al. 2011). Knock-out-Mutanten von *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* sowie von *M. truncatula*-Anionenkanälen der R-Typ-Familie sollten zudem hinsichtlich ihrer Nod-LCO-induzierten Depolarisierung untersucht werden. Die CRISPR/Cas-Technik (engl.: CRISPR = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, Cas = CRISPR associated protein) bietet eine gute Möglichkeit zur Herstellung solcher Knock-out-Pflanzen durch ein Herausschneiden bzw. Zerstören des Kandidatengens (Jinek et al. 2012, Schaeffer and Nakata 2015, Cardi and Neal Stewart 2016, Meng et al. 2017). Außerdem sollten die diskutierten Kandidaten-Gene der Linie NF10039 hinsichtlich ihres Einflusses auf die Antwort der *M. truncatula*-Wurzelhaare auf Nod-LCOs untersucht werden.

## 5. Literaturverzeichnis

- AKIYAMA K, MATSUZAKI K AND HAYASHI H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435: 824-827.
- ALBRECHT M AND TAKKEN FL. 2006. Update on the domain architectures of NLRs and R proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 339: 459-462.
- ALLEN GJ, CHU SP, HARRINGTON CL, SCHUMACHER K, HOFFMANN T, TANG YY, GRILL E AND SCHROEDER JI. 2001. A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* 411: 1053-1057.
- AMOR BB, SHAW SL, OLDROYD GE, MAILLET F, PENMETSA RV, COOK D, LONG SR, DENARIE J AND GOUGH C. 2003. The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 34: 495-506.
- ANE JM ET AL. 2004. *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* 303: 1364-1367.
- ARRIGHI JF ET AL. 2006. The *Medicago truncatula* lysin [corrected] motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant physiology* 142: 265-279.
- BANFALVI Z AND KONDOROSI A. 1989. Production of root hair deformation factors by *Rhizobium meliloti* nodulation genes in *Escherichia coli*: HsnD (NodH) is involved in the plant host-specific modification of the NodABC factor. *Plant molecular biology* 13: 1-12.
- BARKER DG, CHABAUD M, RUSSO G AND GENRE A. 2017. Nuclear Ca<sup>2+</sup> signalling in arbuscular mycorrhizal and actinorhizal endosymbioses: on the trail of novel underground signals. *The New phytologist* 214: 533-538.
- BATISTIC O AND KUDLA J. 2004. Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta* 219: 915-924.
- BLUME B, NURNBERGER T, NASS N AND SCHEEL D. 2000. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *The Plant cell* 12: 1425-1440.
- BOLLER T AND FELIX G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology* 60: 379-406.
- BOUDSOCQ M, WILLMANN MR, MCCORMACK M, LEE H, SHAN L, HE P, BUSH J, CHENG SH AND SHEEN J. 2010. Differential innate immune signalling via Ca<sup>2+</sup> sensor protein kinases. *Nature* 464: 418-422.
- BRANDT B, BRODSKY DE, XUE S, NEGI J, IBA K, KANGASJARVI J, GHASSEMIAN M, STEPHAN AB, HU H AND SCHROEDER JI. 2012. Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1 anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 10593-10598.
- CALLAHAM DA AND TORREY JG. 1981. The structural basis for infection

- of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can J Bot* 59: 1647-1664.
- CAMERON DD, NEAL AL, VAN WEES SC AND TON J. 2013. Mycorrhiza-induced resistance: more than the sum of its parts? *Trends in plant science* 18: 539-545.
- CAPOEN W, DEN HERDER J, SUN J, VERPLANCKE C, DE KEYSER A, DE RYCKE R, GOORMACHTIG S, OLDROYD G AND HOLSTERS M. 2009. Calcium spiking patterns and the role of the calcium/calmodulin-dependent kinase C<sub>CaMK</sub> in lateral root base nodulation of *Sesbania rostrata*. *The Plant cell* 21: 1526-1540.
- CAPOEN W ET AL. 2011. Nuclear membranes control symbiotic calcium signaling of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 14348-14353.
- CARDI T AND NEAL STEWART C, JR. 2016. Progress of targeted genome modification approaches in higher plants. *Plant cell reports* 35: 1401-1416.
- CHABAUD M, GENRE A, SIEBERER BJ, FACCIO A, FOURNIER J, NOVERO M, BARKER DG AND BONFANTE P. 2011. Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca<sup>2+</sup> spiking in the legume and nonlegume root epidermis. *The New phytologist* 189: 347-355.
- CHANDRAN V, STOLLAR EJ, LINDORFF-LARSEN K, HARPER JF, CHAZIN WJ, DOBSON CM, LUISI BF AND CHRISTODOULOU J. 2006. Structure of the regulatory apparatus of a calcium-dependent protein kinase (CDPK): a novel mode of calmodulin-target recognition. *Journal of molecular biology* 357: 400-410.
- CHARPENTIER M, BREDEMEIER R, WANNER G, TAKEDA N, SCHLEIFF E AND PARNISKE M. 2008. Lotus japonicus CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis. *The Plant cell* 20: 3467-3479.
- CHARPENTIER M ET AL. 2016. Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science* 352: 1102-1105.
- CHATER C AND GRAY JE. 2015. Stomatal closure: the old guard takes up the SLAC. *Current biology* : CB 25: R271-273.
- CHATER C, KAMISUGI Y, MOVAHEDI M, FLEMING A, CUMING AC, GRAY JE AND BEERLING DJ. 2011. Regulatory mechanism controlling stomatal behavior conserved across 400 million years of land plant evolution. *Current biology* : CB 21: 1025-1029.
- CHEN YH, HU L, PUNTA M, BRUNI R, HILLERICH B, KLOSS B, ROST B, LOVE J, SIEGELBAUM SA AND HENDRICKSON WA. 2010. Homologue structure of the SLAC1 anion channel for closing stomata in leaves. *Nature* 467: 1074-1080.
- CHENG SH, WILLMANN MR, CHEN HC AND SHEEN J. 2002. Calcium signaling through protein kinases. The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant physiology* 129: 469-485.
- COLE KS AND MOORE JW. 1960. Potassium ion current in the squid giant axon: dynamic characteristic. *Biophysical journal* 1: 1-14.

- CORDIER C, POZO MJ, BAREA JM, GIANINAZZI S AND GIANINAZZI-PEARSON V. 1998. Cell Defense Responses Associated with Localized and Systemic Resistance to *Phytophthora parasitica* Induced in Tomato by an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *MPMI* 11: 1017-1028.
- CUBERO-FONT P ET AL. 2016. Silent S-Type Anion Channel Subunit SLAH1 Gates SLAH3 Open for Chloride Root-to-Shoot Translocation. *Current biology* : CB.
- CZAJA LF, HOGEKAMP C, LAMM P, MAILLET F, MARTINEZ EA, SAMAIN E, DENARIE J, KUSTER H AND HOHNJEC N. 2012. Transcriptional responses toward diffusible signals from symbiotic microbes reveal MtNFP- and MtDMI3-dependent reprogramming of host gene expression by arbuscular mycorrhizal fungal lipochitooligosaccharides. *Plant physiology* 159: 1671-1685.
- D'ANGELO C ET AL. 2006. Alternative complex formation of the Ca-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 48: 857-872.
- DE BARY A. 1879. *Die Erscheinung der Symbiose*. Strassburg, Germany: Verlag von Karl J Trubner.
- DEMIR F ET AL. 2013. *Arabidopsis* nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 8296-8301.
- DENARIE J, DEBELLE F AND PROME JC. 1996. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual review of biochemistry* 65: 503-535.
- DEVERS EA, BRANSCHIED A, MAY P AND KRAJINSKI F. 2011. Stars and symbiosis: microRNA- and microRNA\*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant physiology* 156: 1990-2010.
- DOUGLAS A. 2010. *The Symbiotic Habit*. New Jersey: Princeton University Press.
- DOUGLAS AE. 1994. *Symbiotic interactions*. . Oxford, UK: Oxford University Press
- DREYER I, GOMEZ-PORRAS JL, RIANO-PACHON DM, HEDRICH R AND GEIGER D. 2012. Molecular Evolution of Slow and Quick Anion Channels (SLACs and QUACs/ALMTs). *Frontiers in plant science* 3: 263.
- DUBIELLA U, SEYBOLD H, DURIAN G, KOMANDER E, LASSIG R, WITTE CP, SCHULZE WX AND ROMEIS T. 2013. Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 8744-8749.
- EHRHARDT DW, ATKINSON EM AND LONG SR. 1992. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* 256: 998-1000.
- EHRHARDT DW, WAIS R AND LONG SR. 1996. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. *Cell* 85: 673-681.
- ENDRE G, KERESZT A, KEVEI Z, MIHACEA S, KALO P AND KISS GB. 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962-966.

- EVANS NH, MCAINSH MR AND HETHERINGTON AM. 2001. Calcium oscillations in higher plants. *Current opinion in plant biology* 4: 415-420.
- FAUCHER C, MAILLET F, VASSE J, ROSENBERG C, VAN BRUSSEL AA, TRUCHET G AND DENARIE J. 1988. *Rhizobium meliloti* host range nodH gene determines production of an alfalfa-specific extracellular signal. *Journal of bacteriology* 170: 5489-5499.
- FEI Q, LI P, TENG C AND MEYERS BC. 2015. Secondary siRNAs from *Medicago* NB-LRRs modulated via miRNA-target interactions and their abundances. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 83: 451-465.
- FELIX G, DURAN JD, VOLKO S AND BOLLER T 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin *The Plant Journal* Volume 18, Issue 3. *The Plant Journal*, p. 265-276.
- FELIX G, REGENASS M AND BOLLER T 1993. Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state, *The Plant Journal* Volume 4, Issue 2. *The Plant Journal*, p. 307-316.
- FELLE H, KONDOROSI E, KONDOROSI A AND SCHULTZE M. 1996. Rapid alkalinization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitooligosaccharide signals. *The Plant Journal* 10: 295-301.
- FELLE HH, HERRMANN A, HANSTEIN S, HUCKELHOVEN R AND KOGEL KH. 2004. Apoplastic pH signaling in barley leaves attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 17: 118-123.
- FELLE HH, KONDOROSI E, KONDOROSI A AND SCHULTZE M. 1999a. Elevation of the cytosolic free [Ca<sup>2+</sup>] is indispensable for the transduction of the Nod factor signal in alfalfa. *Plant physiology* 121: 273-280.
- FELLE HH, KONDOROSI E, KONDOROSI A AND SCHULTZE M. 1999b. Nod factors modulate the concentration of cytosolic free calcium differently in growing and non-growing root hairs of *Medicago sativa* L. *Planta* 209: 207-212.
- FELLE HH, KONDOROSI E, KONDOROSI A AND SCHULTZE M. 2000. How alfalfa root hairs discriminate between Nod factors and oligochitin elicitors. *Plant physiology* 124: 1373-1380.
- FELLE HH, KONDOROSI É, KONDOROSI Á AND SCHULTZE M. 1995. Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. *The Plant Journal* 7: 939-947.
- FELLE HH, KONDOROSI É, KONDOROSI Á AND SCHULTZE M. 1998. The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa* *The Plant Journal* Volume 13, Issue 4. *The Plant Journal* 13: 455-463.
- FINKEL AG AND GAGE PW. 1985. Conventional voltage clamping with two intracellular microelectrodes. In *Voltage and patch clamping with microelectrodes*. Williams and Wilkins Co: 47-94.
- FINKEL AS AND REDMAN SJ. 1985. Optimal Voltage Clamping with Single Microelectrode. In *Voltage and Patch Clamping with Microelectrodes*. Williams and Wilkins Co: 95-120.

- FRACHISSE JM, THOMINE S, COLCOMBET J, GUERN J AND BARBIER-BRYGOO H. 1999. Sulfate is both a substrate and an activator of the voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis hypocotyl* cells. *Plant physiology* 121: 253-262.
- FRANK A. 1885. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber Dtsch Bot Ges* 3: 128-145.
- FUJII H AND ZHU JK. 2009. *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 8380-8385.
- FUJITA Y ET AL. 2009. Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant & cell physiology* 50: 2123-2132.
- GEIGER D ET AL. 2011. Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1. *Science signaling* 4: ra32.
- GEIGER D ET AL. 2010. Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca<sup>2+</sup> affinities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 8023-8028.
- GEIGER D ET AL. 2009. Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 21425-21430.
- GENRE A ET AL. 2013. Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *The New phytologist* 198: 190-202.
- GENRE A AND RUSSO G. 2016. Does a Common Pathway Transduce Symbiotic Signals in Plant-Microbe Interactions? *Frontiers in plant science* 7: 96.
- GOBBATO E ET AL. 2012. A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Current biology* : CB 22: 2236-2241.
- GOH CH, KINOSHITA T, OKU T AND SHIMAZAKI K. 1996. Inhibition of Blue Light-Dependent H<sup>+</sup> Pumping by Abscisic Acid in *Vicia* Guard-Cell Protoplasts. *Plant physiology* 111: 433-440.
- GRANQVIST E, SUN J, OP DEN CAMP R, PUJIC P, HILL L, NORMAND P, MORRIS RJ, DOWNIE JA, GEURTS R AND OLDROYD GE. 2015. Bacterial-induced calcium oscillations are common to nitrogen-fixing associations of nodulating legumes and nonlegumes. *The New phytologist* 207: 551-558.
- GROTH M ET AL. 2010. NENA, a *Lotus japonicus* homolog of Sec13, is required for rhizodermal infection by arbuscular mycorrhiza fungi and rhizobia but dispensable for cortical endosymbiotic development. *The Plant cell* 22: 2509-2526.
- GRYNKIEWICZ G, POENIE M AND TSIEN RY. 1985. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* 260: 3440-3450.
- GUNDERSEN CB, MILEDI R AND PARKER I. 1983. Serotonin receptors induced by exogenous messenger RNA in *Xenopus oocytes*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 219: 103-109.

- GURDON JB, LANE CD, WOODLAND HR AND MARBAIX G. 1971. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233: 177-182.
- GUZEL DEGER A, SCHERZER S, NUHKAT M, KEDZIERSKA J, KOLLIST H, BROSCHE M, UNYAYAR S, BOUDSOCQ M, HEDRICH R AND ROELFSEMA MR. 2015. Guard cell SLAC1-type anion channels mediate flagellin-induced stomatal closure. *The New phytologist* 208: 162-173.
- HAMILL OP, MARTY A, NEHER E, SAKMANN B AND SIGWORTH FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 391: 85-100.
- HAMILTON DW, HILLS A, KOHLER B AND BLATT MR. 2000. Ca<sup>2+</sup> channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 4967-4972.
- HARMON AC, YOO BC AND MCCAFFERY C. 1994. Pseudosubstrate inhibition of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* 33: 7278-7287.
- HARPER JF, BRETON G AND HARMON A. 2004. Decoding Ca<sup>2+</sup> signals through plant protein kinases. *Annual review of plant biology* 55: 263-288.
- HARPER JF, HUANG JF AND LLOYD SJ. 1994. Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* 33: 7267-7277.
- HARRISON MJ. 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual review of microbiology* 59: 19-42.
- HEDRICH R, BUSCH H AND RASCHKE K. 1990. Ca<sup>2+</sup> and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *The EMBO journal* 9: 3889-3892.
- HEDRICH R AND GEIGER D. 2017. Biology of SLAC1-type anion channels - from nutrient uptake to stomatal closure. *The New phytologist*.
- HILLE B. 1992. Ionic channels of excitable membranes. In 2nd edition edn Sunderland , (Massachusetts, Sinauer Associates Inc).
- HODGKIN AL, HUXLEY AF AND KATZ B. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *The Journal of physiology* 116: 424-448.
- HODGKIN AL AND KATZ B. 1949a. The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *The Journal of physiology* 108: 37-77.
- HODGKIN AL AND KATZ B. 1949b. The effect of temperature on the electrical activity of the giant axon of the squid. *The Journal of physiology* 109: 240-249.
- HOEKENGA OA ET AL. 2006. AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 9738-9743.

- HOFFMANN B, TRINH TH, LEUNG J, KONDOROSI A AND KONDOROSI E. 1997. A New *Medicago truncatula* Line with Superior in Vitro Regeneration, Transformation, and Symbiotic Properties Isolated Through Cell Culture Selection. *MPMI* 10: 307-315.
- HRABAK EM ET AL. 2003. The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant physiology* 132: 666-680.
- HRABAK EM, DICKMANN LJ, SATTERLEE JS AND SUSSMAN MR. 1996. Characterization of eight new members of the calmodulin-like domain protein kinase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* 31: 405-412.
- IMES D, MUMM P, BOHM J, AL-RASHEID KA, MARTEN I, GEIGER D AND HEDRICH R. 2013. Open stomata 1 (OST1) kinase controls R-type anion channel QUAC1 in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 74: 372-382.
- JABORSKY M ET AL. 2016. SLAH3-type anion channel expressed in poplar secretory epithelia operates in calcium kinase CPK-autonomous manner. *The New phytologist* 210: 922-933.
- JEWORUTZKI E, ROELFSEMA MR, ANSCHUTZ U, KROL E, ELZENGA JT, FELIX G, BOLLER T, HEDRICH R AND BECKER D. 2010. Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca-associated opening of plasma membrane anion channels. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 62: 367-378.
- JIMENEZ-GUERRERO I, PEREZ-MONTANO F, MEDINA C, OLLERO FJ AND LOPEZ-BAENA FJ. 2017. The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 Nodulation Outer Protein NopI Is a Determinant for Efficient Nodulation of Soybean and Cowpea Plants. *Applied and environmental microbiology* 83.
- JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA AND CHARPENTIER E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816-821.
- JOURNET EP, PICHON M, DEDIEU A, DE BILLY F, TRUCHET G AND BARKER DG. 1994. *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 6: 241-249.
- KALO P ET AL. 2005. Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* 308: 1786-1789.
- KANAMORI N ET AL. 2006. A nucleoporin is required for induction of Ca<sup>2+</sup> spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 359-364.
- KELLY S, RADUTOIU S AND STOUGAARD J. 2017. Legume LysM receptors mediate symbiotic and pathogenic signalling. *Current opinion in plant biology* 39: 152-158.
- KERPPOLA TK. 2008. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annual review of biophysics* 37: 465-487.
- KEVEI Z ET AL. 2007. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase 1 interacts with NOR1 and is crucial for nodulation in *Medicago truncatula*. *The Plant cell* 19: 3974-3989.

- KOERS S, GUZEL-DEGER A, MARTEN I AND ROELFSEMA MR. 2011. Barley mildew and its elicitor chitosan promote closed stomata by stimulating guard-cell S-type anion channels. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 68: 670-680.
- KOLB HA, MARTEN I AND HEDRICH R. 1995. Hodgkin-Huxley analysis of a GCAC1 anion channel in the plasma membrane of guard cells. *The Journal of membrane biology* 146: 273-282.
- KOLLMEIER M, DIETRICH P, BAUER CS, HORST WJ AND HEDRICH R. 2001. Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. *Plant physiology* 126: 397-410.
- KOLUKISAOGLU U, WEINL S, BLAZEVIC D, BATISTIC O AND KUDLA J. 2004. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant physiology* 134: 43-58.
- KOSUTA S, CHABAUD M, LOUGNON G, GOUGH C, DENARIE J, BARKER DG AND BECARD G. 2003. A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant physiology* 131: 952-962.
- KOSUTA S, HAZLEDINE S, SUN J, MIWA H, MORRIS RJ, DOWNIE JA AND OLDROYD GE. 2008. Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 9823-9828.
- KOVERMANN P, MEYER S, HORTENSTEINER S, PICCO C, SCHOLZ-STARKE J, RAVERA S, LEE Y AND MARTINOIA E. 2007. The Arabidopsis vacuolar malate channel is a member of the ALMT family. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 52: 1169-1180.
- KUCHITSU K, YAZAKI Y, SAKANO K AND SHIBUYA N. 1997. Transient cytoplasmic pH change and ion fluxes through the plasma membrane in suspension-cultured rice cells triggered by N-acetylchitooligosaccharide elicitor. *Plant Cell Physiol* 38: 1012-1018.
- KURKDJIAN AC. 1995. Role of the Differentiation of Root Epidermal Cells in Nod Factor (from *Rhizobium meliloti*)-Induced Root-Hair Depolarization of *Medicago sativa*. *Plant physiology* 107: 783-790.
- LAURESSERGUES D, DELAUX PM, FORMEY D, LELANDAIS-BRIERE C, FORT S, COTTAZ S, BECARD G, NIEBEL A, ROUX C AND COMBIER JP. 2012. The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting NSP2. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 72: 512-522.
- LECOURIEUX D, LAMOTTE O, BOURQUE S, WENDEHENNE D, MAZARS C, RANJEVA R AND PUGIN A. 2005. Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell calcium* 38: 527-538.
- LEE SC, LAN W, BUCHANAN BB AND LUAN S. 2009. A protein kinase-phosphatase pair interacts with an ion channel to regulate ABA signaling in plant guard cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 21419-21424.
- LEROUGE P, ROCHE P, FAUCHER C, MAILLET F, TRUCHET G, PROME JC AND DENARIE J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344: 781-784.

- LEVCHENKO V, KONRAD KR, DIETRICH P, ROELFSEMA MR AND HEDRICH R. 2005. Cytosolic abscisic acid activates guard cell anion channels without preceding Ca<sup>2+</sup> signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 4203-4208.
- LEVY J ET AL. 2004. A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303: 1361-1364.
- LI B, TESTER M AND GILLIHAM M. 2017. Chloride on the Move. *Trends in plant science* 22: 236-248.
- LI HL, WANG W, MORTIMER PE, LI RQ, LI DZ, HYDE KD, XU JC, SOLTIS DE AND CHEN ZD. 2015. Large-scale phylogenetic analyses reveal multiple gains of actinorhizal nitrogen-fixing symbioses in angiosperms associated with climate change. *Scientific reports* 5: 14023.
- LI J AND ASSMANN SM. 1996. An Abscisic Acid-Activated and Calcium-Independent Protein Kinase from Guard Cells of Fava Bean. *The Plant cell* 8: 2359-2368.
- LI J, WANG XQ, WATSON MB AND ASSMANN SM. 2000. Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 287: 300-303.
- LIMPENS E, FRANKEN C, SMIT P, WILLEMSE J, BISSELING T AND GEURTS R. 2003. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302: 630-633.
- LIND C ET AL. 2015. Stomatal guard cells co-opted an ancient ABA-dependent desiccation survival system to regulate stomatal closure. *Current biology* : CB 25: 928-935.
- LINDER B AND RASCHKE K. 1992. A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. *FEBS letters* 313: 27-30.
- LIVAK KJ AND SCHMITTGEN TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- LUDWIG AA, ROMEIS T AND JONES JD. 2004. CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *Journal of experimental botany* 55: 181-188.
- MADSEN EB ET AL. 2003. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* 425: 637-640.
- MAIERHOFER T ET AL. 2014a. Site- and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of SLAC1, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid. *Science signaling* 7: ra86.
- MAIERHOFER T ET AL. 2014b. A Single-Pore Residue Renders the Arabidopsis Root Anion Channel SLAH2 Highly Nitrate Selective. *The Plant cell* 26: 2554-2567.
- MAILLET F ET AL. 2011. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469: 58-63.
- MARMONT G. 1949. Studies on the axon membrane; a new method. *J Cell Physiol* 34: 351-382.
- MARTEN H, HEDRICH R AND ROELFSEMA MR. 2007. Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin-dependent manner. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 50: 29-39.

- MARTIN BD AND SCHWAB E. 2013. Current Usage of Symbiosis and Associated Terminology. *International Journal of Biology* 5.
- MARTIN ML AND BUSCONI L. 2000. Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 24: 429-435.
- MCADAM SA ET AL. 2016. Abscisic acid controlled sex before transpiration in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- MENG Y, HOU Y, WANG H, JI R, LIU B, WEN J, NIU L AND LIN H. 2017. Targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 system in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant cell reports* 36: 371-374.
- MESSINESE E ET AL. 2007. A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 20: 912-921.
- MEYER S, MUMM P, IMES D, ENDLER A, WEDER B, AL-RASHEID KA, GEIGER D, MARTEN I, MARTINOIA E AND HEDRICH R. 2010. AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 63: 1054-1062.
- MEYERS BC, CHIN DB, SHEN KA, SIVARAMAKRISHNAN S, LAVELLE DO, ZHANG Z AND MICHELMORE RW. 1998. The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *The Plant cell* 10: 1817-1832.
- MIDDLETON PH ET AL. 2007. An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *The Plant cell* 19: 1221-1234.
- MILLER JB AND OLDROYD GED. 2012. The role of diffusible signals in the establishment of rhizobial and mycorrhizal symbioses. *Signal Commun Plants* 10: 1-30.
- MITRA RM, GLEASON CA, EDWARDS A, HADFIELD J, DOWNIE JA, OLDROYD GE AND LONG SR. 2004. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 4701-4705.
- MIWA H AND OKAZAKI S. 2017. How effectors promote beneficial interactions. *Current opinion in plant biology* 38: 148–154.
- MIWA H, SUN J, OLDROYD GE AND DOWNIE JA. 2006. Analysis of calcium spiking using aameleon calcium sensor reveals that nodulation gene expression is regulated by calcium spike number and the developmental status of the cell. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 48: 883-894.
- MIYA A, ALBERT P, SHINYA T, DESAKI Y, ICHIMURA K, SHIRASU K, NARUSAKA Y, KAWAKAMI N, KAKU H AND SHIBUYA N. 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 19613-19618.
- MIYATA K ET AL. 2014. The bifunctional plant receptor, OsCERK1, regulates both chitin-triggered immunity and arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice. *Plant & cell physiology* 55: 1864-1872.

- MONDRAGON-PALOMINO M, MEYERS BC, MICHELMORE RW AND GAUT BS. 2002. Patterns of positive selection in the complete NBS-LRR gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Genome research* 12: 1305-1315.
- MORAN N, EHRENSTEIN G, IWASA K, BARE C AND MISCHKE C. 1984. Ion channels in plasmalemma of wheat protoplasts. *Science* 226: 835-838.
- MORIERI G, MARTINEZ EA, JARYNOWSKI A, DRIGUEZ H, MORRIS R, OLDROYD GE AND DOWNIE JA. 2013. Host-specific Nod-factors associated with *Medicago truncatula* nodule infection differentially induce calcium influx and calcium spiking in root hairs. *The New phytologist* 200: 656-662.
- MULLER HM ET AL. 2017. The desert plant *Phoenix dactylifera* closes stomata via nitrate-regulated SLAC1 anion channel. *The New phytologist*.
- MUS F ET AL. 2016. Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. *Applied and environmental microbiology* 82: 3698-3710.
- MUSTILLI AC, MERLOT S, VAVASSEUR A, FENZI F AND GIRAUDAT J. 2002. *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *The Plant cell* 14: 3089-3099.
- NAKASHIMA K ET AL. 2009. Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant & cell physiology* 50: 1345-1363.
- NEGI J, MATSUDA O, NAGASAWA T, OBA Y, TAKAHASHI H, KAWAI-YAMADA M, UCHIMIYA H, HASHIMOTO M AND IBA K. 2008. CO<sub>2</sub> regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452: 483-486.
- NEHER E AND SAKMANN B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.
- NOEL L, MOORES TL, VAN DER BIEZEN EA, PARNISKE M, DANIELS MJ, PARKER JE AND JONES JD. 1999. Pronounced intraspecific haplotype divergence at the RPP5 complex disease resistance locus of *Arabidopsis*. *The Plant cell* 11: 2099-2112.
- NOUR-ELDIN HH, HANSEN BG, NORHOLM MH, JENSEN JK AND HALKIER BA. 2006. Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic acids research* 34.
- OHSTEN RASMUSSEN M, HOGG B, BONO JJ, SAMAIN E AND DRIGUEZ H. 2004. New access to lipochitooligosaccharide nodulation factors. *Organic & biomolecular chemistry* 2: 1908-1910.
- OLDROYD GE. 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature reviews Microbiology* 11: 252-263.
- OLDROYD GE AND DOWNIE JA. 2006. Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Current opinion in plant biology* 9: 351-357.
- OLDROYD GE AND DOWNIE JA. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual review of plant biology* 59: 519-546.

- OP DEN CAMP R ET AL. 2011. LysM-type mycorrhizal receptor recruited for rhizobium symbiosis in nonlegume *Parasponia*. *Science* 331: 909-912.
- PARNISKE M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature reviews Microbiology* 6: 763-775.
- PAWLOWSKI K AND BISSELING T. 1996. Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? *The Plant cell* 8: 1899-1913.
- POZO MJ AND AZCON-AGUILAR C. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current opinion in plant biology* 10: 393-398.
- PRICE NP, RELIC B, TALMONT F, LEWIN A, PROMÉ D, PUEPPKE SG, MAILLET F, DENARIE J, PROMÉ JC AND BROUGHTON WJ. 1992. Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated. *Molecular microbiology* 6: 3575-3584.
- QIU QS, GUO Y, DIETRICH MA, SCHUMAKER KS AND ZHU JK. 2002. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 8436-8441.
- QUINTERO FJ, OHTA M, SHI H, ZHU JK AND PARDO JM. 2002. Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na<sup>+</sup> homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9061-9066.
- RADUTOIU S ET AL. 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425: 585-592.
- RAIRDAN GJ AND MOFFETT P. 2006. Distinct domains in the ARC region of the potato resistance protein Rx mediate LRR binding and inhibition of activation. *The Plant cell* 18: 2082-2093.
- RAMAN H ET AL. 2005. Molecular characterization and mapping of ALMT1, the aluminium-tolerance gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* 48: 781-791.
- RANF S, WUNNENBERG P, LEE J, BECKER D, DUNKEL M, HEDRICH R, SCHEEL D AND DIETRICH P. 2008. Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca<sup>2+</sup> signals induced by abiotic and biotic stresses. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 53: 287-299.
- REMY W, TAYLOR TN, HASS H AND KERP H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 11841-11843.
- RIDGE RW AND ROLFE BG. 1985. *Rhizobium* sp. Degradation of Legume Root Hair Cell Wall at the Site of Infection Thread Origin. *Applied and environmental microbiology* 50: 717-720.
- ROCHE P, DEBELLE F, MAILLET F, LEROUGE P, FAUCHER C, TRUCHET G, DENARIE J AND PROMÉ JC. 1991. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell* 67: 1131-1143.
- ROELFSEMA MR, HEDRICH R AND GEIGER D. 2012. Anion channels: master switches of stress responses. *Trends in plant science* 17: 221-229.

- ROOS A AND BORON WF. 1981. Intracellular pH. *Physiological reviews* 61: 296-434.
- RUDD JJ AND FRANKLIN-TONG VE 2001. Unravelling response-specificity in Ca<sup>2+</sup> signalling pathways in plant cells *New Phytologist* Volume 151, Issue 1. *New Phytologist*, p. 7-33.
- RYAN PR, SKERRETT M, FINDLAY GP, DELHAIZE E AND TYERMAN SD. 1997. Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 6547-6552.
- SACCO MA, MANSOOR S AND MOFFETT P. 2007. A RanGAP protein physically interacts with the NB-LRR protein Rx, and is required for Rx-mediated viral resistance. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 52: 82-93.
- SAITO K ET AL. 2007. NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *The Plant cell* 19: 610-624.
- SANCHEZ-BARRENA MJ, FUJII H, ANGULO I, MARTINEZ-RIPOLL M, ZHU JK AND ALBERT A. 2007. The structure of the C-terminal domain of the protein kinase AtSOS2 bound to the calcium sensor AtSOS3. *Molecular cell* 26: 427-435.
- SANDERS D, BROWNLEE C AND HARPER JF. 1999. Communicating with calcium. *The Plant cell* 11: 691-706.
- SASAKI T, MORI IC, FURUICHI T, MUNEMASA S, TOYOOKA K, MATSUOKA K, MURATA Y AND YAMAMOTO Y. 2010. Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter. *Plant & cell physiology* 51: 354-365.
- SASAKI T, YAMAMOTO Y, EZAKI B, KATSUHARA M, AHN SJ, RYAN PR, DELHAIZE E AND MATSUMOTO H. 2004. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 37: 645-653.
- SCHAEFFER SM AND NAKATA PA. 2015. CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: Transitioning from lab to field. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* 240: 130-142.
- SCHERZER S, MAIERHOFER T, AL-RASHEID KA, GEIGER D AND HEDRICH R. 2012. Multiple calcium-dependent kinases modulate ABA-activated guard cell anion channels. *Molecular plant* 5: 1409-1412.
- SCHMIDT J, WINGENDER R, JOHN M, WIENEKE U AND SCHELL J. 1988. *Rhizobium meliloti* nodA and nodB genes are involved in generating compounds that stimulate mitosis of plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 8578-8582.
- SCHMUTZ J ET AL. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463: 178-183.
- SCHROEDER J, HEDRICH R AND FERNANDEZ JM. 1984. Potassium-selective single channels in guard-cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* 312: 361-362.
- SCHROEDER JI AND KELLER BU. 1992. Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 5025-5029.

- SCHULTZ J, COPLEY RR, DOERKS T, PONTING CP AND BORK P. 2000. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic acids research* 28: 231-234.
- SCHULTZE M, QUICLET-SIRE B, KONDOROSI E, VIRELIZER H, GLUSHKA JN, ENDRE G, GERO SD AND KONDOROSI A. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulfated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 192-196.
- SCHULTZE M, STAEHELIN C, ROHRIG H, JOHN M, SCHMIDT J, KONDOROSI E, SCHELL J AND KONDOROSI A. 1995. In vitro sulfotransferase activity of *Rhizobium meliloti* NodH protein: lipochitooligosaccharide nodulation signals are sulfated after synthesis of the core structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 2706-2709.
- SEDDAS P, GIANINAZZI-PEARSON V, SCHOEFS B, KÜSTER H AND WIPF D. 2009. *Communication and Signaling in the Plant–Fungus Symbiosis: The Mycorrhiza Plant-Environment Interactions. Signaling and Communication in Plants*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg: 45-71.
- SHAW SL AND LONG SR. 2003. Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant physiology* 131: 976-984.
- SIEBERER BJ, CHABAUD M, FOURNIER J, TIMMERS AC AND BARKER DG. 2012. A switch in Ca<sup>2+</sup> spiking signature is concomitant with endosymbiotic microbe entry into cortical root cells of *Medicago truncatula*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 69: 822-830.
- SIEBERER BJ, CHABAUD M, TIMMERS AC, MONIN A, FOURNIER J AND BARKER DG. 2009. A nuclear-targeted cameleon demonstrates intranuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in *Medicago truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors. *Plant physiology* 151: 1197-1206.
- SIMON L, BOUSQUET J, LEVESQUE C AND LALONDE M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.
- SMIT P, RAEDTS J, PORTYANKO V, DEBELLE F, GOUGH C, BISSELING T AND GEURTS R. 2005. NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* 308: 1789-1791.
- SMITH S AND READ D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London, UK 3rd ed.
- SOLTIS DE, SOLTIS PS, MORGAN DR, SWENSEN SM, MULLIN BC, DOWD JM AND MARTIN PG. 1995. Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 2647-2651.
- SOYANO T, KOUCHI H, HIROTA A AND HAYASHI M. 2013. Nodule inception directly targets NF-Y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*. *PLoS genetics* 9: e1003352.
- SPAINK HP, SHEELEY DM, VAN BRUSSEL AA, GLUSHKA J, YORK WS, TAK T, GEIGER O, KENNEDY EP, REINHOLD VN AND LUGTENBERG BJ. 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature* 354: 125-130.
- STACEY GS, BURRIS RH AND EVANS HJ. 1992. *Biological nitrogen fixation*. New York, NY,

USA: Chapman and Hall.

STRACK D, FESTER T, HAUSE B AND WALTER M. 2001. Die arbuskuläre Mykorrhiza. . Biologie in unserer Zeit 31: 286-295.

STRACKE S ET AL. 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. Nature 417: 959-962.

SUN J ET AL. 2015. Activation of symbiosis signaling by arbuscular mycorrhizal fungi in legumes and rice. The Plant cell 27: 823-838.

TADEGE M ET AL. 2008. Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. The Plant journal : for cell and molecular biology 54: 335-347.

TAKANASHI K, SASAKI T, KAN T, SAIDA Y, SUGIYAMA A, YAMAMOTO Y AND YAZAKI K. 2016. A Dicarboxylate Transporter, LjALMT4, Mainly Expressed in Nodules of *Lotus japonicus*. Molecular plant-microbe interactions : MPMI 29: 584-592.

TAMELING WI, ELZINGA SD, DARMIN PS, VOSSSEN JH, TAKKEN FL, HARING MA AND CORNELISSEN BJ. 2002. The tomato R gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. The Plant cell 14: 2929-2939.

TAMELING WI, VOSSSEN JH, ALBRECHT M, LENGAUER T, BERDEN JA, HARING MA, CORNELISSEN BJ AND TAKKEN FL. 2006. Mutations in the NB-ARC domain of I-2 that impair ATP hydrolysis cause autoactivation. Plant physiology 140: 1233-1245.

THOR K AND PEITER E. 2014. Cytosolic calcium signals elicited by the pathogen-associated molecular pattern flg22 in stomatal guard cells are of an oscillatory nature. The New phytologist 204: 873-881.

TORRES MA, DANGL JL AND JONES JD. 2002. Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 517-522.

TRINICK MJ. 1979. Structure of nitrogen-fixing nodules formed by *Rhizobium* on roots of *Parasponia andersonii* Planch. Canadian journal of microbiology 25: 565-578.

TRUCHET G, ROCHE P, LEROUGE P, VASSE J, CAMUT S, DE BILLY F, PROMÉ JC AND DÉNARIÉ J. 1991. Sulphated lipooligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. Nature 351: 670-673.

TSAI TD, SHUCK ME, THOMPSON DP, BIENKOWSKI MJ AND LEE KS. 1995. Intracellular H<sup>+</sup> inhibits a cloned rat kidney outer medulla K<sup>+</sup> channel expressed in *Xenopus* oocytes. The American journal of physiology 268: C1173-1178.

TSIEN RY. 1989. Fluorescent probes of cell signaling. Annu Rev Neurosci 12: 227-253.

VAHISALU T ET AL. 2008. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. Nature 452: 487-491.

- VAN BRUSSEL AA, BAKHUIZEN R, VAN SPRONSEN PC, SPAINK HP, TAK T, LUGTENBERG BJ AND KIJNE JW. 1992. Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of Rhizobium. *Science* 257: 70-72.
- VAN BRUSSEL AA, ZAAT SA, CREMERS HC, WIJFFELMAN CA, PEES E, TAK T AND LUGTENBERG BJ. 1986. Role of plant root exudate and Sym plasmid-localized nodulation genes in the synthesis by Rhizobium leguminosarum of Tsr factor, which causes thick and short roots on common vetch. *Journal of bacteriology* 165: 517-522.
- VAN DER BIEZEN EA AND JONES JD. 1998a. The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current biology : CB* 8: R226-227.
- VAN DER BIEZEN EA AND JONES JD. 1998b. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in biochemical sciences* 23: 454-456.
- VENKATESHWARAN M ET AL. 2015. A role for the mevalonate pathway in early plant symbiotic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 9781-9786.
- VERNIE T, KIM J, FRANCES L, DING Y, SUN J, GUAN D, NIEBEL A, GIFFORD ML, DE CARVALHO-NIEBEL F AND OLDROYD GE. 2015. The NIN Transcription Factor Coordinates Diverse Nodulation Programs in Different Tissues of the Medicago truncatula Root. *The Plant cell* 27: 3410-3424.
- VITART V, CHRISTODOULOU J, HUANG JF, CHAZIN WJ AND HARPER JF. 2000. Intramolecular activation of a Ca(2+)-dependent protein kinase is disrupted by insertions in the tether that connects the calmodulin-like domain to the kinase. *Biochemistry* 39: 4004-4011.
- WAIS RJ, GALERA C, OLDROYD G, CATOIRA R, PENMETSA RV, COOK D, GOUGH C, DENARIE J AND LONG SR. 2000. Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of Medicago truncatula. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 13407-13412.
- WAIS RJ, KEATING DH AND LONG SR. 2002. Structure-function analysis of nod factor-induced root hair calcium spiking in Rhizobium-legume symbiosis. *Plant physiology* 129: 211-224.
- WALTER M ET AL. 2004. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 40: 428-438.
- WENDEHENNE D, LAMOTTE O, FRACHISSE JM, BARBIER-BRYGOO H AND PUGIN A. 2002. Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *The Plant cell* 14: 1937-1951.
- WOOD SM AND NEWCOMB W. 1989. Nodule morphogenesis: the early infection of alfalfa (Medicago sativa) root hairs by Rhizobium meliloti. *Can J Bot* 67: 3108-3122.
- YANO K ET AL. 2008. CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 20540-20545.
- YE W, MUROYAMA D, MUNEMASA S, NAKAMURA Y, MORI IC AND MURATA Y. 2013. Calcium-dependent protein kinase CPK6 positively functions in induction by yeast elicitor of stomatal

- closure and inhibition by yeast elicitor of light-induced stomatal opening in Arabidopsis. *Plant physiology* 163: 591-599.
- YOSHIDA R, UMEZAWA T, MIZOGUCHI T, TAKAHASHI S, TAKAHASHI F AND SHINOZAKI K. 2006. The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry* 281: 5310-5318.
- YOUNG ND ET AL. 2011. The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480: 520-524.
- ZAAT SA, VAN BRUSSEL AA, TAK T, PEES E AND LUGTENBERG BJ. 1987. Flavonoids induce Rhizobium leguminosarum to produce nodDABC gene-related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. *Journal of bacteriology* 169: 3388-3391.
- ZHAI J ET AL. 2011. MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*: 2540–2553.
- ZHENG X, HE K, KLEIST T, CHEN F AND LUAN S. 2015a. Anion channel SLAH3 functions in nitrate-dependent alleviation of ammonium toxicity in Arabidopsis. *Plant, cell & environment* 38: 474-486.
- ZHENG X, HE KAI, KLEIST T, CHEN F AND LUAN S 2015b. Anion channel SLAH3 functions in nitrate-dependent alleviation of ammonium toxicity in Arabidopsis *Plant, Cell & Environment* Volume 38, Issue 3. *Plant, cell & environment*, p. 474-486.

## 6. Anhang

### 6.1 Aminosäuresequenzvergleiche der Gene *MtSLAH2-3A* und *MtSLAH2-3B* aus den Genotypen A17 und R108

										Section 1
MtSLAH2-3A R108	(1)	1	10	20	30	40	51			
MtSLAH2-3A A17	(1)									
										Section 2
MtSLAH2-3A R108	(52)	52	60	70	80	90	102			
MtSLAH2-3A A17	(49)									
										Section 3
MtSLAH2-3A R108	(103)	103	110	120	130	140	153			
MtSLAH2-3A A17	(100)									
										Section 4
MtSLAH2-3A R108	(154)	154	160	170	180	190	204			
MtSLAH2-3A A17	(151)									
										Section 5
MtSLAH2-3A R108	(205)	205	210	220	230	240	255			
MtSLAH2-3A A17	(202)									
										Section 6
MtSLAH2-3A R108	(256)	256	270	280	290	308				
MtSLAH2-3A A17	(253)									
										Section 7
MtSLAH2-3A R108	(307)	307	320	330	340	357				
MtSLAH2-3A A17	(304)									
										Section 8
MtSLAH2-3A R108	(358)	358	370	380	390	408				
MtSLAH2-3A A17	(355)									
										Section 9
MtSLAH2-3A R108	(409)	409	420	430	440	459				
MtSLAH2-3A A17	(406)									
										Section 10
MtSLAH2-3A R108	(460)	460	470	480	490	500	510			
MtSLAH2-3A A17	(457)									
										Section 11
MtSLAH2-3A R108	(511)	511	520	530	540	550	561			
MtSLAH2-3A A17	(508)									
										Section 12
MtSLAH2-3A R108	(562)	562	570	580	590	600	612			
MtSLAH2-3A A17	(559)									
										Section 13
MtSLAH2-3A R108	(613)	613								
MtSLAH2-3A A17	(610)									
MtSLAH2-3A R108	(610)	PN-								
MtSLAH2-3A A17	(613)	PN-								

Abbildung 35: Aminosäuresequenzvergleich des Gens *MtSLAH2-3A*

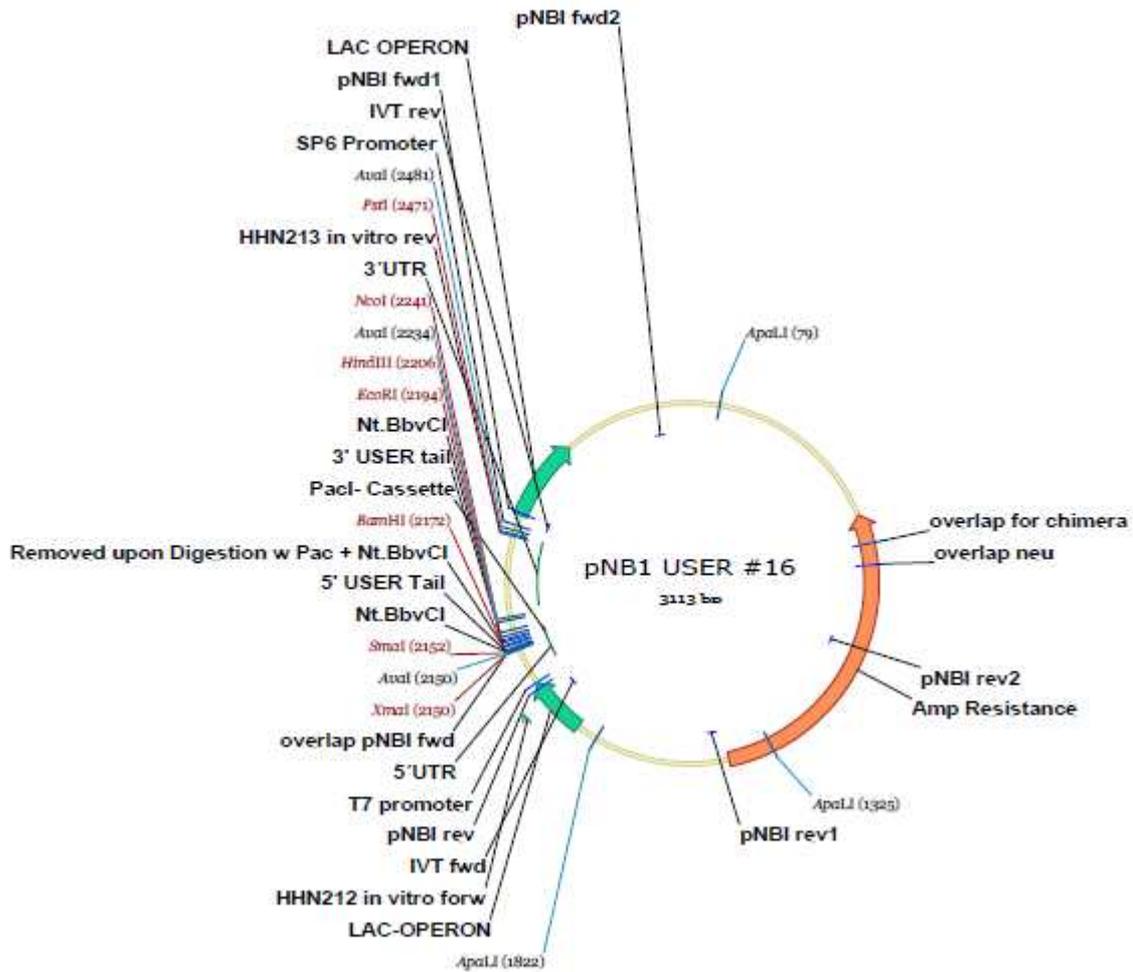
Die *MtSLAH2-3A*-Aminosäuresequenzen der *M. truncatula*-Genotypen R108-1 und A17 im Vergleich.

		Section 1					
		(1)	10	20	30	40	51
MtSLAH2-3B R108	(1)	MENHITLIEIEQASPPETPSLIKVISSNELEDFDFDSEFFPSFN					SKESEET
MtSLAH2-3B A17	(1)	MENHITLIEIEQASPPETPSLIKVISSNELEDFDFDSEFFPSFI					SKESEET
		Section 2					
		(52)	60	70	80	90	102
MtSLAH2-3B R108	(52)	YNHORKPSISVSMPLCYKETOLOSLNNNNNKNVFSFGENVIRDDLAGSIA					
MtSLAH2-3B A17	(52)	YNHORKPSISVSMPLCYKETOLOSLNNNNNKNVFSFGENVIRDDLAGSIA					
		Section 3					
		(103)	110	120	130	140	153
MtSLAH2-3B R108	(103)	MSEPPROSKFKSOPMPKGVAFODGYSOTGKANRNHNOPGIKMFDRKRFDSF					
MtSLAH2-3B A17	(103)	MSEPPROSKFKSOPMPKGVAFODGYSOTRKANRNHNOPGIKMFDRKRFDSF					
		Section 4					
		(154)	160	170	180	190	204
MtSLAH2-3B R108	(154)	KTWGGGLEROLSILRGKEPIGNAODGNNVTRSFDRALPVDRYFDALEGPE					
MtSLAH2-3B A17	(154)	KTWGGGLEROLSILRGKEPIGNAODGNNVTRSFDRALPVDRYFDALEGPE					
		Section 5					
		(205)	210	220	230	240	255
MtSLAH2-3B R108	(205)	LETLSSEEIMLPHDKQWPFLLRFPVSSFGICLVSSOAILWKT LATSPTT					
MtSLAH2-3B A17	(205)	LETLSSEEIMLPHDKQWPFLLRFPVSSFGICLVSSOAILWKT LATSPTT					
		Section 6					
		(256)	270	280	290	308	
MtSLAH2-3B R108	(256)	EFLHITPKINLILWYI SAVLIATIFAVYILKLLFYFEAVRREYYHPIRVNF					
MtSLAH2-3B A17	(256)	EFLHITPKINLILWYI SAVLIATIFAVYILKLLFYFEAVRREYYHPIRVNF					
		Section 7					
		(307)	320	330	340	357	
MtSLAH2-3B R108	(307)	FFAPWIALFLALGVPPSITKNLHOSLWYILMAPILFLELKIYGOWMSGGO					
MtSLAH2-3B A17	(307)	FFAPWIALFLALGVPPSITKNLHOSLWYILMAPILFLELKIYGOWMSGGO					
		Section 8					
		(358)	370	380	390	408	
MtSLAH2-3B R108	(358)	RRLSKVANPSNHLVGVNFVGGALLGASMGLEIGPIFFFAVGLAHYTVLFVT					
MtSLAH2-3B A17	(358)	RRLSKVANPSNHLVGVNFVGGALLGASMGLEIGPIFFFAVGLAHYTVLFVT					
		Section 9					
		(409)	420	430	440	459	
MtSLAH2-3B R108	(409)	LYORLPTNATLPKELHPVFFLFVAAPSVASMAWAKI OGSFDYGSRIAYFIA					
MtSLAH2-3B A17	(409)	LYORLPTNATLPKELHPVFFLFVAAPSVASMAWAKI OGSFDYGSRIAYFIA					
		Section 10					
		(460)	470	480	490	500	510
MtSLAH2-3B R108	(460)	LFLYFSLAVRINFFRGFKFSLAWWAYTFPMTGAAIATIRYSNOVPNIVTKS					
MtSLAH2-3B A17	(460)	LFLYFSLAVRINFFRGFKFSLAWWAYTFPMTGAAIATIRYSNOVPNIVTKS					
		Section 11					
		(511)	520	530	540	550	561
MtSLAH2-3B R108	(511)	LCIALALISTFTVIALLLSTILHAFVFRDLFPNDIAIAISDRKRKPKHKHWL					
MtSLAH2-3B A17	(511)	LCIALALISTFTVIALLLSTILHAFVFRDLFPNDIAIAISDRKRKPKHKHWL					
		Section 12					
		(562)	570	580	590	608	
MtSLAH2-3B R108	(562)	GFRYGSODSKEIENYLKFNVDSSSLDDSTPOPPSSNDTDHNLPK -					
MtSLAH2-3B A17	(562)	-FRYGSODSKEIENYLKFNVDSSSLDDSTPOPPSSNDTDHNLPK -					

Abbildung 36: Aminosäuresequenzvergleich des Gens *MtSLAH2-3B*

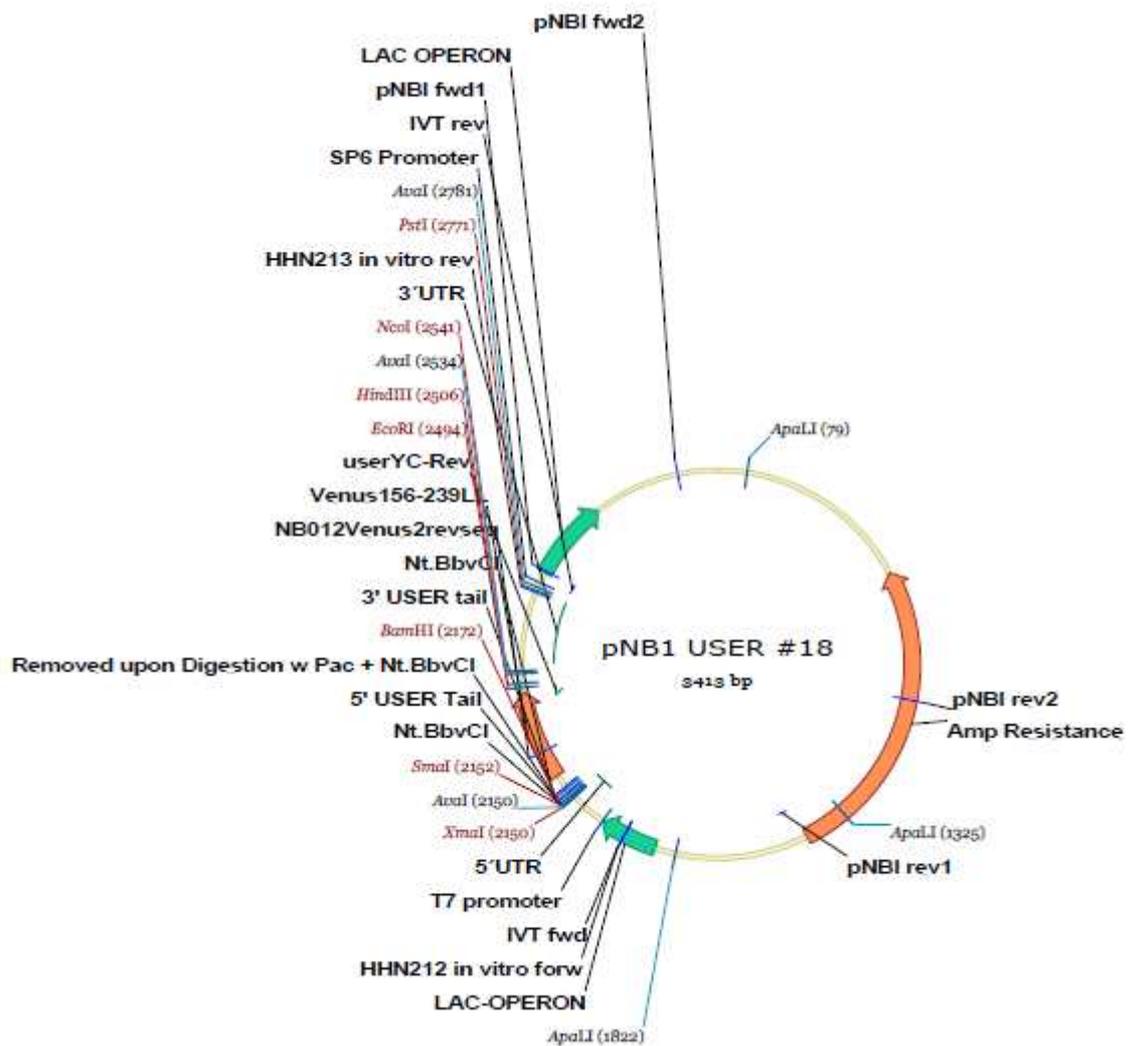
Die *MtSLAH2-3B*-Aminosäuresequenzen der *M. truncatula*-Genotypen R108-1 und A17 im Vergleich.

## 6.2 Vektorkarten



**Abbildung 37: Vektorkarte pNB1u16**

USER-kompatibler Oozyten-Expressionsvektor pNB1u16 mit Ampicillin-Resistenz.



**Abbildung 38: Vektorkarte pNB1u18**

USER-kompatibler Oozyten-Expressionsvektor pNB1u18 mit C-terminaler Hälfte eines YFP downstream der USER-Kassette.

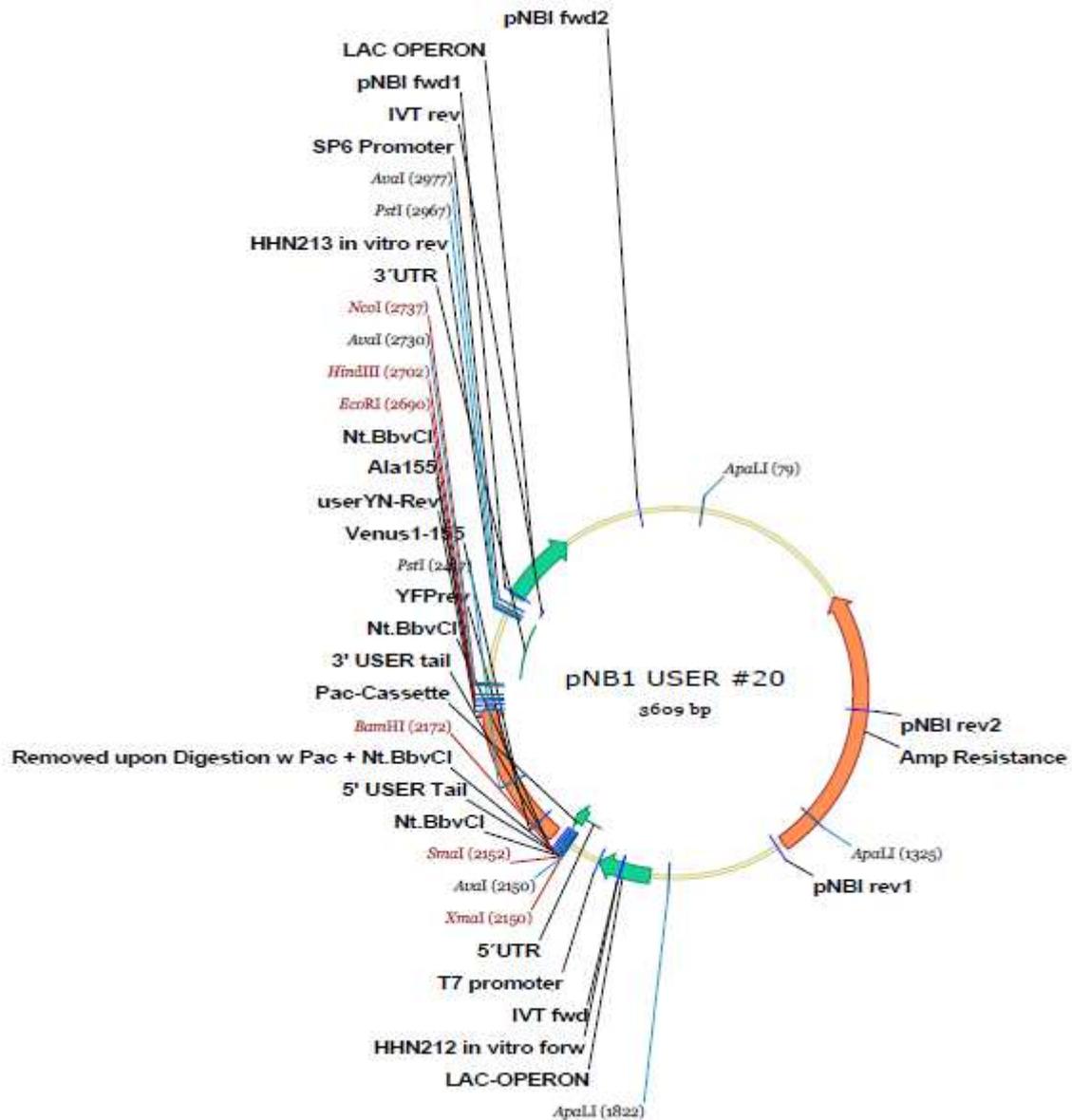


Abbildung 39: Vektorkarte pNB1u20

USER-kompatibler Oozyten-Expressionsvektor pNB1u20 mit N-terminaler Hälfte eines YFP downstream der USER-Kassette.

### 6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur eines Nod-LCOs .....	5
Abbildung 2: Chemische Strukturen von Myc-LCOs.....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Signaltransduktionsweges der RNS und AM.....	10
Abbildung 4: Vereinfachtes Modell zur Depolarisierung des Membranpotentials von <i>M. truncatula</i> Wurzelhaarzellen .....	19
Abbildung 5: Spannungspulsprotokoll, das in den Experimenten dieser Arbeit genutzt wurde .....	40
Abbildung 6: <i>M. truncatula</i> -Wurzelhaareinstich.....	57
Abbildung 7: Einfluss von Nod-LCOs auf das Membranpotential von <i>M. truncatula</i> -Wurzelhaarzellen .....	58
Abbildung 8: Myc-LCO-induzierte Depolarisierung des Membranpotentials von <i>M. truncatula</i> -Wurzelhaarzellen .....	60
Abbildung 9: Beeinflussung der Nod-LCO-induzierten Depolarisierung des Membranpotentials durch die verschiedenen Myc-LCOs.....	62
Abbildung 10: Einfluss der extrazellulären Anionenkonzentrationen auf die Nod-LCO-induzierte Depolarisierung des Membranpotentials in Wurzelhaarzellen von <i>M. truncatula</i> .....	64
Abbildung 11: Änderungen der zytosolischen Ca <sup>2+</sup> -Konzentration in <i>M. truncatula</i> -Wurzelhaarzellen nach der Zugabe von Nod-LCOs .....	66
Abbildung 12: Zusammenhang zwischen Änderungen der zytosolischen Calcium-Konzentration und des Membranpotentials in <i>M. truncatula</i> -Wurzelhaarzellen nach der Zugabe von Nod-LCOs .....	68
Abbildung 13: Dendrogramm von AtSLAC1 und seinen vier Homologen aus <i>A. thaliana</i> sowie den dazu orthologen Anionenkanälen aus <i>M. truncatula</i> .....	71
Abbildung 14: Vergleich der Anionenkanäle SLAH2 und SLAH3 aus <i>A. thaliana</i> und <i>M. truncatula</i> .....	72
Abbildung 15: Vergleich der Anionenkanäle SLAC1 aus <i>A. thaliana</i> und <i>M. truncatula</i> .....	73
Abbildung 16: MtSLAH2-3B-vermittelte Anionenströme und BIFC-Interaktionsstudien.....	75
Abbildung 17: Aktivierung von MtSLAH2-3A und MtSLAH2-3B durch die Kinasen AtOST1, AtCPK21ΔEF und AtCIPK23+CBL1 .....	77
Abbildung 18: Nitratabhängige Aktivierung von MtSLAH2-3B + AtCPK21ΔEF in <i>Xenopus</i> -Oozyten ..	79
Abbildung 19: Bestimmung der Anionenselektivität von MtSLAH2-3B und MtSLAH2-3A in <i>Xenopus</i> -Oozyten.....	80
Abbildung 20: Aktivierung von MtSLAC1 durch die Kinasen AtOST1, AtCPK21ΔEF und AtCIPK23 CBL1 .....	82
Abbildung 21: Relative Permeabilität von MtSLAC1.....	83
Abbildung 22: Kanalaktivierung nach zytosolischer Azidifikation .....	85

Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der pH-induzierten Kanalaktivierung.....	86
Abbildung 24: Kanalaktivierung durch Koexpression mit <i>AtSLAH1</i> .....	87
Abbildung 25: Schematische Darstellung des Prinzips der Genotypisierung der <i>Tnt1</i> - Transposoninsertionslinien mittels PCR.....	90
Abbildung 26: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCRs zur Genotypisierung der <i>Tnt1</i> - Transposoninsertionslinie NF10039 .....	91
Abbildung 27: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCRs zur Genotypisierung der <i>Tnt1</i> - Insertionslinie NF11647 .....	92
Abbildung 28: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCRs zur Genotypisierung der <i>Tnt1</i> - Transposoninsertionslinie NF14366 .....	93
Abbildung 29: Lokalisation der <i>Tnt1</i> -Transposoninsertionen und deren Einfluss auf die Genexpression von <i>MtSLAH2-3B</i> .....	95
Abbildung 30: Membranpotentialsmessungen an Wurzelhaarzellen der <i>Tnt1</i> - Transposoninsertionslinien NF11647 und NF10039 .....	96
Abbildung 31: Gene mit <i>Tnt1</i> -Transposoninsertionen in der Linie NF10039 .....	97
Abbildung 32: Dendrogramm von <i>AtSnRK2</i> -Kinasen und deren Homologen aus <i>M. truncatula</i> ....	113
Abbildung 33: Ausschnitt eines Alignments von <i>AtSnRK2.2</i> , <i>2.3</i> und <i>2.6 (OST1)</i> und der zwei nächsten Homologen aus <i>M. truncatula</i> ( <i>Medtr4g086855.1</i> , <i>Medtr8g079560.1</i> ) .....	114
Abbildung 34: Membranpotentialsdepolarisierung und Calcium-Oszillationen: Ergebnisse dieser Arbeit im Modell .....	121
Abbildung 35: Aminosäuresequenzvergleich des Gens <i>MtSLAH2-3A</i> .....	140
Abbildung 36: Aminosäuresequenzvergleich des Gens <i>MtSLAH2-3B</i> .....	141
Abbildung 37: Vektorkarte pNB1u16 .....	142
Abbildung 38: Vektorkarte pNB1u18 .....	143
Abbildung 39: Vektorkarte pNB1u20 .....	144

## 6.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der ND96-Lösung .....	35
Tabelle 2: Standardmesslösungen für die Charakterisierung der <i>M. truncatula</i> -Anionenkanäle.....	41
Tabelle 3: Messlösungen zur Bestimmung der Selektivität der Anionenkanäle.....	42
Tabelle 4: Zusammensetzung des Lysis-Puffers (DNA Iso nach Köln Methode) .....	45
Tabelle 5: Reaktionsansatz der DNase-Behandlung .....	46
Tabelle 6: Reaktionsansatz für die reverse Transkription von mRNA in cDNA.....	46
Tabelle 7: Auflistung der zur Amplifikation kodierender Sequenzen putativer Ionenkanäle verwendeten USER-Primer.....	47
Tabelle 8: Ansatz der Standard-PCR, der sowohl zur Amplifikation kodierender Sequenzen putativer Ionenkanäle als auch zur Genotypisierung der Transposon-Mutanten genutzt wurde .....	48
Tabelle 9: PCR-Programm, das sowohl zur Amplifikation kodierender Sequenzen putativer Ionenkanäle als auch zur Genotypisierung der Transposon-Mutanten genutzt wurde .....	48
Tabelle 10: Übersicht über die für die Genotypisierung der Tranposon-Mutanten verwendeten PCR- Primer .....	49
Tabelle 11: Auflistung der in der qPCR verwendeten Primer.....	49
Tabelle 12: Reaktionsansatz der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qPCRs.....	50
Tabelle 13: Light Cycler-Standard-Programm der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qPCRs	50
Tabelle 14: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten USER-Vektoren .....	52
Tabelle 15: Reaktionsansatz der USER-Reaktion.....	52
Tabelle 16: Reaktionsansatz der IVT-PCR .....	54
Tabelle 17: Programm der IVT-PCR .....	55
Tabelle 18: Standardansatz der <i>in vitro</i> -Transkription.....	55
Tabelle 19: Auflistung der von der <i>Noble Foundation</i> für die Gene <i>MtSLAH2-3A</i> und <i>MtSLAH2-3B</i> identifizierten Tnt1-Transposoninsertionslinien.....	89
Tabelle 20: Übersicht der Ergebnisse der Genotypisierung der Tnt1-Transposoninsertionslinien NF10039, NF11647 und NF14366 .....	93

## 6.6 Abkürzungsverzeichnis

A17	<i>M. truncatula</i> Genotyp
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
Ag	Silber
AgCl	Silberchlorid
ALMT	aluminum activated malate transporter
AM	Arbuscular Mycorrhiza
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
<i>A. thaliana, At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	Basenpaare
BIFC	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
CaM	Calmodulin
CBL	Calcineurin B-like
CCaMK	Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase
cDNA	complementary DNA
CDPK	Ca <sup>2+</sup> -dependent protein kinase
CE	Stromelektrode
CIPK	CBL-interacting protein kinase
Cl <sup>-</sup>	Chlorid-Ion
CLSM	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie
CNGC	cyclic nucleotide-gated channel
CO	Chitinoligosaccharid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CO4	Tetra-Acetyl Chitotetraose

CPK	Ca <sup>2+</sup> -dependent protein kinase
cRNA	complementary RNA
Cs <sup>+</sup>	Caesium-Ion
CT	C-Terminus
C <sub>T</sub>	cycle threshold
DA/AD	Digital-Analog/Analog-Digital-Wandler
DEVC	Double electrode voltage clamp
d.h.	das heißt
DMI 1-3	Does not Make Infection Proteine 1 bis 3
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EF-Hand	Spezifisches Aminosäuremotiv
EGTA	Ethylenglykol-bis (2-aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alteres
EtOH	Ethanol
Enod12	Nodulierungsgen
F	Faradaykonstante
g	Erdbeschleunigung
GHK	Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O	Wasser
HiTehA	Tellurit-Resistenz Protein aus <i>Haemophilus influenzae</i>
Hz	Herz
I	Strom
I <sub>inst</sub>	instantane Ströme
I <sub>ss</sub>	Gleichgewichtsströme
I <sub>tail</sub>	Folgepulsströme
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion

---

KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
<i>L. japonicus, Lj</i>	<i>Lotus japonicus</i>
LCO	Lipochitinoligosaccharid
LRR-RLK	leucin rich repeat receptor like kinase
LYK3	LysM receptor kinase 3
LysM-RLK	lysin motiv receptor like kinase
M	Molar
max.	maximal
MES	Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
mRNA	messenger RNA
<i>M. truncatula, Mt</i>	<i>Medicago truncatula</i>
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i>
MAMP	Microbe-Associated-Molecular-Pattern
MCA8	Calcium-ATPase der SERCA-Familie
n	Anzahl
N <sub>2</sub>	molekularer Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NFP	Nod factor perception
NFR1	Nod factor receptor 1
NFR5	Nod factor receptor 5
nM	Nanomolar
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat-Ion
NodSM	<i>S. meliloti</i> Nod-LCO

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
nsMyc	nicht-sulfatisierter Myc-LCO
NT	N-Terminus
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
OST	Open stomata
P	Permeabilität
P <sub>o</sub>	Offenwahrscheinlichkeit
PPA	prepenetration apparatus
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Potentialelektrode
pH	Potentia Hydrogenii
PM	Plasmamembran
%	Prozent
QUAC	quickly activating anion conductance
R	Gaskonstante
R108-1	<i>M. truncatula</i> Genotyp
RE	Referenzelektrode
Rel.	relativ
RNA	Ribonucleic acid
RNS	Root Nodule Symbiosis
ROS	Reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
S	Sulfatgruppe
s	Sekunde
SDS	sodium dodecyl sulfate
SE	standard error
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SLAC1	Slow anion channel associated 1
SLAH1-4	SLAC1-Homolog 1-4
SM, <i>S. meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>

---

sMyc	sulfatisierter Myc-LCO
SnRK	Snf-1 related kinase
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfat-Ion
t	Zeit
T	absolute Temperatur
TF	Transkriptionsfaktor
Tnt1	transposable element of <i>Nicotiana tabacum</i> cell type 1
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Spannung
U <sub>rev</sub>	Umkehrpotential
USER	uracil-specific excision reagent
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettstrahlung
V <sub>m</sub>	Membranpotential
<i>V. faba</i>	<i>Vicia faba</i>
WT	Wildtyp
YFP	yellow fluorescent protein
z.B.	zum Beispiel
τ	Zeitkonstante
%	Prozent
~	ungefähr
Ω	Ohm (elektrischer Widerstand)
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
μM	Mikromolar
Δ mV	Membranpotentialdifferenz in mV

## 7. Lebenslauf und Publikationsliste

### 7.1 Curriculum Vitae

**Anna-Lena Hürter**

Master of Science

#### **Bildungsweg**

---

- seit 01.11.2012**      **Promotionsstudentin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**  
Botanik I - Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik, Julius-v.-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Prof. Dr. Rainer Hedrich, Prof. Dr. Dietmar Geiger, PD Dr. M. Rob G. Roelfsema  
Titel der Dissertation: Funktion von Anionenkanälen bei der Entwicklung der Wurzelknöllchen- und Arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose in *Medicago truncatula*  
  
Assoziiertes Mitglied im Graduiertenkolleg GK1342 „Lipid Signalling“
- 12.07.-25.10.12**      **Auslandspraktika in Indonesien**  
Bogor Agricultural University, Bogor: Summerschool  
University of Jember, Jember: Arbeit im Labor, Betreuung von Studierenden, Kulturaustausch, Sprachkurs
- 01.10.09-15.11.11**      **Master Pflanzenbiotechnologie and der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover**  
Institut für Pflanzengenetik, Abteilung Pflanzengenomforschung, Prof. Dr. Helge Küster, Dr. Natalija Hohnjec  
Titel der Masterarbeit: Zellspezifische Analyse symbiose-induzierter *Medicago truncatula* Gene durch Lasermikrodissektion

**01.10.06-13.10.09 Bachelor Pflanzenbiotechnologie and der Gottfried Wilhelm Leibniz  
Universität Hannover**

Institut für Gartenbauliche Produktionssysteme, Abteilung  
Zierpflanzenbau, Prof. Dr. Margrethe Serek, Dr. Viola Mußmann  
Titel der Bachelorarbeit: Real-Time PCR zur Bestimmung der T-DNA  
Kopienzahl in Petunia Cultivars

**30.06.06 Allgemeine Hochschulreife:**  
Otto-Hahn-Gymnasium Springe

**Konferenzen**

**30.08.-03.09.15 From Molecules to the Field**  
Botanikertagung, München, Beitrag: Poster

**30.09.-02.10.15 2nd Doctoral Researcher`s Conference of GRK 1798 „Signaling at the  
Plant-Soil Interface“**  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Goslar, Beitrag: Vortrag

**17.07.-18.07.12 The 1st IGN-TTRC International Conference “Biotechnology for Human  
Life”**  
Bogor Agricultural University, Bogor, Indonesien, Beitrag: Poster

Würzburg, den

## 7.2 Publikationsliste

Cubero-Font, P., Maierhofer, T., Jaslan, J., Rosales, M.A., Espartero, J., Díaz-Rueda, P., Müller, H.M., Hürter, A-L., AL-Rasheid, K.A.S., Marten, I., Hedrich, R., Colmenero-Flores, J.M. and Geiger, D. (2016). „Silent S-Type Anion Channel Subunit SLAH1 Gates SLAH3 Open for Chloride Root-to-Shoot Translocation” Current Biology 26, 1-8

### **In Submission:**

Hürter, A-L., Fort, S., Cottaz, S., Hedrich, R., Geiger, D. and Roelfsema, M.R.G. (in submission)  
„Micorrhizal lipochitinoligosaccharides (LCOs) depolarize root hairs of *Medicago truncatula*”  
PLOS ONE

## 8. Eidesstattliche Erklärung und Danksagung

### 8.1 Eidesstattliche Erklärung

Anna-Lena Hürter

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Funktion von Anionenkanälen bei der Entwicklung der Wurzelknöllchen- und Arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose in *Medicago truncatula*“ eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den.....

.....

Anna-Lena Hürter

## 8.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rainer Hedrich danke ich für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit und die Möglichkeit, am Lehrstuhl für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik-Botanik I des Julius-von-Sachs-Instituts für Biowissenschaften der Julius-Maximilians-Universität Würzburg zu promovieren.

In der Zeit der Doktorarbeit habe ich durch die engagierte, freundliche und fachlich kompetente Betreuung von Herrn Prof. Dr. Dietmar Geiger und Herrn PD Dr. M. Rob G. Roelfsema sehr viel gelernt. Beide Betreuer haben mich bei der Einarbeitung in die Methoden der Elektrophysiologie unterstützt und standen für Fragen immer zur Verfügung. Durch ihr Interesse an den Experimenten und ihre fachliche Unterstützung haben sie einen großen Teil zu dieser Arbeit beigetragen. Dafür bin ich ihnen sehr dankbar.

Herrn PD Dr. Frank Waller danke ich für die Zweitbegutachtung dieser Dissertation.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Botanik I für ihre Hinweise und Hilfen bei der Laborarbeit und für die Belebung des Arbeitsalltags durch viele schöne und lustige Momente.

Für das Lektorat dieser Dissertation danke ich meiner Schwester Rebecca und meinen Eltern.

Ganz besonderer Dank gilt meinen „Würzburger“-Freunden, auf die ich mich immer verlassen kann, vor allem Hanna, Lena, Franziska und Pauline.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie. Mama, Papa, Rebecca, Catharina – danke, dass ihr immer für mich da seid und mir diesen Weg ermöglicht habt.

Abschließend ein herzliches *Terima Kasih* an meinen Freund Eibe, der mir in jeder Phase dieser Arbeit seine Ruhe, seine Kraft und vor allem seinen Optimismus geschenkt hat.

„*Bhinneka Tunggal Ika*“ – „*Unity in Diversity*“ – „*Einheit in der Vielfalt*“