

Die Rolle der Mitochondrien in der
symbiotischen Stickstofffixierung von
Vicia faba L.

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

Patrick Künzler, M. Sc.

2020

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Hans-Peter Braun

Korreferent: Prof. Dr. Claus-Peter Witte

Tag der Promotion: 20.02.2020

1 Abstract

Nitrogen is an essential element of biomolecules such as amino acids and nucleotides. As such, it is indispensable for life. Animals and fungi rely on the intake of nitrogen in form of amino acids, most of which, either directly or indirectly, stems from plant material. Plants usually rely on inorganic nitrogen compounds in the rhizosphere, such as ammonium or nitrate, to produce amino acids. Nitrate is a key component of chemical fertilizer. Its copious application in agriculture benefits plant growth and crop yields but also pollutes ground water and enhances the greenhouse effect.

Legume plants are exceptional in having the ability to develop symbiotic root nodules after infection with Rhizobia. These bacteria turn into semi-autonomous bacteroids inside the nodule cells and house the oxygen-sensitive and energy-intensive nitrogenase reaction, which reduces N_2 directly to NH_3 . In exchange for the ammonia plants supply the bacteroids with photoassimilates.

Transferring the nitrogenase activity to non-legume plants would provide a breakthrough ensuring high crop yields while simultaneously reducing environmental pollution. However, the implications of the presence of nitrogenase reactions in the host cell trigger changes in its metabolism. These changes need to be understood prior to conferring symbiotic nitrogen fixation to non-legume plants. Establishing hypoxic conditions is the main function of the root nodules, which prevents the inhibition of the nitrogenase by O_2 . In addition, infected cells must provide reduced organic compounds to the bacteroid for fuelling the nitrogenase reaction. Both functions potentially affect the mitochondria which also depend on the supply with O_2 and organic compounds by the cell.

The results obtained in the course of this study demonstrate that nodule mitochondria are adjusted to the reduced supply of substrates and that their metabolism is focussed on NH_3 assimilation. Mitochondria contribute to nitrogen assimilation by converting alanine, a product of the bacteroids NH_3 assimilation. This triggered an investigation of the role of alanine in bacteroids metabolism, which showed that bacteroids produce alanine either by the direct assimilation of produced ammonia or by deaminating amino acids derived from the infected cell. Results also indicate that alanine production by NH_3 assimilation inside the bacteroids may be the rate-limiting factor of amino acid synthesis in root nodules, thus defining alanine as a key intermediate of nodule metabolism.

Hence, the results presented in this work expand the model of the nitrogen assimilation in root nodule cells and shed new light on the role of mitochondria within this process.

Keywords: Symbiotic nitrogen fixation, Alanine metabolism, Bacteroid metabolism, Mitochondria, Root nodules

2 Zusammenfassung

Stickstoff z.B. als Bestandteil von Aminosäuren und DNA ist unabdingbar für den Aufbau und die Organisation von biologischen Systemen. Tiere und Pilze müssen Stickstoff in der Form von organischen Verbindungen, insbesondere Aminosäuren, die entweder direkt oder indirekt zu einem großen Teil pflanzlichen Ursprungs sind, mit der Nahrung aufnehmen. Als autotrophe Organismen können Pflanzen Aminosäuren aus Ammoniak (NH_3) und organischen Kohlenstoffverbindungen produzieren. Das NH_3 kann als NH_4^+ aus dem Boden aufgenommen oder aus bodenverfügbarem Nitrat in Pflanzen gebildet werden. Exzessive Nitratdüngung in der Landwirtschaft erhöht zwar die Wachstumsrate von Pflanzen, belastet jedoch das Grundwasser und fördert den Treibhauseffekt. Pflanzen aus der Familie der Leguminosen sind jedoch in der Lage, eine Symbiose mit Rhizobien (Knöllchenbakterien) einzugehen, welche innerhalb der Zellen von spezialisierten Pflanzenorganen, den Wurzelknöllchen, als Bakterioide vorliegen. Diese vollziehen die Sauerstoff-empfindliche und Energie-intensive Nitrogenase-Reaktion, durch die N_2 direkt zu NH_3 reduziert und der Pflanze zur Verfügung gestellt wird. Im Gegenzug versorgt die Pflanze die Bakterioide mit Photoassimilaten (organischen Kohlenstoffverbindungen). Diese sogenannte symbiotische Stickstofffixierung (SNF) macht die Düngung mit zusätzlichen Stickstoffverbindungen überflüssig.

Die Übertragung der Nitrogenase-Reaktion auf Nicht-Leguminosen ist daher ein wichtiges Ziel der Pflanzenbiotechnologie. Es setzt jedoch ein dezidiertes Verständnis des Stoffwechsels pflanzlicher Knöllchenzellen voraus, insbesondere in Bezug auf die zellulären Anpassungen an die Präsenz der Bakterioide und die Aufnahme des bereitgestellten Ammoniums in den pflanzlichen Stoffwechsel. Eine essenzielle Funktion von Wurzelknöllchen und den darin befindlichen Zellen ist die Schaffung von hypoxischen Bedingungen, um eine O_2 -Inhibierung der Nitrogenase zu verhindern. Des Weiteren müssen die Knöllchenzellen organische Kohlenstoffverbindungen bereitstellen, damit die Bakterioide energiereiche Verbindungen für die Nitrogenasereaktion bilden können. Beides hat Auswirkungen auf die Mitochondrien in den Knöllchenzellen, die ebenfalls auf eine ausreichende Bereitstellung von O_2 und organischen Kohlenstoffverbindungen angewiesen sind.

Die experimentellen Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift belegen, dass Mitochondrien an die geänderten Substratverfügbarkeiten der Knöllchenzellen angepasst sind und ihren Metabolismus auf die Stickstoffassimilation ausgerichtet haben. Es ergaben sich konkrete Hinweise, dass sie Alanin, ein kontrovers diskutiertes Stickstofffixierungsprodukt der Bakterioide, umwandeln und so aktiv an der Stickstoffassimilation der Zelle partizipieren. In diesem Zusammenhang wurde auch die Rolle von Alanin im Knöllchenmetabolismus untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Bakterioide neben NH_3 auch Alanin exportieren, wofür mehrere alternative Mechanismen zur Verfügung stehen. Die NH_3 Assimilation innerhalb der Bakterioide könnte einen Geschwindigkeits-

bestimmenden Schritt in der Produktion von Aminosäuren innerhalb des Knöllchens darstellen und Alanin damit als ein zentrales Intermediat des Knöllchenmetabolismus definieren.

Diese Arbeit stellt eine Erweiterung des Stoffwechselmodells der Wurzelknöllchenzelle dar und rückt insbesondere die Rolle der Mitochondrien in der symbiotischen Stickstofffixierung in ein neues Licht.

Schlagwörter: Symbiotische Stickstofffixierung, Alaninmetabolismus, Bakteroidmetabolismus, Mitochondrien, Wurzelknöllchen

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	3
2	Zusammenfassung.....	4
3	Abkürzungsverzeichnis	10
4	Einleitung.....	11
4.1	Die Rolle und Assimilation von Stickstoff in Pflanzen	11
4.2	Symbiotische Stickstofffixierung (SNF) in Wurzelknöllchen.....	13
4.3	Knöllchenentwicklung, -klassifizierung und -struktur	14
4.4	Subzellulärer Metabolismus in Knöllchenzellen.....	15
4.5	Herausforderungen für den mitochondrialen Metabolismus in Knöllchenzellen.....	19
4.5.1	Respiration in Mitochondrien aus SNF-Zellen.....	19
4.5.2	Der mitochondriale TCA-Zyklus in SNF-Zellen.....	20
4.6	Der mitochondriale Beitrag zur Assimilation des fixierten Stickstoffs	20
4.7	Zielsetzung dieser Arbeit.....	23
5	Material und Methoden	24
5.1	Materialien	24
5.1.1	Chemikalien	24
5.1.2	Protein- und DNA-Standards	24
5.1.3	Antikörper.....	24
5.2	Biologische Materialien	24
5.2.1	Bohnen	24
5.2.2	Bakterien	24
5.3	Pflanzenanzucht	24
5.4	Bakterienkultivierung und Pflanzeninfektion.....	25
5.5	Stärkefärbung.....	26
5.6	Suberinfärbung.....	26
5.7	Primerdesign.....	26
5.8	Kolonien-PCR	27
5.9	DNA-Agarosegele.....	28
5.10	Sequenzierung	28
5.11	Organellenisolation	29
5.12	Proteinbestimmungen nach Bradford.....	30
5.13	Shotgun-Massenspektrometrie.....	30
5.13.1	Auswertung der Proteomdaten mit MaxQuant	31
5.13.1.1	Mitochondrien.....	32
5.13.1.2	Bakteroide	33
5.13.2	Analysen anhand der Perseus Software.....	34

5.13.2.1	Mitochondrien.....	34
5.13.2.2	Bakteroide	34
5.14	Western Blotting	34
5.15	Messung der Nitrogenaseaktivität mittels H ₂ Detektion	35
5.16	Bestimmung des Pflanzenwuchs und der photosynthetischen Aktivität.....	36
5.17	Aktivitätsassays	36
5.17.1	Alanine-Dehydrogenase	36
5.17.2	Alanine-Aminotransferase.....	37
5.18	Messung der Respirationsrate von Mitochondrien und Bakteroide.....	37
5.19	Bestimmung der Konzentrationen freier Aminosäuren in Wurzeln und Knöllchen	38
5.19.1	Extraktion und Probenvorbereitung.....	38
5.19.2	Derivatisierung und Quantifizierung	38
5.20	Isotopenmarkierung	39
5.20.1	Probenerstellung	39
5.20.2	Hydrolyse, Extraktion und Aufreinigung	39
5.20.3	Derivatisierung	40
5.20.4	Messung der Aminosäuren im Gaschromatographen	40
5.21	Statistische Analysen	41
6	Ergebnisse.....	42
6.1	Anpassungen des mitochondrialen Proteoms an SNF	42
6.1.1	Reinheit der Mitochondrienisolate	42
6.1.2	Normalisierung der mitochondrialen Proteine	46
6.1.3	Anpassungen des mitochondrialen Proteoms in Knöllchen.....	46
6.1.3.1	Proteine des Aminosäurestoffwechsels und der OXPHOS zeigen stark veränderte Abundanzen in Knöllchen.....	49
6.1.3.2	Aminosäure Metabolismus.....	51
6.1.3.3	TCA-Zyklus & assoziierte Enzyme	52
6.1.3.4	OXPHOS	53
6.1.4	Veränderungen der zentralen mitochondrialen Funktionen in Knöllchen	55
6.1.5	Respiration in Mitochondrien aus Wurzeln und Knöllchen.....	58
6.2	Untersuchungen zur Rolle von Alanin in Stickstoff fixierenden Knöllchen	61
6.2.1	Etablierung der bakteriellen alaDH- Mutante in den Experimentalaufbau	61
6.2.2	Pflanzenwuchs und Photosynthese.....	62
6.2.3	Knöllchenstruktur und Nitrogenaseaktivität.....	64
6.2.4	Quantifizierung freier Aminosäuren in Knöllchen und Wurzeln	66
6.2.5	Untersuchung des Alaninmetabolismus in Knöllchen.....	69
6.2.5.1	Alaninproduktion durch Bakterioide.....	69
6.2.5.2	Alanin als Substrat der mitochondrialen AlaAT.....	70

6.2.6	Veränderungen des Bakteroidproteoms in Fix- und alaDH-	72
6.2.6.1	Pflanzliche „Kontaminanten“ in Bakteroidisolaten	72
6.2.6.2	Pflanzliche Kontaminanten in Bakteroidisolaten stammen vor allem aus dem Cytosol und aus Mitochondrien	74
6.2.6.3	Veränderungen des Bakteroid Proteoms in <i>alaDH</i> - und <i>Fix</i> - Knöllchen	76
6.2.6.4	Veränderungen des TCA-Zyklus und alternative Alaninproduktionswege in <i>alaDH</i> -.....	77
6.2.7	¹⁵ N-Markierung von Intermediaten der SNF	81
6.2.8	Vergleich Stickstoff fixierender Pflanzen in Langtag-/Kurztagbedingungen	84
7	Diskussion.....	86
7.1	Alanin als intrazelluläre Transportform von reduziertem Stickstoff	86
7.1.1	Alanin scheint Intermediat der Stickstoffassimilation zu sein	86
7.1.2	Alanin als diskutiertes Exportprodukt aus Bakteroiden	86
7.1.3	Die Symbiose und der Alaningehalt in <i>Vicia faba</i> Knöllchen ist unabhängig von der AlaDH....	87
7.1.4	Alternative Wege der Alaninproduktion	88
7.1.5	Bakteroide werden mit GABA versorgt, welches der Versorgung des TCA-Zyklus dient	90
7.1.6	OpaA/SSDH regulieren das NADH:NAD Verhältnis in <i>alaDH</i> - Bakteroiden	90
7.1.7	OpaA/SSDH erklären die unveränderte Alaninkonzentration im <i>alaDH</i> - Knöllchen	91
7.1.8	<i>alaDH</i> - Mutation verringert die Stickstoffassimilationsrate.....	92
7.1.9	Pflanzen mit <i>alaDH</i> - Knöllchen profitieren nicht von Langtagbedingungen	94
7.2	Anpassungen des mitochondrialen Proteoms an die geänderte Kohlenstoff- und O ₂ -Versorgung in der SNF-Zelle	95
7.2.1	Typische Anpassungen des mitochondrialen Metabolismus auf hypoxische Situationen.....	95
7.2.2	Das mitochondriale Proteom in Knöllchenzellen zeigt nicht die typischen Anpassungen auf hypoxische Bedingungen.....	97
7.2.3	Der TCA-Zyklus nutzt alternative Substrate und stellt 2-OG zur Verfügung	98
7.2.4	Die mitochondriale AlaAT versorgt sowohl Pyruvat als auch Glutamatbedarf.....	99
7.2.5	Der oxidative Teil des TCA-Zyklus zeigt ungewöhnliche Enzymabundanz	101
7.2.6	SNF-Mitochondrien respirieren und zeigen weniger alternative OXPHOS-Enzyme	103
7.2.7	Die ambivalenten Änderungen von Knöllchenmitochondrien sind zugeschnitten auf die Bedingungen in der SNF-Zelle	104
7.3	Fazit	106
8	Ausblick.....	107
9	Referenzen	I
10	Anhang.....	XI
10.1	Gensequenzen	XI
10.1.1	Tn5-Transposon	XI
10.1.2	<i>alaDH</i> -Gen.....	XII
10.2	Daten	XIII
10.2.1	Respirationsmessungen.....	XIII

10.2.2	Sequenzierung.....	XIV
10.2.3	Wuchsmessungen.....	XIV
10.2.4	Aktivitätstests.....	XV
10.2.4.1	AlaAT.....	XV
10.2.4.2	AlaDH.....	XV
10.2.5	Vergleich des Pflanzenwuchses in Langtag- und Kurztagbedingungen.....	XVI
10.3	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	XVII
10.3.1	Abbildungen.....	XVII
10.3.2	Tabellen.....	XIX
10.4	Lebenslauf.....	XX
10.5	Liste wissenschaftlicher Publikationen.....	XXI
10.6	Konferenzbeiträge.....	XXII
10.7	Danksagungen.....	XXIII

3 Abkürzungsverzeichnis

2-OG	2-Oxoglutarat
AlaAT	Alanin Aminotransferase
AlaDH	Alanin Dehydrogenase
AOX	Alternative Oxidase
AspAT	Aspartat Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
CoA	Coenzym A
COX	Cytochrom C Oxidase
FDR	Fumarat Dehydrogenase
GabT	Gaba 2-OG Aminotransferase
GOGAT	Glutamin Oxoglutarat Aminotransferase
GS	Glutamin Synthetase
ICDH	Isocitrat Dehydrogenase
MDH	Malat Dehydrogenase
NAD; reduzierte Form: NADH	Nicotinamadenindinukleotid
NCRs	Cystein-reiche Peptiden
OGDH	2-OG Dehydrogenase
OpaA	Omega Aminosäuren Pyruvate Aminotransferase
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PDC	Pyruvat Dehydrogenase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvat Carboxylase
SDH	Succinat Dehydrogenase
SM	Symbiosommembran
SNF	Symbiotische Stickstofffixierung
SSA	Succinat Semialdehyd
SSDH	Succinat Semialdehyd Dehydrogenase
TCA	Zitronensäure Zyklus
SHAM	Salicylhydroxyaminsäure

4 Einleitung

4.1 Die Rolle und Assimilation von Stickstoff in Pflanzen

Stickstoff als essenzielles Element in Biomolekülen ist unverzichtbar für das Leben. Molekularer, atmosphärischer Stickstoff (N_2) ist mit 78% das abundanteste Element der Erdatmosphäre. Doch Tiere und Pilze sind nicht in der Lage, die kovalente Bindung zwischen den beiden Stickstoffatomen zu spalten und können sich deshalb N_2 nicht zunutze machen. Aus diesem Grund sind sie auf die Versorgung mit aktiviertem Stickstoff angewiesen, beispielsweise in Form von Aminosäuren (Marzluf, 1997; Jayasinghearachchi *et al.*, 2004). Diese beziehen sie unter anderem durch die Aufnahme von Pflanzen.

Pflanzen als autotrophe Organismen können N_2 zwar auch nicht verwerten, jedoch sind sie in der Lage, Aminosäuren aus anorganischen Stickstoffverbindungen (Nitrat [NO_3^-], Nitrit [NO_2^-]) zu synthetisieren (Abbildung 1). Sie nehmen Stickstoff in Form von Nitrat oder Ammoniak/Ammonium über die Wurzel aus dem Erdreich auf. Transporter in der Plasmamembran importieren diese Verbindungen in das Cytosol (Miller *et al.*, 1996; Von Wirén *et al.*, 2000). Hier wird Nitrat durch die Nitrat Reduktase zu Nitrit oxidiert, welches allerdings toxisch ist und deshalb schnell in die Plastiden transportiert werden muss, wo es durch die Nitritreduktase zu Ammonium reduziert wird. Ammonium kann im Cytosol oder in Plastiden durch die Glutamin Synthetase (GS) auf Glutamat übertragen werden, welches somit zu Glutamin wird. So ist Glutamin die erste Aminosäure, in der aufgenommener Stickstoff zu finden ist. Es hat je eine Amidgruppe und Aminogruppe, von denen Letztere auf andere Verbindungen übertragen werden kann. Diese Reaktion wird von Aminotransferasen durchgeführt, welche die Übertragung von spezifischen Amidgruppen katalysieren und deshalb eine essenzielle Rolle im Stickstoffmetabolismus ausüben. Von zentraler Bedeutung ist die Glutamin 2-Oxoglutarat (2-OG) Aminotransferase (GOGAT), die eine Amidgruppe des Glutamins auf 2-OG überträgt. Glutamin wird durch die Deaminierung wieder zu Glutamat und 2-OG durch die Aminierung ebenfalls zu Glutamat. Glutamat kann für die weitere Ammoniumassimilation durch GS verwendet werden. Die Deaminierung von Glutamin kann jedoch auch an die Aminierung von Aspartat gekoppelt werden, welches dadurch zu Asparagin wird. Asparagin ist die Haupttransportform von fixiertem Stickstoff der Ackerbohne, *Vicia faba* (Mifflin *et al.*, 1976; Schubert, 1986; Perlick *et al.*, 1993; Tobin *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2004; Foyer *et al.*, 2011).

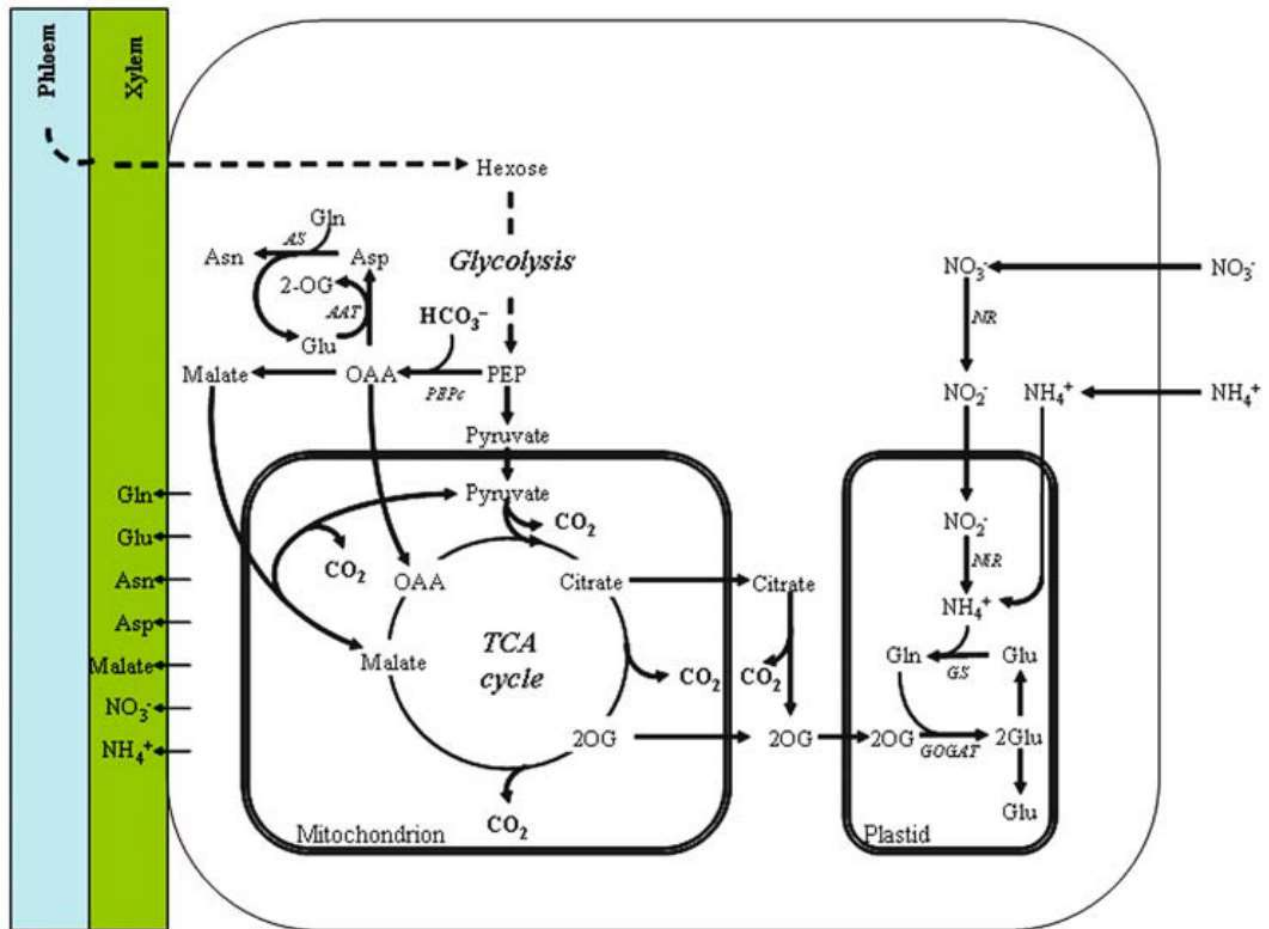


Abbildung 1: Stickstoffaufnahme und Assimilation in Pflanzenwurzeln (Miller *et al.*, 2004).

Nähere GS: GS (cytosolisch oder plastidär), GOGAT: Glutamin Oxoglutarat Aminotransferase, AAT: Aspartat Aminotransferase, AS: Asparagin Synthase, NR: Nitrat Reduktase, NiR: Nitrit Reduktase, PEPC: Phosphoenolpyruvat Carboxylase.

Der Stickstoffgehalt des Bodens ist ein Schlüsselkriterium für die Nutzbarkeit von agrarwirtschaftlichen Flächen. Die Erfindung der industriellen N_2 -Fixierung durch den Haber-Bosch Prozess war Wegbereiter für die "grüne Revolution", welche beispielsweise den Produktionsanstieg von Getreide von 1 Milliarde Tonne (1960) auf zwei Milliarden Tonnen (2000) möglich machte (Khush, 2001; Erisman *et al.*, 2011).

In den letzten Jahren sind jedoch die Nachteile der übermäßigen Applikation von Stickstoffdünger untersucht worden. Eine wichtige Feststellung ist, dass nur ein Teil der aufgetragenen Stickstoffmenge von den Nutzpflanzen aufgenommen wird. So beträgt die Aufnahmemenge bei Zuckerrüben nur 50% (Brackin *et al.*, 2015). Der restliche Stickstoff geht entweder durch denitrifizierende Prozesse in gasförmige Stickoxide über oder durch Auswaschung in das Grundwasser verloren (Marschner *et al.*, 2007). Gerade Letzteres befördert die Eutrophierung von Seen und Flüssen (Pradesh, 2005). Des Weiteren tragen Stickstoffoxide, vor allem N_2O , zum Abbau des atmosphärischen Ozons und zum Treibhauseffekt bei (Ravishankara *et al.*, 2009).

4.2 Symbiotische Stickstofffixierung (SNF) in Wurzelknöllchen

Rhizobien, auch Knöllchenbakterien genannt, bilden ein Enzym, welches N_2 zu Ammoniak reduziert und so biologisch verfügbar macht. Der Stickstoff ist somit in der Zelle gebunden und eine Auswaschung bzw. Denitrifizierung bleibt aus. Pflanzen der Leguminosenfamilie können mit Rhizobien eine Symbiose eingehen, wodurch der atmosphärische Stickstoff für sie nutzbar wird und sie daher keiner weiteren Düngung bedürfen. Ungefähr für 20% der 13 000 bekannten Leguminosen ist die SNF nachgewiesen; einige davon (z. B. *Vicia faba*, *Pisum sativum*, *Glycine max*, *Medicago truncatula*) sind wichtige Nutzpflanzen (Freiberg, 1997; Zahran, 1999). Die Symbiose basiert auf dem Austausch von reduziertem Stickstoff, der aus dem Knöllchen im Xylem zum Spross transportiert wird, und Photoassimilaten, die der Versorgung des Knöllchens dienen. Durch diesen zusätzlichen Kohlenstoffbedarf produzieren SNF-Pflanzen weniger Biomasse als gedüngte, uninfizierte Pflanzen der gleichen Art (Bouma, 1970; Ryle *et al.*, 1979). Es wird geschätzt, dass 6 g Kohlenstoff für die symbiotische Fixierung von 1 g Stickstoff benötigt werden (Schubert, 1986; Vance *et al.*, 1991).

Schätzungen geben an, dass in der Landwirtschaft 85 Millionen Tonnen industriell fixierter Stickstoff verwendet werden, während 33 Millionen Tonnen durch SNF eingebracht werden (Erisman *et al.*, 2005). Die Erhöhung dieses Anteils ist zentrales Ziel der SNF-Forschung. Das größte Hindernis stellen dabei Pflanzen dar, welche diese Symbiose nicht eingehen können. Aktuell gibt es drei Strategien, um die Vorteile der SNF auch Nichtleguminosen zugänglich zu machen:

1. Die indirekte Düngung durch das Aufbringen von Bakterien auf den Boden, die N_2 unabhängig von einer SNF fixieren. Dies wäre allerdings kein symbiotisches Modell.
2. Die Übertragung von SNF-Genen auf nicht-SNF-Pflanzen, welche dort die Ausbildung von Wurzelknöllchen ermöglichen.
3. Die Transformierung des Nitrogenaseenzym in das Genom von nicht-SNF-Pflanzen.

Während die erste Option zwar die Nutzung von atmosphärischem Stickstoff ermöglichen würde, wäre die potenziell übermäßige Anreicherung von Ammoniak und Nitraten mit der einhergehenden Auswaschung dieser Nährstoffe ein immenser Nachteil im Vergleich zum geschlossenen symbiotischen System. Die zweite Strategie ist hingegen durch die Anzahl und Komplexität der SNF-vermittelnden Gene schwierig umzusetzen. Demgegenüber erscheint der Aufwand der alleinigen Transformation der Nitrogenase in ein eukaryotisches System als vergleichsweise gering. Die Transformierung einer funktionalen Nitrogenaseuntereinheit in die Mitochondrien von Hefezellen (López-Torrejón *et al.*, 2016; Burén *et al.*, 2017) lässt in nächster Zeit signifikante Fortschritte auf diesem Gebiet erwarten. Eine Stickstoff fixierende, eukaryotische Zelle wäre sicherlich ein entscheidender Schritt hin zu einer „selbstdüngenden“ Nichtleguminose. Das bedarf aber einer Erforschung der zellulären Mechanismen und Regulationen innerhalb der Wurzelknöllchen, um die

damit einhergehenden zellulären Veränderungen beurteilen zu können. Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, indem der Metabolismus des fixierten Stickstoffs und die Einbindung der Mitochondrien in diesem Prozess untersucht werden.

4.3 Knöllchenentwicklung, -klassifizierung und -struktur

Wenn SNF-Pflanzen Stickstoffmangel erfahren, sekretieren sie Flavonoide in den umgebenden Boden. In Rhizobien bewirken diese die Expressionen von Nodulationsgenen (Perret *et al.*, 2000), welche die rhizobielle Anlagerung an und Infiltration in die Wurzelhaare der Pflanze (Denarie *et al.*, 1996; Long, 1996) ermöglichen. An jeder Stelle der „Infektion“ kommt es zur Knöllchenbildung, wobei es, in Abhängigkeit der Pflanzenart, zwei Knöllchenarten gibt. Pflanzen des Tribus Phaseolae bilden determinierte Knöllchen aus. Die Aktivität des Wurzelmeristems wird früh in der Knöllchenentwicklung eingestellt. Dadurch läuft die Entwicklung der Zellen im determinierten Knöllchen synchron ab und es kommt zu der charakteristischen globulären Form dieses Knöllchentypus (Sprent, 1980).

Die in dieser Arbeit untersuchte Pflanze, *Vicia faba*, bildet nach der Infektion mit *Rhizobium leguminosarum* hingegen indetermierte Knöllchen aus. Deren Meristem ist nach der Infektion noch einige Wochen aktiv, wodurch fortwährend neue Zellen gebildet werden. Es kommt zum länglichen Wuchs und zu einem Altersgradienten innerhalb des indetermierten Knöllchens (Sprent, 1980; Abd-Alla *et al.*, 2000). Dieses lässt sich in vier Zonen einteilen (Abbildung 2): Das Knöllchen wächst durch Zellteilungen des Meristems in der Knöllchenspitze (Zone I). Ein Teil der neu gebildeten Zellen wird fortwährend mit Rhizobien infiziert (Zone II). Zone III besteht aus uninfizierten und infizierten Zellen, wobei Erstere die Stickstofffixierung durch Bereitstellung von Photoassimilaten aus dem Spross unterstützen. Im Zuge der Knöllchenaktivität wird die vom Spross erhaltene Stärke in Zone III „verbraucht“, indem sie aufgespalten wird und die erhaltenen Hexosen oxidiert und die freiwerdende Energie größtenteils der Stickstofffixierung nutzt (Forrest *et al.*, 1991) (Abbildung 3). In infizierten Zellen differenzieren sich die Rhizobien zu Bakteroiden, welche die Nitrogenasereaktion ausführen. Charakteristisch für *Vicia faba* in diesem Zuge ist die Produktion von cysteinreichen Peptiden (NCRs) in den infizierten Zellen. Diese bewirken eine DNA-Endoreduplikation in den Bakteroiden auf das bis zu 24fache des haploiden DNA-Satzes. In der Folge vergrößern sich die Bakterioide, und ihre Membranintegrität nimmt ab. Dieser massive Eingriff in das Genom führt zur terminalen Differenzierung der Bakterioide, sie verlieren ihre Reproduktionsfähigkeit und sterben zusammen mit der infizierten Zelle in Zone IV des Knöllchens ab (Mergaert *et al.*, 2006; Van De Velde *et al.*, 2010; Rodríguez-Haas *et al.*, 2013; Udvardi *et al.*, 2013). Zone IV wird mit der Zeit immer größer, bis das komplette Knöllchen abgestorben ist (Rodríguez-Haas *et al.*, 2013).

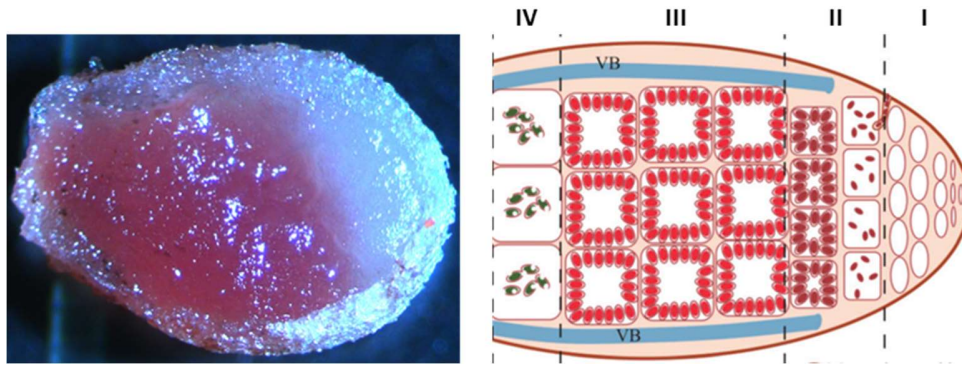


Abbildung 2: Aufbau des indeterminierten Knöllchens.

Links: Längsschnitt eines Stickstoff fixierenden Knöllchens von *Vicia faba* und *Rhizobium leguminosarum* (Künzler et al., nicht publiziert). Rechts: Schematische Knöllchenstruktur im Längsschnitt mit typischer Zonierung (Rodríguez-Haas et al., 2013). I: Wurzelmeristem, II: Infektions/Differenzierungszone, III: Fixierungszone, IV: Seneszenzzone, VB: Vaskuläres Bündel. Dieses versorgt das Knöllchen mit Photoassimilaten und transportiert den fixierten Stickstoff ab.

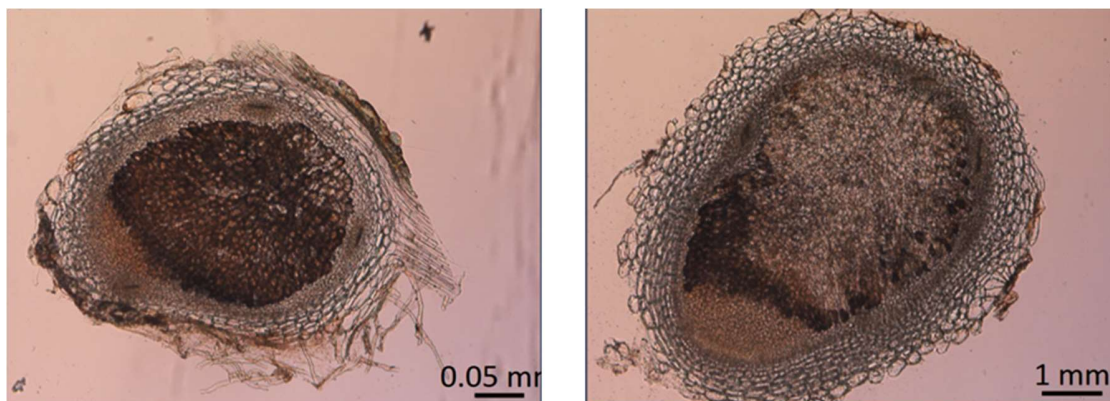
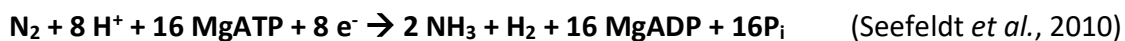


Abbildung 3: Iodfärbung von Knöllchen einer 4 Wochen alten Pflanze (links) und einer 5 Wochen alten Pflanze (rechts). Dunkel gefärbte Bereiche beinhalten Stärke. Künzler et al., nicht publiziert.

4.4 Subzellulärer Metabolismus in Knöllchenzellen

Die vorliegende Arbeit untersucht die infizierten Zellen des *Vicia faba* Knöllchens im Hinblick auf den Metabolismus der Mitochondrien und Bakterioide. Diese sind von einer Membran pflanzlichen Ursprungs umgeben, der Symbiosommembran (SM). Symbiosomen in determinierten Knöllchen können mehrere Bakterioide beinhalten, wohingegen Symbiosomen in indeterminierten Knöllchen, wie bei *Vicia faba*, auf ein Bakteroid beschränkt sind. Der Grund hierfür ist der Eingriff in die Teilungsfähigkeit der Bakterioide durch die pflanzlichen NCRs (Ishihara et al., 2011; Clarke et al., 2014; Kereszt et al., 2018). Bakterioide verlieren darüber hinaus die Fähigkeit, verzweigt-kettige Aminosäuren zu produzieren. Sie reduzieren ihre glykolytische Aktivität und sind auf die Kohlenstoffversorgung von der infizierten Zelle angewiesen. Diese Anpassungen erinnern stark an die Charakteristika von Organellen endosymbiontischen Ursprungs, weshalb sie auch als „Ammonioplasten“ bezeichnet werden (Kouchi et al., 1988; J Prell et al., 2009; Udvardi et al., 2013). Durch Transporter und Kanäle in der SM kommt dieser eine elementare Bedeutung in der Versorgung der Bakterioide mit Aminosäuren und reduziertem Kohlenstoff, sowie dem Transport von fixiertem Stickstoff ins Cytosol zu (Clarke et al., 2015).

Der zentrale Kohlenstoff-Stickstoff Metabolismus in Bakteroiden und im Cytosol der infizierten Zelle ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Glykolyse ist in Knöllchen stärker aktiv, jedoch ist das Endprodukt nicht Pyruvat, sondern Phosphoenolpyruvat (PEP). Dieses wird zu Oxalacetat carboxyliert und zu Malat reduziert (Rosendahl *et al.*, 1990; White *et al.*, 2007; Vance, 2008). Malat ist das Hauptsubstrat für den Metabolismus der Bakterioide. Malat versorgt als C₄-Körper den rhizobiellen Zitronensäure- (TCA-) Zyklus, wird aber auch zum Teil, beispielsweise durch das malische Enzym, zu Pyruvat decarboxyliert, welches nach Umwandlung zu Acetyl-CoA den TCA-Zyklus als C₂-Körper versorgt (Van Dao *et al.*, 2008; Udvardi *et al.*, 2013). Im TCA-Zyklus wird Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) reduziert (NADH) und dessen Elektronen werden durch die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) für die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) genutzt. Dieses wird größtenteils in der Nitrogenasereaktion verbraucht:



Das Nitrogenaseenzym ist extrem empfindlich gegenüber Sauerstoff, da die Molybdän-Eisen Untereinheit irreversibel oxidiert werden kann (Kuzma *et al.*, 1993). Wurzelknöllchen weisen deshalb in ihrem Innern ein extrem sauerstoffarmes Milieu auf. Die Knöllchenstruktur ist darauf ausgelegt, den Sauerstoffeinstrom zu behindern. Die innere Zone des Knöllchens ist umgeben vom Kasparischen Streifen, der aus Lignin und Suberin besteht (Abbildung 5) (Abd-Alla *et al.*, 2000; Lotocka, 2007; Schwember *et al.*, 2019). Die Mitochondrien in infizierten Zellen sind zum Teil in der Peripherie der infizierten Zelle lokalisiert und verringern so den Eintritt von O₂ in das Cytosol der infizierten Zellen (Day *et al.*, 1986; Millar *et al.*, 1995). Zusätzlich wird in infizierten Zellen Leghämoglobin in hohen Konzentrationen (0,1 – 3mM) produziert, das freien Sauerstoff im Cytosol durch seine extrem hohe Affinität (Dissoziationskonstante: 65 nM) effizient bindet (Verma, 1976; Appleby, 1984; Becana *et al.*, 1992; Ott *et al.*, 2005). Schließlich wird die intrazelluläre O₂ Konzentration durch die Respiration der Bakterioide weiter reduziert. Diese Mechanismen bewirken eine intrazelluläre Sauerstoffkonzentration infizierter Zellen zwischen 5 und 50 nM (Kuzma *et al.*, 1993, 1999; Bergersen, 1994).

In potenziellem Konflikt mit diesen niedrigen O₂ Konzentrationen steht der Sauerstoffbedarf der rhizobiellen Atmungskette, die Sauerstoff im Rahmen ihres Beitrags für die ATP-Produktion benötigt. Rhizobien haben jedoch Mechanismen entwickelt, um unter diesen Bedingungen den Energiebedarf der Stickstofffixierung zu gewährleisten. So scheint Leghämoglobin die Sauerstoffversorgung des Bakteroiden zu unterstützen, auch wenn die zugrundeliegenden Mechanismen nicht genau bekannt sind (Wittenberg, 1974; Appleby, 1984; Becana *et al.*, 1992). Darüber hinaus ist deren OXPHOS bereits in nanomolaren Sauerstoffkonzentration aktiv, da Rhizobien eine hoch affine terminale Oxidase besitzen (K_m < 50 nM) (Bergersen *et al.*, 1993; Haaker *et al.*, 1996). Des Weiteren besitzen

Rhizobien einen „Grünen“ Komplex I, eine veränderte Form der NADH:Ubiquinon Oxidoreductase, der die Elektronen vom NADH nicht auf Ubiquinon, sondern auf Ferredoxin überträgt. Ferredoxin wiederum ist ein Substrat für die Nitrogenasereaktion (Esposti *et al.*, 2016).

Durch die Nitrogenase produziertes Ammoniak kann die Bakteroidmembran durch Diffusion passieren (D. A. Day *et al.*, 2001). In das Cytosol der umgebenden Zelle kann es durch ein Porin in der SM gelangen, welches mit der GS assoziiert ist (Masalkar *et al.*, 2010). Somit könnte Ammoniak direkt unmittelbar nach dem Export assimiliert werden. Durch die ATPase Aktivität in der SM herrscht im Symbiosomraum ein erheblich niedrigerer pH-Wert als im leicht alkalischen Cytosol des Bakteroids (Blumwald *et al.*, 1985; Day *et al.*, 2001; Krylova *et al.*, 2013). Dementsprechend ist die Protonierung des Ammoniaks wahrscheinlicher (in dieser Arbeit wird deshalb im Folgenden auch nur von Ammonium gesprochen), welches als Kation für den Transport ins Cytosol auf einen Transporter angewiesen ist (Day *et al.*, 2001). Es gibt verschiedene Transporterfamilien, welche in Knöllchen exprimiert werden und diese Aufgabe übernehmen können (Tyerman *et al.*, 1995; Simon-Rosin *et al.*, 2003). Im Cytosol kann das exportierte Ammonium als Substrat des „regulären“ GS-GOGAT Weges zur Produktion von Asparagin genutzt werden (Vance *et al.*, 1992), was im indeterminierten Knöllchensystem die Transportform des fixierten Stickstoffs ist (Küster *et al.*, 1997; Udvardi *et al.*, 2013).

Parallel kann der fixierte Stickstoff bereits im Bakteroiden durch die Alanin Dehydrogenase (AlaDH) auf Pyruvat übertragen werden. Das produzierte Alanin wird dann parallel zu Ammonium in das Cytosol exportiert (Waters *et al.*, 1998). Aus dem Symbiosom exportiertes Ammonium wird entlang des bereits erläuterten Assimilationsweges aufgenommen und führt zur Produktion von Asparagin. Essenziell für die Stickstoffassimilation in der infizierten Zelle ist die Bereitstellung von Oxalacetat, welches permanent durch die Phosphoenolpyruvat Carboxylase (PEPC) Reaktion im Cytosol bereitgestellt wird, und 2-OG, welches mutmaßlich dem mitochondrialen TCA-Zyklus entzogen wird.

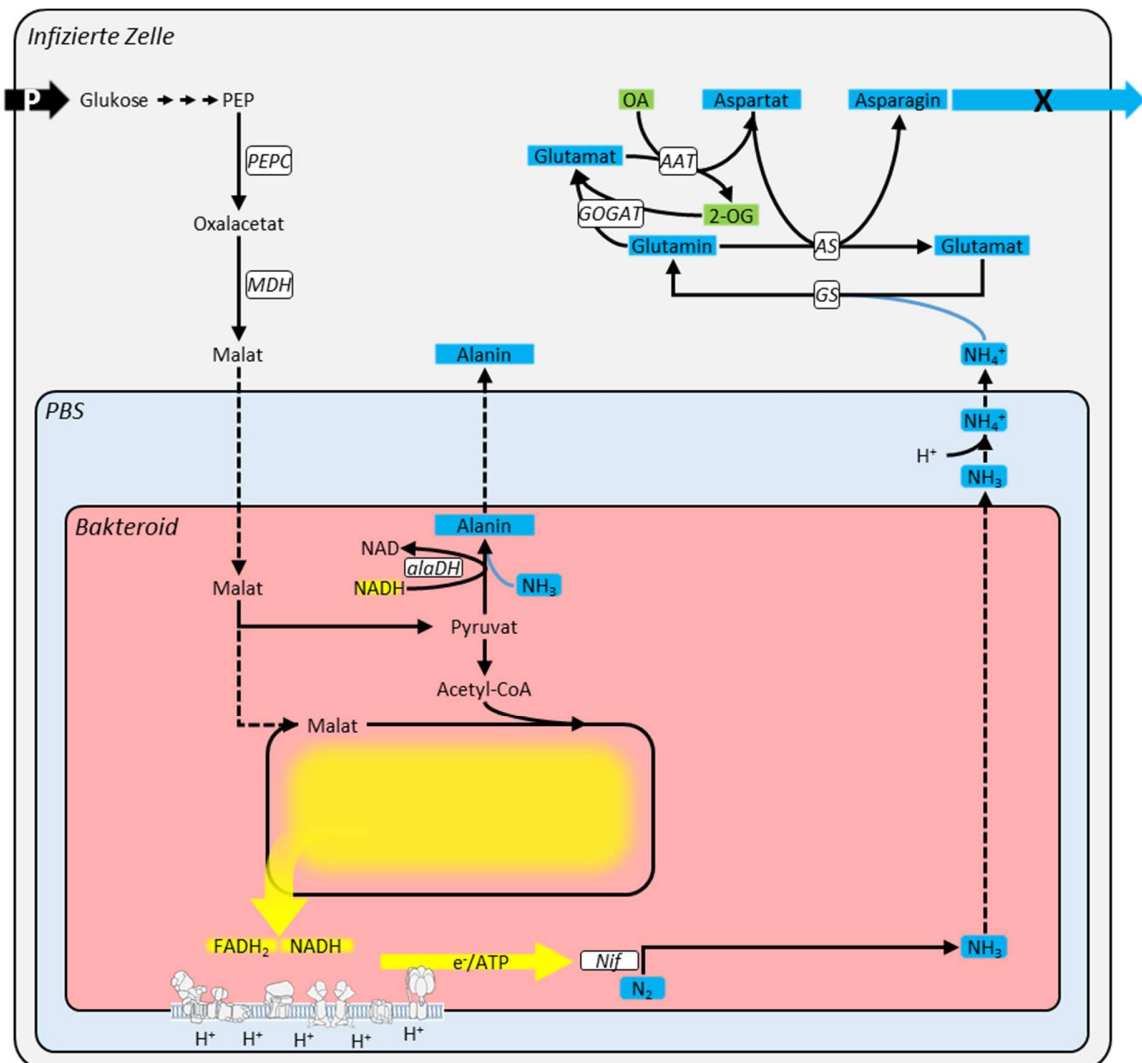


Abbildung 4: Zentraler Metabolismus im Cytosol und Bakteroiden in einer infizierten Zelle.

Enzymatisch katalysierte Reaktionen sind durch durchgezogene Pfeile dargestellt. Gestrichelte Pfeile stellen Diffusion und aktive Transportprozesse dar. Die infizierte Zelle erhält Glukose, die als Saccharose im Phloem (P) transportiert wurde. Der TCA-Zyklus ist schematisch dargestellt und führt zur Erhöhung der Reduktionsäquivalente (in Gelb). Blau hinterlegt sind Intermediate des fixierten Stickstoffs. Die infizierte Zelle muss für die Ammoniumassimilation Oxalacetat und 2-OG (in Grün) bereitstellen. Endprodukt der Assimilation ist Asparagin, welches im Xylem (X) Richtung Spross transportiert wird. Die wichtigsten SNF-Enzyme sind weiß hinterlegt (PEPC: Phosphoenolpyruvat Carboxylase, MDH: Malat Dehydrogenase, alaDH: Alanin Dehydrogenase, Nif: Nitrogenase, GS: Glutamin Synthetase, AS: Asparagin Synthase, GOGAT: Glutamin Oxoglutarat Aminotransferase, AAT: Aspartat Aminotransferase).

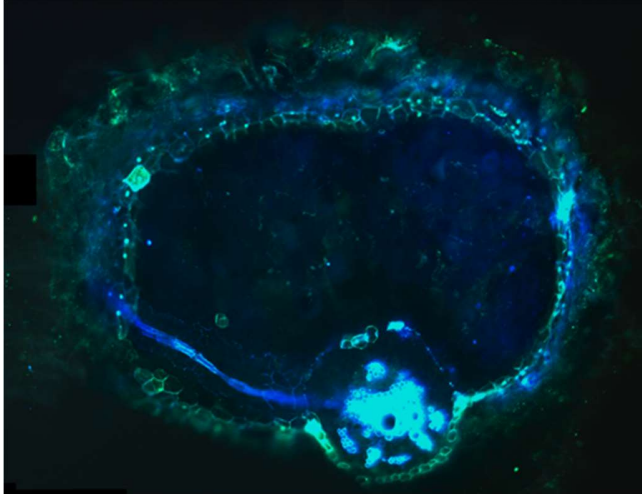


Abbildung 5: Suberinlamelle in einem Knöllchen (Querschnitt).

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von suberingebundenem Fluorol (Künzler et al., nicht publiziert).

4.5 Herausforderungen für den mitochondrialen Metabolismus in Knöllchenzellen

4.5.1 Respiration in Mitochondrien aus SNF-Zellen

Mitochondriale Funktionen müssen auch im hypoxischen Milieu der infizierten Knöllchenzelle weiterlaufen. Dies kann durch deren Lokalisation in der Peripherie der Zelle unterstützt werden, in der die O_2 Konzentration bis zu $2 \mu M$ betragen kann (Millar *et al.*, 1995; Bergersen, 1996). Zusätzlich ist die Cytochrom C Oxidase (COX) in Knöllchen der Sojapflanze affiner für Sauerstoff ($K_{M[O_2]} = 50 \text{ nM}$) als in entsprechenden Wurzeln ($K_{M[O_2]} = 100\text{-}125 \text{ nM}$) (Millar *et al.*, 1995). Die alternative Oxidase (AOX) ist neben der COX ein weiteres Sauerstoff verbrauchendes Enzym, welches die Elektronen von reduziertem Cytochrom C auf molekularen Sauerstoff übertragen kann. Dieser Transport ist jedoch nicht an eine Translokation von Protonen über die Cristaemembran und somit nicht an die ATP-Produktion koppelt. Respirationmessungen an isolierten Mitochondrien aus Knöllchen zeigen, dass die AOX-Kapazität in Knöllchen wesentlich geringer ist als im Hypokotyl (Muecke, 1969; Rawsthorne *et al.*, 1986b; Ignatov *et al.*, 2000). Dieses kann theoretisch zu einer stärkeren Kopplung des O_2 Verbrauchs an die ATP-Produktion beitragen. Dagegen spricht jedoch die hohe $K_{M[O_2]}$ der AOX von $2,5 \mu M$ (Millar *et al.*, 1997), wodurch sie im Knöllchen ($C_{O_2} = 5 \text{ nM}$ bis maximal $2 \mu M$ in der Peripherie) nicht mit der COX um O_2 konkurriert.

Die OXPHOS in Knöllchenmitochondrien in Bezug zur O_2 -Verfügbarkeit ist mit physiologischen Methoden relativ gut untersucht. Mitochondrien aus Knöllchen sind in der Lage, verschiedene Substrate für das OXPHOS-System zu nutzen (de Visser *et al.*, 1983; Rawsthorne *et al.*, 1986a,b; Suganuma *et al.*, 1987; Millar *et al.*, 1995, 1997; Ignatov *et al.*, 2000). Allerdings fehlen bisher detaillierte Studien zur Proteinbestückung der Mitochondrien, welche weitergehende Aussagen über die möglichen Veränderungen in den atmungsphysiologischen Prozessen in Knöllchenbakterien erlauben.

4.5.2 Der mitochondriale TCA-Zyklus in SNF-Zellen

Der Energiebedarf der Nitrogenase erfordert die stetige Versorgung der Bakterioide mit Kohlenstoff durch die infizierte Zelle. Wie bereits dargelegt, erfährt der glykolytische Strom eine Umleitung an der Stelle des PEP hin zum Symbiosomen (Rosendahl *et al.*, 1990; White *et al.*, 2007; Vance, 2008). Dieses beeinflusst möglicherweise die Pyruvatversorgung der Mitochondrien in infizierten Zellen. Des Weiteren erfordert die Assimilation des vom Bakteroid exportierten Stickstoffs die Bereitstellung von Intermediaten des TCA-Zyklus, vor allem 2-OG (Abbildung 4). Im Gegensatz zum OXPHOS-System sind der TCA-Zyklus und damit assoziierte Enzyme in SNF-Mitochondrien bisher wenig untersucht und basieren lediglich auf Messungen von einzelnen Enzymaktivitäten (Rawsthorne *et al.*, 1986a; Bryce *et al.*, 1990). Proteom basierte Studien an isolierten Knöllchenmitochondrien wurden bislang anhand von 2D-Gelen vollzogen und lassen nur auf die Änderungen vereinzelter Enzyme schließen (Hoa *et al.*, 2004). Demgegenüber zeigen globale Analysen des Transkriptoms bzw. Proteoms von ganzen Knöllchen zahlreiche Anpassungen des mitochondrialen Stoffwechsels auf die symbiotische Situation in SNF-Knöllchen (Colebatch *et al.*, 2004; Ogden *et al.*, 2017; Thal *et al.*, 2018; Green *et al.*, 2019). Umfassende Analysen des Gesamtproteoms isolierter Mitochondrien sind bislang nicht durchgeführt worden.

4.6 Der mitochondriale Beitrag zur Assimilation des fixierten Stickstoffs

Die Annahme über die Assimilation des vom Bakteroiden exportierten Ammoniums durch den GS-GOGAT-AS Weg (Abbildung 4) wurde in vielen Studien postuliert (Vance *et al.*, 1992; Barsch *et al.*, 2006). In diesem Modell wird Glutamat für die GS-vermittelte Ammoniumassimilation benötigt.

Demgegenüber zeigten Inkubationsstudien mit $^{15}\text{N}_2$ einen alleinigen Export von Alanin aus isolierten Bakteroiden (Waters *et al.*, 1998). Als Alanin produzierendes Enzym in isolierten Bakteroiden wurde daraufhin die AlaDH identifiziert, welche einen $K_{m\text{NH}_4^+}$ von 5,1 mM hat (Allaway *et al.*, 2000). In diesem Bezug wurde darauf hingewiesen, dass Ergebnisse der $^{15}\text{N}_2$ -Inkubationsexperimente an isolierten Bakteroiden fundamental von dem Experimentalaufbau abhängen: Während geschlossene Inkubationskammern die Ammoniumkonzentration in den Stickstoff fixierenden Bakteroiden ausreichend für die AlaDH-Reaktion erhöhen, ist das in Fließkammern nicht der Fall. Diese bewirken eine permanente Abfuhr des produzierten Ammoniums, sodass die entsprechende Konzentration nicht für eine Assimilation durch die AlaDH ausreicht. (Allaway *et al.*, 2000; E. Ludwig *et al.*, 2003). Der aktuelle Stand der Forschung geht von einem gemischten Export von Ammonium und Alanin aus, wobei sowohl die Mutation als auch die Überexpression der AlaDH eine Verringerung der Biomasseproduktion der symbiotischen, indeterminierten Erbsenpflanze zur Folge hat (Allaway *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2004). Da diese Pflanzen keine Stress assoziierten Änderungen (beispielsweise der Blätter) zeigten, wurde spekuliert, dass der Wegfall der Alaninproduktion des Bakteroiden durch

den verbleibenden Ammonium Export für eine genügende Pflanzenversorgung ausreicht. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind dabei noch nicht genau bekannt.

Der Rolle von Alanin in SNF-Zellen wurde jüngst bei der Quantifizierung des Proteoms von *Vicia faba* Knöllchen erneut aufgeworfen: Hier wurde das Glutamat produzierende GOGAT-Enzym nicht ausreichend detektiert. Als alternatives Enzym wurde die mitochondriale Alanin Aminotransferase (AlaAT) in Knöllchen vorgeschlagen, welche höher abundant als in Wurzeln detektiert wurde (Thal *et al.*, 2018). Es wurde postuliert, dass dieses Enzym Alanin, welches durch die rhizobielle AlaDH-Reaktion produziert würde, mit 2-OG zu Pyruvat und Glutamat transaminiert und so Glutamat für die NH_4^+ -Assimilation bereitstellt (Abbildung 6). Dies würde den Mitochondrien eine zentrale Rolle im Kontext der Stickstoff fixierenden Zelle zuweisen, die weit über die zu untersuchenden Anpassungen an die Sauerstoffknappheit und Substratänderungen in der infizierten Zelle hinausgehen. Die Analyse des mitochondrialen Proteoms im Hinblick auf diese Hypothese ist in oben genannter Studie jedoch nicht vollzogen worden.

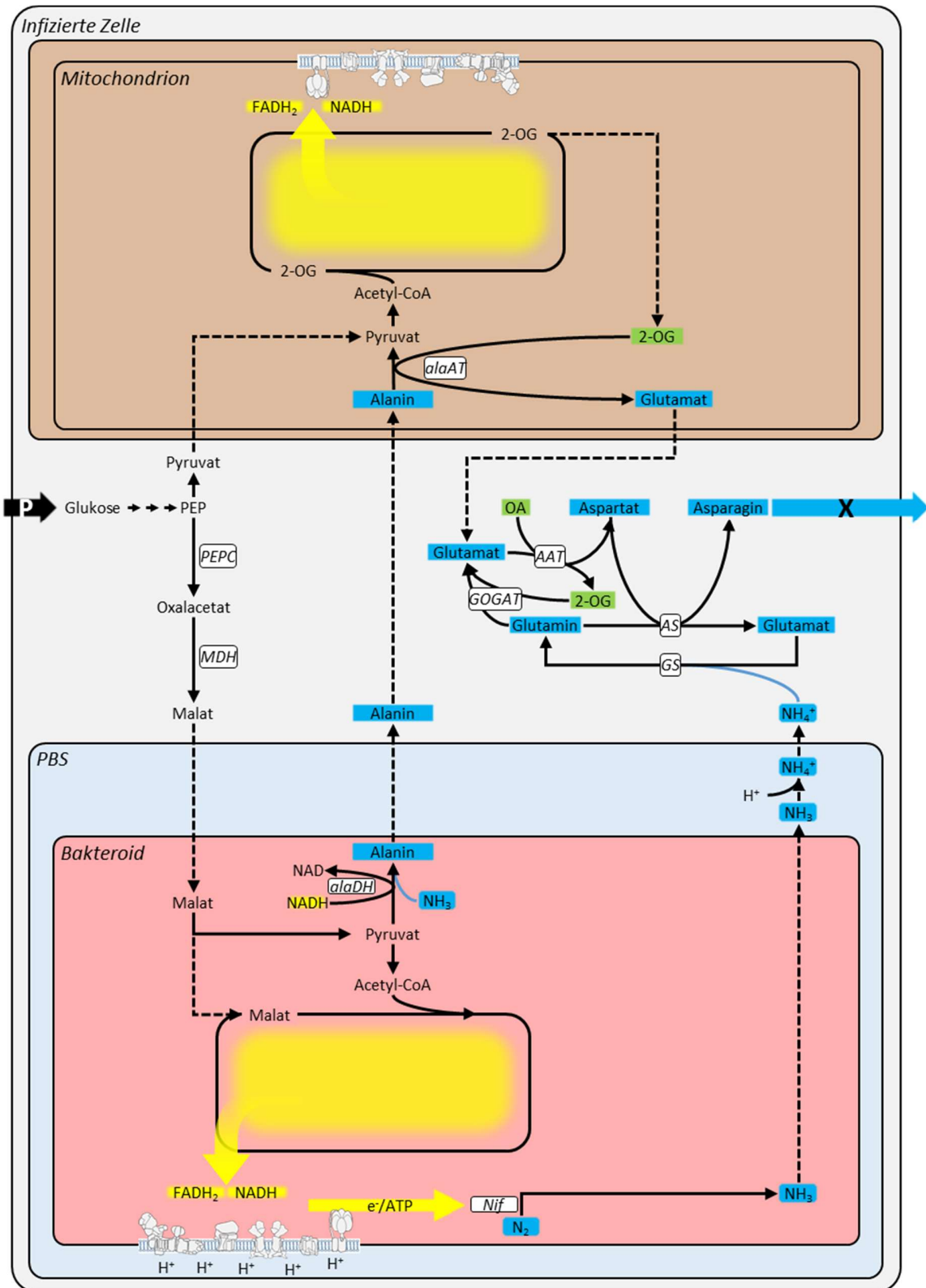


Abbildung 6: Beteiligung der Mitochondrien an der Stickstoffassimilation in SNF-Zellen.

Abbildung 4 wurde entsprechend der Ergebnisse von Thal (2018) verändert. Enzymatisch katalysierte Reaktionen sind durch durchgezogene Pfeile dargestellt. Gestrichelte Pfeile stellen Diffusion und aktive Transportprozesse dar. Die infizierte Zelle erhält Glukose, die als Saccharose im Phloem (P) transportiert wurde. Die TCA-Zyklen sind schematisch dargestellt und führen zur Erhöhung der Reduktionsäquivalente (in Gelb). Blau hinterlegt sind Intermediate des fixierten Stickstoffs. Die infizierte Zelle muss für die Ammoniumassimilation Oxalacetat und 2-OG (in Grün) bereitstellen. Endprodukt der Assimilation ist Asparagin, welches im Xylem (X) Richtung Spross transportiert wird. Die wichtigsten SNF-Enzyme sind weiß hinterlegt (PEPC: Phosphoenolpyruvat Carboxylase, MDH: Malat Dehydrogenase, *alaDH*: Alanin

Dehydrogenase, Nif: Nitrogenase, GS: Glutamin Synthetase, AS: Asparagin Synthase, GOGAT: Glutamin Oxoglutarat Aminotransferase, AAT: Aspartat Aminotransferase, AlaAT: Alanin Aminotransferase).

4.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Es zeigt sich, dass noch viele offene Fragen bezüglich der Rolle von Mitochondrien in SNF-Zellen existieren. Insbesondere fehlen Proteom-basierte Aussagen über die Anpassungen an die Präsenz der Bakterioide, die geänderten Sauerstoffbedingungen und den mitochondrialen Beitrag zur Assimilation des fixierten Stickstoffs. Explizit lassen sich drei Ziele der vorliegenden Arbeit definieren:

1. Eine tiefe Analyse der proteomischen Anpassungen der Mitochondrien an die geänderte Sauerstoff/Substrat Versorgung in infizierten Zellen und die Erforschung des mitochondrialen Beitrags zur Stickstoffassimilation in der SNF-Zelle.
2. Die Definition der Rolle von Alanin in der SNF-Zelle.
3. Die Untersuchung des C/N Metabolismus in Bakteroiden in Abhängigkeit von der internen Stickstoffassimilation.

Zentrale Methode dieser Arbeit ist die Quantifizierung des mitochondrialen Proteoms aus Knöllchen und Wurzeln und deren Vergleich. Insbesondere stehen dabei der TCA-Zyklus und das OXPHOS-System im Fokus. Die Signifikanz von Alanin als Bakteroid und Mitochondrien verbindendes Intermediat wird vor allem durch die Quantifizierung der Aminosäuren und Messungen der Alanin umsetzenden Enzyme untersucht. Die Bedeutung des AlaDH-Enzyms für die Symbiose soll durch die Charakterisierung der entsprechenden *alaDH*- Mutante definiert werden. In diesem Zuge wird die Bedeutung dieses Enzyms auf den Pflanzenwuchs und die Nitrogenaseaktivität gemessen. Ein weiteres Kernexperiment ist die ¹⁵N-Markierung und nachfolgende Bestimmung der entsprechenden Anreicherungsrate der Aminosäuren, um die Umwandlungsschritte der Asparaginproduktion in *Vicia faba* Knöllchen zu identifizieren. Im Gegensatz zu den bisher durchgeführten Studien werden allerdings intakte Knöllchen inkubiert, um den Knöllchenmetabolismus unter Bedingungen *in vivo* zu beleuchten. Die aus diesen Experimenten gemachten Beobachtungen sollen durch die Quantifizierung des Bakteroidproteoms belegt und erklärt werden.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, bezogen von: Applichem (Darmstadt); BioRad GmbH (München); Roche (Mannheim); Carl Roth GmbH (Karlsruhe); Invitrogen (Leck, NL); Fermentas (St. Leon-Rot); Promega (Madison, USA), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Sigma (Taufkirchen). Alle Chemikalien entsprachen analytischem Reinheitsgrad. Verbrauchsmaterialien wurden verwendet von BioRad GmbH (München); Eppendorf (Hamburg); Serva (Heidelberg); Sorvall (Bad Homburg); Sartorius (Göttingen); GE Healthcare (Little Chalfont, UK) und Invitrogen (Kalifornien, USA).

5.1.2 Protein- und DNA-Standards

Als Proteingrößenstandard wurde der „ECL Rainbow Marker - Full Range“ Marker von Merck verwendet. Um die Größen der PCR-Amplifikate einschätzen zu können, wurde der FastGene 1kb DNA Marker Plus (Nippon Genetics, Japan) in einer Spur auf demselben Agarosegel aufgetragen.

5.1.3 Antikörper

Tab. 1: Verwendete Antikörper.

Nachweis von	Untereinheit	Größe der Untereinheit	Konzentration	Ursprung
Nitrogenase	NifH	32 kDa	1:500	Huhn
Sekundärer AK	IGG (Huhn)	---	1:2500	Ziege

5.2 Biologische Materialien

5.2.1 Bohnen

Die *Vicia faba* Bohnen (Sorte: Fuego) wurden bezogen von „BSV Saaten“ (Ismaningen). Es handelt sich um zertifiziertes Saatgut erster Generation mit der Anerkennungsnummer CZ5-2232-50750-01.

5.2.2 Bakterien

In dieser Arbeit wurde der *Rhizobium leguminosarum* Stamm 3841 verwendet, ein Streptomycin resistentes Derivat des Stammes 300 (*Fix+*; Johnston *et al.*, 1975). Ein davon abgeleiteter Stamm (hier: *Fix-*) ist nicht in der Lage, eine funktionale NifH-Nitrogenaseuntereinheit zu exprimieren, da das betreffende Gen mittels Insertion eines Tn5-Transposons inaktiviert wurde. Dieser Stamm trägt zusätzlich eine Kanamycinresistenz (Ma *et al.*, 1982). Außerdem wurde ein 3841 Stamm mit einer Tn5-Insertion im *alaDH*-Gen (hier: *alaDH-*) in den Versuchsaufbau aufgenommen, welche eine Streptomycin- und Kanamycinresistenz trägt (Allaway *et al.*, 2000).

5.3 Pflanzenanzucht

Vicia faba Samen wurden für 2 Minuten in 70%-igem Ethanol, 10 Minuten in ddH₂O und 10 Minuten in 5%-igem NaOCl und abschließend fünfmal mit ddH₂O gewaschen. Sie wurden über Nacht im Dunkeln in ddH₂O aufgequollen. Am nächsten Tag wurden sie ca. 1 cm tief in Blähton (Lamstedt Lecaton, 2-4 mm, Kamstedt, Deutschland) eingepflanzt. Es folgte eine zweiwöchige Wachstumsphase

unter Kurztagbedingungen (8 h Licht/16 h Dunkelheit) bei Umgebungstemperatur. Die Pflanzen wurden einmal wöchentlich mit 0,5x Hoagland Nährlösung (Tab. 2) gewässert, die jedoch keine Stickstoff haltigen Bestandteile enthielt, da dies die Entwicklung von Knöllchen inhibiert (Hoagland *et al.*, 1950; Saito *et al.*, 2014).

5.4 Bakterienkultivierung und Pflanzeninfektion

Bakterien der drei Rhizobienstämme (*Fix+*, *Fix-*, *alaDH-*, siehe 5.2.2.) wurden in Flüssigkultur (33 ml Nährmedium (Tab. 3) in einem 50 ml Reaktionsröhrchen) bei 30° C für 3-5 Tage schüttelnd (90 rpm) angezogen. Antibiotika wurden entsprechend der Resistenzgene (Streptomycin: 1 mg/ml, Kanamycin: 40 µg/ml). Die Bakterien wurden für 5 Minuten bei 3000 x g pelletiert und in der Hoagland Nährlösung (Tab. 2) resuspendiert. Für die Infektion der zwei Wochen alten Pflanzen wurden 50 ml Infektionslösung bodennah auf die Pflanzen gegeben. Am Infektionstag wurde die Gruppe *Null* mit normaler Hoagland Lösung gegossen und die Gruppe *Gedüngt* erhielt einmalig Hoagland Lösung mit Nitratverbindungen (Tab. 2), sodass sich der Experimentalaufbau in Abbildung 7 ergibt.

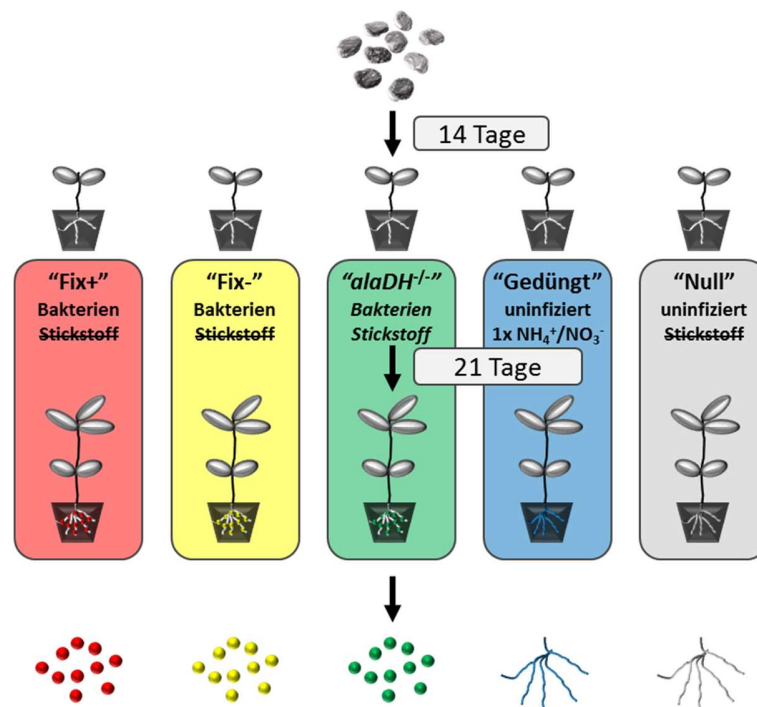


Abbildung 7: Experimentalaufbau.

Sterilisierte Bohnen wurden nach zweiwöchigem Wuchs in die fünf Experimentalgruppen aufgeteilt: *Fix+* (mit WT Rhizobien infiziert); *Fix-* (mit Nitrogenase defizienten Bakterien infiziert); *alaDH-* (mit AlaDH defizienten Bakterien infiziert); *Gedüngt* (uninfizierte Pflanzen, welche einmalig Stickstoffdüngung erhalten und als Kontrolllinie für die *Fix+*/*alaDH-* Pflanzen dienen); *Null* (uninfizierte, ungedüngte Pflanzen als Kontrolllinie für *Fix-* Pflanzen).

Nach weiteren drei Wochen wurden die Pflanzen bzw. die Wurzeln und Knöllchen für die Experimente geerntet.

Tab. 2: Komposition der Nährlösungen mit und ohne stickstoffhaltige Bestandteile.

Nährstoff	Für alle Pflanzen 1x/Woche	Gedüngt Pflanzen am Infektionstag
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	-	2,5 mM
KNO ₃	-	2,5 mM
MgSO ₄ *7H ₂ O	1 mM	1 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	0,75 mM
NaFeEDTA	5 µM	5 µM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	3,14 mM	-
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,2 µM	0,2 µM
H ₂ BO ₃	1 µM	1 µM
NiSO ₄ *6H ₂ O	0,2 µM	0,2 µM
ZnSO ₄ *7 H ₂ O	1 µM	1 µM
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	2 µM	2 µM
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,5 µM	0,5 µM
CoCl ₂ * H ₂ O	0,2 µM	0,2 µM

Tab. 3: Anzuchtmedium für Rhizobien.

TY Medium	
Trypton	0,5% [w/v]
Hefeextrakt	0,3% [w/v]
Glukose	0,02 M
CaCl ₂	0,005 M

5.5 Stärkefärbung

Knöllchen wurden mittels eines Skalpell in Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger unter ein Deckgläschen gelegt. Es folgte die Benetzung mit einem Tropfen ddH₂O mittels Kapillarsog durch ein Papiertuch. Dies wurde anschließend mit einem Tropfen Kaliumiodid Lösung wiederholt. Nach einer zehnminütigen Inkubation erfolgte die Entfärbung unspezifisch gefärbter Regionen durch die erneute Zugabe von ddH₂O.

5.6 Suberinfärbung

Suberinhaltige Regionen in Querschnitten von Knöllchen wurden entsprechend dem Protokoll von Fleck et al., (2015) an Fluorol gebunden und unter UV-Licht im Mikroskop aufgenommen.

5.7 Primerdesign

Die *alaDH*- Rhizobienmutante trägt eine Tn5-Insertion im *alaDH*-Gen (Allaway et al., 2000). Diese sollte per PCR und Sequenzierung nachgewiesen werden. Dafür wurde die Tn5-Sequenz vom „National Centre for Biotechnology Information“ (NCBI) unter der Identifikationsnummer U00004.1 bezogen. Die *alaDH*-Sequenz stammt von der Internetpräsenz des Sanger Instituts (ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/rl/GeneDB_Rleguminosarum_Genes) unter der ID RL1966. Beide Sequenzen können im Anhang gefunden werden.

Für die Konstruktion der Primer für PCR und Sequenzierung wurde das „Primer Blast Tool“ von NCBI verwendet (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Es wurden Primer mit einer Schmelztemperatur von $60 \pm 3^\circ \text{C}$ erstellt (Tab. 4). Die Bindungsstellen der Primer sind Abbildung 8 zu entnehmen. Das Primerpaar GL/GR amplifiziert das *alaDH*-Gen auf einer Länge von 1106 Basenpaaren. Wenn das Tn5-Transposon (5816 Basenpaare) innerhalb des amplifizierten Bereichs liegt, beträgt die Gesamtlänge des Amplifikats 6924 Basenpaare. Das Primerpaar GTL/GTR amplifiziert einen Genabschnitt zwischen dem 5'-Ende des *alaDH*-Gens, der bis in das 5' Ende des Transposons ragt. Da die Insertionsstelle des Transposons nicht bekannt ist, kann die Länge des GTL/GTR Amplifikats nicht vorausgesagt werden. Der Sequenzierprimer ATR wurde für die Sequenzierung der Insertionsstelle verwendet. Als Matrize fungiert das PCR-Produkt, welches mittels GTL und GTR hergestellt wurde.

Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete Primer.

Primer Paar	Name	Verwendet für	Sequenz (5'-3')	Amplifikat (bp)
Gen-Gen	GL	PCR, Sequenzierung	GGTTGCCCGAAGGAAATCAAG	1106 in <i>Fix+</i> , <i>Fix-</i> 6924 in <i>alaDH-</i>
	GR	PCR	GCTACGTTTCAGCACGCTTTC	
Gen- Transposon	GTL	PCR	GCGAATATGTTGCCACGGC	unbekannt
	GTR	PCR	TGCTCTCGTCCAGATCATCCT	
Transposon- Gen	ATR	Sequenzierung	CCTTCCTGCATGGCTTCACTA	X

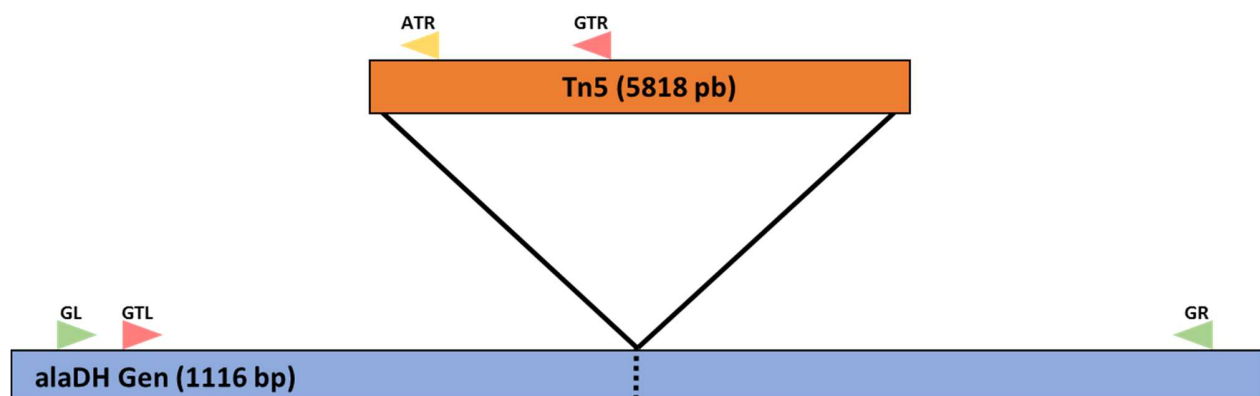


Abbildung 8: Bindungsstellen der Primer für PCR und Sequenzierung zum Nachweis der Tn5 Insertion im *alaDH*-Gen.

5.8 Kolonien-PCR

Rhizobien (*Fix+*, *Fix-*, *alaDH-*) wurden auf TY-Medium (Tab. 5) ausgestrichen und vier Tage bei 30°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden mit einem Zahnstocher gepickt und in $10 \mu\text{L}$ ddH₂O resuspendiert. Die Suspension wurde als Vorlage in nachfolgenden PCRs (Tab. 6) verwendet. Die PCR im Thermocycler (LifeTouch TC-96/G/H(b)C, Hangzhou Bior Technology Co. Ltd., Hangzhou, China)

wurde mit einer Initiativinkubation bei 95° C für 5 Minuten gestartet. Es folgten 36 Amplifikationszyklen mit den in Tab. 7 dargestellten Parametern.

Tab. 5: Agar Medium für das Anziehen von Rhizobien Kolonien.

TY Medium (fest)	
Trypton	0,5% [w/v]
Hefeextrakt	0,3% [w/v]
Glukose	0,02 M
Agar	1,2% [w/v]
CaCl ₂	0,005 M

Tab. 6: PCR Mix.

PCR Mix	
"DreamTaq" Puffer	10% [v/v]
dNTP Mix	0,4 mM
"DreamTaq" DNA Polymerase	2,5 U
Primer	0,2 mM
DNA Vorlage	0,04% [v/v]

Tab. 7: Ablauf der PCR.

Primer Paar	Parameter der PCR Stufen		
	Trennung	Hybridisierung	Polymerisierung
GL/GR	95° C; 30 Sek.	61,1 ° C; 35 Sek.	72° C; 7 Min
GTL/GTR	95° C; 30 Sek.	60,9 ° C; 35 Sek.	72° C; 4 Min

5.9 DNA-Agarosegele

Die PCR-Produkte wurden im Verhältnis 1:10 mit dem „Midori Green Direct“ Ladepuffer versetzt, auf ein 2% Agarosegel geladen und mit TAE-Puffer (Tab. 8) überschichtet. Als Größenstandard diente der „FastGene 1kb DNA Marker Plus“, der ebenfalls 1:10 mit dem oben genannten Ladepuffer versetzt wurde. An die Gelkammern (Biorad DNA Subcell, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) wurde jeweils eine Spannung von 120 V und eine Stromstärke von 120 mA angelegt (Netzgeräte: EPS301, GE Healthcare Biosciences AB, Upsala, Schweden). Die Auftrennung wurde gestoppt, als die Lauffront das Ende des Gels erreichte. Die DNA im Gel wurde durch Inkubation in Ethidiumbromid und anschließendes Scannen der Fluoreszenz im UV-Bereich detektiert.

Tab. 8 TAE-Puffer für die DNA-Gelelektrophorese.

TAE Puffer	
Tris-HCl (pH=8,5)	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

5.10 Sequenzierung

Das PCR-Produkt des Primerpaares GTL/GTR wurde mit einem Primer innerhalb des Tn5-Transposons (ATR, siehe Abbildung 8) durch „Microsynth Seqlab“ (Microsynth, Göttingen) sequenziert. Die

erhaltenen Sequenzen wurden mit den Sequenzen des *alaDH*-Gens und des Tn5-Transposons durch „ClustalX“ (Version 2.1, Conway Institut UCD, Dublin, Irland, (Larkin *et al.*, 2007) verglichen. Die Auswertung der Vergleiche erfolgte mit „Genedoc“ (Version 2.6.002).

5.11 Organellenisolation

Die Isolation der Bakterioide und Mitochondrien erfolgte nach Kouchi *et al.*, (1989), Neuburger *et al.*, (1982) und Thal *et al.*, (2018). Die dazu verwendeten Puffer sind Tab. 9 zu entnehmen. Drei bis zehn Gramm Knöllchen der infizierten Linien (*Fix+*, *Fix-*, *alaDH-*) bzw. 50 bis 100 g Wurzeln der Kontrolllinien (*Gedüngt*, *Null*) von fünfwöchigen Pflanzen wurden morgens für 10 Minuten in 50 ml (Knöllchen) bzw. 100 ml (Wurzeln) Aufschlusspuffer mit Sand und auf Eis gemörsert. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis, die Zentrifugationsschritte bei 4° C vollzogen. Die Homogenate wurden durch vier Lagen Miracloth-Membran gefiltert und bei 400 x g fünf Minuten lang zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Zentrifugenbecher überführt und weitere fünf Minuten bei 4000 x g zentrifugiert.

Ab diesem Punkt wurde das Protokoll für die zu isolierenden Bakterioide und Mitochondrien getrennt. Die Bakterioide aus den resultierenden Pellets der infizierten Linien wurden in 6 ml Bakteroidpuffer suspendiert und isoliert nach Kouchi *et al.*, (1989): Die Suspensionen wurden auf einen Percollstufengradienten (Percoll, GE Healthcare, Upsala, Schweden) aus drei Konzentrationstufen (je 10 ml, 22%, 40%, 62% [v/v], jeweils aufgefüllt mit Bakteroidpuffer) gegeben und in einem Schwingrotor bei 18542 x g zentrifugiert.

Für die Mitochondrienisolation wurden die Überstände nach dem 4000 x g Zentrifugationsschritt aller Linien in neuen Zentrifugenbechern für 20 Minuten bei 17000 x g zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden in je 3 ml Mitochondrienpuffer mittels eines Pinsels resuspendiert und mit einem Potter homogenisiert. Anschließend wurden sie ebenfalls auf einen Percollstufengradienten gegeben. Dieser setzte sich zusammen aus 14% (5 ml), 22% (15 ml) und 45% (ml) ([v/v], jeweils mit Mitochondrienpuffer aufgefüllt). Die Zentrifugation wurde ebenfalls in einem Schwingrotor bei 35248 x g für 30 Minuten ausgeführt.

Die Bakteroid- bzw. Mitochondrienbanden wurden mit Glaspipetten abgenommen und je dreimal (zweimal bei 18000 x g, einmal bei 10000 x g) für jeweils 10 Minuten gewaschen. Der Überstand wurde jeweils verworfen und durch neuen Bakteroid- bzw. Mitochondrienpuffer ersetzt. Die gereinigten Pellets wurde in Abhängigkeit von ihrer Größe in 100 µL – 800 µL des jeweiligen Puffers resuspendiert.

Tab. 9: Puffer für die Organellenisolation. *= kurz vor Gebrauch hinzugefügt

Aufschlusspuffer		Mitochondrienpuffer		Bakteroidpuffer	
Mannitol	0,6 M	Mannitol	0,6 M	Mannitol	0,3 M
EGTA	1 mM	EGTA	1 mM	EGTA	1 mM
MOPS	25 mM	KH ₂ PO ₄	25 mM	MOPS	50 mM
L-Cystein	5 mM	PMSF*	0,05 mM	MgCl ₂	5 mM
BSA*	0,1% [w/v]	pH=7,2 (KOH)		pH= 7,4 (KOH)	
PMSF*	0,05 mM				
pH= 7,8 (KOH)					

5.12 Proteinbestimmungen nach Bradford

Sofern nicht anders angegeben, wurden Proteinkonzentrationen durch die Bradfordmethode gemessen (Bradford, 1976). 1 μ L der zu untersuchenden Probe wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäßen mit 500 μ L und 500 μ L Coomassiereagenz (Coomassie Protein Assay Reagent, Rockford, USA) versetzt und durch Vortexen gemischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation im Dunkeln erfolgte die Überführung in 1 ml Polypropylenküvetten und die Messung der Absorptionsstärke bei 595 nm in einem Photometer (UV-1800, Shimadsu Corporation Kyoto, Japan). Die Kalibrierung zuvor erfolgte mittels einer BSA-Verdünnungsreihe.

5.13 Shotgun-Massenspektrometrie

Die Proteome der Organellen wurden mittels Shotgun-Massenspektrometrie analysiert (Thal *et al.*, 2018). Ein Volumen isolierter Bakterioide/Mitochondrien äquivalent zu 50 μ g Protein wurde in Probenpuffer aufgenommen und 5 Minuten lang bei 90° C inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert. Die so vorbereiteten Proben wurden auf Fokussierungsgele bestehend aus Trenn- und Sammelphase (14% Acrylamid bzw. 4% Acrylamid), geladen. Die Elektrophorese wurde bei 290 V und 45 mA (Electrophoresis Power Supply EPS601, Amersham Biosciences) ausgeführt und gestoppt, sobald die Phasengrenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht wurde. Nach Fixierung der Proteine für 30 Minuten in Fixierlösung (15% Ethanol, 10% Essigsäure [v/v]) erfolgte die Färbung in Coomassiefärbelösung für 1-2 Stunden (Neuhoff *et al.*, 1985). Die Bande mit den fokussierten Proteinen wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und für 20 Sekunden in 100%iger ACN-Lösung dehydriert. Der Verdau der Proteine und die Extraktion der Peptide erfolgte wie in Thal *et al.*, (2018) beschrieben.

Die resultierenden, getrockneten Peptide wurden in 20 μ L Puffer P (98% Azetonitril, 2% Trifluoressigsäure [v/v]) mittels zehnmütiger Behandlung im Ultraschallbad gelöst und durch Flüssigkeitschromatografie aufgetrennt. Ein Mikroliter wurde auf eine 2 cm, C18, 5 μ m, 100 Å Umkehrphasen-Säule mit einer Rate von 3 μ L/min geladen. Die Trennung der Peptide erfolgte entlang einer 50 cm, C18, 3 μ m, 100 Å analytischen Umkehrphasensäule. Die Elution der an der Säule gebundenen Peptide geschah durch die Applizierung eines nicht linearen Azetonitril-Gradienten von 5% - 30% (v/v) in 0,1% Ameisensäure mit einer Flussrate von 250 nl/min über 4 Stunden bei 35° C.

Die getrennten Peptide wurden durch eine Elektronensprayionisierung (ESI)-Quelle in das Massenspektrometer überführt. Zwischen Emitter und Ionentransferkapillare wurde dazu eine Spannung von 2,2 V angelegt, die Temperatur der Kapillare betrug 275° C. Das Massenspektrometer wurde im positiven Modus betrieben und die MS/MS Spektren wurden mittels einer Top10 Methode von Minute 20 bis Minute 100 aufgezeichnet. Die MS1 Auflösung betrug 70.000 (AGC: 1E6), bei MS2 wurde 17.500 (AGC: 1E5) gewählt. Es wurden nur Peptide mit 2, 3 oder 4 positiven Ladungen berücksichtigt.

Tab. 10: Puffer und Lösungen für das Erstellen Fokussierungsgele und Probenpuffer für die Massenspektrometrie.

Probenpuffer		Trenngel	
SDS	2% [w/v]	Tris-HCl (pH=8,8)	375 mM
Tris-HCl (pH=6,8)	65,5 mM	SDS	0,1% [v/v]
Glycerol	10% [v/v]	Acrylamid	14% [v/v]
Bromphenolblau	einige mg	Ammoniumpersulfat	0,04% [w/v]
β-Mercaptoethanol	5% [v/v]	TEMED	0,04% [v/v]

Sammelgel		Laufpuffer	
Tris-HCl (pH=6,8)	125 mM	Tris	24,8 mM
SDS	0,1% [v/v]	Glycin	192 mM
Acrylamid	4% [v/v]	SDS	0,1% [w/v]
Ammoniumpersulfat	0,063% [w/v]		
TEMED	0,125% [v/v]		

Färbelösung	
H ₃ PO ₄	0,017% [v/v]
Ammoniumsulfat	10% [w/v]
CBB-G250 Farbstoff	5% [w/v]
Ethanol	5% [v/v]

5.13.1 Auswertung der Proteomdaten mit MaxQuant

Die massenspektrometrischen Rohdaten wurden anhand der MaxQuant Software (Version 1.5.2.8. (Cox *et al.*, 2008) gegen eine kombinierte Datenbank aus den Sequenzen aller bekannten *Rhizobium*- und *Medicago*proteine ausgewertet (Tab. 11).

Tab. 11: Einstellungen der MaxQuant Software für die Analyse der gemessenen Mitochondrien und Bakteroid Peptidspektren.

Parameter	Wert in Mitochondrienanalyse	Wert für Bakterioide
Version	1.5.2.8	1.5.2.8
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)	Carbamidomethyl (C)
Decoy mode	revert	revert
Special AAs	KR	KR
Include contaminants	True	True
MS/MS tol. (FTMS)	20 ppm	20 ppm
Top MS/MS peaks per 100 Da. (FTMS)	12	12
MS/MS deisotoping (FTMS)	True	True
MS/MS tol. (ITMS)	0.5 Da	0.5 Da
Top MS/MS peaks per 100 Da. (ITMS)	8	8
MS/MS deisotoping (ITMS)	False	False
MS/MS tol. (TOF)	40 ppm	40 ppm
Top MS/MS peaks per 100 Da. (TOF)	10	10
MS/MS deisotoping (TOF)	True	True
MS/MS tol. (Unknown)	0.5 Da	0.5 Da
Top MS/MS peaks per 100 Da. (Unknown)	8	8
MS/MS deisotoping (Unknown)	False	False
PSM FDR	0.01	0.01
Protein FDR	0.01	0.01
Site FDR	0.01	0.01
Use Normalized Ratios For Occupancy	True	True
Min. peptide Length	7	7
Min. score for unmodified peptides	0	0
Min. score for modified peptides	40	40
Min. delta score for unmodified peptides	0	0
Min. delta score for modified peptides	6	6
Min. unique peptides	0	0
Min. razor peptides	1	1
Min. peptides	1	1
Use only unmodified peptides and	True	True
Modifications included in protein quantification	Acetyl (Protein N-term);Oxidation (M)	Acetyl (Protein N-term);Oxidation (M)
Peptides used for protein quantification	Razor	Razor
Discard unmodified counterpart peptides	True	True
Min. ratio count	2	2
Re-quantify	False	False
Use delta score	False	False
iBAQ	True	True
iBAQ log fit	True	True
Match between runs	False	False
Find dependent peptides	False	False
Labeled amino acid filtering	True	True
Site tables	Oxidation (M)Sites.txt	Oxidation (M)Sites.txt
Decoy mode	revert	revert
Special AAs	KR	KR
Include contaminants	True	True
RT shift	False	False
Advanced ratios	True	True
AIF correlation	0.47	0.47
First pass AIF correlation	0.8	0.8
AIF topx	20	20
AIF min mass	0	0
AIF SIL weight	4	4
AIF ISO weight	2	2
AIF iterative	True	True
AIF threshold FDR	0.01	0.01

5.13.1.1 Mitochondrien

Kontaminanten, revers identifizierte Proteine und die Proteine, welche zwar aufgeführt waren, aber keinen iBAQ Wert besaßen, wurden entfernt. Zur Berechnung der Reinheiten der 20 Proben wurden jene iBAQ-Intensitäten herangezogen, die diese Qualitätsstandards erfüllten (Abbildung 11). Die Proben mit den höchsten Anteilen an rhizobiellen Proteinen wurden aus dem Datensatz entfernt. Die

Proteine in den restlichen Replikaten wurden jeweils dem *Arabidopsis*-Protein mit der höchsten Sequenzähnlichkeit zugeordnet und mittels des SUBAcon-Algorithmus (Hooper *et al.*, 2014) einem Zellkompartiment zugewiesen (Abbildung 12).

Im Sinne dieser Arbeit wurden nur die mitochondrialen Proteine betrachtet. Für die Auswertung der Proteinabundanz wurden normalerweise die von MaxQuant errechneten Label-Free-Quantification (LFQ-) Werte eines Proteins miteinander verglichen. Diese basieren auf der Normalisierung der gemessenen Intensitäten des Proteins zwischen allen Proben und ermöglichen so Vergleiche zwischen den Proben/Linien. Aufgrund der Unterschiedlichkeit der isolierten Mitochondrien in Bezug auf die Präsenz von Kontaminanten (v. A. Bakterioide in den infizierten Linien) ergab diese Analyse allerdings verfälschte Ergebnisse: Die Intensitäten der *Fix+*/*Fix-*-Proteine wurden überschätzt (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde eine andere Normalisierungsmethode gewählt: Die gemessenen Intensity-Based-Absolute-Quantification (iBAQ-) Intensitäten wurden normalisiert, indem sie als prozentualer Anteil aller aufsummierten mitochondrialen Proteine der Probe dargestellt wurden. Diese relativen Anteile der Proteine an den Gesamtintensitäten der Proben wurden für die weiterführende Analyse in Perseus ((Tyanova *et al.*, 2016); PCA Analyse und paarweise Vergleiche) verwendet. Um ein Protein zwischen zwei Linien zu vergleichen, wurden die Mittelwerte der Replikate der beiden Linien dividiert. Die Divisionsrichtungen waren dabei: *Fix+*/*Gedüngt*; *Fix-/Null* und *Fix+*/*Fix-*.

5.13.1.2 Bakterioide

Die Analyse der Peptidspektren aus isolierten Bakteroiden erfolgt analog zu der Methode, wie sie für die Mitochondrien beschrieben wurde. Für die Reinheitsbestimmung der einzelnen Proben wurden erneut die iBAQ-Werte herangezogen (Abbildung 34), im Gegensatz zur Vorgehensweise bei den Mitochondrien, wurden hier allerdings Label Free Quantitation (LFQ) Werte für die nachfolgenden Abundanzanalysen verwendet.

Sämtliche nachfolgenden Analysen wurden im reduzierten Datensatz vollzogen, welcher aus den 12 nicht-kontaminierten Replikaten (5 *Fix+*, 4 *Fix-* und 3 *alaDH-* Proben) bestand.

Zunächst wurden die pflanzlichen Proteine in den Bakteroidisolaten betrachtet. Jedes *Medicago*-wurde dem *Arabidopsis*-Protein mit der höchsten Sequenzähnlichkeit und mittels dem Suba4 Consensus einem Zellkompartiment zugeordnet (Hooper *et al.*, 2014). Die Intensitätsverteilung auf die Kompartimente wurde anhand der iBAQ-Werte vollzogen (Abbildung 36). Um die Intensität der pflanzlichen, cytosolischen Enzyme zwischen den *Fix+*, *Fix-* und *alaDH-* zu vergleichen, wurden die entsprechenden LFQ-Mittelwerte der Linien berechnet (Abbildung 37). Dies war möglich, da die Reinheiten der Proben zwischen allen Replikaten auf ähnlichem Niveau lag.

Die LFQ-Werte der Replikate einer Linie wurden gemittelt und mit dem Mittelwert der anderen Linie verglichen. Es wurde der Mittelwert von *Fix-* bzw. *alaDH-* durch den von *Fix+* dividiert, was den „Faktor“ ergab. Dieser war dann signifikant unterschiedlich, wenn $p < 0,05$ war.

5.13.2 Analysen anhand der Perseus Software

5.13.2.1 Mitochondrien

Die PCA Analyse der 548 identifizierten mitochondrialen Proteine in den 16 Proben erfolgte basierend auf den normalisierten iBAQ-Werten (siehe oben). Falls ein Protein in einer Probe nicht gefunden wurde, wurde dieser leere Wert, analog zu der Analyse der Mitochondrien, durch einen Wert innerhalb der Normalverteilung der gemessenen Intensitäten der anderen Proben ersetzt (Funktion „Replace missing values from normal distribution“; Width: 0,3; Downshift: 1,8; Mode: Separately for each column).

Perseus wurde außerdem für die Erstellung von „Volcano-Plots“ verwendet, um die als signifikant veränderten Proteine der paarweisen Vergleiche zu visualisieren. Es wurden die normalisierten iBAQ-Werte der Proben der zu vergleichenden Linien in Perseus geladen, transformiert, in die beiden Liniengruppen eingeteilt und mit der Funktion „Volcano Plot“ mit den folgenden Parametern dargestellt: Test: t-test, Side: Both, Paired: nicht gewählt, Number of randomizations: 250, Preserve grouping in randomizations: None, FDR: 0,05, S0: 0,1). Die Proteinpunkte wurden entsprechend der Signifikanzniveaus und der Richtung der Abundanzänderung (falls signifikant) eingefärbt.

5.13.2.2 Bakterioide

Die PCA von der Perseus Software wurde ebenfalls für die Visualisierung der Ähnlichkeit der 15 Bakteroidproben verwendet. Falls ein Protein in einem Replikat einer Linie nicht gefunden wurde, wurde dieser „leere“ Wert durch eine Zahl innerhalb der Normalverteilung der Messwerte über alle Proben ersetzt (Funktion „Replace missing values from normal distribution“; Width: 0,3; Downshift: 1,8; Mode: Separately for each column). Die PCA ergab einen Überblick über die Ähnlichkeit der Proben (Abbildung 35), ehe die kontaminierten Replikate entfernt wurden.

5.14 Western Blotting

Jeweils zwei Protein TGX Mini-Gele (BioRad, Mini Protean TGX, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) wurden in identischer Weise mit den jeweils angegebenen Mengen Protein in Probenpuffer (Tab. 10) beladen. Jeweils eine Spur wurde mit einem Größenstandard beladen. Die Läufe fanden in Laufpuffer (Tab. 10) bei einer Spannung von 300 V und maximal 65 mA für ca. 30 Minuten statt. Ein Gel wurde für 30 Minuten in (Fixierlösung 15% Ethanol, 10% Essigsäure [v/v] fixiert) und in Färbelösung (Tab. 10) gefärbt (Neuhoff *et al.*, 1985), während das andere, nicht-gefärbte Gel für den Transfer benutzt wurde.

Die separierten Proteine wurden mittels „Semi-Dry-Westernblot“ aus den SDS-Gelen auf eine Nitrozellulosemembran (Zellulosenitratmembran, Satorius AG, Göttingen) übertragen. Dazu wurden

2 Lagen Blott-Papier mit der Nitrozellulosemembran und dem Gel überschichtet. Den Abschluß nach oben bilden wiederum 2 Lagen Blott-Papier. Alle Komponenten wurden zuvor für 10 Minuten in Transferpuffer (Tab.12) inkubiert. Der Transfer erfolgte bei 22 V und 96 mA (Transblot SDCell, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) für 90 Minuten.

Die Membran wurde daraufhin dreimal für 10 Minuten in TTBS-Lösung gewaschen und getrocknet. Die Banden des Größenstandards wurden mittel eines Chemiepens (WesternBrightPen, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) markiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (bindet die NifH-Nitrogenaseuntereinheit, siehe Tab. 1) über Nacht bei Raumtemperatur.

Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper entfernt und der Blot dreimal für je 10 Minuten mit TTBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Tab. 1) wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben, bevor er wieder entfernt und die Membran erneut dreimal für 10 Minuten mit TTBS gewaschen wurde. Die sekundären Antikörper sind an die Peroxidase aus Meerrettich (HRP) gekoppelt. Zur Detektion dieser wurde die Entwicklerlösung (Tab. 12, welche das HRP-Substrat H_2O_2 beinhaltet) eine Minute auf der Membran belassen und anschließend entfernt. Die Chemilumineszenz aus der Oxidation des darin enthaltenen Luminols wurde bei einer Wellenlänge von 428 nm detektiert (Lumi-Imager F1, Roche Applied Science, Penzberg).

Tab. 12: Puffer und Lösungen für den Transfer von Proteinen und den Nachweis des Nitrogenaseenzym mittels Peroxidase gekoppelten Antikörpern.

Transferpuffer		TTBS	
Tris-HCl (pH=6,8)	25 mM	Tris-HCl (pH=6,8)	100 mM
Glycin	192 mM	Tween 20	0,1% [v/v]
SDS	0,0375%	NaCl	155 mM
Methanol	20% [v/v]		

Entwicklerlösung	
p-Cumarsäure	0,23 mM
Luminol	1,24 mM
Tris-HCl (pH=8,5)	100 mM
H_2O_2	0,015 % [v/v]

5.15 Messung der Nitrogenaseaktivität mittels H_2 Detektion

Knöllchen der drei infizierten Linien wurden geerntet und in eine geschlossene Kammer gegeben, in der ein H_2 -Sensor (Euro-Gas, Devon, UK) installiert wurde. Innerhalb des Sensors werden dem H_2 die Elektronen entzogen und der dadurch generierte Strom wird durch einen „Raspberry Pi“ detektiert. Die Wasserstoffkonzentration wurde fortlaufend 1x pro Sekunde gemessen. Zuvor wurde der Sensor mit H_2 -Gas kalibriert (500 ppm). Der lineare Anstieg der Konzentration über die ersten 300 Sekunden

nach Schließen der Kammer wurde für die Auswertung gegen das verwendete Knöllchengewicht normalisiert.

5.16 Bestimmung des Pflanzenwuchs und der photosynthetischen Aktivität

Die Größe der Pflanzen wurde täglich nach dem Tag der Infektion (14 Tage nach Aussaat) ab Substrathöhe gemessen. Ungerade/kurvige Abschnitte der Pflanzen wurden vorsichtig begradigt. Die in dieser Arbeit dargestellten Wuchsverläufe (Abbildung 28) wurden vom 26.03.2019 bis zum 31.05.2019 aufgezeichnet.

Vor Messung der photosynthetischen Aktivität wurden die Pflanzen mindestens einen Tag nicht mehr bewegt sowie einige Stunden vor der Messung gewässert. Die Messungen der CO₂ Assimilationsrate und der stomatalen Leitfähigkeit erfolgte vormittags zwischen 09:30 und 12:00 Uhr mit einem portablen Messsystem („LI-6800 Portable Photosynthesis System“ [LI-COR Inc., Lincoln, USA]). Das Messsystem bestand aus einer Referenzkammer, in der definierte Bedingungen gehalten wurden (400 μmol_[CO₂]*mol⁻¹, 70% Luftfeuchtigkeit) und einer Probenkammer, in der ein intaktes, an der Pflanze befindliches Blatt (viertältestes) fixiert wurde und mit 1300 μmol*(m²*s)⁻¹ Photonen bei 28° C bestrahlt wurde. Die Veränderung der Luftkomposition im Vergleich zur Referenzkammer wurde verfolgt und die Messwerte nach Stabilisierung der Werte dienten als Grundlage zur Berechnung von Assimilation und Leitfähigkeit durch eine vom Hersteller bereitgestellte Software (LI-COR (2017) Version 1.2).

5.17 Aktivitätsassays

Die Ermittlung der Enzymkapazitäten erfolgte jeweils über die Umwandlungsraten von NADH in einer Mikroplatte (96 Reaktionskammern). Diese wurden fortlaufend photometrisch durch einen Platerader (Multiscan Sky, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA) bestimmt. Die Ermittlung der Enzymkapazitäten erfolgte jeweils über die Abnahmerate von NADH und wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Aktivität} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{min} * \mu\text{g}} \right] = \frac{\Delta \text{ Absorption} * \text{Reaktionsvolumen} [\mu\text{L}]}{\text{Probenvolumen} [\mu\text{L}] * \text{Proteinkonzentration} \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right] * \epsilon \left[\frac{\mu\text{L}}{\text{mmol} * \text{cm}} \right] * \text{Kammerhöhe} [\text{cm}] * 1 \text{ Min}}$$

Das Reaktionsvolumen betrug 300 μL und die Kammerhöhe (Höhe des Reaktionsgefäßes in der Mikroplatte) 0,833 cm. Der Extinktionskoeffizient (ε) für NADH ist 6220000 μL*(mmol*cm)⁻¹. Die Probenvolumina wurden abhängig von der Proteinkonzentration der isolierten Organellen und der zu verwendenden Proteinmengen gewählt.

5.17.1 Alanine-Dehydrogenase

Pro Reaktionsansatz (Tab. 13) wurden 30 μg isolierte Bakterioide eingesetzt. Es wurde die Abnahmerate der NADH Absorption im Zuge der AlaDH-Aktivität gemessen. Die Zugabe von KCN inhibierte die Oxidation von NADH durch das OXPHOS System. Die Rate für jedes biologische Replikat

ist aus dem Mittelwert dreier technischer Replikate errechnet worden, abzüglich der Rate der Kontrolle, in der kein NH_4Cl zugegeben wurde.

Tab. 13: Reaktionsansatz für den AlaDH-Aktivitätstest.

AlaDH	
NADH	0,2 mM
Pyruvat	5 mM
KCN	1 mM
NH_4Cl	200 mM
Tris-HCl (pH=8,5)	50 mM

5.17.2 Alanine-Aminotransferase

Pro Messung (Tab. 14) wurden 5 μg isolierte Mitochondrien verwendet. Die Deaminierung von Alanin wurde an die Reduktion des entstehenden Pyruvats durch die Laktat Dehydrogenase (LDH) gekoppelt, bei der NADH oxidiert wird. Für jedes biologische Replikat wurde erneut die Abnahme der NADH-Absorption aus drei technischen Replikaten ermittelt, von der die Rate der Kontrolle (ohne Alanin) subtrahiert wurde.

Tab. 14: Reaktionsansatz für den AlaAT-Aktivitätstest.

AlaAT	
NADH	0,8 mM
2-OG	12 mM
L-Alanin	250 mM
LDH	45 U
Tris-HCl (pH=7,5)	200 mM

5.18 Messung der Respirationsrate von Mitochondrien und Bakterioide

Der Sauerstoffverbrauch im Zuge der Atmungsaktivität der Bakterioide/Mitochondrien wurde durch die fortlaufende Messung der Sauerstoffkonzentration in der Versuchskammer (Oroboros Oxygraph 2K, Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich) mit einer Elektrode gemessen. Für die Messungen der Respirationsraten von Mitochondrien wurden nur frisch isolierte Proben verwendet. In ein Gesamtvolumen von 2 ml des Respirationspuffers (Tab. 15) in der Kammer wurden jeweils 20 μL der Substrate/Inhibitoren gegeben, sodass sich die folgenden Konzentrationen ergaben (angegeben in der Reihenfolge der Zugabe): NAD (2mM), CoA (120 μM), TPP (200 μM), Pyruvat (10 mM), Malat (10 mM), ADP (1 mM), KCN (1 mM), SHAM (10 mM). Die Atmungsrate nach den Zugaben von ADP/KCN/SHAM wurde immer dann aufgezeichnet, wenn die Respiration ein stabiles Niveau gehalten hat. Hierfür kam die vom hergestellte Software (Oroboros Datlab Version 6.1.0.7.) zum Einsatz.

Tab. 15: Respirationspuffer zur Messung der Atmung isolierter Mitochondrien.

Respirationspuffer	
Saccharose	0,6 M
KH ₂ PO ₄	5 mM
TES	10 mM
NaCl	10 mM
MgSO ₄	2 mM
BSA	0,2% [w/v]

5.19 Bestimmung der Konzentrationen freier Aminosäuren in Wurzeln und Knöllchen

5.19.1 Extraktion und Probenvorbereitung

Die Knöllchen oder Wurzeln der Experimentallinien wurden in Eppendorf-Gefäße geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es erfolgte die Gefriertrocknung über Nacht und der Aufschluß der Zellen in einer Schwingmühle mittels einer Metallkugel (2 mm Durchmesser) bei 25 rpm/s für 90 Sekunden. 10 mg des Pulvers wurden in 800 µL 0,1 M HCl solubilisiert und 15 Minuten inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden bei 16100xg für 5 Minuten pelletiert. 600 µL des Überstands wurden im Verhältnis 1:1 mit Boratpuffer (0,5 M H₃BO₃; pH 11 [KOH]) 15 Minuten lang inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation (15 Minuten, 16100xg) wonach der Überstand durch einen „Son-X“ (0,2 µm; Sigma-Aldrich; Stadt) Filter für 30 Sekunden bei 18000 x g filtriert. Das Filtrat wurde bis zur weiteren Prozessierung bei -20° C gelagert. 50 µL des Filtrats wurden mit 300 µL Boratpuffer und 190 µL 0,1 M HCl versetzt. Für primäre Aminosäuren wurde 5 µL 0,5 mM β-Aminobutyrat, für sekundäre Aminosäuren 5 µL 0,5 mM Sarkosin zur Normalisierung des Derivatisierungsvorgangs zugegeben.

5.19.2 Derivatisierung und Quantifizierung

1 µL der Proben wurde mit 25 µL 0,1 M Boratpuffer und 0,5 µL Ortho-Phthaldialdehyd (OPA) gemischt. Nach 15 Sekunden wurden 0,4 µL 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid auf die Säule gegeben, wonach die Derivatisierung durch einen Impuls von 3 µL Essigsäure (1 M) gestoppt wurde. Das Gemisch wurde schließlich auf eine 100 mm x 3 mm „InfinityLap Poroshell HPH-C18“ Säule (2,7 µm; Agilent, Waldbronn) gegeben, welche von einem „Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) System, Ultimate 3000“ (ThermoFisher, Dreieich, Germany) angesteuert wurde. Die Temperatur der Säule wurde auf 40° C festgelegt. Die Trennung der Aminosäuren von der Säule erfolgte durch die Applizierung eines Gradienten aus Lösung A und B. Lösung A beinhaltete dibasisches Natriumphosphat (10 mM) und Natriumtetraborat (10 mM). Lösung B bestand aus Methanol, Azetonitril und ddH₂O im Verhältnis (45:45:10). Die Flussrate wurde auf 0,71 ml/min festgelegt. Der Gradientenverlauf ist Abbildung 9 zu entnehmen.

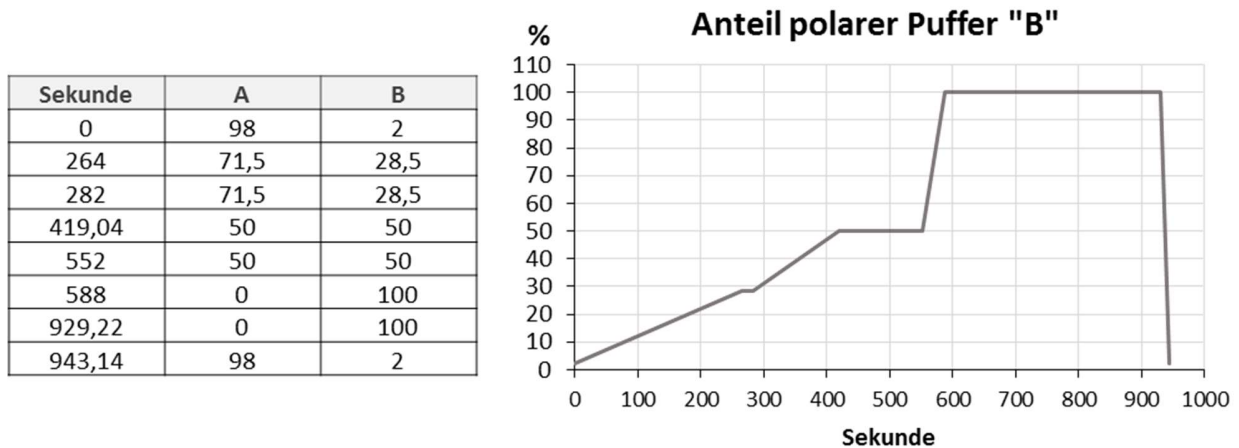


Abbildung 9: Verlauf des Gradienten für Eluierung der Aminosäuren.

Die an den Aminosäuren befindliche OPA wurde durch einen Fluoreszenzdetektor „3400 RS“ und einen UV Detektor „3100“ (ThermoFisher, Dreieich, Deutschland) detektiert. Primäre/Sekundäre Aminosäuren wurden auf einer Wellenlänge von 337/266 nm angeregt und ihre Extinktion bei 442/305 nm gemessen. Mitlaufende Aminosäurestandards (Sigma-Aldrich Produktnr: AAS18-5ML) beinhalteten L-Asparagin, L-Glutamin, γ -Aminobutyrat, β -Aminobutyrat, L-Tryptophan und Sarkosin. Die Integrale unter den Elutionskurven wurden mit der Software „Chromleon 7.2 SR4“ (ThermoFisher, Dreieich) bestimmt.

5.20 Isotopenmarkierung

5.20.1 Probenerstellung

Die Knöllchen der infizierten Linien (*Fix+*, *Fix-*, *alaDH-*) wurden geerntet und gesammelt, woraufhin 0,15 – 0,3 g einer Knöllchenart in ein luftdichtes Glasfläschchen ($V=4$ ml) gegeben wurden. Das Fläschchen wurde mit einer 20 ml Spritze durch das Septum des Deckels evakuiert, bevor 4 ml eines ^{15}N Isotopengases (99,6% Reinheit im Verhältnis 80:20 mit O_2 , bezogen von Euriso-Top GmbH, Saarbrücken) mit einer Spritze injiziert wurden. Die Inkubation erfolgte zwischen 0 und 780 Sekunden und wurde mit dem Einfrieren des Fläschchens in flüssigem Stickstoff beendet. Die Knöllchen wurden über Nacht gefriergetrocknet und mit einer Schwingmühle mittels Metallkugel bei 25 rpm/s für 90 Sekunden gemahlen. Die Aufbereitung der Proben basierte auf dem Protokoll von Amelung *et al.* (2001) und berücksichtigte die Änderungen von Sauheidl *et al.*, (2009). Die Hydrolyse, Extraktion und Aufreinigung der Aminosäuren erfolgte durch Dr. Leopold Sauheidl und Viola Rünzi (Institut für Bodenkunde, Leibniz Universität Hannover).

5.20.2 Hydrolyse, Extraktion und Aufreinigung

Die Aminosäuren aus 10-20 mg des Pflanzenpulvers wurden mit Salzsäure (6 M) zwölf Stunden bei 105°C hydrolysiert. Als interner Standard wurde nun dem Hydrolysat 35 μg Norvalin zugegeben. Es wurde filtriert (Filtertyp GF6, Schleicher und Schuell, Dassel) und es folgte die Extraktion und Aufreinigung mittels einer SPE-Säule (Polypropylen Probenrennsäule 25 ml, BioRad Laboratories, München), die zuvor mit einer Kationenaustauschlösung (DOWEX 50 W X8, Sigma-Aldrich Chemie

GmbH, Deisenhofen) behandelt wurde. Die hydrolysierten Aminosäuren wurden auf die SPE-Säule gegeben, fünfmalig (je 5 ml) mit Oxalsäure (0,1 M, pH [NH₄OH]=1,6-1,7) einmalig (5 ml) mit Salzsäure (0,01 M) und einmalig mit 5 ml ddH₂O gewaschen und schließlich durch die fünfmalige (je 5 ml) Zugabe von NH₄OH (2 M) von der Säule eluiert. Es folgte die Gefriertrocknung der Proben, ehe sie in 850 µl Salzsäure (0,1 M) gelöst wurden. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (RCF= 2500, 20 Minuten), der pH-Wert des Überstands wurde mit Salzsäure (0,1 M) unter 2 eingestellt und die Zugabe des internen Standards (trans-4-Aminomethylcyclohexancarboxylsäure) für die nachfolgende Derivatisierung. Zuvor wurden die Proben mindestens 2 Stunden bei -20° C in Reaktionsgefäßen (Reactivials, Thermofisher, Dreieich) gelagert und gefriertrocknet.

5.20.3 Derivatisierung

Isopropanol und Acetylchlorid (Verhältnis 2,5:1) wurden bei 4° C gemischt und 400 µl davon auf die Proben gegeben. Die Veresterung erfolgte durch die anschließende 30minütige Inkubation bei 110° C. Anschließend erfolgte die Eindampfung unter N₂ und Acetylierung, indem Dichlormethan und Perfluorpropionsäureanhydrid (im Verhältnis 1:1) zugegeben und bei 110° C zehn Minuten inkubiert wurde. Nach der erneuten Eindampfung unter N₂ wurden die Proben maximal eine Woche bis zur Messung gelagert.

5.20.4 Messung der Aminosäuren im Gaschromatographen

Die Aminosäure spezifischen ¹⁵N Messungen wurden in freundlicher Zusammenarbeit mit Dr. Jens Dyckmans (Kompetenzzentrum Stabile Isotope, Büsgen-Institut, Georg-August-Universität, Göttingen) durchgeführt. Es kam ein Isotopenverhältnismassenspektrometer (IRMS, ThermoFinnigan, Dreieich) zum Einsatz, welches durch eine Verbrennungsschnittstelle (GC Combustion III, ThermoFinnigan) an einen Gaschromatographen (Trace GC 2000, ThermoFinnigan) gekoppelt wurde. Die Geräteeinstellungen wurden von Sauheidl *et al.*, (2009) übernommen. Die Aminosäuren wurden bei 250° C verdampft und durch eine GC-Säule (BPX5 Säule (60m lang x 0.25mm Durchmesser 0.25 mm), Trajan Scientific, Australien) voneinander separiert. Dabei wurde Helium konstant mit einem Fluss von 1,1 ml/min durch die Säule gegeben. Der angewandte Temperaturgradient des Gaschromatographen ist ebenfalls Sauheidl *et al.*, (2009) zu entnehmen. Nach Trennung der Peaks im Chromatogramm wurde der Gasstrom in das Isotopenverhältnismassenspektrometer geleitet und es erfolgte die Messung der ¹⁵N Anreicherung der untersuchten Aminosäuren. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte nach Sauheidl *et al.*, (2009).

5.21 Statistische Analysen

Sofern nicht anders angegeben erfolgten paarweise Vergleiche durch den Students T-Test in Excel (Zweiseitig, Heteroskedastisch). Für die Vergleiche mehrerer Gruppen wurde der Online verfügbare Tukey Test verwendet (https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/).

6 Ergebnisse

6.1 Anpassungen des mitochondrialen Proteoms an SNF

Zu Beginn der Doktorarbeit stand die Analyse des Knöllchenproteoms aus Thal *et al.* (2018), welche eine Adaption und Beteiligung des mitochondrialen Proteoms an der Stickstofffixierung in den Bakteroiden nahelegte. Aus diesem Grund wurden Mitochondrien aus den vier Linien (*Fix+*, *Fix-*, *Gedüngt* und *Null*) isoliert und ihre Proteome mittels Shotgunproteomik analysiert (n=5). Dazu wurden zunächst Fokussierungsgel angefertigt, aus denen die Proteinbanden ausgeschnitten wurden (Abbildung 10).

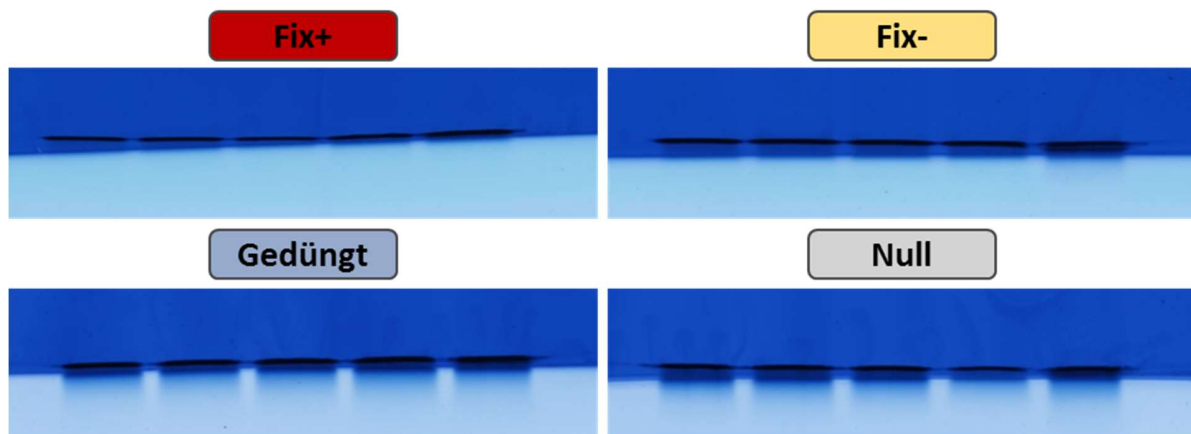


Abbildung 10: Fokussierung und Reinigung von mitochondrialen Proteinen in Coomassie-gefärbten Polyacrylamid-Gelen.

Pro Linie wurden 5 Replikate zu je 50 µg aufgetragen.

6.1.1 Reinheit der Mitochondrienisolate

Die Proteine wurden mit Trypsin verdaut und die resultierenden Peptide mittels Flüssigkeitschromatografie getrennt. Eluierende Peptide wurden direkt mittels Tandemmassenspektrometrie (ESI-MS²) analysiert. Die MS²-Spektren wurden mit Hilfe von MaxQuant gegen eine Fusionsdatenbank aus *Medicago* (*Mt*) sowie *Rhizobium* (*Rl*) Peptiden ausgewertet. Über alle 20 Proben wurden 5032 nicht-redundante Proteine identifiziert. Abzüglich der als Kontaminanten identifizierten Proteine und der Pseudo-Proteine aus einer Datenbank mit revertierter Aminosäuresequenz (zur Bestimmung der Rate falsch-positiver Identifizierung), beinhaltet die Liste 4129 Proteine, die in mindestens einer Probe gefunden wurden (1253 für *Rl* und 2877 für *Mt*). Die Menge der Proteine und deren *Mt/Rl* Verteilung für jede Probe sind in Abbildung 11 A und B zu sehen. Es wird deutlich, dass gerade in den infizierten Linien jeweils mehrere Hundert rhizobielle Proteine und jeweils ca. 1300-1400 pflanzliche Proteine enthalten sind. Die Reinheiten liegen hier mit Ausnahme der Proben *Fix-4* und *Fix-5* bei mindestens 60%. Die uninferierten Kontrolllinien weisen nur geringfügige rhizobielle Kontaminationen auf, die Reinheit liegt mit Ausnahme von *Null 3* in allen Proben bei über 90%. Die klassifizierten Proteine wurden als Nächstes aufgrund ihrer Messintensität quantifiziert (iBAQs, Abbildung 11 C und D). Es ist zu sehen, dass die

Anteile der pflanzlichen Proteine in den infizierten Proben (*Fix+*: 86/77/88/78/90% und *Fix-*: 78/74/77/63/41%) teilweise erheblich niedriger sind als in den Isolatn aus Wurzeln (*Gedüngt*: 98/98/98/99/98% und *Null*: 99/99/90/97/99). Dies ist auch naheliegend, da beide Kontrolllinien nicht in Kontakt mit Rhizobien kamen, während die Zellen der infizierten Linien neben Mitochondrien zusätzlich noch Bakterioide besitzen. Aufgrund ihrer ähnlichen Größe können Bakterioide während der Mitochondrienisolation nicht quantitativ von den Mitochondrien separiert werden. Für die folgenden Analysen wurden pro Linie die vier reinsten Replikate ausgewählt (ab sofort nicht berücksichtigte Proben sind in Abbildung 11 D mit Pfeilen gekennzeichnet). Darüber hinaus wurden für die nachfolgenden Analysen nur die pflanzlichen Proteine analysiert.

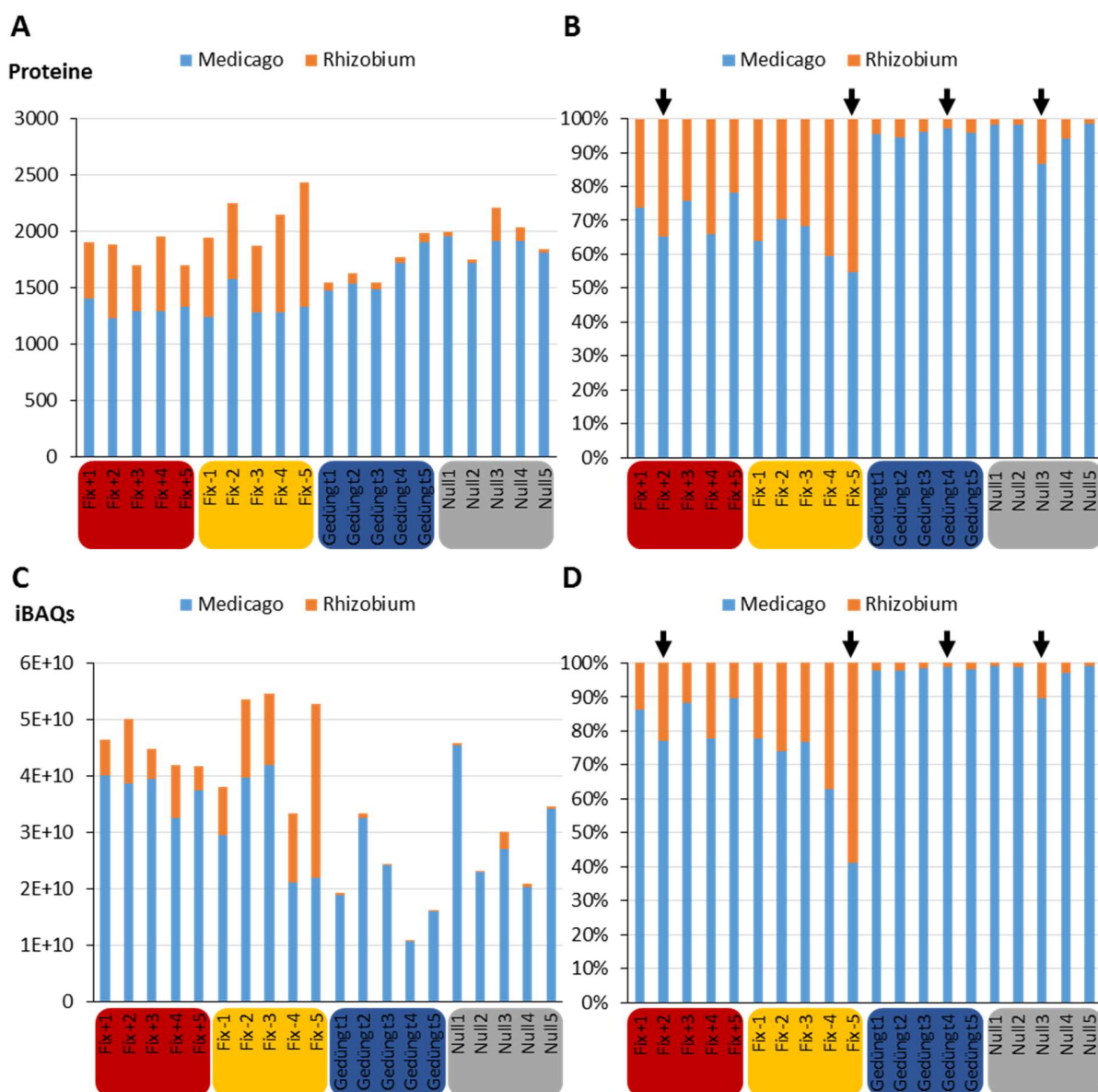


Abbildung 11: Ursprünge der identifizierten Proteine in den 20 Mitochondrienisolaten.

Im weiteren Verlauf nicht berücksichtigte Proben sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. **A und B:** Absolute Anzahl der Proteinspezies, die *Mt* und *Rl* zugewiesen werden können. **C und D:** Aufsummierte absolute Proteinintensitäten (iBAQs) von *Mt*- und *Rl*-Proteinen und ihre prozentualen Anteile.

In den verbleibenden 16 Replikaten wurden 2843 Proteine mindestens einmal gefunden. Für 2833 dieser Proteine konnte mittels Sequenzanalyse ein *Arabidopsis thaliana* (*At*)-Homolog gefunden werden. Hierbei wurde das *Arabidopsis*-Protein gewählt, welches die größte Sequenzähnlichkeit aufweist. Es kam vor, dass zwei oder mehrere verschiedene *Medicago*-Proteine demselben *At*-Protein zugeordnet wurden. Diese Redundanz wurde nicht eliminiert, da die Messung der Peptide und deren Zuordnung mittels MaxQuant zu verschiedenen Proteinen innerhalb der *Medicago*-Datenbank erfolgten und jedes der identifizierten *Medicago*-Proteine in die Bewertung einfließen sollte. Mit Hilfe der SUBA-Datenbank (Hooper *et al.*, 2014) wurden die 2833 *At*-Proteine einem Zellkompartiment zugeordnet (Abbildung 12 A und B). Lediglich 548 (19%) aller identifizierten Proteine sind mitochondrial lokalisiert, wobei ihr Anteil an der gemessenen Gesamtintensität (iBAQs) über alle Proben bei 74% liegt.

Dieser Trend spiegelt sich auch bei Analyse der einzelnen Proben wieder (Abbildung 12 C und D): Es wurden 1397 Proteine in *Fix+1* gefunden, von denen 446 aus Mitochondrien stammen. Für die anderen Proben betragen die Verhältnisse 1285/442, 1285/444, 1326/443, 1236/436, 1576/407, 1277/416, 1275/392, 1474/369, 1531/386, 1475/392, 1900/314, 1952/406, 1715/376, 1908/307 und 1811/360. Die Anzahl der identifizierten mitochondrialen Proteine ist daher in allen Proben vergleichbar gering bei ca. 15-40%. Die Anteile an den Intensitäten (Abbildung 12 E und F) sind jedoch höher und liegen, mit Ausnahme der Proben *Gedüngt 5* und *Null 4* bei über 60%. Im Vergleich mit anderen Mitochondrienisolationen, beispielsweise aus *Arabidopsis* Blättern (Fuchs *et al.*, 2019a), sind diese Reinheitsgrade unterdurchschnittlich, was vermutlich auf die Isolation aus Wurzelgeweben zurückzuführen ist. In allen Proben bilden cytosolische und plastidäre Proteine die Hauptkontaminanten. Es ist naheliegend, dass im Zuge der Mitochondrienisolation ebenfalls Plastiden mit (in Wurzeln) ähnlichen Sedimentationseigenschaften (v. A. ähnlicher Größe) isoliert werden (Ishihara *et al.*, 2011; Kaneko *et al.*, 2019). Zudem wurde bereits gezeigt, dass cytosolische Enzyme, allen voran Enzyme der Glykolyse, mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert sein können, was eine höhere Transportrate von Pyruvat in die Mitochondrien ermöglichen würde (Giegé *et al.*, 2003).

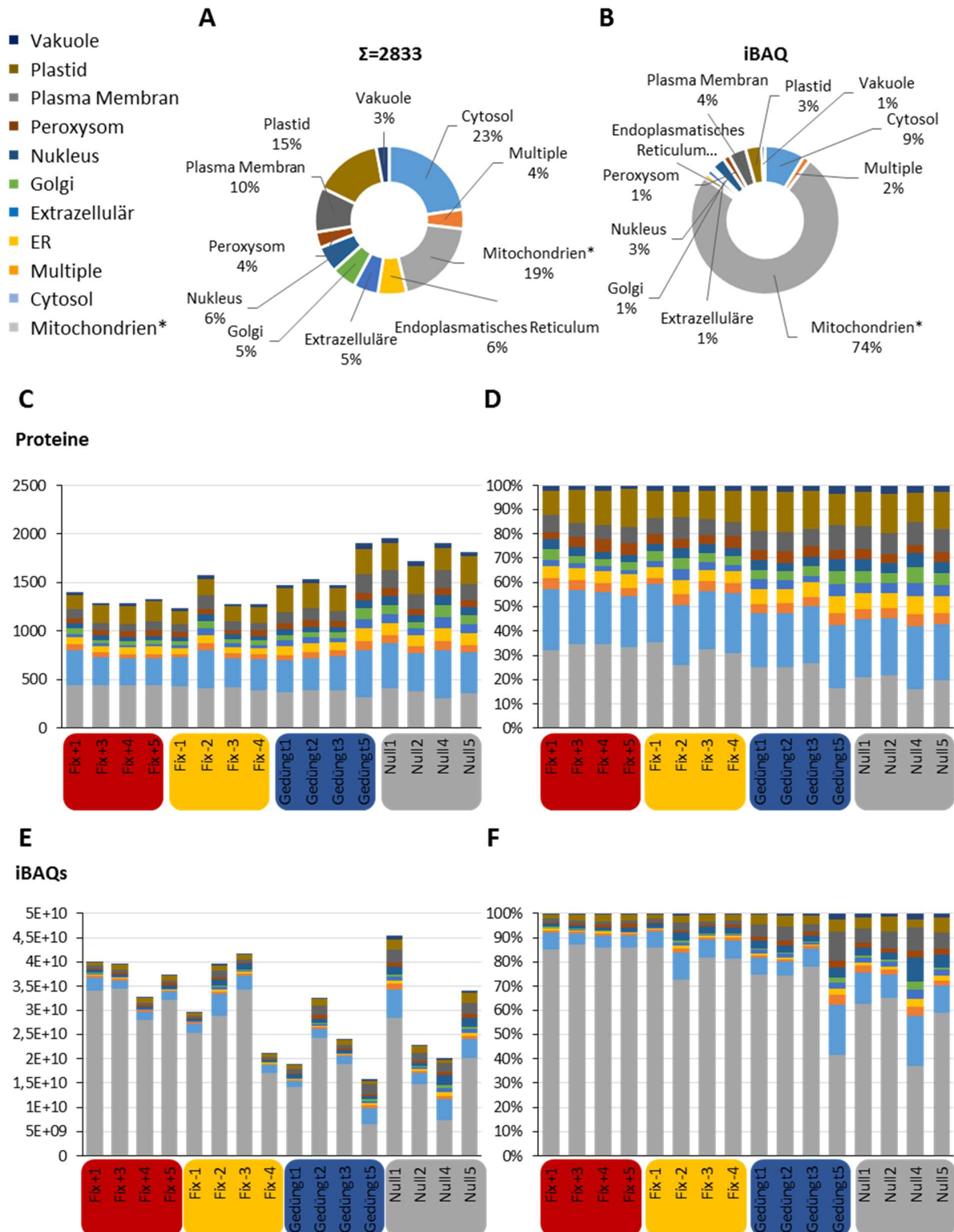


Abbildung 12: Intrazelluläre Lokalisierungen der 2833 Proteine in den 16 verbliebenen Replikaten.

Die zugeordneten *Medicago*proteine wurden dem *Arabidopsis*protein mit der höchsten Sequenzähnlichkeit zugeordnet. Die homologen *Arabidopsis*proteine wurden anhand der Suba 4 Datenbank analysiert und entsprechend dem Suba-Consensus einem Zellkompartiment zugeordnet. Mitochondrien*= Proteine, welche in Mitochondrien lokalisiert sind, aber auch in anderen Kompartimenten nachgewiesen wurden (Kokolisierung) **A und B:** Verteilung der Proteine aller Proben, **A:** Basierend auf Proteinspezies; **B:** Basierend auf Proteinabundanz. **C:** Absolute Anzahl identifizierter Proteinspezies pro Zellkompartiment und Probe; **D:** Relative Anzahl identifizierter Proteinspezies pro Probe; **E:** Absolute aufsummierte Proteinabundanz pro Zellkompartiment und Probe; **F:** Relative aufsummierte Proteinabundanz pro Zellkompartiment und Probe.

Die Anreicherung von mitochondrialen Proteinen in den Isolaten ist auch bei den Proteinen sichtbar, welche in allen 16 Replikaten gefunden wurden (Abbildung 13). Unter den 496 Proteinen sind 205 (41%) in Mitochondrien lokalisiert, deren Anteil an der gemessenen iBAQ-Intensität liegt dagegen bei 80%. Unter den Kontaminanten aus dem Cytosol befinden sich die Fruktose-bisphosphate Aldolase (AT3G52930.1), Pyruvat-Kinase (AT3G52990.1), Triosephosphat-Isomerase (AT3G55440.1) und ein „Phosphoglycerat-like Protein“ (AT1G79550.2) (nicht gesondert aufgeführt).

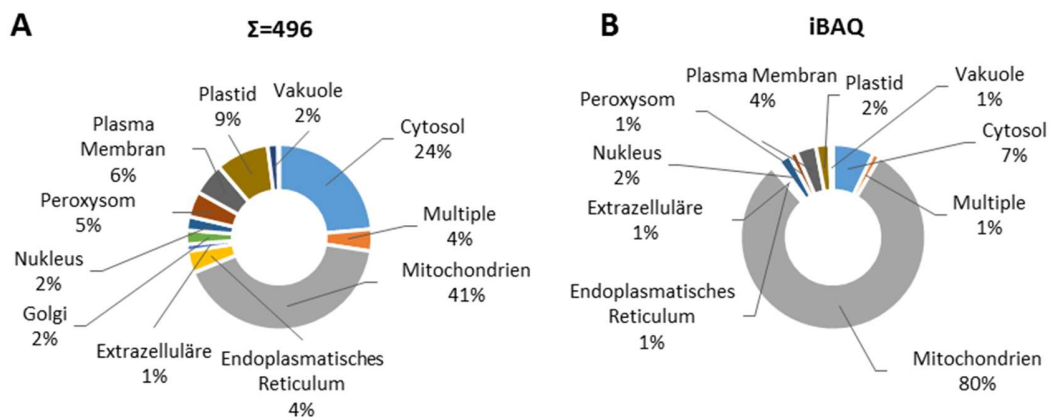


Abbildung 13: Intrazelluläre Lokalisierung von 496 Konsensusproteinen, die in allen 16 Proben präsent sind. **A:** Basierend auf der Anzahl der Proteinspezies pro Kompartiment. **B:** Basierend auf der aufsummierten, relativen Abundanz pro Kompartiment (iBAQs).

6.1.2 Normalisierung der mitochondrialen Proteine

Wie bereits erwähnt befinden sich unter den 2833 identifizierten und *Medicago* zugeordneten Proteinen 548 Enzyme, dessen *At*-Pendant in Mitochondrien lokalisiert und in mindestens einer der 16 Proben vorhanden ist. Für die paarweisen Vergleiche der Experimentallinien würden normalerweise die von MaxQuant errechneten LFQ-Werte miteinander verglichen, die eine Normalisierungsmethode der rohen Intensitätswerte darstellt. Aufgrund der Unterschiedlichkeit, gerade zwischen den Mitochondrienisolaten aus Knöllchen und Wurzeln ergab diese Analyse allerdings verfälschte Ergebnisse: Die Intensitäten der *Fix+*/*Fix-* Proteine wurden überschätzt (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde statt der Normalisierung durch den LFQ-Algorithmus eine andere Methode gewählt: Die gemessene iBAQ-Intensität eines mitochondrialen Proteins wurde gegen die aufsummierten iBAQs aller mitochondrialen Proteine dieser Probe normalisiert.

6.1.3 Anpassungen des mitochondrialen Proteoms in Knöllchen

Die 16 Proben wurden aufgrund ihrer so normalisierten iBAQ-Werte mittels „Principal Component Analysis“ (PCA) in der Perseus Software auf ihre Ähnlichkeiten zueinander untersucht (Abbildung 14). Dabei ist zu erkennen, dass die Wurzelisolate zueinander ähnlicher sind als jene aus Knöllchen, wobei die Experimentalgruppen nicht in engen Gruppen zusammenliegen. Die Gruppen *Fix-*, *Gedüngt* und *Null* haben jeweils ein Replikat abseits der anderen drei Replikate.

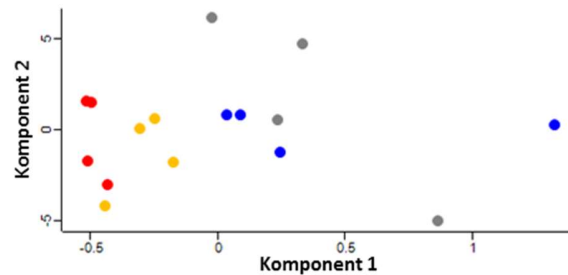


Abbildung 14: Qualitative Relationen der vier Experimentallinien zueinander durch PCA Analyse (Perseus Software).

Rot: *Fix+* Proteine, Gelb *Fix-* Proteine, Blau: *Gedüngt* Proteine, Grau: *Null* Proteine. Die 548 mitochondrialen, normalisierten (basierend auf dem iBAQs) Proteine, welche in mindestens 1/16 Replikaten gefunden wurden, wurden mittels der „Principal Component Analysis“ Funktion in Perseus analysiert.

Für die paarweisen Vergleiche (*Fix+/Gedüngt*; *Fix-/Null*; *Fix+/Fix-*) wurden als nächstes nur die mitochondrialen Proteine berücksichtigt, die in den zu vergleichenden Gruppen in mindestens zwei Replikaten gefunden wurden (*Fix+/Gedüngt*: 375; *Fix-/Null*: 369; *Fix+/Fix-*: 418 Proteine). Für den Vergleich eines Proteins zwischen zwei Gruppen wurden zunächst die normalisierten iBAQ-Werte der Replikate für jede Linie gemittelt. Die Veränderung ergab sich dann durch dessen Division gegen den Mittelwert der anderen Gruppe (=„Faktor“), wobei das Protein als verändert klassifiziert wurde, wenn $p < 0,05$ zwischen den Replikaten der Gruppen vorlag.

Daraus ergeben sich 117 Proteine mit geänderter Abundanz im *Fix+/Gedüngt* Vergleich, bzw. 78 (*Fix-/Null*) und 30 im Vergleich der *Fix+/Fix-* Knöllchen untereinander. Die Perseus Software wurde dazu verwendet, die so errechneten Unterschiede zu visualisieren (Abbildung 15). Die normalisierten iBAQ-Intensitäten wurden logarithmiert und diese Werte wurden für einen „Volcano-Plot“ verwendet. Die Proteinpunkte wurden auf Basis der ermittelten p-Werte und Differenzen (siehe vorheriger Absatz) eingefärbt. Es ist ersichtlich, dass die Vergleiche der Mitochondrien aus Knöllchen mehr Unterschiede aufweisen als die Knöllchenproben untereinander.

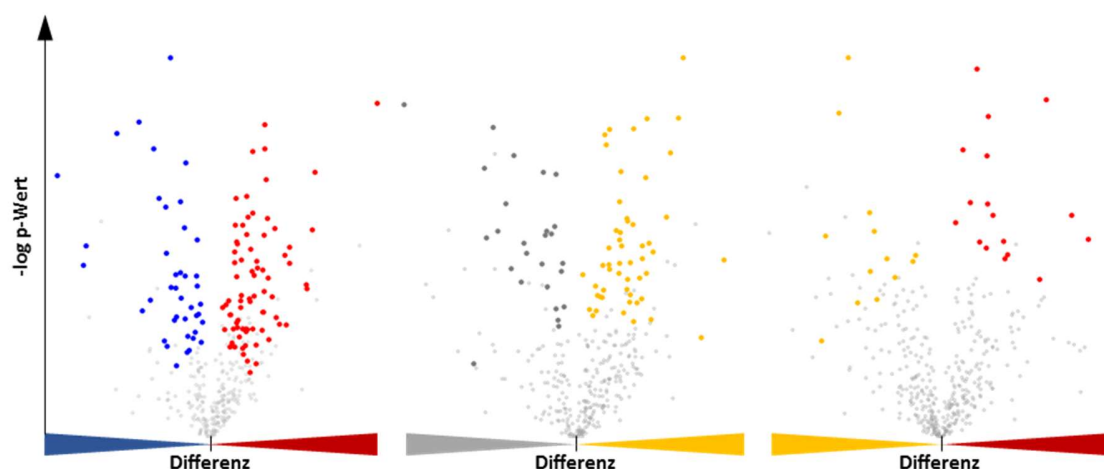


Abbildung 15: Qualitative Auswertung der paarweisen Vergleiche mitochondrialer Proteome.

Rot: *Fix+* Proteine, Gelb *Fix-* Proteine, Blau: *Gedüngt* Proteine, Grau: *Null* Proteine. Paarweise Vergleiche der Proteine, die in beiden verglichenen Gruppen in mindestens zwei Replikaten gemessen wurden (*Fix+/Gedüngt*: 375 Proteine, *Fix-/Null*: 369 Proteine, *Fix+/Fix-*: 418 Proteine). Auf der Abszisse ist qualitativ die Differenz dargestellt. Die Einordnung hier gibt an, in welcher Linie das Protein höher abundant ist. Die Ordinate gibt den

logarithmierten p-Wert an, je höher dieser Wert, desto niedriger der unarithmierte p-Wert. Graue Datenpunkte stehen für nicht signifikant veränderte Proteine. Gefärbte Punkte stehen für signifikant erhöhte Proteine (entsprechend der Farbe) mit $p < 0,05$. Nähere Anmerkungen im Fließtext.

Es wird also bereits an diesem Punkt ersichtlich, dass das mitochondriale Proteom in Knöllchen verändert ist. Man muss jedoch festhalten, dass Wurzelknöllchen sowohl infizierte als auch uninfizierte Zellen beinhalten und somit die isolierten Mitochondrien heterogenen Ursprungs sind. Doch infizierte Zellen, die 80% der Fixierzone in Knöllchen ausmachen, weisen gegenüber uninfizierten Zellen ca. 10x mehr Mitochondrien auf und somit kann man das hier analysierte Mitochondrienproteom im Kontext des Metabolismus infizierter Zellen betrachten (Millar *et al.*, 1995).

6.1.3.1 Proteine des Aminosäurestoffwechsels und der OXPHOS zeigen stark veränderte Abundanzen in Knöllchen

Um die Hauptunterschiede zwischen den verglichenen Linien beurteilen zu können, wurden bei jedem Vergleich die zehn Proteine mit der höchsten Abundanzzu- und -abnahme ermittelt (Abbildung 16-Abbildung 18). Dabei sind die Unterschiede (=“Faktoren“), wie bereits dargelegt die Quotienten der Mittelwerte der normalisierten iBAQ-Werte. Die Tendenzen der PCA-Analyse bestätigen sich bei näherer Betrachtung der paarweisen Vergleiche: Die Unterschiede zwischen *Fix+* und *Fix-* Mitochondrien (Abbildung 16) sind niedriger als bei den Vergleichen zwischen Mitochondrien aus Knöllchen und den entsprechenden uninfizierten Kontrollen. Ein Pentatricopeptid Repeat (PPR) Protein zeigt die höchste Abundanz-Zunahme um Faktor 4. An zweiter Stelle befindet sich eine Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase, welche das NADH:NAD Verhältnis in Mitochondrien mitreguliert (Shen *et al.*, 2006). Unter den herabgesetzten Proteinen befindet sich ein mit der Prolinsynthese assoziiertes Protein. Darüber hinaus sind einige mitochondriale ribosomale Proteine verändert. Hier lässt sich aber keine klare Richtung der Abundanzänderung erkennen, da es sowohl hochregulierte als auch herabgesetzte Vertreter dieser Enzymklasse gibt.

Fix+ (Mitochondrien aus Knöllchen) / Fix- (Mitochondrien aus Knöllchen)		
Protein ID und Beschreibung	p-Wert	Fakt.
>Medtr6g021740.1 PPR containing plant-like protein	0,022	4,13
>Medtr1g050720.1 glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0,001	3,56
>Medtr4g029500.1 Zn-dependent alcohol dehydrogenase family protein	0,016	3,29
>Medtr1g050750.1 DNA-binding protein	0,042	3,14
>Medtr3g082760.1 50S ribosomal protein L13	0,038	2,04
>Medtr8g028760.1 mechanosensitive ion channel protein MscS	0,036	1,96
>Medtr4g074920.1 P-loop nucleoside triphosphate hydrolase superfamily protein	0,008	1,88
>Medtr8g069570.1 PPR containing plant protein	0,030	1,79
>Medtr4g018750.1 uncoupling protein	0,025	1,69
>Medtr2g098070.1 ADP/ATP carrier protein	0,008	1,65
>Medtr1g040020.3 50S ribosomal protein L22	0,041	0,54
>Medtr2g015360.1 ribosomal protein L2, carboxy-terminal domain protein	0,025	0,53
>Medtr8g028485.1 39S ribosomal protein L46	0,048	0,48
>Medtr4g052910.3 copper ion-binding protein	0,023	0,48
>Medtr1g049180.1 DUF155 family protein	0,031	0,47
>Medtr3g053230.1 proline synthetase associated protein	0,037	0,44
>Medtr1g095830.2 ATP synthase D chain	0,000	0,37
>Medtr5g091910.1 3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	0,014	0,36
>Medtr8g040150.1 NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	0,011	0,33
>Medtr2g031760.1 50S ribosomal protein L7/L12	0,002	0,32

Abbildung 16: Proteine mit den ausgeprägtesten Abundanzänderungen zwischen *Fix+* und *Fix-* Mitochondrien.

Die Grün/Rot Färbung dient zur Einordnung der Abundanzänderung entsprechend des Quotienten (Mittelwert *Fix+*/Mittelwert *Fix-*).

Große Abundanzänderungen gibt es im Vergleich von Knöllchenmitochondrien zu den entsprechenden Wurzelkontrollen. Im Vergleich *Fix+/Gedüngt* (Abbildung 17) fällt vor allem die 72fache Erhöhung eines PPRs auf, welches an der Modifizierung von RNA-Molekülen beteiligt ist (Rovira *et al.*, 2019). Weitere Enzyme mit hoher Abundanzzunahme sind am Serinmetabolismus und der OXPHOS beteiligt. Außerdem hochreguliert ist eine Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase (5fach). Diese Proteinklasse spielt in der Proteinfaltung im Zuge der Proteinreifung eine Rolle, die auch bei

der Maturation der NifH-Untereinheit der Nitrogenase relevant ist (Gavini *et al.*, 2006). Außerdem sind ein FTSH Protein, welches Membran gebundene Proteine prozessiert, und ein nicht näher definiertes Substrat-Transportprotein jeweils ca. 6fach erhöht. Unter den Proteinen mit geringerer Abundanz in *Fix+* Mitochondrien befinden sich eine Aspartat Aminotransferase (aspAT), alternative Enzyme des Elektronentransports in der Atmungskette und eine Phosphoribosylformylglycinamide Synthase (- 96%), welche im Purinmetabolismus eine Rolle spielt. Dieser ist normalerweise in den Plastiden lokalisiert. Jedoch wurde dieses Enzym bereits in Neuronzellen mit Mitochondrien co-lokalisiert gefunden (Mangold *et al.*, 2018) und das Arabidopsis Pendant ist in der TAIR10 Datenbank als plastidär und mitochondrial kategorisiert. Eine mitochondriale Funktion dieses Enzyms in Wurzelknöllchen ist bisher nicht bekannt.

Fix+ (Mitochondrien aus Knöllchen) / Gedüngt (Mitochondrien aus Wurzeln)		
Protein ID und Beschreibung	p-Wert	Fakt.
>Medtr6g021740.1 PPR containing plant-like protein	0,014	72,83
>Medtr5g030950.1 serine hydroxymethyltransferase	0,045	15,05
>Medtr1g046380.1 NADH-ubiquinone oxidoreductase B16.6 subunit	0,003	11,29
>Medtr2g103150.1 cytochrome C oxidase subunit 5b	0,007	8,95
>Medtr7g116340.1 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0,002	7,63
>Medtr5g096830.2 cytochrome C oxidase assembly protein COX15	0,016	6,99
>Medtr3g058410.1 serine acetyltransferase	0,003	6,62
>Medtr4g074920.1 P-loop nucleoside triphosphate hydrolase superfamily protein	0,000	6,30
>Medtr4g064350.1 ATP-dependent zinc metalloprotease FTSH protein	0,046	6,19
>Medtr2g436930.1 substrate carrier family protein	0,020	5,95
>Medtr8g102460.1 hexokinase	0,004	0,33
>Medtr4g080130.1 aspartate aminotransferase	0,000	0,28
>Medtr8g098910.4 monodehydroascorbate reductase	0,001	0,24
>Medtr4g080140.2 aspartate aminotransferase	0,009	0,23
>Medtr4g091240.1 NAD(P)H dehydrogenase B2	0,048	0,20
>Medtr7g089330.2 hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	0,008	0,16
>Medtr4g094222.1 ubiquinol oxidase 1a	0,000	0,10
>Medtr5g070870.1 ubiquinol oxidase 1a	0,038	0,04
>Medtr6g011360.1 phosphoribosylformylglycinamide synthase	0,042	0,04
>Medtr5g026620.1 ubiquinol oxidase 1a	0,029	0,02

Abbildung 17: Die am stärksten veränderten Proteine in *Fix+* Mitochondrien gegenüber Mitochondrien aus *Gedüngt* Wurzeln.

Die Grün/Rot Färbung dient zur Einordnung der Abundanzänderung entsprechend des Quotienten (Mittelwert *Fix+*/Mittelwert *Gedüngt*).

Das PPR-Protein, welches in *Fix+* gegenüber *Gedüngt* über 70fach erhöht vorliegt, findet sich in der Liste der am stärksten veränderten Proteine zwischen *Fix-/Null* (Abbildung 18) nicht. Dieses Protein scheint also eine Funktion spezifisch für funktionale, Stickstoff fixierende Knöllchen zu besitzen. Bisher keine Erwähnung fand die Biotin Synthase, welche in *Fix-* über 4fach höher abundant ist als in Wurzeln. Des Weiteren zeigen einige Proteine eine ähnliche Änderung wie im *Fix+/Gedüngt* Vergleich, so zum Beispiel die Serin Acetyltransferase (6fach erhöht), und alternative Enzyme der Atmungskette (alt. NADH Dehydrogenase und die AOX 1a).

Fix- (Mitochondrien aus Knöllchen) / Null (Mitochondrien aus Wurzeln)		
Protein ID und Beschreibung	p-Wert	Fakt.
>Medtr8g009900.1 glutamyl-tRNA synthetase	0,004	9,24
>Medtr3g058410.1 serine acetyltransferase	0,001	5,99
>Medtr4g079360.1 GTP-binding protein TypA/BipA	0,006	5,79
>Medtr2g009320.1 ubiquinol-cytochrome C chaperone protein	0,041	5,48
>Medtr4g086270.1 PPR containing plant-like protein	0,019	4,63
>Medtr4g076870.1 biotin synthase	0,005	4,24
>Medtr5g090120.1 DEAD-box ATP-dependent RNA helicase-like protein	0,005	3,36
>Medtr8g040150.1 NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	0,010	3,34
>Medtr2g031240.5 S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase, putative	0,002	3,28
>Medtr3g078370.1 30S ribosomal protein S9P	0,002	3,26
>Medtr4g090580.1 NAD(P)H dehydrogenase B2	0,046	0,41
>Medtr4g093170.1 methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	0,044	0,39
>Medtr8g098910.4 monodehydroascorbate reductase	0,005	0,36
>Medtr4g129950.2 AFG1-family ATPase	0,038	0,35
>Medtr4g094222.1 ubiquinol oxidase 1a	0,001	0,33
>Medtr4g060480.1 acyl-CoA dehydrogenase	0,002	0,3
>Medtr7g089330.2 hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	0,002	0,26
>Medtr8g102460.1 hexokinase	0,028	0,24
>Medtr4g045997.2 NAD(P)H dehydrogenase B2	0,001	0,23
>Medtr4g093750.1 dynamin 3A-like protein	0,009	0,06

Abbildung 18: Proteine mit den ausgeprägtesten Abundanzänderungen zwischen Fix- und Null Mitochondrien.

Die Grün/Rot Färbung dient zur Einordnung der Abundanzänderung entsprechend des Quotienten (Mittelwert Fix-/Mittelwert Null).

Gerade in den Vergleichen zwischen Knöllchen- und Wurzelmitochondrien unterliegen Enzyme der OXPHOS Abundanzänderungen. Des Weiteren scheint der Aminosäuremetabolismus betroffen zu sein. Aus diesem Grund folgte die nähere Analyse der Enzyme, die an beiden Stoffwechselwegen beteiligt sind. Bindeglied zwischen Aminosäuremetabolismus und Energieproduktion ist der TCA-Zyklus, der deshalb ebenfalls untersucht wurde.

6.1.3.2 Aminosäure Metabolismus

Im Vergleich der gefundenen Enzyme des Aminosäuremetabolismus (Abbildung 19) gibt es kaum Unterschiede zwischen *Fix+* und *Fix-* Mitochondrien. Lediglich Enzyme des γ -Aminobuttersäure (GABA) Weges liegen verändert vor: Die Succinat Semialdehyd (SSA) Dehydrogenase (SSDH) steigt um 49% und die GABA-Transaminase sinkt um 28%. Dagegen gibt es auch hier gemeinsame Veränderungen der Knöllchen im Vergleich zu der entsprechenden Kontrollgruppe: Allen voran steigt die Abundanz der Enzyme, die in den Serin-Metabolismus involviert sind: Serin Acetyl Transferase (um ca. 500% in beiden Vergleichen) und die Serin Transhydroxymethyltransferase (um 83% bzw. 34%). Herausragend ist der Anstieg auf 1500% der Serin Hydroxymethyltransferase (SHMT) der zwar in *Fix+/Gedüngt* vorliegt, jedoch im *Fix-/Null* Vergleich nicht. Der GDC (Glycin Decarboxylase Complex), welcher im selben Stoffwechselweg wie die SHMT wirkt, ist in diesem Vergleich ebenfalls erhöht, jedoch nur um 38%. Ebenfalls verringert in *Fix+* Mitochondrien sind die AspAT (um ca. 75%) und die Alanine Glyoxylat Aminotransferase (um 35%), welche in *Fix-* jedoch ebenfalls um 37% herabgesetzt ist. Eine weitere Aminotransferase, welche Alanin zu Pyruvat umsetzt (AlaAT), ist dagegen in *Fix+* vermehrt vorhanden (+58%). Ferner ist die Acyl-Coenzym A (CoA) Dehydrogenase, ein Enzym des Leucinkatabolismus, in *Fix+* und *Fix-* Mitochondrien herabgesetzt (um 66 bzw. 70%)

und die E3-Untereinheit, die in Pyruvat Dehydrogenase (PDC) und 2-OG Dehydrogenase (OGDH), aber auch im GDC, vorhanden ist (Timm *et al.*, 2015), liegt 28% bzw. 30% niedriger als in den Kontrollen. Ein Enzym (D-2 Hydroxyglutarat Dehydrogenase), welches die Nutzung von Lysin für die Erzeugung von 2-OG und die Einspeisung von Elektronen in die Atmungskette vermittelt, zeigt ebenfalls ein gleiches Verhalten in Fix+ bzw. Fix-, es ist um 108% bzw. 77% erhöht (Araújo *et al.*, 2010, 2011).

Aminosäuren Metabolismus	Fix+/Ged		Fix+/Fix-		Fix-/Null	
	p-Wert	Fakt.	p-Wert	Fakt.	p-Wert	Fakt.
>Medtr1g016230.1 glycine dehydrogenase [decarboxylating] protein	0,011	1,38	0,786	1,02	0,073	1,20
>Medtr1g030450.1 methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	0,544	1,15	0,853	1,06	0,975	1,01
>Medtr1g071610.1 acetyl-CoA carboxylase, putative	0,262	0,66	0,925	0,99	0,252	0,77
>Medtr2g009750.3 methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	0,027	0,47	0,380	0,89	0,753	0,93
>Medtr2g067660.1 succinate-semialdehyde dehydrogenase	0,285	1,22	0,007	1,49	0,085	0,60
>Medtr3g058410.1 serine acetyltransferase	0,003	6,62	0,190	0,81	0,001	5,99
>Medtr3g072670.1 aspartate aminotransferase family protein	0,912	0,97	0,769	1,04	0,914	0,97
>Medtr3g072690.1 aspartate aminotransferase family protein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
>Medtr4g024940.1 arginase family protein	0,959	0,98	0,154	0,61	0,186	1,78
>Medtr4g024960.1 arginase family protein	0,049	0,59	0,741	0,90	0,217	0,53
>Medtr4g060480.1 acyl-CoA dehydrogenase	0,004	0,34	0,198	1,53	0,002	0,30
>Medtr4g076100.1 gamma-aminobutyrate transaminase	0,543	0,80	0,047	0,72	0,178	1,19
>Medtr4g080130.1 aspartate aminotransferase	0,000	0,28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
>Medtr4g080140.2 aspartate aminotransferase	0,009	0,23	0,125	0,54	0,122	0,50
>Medtr4g084110.1 glycine cleavage system H protein	0,453	1,44	0,760	0,89	0,312	0,79
>Medtr4g085890.1 methylcrotonyl-CoA carboxylase beta chain, putative	0,156	0,72	0,664	1,11	0,353	0,84
>Medtr4g093170.1 methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	0,505	0,82	0,068	2,25	0,044	0,39
>Medtr4g099320.1 NADP-specific glutamate dehydrogenase	0,194	1,71	0,932	1,04	0,074	7,50
>Medtr4g107940.1 delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	0,291	0,82	0,290	1,13	0,981	1,01
>Medtr4g120220.1 2-oxoacid dehydrogenase acyltransferase family protein	0,883	0,94	0,300	1,36	0,175	1,68
>Medtr4g120230.2 fumarylacetoacetate hydrolase family protein	0,058	1,40	0,316	0,75	0,123	1,81
>Medtr4g123070.1 dihydrolipoyl dehydrogenase	0,001	0,72	0,071	1,18	0,011	0,70
>Medtr4g132360.2 glycine cleavage system T protein	0,082	0,81	0,497	1,12	0,689	1,08
>Medtr5g012880.2 phosphatidylserine decarboxylase	0,550	0,69	0,416	0,71	n.d.	n.d.
>Medtr5g014820.1 cysteine desulfurase-like protein	0,045	2,33	0,486	1,24	0,470	1,26
>Medtr5g021240.2 D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase	0,042	2,08	0,051	1,43	0,016	1,77
>Medtr5g030950.1 serine hydroxymethyltransferase	0,045	15,05	0,254	1,74	0,092	3,63
>Medtr5g044980.1 dihydropterin pyrophosphokinase/dihydropteroate synthase	0,472	1,26	0,541	1,08	0,437	1,27
>Medtr5g067060.1 serine transhydroxymethyltransferase	0,048	1,83	0,434	1,15	0,045	1,34
>Medtr7g020820.1 proline dehydrogenase	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
>Medtr7g072420.2 alanine-glyoxylate aminotransferase-like protein	0,060	0,44	0,094	0,41	0,316	1,43
>Medtr7g085630.6 NADP-specific glutamate dehydrogenase	0,091	0,76	0,640	1,07	0,256	0,70
>Medtr8g023140.1 alanine aminotransferase	0,006	1,58	0,266	1,21	0,249	1,29
>Medtr8g091660.1 alanine-glyoxylate aminotransferase-like protein	0,048	0,65	0,679	1,07	0,024	0,63

Abbildung 19: Paarweise Vergleiche der Proteine des Aminosäuremetabolismus.

Die Sortierung erfolgte nach aufsteigenden Identifikationsnummern. Blau markierte Zellen geben einen p-Wert des Vergleichs von <0,05 im entsprechenden Vergleich an. Die Änderungsrichtung (Grün: Erhöhung, Rot: Verringerung) ist in der angegebenen Vergleichsrichtung zu lesen. Der Faktor ist der Quotient der Mittelwerte der verglichenen Linien.

6.1.3.3 TCA-Zyklus & assoziierte Enzyme

Die Abundanz von TCA-Zyklusenzymen (Abbildung 20) in Fix+/Fix- Knöllchen unterscheidet sich erneut relativ wenig. Es zeigt sich die Erhöhung der E1-Untereinheiten von PDC und OGDC (Erhöhung um 37/17%). Es liegen zwei gemeinsame Veränderungen der Fix+/- Mitochondrien im Vergleich mit der entsprechenden Kontrolle vor: So zeigen die Verringerungen der Citrat Synthase um jeweils 39% und der E1-Untereinheit der PDC um 27% bzw. 17% in beiden Vergleichen ähnliche Ausmaße. In diesem Zusammenhang ist die tendenzielle Erhöhung auf das 60 (!)fache der Isocitrat Dehydrogenase

(ICDH) in *Fix+* als erstes Enzym des TCA-Zyklus zu nennen. Im *Fix+/Gedüngt* Vergleich ist ferner die Succinat Dehydrogenase (SDH) um 73% erhöht, wobei die Succinyl-CoA Ligase um 18% verringert vorliegt. Im Kontrast dazu befindet sich der *Fix-/Null* Vergleich, in dem die Succinyl-CoA Ligase in *Fix-* um 43% erhöht und die SDH um 19% verringert ist. Ferner fällt die Verdoppelung des Malat Enzyms im *Fix+/Gedüngt* Vergleich auf.

TCA Zyklus & assoziierte Proteine Protein ID und Beschreibung	Fix+/Ged		Fix+/Fix-		Fix-/Null	
	p-Wert	Fakt.	p-Wert	Fakt.	p-Wert	Fakt.
>Medtr5g036600.1 pyruvate dehydrogenase complex E1 alpha subunit	0,434	1,09	0,011	1,37	0,126	0,69
>Medtr7g005380.2 pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	0,009	0,73	0,439	0,94	0,033	0,83
>Medtr7g009250.1 pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
>Medtr7g024460.1 pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) kinase	0,950	0,98	0,116	1,58	0,569	0,78
>Medtr8g062670.1 pyruvate dehydrogenase complex E1 alpha subunit	0,487	0,92	0,076	1,36	0,105	0,73
>Medtr1g091037.1 long form dihydrolipoamide acetyltransferase	0,436	0,87	0,942	1,02	0,312	1,37
>Medtr8g018770.1 long form dihydrolipoamide acetyltransferase	0,239	0,74	0,652	1,08	0,281	0,82
>Medtr2g061630.1 citrate synthase	0,041	0,61	0,699	0,95	0,004	0,61
>Medtr4g048190.1 cytoplasmic-like aconitate hydratase	0,479	1,63	0,867	1,10	0,700	1,37
>Medtr2g088360.1 cytoplasmic-like aconitate hydratase	0,325	1,06	0,594	0,97	0,092	1,08
>Medtr8g074030.2 NAD-dependent isocitrate dehydrogenase	0,336	1,20	0,541	1,12	0,961	0,99
>Medtr1g064070.1 NAD-dependent isocitrate dehydrogenase	0,073	2,28	0,321	1,51	0,535	0,72
>Medtr3g101470.1 NAD-dependent isocitrate dehydrogenase	0,281	1,12	0,118	1,20	0,097	1,25
>Medtr5g023740.4 NAD-dependent isocitrate dehydrogenase	0,068	60,66	0,241	2,09	0,062	4,75
>Medtr7g023770.1 E1 subunit-like 2-oxoglutarate dehydrogenase	0,046	0,68	0,513	1,09	0,268	0,89
>Medtr1g115340.1 E1 subunit-like 2-oxoglutarate dehydrogenase	0,089	0,89	0,015	1,17	0,083	0,88
>Medtr1g069645.1 succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	0,024	0,82	0,843	0,98	0,633	0,94
>Medtr6g077820.1 succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha-2	0,820	1,06	0,580	0,90	0,049	1,43
>Medtr0018s0260.1 succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit	0,070	3,26	0,194	1,75	0,610	0,76
>Medtr1g019810.1 succinate dehydrogenase	0,045	1,73	0,086	0,60	0,502	1,22
>Medtr4g048070.1 succinate dehydrogenase subunit 3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
>Medtr5g020050.1 succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	0,825	1,02	0,075	1,20	0,018	0,81
>Medtr1g087900.1 fumarate hydratase	0,277	1,41	0,142	1,57	0,645	0,88
>Medtr8g463760.1 malate dehydrogenase	0,192	1,50	0,745	1,09	0,638	0,84
>Medtr7g076650.2 NADP-dependent malic enzyme	0,036	2,00	0,690	1,22	0,985	0,99
>Medtr8g009500.1 NADP-dependent malic enzyme	0,279	1,21	0,124	1,27	0,259	0,70
>Medtr8g032040.1 NADP-dependent malic enzyme	0,541	0,90	0,478	1,15	0,533	0,84

Abbildung 20: Paarweise Vergleiche der mit dem TCA-Zyklus assoziierten Proteine.

Die Sortierung erfolgte nach funktionalem Ablauf des Stoffwechselweges beginnend mit der Decarboxylierung des Pyruvats. Blau markierte Zellen geben einen p-Wert des Vergleichs von $<0,05$ im entsprechenden Vergleich an. Die Änderungsrichtung (Grün: Erhöhung, Rot: Verringerung) ist in der angegebenen Vergleichsrichtung zu lesen. Der Faktor ist der Quotient der Mittelwerte der verglichenen Linien.

6.1.3.4 OXPHOS

Auffällig ist, dass vor allem Untereinheiten der OXPHOS mit niedriger Hydrophobizität, i.e. solche Proteine ohne/mit nur wenigen membrandurchspannenden Helices, identifiziert wurden (Abbildung 22-Abbildung 24). Dies liegt daran, dass hydrophobe Proteine tendenziell weniger tryptische Schnittstellen besitzen und daher nur schlecht mittels Massenspektrometrie gemessen werden können (Olsen *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2019a). Innerhalb der drei Vergleiche gibt es die größten Abundanzunterschiede erneut zwischen Köllchenmitochondrien und den entsprechenden Kontrolllinien. Hier fallen vor allem zwei Tendenzen auf: Untereinheiten der klassischen Atmungskettenkomplexe I - IV, welche den Elektronentransport mit der Protonentranslokation koppeln, sind in *Fix+* und *Fix-* hochreguliert, auch wenn dies nicht auf alle Untereinheiten zutrifft. Demgegenüber gibt es eine deutliche Herabsetzung der alternativen Oxidase und der alternativen

NADH Dehydrogenase B2, welche Elektronen transportieren, dies jedoch nicht mit der Protonentranslokation koppeln und somit nicht zur ATP-Produktion beitragen.

Oxidative Phosphorylierung		Fix+/Ged		Fix+/Fix-		Fix-/Null	
Protein ID und Beschreibung		p-Wert	Fakt.	p-Wert	Fakt.	p-Wert	Fakt.
I	>Medtr4g052910.3 copper ion-binding protein	0,165	1,45	0,023	0,48	0,044	1,83
	>Medtr8g040150.1 NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	n.d.	2,19	0,011	0,33	0,010	3,34
	>Medtr8g009960.1 NADH:ubiquinone oxidoreductase 17.2 kDa subunit	0,005	2,02	0,089	0,76	0,005	2,62
	>Medtr4g097160.1 NADH-ubiquinone oxidoreductase 18 kDa subunit	0,003	2,95	0,845	0,97	0,201	1,73
	>Medtr3g117550.1 NADH ubiquinone oxidoreductase B22-like subunit	0,015	2,30	0,109	0,65	0,149	1,51
	>Medtr1g042300.2 NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit	0,030	1,42	0,004	1,26	0,261	1,09
	>Medtr2g034290.1 NADH-ubiquinone oxidoreductase 10.5 kDa subunit	n.d.	n.d.	0,120	0,70	0,018	2,68
	>Medtr3g104310.1 NADH:ubiquinone oxidoreductase protein	0,018	1,99	0,614	0,89	0,032	2,81
	>Medtr0212s0080.1 NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein	0,004	1,95	0,379	1,14	0,036	1,62
	>Medtr0165s0060.1 NADH dehydrogenase subunit 7, putative (LC)	0,137	0,85	0,463	0,90	0,496	1,11
	>Medtr3g065130.1 NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	0,145	1,22	0,056	1,21	0,876	1,02
	>Medtr6g053280.1 NADH-ubiquinone oxidoreductase, putative	0,208	3,49	0,628	0,71	0,584	1,50
	>Medtr4g094792.1 complex I subunit	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	>Medtr2g104110.1 NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit, putative	0,869	1,02	0,488	1,04	0,967	1,00
	>Medtr1g069455.1 NADH-ubiquinone oxidoreductase 39 kDa subunit	0,407	1,06	0,287	1,05	0,045	1,13
	>Medtr3g112020.1 gamma carbonic anhydrase-like protein	0,009	1,49	0,581	0,90	0,390	1,21
	>Medtr8g010570.3 NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein	0,057	1,99	0,707	0,92	0,370	1,33
	>Medtr8g096820.1 gamma carbonic anhydrase-like protein	0,335	1,15	0,518	0,92	0,029	1,45
	>Medtr1g046380.1 NADH-ubiquinone oxidoreductase B16.6 subunit	0,003	11,29	0,030	1,64	0,173	1,68
>Medtr7g076630.1 transmembrane protein, putative	n.d.	n.d.	0,410	0,28	n.d.	n.d.	
>Medtr4g077950.8 import inner membrane translocase subunit TIM22	0,877	0,96	0,112	0,62	n.d.	n.d.	
>Medtr1g059290.1 complex I subunit	0,027	4,46	0,739	0,92	0,207	1,30	
>Medtr4g101140.1 NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,04	
>Medtr1g112480.1 NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit, putative	0,007	3,66	0,221	0,79	0,013	2,22	
>Medtr1g050360.2 L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase	0,695	1,09	0,786	1,07	0,287	1,27	
>Medtr4g084320.1 rickettsia surface antigen family protein, putative	n.d.	4,27	0,470	0,46	0,918	0,93	
II	>Medtr5g020050.1 succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	0,825	1,02	0,075	1,20	0,018	0,81
	>Medtr0018s0260.1 succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit	0,070	3,26	0,194	1,75	0,610	0,76
	>Medtr1g019810.1 succinate dehydrogenase	0,045	1,73	0,086	0,60	0,502	1,22
	>Medtr4g048070.1 succinate dehydrogenase subunit 3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	>Medtr5g075690.1 cytochrome B-c1 complex, subunit 8	0,000	4,18	0,245	0,72	0,112	1,73
III	>Medtr6g023290.1 cytochrome c1, heme protein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	>Medtr1g011880.2 cytochrome B-c1 complex subunit 7	0,650	1,20	0,058	0,52	0,425	1,37
	>Medtr7g053330.1 processing peptidase	0,016	0,79	0,287	1,09	0,192	0,81
	>Medtr8g014660.1 processing peptidase	0,024	0,62	0,392	0,84	0,533	0,83
	>Medtr6g023230.1 cytochrome c1, heme protein	0,632	0,91	0,117	1,38	0,046	0,75
	>Medtr7g104570.1 ubiquinol-cytochrome C reductase	0,175	2,45	0,091	0,55	0,048	1,43
	>Medtr2g008070.1 cytochrome B-c1 complex subunit 6	n.d.	n.d.	0,787	0,93	n.d.	n.d.
IV	>Medtr7g084150.1 cytochrome B-c1 complex subunit Rieske protein	0,021	2,21	0,678	0,81	0,489	1,49
	>Medtr4g097800.1 cytochrome C oxidase	0,053	14,37	0,537	1,36	0,186	2,73
	>Medtr2g085045.2 cytochrome-C oxidase/electron carrier protein	n.d.	n.d.	0,222	3,09	n.d.	n.d.
	>Medtr5g064600.1 cytochrome C oxidase, subunit VIb family protein	0,069	1,17	0,250	0,91	0,237	1,18
V	>Medtr2g103150.1 cytochrome C oxidase subunit 5b	0,007	8,95	0,803	0,93	0,445	1,35
	>Medtr3g028730.1 FOF1-type ATP synthase, delta subunit	0,057	2,00	0,305	0,67	0,227	1,69
	>Medtr8g092040.1 ATP synthase	0,848	0,95	0,846	0,96	0,458	0,78
	>Medtr1g095830.2 ATP synthase D chain	0,227	0,73	0,000	0,37	0,191	1,29
	>Medtr8g008870.1 FOF1-type ATP synthase, epsilon subunit	0,175	0,77	0,720	0,91	0,399	0,82
	>Medtr4g129790.1 FOF1 ATP synthase subunit gamma	0,596	1,06	0,520	1,06	0,582	1,06
	>Medtr5g040610.1 ATP synthase epsilon chain	n.d.	n.d.	0,352	1,53	0,231	2,86
	>Medtr0212s0040.1 ATP synthase F1, alpha subunit (HC)	0,281	0,86	0,660	1,02	0,251	0,91
	>Medtr1g108770.1 FOF1-type ATP synthase, beta subunit	0,106	0,76	0,225	0,80	0,777	0,95
	>Medtr4g091240.1 NAD(P)H dehydrogenase B2	0,002	0,36	0,201	0,88	0,001	0,59
A	>Medtr5g071250.1 NAD(P)H dehydrogenase B2	0,041	0,40	0,346	0,82	0,108	0,57
	>Medtr4g090580.1 NAD(P)H dehydrogenase B2	0,045	0,35	0,869	1,07	0,046	0,41
	>Medtr4g045997.2 NAD(P)H dehydrogenase B2	0,064	0,24	0,621	0,86	0,001	0,23
	>Medtr5g026620.1 ubiquinol oxidase 1a	0,029	0,02	0,103	0,27	0,132	0,11
	>Medtr5g070680.1 ubiquinol oxidase 1a	0,000	0,10	0,062	0,34	0,001	0,33
>Medtr5g008460.1 cytochrome protein C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

Abbildung 21: Paarweise Vergleiche der Proteine der OXPHOS.

Die Sortierung erfolgte nach Zugehörigkeit der Untereinheiten/Enzyme zu den Komplexen der OXPHOS (römische Ziffern) bzw. den alternativen Elektronentransportenzymen (A). Blau markierte Zellen geben einen p-Wert des Vergleichs von <0,05 im entsprechenden Vergleich an. Die Änderungsrichtung (Grün: Erhöhung,

Im Gegensatz dazu gibt es Veränderungen, die sowohl im *Fix+/Gedüngt* (Abbildung 23) als auch im *Fix-/Null* (Abbildung 24) Vergleich zu finden sind:

1. Die verringerte Abundanz der Enzyme, welche die Einspeisung des Pyruvats in den TCA-Zyklus vollziehen (PDC und Citrat Synthase).
2. Die Erhöhung der D-2 Hydroxyglutarat Dehydrogenase, welche potenziell 2-OG in den TCA-Zyklus einspeisen kann.
3. Die Herabsetzung der Alanin-Glyoxylat Aminotransferase
4. Die Abundanzerrhöhung von Enzymen, welche in den Serinmetabolismus involviert sind.
5. Die verringerten Abundanzen von alternativen Respirationsenzymen bei Erhöhung einiger Untereinheiten, welche den Komplexen I-IV zugeordnet werden, vor allem Komplex I.

Diese Entwicklungen scheinen demnach knöllchenspezifisch zu sein, ungeachtet der Funktionalität der Nitrogenase. Darüber hinaus gibt es Anpassungen der Enzymabundanzen, die nur im *Fix+/Gedüngt* Vergleich (Abbildung 23) zu finden sind, also mutmaßlich Anpassungen auf die Stickstofffixierung darstellen:

1. Die Herabsetzung der Enzyme, die 2-OG entlang des TCA-Zyklus zu Succinat umsetzen (2-OG Dehydrogenase sowie Succinyl-CoA Ligase) und die Erhöhung der SDH.
2. Die Verdopplung der Abundanz des Malat Enzyms, welches Malat zu Pyruvat umsetzt.
3. Die Verringerung der AspAT auf unter 30%
4. Die relativ hohe Zunahme der Enzyme des mitochondrialen Serin- und Glycinmetabolismus (SHMT: auf 1500% und GDC: auf 138%).
5. Die Erhöhung der Abundanz der AlaAT um 58%.

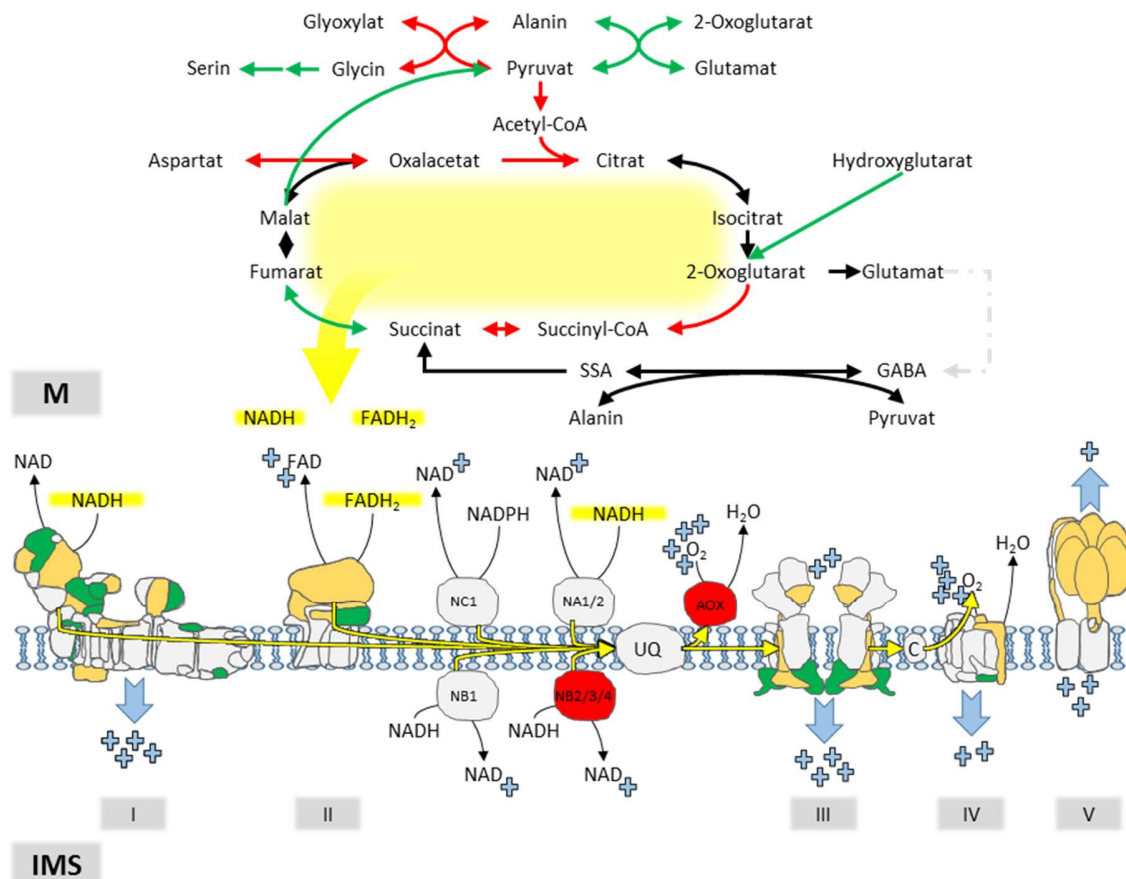


Abbildung 23: Abundanzänderungen des zentralen Mitochondrienmetabolismus von *Fix+* im Vergleich mit *Gedüngt*.

Schwarz dargestellte Pfeile im TCA-Zyklus geben identifizierte, jedoch unveränderte Enzyme an. Grün bedeutet eine Abundanzzunahme, Rot steht für eine Abundanzabnahme (mit $p < 0,05$). In der OXPHOS sind die einzelnen Untereinheiten dargestellt (Diaz, 2010; Li *et al.*, 2012; Meyer, 2012; Yu *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2019). Grau hinterlegte Untereinheiten wurden im vorliegenden Datensatz nicht gefunden, dies betrifft vor allem membranständige Teilenzyme. In Gelb wurden identifizierte Proteine gefärbt, deren Abundanz nicht verändert ist. In Grün/Rot sind stärker/schwächer abundante Untereinheiten in Knöllchenzellen zu erkennen.

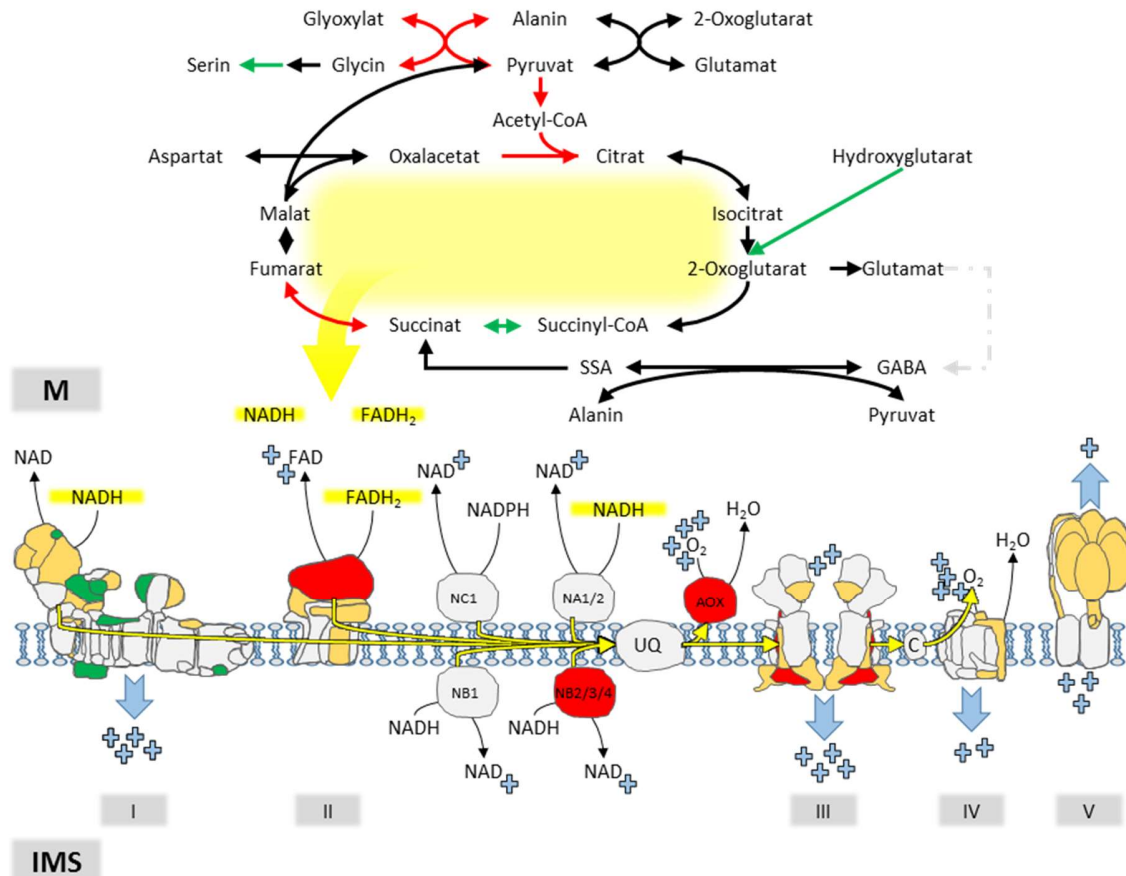


Abbildung 24: Abundanzänderungen des zentralen Mitochondrienmetabolismus von *Fix-* im Vergleich mit *Null*.

Schwarz dargestellte Pfeile im TCA-Zyklus geben identifizierte, jedoch unveränderte Enzyme an. Grün bedeutet eine Abundanzzunahme, Rot steht für eine Abundanzabnahme (mit $p < 0,05$). In der OXPHOS sind die einzelnen Untereinheiten dargestellt (Diaz, 2010; Li *et al.*, 2012; Meyer, 2012; Yu *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2019). Grau hinterlegte Untereinheiten wurden im vorliegenden Datensatz nicht gefunden, dies betrifft vor allem membranständige Teilenzyme. In Gelb wurden identifiziert gefärbte Proteine markiert, deren Abundanz nicht verändert ist. In Grün/Rot sind stärker/schwächer abundante Untereinheiten in Knöllchenzellen zu erkennen.

6.1.5 Respiration in Mitochondrien aus Wurzeln und Knöllchen

Isolierte Mitochondrien wurden mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode auf ihre Respirationsaktivität untersucht. Dies diente zur Überprüfung, ob die höhere Abundanz von Untereinheiten der regulären OXPHOS (Komplexe I-V) einen höheren Sauerstoffverbrauch bewirkt. Die verschiedenen Co-Substrate (NAD, Co-Enzym A und Thiaminpyrophosphat) wurden zu den Mitochondrien gegeben, danach erfolgte die gemeinsame Zugabe von Pyruvat und Malat. Dadurch wurden dem TCA-Zyklus sowohl C_4 als auch C_2 Körper (durch den Pyruvat Dehydrogenase Komplex) zugeführt. Die Reaktionen des TCA-Zyklus übertragen dessen Elektronen auf Reduktionsequivalente, welche an den Komplexen der Atmungskette reoxidiert werden. Die Elektronen werden innerhalb der Atmungskette durch Redoxreaktionen transportiert, die dadurch frei werdende Energie wird genutzt, um Protonen von der Matrix in die Cristae-Lumen zu schleusen. Endakzeptor der Elektronen ist Sauerstoff, welcher durch die Reduktion an der COX oder der AOX zu Wasser umgewandelt wird. Die mitochondriale Aktivität der Atmungskette verbraucht also Sauerstoff, dessen Konzentration in einem geschlossenen

System kontinuierlich gemessen werden kann. Als Respirationsaktivität wurde die Atmung ermittelt, welche die Sauerstoffabnahmerate in Anwesenheit von ADP angibt (Abbildung 25 A). Es fällt auf, dass Mitochondrien aus Knöllchen tendenziell eine höhere Respiration zeigen ($41,3/37,8 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) als aus Wurzeln ($21,9/24,7 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

Die zweite aus den Proteomanalysen abgeleitete Beobachtung ist die geringere Abundanz der AOX. Sie ist, neben der COX, das zweite Enzym der pflanzlichen Elektronentransportkette, welches Sauerstoff als Elektronenendakzeptor zu Wasser reduziert. Der Sauerstoffverbrauch an der Atmungskette kann sowohl an der COX als auch an der AOX inhibiert werden. Salicylhydroxaminsäure (SHAM) blockiert die AOX der mitochondrialen Atmungskette in Pflanzen, wohingegen KCN die COX durch die Sauerstoffbindungsstelle im aktiven Zentrum blockiert. Durch die hintereinandergeschaltete Zugabe dieser Substanzen kann man auf die Kapazitäten der AOX und COX schließen (Abbildung 25 B). Die COX-Kapazität von Mitochondrien aus Knöllchen ist höher als die in Wurzeln. Die reduzierte Abundanz der AOX in den Proteomdaten bestätigt sich in der Sauerstoff-Elektrode nicht, da die Kapazität der AOX unverändert ist.

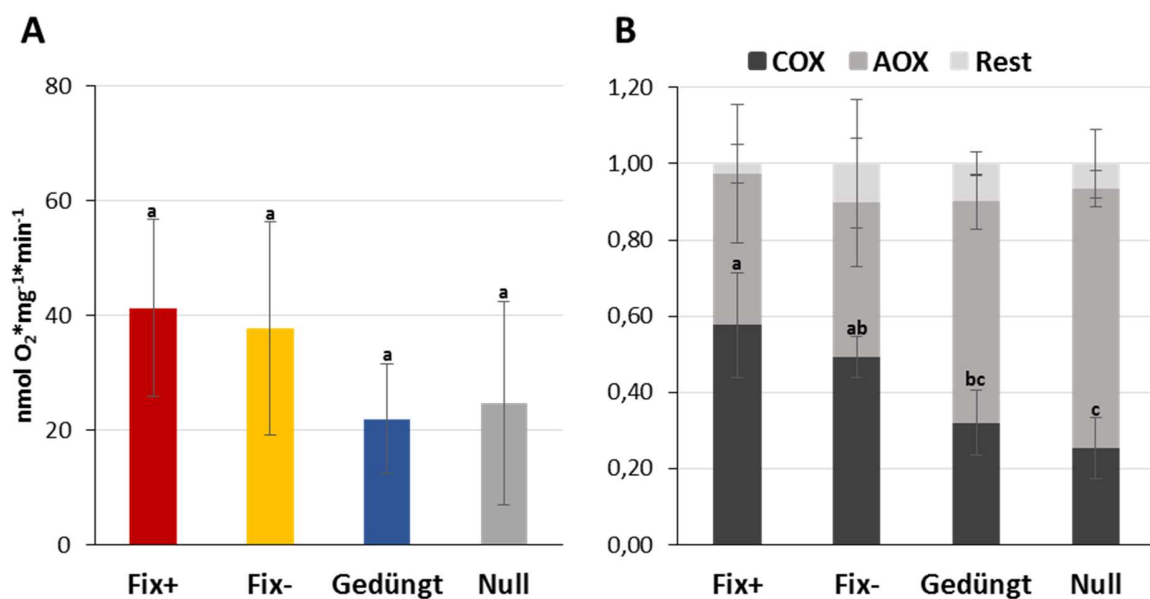


Abbildung 25: Respiration in isolierten Mitochondrien aus Knöllchen und Wurzeln.

Der Sauerstoff-Verbrauch von Mitochondrien (*Fix+*, *Fix-*, *Null*: $n=4$; *Gedüngt*: $n=3$; Tukey Test, $p<0,05$) wurde in einer Clark Sauerstoffelektrode in Anwesenheit von Kofaktoren und Substraten des TCA-Zyklus, sowie ADP, gemessen (**A**). **B**: Die Atmungskapazitäten der COX und AOX wurden schrittweise mit SHAM (gegen AOX) und KCN (gegen COX) inhibiert.

Die Anpassungen des mitochondrialen Proteoms sind zum großen Teil unabhängig von der tatsächlich stattfindenden Stickstofffixierung und sind deshalb wahrscheinlich Teil der grundlegenden Anpassungen der SNF-Zelle. Die Enzymabundanzen des TCA-Zyklus legen eine verminderte Nutzung von Pyruvat nahe. Dies kann theoretisch durch die Verstoffwechslung von Aminosäuren (erhöhte Abundanz der Hydroxyglutarat Dehydrogenase und AlaAT) kompensiert werden. 2-OG wird vermutlich im Vergleich zu Wurzeln weniger entlang des TCA-Zyklus katabolisiert (entsprechende Enzyme geringer vorhanden) und könnte der Stickstoffassimilation zur Verfügung stehen. Der oxidative Arm des TCA-Zyklus zeigt ambivalente Änderungen und bedarf einer näheren Betrachtung, die im entsprechenden Diskussionsabschnitt vollzogen wird. Knöllchenmitochondrien zeigen eine funktionale Respiration, die herabgesetzte AOX-Abundanz wird zumindest durch die höhere COX Kapazität gestützt.

6.2 Untersuchungen zur Rolle von Alanin in Stickstoff fixierenden Knöllchen

Neben der Gesamtbeurteilung der Anpassungen des mitochondrialen Stoffwechsels in infizierten Zellen ist die mitochondriale Kontribution an der Stickstoffassimilation der zweite Fokus dieser Arbeit. Speziell die Beteiligung der AlaAT als Glutamat produzierendes Enzym soll dabei beleuchtet werden. Die höhere Abundanz dieses Enzyms in *Fix+* (Abbildung 23) unterstützt die Theorie. Essenziell für diese Hypothese ist jedoch die Frage, ob Alanin als zentrales Intermediat des fixierten Stickstoffs in Frage kommt und ferner, ob es vom Bakteroiden produziert und exportiert wird.

6.2.1 Etablierung der bakteriellen *alaDH*- Mutante in den Experimentalaufbau

Um die Bedeutung von Alanin für die SNF zu testen, wurde eine Rhizobien-Mutante in den Versuchsaufbau implementiert, bei der das *alaDH*-Gen durch die Insertion eines Tn5-Transposons deaktiviert wurde (Allaway *et al.*, 2000). Bakterien der drei Rhizobienlinien (*Fix+*, *Fix-*, *alaDH-*) wurden ausplattiert, um die Präsenz der Tn5-Insertion durch Sequenzierung des *alaDH*-Gens mittels Colony PCR zu amplifizieren. Verschiedene Primerkonstrukte wurden ausgewählt, um die Präsenz und die genaue Position des Tn5-Transposons zu überprüfen (Abbildung 8, Abschnitt 3.3). Die Primer GL und GR befinden sich an den Flanken des *alaDH*-Gens. Während bei der DNA der *Fix+* und *Fix-* Kolonien (mit einer Ausnahme bei einer *Fix+*) Amplifikate mit einer Länge von ca. 1100 bp auf dem Agarosegel (Abbildung 26 A) sichtbar sind (was der Länge des erwarteten *alaDH*-Gens entspricht), ist für die *alaDH-* Mutante keine Bande sichtbar. Vermutlich liegt das daran, dass das Gen, falls es das Tn5-Transposon beinhaltet, über 6000 bp groß ist und die gewählten Parameter der PCR nicht ausreichen, um Sequenzen dieser Länge zu amplifizieren.

Die Primerkombination GTL/GTR erzeugt in der PCR Amplifikate, die an der linken Flanke des *alaDH*-Gens starten und in das Tn5-Transposon hineinreichen. Auf dem Agarosegel (Abbildung 26 B) sind lediglich bei der Template-DNA aus *alaDH-* Kolonien Amplifikate bei einer Größe von ca. 2300 bp zu erkennen. Dies entspricht der Erwartung, dass die DNA aus *Fix+/Fix-* Kolonien keine Transposon spezifische GTR Primersequenz enthält, und somit keine Amplifikation erfolgen kann. Die GTL/GTR PCR-Produkte der *alaDH-* Kolonien wurden für eine weiterführende Analyse anschließend sequenziert. Dafür wurde ein Sequenzierprimer (ATR) verwendet, welcher an der 280. Base des Transposons startet und in 3'-5' Richtung zur linken Flanke des Transposons gerichtet ist. Die erhaltene Sequenz wurde sowohl gegen die Sequenz des Tn5-Transposons als auch gegen die des *alaDH*-Gens abgeglichen (Abbildung 27 A und B). Man kann erkennen, dass der größte Teil der erhaltenen Sequenz die linke Flanke des Transposons widerspiegelt, wobei die letzten 16 Basen die der Insertionsstelle vorangehenden Basen des *alaDH*-Gens entsprechen. Somit kann man ableiten, dass sich die Tn5-Insertion an der 97. Stelle des *alaDH*-Gens befindet.

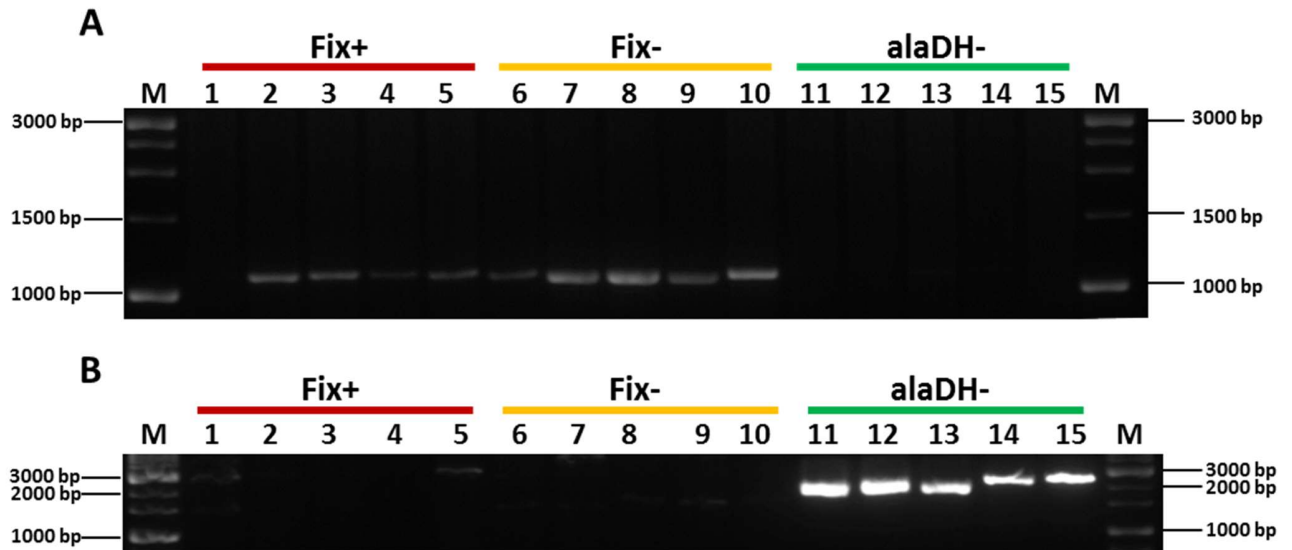


Abbildung 26: Ethidiumbromid gefärbte Agarosegele der Colony PCR-Produkte aus *Fix-/Fix-/alaDH-* Kolonien.

A: PCR-Produkt der Primerkombination GL/GR. **B:** PCR-Produkt der Primerkombination GTL/GTR.

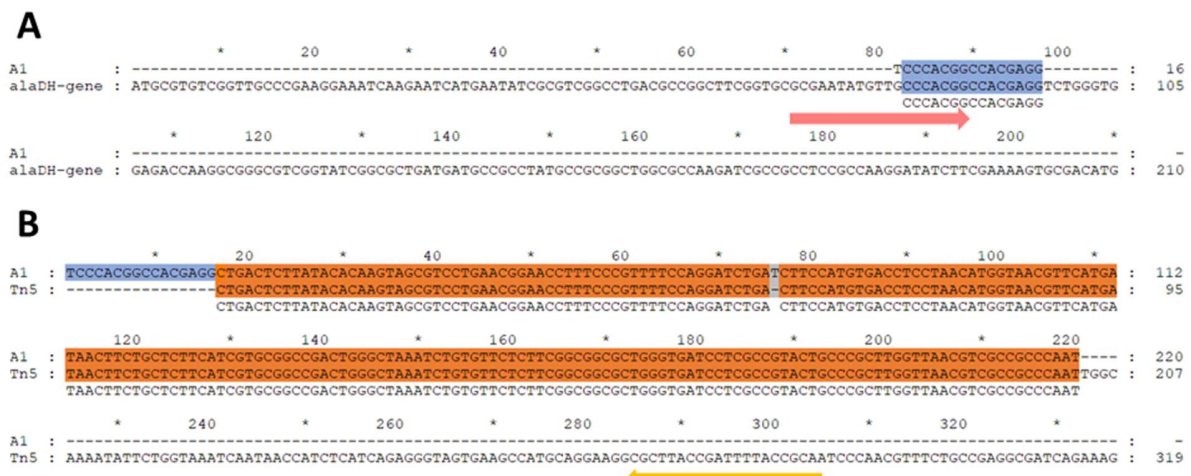


Abbildung 27: Sequenzierergebnisse des GTL/GTR Amplifikats von *alaDH-* Kolonien und dessen Abgleich mit den Sequenzen des *alaDH-*Gens (A) und des Tn5-Transposons (B).

A: Die erhaltene Sequenz (obere Zeile) stimmt mit einem kurzen Stück (in blau) des *alaDH-*Gens überein, welches zufällig Teil des GTL Primers (roter Pfeil) ist. **B:** Der Sequenzierprimer ATR (gelber Pfeil) wurde näher an der linken Flanke des Transposons gewählt, um den Übergang zum *alaDH-*Gen abzudecken. Sie ist auf der übrigen Länge nahezu identisch mit der linken Flanke des Tn5-Transposons (gepaarter Bereich in orange). Der darüber hinaus sequenzierte Bereich ist Teil des *alaDH-*Gens (in blau).

6.2.2 Pflanzenwuchs und Photosynthese

Zum Zeitpunkt der Infektion (zwei Wochen nach Aussaat (Abbildung 28 A) gibt es keine Größenunterschiede zwischen den fünf Pflanzenlinien (*Fix+*, *Fix-*, *alaDH-*, *Gedüngt* und *Null*). Wie in der gesamten Arbeit wurden für alle Experimente fünf Wochen alte Pflanzen verwendet (drei Wochen nach Infektion). Auch hier zeigen sich noch keine Größenunterschiede zwischen den Linien (Abbildung 28 C). Nach dem eigentlichen Erntezeitpunkt zeichnen sich zwei Signifikanzgruppen ab: Die Stickstoff fixierenden Pflanzen (*Fix+*, *alaDH-*) sind größer als *Fix-*, *Gedüngte* und *Null* Pflanzen. Exemplarische Bilder von *Fix+/Fix-* Pflanzen sind in Abbildung 28 B dargestellt. Die *Gedüngt* Pflanzen

erhalten lediglich am „Infektionstag“ Stickstoff haltigen Dünger, der für die dreiwöchige Wuchssperiode bis zur Ernte ausreichend ist (Thal *et al.*, 2018). Mit zunehmender Zeit scheint sich die ausbleibende Versorgung mit Stickstoff auszuwirken, sodass die *Gedüngt* Pflanzen sich dem Wuchsverhalten der *Null* und *Fix-* Gruppe annähern. Es ist weiterhin anzumerken, dass die Messungen und Bilder in den Abbildung 28 A, B und C aus zueinander unabhängigen Experimenten in thermisch nicht regulierten Gewächshauskammern entstanden. Etwaige Größenunterschiede zwischen den Experimenten lassen sich durch jahreszeitliche Schwankungen der Umgebung, vor allem der Temperatur, erklären. Die Linien innerhalb eines Experiments wuchsen jedoch alle unter identischen Bedingungen auf, sodass die Linien spezifischen Ergebnisse in allen Experimenten zutreffen.

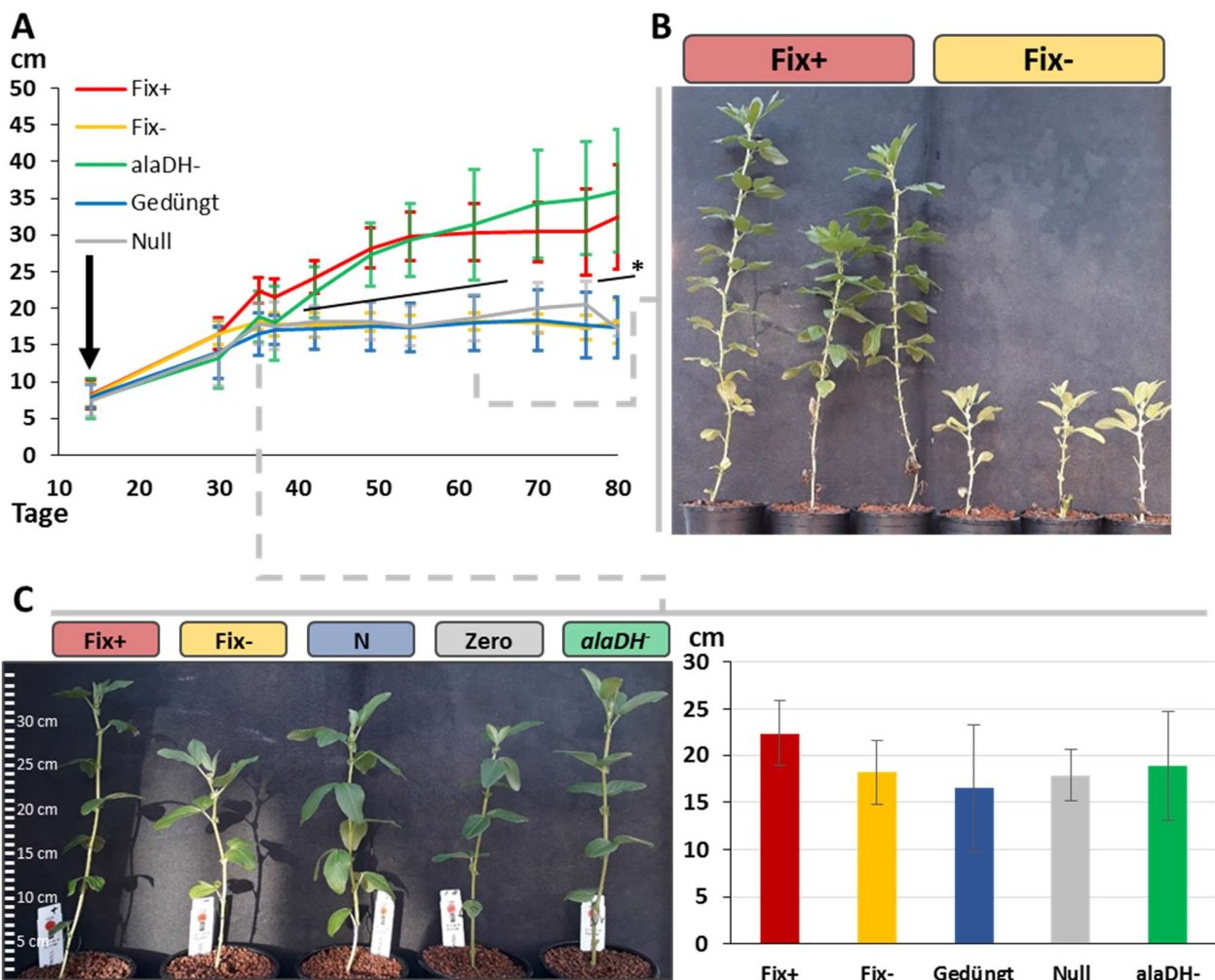


Abbildung 28: Pflanzenwuchs der Experimentallinien, inklusive der neu aufgenommenen *alaDH-* Mutante.

Die Experimente **A**, **B** und **C** sind nicht an den gleichen Pflanzen entstanden, wodurch Wuchsunterschiede zu erklären sind. **A**: Messung der Pflanzen, auch über den eigentlichen Erntezeitpunkt (5 Wochen) hinaus. Der Beginn der wöchentlichen Messungen ist der Zeitpunkt der Infektion/Düngung der zwei Wochen alten Pflanzen (schwarzer Pfeil). **B**: Nach 5 Wochen zeichnen sich zwei Signifikanzgruppen ab (*Fix+/alaDH-* und *Fix-/Gedüngt/Null* mit $n=2-8$ und $p<0,05$). Beispielbilder von einem unabhängigen Experiment zeigen 10 Wochen alte *Fix+* und *Fix-* Pflanzen **C**: Pflanzen nach fünfwöchigem Wuchs. Alle Experimente dieser Arbeit wurden an Pflanzen in diesem Alter durchgeführt (Exemplarisches Bild und Wuchsmessung mit $n=4-5$).

Als nächstes wurden die photosynthetische Aktivität und stomatale Leitfähigkeit (Abbildung 29) von fünf Wochen alten Pflanzen gemessen. Die Photosyntheserate ist bei *Fix+* und *alaDH-* Pflanzen auf einem Niveau mit $15,6$ bzw. $14,3 \mu\text{mol}_{\text{CO}_2} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$ bei einer Leitfähigkeit von $0,23$ bzw. $0,19 \text{ mol}_{\text{H}_2\text{O}} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$. *Fix-*, *Gedüngt* und *Null* Pflanzen liegen signifikant darunter mit $8,1$; $7,8$; $7,9 \mu\text{mol}_{\text{CO}_2} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$ bei $0,11$; $0,11$; $0,09 \text{ mol}_{\text{H}_2\text{O}} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$, wobei sich hier die Leitfähigkeit nicht von *alaDH-* Pflanzen unterscheidet. Um den Einfluss der Düngungsrate auf die *Gedüngt* Pflanzen zu untersuchen, wurde das Experiment mit Pflanzen wiederholt, welchen nur einmal Stickstoff zugeführt wurde (die normale *Gedüngt* Linie dieser Arbeit) sowie mit Pflanzen, welche einmal wöchentlich Nitratverbindungen erhielten (Abbildung 29 B). Es ist zu erkennen, dass die Photosyntheserate und Leitfähigkeit von beiden Behandlungen auf einem ähnlichen Niveau wie im vorherigen Experiment liegen ($7,2$ und $7,3 \mu\text{mol}_{\text{CO}_2} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$ bzw. $0,8$ und $0,9 \text{ mol}_{\text{H}_2\text{O}} \cdot (\text{m}^2 \cdot \text{s})^{-1}$). Es ist also davon auszugehen, dass die erhöhte Photosyntheserate mit der Präsenz Stickstoff fixierender Knöllchen und nicht mit der Düngungsrate der Pflanzen zusammenhängt.

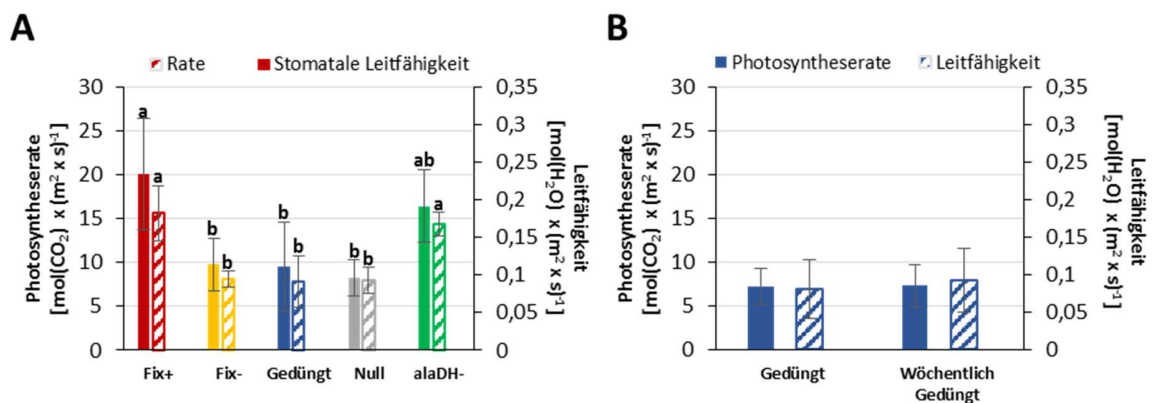


Abbildung 29: Photosyntheserate und stomatale Leitfähigkeit der fünf Linien und nähere Untersuchung der *Gedüngt* Pflanzen in Bezug zur Düngungsrate.

Die Messungen erfolgten in Hochlichtbedingungen. **A:** Vergleich der fünf Linien ($n=5$ bzw. 6 ; $p<0,05$). **B:** Vergleich von *Gedüngt* Pflanzen, welche (entsprechend der *Gedüngt* Linie dieser Arbeit) einmalig Stickstoffverbindungen erhalten haben mit Pflanzen, welche einmal wöchentlich Stickstoffdünger erhielten ($n=5$).

6.2.3 Knöllchenstruktur und Nitrogenaseaktivität

Die Knöllchenstruktur wurde im Querschnitt unter einem Binokular betrachtet (Abbildung 30). Während *Fix+* und *alaDH-* Knöllchen den typischen Aufbau aus Meristem, Infektionszone und Fixierungszone (mit der durch Leghämoglobin roten Färbung) zeigen, weisen *Fix-* Knöllchen eine homogenere Struktur ohne definierte Zonen und eine gelbliche Färbung auf.

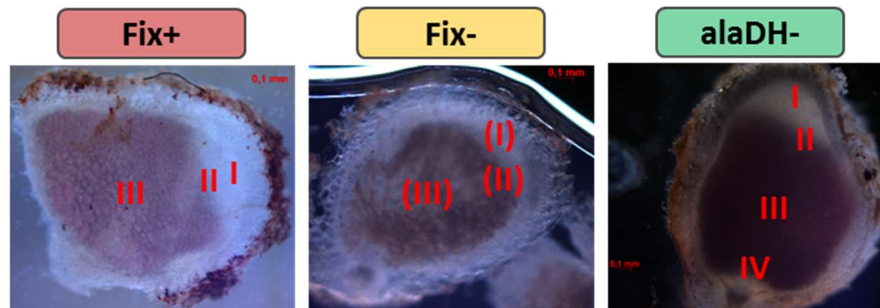


Abbildung 30: Querschnitte der drei Knöllchenarten.

Erkennbar an einer weißlichen Farbe ist das Wurzelmeristem (I). Im Übergang zum rötlichen Bereich findet die Infektion der Wurzelzellen durch die Rhizobien statt (II). Im größten Bereich des Knöllchens wird der atmosphärische Stickstoff durch die in Zellen befindlichen Bakterioide fixiert (III, Fixierungszone). Im *alaDH*-Knöllchen ist außerdem die Zone IV zu erkennen, welche die abgestorbenen Zellen beinhaltet. Diese wird mit zunehmendem Alter des Knöllchens größer, ehe sie nach ca. 4-6 Wochen die gesamte Struktur ausfüllt und das Knöllchen abstirbt.

Isolierte Bakterioide aus den drei Knöllchenarten wurden auf Anwesenheit der NifH-Untereinheit (32 kDa) des Nitrogenaseenzym mittels Western Blot untersucht (Abbildung 31 A). Während die *Fix-* Linie kein Signal hat, ist dies in *Fix+* und *alaDH-* Bakteriden vorhanden. Zur Messung der Nitrogenaseaktivität wird häufig Acetylen verwendet, welches von der Nitrogenase zu Ethylen reduziert wird, das mit einem Gaschromatographen nachgewiesen werden kann (Dilworth, 1966; David *et al.*, 1980). Alternativ dazu kann die Nitrogenaseaktivität durch die Detektion von biatomarem Wasserstoff, einem Nebenprodukt des Enzyms, bestimmt werden. Dies erfolgt in einem geschlossenen System mit einem Sensor, an dem H_2 zu zwei Protonen oxidiert wird und die freiwerdenden Elektronen detektiert werden (Thal, 2018). Zunächst wurden Knöllchen/Wurzeln aller Linien im Einzelreplikat untersucht (Abbildung 31 B). Die Steigungen der Messkurven wurden normalisiert gegen die Knöllchen-/Wurzelgewichte und für die Erstellung des Diagramms in Abbildung 31C (links) verwendet. Während *Fix-* Knöllchen und Wurzeln beider Kontrolllinien keine H_2 -Produktion im beobachteten Zeitraum zeigen, bewirken *Fix+* und *alaDH-* Knöllchen eine H_2 -Akkumulation in der Kammer, deren Rate sich auch bei Analyse von je drei Replikaten nicht voneinander unterscheidet (Abbildung 31 C rechts).

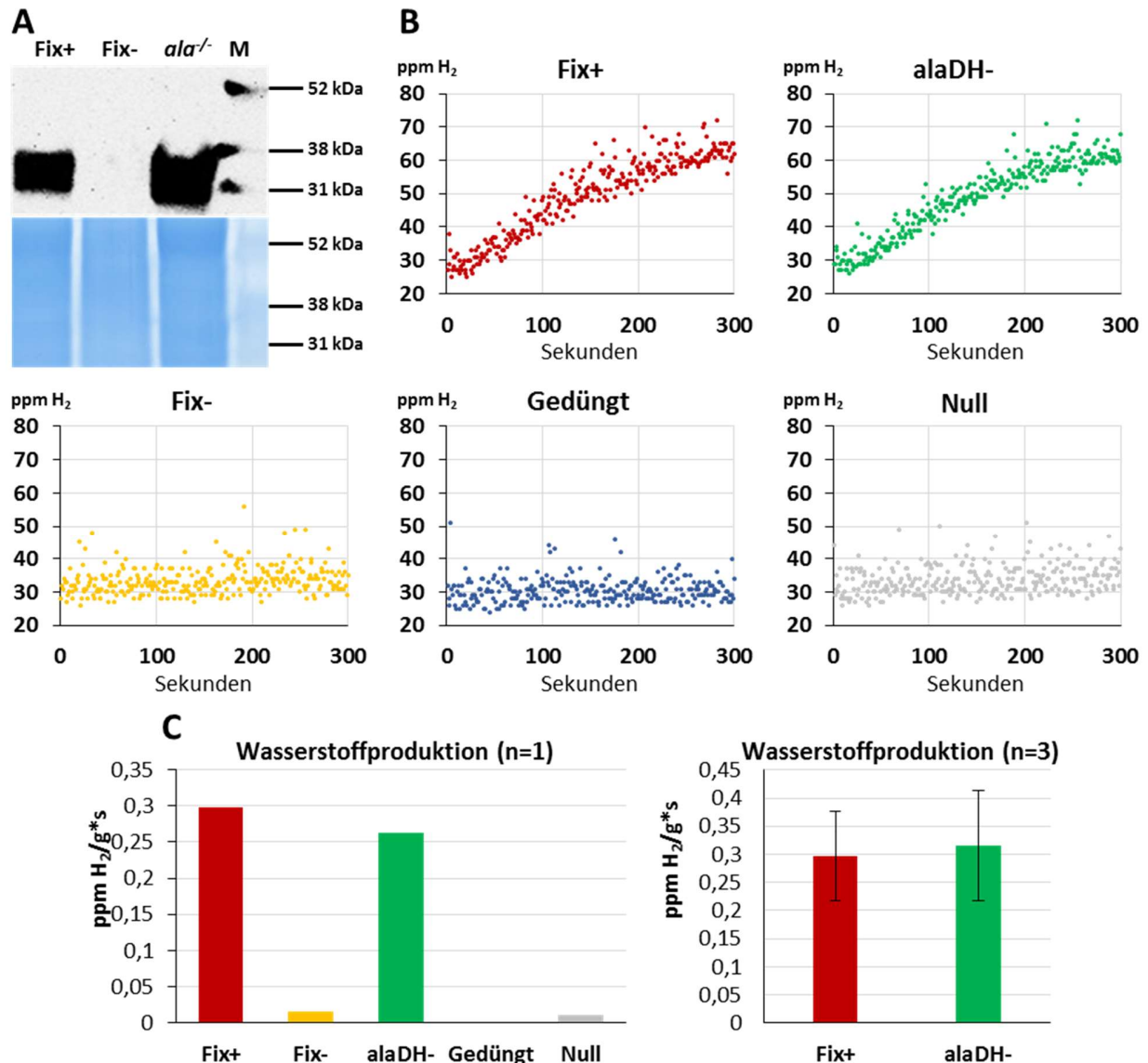


Abbildung 31: Nitrogenaseabundanz und -aktivität in Knöllchen und Wurzeln.

A: Coomassiefärbung und Western Blot von isolierten Bakteroiden der drei Knöllchenlinien gegen die 32 kDa NifH-Untereinheit der Nitrogenase (M=Marker) **B:** Knöllchen der drei infizierten Pflanzenlinien wurden von den Wurzeln abgetrennt und in eine geschlossene Kammer gegeben, in der ein Sensor kontinuierlich den H₂-Gehalt der Kammerluft gemessen hat. Die normalisierten Steigungen wurden für die Auswertung verwendet. (C links: n=1; C rechts: n=3).

6.2.4 Quantifizierung freier Aminosäuren in Knöllchen und Wurzeln

Die Knöllchen der infizierten Linien und die Wurzeln der beiden Kontrolllinien von fünf Wochen alten Pflanzen wurden geerntet und die daraus extrahierten freien Aminosäuren mit einer uHPLC quantifiziert (Abbildung 32). Ähnlich zu den Ergebnissen der Photosynthese- und Nitrogenasemessungen findet sich auch hier kein Unterschied zwischen *Fix+* und *alaDH*- Knöllchen, weshalb diese im Folgenden als „Stickstoff fixierende“ Knöllchen bezeichnet werden. Im Vergleich zu *Fix-*, *Gedüngt* und *Null* haben beide höhere Konzentrationen der Aminosäuren entlang des Stoffwechselweges der Ammoniumassimilation (Glutamat, Glutamin, Aspartat; B; alle Werte in $\mu\text{mol} \cdot \text{g DW}^{-1}$; *Fix+*: 12 Glutamat/8 Glutamin/5 Aspartat; *alaDH*-.: 12/9/6; *Fix-*: 4/5/2). Das Endprodukt der Stickstoffassimilation im untersuchten Knöllchentyp ist Asparagin, welches die Transportform des

fixierten Stickstoffs ist und im Xylem Richtung Spross geleitet wird. Entsprechend lassen sich die hohen Asparaginkonzentrationen in Stickstoff fixierenden Knöllchen erklären (*Fix+*: 217 $\mu\text{mol}\cdot\text{g DW}^{-1}$; *alaDH-*: 260 $\mu\text{mol}\cdot\text{g DW}^{-1}$). Die anderen drei Linien liegen bei 19 (*Fix-*), 13 (*Gedüngt*) und 5 (*Null*) $\mu\text{mol}\cdot\text{g DW}^{-1}$. Die hohe Konzentration des Asparagins macht den Hauptanteil an Aminosäuren in Stickstoff fixierenden Knöllchenarten aus, deren Summe folgerichtig in *Fix+* und *alaDH-* höher ist (Abbildung 32 A; *Fix+*:284; *alaDH-*: 328) als in *Fix-* (105), *Gedüngt* (98) und *Null* (71).

Auch Alanin und GABA zeigen eine höhere Konzentration in Stickstoff fixierenden Knöllchen als in den anderen Linien. Allerdings ist hier die Abgrenzung zu den anderen drei Linien nicht so klar erkennbar, da für Alanin nur Tendenzen im Vergleich zu *Gedüngt* (p-Wert = 0,25 (*Fix+*) bzw. 0,19 (*alaDH-*)) und für GABA nur eine Tendenz im Vergleich zu *Fix-* (p-Wert = 0,41 (*Fix+*) bzw. 0,12 (*alaDH-*)) festgestellt werden kann.

Neben den Aminosäuren mit höheren Konzentrationen in Stickstoff fixierenden Knöllchen, gibt es auch Aminosäuren, die in *Fix-* Knöllchen höher konzentriert sind (Abbildung 32 C): Lysin, Histidin, Tryptophan, Phenylalanin und Valin. Außerdem gibt es Aminosäuren, welche in einem oder beiden Wurzeltypen häufiger sind: Glycin, Serin, Threonin, Prolin und Isoleucin (Abbildung 32 D). Keine klare Tendenz zeigen hingegen Arginin, Tyrosin, Methionin und Leucin (Abbildung 32 E). Diese drei Gruppen werden an dieser Stelle nicht näher beleuchtet.

Aminosäuren in Knöllchen/Wurzeln

■ Fix+ ■ Fix- ■ Gedüngt ■ Null ■ alaDH-

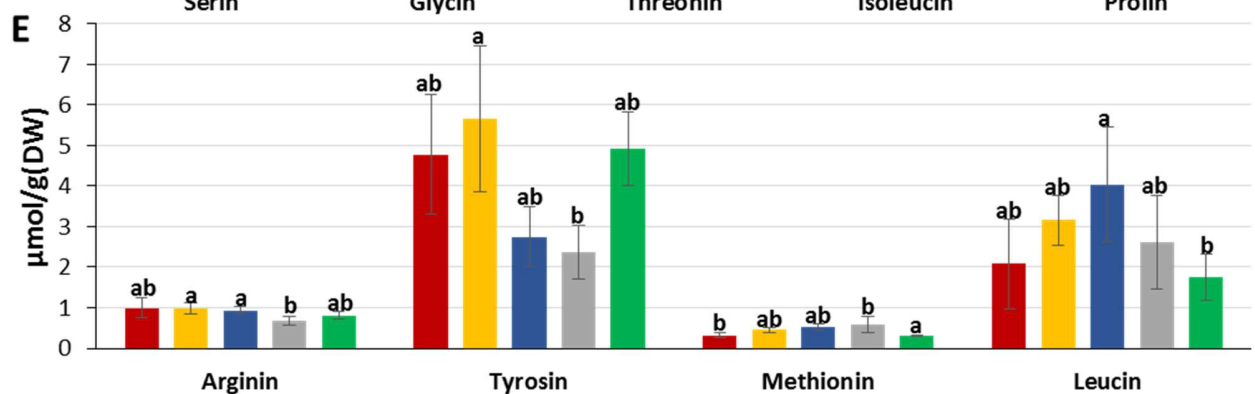
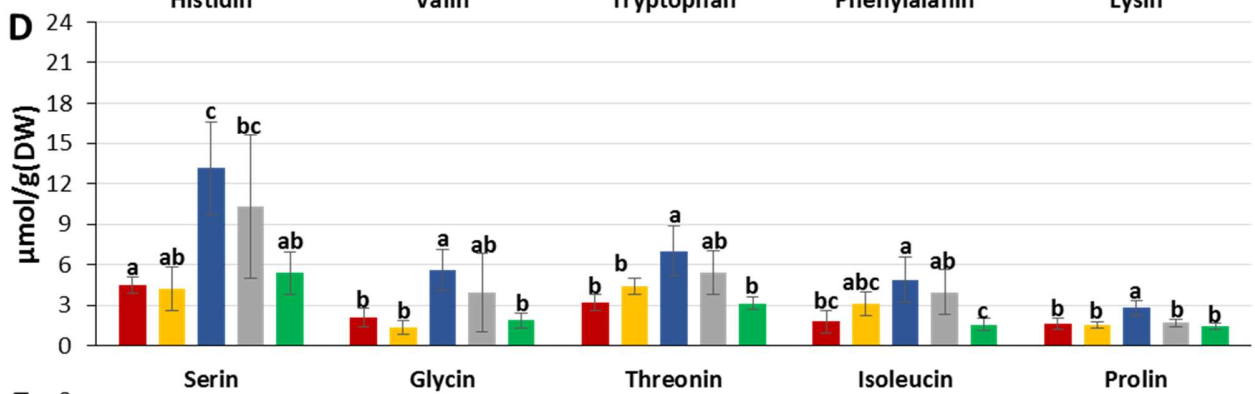
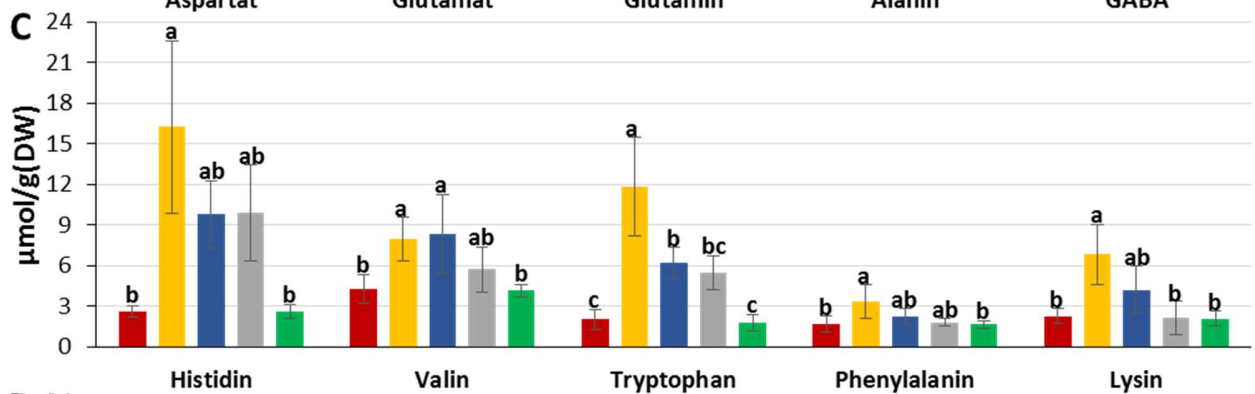
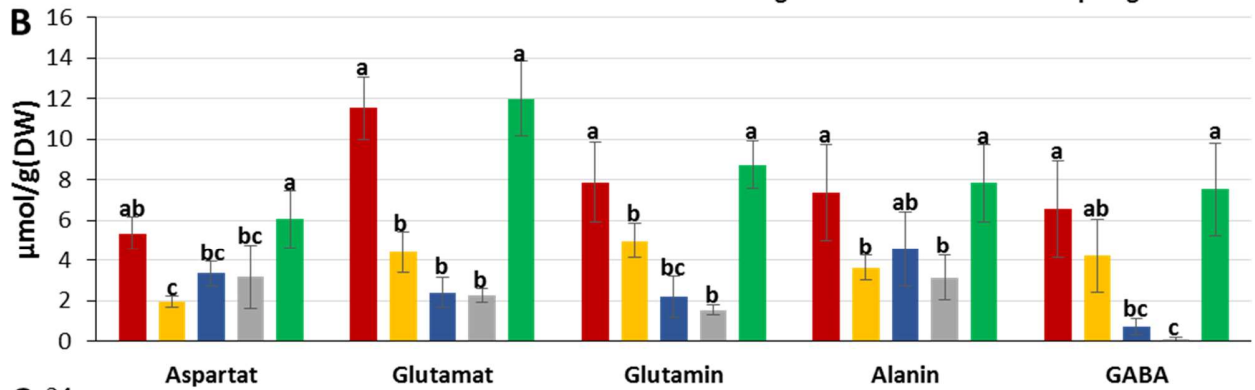
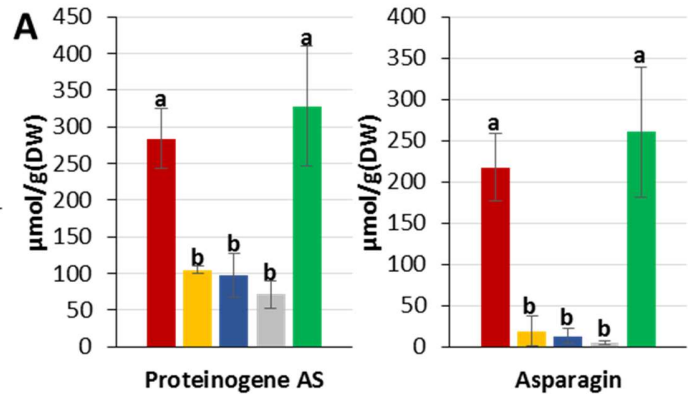


Abbildung 32: Aminosäurekonzentrationen in Wurzeln und Knöllchen.

Gefriergetrocknete Knöllchen und Wurzeln der fünf Linien wurden pulverisiert und ihre Aminosäuren mittels uHPLC gemessen (*Fix+* und *alaDH-*: n=5; *Fix-*: n=4; *Null/Gedüngt*: n=3; Tukey Test mit $p < 0,05$). **A:** Asparagin, das Endprodukt der Stickstoffassimilation in diesem Knöllchentypus und die Transportform des fixierten Stickstoffs sowie die Summe aller proteinogenen Aminosäuren, die hier aufgeführt sind. Dies trägt maßgeblich zu dem hohen Konzentrationsunterschied an proteinogenen Aminosäuren bei. **B:** Aminosäuren, die in Stickstoff fixierenden Knöllchen vermehrt vorliegen. **C:** Aminosäuren, deren Konzentration in *Fix-* Knöllchen erhöht ist. **D:** Aminosäuren, deren Konzentration in einer oder beiden Wurzellinien erhöht ist. **E:** Unveränderte Aminosäuren.

6.2.5 Untersuchung des Alaninmetabolismus in Knöllchen

6.2.5.1 Alaninproduktion durch Bakterioide

Bei Betrachtung der Aminosäuregehalte von *alaDH-* Knöllchen fällt vor allem die, im Vergleich mit *Fix+* Knöllchen, unveränderte Alaninkonzentration auf. Um die Alaninproduktion durch die AlaDH zu überprüfen, wurde ein Aktivitätsassay an isolierten Bakteroiden durchgeführt, der die Abnahme von NADH im Zuge der Aminierung von Pyruvat durch dieses Enzym photometrisch quantifiziert (Abbildung 33 E; Messprinzip in C). Da die gemessene Aktivität sowohl auf einer höheren Umsatzrate (=der eigentlichen „Aktivität“) und/oder einer höheren Abundanz des Enzyms basieren kann, kann man bei Betrachten der nachfolgenden Ergebnisse lediglich von einer Kapazität sprechen, die von beiden Faktoren beeinflusst wird.

Bakterioide von *Fix-* und *alaDH-* Knöllchen haben im Vergleich zu *Fix+* eine herabgesetzte AlaDH-Kapazität von -52% bzw. -64%. Weshalb die *alaDH-* Bakterioide, trotz der Mutation des entsprechenden Gens, eine Aktivität zeigen, kann nicht genau festgestellt werden. Höchstwahrscheinlich waren einige Pflanzen, die für die Isolation von Bakteroiden verwendet wurden, teilweise mit *Fix+* Knöllchen kontaminiert. Eine andere Möglichkeit ist die Präsenz von anderen, NADH-verbrauchenden Enzymen. Hier muss aber beachtet werden, dass die Reaktionsmischungen KCN beinhalteten, was den NADH-Verbrauch zumindest durch die Atmungskette verhinderte und als Kontrollen Ansätze zur Verwendung kamen, denen kein Pyruvat hinzugefügt wurde. Die weitere Untersuchung des Bakteroidproteoms in einer Datenbank ergab zudem kein Protein, welches NADH unter Pyruvatverbrauch aminiert.

Somit ist der Grund für die gemessene Aktivität wahrscheinlich eine *Fix+* Kontamination in einigen Replikaten - eine Hypothese, die durch die hohen Standardabweichungen gestützt wird (Abbildung 33 E). Die Stämme tragen unterschiedliche Resistenzgene (*Fix+*: Resistent gegen Streptomycin; *alaDH-*: Resistent gegen Streptomycin und Kanamycin). Dadurch kann eine *Fix+* Kontamination in den *alaDH-* Anzuchtmedien ausgeschlossen werden. Somit ist wahrscheinlich das gemeinsame Aufwachsen von *Fix+* und *alaDH-* Pflanzen in einer Gewächshauskammer verantwortlich für Kreuzkontaminationen. Während *Fix-* Knöllchen klar von *Fix+* Knöllchen im Zuge der Ernte unterschieden werden können (vgl. Abbildung 30), sind *Fix+* und *alaDH-* Knöllchen zueinander identisch, was die Erkennung von Kreuzkontaminationen erschwert. Neben dem AlaDH-

Aktivitätsassay (Abbildung 33) ist auch die Analyse der Bakteroidproteome (Abschnitt 6.2.6.) von der AlaDH-Präsenz in *alaDH*- Bakteroiden betroffen. In der Folge ist die AlaDH-Aktivität von isolierten *alaDH*- Bakteroiden nicht 0 und es mussten zwei der fünf *alaDH*- Replikate der Proteomanalyse aufgrund der Präsenz der AlaDH herausgenommen werden. Das globale Proteom dieser zwei Proben zeigte auch eine größere Ähnlichkeit zu den Fix+ Replikaten (nicht gezeigt).

Daneben zeigt sich, dass *Fix*- Bakterioide ebenfalls eine geringere Abundanz des AlaDH-Enzyms aufweisen (Abbildung 33 A). Die nähere Analyse des Bakteroidproteoms erfolgt in Abschnitt 6.2.6.

6.2.5.2 Alanin als Substrat der mitochondrialen AlaAT

Die mitochondriale AlaAT weist, wie bereits dargelegt, eine höhere Abundanz in isolierten *Fix*+ Mitochondrien auf (dargestellt in Abbildung 33 B). Es sind verschiedene Isoformen dieses Enzyms bekannt. So sind in *Medicago* vier Isozyme identifiziert. Die in dieser Studie gefundene, in *Fix*+ Knöllchen höher abundante AlaAT (Medtr8g023140.1) wird in allen Pflanzenorganen exprimiert und ist in *Medicago truncatula* mitochondrial lokalisiert (Ricoult *et al.*, 2018). Die Zuordnung gegen *Arabidopsis* (TAIR) ergibt das Protein mit der ID AT1G72330.1 (AlaAT 2) mit einer Sequenzähnlichkeit von 839 (e-value: 0,0), welches ebenfalls mitochondrial lokalisiert ist.

Daneben gibt es zwei Isoformen, welche hauptsächlich im Stamm und in den Wurzeln vorkommen. Eine davon (Medtr5g033230) kommt in Mitochondrien und Peroxisomen vor und hätte demnach an dieser Stelle gefunden werden können. Sie koppelt die Deaminierung des Alanins mit der Produktion von Glycin aus Glyoxylat. Sie wurde jedoch nur in den Mitochondrien einer *Fix*+ Probe gefunden und das zugeordnete Arabidopsisprotein ist in der SUBA-Datenbank nicht in Mitochondrien lokalisiert. Die vierte AlaAT Isoform ist ausschließlich im Cytosol von Blättern lokalisiert, weshalb sie im vorliegenden Mitochondrienproteom aus Knöllchen-/Wurzelgeweben nicht zu erwarten ist (Ricoult *et al.*, 2018). Die identifizierte, nun näher untersuchte AlaAT ist dementsprechend mit hoher Wahrscheinlichkeit in Mitochondrien lokalisiert. Leider konnte bis zu diesem Zeitpunkt das mitochondriale Proteom von *alaDH*- Knöllchen nicht gemessen werden.

Die enzymatische Kapazität des Enzyms wurde in einem gekoppelten Assay gemessen, in dem das von der AlaAT produzierte Pyruvat von der zugegebenen Laktat Dehydrogenase unter NADH-Verbrauch zu Laktat umgewandelt wurde (Abbildung 33 D; Messprinzip in C). *Fix*+ Mitochondrien haben die höchste AlaAT-Kapazität, die Raten der Linien *Fix*-, *Gedüngt* und *Null* liegen damit verglichen bei 54%, 42% und 37%. Vergleicht man die AlaAT-Kapazität der Knöllchenmitochondrien unter Zunahme der *alaDH*- Linie, so zeigt sich, dass die Mitochondrien dieser Mutante auf dem Niveau der *Fix*+ Mitochondrien liegen (Abbildung 33 E; *Fix*-: 42%; *alaDH*-: 92%).

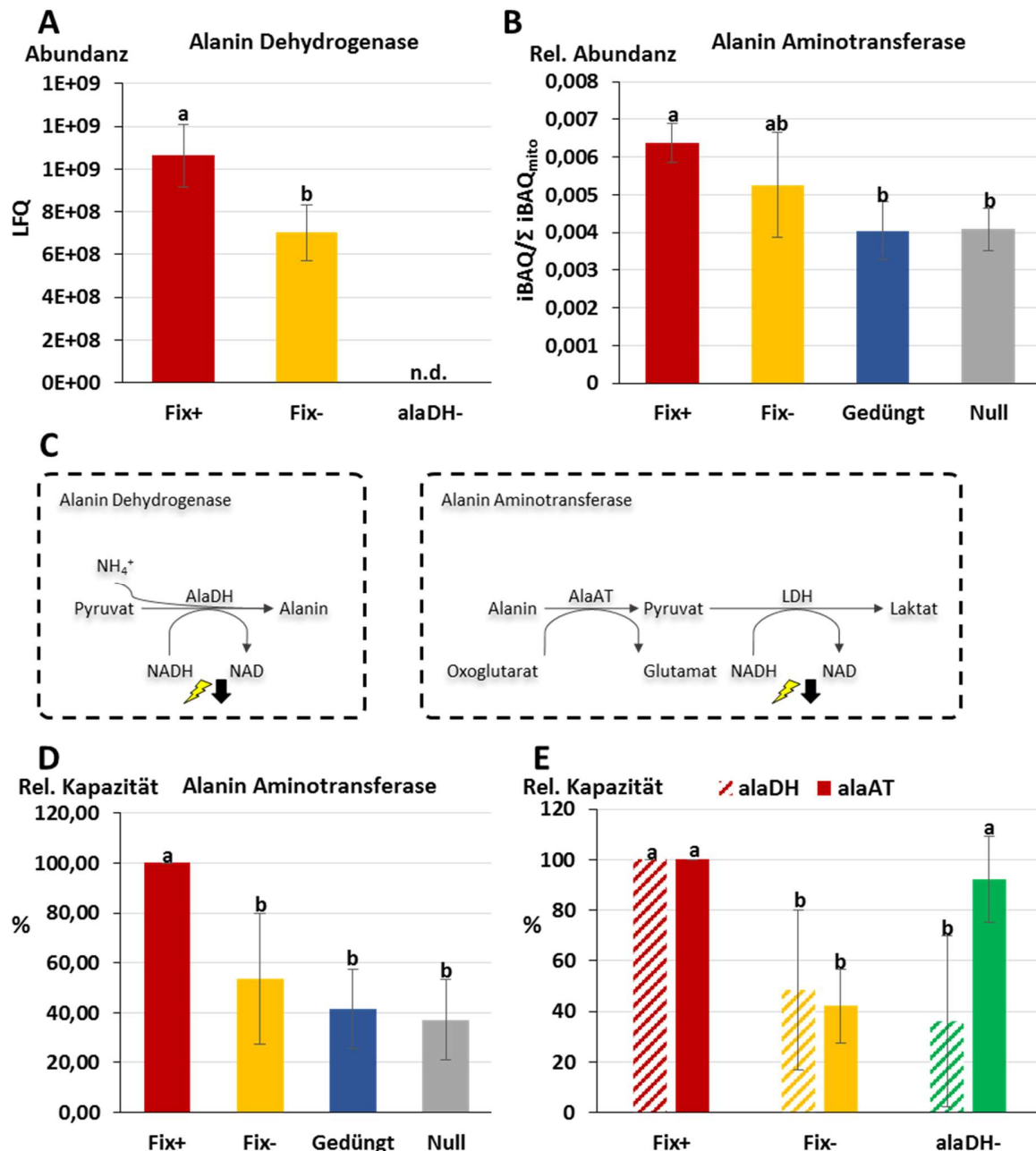


Abbildung 33: Am Alaninmetabolismus beteiligte, untersuchte Enzyme in isolierten Mitochondrien (AlaAT) und Bakteroiden (AlaDH).

A: LFQ-Abundanz der AlaDH in isolierten Bakteroiden, welche massenspektrometrisch analysiert wurden (n=5 (*Fix+*), 4 (*Fix-*), 3 (*alaDH-*); p<0,05). Nähere Ergebnisse in Abschnitt 4.2.7. **B:** AlaAT Abundanz in isolierten Mitochondrien. Für die Normalisierung wurde der iBAQ in einer Probe durch die aufsummierten iBAQs aller mitochondrialen Proteine dieser Probe (Σ iBAQ_{mito}) dividiert (n=4; Tukey Test mit p<0,05). **C:** Funktionsprinzip der AlaDH-, bzw. AlaAT-Messungen. Die Aktivitäten beider Enzyme sind direkt (AlaDH) oder indirekt (AlaAT) mit der Oxidation von NADH gekoppelt, welche photometrisch verfolgt werden kann (Blitze). Die Deaminierung von Alanin durch die AlaAT wurde an die Reduktion von Pyruvat durch die Laktat Dehydrogenase (LDH) gekoppelt. **D:** Kapazität von AlaAT in Mitochondrien isoliert aus *Fix-*, *Gedüngt* und *Null* relativ zu *Fix+* (Tukey Test, n=8; p<0,05). **E:** Kapazität von mitochondrialer AlaAT (Tukey Test; n=5; p<0,05) und bakterieller AlaDH (Tukey Test; n=8; p<0,05) in *Fix-* und *alaDH-* relativ zu *Fix+*.

Knöllchen, welche den Stickstoff nicht durch die AlaDH in Bakteroiden assimilieren können (*alaDH-*), zeigen also keine Unterschiede im Vergleich zu *Fix+* in der Kapazität des Alanin verbrauchenden Enzyms AlaAT. Die Nitrogenaseaktivität ist unverändert. Die Pflanzen sind ebenfalls nicht von der

Mutation des *alaDH*-Gens betroffen, da Wuchs und photosynthetische Aktivität gleich sind. Ebenso sind die Menge und das Profil der Aminosäuren, vor allem Asparagin, in den Knöllchen nicht verändert. Somit ist festzuhalten, dass die *AlaDH* für eine funktionelle Symbiose, zumindest unter den beobachteten Konditionen, nicht essenziell ist.

6.2.6 Veränderungen des Bakteroidproteoms in *Fix*- und *alaDH*-

Vermutlich auch wegen der Kontaminationsproblematik zwischen *Fix*+/*alaDH*- liefern die dargelegten Beobachtungen der *alaDH*- Mutante noch keine Indizien für/gegen die hypothetische Nutzung des Alanins für die Glutamatproduktion in Mitochondrien. Essenziell hierfür wäre eine erfolgte Verringerung des Alaningehaltes in *alaDH*- Knöllchen. Die gleichzeitige Verringerung der *AlaAT*-Kapazität hätte diese Hypothese gestützt, ein Gleichbleiben widerlegt. Die gleichbleibende Alaninkonzentration in der *alaDH*- Mutante erscheint verwunderlich. Um alternative Enzyme für die Alaninproduktion zu identifizieren und ferner die Auswirkungen der *alaDH*- Mutation auf zellulärer Ebene zu beleuchten, wurde das Proteom isolierter Bakterioide quantifiziert (n=5). Die Peptidspektren wurden mittels der gleichen Datenbank (fusioniert aus *Medicago*- und *Rhizobium*sequenzen) analysiert, die bereits in der Untersuchung des mitochondrialen Proteoms herangezogen wurde.

6.2.6.1 Pflanzliche „Kontaminanten“ in Bakteroidisolaten

In den 15 Proben wurden insgesamt 1834 unterschiedliche Proteine identifiziert, wobei auch *Vicia faba* Proteine enthalten sind, die durch die MaxQuant Analyse gegen eine entsprechende Datenbank als *Medicago* gekennzeichnet wurden. Diese verteilen sich auf die Proben wie in Abbildung 34 abgebildet. Die isolierten Bakterioide sind weitestgehend frei von pflanzlichen Proteinen. Zwar sind zwischen 10-20% der identifizierten Proteine pflanzlichen Ursprungs (Abbildung 34 A und B), deren Anteil an der Gesamtproteinmenge (kumulierte iBAQ-Werte) liegt aber bei maximal 4% (*Fix*-4) (Abbildung 34 C und D).

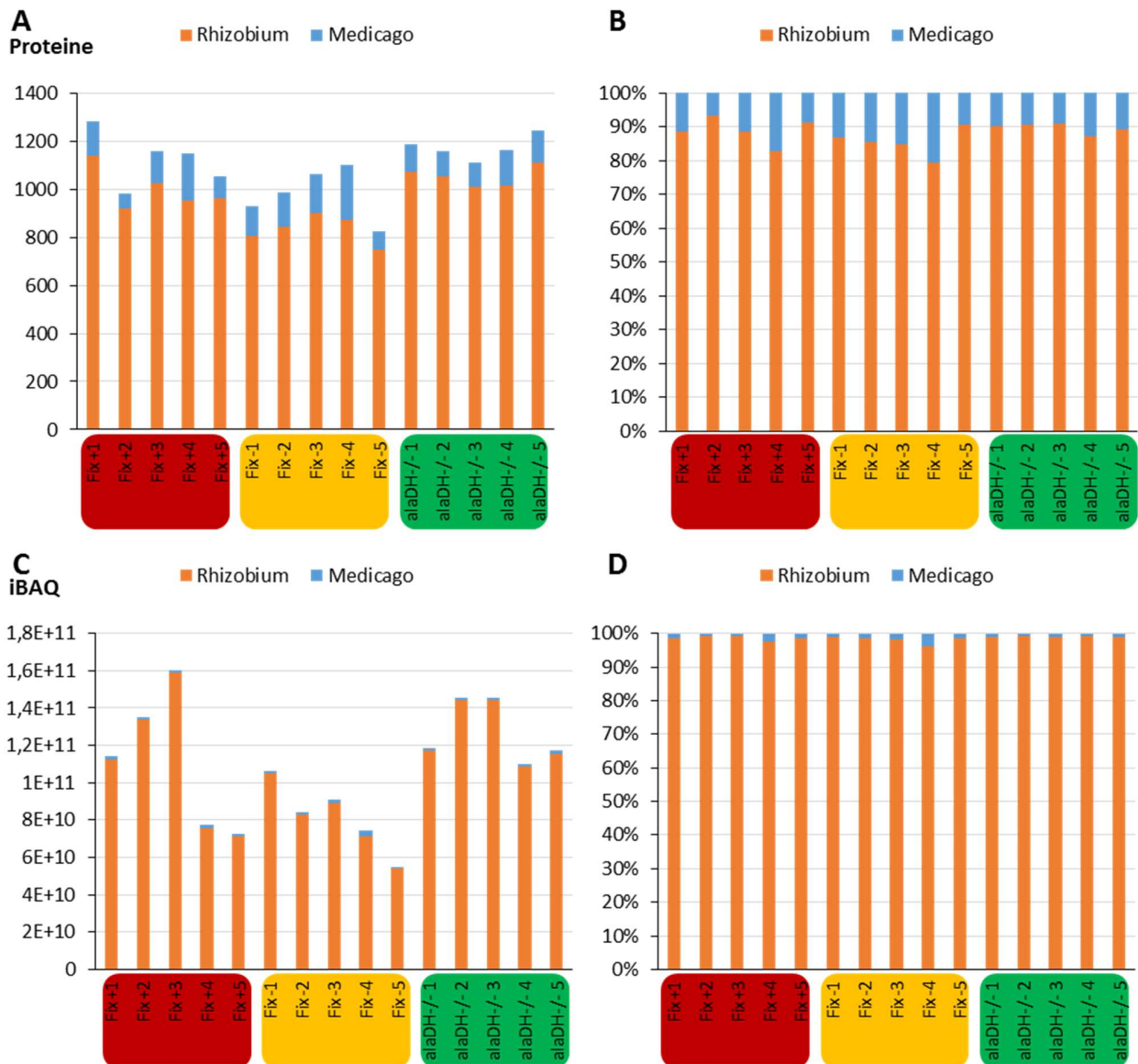


Abbildung 34: Reinheit der isolierten Bakterioide.

A und B: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine pflanzlichen und rhizobiellen Ursprungs und deren prozentuale Verteilung. Die Zuordnung der Peptidspektren erfolgte mittels der gleichen Datenbank, die für die Analyse des Mitochondrienproteoms (fusioniert aus *Rl*- und *Mt*-Proteinen) zum Einsatz kam. **C und D:** Proteinintensitäten (iBAQ).

Die LFQ-Werte jeder Probe wurden in Perseus verwendet, um eine PCA zu erstellen (Abbildung 35). Die Replikate der *Fix*- Bakterioide sind, mit einer Ausnahme, in einem engen Cluster angeordnet. Die abseits liegende Probe hat bei näherer Betrachtung die höchste Abundanz der NifH-Untereinheit innerhalb der fünf *Fix*- Replikate, welche im *Fix*- Stamm eigentlich nicht vorhanden sein sollte. Aus diesem Grund wurde diese Probe für die folgenden Analysen nicht berücksichtigt (Abbildung 35, schwarzer Pfeil). Die *Fix*⁺ und *alaDH*⁻ Bakterioide sind weit verteilt. Zwei der *alaDH*⁻ Isolate weisen das AlaDH-Enzym auf, sie wurden ebenfalls für die folgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt (Abbildung 35, schwarze Pfeile). Somit verbleiben für *Fix*⁺ unverändert fünf Replikate, für *Fix*⁻ derer vier und für die *alaDH*⁻ Linie drei Replikate.

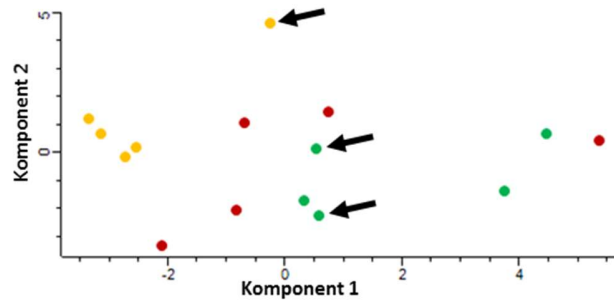


Abbildung 35: PCA Analyse mittels Perseus Software.

Die LFQ-Werte aller 15 Proben wurden mittels zwei-dimensionaler PCA auf Ihre Ähnlichkeit zueinander überprüft. Markierte Proben (schwarze Pfeile) wurden für die proteomischen Vergleiche der Linien nicht berücksichtigt, weil die Pflanzen vermutlich mit *Fix+*-Knöllchen kontaminiert waren (siehe Text).

6.2.6.2 Pflanzliche Kontaminanten in Bakteroidisolaten stammen vor allem aus dem Cytosol und aus Mitochondrien

In den verbleibenden zwölf Replikaten sind 296 *Medicago* Proteine enthalten. Deren Zuordnung zu *Arabidopsis*pendants (analog zu dem Verfahren in Abschnitt 4.1.1.) ermöglicht die Einordnung in ein Zellkompartiment anhand der SUBA-Datenbank (Hooper *et al.*, 2014). Es wird deutlich, dass diese zum größten Teil aus Mitochondrien und dem Cytosol stammen (Abbildung 36).

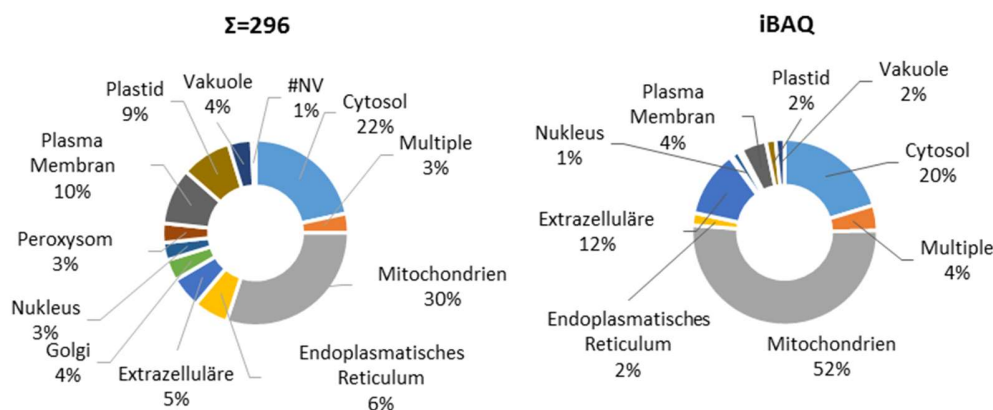


Abbildung 36: Pflanzliche Proteine in Bakteroid Fraktionen.

Identifizierte Proteine aus *Fix+/-Fix-/alaDH-* Bakteroidfraktionen wurden mittels Massenspektrometrie quantifiziert und deren subzelluläre Lokalisation durch Homologievergleich mit einer *Arabidopsis*datenbank und dem SUBA-Algorithmus abgeschätzt. Über die verbliebenen zwölf Bakteroidisolate wurden insgesamt 296 *Medicago* Proteine identifiziert (links), deren Anteil an der Gesamtabundanz der *Medicago* „Kontaminanten“ errechnet wurde (rechts).

Es folgte die nähere Untersuchung der pflanzlichen Kontaminanten in den zwölf Bakteroidisolaten. Während es logisch ist, dass einige Mitochondrien im Zuge des Isolationsprozesses aufgrund der physischen Ähnlichkeit zu Bakteroiden (Größe und Form) mit-aufgereinigt werden, trifft diese Erklärung nicht auf cytosolische Enzyme zu. Diese sollten nach der Ultrazentrifugation und Pelletierung der Bakterioide im Überstand zu finden sein, wenn sie nicht mit Membranen der sedimentierten Organellen assoziieren. Aus diesem Grund wurden die cytosolischen „Kontaminanten“ in Bezug auf ihre Quantität untersucht, die in acht der verbliebenen zwölf Proben enthalten waren. Dazu wurde der LFQ-Mittelwert jeder Linie der Proteine berechnet (Abbildung 37).

Von besonderer Bedeutung sind Enzyme, welche die Funktion des Bakteroids unterstützen könnten. Dazu zählt das Leghämoglobin, dessen Assoziation mit Bakteroiden bereits gezeigt wurde, wobei nicht klar ist, ob dies wirklich der Versorgung des Bakteroids mit Sauerstoff dient (Wienkoop *et al.*, 2003). Das Leghämoglobin ist vor allem in *Fix*- Isolaten präsent, jedoch vergleichsweise wenig in *Fix+* und gar nicht in *alaDH*- zu detektieren. Außerdem sind mit der GS (zwei verschiedene *Medicago* Gene) und der Asparagin Synthase zwei Enzyme der cytosolischen Stickstoffassimilation mit einer höheren Intensität in *Fix*- und *alaDH*- Bakterioide als in *Fix+* Isolaten zu finden. Deren Interaktion mit der SM könnte die Assimilation des exportierten Ammoniums beschleunigen und für die GS ist diese Observation bereits bekannt (Masalkar *et al.*, 2010). Ferner ist die häufigere Assoziation beider Enzyme vor allem mit *alaDH*- Bakteroiden zu erkennen, dies könnte einen verstärkten Ammoniumexport bei Wegfall der AlaDH nahelegen.

Die außerdem gefundene Phosphoglyceratkinase katalysiert reversibel die Dephosphorylierung des bis-Phosphoglycerats entlang der Glykolyse und assoziiert ebenfalls stärker mit *Fix*- als *alaDH*- und *Fix+* Bakteroiden. Die Glykolyse ist in Knöllchenzellen forciert, um die Symbiosomen mit Kohlenstoff zu versorgen und einige Enzyme dieses Stoffwechselweges wurden bereits in Proteomstudien mit der SM identifiziert (Colebatch *et al.*, 2004). Eine Assoziierung könnte dies zusätzlich fördern und wurde für einige Enzyme bereits massenspektrometrisch nachgewiesen (Saalbach *et al.*, 2002; Wienkoop *et al.*, 2003).

Diese Beispiele können mit der verwendeten Methode nur Tendenzen wiedergeben, da deren Abundanz im Vergleich mit rhizobiellen Proteinen nur sehr gering ist (Abbildung 34). Dennoch sind sie Indiz dafür, dass der cytosolische Metabolismus mit den Bakteroiden auch räumlich verknüpft sein kann und der Wegfall des Nitrogenase- oder AlaDH-Enzyms sich ebenfalls auf die Interaktion zwischen SM und Cytosol auswirkt.

Protein ID und Beschreibung	LFQ Mittel Fix+	LFQ Mittel Fix-	LFQ Mittel alaDH-
>Medtr6g021805.1 GTP-binding elongation factor Tu family protein	1590896000	2033950000	1363336667
>Medtr1g013680.1 GTP-binding elongation factor Tu family protein	67834000	490372500	0
>Medtr1g112870.3 archaeal/vacuolar-type H ⁺ -ATPase subunit B	141910400	485767500	100676667
>Medtr1g082870.1 Rho GTPase-like protein	92008000	118795000	98350000
>Medtr7g024390.1 heat shock cognate 70 kDa protein	85621400	155950000	75740000
>Medtr4g124660.3 sucrose synthase	22198000	328402500	92674667
>Medtr7g114560.1 benzyl alcohol O-benzoyltransferase	0	796200000	0
>Medtr7g026130.1 heat shock 70 kDa protein	230600000	0	521866667
>Medtr3g065250.1 glutamine synthetase domain protein	0	90917500	0
>Medtr8g038220.1 annexin D8	179534000	0	206013333
>Medtr4g129070.1 diacylglycerol kinase domain protein	0	16655750	0
>Medtr2g008050.3 actin-related protein 4A	0	154487500	0
>Medtr1g083950.1 universal stress family protein	0	19905500	0
>Medtr8g097320.1 carboxy-terminal region remorin	0	8744250	0
>Medtr6g071070.1 glutamine synthetase domain protein	15219000	21779500	19069000
>Medtr2g069310.1 translation elongation factor EF-2 subunit	0	64092500	0
>Medtr2g066120.1 phosphoglycerate kinase-like protein	0	37318500	0
>Medtr1g011540.1 leghemoglobin Lb120-1	37494000	683685000	0
>Medtr3g464580.3 asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] protein	25956000	115791750	86686667
>Medtr7g110310.1 S-adenosylmethionine synthase-like protein	22284000	54002500	0
>Medtr2g039960.1 DEAD-box ATP-dependent RNA helicase	12993400	117371250	13538333

Abbildung 37: Cytosolische Enzyme, die in mindestens acht der verbliebenen zwölf Bakteroidisolate gefunden wurden.

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte der LFQs der entsprechenden Linie. Die Farbskala dient zur Einordnung der Intensität des jeweiligen Proteins.

6.2.6.3 Veränderungen des Bakteroid Proteoms in *alaDH*- und *Fix*- Knöllchen

Für den Vergleich der rhizobiellen Proteine wurde der Mittelwert der LFQs eines Proteins aus *Fix*- bzw. *alaDH*- durch den *Fix+* Mittelwert dividiert. Analog zu der Auswertung der Mitochondrienproteome wurden nur Enzyme miteinander verglichen, die in mindestens zwei Replikaten jeder Linie gefunden wurden. Zunächst wurden die am stärksten veränderten Proteine beider Vergleiche analysiert (Abbildung 38). In der *alaDH*- Linie liegt eine Erhöhung der SSDH um Faktor 5 vor. Dies ist interessant, da die SSDH ein alternativer Eintrittsweg für Kohlenstoff in den TCA-Zyklus ist. Eine Aminotransferase (*R13200*), die die Deaminierung von Glutamat mit der Produktion von Isoleucin reversibel koppelt, ist um mehr als das Doppelte erhöht. Bakterioide, die Alanin nicht direkt aus dem fixierten Stickstoff assimilieren können, zeigen ebenso eine Verdopplung der Abundanz der NADP Glutamat Synthase (*R110555*). Unter den herabgesetzten Proteinen findet sich eine Nitroglycerin Reduktase (-94%) und Enzyme, die am Eisen-Metabolismus partizipieren.

Die Glutamat Synthase, die in *alaDH*- Bakteroiden doppelt so abundant ist, ist in *Fix*- Bakteroiden in 4facher Menge vorhanden. Unter den niedriger abundanten Proteinen in *Fix*- befinden sich vor allem Untereinheiten der Nitrogenase.

Protein ID und Beschreibung	alaDH ⁻ /Fix+	
	p-Wert	Fakt.
>pRL100134 putative succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+]	0,012	5,07
>RL1883 putative small heat shock protein	0,011	4,14
>RL2815 putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	0,008	2,52
>pRL120556 putative substrate-binding component of ABC transporter	0,012	2,51
>RL3200 putative branched-chain-amino-acid aminotransferase	0,020	2,45
>RL1592 putative molybdopterin-containing oxidoreductase	0,016	2,41
>RL0479 putative proline racemase	0,003	2,35
>RL1567 putative outer membrane protein involved in envelope biosynthesis	0,008	2,15
>pRL110555 putative glutamate synthase [NADPH] large chain precursor	0,030	2,03
>RL2371 putative quinone oxidoreductase	0,048	1,96
>pRL110236 putative dehydrogenase	0,034	0,37
>RL3718 putative D-hydantoinase	0,046	0,34
>RL3697 putative haem iron transport component	0,019	0,33
>RL2003 putative peroxidase	0,017	0,26
>RL0322 putative iron-regulated protein	0,024	0,24
>pRL120322 outer membrane siderophore receptor precursor	0,025	0,23
>RL0751 putative phosphogluconate dehydratase	0,025	0,19
>pRL110203 putative urocanate hydratase	0,033	0,19
>RL3522 putative cation transport protein	0,022	0,08
>RL3432 putative glycerol trinitrate reductase	0,024	0,06

Protein ID und Beschreibung	Fix ⁻ /Fix+	
	p-Wert	Fakt.
>pRL110555 putative glutamate synthase [NADPH] large chain precursor	0,031	4,21
>pRL90080 putative periplasmic binding component of ABC transporter	0,040	3,93
>pRL100370 glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase	0,027	3,59
>RL0776 malonic semialdehyde oxidative decarboxylase	0,015	2,69
>RL1494 putative malonate semialdehyde dehydrogenase	0,024	2,27
>RL1498 putative flavoprotein	0,038	2,25
>pRL90249 putative substrate-binding component of ABC transporter	0,010	2,21
>pRL80044 putative acetyl-coenzyme A synthetase	0,000	2,19
>RL4226 putative osmotically inducible protein C	0,049	2,13
>RL4123 putative sarcosine oxidase alpha subunit	0,045	2,09
>RL4349 putative aerobic cobaltochelataase	0,004	0,15
>RL3522 putative cation transport protein	0,028	0,15
>RL1774 putative 50S ribosomal protein L3	0,030	0,14
>RL0884 putative 10kda chaperonin (protein cpn10)	0,013	0,14
>pRL100160 nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain	0,023	0,13
>RL1673 putative 50S ribosomal protein L13	0,036	0,10
>pRL100161 nitrogenase molybdenum-iron protein alpha chain	0,020	0,10
>RL1340 putative superoxide dismutase	0,011	0,09
>RL3432 putative glycerol trinitrate reductase	0,025	0,07
>pRL100162 putative nitrogenase iron protein	0,008	0,04

Abbildung 38: Die am stärksten veränderten Proteine in Fix⁻/alaDH⁻ Bakteroiden.

Gemittelte LFQ-Intensitäten für Proteine aus Fix⁻ und alaDH⁻ Bakteroiden wurden gegen die aus Fix⁺ verglichen. Zur Berechnung des Faktors wurde der LFQ-Mittelwert der jeweiligen Mutante durch den Mittelwert der Fix⁺ Replikate dividiert (p<0,05). Die zehn Proteine mit der jeweils höchsten Abundanzzu- und abnahme sind aufgelistet.

6.2.6.4 Veränderungen des TCA-Zyklus und alternative Alaninproduktionswege in alaDH⁻

Der TCA-Zyklus ist in Bakteroiden besonders wichtig, da hier die von der pflanzlichen Zelle erhaltenen Dicarboxylate oxidiert und die reduzierten Redoxäquivalente sowohl direkt als auch indirekt die Funktionalität des Nitrogenaseenzym gewährleisten. Die Enzyme des TCA-Zyklus sind jedoch nicht unter den oben aufgezeigten, stark veränderten Proteinen zu finden (Abbildung 38), weshalb sie und die mit dem TCA-Zyklus assoziierten Enzyme gesondert betrachtet wurden (Abbildung 39 A). Fix⁻ Bakterioide zeigen wenige Anpassungen des zentralen TCA-Zyklus: unter Anderem sind die MDH und Fumarase häufiger vorhanden. Daneben scheint sich nur die Stickstoffassimilation in Fix⁻ Bakteroiden

zu verändern, da sowohl die Glutamat Dehydrogenase als auch die GS höher abundant sind. Insgesamt kann man eine Tendenz erkennen, dass in *Fix-* die analysierten Enzyme höher abundant vorliegen als in *Fix+*.

Ein anderes Bild zeigt sich in *alaDH-* Bakteroiden: Viele Enzyme des zentralen TCA-Zyklus sind signifikant niedriger abundant als in *Fix+*. Vor allem der decarboxylierende Arm (ICDH und OGDH) des TCA-Zyklus ist in der *alaDH-* Mutante davon betroffen. Außerdem sind, anders als in *Fix-*, die Fumarase und die MDH herabgesetzt. Unter den Enzymen der Stickstoffassimilation ist nur die Glutamat Dehydrogenase verändert, sie ist weniger abundant.

Vor dem Hintergrund der bisherigen Ergebnisse der *alaDH-* Linie sind vor allem die Enzyme von Interesse, welche die unveränderte Alaninmenge in den Knöllchen erklären könnten (Abbildung 39 B). In diesem Zusammenhang sind die SSDH, die die höchste Abundanzzunahme des Vergleichs aufweist (Abbildung 38), und die Erhöhung der Omega Aminosäuren Pyruvate Aminotransferase (*R/120419*; OpaA) zu nennen. Diese beiden Enzyme zeigen einen alternativen Alaninproduktionsweg in Bakteroiden auf, welcher dieses an die Deaminierung von GABA koppelt. Ein weiteres GABA-transaminierendes Enzym, die GABA-2-OG Aminotransferase (*R/0102*; GabT) wird in der *alaDH-* Mutante, im Gegensatz zu den anderen Linien, nicht detektiert. Die drei genannten Enzyme zeigen zwischen *Fix-* und *Fix+* keinen Unterschied.

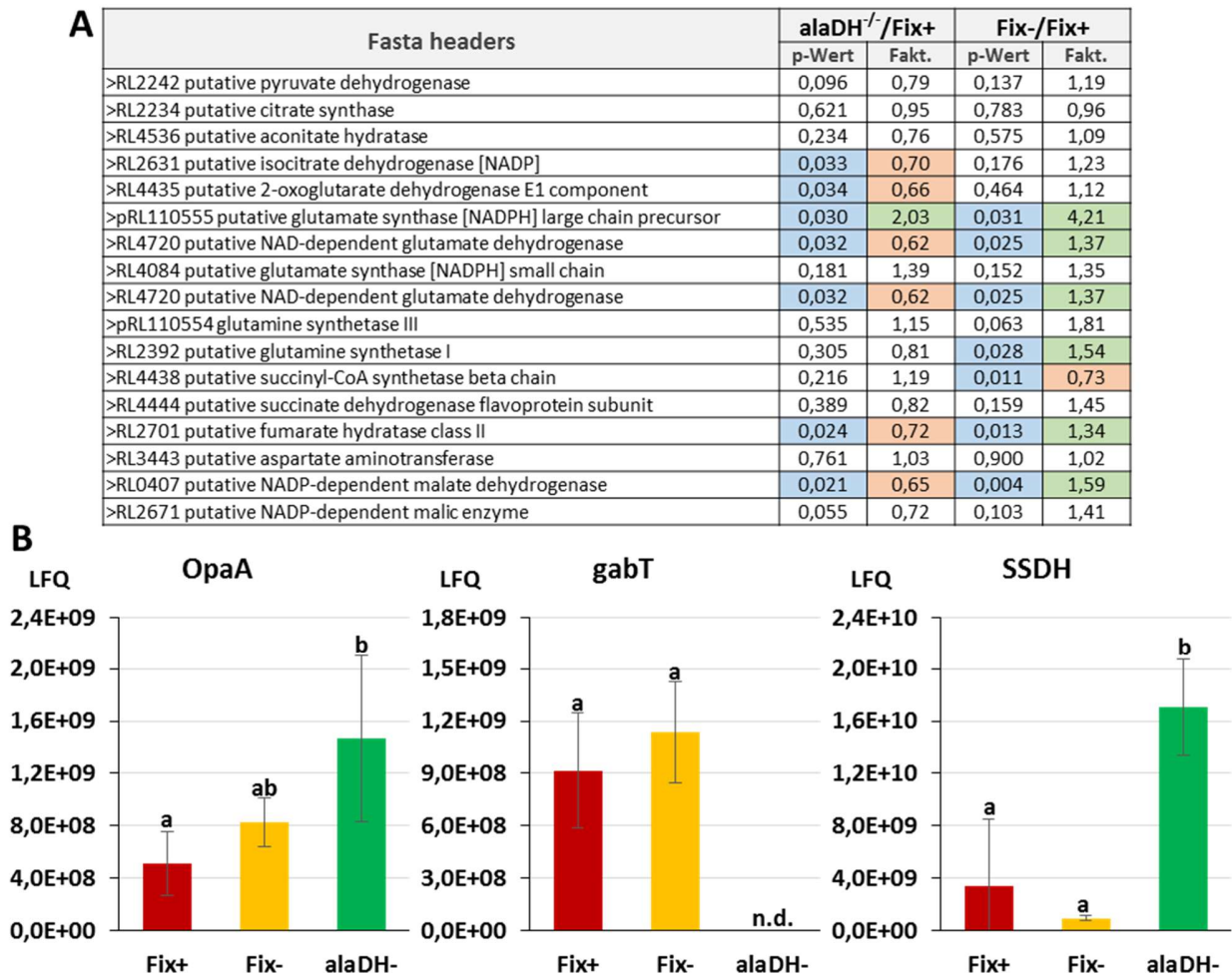


Abbildung 39: Vergleiche des zentralen Bakteroidmetabolismus der *Fix⁻/alaDH⁻* Mutanten mit *Fix⁺* (n=5 (*Fix⁺*), 4 (*Fix⁻*) und 3 (*alaDH⁻*)).

A: Es wurden alle dargestellten Enzyme in ausreichend Replikaten identifiziert und die LFQ Mittelwerte der Linien miteinander verglichen. Blau markiert sind p-Werte unter 0,05. Der Faktor wurde durch die Division des Mittelwerts der LFQ-Intensitäten der Mutante durch den *Fix⁺* Mittelwert berechnet. In den Mutanten höher abundante Enzyme sind in Grün, niedriger abundante Enzyme in Rot markiert. **B:** Nicht mit dem TCA-Zyklus assoziierte Enzyme, welche aufgrund ihres Bezugs zum Alanin/GABA-Metabolismus gesondert analysiert wurden (Tukey Test der LFQ-Werte mit $p < 0,05$).

Das Modell des cytosolischen und rhizobiellen Metabolismus in SNF-Zellen wurde in der Einführung bereits erläutert (Abbildung 4). Die durch die Proteomdaten beobachteten Anpassungen dieses Systems sind in Abbildung 40 dargestellt. Wie bereits dargelegt, sind in *Fix⁻* Bakteroiden (Abbildung 40 A) nicht viele der ausgewerteten Enzyme verändert. Angesichts des vermeintlich fundamentalen Unterschieds, den der Wegfall der Stickstofffixierung darstellt, ist dies überraschend.

Fällt allerdings die AlaDH weg (eine Mutation, die bislang auf allen untersuchten Ebenen keinen Unterschied zu *Fix⁺* bewirkt), kommt es zu eindeutigeren Änderungen (Abbildung 40 B): Der decarboxylierende Arm des TCA-Zyklus (ICDH und OGDH) ist niedriger abundant. Die OpaA, welche die Aminierung von Pyruvat mit der Deaminierung des importierten GABA verbindet, ist vermehrt vorhanden. Auf diese Weise erklärt sich der unveränderte Alaningehalt der *alaDH⁻* Knöllchen. Das aus der OpaA-vermittelten Transaminierung erzeugte SSA kann durch die ebenfalls erhöhte SSDH zu

Succinat oxidiert werden, welches entlang des TCA-Zyklus weiter für die Erzeugung der Reduktionsäquivalente oxidiert wird. In der *alaDH*- Mutante kommt es also, zumindest auf Basis der Proteinabundanzen isolierter Bakterioide, zu einer Veränderung der für den TCA-Zyklus verwendeten Substrate. Der entsprechende Stoffwechselweg wurde in das Modell aufgenommen (Abbildung 40).

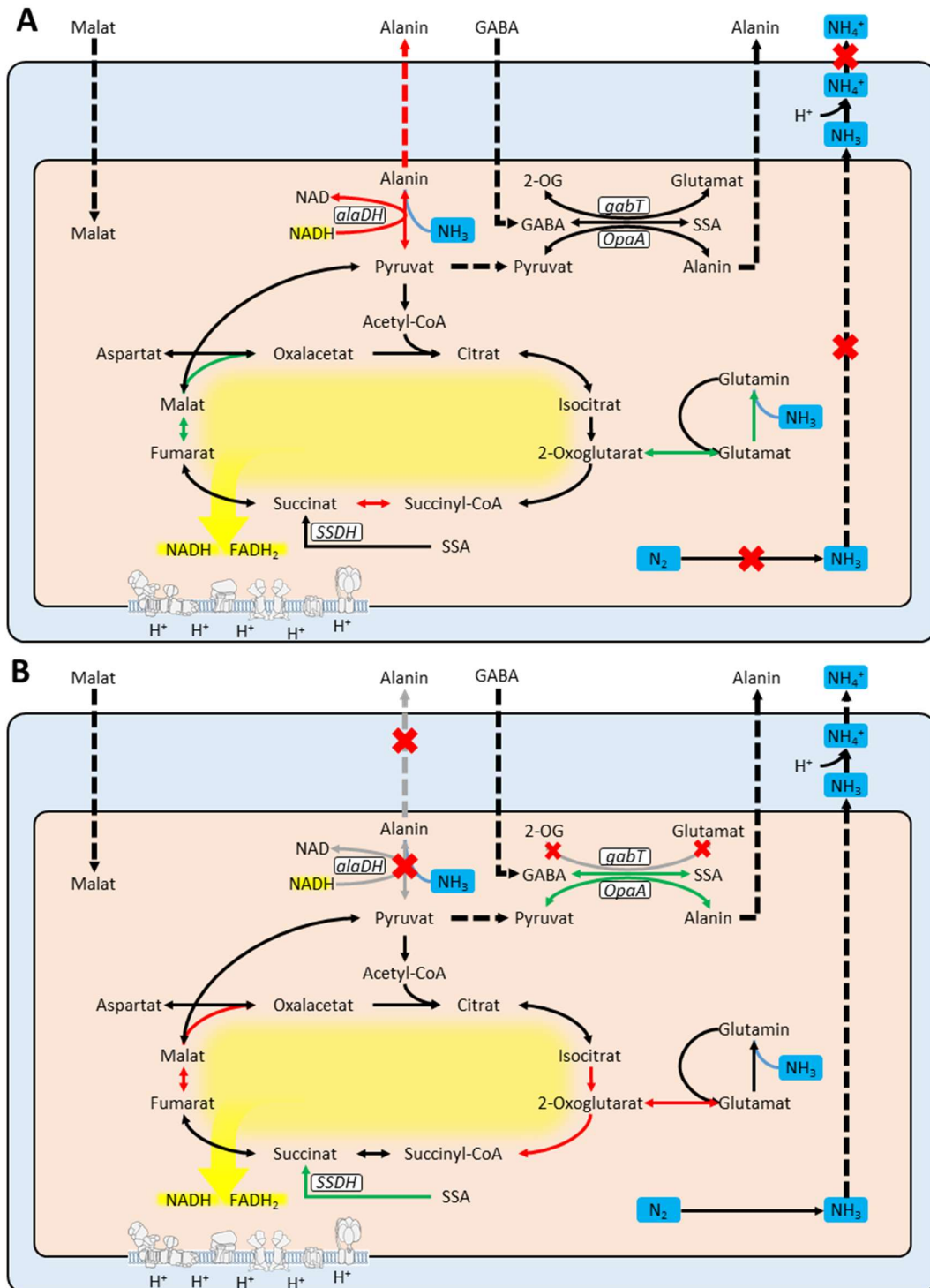


Abbildung 40: Die Änderungen des zentralen Metabolismus in *Fix*- (A) und *alaDH*- (B) Bakteroiden in der Übersicht.

Die in Abbildung 39 aufgeführten Daten ergaben die hier abgebildeten Proteinänderungen. rote Kreuze stehen für nicht detektierte Enzyme. Gestrichelte Pfeile geben Transporte und Diffusionsprozesse an. Schwarze Pfeile symbolisieren unveränderte Enzyme, Grüne geben höher abundante, rote weniger abundante Enzyme an (p -Werte und Signifikanzen sind Abbildung 39 zu entnehmen). Gesondert gekennzeichnet in weißen Boxen sind

Enzyme, welche am Alaninmetabolismus beteiligt sein können (OpaA: Omega Aminosäuren Pyruvate Aminotransferase; alaDH: Alanin Dehydrogenase; GabT: Gaba-2-OG Aminotransferase; SSDH: Succinat Semialdehyd Dehydrogenase) Graue Pfeile signalisieren, dass das Enzym in mindestens einer Linie in nicht genügend Replikaten für einen Vergleich gefunden wurde. Blau hinterlegt ist der Stickstoff, welcher von der Nitrogenase zu Ammoniak reduziert wird. Die OXPHOS ist nur schematisch dargestellt. Nähere Anmerkungen im Text.

6.2.7 ¹⁵N-Markierung von Intermediaten der SNF

Die erhöhte Abundanz des OpaA-Enzyms in *alaDH*- Bakteroiden zeigt einen alternativen Alaninproduktionsweg auf. Um die Bildung von Alanin während der SNF genauer zu untersuchen und die Produktionsrate der an der Stickstoffassimilation beteiligten Aminosäuren zu bestimmen, wurden Knöllchen der drei Linien gesammelt und in eine geschlossene Inkubationskammer (Volumen = 4 ml) gegeben. Die Umgebungsluft darin wurde mit einer Spritze, die durch ein Septum im Deckel der Kammer gestochen wurde, evakuiert, ehe 4 ml eines ¹⁵N₂:O₂ (im Verhältnis 4:1) injiziert wurden. In einer Zeitreihe wurden die Knöllchen für verschiedene Zeitspannen mit ¹⁵N₂ Gas inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt. Die Knöllchen wurden gefriergetrocknet, die Aminosäuren extrahiert, derivatisiert und anschließend in einem Gaschromatographen aufgetrennt und quantifiziert. Im Zuge der Derivatisierung wurden die Aminosäuren mit Säure behandelt, sodass Glutamin und Asparagin in Glutamat bzw. Aspartat umgewandelt wurden. Somit kann bei der Analyse dieser Aminosäuren nicht zwischen der Amid- und Säureform unterschieden werden. Ein Vorversuch (Abbildung 41 A) zeigt eine Anreicherung des in den Knöllchen gebundenen Stickstoffs mit ¹⁵N über drei Stunden, wobei diese während der ersten Stunde linear erfolgt. Da die ersten Intermediate des fixierten Stickstoffs identifiziert werden sollten, wurden relativ kurze gewählt (0 Sekunden, 30 Sekunden, 120 Sekunden, 300 Sekunden, 780 Sekunden).

Für *Fix*- Knöllchen betragen die Anreicherungsraten für Asparagin/Aspartat, Alanin bzw. Glutamin/Glutamat 0,011, -0,036 und 0,005% pro Sekunde (Abbildung 41 B und C). Negative Anreicherungsraten entstehen durch geringfügige *Fix+* oder *alaDH*- Kontaminationen in den *Fix*- Proben der ersten Messpunkte. Deren Ausbleiben in den späteren Proben, in denen keine Fixierung stattfindet, begründet die scheinbare Abnahme der markierten Stickstoffmenge. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse aber die zu erwartende fehlende Stickstofffixierung in *Fix*- Knöllchen.

Man kann festhalten, dass in Stickstoff fixierenden Knöllchen Asparagin/Aspartat am schnellsten angereichert wird gefolgt von Alanin und Glutamin/Glutamat. Aufgrund des hohen Asparagin/Aspartat Verhältnisses in Stickstoff fixierenden Knöllchen (Abbildung 32) ist davon auszugehen, dass die Produktionsrate von Aspartat/Asparagin zu einem großen Teil auf die Anreicherung von Asparagin zurückzuführen ist. Die Aminosäuren werden in *Fix+* am schnellsten mit

schwerem Stickstoff angereichert: Die Rate beträgt in *Fix+* bei Asparagin/Aspartat 1,461‰/s, bei Alanin 0,854‰/s und bei Glutamat/Glutamin 0,383‰/s.

Die *alaDH*- Knöllchen zeigen geringere Assimilationsraten im Vergleich zu *Fix+*, hier betragen diese 0,328‰/s (Asp/Asn, entspricht -78% im Vergleich zu *Fix+*), 0,189‰/s (Ala, entspricht -78%) und 0,041‰/s (Glu/Gln, entspricht -89%). Wie bereits dargelegt, wird Alanin in *alaDH*- Knöllchen weiterhin, vermutlich durch die höher abundante OpaA weiterhin produziert, was den unveränderten Alaningehalt der *alaDH*- Knöllchen erklären kann (Abbildung 32). Die ¹⁵N₂ Inkubationsexperimente machen jedoch deutlich, dass die Alaninproduktion erheblich verlangsamt erfolgt (n=1). Interessanterweise fällt die Produktionsrate von Asparagin im gleichen Maße und jene von Glutamin ist noch stärker herabgesetzt.

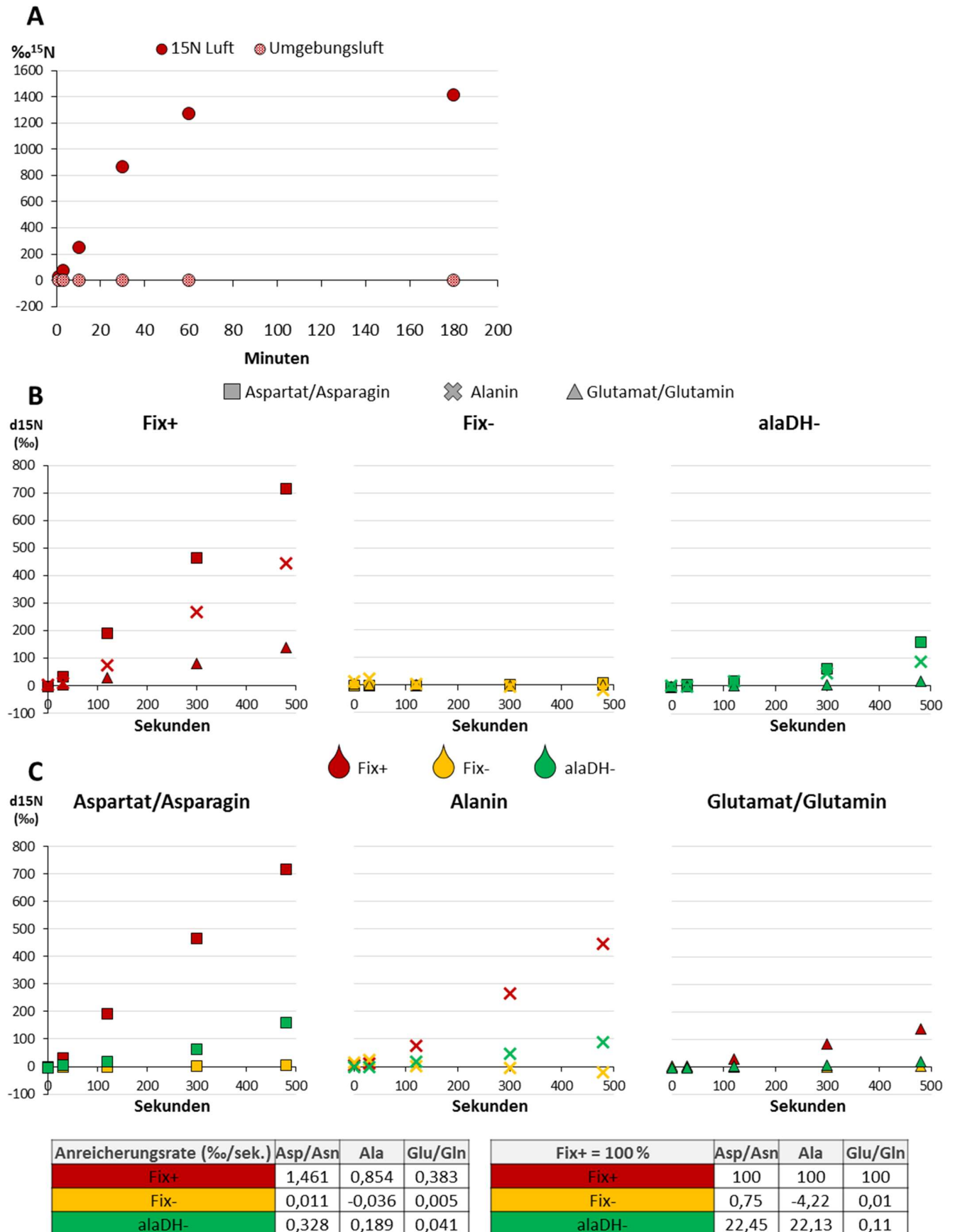


Abbildung 41: Markierte Aminosäuren in Knöllchen nach $^{15}\text{N}_2$ Inkubation im geschlossenen System.

Knöllchen der drei infizierten Pflanzenlinien wurden in ein geschlossenes Gefäß gegeben, in welchem die Umgebungsluft durch ein 4:1 Gemisch aus $^{15}\text{N}_2$ und O_2 ausgetauscht wurde, gefolgt von unterschiedlich langen Inkubationszeiten. **A** Vorversuch (n=1) zur Prüfung, in welchem Zeitrahmen nach der Trennung von der Wurzel

eine Anreicherung mit markiertem Stickstoff in Knöllchen von *Fix+* Pflanzen erfolgt. Die Kontrolle wurde parallel in einem gleichen Gefäß mit Umgebungsluft „inkubiert“. Für die Auswertung wurde der Anteil des ^{15}N Isotops am Stickstoffgehalt der Probe gemessen. Für den folgenden Vergleich der Linien wurde ein Zeitrahmen gewählt, der innerhalb des linearen Anstiegs der ^{15}N Anreicherung liegt (**B und C**). Da die ersten Intermediate der ^{15}N Assimilation von Interesse sind, wurde eine möglichst kurze Inkubationszeit gewählt: Die Knöllchen der Linien wurden für 0, 30, 120, 300 und 780 Sekunden mit dem Isotopengas inkubiert (n=1). In B sind die Anreicherungen pro Linie dargestellt, in C die Anreicherung der relevanten Aminosäuren in den drei Linien und die Anreicherungsraten der Aminosäuren pro Linie (Tabelle links) und beziehungsweise auf die Rate von *Fix+* (Tabelle rechts). Nähere Anmerkungen im Fließtext.

6.2.8 Vergleich Stickstoff fixierender Pflanzen in Langtag-/Kurztagbedingungen

Knöllchen, deren Bakterioide den fixierten Stickstoff nicht durch das AlaDH-Enzym assimilieren können, zeigen unveränderte Alanin- und Asparaginkonzentrationen (Abbildung 32) und bewirken keinen Wuchsnachteil der Pflanze (Abbildung 28). Jedoch ist die Produktionsrate dieser Aminosäuren um jeweils ca. 80%, (Abbildung 41) herabgesetzt. Anscheinend ist die verringerte Rate unter den beobachteten Bedingungen immer noch ausreichend, um die Stickstoffversorgung zu gewährleisten. Um zu überprüfen, ob sie jedoch in Zeiten erhöhten Stickstoffbedarfs einen Nachteil für die entsprechenden Pflanzen darstellt, wurde der Wuchs von *Fix+* und *alaDH-* Pflanzen in normalen Lichtbedingungen (Gewächshauskammer, 8h Lichtperiode) mit Pflanzen der gleichen Aussaat in der Phytokammer (16h Lichtperiode) in verschiedenen Altersstadien verglichen (Abbildung 42). Intensivere Lichtbedingungen bewirken eine erhöhte Photosyntheserate und induzieren die Expression des Photosyntheseapparates (Evans, 1988; Thornley, 1998). Hierfür werden große Mengen Stickstoff gebraucht und geringere Stickstoffassimilationsraten könnten zum Tragen kommen.

Während längere Lichtperioden auf *Fix+* Pflanzen entweder keinen (nach 5/6 Wochen) oder einen positiven Einfluss (nach 7 Wochen) auf den Wuchs haben, ist bei *alaDH-* Pflanzen ein gegenteiliger Effekt zu beobachten.

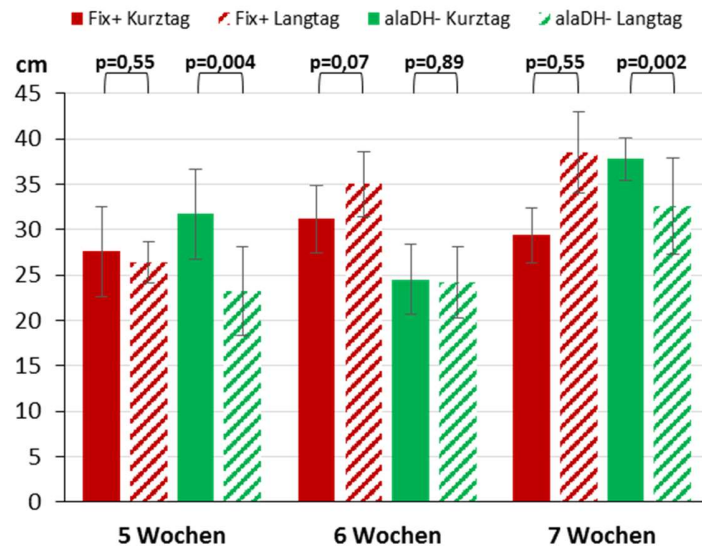


Abbildung 42: Wuchsvergleich von *Fix+* und *alaDH-* Pflanzen unter Langtag (16h) und Kurztag (8h) Bedingungen nach 5, 6 und 7 Wochen (n=10).

7 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung von Mitochondrien in SNF-Zellen. Proteomanalysen werden dazu genutzt, Anpassungen an die mutmaßlich veränderten Sauerstoff- und Substratbedingungen in der Knöllchenzelle zu identifizieren und die Kontribution von Mitochondrien zu der Stickstoffassimilation zu überprüfen. In diesem Zusammenhang steht der rhizobielle Stickstoffmetabolismus im Fokus. Es wird deutlich, dass Alanin ein mögliches Intermediat des fixierten Stickstoffs sein kann und einen Intermediatstrom vom Bakteroiden zum Mitochondrium repräsentieren könnte.

7.1 Alanin als intrazelluläre Transportform von reduziertem Stickstoff

Alanin kann durch die AlaAT mit 2-OG transaminiert werden (Abbildung 33) und könnte so Glutamat für die Stickstoffassimilation im SNF-Knöllchen bereitstellen (Thal *et al.*, 2018). Dies würde, zumindest teilweise, den Pyruvatmangel, der durch die Fokussierung der Glykolyse auf die Produktion von C₄ Körpern für die Bakterioide entsteht, in Mitochondrien kompensieren und Glutamat für die Ammoniumassimilation im Cytosol bereitstellen. Alanin wäre demnach ein zentrales Intermediat des Knöllchenmetabolismus, da es die zelluläre Energieproduktion mit der Stickstoffassimilation verknüpft.

7.1.1 Alanin scheint Intermediat der Stickstoffassimilation zu sein

Um diese Theorie zu überprüfen, wurden Vergleiche zwischen Knöllchen und Wurzeln durchgeführt. Die Abundanz und Enzymkapazität der AlaAT ist in *Fix+* Mitochondrien höher als in den meisten anderen Linien (Abbildung 33 B und D). Die Abundanz zu *Fix-* Mitochondrien ist unverändert, was eine knöllchenspezifische Regulation unabhängig von der Aktivität der Nitrogenase nahelegt. Die Quantifizierung von Aminosäuren in Knöllchen und Wurzeln zeigt, dass Alanin in *Fix+* abundanter ist als in *Fix-* Knöllchen und in Wurzeln von *Gedüngt* und *Null* Pflanzen (Abbildung 32 B). Damit besitzt Alanin ein ähnliches Profil wie die anderen Intermediate der Stickstoffassimilation (Glutamat, Glutamin, Aspartat, Asparagin), was eine Rolle in der SNF nahelegt. Der Ursprung des Alanins kann in den Bakteroiden liegen, da die Alanin produzierende AlaDH in isolierten *Fix+* Bakteroiden höher abundant ist als im *Fix-* Pendant, was auch mit einer etwa doppelt so hohen Aktivität einhergeht (Abbildung 33 A und E). An diesem Punkt wird ersichtlich, dass es in Knöllchen möglicherweise einen Alaninstrom von Bakteroiden zu Mitochondrien gibt. Essenziell für diese Hypothese ist die Annahme, dass Bakterioide Alanin in signifikanter Menge produzieren und exportieren. Aus diesem Grund wird nun kurz auf dieses Modell eingegangen.

7.1.2 Alanin als diskutiertes Exportprodukt aus Bakteroiden

Wie in der Einführung dieser Arbeit bereits dargelegt, wird Ammonium vom Bakteroiden als Transportform des fixierten Stickstoffs in die infizierte Zelle exportiert (Bergersen *et al.*, 1990).

Bakteroide produzieren jedoch auch Alanin und Alanin ist die alleinige Exportform des fixierten Stickstoffs, wenn isolierte Bakterioide mit $^{15}\text{N}_2$ in geschlossenen Kammern inkubiert werden. (Salminen *et al.*, 1992; Waters *et al.*, 1998). Die bakterielle AlaDH wurde als das Enzym identifiziert, welches Ammonium auf Pyruvat überträgt. An *Pisum sativum* bewirkt sowohl die Mutation als auch die Überexpression eine Verringerung der Biomasseproduktion bei gleichbleibender Nitrogenaseaktivität (Allaway *et al.*, 2000; Ludwig *et al.*, 2004). Es wurde schließlich konkludiert, dass Bakterioide den fixierten Stickstoff teilweise assimilieren und ihn als Alanin und Ammonium exportieren. Im Falle eines Ausfalls der Alaninproduktion würde die exportierte Ammoniummenge ausreichen, um die Pflanze mit Stickstoff zu versorgen. Dies wäre jedoch für die Symbiose nicht essenziell, sondern hätte wahrscheinlich eine regulative Funktion im C/N-Metabolismus des Bakteroids (Ludwig *et al.*, 2004).

7.1.3 Die Symbiose und der Alaningehalt in *Vicia faba* Knöllchen ist unabhängig von der AlaDH

Detaillierte Untersuchungen an den Knöllchen von *Vicia faba* hinsichtlich dieser Frage sind bisher nicht erfolgt. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen Alanin als intrazelluläre Transportform in Richtung der Mitochondrien, wie sie von Proteomstudien ganzer Knöllchen abgeleitet wurde (Thal *et al.*, 2018). Bislang gibt es keine Studien bezüglich des möglichen Transports von (Stickstoff-) Assimilaten vom Bakteroiden zu den Mitochondrien infizierter Zellen. Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit eine *alaDH*- Rhizobienlinie (RU1327, (Allaway *et al.*, 2000)) in die experimentelle Strategie aufgenommen. Dies ist die erste Arbeit, welche die Auswirkungen dieser Mutante auf die Symbiose mit *Vicia faba* und ferner auf die Mitochondrien in *alaDH*- Knöllchen als Gegenstand hat.

Vor diesem Hintergrund bestätigt sich, dass die Mutation des *alaDH*-Gens auf die Abundanz und Aktivität der Nitrogenase in Knöllchen (Abbildung 31) keinen Einfluss hat. Dies ist mit den bisherigen Beobachtungen zu der Mutante in der Symbiose mit *Pisum sativum* übereinstimmend, welche die AlaDH-Funktion in Bakteroiden als nicht obligat für eine funktionierende Symbiose belegen (Allaway *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2005). Aus dem unveränderten Pflanzenwuchs und der Photosyntheserate (im Vergleich zu *Fix+* Pflanzen) kann man schließen, dass der fixierte Stickstoff der Pflanze, auch nach zehnwöchigem Wuchs, in ausreichender Menge zur Verfügung steht (Abbildung 28-Abbildung 29). Erklärt wird dies durch die unveränderten Aminosäurekonzentrationen von *Fix+* und *alaDH*-, vor allem in Hinsicht auf die Intermediate der Stickstoffassimilation: Glutamat, Glutamin, Aspartat und Asparagin (Abbildung 32). In diesem Zusammenhang überrascht in erster Linie die unveränderte Alaninkonzentration in der *alaDH*- Mutante. Diese ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass die Deaminierungsrate der AlaAT in *alaDH*- Mitochondrien genauso hoch ist wie in *Fix+* (Abbildung 33). Die Hypothese, dass AlaAT vom Bakteroiden exportiertes Alanin für die Glutamat Produktion in Mitochondrien für die Glutamatproduktion nutzt, lässt sich deshalb nicht überprüfen.

7.1.4 Alternative Wege der Alaninproduktion

Der unveränderte Alaningehalt wirft die Frage nach alternativen Produktionswegen für diese Aminosäure in *alaDH*- Knöllchen auf. Die massenspektrometrische Analyse isolierter Bakterioide zeigt u.a. ein Enzym auf, welches alternativ zur AlaDH ebenfalls Pyruvat zu Alanin aminieren kann und in *alaDH*- Bakteroiden höher abundant ist: Die OpaA (*R/120419*). OpaA koppelt die Aminierung von Pyruvat zu Alanin jedoch nicht an die Assimilation des von der Nitrogenase fixierten Ammoniums, sondern an die Deaminierung von GABA (Abbildung 40). OpaA ist eines von zwei GABA-transaminierenden Enzymen und ist in *alaDH*- Bakteroiden ca. doppelt so abundant wie in *Fix+* Knöllchen (Abbildung 39). Das zweite Enzym, GabT (*R/0102*) transaminiert GABA mit 2-OG, welches zu Glutamat wird (Prell *et al.*, 2009). Dieses wird im vorliegenden Datensatz nur in *Fix+* und *Fix-*, jedoch nicht in *alaDH*- Bakteroiden gefunden. Beide Enzyme wandeln GABA in SSA um. Dieses kann durch die SSDH, welche in *alaDH*- eine ca. fünfmal höhere Abundanz zeigt, zu Succinat umgewandelt und so dem rhizobiellen TCA-Zyklus zugeführt werden (Prell *et al.*, 2002; Jürgen Prell *et al.*, 2009; White *et al.*, 2009). Dieser Stoffwechselweg (Abbildung 43) könnte den Wegfall der Alaninproduktion durch die AlaDH kompensieren und deshalb den gleichbleibenden Alaningehalt in *alaDH*- Knöllchen erklären. Dies könnte es der AlaAT in Mitochondrien weiterhin ermöglichen, Glutamat für die Stickstoffassimilation bereitzustellen.

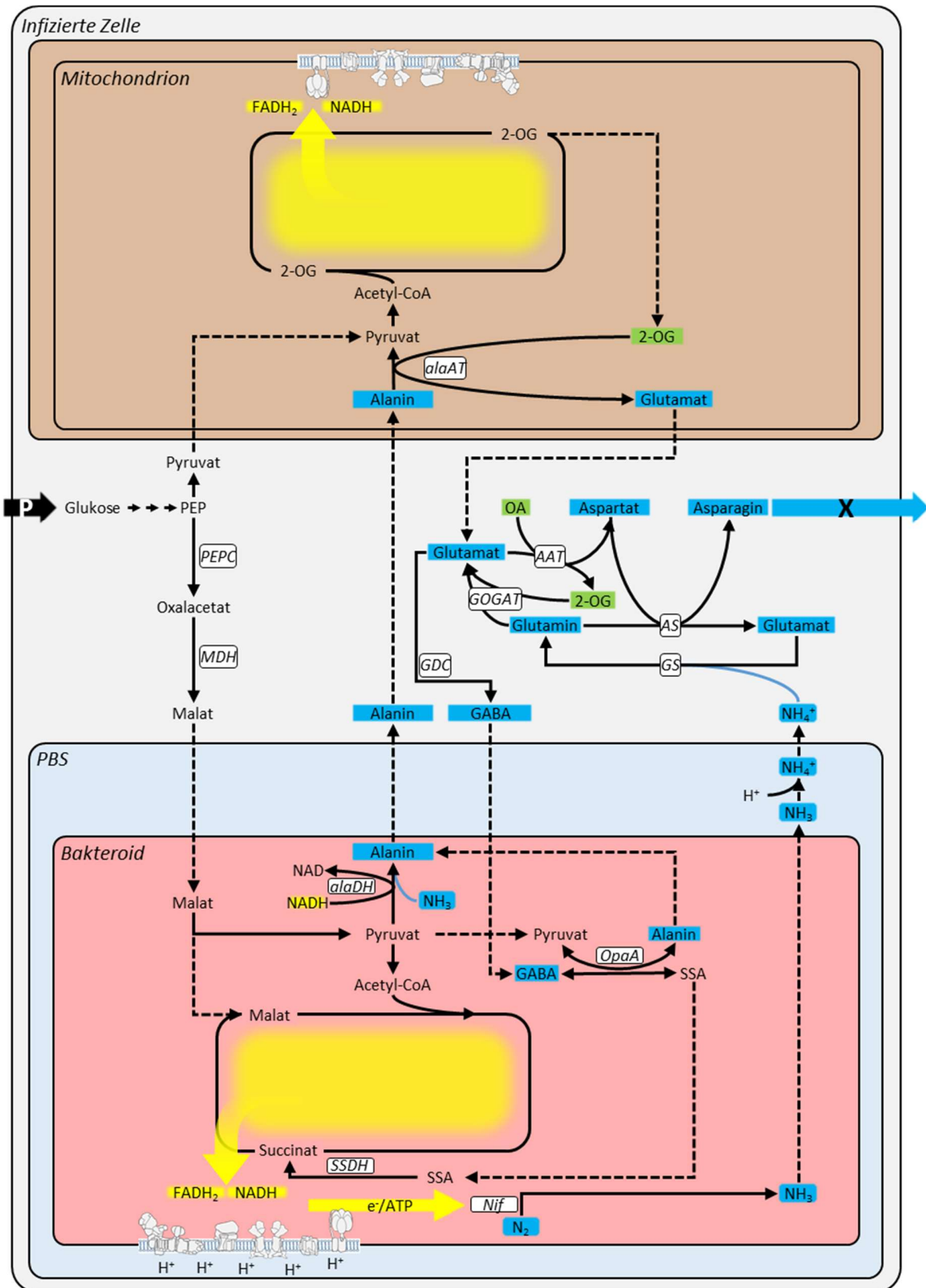


Abbildung 43: Die Transaminierung von GABA ist in alternativer Weg der Alaninproduktion im Bakteroiden.

Abbildung 6 wurde entsprechend der Proteomdaten dieser Arbeit verändert. Enzymatisch katalysierte Reaktionen sind durch durchgezogene Pfeile dargestellt. Gestrichelte Pfeile stellen Diffusion und aktive Transportprozesse dar. Die infizierte Zelle erhält Glukose, die als Saccharose im Phloem (P) transportiert wurde. Die TCA-Zyklen sind schematisch dargestellt und führen zur Erhöhung der Reduktionsäquivalente (in Gelb). Blau hinterlegt sind Intermediate des fixierten Stickstoffs. Die infizierte Zelle muss für die Ammoniumassimilation Oxalacetat und 2-OG (in Grün) bereitstellen. Endprodukt der Assimilation ist Asparagin, welches im Xylem (X) Richtung Spross transportiert wird. Alanin entsteht nicht nur durch die

Assimilation von NH_3 , sondern auch durch die Transaminierung von importiertem GABA, welches zu Succinat Semialdehyd wird (SSA). Die wichtigsten SNF-Enzyme sind weiß hinterlegt (PEPC: Phosphoenolpyruvat Carboxylase, MDH: Malat Dehydrogenase, *alaDH*: Alanin Dehydrogenase, Nif: Nitrogenase, GS: Glutamin Synthetase, AS: Asparagin Synthase, GOGAT: Glutamin Oxoglutarat Aminotransferase, GDC: Glutamat Decarboxylase, *AlaAT*: Alanin Aminotransferase, *OpaA*: Omega Aminosäure Pyruvat Aminotransferase, SSDH: Succinat Semialdehyd Dehydrogenase, AAT: Aspartat Aminotransferase).

7.1.5 Bakterioide werden mit GABA versorgt, welches der Versorgung des TCA-Zyklus dient

GABA ist in Pflanzen ein wichtiges Signalmolekül innerhalb des C/N Stoffwechsels (Bouché *et al.*, 2004) und ist ein intrazellulärer Regulator des pH-Wertes (Crawford *et al.*, 1994). Ein höherer GABA-Gehalt im Phloem führt zu einer Erhöhung der Stickstofffixierung und die Entfernung eines Teils der Knöllchen einer *Medicago truncatula* Pflanze hat wiederum eine Erhöhung des GABA-Gehalts sowohl im Phloem als auch in den restlichen Knöllchen zur Folge. Somit scheint die Pflanze durch GABA die Aktivität der Bakterioide zu regulieren (Sulieman *et al.*, 2010; Sulieman, 2011). Interessanterweise wird GABA nach der Inkubation von Knöllchen der Erbse in $^{15}\text{N}_2$ Gas schnell mit schwerem ^{15}N angereichert und ist nach Asparagin die zweit-abundanteste Aminosäure, was GABA zudem als Trägermolekül des fixierten Stickstoffs definiert (Scharff *et al.*, 2003; Jürgen Prell *et al.*, 2009). Die vorliegenden Aminosäurekonzentrationen in Knöllchen unterstützen diese Funde, da GABA wie die anderen Intermediate der Stickstoffassimilation, in Stickstoff fixierenden Knöllchen höher ist als in den anderen Linien (Abbildung 32).

GABA kann von Bakterien und Pflanzen gleichermaßen durch die Decarboxylierung von Glutamat produziert werden. Dieser Schritt findet in frei lebenden Rhizobien, nicht jedoch in Bakteroiden statt, welche GABA über einen branched-chain amino acid (Bra) Transporter importieren müssen (Hosie *et al.*, 2002; Jürgen Prell *et al.*, 2009). Wird GABA durch *GabT* oder *OpaA* transaminiert und gelangt durch die SSDH als Succinat in den TCA-Zyklus, wird der decarboxylierende Arm umgangen (Green *et al.*, 2000). Es ist also denkbar, dass die Pflanze über einen erhöhten GABA-Transport in den Symbionten dessen Aktivität erhöht, um eine schnellere Stickstofffixierung zu induzieren (Sulieman, 2011).

Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass in *alaDH*- Bakteroiden verstärkt GABA für die Alaninproduktion genutzt wird und es dadurch zu einer erhöhten Nutzung von Succinat für den TCA-Zyklus kommt (Abbildung 43). Die Funktion dieser Anpassungen wird im nachfolgenden Abschnitt erläutert.

7.1.6 *OpaA*/SSDH regulieren das NADH:NAD Verhältnis in *alaDH*- Bakteroiden

Die Umgehung des rechten Arms des TCA-Zyklus durch die verstärkte Nutzung von Succinat in *alaDH*-Bakteroiden kann aus folgenden Gründen von Vorteil sein: Die Enzyme des TCA-Zyklus sind in Bakteroiden im Vergleich zu frei lebenden Rhizobien höher abundant und aktiver, um Reduktionsäquivalente und so ATP für die Nitrogenasereaktion zu erzeugen (Mckay *et al.*, 1989;

Green *et al.*, 2019). Diese hohe NADH Konzentration wird durch die hypoxischen Bedingungen im Knöllchen erhöht, was zu einem NADH:NAD-Verhältnis von 0,83 führt. Dies wurde in unter anaeroben (=Knöllchen ähnlichen) Bedingungen isolierten Bakteroiden gemessen. Demgegenüber reduzieren aerobe Isolationsbedingungen dieses Verhältnis auf 0,19 (Salminen *et al.*, 1990).

Ein Charakteristikum der AlaDH-Reaktion ist der Verbrauch von NADH (siehe Abbildung 33). Somit kann sie das NADH:NAD-Verhältnis reduzieren. Da diese Funktion in der *alaDH*- Mutante fehlt, ist eine weitere Erhöhung dieser Balance denkbar. Dies wäre problematisch, da einige Enzyme des TCA-Zyklus von hohen NADH-Konzentrationen inhibiert werden. Vor allem der decarboxylierende Arm zeichnet sich durch seine NADH-Sensitivität aus: So weist z.B die 2-OG Dehydrogenase bei einem NADH:NAD-Verhältnis von 0,83 nur eine 50%ige Aktivität auf. Auch die Citratsynthase und ICDH werden durch NADH inhibiert (Salminen *et al.*, 1990; Karr *et al.*, 2000; Tabrett *et al.*, 2000). Dies erklärt die geringeren Abundanzen der ICDH und OGDH in *alaDH*- Bakteroiden (Abbildung 39; Abbildung 40).

Die Erhöhung des GABA-Imports, und der OpaA- und SSDH-Abundanz kann eine Reaktion des *alaDH*-Bakteroiden sein, den gehemmten decarboxylierenden Arm des TCA-Zyklus zu umgehen. Ein weiterer Vorteil dieses Mechanismus' ist, dass die Nutzung von GABA an die Reduktion von NADP anstelle von NAD gekoppelt ist (Crawford *et al.*, 1994; Green *et al.*, 2000). Dies vermeidet eine weitere Erhöhung des NADH:NAD-Verhältnisses und stellt die Versorgung der anderen TCA-Enzyme mit NAD sicher. Die Tatsache, dass auch die Fumarase und Malat Dehydrogenase weniger abundant vorliegen, kann des Weiteren ein Indiz für die geringere Nutzung von Malat für den TCA-Zyklus sein. Dagegen spricht jedoch die nicht höher abundante SDH, die keine Veränderung zeigt. Die Anpassungen des oxidativen Arms des TCA-Zyklus lassen sich durch die Proteomanalyse allein leider nicht endgültig erklären.

7.1.7 OpaA/SSDH erklären die unveränderte Alaninkonzentration im *alaDH*- Knöllchen

Neben ihrer Bedeutung für das Reduktionslevel des *alaDH*- Bakteroiden relativiert das beschriebene Modell in *alaDH*- Bakteroiden (Abbildung 39; Abbildung 40) die bisherigen Beobachtungen dieser Mutante. Die Charakterisierung der AlaDH als einziges Alanin produzierendes Enzym in Bakteroiden (Allaway *et al.*, 2000) basiert auf dem ausbleibenden Alaninexport isolierter *alaDH*- Bakterioide. Die vorliegenden Ergebnisse legen nun nahe, dass OpaA den Verlust der Alaninproduktion durch die AlaDH kompensieren kann. OpaA benötigt für die Alaninproduktion jedoch den Import von GABA. Ohne GABA-Zugabe im Medium können Experimente an isolierten *alaDH*- Bakteroiden deshalb keinen Alaninexport nachweisen. Ludwig *et al.* (2004) diskutierten auf der Basis von Allaway *et al.* (2000), dass der Wegfall des Alaninexports von *alaDH*- Bakteroiden keinen Einfluss auf den Wuchs der Pflanzen hat, da der verbleibende Ammoniumexport ausreichen würde. Diese Doktorarbeit zeigt, dass es gar nicht zu einem Abfall der exportierten Alaninmenge kommen muss, sondern nur zu einer Verlagerung der Alaninproduktion auf die OpaA kommen kann. Es ist möglich, dass die höher

abundante OpaA der *alaDH*- Mutante *in vivo* die gleiche Produktionsrate von Alanin erreicht und somit auch einen Export dieser Aminosäure aus diesen Bakteroiden gewährleistet. Pfau et al., 2018 postulierten auf Basis von Computermodellen, dass in *alaDH*- Bakteroiden Alanin durch die Transaminierung mit Glutamat (durch die GabT Reaktion) weiterhin produziert werden kann. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass die Alaninproduktion in *alaDH*- Bakteroiden wahrscheinlich durch das OpaA-Enzym an die Nutzung von GABA gekoppelt ist.

Die Tatsache, dass GabT, welches GABA mit 2-OG transaminiert und so Glutamat produziert, nicht detektiert wurde, spricht außerdem für eine gewisse Signifikanz der Alaninproduktion für den Bakteroidmetabolismus, die hier allerdings nicht definiert werden kann (Abbildung 39). Pflanzen, welche eine Symbiose mit *alaDH*- Rhizobien eingehen zeigen zwar keine stressbedingten Symptome, haben aber eine 20% geringere Trockenmasseproduktion (Allaway et al., 2000). Wird AlaDH im Bakteroid überexprimiert, sinkt sie um ca. 30%, was bedeuten kann, dass die erhöhte Assimilation des fixierten Stickstoffs die Menge des exportierten Stickstoffs verringert (Lodwig *et al.*, 2004). Die Autoren argumentierten, dass der Austausch von Aminosäuren wie Alanin, welcher für eine funktionale Symbiose essenziell ist, durch eine zu hohe Assimilationsrate des Bakteroids verringert werden würde. Die Versorgung des Symbionten mit Aminosäuren durch die Pflanze ermögliche es diesem, auf die eigene Assimilation zu verzichten und den fixierten Stickstoff der Pflanzenzelle zur Verfügung zu stellen. Der Export sei sogar nötig, um Aminosäuren von der infizierten Zelle zu erhalten (E. M. Lodwig *et al.*, 2003). Die artifizielle Verringerung oder Erhöhung der Ammoniumassimilation im Bakteroiden verändere das Gleichgewicht aus Ammonium/Aminosäure im Bakteroiden und in der Folge würden weniger Aminosäuren importiert (Lodwig *et al.*, 2004). Das hier vorgestellte Modell arbeitet nun den zugrunde liegenden Mechanismus heraus: OpaA ist das Enzym, welches den Import von GABA mit dem Verhältnis des exportierten Ammoniums/Alanins koppelt. Eine Veränderung des Alaninproduktionsverhältnisses zwischen AlaDH und OpaA führt zu einem Abfall der Symbioseleistung, auch wenn dies an dem hier beobachteten Modell *Vicia faba* nicht gezeigt werden kann.

7.1.8 *alaDH*- Mutation verringert die Stickstoffassimilationsrate

Alanin kann also offenbar unverändert in den Bakteroiden produziert und ins Cytosol exportiert werden, was den unveränderten Phänotyp der *alaDH*- Pflanzen erklärt. Es ist jedoch festzustellen, dass die Amidgruppe des so produzierten Alanins in der *alaDH*- Linie nicht das ultimativ zuvor fixierte Stickstoffatom aus der Nitrogenasereaktion beinhaltet. Die Transaminierung des Pyruvats mit dem importierten GABA bedeutet, dass der fixierte Stickstoff zuvor mindestens einmal ins Cytosol exportiert und hier assimiliert wurde. Somit kann Alanin in den *alaDH*- Knöllchen kein direktes Exportprodukt des fixierten Stickstoffs sein. Aufgrund des fehlenden Phänotyps der Pflanze müsste

man nun vermuten, dass Ammonium das primäre und für die Asparaginproduktion einzig maßgebende Exportprodukt des fixierten Stickstoffs ist.

Dieses Modell wird jedoch in den gezeigten Resultaten der $^{15}\text{N}_2$ Inkubation von Knöllchen konterkariert. Diese ergeben, dass die Mutation des AlaDH-Enzyms die Produktionsrate von Asparagin um 80% verlangsamt (Abbildung 41).

Bisherige $^{15}\text{N}_2$ Inkubationsstudien bezüglich der möglichen Alaninproduktion in Knöllchen haben unterschiedliche Ergebnisse erbracht, je nachdem, ob isolierte Bakterioide im offenen (Bergersen *et al.*, 1990) oder geschlossenen (Appels *et al.*, 1991; Waters *et al.*, 1998) System inkubiert wurden. Die AlaDH-Reaktion ist reversibel, wobei die Richtung stark von pH-Wert und Substrat- und Eduktkonzentrationen abhängt (Smith *et al.*, 1993). Die NH_4 -Konzentration in Bakteroiden wird auf 12 mM geschätzt, was über dem $K_{m\text{NH}_4^+}$ (5,1 mM) der AlaDH liegt (Streeter, 1989; Allaway *et al.*, 2000; Poole *et al.*, 2000). Wie bei allen reversiblen Enzymreaktionen bestimmt der Versuchsaufbau (hier die offene oder geschlossene Inkubationskammer) das Resultat bei Isotopexperimenten erheblich. Das sofortige Abführen des von der Nitrogenase produzierten NH_3 verhindert seine Nutzung für die AlaDH. Eine Akkumulation in einer geschlossenen Kammer hingegen ermöglicht die Produktion von Alanin (Poole *et al.*, 2000). Experimente mit isolierten Bakteroiden spiegeln demnach nicht die *in vivo* Bedingungen wider. Die Knöllchenstruktur ist darauf ausgelegt, ein genau definiertes Milieu in Bezug auf Gasaustausch und Substratkonzentrationen zu erreichen. *In vitro*-Experimente könnten deshalb speziell bei Untersuchung der AlaDH verfälschte Ergebnisse liefern (Allaway *et al.*, 2000; Poole *et al.*, 2000; E. Ludwig *et al.*, 2003).

Diese Nachteile werden in der vorliegenden Arbeit durch die Nutzung von Knöllchen, welche zwar von der Pflanze entfernt, aber nicht weiter aufgeschlossen wurden, umgangen. Dies garantiert die Unversehrtheit der intrazellulären Struktur, was an der fortlaufenden Nitrogenaseaktivität (Abbildung 31) zu erkennen ist. Isotopenmessungen an intakten Knöllchen sind rar und haben außerdem meistens determinierte Knöllchen als Gegenstand der Forschung. Die *alaDH*- Mutante wurde in diesem Zusammenhang bislang noch nicht untersucht.

Die Anreicherungsrate von Alanin in der *alaDH*- Mutante sinkt zwar um 80%, jedoch ist sie nicht 0 (Abbildung 41). Dies belegt, dass Alanin weiter mit dem fixierten Stickstoff angereichert wird, dies jedoch durch einen langsameren Mechanismus geschieht. Das oben aufgeführte Modell bietet eine Erklärung dafür: Exportiertes Ammonium muss zunächst im Cytosol auf 2-OG übertragen, zu GABA decarboxyliert und in die Bakteroiden importiert werden, ehe die Alaninproduktion durch OpaA erfolgen kann. Dies führt zu der beobachteten langsameren Verdünnung des (unmarkierten) Alaninspeichers durch das markierte Pendant, jedoch nicht zu einer niedrigeren Alaninkonzentration (Abbildung 32). Sollte die mitochondriale AlaAT Alanin für die Glutamatproduktion nutzen, hat sie

hierfür also auch in der *alaDH*- Zelle ausreichend viel Substrat zur Verfügung. Deshalb ist die Glutamatproduktion der AlaAT damit immer noch ausreichend. Interessanterweise wird Glutamat/Glutamin in *alaDH*- noch langsamer mit ^{15}N angereichert als Alanin (10% im Vergleich zu *Fix+*). Diese Beobachtung lässt sich ebenfalls mit dem veränderten Weg der Alaninproduktion erklären. Glutamat wird vermutlich mit derselben Rate produziert wie in *Fix+* Knöllchen. Jedoch bewirkt dessen verstärkte Nutzung als GABA-Substrat im Cytosol eine verlangsamte Anreicherung des Glutamat-Speichers mit ^{15}N . Um diese Hypothese zu testen, wäre die Detektion von markiertem ^{15}N -Gaba nötig, die aus technischen Gründen mit der gegenwärtigen Messmethode nicht durchgeführt werden kann.

Überraschend ist die um 80% verlangsamte Anreicherung von Asparagin in *alaDH*- Knöllchen. Diese Beobachtung zeigt, dass die Stickstoffassimilation durch die AlaDH einen Großteil der Produktionsrate von Asparagin ausmacht, was, in Anbetracht des fehlenden Phänotyps, höchst erstaunlich ist.

7.1.9 Pflanzen mit *alaDH*- Knöllchen profitieren nicht von Langtagbedingungen

Die dargestellten Hypothesen, die sich aus den Proteomdaten und Isotopmessungen ergeben, sind vor dem Hintergrund des unveränderten Phänotyps zu betrachten. *alaDH*- Knöllchen können die Pflanze unter den beobachteten Bedingungen ausreichend mit Asparagin versorgen. Die um 80% verminderte Asparaginproduktionsrate der Mutante kommt jedoch möglicherweise dann zum Tragen, wenn die Pflanze einen höheren Bedarf an Aminosäuren hat. Eine Situation, in der das zutrifft, sind Lichtbedingungen, die eine höhere Photosyntheserate erlauben. Aus diesem Grund wurden Pflanzen ausgesät, mit *Fix+* oder *alaDH*- Rhizobien infiziert und parallel in Kurz- (8 Stunden)- und Langtag (16 Stunden) Bedingungen wachsen gelassen (Abbildung 42). *Fix+* Pflanzen profitieren mit zunehmendem Alter von der längeren Lichtperiode. Diese induziert eine höhere Abundanz des Photosyntheseapparates. Gerade für die Expression von Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) ist die verfügbare Stickstoffmenge ein limitierender Faktor (Evans, 1988; Thornley, 1998). Die verminderte Rate der Asparaginproduktion in *alaDH*- Knöllchen reicht vermutlich nicht aus, um die Rubiscoexpression zu unterstützen und so von der längeren Lichtperiode pro Tag zu profitieren. Diese Hypothese muss in unabhängigen Experimenten überprüft werden.

7.2 Anpassungen des mitochondrialen Proteoms an die geänderte Kohlenstoff- und O₂-Versorgung in der SNF-Zelle

Die Mutation der AlaDH hat keine Änderung des Alaningehalts in Knöllchen zur Folge. Aus diesem Grund lassen sich keine direkten Aussagen darüber machen, ob die AlaAT das Enzym ist, welches rhizobiell produziertes Alanin zu Glutamat umwandelt. Allerdings legen die vorliegenden Proteomdaten nahe, dass Alanin, unabhängig von seinem Ursprung, die reduzierte Pyruvatversorgung (Vance *et al.*, 1992; Vance, 2008; Fischinger *et al.*, 2010; Ogden *et al.*, 2017) zumindest teilweise kompensieren könnte.

Darüber hinaus erfahren Mitochondrien aber mutmaßlich weitere Anpassungen ihres Metabolismus, die sich durch zwei Eigenheiten der SNF-Zelle bedingen:

1. Die Versorgung des Bakteroiden entkoppelt die Glykolyse potenziell vom mitochondrialen TCA-Zyklus und der OXPHOS in den Mitochondrien. Dies legt die Anpassungen des mitochondrialen TCA-Zyklus und damit assoziierter Enzyme nahe.
2. Die Struktur der Knöllchen und die Präsenz von sowohl stark respirierenden Bakteroiden als auch von O₂ bindenden Leghämoglobin bedingen eine O₂ Konzentration im nanomolaren Bereich (5-50 nM (Bergersen, 1996; Kuzma *et al.*, 1999)). Dieses erfordert Anpassungen des mitochondrialen Metabolismus.

Beide Hypothesen wurden durch die Analyse des mitochondrialen Proteoms überprüft. Hierfür wurden die Enzymabundanzen von Knöllchen mit den entsprechenden Wurzelkontrollen verglichen (*Fix+/Gedüngt*; *Fix-/Null*). Es wird klar, dass Mitochondrien in SNF-Zellen ein spezielles, auf den zellulären Kontext zugeschnittenes Anpassungsmuster aufweisen, welches untypisch im Vergleich zu hypoxischen Pflanzengewebe ist.

7.2.1 Typische Anpassungen des mitochondrialen Metabolismus auf hypoxische Situationen

Wenn die Sauerstoffkonzentration in Wurzelgewebe abnimmt (beispielsweise durch Überflutung), sind mehrere Effekte zu beobachten: Die im TCA-Zyklus produzierten Reduktionsequivalente können schlechter durch die Atmungskette reoxidiert werden wodurch der NADH-Pool zunehmend reduziert wird. Als Folge verlangsamt sich die ATP-Produktion durch die ATP Synthase. In Folge wird die Glykolyse mit abnehmender Sauerstoffkonzentration herunterreguliert, um die weitere Erhöhung des NADH:NAD Verhältnisses zu verhindern. (Geigenberger, 2003). Unterschreitet die Sauerstoffkonzentration jedoch eine untere Grenze kann ATP nur noch entlang des TCA-Zyklus und der Glykolyse produziert werden. Der oxidative TCA-Zyklus wird dabei größtenteils herunterreguliert, um das NADH:NAD Verhältnis nicht weiter zu erhöhen (Geigenberger, 2003). Einzig die Umwandlung von 2-OG zu Succinat findet statt, da hier ATP gewonnen wird. 2-OG stammt dabei aus dem Abbau von Glutamat. Das dabei reduzierte NADH kann direkt von der ebenfalls hochregulierten MDH reoxidiert werden, welche Oxalacetat zu Malat reduziert. Oxalacetat stammt dabei aus der

Deaminierung von Aspartat (Nunes-nesi *et al.*, 2010; Sweetlove *et al.*, 2010; Ruperti *et al.*, 2019). Als weiterer ATP-produzierender Weg wird die Glykolyse forciert. Dieses geschieht ebenfalls erst bei extrem niedrigen Sauerstoffkonzentrationen („Pasteur-Effekt“ (Summers *et al.*, 1996, 2000; Geigenberger *et al.*, 2000). Die glykolytische Aktivität bewirkt zusammen mit dem reduzierten Fluss durch den TCA-Zyklus und die Atmungskette eine Akkumulation von Pyruvat, was aus mehreren Gründen von der Zelle vermieden werden muss: (1) Pyruvat bewirkt die verstärkte Expression der AOX. Diese verbraucht den ohnehin kaum vorhandenen Sauerstoff weiter, trägt allerdings nicht zur ATP-Produktion bei (Gupta *et al.*, 2009; Zabalza *et al.*, 2009). (2) Die Akkumulation des Pyruvats und Erhöhung des NADH:NAD-Verhältnisses durch die Glykolyse bedingen die Expression und Aktivierung von Enzymen der Fermentation. Zwar reoxidieren diese NADH und ermöglichen so das Fortlaufen der Glykolyse, sie setzen dabei aber Pyruvat zu Laktat (oder Ethanol um (Sairam *et al.*, 2009). Dies bringt verschiedene Probleme mit sich: Laktat führt zu einer Herabsetzung des intrazellulären pH-Wertes, was toxisch wirken kann (Roberts *et al.*, 1984; Xia Jian Hua *et al.*, 1994). Hohe Ethanol Konzentrationen ermöglichen hingegen die Produktion von Acetaldehyde, welches das Zellwachstum stört (Perata *et al.*, 1991; 1992).

Die AlaAT (in der zur bisherigen Arbeit reversen, Pyruvat aminierenden Reaktion) bietet eine Alternative zur Umsetzung des Pyruvats und wird unter hypoxischen Bedingungen verstärkt synthetisiert und aktiviert, obwohl sie kein NADH oxidiert. Der Sinn der AlaAT ist vielmehr die Vermeidung von Ethanol und Laktat zugunsten einer Akkumulation von nichttoxischem Alanin während hypoxischer Phasen (Good *et al.*, 1989, 1992; Reggiani *et al.*, 2000; De Sousa *et al.*, 2003; Ricoult *et al.*, 2005; Miyashita *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2010). Darüber hinaus wird bei dieser Reaktion 2-OG produziert, welches im TCA-Zyklus zu Succinat umgesetzt wird, wobei ein zusätzliches ATP synthetisiert wird (Nunes-Nesi *et al.*, 2010). Ferner verhindert sie durch die Abführung des Pyruvats ein Stoppen der ATP-produzierenden Glykolyse durch das Produkt (Drew, 1997).

Insgesamt kann man die normalerweise zu beobachtenden Anpassungen auf hypoxische Bedingungen in Wurzelmitochondrien folgendermaßen zusammenfassen:

1. Die Fokussierung des TCA-Zyklus auf die ATP-Produktion entlang des decarboxylierenden Arms (Erhöhung OGDH/Succinyl-CoA Ligase) und erhöhte Expression der MDH zur Reoxidation des dabei entstehenden NADH.
2. Die Umwandlung von Aspartat und Glutamat zu Oxalacetat und 2-OG, welche als Substrate für die OGDH und MDH dienen.
3. die Produktion von Alanin und eine erhöhte Expression/Aktivität der mitochondrialen AlaAT.

7.2.2 Das mitochondriale Proteom in Knöllchenzellen zeigt nicht die typischen Anpassungen auf hypoxische Bedingungen

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten des mitochondrialen Proteoms in infizierten Knöllchenzellen zeichnen hingegen ein anderes Bild, da die meisten dieser Adaptionen in dem untersuchten Datensatz nicht vorhanden sind (Abbildung 23). So sind die meisten Enzyme des TCA-Zyklus sowohl in *Fix+* als auch in *Fix-* Mitochondrien unverändert abundant. Auch sind die Enzyme, welche 2-OG zu Succinat umwandeln und hierbei ATP produzieren, lediglich in *Fix-* häufiger vorhanden, während sie in *Fix+* im Vergleich zu *Gedüngt* sogar deutlich herabgesetzt sind. Es kann also nicht von einer Fokussierung des Zyklus auf die Produktion von ATP ausgegangen werden.

Die Nutzung von Aspartat und Glutamat als Substrate für den TCA-Zyklus ist aufgrund der stetigen Stickstoffversorgung durch die Bakteroiden möglich. Sie sind in *Fix+* Knöllchen höher abundant als in Wurzeln (Abbildung 32) und es ist denkbar, dass deren Menge sowohl für den Abtransport in Richtung Pflanze als auch für die Versorgung des mitochondrialen TCA-Zyklus ausreichend ist. Jedoch sind mit der mitochondrialen AspAT und der Glutamat Dehydrogenase die Enzyme weniger abundant (Abbildung 23), welche die Aspartat/Glutamat in den TCA-Zyklus einspeisen.

In Summe weisen die Mitochondrien aus Stickstoff fixierenden Zellen also eine große Diskrepanz zu Mitochondrien in klassischen hypoxischen Geweben auf, da:

1. der decarboxylierende Arm des TCA-Zyklus nicht erhöht ist und
2. die in den TCA-Zyklus Aspartat/Glutamat einspeisenden AspAT und GDH niedriger abundant sind.

Dies legt nahe, dass sie weniger von den nanomolaren O_2 Konzentrationen betroffen sind als eingangs vermutet. Ein Grund hierfür kann ihre Lokalisation in der Peripherie der infizierten Zelle sein, die bis zu 2 μM Sauerstoff enthalten kann (Bergersen, 1996). Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 44) von Knöllchen der Sojabohne und Respirationsanalysen unterstützen diese Theorie (Suganuma *et al.*, 1987; Millar *et al.*, 1995). Die Mitochondrien wären demnach daran beteiligt, das hypoxische Milieu in der Zelle zu fördern, indem sie einen Teil des einströmenden O_2 verbrauchen. Dieser in der Einführung erläuterte Mechanismus ist nun durch Proteomanalysen bestätigt.

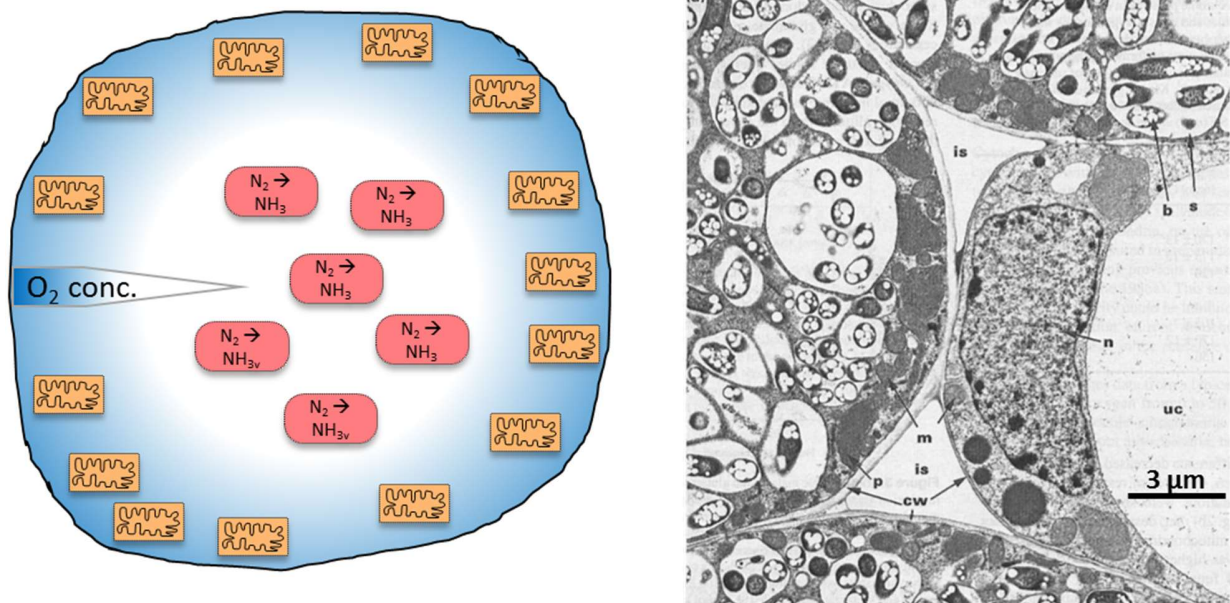


Abbildung 44: Mitochondrien sind in der Sauerstoff reicheren Peripherie der infizierten Knöllchenzelle lokalisiert.

Links eine schematische Darstellung der infizierten Zelle. Zur besseren Übersicht sind nur Bakterioide (rot) und Mitochondrien (braun) abgebildet. Der blaue Farbgradient gibt die Sauerstoffkonzentration qualitativ wieder. Rechts ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Knöllchens der Sojabohne zu sehen, die mit *Bradyrhizobium japonicum* infiziert wurde. Zu sehen sind Mitochondrien (m), Plastiden (p), Zellwände (cw), der Nukleus (n) einer uninfizierten Zelle (uc), Symbiosomen (s), welche, im Gegensatz zu Bohnenknöllchen mehrere Bakterioide (b) beinhalten können und der interzelluläre Raum (is; (Millar *et al.*, 1995)).

Ein weiterer Grund für das Ausbleiben der fermentativen Prozesse der infizierten Zelle liegt wahrscheinlich in der Präsenz der Bakterioide selbst und deren Versorgung durch die infizierte Zelle. Die Glykolyse wird, ähnlich wie in hypoxischen Geweben, in Knöllchenzellen verstärkt durchgeführt, wodurch ATP generiert werden kann. Anders als beispielsweise in überschwemmten Wurzeln kommt es aber nicht zu einer Pyruvatakkumulation, da PEP carboxyliert und als C₄ Körper (Oxalacetat und Malat) zu den Bakteroiden transportiert wird (Vance *et al.*, 1991; Vance, 2008; Thal *et al.*, 2018). Dies kann Grund für das Ausbleiben der fermentativen Prozesse trotz geringer Sauerstoffkonzentrationen sein (Ogden *et al.*, 2017; Thal *et al.*, 2018).

7.2.3 Der TCA-Zyklus nutzt alternative Substrate und stellt 2-OG zur Verfügung

Wie kann man das Profil des mitochondrialen TCA-Zyklus interpretieren, wenn nicht als angepasst auf hypoxische und fermentative Bedingungen? Auch hierfür bietet die Präsenz der Bakterioide teilweise eine Antwort. Wie eben dargelegt, werden Mitochondrien in Knöllchen weniger mit Pyruvat als mit Malat und Oxalacetat versorgt. Dies erklärt die in Knöllchen weniger abundanten Enzyme, die Pyruvat in Form von Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus einschleusen (Abbildung 23: Pyruvat Dehydrogenase und Citrat Synthase). Die Tatsache, dass dies auch in *Fix*- Mitochondrien passiert, zeigt die Anpassung des mitochondrialen Stoffwechsels unabhängig von der tatsächlichen Aktivität der Stickstofffixierung.

Die infizierte Zelle muss Oxalacetat und 2-OG für die Assimilation des fixierten Stickstoffs zur Verfügung stellen. Oxalacetat wird, wie oben bereits dargelegt, fortlaufend aus PEP produziert oder kann direkt durch die in Wurzelknöllchen höher abundante cytosolische Aspartat Synthase katalysiert werden (Thal *et al.*, 2018). 2-OG muss jedoch aus dem mitochondrialen TCA-Zyklus abgeführt werden, was durch den geringeren Einstrom von Pyruvat und die weniger abundante Citratsynthase möglicherweise eingeschränkt ist. Dieser Engpass kann aber durch die bereits diskutierte AlaAT und die in Knöllchen höher abundante Hydroxygutarat Dehydrogenase aufgefangen werden (Abbildung 23). Dieses Enzym oxidiert Hydroxyglutarat aus dem Abbau von Lysin und aromatischen Aminosäuren und kann so den TCA-Zyklus mit 2-OG und die Atmungskette mit Elektronen speisen (Araújo *et al.*, 2011). Durch die höhere Lysin- und generell höhere die Aminosäurekonzentration (Abbildung 32) ist diese Form der Substratversorgung der SNF-Mitochondrien theoretisch denkbar. Das produzierte 2-OG steht wahrscheinlich der Stickstoffassimilation zur Verfügung, da die 2-OG Dehydrogenase in *Fix+* Mitochondrien, gerade in der Fixierungszone der Knöllchen, herabgesetzt ist (Abbildung 23; (Ogden *et al.*, 2017)). Die beobachteten Enzymabundanzen des decarboxylierenden Arms des TCA-Zyklus kann man also als zugeschnitten auf die verringerte Versorgung mit Pyruvat und die Verfügbarmachung des aus Aminosäuren hergestellten 2-OG für die Stickstoffassimilation bezeichnen. Somit zeigt sich, dass SNF-Mitochondrien ihren zentralen Metabolismus auf die Stickstoffassimilation der infizierten Zelle ausrichten. Die dargelegten Ergebnisse lassen sogar die Hypothese einer direkten Beteiligung der Mitochondrien an der Stickstoffassimilation in SNF-Zellen zu, welche in Anbetracht der in *Vicia faba* nur unzureichend nicht detektierten GOGAT essenziell sein könnte (Thal *et al.*, 2018).

Theoretisch kann die Stickstoffassimilation an dieser Stelle durch die Glutamat Dehydrogenase (GDH) erfolgen, welche jedoch in beiden Knöllchenlinien im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle unverändert ist (Abbildung 23) und deren Funktion auch eher der Deaminierung von Glutamat zugeschrieben wird (Ricoult *et al.*, 2008). In Knöllchen ist eine verstärkte GDH-Abundanz zudem erst dann zu beobachten, wenn die GS chemisch inhibiert wird. Die Aminierung von 2-OG erfolgt dann, um die toxischen Auswirkungen einer erhöhten Ammoniumassimilation zu vermeiden (Carvalho *et al.*, 2003; Barsch *et al.*, 2006). Dies macht eine Beteiligung der GDH an der Stickstoffassimilation in regulären Bedingungen unwahrscheinlich.

7.2.4 Die mitochondriale AlaAT versorgt sowohl Pyruvat als auch Glutamatbedarf

Die erhöhte Abundanz und Kapazität der AlaAT in Mitochondrien Stickstoff fixierender Knöllchenzellen ist die einzig „typische Anpassung“ an hypoxische Bedingungen (Abbildung 23).

Wie bereits dargelegt, ist aber nicht davon auszugehen, dass *Fix+* Mitochondrien von akutem Sauerstoffmangel betroffen sind und es ist denkbar, dass die AlaAT in Alanin deaminierender Richtung arbeitet. Ihre Beteiligung an der Glutamatproduktion wird durch eine erhöhte Abundanz in

Vicia faba Knöllchen unterstützt (Thal et al., 2018). Darüber hinaus ist ihre Reaktionskapazität *Fix+* in Alanin deaminierender Richtung höher als in *Fix-* und beiden Wurzellinien. (Abbildung 33).

Charakterisiert ist die Alanindeaminierung der AlaAT während der Reoxygenierung von Sojabohnenwurzeln. Hier führt sie akkumuliertes Alanin wieder in den Kohlenstoffmetabolismus zurück (De Sousa et al., 2003). Die AlaAT-Transkriptabundanz verringert sich bei Normalisierung der O₂-Konzentration zwar, die Enzymaktivität bleibt jedoch erhöht sodass das akkumulierte Alanin schnell wieder abgebaut wird (De Sousa et al., 2003; Rocha et al., 2010). Die Rolle der AlaAT im Abbau von Alanin wird gestützt durch den Befund, dass akkumuliertes Alanin in *alaAT-* Pflanzen während der Reoxidierung nur langsam wieder abgebaut wird (Miyashita et al., 2007).

Die besondere Rolle der AlaAT in Knöllchen wird insbesondere während hypoxischer Phasen in Knöllchen ersichtlich (Abbildung 45): Während Wurzeln sowohl an nodulierten als auch nicht nodulierten Sojabohnen während hypoxischer Phasen eine Erhöhung der Alaninkonzentration und AlaAT-Aktivität zeigen, die bei Reoxydierung wieder abfällt, sind diese Parameter in Knöllchen während aller Phasen des Experiments gleich. Dies legt eine alternative Funktion unabhängig von der Antwort auf Sauerstoffknappheit im Knöllchenmetabolismus nahe (Rocha et al., 2010). Außerdem zeigt es, dass die Alaninakkumulation in Stickstoff fixierenden Knöllchen nicht durch die hypoxischen Bedingungen im Knöllchen begründet ist, sondern wahrscheinlich durch die Alaninproduktion der Symbionten.

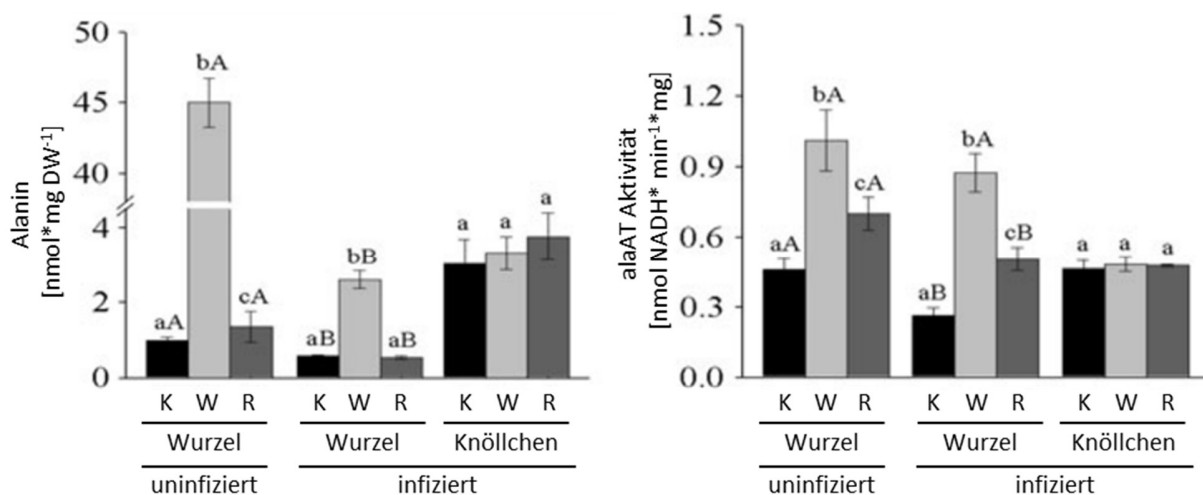


Abbildung 45: Alaninkonzentration und AlaAT-Aktivität in Wurzeln und Knöllchen an Sojapflanzen vor Überschwemmung (K), während 3-tägiger Überschwemmung (W) und drei Tage nach der Überschwemmung (R) (verändert aus Rocha et al., 2010).

Kleine Buchstaben über den Fehlerbalken symbolisieren die Signifikanzniveaus innerhalb eines Gewebetyps (Wurzel, Wurzel von infizierter Pflanze, Knöllchen). Großbuchstaben über den Fehlerbalken geben die Signifikanzniveaus zwischen den zwei Wurzeltypen innerhalb der gleichen Behandlung (C, W, R) an.

Es sprechen also mehrere Gründe dafür, dass die AlaAT in Knöllchen primär dazu dient, Alanin und 2-OG zu Pyruvat und Glutamat zu transaminieren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die

sie, zumindest in Teilen, die Glutamatproduktion und so die Assimilation des vom Bakteroids exportierten Ammoniums unterstützt.

7.2.5 Der oxidative Teil des TCA-Zyklus zeigt ungewöhnliche Enzymabundanzen

Durch diese Funktion wird 2-OG permanent aus dem mitochondrialen TCA-Zyklus entzogen. Es erscheint daher sinnvoll, dass die ODGH und die Succinyl-CoA Ligase in Stickstoff fixierenden Zellen weniger abundant sind (Abbildung 23, (Ogden *et al.*, 2017)), was auch auf eine verringerte SDH-Produktion schließen lässt. Deshalb überrascht es, dass die SDH höher abundant vorliegt (Abbildung 23) und in Sojabohnen Knöllchen aktiver ist als in Wurzeln (Bryce *et al.*, 1990).

Doch welchen Sinn kann die Induktion in Abundanz und Aktivität der SDH haben, wenn der vorherige Teil des TCA-Zyklus herabgesetzt ist? Wie bereits dargelegt, sind Oxalacetat und Malat wahrscheinlich die Substrate, die in den TCA-Zyklus von Knöllchenmitochondrien eingeschleust werden. Deren Nutzung für die Citrat Synthese ist durch die niedrige Abundanz der Citrat Synthase (Abbildung 23) vermutlich gehemmt, sodass eine Reaktionskaskade aus MDH, Fumarase und SDH entgegen der klassischen Richtung denkbar ist. Der resultierende, nicht-zyklische Ablauf des TCA-Zyklus konnte bereits in Blattmitochondrien gezeigt werden (Tcherkez *et al.*, 2009). Es wurde postuliert, dass im Licht zellulär produziertes CO₂ durch die PEPC gebunden wird und das daraus produzierte Oxalacetat in Mitochondrien geschleust wird. Die revers wirkenden TCA-Enzyme würden daraus dann Fumarat produzieren und so Reduktionsäquivalente reoxidieren (Tcherkez *et al.*, 2009). Unterstützt würde diese Reaktionsrichtung durch die geringere Aktivität der PDC am Tag, was zu einem geringeren Einstrom von Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus führt. Aus diesen beiden Befunden kann geschlossen werden, dass in Blattmitochondrien der TCA-Zyklus während des Tages aus zwei Teilen besteht. Der eine Teil produziert Vorstufen für die Stickstofffixierung, während der andere Teil entgegengesetzt zur ursprünglichen Richtung die Refixierung von CO₂ ermöglicht (Sweetlove *et al.*, 2010). In Abwesenheit photosynthetischer Aktivität können diese Befunde aus Blättern nur schlecht auf die Situation in Knöllchen übertragen werden. Dennoch ist es interessant, dass die zu Grunde liegenden Annahmen über die zelluläre Situation (herabgesetzte Citrat Synthase und die Versorgung mit C₄ Körpern aus der hochregulierten PEPC-Reaktion) zumindest qualitativ ähnlich sind. Entsprechend ist es denkbar, dass in Knöllchenmitochondrien das einströmende Malat/Oxalacetat zum Teil zu Fumarat reduziert wird.

Ob dieses durch die SDH reduziert werden kann, wie es bereits für isolierte Knöllchen postuliert wurde (Rawsthorne *et al.*, 1986a), ist nicht gesichert. Es scheint jedoch klar zu sein, dass ein hoch reduzierter Ubiquinonpool die Elektronen auf die SDH übertragen kann, welche dann reaktive Sauerstoffspezies produziert (Quinlan *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013, 2019). Besser charakterisiert ist die Fumaratreduktion in tierischen und prokaryotischen Systemen, wo sie jedoch durch die Fumarat Dehydrogenase (FDR) vollzogen wird. Die FDR ist mit der Atmungskette assoziiert und

akkumuliert unter hypoxischen Bedingungen Succinat. FDR und SDH sind strukturell ähnliche Isoenzyme, FDR kann ferner eine mutierte, funktionslose SDH in Bakterien kompensieren (Livingstone, 1983; Imlay, 1995). Unterstützend für die revers laufende SDH Reaktion in Knöllchen sind Vergleiche der Respiration zwischen Wurzeln und Knöllchen. Die Nutzung von Succinat als Respirationssubstrat bewirkt in Mitochondrien aus Kotyledonen (Bryce *et al.*, 1990) und Hypokotylen (Rawsthorne *et al.*, 1986b) höhere Atmungsraten als aus Knöllchen. Grund hierfür kann die in Knöllchen un favorisierete Oxidation von Succinat durch die SDH sein. Es ist also denkbar, dass Mitochondrien in infizierten Zellen Malat, bzw. Oxalacetat importieren und dieses zunächst zu Fumarat und eventuell zu Succinat umwandeln.

Basierend auf Aktivitätsexperimenten ist neben der SDH lediglich die MDH in Knöllchenmitochondrien aktiver, während alle anderen Enzyme geringere Aktivitäten aufweisen. Es wurde ursprünglich postuliert, dass Malat in die Mitochondrien importiert und durch die MDH oxidiert würde, um als Oxalacetat zurück in das Cytosol transportiert zu werden (Bryce *et al.*, 1990). Diese Theorie ist allerdings fraglich, da bereits die cytosolische Isoform der MDH diese Reaktion durchführen kann und diese ebenfalls hoch abundant ist (Kouchi *et al.*, 1988; Thal *et al.*, 2018). In der hier erfolgten Analyse der *Vicia faba* Knöllchen konnte außerdem keine erhöhte Abundanz der mitochondrialen MDH detektiert werden (Abbildung 23), was jedoch eine erhöhte Aktivität des Enzyms nicht zwingend ausschließt.

Ein weiterer interessanter Befund ist die höhere Abundanz des mitochondrialen Serin/Glycin Metabolismus (Glycin Dehydrogenase und Serin Hydroxymethyl Transferase) sowohl in *Fix+* als auch in *Fix-* Knöllchen. Dieser Weg ist ein essenzieller Bestandteil der Photorespiration photosynthetischer Gewebe und daher ist es unwahrscheinlich, dass das so produzierte Serin, wie in photosynthetisch aktiven Geweben, in Wurzelknöllchen zur Regeneration von Glycerat dient (Peterhänsel *et al.*, 2010). In Sojabohnenknöllchen wurden diese Enzyme ebenfalls stark erhöht vorgefunden. Hier erscheint dies logisch, da die Sojapflanze determinierte Knöllchen ausbildet, deren Transportform des fixierten Stickstoffs Purine sind und Serin ein wichtiges Substrat der Purinsynthese ist (Hoa *et al.*, 2004). Die Knöllchen der Ackerbohne produzieren jedoch Asparagin als Endprodukt der Stickstoffassimilation und Serin ist hier kein Intermediat (Scott *et al.*, 1976). Somit bleibt die Funktion dieses hochregulierten Teils des Mitochondrienmetabolismus in diesen Knöllchen unbekannt.

Die vorliegenden Daten legen nahe, dass der TCA-Zyklus in zweiteiliger Form abläuft. 2-OG wird für die Glutamatproduktion bereitgestellt und importierte C_4 Körper werden für die NAD-Reduktion oxidiert, wobei sie durch die revers laufenden Enzyme des oxidativen Arms möglicherweise auch reduziert werden. Es ist wahrscheinlich, dass die Reaktionsrichtung stark von den Substratkonzentrationen und Reduktionslevels des Mitochondriums abhängt und je nach Bedarf

Reduktionsäquivalente für die OXPHOS generiert werden. Respirationsanalysen zeigten bereits früh, dass Mitochondrien in Knöllchen eine intakte Atmungskette aufweisen (Muecke, 1969). Wie betten sich die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse über die Atmungskette in die bisher erfolgten Analysen ein?

7.2.6 SNF-Mitochondrien respirieren und zeigen weniger alternative OXPHOS-Enzyme

Zunächst bleibt festzuhalten, dass vor allem die Untereinheiten der OXPHOS gemessen wurden, welche in der Matrix oder dem Intermembranraum lokalisiert sind, wohingegen membranständige Untereinheiten meist nicht detektiert werden konnten (Abbildung 22-23). Grund hierfür ist die hohe Hydrophobizität dieser Enzyme und der damit verbundene geringe Gehalt an den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Der angewandte Verdau mit Trypsin, welches spezifisch nach diesen Aminosäuren schneidet, belässt membranständige Peptide deshalb weitestgehend ungeschnitten (Olsen *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2019b), welche in der Folge zu groß für die Detektion im Massenspektrometer sind. Vor diesem Hintergrund ist die Abdeckung des vorliegenden Datensatzes an Proteinen in Matrix/Intermembranraum für einen Vergleich zwischen den Linien aber ausreichend (Abbildung 22-23).

Die Mitochondrien in *Fix+/Fix-* Mitochondrien haben höhere Abundanzen der Enzyme und Enzymkomplexe, welche den Elektronentransport an die Protonentranslokation und so an die ATP-Produktion koppeln. Die höhere Abundanz des Komplex I kann ferner eine Reaktion auf ein höheres NADH:NAD-Verhältnis aufgrund einer herabgesetzten Sauerstoffkonzentration sein (Komatsu *et al.*, 2011). Die oben diskutierte Funktion der höher abundanten SDH, welche Elektronen des reduzierten Ubiquinonpools aufnimmt, unterstützt diese Theorie.

Eine eindeutige Anpassung der Atmungskette in Knöllchenmitochondrien, unabhängig von der SNF-Aktivität, ist die reduzierte AOX-Abundanz, die sich auch in der reduzierten enzymatischen Kapazität dieses Enzyms widerspiegelt (Abbildung 25). Dies bestätigt, dass die Zyanid resistente Atmungskapazität in Knöllchenmitochondrien höher ist als in Wurzeln (Muecke, 1969; Rawsthorne *et al.*, 1986b; Ignatov *et al.*, 2000). Man könnte vermuten, dass diese beiden Entwicklungen einer höheren Kopplung des Elektronentransports an die Protonentranslokation dienen, um in einer hypoxischen Umgebung eine bessere Nutzung des vorhandenen Sauerstoffs für die ATP-Produktion zu bewirken. Wahrscheinlich hat die geringe Abundanz und Kapazität der AOX jedoch andere Gründe: Die AOX hat eine wesentlich geringere Affinität zu Sauerstoff ($K_m = 2,5 \mu\text{M}$) als die in Knöllchen exprimierte COX ($K_m = 50 \text{ nM}$) (Millar *et al.*, 1995, 1997). Somit operiert die mitochondriale Atmungskette, selbst wenn sie in der Peripherie der Knöllchenzellen lokalisiert ist, unter Bedingungen (Kuzma *et al.*, 1993, 1999; Bergersen, 1994), die limitierend für die AOX sind und folglich den Cytochrom c-Weg favorisieren. Ein weiterer Grund für die geringe AOX-Abundanz und Aktivität liegt in ihrer proportionalen Regulation durch die Pyruvatkonzentration. (Millar *et al.*, 1997). Da die

Mitochondrien in infizierten Zellen, wie bereits dargelegt, vermutlich nicht Pyruvat als primäre Kohlenstoffquelle erhalten, fehlt dieser positive Regulator der AOX-Expression (Vance *et al.*, 1991; Millar *et al.*, 1997).

7.2.7 Die ambivalenten Änderungen von Knöllchenmitochondrien sind zugeschnitten auf die Bedingungen in der SNF-Zelle

Zusammenfassend zeigt die OXPHOS der Mitochondrien in Stickstoff fixierenden Knöllchenzellen ein auf den ersten Blick ungewöhnliches Anpassungsmuster an die zellulären Bedingungen. Obwohl sie mutmaßlich in der Peripherie und daher in den sauerstoffreicheren Regionen der Zelle lokalisiert sind, muss man doch davon ausgehen, dass sie sich in hypoxischem Umfeld befinden. Die höhere Abundanz vieler Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen legt nahe, dass es tendenziell zu einer Akkumulation von Reduktionsäquivalenten kommt. Eine eindeutige Anpassung ist jedoch die viel niedrigere Abundanz von Enzymen, welche den Elektronentransport und Sauerstoffverbrauch nicht mit der Translokation koppeln und so nicht mit der ATP-Produktion verbinden. Dies ist aber wahrscheinlich kein Mechanismus für eine effizientere Sauerstoffnutzung, sondern eine Reaktion an die geringere Versorgung mit Pyruvat im Knöllchen. Mitochondrien aus SNF Zellen sind in unverändert in der Lage, Substrate für die ATP-Produktion zu oxidieren und die Zelle zu versorgen.

Das Profil des TCA-Zyklus untermauert die These des nicht akuten Sauerstoffmangels in SNF-Mitochondrien. Er ist nicht auf die ATP-Produktion fokussiert, sondern auf die Assimilation des fixierten Stickstoffs und indirekt auf die Versorgung des Bakteroiden durch die infizierte Zelle. Die grundlegende Verlagerung des zellulären Kohlenstoffstroms auf die Produktion von C₄ Körpern bietet eine Erklärung für das geänderte Profil des TCA-Zyklus. Malat bzw. Oxalacetat und nicht Pyruvat sind die Hauptsubstrate des mitochondrialen TCA-Zyklus, sie werden entweder oxidiert, um die ATP-Produktion sicherzustellen oder – alternativ – zu Succinat reduziert, um Elektronen aus dem überreduzierten Ubiquinonpool der Atmungskette abzuführen. Die Bereitstellung von 2-OG für die Ammoniumassimilation erfolgt vermutlich aus Aminosäuren durch die Hydroxyglutarat Dehydrogenase, welche im selben Zuge Elektronen auf die Atmungskette übertragen kann. Die Bilanz der aus der Atmungskette abgeführten/zugeführten Elektronen ist wahrscheinlich stark abhängig von den lokalen Sauerstoffbedingungen des einzelnen Mitochondriums.

Die höhere Abundanz der AlaAT ist die einzige beobachtete „typische“ Reaktion auf niedrige Sauerstoffbedingungen, sie hat allerdings eine andere Funktion: Aufgrund der niedrigen Pyruvatakkumulationsmenge und des hohen Bedarfs an Glutamat für die Ammoniumassimilation (bei nicht höher abundanter GOGAT (Thal *et al.*, 2018)) ist es wahrscheinlich, dass sie Alanin nicht produziert, sondern das mitochondriale 2-OG, welches im TCA-Zyklus wegen der herabgesetzten OGDH zur Verfügung steht, unter Alaninverbrauch transaminiert. Um diesen Fluss aufrecht zu erhalten benötigen die Mitochondrien eine fortwährende Versorgung mit Alanin, welches

möglicherweise im Bakteroiden produziert wird. Dabei scheint es für die AlaAT irrelevant, ob dieses Alanin aus der Assimilation von Stickstoff im Bakteroiden oder dem in dieser Arbeit charakterisierten, alternativen OpaA-vermittelten Weg stammt.

7.3 Fazit

Wurzelknöllchen zeichnen sich durch eine niedrige interne O_2 -Konzentration aus, die die Funktionalität der Nitrogenase sicherstellt, sich jedoch gleichzeitig negativ auf die Funktion der Mitochondrien auswirken kann. Die typischen mitochondrialen Anpassungen an hypoxische Bedingungen bleiben allerdings aus, da der TCA-Zyklus nicht auf die Produktion von ATP optimiert wird. Es konnte hier gezeigt werden, dass das OXPHOS-System in isolierten Mitochondrien arbeitet und die infizierte Zelle wahrscheinlich mit ATP versorgen kann. Diese Beobachtungen unterstützen die Theorie, dass es innerhalb der infizierten Zelle lokale O_2 -„Inseln“ (z.B. in der Zellperipherie) geben kann, an denen die Funktion der Mitochondrien gewährleistet wird.

Mitochondrien aus aktiven Wurzelknöllchen passen sich aber dennoch an die physiologischen und metabolischen Gegebenheiten innerhalb dieses Gewebes an. Infizierte Knöllchenzellen fokussieren den Fluss durch den glykolytischen Stoffwechselweg auf die Produktion von C_4 Körpern, der sowohl Bakterioide und Mitochondrien speist. Der zentrale mitochondriale Metabolismus passt sich dementsprechend an die verminderte Pyruvatverfügbarkeit an und verwendet wahrscheinlich verstärkt Malat als Substrat für die ATP-Produktion. Der TCA-Zyklus ist auch auf die Bereitstellung von 2-OG ausgerichtet, welches die infizierte Zelle für die Assimilation von NH_4^+ aus den Bakteroiden benötigt. Hieran scheinen Wurzelknöllchenmitochondrien aktiv beteiligt zu sein, da sie 2-OG durch die Transaminierung von Alanin zunächst zu Glutamat umformen, um in weiteren Schritten Asparagin zu produzieren. Zumindest in *Vicia faba* Knöllchen würde dies einen Substratstrom vom Bakteroiden zum Mitochondrium darstellen, der in dieser Form bisher noch nicht beschrieben wurde.

Die Rolle von Alanin geriet dadurch in den Fokus dieser Arbeit. Alanin wurde bereits früher als möglicher Träger des in Bakteroiden fixierten Stickstoffs diskutiert. Die vorliegende Arbeit definiert diese Rolle genauer. Es konnte bestätigt werden, dass NH_4^+ bereits im Bakteroiden assimiliert werden kann und das so produzierte Alanin das gleiche Konzentrationsprofil zwischen den Linien aufweist wie die anderen Intermediate der Stickstoffassimilation. Die Charakterisierung einer rhizobiellen *alaDH*- Mutante, welche NH_4^+ nicht direkt in Alanin assimilieren kann, zeigt dabei auf, dass dieser Schritt für den Aminosäuregehalt in Knöllchen und die Versorgung der Pflanze nicht essenziell ist. Die Analyse des Proteoms von *alaDH*- Bakteroiden legt jedoch einen alternativen Mechanismus in Bakteroiden nahe, der die Alaninproduktion durch die AlaDH kompensiert, hierfür jedoch GABA von der infizierten Zelle beziehen muss. Dies verlangsamt die Asparaginproduktion des Knöllchens und macht deutlich, dass die Alaninproduktion durch die NH_4^+ -Assimilation im Bakteroiden ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt für die Versorgung der Pflanze mit Aminosäuren ist.

Dem Alaninstoffwechsel und den Mitochondrien kommt somit eine zentrale Bedeutung in der Asparaginproduktion im Knöllchen zu.

8 Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse über den Alaninmetabolismus in SNF-Zellen ermöglichen neue Einblicke in die Assimilation des fixierten Stickstoffs und die mitochondriale Beteiligung daran. Allerdings bedürfen diese weiterer experimenteller Untersuchungen. Zunächst ist es essenziell, die durchgeführten $^{15}\text{N}_2$ -Markierungsexperimente zu wiederholen, um die bisher getätigten Beobachtungen zu verifizieren. In diesem Zuge ist die Aufnahme von GABA in die Gruppe der gaschromatographisch detektierbaren Aminosäuren wichtig, um die verstärkte Alaninproduktion durch die Transaminierung mit GABA in *alaDH*-Knöllchen zu testen. Das hier formulierte Modell legt GABA nach Asparagin als frühzeitig markierte Aminosäure nahe.

Um die erläuterten Auswirkungen der AlaDH-Mutation in Bezug auf das Reduktionslevel der Bakterioide zu überprüfen, könnte man zudem das NADH:NAD-Verhältnis gemäß Salminen *et al.* (1990) in den verschiedenen Bakteroidlinien messen. Wie abschließend in dieser Arbeit gezeigt, könnte die verminderte Produktionsrate von Alanin und somit Asparagin erst in Situationen höheren Stickstoffbedarfs zum Tragen kommen. Die Untersuchung mit verschiedenen Lichtbedingungen ergab in der Tat einen nachteiligen Effekt in der *alaDH*-Linie, welcher durch weitere Experimente quantifiziert werden sollte. Es ist denkbar, dass während der Reproduktionsphase ein höherer Bedarf an Aminosäuren auf Seiten der Pflanze besteht (Zhang *et al.*, 2015) und die *alaDH*-Linie einen Phänotyp, beispielsweise hinsichtlich der Samenreifung und -füllung, zeigt.

Andere Folgeexperimente befassen sich direkt mit der Hypothese der Alaninnutzung in SNF-Mitochondrien und deren Bedeutung für die Pflanze. Direkte Einblicke könnten durch die Generierung einer Mutante des mitochondrialen *alaAT*-Gens erlangt werden. Wenn die Transaminierung von Alanin zu Glutamat in Mitochondrien wichtig für die Stickstofffixierung ist, sollten die entsprechenden Pflanzen nur eingeschränkt den rhizobiell fixierten Stickstoff nutzen können und müssten einen Wuchsnachteil aufweisen. Um den Ursprung des in Mitochondrien deaminierten Alanins weiter zu untersuchen, könnte man daran anknüpfend eine rhizobielle Doppelmutante für die *AlaDH*- und *OpaA*-Gene herstellen, um beide (bis hierher) bekannten Alaninproduzenten im Bakteroid auszuschalten. Nach Betrachten der vorliegenden Daten ist nicht damit zu rechnen, dass die Alaninproduktion im Bakteroiden dann noch erfolgen kann. Der Effekt auf den Pflanzenwuchs, aber auch auf die *AlaAT*-Aktivität würde Aufschluss darüber geben, ob der vermutete Alaninstrom vom Bakteroiden zum Mitochondrium der infizierten Zelle tatsächlich in der hier postulierten Weise erfolgt.

9 Referenzen

- Abd-Alla, M. H., Koyro, H. W., Yan, F., Schubert, S. and Peiter, E. (2000) 'Functional structure of the indeterminate *Vicia faba* L. root nodule: Implications for metabolite transport', *Journal of Plant Physiology*, Urban & Fischer Verlag, 157(3), pp. 335–343. doi: 10.1016/S0176-1617(00)80056-5.
- Allaway, D., Lodwig, E. M., Crompton, L. A., Wood, M., Parsons, R., Wheeler, T. R. and Poole, P. S. (2000) 'Identification of alanine dehydrogenase and its role in mixed secretion of ammonium and alanine by pea bacteroids', *Molecular Microbiology*, 36(2), pp. 508–515. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01884.x.
- Amelung, W. and Zhang, X. (2001) 'Determination of amino acid enantiomers in soils', *Soil Biology and Biochemistry*, 33(4–5), pp. 553–562. doi: 10.1016/S0038-0717(00)00195-4.
- Appels, M. A. and Haaker, H. (1991) 'Glutamate Oxaloacetate Transaminase in Pea Root Nodules', *Plant Physiology*, 95, pp. 740–747.
- Appleby, C. A. (1984) 'Leghemoglobin and Rhizobium Respiration', *Annual Review of Plant Physiology*, 35, pp. 443–478. doi: 10.1146/annurev.pp.35.060184.002303.
- Araújo, W. L., Ishizaki, K., Nunes-Nesi, A., Larson, T. R., Tohge, T., Krahnert, I., Witt, S., Obata, T., Schauer, N., Graham, I. A., Leaver, C. J. and Fernie, A. R. (2010) 'Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria', *Plant Cell*, 22(5), pp. 1549–1563. doi: 10.1105/tpc.110.075630.
- Araújo, W. L., Tohge, T., Ishizaki, K., Leaver, C. J. and Fernie, A. R. (2011) 'Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants', *Trends in Plant Science*, 16(9), pp. 489–498. doi: 10.1016/j.tplants.2011.05.008.
- Barsch, A., Carvalho, H. G., Cullimore, J. V and Niehaus, K. (2006) 'Short communication GC – MS based metabolite profiling implies three interdependent ways of ammonium assimilation in *Medicago truncatula* root nodules', *Journal of Biotechnology*, 127, pp. 79–83. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.06.007.
- Becana, M. and Klucas, R. V. (1992) 'Oxidation and reduction of leghemoglobin in root nodules of leguminous plants', *Plant Physiology*, 98(4), pp. 1217–1221. doi: 10.1104/pp.98.4.1217.
- Bergersen, F. J. (1994) 'Distribution of O₂ within infected cells of soybean root nodules: a new simulation', *Protoplasma*, 183, pp. 49–61. doi: 10.1007/BF01276812.
- Bergersen, F. J. (1996) 'Delivery of O₂ to bacteroids in soybean nodule cells: Consideration of gradients of concentration of free, dissolved O₂ in and near symbiosomes and beneath intercellular spaces', *Protoplasma*, 191, pp. 9–20. doi: 10.1007/bf01280821.
- Bergersen, F. J. and Turner, G. L. (1990) 'Bacteroids from soybean root nodules: respiration and N₂-fixation in flow-chamber reactions with oxyleghaemoglobin', *Proceedings of the royal society London*, 238, pp. 295–320.
- Bergersen, F. J. and Turner, G. L. (1993) 'Effects of concentrations of substrates supplied to N₂-fixing soybean bacteroids in flow chamber reactions', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 251(1331), pp. 95–102. doi: 10.1098/rspb.1993.0014.
- Blumwald, E., Fortin, M. G., Rea, P. A., Verma, D. P. S. and Poole, R. J. (1985) 'Presence of Host-Plasma Membrane Type H⁺-ATPase in the Membrane Envelope Enclosing the Bacteroids in Soybean Root Nodules', *Plant Physiology*, 78(4), pp. 665–672. doi: 10.1104/pp.78.4.665.
- Bouché, N. and Fromm, H. (2004) 'GABA in plants: Just a metabolite?', *Trends in Plant Science*, 9(3), pp. 110–115. doi: 10.1016/j.tplants.2004.01.006.
- Bouma, D. (1970) 'Effects of Nitrogen Nutrition on Leaf Expansion and Photosynthesis of *Trifolium subterraneum* L. I: Comparison between Nodulated Plants and Plants Supplied with Combined Nitrogen', *Annals of Botany*, 34(5), pp. 1131–1142. doi: 10.1093/oxfordjournals.aob.a084447.
- Brackin, R., Näsholm, T., Robinson, N., Guillou, S., Vinal, K., Lakshmanan, P., Schmidt, S. and Inselsbacher, E. (2015) 'Nitrogen fluxes at the root-soil interface show a mismatch of nitrogen fertilizer supply and sugarcane root uptake capacity', *Nature Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5(April), pp. 1–9. doi: 10.1038/srep15727.
- Bradford, M. M. (1976) 'A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding', *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248–254.

- Bryce, J. H. and Day, D. A. (1990) 'Tricarboxylic Acid Cycle Activity in Mitochondria from Soybean Nodules and Cotyledons', *Journal of Experimental Botany*, 41(229), pp. 961–967.
- Burén, S., Young, E. M., Sweeny, E. A., Lopez-Torrejón, G., Veldhuizen, M., Voigt, C. A. and Rubio, L. M. (2017) 'Formation of Nitrogenase NifDK Tetramers in the Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*', *ACS Synthetic Biology*, 6(6), pp. 1043–1055. doi: 10.1021/acssynbio.6b00371.
- Carvalho, H. G., Lima, L. M., Melo, P. M. and Cullimore, J. V (2003) 'Nodule-Specific Modulation of Glutamine Synthetase in Transgenic *Medicago truncatula* Leads to Inverse Alterations in Asparagine Synthetase Expression', *Plant Physiology*, 133(September), pp. 243–252. doi: 10.1104/pp.102.017830.1.
- Clarke, V. C., Loughlin, P. C., Day, D. a and Smith, P. M. C. (2014) 'Transport processes of the legume symbiosome membrane.', *Frontiers in plant science*, 5(December), pp. 1–9. doi: 10.3389/fpls.2014.00699.
- Clarke, V. C., Loughlin, P. C., Gavrin, A., Chen, C., Brear, E. M., Day, D. A. and Smith, P. M. C. (2015) 'Proteomic Analysis of the Soybean Symbiosome Identifies New Symbiotic Proteins', *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(5), pp. 1301–1322. doi: 10.1074/mcp.M114.043166.
- Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., Kopka, J. and Udvardi, M. K. (2004) 'Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*', *Plant Journal*, 39(4), pp. 487–512. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02150.x.
- Cox, J. and Mann, M. (2008) 'MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification', *Nature Biotechnology*, 26(12), pp. 1367–1372. doi: 10.1038/nbt.1511.
- Crawford, L. A., Bown, A. W., Breikreuz, K. E. and Guinel, F. C. (1994) 'The synthesis of gamma-aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH', *Plant Physiology*, 104(3), pp. 865–871. doi: 10.1104/pp.104.3.865.
- Van Dao, T., Nomura, M., Hamaguchi, R., Kato, K., Itakura, M., Minamisawa, K., Sinsuwongwat, S., Le, H. T. P., Kaneko, T., Tabata, S. and Tajima, S. (2008) 'NAD-malic enzyme affects nitrogen fixing activity of *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 bacteroids in soybean nodules', *Microbes and Environments*, 23(3), pp. 215–220. doi: 10.1264/jsme2.23.215.
- David, K. A. V., Apte, S. K., Banerji, A. and Thomas, J. (1980) 'Acetylene Reduction Assay for Nitrogenase Activity: Gas Less Than One Minute', *Wisconsin Law Review*, 39(5), pp. 1078–1080.
- Day, D. A., Poole, P. S., Tyerman, S. D. and Rosendahl, L. (2001) 'Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(1), pp. 61–71. doi: 10.1007/PL00000778.
- Day, D A, Poole, P. S., Tyerman, S. D. and Rosendahl, L. (2001) 'Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58(1), pp. 61–71. doi: 10.1007/PL00000778.
- Day, D. A., Price, G. D. and Gresshoff, P. M. (1986) 'Isolation and Oxidative Properties of Mitochondria and Bacteroids from Soybean Root Nodules', *Protoplasma*, 134, pp. 121–129.
- Denarie, J. and Debelle, F. (1996) 'Rhizobium Lipo-Chitooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis', *Annual Review of Biochemistry*, 65(1), pp. 503–535. doi: 10.1146/annurev.biochem.65.1.503.
- Diaz, F. (2010) 'Cytochrome c oxidase deficiency: Patients and animal models', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier B.V., 1802(1), pp. 100–110. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.07.013.
- Dilworth, M. J. (1966) 'Acetylene Reduction by Nitrogen-fixing Preparations from *Clostridium Pasteurianum*', *Biochimica et Biophysica acta*, 127, pp. 285–294.
- Drew, M. C. (1997) 'Oxygen Deficiency and Root Metabolism: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48(1), pp. 223–250. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.223.
- Erisman, J. W., Domburg, N., de Vries, W., Kros, H., de Haan, B. and Sanders, K. (2005) 'The Dutch N-cascade in the European perspective', *Science in China*, 48, pp. 827–842. doi: 10.1360/062005-275.
- Erisman, J. W., Grinsven, H. Van, Grizzetti, B., Bouraoui, F., Powlson, D., Sutton, M. a, Bleeker, A. and Reis, S. (2011) 'The European nitrogen problem in a global perspective', in *The European Nitrogen Assessment*, pp. 9–31.

- Esposti, M. D. and Romero, E. M. (2016) 'A survey of the energy metabolism of nodulating symbionts reveals a new form of respiratory complex I', *FEMS Microbiology Ecology*, 92(6), pp. 1–13. doi: 10.1093/femsec/fiw084.
- Evans, J. (1988) 'Acclimation by the Thylakoid Membranes to Growth Irradiance and the Partitioning of Nitrogen Between Soluble and Thylakoid Proteins', *Functional Plant Biology*, 15(2), pp. 93–106. doi: 10.1071/pp9880093.
- Fischinger, S. A. and Schulze, J. (2010) 'The importance of nodule CO₂ fixation for the efficiency of symbiotic nitrogen fixation in pea at vegetative growth and during pod formation', *Journal of Experimental Botany*, 61(9), pp. 2281–2291. doi: 10.1093/jxb/erq055.
- Fleck, A. T., Schulze, S., Hinrichs, M., Specht, A., Waßmann, F., Schreiber, L. and Schenk, M. K. (2015) 'Silicon promotes exodermal casparian band formation in Si-accumulating and Si-excluding species by forming phenol complexes', *PLoS ONE*, 10(9), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0138555.
- Forrest, I., Verma, D. P. S. and Dhindsa, R. S. (1991) 'Starch content and activities of starch-metabolizing enzymes in effective and ineffective root nodules of soybean', *Canadian Journal of Botany*, 69(13), pp. 697–701.
- Foyer, C. H., Noctor, G. and Hodges, M. (2011) 'Respiration and nitrogen assimilation: Targeting mitochondria-associated metabolism as a means to enhance nitrogen use efficiency', *Journal of Experimental Botany*, 62(4), pp. 1467–1482. doi: 10.1093/jxb/erq453.
- Freiberg, C. (1997) 'Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes', *Nature*, 387(6631), pp. 394–401.
- Fuchs, P., Rugen, N., Carrie, C., Elsässer, M., Finkemeier, I., Giese, J., Hildebrandt, T. M., Kühn, K., Maurino, V. G., Ruberti, C., Schallenberg-Rüdinger, M., Steinbeck, J., Braun, H., Eubel, H., Meyer, E. H., Müller-Schüssele, S. J. and Schwarzländer, M. (2019a) 'Single organelle function and organization as estimated from Arabidopsis mitochondrial proteomics', *The Plant Journal*. doi: 10.1111/tpj.14534.
- Fuchs, P., Rugen, N., Carrie, C., Elsässer, M., Finkemeier, I., Giese, J., Hildebrandt, T. M., Kühn, K., Maurino, V. G., Ruberti, C., Schallenberg-Rüdinger, M., Steinbeck, J., Braun, H., Eubel, H., Meyer, E. H., Müller-Schüssele, S. J. and Schwarzländer, M. (2019b) 'Single organelle function and organization as estimated from Arabidopsis mitochondrial proteomics', *The Plant Journal*, pp. 1–22. doi: 10.1111/tpj.14534.
- Gavini, N., Tungtur, S. and Pulakat, L. (2006) 'Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase-independent functional NifH mutant of *Azotobacter vinelandii*', *Journal of Bacteriology*, 188(16), pp. 6020–6025. doi: 10.1128/JB.00379-06.
- Geigenberger, P. (2003) 'Response of plant metabolism to too little oxygen', *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), pp. 247–256. doi: 10.1016/S1369-5266(03)00038-4.
- Geigenberger, P., Fernie, A. R., Gibon, Y., Christ, M. and Stitt, M. (2000) 'Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers', *Biological Chemistry*, 381(8), pp. 723–740. doi: 10.1515/BC.2000.093.
- Giegé, P., Heazlewood, J. L., Roessner-Tunali, U., Harvey Millar, A., Fernie, A. R., Leaver, C. J. and Sweetlove, L. J. (2003) 'Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells', *Plant Cell*, 15(9), pp. 2140–2151. doi: 10.1105/tpc.012500.
- Good, A. G. and Crosby, W. L. (1989) 'Anaerobic Induction of Alanine Aminotransferase in Barley Root Tissue', *Plant Physiology*, 90(4), pp. 1305–1309. doi: 10.1104/pp.90.4.1305.
- Good, A. G. and Muench, D. G. (1992) 'Purification and characterization of an anaerobically induced alanine aminotransferase from barley roots', *Plant Physiology*, 99(4), pp. 1520–1525. doi: 10.1104/pp.99.4.1520.
- Green, L. S., Li, Y., Emerich, D. W., Bergersen, F. J. and Day, D. A. (2000) 'Catabolism of α -ketoglutarate by a sucA mutant of *Bradyrhizobium japonicum*: Evidence for an alternative tricarboxylic acid cycle', *Journal of Bacteriology*, 182(10), pp. 2838–2844. doi: 10.1128/JB.182.10.2838-2844.2000.
- Green, R. T., East, A. K., Karunakaran, R., Downie, J. A. and Poole, P. S. (2019) 'Transcriptomic analysis of Rhizobium leguminosarum bacteroids in determinate and indeterminate nodules', *Microbial Genomics*, 5, pp. 1–16. doi: 10.1099/mgen.0.000254.
- Gupta, K. J., Zabalza, A. and Dongen, J. T. Van (2009) 'Regulation of respiration when the oxygen availability changes', *Physiologia Plantarum*, 137, pp. 383–391. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01253.x.
- Haaker, H., Szafran, M., Wassink, H., Klerk, H. and Appels, M. (1996) 'Respiratory control determines respiration and nitrogenase activity of Rhizobium leguminosarum bacteroids', *Journal of Bacteriology*, 178(15), pp. 4555–4562.

- Ho, L. T. P., Nomura, M., Kajiwar, H., Day, D. A. and Tajima, S. (2004) 'Proteomic analysis on symbiotic differentiation of mitochondria in soybean nodules', *Plant and Cell Physiology*, 45(3), pp. 300–308. doi: 10.1093/pcp/pch035.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. (1950) 'The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil', *Circular*, 347. doi: citeulike-article-id:9455435.
- Hooper, C. M., Tanz, S. K., Castleden, I. R., Vacher, M. A., Small, I. D. and Millar, A. H. (2014) 'SUBAcon : a consensus algorithm for unifying the subcellular localization data of the Arabidopsis proteome', *Bioinformatics*, 30(23), pp. 3356–3364. doi: 10.1093/bioinformatics/btu550.
- Hosie, A. H. F., Allaway, D., Galloway, C. S., Dunsby, H. A. and Poole, P. S. (2002) 'Rhizobium leguminosarum Has a Second General Amino Acid Permease with Unusually Broad Substrate Specificity and High Similarity to Branched-Chain Amino Acid Transporters', *Journal of Bacteriology*, 184(15), pp. 4071–4080. doi: 10.1128/JB.184.15.4071.
- Huang, S., Braun, H. P., Gawryluk, R. M. R. and Millar, A. H. (2019) 'Mitochondrial complex II of plants: subunit composition, assembly, and function in respiration and signaling', *Plant Journal*, 98(3), pp. 405–417. doi: 10.1111/tbj.14227.
- Huang, S. and Millar, A. H. (2013) 'Succinate dehydrogenase: The complex roles of a simple enzyme', *Current Opinion in Plant Biology*. Elsevier Ltd, 16(3), pp. 344–349. doi: 10.1016/j.pbi.2013.02.007.
- Ignatov, G., Vassileva, V. and Dimova-terziivanova, S. (2000) 'The Oxidative Properties of Mitochondria and Bacteroids From Root Nodules of Soybean', *Journal of Plant*, 26, pp. 3–14.
- Imlay, J. A. (1995) 'A metabolic enzyme that rapidly produces superoxide, fumarate reductase of Escherichia Coli', *The Journal of biological chemistry*, 270(34), pp. 19767–19777.
- Ishihara, H., Koriyama, H., Osawa, A., Zehirov, G., Yamaura, M., Kucho, K. ichi, Abe, M., Higashi, S., Kondorosi, E., Mergaert, P. and Uchiyumi, T. (2011) 'Characteristics of bacteroids in indeterminate nodules of the leguminous tree leucaena glauca', *Microbes and Environments*, 26(2), pp. 156–159. doi: 10.1264/jsme2.ME11104.
- Jayasinghearachchi, H. S. and Seneviratne, G. (2004) 'Can mushrooms fix atmospheric nitrogen?', *Journal of Biosciences*, 29(3), pp. 293–6. doi: 10.1007/BF02702611.
- Johnston, A. W. B. and Behringer, J. E. (1975) 'Identification of the rhizobium strains in pea root nodules using genetic markers', *Journal of General Microbiology*, 87(2), pp. 343–350. doi: 10.1099/00221287-87-2-343.
- Kaneko, Y., Sharmin, F., Bulbul, N. and Atsuzawa, K. (2019) 'Backscattered electron imaging of high pressure frozen soybean root nodules visualizes formation of symbiosome membranes', *Microscopy*, 68(2), pp. 181–184. doi: 10.1093/jmicro/dfy138.
- Karr, D. B. and Emerich, D. W. (2000) 'Bradyrhizobium japonicum isocitrate dehydrogenase exhibits calcium- dependent hysteresis', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376(1), pp. 101–108. doi: 10.1006/abbi.1999.1687.
- Kereszt, A., Mergaert, P., Montiel, J., Endre, G. and Kondorosi, É. (2018) 'Impact of plant peptides on symbiotic nodule development and functioning', *Frontiers in Plant Science*, 9(July), pp. 1–16. doi: 10.3389/fpls.2018.01026.
- Khush, G. S. (2001) 'Green revolution: The way forward', *Nature Reviews Genetics*, 2(10), pp. 815–822. doi: 10.1038/35093585.
- Komatsu, S., Yamamoto, A., Nakamura, T., Nouri, M., Nanjo, Y., Nishizawa, K. and Furukawa, K. (2011) 'Comprehensive Analysis of Mitochondria in Roots and Hypocotyls of Soybean under Flooding Stress using Proteomics and Metabolomics Techniques', *Journal of Proteome Research*, 10, pp. 3993–4004. doi: 10.1021/pr2001918.
- Kouchi, H. and Fukai, K. (1989) 'Rapid isolation of bacteroids from soybean root nodules by percoll discontinuous gradient centrifugation', *Soil Science and Plant Nutrition*, 35(2), pp. 301–305. doi: 10.1080/00380768.1989.10434762.
- Kouchi, H., Fukai, K., Katagiri, H., Minamisawa, K. and Tajima, S. (1988) 'Isolation and enzymological characterization of infected and uninfected cell protoplasts from root nodules of Glycine max', *Physiologia Plantarum*, 73(3), pp. 327–334. doi: 10.1111/j.1399-3054.1988.tb00606.x.
- Krylova, V., Andreev, I. M., Zartdinova, R. and Izmailov, S. F. (2013) 'Biochemical characteristics of the Ca²⁺ pumping ATPase in the peribacteroid membrane from broad bean root nodules', *Protoplasma*, 250(2), pp. 531–538. doi: 10.1007/s00709-012-0436-0.
- Kumar, S., Bourdès, A. and Poole, P. (2005) 'De novo alanine synthesis by bacteroids of Mesorhizobium loti is not required

for nitrogen transfer in the determinate nodules of *Lotus corniculatus*', *Journal of Bacteriology*, 187(15), pp. 5493–5495. doi: 10.1128/JB.187.15.5493-5495.2005.

Küster, H., Albus, U., Frühling, M., Tchetkova, S. A., Tikhonovitch, I. A., Pühler, A. and Perlick, A. M. (1997) 'The asparagine synthetase gene *VfAS1* is strongly expressed in the nitrogen-fixing zone of broad bean (*Vicia faba* L.) root nodules', *Plant Science*, 124(1), pp. 89–95. doi: 10.1016/S0168-9452(97)04607-4.

Kuzma, M. M., Hunt, S. and Layzell, D. B. (1993) 'Role of oxygen in the limitation and inhibition of nitrogenase activity and respiration rate in individual soybean nodules.', *Plant physiology*, 101(1), pp. 161–169. doi: 10.1104/pp.101.1.161 [pii].

Kuzma, M. M., Winter, H., Storer, P., Oresnik, I., Atkins, C. A. and Layzell, D. B. (1999) 'The site of oxygen limitation in soybean nodules', *Plant Physiology*, 119(2), pp. 399–407. doi: 10.1104/pp.119.2.399.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007) 'Clustal W and Clustal X version 2.0', *Bioinformatics*, 23(21), pp. 2947–2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.

Li, L., Carrie, C., Nelson, C., Whelan, J. and Harvey Millar, A. (2012) 'Accumulation of newly synthesized F1 in Vivo in Arabidopsis mitochondria provides evidence for modular assembly of the plant F1Fo ATP synthase', *Journal of Biological Chemistry*, 287(31), pp. 25749–25757. doi: 10.1074/jbc.M112.373506.

Livingstone, D. R. (1983) 'Invertebrate and vertebrate pathways of anaerobic metabolism: evolutionary considerations', *Journal of the Geological Society*, 140(1), pp. 27–37. doi: 10.1144/gsjgs.140.1.0027.

Lodwig, E., Kumar, S., Allaway, D., Bourdes, A., Prell, J., Priefer, U. and Poole, P. (2004) 'Regulation of L-Alanine Dehydrogenase in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and Its Role in Pea Nodules', *Journal of Bacteriology*, 186(3), pp. 842–849. doi: 10.1128/JB.186.3.842-849.2004.

Lodwig, E. M., Hosie, A. H. F., Bourdès, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J. A. and Poole, P. S. (2003) 'Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume – *Rhizobium* symbiosis', *Nature*, 422(April), pp. 722–726. doi: 10.1038/nature01549.1.

Lodwig, E., Poole, P., Lodwig, E. and Poole, P. (2003) 'Metabolism of *Rhizobium* Bacteroids', *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(1), pp. 37–78. doi: 10.1080/713610850.

Long, S. R. (1996) 'Rhizobium symbiosis: Nod factors in perspective', *Plant Cell*, 8(10), pp. 1885–1898. doi: 10.1105/tpc.8.10.1885.

López-Torrejón, G., Jiménez-Vicente, E., Buesa, J. M., Hernandez, J. A., Verma, H. K. and Rubio, L. M. (2016) 'Expression of a functional oxygen-labile nitrogenase component in the mitochondrial matrix of aerobically grown yeast', *Nature Communications*, 7, pp. 1–6. doi: 10.1038/ncomms11426.

Lotocka, B. (2007) 'Vascular Endodermis in root nodules of *Lupinus luteus* L. (Fabaceae)', *Acta Biologica Cracoviensia*, 49(2), pp. 73–80. doi: 10.1227/01.NEU.0000348049.81121.C1.

Ma, Q.-S., Johnston, A. W. B., Hombrecher, G. and Downie, J. A. (1982) 'Molecular genetics of mutants of *Rhizobium leguminosarum* which fail to fix nitrogen', *MGG Molecular & General Genetics*, 187(1), pp. 166–171. doi: 10.1007/BF00384401.

Mangold, C. A., Yao, P. J., Du, M., Freeman, W. M., Benkovic, S. J. and Szpara, M. L. (2018) 'Expression of the purine biosynthetic enzyme phosphoribosyl formylglycinamide synthase (FGAMS) in neurons', *Journal of Neurochemistry*, 144(6), pp. 723–735. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

Marschner, P. and Rengel, Z. (2007) 'Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems', in *Soil biology*, pp. 1–35. doi: 10.1007/978-3-540-68027-7.

Marzluf, G. A. (1997) 'Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi', *Microbiol Mol Biol Rev*, 61(1), pp. 17–32.

Masalkar, P., Wallace, I. S., Hwang, J. H. and Roberts, D. M. (2010) 'Interaction of cytosolic glutamine synthetase of soybean root nodules with the C-terminal domain of the symbiosome membrane nodulin 26 aquaglyceroporin', *Journal of Biological Chemistry*, 285(31), pp. 23880–23888. doi: 10.1074/jbc.M110.135657.

Mckay, I. A., Dilworth, M. J. and Glenn, A. R. (1989) 'Carbon catabolism in continuous cultures and bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* MNF 3841', *Archives of Microbiology*, 152, pp. 606–610.

Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A. E., Barloy-Hubler, F., Galibert, F.,

- Kondorosi, A. and Kondorosi, E. (2006) 'Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium-legume symbiosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), pp. 5230–5235. doi: 10.1073/pnas.0600912103.
- Meyer, E. H. (2012) 'Proteomic investigations of complex I composition: How to define a subunit?', *Frontiers in Plant Science*, 3(MAY), pp. 1–7. doi: 10.3389/fpls.2012.00106.
- Miflin, B. J. and Lea, P. J. (1976) 'The pathway of nitrogen assimilation in plants', *Phytochemistry*, 15(6), pp. 873–885. doi: 10.1016/S0031-9422(00)84362-9.
- Millar, A. H., Day, D. A. and Bergersen, F. J. (1995) 'Microaerobic respiration and oxidative phosphorylation by soybean nodule mitochondria : implications for nitrogen fixation', *Plant, Cell and Environment*, 18, pp. 715–726.
- Millar, A. H., Finnegan, M., Whelan, J. and Drevon, J. J. (1997) 'Expression and kinetics of the mitochondrial alternative oxidase in nitrogen-fixing nodules of soybean roots', pp. 1273–1282.
- Miller, A. J. and Cramer, M. D. (2004) *Root nitrogen acquisition and assimilation*, *Plant and Soil*. doi: 10.1007/s11104-004-0965-1.
- Miller, A. J. and Smith, S. J. (1996) 'Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells', *Journal of Experimental Botany*, 47(300), pp. 843–854. doi: 10.1093/jxb/47.7.843.
- Miyashita, Y., Dolferus, R., Ismond, K. P. and Good, A. G. (2007) 'Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*', *The Plant Journal*, 49, pp. 1108–1121. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2006.03023.x.
- Muecke, P. S. (1969) 'Respiratory Activity of Mitochondria from Legume Root Nodules', *Nature*, 221(5181), pp. 675–677. doi: 10.1038/221675a0.
- Neuburger, M., Journet, E. P., Bligny, R., Carde, J. P. and Douce, R. (1982) 'Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 217(1), pp. 312–323. doi: 10.1016/0003-9861(82)90507-0.
- Neuhoff, V., Stamm, R. and Eibl, H. (1985) 'Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels : A systematic analysis', *Electrophoresis*, 6, pp. 427–448.
- Nunes-nesi, A., Sodek, L., Rocha, M., Licausi, F., Arau, W. L., Fernie, A. R. and Dongen, J. T. Van (2010) 'Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle Are Linked by Alanine Aminotransferase during Hypoxia Induced by Waterlogging of *Lotus japonicus* 1 [W] [OA]', *Plant Physiology*, 152(March), pp. 1501–1513. doi: 10.1104/pp.109.150045.
- Ogden, A. J., Gargouri, M., Park, J., Gang, D. R. and Kahn, L. (2017) 'Integrated analysis of zone-specific protein and metabolite profiles within nitrogen-fixing *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium medicae* nodules', *PLOS One*, pp. 1–17.
- Olsen, J. V., Ong, S. E. and Mann, M. (2004) 'Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues', *Molecular and Cellular Proteomics*, 3(6), pp. 608–614. doi: 10.1074/mcp.T400003-MCP200.
- Ott, T., Van Dongen, J. T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P. and Udvardi, M. K. (2005) 'Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development', *Current Biology*, 15(6), pp. 531–535. doi: 10.1016/j.cub.2005.01.042.
- Perlick, A. M. and Pühler, A. (1993) 'A survey of transcripts expressed specifically in root nodules of broadbean (*Viola faba* L.)', *Plant Molecular Biology*, 22, pp. 957–970.
- Perret, X., Staehelin, C. and Broughton, W. J. (2000) 'Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), pp. 180–201. doi: 10.1128/mubr.64.1.180-201.2000.
- Peterhansel, C., Horst, I., Niessen, M., Blume, C., Kebeish, R., Kürkcüoğlu, S. and Kreuzaler, F. (2010) 'Photorespiration', in *The Arabidopsis Book*, pp. 1–24.
- Pfau, T., Christian, N., Masakapalli, S. K., Swee, L. J., Poolman, M. G. and Ebenhöf, O. (2018) 'The intertwined metabolism during symbiotic nitrogen fixation elucidated by metabolic modelling', *Nature Scientific Reports*, 8(August), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41598-018-30884-x.
- Poole, P. S., Allaway, D., Lodwig, E. and Wheeler, T. (2000) 'Ammonium and Alanine are the Primary Nitrogen Secretion Products of Pea Bacteroids', in *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*, pp. 371–372. doi: 10.1007/0-306-47615-0_198.

- Pradesh, U. (2005) 'Eutrophication : An Ecological Vision', *The Botanical Review*, 71(4), pp. 449–482. doi: 10.1663/0006-8101(2005)071.
- Prell, J., Boesten, B., Poole, P. and Priefer, U. B. (2002) 'The Rhizobium leguminosarum bv. viciae VF39 γ -aminobutyrate (GABA) aminotransferase gene (gabT) is induced by GABA and highly expressed in bacteroids', *Microbiology*, 148(2), pp. 615–623. doi: 10.1099/00221287-148-2-615.
- Prell, Jurgen, Bourdés, A., Karunakaran, R., Lopez-Gomez, M. and Poole, P. (2009) 'Pathway of γ -aminobutyrate metabolism in rhizobium leguminosarum 3841 and its role in symbiosis', *Journal of Bacteriology*, 191(7), pp. 2177–2186. doi: 10.1128/JB.01714-08.
- Prell, J, White, J. P., Bourdes, A., Bunnewell, S., Bongaerts, R. J. and Poole, P. S. (2009) 'Legumes regulate Rhizobium bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(30), pp. 12477–12482. doi: 10.1073/pnas.0903653106.
- Quinlan, C. L., Orr, A. L., Perevoshchikova, I. V., Treberg, J. R., Ackrell, B. A. and Brand, M. D. (2012) 'Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions', *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), pp. 27255–27264. doi: 10.1074/jbc.M112.374629.
- Ravishankara, A. R., Daniel, J. S. and Portmann, R. W. (2009) 'Nitrous oxide (N₂O): The dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st century', *Science*, 326(5949), pp. 123–125. doi: 10.1126/science.1176985.
- Rawsthorne, S. and Larue, T. A. (1986a) 'Metabolism under Microaerobic Conditions of Mitochondria from Cowpea Nodules', *Plant Physiology*, 81(4), pp. 1097–1102. doi: 10.1104/pp.81.4.1097.
- Rawsthorne, S and Larue, T. A. (1986b) 'Preparation and Properties of Mitochondria from Cowpea Nodules', *Plant Physiology*, 81(4), pp. 1092–1096.
- Reggiani, R., Nebuloni, M., Mattana, M. and Brambilla, I. (2000) 'Anaerobic accumulation of amino acids in rice roots: Role of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle', *Amino Acids*, 18(3), pp. 207–217. doi: 10.1007/s007260050018.
- Ricoult, C., Cliquet, J. B. and Limami, A. M. (2005) 'Stimulation of alanine amino transferase (AlaAT) gene expression and alanine accumulation in embryo axis of the model legume *Medicago truncatula* contribute to anoxia stress tolerance', *Physiologia Plantarum*, 123(1), pp. 30–39. doi: 10.1111/j.1399-3054.2005.00449.x.
- Ricoult, C., Cliquet, J., Planchet, E. and Lavoisier, B. (2008) 'Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress', *Journal of Experimental Botany*, 59(9), pp. 2325–2335. doi: 10.1093/jxb/ern102.
- Ricoult, C., Echeverria, L. O., Cliquet, J. and Limami, A. M. (2018) 'Characterization of alanine aminotransferase (AlaAT) multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume *Medicago truncatula*', *Journal of Experimental Botany*, 57(12), pp. 3079–3089. doi: 10.1093/jxb/erl069.
- Rocha, M., Sodek, L., Licausi, F., Hameed, M. W., Dornelas, M. C. and Van Dongen, J. T. (2010) 'Analysis of alanine aminotransferase in various organs of soybean (*Glycine max*) and in dependence of different nitrogen fertilisers during hypoxic stress', *Amino Acids*, 39(4), pp. 1043–1053. doi: 10.1007/s00726-010-0596-1.
- Rodríguez-Haas, B., Finney, L., Vogt, S., González-Melendi, P., Imperial, J. and González-Guerrero, M. (2013) 'Iron distribution through the developmental stages of *Medicago truncatula* nodules', *Metallomics*, 5(5), pp. 1247–1253. doi: 10.1039/c3mt00060e.
- Rosendahl, L., Vance, C. P. and Pedersen, W. B. (1990) 'Products of dark CO₂ fixation in pea root nodules support bacteroid metabolism', *Plant Physiology*, 93(1), pp. 12–19. doi: 10.1104/pp.93.1.12.
- Rovira, A. G. and Smith, A. G. (2019) 'PPR proteins – orchestrators of organelle RNA metabolism', *Physiologia Plantarum*, 166(1), pp. 451–459. doi: 10.1111/ppl.12950.
- Ruperti, B., Botton, A., Populin, F., Eccher, G., Brilli, M., Quaggiotti, S., Trevisan, S., Cainelli, N., Guarracino, P., Schievano, E. and Meggio, F. (2019) 'Flooding responses on grapevine: A physiological, transcriptional, and metabolic perspective', *Frontiers in Plant Science*, 10(March), pp. 1–21. doi: 10.3389/fpls.2019.00339.
- Ryle, G. J. A., Powell, C. E. and Gordon, A. J. (1979) 'The respiratory costs of nitrogen fixation in soyabean, cowpea, and white clover: I. Nitrogen fixation and the respiration of the nodulated root', *Journal of Experimental Botany*, 30(1), pp. 135–144. doi: 10.1093/jxb/30.1.135.

- Saalbach, G., Erik, P. and Wienkoop, S. (2002) 'Characterisation by proteomics of peribacteroid space and peribacteroid membrane preparations from pea (*Pisum sativum*) symbiosomes', *Proteomics*, 2(3), pp. 325–337. doi: 10.1002/1615-9861(200203)2:3<325::AID-PROT325>3.0.CO;2-W.
- Saito, A., Tanabata, S., Tanabata, T., Tajima, S., Ueno, M., Ishikawa, S., Ohtake, N., Sueyoshi, K. and Ohya, T. (2014) 'Effect of nitrate on nodule and root growth of soybean (*Glycine max* (L.) merr.)', *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), pp. 4464–4480. doi: 10.3390/ijms15034464.
- Salminen, S. O. and Streeter, J. G. (1990) 'Factors contributing to the accumulation of glutamate in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids under microaerobic conditions', *Journal of General Microbiology*, 136(10), pp. 2119–2126. doi: 10.1099/00221287-136-10-2119.
- Salminen, S. O. and Streeter, J. G. (1992) 'Labeling of carbon pools in *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* Bacteroids following incubation of intact nodules with $^{14}\text{CO}_2$ ', *Plant Physiology*, 100(2), pp. 597–604. doi: 10.1104/pp.100.2.597.
- Sauheitl, L., Glaser, B. and Weigelt, A. (2009) 'Advantages of compound-specific stable isotope measurements over bulk measurements in studies on plant uptake of intact amino acids', *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23, pp. 3333–3342. doi: 10.1002/rcm.
- Scharff, A. M., Egsgaard, H., Hansen, P. E. and Rosendahl, L. (2003) 'Exploring symbiotic nitrogen fixation and assimilation in pea root nodules by in vivo ^{15}N nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry', *Plant Physiology*, 131(1), pp. 367–378. doi: 10.1104/pp.015156.plant.
- Schubert, K. R. (1986) 'Products of biological nitrogen fixation in higher plants: Synthesis, Transport, and Metabolism', *Annual Review of Plant Physiology*, 37, pp. 539–574.
- Schwember, A. R., Schulze, J., del Pozo, A. and Cabeza, R. A. (2019) 'Regulation of symbiotic nitrogen fixation in legume root nodules', *Plants*, 8(9). doi: 10.3390/plants8090333.
- Scott, D. and Farnden, K. (1976) 'Ammonia Assimilation', *Nature*, 263, pp. 703–705. doi: 10.1201/b19974-6.
- Seefeldt, L. C., Hoffman, B. M. and Dean, D. R. (2010) 'Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase', *Annual Review of Biochemistry*, (1), pp. 1–28. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.070907.103812.Mechanism.
- Shen, W., Wei, Y., Dauk, M., Tan, Y., Taylor, D., Selvaraj, G. and Zou, J. (2006) 'Involvement of a Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase in Modulating the NADH/NAD⁺ Ratio Provides Evidence of a Mitochondrial Glycerol-3-Phosphate Shuttle in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 18(February), pp. 422–441. doi: 10.1105/tpc.105.039750.1.
- Simon-Rosin, U., Wood, C. and Udvardi, M. K. (2003) 'Molecular and cellular characterisation of LjAMT2;1, an ammonium transporter from the model legume *Lotus japonicus*', *Plant Molecular Biology*, 51(1), pp. 99–108. doi: 10.1023/A:1020710222298.
- Smith, M. T. and Emerichs, W. (1993) 'Alanine Dehydrogenase from Soybean Nodule Bacteroids', *The Journal of biological chemistry*, 268(15), pp. 10746–10753.
- De Sousa, C. A. F. and Sodek, L. (2003) 'Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia', *Environmental and Experimental Botany*, 50(1), pp. 1–8. doi: 10.1016/S0098-8472(02)00108-9.
- Sprent, J. I. (1980) 'Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae', *Plant, Cell & Environment*, 3(1), pp. 35–43. doi: 10.1111/1365-3040.ep11580516.
- Streeter, J. G. (1989) 'Estimation of ammonium concentration in the cytosol of soybean nodules', *Plant Physiology*, 90(3), pp. 779–782. doi: 10.1104/pp.90.3.779.
- Suganuma, N. and Yamamoto, Y. (1987) 'Respiratory metabolism of mitochondria in soybean root nodules', *Soil Science and Plant Nutrition*, 33(1), pp. 93–101. doi: 10.1080/00380768.1987.10557555.
- Sulieman, S. (2011) 'Does GABA increase the efficiency of symbiotic N₂ fixation in legumes?', *Plant Signaling and Behavior*, 6(1), pp. 32–36. doi: 10.4161.psb.6.1.14318.
- Sulieman, S. and Schulze, J. (2010) 'Phloem-derived γ -aminobutyric acid (GABA) is involved in upregulating nodule N₂ fixation efficiency in the model legume *Medicago truncatula*', *Plant, Cell and Environment*, 33(12), pp. 2162–2172. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02214.x.

- Summers, J. E. and Jackson, M. B. (1996) 'Anaerobic promotion of stem extension in *Potamogeton pectinatus*. Roles for carbon dioxide, acidification and hormones', *Physiologia Plantarum*, 96(4), pp. 615–622. doi: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb00234.x.
- Summers, J. E., Ratcliffe, R. G. and Jackson, M. B. (2000) 'Anoxia tolerance in the aquatic monocot *Potamogeton pectinatus*: absence of oxygen stimulates elongation in association with an unusually large Pasteur effect', *Journal of Experimental Botany*, 51(349), pp. 1413–1422. doi: 10.1093/jexbot/51.349.1413.
- Sweetlove, L. J., Beard, K. F. M., Nunes-nesi, A., Fernie, A. R. and Ratcliffe, R. G. (2010) 'Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle', *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 15(8), pp. 462–470. doi: 10.1016/j.tplants.2010.05.006.
- Tabrett, C. A. and Copeland, L. (2000) 'Biochemical controls of citrate synthase in chickpea bacteroids', *Archives of Microbiology*, 173(1), pp. 42–48. doi: 10.1007/s002030050006.
- Tcherkez, G., Mahé, A., Gauthier, P., Mauve, C., Gout, E., Bligny, R., Cornic, G. and Hodges, M. (2009) 'In folio respiratory fluxomics revealed by ¹³C isotopic labeling and H/D isotope effects highlight the noncyclic nature of the tricarboxylic acid "cycle" in illuminated leaves', *Plant Physiology*, 151(2), pp. 620–630. doi: 10.1104/pp.109.142976.
- Thal, B., Braun, H.-P. and Eubel, H. (2018) 'Proteomic analysis dissects the impact of nodulation and biological nitrogen fixation on *Vicia faba* root nodule physiology', *Plant Molecular Biology*. Springer Netherlands, 97(3), pp. 233–251. doi: 10.1007/s11103-018-0736-7.
- Thornley, J. H. M. (1998) 'Dynamic model of leaf photosynthesis with acclimation to light and nitrogen', *Annals of Botany*, 81(3), pp. 421–430. doi: 10.1006/anbo.1997.0575.
- Timm, S., Wittmiß, M., Gamlien, S., Ewald, R., Florian, A., Frank, M., Wirtz, M., Hell, R., Fernie, A. R. and Bauwe, H. (2015) 'Mitochondrial dihydrolipoyl dehydrogenase activity shapes photosynthesis and photorespiration of *Arabidopsis thaliana*', *Plant Cell*, 27(7), pp. 1968–1984. doi: 10.1105/tpc.15.00105.
- Tobin, A. K. and Yamaya, T. (2001) 'Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley', *Journal of Experimental Botany*, 52(356), pp. 591–604. doi: 10.1093/jxb/52.356.591.
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M. and Cox, J. (2016) 'The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data', *Nature Methods*, 13(9), pp. 731–740. doi: 10.1038/nmeth.3901.
- Tyerman, S. D., Whitehead, L. F. and Day, D. A. (1995) 'A channel-like transporter for NH₄⁺ on the symbiotic interface of N₂-fixing plants', *Nature*, 378(6557), pp. 629–632. doi: 10.1038/378629a0.
- Udvardi, M. and Poole, P. S. (2013) 'Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses', *Annual review of plant biology*, 64, pp. 781–805. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120235.
- Vance, C. P. (2008) 'Carbon and nitrogen metabolism in legume nodules', *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*, pp. 293–320.
- Vance, C. P. and Gantt, J. S. (1992) 'Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules', *Physiologia Plantarum*, pp. 266–274. doi: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb04731.x.
- Vance, C. P. and Heichel, G. H. (1991) 'Carbon in N₂ fixation: Limitation or exquisite adaptation', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1), pp. 373–392. doi: 10.1146/annurev.pp.42.060191.002105.
- Van De Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., Farkas, A., Mikulass, K., Nagy, A., Tiricz, H., Satiat-Jeunemaître, B., Alunni, B., Bourge, M., Kucho, K. I., Abe, M., Kereszt, A., Maroti, G., Uchiumi, T., Kondorosi, E. and Mergaert, P. (2010) 'Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis', *Science*, 327(5969), pp. 1122–1126. doi: 10.1126/science.1184057.
- Verma, D. P. A. L. S. (1976) 'Intracellular site of synthesis and localization of leghemoglobin in root nodules', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(11), pp. 3843–3847.
- de Visser, R. and Lambers, H. (1983) 'Growth and the efficiency of root respiration of *Pisum sativum* as dependent on the source of nitrogen', *Physiologia Plantarum*, 58(4), pp. 533–543. doi: 10.1111/j.1399-3054.1983.tb05739.x.
- Waters, J. K., Hughes, B. L., Purcell, L. C., Gerhardt, K. O., Mawhinney, T. P. and Emerich, D. W. (1998) 'Alanine, not ammonia, is excreted from N₂-fixing soybean nodule bacteroids', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20), pp. 12038–12042. doi: 10.1073/pnas.95.20.12038.

-
- White, J. P., Prell, J., Ramachandran, V. K. and Poole, P. S. (2009) 'Characterization of a γ -aminobutyric acid transport system of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841', *Journal of Bacteriology*, 191(5), pp. 1547–1555. doi: 10.1128/JB.00926-08.
- White, J., Prell, J., James, E. K. and Poole, P. (2007) 'Nutrient Sharing between Symbionts', *Plant Physiology*, 144(June), pp. 604–614. doi: 10.1104/pp.107.097741.
- Wienkoop, S. and Saalbach, G. (2003) 'Proteome analysis. Novel proteins identified at the peribacteroid membrane from *Lotus japonicus* root nodules.', *Plant physiology*, 131(3), pp. 1080–1090. doi: 10.1104/pp.102.015362.ATPase.
- Von Wirén, N., Lauter, F. R., Ninnemann, O., Gillissen, B., Walch-Liu, P., Engels, C., Jost, W. and Frommer, W. B. (2000) 'Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato', *Plant Journal*, 21(2), pp. 167–175. doi: 10.1046/j.1365-313X.2000.00665.x.
- Wittenberg, J. B. (1974) 'The role of Leghemoglobin in nitrogen fixation by bacteroids isolated from soybean root nodules', *The journal of biological chemistry*, 249(13), pp. 4057–4066.
- Yu, C. A., Yu, L. and Xia, D. (2013) 'Ubiquinol-Cytochrome c Oxidoreductase (Complex III)', in *Encyclopedia of Biophysics*, pp. 2679–2684. doi: 10.1007/978-3-642-16712-6.
- Zabalza, A., Van Dongen, J. T., Froehlich, A., Oliver, S. N., Faix, B., Gupta, K. J., Schmäzlin, E., Igal, M., Orcaray, L., Royuela, M. and Geigenberger, P. (2009) 'Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration', *Plant Physiology*, 149(2), pp. 1087–1098. doi: 10.1104/pp.108.129288.
- Zahran, H. H. (1999) 'Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate.', *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 63(4), pp. 968–89.
- Zhang, L., Garneau, M. G., Majumdar, R., Grant, J. and Tegeder, M. (2015) 'Improvement of pea biomass and seed productivity by simultaneous increase of phloem and embryo loading with amino acids', *Plant Journal*, 81, pp. 134–146. doi: 10.1111/tpj.12716.

10 Anhang

10.1 Gensequenzen

10.1.1 Tn5-Transposon

www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/U00004.1

```

1 ctgactctta tacacaagta gcgtcctgaa cggaaccttt cccgttttcc aggatctgac
61 ttccatgtga cctcctaaca tggtaacggt catgataact tctgctcttc atcgtgcggc
121 cgactgggct aaatctgtgt tctcttcggc ggcgctgggt gatcctcgcc gtaactgccc
181 cttggttaac gtcgcccgcc aattggcaaa atattctggt aaatcaataa ccatctcatc
241 agagggtagt gaagccatgc aggaaggcgc ttaccgattt taccgcaatc ccaacgtttc
301 tgccgaggcg atcagaaagg ctggcgccat gcaaacagtc aagtggctc aggagtttcc
361 cgaactgctg gccattgagg acaccacctc tttgagttat cgccaccagg tgcgcaaga
421 gcttgcaag ctgggctcta ttcaggataa atcccgcgga tggtggttc actccgttct
481 cttgctcgag gccaccacat tccgcaccgt aggattactg catcaggagt ggtggatgag
541 cccgatgac cctgcccgat cggatgaaaa ggagagtggc aaatggctgg cagcggccgc
601 aactagccgg ttacgcatgg gcagcatgat gagcaacgtg attgcggtct gtgaccgca
661 agccgatatt catgcttacc tgcaggacag gctggcgcat aacgagcgtc tctggtgagc
721 ctccaagc acacgcaagg acgtagagtc tgggttgat ctgatcgacc atctgaaga
781 ccaaccggag ttgggtggct atcagatcag cattccgcaa aagggcgtgg tggataaacg
841 cgttaaacgt aaaaatcgac cagcccgcaa ggcgagcttg agcctgcgca gtgggagcat
901 cacgctaaaa caggggaata tcacgctcaa cgcggtgctg gccgaggaga ttaaccgcc
961 caagggtgag accccgttga aatgggtggt gctgaccggc gaaccggtcg agtcgctagc
1021 ccaagccttg cgcgctcatc acatttatac ccatcgtggt cggatcgagg agttccataa
1081 ggcatgaaa accggagcag gagccgagag gcaacgcatg gaggagccg ataactcggg
1141 gcgatggtc tcgatcctct cgtttgttgc ggtcaggctg ttacagctca gagaaagctt
1201 cacgctgccg caagcactca gggcgcaagg gctgctaaag gaagcggaac acgtagaaag
1261 ccagtccgca gaaacggtgc tgaccccgga tgaatgtcag ctactgggct atctggacaa
1321 gggaaaacgc aagcgcgaaag agaaagcagg tagcttgtag tgggcttaca tggcgatagc
1381 tagactggg ggttttatgg acagcaagc aaccggaatt gccagctggg gcgccctctg
1441 gtaaggttgg gaagccctgc aaagtaaac ggatggcttt cttgcccga aggatctgat
1501 ggcgcaagg atcaagatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac
1561 aagatggatt gcacgcagg tctccggccg cttgggtgga gaggctattc ggctatgact
1621 gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgctgtgt cggctgtca ggcaggggc
1681 gcccggttct tttgtcaag accgacctgt ccggtgcctt gaatgaactg caggacgagg
1741 cagcgcggt atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctcgacgttg
1801 tactgaagc gggaaaggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt
1861 catctcacct tgctcctgce gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc
1921 atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcag
1981 cacgtactcg gatggaagcc ggtcttctg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg
2041 ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg catgcccgac ggcgaggatc
2101 tcgctgtag ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggcgctttt
2161 ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcgaccg ctatcaggac atagcgttgg
2221 ctaccggtga tattgctgaa gagcttggcg cgaatgggc tgaccgcttc ctcgctttt
2281 acggtatcgc cgctcccgat tcgcagcgca tgccttcta tgccttctt gacgagttct
2341 tctgagcggg actctggggg tcgaaatgac cgaccaagcg acgcccacc tgccatcacg
2401 agatttcgat tccaccgccc ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttccggga
2461 cgccggtg atgactctcc agcgcgggga tctcatgctg gatttcttcg cccaccgctg
2521 gctcgatccc ctgcgaggtt ggttcagctg ctgcctgagg ctggacgacc tgcgaggtt
2581 ctaccggcag tgcaaatccg tcggcatcca ggaaccagc agcggctatc cgcgcatcca
2641 tgccccgaa ctgcaggagt ggggaggcac gatggccgct ttggtcgacc cggacgggac
2701 gtcctgccc ctgatacaga acgaattgct tgcaggcatc tcatgagtgt gtcttcccgt
2761 tttccgctg aggtcactgc gtggatggag cgtggcgcg tgcgcccga cggcgagctg
2821 ctaccacc actcgagctg gatacttccc gtccgcccagg gggacatgcc ggcgatgctg
2881 aaggtcgcg gcattcccga tgaagaggcc ggttaccgcc tgttgacctg gtggagcggg
2941 cagggcggc cccgagcttt cgcctcggcg cggggcgtc tgctcatgga gcgcgctcc
3001 ggggcccggg accttgca ca gatagcgtgg tccggccagg acgacgaggc ttgcaggatc
3061 ctctgcgaca ccgcccgtcg tctgcacgcg ccgcggtccg gaccgcccgc cgatctccat
3121 ccgctacagg aatggttcca gccgcttttc cggttggccg ctgagcacgc ggcacttgcg
3181 cccgcccga gcgtagcggg ccaacttctg gcggcgccc gcgaggtgtg cccgctccac
3241 ggcgacctgc accacgagaa cgtgctcgac ttcggcgacc gcggctggct ggcacatgac
3301 ccgacggac tgctcggcga gcgcacctc gactatgcca acatcttcac gaatcccgat
3361 ctacgagacc ccggctgccc gcttgcgatc ctgcccggca ggctggaggc tgcactcagc
3421 attgtgggtc gcacgaccgg gtttgagccc gaaccgcttc ttcgctggat cattgcatgg

```

3481 acgggcttgt cggcagcctg gttcatcggc gacggcgacg gcgagggcga gggcgctgcg
 3541 attgatctgg ccgtaaacgc catggcacgc cggttgcttg actagcgcgg tcaccgatct
 3601 cacctggctg tcgagctagg tcaggccgtg tcgggctga tccgctggaa gtcggtgcgg
 3661 gccacacccg ccgcctcgaa gccctgcacc aggcggcat cgtggtgtgc gtggccgagg
 3721 gactatggaa ggtgcccggac gatctgcccg agcagggccg ccgctatgac gccacagctc
 3781 ttggtggcgt gacggtggag ctgaaatcgc acctgccat cgagcggcag gcccgctga
 3841 tcggtgccac ctggcttgac cagcagttga tcgacggtgg ctgggcttg ggcgacctgg
 3901 gctttagcag tgaggccaag taggcgatac agcagcgcgc ggacttcctg gccgaacagg
 3961 gactggccga gcggcgcggg cagcgcgtga tccctaccgg aatctgctcg gcagcagcgg
 4021 gctcgggaac tggcgcaggg ccgcaaggac attgccgccc ataccggcct ggagcatcgc
 4081 cccgtggccg acggccagcg cgttgcccgg gtctaccggc gccccgtcat gctcggcagc
 4141 gggcgaaatg ggatgcttga tgacgccaag gggctccagc tcgtgcggtg gaagcccatc
 4201 gaacagcggc ttggggagca gctcgcgcgc acggtgcgcg gtggcgggct gctctgggag
 4261 attggacgac agcgtgggccc ggcccctgct tcttgatcag atcttgatcc cctgcgcat
 4321 cagatccttg gcgcaagaa agccatccag tttactttgc agggcttccc aaccttccca
 4381 gagggcgccc cagctggcaa tcccggttcg cttgctgtcc ataaaaccgc ccagtctagc
 4441 tatcgccatg taagcccact gcaagctacc tgctttctct ttgcgcttg cttttccctt
 4501 gtccagatag cccagtagct gacattcctc cggggtcagc accgtttctg cggactggct
 4561 ttctacgtgt tccgcttctt ttagcagccc ttgcccctg agtgcttgcg gcagcgtgaa
 4621 gctttctctg agctgtaaca gcctgaccgc aacaaacgag aggatcgaga ccatccgctc
 4681 cagattatcc ggctcctcca tgcgttgccct ctggctcct gctccggtt tccatgcctt
 4741 atggaactcc tcgatccgccc agcagatgggt ataaatgtcg atgacgcgca aggttggggc
 4801 tagcgactcg accggttcgc cggctcagca caaccattc aacggggctc cacccttggg
 4861 cgggttaatc tccctggcca gcaccgcgtt gagcgtgata tccccctgtt ttagcgtgat
 4921 gcgcccactc cgcagctca agctgcctt gcgggctggg cgatttttac gtttaccgcg
 4981 tttatccacc acgccccttt cgggaatgct gatctgatag ccaccaact ccggttggtt
 5041 cttcagatgg tcgatcagat acaaccaga ctctacgtcc ttgctgggt gcttggagcg
 5101 caccacgaag cgctcgttat gcgccagcct gtctgcaga taagcatgaa tatcggttc
 5161 gcggtcacag accgcaatca cgttgctcat catgctgcc atgctgaacc ggctagttgc
 5221 ggccgctgcc agccatttgc cactctcctt tcatccgca tcggcaggg catccgggcg
 5281 catccaccac tctgatgca gtaatcctac ggtgcggaat gtggggcct cgagcaagag
 5341 aacggagtga acccaccatc cgcgggattt atcctgaata gagcccagct tgccaagctc
 5401 ttcggcgacc tgggtggcgat aactcaaaga ggtggtgtcc tcaatggcca gcagttcggg
 5461 aaactcctga gccaaacttga ctgtttgcac ggcgccagcc tttctgatcg cctcggcaga
 5521 aacgttggga ttgcggtaaa atcggtaagc gccttctcgc atggcttcac taccctctga
 5581 tgagatggtt attgatattc cagaatattt tgccaattgg gcggcgacgt taaccaagcg
 5641 ggcagtagcg cgaggatcac ccagcgcgcg cgaagagaac acagatttag ccagtcggc
 5701 cgcacgatga agagcagaag ttatcatgaa cgttaccatg ttaggaggtc acatggaagt
 5761 cagatcctgg aaaacgggaa aggttccggt caggacgcta cttgtgtata agagtacg

10.1.2 *alaDH-Gen*

(ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/rl/GeneDB_R/leguminosarum_Genes)

1 atgctgtctg gttgcccga ggaatcaag aatcatgaat atcgcgtcgg cctgacgccg
 61 gcttcggtgc gcgaatatgt tgcccacggc cagaggtct gggtgagac caaggcggc
 121 gtcggtatcg gcgctgatga tgccgcctat gccgcggctg gcgccaagat gcgcccctcc
 181 gccaaagata tcttcgaaaa gtgcgacatg atcgtcaagg tgaaggagcc gcagcctgcc
 241 gaatgggccc agctccgcca cggtcagctt ctctacacct atctgcatct ggcgccggat
 301 cccgaacaga ccaaaggcct catgcctcc ggcgtcaccg cgatcgcta tgagacgggtg
 361 accgacgagc gcggcgccct gccgttgctg gcgccgatgt cggaggtcgc cgtcgcctg
 421 tcgatccagg caggagcgac cgcctgcag aaggccaatg gcggcctcgg cgtcctcctc
 481 ggcgctgct ccggcgctgt gccggccaag gtcgcagtca tcggcgggcg cgtcgtcggc
 541 ctgcatgcgg ccaggatggc cgcggcctt ggcgcccgat tcagcatcct tgacaagtgc
 601 ctgccgcgct tgccgccagct cgacgatatc tttgaggcc gcatccacac ccgttattcc
 661 agcatccagg cgctggagga ggaagtctt tcggccgatc tcattatcgg gcgccgtgctg
 721 atcccgggcg ctgccgcccc gaagctcgtc accgcgaga tgctgtccgg catgaagaag
 781 ggtccgctca tcgtcgacc tgccatcgac cagggcggt gcttcgagac ctgcgcatcg
 841 acgaccatt ccgatccgac ctatgaagtc gatggcgtcg tgcatattg cgttgccaac
 901 atgcccggcg cgtgcgggt cacctcggca cagcgcgtga acaatgccac attggttcat
 961 ggcctggcgc ttgccgatcg cggcctgcgc gccatcgcg aagacaggca tctgaggaat
 1021 ggcctcaacg tccacaaggg ccgcatcacc agcaagccgg tcgccgaagc gctgggctac
 1081 gaggccttcg gcgggaaag cgtgctgaac gttagcgtaa

10.2 Daten

Die in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen basieren auf Daten, die entweder an dieser Stelle abgebildet sind oder aus Platzgründen auf der beigefügten CD vorliegen. Letzteres betrifft die Rohdaten aus Bakteroid- und Mitochondrienisolaten und aus den Aminosäurequantifizierungen.

10.2.1 Respirationsmessungen

Tab. 16: Anteile der Sauerstoff verbrauchenden Enzyme an der Atmung.

	Fix+	Fix-	Gedüngt	Null
COX	72,90	53,00	19,99	22,49
	69,73	48,76	37,09	16,86
	43,13	40,50	38,74	38,71
	44,63	54,37		23,24
Mittel	57,60	49,16	31,94	25,33
STD	13,77	5,41	8,48	8,11

	Fix+	Fix-	Gedüngt	Null
AOX	21,90	43,39	67,69	73,39
	21,15	12,74	50,74	62,18
	56,64	56,24	55,86	64,53
	59,34	50,47		72,16
Mittel	39,76	40,71	58,10	68,06
STD	18,26	16,78	7,10	4,80

	Fix+	Fix-	Gedüngt	Null
Rest	5,20	3,61	12,32	4,12
	9,12	38,50	12,17	20,96
	0,23	3,26	5,40	-3,24
	-3,97	-4,84		4,61
Mittel	2,64	10,13	9,96	6,61
STD	4,95	16,73	3,23	8,85

Tab. 17: Atmungsraten der nach ADP-Zugabe absolut und im Vergleich zu Fix+.

	State 3 Respiration	%
Fix+	56,44	100,00
Fix-	64,07	113,52
Gedüngt	35,50	62,90
Null	54,36	96,31

	State 3 Respiration	%
Fix+	19,04	100,00
Fix-	13,51	70,93
Gedüngt		0,00
Null	8,56	44,97

	State 3 Respiration	%
Fix+	55,02	100,00
Fix-	43,51	79,09
Gedüngt	14,66	26,65
Null	21,08	38,32

	State 3 Respiration	%
Fix+	34,64	100,00
Fix-	29,84	86,12
Gedüngt	15,66	45,20
Null	14,87	42,93

10.2.2 Sequenzierung

Die dargestellte Sequenz wurde durch die Kolonien-PCR einer *alaDH*- Kolonie und die anschließende Sequenzierung mit dem ATR-Primer erhalten. Die Sequenz ist Teil des codogenen Strangs und ist auf diesem in 5'-3' Richtung (also auf 3'-5' Richtung des kodierenden Strangs) abgebildet.

ATGATTGGGCGGCGACGTTAACCAAGCGGGCAGTACGGCGAGGATCACCCAGCGCCGCGAAGAGAACACAGATTTA
GCCAGTCGGCCGCACGATGAAGAGCAGAAGTTATCATGAACGTTACCATGTTAGGAGGTCACATGGAAGATCAGATC
CTGGAAAACGGGAAAGTTCCGTTTCAGGACGCTACTTGTGTATAAGAGTCAGCCTCGTGGCCGTGGGA

10.2.3 Wuchsmessungen

Tab. 18: Wuchsmessungen der 5 Pflanzenlinien. Lila: Tote Pflanzen, Gelb: Verzweigte Pflanzen, Rot:

Kontaminierte (nodulierte Pflanzen)

Tage nach Saat	14	30	35	37	42	49	54	62	70	76	80
Messdatum	26. Mrz	11. Apr	16. Apr	18. Apr	23. Apr	30. Apr	05. Mai	13. Mai	21. Mai	27. Mai	31. Mai
Linie/Nummer	Pflanzenhöhe in cm										
Fix+/1	10,0	17,5									
Fix+/2	11,0	18,5									
Fix+/3	10,0	19,0	24,0	25,0	27,5	32,0	34,0	34,0	34,0	34,0	35,0
Fix+/4	8,0	16,0	23,0	18,5	21,0	23,5	24,0	23,5	24,0	24,0	24,0
Fix+/5	5,0	16,0	23,0	22,0	25,0	29,0	30,5	31,0	31,0	31,0	35,0
Fix+/6	7,0	15,0	19,0	19,0	22,5	27,5	31,5	34,0	35,0	39,0	43,0
Fix+/7	6,0	12,0									
Fix+/8	9,0	18,5	23,0	23,0	25,0	29,0	29,0	29,0	28,0	24,0	25,0
MW	8,3	16,6	22,4	21,5	24,2	28,2	29,8	30,3	30,4	30,4	32,4
ABW	2,0	2,2	1,7	2,4	2,2	2,8	3,3	3,9	4,0	5,8	7,1
Fix-/1	9,0	16,0									
Fix-/2	9,5	18,0									
Fix-/3	10,0	19,0	20,0	19,5	19,5	19,0	19,0	19,0	19,0	20,0	24,0
Fix-/4	7,5	15,5									
Fix-/5	7,5	16,0	17,0	15,0	17,0	18,0	17,0	18,0	17,0	17,0	17,0
Fix-/6	4,5	13,5	17,0	17,5	15,0	16,0	15,0	16,0	16,0	15,0	16,0
Fix-/7	9,0	18,0	19,0	19,0	19,0	19,5	18,5	19,0	19,0	18,0	17,0
Fix-/8	8,5	17,0	18,0	18,0	18,0	18,0	18,5	19,0	19,0	17,0	17,0
MW	8,2	16,6	18,2	17,8	17,7	18,1	17,6	18,2	18,0	17,4	18,2
ABW	1,6	1,6	1,2	1,6	1,6	1,2	1,5	1,2	1,3	1,6	2,9
ADH/1	9,0	13,5	15,0	10,0	19,5	25,0	28,0	34,5	37,0	40,0	42,0
ADH/2	6,5	10,0									
ADH/3	4,5	7,5									
ADH/4	5,5	12,0	16,0	15,0	17,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
ADH/5	9,5	18,0	19,5	22,0	25,5	31,0	33,5	40,0	40,0	40,0	42,0
ADH/6	13,5	21,0	25,0	24,0	26,0	31,5	33,0	25,5	35,0	36,0	36,0
ADH/7	6,0	10,0									
ADH/8	6,5	14,0	19,0	19,0	23,0	29,0	32,0	37,0	39,0	39,0	40,0
MW	7,6	13,3	18,9	18,0	22,2	27,3	29,3	31,4	34,2	35,0	36,0
ABW	2,7	4,2	3,5	5,0	3,5	4,3	5,0	7,5	7,3	7,6	8,3
N/1	8,0	13,0	12,0	14,0	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0	12,0	12,0
N/3	8,0	12,5									
N/4	10,0	17,0	17,0	17,5	18,0	16,5					
N/5	5,0	11,5									
N/6	7,5	8,0									
N/7	7,5	17,0	17,0	17,0	17,0	19,0	18,0	19,0	19,0	18,0	18,0
N/8	10,0	19,0	20,0	19,5	21,0	22,0	21,0	22,0	23,0	23,0	22,0
MW	8,0	14,0	16,5	17,0	17,3	17,6	17,3	18,0	18,3	17,7	17,3
ABW	1,6	3,6	2,9	2,0	2,9	3,3	3,3	3,7	4,1	4,5	4,1
N/2	6,5	13,5	13,0	13,0	13,5	14,0	14,0	14,0	17,0	25,0	29,0
O/1	9,5	6,0	18,0	17,0	17,0	19,0	17,0	18,0	18,0	18,0	19,0

0/2	3,5	17,0									
0/3	7,5	11,0									
0/4	10,5	21,0	22,5	23,0	22,0	22,0	22,0	24,0	26,0	22,0	17,0
0/5	7,0	15,0	16,0	15,5	16,5	17,0	17,0	17,0	18,0	17,0	17,0
0/6	8,0	15,5	15,0	15,0	17,5	15,0	14,5	16,0	18,0	25,0	16,0
0/8	6,0	12,0									
MW	7,4	13,9	17,9	17,6	18,3	18,3	17,6	18,8	20,0	20,5	17,3
ABW	2,1	4,4	2,9	3,2	2,2	2,6	2,7	3,1	3,5	3,2	1,1
0/7	9,0	16,5	17,0	17,0	19,5	21,0	22,0	25,5	24,0	24,0	26,0

10.2.4 Aktivitätstests

10.2.4.1 AlaAT

Tab. 19: Aktivität der AlaAT von isolierten Mitochondrien. Die Werte sind die Abnahmeraten von NADH im LDH-gekoppelten Assay in $\mu\text{mol} \times (\text{mg} \times \text{min})^{-1}$

Replikant	Fix+	Fix-	AlaDH
1	-3,7533507	-0,7770211	-4,132144
2	-1,2334992	-0,3711259	-1,1922583
3	-0,4218974	-0,2569993	-0,3312167
4	-0,331927	-0,1686848	-0,2211817
5	-0,2225019	-0,1067578	-0,2436126

10.2.4.2 AlaDH

Tab. 20: Aktivität der AlaDH von isolierten Bakteroiden. Die Werte sind die Abnahmeraten von NADH in $\mu\text{mol} \times (\text{mg} \times \text{min})^{-1}$

Replikant	Fix+	Fix-	AlaDH
1	-0,0147	-0,0065	-0,0079
2	-0,0123	0,0001	-0,0024
3	-0,0207	-0,0069	-0,0035
4	-0,0121	-0,0015	-0,0066
5	-0,0220	-0,0132	-0,0122
6	-0,0140	-0,0093	-0,0012
7	-0,0064	-0,0043	0,0011
8	-0,0051	-0,0054	-0,0050

10.2.5 Vergleich des Pflanzenwuchses in Langtag- und Kurztagbedingungen

Tab. 21: Wuchsmessungen von Pflanzen verschiedener Altersstufen (in cm).

7 Wochen	Fix+ Kurztag	Fix+ Langtag	alaDH- Kurztag	alaDH- Langtag
	29	42	40	29
	26	39	39	42
	28	50	34	39
	29	36	38	36
	35	38		26
		35		24
		39		32
		34		30
		36		34
Mittel	29,4	38,5	37,75	32,6
STD	3,006659276	4,432832052	2,277608395	5,314132102
6 Wochen	Fix+ Kurztag	Fix+ Langtag	alaDH- Kurztag	alaDH- Langtag
	27	38	22	20
		41	29	23
	32	37	25	21
	28	32	21	21
	37	29	20	24
	30	35	30	30
	36	36		33
	28	31		22
		36		24
			24	
Mittel	31,14285714	35	24,5	24,2
STD	3,719776162	3,527668415	3,862210075	3,944616585
5 Wochen	Fix+ Kurztag	Fix+ Langtag	alaDH- Kurztag	alaDH- Langtag
	29	25	26	20
	24	26	41	14
	28	30	33	22
	23	30	28	27
	23	27	28	25
	21	24	30	32
	27	25	36	22
	29	24		20
	36			29
36			21	
Mittel	27,6	26,375	31,71428571	23,2
STD	4,943682838	2,287875652	4,919764388	4,915282291

10.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

10.3.1 Abbildungen

Abbildung 1: Stickstoffaufnahme und Assimilation in Pflanzenwurzeln (Miller <i>et al.</i> , 2004).....	12
Abbildung 2: Aufbau des indetermierten Knöllchens, in <i>Vicia faba</i>	15
Abbildung 3: Iodfärbung von Knöllchen einer 4 Wochen alten Pflanze (links) und einer 5 Wochen alten Pflanze (rechts). Kuenzler et al., nicht publiziert.	15
Abbildung 4: Zentraler Metabolismus im Cytosol und Bakteroiden in einer infizierten Zelle.....	18
Abbildung 5: Suberinlamelle in einem Knöllchen (Querschnitt).	19
Abbildung 6: Beteiligung der Mitochondrien an der Stickstoffassimilation in SNF-Zellen.	22
Abbildung 7: Experimentalaufbau.	25
Abbildung 8: Bindungsstellen der Primer für PCR und Sequenzierung zum Nachweis der Tn5 Insertion im <i>alaDH</i> -Gen.	27
Abbildung 9: Verlauf des Gradienten für Eluierung der Aminosäuren.	39
Abbildung 10: Fokussierung und Reinigung von mitochondrialen Proteinen in Coomassie-gefärbten Polyacrylamid-Gelen.	42
Abbildung 11: Ursprünge der identifizierten Proteine in den 20 Mitochondrienisolaten.....	43
Abbildung 12: Intrazelluläre Lokalisierungen der 2833 Proteine in den 16 verbliebenen Replikaten.	45
Abbildung 13: Intrazelluläre Lokalisierung von 496 Konsensusproteinen, die in allen 16 Proben präsent sind.....	46
Abbildung 14: Qualitative Relationen der vier Experimentallinien zueinander durch PCA Analyse (Perseus Software).	47
Abbildung 15: Qualitative Auswertung der paarweisen Vergleiche mitochondrialer Proteome.	47
Abbildung 16: Proteine mit den ausgeprägtesten Abundanzänderungen zwischen <i>Fix+</i> und <i>Fix-</i> Mitochondrien.	49
Abbildung 17: Die am stärksten veränderten Proteine in <i>Fix+</i> Mitochondrien gegenüber Mitochondrien aus <i>Gedüngt</i> Wurzeln.....	50
Abbildung 18: Proteine mit den ausgeprägtesten Abundanzänderungen zwischen <i>Fix-</i> und <i>Null</i> Mitochondrien.	51
Abbildung 19: Paarweise Vergleiche der Proteine des Aminosäuremetabolismus.	52
Abbildung 20: Paarweise Vergleiche der mit dem TCA-Zyklus assoziierten Proteine.....	53
Abbildung 21: Paarweise Vergleiche der Proteine der OXPHOS.	54
Abbildung 22: Abundanzänderungen des zentralen Mitochondrienmetabolismus von <i>Fix+</i> im Vergleich mit <i>Fix-</i>	55
Abbildung 23: Abundanzänderungen des zentralen Mitochondrienmetabolismus von <i>Fix+</i> im Vergleich mit <i>Gedüngt</i>	57

Abbildung 24: Abundanzänderungen des zentralen Mitochondrienmetabolismus von <i>Fix-</i> im Vergleich mit <i>Null</i>	58
Abbildung 25: Respiration in isolierten Mitochondrien aus Knöllchen und Wurzeln.....	59
Abbildung 26: Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele der Colony PCR-Produkte aus <i>Fix-/Fix-/alaDH-</i> Kolonien.	62
Abbildung 27: Sequenzierergebnisse des GTL/GTR Amplifikats von <i>alaDH-</i> Kolonien und dessen Abgleich mit den Sequenzen des <i>alaDH-</i> Gens (A) und des Transposons (B).....	62
Abbildung 28: Pflanzenwuchs der Experimentallinien, inklusive der neu aufgenommenen <i>alaDH-</i> Mutante.....	63
Abbildung 29: Photosyntheserate und stomatale Leitfähigkeit der fünf Linien und nähere Untersuchung der <i>Gedüngt</i> Pflanzen in Bezug zur Düngungsrate.	64
Abbildung 30: Querschnitte der drei Knöllchenarten.	65
Abbildung 31: Nitrogenaseabundanz und -aktivität in Knöllchen und Wurzeln.....	66
Abbildung 32: Aminosäurekonzentrationen in Wurzeln und Knöllchen.....	69
Abbildung 33: Am Alaninmetabolismus beteiligte, untersuchte Enzyme in isolierten Mitochondrien (AlaAT) und Bakteroiden (AlaDH).....	71
Abbildung 34: Reinheit der isolierten Bakterioide.	73
Abbildung 35: PCA Analyse mittels Perseus Software.	74
Abbildung 36: Pflanzliche Proteine in Bakteroid Fraktionen.....	74
Abbildung 37: Cytosolische Enzyme, die in mindestens 8 der verbliebenen zwölf Bakteroidisolate gefunden wurden.....	76
Abbildung 38: Die am stärksten veränderten Proteine in <i>Fix-/alaDH-</i> Bakteroiden.....	77
Abbildung 39: Vergleiche des zentralen Bakteroidmetabolismus der <i>Fix-/alaDH-</i> Mutanten mit <i>Fix+</i> (n=5 (<i>Fix+</i>), 4 (<i>Fix-</i>) und 3 (<i>alaDH-</i>))......	79
Abbildung 40: Die Änderungen des zentralen Metabolismus in <i>Fix-</i> (A) und <i>alaDH-</i> (B) Bakteroiden in der Übersicht.....	80
Abbildung 41: Markierte Aminosäuren in Knöllchen nach $^{15}\text{N}_2$ Inkubation im geschlossenen System.	83
Abbildung 42: Wuchsvergleich von <i>Fix+</i> und <i>alaDH-</i> Pflanzen unter Langtag (16h) und Kurztag (8h) Bedingungen nach 5, 6 und 7 Wochen (n=10).....	85
Abbildung 43: Die Transaminierung von GABA ist in alternativer Weg der Alaninproduktion im Bakteroiden.....	89
Abbildung 44: Mitochondrien sind in der Sauerstoff reicheren Peripherie der infizierten Knöllchenzelle lokalisiert.....	98
Abbildung 45: Alaninkonzentration und AlaAT-Aktivität in Wurzeln und Knöllchen an Sojapflanzen vor Überschwemmung (K), während 3- tägiger Überschwemmung (W) und drei Tage nach der Überschwemmung (R) (verändert aus Rocha et al., 2010).....	100

10.3.2 Tabellen

Tab. 1: Verwendete Antikörper.

Tab. 2: Komposition der Nährlösungen mit und ohne stickstoffhaltige Bestandteile.

Tab. 3: Anzuchtmedium für Rhizobien.

Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete Primer.

Tab. 5: Agar Medium für das Anziehen von Rhizobien Kolonien.

Tab. 6: PCR Mix.

Tab. 7: Ablauf der PCR.

Tab. 8 TAE-Puffer für die DNA-Gelelektrophorese.

Tab. 9: Puffer für die Organellenisolation.

Tab. 10: Puffer und Lösungen für das Erstellen Fokussierungsgele und Probenpuffer für die Massenspektrometrie.

Tab. 11: Einstellungen der MaxQuant Software für die Analyse der gemessenen Mitochondrien und Bakteroid Peptidspektren.

Tab. 12: Puffer und Lösungen für den Transfer von Proteinen und den Nachweis des Nitrogenaseenzym mittels Peroxidase gekoppelten Antikörpern.

Tab. 13: Reaktionsansatz für den AlaDH-Aktivitätstest.

Tab. 14: Reaktionsansatz für den AlaAT-Aktivitätstest.

Tab. 15: Respirationspuffer zur Messung der Atmung isolierter Mitochondrien.

Tab. 16: Anteile der Sauerstoff verbrauchenden Enzyme an der Atmung.

Tab. 17: Atmungsraten der nach ADP-Zugabe absolut und im Vergleich zu Fix+.

Tab. 18: Wachstumsmessungen der 5 Pflanzenlinien.

Tab. 19: Aktivität der AlaAT von isolierten Mitochondrien.

Tab. 20: Aktivität der AlaDH von isolierten Bakteroiden.

Tab. 21: Wachstumsmessungen von Pflanzen verschiedener Altersstufen (in cm).

10.4 Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name: Patrick Künzler
 Geburtsdatum: 05.05.1991
 Geburtsort: Hameln, Deutschland
 Nationalität: Deutsch

Akademische Laufbahn

Seit November 2016 Promotionsstudent
 Leibniz Universität Hannover
 Institut für Pflanzengenetik
 Abteilung Pflanzenproteomik
 Bei Prof. Dr. rer. nat. Hans-Peter Braun

10/2014 – 10/2016 Master of Science „Pflanzenbiotechnologie“ Note: 1,7
 Leibniz Universität Hannover
 Msc. Arbeit: *„Sulfydrierung als posttranslationale Modifikation in Arabidopsis thaliana“*

10/2011 – 09/2014 Bachelor of Science „Biowissenschaften“ Note: 1,7
 Westfälische Wilhelms Universität Münster
 Bsc. Arbeit: *„Investigating the interactions of FEZ proteins with PINK1 and NUA1/2“*

Sonstiges:

2010 – 2011 Zivildienst

Schulische Bildung

2010 Abitur am Viktoria Luise Gymnasium Hameln Note: 1,5

2007 – 2010 Oberstufe des Viktoria Luise Gymnasiums Hameln

2003 – 2007 Sekundarstufe I am Viktoria Luise Gymnasium Hameln

2001 – 2003 Orientierungsstufe

1997 – 2001 Grundschule Hameln – Rohrsen

10.5 Liste wissenschaftlicher Publikationen

- Markus Niehaus¹, Henryk Straube¹, **Patrick Künzler**², Nils Rugen², Jan Hegermann³, Patrick Giavalisco⁴, Holger Eubel², Claus-Peter Witte¹, Marco Herde¹

Rapid affinity purification of tagged plant mitochondria (Mito-AP) for metabolome and proteome analyses

In *Plant Physiology*

Status: Publiziert

- Kerstin Schäfer¹, **Patrick Künzler**², Andreas Klingl¹, Holger Eubel², Chris Carrie^{1*}

The plant mitochondrial Tat pathway is essential for complex III biogenesis

In *Current Biology*

Status: Publiziert

- Lavinia Neubert, Paul Borchert, Helge Stark, Anne Hoefler, Jens Vogel-Claussen, Gregor Warnecke, Holger Eubel, **Patrick Künzler**, Hans-Heinrich Kreipe, Marius M Hoeper, Mark Kuehnel, Danny Jonigk *

Molecular Profiling of Vascular Remodeling in Chronic Pulmonary Disease

In *The American Journal of Pathology*

Status: Publiziert

10.6 Konferenzbeiträge

Vorträge

- **Meeting der Forschungsinitiative “Plant Mitochondria in New Light“**
Düsseldorf, 25-26.10.2018
Titel: “Mitochondrial Contribution to Symbiotic Nitrogen Fixation“

- **5. Symposium der “Research Training Group” 1798 “Plant-Soil Interface“**
Hannover, 25-27.2019
Titel: “Nitrogen Metabolism in *Vicia faba* root Nodules“

Poster

- **11. “International Conference for Plant Mitochondrial Biology” (ICPMB)**
Ein Gedi (Israel), 10.-15.03.2019
Titel: “The Mitochondrial Contribution to Symbiotic Nitrogen Fixation“
Patrick Künzler, Holger Eubel, Hans-Peter Braun

- **13. “European Nitrogen Fixation Conference“ (ENFC)**
Stockholm (Schweden), 18.-21.08.2018
Titel: “Mitochondrial Metabolism in Symbiotic Nitrogen Fixation“
Patrick Künzler, Holger Eubel, Hans-Peter Braun

- **4. Symposion der “Research Training Group” 1798 “Plant-Soil Interface“**
Bad Salzdetfurth, 27.-29.09.2017
Titel: “Symbiotic Nitrogen Fixation: Respiration enzymes under bacterial competition“
Patrick Künzler, Holger Eubel, Hans-Peter Braun

10.7 Danksagungen

Lieber Hans-Peter, ich bedanke mich dafür, dass ich sowohl meine Masterarbeit als auch die Promotion in deiner überragenden Abteilung absolvieren durfte! Die Atmosphäre ermöglichte sowohl produktives Arbeiten als auch das Knüpfen neuer Freundschaften in einem hilfsbereiten, funktionierenden Forschungsalltag. Du persönlich hast mir oft neue Denkanstöße gegeben und standst mir oft zur Seite.

Lieber Holger, dein Einsatz für unser Projekt lässt sich nicht überschätzen. Die unzähligen Tipps und Kniffe in praktischen Laborfragen haben mir oft das „Try and Error“ erspart. Unsere Gespräche, vor allem außerhalb deiner regulären „Sprechstunden“, waren oft der Kompass meiner Arbeit in Momenten der Orientierungslosigkeit und förderten das Fragen der richtigen Fragen. Ich wünsche dir viel Erfolg in der Zukunft, v. A. bei deinem „2-rädrigem Projekt“ in deiner wohlverdienten Pause!

Liebe Beate, ich konnte mich glücklich schätzen, ein etabliertes, funktionierendes Projekt übernehmen zu dürfen, welches es mir ermöglichte, nach kurzer Zeit Ergebnisse zu erhalten. Für die Arbeit hierfür und die perfekte Einarbeitung bedanke ich mich und wünsche dir weiterhin alles Gute in Berlin!

Björn und Nils, immer wenn man denkt, es kann nicht mehr schlimmer kommen...es war eine super Zeit mit Euch! Ich danke Euch für die vielen neuen Hobbies und die tatkräftige Unterstützung in fachlichen Fragen. Es gab in den letzten Jahren zu viele Highlights, um sie hier alle aufzuzählen und ich denke gerne daran zurück. Vor allem freue ich mich aber darauf, in Zukunft neue Anekdoten dieser Liste hinzuzufügen! 007 for life!

Lieber Michael, du hast mir oft im Excel Dschungel den Weg geebnet und mir dadurch viel Arbeit erspart. Außerdem danke ich Dir für die vielen IT-Tipps und die kurzweiligen Mittagspausen!

Christa, Dagmar, Danke für die Hilfe bei einigen Experimenten und die gelegentliche „Nachsicht“ ☺

Liebe Marianne, ich danke Dir für das Bearbeiten der vielen vielen MS-Proben und für die tatkräftige Unterstützung beim Picken der Knöllchen.

Und wo wir gerade davon sprechen.....ich bedanke mich bei Björn, Nils, Lucie, Lucas, David, Colin, Katharina, Elise, Maria, Gabi, Melissa, Jenny (Holger auch!) (habe ich wen vergessen?!) für die insgesamt

1850207,5 gepickten Knöllchen! (Ja, ich habe gezählt)

Liebe Mama, mein Dank geht weit über die Zeit der Doktorarbeit hinaus. Deine Bedeutung für meinen Werdegang lässt sich nicht in Worte fassen. Daher nur soviel: Nicht möglich ohne Dich.

Bentje, ich bin dir unendlich dankbar für die Unterstützung, gerade in den letzten Monaten. Du bist mein größtes Glück und ich blicke mit Freude auf das gemeinsame Weiterschreiben unserer Geschichte.